



**HAL**  
open science

# Mécanismes d'ionisation MALDI en mode négatif à travers l'étude de polyoxométallates

Jean Boulicault

► **To cite this version:**

Jean Boulicault. Mécanismes d'ionisation MALDI en mode négatif à travers l'étude de polyoxométallates. Génie chimique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066506 . tel-01307139

**HAL Id: tel-01307139**

**<https://theses.hal.science/tel-01307139>**

Submitted on 26 Apr 2016

**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 Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale de chimie moléculaire

*IPCM / CSOB*

**Mécanismes d'ionisation MALDI en mode négatif à travers l'étude de polyoxométallates**

Par Jean Boulicault

Thèse de doctorat de Chimie

Dirigée par Sandra Alves et Richard B. Cole

Présentée et soutenue publiquement le 9 novembre 2015

Devant un jury composé de :

Charles Laurence, Professeure	Rapporteur
Buchmann William, Maître de conférences	Rapporteur
Hasenknopf Bernold, Professeur	Président du Jury
Bridoux Maxime, Docteur	Examineur
Alves Sandra, Maître de conférences	Encadrante de thèse
Cole Richard B., Professeur	Directeur de thèse





## Remerciements

Je souhaite exprimer ma reconnaissance au Professeur Richard Cole pour m'avoir accepté dans son équipe et avoir accepté d'être le directeur de mon projet doctoral. J'adresse mes sincères remerciements à la maître de conférence Sandra Alvès qui m'a suivi et aidé tout au long de ce projet.

J'adresse mes vifs remerciements à la Professeure Laurence Charles et au Maître de conférences William Buchmann pour avoir accepté de juger mon travail, ainsi qu'au Professeur Berni Hasenknopf et au Docteur Maxime Bridoux pour avoir accepté de prendre part à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier mes collègues les plus proches, Adrián Schwaezenberg, Quentin Dumont, Mariana Bárcenas, Sergey Sladkevich, Beninia Habchi et Baiyi Xue avec qui j'ai eu un franc plaisir à partager le même bureau et sur qui j'ai pu compter à maintes occasions. Je souhaite remercier chaleureusement mes collègues de travail, Philippe Colomby, Denis Lesage, Héloïse Dossman, Claude Charvy, Maria Luc, David Gatineau, Bérengère Argence et Jean-Claude Tabet avec qui j'ai eu du plaisir à partager ces trois années. J'adresse aussi mes remerciements à Amina Benchohra et Karine Lin que j'ai eu le plaisir d'encadrer en stage et avec qui il a été agréable de travailler. Je tiens à remercier les membres de l'équipe E-POM, en particulier Vincent Jallet, qui m'ont conseillé et fourni les produits analysés.

J'adresse mes remerciements à toute l'équipe enseignante du LC351, en particulier Emmanuelle Sachon mais aussi de nombreux autres collègues qui partageaient les mêmes locaux que notre équipe, avec qui j'ai appris à dispenser des cours.

Je souhaite remercier les membres de l'association Doc'Up, en particulier Clément Courvoisier, Elise Benjenec, Matthieu Siebentritt et Guillaume Binard, avec qui j'ai pu réaliser des projets autour du doctorat toujours très enrichissants. Je tiens aussi à remercier les responsables institutionnels qui m'ont accepté, parfois invité, à m'investir dans la vie de l'université ce qui m'a beaucoup appris.

Enfin je tiens à remercier beaucoup ma femme et ma mère qui m'ont aidé jusqu'à la dernière minute, mais aussi ma famille qui, dans ce projet comme pour tous les autres, m'a beaucoup soutenu, aidé et m'a permis de passer ces trois belles années à Paris.

## Sommaire

Remerciements .....	2
Introduction .....	6
1. L'ionisation en mode négatif à travers l'utilisation du MALDI .....	10
1.1. MALDI, définition, historique de la découverte et description pratique.....	11
1.2. Développement du MALDI.....	12
1.3. Particularités liées au couplage MALDI-TOF.....	16
1.4. Modèles explicatifs des procédés de désorption/ionisation.....	17
1.4.1. Procédé de la désorption et observation de l'ionisation.....	17
1.4.2. Les différents modèles expliquant l'ionisation .....	21
1.5. Le mode négatif en MALDI : un inconnu à développer.....	23
2. Cadre matériel et expérimental.....	25
2.1. Les spectromètres de masses utilisés et leurs logiciels.....	25
2.1.1. L'appareil Autoflex III Smartbeam, et son logiciel FlexAnalysis .....	25
2.1.2. L'appareil LTQ-Orbitrap XL-ETD, Thermo Scientific et son logiciel Xcalibur	31
2.1.3. L'appareil Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer .....	32
2.1.4. Procédure d'étalonnage du spectromètre de masse Autoflex III.....	33
2.2. Développement de la technique MALDI pour l'analyse de POMs.....	37
2.2.1. Présentation des polyoxométallates (POMs).....	37
2.2.2. Choix des matrices .....	44
2.2.3. Ajout de tensioactifs, de sels et/ou de co-matrices.....	50
2.2.4. Mise au point des solutions et de la méthode de dépôt .....	53
2.2.5. Conditions d'analyses, définition de la valeur seuil, réglage de la puissance laser	et vocabulaire associé.....
2.2.5.1. Définition de la valeur seuil.....	56
2.2.5.2. Réglage de la puissance laser.....	56
2.2.5.3. Vocabulaire associé.....	56
2.3. Terminologie particulière liée à l'analyse des POMs par MALDI .....	59
2.3.1. Forme, résolution et dénomination des pics.....	60
2.3.2. Taux de fragmentation.....	64
3. Résultats et discussion.....	67
3.1. Comparaison des aptitudes des matrices à l'ionisation de polyanions et variation de	la méthode d'échantillon .....
3.1.1. Classification relative des matrices .....	67
3.1.2. Influence des supports sur la qualité des spectres .....	68
3.1.3. Applications de la méthode de préparation d'échantillon optimisée et de la	matrice CNA .....
3.1.4. Utilisation du POM en présence d'autres analytes.....	85
3.2. Processus d'ionisation par cationisation et/ou capture électronique.....	92
3.2.1. Cationisation de l'espèce moléculaire intacte et des ions fragments .....	93
3.2.2. Capture électronique et formation d'ions inattendus .....	104
3.2.3. Rendement en fonction de la nature des cations .....	110
3.3. Etude des fragmentations des polyoxométallates.....	112
3.3.1. Fragmentation en source lors du procédé MALDI en condition ISD .....	112
3.3.2. Fragmentation MS/MS sur différents appareils .....	117
3.3.3. Origine de la fragmentation en source lors du MALDI .....	123
4. Conclusion.....	128
Annexes – niveau 1 .....	136
Annexe 1 : Source ESI .....	136
Annexe 2 : Détermination de la composition des ions.....	137
Annexe 3 : procédure de nettoyage des plaques de dépôt MALDI.....	138

Annexe - projet parallèle mené au cours du doctorat.....	140
Analyse d'échantillons activant les cellules MAIT.....	140
Table des abréviations.....	150
Bibliographie.....	151
Table des Figures.....	161
Table des Tableaux.....	165
Résumé / Abstract	



## Introduction

La spectrométrie de masse tient un rôle très important dans le monde de l'analyse. On retrouve des spectromètres de masse embarqués sur les robots spatiaux pour l'analyse de minéraux ou de petits composés organiques. Chaque laboratoire de chimie, qu'il soit spécialisé dans la synthèse de petites molécules ou de matériaux, organiques comme minéraux, en utilise différentes géométries. Le monde de la biologie, que ce soit dans les hôpitaux pour les analyses de routines ou pour la recherche, utilise ce type d'instrument. Bien entendu la plupart des structures ayant pour objectif le contrôle trouve également une utilité à ces appareils, que ce soit dans le domaine de la surveillance des facteurs environnementaux, de l'agroalimentaire, de l'industrie alimentaire, pharmaceutique ou des produits pétroliers.

Les domaines d'application sont par ailleurs, en pleine expansion et la spectrométrie de masse est encore amenée à grandement se développer notamment dans le domaine de l'analyse de très gros ensembles de molécules (ADN par exemple) et de l'imagerie.

La première étape du développement de techniques en spectrométrie de masse passe par le développement des sources d'ionisation. En effet, se basant sur l'attribution d'une masse aux ions étudiés, la spectrométrie de masse requiert, pour tout échantillon à analyser, de produire des ions représentatifs de sa constitution.

Toutefois, bien qu'étant développée depuis plus de 25 ans, on peut encore véritablement dire qu'un expert en analyse par spectrométrie de masse utilisant la source d'ionisation MALDI n'aborde pas cette technique par une approche analytique basée sur des connaissances établies mais plutôt sur des règles issues de ses expériences<sup>[1]</sup> et accumulées lors des observations phénoménologiques rencontrées. Ainsi, le développement de la technique d'ionisation par MALDI s'est toujours fait de manière empirique et les processus fondamentaux de sa capacité à produire des ions ne sont pas encore totalement connus. Les recherches sont pourtant actives dans ce domaine car la compréhension des phénomènes qui les fondent permettra d'accélérer le développement de la technique autorisant ainsi l'analyse plus aisée de toutes sortes de composés.

Malgré les nombreuses études consacrées à la compréhension mécanistique de ce phénomène d'ionisation, peu de projets de recherche sont consacrés à l'analyse en mode ion négatif, c'est-à-dire à la compréhension de la formation des anions. En effet, tout comme les

applications du MALDI, cette technique d'ionisation a été développée de manière importante en mode ion positif et négligeant les phénomènes d'ionisation issus du mode négatif sur lesquels nous nous concentrerons dans cette thèse.

Le travail effectué a donc visé à développer la compréhension de l'ionisation en mode négatif pour comparer nos résultats aux modèles proposés en mode positif. Pour ce faire, nous nous sommes servis d'analytes particuliers, à savoir des polyoxométallates. Ces composés sont des polyanions, habituellement analysés avec succès en spectrométrie de masse par le biais d'une source électrospray. Ces composés sont synthétisés par l'équipe E-POM qui fait partie de notre laboratoire (IPCM) et avec laquelle nous avons de multiples interactions. Les composés que cette équipe synthétise, sont régulièrement analysés sur nos appareils utilisant la source électrospray, ce qui nous a permis d'avoir une base de référence pour aborder nos recherches.

Le premier chapitre de manuscrit offre un compte rendu des connaissances acquises sur la technique d'ionisation MALDI. Une présentation de la découverte et du développement de cette technique qui participa pour beaucoup à l'essor de la spectrométrie de masse depuis la fin des années 1980 amorcera la présentation. On continuera en donnant des précisions sur la particularité du couplage très courant de la source d'ionisation MALDI avec un analyseur à temps de vol. Une présentation des études fondamentales sur les processus de désorption/ionisation qui surviennent au cours du MALDI sera ensuite détaillée pour enfin terminer par un rappel des techniques d'ionisation déjà analysées en mode ion négatif.

Le second chapitre fournira un aperçu des appareils et des produits utilisés (et notamment des polyoxométallates) au cours de ce travail. Nous présenterons ensuite la méthode d'analyse des polyoxométallates à travers la description progressive et systématique des essais préliminaires qui ont permis l'analyse de nos composés. Seront également décrits les notions spécifiques à l'utilisation de la technique MALDI en spectrométrie de masse, les outils et les calculs utilisés pour nos études.

Le troisième chapitre présentera les résultats obtenus associés aux interprétations des phénomènes observés survenant lors du processus d'ionisation par MALDI. Seront présentés, au sein de deux premières sous sections, les résultats obtenus en fonction de la préparation d'échantillon et des conditions expérimentales utilisées. Sur cette base, il sera possible d'établir des classements concernant à la fois les matrices utilisées et les sels ajoutés vis-à-vis leur capacité à permettre l'ionisation de nos analytes. Enfin, la comparaison des résultats obtenus

sur divers appareils et par plusieurs méthodes d'analyse et des expériences de fragmentation des c polyoxométallates sera abordée.

La conclusion de ce travail portera sur l'interprétation sur les résultats présentés dans le chapitre précédent, notamment dans le but de proposer un mécanisme de formation des ions en mode négatif à la lumière des observations effectuées dans l'analyse des polyoxométallates.

*Ce travail doctoral a été réalisé au sein de l'équipe de Chimie Structurale Organique et Biologique (CSOB), de l'Institut Parisien de Chimie Moléculaire (IPCM), grâce à un financement du Ministère de l'enseignement et de la recherche, attribué par l'école doctorale de chimie moléculaire de Paris Centre (ED406).*



## 1. L'ionisation en mode négatif à travers l'utilisation du MALDI

Ce premier chapitre est dédié à la compilation des connaissances nécessaires à l'appréhension de notre étude. Pour ce faire, une présentation de la technique d'ionisation MALDI est réalisée sans distinction de polarité, car la plupart des études, surtout lorsqu'elles visent à déterminer les mécanismes, sont rarement menées en mode ion négatif. Cette section inclut les observations et interprétations relevées dans la littérature sur le phénomène de désorption et présente les modèles principaux permettant de rationaliser l'étape d'ionisation. Nous concluons par une brève esquisse de la situation en mode négatif, en présentant les rares études antérieures acquises dans cette polarité sous l'angle de l'explication de ses mécanismes.

La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI pour « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization ») est une technique douce de désorption/ionisation. Elle permet le passage en phase gazeuse de molécules sous formes d'ions intacts et consiste à isoler des molécules chargées en phase gazeuse. Cette caractéristique n'est pas facile à observer puisque les molécules tendent toujours à être neutres lorsqu'elles sont en phase gazeuse.

Cette technique est largement utilisée depuis plus de vingt ans et est désormais la plus répandue pour l'analyse des molécules de haut poids moléculaire. La simplicité de préparation des échantillons alliée à la facilité d'utilisation de l'instrument MALDI-TOF permet aux chimistes et biologistes, même quand ils ne sont pas spécialistes du domaine analytique ni de l'instrumentation, de s'en servir aisément. Toutefois, la complexité des phénomènes régissant l'ionisation en fait une technique peu adaptée pour l'analyse de composés nouveaux. Les usagers l'utilisent donc préférentiellement en suivant des méthodes de préparation d'échantillon déjà approuvées, plutôt qu'en tentant des méthodes d'analyse dont l'efficacité n'a pas déjà été prouvée par d'autres études. Le développement du mélange d'échantillon nécessitant de véritables recherches systématiques, la préparation demande toujours une approche empirique. Il s'avère difficile à ce stade d'évaluer dans quelle mesure la préparation de l'échantillon joue sur le spectre de masse obtenu, ni pourquoi une préparation reconnue très efficace pour l'analyse d'un composé peut être inapte à produire un résultat dans d'autres cas.

Pour répondre à ces interrogations, la communauté scientifique s'attache depuis les premières études d'ionisation à mieux appréhender les mécanismes impliqués dans la technique MALDI. Ce travail se place dans la même lignée et apporte une contribution dans le champ de l'ionisation en mode ion négatif (anionique), largement moins étudiée.

## 1.1. MALDI, définition, historique de la découverte et description pratique

La technique MALDI a été présentée à la communauté internationale en 1987-88 par deux groupes distincts de chercheurs qui proposaient d'étendre le domaine de la Désorption laser (LDI) en ionisant et isolant un analyte dilué dans un mélange déposé sur une surface grâce à une impulsion de rayon lumineux, une impulsion laser.

Le groupe de Tanaka et ses collaborateurs brevetait en 1985<sup>[2]</sup>, présentait en 1987 lors d'une conférence, puis publiait en 1988<sup>[3]</sup>, une préparation d'échantillon qui permettait d'ioniser une protéine et un polymère synthétique (PEG) de haut poids moléculaire. Le principe consistait à mélanger les analytes avec des particules de cobalt dans une solution de glycérol, par analogie avec le mode FAB. La poudre de cobalt servait à absorber la lumière du laser permettant de chauffer la goutte de glycérol localement et aidait à désorber sous forme d'ions intacts, hors de la suspension, les molécules désirées. C'est pour ces travaux, considérés comme précurseurs du mode MALDI, que Tanaka reçut le Prix Nobel de chimie en 2002.

Un principe similaire avait été révélé en 1987<sup>[4]</sup> par Karas et ses collaborateurs. Leurs expériences portaient sur l'utilisation de petites molécules organiques solides en guise de molécules absorbantes de la longueur d'onde du laser. Ici, les petites molécules organiques étaient un moyen de parvenir à la désorption et l'ionisation des analytes de hauts poids moléculaires. La grande quantité de ces molécules permettant l'ionisation fit qu'on appela ces composés « Matrice ». Les molécules analysées étaient des polysaccharides et des peptides de bien plus petite tailles que le polyéthylène glycol ionisé par Tanaka, mais toujours imposante pour l'époque. C'est la technique développée par Karas<sup>[4]</sup> et ses collaborateurs qui a été largement développée pour l'application à une multitude de composés et qu'on appelle MALDI aujourd'hui.

Depuis cette découverte, les analyses par MALDI sont toutes basées sur ce principe : disperser les molécules à analyser dans un grand nombre de molécules (la matrice) qui absorbent la longueur d'onde d'un laser. Le laser vient illuminer l'échantillon par impulsion (on parle de « tirs laser qui irradient »<sup>[5]</sup>) et provoque la désorption du mélange échantillon, qui est en général en phase solide. Le phénomène de désorption permet d'entraîner les molécules depuis la phase solide (les cristaux) vers la phase gazeuse (vers le vide). Les phénomènes d'ionisation surviennent tout au long de ces processus. Les ions produits, parmi lesquels se

trouvent ceux des espèces à analyser (les analytes), sont alors dirigés vers l'analyseur qui va permettre d'attribuer un rapport masse sur charge à chaque ion.

La première étape consiste à préparer l'échantillon permettant le mélange de la matrice et de l'analyte. Il existe aujourd'hui un nombre énorme de matrices décrites, Il reste néanmoins toujours délicat de trouver la bonne matrice pour une analyse donnée. En effet aucune prédiction quant au choix de la matrice pour un analyte inconnu ne peut être formellement réalisée<sup>[6]</sup>. Ce mélange se réalise en mettant une grande quantité de matrice avec peu du composé à analyser (environ 100 à 10000 fois plus de matrice que d'analyte)<sup>[5]</sup>. Il est possible d'ajouter toutes sortes de produits dont l'objectif est d'améliorer l'ionisation des molécules visées (voir partie 2.2.3). La plupart du temps ce mélange se fait dans un solvant qui a pour but un mélange uniforme des composés. Une goutte du mélange formé est alors prélevée et déposée sur une plaque (cible) pour qu'elle sèche, ce qui permet l'apparition de cristaux solides. Une fois le solvant évaporé, la plaque sur laquelle se trouve l'échantillon est introduite dans le spectromètre de masse sous vide.

La suite de l'analyse consiste à envoyer des tirs laser sur l'échantillon qui en absorbe la longueur d'onde. On observe la production d'ions lors des tirs lasers, ou immédiatement après. Ces ions sont alors dirigés vers l'analyseur en masse qui permet de trier les ions en fonction de leurs rapports masse/charge ( $m/z$ ) et sont détectés au final pour produire des spectres de masse.

Les champs d'application ouverts par de telles propriétés sont applicables à de très nombreux domaines et peu de techniques, à l'époque comme aujourd'hui, permettent de telles possibilités.

## **1.2. Développement du MALDI**

Aujourd'hui le MALDI est une technique des plus répandues pour l'analyse en spectrométrie de masse et pour des analyses de routine essentiellement dans les champs de la biologie et des polymères de synthèse. L'évolution rapide de ses applications s'est faite à travers le développement parallèle des méthodes de préparation d'échantillon. En effet, lors de la première étude de Karas<sup>[4]</sup> et ses collaborateurs, seulement quatre petites molécules organiques étaient utilisées comme matrices ; depuis, l'utilisation de multiples autres molécules organiques ont été testées afin de permettre l'analyse d'autant de composés d'intérêt. L'avantage d'utiliser

un laser est que tous les composés pouvant se volatiliser lors de l'absorption de la longueur d'onde du laser peuvent être testés comme matrices.

Pour montrer l'engouement rapide de l'utilisation du MALDI, il suffira de mentionner la découverte de quelques matrices (à retrouver en Tableau 4) parmi les plus couramment utilisées encore aujourd'hui :

- la matrice DHB, introduite dès 1991<sup>[7]</sup> pour l'analyse de l'hémoprotéine Cytochrome C.
- Les matrices SA et FA, utilisées dès 1989<sup>[8]</sup> pour l'analyse de protéines.
- La matrice CHCA, qui est encore l'une des plus utilisées 23 ans plus tard, introduite en 1992<sup>[9]</sup> pour l'analyse de peptides et de protéines sous forme protonnés (cations).
- Deux matrices très utilisées dans notre étude, DCTB et CNA, présentées dans les années 2000<sup>[10][11]</sup> pour les molécules peu polaires et les molécules inorganiques.

La liste des composés présentés comme des matrices efficaces s'allonge sans cesse : une étude récente, publiée en juillet 2015, mentionne par exemple l'utilisation de la coumarine, permettant une meilleure détection des lipides<sup>[12]</sup>. Certaines matrices largement utilisées, font même preuve de modifications chimiques afin de faire varier légèrement leurs propriétés<sup>[13][14]</sup>. Ce type de matrice a été étudié lors d'étude des mécanismes d'ionisation afin d'augmenter leur potentiel pour l'ionisation des molécules.

Il est souvent considéré que la matrice et le composé à analyser doivent pouvoir former un mélange homogène. Cette recommandation se justifie du fait que l'analyte se retrouve co-cristallisé avec la matrice, c'est à dire véritablement inséré dans les cristaux de matrice ; cette cristallisation varie nécessairement avec la nature, et surtout avec la taille de l'analyte. Cette observation est courante mais n'est pas la règle : il a par exemple été montré que l'hémoprotéine Cytochrome C se retrouve à la surface des cristaux de matrice constitués avec l'acide sinapique (SA)<sup>[15][16]</sup>. Une étude récente mentionne également une méthode de préparation d'échantillon pour l'analyse de polymères sans solvant, pour que l'analyte ne se trouve justement pas pris dans des cristaux de matrice<sup>[17]</sup>. Cette méthode avait également été utilisée pour l'analyse de protéine dans le but d'étudier les interactions matrice-analyte<sup>[18]</sup>.

A partir de la fin des années 90 des matrices de haut poids moléculaire<sup>[19]</sup> sont apparues afin de permettre l'analyse des molécules de petite masses en mode MALDI. En effet cette technique présentait comme inconvénient l'apparition des ions des petites molécules utilisées

comme matrices. Ces ions de matrices produits sont en général très abondants et occupent une gamme de masses importantes dues à la formation d'ions dimères ou trimères et d'ions fragments, ce qui rend difficile la détection des ions d'analyte aux bas rapports masse/charge.

Il est également possible d'ajouter, dans les solutions de matrices, des composés qui n'absorbent pas la longueur d'onde du faisceau lumineux utilisé, ou qui, utilisés seuls, ne permettent pas d'obtenir l'ionisation : ces composés sont nommés co-matrices. La combinaison de ces composés avec les matrices permet de créer d'autant plus de mélanges aux propriétés variées, à utiliser dans la préparation des échantillons à analyser en MALDI.

Comme mentionné peu avant, tous les essais de préparation d'échantillons se font de manière empirique, car il n'a pas été possible, jusqu'à aujourd'hui, de modéliser théoriquement les différents processus d'ionisation d'un composé. Les qualités de la matrice, bien qu'incompréhensibles, dépendent certainement de paramètres fins. Il a été rapporté que le changement de position d'un groupement hydroxyl sur la matrice DHB (Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque ou 3,5-Dihydroxybenzoïque) modifie considérablement son aptitude à ioniser un phospholipide<sup>[20]</sup>.

La préparation d'échantillons joue aussi sur la qualité des résultats<sup>[21]</sup>. Plusieurs méthodes sont utilisées, la plus commune est celle dite de la goutte séchée. Elle consiste à mélanger la matrice et les analytes dans un solvant, puis à déposer simplement une goutte sur la plaque d'échantillon et la laisser sécher. Il est possible de varier légèrement la méthode en modifiant la nature du solvant<sup>[22][23]</sup> ou en ajoutant des acides en faible quantité<sup>[24]</sup>.

Parmi les autres manières de préparer le dépôt d'échantillon existantes, on peut mentionner la méthode sandwich fréquemment utilisée, qui consiste à déposer alternativement une couche de solution de matrice qu'on laisse sécher, pour la recouvrir d'une solution contenant les molécules à analyser, puis les recouvrir à nouveau d'une goutte de solution de matrice<sup>[25]</sup>.

De nouvelles méthodes de préparation d'échantillon sont aussi rendues nécessaires<sup>[26]</sup> pour le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse utilisant le MALDI (appelée MALDI-IMS). En effet un fort intérêt se développe autour des possibilités du MALDI en termes d'analyse<sup>[27]</sup> par spectrométrie de masse en tenant compte de la localisation des espèces analysées au sein d'un échantillon. L'imagerie consiste à analyser directement une coupe de

tissu dans le but de connaître sa composition chimique et la localisation de molécules d'intérêt en son sein. L'utilisation d'un laser est particulièrement avantageuse, car elle permet de tirer avec précision à la surface de la coupe de tissu et de déterminer ainsi très précisément l'emplacement des composés d'intérêt. L'application de la matrice à la surface du tissu reste toutefois une étape difficile. Pour la réaliser, divers procédés, tels que la nébulisation d'une solution de matrice à la surface de l'échantillon, la mise en contact avec un film de matrice, ou encore la sublimation<sup>[28]</sup>, suivie de la re-déposition de la matrice, peuvent être envisagés<sup>[27]</sup>.

Enfin, vient le développement de techniques qui, sans être du MALDI, s'en approchent quant à l'instrumentation utilisée et à la façon d'aborder l'ionisation. Elles tentent de reproduire les effets observés en MALDI sans utiliser de matrices. Ces techniques sont un développement de l'ionisation par désorption laser (LDI).

Le LDI est utilisé depuis longtemps, bien avant le MALDI, et consiste à placer directement le mélange à analyser sur le support d'analyse. Cette technique convient aux analytes qui absorbent la longueur d'onde du laser et qui ne se dégradent pas.

Pour permettre l'analyse de composés qui n'absorbent pas la longueur d'onde du laser, et qui ne peuvent donc pas se désorber d'eux-mêmes, de nouvelles techniques se développent et s'appuient sur des surfaces fonctionnalisées, permettant la désorption et l'ionisation. Ces techniques se nomment SALDI<sup>[29]</sup> ou SELDI<sup>[30]</sup> (Surface Assisted/Enhanced Laser Desorption Ionisation) ou encore MELDI<sup>[31]</sup> (Material-enhanced LDI) ou NALDI<sup>[32]</sup> (Nanostructured Assisted LDI) parmi celles les mieux documentées. Les matériaux utilisés sont presque aussi diversifiés que les matrices utilisées en MALDI, il s'agit la plupart du temps de plaques d'acier recouvertes avec de nanotubes de carbones ou de graphites<sup>[33][34]</sup> ou du silicium nanostructurés<sup>[32]</sup>, des nanoparticules de fer fonctionnalisées de bras organiques acides<sup>[35]</sup> b ou de simples poudres d'oxyde de tungstène<sup>[36]</sup>, ou d'oxyde de zinc<sup>[37]</sup>. Ces développements permettent de parer aux inconvénients majeurs de l'utilisation d'une matrice, à savoir la difficulté de son choix en relation à l'analyte et la production des ions de matrice qui occupent une partie du spectre de masse et empêchent en général l'analyse des composés de petites masses<sup>[38]</sup>. Toutefois, ces matériaux ne s'adressent encore qu'à l'analyse de petites molécules et ne permettent pas de reproduire les avantages du MALDI en terme de gamme de masse accessible.

Le MALDI est en premier lieu une technique aisée, tant pour la préparation d'échantillons que pour le réglage des paramètres expérimentaux. C'est également une source d'ionisation qui s'adapte aisément au couplage avec un analyseur à temps de vol, qui est l'analyseur idéal pour l'analyse d'ions de haute masse. Enfin le coût de fonctionnement d'un appareil MALDI-TOF est relativement faible. Ces qualités en font un instrument de choix pour les analyses par spectrométrie de masse.

### **1.3. Particularités liées au couplage MALDI-TOF**

La source d'ionisation MALDI est si souvent couplée à un analyseur à temps de vol (TOF pour time of flight) que les deux termes sont indissociables pour une grande partie des utilisateurs de cet instrument. L'appareil est désigné par ses deux composantes et prononcé d'un seul tenant : MALDI-TOF. En effet, ces deux parties de l'instrument ont des propriétés qui rendent ce couplage intéressant. En premier lieu, le TOF nécessite une production ponctuelle de paquets d'ions, le MALDI en produit justement de manière pulsée, à chaque fois que l'échantillon reçoit un tir laser. Deuxièmement, leur couplage permet de couvrir une large gamme de masses : le MALDI est une technique capable de produire des ions de très hauts  $m/z$ , souvent peu chargés ou chargés une seule fois, et le temps de vol est l'unique analyseur en masse capable de séparer des  $m/z$  de valeurs théoriquement infinies. En guise de démonstration, l'analyse d'édifices de  $m/z$  1 000 000<sup>[39]</sup>, c'est-à-dire de molécules, ou ensemble de molécules, dont la taille dépasse ce que peut s'imaginer un chimiste, a été réalisée.

Le fonctionnement d'un TOF consiste à accélérer les ions à l'entrée d'un tube vide de gaz (pression autour de  $10^{-7}$  mbar) et exempt de champ électromagnétique, à l'extrémité duquel se trouve le détecteur. Cette action permet la séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ ) par leur différence de temps de parcours du tube vide. Les ions sont tous accélérés avec une énergie proportionnelle à leur  $m/z$  durant la phase d'accélération de l'analyseur. Le TOF toutefois ne permet aucun contrôle sur les ions lors de la majeure partie du temps de leur analyse, c'est à dire lorsqu'ils sont dans le tube de vol exempt de champ électromagnétique. Cela a pour conséquence que les décompositions métastables des ions (ions précurseurs) qui apparaissent dans la région sans champ n'affectent pas, ou très peu, la vitesse des ions fragments produits. Le temps d'arrivée des fragments formés dans la région sans champ du TOF est identique au temps d'arrivée de l'ion précurseur : tous ces ions sont perçus comme ayant la même masse.

Il est donc impossible, sans modification instrumentale, d'identifier la masse des ions fragments, alors que cette information est intéressante pour d'obtenir d'informations visant à déterminer la structure des molécules analysées. Pour contourner cet écueil, des expériences appelées PSD<sup>[40]</sup> (pour Post Source Decay) réussissaient, en modifiant les paramètres de l'instrument, à obtenir les rapports  $m/z$  des ions fragments produits dans le tube de vol. Ces expériences ont désormais été remplacées par le mode LIFT<sup>[41]</sup>, qui est plus facile et plus rapide d'utilisation. Le LIFT nécessite toutefois que l'instrument soit équipé d'une sorte de second analyseur TOF, la description en étant réalisée en partie 2.1.1. Une autre possibilité est d'utiliser un appareil équipé de deux analyseurs TOF successifs, le premier permettant de sélectionner et de laisser les ions se fragmenter, le second identifiant tous les ions formés par fragmentation spontanée. Ce type d'appareil est décrit en partie 2.1.3.

#### **1.4. Modèles explicatifs des procédés de désorption/ionisation.**

Le procédé régissant la formation d'ions durant la désorption laser assistée par matrice a fait l'objet de nombreuses recherches mais reste encore peu compris. Il s'agit d'un phénomène qui survient au moment de la désorption et qui inclut largement cette phase, c'est-à-dire qu'il se produit entre le début de l'irradiation de la surface de l'échantillon avec le laser et la dispersion totale des molécules désorbées.

La désorption étant un phénomène plus aisé à observer et à étudier, elle est aujourd'hui bien décrite et modélisée<sup>[42][43][44]</sup>, au contraire de l'ionisation, pour laquelle plusieurs modèles sont proposés<sup>[1][45][46][47][48]</sup>. L'ionisation et la désorption sont toutefois reconnues comme intimement liées<sup>[46]</sup>, au point qu'il est difficile de les considérer séparément.

De manière à mieux cerner les différentes descriptions des phénomènes d'ionisation, on se consacrera d'abord à la description de la désorption et à l'observation factuelle de l'ionisation, sans s'arrêter sur les mécanismes qui régissent l'ionisation. La description des deux principaux modèles d'ionisation proposés dans la littérature sera ensuite exposée.

##### **1.4.1. Procédé de la désorption et observation de l'ionisation**

La technique de désorption/ionisation assistée par matrice sous impulsion laser permet d'observer des ions en mode positif comme en mode négatif. Sont utilisées pour cela des impulsions laser dont la durée est brève, typiquement entre 3 et 7 ns, et répétée à une fréquence allant jusqu'à 1 kHz<sup>[27]</sup>. Pourtant, ces brèves impulsions sont bien plus longues que le simple

phénomène de désorption<sup>[44]</sup>, qui advient, par ailleurs, très rapidement, puisqu'un tir laser de seulement 22 picosecondes permet d'obtenir des ions<sup>[49]</sup>.

Les études phénoménologiques d'éjection de matériaux sont largement modélisées et les valeurs mesurées sont en agrément avec les simulations informatiques<sup>[43]</sup>. Ces modélisations proposent l'apparition des premiers agrégats propulsés hors des cristaux de matrices après 10 picosecondes. Ces agrégats continuent donc de recevoir l'irradiation de la lumière laser, ce qui provoque leur échauffement. La température atteinte calculée varie beaucoup selon les modèles théoriques utilisés et varie entre environ 800 K<sup>[50]</sup> jusqu'à plus de 3500 K<sup>[51]</sup>. La puissance laser appliquée pour obtenir l'observation d'ions est supérieure à celle nécessaire pour provoquer la désorption de molécules isolées<sup>[9]</sup>. Cette valeur d'observation des ions est dénommée comme la « valeur seuil ». Avant même que le MALDI n'existe, cette « valeur seuil » avait été décrite dans des travaux montrant la possibilité d'analyser des molécules par désorption laser<sup>[5]</sup>. Cette valeur varie en fonction de la matrice et se révèle identique pour la visualisation d'ions de matrice et d'analyte formés donc, simultanément<sup>[52]</sup>; elle varie également en fonction de la température de l'échantillon<sup>[53]</sup> qui nécessite une puissance laser légèrement supérieure lorsqu'il est à basse température (-100°C).

La modélisation du phénomène de désorption a depuis les premières expériences MALDI été largement étudiée : les études montrent que les impulsions laser permettent la désorption d'agrégats plutôt que de molécules isolées<sup>[42, 44]</sup>. Ainsi, le phénomène de désorption concernant des ensembles moléculaires de toute tailles, il conviendrait mieux de parler d'ablation, ce qui reflète mieux le caractère plus dynamique et hétérogène de son événement. Toutefois, le mot désorption continue par habitude d'être exclusivement utilisé.

La désorption amène un déploiement de matière de quelques micromètres de haut. Il est appelé « panache » (comme lors d'une éruption volcanique explosive). Le panache se forme à la surface des cristaux de matrice et présente une grande densité de matière<sup>[54]</sup> dont la pression atteint plusieurs bars<sup>[24]</sup>.

La Figure 1 schématise les phénomènes de désorption laser en fonction de la puissance du laser utilisée (à gauche) et du temps après le début de l'impulsion laser (à droite). Ces images sont issues de modélisations<sup>[43][55]</sup> utilisant le modèle de Monte Carlo, qui considère chaque molécule comme indépendante, mais toujours en interaction avec les autres par des liaisons de Van-der-Wals. Un nombre de molécules important, 255 744 molécules, est renseigné dans le programme permettant la simulation. Chaque molécule peut emmagasiner de l'énergie et la

transformer en état électronique excité ou en vibration. Des paramètres de cohésion du solide et de l'énergie fournie au système sont entrés comme variables du système considéré.

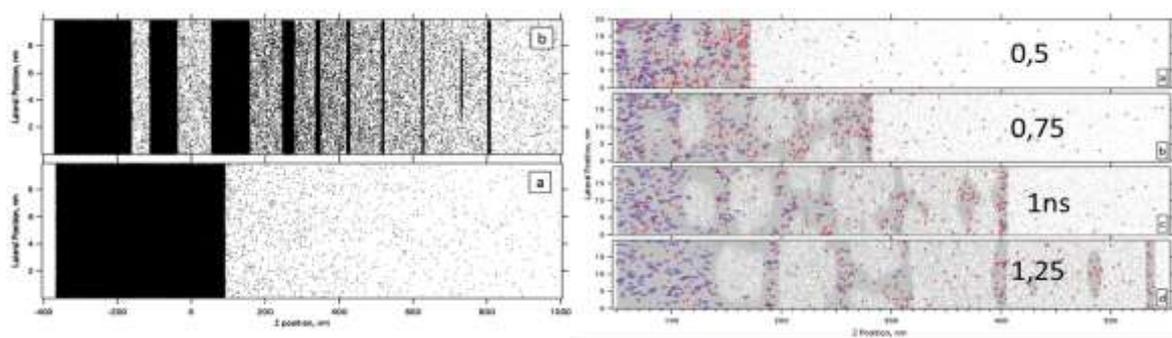


Figure 1 : Simulations des phénomènes de désorption laser de la matrice. A gauche : (a) à faible puissance laser, (b) à puissance laser supérieure à la valeur seuil. A droite : désorption à différents temps (nanosecondes) au moment de l'application de l'impulsion laser<sup>[55]</sup>.

Il a été observé que la longueur d'onde du laser utilisé influe très peu sur le phénomène d'ionisation<sup>[56]</sup> d'une protéine. La quantité de matière désorbée est plus importante lors de l'utilisation de longueur d'onde dans l'infrarouge que lors de l'utilisation d'une longueur d'onde dans l'UV<sup>[57]</sup>, mais apparemment il n'existe pas de spécificité reliant le laser utilisé à la nature des ions obtenus. Les ions de matrices sont observés sous toutes les formes ionisées possibles, protonnées ou déprotonnées ou radicalaires<sup>[42][58]</sup>; la proportion de ces ions de matrice, comparée à l'abondance des ions des analytes, varie en fonction du ratio matrice/analyte.

La désorption est un phénomène très hétérogène et l'on retrouve dans le panache des molécules isolées tout comme des agrégats très volumineux<sup>[44]</sup>. Les premières couches de l'échantillon désorbé reçoivent une forte irradiation laser et leur température ainsi que leur vitesse de désorption sont bien différentes de celles observées dans les parties plus profondes (environ 350nm)<sup>[59]</sup>, qui sont également expulsées en phase gazeuse. De nombreuses études se sont attachées à déterminer la vitesse initiale des ions lors de la désorption<sup>[60]</sup>. Les valeurs varient beaucoup selon les études et situent la vitesse entre 300 et 1000 m/s<sup>[61][62]</sup>. La vitesse de désorption dépend de la matrice utilisée et est centrée sur une valeur moyenne, tout en présentant une large distribution<sup>[58]</sup>.

La puissance laser utilisée joue sur la quantité de matière désorbée et donc sur la quantité d'ions produits. Augmenter la puissance laser au-delà de la valeur seuil fait augmenter sensiblement le nombre d'ions formés<sup>[1]</sup> : cela reflète le fait qu'une plus grande quantité de

matière est désorbée ainsi qu'une augmentation du taux d'ionisation<sup>[63]</sup>. Toutefois la proportion d'ions de matrice produits lors de l'augmentation de la puissance laser est souvent plus importante que celle des analytes.

Le rendement d'ionisation est faible, environ 1/10 000 molécules expulsées étant ionisées<sup>[10]</sup>. On assiste toutefois à un phénomène appelé *l'effet de suppression de matrice*<sup>[64]</sup>, qui permet d'observer une proportion d'ions d'analytes bien supérieure au ratio des molécules mélangées. La disparition complète des ions de matrice devant ceux de l'analyte<sup>[64]</sup>, et notamment lorsqu'on utilise des solutions concentrées en analyte (ratio matrice/analyte = 200) peut même être observé.

L'ionisation n'est pas uniquement liée à l'interaction du rayon laser avec les molécules désorbées : des expériences ont montré qu'il est en effet possible de produire des ions en irradiant le support portant l'échantillon du côté opposé à celui où l'on observe la désorption des ions<sup>[65]</sup> ou simplement en déposant le mélange échantillon sous vide, par sublimation de la matrice<sup>[66]</sup>. Cette expérience montre que c'est l'effet de l'échauffement thermique qui permet la désorption d'ions. Les résultats de la même étude révélaient également que les ions produits étaient des adduits avec du sodium et que, contrairement à l'expérience produite en irradiant directement l'échantillon avec le laser, peu d'ions protonnés étaient formés.

D'autres expériences ont démontré la possibilité de désorber des ions sans le concours d'un faisceau laser, par simple choc mécanique au dos de la plaque supportant l'échantillon<sup>[65]</sup>, ou par chauffage de la plaque d'échantillon dans l'appareil<sup>[67]</sup>. Enfin, il est possible d'accroître le taux d'ionisation en vaporisant des ions sodium lors des tirs du laser sur l'échantillon<sup>[68]</sup>.

La désorption laser, assistée par matrice ou non, produit presque exclusivement des ions mono-chargés quand il s'agit de molécules synthétiques<sup>[69]</sup>. Seules les protéines de haute masse (supérieure à 20 000 Da) s'observent aisément sous forme d'ions portant plusieurs charges<sup>[70]</sup>. L'utilisation de la source MALDI placée à pression atmosphérique permet plus aisément d'observer des ions multichargés. Cette capacité à ne produire que des bas états de charge, et principalement mono-chargés, est surprenante. Notamment à cause des observations réalisées en ionisation par électrospray (ESI) - qui est l'autre technique d'ionisation très largement utilisée (décrite en Annexe 1). L'ESI produit des ions dont l'état de charge est fréquemment élevé, d'autant plus que la molécule est de taille importante. Toutefois, l'ESI est une technique particulière qui recourt à l'utilisation de réactions d'électrochimie pour créer un nombre de

charges très conséquent, ce qui n'est pas le cas du MALDI, lequel utilise des matières neutres<sup>[24]</sup>. Les observations en MALDI ont la particularité d'être difficiles à reproduire quantitativement<sup>[71]</sup> car tout les processus couvrant l'analyse - depuis la cristallisation de la matrice jusqu'aux taux d'ionisation finalement observés – sont sujet à d'importantes variations.

#### 1.4.2. Les différents modèles expliquant l'ionisation

Si la compréhension du phénomène de désorption et d'ablation de matériaux, vidé de sa composante sur les mécanismes d'ionisation, fait consensus, il en est tout autrement des phénomènes d'ionisation, pour lesquels de nombreux modèles ont été proposés au fur et à mesure des observations expérimentales<sup>[47]</sup>. Deux principaux modèles s'affrontent depuis les années 90 et chacun accumule depuis des éléments le justifiant ou le faisant évoluer<sup>[1]</sup>.

Le premier modèle, incarné depuis les écrits précurseurs de Karas en 2000<sup>[72]</sup> comme celui du Lucky-Survivor (*chanceux survivant*), considère que l'analyte, avec pour exemple un peptide utilisé lors de toutes ces études menées en mode ion positif, existe sous sa forme protonnée à l'intérieur même du cristal de matrice<sup>[48]</sup>. Ici, l'analyte retient la charge acquise en solution lors de la préparation de l'échantillon, avant qu'on ne laisse sécher la goutte à l'air libre. L'existence de ces charges à l'état solide a été démontrée par l'incorporation d'indicateurs de pH dans des cristaux de matrice<sup>[73]</sup>. Le modèle se base sur une possibilité très faible que les agrégats désorbés soient globalement chargés, et ce par « chance », et mènent à la formation finale de l'ion en phase gazeuse par perte successive des molécules neutres et/ou de paires d'ions de charges opposées.

Ce modèle a été enrichi par les apports de Alves et ses collaborateurs<sup>[46]</sup> en 2006, par la proposition d'une formation d'ions multichargés au sein d'agrégats<sup>[74]</sup> en fonction des conditions expérimentales (nature de la matrice). Le processus d'ionisation, ici proposé, prévoit une réaction intermoléculaire de matrices et d'analytes ionisés. Ces apports permettent de prendre en compte le rôle de la matrice<sup>[44]</sup> dans les processus d'ionisation ou plutôt lors des échanges au cours de la désorption. Il y est noté une ressemblance avec les modèles proposés pour l'électrospray<sup>[75]</sup>.

La dernière publication reprenant le modèle du Lucky-Survivor, tel que publié par Karas et ses collaborateurs en 2011<sup>[48]</sup>, précise à nouveau qu'avec ce modèle il est possible de démontrer la production d'ions préformés dans les cristaux de matrices. Cette étude quantifie

aussi, à travers des mesures expérimentales à l'aide de matrices dérivatisées, la proportion de peptides protonnés ne provenant pas directement du crystal selon ce modèle. Il est alors proposé que la formation des ions en suivant le modèle du Lucky-Survivor coexiste avec le modèle du transfert de protons. Le modèle du Lucky-Survivor serait toutefois largement prépondérant et représenterait 90% des espèces formées à partir d'un peptide, en particulier lorsque la puissance laser est proche de la valeur seuil. Il est toutefois observé qu'en parallèle de ce modèle, existe le transfert de proton provenant de la matrice, à hauteur de 10%, puisque la modification structurale de la matrice provoque des variations du taux d'ionisation<sup>[48]</sup>. Le rôle de la matrice dans ce modèle intervient dans l'accumulation d'énergie qui permet la désolvation des agrégats<sup>[1]</sup>.

Le second modèle repose sur les mécanismes d'ionisation secondaire<sup>[76]</sup> ou, dit autrement, sur des mécanismes de transfert de protons qui implique les ions de matrice protonnés et un peptide afin de produire l'espèce moléculaire intacte<sup>[46][47][77]</sup>. Il y est considéré que la matrice joue le rôle exclusif d'agent ionisant<sup>[1]</sup>. Ce postulat se justifie par l'observation de l'augmentation rapide du rendement d'ionisation de la matrice avec l'augmentation de la puissance laser<sup>[78]</sup>, ainsi que par la modélisation du phénomène de désorption qui montre une grande quantité de molécules de matrice à l'état excité<sup>[79]</sup> qui se retrouvent parfois à proximité des analytes lors de la désorption.

Les recherches concernant ce second modèle se concentrent notamment sur l'explication de la formation des ions primaires, c'est-à-dire les ions de matrice. Les molécules de matrice s'ionisent par effet d'assemblage d'états électroniques excités de deux molécules de matrice<sup>[47]</sup>. Les états électroniques excités sont induits par la faculté des matrices à absorber la longueur d'onde du laser et qui peuvent ainsi être transférés au sein du panache, où la densité de matière est importante, sous forme de pseudo-particules appelées excitons. Les molécules de matrice ionisées par ce biais vont réagir avec des molécules neutres pour former des molécules protonnées sous contrôle de la thermodynamique. Ce sont ces dernières molécules qui vont interagir avec l'analyte, bien souvent un peptide, et lui transférer le proton. Ainsi la relation du rendement d'ionisation de peptides en considérant l'affinité protonique de la matrice et des analytes a été démontrée<sup>[77]</sup>. La réaction va donc dans le sens de la réaction thermodynamiquement favorable.

Ces deux principaux modèles sont représentés sur le schéma de la *Figure 2* tiré des travaux de Jaskolla et ses collaborateurs<sup>[48]</sup>.

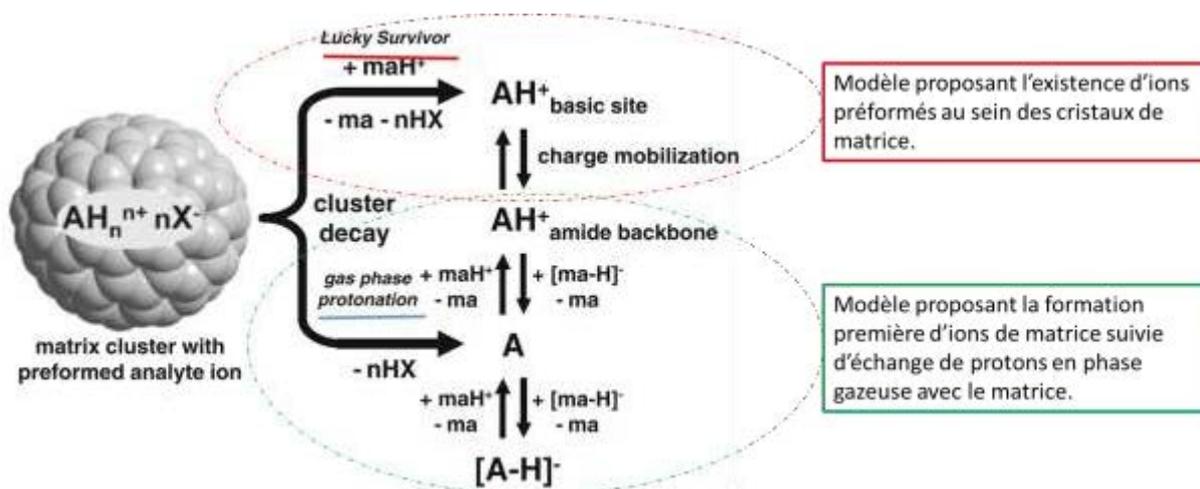


Figure 2 : Schéma des deux principaux modèles proposant le mécanisme d'ionisation MALDI<sup>[48]</sup>.

Ces deux modèles ne sont pas les seuls possibles, mais ils servent de base à presque tous les autres : il est donc important de considérer leurs différences, qui résident notamment dans la formation des ions primaires<sup>[1]</sup>. Le premier modèle proposant que les ions primaires soient directement les ions des peptides étudiés, le second modèle suggérant qu'ils passent d'abord par la formation d'ions de matrices, qui seraient eux-mêmes, les seuls responsables de l'ionisation des peptides par réaction intermoléculaire en phase gazeuse.

### 1.5. Le mode négatif en MALDI : un inconnu à développer

Le mode négatif en MALDI a longtemps été peu considéré au point qu'encore aujourd'hui les études se donnent l'obligation de préciser lorsque cette polarité est utilisée<sup>[80][81]</sup>. Les premières recherches en MALDI concernaient l'analyse de peptides protonnés ou de polymères synthétiques cationisés, donc en mode ion positif. On suppose que la difficulté de trouver des matrices permettant l'ionisation efficace des analytes, faisait que les méthodes développées tentaient d'améliorer progressivement les techniques existantes, progressant ainsi pas à pas et conservant la polarité testée initialement. Les matrices les plus utilisées possèdent un caractère acide,<sup>[82][83]</sup> ce qui induit une plus grande facilité à la matrice de fournir des protons que d'en capter et augmente le rendement en mode ion positif. Une autre raison a également été mise en exergue par l'utilisation de certains types d'appareils, il s'agit de défauts instrumentaux capables de fournir une meilleure réponse en mode ion positif qu'en négatif<sup>[82]</sup>.

Il existe toutefois des champs d'applications en mode négatif, visant notamment à analyser des oligonucléotides<sup>[84]</sup> déprotonés plusieurs fois et sodiés de manière à observer des ions mono-chargés, des polysaccharides et cyclodextrines par attachement anionique d'ions chlorure<sup>[85]</sup>, des phospholipides<sup>[86]</sup> et toutes sortes de molécules démontrant une forte tendance anionique. Ces études montrent surtout l'analyse par spectre de masse mais aussi des expériences de fragmentation permettant de déterminer la structure des composés analysés<sup>[87]</sup>. Certaines recherches se sont évertuées à tester de très nombreuses matrices à caractère basique afin de permettre l'analyse en mode négatif de composés, tels que les fragments d'ADN, dont on présume la tendance à mieux s'ioniser sous forme d'anions<sup>[88]</sup>.

Les études mécanistiques visant à proposer des modèles d'ionisations sont presque toujours considérées en mode positif, et pour l'ionisation de peptides qui servent toujours de molécules modèles. En effet, lorsqu'un intérêt pour le mode négatif est mentionné, il s'agit la plupart du temps de ne considérer que les ions de matrice<sup>[89]</sup> dans le but de comparer la quantité totale d'ions produits selon les deux polarités.

Il n'est toutefois pas utile d'étudier de manière isolée l'ionisation de peptide en mode négatif, puisque ces composés s'ionisent selon les deux polarités et bien souvent de manière plus abondante en mode positif : les mécanismes d'ionisation ont en effet aucune raison d'être différents dans les deux polarités. C'est aussi pour cette raison que l'absence dans la littérature d'une étude approfondie, capable de décrire ces molécules de manière aussi complète qu'en mode positif, est un manque regrettable.

Dans le but de combler cette absence, au cours de ces trois années, mon travail s'est particulièrement attaché à l'étude de ce mode, notamment à travers la mise au point d'une méthode d'analyse de polyoxoanions, des polyoxométallates fonctionnalisés, que la charge initiale prédestinaient à cette polarité.

## 2. Cadre matériel et expérimental

Cette seconde partie rassemble la liste détaillée du matériel utilisé, tant au niveau des spectromètres de masse que des substances chimiques qui ont servi à mettre au point les échantillons pour analyse MALDI.

En premier lieu le fonctionnement des appareils à travers les expériences menées sera détaillé et on précisera la façon dont ont été traitées les données acquises. Dans la seconde section les analytes et les matrices permettant la préparation d'échantillons seront détaillés.

Enfin, une troisième partie est consacrée à introduire la terminologie utilisée pour nommer les ions observés, ainsi que la méthode de calcul du taux de fragmentation en source.

### 2.1. Les spectromètres de masses utilisés et leurs logiciels

Pour mener cette étude j'ai principalement travaillé sur un appareil, l'*Autoflex III*, qui est le spectromètre de masse équipé d'une source MALDI utilisé par notre équipe. En complément, au sein d'autres laboratoires dans lesquels j'ai eu la chance d'être accueilli et de réaliser des expériences, des appareils différents dont la source est également le MALDI ont été utilisés. Parmi ceux-ci, deux m'ont permis d'obtenir des résultats qui sont présentés ici : il s'agit des appareils *MALDI-LTQ-Orbitrap* (utilisé au sein du laboratoire SMBP à l'ESPCI, unité CNRS et USR3149) et *Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer* (au sein du LBM, UMR CNRS 7203).

Enfin un autre appareil a été utilisé, un *ESI-LTQ-Orbitrap*, présent dans notre laboratoire. Il est équipé d'une source d'ionisation électrospray (ESI) décrite en Annexe 1.

#### 2.1.1. L'appareil Autoflex III Smartbeam, et son logiciel FlexAnalysis

La majeure partie du travail effectué et la plupart des spectres de masse présentés dans ce document ont été réalisés sur un spectromètre de masse de type MALDI-TOF-TOF illustré sur la Figure 3. Il s'agit de l'*Autoflex III Smartbeam* présenté la première fois en 2006 par Bruker Daltonics et appartenant à notre laboratoire depuis 2010. Ses performances sont parmi les meilleures des appareils actuels. Il est équipé d'un laser Nd:YAG dont la longueur d'onde est de 355 nm, mentionné sous le terme Smartbeam. La puissance de ce laser est réglable avec un plafond de 500  $\mu$ J et une fréquence de tirs maximale de 200 Hz. Le diamètre du faisceau

laser est de 50  $\mu\text{m}$ . La plupart de nos expériences a été réalisée avec une fréquence de tirs de 20 Hz, accumulant 200 tirs dispersés sur la totalité de la surface du dépôt. L'Autoflex III est équipé d'un réflectron permettant des analyses jusqu'à des masses de 6 kDa, pour un pouvoir résolutif atteignant 20 000. En outre, il est possible d'utiliser le mode linéaire pour détecter des  $m/z$  jusqu'à 500 kDa. Les spectres de masse obtenus sur cet appareil ont été traités avec le logiciel flexAnalysis 3.3 développé par la société Bruker Daltonik.

Sur les supports (photographiés et présentés dans la Figure 3) indexés  $\phi$  sur le schéma de la Figure 4, les échantillons préparés en solution sont déposés par gouttes de 1  $\mu\text{L}$ . Une fois le solvant évaporé, restent des cristaux contenant l'analyte et la matrice, et formant une couche de quelques micromètres d'épaisseur (photo en Figure 3). Les cibles permettant le dépôt de l'échantillon, utilisées pour la plupart des expériences, sont des plaques d'acier inoxydable fournies avec l'appareil et présentées sur la Figure 3 en  $\beta$ . Ces supports sont de deux types très similaires, le premier en acier brossé et le second en acier poli. Ils sont recouverts de 384 « puits » de 3 mm de diamètre permettant de réduire l'étalement de la goutte déposée. Aucune différence notable n'a été relevée par l'utilisation de l'un ou de l'autre de ces supports lors de nos expériences. D'autres typologies de plaques ont été testées, telles que les « Prespoted AnchorChip », plaques en polymères, conçues par les entreprises Bruker et Eppendorf, et abrégées *PAC* dans cette thèse (visibles en  $\alpha$  de la Figure 3). Ces plaques sont vendues avec 384 pré-dépôts de matrice CHCA permettant une préparation d'échantillons plus rapide. Elles sont jetables, ce qui permet d'éviter les procédures longues et onéreuses de lavage. Leur propriété de support isolant nous ayant été utile, nous les avons lavées de leurs dépôts de CHCA pour y déposer d'autres types d'échantillons. Enfin un dispositif présentant un cadre adaptateur (Figure 3, plaque  $\gamma$ ) a permis d'utiliser de nombreux autres matériaux sous forme de plaques fines de moins d'un millimètre d'épaisseur comme supports de dépôt. Sur ce modèle, des plaques de polystyrène, aluminium, polytétrafluoroéthylène, polyoxométhylène et verre ont été également testées.

Les dépôts réalisés contenaient bien souvent des solvants volatils et leurs séchages étaient rapides. À d'autres moments, une cloche à vide, reliée à une pompe primaire a été utilisée pour permettre le séchage, plus long à obtenir, de certains dépôts mettant en jeu par exemple le solvant diméthylsulfoxyde.

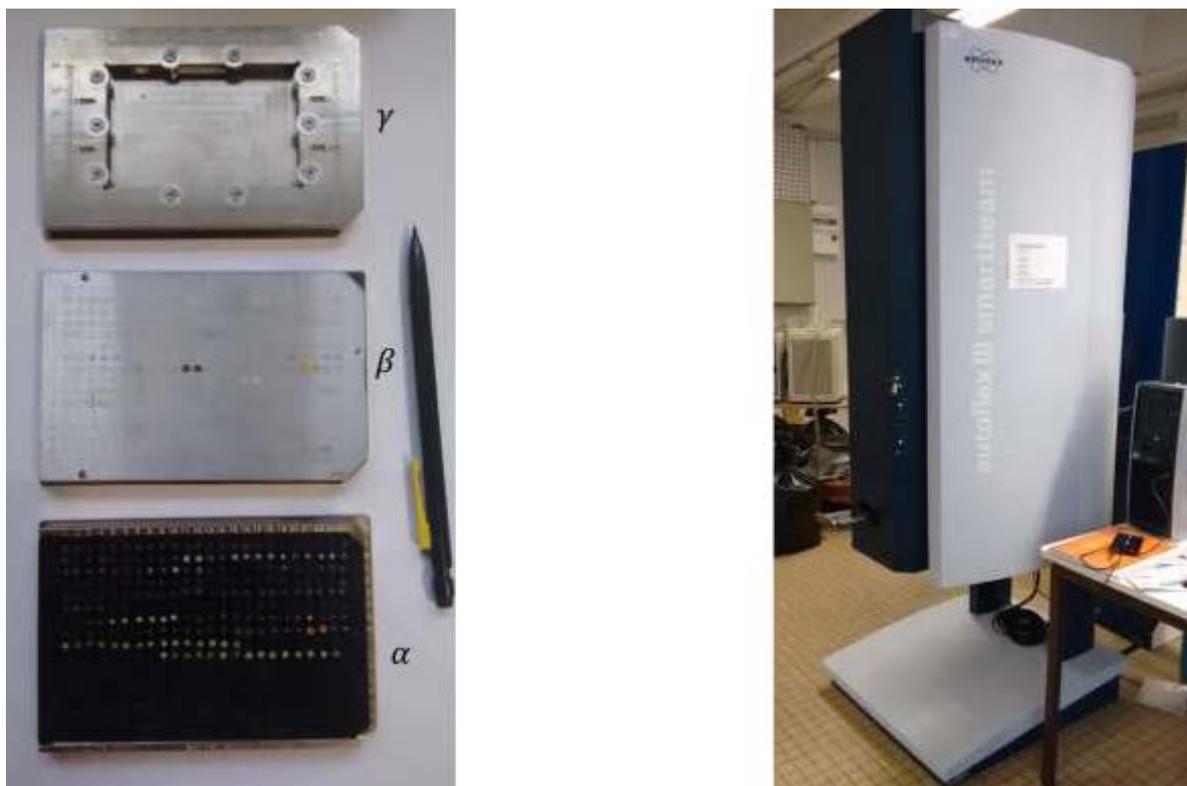


Figure 3 : Photographie des plaques de dépôts (gauche). Plaque « Prespoted AnchorChip » ( $\alpha$ ), plaque acier inoxydable ( $\beta$ ), plaque adaptatrice pour plaque de tout type ( $\gamma$ ). Photographie de l'Autoflex III Smartbeam de Bruker Daltonics (droite).

Le schéma du principe de fonctionnement d'un instrument à temps de vol équipé d'une source MALDI (l'AutoflexIII - MALDI-TOF), sans pratiquer de sélection d'ions particulier (autre méthode qui est détaillée plus loin) est donné en Figure 4. Cette Figure 4 montre également le trajet des ions dans l'instrument à temps de vol utilisé en mode réflectron.

Le réflectron est un miroir électrostatique qui permet d'augmenter le pouvoir résolutif de l'analyseur. Son action est à la fois d'allonger la distance parcourue par les ions et de refocaliser les ions de même rapport  $m/z$ , pour lesquels il existe de faibles écarts d'énergie cinétique<sup>[90]</sup>. En l'absence de réflectron à l'extrémité du tube de vol le trajet des ions est direct et les ions sont détectés par le détecteur linéaire.

Les spectres de masse présentés dans cette thèse ont tous été enregistrés en mode réflectron.

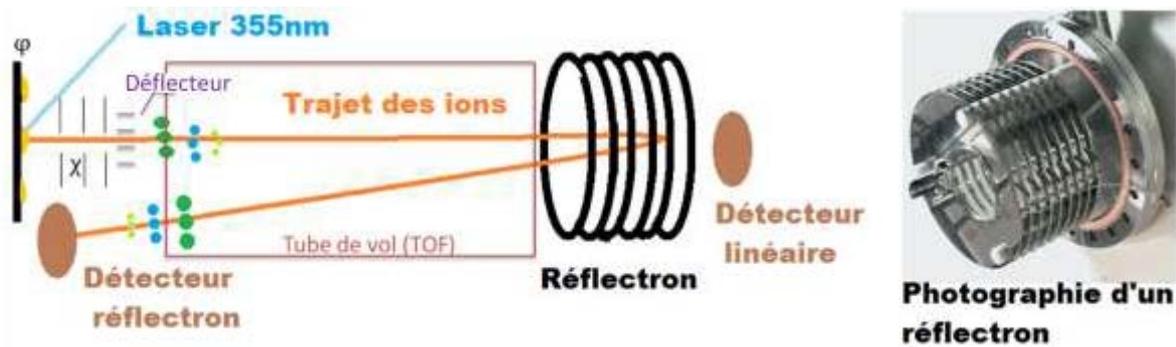


Figure 4 : Schéma de principe de l'appareil MALDI-TOF et photographie d'un réflectron (pris sur le site web du National Institute of scientific material)

Lors d'une expérience MALDI-TOF, le solide constitué de cristaux de matrice contenant l'échantillon est visé par des impulsions laser de 3 nanosecondes, ce qui en provoque l'échauffement rapide et donc le passage de la matière de la forme solide à gazeuse. Il s'agit d'une petite explosion propulsant de la matière sous forme de molécules isolées et/ou d'agrégats. Ce déploiement de matière est appelé « panache », la vitesse d'expansion de la matière désorbée est proche de 1000 m/s<sup>[58]</sup>.

On peut laisser le panache se déployer quelques nanosecondes ce qui améliore dans certains cas la résolution des pics détectés. Un délai d'extraction de 80 ns a été paramétré dans notre cas, avant d'accélérer les ions présents à l'aide de lentilles électrostatiques annotées en  $\chi$  (système d'extraction retardée). Tous les ions de même charge vont obtenir la même énergie cinétique, ainsi le temps mis à parcourir le temps de vol est directement lié au rapport  $m/z$  des ions.

Les conditions d'extraction des ions de la source et les paramètres expérimentaux de l'analyseur utilisé, sont tout à fait classiques.

Les potentiels appliqués aux lentilles d'extraction, de focalisation et du réflectron sont décrits sur l'instrument comme suit (en kV) : Ion Source 1 : 19,07 ; Ion Source 2 : 16,75 ; Lens : 8,25 ; Reflector : 21 ; Reflector 2 : 9,7.

En mode LIFT (voir explication du LIFT plus bas) les potentiels, également d'origine, sont de (en kV) : Ion Source 1 : 6 ; Ion Source 2 : 5,3 ; Lens : 3 ; Reflector : 27 ; Reflector 2 : 11.45 ; Lift 1 : 19 ; Lift2 : 3.

L'utilisation d'un laser dont la puissance peut être réglée, alliée à l'utilisation de matrice, peut permettre d'induire la fragmentation en source de l'analyte étudié. Ce mode, appelé ISD (Ion Source Decay)<sup>1</sup>, consiste à utiliser des tirs laser dont la puissance est largement supérieure à celle nécessaire pour observer l'ion sous sa forme intacte.

Il est possible d'utiliser l'instrument Autoflex III, qui est un instrument hybride de type TOF-TOF, pour mener des expériences de fragmentations. Cette technique est appelée LIFT<sup>[41]</sup> et permet de mener des expériences de spectrométrie de masse en tandem (expériences MS/MS). Le principe est de sélectionner un ion particulier (ion précurseur) pour en observer les fragments. Le mode LIFT est spécifique à l'appareil Autoflex III ; il permet de réaliser des expériences de fragmentations liées à la capacité du MALDI de produire des ions métastables, c'est-à-dire contenant une énergie suffisante pour se fragmenter après un délai de plusieurs microsecondes. La fragmentation métastable peut se produire au bout d'un temps relativement long, par comparaison à l'échelle de temps inférieure à la microseconde observée lors des phénomènes d'ionisation suivis de l'envoi des ions vers l'analyseur.

La fragmentation survient dans la région du premier analyseur TOF ; les ions fragments ont alors la même vitesse que l'ion précurseur et ne sont pas différenciables à ce stade. L'utilisation d'un second analyseur, un TOF, permet alors d'attribuer à chaque ion son rapport  $m/z$ . Cette expérience, dont le schéma explicatif est donné en *Figure 5*, est basée sur le même principe que celle appelée autrefois *post-source decay* (PSD)<sup>[91]</sup>.

La sélection de l'ion est permise par l'ouverture électrostatique durant une gamme de temps correspondant au passage de l'ion à travers ce dispositif. Sur la *Figure 5* ce dispositif est représenté et annoté PCIS (precursor ion selector). Les ions sélectionnés peuvent ainsi se

---

<sup>1</sup> Note concernant le mode ISD : ces fragmentations sont promptes et surviennent bien avant que les ions ne soient envoyés vers l'analyseur en masse : aucun paramètre instrumental (par rapport à ceux utilisés pour l'acquisition de spectres de masse) en dehors de la puissance du laser n'est donc modifié. Il ne s'agit pas d'expérience de fragmentation au sens strict du terme qui, dans le domaine de la spectrométrie de masse, la MS/MS sous-entend la sélection et l'isolation formelle d'un ion avant de le fragmenter.

fragmenter avant d'être à nouveau ré-accélérés dans la partie nommée LIFT. En réalité, une faible proportion de l'ion sélectionné se fragmente ; c'est pourquoi la cellule LIFT est suivie d'une cellule appelée « post lift metastable suppressor (PLMS) » permettant la suppression de la majorité des ions parents. Le résultat aboutit à la production d'un spectre MS/MS qui présente une quantité d'ions fragments surestimée par rapport à celui de l'ion parent.

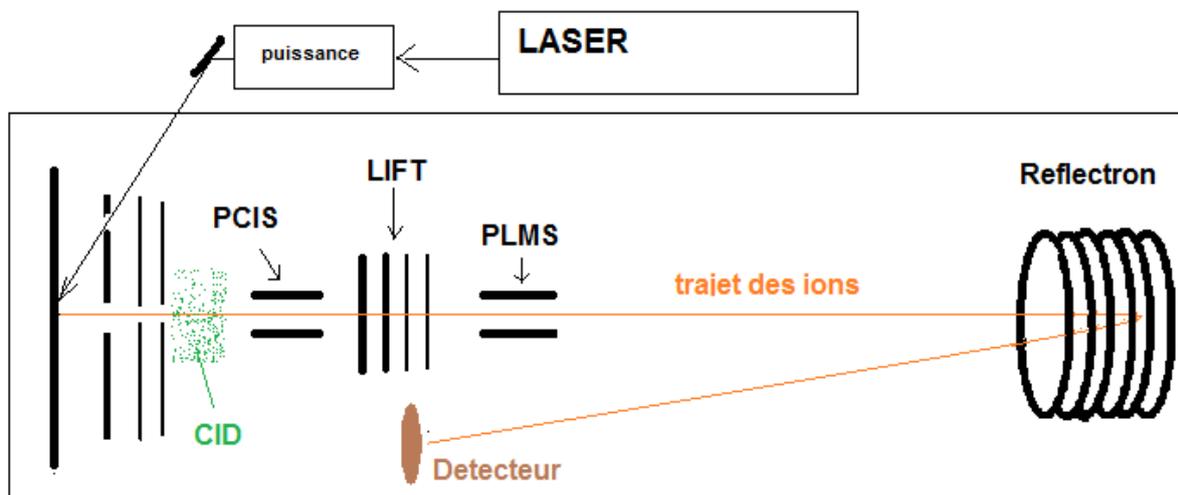


Figure 5 : Schéma illustrant l'AutoflexIII en mode LIFT. Des barrières électrostatiques sont placées sur la trajectoire des ions pour dans un premier temps sélectionner l'ion précurseur (PCIS : PreCursor Ion Selector), dans un second temps éliminer le précurseur non fragmenté avant la cellule LIFT (PLMS : Post LIFT metastable suppressor). Schéma inspiré de celui présenté par le constructeur Bruker Daltonics.

Il est possible d'introduire un gaz à la suite de la phase d'accélération des ions, ce qui devrait<sup>[92]</sup> provoquer des fragmentations par collisions.

Les spectres MALDI obtenus sur l'Autoflex III ont été traités avec le logiciel FlexAnalysis, fourni par le constructeur (Bruker Daltonics). La détermination de la composition des espèces formées, dont les massifs isotopiques sont étendus et complexes, a été réalisée par superposition des spectres de masse obtenus sur des spectres théoriques modélisés avec le logiciel Xcalibur (Thermo Scientific).

La manière dont sont réalisées ces déterminations de formules par superposition de massifs isotopiques théoriques et expérimentaux est détaillée en Annexe 2.

### 2.1.2. L'appareil LTQ-Orbitrap XL-ETD, Thermo Scientific et son logiciel Xcalibur

Deux appareils différents de ce même spectromètre de masse vendus par la société Thermo Scientific ont été utilisés lors de nos travaux. Le fonctionnement de l'appareil est identique sur les deux appareils, seules les sources d'ions, et en conséquence la nature des espèces formées, étant différentes. L'un est équipé d'une source ESI, l'autre d'une source MALDI sous vide dont le principe a été précédemment décrit.

Les analyses réalisées avec la source ESI ont été effectuées sur l'instrument ESI-LTQ-Orbitrap disponible dans notre laboratoire. Les analyses réalisées avec la source MALDI ont été effectuées au sein du laboratoire dirigé par la Dr. Joëlle Vinh, situé à l'ESPCI (CNRS USR3149). Cet appareil est équipé d'un laser à azote qui produit une longueur d'onde de 337 nm, ce qui représente un écart avec le laser utilisé sur l'*AutoflexIII*. Toutefois, la longueur d'onde du laser n'a pas montré d'influence notable sur les résultats obtenus, puisque dans notre cas l'objectif était uniquement la production de l'espèce moléculaire intacte pour l'étude successive des fragments produits par collisions (mode CID), seule la nature des ions fragments a été comparée.

Le LTQ-Orbitrap est un instrument hybride couplant un piège ionique linéaire (LTQ) et un analyseur d'ultra haute résolution dit Orbitrap. Le schéma présenté en Figure 6 illustre le fonctionnement de cet appareil équipé d'une source ESI (la source ESI est détaillée en Annexe 1).

Les spectres de fragmentations des polyoxométallates étudiés ont été enregistrés sur cet appareil en utilisant le mode dit HCD, consistant à produire des collisions entre les ions sélectionnés avec un gaz neutre. L'analyte en solution est introduit dans la source et ionisé par électrospray ou en mode MALDI. Les ions formés sont dirigés vers l'analyseur en masse ou vers des cellules de collisions (mode MS/MS).

L'analyseur Orbitrap est un analyseur à transformée de Fourier et se base sur la mesure des fréquences d'oscillations axiales des ions tournant autour de l'électrode centrale, pour la détermination des rapport  $m/z$  des ions. Cette méthode de mesure des rapports  $m/z$  permet d'atteindre un pouvoir résolutif de plus de 100 000.

Cet appareil, schématisé en *Figure 6*, peut réaliser des expériences de fragmentations (MS/MS) en conditions CID d'ions sélectionnés dans le piège ionique et il est aussi équipé

d'une cellule de collision, permettant de réaliser des fragmentations en mode dit « HCD ». Ces deux méthodes consistent à faire collisionner les ions précurseurs sélectionnés, avec un gaz, de manière à apporter suffisamment d'énergie vibrationnelle induisant les fragmentations.

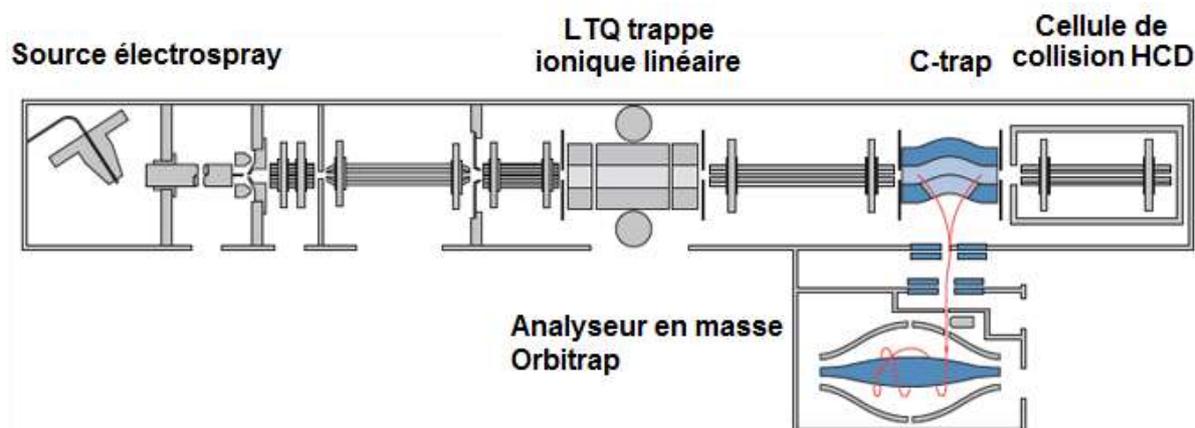


Figure 6 : Schéma de l'appareil LTQ-Orbitrap avec une source ESI (image prise sur le site du constructeur ThermoScientific)

Les spectres MS/MS obtenus sur ces appareils (l'un équipé d'une source MALDI, l'autre ESI) ont été traités avec le logiciel fourni par le constructeur, Thermo Scientific, dénommé Xcalibur. Il permet, entre autres, de simuler des profils isotopiques tout en choisissant la résolution désirée. Nous l'avons utilisé pour la détermination de formules brutes des ions visibles sur tous les spectres de masse, quel que soit l'appareil utilisé. La manière d'utiliser ce logiciel pour permettre la détermination de la formule des ions est rapportée en Annexe 2.

### 2.1.3. L'appareil Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer

L'instrument « Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer » a été utilisé pour une unique expérience MS/MS utilisant un mode d'activation de fragmentation par collisions (CID) de haute énergie. Cet appareil, situé dans le laboratoire LBM au sein de l'équipe dirigée par le Pr. Gérard Bolbach, est équipé d'une source MALDI et d'un instrument en tandem TOF-TOF séparés d'une cellule de collision. Le laser utilisé est un laser Nd :YAG, émettant à une longueur d'onde de 355 nm.

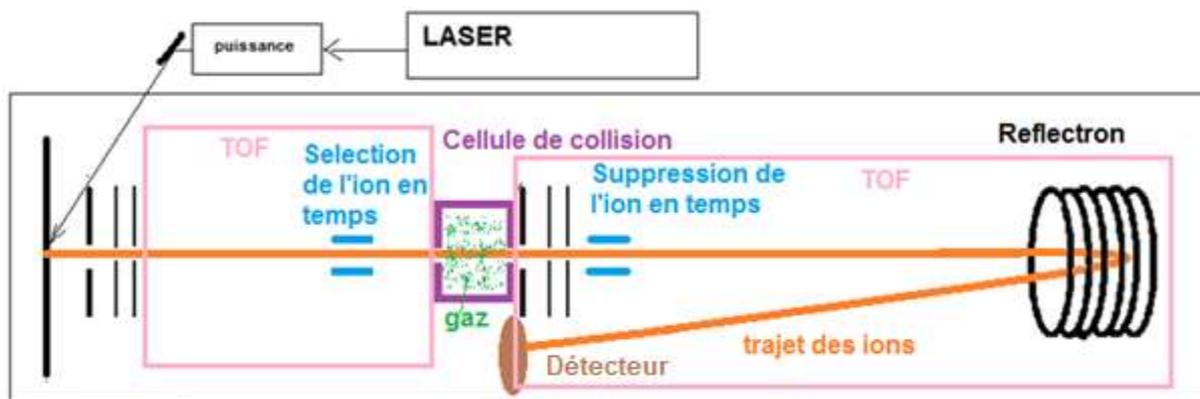


Figure 7 : Schéma de l'appareil Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer en mode CID TOF-TOF. (Schéma inspiré d'une publication de Sachon et ses collaborateurs<sup>[93]</sup>)

Cet outil apporte une fonctionnalité différente de l'AutoflexIII car il permet véritablement d'effectuer une expérience de fragmentation sous collisions de haute énergie d'un ion sélectionné. Une fois l'ionisation effectuée par MALDI, un premier analyseur TOF et un dispositif de sélection de l'ion permettent de transférer l'ion désiré dans une cellule de collision. La cellule de collision contient de l'air à une pression de  $4 \cdot 10^{-6}$  mBar. Les collisions se produisent à haute énergie (1 KeV). Les ions ainsi fragmentés sont analysés par le second analyseur TOF équipé d'un réflectron. Lorsque l'ion parent est peu fragmenté -son abondance reste alors très grande par rapport à celles des ions fragments produits- il est possible de supprimer l'ion parent au sein du second temps de vol afin d'amplifier la détection des ions fragments.

#### 2.1.4. Procédure d'étalonnage du spectromètre de masse Autoflex III

La plupart des appareils n'ont pas nécessité de procédures d'étalonnage particulières, des mélanges standards ayant été utilisés dans tous les cas, sauf avec le MALDI-TOF.

En effet l'Autoflex III utilisé en mode ion négatif n'avait pas de méthode d'étalonnage efficace. Le faible nombre d'études en mode négatif utilisant le MALDI-TOF rend limité les protocoles connus. En outre, le couplage MALDI-TOF nécessite un étalonnage attentif du fait que la matrice et le délai d'extraction utilisés diffèrent pour chaque méthode et influent sur la précision en masse. Nos travaux ont débuté par la préparation de divers mélanges étalons qui se trouvent largement détaillés dans ce document.

Le choix a été fait d'utiliser initialement un mélange de peptides dans la matrice CHCA, à l'instar de ce qui est utilisé en mode positif. D'autres méthodes suggérées par la littérature, basées sur la production d'agrégats d'iodure de césium<sup>[94]</sup> ou de phosphore,<sup>[95][96]</sup> ont été testées, sans qu'ils prouvent leur efficacité. Enfin, un mode d'étalonnage propre à nos analyses a été mis au point, par l'utilisation d'un polyoxométallate et de ses ions fragments une fois leurs compositions déterminés par le premier étalonnage.

Des peptides connus pour s'ioniser aisément en négatif, en MALDI comme en ESI, ont d'abord été testés un par un, puis en mélange dans la matrice CHCA. Différentes concentrations de chaque peptide ont été testées de façon à obtenir des pics d'intensités voisines. L'intensité des pics correspondants aux peptides évoluant une fois les espèces mélangées, il s'est avéré nécessaire de recommencer l'ajustement des quantités de chaque peptide. Le fait que le taux d'ionisation des espèces est différent lorsqu'on utilise un mélange ou lorsqu'on les traite séparément s'explique par les effets de compétition pour l'ionisation, phénomène abondamment relayé dans la littérature tant pour le MALDI<sup>[62]</sup> que pour l'ESI<sup>[97]</sup>.

Cette compétition dans le rendement d'ionisation est un effet bénéfique en MALDI puisqu'on utilise une très faible quantité d'analyte dispersé dans un excès de matrice.

On observe pourtant que l'intensité des ions correspondants aux analytes est bien plus importante que celle des ions de matrice<sup>[98]</sup>, en fonction de la préparation du dépôt<sup>[64]</sup>. La composition finale du mélange étalon mis au point est donnée dans le tableau 1 ci-dessous présenté.

*Tableau 1: Mélange peptides et masse mono-isotopique*

Produit (N° CAS) ; formule brute de l'anion	Masse exacte	Concentration (μMolaire) de l'étalon dans le mélange final avec la matrice CHCA à 10g/L
Angiotensine II ([Asn ;Val] (20071-00-5) ; C <sub>49</sub> H <sub>69</sub> N <sub>14</sub> O <sub>11</sub> <sup>-</sup>	1029,527	41
Angiotensine I (70937-97-2) ; C <sub>62</sub> H <sub>88</sub> N <sub>17</sub> O <sub>14</sub> <sup>-</sup>	1294,670	115
Glu-Fibrinopeptide-B (103213-49-6) ; C <sub>66</sub> H <sub>94</sub> N <sub>19</sub> O <sub>26</sub> <sup>-</sup>	1568,662	75

Apamine (24345-16-2) ; C <sub>79</sub> H <sub>130</sub> N <sub>31</sub> O <sub>24</sub> S <sub>4</sub> <sup>-</sup>	2024,879	21
ACTH fragment 18-39 (53917-42-3) ; C <sub>112</sub> H <sub>164</sub> N <sub>27</sub> O <sub>36</sub> <sup>-</sup>	2463,184	3,4

Lorsque le mélange de peptides est conservé, même à – 20 °C, le spectre de masse MALDI obtenu évolue sensiblement au cours du temps. Cette évolution tient à des processus de dégradation des peptides mis en solution dans les mélanges étalons préparés. La cinétique de dégradation diffère d'un composé à l'autre, certains peptides réagissant même avec le solvant au cours du temps<sup>[99]</sup>.

Une autre technique utilisant toujours ces mêmes peptides dans CHCA permet d'obtenir un spectre de masse d'étalonnage avec une préparation facilitée. Elle consiste à placer côte à côte des solutions préparées séparément, puis à additionner les spectres obtenus dans les mêmes conditions d'appareillage. Cette technique peut être utilisée également afin d'améliorer un mélange étalon déjà préparé, en ajoutant un point d'étalonnage au-delà de la gamme de masse couverte. Ainsi notre mélange étalon a maintes fois servi de base augmentée par le dépôt d'une poussière de Fullerène C<sub>60</sub> (*m/z* 720,00) ou d'un dépôt de matrice contenant la chaîne β de l'insuline oxydée (N° CAS : 30003-72-6 ; [M-H]<sup>-</sup> *m/z* 3492,6362), placé à côté du dépôt du mélange étalon. Cette technique peut induire des écarts de masse, à cause de la différence de vitesse initiale et de la distribution spatiale<sup>[100]</sup> des ions désorbés issus de différents dépôts<sup>[101]</sup>. Toutefois, dans notre cas, cet écueil a été évité et la qualité de l'étalonnage constatée était aussi bonne par cette méthode que grâce à l'utilisation d'un mélange unique.

L'utilisation de peptides comporte un inconvénient financier lié à la fois aux coûts de leur fabrication et à la nécessité de les renouveler fréquemment car leur stabilité dans le temps est limitée. Afin de pallier cet inconvénient, des mélanges étalons réalisés à partir de dendrimères insensibles à l'oxydation et stables dans le temps ont récemment été mis sur le marché<sup>[102]</sup> mais cette solution n'est adaptée que pour le mode positif.

Des composés minéraux, soit du phosphore rouge<sup>[95]</sup> déposé directement sur la plaque, soit de l'iodure de césium<sup>[94]</sup> mis dans une matrice, ont été testés avec un succès mitigé. Les essais réalisés avec le phosphore rouge, par LDI, n'ont donné aucun résultat convaincant. Par ailleurs, les résultats publiés à ce sujet ont été contestés par la suite<sup>[96]</sup>. L'iodure de césium mis dans la matrice DCTB se désorbe et s'ionise sous forme d'agrégats de la forme [(CsI)<sub>n</sub>I]<sup>-</sup> en

négatif. Bien que les résultats précédemment obtenus<sup>[94]</sup> montrent que des ions jusqu'à  $m/z$  20 000 soient visibles, les agrégats détectés au cours de nos études se sont révélés de taille bien plus modeste.

Enfin, une autre méthode d'étalonnage a pu être utilisée dès que des analytes ont été caractérisés. Elle consiste à ioniser un POM de formule  $[\text{SiW}_{10}\text{O}_{38}\text{P}_2\text{C}_{24}\text{H}_{50}]^{4-}$  (dénommé POMc12 dans ce document) en présence du cation  $\text{Al}^{3+}$ . Ce mélange, dans la matrice 9-cyanoanthracène (CNA), produit sous conditions MALDI l'espèce moléculaire intacte  $[\text{POMc12}+\text{Al}]^-$  et lorsque la puissance laser utilisée est forte (1,5\*seuil par exemple) la production abondante d'ions fragments est détectée (voir Figure 8). Les rapports  $m/z$  des ions fragments et de l'espèce moléculaire intacte sont alors utilisés pour un protocole d'étalonnage (interne ou externe). Le Tableau 2 rassemble les formules et les rapports  $m/z$  de ces ions qui sont régulièrement répartis sur la gamme des  $m/z$  enregistré.

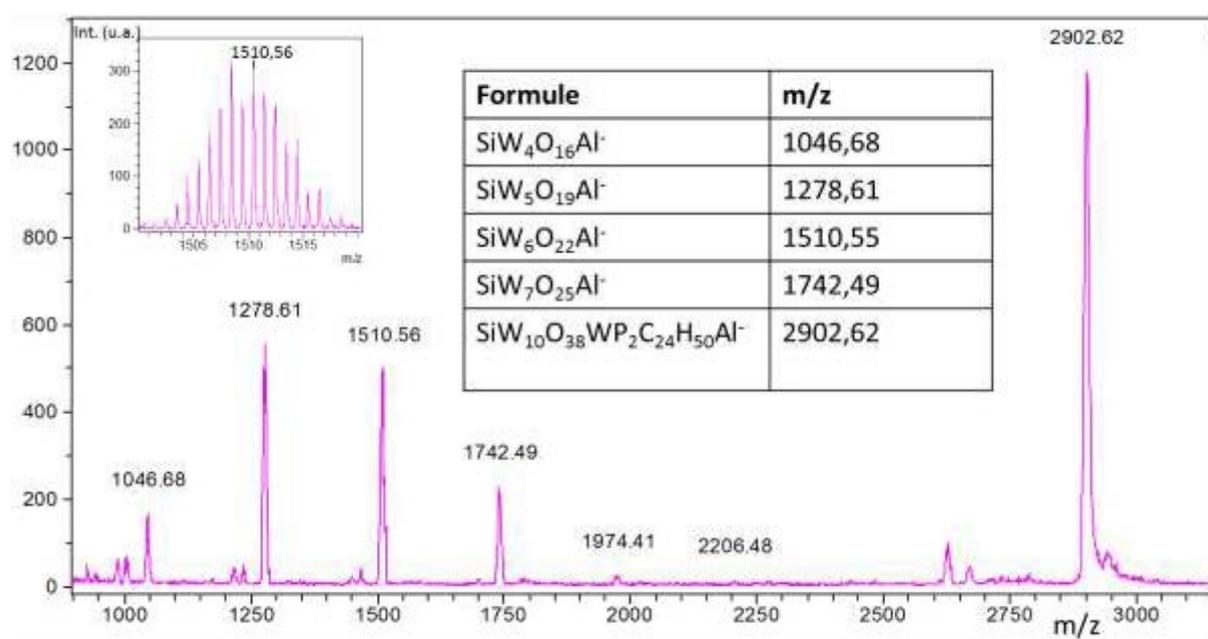


Figure 8 : Spectre MALDI du mélange CNA+POMc12 en présence d' $\text{Al}^{3+}$ , laser 1,5\*valeur seuil, 60 tirs. Tableau 2 : détails des formules et masses des ions fragments utilisés pour étalonner l'appareil.

Cette méthode d'étalonnage est particulièrement aisée à mettre en place et l'utilisation de composés tels que notre polyoxométallate, produisant des fragments en source est une technique prometteuse pour étalonner les spectromètres de masse utilisant la source MALDI. Il

a été remarqué qu'un POM non fonctionnalisé donne des fragments du même type que ceux observés avec notre POMc12 présenté ici. Il faut toutefois noter que l'étalonnage en MALDI-TOF tient compte de la puissance laser, en effet lorsqu'une puissance laser très différente est utilisée la désorption des ions s'effectue avec des vitesses initiales différentes ce qui influe très légèrement sur la vitesse des ions dans le TOF et modifie de ce fait l'étalonnage.

## **2.2. Développement de la technique MALDI pour l'analyse de POMs**

Dans cette section, sont présentés les analytes que sont les POMs et les expériences d'analyse en MALDI ou LDI publiées par la communauté internationale sont reportées et détaillées. Une présentation générale de ces composés est initialement abordée, pour ensuite détailler la nature de ceux utilisés au cours de notre étude. Constatant le faible intérêt de la littérature pour l'analyse de ces composés par MALDI, une première étape vise à détailler le travail réalisé pour mettre au point une méthode d'analyse des POMs. Le procédé développé ayant été initialement exploratoire, un grand nombre de matrices enrichies par la suite de diverses co-matrices ou sels ont été testées de manière systématique. Une fois le détail du mélange réalisé ayant été explicité, les conditions d'analyses optimisées seront détaillées. Le vocabulaire lié à l'utilisation d'un appareil dont la source d'ionisation se sert d'un laser sera détaillé à la suite. Cette particularité amènera à considérer la puissance des tirs laser dans les conditions d'analyse pour discuter de la production des ions à détecter.

### **2.2.1. Présentation des polyoxométallates (POMs)**

Les polyoxométallates rassemblent une classe d'édifices moléculaires dont la caractéristique première est de pouvoir contenir un grand nombre d'oxydes métalliques reliés de manière ordonnée. Les métaux utilisés pour la synthèse de ces composés appartiennent aux colonnes V et VI, les métaux utilisés sont principalement le tungstène (W), le molybdène (Mo) ou le vanadium (V) et se retrouvent à haut degré d'oxydation entourés de ligands oxo ( $O^{2-}$ )<sup>[103]</sup>. Leur synthèse est réalisée à partir d'acides métalliques (tels que  $WO_4H_2$ ) qui s'arrangent et forment des liens covalents. Les polyoxométallates les plus communs ont des structures basées sur des assemblages de 12 ou 18 octaèdres composés d'un centre métallique entourés de six ligand oxo ( $O^{2-}$ ) organisés autour d'un ou deux centre(s) structurant qui est(ont) en général des phosphates ( $PO_4^{3-}$ ) ou silicates ( $SiO_4^{4-}$ ). Certains de ces ligands sont pontants entre plusieurs octaèdres. D'autres sont liés uniquement au métal central. Les POMs à 12 ou 18 métaux sont

dénommés par les appellations Keggin ou Dawson, respectivement comme représentés en Figure 9.

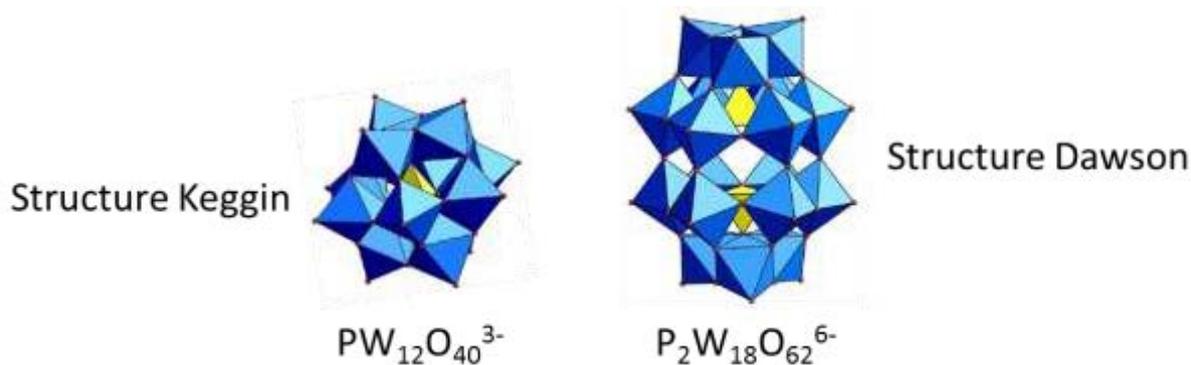
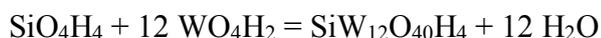


Figure 9 : Structures de bases des POMs à 12 ou 18 centres métalliques, et un ou deux centre(s) structurant utilisés pour la synthèse de nombreux composés hybrides. La dénomination Keggin et Dawson est l'appellation de ces deux familles de composés.

La taille finale de l'édifice est variable, les plus volumineux sont de taille nanométrique. Toutefois, bien que leurs tailles puissent atteindre quelques de nanomètres, les molécules issues d'une même synthèse sont toujours parfaitement définies et identiques entre elles. Cette capacité à produire des edifices dont la composition est exacte provient de leur mode de synthèse, qui consiste justement à assembler de petits edifices de manière ordonnée comme le laisse entrevoir l'équation bilan suivante qui mène à la synthèse d'un POM de structure Keggin.



Ces constructions s'effectuent autour de centres structurants fortement chargés négativement au départ, ce qui induit la formation d'espèces plusieurs fois chargées négativement au final. Les POMs fonctionnalisés contiennent généralement entre 2 et 11 charges négatives<sup>[104]</sup> qui sont entièrement délocalisée sur la structure oxométallique et n'ont pas de localisation attribuées. Les POMs sont de ce fait considérées comme des anions polarisables. Portées par les POMs, elles induisent la présence, en solution comme sous forme cristallisée, de contre-ions chargés positivement : il s'agit, en général, soit de cations alcalins ( $Na^+$ ,  $K^+$ ), soit d'ammoniums quaternaires (tétraméthylammonium (TMA), tétrabutylammonium (TBA)).

Les polyoxométallates se retrouvent donc sous forme de sels ( $\text{POM}^{n-} + n \text{ cations}^+$ ) et se voient qualifiés d'oxydes solubles, tant leur solubilisation dans des milieux aqueux ou organiques est aisée. En effet, la nature des contre-ions module la solubilité des POMs, les ammoniums augmentant leur solubilisation dans des milieux organiques, au contraire des alcalins.

La Figure 10 présente quelques exemples de structures de POMs synthétisés par notre laboratoire (équipe E-POM de l'IPCM, UMR 8232), dont la taille, la structure et les applications sont variées. Les deux structures les plus petites ont été caractérisées dans notre groupe par spectrométrie de masse en utilisant une source ESI, tandis que la structure centrale qui s'agrège pour former des structures plus importantes n'a pas encore été caractérisée sur notre instrument.

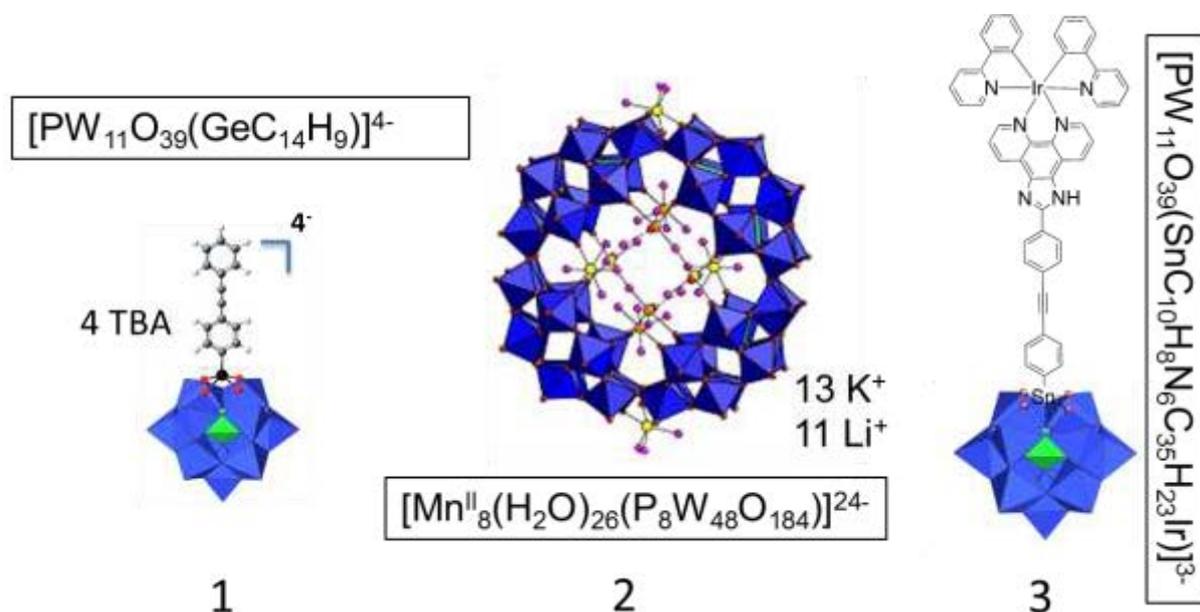


Figure 10 : POMs 1 , 2 , 3 annotés de leurs formules brutes et de leurs contre-ions. (Figures utilisées avec autorisation , où demandées expressément auprès de membres de l'équipe E-POM de l'IPCM).

La découverte des POMs est fort ancienne puisque le premier composé synthétisé a été obtenu en 1826, bien que sa structure exacte ait dû attendre 1933 pour être déterminée<sup>[103]</sup>. L'utilisation de POM pour des procédés industriels a lieu depuis de nombreuses années<sup>[105]</sup> et s'appuie notamment sur leurs propriétés oxydo-réductrices. La fonctionnalisation de ces édifices minéraux par le greffage de parties organiques, ou organométalliques, ouvre des voies

encore plus larges pour leur utilisation. Les champs potentiels d'applications se révèlent en effet nombreux et couvrent, à titre d'exemple, la catalyse (1), le stockage d'information ou le photovoltaïque (3)<sup>[106]</sup>.

Une fois synthétisés, la caractérisation de ces composés se fait par diffraction des rayons X, par RMN, par voltamétrie cyclique et par spectrométrie de masse<sup>[107][108]</sup>. Ce type de molécules pourrait particulièrement bien être analysé par MALDI, tant par la masse qu'elles peuvent atteindre de ces composés que par leur nature robuste. Pourtant, peu d'exemples portent sur la caractérisation de POMs par MALDI ou par LDI (LDI pour « Desorption Laser Ionization » c'est à dire sans l'ajout de matrice) sont rapportés dans la littérature. Il est en effet possible de recourir à la technique d'ionisation LDI car les POMs ont des propriétés d'absorption de la lumière UV. Cela leur permet de se désorber et de s'ioniser lors des tirs de lumière UV<sup>[109]</sup>. Cette capacité à absorber la longueur d'onde<sup>[110]</sup> provient de la présence de leur cage oxométallique. Ces études montrent que les ions détectés, qu'ils soient des ions fragments ou des espèces chargées intactes, sont toujours majoritairement mono-chargés.

Une publication datée de 2006<sup>[111]</sup>, utilisant la matrice DCTB a montré la présence dans le spectre de masse MALDI d'un large massif de pics attribués à l'ion moléculaire du POM  $K_8SiMo_8W_3O_{39}$ . Toutefois, la comparaison des pics obtenus avec le spectre de masse théorique de cette espèce suggère que plusieurs espèces sont mélangées et qu'elles correspondent au composé sous la forme d'adduits avec différents contre-ions. Cette même étude a testé l'analyse du même composé par LDI, mais l'espèce moléculaire intacte n'a pas été observée. Un autre cas récemment publié en 2013<sup>[112]</sup> a montré aussi une analyse de POMs en LDI, celle-ci étant improprement qualifiée d'analyse MALDI, puisque la préparation de l'échantillon s'est opérée sans le concours d'une matrice. L'espèce moléculaire intacte en même temps que de nombreux ions fragments ont été détectés pour le composé représenté sur la

Figure 11 en  $\sigma$ . Cette espèce portant deux charges négatives a été observée sous forme d'anion mono-chargé avec adduction d'un TBA.

Deux autres études<sup>[109,113]</sup> mentionnent l'analyse de POMs en utilisant la matrice CHCA, très communément utilisée en MALDI pour l'analyse de composés biologiques. L'étude la plus récente date de 2011<sup>[109]</sup> et montre la détection d'un anion formé par interaction entre une porphyrine et un édifice polyoxométallique de formule  $PW_{12}O_{40}H_3$  (voir  $\rho$  en

Figure 11). L'autre étude publiée en 2004<sup>[113]</sup> montre différentes espèces moléculaires ionisées sous forme d'adduits entre l'espèce polyanionique et des cations TBA ou des H<sup>+</sup>. Les pics observés étaient peu résolus et les espèces se présentaient sous de nombreuses formes d'adduits entre le polyanion et un nombre variable de TBA et de H<sup>+</sup>, y compris des dimères, toutes détectées sous forme monochargées en mode ion positif, ce qui n'a jamais été observé dans notre cas.

Pour notre part, les composés à notre disposition ont été testés par LDI sans qu'aucun résultat satisfaisant n'en ressorte. Seul un POM non fonctionnalisé ([SiW<sub>10</sub>O<sub>40</sub>]<sup>3-</sup>) a permis la visualisation de pics dans la région de l'espèce moléculaire ionisée en LDI (représenté dans le Tableau 3).

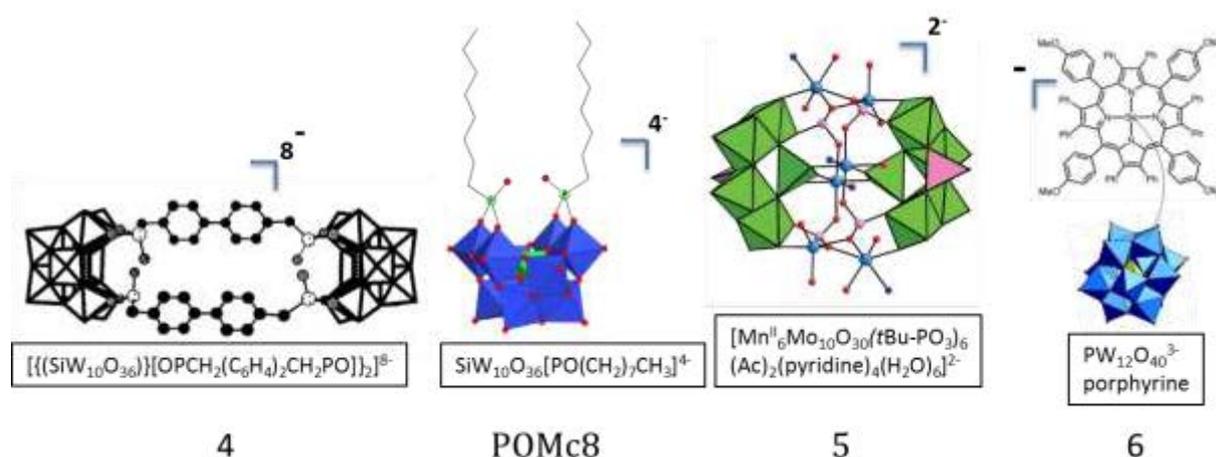


Figure 11 : Structures de différents POMs détectés sous forme d'espèces moléculaires intactes. La molécule 4 fut observée sous forme de cation en 2004<sup>[114]</sup> **POMc8** est un composé présenté dans ce rapport. La molécule 5 fut observée en LDI en 2013<sup>[112]</sup>, et 6 fut observée avec CHCA en 2011<sup>[109]</sup>.

Les produits synthétiques à notre disposition proviennent d'une équipe de l'IPCM, l'équipe E-POM, appartenant à notre laboratoire, spécialisée dans la synthèse de polyoxométallates fonctionnalisés. Nous collaborons étroitement avec cette équipe pour la caractérisation de leurs produits par spectrométrie de masse depuis quelques années<sup>[115,116]</sup>. Ces analyses sont couramment réalisées sur notre instrument LTQ-Orbitrap ayant pour source d'ionisation l'ESI. Les POMs sont aisément ionisés en polarité négative sous forme d'anions

multichargés par la technique ESI, mais génèrent une forte pollution de l'appareillage, et sont la cause d'effets mémoire dégradant durant plusieurs jours les analyses ultérieures. Ce sont principalement les contre-ions ammoniums qui polluent la source : bien qu'ils ne soient pas détectés lors de l'analyse en mode négatif, ils restent durablement dans la source et sont aisément détectés en mode positif.

Lors de l'utilisation d'une source ESI, un instrument à ultra-haute résolution est souhaitable pour l'analyse de ces composés. Comme il est montré sur le spectre de masse de la Figure 12, les espèces moléculaires multichargées sous forme d'adduits induisent la présence de plusieurs pics isotopiques par unités de masse, ce qui nécessite un grand pouvoir résolutif pour obtenir un massif isotopique résolu et accéder à la composition élémentaire de l'ion.

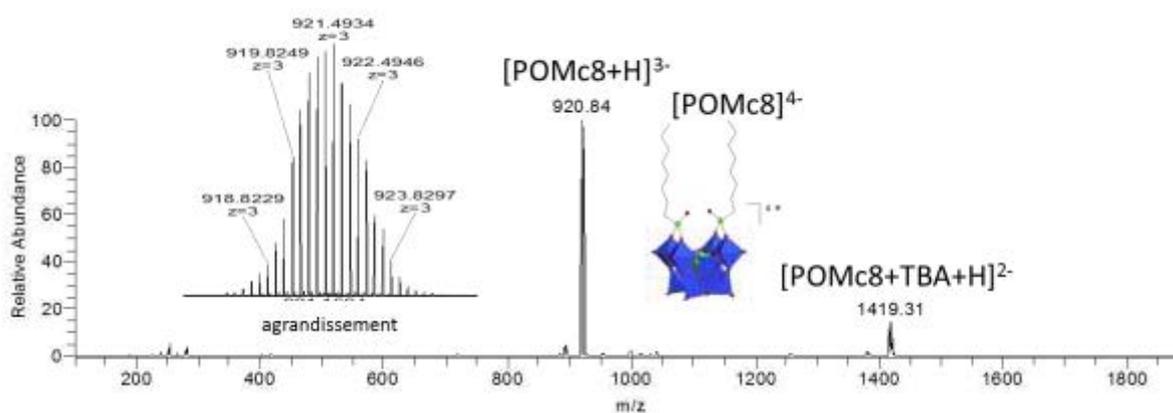


Figure 12 : Spectre ESI acquis sur le LTQ-Orbitrap de  $[SiW_{10}O_{38}P_2C_{16}H_{34}]^{4-}$  (POMc8) en ultra haute résolution avec un pouvoir résolutif théorique de 100 000 à  $m/z$  400.

A ce niveau, une analyse MALDI de ce type de composé pourrait être extrêmement attractive. Un avantage majeur de la technique MALDI est de produire exclusivement des ions mono-chargés, ce qui permet d'utiliser un analyseur en masse de plus faible pouvoir résolutif, dont le coût d'équipement et de fonctionnement est, par ailleurs, bien moindre.

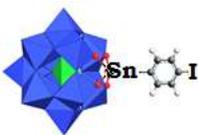
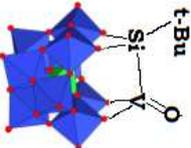
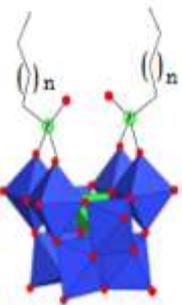
En outre, la préparation d'échantillons pour l'utilisation d'une source ESI nécessite d'ajuster la composition du solvant qui doit être à la fois compatible avec l'utilisation de la source ESI ( cad : concentration des analytes, volatilité des solvants) et compatible avec la solubilisation des espèces considérées, qui dans de rares cas nécessitent des solvants exotiques (DMSO par exemple) peu conseillés pour la source ESI. Le MALDI est connu pour offrir une

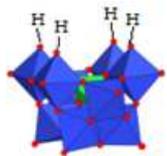
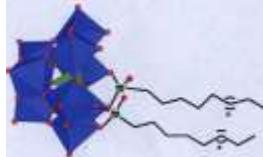
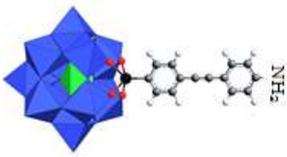
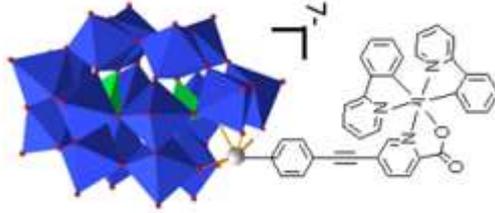
plus grande latitude en termes de préparation d'échantillons et notamment de choix du solvant (même si le choix de la matrice reste primordial).

Une grande partie des POMs disponibles, accumulés au cours des expériences de caractérisation par ESI-LTQ-Orbitrap, a été utilisée. Le Tableau 3 rassemble la liste de certains de ces composés testés et les résultats majeurs obtenus lors des essais par MALDI.

On remarquera qu'un nombre restreint de POMs fonctionnalisés a été détecté en MALDI sous la forme d'espèces moléculaires intactes : hormis une série de POMs dont les structures sont très proches, seules leurs parties fonctionnalisées étaient différentes. Un POM non fonctionnalisé a également longuement été testé. C'est justement sur la base de ces composés que nous avons focalisé le développement de l'ionisation MALDI en mode ion négatif, bien que d'autres POMs aient été testés à maintes reprises lors des évolutions de la mise au point de la préparation d'échantillons avec un succès plus mitigé.

Tableau 3 : POMs testés et donnant des pics abondants avec leurs interprétations.

Formule brute (et nom utilisé dans ce document)  Masse de l'espèce mutichargée (les contre-ions sont des TMA, TMA, Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> ou H et peuvent varier en fonction des conditions de synthèse puis des réactions d'échanges de cations.	Ions les plus proches de l'espèce intacte obtenue
$[PW_{11}O_{39}SnC_6H_4I]^{4-}$  3001 Da  	Fragment $[PW_{11}O_{38}SnC_6H_4IH]^-$
$[PW_{10}O_{38}VSiC_4H_9]^{3-}$  2614 Da  	Attribution incertaine de la formule $[PW_{10}O_{37}VSi]^-$
$[SiW_{10}O_{38}P_2C_{24}H_{50}]^{4-}$ (POMc12) 2875 Da $[SiW_{10}O_{38}P_2C_{20}H_{42}]^{4-}$ (POMc10) 2819 Da $[SiW_{10}O_{38}P_2C_{16}H_{34}]^{4-}$ (POMc8) 2763 Da $[SiW_{10}O_{38}P_2H_2]^{4-}$ 2539 Da  	Espèces moléculaires intactes multiples, adduits de différents cations (détaillé en partie résultats)

$[\text{SiW}_{10}\text{O}_{36}\text{H}_4]^{4-}$ 2447 Da 	Pics multiples, aucune attribution trouvée
$[\text{SiW}_9\text{O}_{36}\text{P}_2\text{C}_{24}\text{H}_{50}]^{6-}$ 2659 Da 	Pics multiples, aucune attribution trouvée
$[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}\text{GeC}_{14}\text{H}_8\text{NH}_2]^{4-}$ 2944 Da 	Pics multiples, aucune attribution trouvée
$[\text{PW}_{11}\text{O}_{39}\text{SnC}_8\text{H}_4(\text{C}_6\text{H}_4\text{N})]^{4-}$ 2988 Da 	Fragment $\text{PW}_{11}\text{O}_{38}\text{Sn}(\text{Ph})\text{CC}(\text{C}_6\text{H}_4\text{NH})^-$
$[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$ ( <i>POMv</i> ) 2860 Da 	DaIon $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}\text{Li}_2]^-$ (détaillé à la suite). Possibilité de le voir sous forme $[\text{PW}_{12}\text{O}_{39}]^-$ en LDI.
$[\text{P}_2\text{W}_{17}\text{O}_{63}\text{SnC}_{36}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{Ir}]^{7-}$ 5038 Da 	Uniquement des ions fragments de basse masse (< m/z 3500)

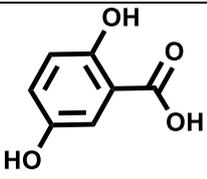
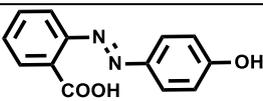
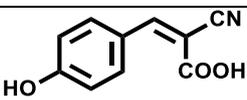
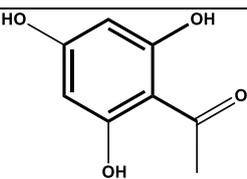
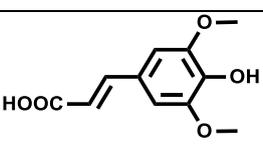
### 2.2.2. Choix des matrices

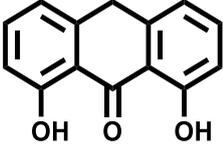
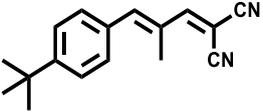
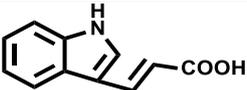
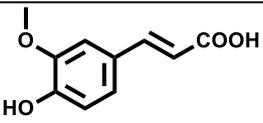
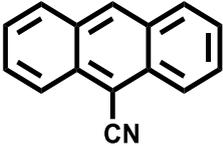
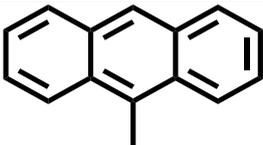
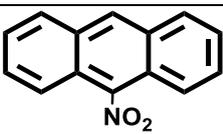
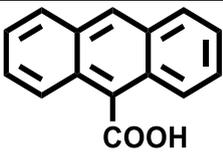
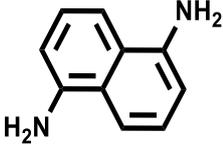
Les études trouvées dans la littérature montrent qu'il est nécessaire de recourir à l'utilisation d'une matrice sans quoi, à de rares exceptions près, il est impossible d'ioniser les POMs sous forme intacte. Seuls des ions mono-chargés sont visibles, et c'est ce qui a été constaté aussi lors des expériences menées dans le cadre de ces travaux. Les espèces polyanioniques que sont les POMs forment donc des adduits avec des contre-ions positifs. La première étape consista à tester de nombreuses matrices pour déterminer quelles préparations permettent l'ionisation de ces composés.

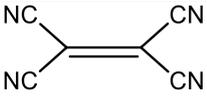
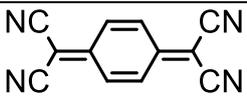
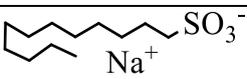
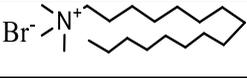
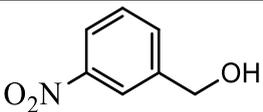
La plupart des molécules utilisées en tant que matrice dans cette étude avait été achetée en tant que matrice pour le MALDI, elles étaient de grande pureté car spécialement dédiées

pour les analyses MALDI et furent utilisées telles quelles. Nous avons testés les matrices reportées dans le Tableau 4 pour l'analyse MALDI en mode ions négatifs des POMs mais également pour d'autres familles de composés (voir partie 3.1.3). La matrice CNA n'est pas véritablement vendue en tant que matrice et donc sa pureté était faible (97%). Une étape de purification fut nécessaire. Elle a consisté en premier lieu à laver ce composé avec de l'eau distillée avant de le solubiliser dans du THF pur pour, ensuite, y ajouter de l'eau distillée provoquant sa précipitation. Le solide filtré obtenu fut lavé avec une solution 1/1 eau/acétonitrile puis avec de l'éthanol absolu avant de le laisser sécher à l'air libre. Assurément cette technique rapide ne permet pas d'obtenir un solide de haute pureté, toutefois cela semble suffisant. Le fait que la matrice CNA ne nécessite pas une très grande pureté est positif car cela en fait une matrice à faible coût (10€/g alors que DCTB coûte 100€/g).

Tableau 4 : Matrices et co-matrices testées pour l'ionisation de POMs

Nom (anglais) (numéro CAS)	Abbré- viations	Structure	Applications
2,5-Dihydroxybenzoic acid (CAS 490-79-9)	DHB		Carbohydrates Peptides/protéines <sup>[114]</sup>
2-(4-hydroxyphenylazo)- benzoic acid (CAS 1654-82-8)	HABA		Oligosaccharides, protéines <sup>[114]</sup>
$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CAS 28166-41-8)	CHCA		Peptides/protéines <sup>[114]</sup>
Trihydroxyacetophenone (CAS 480-66-0)	THAP		Oligonucléotides <sup>[114]</sup>
3,5-Dimethoxy-4- hydroxycinnamic acid (CAS 530-59-6)	SA		Oligonucléotides <sup>[114]</sup>

Dithranol (CAS 1143-38-0)	DIT		Polymères synthétiques Lipides <sup>[114]</sup>
Trans-2-(3-(4-tert-Butylphenyl)-2methyl-2-propenyliedene)malononitrile (CAS 300364-84-5)	DCTB		Molécules inorganiques [114]
Trans-3-indoleacrylic acid (CAS 29953-71-7)	IAA		Polymères synthétiques [114]
Ferulic acid	FA		Oligonucléotide <sup>[117]</sup>
9-cyanoanthracene (CAS 1210-12-4)	CNA		Résidus pétroliers <sup>[11]</sup>
9-methyleanthracene (CAS 602-60-8)	∅		Vitamine A <sup>[118]</sup>
9-nitroanthracene (CAS 602-60-8)	∅		Fullerène <sup>[10]</sup>
9-anthracenecarboxylic acid (CAS 723-62-6)	∅		Composés apolaires <sup>[11]</sup>
Diaminonaphtalène (CAS 2243-62-1)	DAN		Peptides, protéines <sup>[119]</sup>
Fullerene C <sub>60</sub> (CAS 99685-96-8)	/		

Tétracyanoethylene (CAS 670-54-2)	TCE		Comatrice
Tétracyanoquinidiméthane	TCNQ		Pigments <sup>[120]</sup> Co-matrice
Sodium dodécylsulfate	SDS		Co-matrice <sup>[121]</sup>
Cétyl-triammonium bromide	CTAB		Co-matrice <sup>[122]</sup>
Méta-nitrobenzyl alcool	M-NBA		Protéines <sup>[123]</sup> Peptides <sup>[124]</sup>

Des essais systématiques utilisant de nombreuses matrices furent donc entrepris avec un grand nombre de POMs fonctionnalisés ou non. Certains de ces analytes sont renseignés dans le Tableau 3, mais peu donnèrent de résultats. En premier lieu les matrices usuellement utilisées en MALDI, furent testées puis complétées par d'autres composés absorbant la longueur d'onde UV du laser. Les premiers essais principalement menés avec les matrices communes que sont DHB, HABA, CHCA, THAP, SA et DIT montrèrent la possibilité d'obtenir des pics de forte intensité avec divers analytes (listés dans le Tableau 3). Les essais de matrices ne se limitèrent pas à l'utilisation des matrices communes, en fait de nombreuses petites molécules ayant la capacité d'absorber la lumière UV du laser ont été essayées. De bons résultats furent obtenus avec le 9-anthracenecarbonitrile, des fullerènes ou nanotubes de carbones furent aussi testés sans que cela ne permette toutefois d'observer des ions moléculaires correspondants à nos analytes.

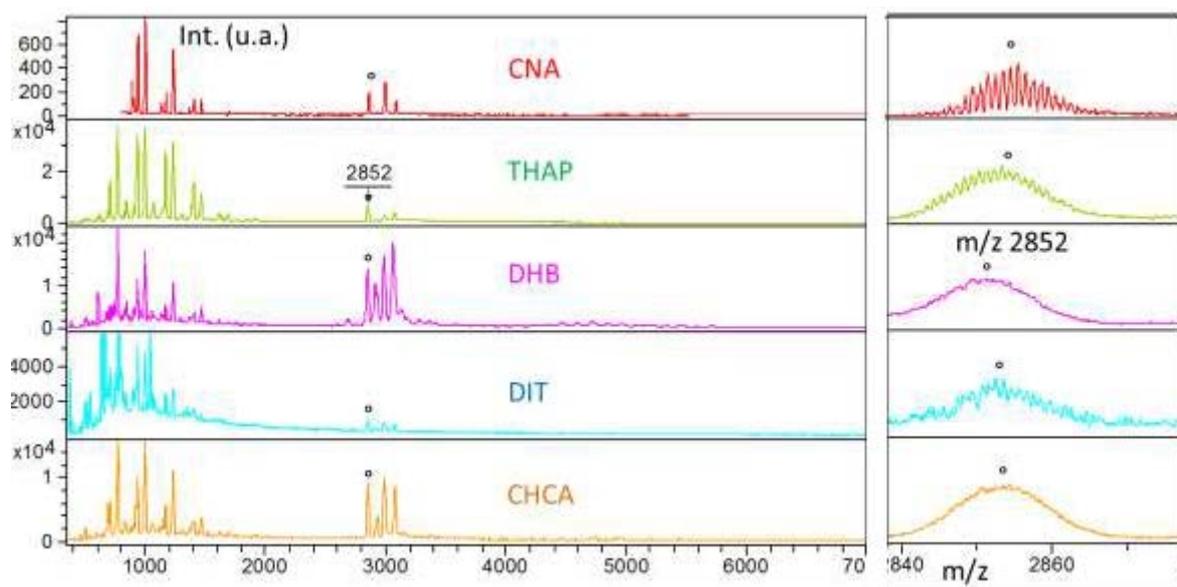


Figure 13 : Spectre MALDI du composé de formule  $[P_2W_{17}O_{63}SnC_{36}H_{23}N_3O_2Ir]^{7-}$  (masse 5038 Da) dans 5 matrices différentes. Agrandissement du signal d'un ion non résolu et inconnu.

On constate sur les spectres de masse de la Figure 13 que de nombreux ions sont observés avec des matrices très différentes. Dans le cas de ce POM, dont la masse moléculaire est de 5038 Da, quelle que soit la matrice utilisée aucun ion de haute masse n'est détecté, ni même des ions qui puisse s'approcher de la masse de l'espèce moléculaire ionisée. Les pics observés sur tous les spectres de masses sont similaires même si le rapport signal sur bruit, qui est un élément fort pour juger de la qualité d'un spectre de masse, est bien meilleur dans certaines matrices que d'autres. La matrice CNA montre en cela des pics dont la qualité est relativement bonne.

Les anthracènes peu polaires sont peu usuels en tant que matrice, ils avaient été choisis dans l'optique d'utiliser des matrices ayant des propriétés de transfert d'électrons (dites « electron-transfert MALDI matrix » pour leur aptitude à produire un cation radical et non protonné<sup>[118]</sup>).

Parmi les analytes produisant des ions intacts aisément figurait le composé POMc8 (chargé 4<sup>-</sup>) dont on possédait des POMs homologues (voir leurs structures dans la Figure 14). Grâce à ces structures proches la détermination de la nature des ions formés en MALDI négatif fut facilitée, car la répétition des expériences avec ces trois analytes montraient quels signaux conservaient une, deux ou aucune des fonctionnalisations.

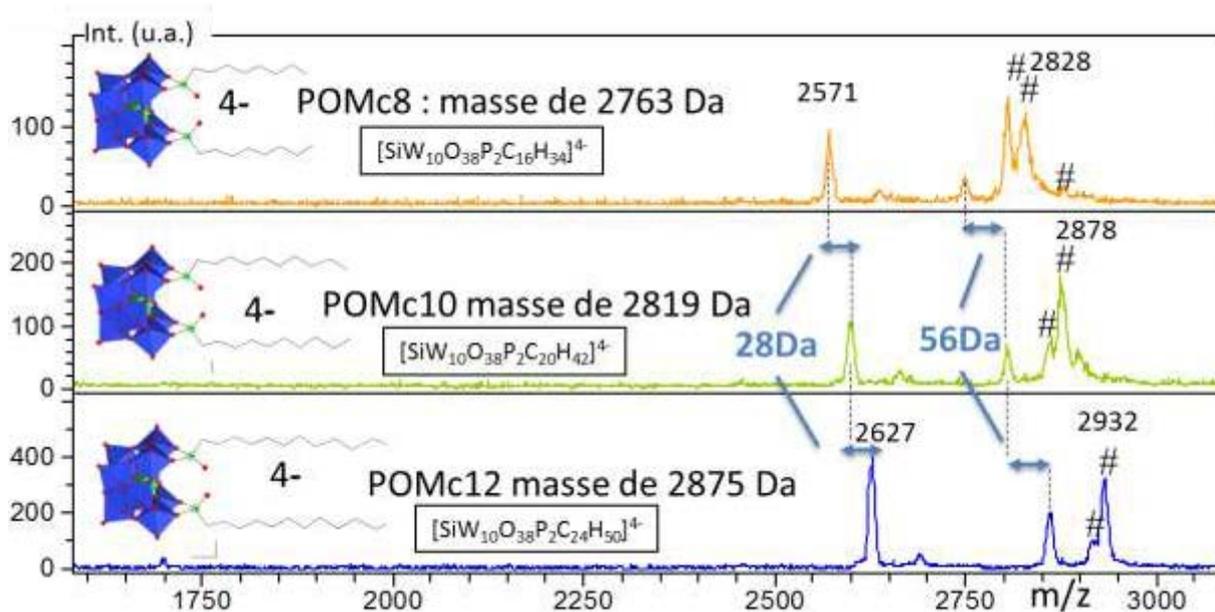


Figure 14 : Spectres MALDI et structures de POMc8, POMc10 et POMc12 dans CNA. Observation de signaux séparés de 28Da ( $-\text{CH}_2\text{-CH}_2-$ ) et de 56Da ( $(-\text{CH}_2\text{-CH}_2)_2$ ). Enregistrés à la puissance laser seuil.

On observe sur les spectres de masse de la Figure 14 que certains ions de rapports  $m/z$  plus faibles que la masse de la structure intacte, et donc des ions fragments, sont espacés de 56 Da. Or une différence de 56 Da correspond à la différence de masse des fonctionnalisations : ces ions contiennent donc encore les fonctionnalisations organiques. Avec la même logique il est aisé de déterminer que les ions de  $m/z$  2571, 2599 et 2627 ont perdu une seule fonctionnalisation. Une fois ces renseignements pris en compte il est possible d'évaluer quels sont les éléments perdus par les POMs. Il fut en revanche impossible d'attribuer des formules pour les signaux dont la masse était plus grande que celle de l'analyte. Ces ions, annotés # sur la Figure 14, étaient fort probablement des espèces moléculaires intactes, correspondant au POM introduit accompagné d'adduits mais il n'était pas possible de déterminer quelles étaient les compositions de ces ions. Qui plus est la multitude des pics autour de l'ion attendu rendaient difficile leurs interprétations.

A l'issue de ces essais systématiques on observa que l'utilisation de quelques POMs permettaient d'obtenir des ions dans toutes les matrices. Les plupart des ions détectés étaient similaires quelles que soient les matrices même si le pouvoir résolutif observé sur les pics était différent. La suite des expériences a été menée en retenant douze matrices différentes, à savoir CNA, IAA, HABA, DAN, DIT, DCTB, CHCA, DHB, FA, SA, HPA et THAP.

Toutefois, quelle que soit la matrice utilisée aucune espèce moléculaire intacte ionisée, dont la masse attendue excède nécessairement la masse des anions tétrachargés, n'avait été déterminé avec succès.

### 2.2.3. Ajout de tensioactifs, de sels et/ou de co-matrices

Il est possible d'ajouter des composés dans la matrice afin de modifier le type d'ions produits. L'ajout du composé dit co-matrice est un procédé courant, dont le principe est de choisir une matrice principale à laquelle un autre composé, dont la quantité avoisine 10%, est ajouté. L'un des exemples les plus connus de mélange de composés permettant l'obtention d'une préparation aux propriétés particulières est le *super-DHB*<sup>[125]</sup>. Ce mélange composé d'un mélange 9/1 de DHB/acide-2-hydroxy-5-methoxybenzoïque est commercialisé par des fournisseurs de produits, preuve de sa vaste utilisation. Ces mélanges permettent notamment d'utiliser des composés qui n'absorbent pas à la longueur d'onde du laser (exemple TCE). Il existe de multiples exemples mentionnant l'utilisation de mélanges de composés améliorant la reproductibilité<sup>[126]</sup> et la sensibilité<sup>[127]</sup> la tolérance aux sels polluants<sup>[128]</sup> ou encore la polyvalence envers de multiples analytes<sup>[129]</sup>. Au cours de nos essais, des mélanges de matrices ou co-matrice ont été réalisés, en particulier la nature du groupement cyano que portent certaines matrices a été étudiée par l'introduction de composés riches en cette fonction. Il s'agit du tétracyanoéthylène (TCN représenté dans le Tableau 4) ou le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ). La volonté d'obtenir des anions multichargés, similaires à ceux produits par la source ESI pour nos analytes, nous a également poussé à utiliser le m-NBA comme co-matrice (voir Tableau 4). Ce composé a montré un pouvoir d'agent super-chargeant lors d'analyse de simple brin d'ADN<sup>[130]</sup> en ESI, bien qu'aucun ion multichargé n'a été observé lors de nos recherches.

L'ajout de tensioactif est un procédé commun en analyse de spectrométrie de masse protéomique. Les tensioactifs aidant les protéines ou peptides hydrophobes à se mélanger à la solution de matrice afin de permettre leur ionisation sans discrimination. Dans cette étude préliminaire, l'ajout de tensioactifs ioniques a été testé dans l'analyse de POMs dans l'idée de promouvoir les espèces moléculaires intactes, et si possible une seule espèce moléculaire ionisée. En effet nos analytes étant chargés il était envisageable que des interactions électrostatiques se créent. Certains des POMs utilisés, la famille de POMc12 représentée en *Figure 12*, sont d'ailleurs des tensioactifs eux mêmes et peuvent donc former des complexes avec des tensioactifs ajoutés. Deux tensioactifs, le dodécylsulfate de sodium (SDS) et le bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB représentés en Tableau 4) ont été utilisés. Le SDS

est un tensioactif cationique tandis que le CTAB est un tensioactif anionique ce qui permettait d'évaluer si des interactions électrostatiques pouvaient avoir lieu avec nos polyanions.

Si l'ajout de CTAB ou de SDS ne changeait pas grand chose aux spectres de masses des POMs fonctionnalisés, l'apparition de nouveaux pics au-delà de la masse de l'ion intact fut constatée lors de l'ajout de SDS dans le mélange matrice d'un POM non fonctionnalisé, le POMv. La Figure 15 présente l'apparition de nouveaux signaux dont la masse dépasse le poids moléculaire de cette espèce tri-chargée lors de l'ajout de SDS.

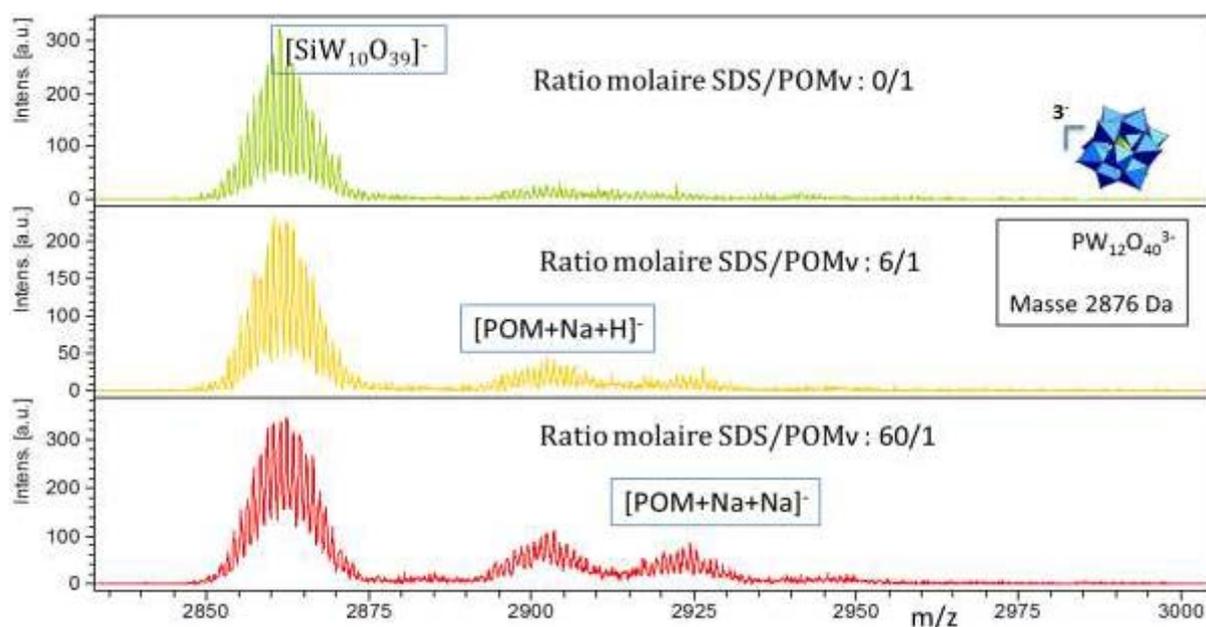


Figure 15 : Spectres MALDI de POMv préparé dans CNA avec ajout de SDS, enregistrés à la puissance laser 55u.a. et 100 tirs.

Les nouveaux ions ont été identifiés comme des ions adduits au sodium, contenant soit un sodium et un proton, soit deux sodium. On observe que plus on ajoute de SDS, plus les adduits sont abondants. Le tensioactif en tant que tel se révéla donc inutile, aucun adduit possible entre le POM et les tensioactifs n'a été observé, on n'observe pas non plus l'augmentation d'intensité des pics ni la diminution de l'ion fragment centré sur m/z 2860. Seul l'apport de cation sodium, dans le cas du SDS, permet d'observer l'espèce moléculaire ionisée. Une fois compris que des ions intacts pouvaient être obtenus par formation d'espèce adduit de cations avec les polyanions, de nombreux autres cations furent utilisés.

De nombreux cations ayant pour but de promouvoir la formation d'une espèce moléculaire intacte unique ont été essayés, l'objectif étant non seulement de promouvoir

l'ionisation d'ions contenant le POM intact mais aussi de ne former qu'une seule espèce moléculaire. En effet il est avantageux d'ioniser les POMs sous une forme unique afin d'éviter toute superposition de massifs isotopiques qui rendent difficile la détermination de la nature des ions.

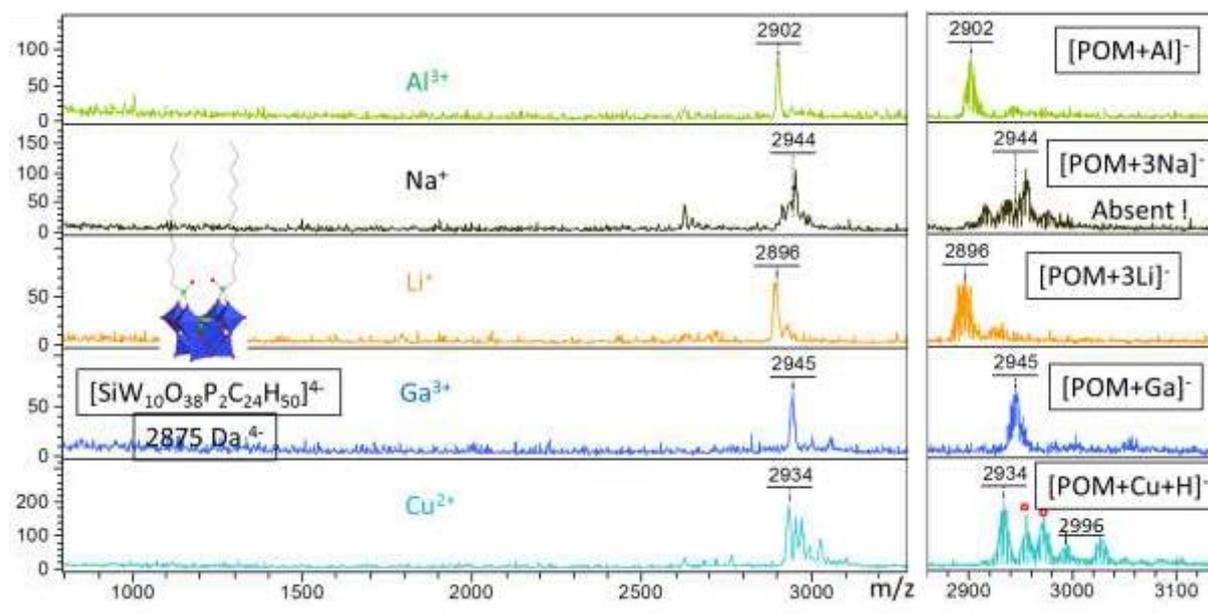


Figure 16 : Spectres MALDI de POMc12 préparés dans CNA en présence de cations (rapport molaires 1500/150/1 CNA/cation/POM) enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.

Considérant la nécessité de produire des ions relativement distants, tous les cations ne permettent pas d'obtenir des spectres de masses exploitables. On observe sur la Figure 16 que certains cations (ici  $^{27}\text{Al}^{3+}$ ,  $^7\text{Li}^+$ ,  $^{69}\text{Ga}^{3+}$ ) permettent d'obtenir une unique espèce moléculaire intacte correspondant à celui logiquement attendu tandis que d'autres comme  $\text{Cu}^{2+}$  permettent la production de divers adduits mixtes, parmi lesquels figure celui attendu, et enfin des cations comme  $\text{Na}^+$  qui produit de nombreux ions, dont les massifs isotopiques se superposent, sauf celui attendu à 2944. Le spectre de masse du mélange contenant du cuivre(II) présente deux massifs annotés d'étoiles\*, ces massifs correspondent aux ions  $[\text{POM}+\text{Cu}+\text{Na}]^-$  et  $[\text{POM}+\text{Cu}+\text{K}]^-$  (de  $m/z$  2956 et  $m/z$  2972). Il n'y a pas eu d'ajout volontaires de Na ou K, ces cations sont présents en tant qu'impuretés dans la préparation d'échantillon.

Des mélanges de cations ont été réalisés pour évaluer la possibilité d'obtenir des espèces mixtes ou plusieurs espèces en même temps. Ces résultats sont présentés en partie 3.2 où l'on observe que l'attachement des cations à l'espèce polyanionique se révèle concurrentiel. Dans

la plupart des cas seulement un seul cation est présent dans l'espèce moléculaire. Il existe des exceptions, fréquente avec les cations divalents, telles que celle observées pour le cuivre(II) ici.

#### **2.2.4. Mise au point des solutions et de la méthode de dépôt**

La préparation des échantillons choisie est la méthode de la goutte séchée (« dried droplet » en anglais). Il s'agit d'une méthode simple qui consiste à mélanger dans un solvant : la matrice, les possibles co-matrices et l'analyte. Une goutte de 1  $\mu\text{L}$  est ensuite déposée sur la plaque d'échantillon puis laissée sécher. Il en résulte un dépôt solide cristallisé (voir Figure 18). La première étape consiste à mettre en solution la matrice, qui est initialement sous forme de poudre. De manière à conserver des conditions semblables pour toutes les solutions, la concentration des matrices a été fixée à 10 g/L et le solvant utilisé a été identique pour tous les composés utilisés. Toutefois, l'utilisation de multiples matrices dont les propriétés physicochimiques sont bien différentes induit un problème immédiat relatif à leur solubilisation. En effet, si CHCA et DHB sont solubles dans des solvants polaires et aqueux, il en est autrement pour CNA, DIT ou DCTB, dont le solvant ordinairement utilisé est le dichlorométhane. Pour utiliser un solvant commun il a fallu mettre au point un mélange de solvants capable d'autoriser la solubilisation de toutes ces matrices à la même concentration et également compatible avec les analytes étudiés (POMs, polymères, fullerènes).

Le choix du solvant ne pouvant pas être uniquement basé sur ses propriétés de solubilisation des produits, il doit aussi permettre la formation aisée d'un dépôt « rond » sur les cibles métalliques. Pour ce faire, il est préférable d'obtenir une tension de surface importante de la solution, par exemple grâce à l'eau, dont la présence améliore la tenue de la goutte.

Un mélange de solvant ternaire contenant 50% de MeCN, 40% de THF et 10% d'eau a donc été mis au point. Le MeCN est fréquemment utilisé avec l'eau pour les matrices protiques. Le THF permet de solubiliser les matrices peu polaires et l'on arrive à introduire 10% d'eau pour que le dépôt ne s'étale pas trop. Il est impossible d'introduire davantage d'eau sans provoquer la précipitation des matrices les moins polaires. L'intérêt de l'introduction d'eau est également d'augmenter la solubilité des sels introduits qui, sinon, précipiteraient. Un tel solvant nous autorise à déposer jusqu'à 1  $\mu\text{L}$  sur la plaque en inox pour que la tache provoquée reste cantonnée à la taille du puits de 3 mm de diamètre (voir Figure 18).

On ajoute les sels, préalablement solubilisés à 0,5 M dans l'eau, dans la solution de matrice à hauteur de 1 % volumique. Ce faible volume de solution aqueuse contenant les sels permet d'introduire une quantité d'eau minime, afin de ne pas perturber la solubilisation des matrices peu polaires.

Il est indispensable de bien agiter les solutions de matrices qui contiennent du sel pour s'assurer de leur homogénéité. Certaines solutions, en particulier la solution de matrice CNA contenant du nitrate de fer III, voient un précipité apparaître rapidement après leur confection. Cette précipitation gênante peut toutefois être remédiée par l'agitation vigoureuse de la solution de matrice juste avant son emploi. Cela ne permet pas de solubiliser de nouveau le précipité, mais permet d'obtenir une solution au sein de laquelle le précipité est dispersé et mène à l'obtention des résultats attendus.

L'analyte est solubilisé dans de l'acétonitrile (MeCN) à une concentration de 1 g/L, et il est aisé lors du mélange des différentes solutions produisant le mélange échantillon de faire varier les proportions des différents composés du mélange. Dans notre cas, nous avons étudié les proportions matrice/analyte et cation/analyte. Des essais concernant l'ionisation du POMc12 dans la matrice CNA (reproduits dans les graphiques de la Figure 17) ont été réalisés, en faisant varier le ratio matrice/analyte ou sel/analyte. Le ratio matrice/analyte dans un mélange a été étudié en utilisant une valeur de ratio cation/analyte de 6, tandis que l'optimisation du ratio cation/analyte s'est faite dans un mélange présentant une proportion matrice/analyte de 600.

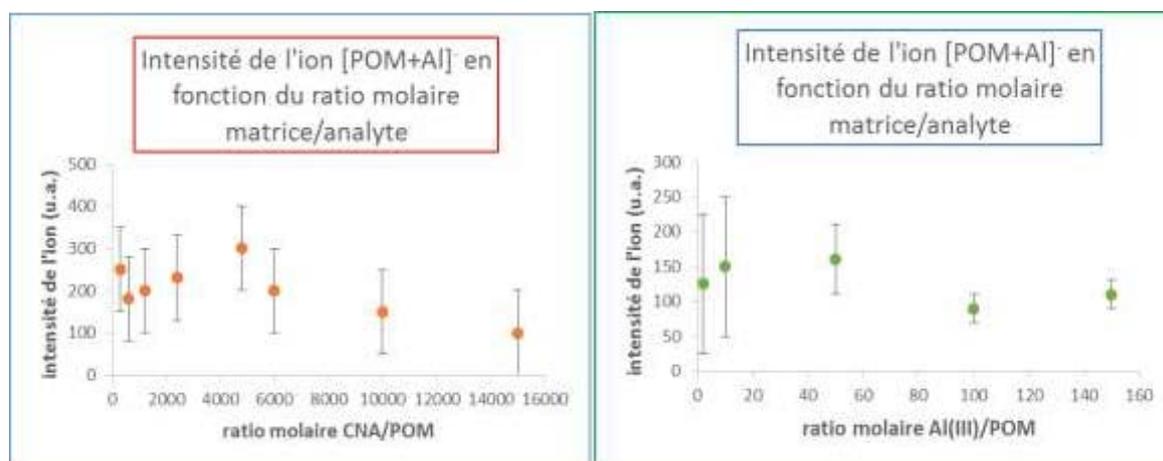


Figure 17 : Graphiques reportant l'intensité de l'espèce moléculaire intacte de  $m/z$  2902 ( $POMc12+Al$ ) obtenu du mélange de  $CNA+Al^{3+}+POMc12$ . Le graphique de gauche le rapport matrice/cation est fixé à 10. Le graphique de droite a sa proportion matrice/analyte fixée à 600.

*Dans les graphiques sont présentées les valeurs moyennes obtenues de 6 séries de 200 tirs sur 3 dépôts différents.*

On observe une grande variabilité dans les résultats (voir l'écart type reporté sur la Figure 17), particulièrement en ce qui concerne l'optimisation de la proportion matrice/analyte. Il apparaît qu'une vaste gamme de concentration permet d'obtenir les ions désirés, tant au niveau du rapport matrice/analyte qui peut aisément varier de 600/1 à 15000/1, que pour le ratio cation/analyte, qui doit être supérieur à 10 afin d'obtenir avec certitude l'espèce moléculaire intacte attendu.

La quantité de sels introduits ne doit toutefois pas être trop importante car elle entraîne une légère diminution générale de l'abondance des ions produits. Finalement, les solutions ultimes sont produites avec un mélange matrice/cation/analyte d'environ 1500/150/1, ce qui permet d'obtenir une présence considérable de l'espèce moléculaire intacte et qui est aisé à préparer à partir des solutions disponibles.

Les échantillons ont été déposés sur différents types de supports dans le but d'étudier l'influence de ceux-ci sur l'ionisation. Les deux les plus utilisés ont été une plaque en inox fournie avec le spectromètre et une plaque en polymère dénommée « Prespotted AnchorChip ». Ces plaques en polymère ont, pour cette étude particulière, été nettoyées avec une procédure semblable à celle utilisée pour les plaques inox réutilisables, exception faite du lavage au THF que la plaque ne tolère pas (Description en Annexe 3). D'autres supports ont été utilisés, tels qu'une plaque de verre, de polystyrène de faible épaisseur (assiette jetable), une plaque d'aluminium, du poly(oxyde d'éthylène) ou du téflon. Les résultats sont reportés en partie 3.2.1, mais seuls les résultats obtenus sur les plaques d'inox ou « Prespotted AnchorChip » ont conséquemment été exploités.

Quoi qu'il en soit, la nature du solvant doit être déterminée en prenant en compte le support utilisé car, comme il est montré sur la Figure 18 la façon dont se répand le microlitre déposé peut varier. L'épaisseur du dépôt est inexorablement différente selon la nature du support et peut donc avoir une influence sur l'abondance des ions observés. Il a été montré<sup>[59]</sup> que des dépôts fins sur supports métalliques permettent un rendement d'ionisation plus important. Cependant, nos résultats concernant la nature du support n'ont donné aucune confirmation allant dans ce sens, l'abondance des ions se révélant légèrement supérieure sur support plastique (voir discussion partie 3.1.2).

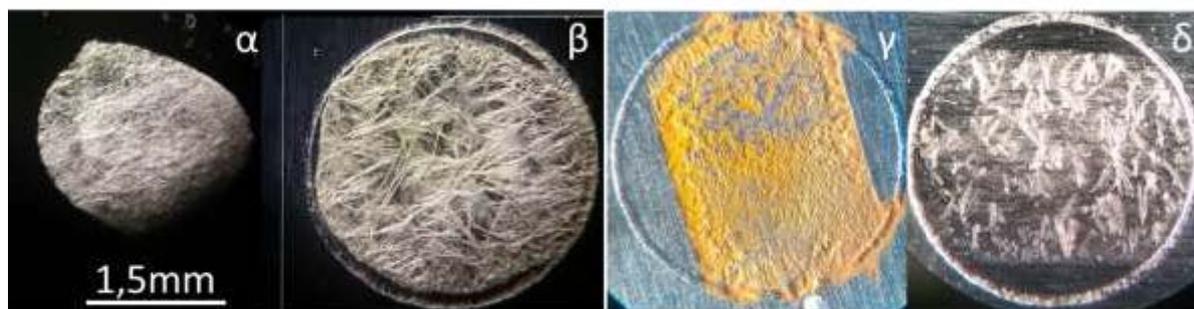


Figure 18 : Photographies de dépôts de matrice dans le solvant ternaire MeCN/THF/eau 5/4/1 sur plaque « Prespotted AnchorChip » ( $\alpha$ ) ou sur plaque inox ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). CNA ( $\alpha$  et  $\beta$ ), HABA ( $\gamma$ ) et DHB ( $\delta$ ).

### 2.2.5. Conditions d'analyses, définition de la valeur seuil, réglage de la puissance laser et vocabulaire associé.

L'appareil AutoflexIII a été utilisé pour la plupart de nos expériences MALDI. Aussi nous détaillons uniquement ici ses paramètres opératoires.

Sauf mention contraire, l'ensemble des spectres présentés ont été obtenus sur cet appareil en mode ion négatif utilisant l'analyseur TOF en mode réflectron. Les réglages d'usine du spectromètre ont été conservés, exception faite du délai d'extraction et de la puissance du laser (comme expliqué ci-après).

L'utilisation de la source MALDI nécessite de régler la puissance laser à chaque échantillon en fonction de la nature de la matrice, de l'analyte et du mode de préparation du dépôt. Les tirs laser sur le dépôt ne provoquent aucune ionisation en dessous d'une certaine valeur, puis, à partir d'une certaine valeur, dénommée « valeur seuil », l'analyte est détecté. Cette valeur seuil varie en fonction de la matrice, de sa cristallisation<sup>[122]</sup> et de l'analyte. De manière à comparer les séries d'expériences acquises dans diverses conditions (sels, matrice, solvant) la valeur seuil de chaque échantillon sera toujours utilisée comme référence plutôt que la valeur de puissance laser paramétrée sur l'instrument.

L'augmentation de la puissance du laser au-delà de cette valeur donne lieu à des processus de fragmentations des analytes. Cela provoque aussi l'augmentation de l'intensité des ions et, en général, la perte de résolution des pics et la hausse du bruit de fond (voir Figure

20). Cette dégradation de la qualité du signal des ions provient de la plus grande dispersion spatiale des ions produits en source, mêlés à la formation d'agrégats ou d'ions métastables qui se dégradent dans l'analyseur et produisent des ions dont l'énergie cinétique n'est pas en lien avec leurs rapports masse/charge. Il convient donc de se placer à la valeur seuil si l'on souhaite observer un signal de l'espèce moléculaire intacte dont le bruit sous signal et la résolution des pics sont de bonne qualité.

Pour ne pas être gênés par les ions de matrice qui, d'une part, apparaissent à une valeur de puissance laser plus faible que l'analyte et, d'autre part, risquent de saturer le détecteur, il est préférable de les éliminer. Pour ce faire, un paramètre de l'appareil est réglé de manière à placer une barrière électrostatique à l'entrée de l'analyseur à temps de vol sur le chemin des ions durant les premières microsecondes (voir schéma Figure 4). En effet, l'analyseur à temps de vol sépare les ions en fonction de la vitesse qu'ils acquièrent. La vitesse des ions étant inversement proportionnelle à leur masse, ce sont les petites masses qui arrivent en premier au détecteur. Ainsi toutes les ions de  $m/z$  en dessous d'une certaine valeur sont éliminés, la valeur fréquemment utilisée supprime tous les  $m/z$  inférieurs à 900 dans nos expériences.

Les autres réglages réalisés sur l'appareil AutoflexIII ont concerné le délai d'extraction des ions désorbés, ainsi que l'ajustement de la puissance et du nombre de tirs du laser. Ces deux paramètres sont modifiés par chaque utilisateur et sont propres à chaque échantillon, le nombre de tirs pouvant varier beaucoup selon le besoin. En général plus les espèces sont lourdes, moins la sensibilité est grande et plus le nombre de tirs requis sera important. Le délai d'extraction a été testé pour des valeurs variant de 0 ns à 1000 ns et la résolution la plus haute pour les ions a été mesurée pour un délai de 80 ns.

Le nombre de tirs laser utilisé a été arbitrairement placé à 200 pour tous les spectres réalisés à la puissance laser seuil. En augmentant la puissance laser, le nombre d'ions produits augmente beaucoup, ce qui a été autant attribué à la plus grande quantité de matière désorbée<sup>[9]</sup> qu'à un rendement d'ionisation supérieur<sup>[63]</sup>. Lorsque le nombre d'ions venait à saturer le détecteur, le nombre de tirs a été diminué, jusqu'à atteindre le faible nombre de 10 tirs.

Le nombre multiple de tirs sert à moyenner les spectres singulièrement acquis, car le MALDI est une méthode fortement dépendante de l'épaisseur et de la forme des cristaux de matrices qui, bien souvent, souffrent d'une variabilité importante. Bon nombre d'études

publiées s'appliquent à mettre au point des techniques de préparation de dépôts dont la reproductibilité est majeure<sup>[122]</sup>.

Le laser utilisé possède un cristal de grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:YAG) produisant, dans notre cas, une longueur d'onde utile de 355 nm. La puissance d'émission est constante et plus forte que nécessaire. Elle doit donc être modulée à la sortie du dispositif optique. Ce dispositif optique peut être réglé de manière à faire varier la puissance des tirs laser. La valeur de cette puissance laser est exprimée dans cette thèse en unité arbitraire (u.a.), car la valeur absolue de la puissance du rayonnement utilisé n'est pas connue. Seule la puissance maximale du laser théorique est connue et provient des valeurs fournies par le constructeur. Toutefois, celle-ci diminue avec le vieillissement du laser, comme il a été remarqué entre les premières expériences menées au cours de mon doctorat et les dernières, effectuées trois ans plus tard, quand pour obtenir un résultat identique, la puissance du laser devait être augmentée de 26%.

Il convient de préciser qu'il est toujours question de tirs laser, puisque l'échantillon n'est pas irradié en continu mais avec de brèves impulsions de la durée de cinq nanosecondes. Les phénomènes de désorption/ionisation et certains phénomènes de fragmentations en source, ont alors largement le temps de survenir<sup>[1, 62]</sup> pendant ces impulsions laser. La puissance maximale des tirs laser étant de 500  $\mu$ J (spécification indiquée par le constructeur), la valeur utilisée se situe toujours en dessous de cette valeur.

La plupart des spectres sont enregistrés à la valeur seuil de puissance laser permettant la détection des espèces. Cette valeur varie en fonction de l'échantillon (principalement en fonction de la nature de la matrice), on rapporte dans le Tableau 5 les valeurs relevées pour l'observation des ions en fonction de la matrice utilisée. Dans notre cas, la puissance laser d'observation des ions de matrice est plus faible que celle permettant d'observer les ions de l'analyte ; cependant des études montrées que la puissance du laser permettant l'observation de ces deux catégories d'ions est identique.

Tableau 5 : Valeurs de puissance laser (u.a.) utilisée en fonction de la matrice pour l'observation de l'espèce moléculaire intacte [POMc12+Al]<sup>-</sup> ou d'ions de matrice en négatif.

matrice	Valeur seuil d'observation d'ions de matrice (anions observés)	Valeur seuil d'observation de l'espèce moléculaire intacte
HABA	41	52
HPA	69	102
IAA	40	60
CHCA	37	54
THAP	58	97
DT	48	60
DCTB	35	40
DHB	59	90
CNA	53	63
FA	53	76
SA	62	84

Comme évoqué précédemment la puissance du laser a diminué au cours du temps, en fonction du vieillissement du laser. Le tableau présente les valeurs obtenues au même moment pour toutes ces préparations de dépôts. La valeur seuil d'observation des ions varie beaucoup en fonction de la nature de la matrice. Lors des expériences visant à fragmenter l'espèce moléculaire intacte par l'utilisation d'une plus forte puissance laser, la valeur utilisée a été proportionnellement à la valeur seuil de chaque mélange. On exprimera alors, et notamment lors de ces études de fragmentation en source (dites ISD), la puissance laser en fonction de la valeur seuil. Typiquement, les résultats qui mènent à l'observation d'une abondante fragmentation en source sont obtenus à une valeur 1,5 fois plus haute que la puissance laser seuil déterminée singulièrement pour chaque type d'échantillon. La puissance laser est donc exprimée soit en unités arbitraires (u.a.), qui dépendent du vieillissement du laser, donc de la date à laquelle l'analyse a été effectuée, soit en proportion de la valeur seuil unique de chaque matrice.

### 2.3. Terminologie particulière liée à l'analyse des POMs par MALDI

Dans le domaine de la spectrométrie de masse les utilisateurs sont amenés à utiliser une terminologie capable de nommer les espèces chargées auxquelles ils s'intéressent. Il s'agit d'un

vocabulaire qui a pour vocation de nommer précisément les ions et leurs rapports  $m/z$ . Dans une première partie ces termes utilisés sont succinctement rappelés pour ensuite présenter l'allure des pics correspondant à nos composés qui seront davantage décrits dans la section dédiée aux résultats.

Au cours de cette étude l'analyse sous forme intacte des molécules visées n'a pas été la seule considération. Nous nous sommes également intéressés, comme il est très fréquent dans notre domaine, à la fragmentation des analytes lors du processus d'ionisation en source. Ainsi, le détail de la façon dont est considérée la quantité de fragments obtenus est explicitée dans une deuxième partie.

### **2.3.1. Forme, résolution et dénomination des pics**

L'analyse de composés particuliers, comportant de multiples atomes dont les isotopes sont nombreux, mène à utiliser une terminologie particulière. Cette particularité reste strictement conforme à celle utilisée ordinairement dans le domaine de la spectrométrie de masse (norme IUPAC).

Par exemple, dans le jargon du domaine, il est habituel, pour désigner un ion, de parler de rapport  $m/z$  mono-isotopique, ce qui correspond à la masse de l'ion composé des isotopes les plus abondants pour chaque élément composant la molécule. Lorsque des molécules organiques sont utilisées, la masse mono-isotopique d'un ion est systématiquement la plus légère du massif isotopique (voir Figure 19). Or, l'utilisation de composés contenant du tungstène, qui présente 4 isotopes principaux et un isotope minoritaire (voir Tableau 6), fait que la masse mono-isotopique se trouve au centre du massif isotopique de l'espèce. Qui plus est lorsqu'un analyseur de haute résolution est utilisé, il ne permet pas de distinguer les masses exactes (il faut pour cela de l'ultra haute résolution). En effet chaque pic détecté peut contenir un nombre d'isobares important (voir Figure 19).

Nos composés comportant un nombre de tungstènes conséquent, donnent l'apparence que l'on se reporte à la masse moyenne de l'ion considéré, alors qu'il s'agit bel et bien de la masse mono-isotopique. Afin d'éviter toute ambiguïté, et pour simplifier, nous nommerons les masses des ions comme étant des rapports  $m/z$  « centrés sur » un certain  $m/z$  selon des valeurs arrondies correspondant au centroïde du pic contenant l'ion monoisotopique.

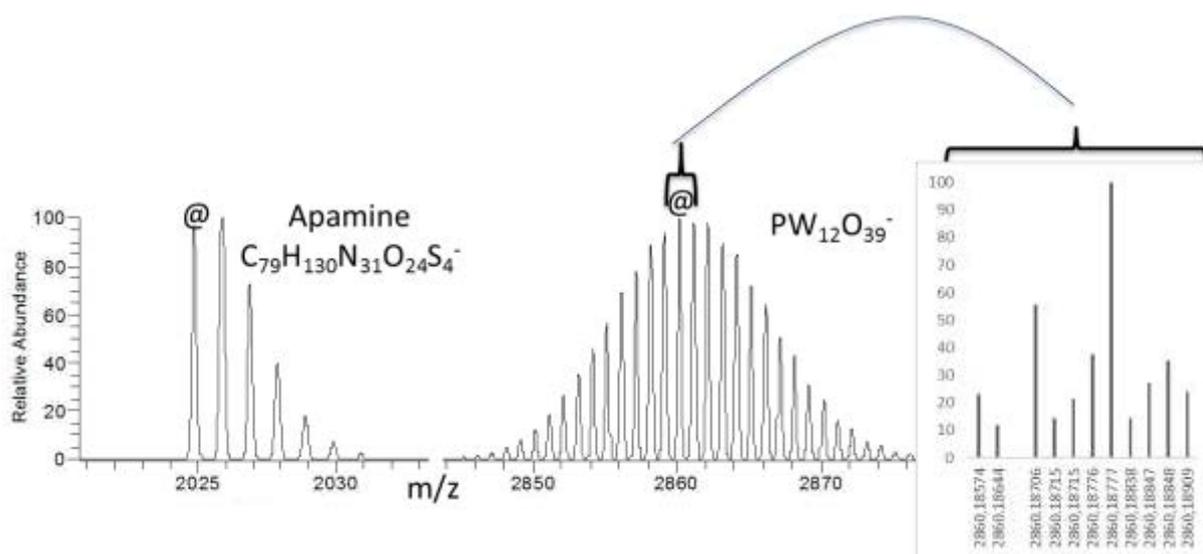


Figure 19 : Profils isotopiques théoriques simulés à une résolution de 10000 pour l'apamine (neurotoxine du venin d'abeille) et d'un POM. Annotation du pic contenant l'ion mono-isotopique par @. Grafique (à droite) représentant les masses exactes les plus abondantes contenues dans le pic de  $m/z$  2860.

Il est opportun de rappeler que lorsqu'un ion est mentionné, par exemple lorsqu'on fait référence à un ion de formule  $PW_{12}O_{39}^-$  de  $m/z$  2860, les autres pics autour de lui ont tous la même composition élémentaire, ce sont les isotopes des éléments (principalement du tungstène) qui provoquent ce large massif isotopique. L'ion  $m/z$  2860 correspond à l'ensemble des pics aux rapports  $m/z$  [2845-2875].

Tableau 6: Isotopes du tungstène.

Isotope du W	$^{180}\text{W}$	$^{182}\text{W}$	$^{183}\text{W}$	$^{184}\text{W}$	$^{186}\text{W}$
Masse	179.946	181.948	182.950	183.950	185.954
Abondance naturelle	0,12	26,30	14,28	30,70	28,60

La résolution des pics détectés est un paramètre important en spectrométrie de masse. En général la « qualité » de la résolution ou du pouvoir résolutif de l'appareil, est classé selon trois niveaux :

- La basse résolution ( $R = 1.000$ ),
- La haute résolution ( $10.000$ ) => valeur typique obtenue avec un TOF-rélectron

- La très-haute/ultra-haute résolution (> 100.000).

Ces qualificatifs renseignent sur la capacité de distinction de deux espèces de masses proches et donc sur la forme des pics observés.

Comme la Figure 20 le présente, la résolution varie en fonction de l'analyseur utilisé mais aussi, dans le cas du MALDI-TOF, des conditions expérimentales appliquées et tout particulièrement de la puissance laser utilisée.

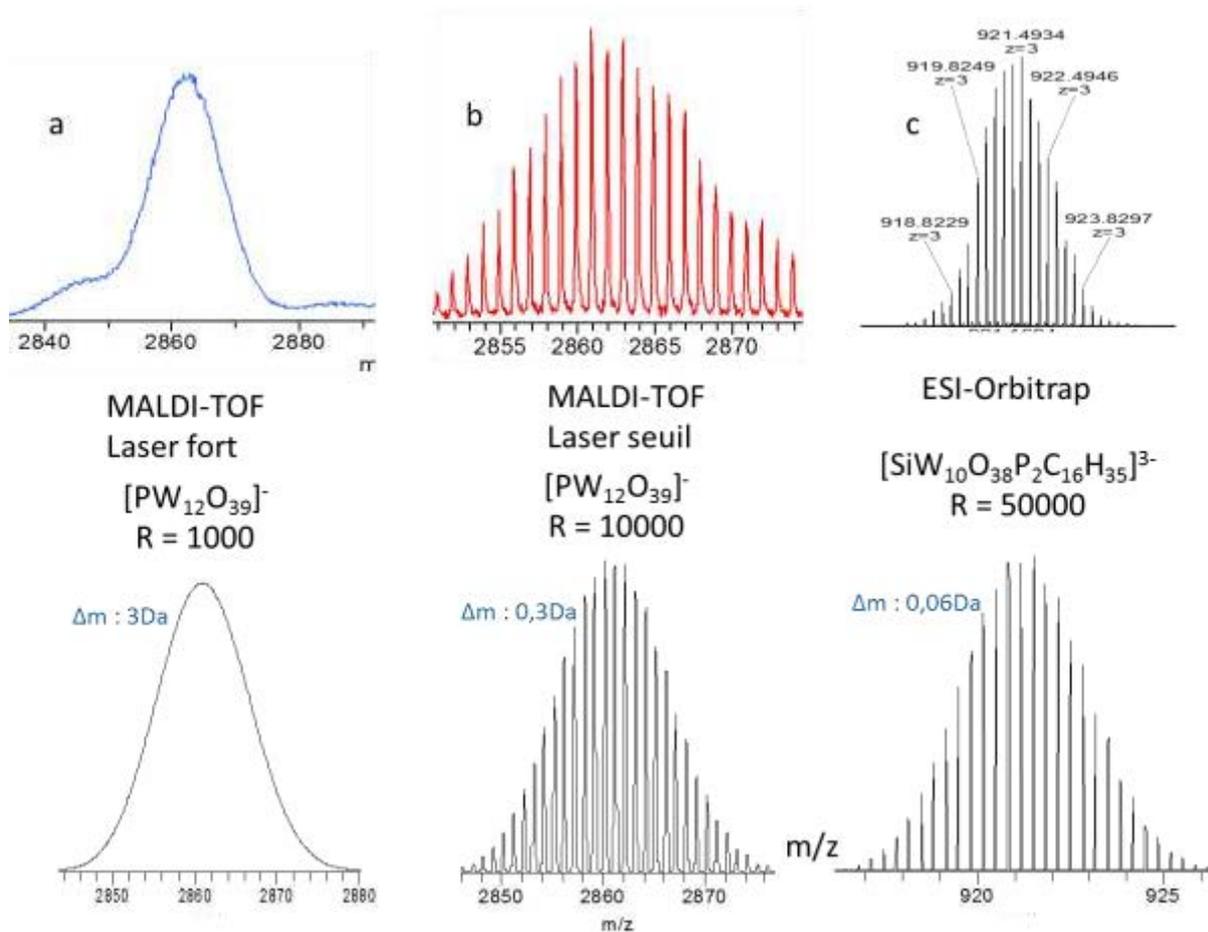


Figure 20 : Agrandissement de spectres de masse sur des ions (a et b en MALDI, c en ESI) avec leur simulation en dessous en prenant en compte la résolution. En a : signal détecté en utilisant une puissance laser très forte, b : même composé à puissance laser seuil, c : signal détecté après l'ionisation en ESI.

La qualité d'un spectre de masse est considérée comme bonne lorsque la résolution des pics observés est grande. La puissance laser n'est pas le seul phénomène en jeu, la résolution

des signaux varie aussi en fonction de la nature de la matrice utilisée, et ceci malgré l'ajustement de la puissance laser de manière à se placer au seuil, donc enregistré à la résolution maximale (voir en partie 3.1.1).

Un autre paramètre fréquemment mentionné dans ce document est le rapport signal sur bruit. C'est un paramètre important en MALDI car la présence d'ions métastables et d'agrégats de matrices, ou simplement l'utilisation d'une puissance laser trop forte, accroissent le bruit sous le signal - qui peut à son tour être masqué lorsqu'il est peu abondant. L'objectif étant toujours de faire en sorte que les pics soient intenses, en augmentant la puissance laser notamment, tout en prêtant attention à ne pas faire augmenter le bruit.

On représente sur la figure ci-dessous des spectres MALDI obtenus lors d'analyse de POMs en montrant l'importance du paramètre signal sur bruit.

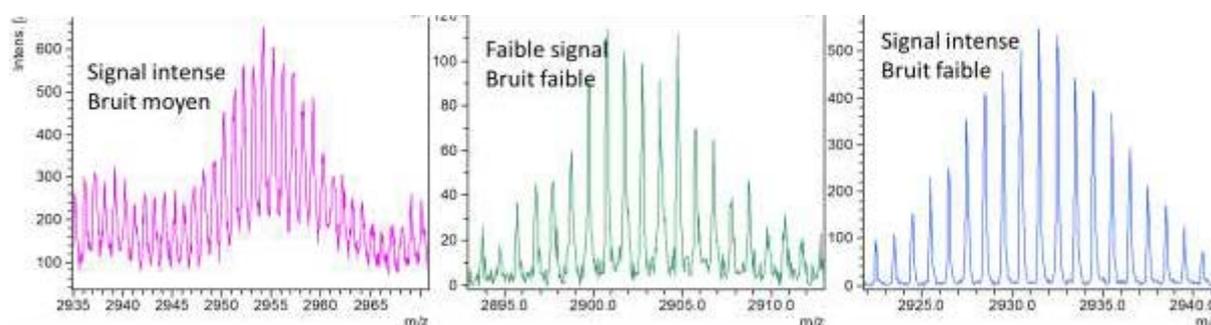


Figure 21 : Agrandissement des spectres MALDI de différents ions intacts, enregistrés à des puissances de laser variables, montrant différentes valeurs de rapport signal/bruit.

Au cours de nos études, nous n'avons pas cherché à quantifier le signal sur bruit. Ainsi, dans nos explications, ce paramètre n'est mentionné que de manière qualitative, avec les mêmes qualificatifs que ceux mentionnés sur la Figure 21. Un rapport signal/bruit faible étant synonyme de spectre de masse de mauvaise qualité. Lors des analyses MALDI, l'objectif est de détecter d'abondants ions correspondant à l'analyte, ce qui pousse à augmenter la puissance laser pour augmenter la quantité de matière désorbée et donc la quantité d'ions formée. Cette augmentation peut détériorer la qualité du signal, il convient donc d'acquérir nos spectres à une valeur la plus proche de la valeur seuil de puissance laser.

### 2.3.2. Taux de fragmentation

Une large fragmentation en source a été observée dès les premières expérimentations, et ce pour de nombreux POMs analysés. Cette capacité à provoquer des fragmentations en source a poussé à rechercher la cause de ce phénomène et, par conséquent, à développer une manière de calculer le taux de fragmentation.

Les ions fragments pris en compte correspondent aux ions dont les rapports  $m/z$  sont inférieurs à ceux de l'analyte considéré. Il convient de préciser toutefois que le taux de fragmentation ne représente pas en valeur absolue le nombre d'ions fragments produits lors des expériences. En effet, les spectres acquis ne s'intéressent pas à la totalité des ions produits, puisqu'on ne prend pas en considération les ions de rapport  $m/z$  de moins de 1000 Da. Les faibles masses sont en effet polluées par de nombreux pics provenant de la formation d'agrégats de matrice, d'autant plus visibles que la fluence laser est grande.

Le taux de fragmentation sert au cours de cette étude à réaliser des comparaisons entre différentes conditions de préparation d'échantillon, mais ne prend pas en compte la totalité des ions fragments. Ces valeurs ne peuvent pas être utilisées pour effectuer des calculs d'énergies internes à partir de la théorie Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus (RRKM)<sup>[131]</sup>, comme cela est également suggéré dans des nombreuses études cherchant à quantifier l'énergie interne des ions formés<sup>[1]</sup>.

Le taux de fragmentation (TdF) représente la quantité d'ions fragments par rapport à la quantité totale des ions observés.

$$\text{La formule utilisée est : TdF} = \frac{\Sigma (\text{aires de pics des fragments})}{\Sigma (\text{aires de pics de tous les ions})}$$

Si l'expression du taux de fragmentation est simple, la détermination des aires des pics de nos composés est beaucoup plus délicate. D'ordinaire, le taux de fragmentation peut se calculer, pour les petites molécules carbonées, à partir du pic mono-isotopique<sup>[132]</sup> qui représentent la quasi-totalité de l'aire des ions produits. Mais dans notre cas, un calcul aussi rapide n'était pas possible. En effet, si l'on considère l'ion  $[\text{HPW}_4\text{O}_{15}]^-$  l'aire de l'ion mono-isotopique représente 15%, alors que l'aire de l'ion mono-isotopique  $[\text{PW}_{12}\text{O}_{39}]^-$  représente 7%

de l'aire totale théorique du massif isotopique<sup>2</sup>. Afin de ne pas sur-évaluer de beaucoup la part des fragments il est impératif de prendre en compte plus de pics par massif isotopique. Cependant, le grand nombre de pics de chaque massif isotopique rend impossible l'intégration totale de tous les pics. En effet, lorsqu'un ion est abondant et bien résolu, il est possible de prendre en compte une grande partie de l'aire totale du massif ; en revanche, lorsque le rapport signal/bruit est médiocre ou que le massif isotopique se retrouve tronqué ou mêlé à d'autres pics, il devient difficile d'intégrer tous les pics et donc de comparer la quantité des ions.

Une technique systématique, qui se veut équitable pour chaque type d'ion a donc été mise en place : il s'agit, comme illustré sur la Figure 22, de comptabiliser la moitié de la surface des pics du massif isotopique, le nombre de pics à considérer étant différent selon la largeur du massif isotopique. On montre sur la Figure 22 que pour un ion à  $m/z$  1005 il est nécessaire d'intégrer 5 pics pour couvrir 50% de la surface totale des pics du massif isotopique. Pour un ion de  $m/z$  supérieur, par exemple 1510, il est nécessaire d'intégrer l'aire de 6 pics, alors que pour un ion de  $m/z$  2860 il est nécessaire d'en intégrer 9. Toutefois, certains massifs isotopiques ne sont pas détectés avec une résolution suffisante pour individualiser les pics qui les composent et dans ce cas il est proposé de grossièrement évaluer la moitié de la surface totale en considérant le large massif isotopique comme un triangle. Cette manière de ne considérer que les pics les plus abondants rend plus aisé le calcul du nombre d'ions tout en permettant de comptabiliser de manière justifiée l'abondance de tous les ions détectés.

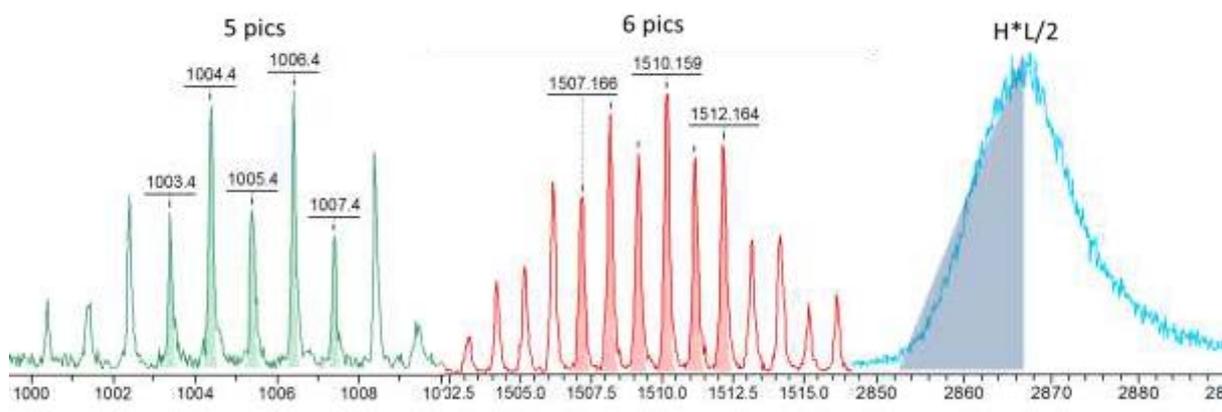


Figure 22 : Intégration de pics des massifs isotopiques d'ions présentant un massif isotopique complexe. L'aire sélectionnée pour chaque massif correspondant à 50% de la surface totale théorique calculée (note <sup>2</sup>).

<sup>2</sup> Le calcul des aires théoriques a été réalisé à l'aide du logiciel Isopro 3.1 (logiciel libre)



### 3. Résultats et discussion

Les essais préliminaires, rapportés en partie 2.2, ont permis de développer un protocole d'analyse de POMs en MALDI mode ions négatifs. Il a été ainsi possible d'identifier quelques POMs par détection MALDI d'espèces intactes. Les meilleurs résultats en termes de sensibilité ont été obtenus pour les composés POMc8, POMc10 et POMc12 (voir structures dans la partie 2.2.2 Figure 14). Notre description se concentrera donc sur ces molécules. La préparation des échantillons, élaborée selon la manière décrite dans l'étude préliminaire, implique l'addition de cations dans les solutions de matrice. Cette présence cationique permet aux polyanions que sont les POMs de former des adduits et d'être donc ionisés sous forme mono-chargée.

Ce chapitre présente les expériences réalisées dans l'objectif de comprendre les mécanismes impliqués dans la formation des ions par la technique MALDI négatif. Dans ce cadre, les observations sont organisées en trois parties. Une première section sera consacrée au comportement de différentes matrices permettant la production des ions. L'attachement de différents cations aux analytes est présenté à la suite, attachement qui permet d'obtenir les espèces moléculaires sous forme d'adduits. Ces considérations seront complétées, dans la troisième partie, par une étude de la décomposition des analytes, soit au cours d'expériences de fragmentations MS/MS, soit en observant la fragmentation qui peut survenir en source (ISD) lors de la désorption/ionisation. La nature des fragments en source lorsque la puissance du laser et la préparation d'échantillons sont modulées seront détaillées et comparées à la nature des espèces moléculaires intactes formés.

La conclusion portera sur les apports de cette étude à la compréhension des mécanismes de production des ions par MALDI, ainsi qu'à ceux permettant la fragmentation ISD.

#### 3.1. Comparaison des aptitudes des matrices à l'ionisation de polyanions et variation de la méthode d'échantillon

Dans cette partie, le rôle des matrices dans la formation par MALDI, des espèces adduits est décrit et mis en évidence à travers la comparaison des résultats obtenus lors de l'utilisation de conditions expérimentales identiques pour différents mélanges échantillon. L'influence du type de support (cible) pour le MALDI a également été étudiée dans le but d'explorer tous les phénomènes pouvant avoir une influence sur l'allure du spectre de masse MALDI.

Afin de comprendre la particularité du mélange optimal pour l'analyse des POMs étudiés, qui s'ionisent en présence de la matrice CNA par formation d'adduits avec des cations, nous avons tenté d'appliquer la méthode de préparation d'échantillon développée pour le POMc12 à d'autres POMs ainsi qu'à divers analytes, sans résultats satisfaisants.

Enfin l'utilisation éventuelle des POMs en tant que co-matrice permettant l'analyse de peptides ou de polymères est reportée ci-dessous.

### 3.1.1. Classification relative des matrices

Le rôle de la matrice est primordial en ionisation MALDI. D'ordinaire, les matrices choisies et la préparation optimale des échantillons sont élaborées de manière spécifique à chaque classe de composés (voir Tableau 4 présenté avant). Néanmoins, il n'est pas rare de trouver plusieurs matrices considérées comme viables pour l'analyse d'un type de composé : par exemple les matrices DHB et CHCA, communément utilisées pour la préparation d'échantillons en MALDI, sont toutes deux fréquemment utilisées pour l'analyse de peptides [50,27]. La nature des matrices n'a pas à être proche pour permettre l'ionisation de la même famille d'analytes : par exemple la matrice aprotique et peu polaire DCTB a récemment montré son efficacité<sup>[133]</sup> pour l'analyse du polystyrène, polymère plus fréquemment analysé avec des matrices polaires et protiques telles que DHB ou DIT<sup>[134]</sup>. Or, nos essais préliminaires nous ont montré la possibilité d'obtenir des ions de ces composés polyanioniques dans presque toutes les matrices testées. Cette capacité du POM a permis d'effectuer des comparaisons relativement inédites entre des matrices de natures différentes. Bien entendu la qualité des spectres de masse n'est pas toujours satisfaisante en terme de résolution, de rapport signal/bruit ou du point de vue des espèces ionisées pour toutes les expériences et, au vu de l'allure des spectres de masse, nous pouvons séparer les matrices en deux groupes aux propriétés très distinctes. Il faut noter qu'ici les échantillons ont été préparés selon la procédure détaillée en partie 2.2.4, c'est à dire avec addition de chlorure d'aluminium(III) dans les solutions de matrice.

Le « premier groupe » rassemble les matrices au sein desquelles des espèces moléculaires intactes, avec des intensités moyennes voire faibles, sont observables quels que soient les paramètres instrumentaux appliqués. Il s'agit des matrices DHB, FA, SA, HPA et THAP. Le signal de l'espèce moléculaire intacte obtenu est ténu, ce qui pousse à utiliser une puissance laser importante, réduisant alors la résolution des pics détectés. La puissance laser utilisée pour observer un signal intense pour ces matrices (rassemblées dans ce qui est appelé

ici le « premier groupe ») est plus importante que celle du « second groupe » (qui sera présenté par la suite). Il en est de même pour les matrices de ce groupe. L'utilisation de ces matrices provoque la détection de nombreux pics par MALDI dans la région de l'espèce moléculaire intacte (annoté @ sur la Figure 23) auxquels il est difficile d'attribuer une composition. L'augmentation de la puissance laser provoque aussi l'apparition d'ions agrégats de matrices dont les intensités sont si importantes qu'il est pertinent de régler le processus de déflexion (suppression des ions en dessous d'une valeur déterminée) à une valeur de  $m/z$  2000. Il faut surtout noter la quasi-absence de fragmentation en source du polyoxométallate analysé, au contraire de ce qui est observé pour le second groupe de matrice (voir discussion ci-dessous).

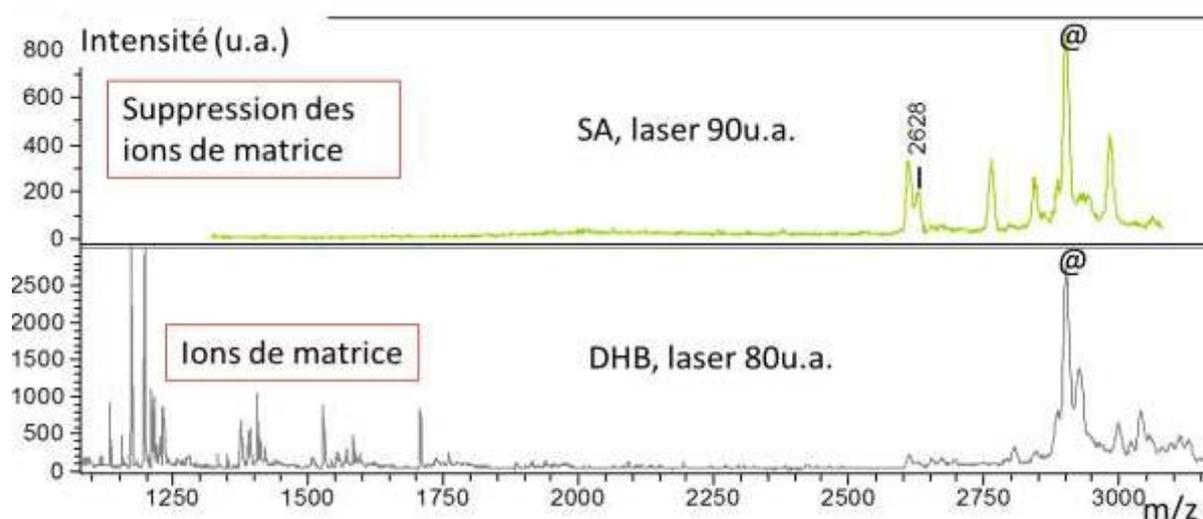


Figure 23 : Spectre MALDI du mélange  $POMc12+Al^{3+}$  dans les matrices DHB et SA enregistré à la puissance laser 80 et 90 (u.a.). L'espèce moléculaire intacte  $[POMc12Al]^-$  est annoté @.

La quasi-totalité des ions de bas rapports  $m/z$ , au moins pour les plus abondants, correspond à des ions contenant des molécules de matrice (voir Figure 24). Sans même connaître la composition exacte d'un ion observé, il est aisé de déterminer s'il est issu de la fragmentation d'un POM du fait du massif isotopique particulier lié à la présence de tungstène. L'agrandissement du spectre de masse acquis en présence de DHB à haute puissance laser est donné en Figure 24, ci-dessous. On est en mesure d'y identifier un ion fragment centré sur  $m/z$  1510. Cette espèce correspond à un ion de formule  $[SiW_6O_{22}Al]^-$  et se trouve noyée parmi les autres pics dont la nature ne peut être qu'attribuée à des agrégats de matrices.

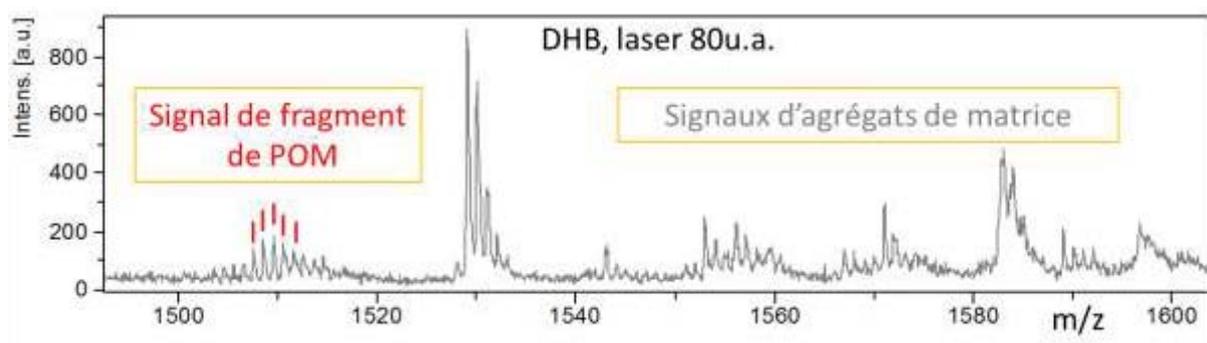


Figure 24 : Spectre MALDI du mélange DHB+POMc12+Al<sup>3+</sup> enregistré à laser 80(u.a.)

Le second groupe rassemble les matrices avec lesquelles il est aisé d'analyser nos POMs par MALDI. Il s'agit des matrices CNA, IAA, HABA, DAN, DIT, DCTB et CHCA.

En utilisant une préparation d'échantillon simple, consistant à introduire dans les matrices 5 mM d'AlCl<sub>3</sub>, l'espèce moléculaire intacte de formule [POMc12Al]<sup>-</sup> à *m/z* 2902 est produite. Cette espèce se trouve être identique quelle que soit la matrice utilisée lors de la préparation d'échantillon.

L'espèce moléculaire intacte est formé de l'analyte adduit des cations introduits lors de la préparation d'échantillons, dans le cas présenté ici, s'agissant du cation aluminium(III). La puissance laser utilisée pour obtenir des espèces moléculaires intactes avec ces matrices (voir Figure 25), rassemblées dans le second groupe, est largement inférieure aux diverses puissances laser nécessaires à observer la production d'ions avec les matrices du premier groupe. A titre d'exemple, la matrice SA (appartenant au premier groupe) nécessite une puissance laser 1,6 fois supérieure à celle utilisée pour la matrice CHCA (second groupe) pour ioniser l'espèce intacte de rapport *m/z* 2902.

Cette famille de matrices a également pour point commun notable de permettre l'observation d'une large fragmentation en source : de multiples ions abondants sur toute la gamme de masse considérée sont détectés (voir Figure 26). On peut suggérer que cette capacité à produire des ions, moléculaires et/ou fragments, à des puissances laser bien différentes, est en lien avec le coefficient d'absorption des matrices. Par exemple il est possible de comparer le coefficient d'absorption mesuré<sup>[135]</sup> à 355 nm pour des dépôts solides de DHB (1<sup>er</sup> groupe), qui est de 9000 cm<sup>-1</sup>, et celui de CHCA à l'état solide (2<sup>ème</sup> groupe), qui est de 30000 cm<sup>-1</sup> : cela induit à penser que la désorption et la fragmentation sont en lien avec la capacité d'absorption de la longueur d'onde du laser. Le fait que CHCA produise d'abondants ions et fragments, à

l'inverse de ce qui est observé pour DHB, semble pouvoir être mis en lien avec ces valeurs ; toutefois nous n'avons pas trouvé de valeurs correspondantes à d'autres matrices permettant d'étendre plus loin la comparaison.

Au sein de ce second groupe, les comportements des matrices permettant la production d'ions varient largement. Les matrices CHCA et DAN produisent des ions fragments dès la valeur seuil (de puissance laser) d'observation des ions. A l'inverse, en présence des matrices comme CNA, DCTB ou DIT, un ion unique est détecté aux valeurs seuils et sa nature dépend du cation introduit en large quantité. La proportion relative de ces ions fragments est liée en premier lieu, à la puissance laser utilisée, mais également à la nature de la matrice utilisée ainsi qu'à celle du cation utilisé (voir partie 3.2).

La résolution des pics détectés, tant par leur abondance que par leur rapport signal sur bruit, varie en fonction de la matrice utilisée. Les spectres de masse de la Figure 25 mettent en évidence que la matrice CNA permet d'obtenir un massif isotopique correspondant à l'ion adduit de formule  $[\text{SiW}_{10}\text{O}_{38}\text{P}_2\text{C}_{24}\text{H}_{50}\text{Al}]^-$  abondant et bien résolu. La qualité du signal de cet ion peut être comparée à la simulation réalisée à partir de cette formule grâce au protocole de préparation d'échantillon optimisé précédemment.

La plupart des matrices produisent majoritairement cet ion intact, seules les matrices CHCA et DAN produisent de nombreux massifs isotopiques différents dans la région de l'espèce moléculaire intacte, ce qui rend plus difficile l'attribution de formules aux pics détectés. Les matrices CHCA et DAN sont remarquables, car elles produisent dès la valeur seuil un grand nombre de fragments dont les  $m/z$  sont compris entre 2600-2900. La détection de ces multiples ions fragments apparaît d'ailleurs à une puissance laser plus faible que celle nécessaire à l'observation de l'ion contenant l'espèce intacte. Or, l'utilisation d'une puissance laser supérieure provoque l'augmentation du signal des ions fragments et produit des pics de l'espèce moléculaire intacte dont le signal sur bruit, et la résolution sont médiocres (voir Figure 20).

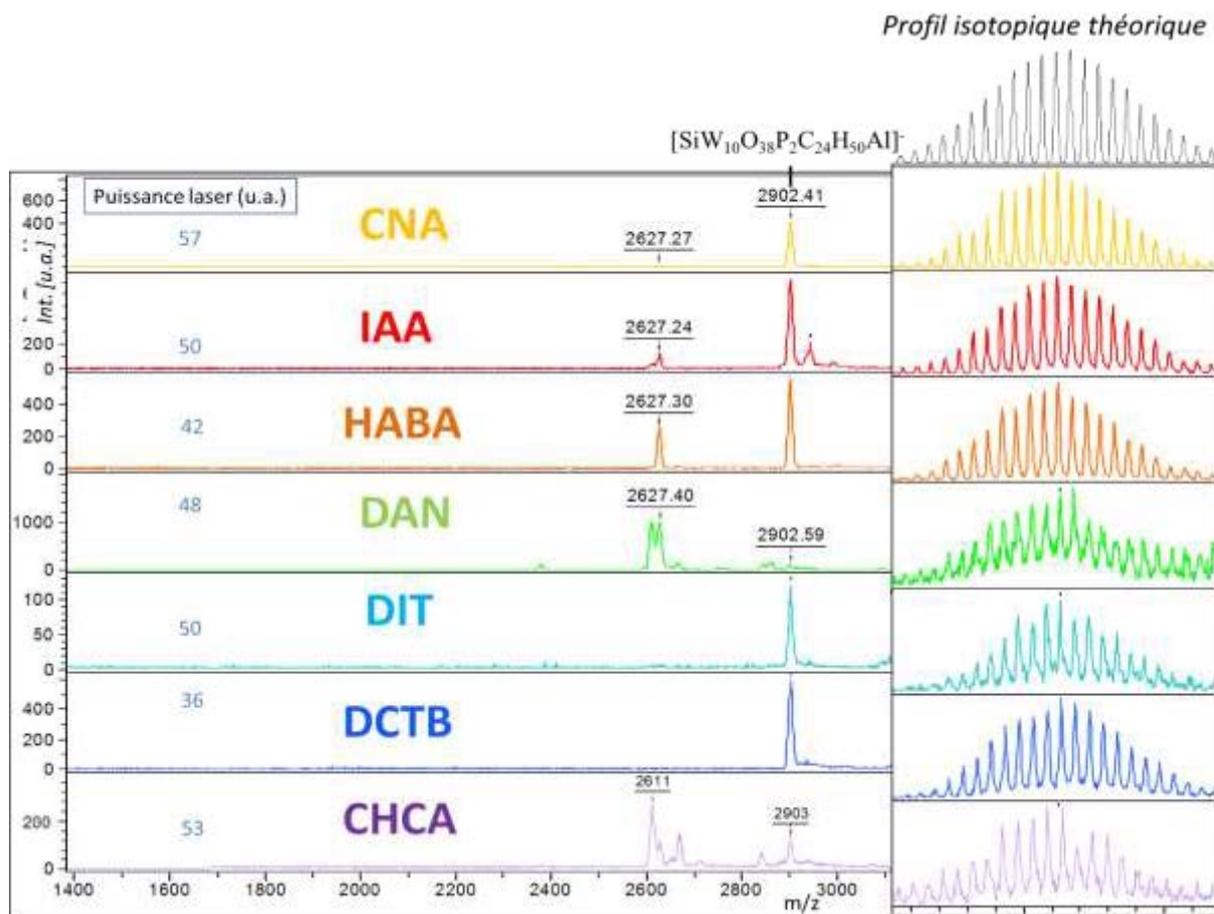


Figure 25 : Spectres MALDI du mélange POMc12+Al<sup>3+</sup> dans les différentes matrices du second groupe, enregistrés aux puissances laser seuil de chaque échantillon. Agrandissement du signal de l'ion contenant l'espèce intacte et comparaison avec le massif isotopique théorique de formule [SiW<sub>10</sub>O<sub>38</sub>P<sub>2</sub>C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>Al]<sup>-</sup> modélisé à une résolution de 12000.

On observe (Figure 25) sur la plupart des spectres de masse acquis à la puissance laser seuil un ion fragment abondant à  $m/z$  2627. Il représente la perte d'une fonctionnalisation alkylphosphonilée ([H<sub>25</sub>C<sub>12</sub>PO<sub>3</sub>]). Cet ion fragment mono-chargé à  $m/z$  2627, dont la composition est [HSiW<sub>10</sub>O<sub>34</sub> POC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>]<sup>-</sup>, contient un hydrogène, de provenance externe au POM. Cette présence a été prouvée en renouvelant l'expérience MALDI avec addition de lithium, qui provoque le décalage de ce pic de 6 Da, pour mener à un ion centré sur  $m/z$  2633 (le <sup>7</sup>Li<sup>+</sup> venant remplacer le <sup>1</sup>H<sup>+</sup>). Cet ion fragment de haut rapport  $m/z$  apparaît de manière relativement aléatoire, non maîtrisée, bien que son abondance semble dépendre de la nature de la matrice. Il est fort possible qu'il s'agisse d'une dégradation survenant avant l'expérience

d'ionisation, Vincent Jallet ayant montré dans ses travaux<sup>[103]</sup> que la cinétique de dégradation de cette espèce est dépendante de l'acidité environnante.

En revanche, lorsqu'on augmente fortement la puissance laser au-delà de la valeur seuil, par exemple à la valeur 1,5\*seuil, de nombreux ions de plus faibles  $m/z$  s'observent sur la gamme de masse  $m/z$  [1000-3000]. On observe sur la Figure 26 que les ions fragments annotés de leurs  $m/z$  se retrouvent présents dans tous les spectres de masse MALDI des matrices du second groupe. Il s'agit d'ions fragments qui contiennent  $Al^{3+}$ . D'autres ions fragments sont aussi visibles. Ils contiennent uniquement des éléments de la cage oxométallique (Si, O, W), avec parfois un hydrogène, leurs formulations étant décrites plus précisément dans le Tableau 9 de la partie 3.3.1.

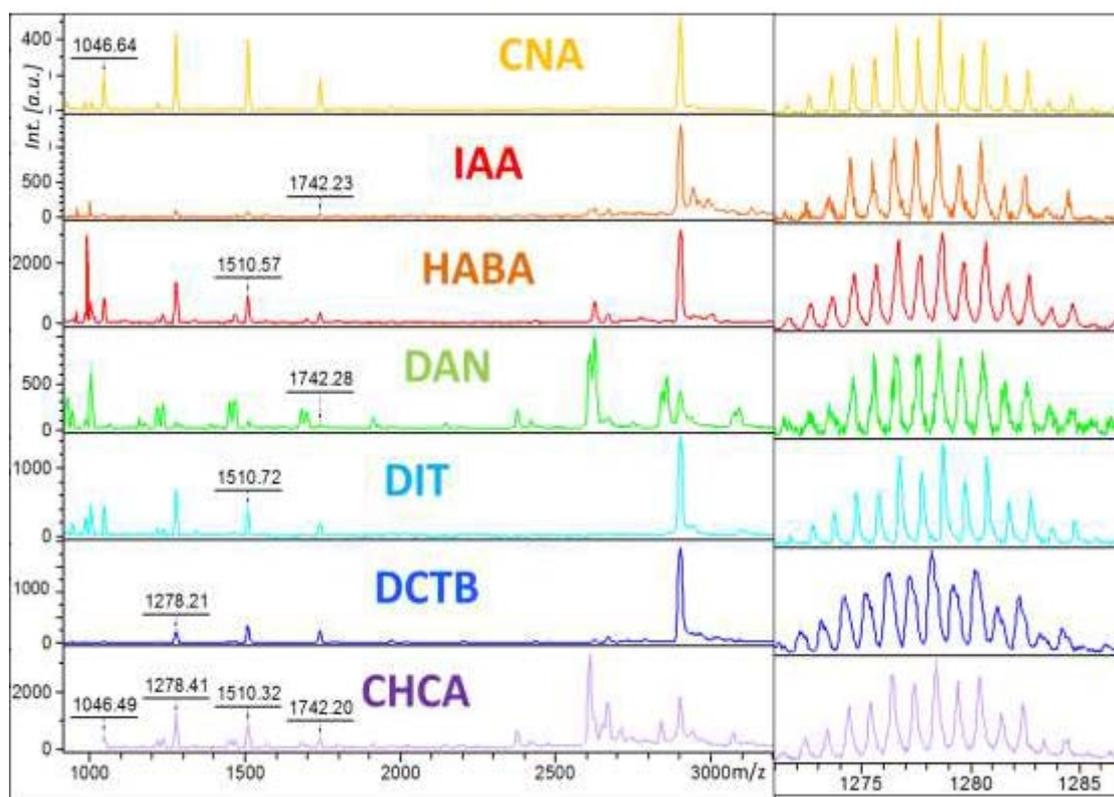


Figure 26 : Spectre MALDI de  $POMc12+Al^{3+}$  avec les matrices du second groupe à une puissance laser équivalente à 1,5\*(valeur seuil). Agrandissement de la région de l'ion fragment  $m/z$  1278 de composition  $[SiW_6O_{22}Al]$ . Les ions fragments de  $m/z$  [1046-1278-1510-1742] contiennent de l'aluminium.

Ces sept matrices semblent pouvoir être appelées « matrices énergétiques » dans notre analyse des POMs : en effet, elles donnent toutes lieu à des fragmentations en source abondantes. Ces matrices sont pourtant de natures variées lorsqu'on considère leurs propriétés physicochimiques, ou même leurs applications habituelles en MALDI. Certaines sont acides, polaires et protiques (IAA, CHCA, HABA), DIT est une matrice polaire et protique, CNA et DCTB sont peu polaires, aprotiques, tandis que DAN est matrice polaire, basique et protique.

On ne peut différencier ces matrices de celles décrites dans le premier groupe (contenant DHB et SA) que si l'on considère ces mêmes propriétés physicochimiques. L'énergie d'ionisation<sup>[136]</sup> des matrices du second groupe, c'est-à-dire l'énergie leur permettant de perdre un électron, est du même ordre de grandeur que celle des matrices du premier groupe. L'utilisation courante des matrices du second groupe est destinée à un panel d'analytes bien différent (voir le récapitulatif en Tableau 4).

Les fragmentations obtenues lors de l'utilisation de la source d'ionisation MALDI ont été étudiées en détail dans le cas des analytes couramment analysés par cette technique. Ces fragmentations sont soit recherchées pour permettre de caractériser les molécules considérées, soit évitées pour s'assurer que les ions observés correspondent aux espèces présentes dans l'échantillon initial et qu'ils ne proviennent pas de dégradation issues de la technique d'analyse. Il est donc important de déterminer quelles sont les possibilités de fragmentations.

Au contraire des choix effectués dans les publications antérieures, ces matrices de matrices ne peuvent pas être qualifiées de *chaudes* ou *froides*, car ces termes ont été utilisés lors de l'édification d'une classification relative empirique antérieure. L'ordre CHCA>SA>DHB, avait été obtenu selon l'aptitude des matrices à induire plus ou moins de fragmentations métastables de peptides.

Ici, il s'agit au contraire de fragmentations *promptes* (dites ISD pour In Source Decay), qui apparaissent lors de la désorption/ionisation avant extraction des ions pour les envoyer dans l'analyseur. Une autre classification relative a été réalisée<sup>[137]</sup> en rapportant la capacité à induire des fragmentations promptes de plusieurs molécules thermomètres (des benzylpyridiniums) et établit un ordre relatif comme DHB > SA >> CHCA. Cet ordre relatif, classé selon les aptitudes à engendrer d'abondantes fragmentations en source, est inverse au précédent mais, comme il est expliqué dans l'étude présentant ces résultats<sup>[137]</sup>, cela est logique puisqu'il ne s'agit pas des mêmes temps de décomposition. Une classification relative est basée sur l'observation des

fragmentations métastables lentes et l'autre sur les fragmentations promptes, ayant lieu en source.

Une étude plus récente considérant la fragmentation ISD des peptides confirme cet ordre et montre que la matrice DAN donne lieu à plus de fragmentations promptes que DHB<sup>[138]</sup>. La classification provenant de ces études devient DAN>DHB>SA>CHCA. C'est dans ce cadre comparatif de taux de fragmentation que l'on est amené à considérer nos résultats ; bien que les fragmentations des molécules organiques présentées soient différentes de nos composés polyanioniques, il s'agit également de fragmentations ISD, c'est-à-dire survenant en source de manière prompte.

On a alors calculé le taux de fragmentation (voir partie 2.3.2) observé pour chaque mélange d'échantillon préparé avec les 7 matrices du second groupe mises en présence du POMc12 et de l'aluminium(III), en ratio 1500/150/1 (matrice/cation/analyte). La Figure 27 montre que les matrices DAN et CHCA présentent un comportement différent des autres matrices car elles conduisent à d'abondantes fragmentations dès la valeur seuil de puissance laser sans évolution majeure après augmentation de la puissance laser. La matrice HABA entraîne aussi un comportement singulier, et notamment l'augmentation de la quantité d'ions fragments au même rythme que la quantité d'espèces moléculaires intactes (et donc une taux de fragmentation constant sur la Figure ci-dessous). Les autres matrices, qui montrent un taux de fragmentation nul à la valeur seuil de puissance laser, voient la proportion des ions fragments augmenter avec la puissance laser appliquée.

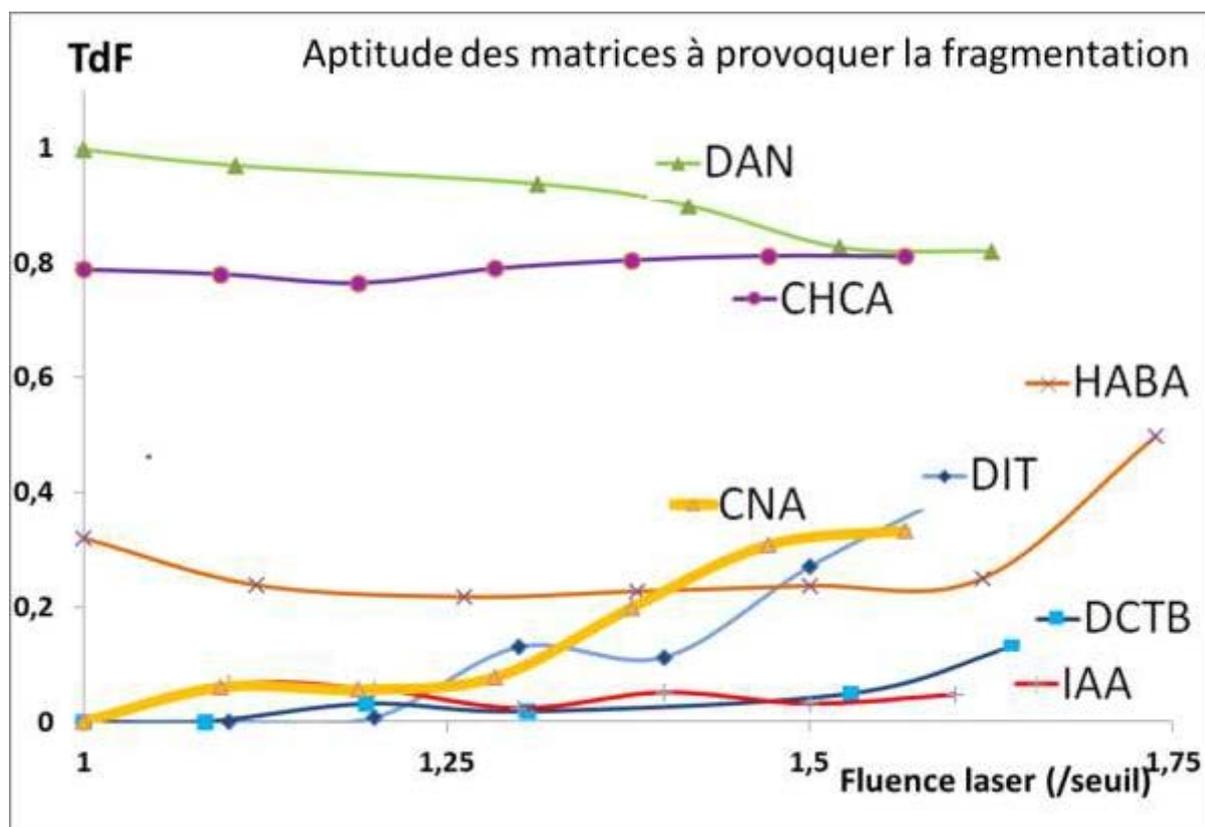


Figure 27 : Graphique représentant le taux de fragmentation (TdF) en fonction de la puissance laser (puissance laser/puissance laser seuil), pour 7 matrices différentes en mélange avec POMc12+Al<sup>3+</sup>.

Considérant ces valeurs, certaines matrices semblent plus efficaces que d'autres pour la production d'ion fragments. Toutefois, il est aussi nécessaire de considérer aussi l'abondance « absolue » de ces ions fragments, ainsi que la résolution des pics. La Figure 28 permet de comparer l'efficacité des matrices à produire des ions fragments et l'espèce moléculaire intacte. On ajoute, aux valeurs calculées pour les sept matrices du second groupe, des valeurs calculées pour DHB (qui fait partie du premier groupe). Toutefois, les fragments comptabilisés pour la matrice DHB ne sont pas comparables aux fragments obtenus avec les matrices du second groupe. Pour DHB il s'agit uniquement de fragments de haute masse ( $m/z$  2600-2875), dont la nature reste indéterminée (voir Figure 23). DHB est présenté sur cette figure dans le seul but de donner une idée de la quantité d'ions obtenus avec les matrices du premier groupe, la puissance laser utilisée pour DHB ne correspond pas à 1,5\* valeur seuil puisqu'on est difficilement en mesure d'identifier le seuil pour les matrices du premier groupe.

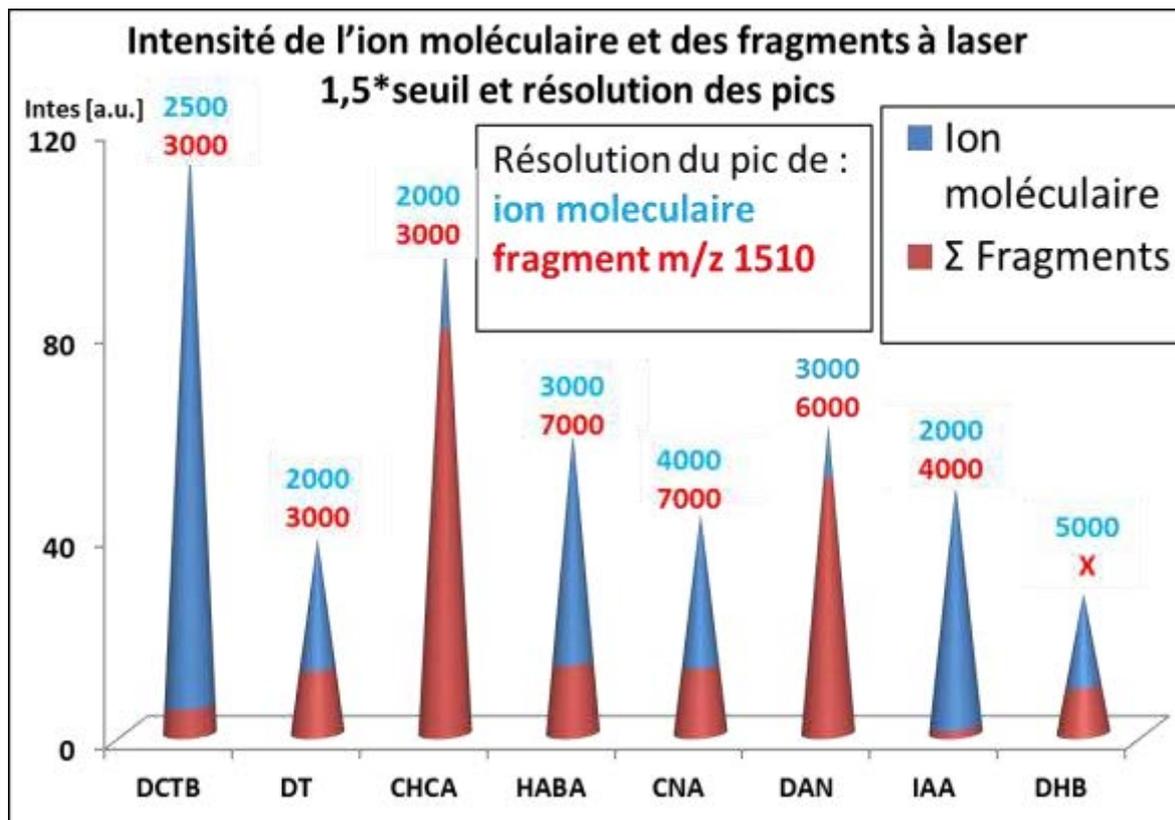


Figure 28 : Graphique représentant l'intensité et la résolution du signal de l'espèce moléculaire intacte et des ions fragments enregistré à laser 1,5\*valeur seuil.

La valeur de la résolution des pics sur la Figure 28 est déterminée à la puissance laser 1,5\*valeur seuil du laser pour chaque mélange de matrice. Cette puissance laser forte détériore beaucoup la résolution des pics de l'espèce moléculaire intacte. Ainsi la résolution donnée pour cet ion est bien en-deçà de ce qui peut être obtenu à la puissance seuil.

Le comportement diffère largement entre la matrice DAN, induisant, en quantité et en proportion, beaucoup d'ions fragments, et la matrice IAA, capable au contraire de produire une espèce moléculaire intacte abondante mais très peu d'ions fragments quelque soit la puissance laser. En considérant les taux de fragmentations dans toutes les matrices du second groupe, on est en mesure d'établir un classement des matrices en fonction de leurs facultés à induire la production des ions fragments source. Le classement relatif établi est le suivant :

DAN>CHCA>CNA>DIT>HABA>DCTB>IAA

A la suite de cette classification relative peuvent s'ajouter les matrices du premier groupe, notamment DHB et SA, régulièrement étudiées dans les études de fragmentation en

mode ISD. Ces matrices ne produisent pas à proprement parler de fragmentations comme les matrices du second groupe. Nos résultats ne sont pas comparables, par ailleurs, avec ceux observés lors des études de fragmentation en source de peptides ou de molécules thermomètres<sup>[137]</sup>. Il est toutefois possible de mettre à part de nos considérations les matrices DAN et CHCA qui, outre le fait de provoquer la fragmentation comme les Figure 28 et Figure 29 le montrent, produisent faiblement l'espèce moléculaire intacte. La Figure 27 fait noter que DAN, encore plus que CHCA, produit minoritairement des ions fragments contenant l'aluminium, au contraire des autres matrices du second groupe.

Il est possible que des mécanismes de fragmentations supplémentaires œuvrent lorsque les matrices DAN et CHCA sont utilisées. En revanche, dans les matrices CNA, DIT, HABA, DCTB et IAA le mécanisme semble identique, puisque la nature des ions fragments est la même. Les mécanismes de fragmentations seront discutés au paragraphe 3.3.

A la lumière de ces considérations, il est possible de conclure que la matrice CNA est la matrice la plus adaptée à l'analyse des POMs. Elle permet d'obtenir une espèce moléculaire intacte dont la qualité du signal, par son intensité et par son signal/bruit, est la meilleure pour observer, éventuellement, d'abondantes fragmentations porteuses d'informations structurales. Ces propriétés pourraient permettre de caractériser un analyte inconnu, bien que dans le cas des POMs la structure des ions fragments, ainsi que leur mode de production soient à ce jour peu étudiés<sup>[112]</sup>.

### **3.1.2. Influence des supports sur la qualité des spectres**

Outre la préparation d'échantillon, qui est l'étape cruciale du MALDI, d'autres paramètres expérimentaux peuvent influencer la qualité des spectres de masse MALDI. Il y a bien entendu les paramètres instrumentaux, dont nous n'avons modifié que le délai d'extraction, mais aussi la nature du support (sur lequel est déposé l'échantillon).

Il était important de s'attarder sur la nature du support puisque des travaux antérieurs rapportent l'émission d'électrons de celui-ci. En effet, les cibles métalliques sur lesquelles le dépôt de matrice est réalisé sont reconnues pour avoir une interaction avec les impulsions laser et pour émettre des électrons<sup>[139]</sup>. Ces électrons sont supposés être impliqués dans les mécanismes d'ionisation MALDI, tant au niveau de la formation des espèces chargées (et notamment des ions de la matrice), que de la possible neutralisation des espèces produites.

Frankevich et ses collaborateurs<sup>[132]</sup> rapportent que le rendement d'ionisation en mode positif d'un peptide est bien plus grand lors de l'utilisation de supports non métalliques du fait de la neutralisation des cations produits par les électrons. Il est rapporté qu'un support isolant permet d'observer des peptides protonnés deux fois avec une plus grande abondance. Toutefois McCombie et ses collaborateurs<sup>[59]</sup> notent un phénomène contraire dans leurs expériences. Leurs résultats montrent aussi que les substrats métalliques accroissent l'ionisation de peptides lorsque le dépôt est fin, par interaction entre la matrice, le support et le laser. Or c'est dans ces conditions que la production d'électrons est la plus à même d'interagir avec les peptides protonnés, cela montre que les électrons supposés neutraliser les cations formés n'ont pas d'impact ou d'autres composantes rendent leurs actions négligeables. Il est aussi montré dans cette étude<sup>[59]</sup> que le fait que le support soit conducteur n'est pas la seule condition, puisqu'étrangement le rendement d'ionisation est moindre sur un support en or que sur un support en Inox. Ces observations sont interprétées comme des réactions complexes d'association des orbitales moléculaires de la matrice et du support, qui sont plus favorable avec l'acier que l'or.

Malgré de nombreuses études exploratoires visant à une meilleure compréhension du rôle des électrons, le concours des électrons reste encore mal défini et au vu de la discordance des résultats rapportés il est regrettable qu'aucune étude n'ait été menée en mode négatif.

Puisque l'ionisation de nos analytes s'opère en mode négatif nous devrions, sinon observer un phénomène d'accroissement des anions formés, ne pas être gêné par le phénomène de réduction des charges positives induit par les électrons. Qui plus est, l'apport de la contribution des électrons pour l'ionisation des POMs peut être doublement intéressant puisque ces composés possèdent des propriétés oxydo-réductrices importantes et ils sont considérés comme des réservoirs à électrons<sup>[108]</sup>. Ils sont aptes (lorsqu'ils sont en solution) à accumuler plusieurs électrons sans que cela ne change leur structure<sup>[104]</sup>.

Ainsi, sept matériaux différents avec des propriétés isolantes ou conductrices, sur lesquels le même échantillon a été déposé lors de nos essais, ont été sélectionnés pour étudier le rôle des électrons (détail en partie 2.1.1).

Afin d'évaluer l'influence des supports utilisés sur l'ionisation d'un peptide en mode positif, un mélange qui donne aisément l'ion correspondant au peptide protonné a été testé. Ce mélange contenait l'angiotensine I (peptide de masse 1295Da) dans la matrice CHCA acidifiée

par 0,1% d'acide trifluoroacétique, dont le ratio matrice/analyte était de 1/1500. Les spectres de masses acquis sont similaires sur tous les supports à l'exception du PTFE qui ne permettait pas d'observer d'ions. Aucune fragmentation en source à la puissance seuil de laser n'a été observée sur quelque support que ce soit. Dans le but d'évaluer si les électrons, forcément émis en nombre différents selon les supports, avaient une influence sur la stabilité des ions formés, nous nous sommes intéressés aux fragmentations métastables. En effet il est mentionné dans la littérature que les électrons seraient émis par le support métallique et viendrait neutraliser les cations produits. Ces captures électroniques, si elles ont lieu, devraient induire une instabilité des ions formés et donc l'on devrait observer des différences sur les spectres de masse ou sur les spectres MS/MS. Ainsi des expériences MS/MS menées en mode LIFT sur l'ion du peptide protonné ont été menées, elles ont produit des résultats analogues sur tous les supports (hormis PTFE qui ne donne pas d'ions) : la nature ainsi que l'abondance des ions issus de la fragmentation du peptide protonné étaient semblables quel que soit le support. Les résultats de ces expériences (non reportées ici) ont donc uniquement permis de valider la possibilité d'obtenir des espèces en utilisant la technique MALDI sur divers support, à l'exception du PTFE.

Les résultats obtenus en mode négatif lors de l'analyse du POMc12 dans la matrice CNA dopée avec du chlorure d'aluminium sont similaires aux observations réalisées en mode positif pour le peptide. La production d'espèces moléculaires intactes (ions qui dépassent la masse du POM) sur tous les supports, sauf le PTFE est constatée. L'espèce moléculaire intacte produite est celle attendu, de formule  $[\text{POMc12+Al}]^-$ , à l'exception de la plaque d'aluminium qui produit une multitude d'espèces dans la région moléculaire.

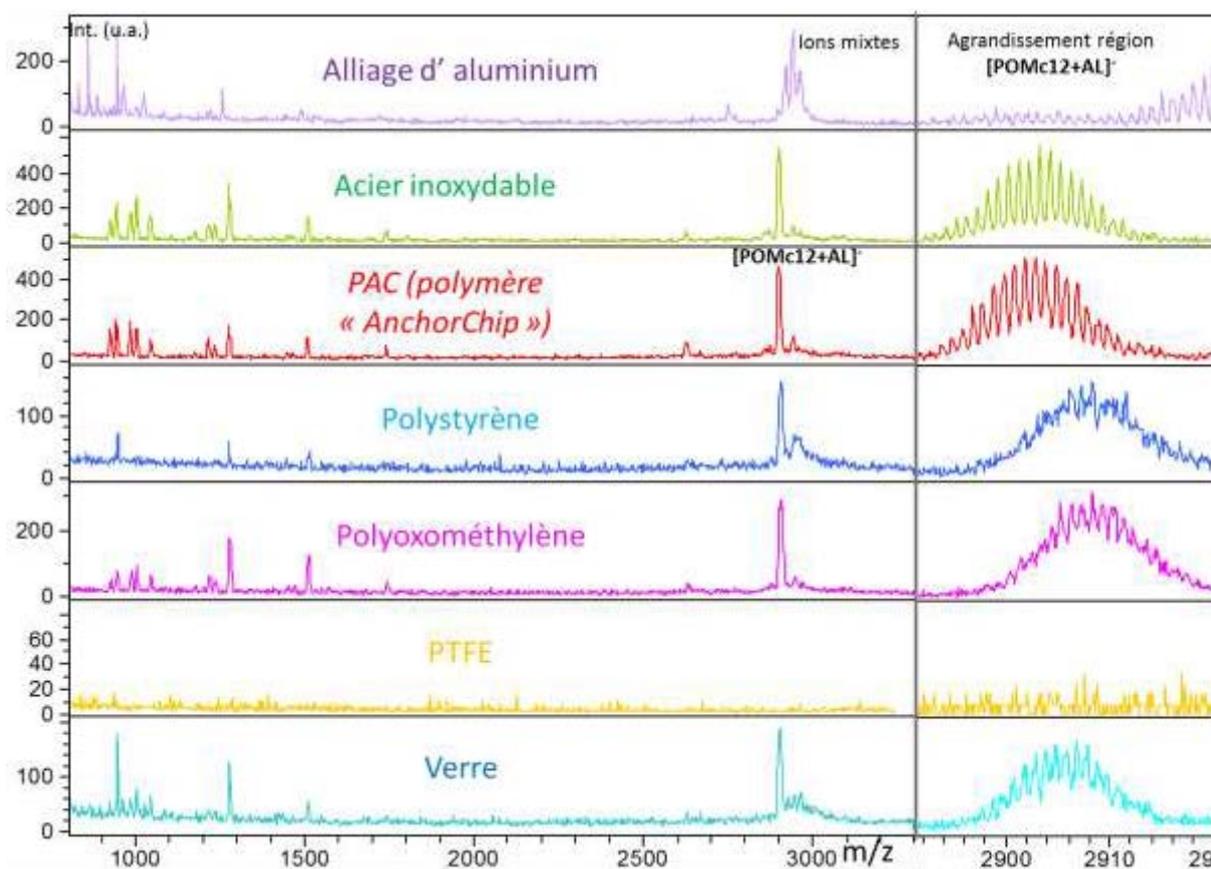


Figure 29 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Al<sup>3+</sup> déposé sur sept supports différents dans des conditions expérimentales identiques. Les spectres ont été enregistrés à une puissance laser de 75 (u.a.).

On n'explique pas l'absence d'ions produits lors de l'utilisation de la plaque de PTFE. Cette matière a pourtant été utilisée avec succès au cours d'études publiées dans des journaux scientifiques<sup>[140,141]</sup>. La plaque en aluminium provoque la formation de multiples adduits non attendue, dont les pics superposés rendent difficiles l'attribution. La résolution des pics varie beaucoup d'un support à l'autre et les meilleurs résultats sont obtenus sur la plaque en inox. Bien que des ions fragments produits en source soient visibles sur la majorité des supports, l'abondance des ions fragments n'est importante que sur les plaques en polyoxométhylène, sur la plaque PAC et sur la plaque inox. Ces résultats ne permettent pas de tirer une conclusion sur le rôle des électrons.

Peu de supports donnent des pics abondants ; toutefois la plaque *PAC*, dont le caractère isolant a été vérifié, permet d'observer un ion contenant l'espèce intacte intense, dont la résolution est comparable à celle obtenue sur le support inox. Ainsi nous avons continué de réaliser les expériences MALDI en n'utilisant que ces deux plaques qui présentent un caractère conducteur électrique opposé, la plaque *PAC* étant électriquement isolante, à l'inverse de la plaque en inox.

La surface plus hydrophobe de la plaque *PAC* rend plus aisé les dépôts des échantillons (la goutte s'étale moins même lorsque les solvants utilisés sont volatils). Cette plaque est vantée par ses constructeurs (Bruker/Eppendorf) comme capable d'obtenir des ions bien plus abondants pour l'analyse MALDI en mode positif de peptides. La préparation des échantillons étant très simplifiée, il suffit de déposer une goutte de l'échantillon sur les dépôts de matrices déjà présents sur les plaques *PAC*. Il faut préciser que ces plaques n'ont pas été utilisées de cette manière, puisqu'elles ont été lavées des pré-dépôts qu'elles présentaient afin d'y déposer nos échantillons de POM dans des matrices choisies en utilisant la technique de la goutte séchée. L'utilisation de ces plaques a été faite de la même manière que les plaques communes en acier inoxydable, c'est à dire en déposant nos échantillons et en laissant sécher la goutte du mélange du POMc12 préparé avec différents sels et matrices.

La totalité des essais mettant en présence le POMc12 dans CNA avec divers cations, seuls ou en mélange, a été répétée à la fois sur la plaque en inox et sur la plaque *PAC*. La nature des ions observés ne diffère pas selon la cible utilisée, en revanche l'abondance totale et relative des espèces diffère. En général, l'intensité des pics est légèrement plus grande sur la plaque *PAC* et le seuil d'observation des ions est identique. Toutefois, l'augmentation de la production totale ionique est difficile à mettre en évidence en raison de la variabilité des spectres de masse MALDI, et pouvant tenir de facteurs externes, comme le fait que la cristallisation et l'épaisseur des dépôts sont différentes. En revanche, l'abondance relative entre les pics d'un même spectre de masse est aisément mesurable et permet d'établir des comparaisons de ces deux supports. C'est le cas ici, où l'on observe (sur la Figure 30) un taux de fragmentation en source supérieur sur le support plastique que sur celui inox.

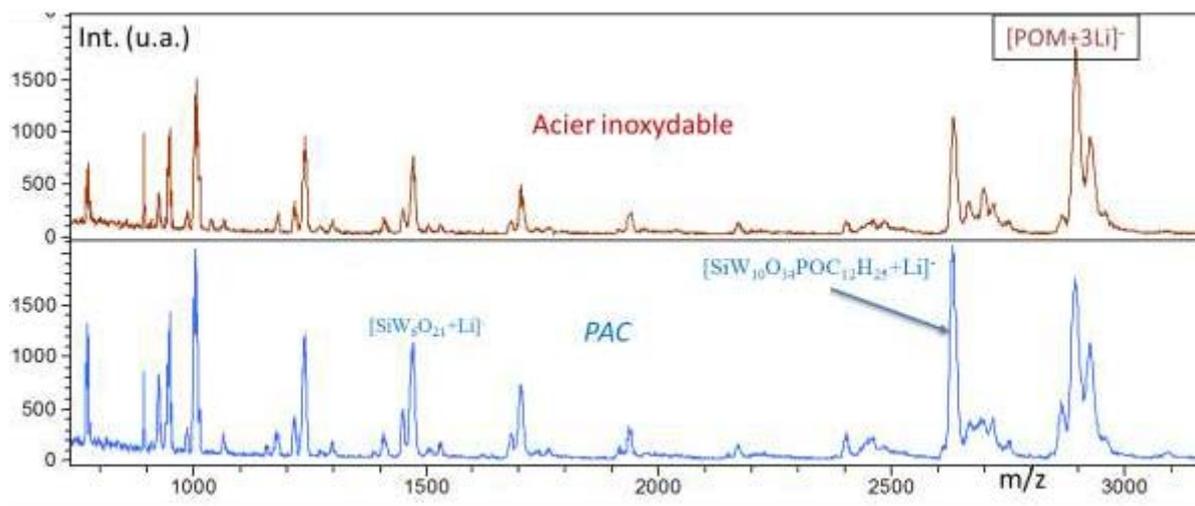


Figure 30 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Li<sup>+</sup> enregistré à une intensité laser de 97 (u.a.). Le mélange est déposé sur une plaque en acier ou en polymère (PAC).

Les différences ne s'arrêtent pas là. En effet, si tous les fragments se trouvent être plus abondants, la formation de certains type d'ions fragments est favorisée relativement aux autres. Les spectres de masse de la Figure 31, où sont annotés les ions fragments et leurs formules, montrent que la proportion de certains ions particuliers ( $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ) se trouve augmentée sur le support *PAC*. Ces ions sont annotés d'une étoile\* et ont pour caractéristique de contenir un électron excédentaire. Ce type d'ion fragment est particulièrement visible lors de l'utilisation de cuivre(II) ou de cobalt(II) en tant que sel dopant l'échantillon. Le support a donc un effet notable sur la proportion relative des ions formés au cours du processus MALDI (voir discussion sur les captures électroniques en partie 3.2.2).

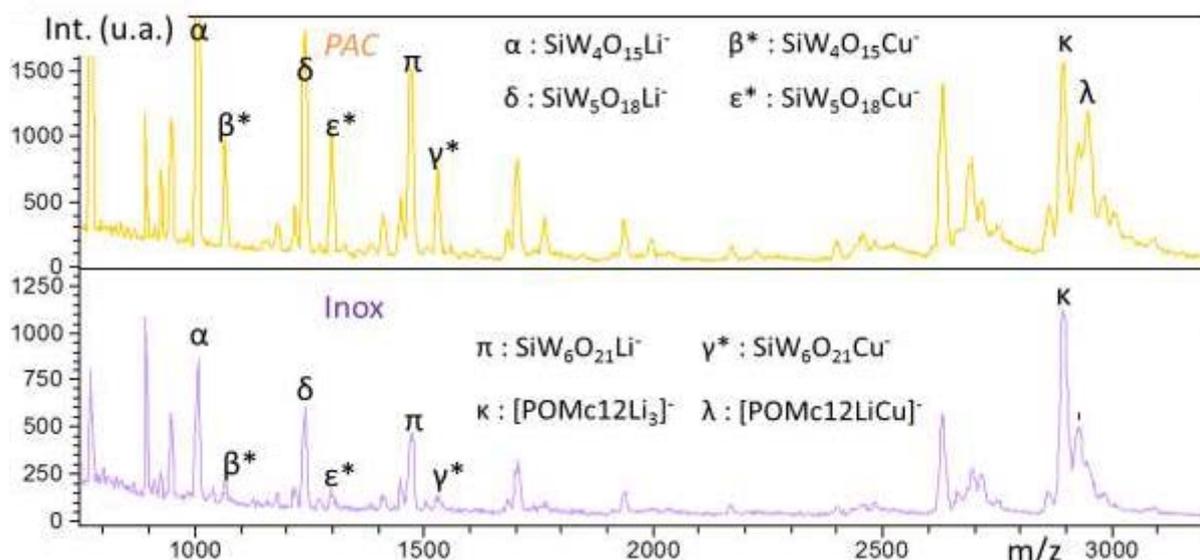


Figure 31 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Cu<sup>2+</sup>+Li<sup>+</sup> enregistré à laser 97 u.a. Le mélange est déposé sur une plaque en acier (inox) ou en polymère (PAC). Les ions annotés d'une étoile ont capté un électron.

Ces électrons peuvent être détectés grâce à un dispositif qui permet de les capter grâce à un gaz composé d'hexafluorure de soufre<sup>[139]</sup>. Nous ne pouvons pas reproduire cette expérience et donc nous ne pouvons pas affirmer que les électrons responsables retrouvés dans certains ions fragments (noté\* dans la Figure 31) ont la même origine que ceux observés libres. Toutefois on s'attendait, au vu des résultats publiés, à ce que la capture d'électrons soit plus abondante sur le support en acier. Nos expériences montrent que les électrons disponibles dans le panache sont plus nombreux sur le support isolant que sur le support métallique.

Dans le cas de nos analyses, il est évident que les électrons captés par les ions ne proviennent pas du support plastique qui ne peut émettre des électrons. Le fait d'utiliser un support conducteur n'induit pas d'augmentation de l'intensité des ions en négatif et l'inverse est même observé : le nombre d'ions total obtenus sur un support isolant étant plus important, et notamment celui des ions fragments qui ont capté un électron. Les processus MALDI induisant des transferts d'électrons ne sont, dans ce cas, pas liés à la nature conductrice du support. Ces électrons proviennent assurément de la matrice qui peut s'ioniser de manière radicalaire<sup>[136]</sup> avec d'autant plus de probabilité que la fluence laser est augmentée lors des expériences ISD. De plus, dans le cas de la matrice CNA les ions de matrices ne sont observés que sous forme d'anion ou cation radicalaire (CNA<sup>+°</sup> et CNA<sup>-°</sup>), ce qui s'observe en proportion

faible ou négligeable lors de l'utilisation de la plupart des matrices protiques qui sont détectées sous forme déprotonnées.

### 3.1.3. Applications de la méthode de préparation d'échantillon optimisée et de la matrice CNA

La matrice CNA qui s'est montrée si performante pour l'ionisation des POMs n'a été mentionnée qu'une seule fois dans la littérature<sup>[11]</sup>. Elle était définie comme une matrice permettant l'ionisation de produits bruts pétroliers. La complexité des spectres obtenus alors ne permettait pas d'identifier les ions obtenus, cette matrice était simplement mentionnée comme capable de désorber beaucoup d'espèces différentes par rapport à la matrice acide IAA qui ne permettait de voir que peu d'ions.

Nous avons donc entrepris d'appliquer la technique consistant à introduire des cations dans la matrice CNA aux autres POMs disponibles au laboratoire (détaillés dans le Tableau 3) portant des fonctionnalisations variées.

Nous n'avons toutefois jamais réussi à obtenir les mêmes résultats qu'avec les POMs du type de POMc12 et ce quels que soient la matrice utilisée ou les cations introduits. Quelques POMs ont été observés sous forme d'ions fragments toujours mono-chargés dont les m/z étaient proches de l'ion contenant l'espèce intacte, mais aucun ion intact, donc sous forme d'ion adduits, n'a pu être détecté. Les POMs fonctionnalisés qui ont montré des ions fragments dont la masse était proche de la formule intacte étaient des POMs chargés 4<sup>-</sup> comme POMc12 mais qui avaient perdu un ligand oxo (O<sup>2-</sup>), type d'ion qui peut aussi être observé avec le POMc12 en absence de cation ajouté. Cette différence de comportement peut être expliquée par la différence de force de liaison, qui est [phosphore-cage oxométallique] dans le POMc12, plus stable<sup>[142]</sup> comparée à une liaison telle que [étain-cage oxométallique], qui est présente dans la structure de l'espèce [PW<sub>11</sub>O<sub>39</sub>SnC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>I]<sup>4-</sup> (voir Tableau 3). En effet l'espèce précédente s'observe sans la fragmentation de la liaison, sous la forme de l'ion [PW<sub>11</sub>O<sub>38</sub>SnC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>I+H]<sup>-</sup>, qui a donc perdu un oxygène et a fixé un H.

Le seul autre POM de structure bien différente de POMc12 qui montre la possibilité de s'ioniser de manière intacte est un POM non fonctionnalisé, nommé POMv. Comme les POMs de la famille de POMc12, il s'observe sous forme d'adduit avec des cations monovalents (Na<sup>+</sup> ou Li<sup>+</sup> par exemple). C'est d'ailleurs ce composé qui a été observé comme étant capable de

s'attacher au cation sodium au début de nos recherches (présenté en Figure 15). Néanmoins ce POM a la particularité de pouvoir s'ioniser sans le concours d'une matrice, en mode LDI. L'ion intact ne peut être observé sans l'aide d'une matrice, même en présence de cations comme le lithium, mais sous forme de fragment (voir la Figure 32).

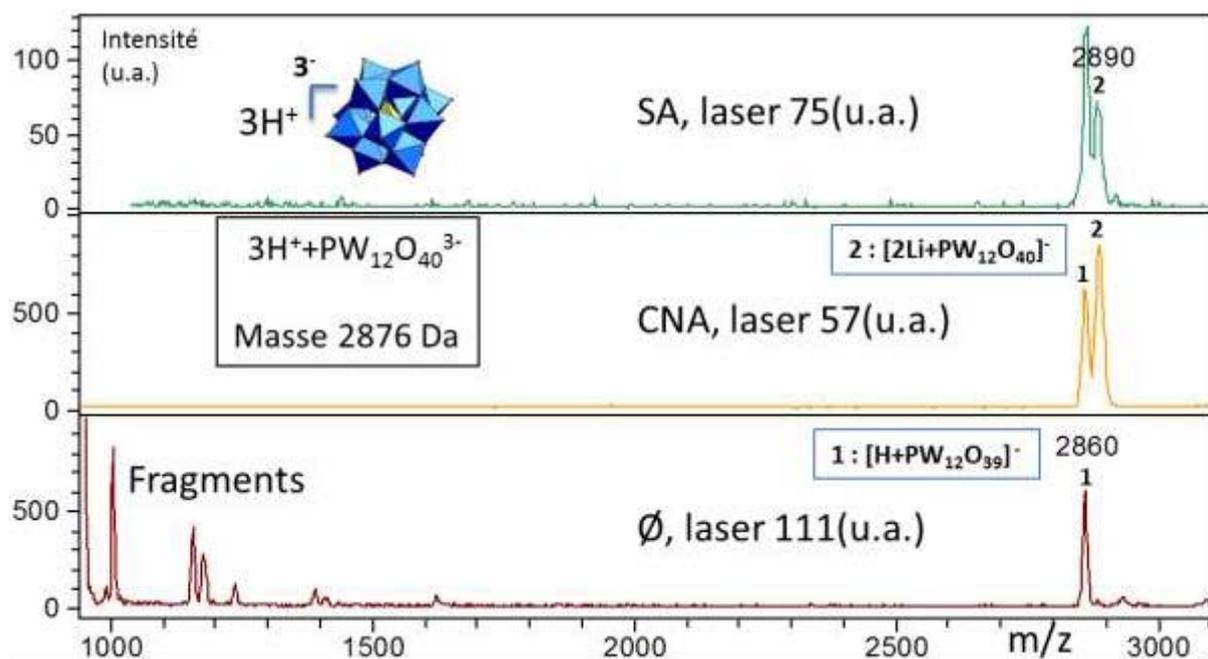


Figure 32 : Spectre de masse du mélange POMv+Li<sup>+</sup> en LDI (bas) ou en MALDI dans les matrices CNA ou dans SA enregistré à aux puissances laser décrites.

A travers l'ionisation MALDI du mélange CNA/Li/POMv il est observé que, même déposé sur une plaque avec le sel de lithium, ce POM ne peut se désorber sous forme d'ion moléculaire intact. Cette expérience (spectre non montré) indique qu'il est impossible pour ce POMv de s'associer avec le lithium en absence de matrice.

Seul l'ion fragment  $m/z$  2860 de formule  $[PW_{12}O_{39}]^-$  est observé par LDI, en plus des ions fragments de bas rapport  $m/z$ . L'ion intact peut être observé sous la forme d'un ion adduit avec des cations lorsqu'on utilise une matrice. La Figure 32 montre que même la matrice SA (premier groupe) qui ne s'est pas révélée être une matrice performante pour l'ionisation des POMs, permet en présence de lithium ajouté d'obtenir l'ion  $[PW_{12}O_{40}Li_2]^-$ . Lors de l'utilisation du

mélange en solution POMv+Li<sup>+</sup> on n'obtient pas du tout d'adduit, ce qui tend à montrer que l'adduit se forme en présence de matrice, que se soit dans le solide déposé ou probablement lors de la désorption/ionisation.

Avant de comprendre la particularité de la matrice CNA pour l'analyse de nos POMs, nous présentons les expériences qui ont permis de reproduire les effets de la matrice CNA avec d'autres matrices. Cela s'est traduit par l'utilisation de composés qui ressemblent à CNA, mais qui ne possèdent pas toutes ses caractéristiques. La matrice CNA a été considérée comme composée de deux parties distinctes : elle est un anthracène et possède une fonction nitrile. Ainsi, nous avons aussi utilisé des échantillons contenant les matrices méthylantracène et nitroanthracène mélangés avec des composés possédant des fonctions nitriles, tels que le tétracyanoéthylène (TCE) ou le tétracyanoquinodiméthane (TCNQ) (voir Tableau 4). Ces deux anthracènes ont des capacités d'absorption de la lumière UV du laser très similaires à celle de la matrice CNA. Des résultats intéressants illustrés en Figure 33 montrent que le méthylantracène permet de produire l'ion contenant l'espèce intacte de façon moins abondante que la matrice CNA et ne permet d'observer aucune fragmentation en source alors que son mélange avec le TCNQ permet d'obtenir des résultats très similaires à CNA.

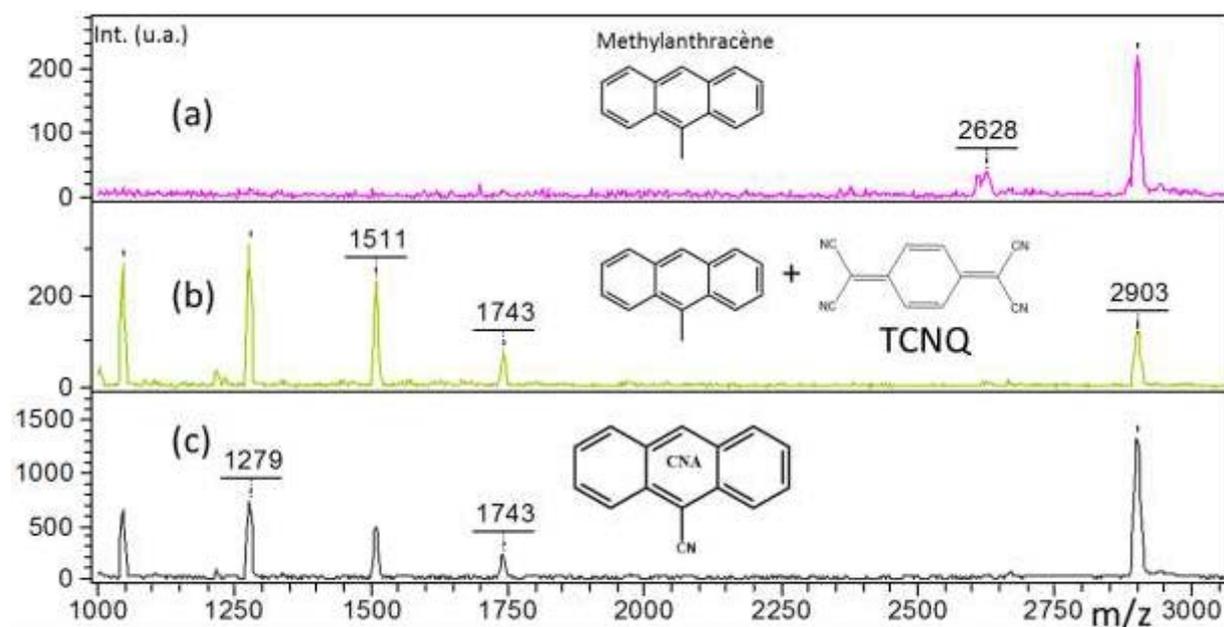


Figure 33 : Spectre MALDI de POMc12+Al<sup>3+</sup> dans des mélanges de matrices, enregistrés à la puissance laser 1,5\* valeur seuil. (a) : méthylantracène, (b) : méthylantracène+TCNQ (9/1), (c) : CNA.

On observe le même phénomène avec la matrice nitroanthracène, qui lorsqu'elle est utilisée seule n'induit pas de fragmentation en source à moins qu'on ne lui ajoute la co-matrice TCNQ. L'ajout de TCNQ dans la matrice CNA permet aussi d'augmenter légèrement le taux de fragmentation en source (figure non montrée). Ce comportement n'est pas seulement lié à la fonction cyano, car l'addition de TCE ne modifie pas les spectres MALDI d'échantillon préparés avec les matrices méthylantracène et nitroanthracène. Il semble nécessaire que cette fonction chimique soit portée sur une molécule aromatique. Ces résultats sont toutefois relativement isolés. En effet, l'utilisation de TCNQ en tant que co-matrice dans d'autres matrices qui permettent d'analyser le POMc12, telles que DCTB ou CHCA (qui possèdent toutes deux déjà des groupements cyano), n'accroît que subtilement le taux de fragmentations en source. La Figure 34 indique que lorsqu'on ajoute TCNQ à la matrice SA, aucune fragmentation n'est à relever. Il en est de même pour les matrices du premier groupe décrites en partie 3.1.1, auxquelles SA appartient. On en déduit que les anthracènes qui produisent d'abondants ions radicalaires doivent permettre une interaction particulière avec le TCNQ qui permet de transmettre une grande quantité d'énergie au POM pour qu'il se fragmente.

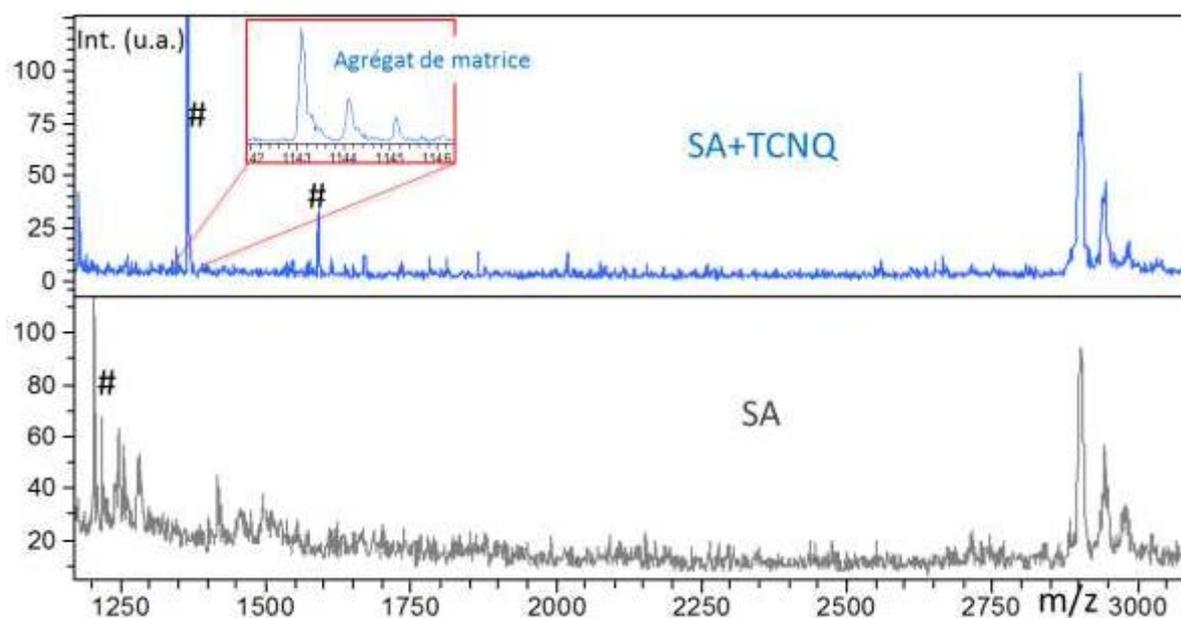


Figure 34 : Spectre MALDI de  $\text{POMc12}+\text{Al}^{3+}$  dans des mélanges de matrices enregistré à laser de forte puissance. (haut) : SA, (bas) : SA+TCNQ (9/1). Les agrégats de matrice sont annotés#.

La matrice TCNQ a déjà été mentionnée<sup>[136]</sup> pour ses propriétés de capture électronique permettant d'ioniser des pigments sous forme de cation radicalaire en mode ion positif. Il a,

dans le même temps, été montré qu'en mode négatif elle ne permettait pas l'ionisation de ces mêmes composés et que seul l'anion radicalaire TCNQ<sup>°</sup> était détecté<sup>[120]</sup>. L'utilisation de TCNQ a aussi été considérée pour l'analyse de peptides car elle promeut la fragmentation en source des peptides par abstraction radicalaire d'hydrogène<sup>[143]</sup>. Toutefois, dans le cas des POM analysés, les procédés de fragmentations ne sont pas connus et il nous est impossible de relier le caractère radicalaire de la matrice avec les fragmentations observées. Si quelques ions fragments montrent de la capture électronique cela semble relativement indépendant de la capacité de la matrice à s'ioniser de manière radicalaire (voir partie 3.2.2).

Enfin dans le but d'essayer d'observer des espèces multichargées, et ce quel que soit le POM utilisé, un dernier composé, le m-nitrobenzylalcool (m-NBA), a été introduit en tant que co-matrice avec CNA. Intégré en faible quantité, cet agent est fréquemment utilisé en ESI<sup>[130]</sup>. Il a la propriété d'accroître l'état de charge des espèces multiprotonées de protéines. En utilisant la technique MAI (Matrix Assisted Ionization, qui consiste à chauffer un échantillon dans une source à pression atmosphérique) son utilisation a permis d'observer des peptides multiprotonnés<sup>[144]</sup>. Cependant nos essais en introduisant de 1% à 10% molaire de m-NBA dans CNA, n'ont montré aucun bénéfice lié à son utilisation. Nous attendions la possibilité d'observer des ions multichargés ou un effet sur la fragmentation mais seule une diminution notable de l'intensité des ions a été observée (résultats non représentés).

Par la suite d'autres essais, tous plus ou moins infructueux, ont été réalisés en tentant l'analyse MALDI d'analytes différents par le biais d'un échantillon préparé avec ou sans le mélange CNA des cations (Li<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>), en mode positif comme en mode négatif. Les analytes testés, dont ne sont pas présentés les spectres obtenus, ont couvert une vaste gamme de familles de composés, telles que :

- des polymères de natures très variées (polystyrène, polyméthacrylate de méthyle, poly carbonate, polypropanediol, polyvinylpyrrolidone, dendrimère de carbohydrate) ;
- des lipides (acides élaïdique, linoléique, euricique, du rétinol) ;
- des glycanes (cyclodextrines, des sucres contenant des groupements sulfates) ;
- des porphyrines (composés synthétisés par un laboratoire collaborant avec S. Alves), qui sont des composés détectés sous forme d'ions fragments en LDI.

Dans aucun de ces cas précédents des ions ont été détectés.

- des nanoparticules d'or (composés synthétisés par un laboratoire collaborant avec D. Lesage) de masse molaires de 40 000 Da ont été également testées. Ces particules sont très difficilement détectés en utilisant la matrice CNA, et presque exclusivement sous forme d'ions fragments de  $m/z$  10 000-25000, alors que la matrice DCTB permet d'obtenir de bien meilleurs résultats, rendant peu attractive la matrice CNA.

La méthode consistant à introduire des cations dans la matrice pour permettre l'ionisation par formation d'un ion intact adduit a été testée en utilisant des fragments d'ADN dans la matrice THAP et CHCA. Ces composés contiennent de nombreux groupements basiques. Cela laisse supposer qu'ils soient à un moment sous forme de polyanions. La formation d'adduit entre un analyte et des cations pourrait alors se constituer, mais aucun résultat n'a été observé en cette direction.

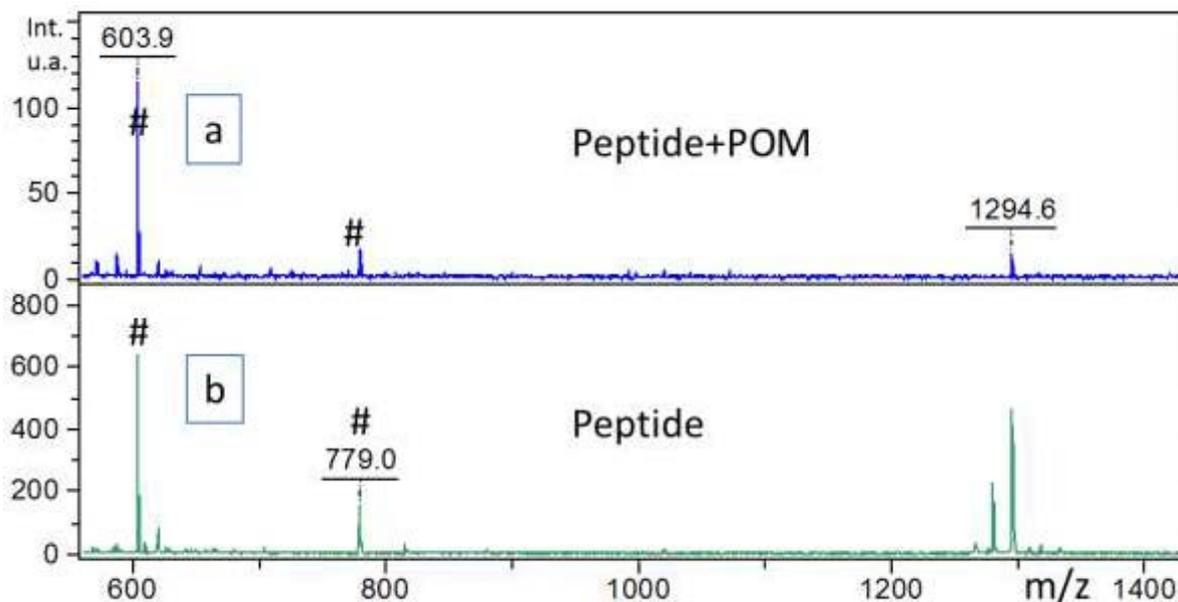
Bien que nos essais aient été pour la plupart infructueux, l'idée d'utiliser une matrice peu polaire permettant d'attacher des cations à des analytes a trouvé du succès à travers l'utilisation de la matrice DCTB pour l'analyse de polystyrène. Une étude récente publiée en 2015<sup>[133]</sup> montre la possibilité d'attacher les cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  et surtout  $\text{Cs}^+$  à ce polymère avec un meilleur rendement d'ionisation, surtout avec  $\text{Cs}^+$ . Ces résultats montrent entre autres l'avantage d'utiliser la matrice DCTB, issue d'une méthode d'analyse très robuste face à la variation des paramètres, tels que les ratios matrice/cation/sel. C'est le cas pour l'analyse des POMs pour lesquels il est montré (voir Figure 17) que les proportions peuvent varier énormément sans que les résultats n'en pâtissent. Néanmoins CNA n'a pas pu être utilisée comme matrice malgré les résultats prometteurs que nous sommes arrivés à obtenir pour quelques polyanions.

#### **3.1.4. Utilisation du POM en présence d'autres analytes**

Les POMs étant des composés chargés négativement et qui ont la capacité d'emmagasiner des électrons pour les redonner lors de réactions de catalyse en phase liquide, il était envisageable qu'ils présentent des interactions mettant en jeu des transferts de charge ou d'électrons avec d'autres analytes lors des processus MALDI. Afin de vérifier si l'interaction entre les POM, la matrice et les ions permettait d'augmenter l'ionisation, d'induire des fragmentations, ou de promouvoir la formation d'adduits ou d'agrégats particuliers, des mélanges permettant

d'observer aisément des peptides (ceux du *Tableau 1*) ou des polymères (polystyrène ou polyéthylène glycol) ont été utilisés.

Des essais d'analyses de peptides ou polymères ont été réalisés avec pour seul résultat une perte du signal des ions. Les spectres de masse présentés sur la *Figure 35* ont été réalisés avec un mélange ordinaire pour un peptide avec la matrice CHCA, (peptide à 1g/L et matrice à 10g/L, mélange 2/10) dopé du POMv non fonctionnalisé (ajout de 2 $\mu$ L de POM à 1g/L). Cela provoque la diminution drastique du nombre d'ions détectés et seul un très léger bruit de fond au rapport m/z attendu du peptide est constaté. Même les ions de matrices (marqués par des #) voient diminuer leurs abondances.



*Figure 35 : Spectres MALDI (60 tirs, laser 40 u.a.) du mélange CHCA+Angiotensine I en présence de POMv (a) et sans ajout de POMv (b). Les agrégats de matrice sont annotés #.*

La diminution de la quantité de POM introduite dans l'échantillon n'apporte rien de différent, à moins que sa concentration ne devienne suffisamment basse pour que le nombre d'ions détectés soit identique à celui obtenu lors du mélange sans l'ajout de POM. Les POMs ont donc une influence considérable sur la qualité du signal des peptides, bien qu'elle soit strictement négative dans les expériences tentées. Il serait toutefois possible d'envisager l'introduction de POMs dans la matrice CNA avec des composés portant des charges positives, pour tenter d'observer un comportement similaire à celui publié en 2011<sup>[109]</sup> et qui a mené à

l'observation du complexe formé en solution entre une porphyrine et le POMv représenté en Figure 11.

La possibilité de fonctionnaliser des surfaces avec des POMs, qui peuvent absorber la longueur d'onde avait initialement été envisagée. Cependant, au vu du peu de résultats obtenus au cours des essais de mise en contact de nos analytes, cette idée avait peu de chance d'aboutir à un résultat. Qui plus est ce genre de développement ne concernant plus le MALDI, il dépassait nos compétences et nécessitait notamment l'appui du domaine de la synthèse de matériaux complexe.

### **3.2. Processus d'ionisation par cationisation et-ou capture électronique**

Dans cette seconde section de notre chapitre résultat sont évaluées les interactions des POMs avec différents cations afin de déterminer quelles sont les préparations d'échantillon qui permettent la production de l'ion moléculaire ou des ions fragments les plus abondants en vue d'améliorer l'analyse générale pour les POMs.

Les polyoxométallates sont détectés en spectrométrie de masse en utilisant une source ESI sous forme d'ions intacts adduits à différents états de charge. Les ions détectés conservent quelques uns des contre-ions avec lesquels ils sont appariés sous forme cristalline avant leur solubilisation (voir Figure 12), c'est-à-dire des ammoniums, sodiums et parfois potassiums sans qu'il soit nécessaire d'ajouter un surplus de ces sels dans la solution échantillon. Mais les spectres MALDI montrent la production d'ions mono-chargés, sous forme d'adduits avec des cations, qui contiennent difficilement ou même pas du tout ces mêmes cations : si il est possible d'observer en de faible proportion ou partielemnt des adduits sodiums ou potassiums il n'a jamais été possible d'observer Les expériences préliminaires MALDI ont montré que la seule manière d'obtenir l'ion intact de certains POMs est conditionnée à la présence d'un excès de sels introduisant des cations dans le mélange échantillon.

En premier lieu, dans cette section nous rapporterons l'évaluation de l'affinité relative du POMc12 pour les différents cations. Nous avons privilégié la matrice CNA au cours de ces expériences pour sa capacité à produire des espèces moléculaires intactes abondantes et de grande résolution, ainsi que des fragmentations en source lorsque la puissance du laser est élevée. Enfin, cette matrice étant peu connue, il était intéressant d'en explorer les possibilités dans nos applications en MALDI négatif.

Une deuxième partie sera dédiée aux processus de capture électronique et aux conditions expérimentales qui influent sur leurs production et induisent des compositions d'ions inattendues.

Enfin, le troisième point de cette section de ce chapitre porte sur une analyse semi-quantitative de l'influence des cations sur le rendement d'ionisation des POMs

### **3.2.1. Cationisation de l'espèce moléculaire intacte et des ions fragments**

La nécessité d'introduire des cations pour permettre la production d'une espèce moléculaire intacte nous a poussé à en essayer une vingtaine de différents, dont beaucoup ont donné lieu à la formation d'espèces moléculaires intactes constituées du POM adduit des cations introduits.

L'intérêt d'ajouter un cation dans la préparation du dépôt est avant tout celui d'obtenir un ion intact unique de type adduit et donc un spectre de masse simple. En effet, lorsque l'on n'introduit aucun cation, de multiples pics dans la région de l'ion moléculaire sont détectés avec une faible résolution. Cela rend d'autant plus difficile l'identification des espèces que les adduits formés vont contenir n'importe quel cation présent à l'état de traces dans l'échantillon.

Les premières espèces moléculaires intactes observés, illustrés dans la Figure 15, se composaient d'adduits multiples avec le sodium présent avec le POM de composition  $PW_{10}O_{40}^{3-}$ . Sachant que les analyses en ESI montrent également des adduits avec le potassium ou le tétrabutylammonium, ces ions ont dans un premier temps été ajoutés en grande quantité pour aider l'ion intact à se former. Toutefois, les cations alcalins sodiums et potassiums se sont révélés être de faible intérêt pour l'attachement aux POMs fonctionnalisés. Des essais avec d'autres alcalins ( $Li^+$  et  $Cs^+$ ) furent donc menés avant de tester des cations tri-chargés. En effet, les POMs fonctionnalisés étudiés possédant quatre charges négatives, ils ont permis d'obtenir un anion mono-chargé. Il n'est pas rare d'ajouter des cations lors des analyses MALDI pour l'analyse de multiples molécules, biologiques ou de synthèse (voir description partie 2.2.3).

Au final, un panel de cations très large a été testé. Il s'agit uniquement de cations minéraux, car les seuls essais réalisés avec des ammoniums n'ont pas été concluants (la liste exhaustive des sels utilisés est présentée dans le Tableau 7).

Tous les cations testés provoquent une modification du spectre de masse MALDI lorsqu'ils sont introduits dans la préparation. Cela prouve l'influence des cations introduits sur l'ionisation du POMc12. Toutefois, tous ne permettent pas la production d'une espèce ionique contenant l'espèce intacte unique et résolu.

En effet, s'il est aisé de constater que les pics du spectre de masse changent en fonction de la nature du sel introduit, il n'est pas toujours évident d'identifier les espèces produites. L'ambiguïté liée à l'attribution des pics détectés provient du fait que de multiples espèces sont produites simultanément et que la superposition des massifs isotopiques des ions rend impossible leur attribution exacte. Malgré tout, une bonne partie des cations testés permet d'obtenir un nombre restreint, ou même une unique espèce moléculaire, c'est-à-dire qu'une seule espèce mono-chargée est produite ce qui est avantageux afin de ne pas avoir de superposition de pics.

*Tableau 7: Sels utilisés pour obtenir la cationisation et principaux ions détectés sur le spectre de masse MALDI négatif (voir partie 2.2.4 pour la description des conditions expérimentales. (POM étant POMc12 de composition  $SiW_{10}O_{34}POC_{12}H_{25}^{4+}$ )*

Sel	Ion adduit recherché	Principaux $m/z$ observés, leurs attributions possibles	Commentaires
∅	∅	$m/z$ 2860 > [POM-O+H] <sup>-</sup> $m/z$ 2915 > [POM+K+H] <sup>-</sup> ? $m/z$ 2930 > [POM+Fe] <sup>-</sup> ? $m/z$ 2953 > ?	Pics abondants Adduits mixtes mal résolus
AlCl <sub>3</sub>	[POM+Al] <sup>-</sup>	$m/z$ 2902 > [POM+Al] <sup>-</sup>	Pics abondants et uniques
FeCl <sub>3</sub>	[POM+Fe] <sup>-</sup>	$m/z$ 2931 > [POM+Fe] <sup>-</sup> $m/z$ 3022 > [POM+2Fe+Cl] <sup>-</sup>	Pics abondants a capté 2 électrons
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	[POM+Fe] <sup>-</sup>	$m/z$ 2931 > [POM+Fe] <sup>-</sup>	Pics abondants
FeCl <sub>2</sub>	[POM+HFe] <sup>-</sup>	Spectre de masse de faible qualité	
GaCl <sub>3</sub>	[POM+Ga] <sup>-</sup>	$m/z$ 2945 > [POM+Ga] <sup>-</sup>	Faible abondance
		$m/z$ 2917 > ?	Pics mal résolu

CrCl <sub>3</sub>	[POM+Cr] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2927 > [POM+Cr] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 2951 > ? <i>m/z</i> 2966 > ?	Faible abondance  Adduits mixtes mal résolus
LiCl	[POM+Li <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2996 [POM+3Li] <sup>-</sup> , [POM+4Li] <sup>-</sup> et [POM+2Li+H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 3010 : [POM+5Li] <sup>+</sup>	Pic Abondant, signal mixte des 3 espèces  <b>Mode positif</b>
NaCl	[POM+Na <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2901 > [POM+Na+2H] <sup>-</sup> , <i>m/z</i> 2917 > ? <i>m/z</i> 2938 > ? <i>m/z</i> 2956 > ?	Pic Faible abondance  Adduits mixtes mal résolus
KI	[POM+K <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2920 > [POM+K+2H] <sup>-</sup> , <i>m/z</i> 2938 > ? <i>m/z</i> 2957 > ? <i>m/z</i> 2994 > ?	Pic Faible abondance  Adduits mixtes mal résolus
MnCl <sub>2</sub>	[POM+MnH] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2930 > [POM+Mn+H] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 2953 > [POM+Mn+Na] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 2969 > [POM+Mn+K] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 2985 > [POM+2Mn] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 3021 > ?	Pic Faible abondance  Adduits mixtes mal résolus
MgCl <sub>2</sub>	[POM+MgH] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2925 > [POM+2Mg] <sup>-</sup> , <i>m/z</i> 2938 > [POM+Mg+K] ? <i>m/z</i> 2979 > ?	Pic Faible abondance  Adduits mixtes mal résolus
CoCl <sub>2</sub>	[POM+CoH] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2934 > [POM+CoH] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 2993 > [POM+2Co] <sup>-</sup>	Pic Faible abondance, a capté un électron

CuSO <sub>4</sub>	[POM+CuH] <sup>-</sup>	<i>m/z</i> 2938 > [POM+Cu+H] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 2960 > [POM+Cu+Na] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 2976 > [POM+Cu+K] <sup>-</sup> ? <i>m/z</i> 3000 > [POM+2Cu] <sup>-</sup> <i>m/z</i> 3021 > ?	Adduits mixte  A capté un électron  Mal résolu
CsI	[POM+Cs <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	Spectre de masse de faible qualité	
AgI	[POM+Ag <sub>3</sub> ] <sup>-</sup>	Spectre de masse de faible qualité	
NiCl <sub>2</sub>	[POM+NiH] <sup>-</sup>	Signal confus et peu abondant	
ZnCl <sub>2</sub>	[POM+ZnH] <sup>-</sup>	Signal confus et peu abondant	
CaCl <sub>2</sub>	[POM+CaH] <sup>-</sup>	Signal confus et peu abondant	
TBA	[POM+3TBA] <sup>-</sup>	Signal confus et peu abondant	
TMA	[POM+3TMAH] <sup>-</sup>	Signal confus et peu abondant	

Il faut noter le cas du lithium, qui montre un comportement particulier puisqu'il permet l'analyse du POMc12 en MALDI en mode positif. L'obtention d'un pic correspondant à l'espèce intacte nécessite de recourir à des conditions particulières par rapport à l'analyse en mode négatif : la détection de l'ion en mode positif nécessite un nombre de tirs plus important (1000 pour obtenir un pic de faible intensité) et une puissance laser accrue (75 au lieu de 60 u.a.). Néanmoins, aucun autre cation, ni mélange de cations (même parmi les autres alcalins), ne permet d'obtenir un signal équivalent en MALDI positif. Les seules espèces obtenues l'ont été en mode négatif.

L'attribution des formules des espèces détectées dans les spectres MALDI et annotées dans le Tableau 7 prennent en compte que les mélanges réalisés contiennent également du sodium et du potassium, puisqu'il est fréquent de retrouver ces deux cations à l'état de traces dans les solvants utilisés. Beaucoup des pics détectés sont interprétés comme des adduits mixtes contenant le cation ajouté et/ou du sodium ou potassium. Toutefois, on peut douter de ces attributions qui concernent des pics lorsqu'un adduit potassium semble être formé sans qu'un adduit sodium ne soit détecté, ces deux cations étant présent de manière résiduelle similaire. De plus ces ions sont bien souvent peu abondants, mélangés à d'autres, ce qui rend difficile d'identifier la forme du massif isotopique et donc de déterminer leur rapports *m/z*.

On observe que beaucoup de cations différents permettent d'obtenir les ions adduits recherchés. L'espèce moléculaire intacte n'est pas toujours formé sous une forme unique et l'on assiste véritablement à la production de spectres MALDI de qualité variée. Comme la Figure 36 l'explique, les cations lithium ou aluminium permettent d'obtenir des spectres de masse satisfaisants en termes d'observation d'espèce moléculaire intacte unique, à l'inverse du chrome(III) ou du cuivre(II) qui donnent de multiples espèces. Par ailleurs, l'utilisation de césium produit un grand nombre d'ions intacts dont les pics se superposent. Il est impossible de distinguer la nature des ions produits.

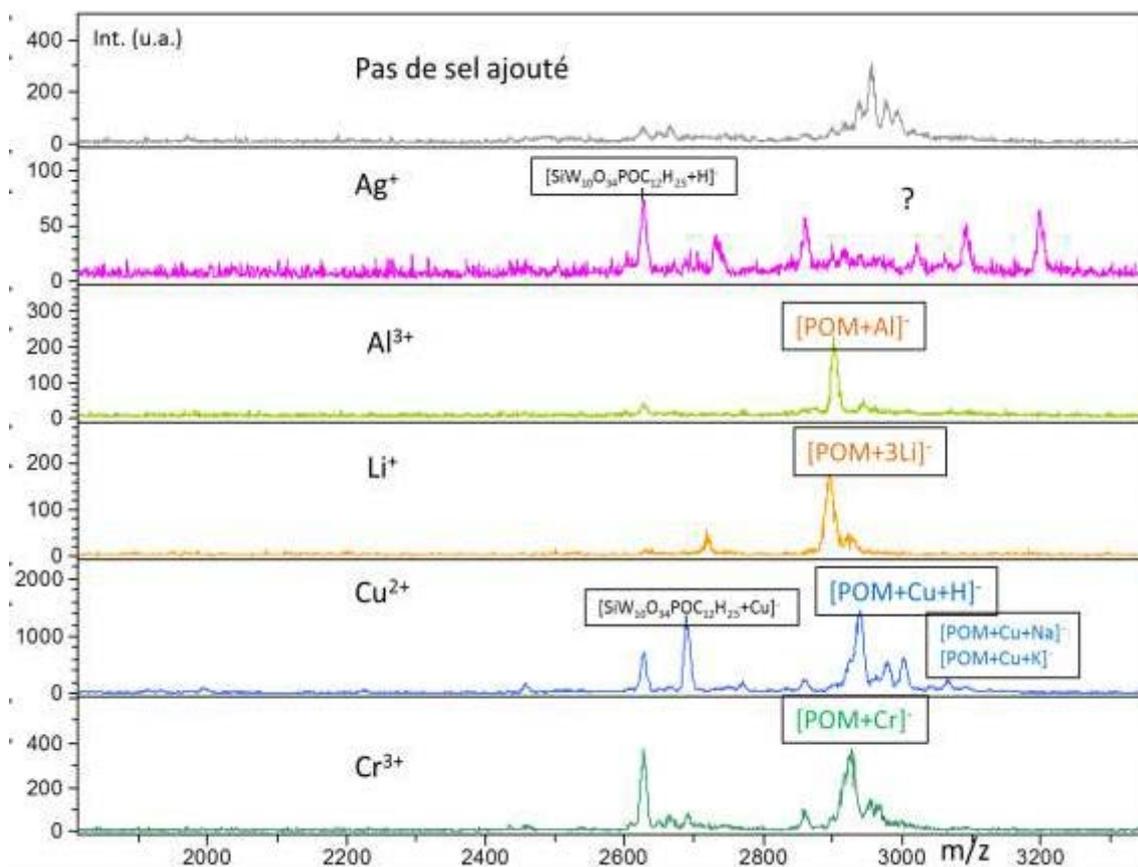


Figure 36 : Agrandissement des spectres MALDI des mélanges CNA+POMc12 préparés sans sel ajouté, ou en présence de  $Ag^+$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Li^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ , enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.

On observe l'apparition de l'ion fragment ayant perdu une fonctionnalisation à  $m/z$  2627 ou à  $m/z$  2689 lorsque le cuivre est utilisé.

Dans la poursuite de ces expériences, l'attachement préférentiel des cations a été évalué en réalisant des mélanges de cations deux par deux (« expériences en compétition »). Nous

avons choisi uniquement les cations qui permettaient d'identifier au minimum un adduit défini. Cela a permis d'établir une classification relative de la préférence d'attachement des cations au POM durant le processus d'ionisation MALDI.

Pour réaliser cela les matrices furent mélangées avec des cations qui avaient été préparés au cours de l'expérience précédente. Les mélanges obtenus contiennent alors autant des deux cations et le ratio molaire (matrice/cation1/cation2/POM) est de 1500/75/75/1. Cette baisse de concentration des cations, qui étaient présents à un ratio (matrice/cation1/POM) de 1500/150/1 lors des expériences précédentes, n'affecte pas l'allure des spectres de masse comme discuté à la partie 2.2.4. Comme la Figure 17 le détaille, le mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12 peut voir ses proportions varier grandement sans que des conséquences sur le résultat ne se produisent.

Dans la majorité des cas un ion intact unique est détecté et ne contient qu'une seule espèce d'ion, montrant l'attachement préférentiel du POM pour l'un des deux cations. Quelques spectres de masse sont reproduits sur la Figure 37 et montrent une affinité relative des POMs. Même dans le cas des cations qui donnent de multiples ions lorsqu'ils sont seuls dans le mélange, par exemple le cuivre et le cobalt, les ions détectés ne proviennent que de l'attachement d'un seul des deux cations. Une expérience mettant en présence dix fois plus d'aluminium(III) que de fer(III) a révélé la présence quasi exclusive de l'ion intact [POMc12+Fe]<sup>-</sup>, ce qui démontre de manière manifeste l'attachement préférentiel pour ce dernier. Cette expérience, qui fournissent des résultats identiques, a aussi été menée dans la matrice DCTB afin de s'assurer de l'absence d'interactions éventuelles entre la matrice et les sels utilisés.

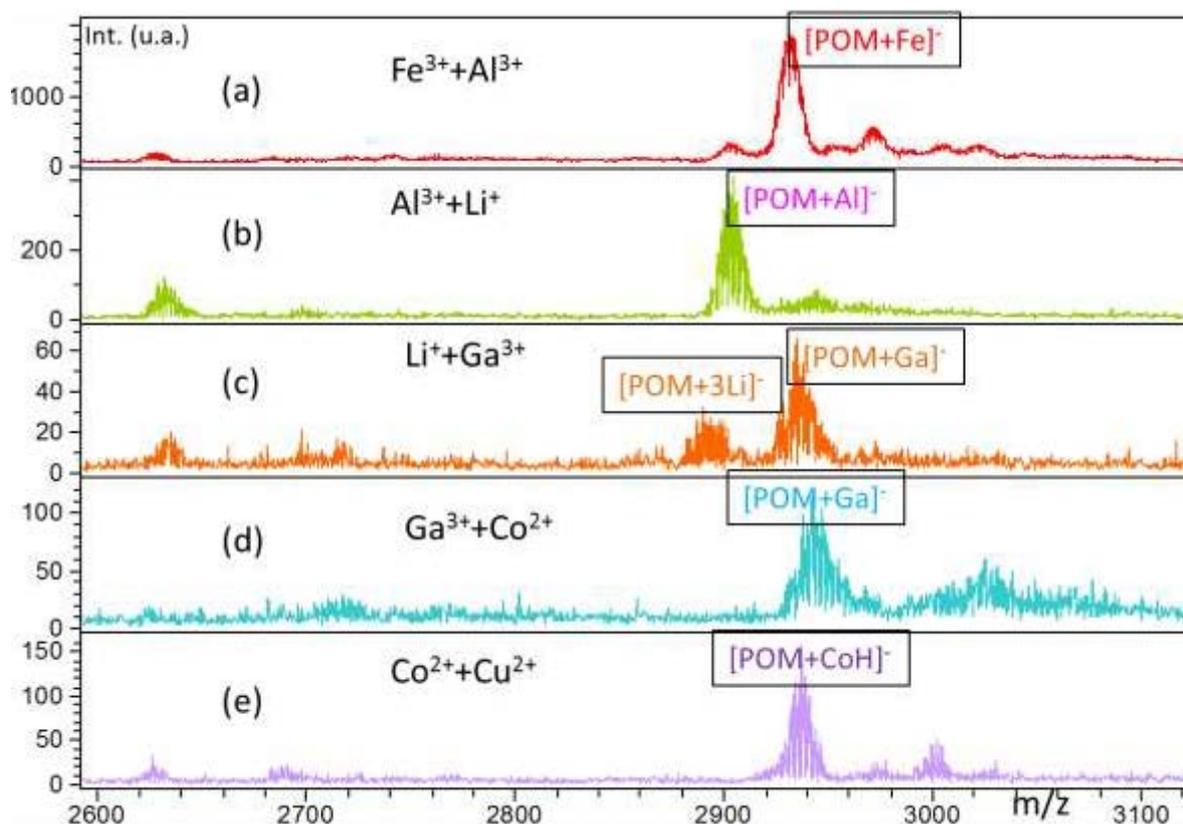


Figure 37 : Spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 préparé avec deux espèces cationiques différentes. (a) :  $Fe^{3+}+Al^{3+}$ , (b) :  $Al^{3+}+Li^{+}$ , (c) :  $Li^{+}+Ga^{3+}$ , (d) :  $Ga^{3+}+Co^{2+}$ , (e) :  $Co^{2+}+Cu^{2+}$ , enregistré à la valeur seuil de puissance laser.

Il existe donc à une préférence d'attachement de l'analyte pour un seul des deux cations mis en présence, bien que quelques exceptions soient observées par MALDI lorsque le lithium, qui se retrouve présent dans l'espèce produite avec d'autres cations (formation d'adduit mixte), est utilisé. Ces expériences ont été réalisées dans d'autres matrices de la sconde familles (résultats non montrés) et produisent des résultats identiques en terme d'attachement préférentiel de cations au POMc12.

Le lithium donne lieu à la formation des espèces moléculaires intactes avec capture d'un électron ; les résultats seront détaillés plus loin (3.2.2). Des adduits mixtes apparaissent lors de l'utilisation de mélangee des espèces divalentes et monovalentes. Par exemple, les cations cuivre(II) ou cobalt(II) mélangés avec le lithium forment, conjointement à l'espèce adduit  $[POMc12+3Li]^{-}$ , les espèces  $[POMc12+Cu+Li]^{-}$  et  $[POMc12+Co+Li]^{-}$  qui sont majoritaires ; démontrant ainsi une fixation préférentielle par le lithium, comparativement au cobalt(II) ou

cuivre(II). En revanche, lors de l'utilisation, dans d'identiques conditions, d'un mélange de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , les espèces deux espèces  $[\text{POMc12}+\text{Cu}+\text{Na}]^-$  et  $[\text{POMc12}+\text{Co}+\text{K}]^-$  sont observées, mais pas l'ion  $[\text{POMc12}+3\text{Na}]^-$ .

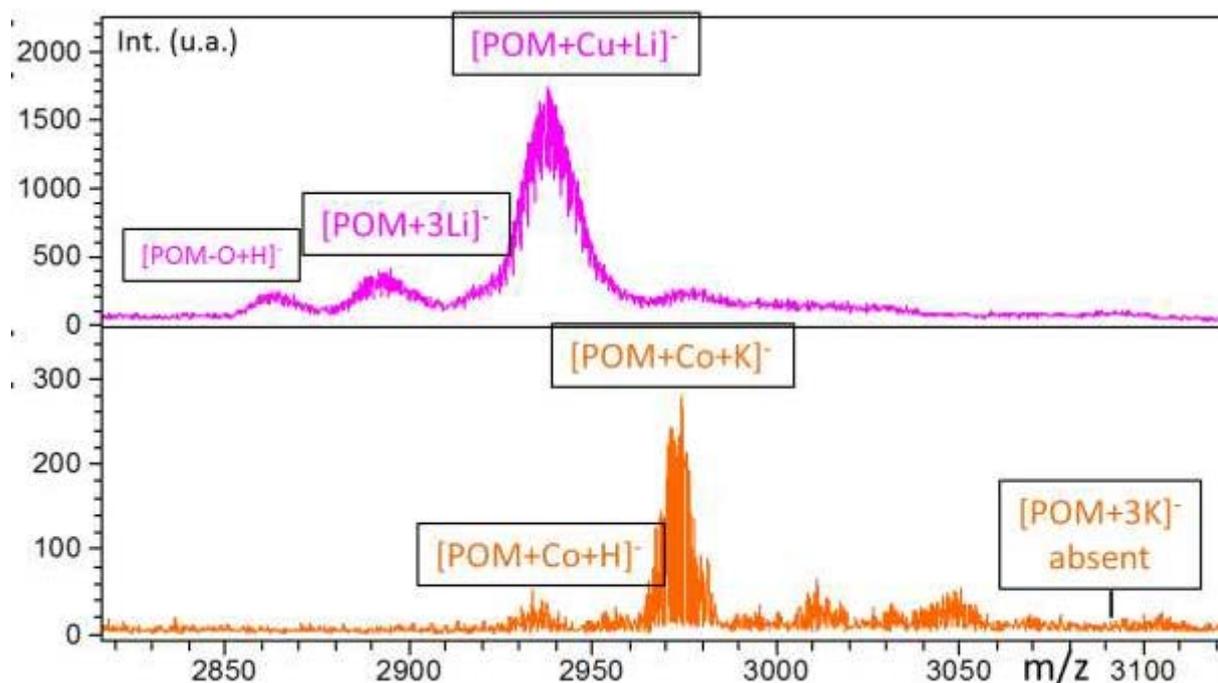


Figure 38 : Spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 préparés avec des mélanges de cations divalents et monovalents. (a) :  $\text{Li}^+ + \text{Cu}^{2+}$ , (b)  $\text{Co}^{2+} + \text{K}^+$ . Spectres enregistrés à la valeur seuil.

La présence de ces adduits contenant des cations de natures différentes ne remet pas en cause l'idée selon laquelle le POMc12 montre des affinités cationiques valables.

Bien que ces espèces mixtes, lorsqu'elles sont considérées isolément, suggèrent que le POMc12 a une affinité égale pour les cations présents dans l'espèce mixte, il est alors possible de relativiser l'affinité du POMc12 en tenant compte d'autres expériences.

Par exemple, 3  $\text{Li}^+$  et  $\text{Cu}^{2+}$  semblent avoir une affinité équivalente pour le POMc12, au vu de la production d'adduit mixte POM+Cu+Li (Figure 38).

Toutefois, lors du mélange de  $\text{Li}^+$  avec  $\text{Ga}^{3+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$  avec  $\text{Ga}^{3+}$  (non montré ici mais on peut observer  $\text{Co}^{2+}$  avec  $\text{Ga}^{3+}$  sur la Figure 38 qui se comporte de la même manière), il est constaté que  $\text{Li}^+$  fixe le POM de façon équivalente à  $\text{Ga}^{3+}$ , alors que, dans le second mélange  $\text{Ga}^{3+}$  exclut la formation d'adduits mixtes ou non avec  $\text{Cu}^{2+}$ .

Cette comparaison des trois dernières expériences permet d'établir un classement relatif  $\text{Li}^+ \geq \text{Ga}^{3+} > \text{Cu}^{2+}$  et donc d'affirmer que l'affinité cationique du POMc12 pour le lithium est plus forte que pour le cuivre(II). De la même manière, si on considère qu'il existe, conjointement à l'espèce mixte  $[\text{POMc12}+\text{Cu}+\text{Li}]^-$ , l'espèce  $[\text{POMc12}+3\text{Li}]^-$ , l'affinité pour le lithium est majeure que pour le cation divalent. La même logique est utilisée pour considérer les cations divalents avec le sodium ou le potassium.

Ces expériences d'attachement de cation pour la formation de l'ion intact sont complétées par l'observation des ions fragments obtenus en source. Ces expériences ont aussi été menées avec une sélection plus restreinte de cations, incluant des cations des trois états de charges différents ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$  et  $\text{Cu}^{2+}$ ).

Les résultats obtenus obéissent aux mêmes règles que celles constatées pour l'ionisation de l'ion intact. La Figure 39 détail le fait que le cation qui se retrouve dans les ions fragments est celui (ceux) également présents dans l'espèce moléculaire intacte.

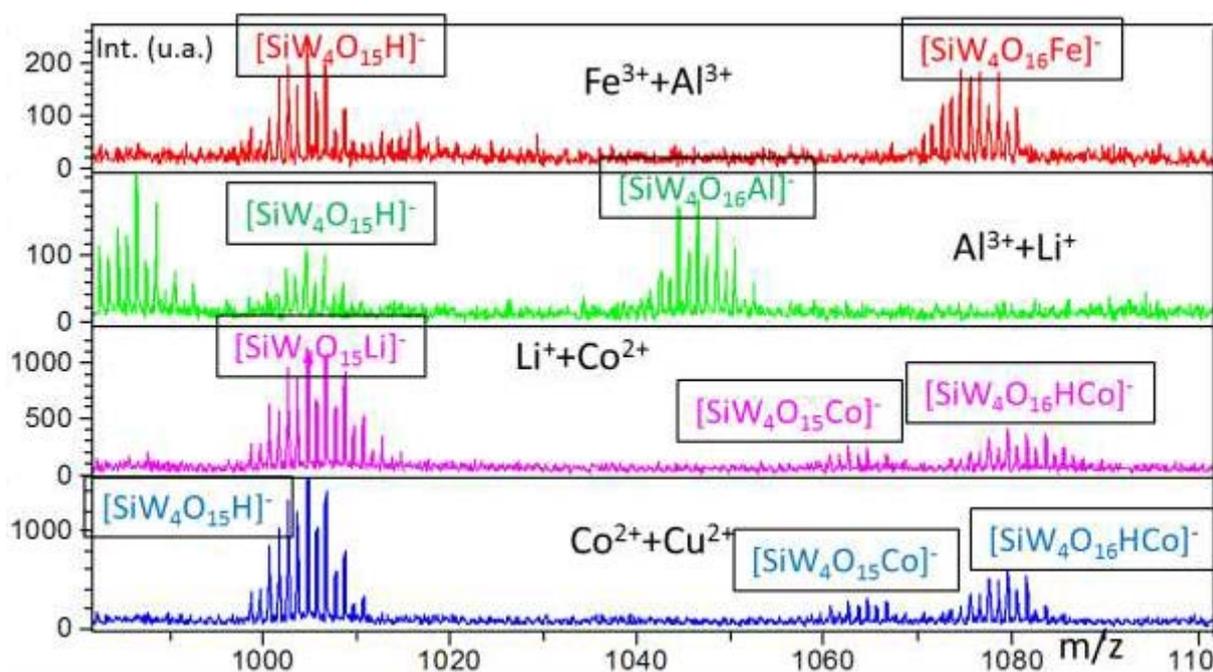
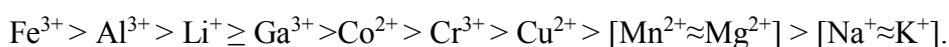


Figure 39 : Agrandissements des spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 dopé avec deux espèces cationiques différentes. (a) :  $\text{Fe}^{3+}+\text{Al}^{3+}$ , (b) :  $\text{Al}^{3+}+\text{Li}^+$ , (c) :  $\text{Li}^++\text{Co}^{2+}$ , (d) :  $\text{Co}^{2+}+\text{Cu}^{2+}$ , enregistré à la puissance laser 80 u.a

En parallèle des ions fragments cationisés sont aussi présent des fragments contenant un hydrogène. Il est possible que ces ions fragments ne proviennent pas des mêmes voies de fragmentation que les ions fragments qui contiennent le cation (voir partie 3.3.3).

Une grande difficulté apparait en revanche lorsqu'il s'agit de classer les cations qui donnent des spectres de masses sur lesquels de nombreux pics sont indéfinis, c'est-à-dire les mélanges  $Mn^{2+}$  avec  $Mg^{2+}$  et  $Na^+$  avec  $K^+$ . De plus, il faut ajouter quelques exceptions de formations d'adduits moléculaires mixtes, très particuliers car ils révèlent des processus de captures électroniques. Ces espèces seront détaillées dans le paragraphe 3.2.2.

Toutefois, ces expériences de compétition d'attachement de cation permettent d'établir un classement relatif d'affinité cationique apparente du POMc12 en phase gazeuse (et de ses homologues POMc8 et POMc10, voir Figure 14).



Considérant le classement obtenu, il n'est pas évident de trouver une tendance expliquant les observations expérimentales (par exemple une relation avec la charge du cation n'est pas obtenue). Tous les cations classifiés et détectés dans l'espèce moléculaire intacte sont considérés comme des cations durs selon Pearson. Il est étonnant d'observer que ces cations aient un attachement aisé avec le POM, qui est une espèce anionique dont la densité de charge est faible.

En effet, les charges négatives sont délocalisées sur toute la structure oxométallique, ce qui les rend polarisables ; par ailleurs, la formation d'adduits avec des cations mous, tels que les ammoniums, est aisément obtenue à la fois en phase solide et liquide (par caractérisation RMN et RX), mais également en phase gazeuse lors de leur ionisation par ESI (voir Figure 12) où l'adduit  $[POMc12+TBA]^{3-}$  est détecté.

Or, des ions adduits avec ces derniers cations ammonium n'ont jamais été observés lors des analyses MALDI, contrairement aux expériences ESI. Si il est délicat de qualifier les POMs d'anions mous, notamment parce qu'ils forment des sels avec le sodium et le potassium qui sont des cations durs, il reste étonnant d'observer qu'ils forment des adduits avec les cations trivalents en MALDI.

Un spectre de masse utilisant pour source l'ESI, et plaçant des ions aluminium en solution avec le POMc12, n'a pas montré la production de l'espèce [POMc12+Al]<sup>+</sup>

Le facteur qui peut expliquer l'affinité du POMc12 avec les cations en ionisation par MALDI est le faible rayon cationique des cations (voir Tableau 8 ci-dessous).

Le POMc12 montre une plus faible affinité avec les cations ayant un grand rayon cationique. Les énergies de liaison<sup>[145]</sup> entre les cations considérés et l'oxygène, car on suppose que l'attachement des cations se fait en interaction avec les oxygènes de la cage oxométallique, peuvent aussi être considérées. Toutefois, ces valeurs d'énergies de liaison, comme celles des rayons cationiques, sont à considérer avec prudence car elles ne peuvent pas correspondre à notre réalité, qui met en jeu des liaisons a priori non covalentes mais multiples (avec les cations di- et trivalents). La force des liaisons est donnée pour une liaison hypothétique « élément-Oxygène » alors que dans notre cas il ne s'agit pas d'un oxygène, mais un oxygène relié à un ensemble d'oxyde de tungstène chargé. Ces facteurs ne sont assurément pas les seuls, qui plus est le classement que l'on a établi expérimentalement ne peut pas être directement corrélée à la progression des valeurs de rayon cationique ou de force de liaison avec l'oxygène présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Rayon cationique des cations utilisés<sup>[146]</sup> et force de la liaison de ces cations avec l'oxygène<sup>[145]</sup>

Li <sup>+</sup> : 76 pm	Rayons cationiques théoriques				Al <sup>3+</sup> : 54 pm
Li-O : 341	Force de la liaison O-élément (kJ/mol)				Al-O : 512
Na <sup>+</sup> : 102 pm	Mg <sup>2+</sup> : 72 pm				Ga <sup>3+</sup> : 62 pm
Na-O : 257	Mg-O : 394				Ga-O : 285
K <sup>+</sup> : 138 pm	Cr <sup>3+</sup> : 62 pm	Mn <sup>2+</sup> : 67 pm	Fe <sup>3+</sup> : 55 pm	Co <sup>2+</sup> : 65 pm	Cu <sup>2+</sup> : 73 pm
K-O : 239	Cr-O : 427	Mn-O : 402	Fe-O : 409	Co-O : 368	Cu-O : 343

En conclusion il est montré que le MALDI constitue une méthode simple et rapide pour comparer l'affinité relative entre un analyte et des espèces participant à la formation d'une espèce moléculaire intacte. Cependant ces affinités ne semblent valoir que lors de l'ionisation en MALDI car ces mêmes attachements ne sont jamais observés lors de l'utilisation d'autres méthodes, y compris en phase gazeuse en source ESI. Ce classement d'affinité relative des cations pour le POMc12 est à considérer avec les irrégularités observées dans le cas du mélange d'espèces divalentes et monovalentes qui montre la possibilité de retrouver deux cations différents dans l'espèce moléculaire intacte.

### **3.2.2. Capture électronique et formation d'ions inattendus**

Lors de l'analyse des adduits cationiques présents dans l'espèce moléculaire intacte, on a été amené à observer des espèces moléculaires intactes et/ou des ions fragments dont les compositions révèlent des processus de capture d'électron. Ces ions sont relativement rares mais présentent un grand intérêt pour la compréhension de l'ionisation en MALDI. Il était intéressant de s'appliquer à les décrire et analyser leur processus de formation.

Ces ions contiennent un électron supplémentaire, ce qui est montré par la présence d'un excès de cations dans la formule de l'ion considéré. Par exemple, lors de l'observation du spectre de masse obtenu en présence de lithium dans l'échantillon, il existe en plus de l'espèce  $[\text{POM}+3\text{Li}]^+$ , l'espèce  $[\text{POM}+4\text{Li}]^+$  contribuant à la largeur importante du massif isotopique détecté. Sa présence est révélée par un massif isotopique plus large qu'il ne devrait l'être pour l'ion adduit attendu de composition  $[\text{POM}+3\text{Li}]^+$ . En modélisant le massif isotopique expérimental, on atteste la présence de cette espèce contenant quatre lithiums, comme l'indique la Figure 40. Cette espèce est inattendue puisqu'elle contient un électron supplémentaire.

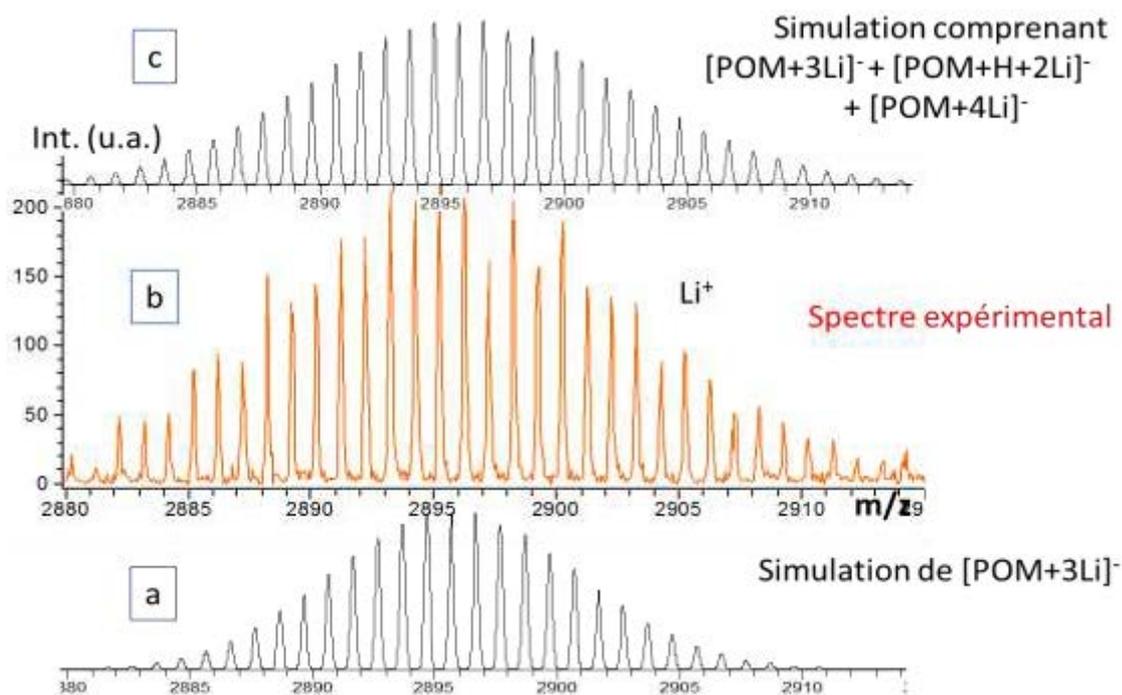


Figure 40 : Spectre MALDI du mélange CNA+POMc12+Li enregistré à la valeurs seuil (b) comparé aux simulations de massifs isotopiques de la seule espèce moléculaire intacte  $[POM+3Li]^-$  (a) et d'un mélange de plusieurs espèces (c).

Sont observés également des espèces moléculaires formées après capture électronique pour les échantillons préparés avec des cations divalents, par exemple trois spectres de masse montrent la présence de  $[POMc12+2Co]^-$  et  $[POMc12+2Cu]^-$  (voir Tableau 9).

Des adduits mixtes inattendus obtenus en présence de lithium sont observés lors des expériences MALDI de mélanges de cations. Il s'agit des mélanges avec du fer(III) ou de l'aluminium(III). Comme le montre la Figure 41, qui regroupe les spectres de masse des mélanges POMc12+Fe+Li et POMc12+Al+Li, les massifs isotopiques détectés ne sont pas centrés sur la valeur attendue des espèces qui sont  $[POMc12+Fe]^-$  et  $[POMc12+Al]^-$ . La présence des espèces mixtes  $[POMc12+Fe+Li]^-$  et  $[POMc12+Al+Li]^-$  se révèlent être aussi présentes et les massifs isotopiques de ces espèces proches en masse (le lithium pesant que 7 Da) se superposent. Les deux dernières espèces moléculaires ne peuvent se former sans capturer un électron supplémentaire.

La Figure 41 représente les différents massifs isotopiques qui se trouvent mêlés dans le spectre de masse détecté et permet de se rendre compte de la présence de différents ion dont les massifs isotopiques se superposent.

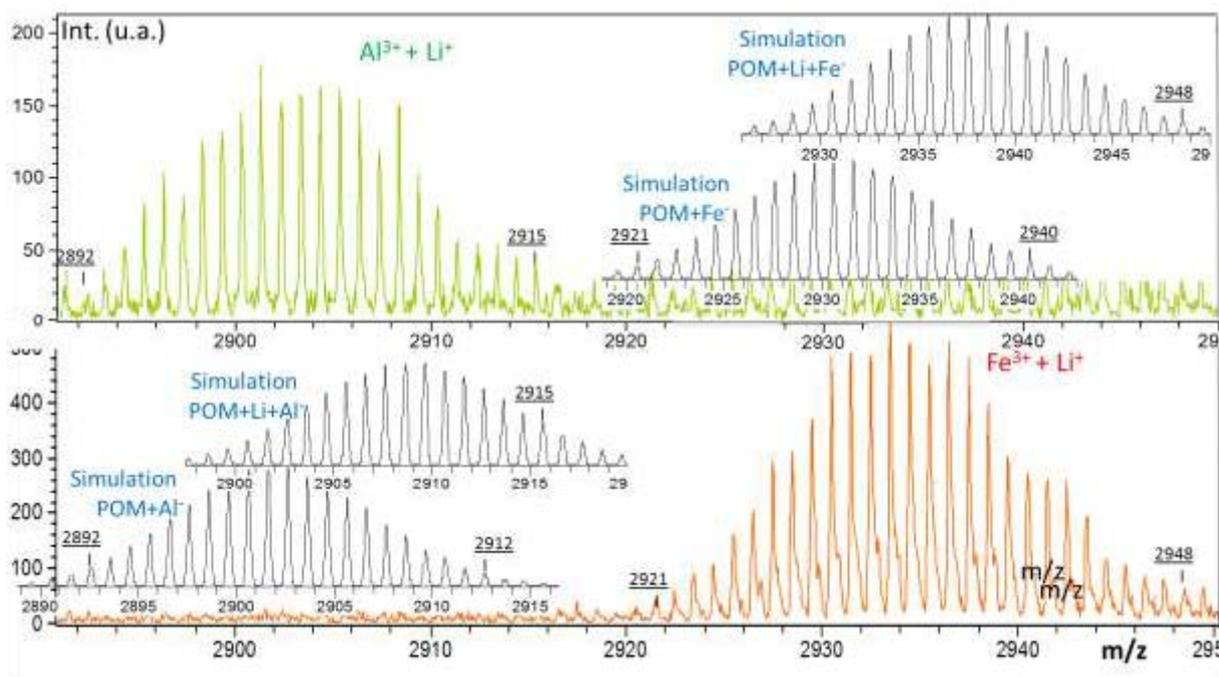


Figure 41 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 préparé en présence du mélange de  $Al^{3+}+Li^{+}$  (haut) ou de  $Fe^{3+}+Li^{+}$  (bas) accompagnés des simulations de profils isotopiques (encarts), enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.

Dans le cas du mélange avec l'aluminium et le lithium, l'espèce moléculaire correspond donc à l'espèce  $[POMc12+Li+Al+e]^{-}$ . Ce comportement ne trouve aucun équivalent lorsque des mélanges avec les autres alcalins  $Na^{+}$  et  $K^{+}$  sont réalisés. Il semble malgré tout difficile d'imaginer le lithium se réduire, car il possède l'un des potentiels d'oxydation les plus élevés qui soit ( $-3V_{ESH}$ ). Le lithium est connu pour être un cation extrêmement stable, qui forme des liaisons très fortes, au point d'être considéré comme un pseudo-proton. Il n'y a pas, dans le domaine de la spectrométrie de masse, d'exemples relevant la réduction du lithium au cours des processus d'ionisation et/ou d'expériences de fragmentation.

Quoi qu'il en soit, il se peut que ce soit le POM qui se réduise, en faisant passer l'un de ses dix tungstènes du degré d'oxydation VI à V. En effet, les POMs sont considérés comme des très bons récepteurs d'électrons (voir partie 2.2.1). C'est d'ailleurs l'une de leurs propriétés maîtresses, leur permettant d'accumuler des électrons pour les relâcher ensuite, en leur conférant tant un caractère catalyseurs oxydo-réducteurs que des propriétés photovoltaïques<sup>[104]</sup>.

Pourtant, il n'est pas évident d'attribuer au POMc12 la responsabilité de cette capture électronique. En effet, selon les cations, différentes proportions d'espèces ayant capté un

électron sont détectées. Par exemple, en comparant la largeur des massifs isotopiques sur la Figure 41, les massifs isotopiques des espèces moléculaires intactes produites lors de l'ionisation des mélanges contenant soit  $\text{Fe}^{3+}+\text{Li}^+$ , soit  $\text{Al}^{3+}+\text{Li}^+$ , sont différents.

Le massif correspondant au mélange des espèces moléculaires intactes  $[\text{POMc12}+\text{Fe}]^-$  +  $[\text{POMc12}+\text{Fe}+\text{Li}]^-$  est plus large que celui détecté pour son homologue regroupant les espèces  $[\text{POMc12}+\text{Al}]^-$  et  $[\text{POMc12}+\text{Al}+\text{Li}]^-$ . Cette différence d'élargissement provient du fait que l'espèce lithiée est plus abondante dans le cas du mélange avec le fer(III). En termes de capture électronique, cela traduit le fait que l'espèce moléculaire contenant le fer se réduit plus aisément que celle contenant un aluminium. Cette observation est à relier à la facilité de passer à l'ion réduit Fer(II) qui est, de toute évidence, plus aisée que celle permettant de réduire l'aluminium(III) en aluminium(II). La Figure 42 montre que lors de l'utilisation de l'ion fer(III) sous forme de chlorure, une espèce moléculaire intacte de formule  $[\text{POMc12Fe}_2\text{Cl}]^-$  qui a capté deux électrons.

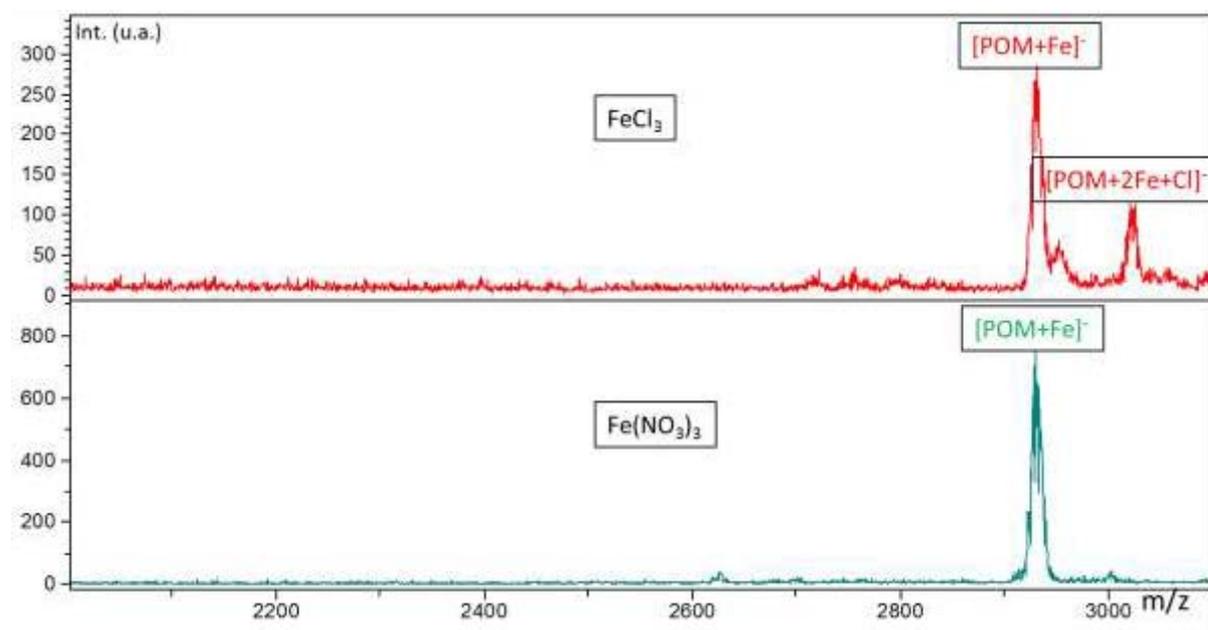


Figure 42 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 préparé avec un mélange des deux sels de fer(III)  $\text{FeCl}_3$  et  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , enregistré à la valeur seuil de puissance laser.

Par ailleurs, des processus de capture d'électron sont également observés par la présence d'ions fragments contenant un électron supplémentaire. Ces derniers ne contiennent pas nécessairement un cation. Par exemple les ions  $[\text{W}_3\text{O}_9]^-$ ,  $[\text{W}_4\text{O}_{12}]^-$  ou encore  $[\text{SiW}_5\text{O}_{19}]^-$  sont

présents sur tous les spectres de masse acquis à forte puissance laser, quelle que soit la matrice utilisée et le cation.

Un phénomène comparable est constaté lors de la production en source du POMc12 en présence de  $\text{Co}^{2+}$  ou de  $\text{Cu}^{2+}$ . Sur la Figure 43 le fragment contenant quatre tungstènes forme des ions ayant un électron supplémentaire (annotés par une étoile\* sur les spectres de masse).

L'ion de formule  $[\text{SiW}_4\text{O}_{15}\text{Cu}]^-$  se révèle être le seul fragment contenant ce cation à exister contrairement au cobalt (II) qui présente différentes espèces (explicitées quelques lignes plus loin). Or, le cuivre est connu pour sa capacité à se réduire aisément lors de l'ionisation assistée par matrice<sup>[145]</sup>. Avec le cobalt, l'ion  $[\text{SiW}_4\text{O}_{15}\text{Co}]^-$  est moins abondant que l'ion de formule  $[\text{SiW}_4\text{O}_{16}\text{HCo}]^-$  qui n'a pas subi de capture électronique. Des fragments à capture d'électron existent apparaissent aussi sans le concours d'un cation, comme on le voit sur le spectre réalisé sans ajout de sels sur la Figure 43. Ce fragment est d'ailleurs présent sur tous les spectres, même en présence de sels, bien qu'en proportions variables.

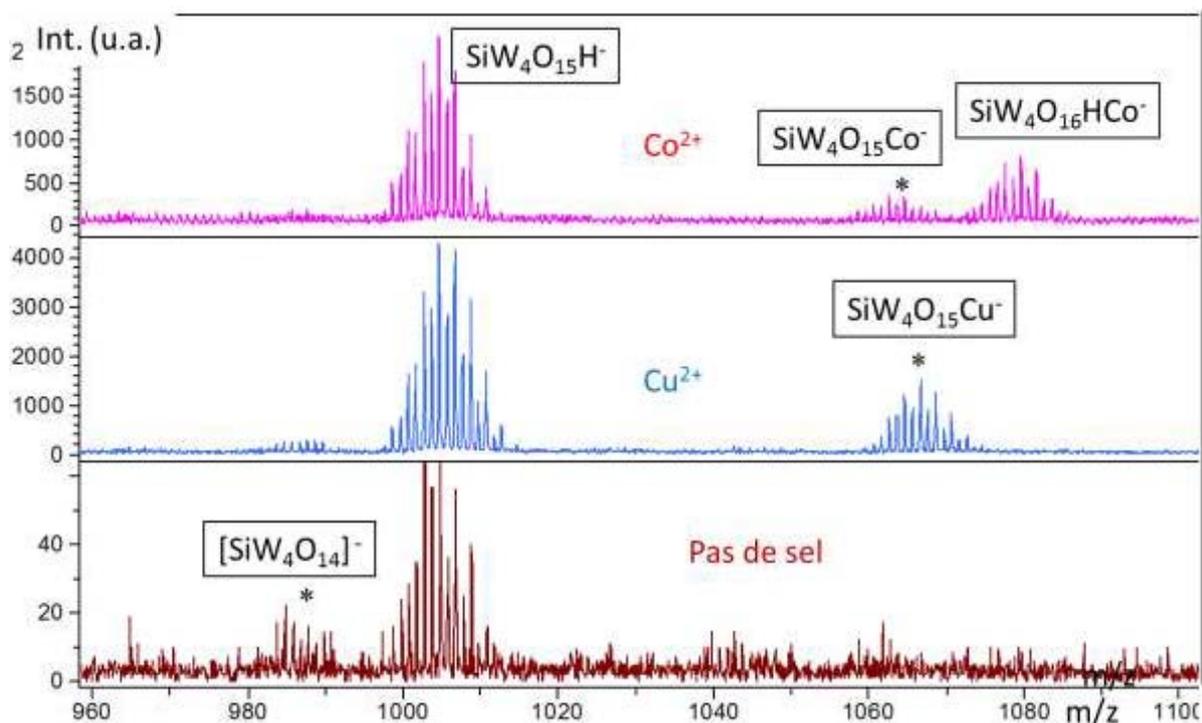


Figure 43 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 en présence de  $\text{Cu}^{2+}$  ou de  $\text{Co}^{2+}$  ou sans sel ajouté, enregistré à forte puissance laser (97 u.a.). Les pics sont annotés de leurs formules. Les espèces ayant pu être un électron sont annotés d'une étoile.

Ces ions fragments contenant du cuivre ou du cobalt avec un électron supplémentaire, peuvent provenir de la fragmentation des espèces moléculaires intactes contenant deux cuivre(II) ou deux cobalt(II) qui, eux aussi, avaient probablement capté un électron supplémentaire.

Si la présence d'un cation facile à réduire, tel que le cuivre(II), pourrait expliquer la présence d'un électron supplémentaire, il semble également que la présence du lithium dans l'échantillon enjoigne le POM à garder/capter un électron. Toutefois, comme il est déraisonnable de penser que le lithium se réduise, cela induit à penser que la capture électronique est réalisée par le POM lui-même, et que les cations qui sont présents dans l'ion formé peuvent faciliter la capture de l'électron par le POM. Ainsi, lors de l'ionisation, le POM peut récupérer un électron qu'il est en mesure de relâcher par la suite, par exemple au sein de l'agrégat de matrice. L'espèce oxométallique est un réservoir transitoire pour électrons, comportement observé en phase condensée lors d'expériences de voltamétrie<sup>[110]</sup>. En effet, contrairement à une molécule biologique qui se fragmente lorsqu'elle reçoit un électron, le POM pourrait capter cet électron pour le relâcher ensuite au cours des processus de désorption ionisation. L'espèce moléculaire intacte, tout comme les fragments, sont donc capables de retenir un électron excédentaire avec d'autant plus de probabilité que l'interaction entre le cation et le POM est favorable.

Lorsqu'un POM accueille un électron et qu'il est entouré d'un cuivre(II), il est stabilisé par la capacité du cuivre à se réduire. Lorsque la même situation est rencontrée avec un lithium (qui crée de fortes interactions avec l'anion), le lithium pousserait le POM à garder l'électron, car il accaparerait en partie cet électron supplémentaire pour former son interaction avec les ligands oxo de la cage métallique. De plus, considérant que de nombreux ions fragments contiennent un électron supplémentaire, et ne contiennent rien d'autre que des éléments de la cage tungsténique (W, O, Si), les électrons excédentaires semblent contenus dans la cage oxométallique.

L'origine des électrons captés est indéterminée. En effet, il a été montré vu dans la sous-section 3.1.2 qu'un support isolant permet d'observer plus d'ions fragments issus de captures électroniques. Il ne semble pas que ces captures électroniques induisent la majorité des fragmentations, puisque dans la plupart des cas peu de fragments au total montrent des captures électroniques. Le mécanisme de fragmentation que nous avançons sera décrit plus en détail au paragraphe 3.3.

### 3.2.3. Rendement en fonction de la nature des cations

D'autre part il est démontré que l'abondance des espèces moléculaires intactes est variable en fonction des sels utilisés. Le rendement d'ionisation semble meilleur avec les cations à forte affinité avec le POMc12. Toutefois, il ne semble pas y avoir de corrélation entre l'abondance le taux de fragmentation et l'affinité relative des cations pour le POM. Si l'abondance de l'espèce moléculaire intacte est plus grande lors de l'utilisation de cations à forte affinité pour le POMs12, c'est aussi car une unique espèce moléculaire intacte est produit. Ainsi, toutes les espèces moléculaires intactes ont la même masse et leur abondance n'est pas dispersée sur une large gamme de masse. Par exemple, avec le fer(III), seul  $[\text{POMc12+Fe}]^-$  est produit, alors que cela n'est pas le cas du mélange avec le cobalt(II), qui produit  $[\text{POMc12+CoH}]^-$ ,  $[\text{POMc12+CoNa}]^-$ ,  $[\text{POMc12+CoK}]^-$  et  $[\text{POMc12+2Co}]^-$ .

Si le rendement d'ionisation des POMs semble donc plus élevé pour les cations de forte affinité, une tendance différente est constaté lorsqu'il s'agit de l'abondance des ions fragments produits en source. En effet, il n'existe pas de relation entre le classement relatif d'affinité cationique et la quantité que ces échantillons produisent avec la technique MALDI lorsque la puissance du laser est augmentée.

La Figure 44 fait apparaitre que le taux de fragmentation varie grandement d'un échantillon à l'autre, uniquement en fonction du cation ajouté comme cela avait été observé pour les matrices (partie 3.1.1).

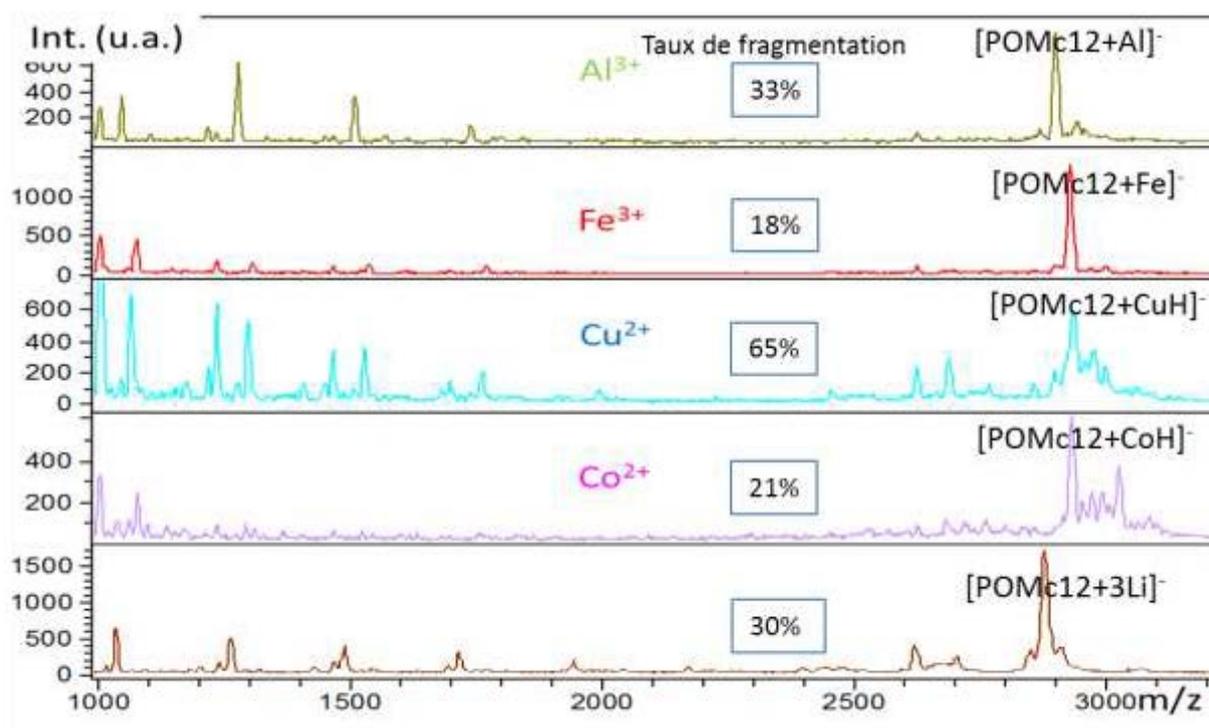


Figure 44 : Spectres MALDI du POMc12 dans la matrice CNA en présence de différents cations, enregistré à fort laser (75 u.a.). Le taux de fragmentation est annoté sur chaque spectre. Les formules des fragments sont décrites en Tableau 9.

Les taux de fragmentations (dont le calcul est explicité en partie 2.3.2) sont présentés ici de manière à donner un ordre de grandeur, car leur calcul est difficile lorsqu'il s'agit de comptabiliser des ions peu abondants, ou au contraire, des espèces moléculaires intactes multiples et inconnus (comme dans le cas du cuivre(II))

Ainsi sur la Figure 44, où le taux de fragmentation calculé pour le mélange avec le cobalt (aux nombreux pics fragments de faible intensité) est reporté, laisse entrevoir que le calcul est sans doute surestimé, notamment lorsque l'allure du spectre obtenu avec le cobalt est comparé au mélange avec l'aluminium (aux ions fragments abondants et identifiés).

La stabilité de l'espèce moléculaire, qui se rompt en partie lorsqu'une puissance laser forte est utilisée, dépend des cations adduits. Toutefois les taux de fragmentation obtenus ne sont pas en corrélation avec les autres phénomènes observés tels que l'affinité cationique ou la possibilité de former des ions fragment ayant capté un électron. En effet, le taux de fragmentation ne suit pas l'ordre d'affinité des cations pour le POM. Il ne semble pas y avoir de lien non plus avec la faculté des ions à produire des espèces ayant capté un électron, puisque

les mélanges avec le cuivre et le cobalt, menant tous deux à de multiples espèces ayant capté un électron, ont des taux de fragmentation des plus différents.

### **3.3. Etude des fragmentations des polyoxométallates**

La fragmentation en source des POMs a été observée dès le commencement des expériences MALDI, en orientant le choix d'utilisation de la matrice CNA, qui s'était révélée comme la plus adéquate à leurs analyses.

Sont à la suite décrit, dans leur totalité, les ions fragments observés en source lors de l'ionisation par MALDI des POMs étudiés jusque-là. Les facteurs qui peuvent influencer la nature de ces ions fragments ou leurs abondances seront passés en revue. Une seconde sous-partie rendra compte des expériences de fragmentation par MS/MS, menées par différentes techniques. L'intérêt de ces expériences MS/MS est que les ions fragments observés ne proviennent que d'un ion choisi. La dernière partie (partie 3.3.3) s'attachera à comparer les fragments obtenus lors des expériences MS/MS aux fragments produits en source lors du phénomène de désorption/ionisation.

#### **3.3.1. Fragmentation en source lors du procédé MALDI en condition ISD**

Comme cela est décrit dans la partie 3.1.1 lors de la classification relative des matrices, une large fragmentation en source des POMs survient lors du processus d'ionisation MALDI. Ces fragmentations survenant « subitement » lors des phénomènes de désorption/ionisation, ils sont appelées « In-Source Decay » (ISD). La Figure 45 montre que ces fragmentations se vérifient quel que soit le délai d'extraction (temps entre l'impulsion laser et l'envoi des ions dans l'analyseur), c'est-à-dire qu'elles surviennent durant les premiers dixièmes de nanoseconde, alors que l'impulsion laser de 5 ns est encore en train d'irradier l'échantillon<sup>[43][131]</sup>

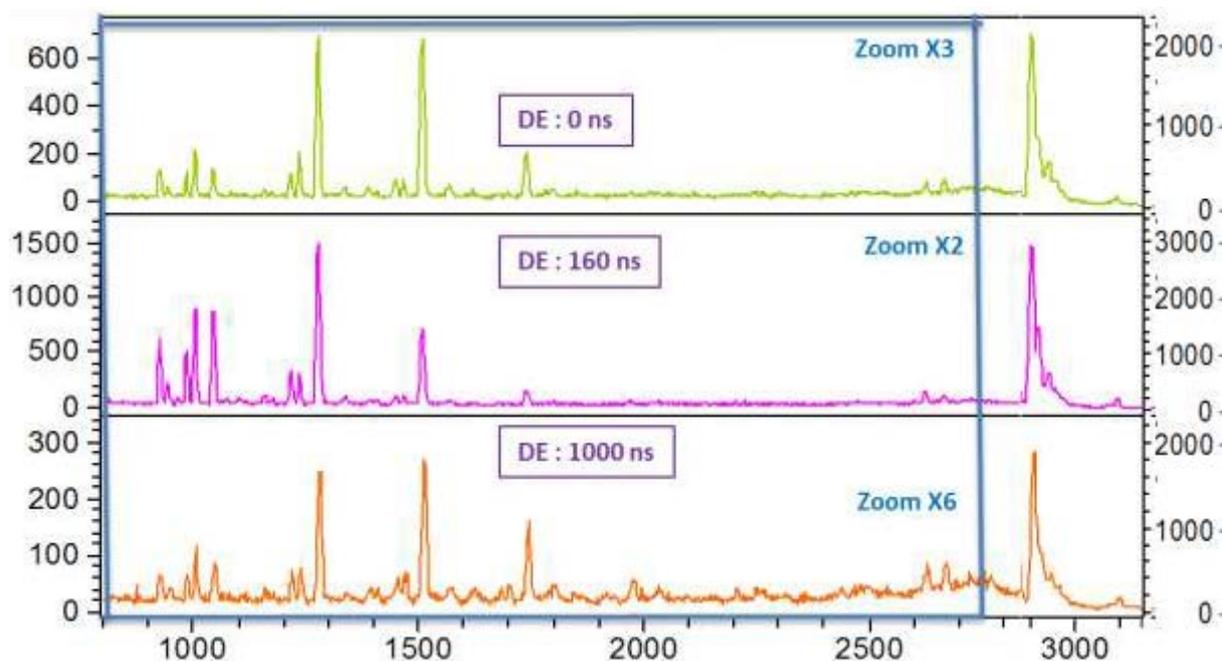


Figure 45 : Spectres MALDI du mélange CNA-Al<sub>3</sub><sup>+</sup>-POMc12 à haute puissance laser avec des temps de délai d'extraction variant de 0 à 1000ns. La gamme de masse basse est agrandie.

Les fragmentations en source sont détectées avec tous les types de POMs testés (par exemple voir Figure 13 et Figure 21), mais la description de la nature des ions fragments ne concerne que les POMs dont on était en mesure de détecter l'espèce moléculaire intacte. Ces fragmentations sont d'autant plus abondantes que la puissance laser utilisée est forte.

Lors du développement des expériences d'attachement de différents cations (voir partie 3.2.3), il est montré que la nature du cation introduit peut altérer la proportion et la nature des ions fragments. Les cations se retrouvent dans les ions fragments et cela modifie leurs formules : leurs compositions ne diffèrent pas seulement par la nature du cation qu'ils incorporent, mais aussi par leur nombre d'oxygènes. Les fragments qui contiennent un cation trivalent contiennent aussi un oxygène supplémentaire (sous forme de ligand oxo O<sup>2-</sup>) ce qui permet de produire un fragment qui est une seule fois chargée négativement. Le Tableau 9 rassemble les formule de composition des fragments et montre ainsi que peut dépendre aussi de la valence du cation puisqu'un fragment contenant l'aluminium, tel que [SiW<sub>6</sub>O<sub>22</sub>+Al]<sup>-</sup> aura une composition identique en présence de galium ([SiW<sub>6</sub>O<sub>22</sub>+Ga]<sup>-</sup>), alors qu'elle diffère lors de l'utilisation d'un échantillon mettant en contact le lithium, ce qui mènera à un fragment contenant un oxygène de moins : soit un ion fragment de formule [SiW<sub>6</sub>O<sub>21</sub>+Li]<sup>-</sup>. La représentation de ces fragments, de manière à respecter la valence des tungstènes qui y sont contenus, n'est pas aisément réalisable. Il semble que la structure de ces fragments soit très

différente de la structure du polyoxométallate de départ. Une réorganisation complète de la cage est plus qu'envisageable tels que le changement du nombre de ligand et de la configuration octaédrique des tungstènes, ce qui explique que certains ions fragments aient des formules étonnante, comme par exemple  $[\text{W}_6\text{O}_{20}+\text{Al}]^-$ . Ce dernier fragment a perdu le silicium central, qui est possiblement perdu sous forme de  $\text{SiO}_2$  au vu de la formule du fragment détecté. Le fragment semble donc dynamique et les interactions avec le cation peuvent être plus complexes que de simples interactions électrostatiques entre une sphère chargée quatre fois négativement et un ou plusieurs cation.

*Tableau 9 : Nature des ions abondants observés en ISD et classés par nombre de tungstènes qu'ils contiennent et en fonction des cations, ou mélanges de cations, utilisés. Les espèces soulignées contiennent un électron supplémentaire. Les espèces en italique sont minoritaires. Chaque cation de valence différente représente les cations de même valence (par exemple  $\text{Al}^{3+}$  représente les cations  $\text{X}^{3+}$ ). Les espèces obtenues sans adjonctions de cations sont présentes sur tous les spectres, même ceux obtenus en présence de cations ajoutés. (POMc12 étant de formule  $\text{SiW}_{10}\text{O}_{34}\text{POC}_{12}\text{H}_{25}^+$ )*

#W cation	W <sub>4</sub> m/z ~1004	W <sub>6</sub> m/z ~1478	W <sub>7</sub> m/z ~1704	W <sub>10</sub> m/z ~2627	Espèce moléculaire intacte
∅	$[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{H}]^-$ <u><math>[\text{SiW}_4\text{O}_{16}]^-</math></u>	$[\text{SiW}_6\text{O}_{21}+\text{H}]^-$ <u><math>[\text{SiW}_6\text{O}_{20}]^-</math></u>	$[\text{SiW}_7\text{O}_{24}+\text{H}]^-$ <u><math>[\text{SiW}_7\text{O}_{24}]^-</math></u>	$[\text{SiW}_{10}\text{O}_{34}]^-$ $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{H}]^-$	Pics mélangés et non résolus
$\text{Li}^+$	$[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{Li}]^-$	$[\text{SiW}_6\text{O}_{21}+\text{Li}]^-$	$[\text{SiW}_7\text{O}_{24}+\text{Li}]^-$	$[\text{SiW}_{10}\text{O}_{34}]^-$ $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{Li}]^-$	$[\text{POMc12}+3\text{Li}]^-$ <i><math>[\text{POMc12}+4\text{Li}]^-</math></i> <i><math>[\text{POMc12}+\text{H}2\text{Li}]^-</math></i>
$\text{Al}^{3+}$ Idem pour (les $\text{X}^{3+}$ )	$[\text{SiW}_4\text{O}_{16}+\text{Al}]^-$ <u><math>[\text{W}_4\text{O}_{14}+\text{Al}]^-</math></u>	$[\text{SiW}_6\text{O}_{22}+\text{Al}]^-$ <u><math>[\text{W}_6\text{O}_{20}+\text{Al}]^-</math></u>	$[\text{SiW}_7\text{O}_{25}+\text{Al}]^-$	$[\text{SiW}_{10}\text{O}_{34}]^-$ $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{H}]^-$	$[\text{POMc12}+\text{Al}]^-$
$\text{Co}^{2+}$ Idem pour ( $\text{Cu}^{2+}$ )	$[\text{SiW}_4\text{O}_{16}+\text{HCo}]^-$ $[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{Co}]^-$	$[\text{SiW}_6\text{O}_{22}+\text{HCo}]^-$ $[\text{SiW}_6\text{O}_{21}+\text{Co}]^-$	$[\text{SiW}_7\text{O}_{25}+\text{HCo}]^-$ $[\text{SiW}_7\text{O}_{24}+\text{Co}]^-$	<u><math>[\text{SiW}_{10}\text{O}_{34}]^-</math></u> $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{Co}]^-$	$[\text{POMc12}+\text{CoH}]^-$ <i><math>[\text{POMc12}+2\text{Co}]^-</math></i> + non résolus
$\text{Al}^{3+}+\text{Li}^+$ Idm pour ( $\text{Fe}^{3+}+\text{Li}^+$ )	$[\text{SiW}_4\text{O}_{16}+\text{Al}]^-$ <i><math>[\text{W}_4\text{O}_{14}+\text{Al}]^-</math></i>	$[\text{SiW}_6\text{O}_{22}+\text{Al}]^-$ <i><math>[\text{W}_6\text{O}_{20}+\text{Al}]^-</math></i>	$[\text{SiW}_7\text{O}_{25}+\text{Al}]^-$	$[\text{LiSiW}_{10}\text{O}_{34}]^-$ $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{Li}]^-$	$[\text{POMc12}+\text{Al}]^-$ <i><math>[\text{POMc12}+\text{AlLi}]^-</math></i>
$\text{Co}^{2+}+\text{Li}^+$ Idem pour ( $\text{Cu}^{2+}+\text{Li}^+$ )	$[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{Li}]^-$ $[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{Co}]^-$ $[\text{SiW}_4\text{O}_{16}+\text{LiCo}]^-$	$[\text{SiW}_6\text{O}_{21}+\text{Li}]^-$ $[\text{SiW}_6\text{O}_{21}+\text{Co}]^-$ $[\text{SiW}_6\text{O}_{22}+\text{LiCo}]^-$	$[\text{SiW}_7\text{O}_{24}+\text{Li}]^-$ $[\text{SiW}_7\text{O}_{24}+\text{Co}]^-$ $[\text{SiW}_7\text{O}_{25}+\text{LiCo}]^-$	$[\text{LiSiW}_{10}\text{O}_{34}]^-$ $\text{POC}_{12}\text{H}_{25}+\text{Li}]^-$	$[\text{POMc12}+3\text{Li}]^-$ $[\text{POMc12}+\text{CoH}]^-$ $[\text{POMc12}+\text{CoLi}]^-$

Les cations ne portant qu'une charge ou trois charges se retrouvent systématiquement fixes dans les ions fragments (ion adduit avec un cation). Les cations divalents montrent dans les spectres MALDI la présence d'ions fragments adduits mixtes, soit avec fixation du cation monovalent (par exemple  $[\text{SiW}_4\text{O}_{16}+\text{HCo}]^-$ ), soit seuls (par exemple  $[\text{SiW}_4\text{O}_{15}+\text{Co}]^-$ ), à condition que l'ion fragment ait capté un électron. Ce phénomène semble trouver une raison dans la faculté du MALDI à produire exclusivement des ions mono-chargés, même pour nos polyanions.

Tous les ions fragments obtenus dans la source MALDI ne sont pas reportés dans le tableau. En premier lieu, les ions fragments dont la masse est inférieure à 1000 Da, auxquels on ne s'est pas intéressés, mais aussi les peu abondants de plus haut  $m/z$ , que l'on devine plus qu'on ne les détecte. C'est le cas des haut  $m/z$  contenant 8 ou 9 tungstènes dont un agrandissement est présenté sur la Figure 46 un agrandissement de cette partie du spectre montrant qu'ils existent.

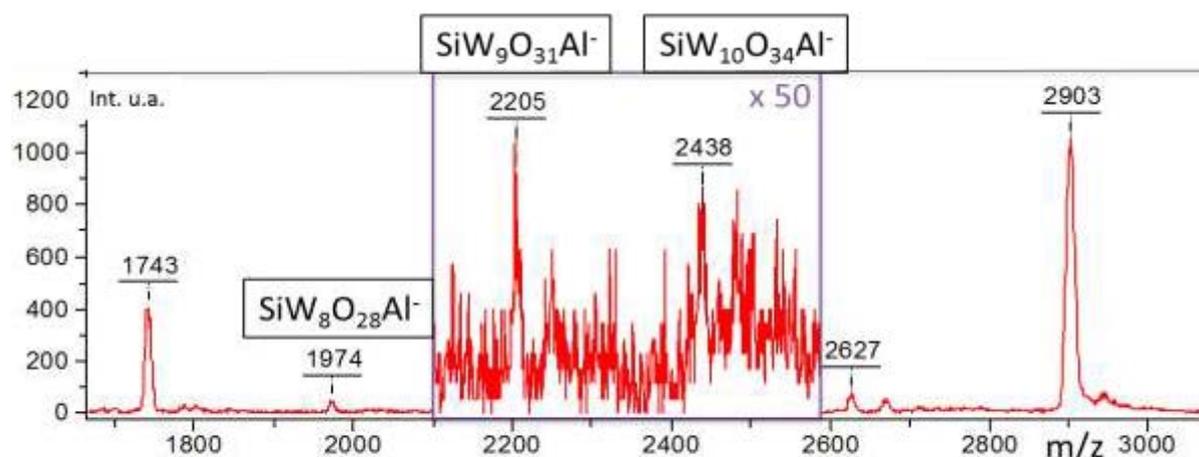


Figure 46 : Spectre MALDI du mélange CNA-POMc12- $\text{Al}^{3+}$  enregistré à forte puissance laser, 30 tirs. Agrandissement de la gamme  $m/z$  où se trouvent des ions fragments de haute masse.

On a également reporté dans le Tableau 9 ce qui a été décrit lors des expériences de compétition d'attachement anionique en partie 3.2.1, à savoir que, dans la majorité des cas, lorsque deux cations sont placés en présence du POM, seul un des deux cations est présent dans tous les ions fragments, et dans l'espèce moléculaire intacte.

En dehors de ces variations de nature d'ions fragments, plusieurs autres paramètres jouent sur l'abondance des ions fragments. Par exemple, la nature du cation, susceptible d'influencer le taux de fragmentation, comme déjà dit plus en haut (paragraphe 3.2.3).

La nature de la matrice influe fortement sur le taux de fragmentation, ce qui a permis de réaliser le classement des matrices illustré plus haut (paragraphe 3.1.1). La nature de la matrice influe aussi sur la proportion des ions fragments produits. Bien qu'on voie, ou qu'on puisse deviner, sur tous les spectres, la présence d'ions fragments contenant un hydrogène, la proportion des ions fragments hydrogénés varie en fonction de la nature de la matrice utilisée. La Figure 47 fait observer que la proportion du fragment contenant uniquement un H varie de manière conséquente selon la matrice employée.

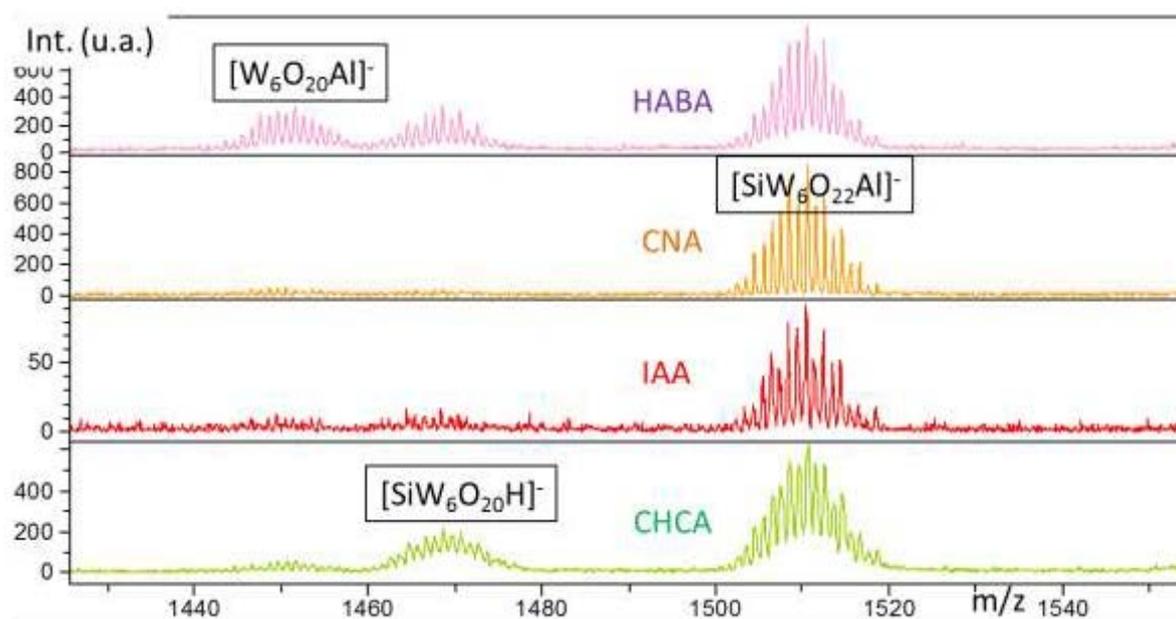


Figure 47 : Agrandissements des spectres MALDI du mélange POMc12+Al<sup>3+</sup> dans quatre matrices différentes, enregistrés à haute puissance laser.

Si l'absence du fragment  $[SiW_6O_{20}H]^-$  peut se justifier sur le spectre de masse obtenu avec la matrice CNA (qui est une matrice aprotique) et son abondance importante en présence de la matrice CHCA (qui contient des hydrogènes labiles), il est surprenant de constater que dans la matrice IAA (qui possède une affinité protonique en phase gazeuse proche de CHCA<sup>[87]</sup>) cet ion fragment est peu abondant. La capacité de la matrice à fournir un H<sup>+</sup> à l'analyte ne semble donc pas être la raison principale de sa présence. Les interactions entre la matrice et le cation entrent possiblement aussi en jeu, comme il est considéré pour les échange de H<sup>+</sup>, la matrice, ou des agrégats de matrices pourraient interagir avec le POM et lui échanger préférentiellement des protons ou d'autres cations.

Le dernier paramètre capable d'influencer la proportion des fragmentations concerne la nature du support. La proportion des ions fragments présentant une capture électronique (soulignés dans le Tableau 9) varie fortement entre un support métallique conducteur ou isolant. Ce type d'ion fragment s'observe même en l'absence de cation (voir Tableau 9), ils contiennent alors des éléments de la cage oxométallique (par exemple  $[\text{SiW}_4\text{O}_{16}]^-$ ). Néanmoins des ions fragments ayant capté un électron sont nettement plus visibles en présence de cations divalents cuivre(II) et cobalt(II) dans l'échantillon. Ils contiennent alors un cuivre ou un cobalt et un électron excédentaire. Ces résultats ont été abordés dans la partie 3.1.2 en présentant l'influence des supports sur le rendement d'ionisation. Le taux de fragmentation général observé était bien plus important si le support était isolant plutôt que métallique. Toutefois, si l'abondance générale des ions fragments augmentait relativement par rapport à l'espèce moléculaire intacte lors de l'utilisation du support plastique, les ions fragments ayant capté un électron voyaient leur proportion augmenter encore plus nettement que tous les autres fragments (voir Figure 31).

### 3.3.2. Fragmentation MS/MS sur différents appareils

Pour comprendre la formation des fragments en source (ISD) lors du processus MALDI, nous avons mené quatre expériences de fragmentations différentes de l'expérience ISD. Les expériences MS/MS permettent de sélectionner l'ion et de lui faire subir des collisions, ou d'attendre qu'il se fragmente seul, pour détecter des ions fragments. Ce procédé permet d'être certain que les fragments proviennent de l'ion sélectionné.

La première expérience a été menée sur le même appareil utilisé pour acquérir les spectres de masse lors de nos expériences ISD. Dans cette configuration l'*AutoflexIII* utilise le coulage de deux analyseurs à temps de vol (TOF) à la suite l'un de l'autre (voir Figure 5). A l'entrée du premier TOF un ion parent est sélectionné, pour lequel on attend la fragmentation non immédiate.

Ces ions sont définis comme des « ions métastables », donc l'ion précurseur possède une énergie suffisante pour se fragmenter de lui-même après un temps suffisamment long (plus de d'une  $\mu\text{s}^{[147]}$ , avant d'être analysés dans un second analyseur.

Ensuite, un deuxième TOF permet de séparer les ions fragments issus de la décomposition de l'ion métastable sélectionné, et la masse des ions fragments formés peut ainsi être attribuée.

Cette technique appelée LIFT, est largement appliquée pour l'analyse des peptides, et se fonde sur le même principe que les analyses autrefois appelées<sup>[148]</sup> PSD (post source decay). Il a été prouvé que les fragmentations obtenues en LIFT correspondent aux mêmes mécanismes de fragmentations obtenues lors d'expériences de collision à faible vitesse entre l'ion désiré et des molécules de gaz (mode CID<sub>basse énergie</sub>). Les ions fragments obtenus sont issus de processus ergodiques, c'est-à-dire que l'énergie vibrationnelle transmise à la molécule est répartie sur l'ensemble des liaisons de la molécule. Ces fragmentations sont initiées par la charge que porte l'ion. La Figure 48 l'expérience LIFT menée à partir de l'ion [POM+Al]<sup>-</sup> ne permet d'observer aucun fragment.

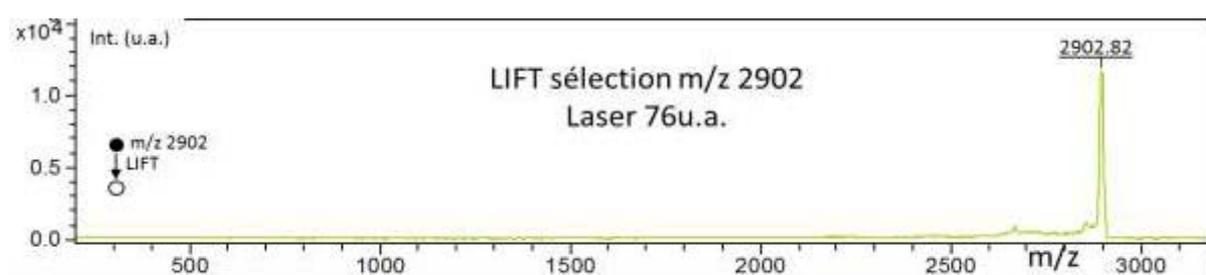


Figure 48 : Spectre LIFT de l'ion [POM+Al]<sup>-</sup> obtenu en MALDI à partir du mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12.

Cette expérience réalisée dans un mélange mettant en contact le POMc12 avec l'Aluminium(III) a été répétée pour des échantillons contenant les cations Li<sup>+</sup>, Fe<sup>3+</sup> ou Cu<sup>2+</sup>. Les résultats ont été les mêmes. Il est particulièrement étonnant de n'observer aucun fragment alors que cet analyte produit au cours des processus d'ionisation MALDI de nombreux ions fragments en source lorsque les conditions s'y prêtent.

Il est possible lors de cette expérience d'introduire un gaz de collision sur le trajet des ions parents (voir schéma Figure 5). Cela n'a pas d'influence sur le résultat. D'ailleurs, l'utilisation de gaz en mode LIFT sur cet appareil a été jugée comme relativement inefficace par une étude de Moneti<sup>[92]</sup> qui observait que la fragmentation en mode LIFT d'un peptide protonné, avec ou sans gaz, donnait des résultats semblables.

Des expériences LIFT supplémentaires ont été menées sur l'ion fragment de plus haut m/z observé, qui correspond à l'espèce [SiW<sub>10</sub>O<sub>35</sub>POC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>+H]<sup>-</sup> (de m/z 2627). Ce fragment correspond à la perte d'une fonctionnalisation. Il n'est pas certain que ce fragment soit obtenu par fragmentation en source, il est au contraire possible qu'il soit un produit de dégradation du

POMc12, sans rapport avec nos expériences de spectrométrie de masse. Le collaborateur qui a synthétisé ce composé a exposé des études qui montrent que ce POM se dégrade en solution<sup>[103]</sup>. Aucune fragmentation de cet ion de  $m/z$  2627 n'a été observée en mode LIFT.

En revanche lorsqu'un ion précurseur sélectionné est un ion fragment formé en source de plus faible rapport  $m/z$  (ayant perdu les fonctionnalisations organiques) des fragmentations consécutives sont constatées. Cela se traduit sur les spectres MS/MS de la Figure 49 qui montrent que les ions fragments produits par ISD sont métastables et qu'ils se fragmentent consécutivement de manière métastable.

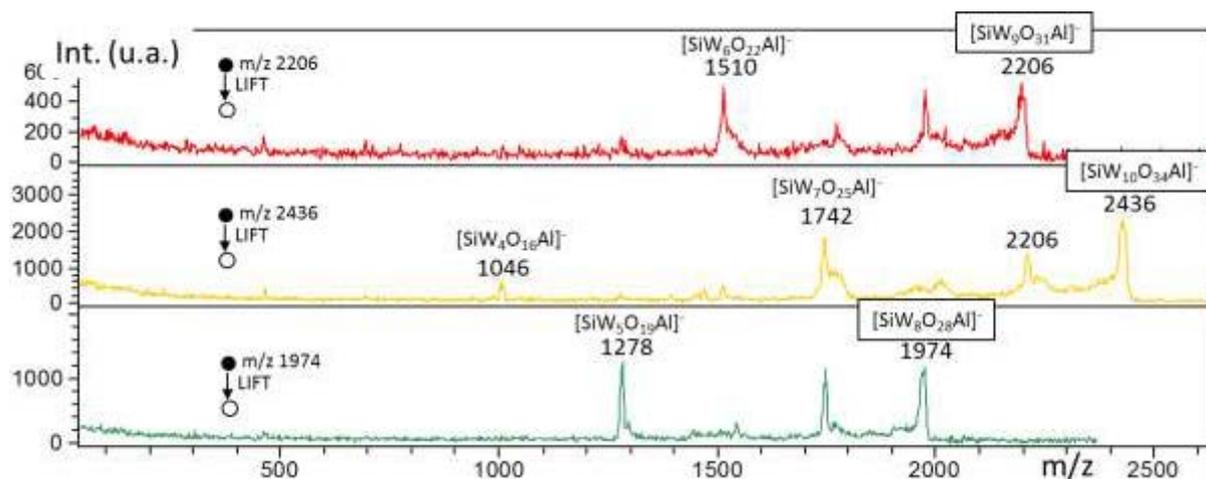


Figure 49 : Spectres MS/MS (LIFT) des ions précurseurs (encadrés sur la figure) obtenus en MALDI par sélection de fragments ISD à partir du mélange CNA-POMc12- $Al^{3+}$  enregistrés à forte puissance laser (80 u.a.)

La Figure 49 montrent la décomposition métastable (mode LIFT) des ions fragments centrés sur les  $m/z$  2203,  $m/z$  2436 et  $m/z$  1974 (qui sont peu abondants sur les spectres de masse comme le représente la Figure 46). On peut donc suggérer que lors des fragmentations ISD, les ions fragments de plus faibles  $m/z$  sont obtenus par fragmentations consécutives de l'espèce moléculaire, par perte des fonctionnalisations suivie par des pertes consécutives de multiples de  $WO_3$ . Il semble donc que l'édifice moléculaire reste stable tant que la cage oxométallique n'est pas entamée, mais dès que cette structure perd les deux fonctionnalisations organiques, elle perd aussi sa stabilité et se fragmente.

Une expérience complémentaire a été réalisée sur l'appareil MALDI-LTQ-Orbitrap, qui permet de sélectionner la même espèce moléculaire intacte et de réaliser une expérience de

fragmentation sans collision (mode CID). L'énergie cinétique du piège LTQ mise en jeu est faible (quelques électronVolts), cette expérience est dénommé ici « CID<sub>(basse énergie)</sub> ». Le spectre de masse présenté en Figure 50 sur laquelle peu de fragmentations sont observées, et surtout l'absence d'ions fragments de bas rapport m/z, montre la très forte stabilité des espèces moléculaires intactes après les processus MALDI.

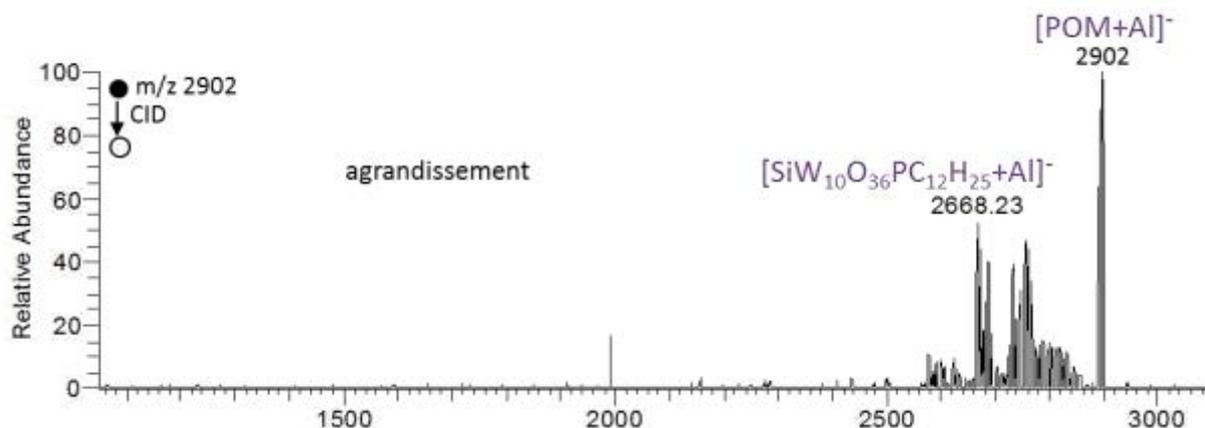


Figure 50 : Spectre MS/MS en mode CID<sub>basse énergie</sub> de l'ion précurseur m/z 2902 de composition  $[SiW_{10}O_{38}P_2C_{24}H_{50}+Al]^-$  formé en MALDI à partir d'un mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12. (voir condition en partie 2.1.2)

Cependant, les ions fragments observés entre m/z 2600 et 2900 sont d'intensités très faibles car dans cette expérience de fragmentation la plupart des ions ont été perdus sans pour autant donner de fragmentation. En effet la trop grande énergie appliquée couplée au fait que cet ion soit de haute masse fait qu'il y a eu l'éjection résonnante de l'ion précurseur hors de la cellule de collision. Toutefois il faut considérer que de manière générale cette technique de fragmentation s'applique difficilement à des ions de haut rapport m/z comme celui-ci. Parmi les ions fragments observés, un ion de m/z 2628 est identifié, il correspond à la perte d'une fonctionnalisation (O<sub>2</sub>PC<sub>12</sub>H<sub>25</sub>), sa formule est  $[SiW_{10}O_{36}PC_{12}H_{25}+Al]^-$ . Les autres ions fragments ne sont pas identifiables car les massifs isotopiques sont confondus. Néanmoins aucun ion ne révèle la perte de tungstène.

Une expérience permettant d'apporter beaucoup d'énergie par collision entre l'ion précurseur et un gaz neutre (dite CID<sub>haute énergie</sub>) a été menée afin d'obtenir la fragmentation de l'espèce moléculaire  $[POM+Al]^-$ . Il s'agit d'une expérience au cours de laquelle l'ion précurseur sélectionné est porté à grande vitesse dans un premier analyseur TOF, à la suite duquel se trouve une cellule de collision remplie d'air. Les ions fragments issus de ces collisions

de haute énergie (1 keV) sont ensuite envoyés vers un second analyseur (de nouveau un TOF dans ce cas) qui permet de déterminer le rapport  $m/z$  de ces ions fragments. Dans ces conditions de haute énergie de nombreux ions fragments (voir Figure 51) sont détectés.

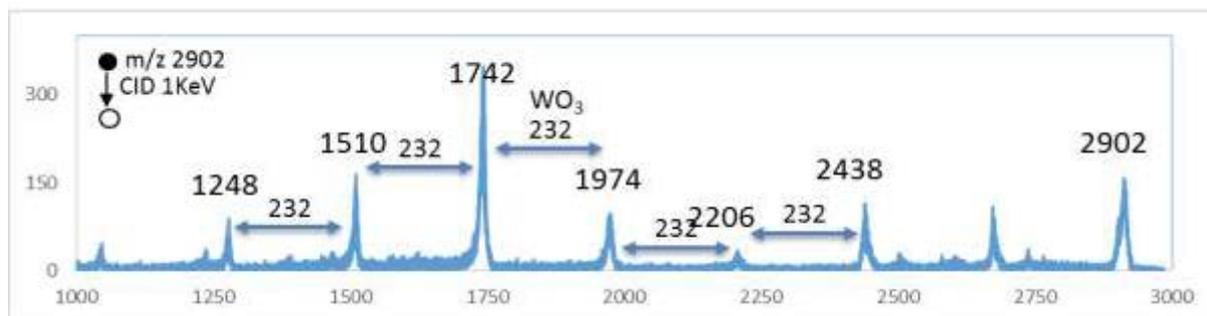


Figure 51 : Spectre MS/MS en mode  $CID_{haute\ énergie}$  de l'ion précurseur  $m/z$  2902 de composition  $[SiW_{10}O_{36}P_2C_{24}H_{50}+Al]^-$  formé en MALDI à partir d'un mélange CNA+ $Al^{3+}$ +POMc12 (voir conditions expérimentales partie 2.1.3)

La masse des ions est régulièrement distante d'un écart de  $m/z$  232 ce qui correspond à la masse d'un oxyde tungstique prouve que l'ion précurseur peut perdre des multiples de  $WO_3$ . Les ions fragments obtenus sont identiques à de nombreux ions observés lors des fragmentations en source. Cette similarité est discutée en détail un peu plus loin (avec la Figure 53).

Enfin, une expérience MS/MS d'une espèce moléculaire intacte multichargé, obtenu par électrospray, vient montrer que les fragments obtenus de cette espèce ne sont pas comparables à ceux observés lors de la fragmentation de l'espèce mono-chargée en MALDI. L'expérience de fragmentation réalisée sur l'appareil «ESI-LTQ-Orbitrap» est très similaire à celle menée sur l'appareil «MALDI-LTQ-Orbitrap» précédemment décrite, la différence principale étant que l'ion précurseur est deux ou trois fois chargés (voir le spectre MS ESI présenté en Figure 12).

Les fragmentations de basse énergie sont initiées par la charge et puisque notre ion précurseur possède ici plusieurs charges, la répulsion coulombienne vient assister la fragmentation. Les voies de fragmentation sont donc profondément différentes de ce qui est observé en mode  $CID_{(haute\ énergie)}$  et à fortiori en mode ISD en MALDI qui voient une espèce mono-chargée se fragmenter. Toutefois cette expérience à l'avantage de présenter quelles sont

les autres voies de fragmentations que l'on peut observer à partir de l'espèce moléculaire intacte.

L'ion précurseur encore présent sur le spectre de la Figure 52 est ici un ion trois fois chargé adduit d'un sodium. Sa fragmentation en mode CID<sub>(basse énergie)</sub> produit une multitude d'ion fragments dont l'état de charge est moindre que l'ion précurseur, ce qui va dans le sens d'un mécanisme de fragmentation initié par les charges. La même expérience a été réalisée sur un ion intact deux fois chargé et les ions fragments détectés sont similaires, à cela près qu'ils sont tous mono-chargés.

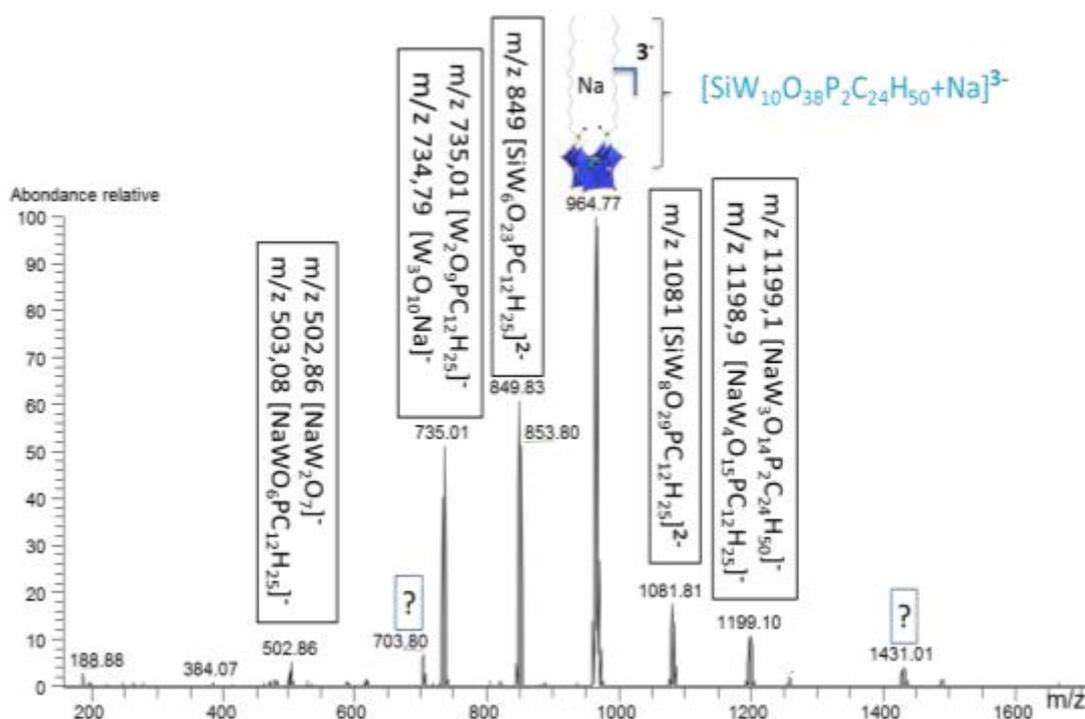


Figure 52 : Spectre MS/MS en CID<sub>(basse énergie)</sub> de l'ion  $[POMc12+Na]^{3-}$  obtenu en ESI. Attribution des formules aux ions observés.

La particularité des ions fragments observés sur le spectre de la Figure 52, face aux ions fragments observés sur les spectres ISD et CID<sub>(haute énergie)</sub>, est qu'ils ont presque tous conservé le lien entre les fonctionnalisations organiques et une partie de la cage oxométallique. La nature de ces fragments diffère beaucoup des fragments obtenus soit lors des expériences MS/MS soit des fragmentations en mode ISD à partir d'ion mono-chargés produits par la source MALDI. L'état de charge de l'ion précurseur est donc responsable des voies de fragmentations

empruntées par l'ion précurseur. La séquence de masse séparant plusieurs pics comme ce qui est observé lors de la fragmentation des ions mono-chargés en MALDI ne se retrouve pas dans ce cas.

Ces différentes expériences produisant des fragmentations montrent que la perte des fonctionnalisations lors de la fragmentation des ions produits en MALDI n'indique pas que ces liaisons sont plus fragiles que les liaisons de la cage oxométallique lorsque la fragmentation lorsque l'ion multichargé est produit. La nature des fragmentations constatées, où la cage multichargée se fragmente et le lien avec les fonctionnalisations est souvent conservé, est cohérent avec le mécanisme de fragmentation utilisant de faibles énergies qui est initiée dans ce cas par la charge contenue dans la cage oxométallique.

### **3.3.3. Origine de la fragmentation en source lors du MALDI**

Les fragmentations ISD sont décrites depuis 1998<sup>[149]</sup> pour l'analyse de biomolécules telles que les peptides et protéines. Les fragmentations ISD surviennent durant les premiers dixièmes de nanoseconde, et peut-être même lorsqu'ils sont encore dans la matrice à l'état solide<sup>[148]</sup>. Les ions fragments obtenus avec les peptides ont l'avantage d'être bien connus car ils ont été étudiés avec diverses méthodes.

Les études publiées font état de comparaisons des ions fragments des peptides obtenus par ISD avec les ions fragments obtenus lors d'expériences de collision (CID) ou de captures électroniques (ECD)<sup>[150]</sup>. Il a ainsi pu être déterminé que certaines fragmentations obtenues dans la source MALDI proviennent de processus radicalaires, tandis que d'autres sont similaires à des fragmentations obtenues par collisions de basse énergie. Les ions fragments obtenus par processus radicalaires sont soit imputés au don d'hydrogène (sous forme de H<sup>•</sup><sup>[151]</sup> de la part de la matrice vers les peptides, soit à l'abstraction de H<sup>•</sup><sup>[152]</sup>. Des expériences utilisant un marquage isotopique de la matrice, remplaçant les hydrogènes labiles par des deutériums, ont prouvé que les ions fragments de peptides contiennent les deutériums labiles de la matrice<sup>[153]</sup>.

Il apparaît évident que les schémas de fragmentations des POMs ne peuvent pas être comparés à ceux des peptides ou des molécules organiques. La structure des POMs est particulière car les liaisons dans la cage oxométallique ne sont pas des liaisons simples. La

rupture d'une liaison n'engendre pas la formation d'un fragment puisque chaque octaèdre centré sur un atome de tungstène est relié plusieurs fois au reste de la molécule.

Le haut degré d'oxydation des métaux et la conjugaison de la molécule l'autorisent à capter un électron et à rester intacte même en phase gazeuse, puisqu'on observe des ions intacts, tels que  $[\text{POM}+4\text{Li}+\text{e}^-]$ . Toutefois il est possible que l'activation énergétique induisant la fragmentation des POMs comme des peptides aient la même origine.

On observe, grâce aux expériences de fragmentation en  $\text{CID}_{(\text{basse énergie})}$ , que la cage oxométallique peut se fragmenter sans avoir recours à une énergie très importante lorsque l'ion intact est multichargé. Ces fragmentations de basse énergie utilisent uniquement de l'énergie vibrationnelle. Elles montrent des ions fragments qui conservent les liaisons entre les fonctionnalisations organiques et la cage oxométallique. Or, ce type de fragmentation n'est pas observé en ISD. Les ions fragments obtenus en source sont identiques à ceux obtenus par collision de haute énergie, ce qui montre que cette fragmentation est induite par des états électroniques excités.

Quels que soient les mélanges, ou les efforts en termes de puissance laser ou de collision, aucun ion multichargé n'est observé, même parmi les ions fragments. Lorsque le polyanion ne se retrouve pas en présence du cation inclus dans l'espèce moléculaire intacte, il s'associe avec un  $\text{H}^+$  de manière à rester mono-chargé. Dans le cas où il n'y a pas d'hydrogène dans l'espèce moléculaire intacte, avec les cations trivalents par exemple, les ions fragments contenant un hydrogène existent tout de même, bien que ce soit de manière marginale. Ils trouvent donc nécessairement naissance à partir d'un processus de fragmentation différent des ions fragments cationisés. En effet, ils ne peuvent pas provenir de la seule espèce moléculaire intacte présent sur le spectre de masse qui contient un cation. Ces ions fragments sont donc formés alors qu'ils sont encore en interaction avec la matrice, peut-être même lorsqu'ils sont encore dans le cristal, comme il est suggéré pour les peptides. La nature de la matrice joue d'ailleurs dans la proportion de ces ions (voir Figure 47). Toutefois ces ions fragments se retrouvent à l'état de traces et ils pourraient tout aussi bien provenir d'autres espèces moléculaires produites simultanément à notre espèce moléculaire intacte principale. On annote d'un «  $\square$  » sur le spectre de masse de la Figure 53 les hypothétiques espèces moléculaires intactes responsables de la présence d'ions fragments contenant un  $\text{H}^+$ . Les ions fragments contenant un  $\text{H}^+$  sont annotés d'un H sur le même spectre.

La comparaison de ce spectre MS/MS avec le spectre de masse MALDI produisant de la fragmentation ISD, révèle que les ions produits lors de l'expérience de fragmentation par CID<sub>(haute énergie)</sub> ou par ISD sont de nature identique. L'énergie interne atteinte par l'espèce moléculaire intacte au moment de la fragmentation ISD semble plus importante que celle acquise lors des collision CID<sub>(haute énergie)</sub> effectuées au cours des expériences TOF-TOF CID. En effet, considérant l'abondance des ions fragments obtenus (voir Figure 53), il est clair que la taille des ions fragments détectés en ISD est inférieure à celle des ions fragments obtenus en CID<sub>(haute énergie)</sub>. Cette observation invite à penser que l'énergie accumulée dans l'espèce moléculaire intacte est induite par la transmission des états excités des molécules de matrice à l'analyte et non pas seulement par les collisions entre les molécules de matrice et l'analyte.

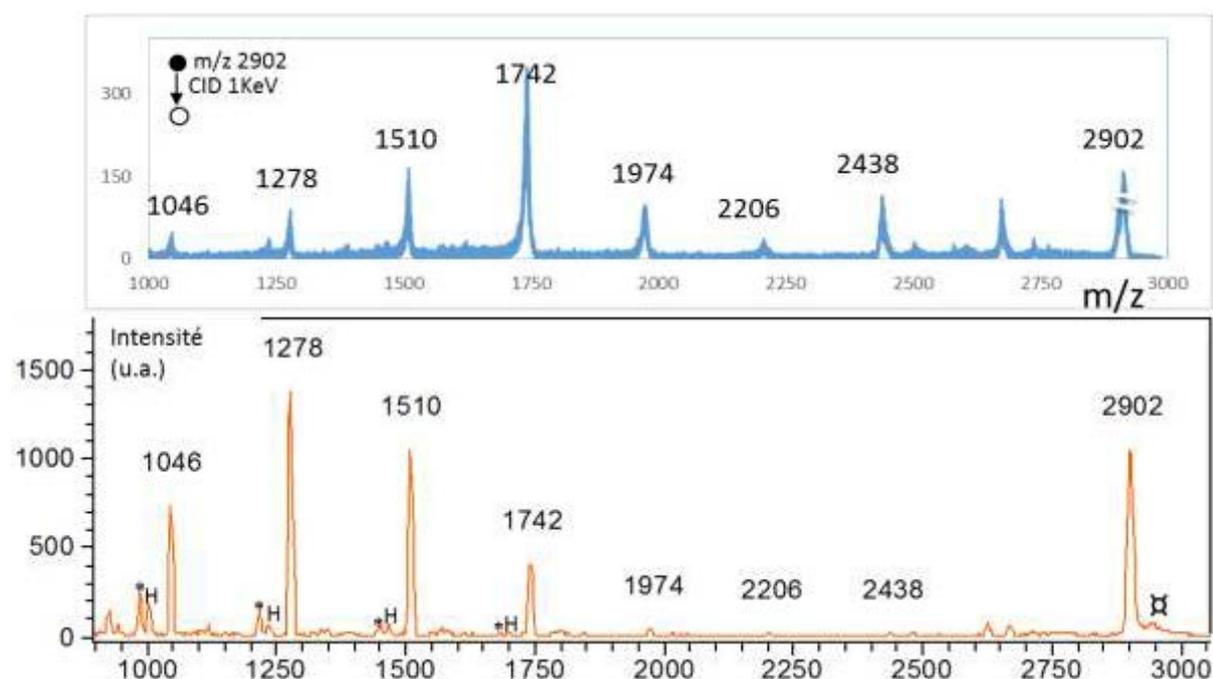


Figure 53 : Haut : Spectre MS/MS en TOF-TOF CID de l'ion m/z 2902 obtenu en MALDI. Bas : spectre MALDI du mélange CNA+POMc12+Al<sup>3+</sup> à fort laser. Les ions annotés de leurs masses contiennent un atome d'aluminium. Les ions qui contiennent un H<sup>+</sup> sont annotés H. Les ions qui ont capté un électron sont annotés d'une étoile\*.

En revanche le taux de fragmentation obtenu avec les deux techniques ne peut être comparé car l'espèce moléculaire intacte est artificiellement diminuée lors de l'acquisition du

spectre de masse TOF-TOF CID (voir principe partie 2.1.3). Cette nécessité de suppression de l'espèce moléculaire intacte provient de la probabilité limitée de collisions entre l'ion parent et le gaz durant l'expérience TOF-TOF. Ainsi, la plupart des ions parents ne se fragmentent pas et sont éliminés intentionnellement dans le but d'obtenir un spectre MS/MS satisfaisant. En ISD aucun ion n'est supprimé, ce qui révèle que le taux de fragmentation est important.

Les expériences de fragmentation en TOF-TOF CID<sub>(haute énergie)</sub> mettent en évidence que les fragmentations, obtenues par MS/MS ou en source (ISD), proviennent de l'ion intact adduit.

On suppose que l'ion intact se fragmente en ISD s'il acquiert suffisamment d'énergie et sans qu'il n'y ait besoin de capture électronique ou de transfert d'hydrogène radicalaire. En ISD comme en CID<sub>(haute énergie)</sub> la fragmentation survient lorsque l'espèce moléculaire intacte a acquis une grande énergie ; il perd alors les fonctionnalisations organiques pour former l'ion contenant dix tungstènes. Cette espèce est peu stable et se fragmente en perdant des oxydes de tungstène (WO<sub>3</sub>), phénomène observé avec les expériences LIFT (Figure 49). Cette décomposition est représentée sur la Figure 54.

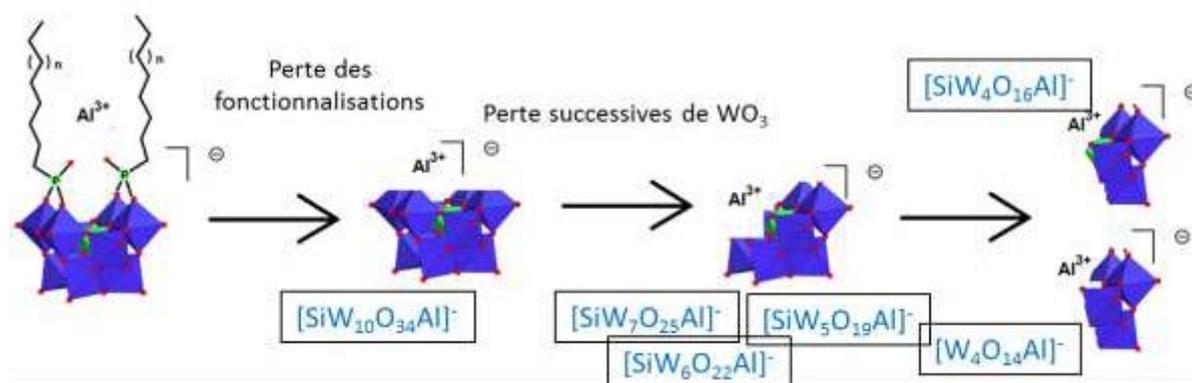


Figure 54 : Schéma représentant les fragmentations en source observées. Les formules annotées sont non exhaustives et sont données à titre d'exemples d'ions fragments.

Vraisemblablement, la seule manière qui permettrait à l'espèce moléculaire intacte d'atteindre ce haut niveau d'énergie est la réception d'une grande quantité d'énergie lorsqu'il est encore dans l'agrégat. A ce stade des processus MALDI, le POM peut capter un électron et former des ions fragments qui contiennent cet électron supplémentaire ; ce dernier n'est cependant pas responsable de la fragmentation. Des espèces moléculaires détectées intactes et

qui ont capté un électron, et cela quelle que soit la puissance laser, sont présentent sur les spectres de masse. La plupart des ions fragments ne contiennent pas d'électrons supplémentaires.

L'énergie interne de l'espèce moléculaire intacte provient de la fluence laser qui excite les molécules de matrices. Les molécules de matrice de l'agrégat, qui sont dans un état excité<sup>[51]</sup> provoquent l'accumulation ponctuelle d'une grande quantité d'énergie. Cette énergie est transmise à l'ion intact qui est encore dans les agrégats de matrice durant ces premiers instants, puis dissipée par la désintégration de l'agrégat ; cependant, une quantité d'énergie suffisante peut rester à l'espèce moléculaire intacte. L'ion excité dissipe l'énergie emmagasinée en se fragmentant de lui-même lorsqu'il se retrouve isolé. La fragmentation en source apparait lorsque la quantité d'énergie résiduelle sur l'analyte est importante, ce qui implique que la puissance du laser doit être bien au-delà de la valeur seuil.

Ces propositions sont différentes de celles proposées dans la littérature pour la fragmentation des peptides par ISD. Toutefois, il était peu probable que la fragmentation en source des peptides et du POM étudiés soit similaire. En effet les matrices telles que SA ou DHB, qui provoquent des fragmentations en source abondantes des peptides, ne causent aucune fragmentation en source du POM. Il se peut que les peptides, qui ont une structure moins solide et sensible au transfert d'hydrogène radicalaire, soient fragmentés avant que l'étape vécue par les POM n'advienne.

De manière à valider l'hypothèse selon laquelle la fragmentation est issue d'un processus uniquement vibrationnel, il faudrait étudier quelle est la température des agrégats formés avec les différentes matrices testées, ou encore comparer la température des agrégats formés par la matrice CNA et la matrice nitroanthracène, qui se ressemblent beaucoup mais révèlent un comportement différent au moment d'induire de la fragmentation en source.

#### 4. Conclusion

Deux aspects concernant les mécanismes d'ionisation par MALDI ont été largement discutés au cours de la présentation de nos expériences. Le premier traite des mécanismes de fragmentation en source, qui se sont avérés très abondants pour les composés POMc8, POMc10 et POMc12 ; le second aspect considère les processus responsables de l'ionisation de ces composés sous forme d'adduits mono-chargés.

##### Concernant le premier aspect : mécanismes de fragmentation en source

La fragmentation en source par MALDI s'est révélée plus ou moins abondante lors des analyses de polyanions, en fonction de la nature des matrices et des contre-ions utilisés dans la préparation des échantillons. Parmi ces matrices, une, rarement utilisée, s'est avérée particulièrement intéressante pour l'analyse de nos composés. Il s'agit de la matrice 9-cyanoanthracène (CNA). Elle a permis d'obtenir uniquement l'espèce moléculaire intacte lorsque la puissance des tirs laser était appliquée à la valeur seuil, ainsi qu'une large quantité d'ions fragments à plus forte puissance laser. En utilisant cette préparation d'échantillon, la qualité des spectres de masse était satisfaisante tant pour la résolution, que pour le signal sur bruit et l'abondance des ions formés.

Les douze matrices testées au cours de notre étude ont été comparées et classées en deux familles distinctes en fonction de l'allure du spectre MALDI :

- La première comprend les cinq matrices donnant lieu à la production d'espèces moléculaires intactes peu abondantes et à l'absence de fragmentation en source (ISD). Il s'agit des matrices DHB, FA, SA, HPA et THAP
- La deuxième comprend celles qui produisent d'abondantes espèces moléculaires intactes mais qui induisent aussi fragmentations en source, selon des proportions variables en fonction de la matrice utilisée et de la puissance laser appliquée. Il s'agit des matrices DAN, CHCA, CNA, DIT, HABA, DCTB, IAA. Ces matrices sont bien différentes tant au niveau des propriétés physicochimiques, que des applications habituelles en analyse par MALDI.

En outre, les différentes valeurs de taux de fragmentations ont permis d'établir une classification relative et de rendre compte de leurs diverses propensions à induire des

fragmentations en mode ISD. Cette classification, dans l'ordre décroissant des taux de fragmentations, correspond à la séquence suivante :

DAN>CHCA>CNA>DIT>HABA>DCTB>IAA.

Des classements similaires ont été proposés dans la littérature<sup>[132,137,152]</sup> notamment en fonction de la propension à induire des processus de fragmentation en source est corrélée à certaines propriétés chimiques des matrices. Notre classement n'a pas pu être organisé selon ce même critère.

Le paramètre donnant un indice sur la facilité à désorber des ions est le coefficient d'absorption à la longueur d'onde du laser des molécules de matrices utilisées. Celui-ci se trouve être majeur pour la matrice CHCA, qui produit aisément des ions à basse puissance laser, alors que la matrice DHB n'en produit presque pas. La matrice CHCA produit également des fragments, alors que la matrice DHB, dont le coefficient d'absorption est trois fois moindre, n'offre pas les mêmes résultats.

Les mécanismes évoqués dans la littérature, permettant d'expliquer une partie des fragmentations ISD, pour les peptides<sup>[152]</sup>, les oligosaccharides<sup>[35]</sup> ou les benzyropyridiniums<sup>[137]</sup>, font appel à des mécanismes impulsés par des transferts d'hydrogène radicalaires, ou aussi à un processus de décomposition thermique pour les benzyropyridiniums. Certaines fragmentations en source pour ces molécules ne sont pas issues de processus radicalaire et il est en ce cas proposé un mécanisme de fragmentation par collision car les ions fragments obtenus sont de même nature que ceux obtenus par des expériences de collision à basse énergie<sup>[154]</sup>.

Dans notre cas, il semble impossible d'appliquer les mêmes mécanismes : nos analytes ne se fragmentent pas lorsqu'ils reçoivent un électron supplémentaire et est observé, au contraire, des espèces moléculaires intactes ayant capté un électron. Bien que quelques ions fragments possèdent un électron supplémentaire, il semblerait que cela soit plutôt dû à une capacité à contenir un électron supplémentaire, plutôt que la cause de la fragmentation. Cette capacité serait liée aux conditions de préparation de l'échantillon (nature du cation et du support), comme observé à plusieurs reprises avec des espèces moléculaires intactes ayant un électron supplémentaire, preuve de sa stabilité en phase gazeuse. Le fort taux de fragmentation et la ressemblance entre les spectres obtenus par des expériences de collision à haute énergie, laisse penser que le processus de fragmentation met en jeu une très grande quantité d'énergie. Cet état ne peut pas être atteint par de simples collisions avec les molécules du panache.

La facilité des matrices à transférer des hydrogènes radicalaires<sup>[138]</sup>, qui dicte l'ordre des matrices dans les classifications concernant la fragmentation en source des molécules organiques, ne va pas dans le même sens que celle observée au cours de nos expériences.

Il semblerait que seul un excès d'énergie interne soit en cause lors des fragmentations observées et que cela soit à relier à la température des agrégats. Par exemple, dans le cas de la matrice DHB, pour laquelle il a été calculé que les agrégats atteignent une température de 850 K<sup>[150]</sup>, la quantité de fragments en source observés lors de nos expériences est à l'état de traces. En revanche, les agrégats formés par la matrice CHCA lors de la désorption, dont la température calculée est de 3265 K<sup>[155]</sup>, permettent l'observation d'une large fragmentation ISD de nos POMs.

Cette corrélation se faisant sur deux exemples seulement, nous aurions besoin de données supplémentaires pour justifier le lien entre la température des agrégats et la classification relative établie grâce à nos observations expérimentales.

Concernant le second aspect : processus responsables de l'ionisation des composés POMc8, POMc10 et POMc12 sous forme d'adduits mono-chargés.

Les polyanions ont toujours été détectés sous forme d'ions mono-chargés, ces observations ayant mis en évidence que de nombreux cations différents peuvent mener à la formation de l'espèce ionisée intacte. Nous avons pu exploiter le fait qu'à l'issue du processus d'ionisation par MALDI, les polyanions ne se retrouvent pas en phase gazeuse avec leurs contre-ions initiaux.

En effet, l'analyse par MALDI d'espèces *portant* plusieurs charges en solution est déjà mentionnée dans la littérature<sup>[156]</sup>. Cependant, ces espèces se retrouvent en phase gazeuse avec tous leurs contre-ions présents en phase solide, ionisés et sous forme d'adduit cationique. La capacité des POMs d'être séparés en phase gazeuse des contre-ions avec lesquels ils sont appariés lorsqu'ils sont cristallisés purs, ou que l'on retrouve lors des analyses par spectrométrie de masse utilisant la source ESI, est l'étape clef de nos observations.

La mise en présence de deux cations différents dans le mélange échantillon contenant le POM étudié a permis d'observer une compétition pour l'attachement des cations sur le POM. Dans la plupart des cas, un seul cation se retrouvait attaché au POMc12, ce cation unique étant trouvé à la fois dans les espèces moléculaires intactes et dans les ions fragments. Cela a permis d'établir une classification relative allant du cation à plus forte affinité pour le POMc12,

jusqu'aux cations ayant peu d'affinité et qui ne permettent pas d'obtenir l'espèce moléculaire intacte unique, logiquement attendu par manque de sensibilité.

L'ordre de cette classification relative déterminée expérimentalement est :  $\text{Fe}^{3+} > \text{Al}^{3+} > \text{Li}^+ \geq \text{Ga}^{3+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > [\text{Mn}^{2+} \approx \text{Mg}^{2+}] > [\text{Na}^+ \approx \text{K}^+]$ .

Cette classification relative et expérimentale se complète par quelques exceptions, montrant parfois la présence d'adduits mixtes composés de deux cations. Cet ordre préférentiel d'attachement peut être complété par la famille des ammoniums<sup>[113]</sup>, qui s'observent lors de l'ionisation par ESI, mais qui n'ont jamais été détectés lors de l'ionisation MALDI sous forme d'adduits<sup>3</sup>.

Aucune tendance véritablement rationnelle n'a pu être établie pour justifier ce classement, bien que la taille et la force de liaison des cations avec la cage oxométallique ait été évoquée.

Afin de comprendre les processus responsables d'ionisation de nos analytes, les deux principaux modèles expliquant la formation des ions, à savoir le modèle du Lucky-Survivor<sup>[72]</sup> et le mécanisme d'ionisation secondaire (déjà évoqués au chapitre 1.1.3) sont pris en référence.

- Le premier modèle<sup>[72]</sup> avance l'hypothèse selon laquelle les analytes sont incorporés dans les cristaux de matrice avec leurs charges respectives préservées de la solution<sup>[48]</sup>. Le POMc12 est un acide relativement fort<sup>[103]</sup> et il porte entre 3 et 4 charges en solution. Ainsi, selon le modèle *Lucky Survivor*, nous devrions obtenir aisément des ions multichargés lors de nos expériences MALDI. De plus, des études en MALDI indiquent la détection d'ions multichargés de peptide, et ce même pour des peptides de petite taille, lorsqu'il est possible de les multi-protonner comme pour la bradykinine<sup>[157]</sup> dont le poids moléculaire est de 1059 Da. On s'attendrait donc à observer de tels ions multichargés puisque la préservation de l'état de charge de l'analyte en solution est considéré parmi les possibilités d'ionisation (les POMs étant multichargés en solution).

---

<sup>3</sup> Pourtant une étude parmi les seules études trouvées dans la littérature mentionne les ammoniums comme adduit possible lors d'une analyse par MALDI

Néanmoins, lors de l'analyse des POMs, seuls des ions mono-chargés sont observés. Nous supposons alors que le POM est partiellement neutralisé dans les cristaux de matrice, car il est entouré de cations. Selon ce modèle, la nature de ces cations pourrait être identique à celle avec laquelle le POM est solubilisé en phase liquide ; or, elle penche normalement vers les alcalins ou les ammoniums, au vu des procédés utilisés par nos collaborateurs qui les synthétisent. Ces cations adduits au POM sont d'ailleurs observés lors des analyses utilisant la source d'ionisation ESI, donc en désolvant des ions présents en phase liquide.

Avec ce modèle, il est également difficile de proposer le mécanisme de formation d'espèces qui ont capté des électrons, dont l'abondance dépend notamment du cation inclus dans l'ion formé. En guise d'exemple, citons l'espèce moléculaire intacte  $[\text{POM}+4\text{Li}+\text{e}]^-$  ou encore  $[\text{POM}+2\text{Fe}+\text{Cl}+2\text{e}]^-$ , ne pouvant pas être préformés dans les cristaux de matrice.

- Selon le second modèle<sup>[76]</sup>, basé sur l'ionisation première des molécules de matrice qui réagissent ensuite avec les analytes pour leur transférer des protons, ou des cations divers (dans le cas présent), il faut envisager des réactions intermoléculaires. En effet, la formation des agrégats est prise en compte, mais a pour but principal de permettre la désorption de la matière, les réactions d'ionisations de l'analyte s'effectuant lors des collisions des molécules, ou des agrégats, dans le panache et sous contrôle thermodynamique.

Pour appliquer ce second modèle à notre cas d'analyse de polyanions, nous considérerons que le POMc12 est initialement produit en phase gazeuse, à la suite de la désolvatation de l'agrégat, sous forme neutre avec des contre-ions, le résultat final étant la formation d'un ion intact associé avec les cations pour lesquels il a le plus d'affinité en phase gazeuse. Dans notre cas, il faudrait donc que les molécules de matrices réagissent avec des sels de manière à former en premier lieu des ions de matrices anionisés ou cationisés.

Une réaction ion-molécule, selon ce modèle, a lieu entre le POM et les ions de matrices. La production d'ion intact  $[\text{POM}+\text{ncation}]^-$  est alors possible. L'exothermicité de la réaction est responsable de l'excès d'énergie interne et de la possible fragmentation de l'ion ainsi formé.

L'ordre d'affinité pour les cations reflète le caractère plus ou moins favorable de ce type de réactions, il devrait être possible d'observer une corrélation directe entre l'affinité pour le cation et le taux de fragmentation. Or, ce n'est pas le cas puisque le taux de fragmentation en source varie en fonction de la nature du cation, et ce indépendamment de l'ordre d'affinité cationique du POM.

Enfin, d'après ce second modèle, toute réaction favorable thermodynamiquement pourrait survenir, étant donné que, lors de la mise en mélange du POM avec divers cations, la production d'ion intact contenant un, ou plusieurs, cation se produit. Si la réaction d'appariement entre le POM et différents cations a lieu, cela signifie que toutes ces réactions sont thermodynamiquement favorables. Dans ce cas, aussi, lors du mélange de différents cations, une forte composante statistique de production des différentes espèces moléculaires intactes, tenant compte de la proportion de chaque cation présent dans le mélange échantillon, devrait être observée. Or, nos observations invitent à d'autres conclusions, puisque le mélange de deux cations différents, même lorsque 10 fois plus d'un cation est introduit, mène à la production d'un unique type d'espèce moléculaire intacte.

Ces deux modèles semblent donc rencontrer rapidement des limites pour pouvoir expliquer la formation des ions moléculaire contenant nos polyanions, tant pour la formation de l'espèce moléculaire intacte que pour la formation des ions fragments survenant lors des processus de désorption/ionisation.

Nous proposons alors que la formation de nos espèces moléculaires intactes se réalise par un procédé uniquement thermique. Ce modèle emprunte des aspects aux deux références précédentes. Ses mécanismes sont basés sur l'excitation thermique des molécules de matrices et toutes les réactions interviennent dans les agrégats.

Une version de ce modèle a déjà été proposée pour l'ionisation par cationisation de peptides utilisant un chauffage de l'échantillon, en utilisant des tirs laser du côté opposé à l'emplacement de l'échantillon sur la plaque de dépôt<sup>[65, 67]</sup>. Ainsi, seul l'effet thermique du tir laser était pris en compte. Les ions observés lors de ce type d'analyse appelée Matrix Assisted Ionisation<sup>[66]</sup>, étaient des peptides cationisés.

Nous proposons de considérer à présent l'agrégat comme une solution de molécules de matrice neutres, au sein de laquelle, dans notre cas, sont solubilisés les sels (donc les cations avec leurs contre-ions), les molécules de matrice ionisées et nos analytes (les POMs). Les sels présents dans l'agrégat sont très majoritairement sous forme neutres (cations appariés avec les anions). Il a été montré que l'agrégat ne peut être considéré comme une solution liquide au sein de laquelle des sels pourraient être largement dissociés car la constante diélectrique des matrices dans l'agrégat est faible et n'autorise pas leurs dissociations<sup>[47]</sup>.

L'agrégat formé dans le panache n'a pas besoin de porter une charge nette globale, ni même de contenir de manière préformée l'espèce moléculaire intacte finale (en contradiction au postulat du premier modèle). Le rôle de la matrice est ici uniquement de participer à la formation d'un agrégat par solvatation des sels et de l'analyte, dont l'énergie interne est importante. L'agrégat, comme le fait la gouttelette en ESI, perd des molécules, ou un ensemble de molécules, qu'elles soient chargées ou neutres. Il s'agit dans notre cas de molécules de matrice neutres ou ionisées, ou encore de sels. Ces départs seraient impulsés par la grande quantité d'énergie disponible provenant de l'absorption de la longueur d'onde du laser par la matrice. Les molécules ou les sels qui quittent l'agrégat globalement neutre sont pour la plupart neutres également malgré la quantité d'énergie importante qui autoriserait la production d'ions en phase gazeuse.

Dans ce modèle, toutes les réactions sont endothermiques donnant lieu à une relaxation en énergie. L'agrégat perd donc successivement les molécules qui induisent les réactions les moins défavorables thermodynamiquement, jusqu'à la consommation totale du surplus d'énergie interne de l'agrégat<sup>[46]</sup>. L'existence de ces agrégats a été démontrée<sup>[93]</sup> car tous n'atteignent pas leur désolvatation complète. En effet une expérience prouve que lorsque le bruit de fond est sélectionné, dont les  $m/z$  sont au-delà du pic moléculaire d'une protéine, la protéine en question se retrouve présente dans ce bruit de fond sous la forme d'agrégats

Au cours de ce processus, dans notre cas les cations tels que les ammoniums, ont une plus faible affinité en phase gazeuse pour l'espèce polyanionique que les cations multivalents et les cations monovalents de plus petite taille.

Lorsqu'on utilise une matrice qui absorbe fortement la longueur d'onde du laser et qui forme des agrégats capables de contenir cette énergie, la désolvatation, lorsqu'elle est complète, peut laisser une grande quantité d'énergie aux dernières molécules restantes. Il est alors possible d'observer la fragmentation des espèces moléculaires intactes qui dispensent cette énergie interne. Ce mécanisme de formation des ions permet d'expliquer qu'au cours de nos expériences, un seul cation se retrouve présent à la fois dans l'espèce moléculaire intacte et dans les fragments. La taille initiale des agrégats étant très importante<sup>[44]</sup>, les POMs peuvent donc être en contact avec les nombreux cations introduits et ainsi produire des espèces moléculaires intactes représentatives du mélange échantillon.

La seule production d'ions mono-chargés à la fin du processus s'explique d'abord par le fait qu'en MALDI les agrégats, comme les molécules isolées, sont très majoritairement neutres. On peut aussi suggérer que lors du processus de désintégration de l'agrégat, si plusieurs

charges apparaissent, elles vont provoquer la scission de l'agrégat en deux agrégats de taille plus modeste et de moindre charge.

Le modèle de formation des espèces moléculaires intactes des polyoxométallates par MALDI ici proposé peut également s'appliquer à la formation des espèces moléculaires intactes des molécules organiques tels que les peptides toujours considérés dans les modèles d'ionisation. Il semble aussi que les réactions avec la matrice, notamment les réactions provoquant la fragmentation, soient différentes en fonction des molécules considérées. Néanmoins, quelles que soient les réactions considérées, nos résultats suggèrent que toutes les réactions surviennent à l'intérieur des agrégats, donnant aux molécules incluses en son sein la possibilité d'interagir de multiples fois.

## Annexes – niveau 1

### Annexe 1 : Source ESI

En ESI (ElectroSpray Ionisation), l'échantillon passe à travers un capillaire électrisé (généralement 2-5 kV) qui va former à son extrémité des gouttelettes chargées de taille relativement importante. Cette haute tension produit un champ électrique entre le capillaire (anode) et la contre-électrode (cathode) située à l'entrée de l'instrument (Schéma 9). Lorsque la solution sort du capillaire, le champ induit une accumulation de charges sur la surface du liquide à la pointe du capillaire résultant en la formation d'un cône de Taylor, suivi par une dispersion en aérosol contenant des gouttelettes hautement chargées. L'évaporation du solvant dans la zone de dé-solvatation conduit à une réduction de la taille des gouttelettes, jusqu'à ce qu'elles atteignent la limite de Rayleigh, c'est-à-dire lorsque la force de répulsion coulombienne (due à la répulsion des charges à proximité les unes des autres) induisent l'explosion coulombienne de la gouttelette. La goutte se scinde alors en plusieurs gouttelettes de plus petit rayon. Ce processus se répète jusqu'à obtenir des ions solvatés (une molécule d'analyte entourée de solvant). Enfin, une fois l'ensemble du solvant évaporé l'analyte est sous forme ionique multichargée et peut être envoyé vers l'analyseur.

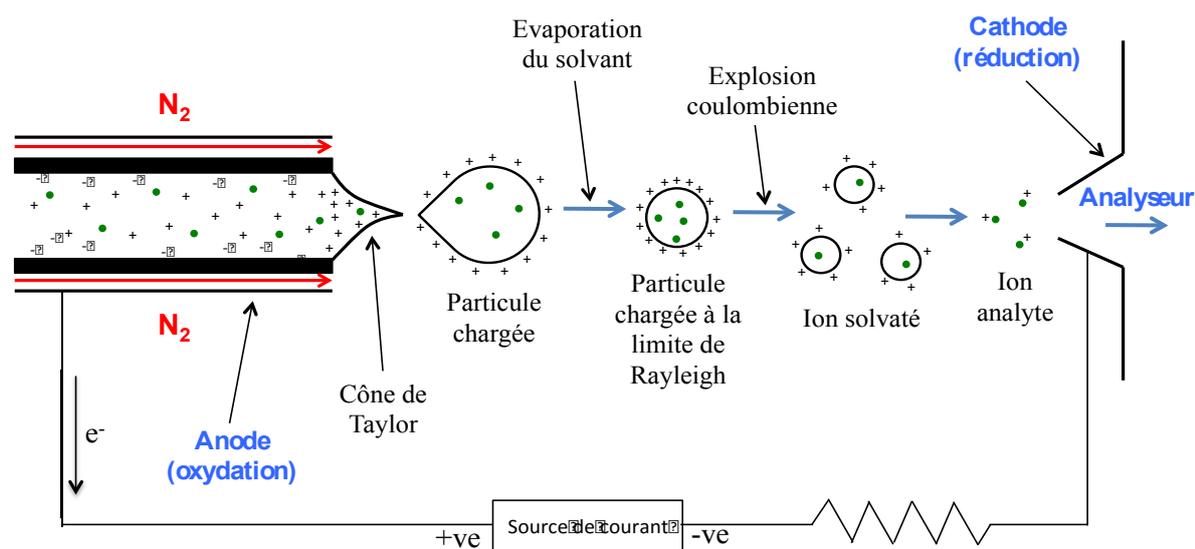


Figure 55 : Schéma du principe d'une source ESI opérée en mode positif (le mode négatif étant exactement l'inverse, c'est-à-dire que l'anode devient la cathode, les charges « + » sont remplacées par des charges « - »).

La grande quantité de charge introduite par le mécanisme électrochimique provoque la formation d'ions bien souvent multichargés dès lors qu'on utilise des molécules de taille suffisamment importante (typiquement des peptides de plus de

Il est important de noter que le mécanisme de formation des ions en phase gazeuse dans une source ESI n'est pas entièrement connu bien que mieux décrit que le MALDI. Deux modèles différents proposent une explication : celui qui est expliqué précédemment et repose sur des explosions coulombiennes consécutives est celui de Dole et tandis qu'Iribarne et Thomson ont postulé que lorsque les gouttelettes ont une densité de charge suffisante, elles ne subissent plus de fission mais émettent directement des ions en phase gazeuse.

## **Annexe 2 : Détermination de la composition des ions**

La détermination de la composition des espèces formées en MALDI, dont le massif est étendu et complexe, fut réalisée par superposition des spectres de masse obtenus avec des spectres théoriques modélisés grâce au logiciel Xcalibur (Thermo Scientific). La Figure 56 montre qu'il est facile d'annoter par comparaison des pics d'un ion contenant un faible nombre de tungstènes, mais qu'au-delà de 8 tungstènes le caractère gaussien du signal obtenu rend cette attribution délicate. Par exemple sur la Figure 56 on s'aperçoit qu'il est évident, de par l'allure du massif isotopique, de superposer les spectres de l'ion détecté à  $m/z$  1321,6 et de sa modélisation théorique. En effet l'abondance relative des différents pics de ce signal diffère beaucoup. En revanche si l'on considère le signal d'un ion contenant dix tungstène (à gauche sur la figure), il est moins évident de correctement superposer le profil isotopique modélisé, et donc l'attribution d'une formule adéquate est plus subjective.

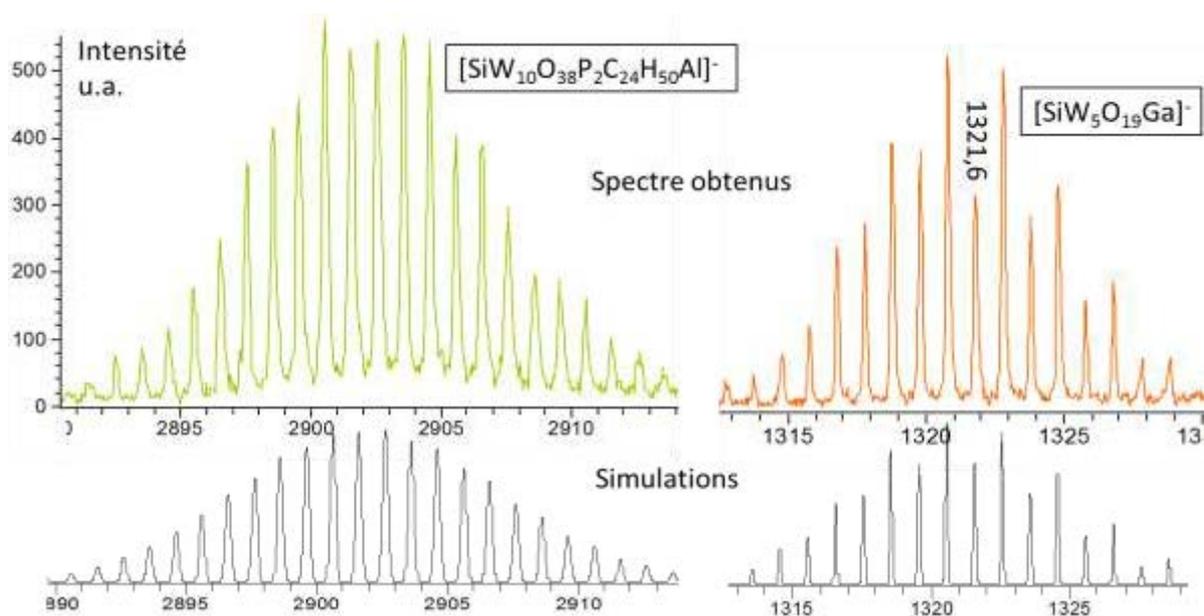


Figure 56 : Spectre MALDI présentant deux ions détectés contenant 10 ou 5 tungstènes accompagnés des profils isotopiques théoriques enregistrés à forte puissance laser.

### Annexe 3 : procédure de nettoyage des plaques de dépôt MALDI

La procédure de nettoyage des plaques en acier inoxydable consiste, en présence d'un mélange eau/MeCN, à d'abord frotter doucement la plaque avec des papiers-chiffon certifiés non abrasif. On immerge ensuite les plaques dans différents solvants dans une cuve de verre pour leur faire subir des périodes de 10 minutes d'ultra-sonication. Les solvants successifs utilisés à cette fin sont :

- eau millipore
- eau millipore + MeCN
- eau millipore + MeCN + 10% d'acide formique
- eau millipore + MeCN + 10% d'hydroxyde de sodium (10M)
- Hexane
- Ethanol (95%)
- THF
- MeCN

On laisse la plaque sécher à l'air libre et il est utile de la laisser reposer une journée avant de l'utiliser. En effet il a été observé que lorsqu'on utilise la plaque immédiatement après son nettoyage, les dépôts réalisés s'étalent à sa surface très facilement. On a ainsi du mal à faire en sorte que la goutte déposée reste dans son puits. On avance comme explication que la plaque, séchée à la suite du dernier lavage de solvant organique, a sa surface couverte de molécules de solvant organique aidant la goutte à s'étaler de trop. On peut imaginer aussi que même s'il n'y a pas de couche de solvant organique, la plaque étant très propre permet au solvant de s'étendre. On suggère que le fait de laisser la plaque reposer un jour permet à l'humidité de l'air de déposer une couche d'eau à la surface de l'inox et permet ensuite aux dépôts de ne pas s'étaler de trop.

La procédure de nettoyage des plaques *PAC* (Prespoted AnchorChip, plaque en polymère vendue par Bruker et recouvertes de dépôts de matrice CHCA) diffère légèrement. Il faut éviter le contact prolongé de cette plaque avec le solvant THF qui la dégrade. On peut toutefois imbiber un papier-chiffon de THF et succinctement passer à sa surface. Toutes les autres étapes sont conservées.

Les plaques de verre, polystyrène, polytétrafluoroéthylène, polyoxométhylène et d'aluminium ont été nettoyées en les plongeant dans des bains d'eau, d'acétonitrile et de méthanol sous sonication. Un simple rinçage à l'hexane a été réalisé avec un papier chiffon. Les bains acide et de basique ont été évités pour toutes les plaques.

## **Annexe - projet parallèle mené au cours du doctorat**

Au cours des trois années de doctorat passées à l'UPMC, j'ai pu participer à des projets requérant l'apport de la spectrométrie de masse pour réaliser des analyses. Bien souvent il s'est agi de participations succinctes dont aucune trace n'est présentée dans cette thèse. Un travail est reporté ici, en annexe de la thèse. Il concerne des analyses de composés biologiques dont l'intérêt scientifique dans le monde de la recherche est important.

Ce projet s'est développé au sein d'une collaboration avec le groupe CD4+ T LYMPHOCYTE AND ANTI-TUMOR RESPONSE dirigé par le Pr. Olivier Lantz dont les laboratoires se situent au sein de l'institut Curie. Les analyses réalisées pour ce groupe de recherches s'inscrivaient dans la thématique de la compréhension de l'activation de cellules du système immunitaire. Les composés inclus dans les échantillons considérés, dont l'activité avait été révélée par des tests biologiques, étaient absolument inconnus.

Ce projet m'a permis de mettre en pratique une utilisation différente du MALDI et d'utiliser d'autres types d'instruments. L'organisation du travail était également radicalement différente puisque la quantité d'échantillons disponibles était très limitée. En effet lorsqu'on travaille avec des produits issus de synthèses chimiques, la contrainte de la quantité de matière n'existe pas lorsqu'on les caractérise par spectrométrie de masse. Quand bien même on ne dispose que de quelques milligrammes cela suffit amplement à répéter des dizaines d'analyses en spectrométrie de masse. En revanche les échantillons biologiques contiennent bien moins de composés d'intérêt. La stabilité des échantillons est également bien différente, les échantillons biologiques se dégradant bien plus rapidement que la plupart des molécules de synthèse.

### **Analyse d'échantillons activant les cellules MAIT**

Les Lymphocytes T invariants associés aux muqueuses, MAIT (de l'anglais : mucosal-associated invariant T), sont des cellules présentes dans l'intestin qui sont activées par des cellules infectées ou par des bactéries. Elles jouent un rôle important dans notre système immunitaire et leurs mécanismes d'activation font l'objet des recherches du groupe du Pr. Lantz. Dans ce cadre, des E. Coli, ont été testés biologiquement de manière à déterminer quelles cultures provoquaient l'activation des MAIT. Les solutions qui contenaient les E. Coli furent ensuite broyées ou lysées afin d'extraire le contenu des bactéries et faire passer en solution leur contenu.

Une première étape de fractionnement de l'échantillon, par chromatographie liquide, permet de subdiviser chaque échantillon en plusieurs parties contenant un nombre d'espèces plus restreint. L'utilisation de ces fractions fut alors testée biologiquement de manière à déterminer dans laquelle se retrouvait le composé actif.

Des échantillons qui, soit déclenchaient l'activation, soit ne provoquaient aucune réaction, ont été fournis à des laboratoires d'analyse, dont le nôtre, pour identifier les espèces chimiques responsables de l'activation. Des analyses réalisées sur un spectromètre MALDI-TOF furent réalisées par un autre laboratoire, et produisirent les premiers spectres de masses. La comparaison des spectres des échantillons actifs et inactifs permit de se focaliser sur un nombre restreint d'ions alors que ces échantillons contenaient une variété d'espèces chimiques très importante.

Il nous fut alors demandé de caractériser ces espèces sélectionnées. Or le seul appareil utilisant la source MALDI qui est à notre disposition ne permet pas d'opérer des expériences permettant la détermination complète de structures inconnues. Il est nécessaire pour arriver à cet objectif de pouvoir réaliser des expériences de fragmentations, méthode qui permet d'obtenir des séquences de la molécule initiale dont il est plus aisé de déterminer la structure. L'analyse à ultra haute résolution est très utile afin de déterminer la composition des molécules. Aussi, on tenta les analyses avec deux autres appareils aux sources d'ionisation différentes du MALDI, qui permirent de détecter un ion d'intérêt déjà révélé dans les analyses précédemment effectuées par MALDI. Il s'agit des appareils LTQ-Orbitrap et SolarX-FT-ICR, qui ont des sources d'ionisation électrospray (ESI : détail en Annexe 1).

L'inconvénient de la source ESI comparée au MALDI, est qu'elle consomme en continu l'échantillon, donc le temps passé à régler les paramètres instrumentaux se fait au détriment du temps d'analyse de l'échantillon dont la quantité vient à manquer.

Les analyses ont été réalisées sur le SolarX-FT-ICR, appareil à ultra haute résolution, qui permet de déterminer la composition élémentaire de la molécule visée, une fois la masse exacte déterminée. Pour obtenir une masse dont la justesse et la précision sont importantes, il est impératif de recourir à un étalonnage interne.

L'étalonnage interne consista à ajouter du mélange étalon à l'échantillon. Cette étape est périlleuse. En effet, il ne faut pas ajouter trop d'étalon à l'échantillon car les espèces ioniques

vivent une concurrence pour l'ionisation au cours du processus ESI. Ainsi, ajouter une trop grande quantité d'étalon peut complètement annihiler le signal de l'échantillon. On ne peut toutefois se permettre de commencer par l'ajout d'une faible quantité d'étalon pour l'augmenter progressivement car cela provoque la consommation de l'échantillon que l'on possède en quantité très limitée.

Cette opération a été menée en mettant d'abord au point un mélange étalon dont la teneur permit d'obtenir des pics d'intensité comparable à l'espèce visée. On dopa ensuite l'échantillon avec les étalons de manière à ce qu'il contienne les étalons aux concentrations établies lors des essais. L'étalonnage, réalisé à partir de 5 points, permit d'obtenir une courbe d'étalonnage très bonne dont les masses de tous les étalons étaient à moins de 0,04 ppm de leur masse théorique. Cela nous permit de mesurer la masse de l'ion inconnu avec une grande confiance. La masse trouvée pour l'ion d'intérêt était de 572,114786.

Afin de déterminer quelle sont les formules possibles pour l'ion, la première hypothèse a été de considérer cet ion comme un anion non radicalaire, donc à nombre pair d'électron. En effet, il est très peu probable d'obtenir un ion radicalaire stable issu d'un milieu biologique. Nous avons aussi considéré la mesure de la hauteur du pic isotopique correspondant à (M-H)+1, qui nous permet de déterminer que l'espèce considérée contient environ 17 carbones.

En effet l'abondance du  $^{13}\text{C}$  est de 1,1%, la hauteur du signal à 573,11 correspond environ à 19% de la hauteur du pic mono-isotopique.

Il est alors possible d'appliquer la formule :  $\frac{\text{hauteur du pic à } (M-H)+1}{\text{Abondance du carbone } 13} = \text{nombre de carbones dans la molécule.}$

L'utilisation d'un logiciel, auquel on renseigne la masse mesurée et l'écart accepté (placé ici à 2 ppm, qui correspond à une large marge de confiance au vu de l'écart constaté de 0,04 ppm sur l'étalonnage), permet instantanément d'obtenir diverses formules brutes.

Les formules proposées sont basées uniquement sur des calculs mathématiques, ainsi de nombreuses propositions peuvent être écartées sur la seule base de la logique. Aussi les formules des lignes 2, 3, 4, 5 et 8 qui présentent un nombre extravagant de carbones peuvent être immédiatement écartées.

Le choix devient restreint et la formule  $C_{19}H_{23}O_{12}N_7P$  correspond le mieux à la masse mesurée.

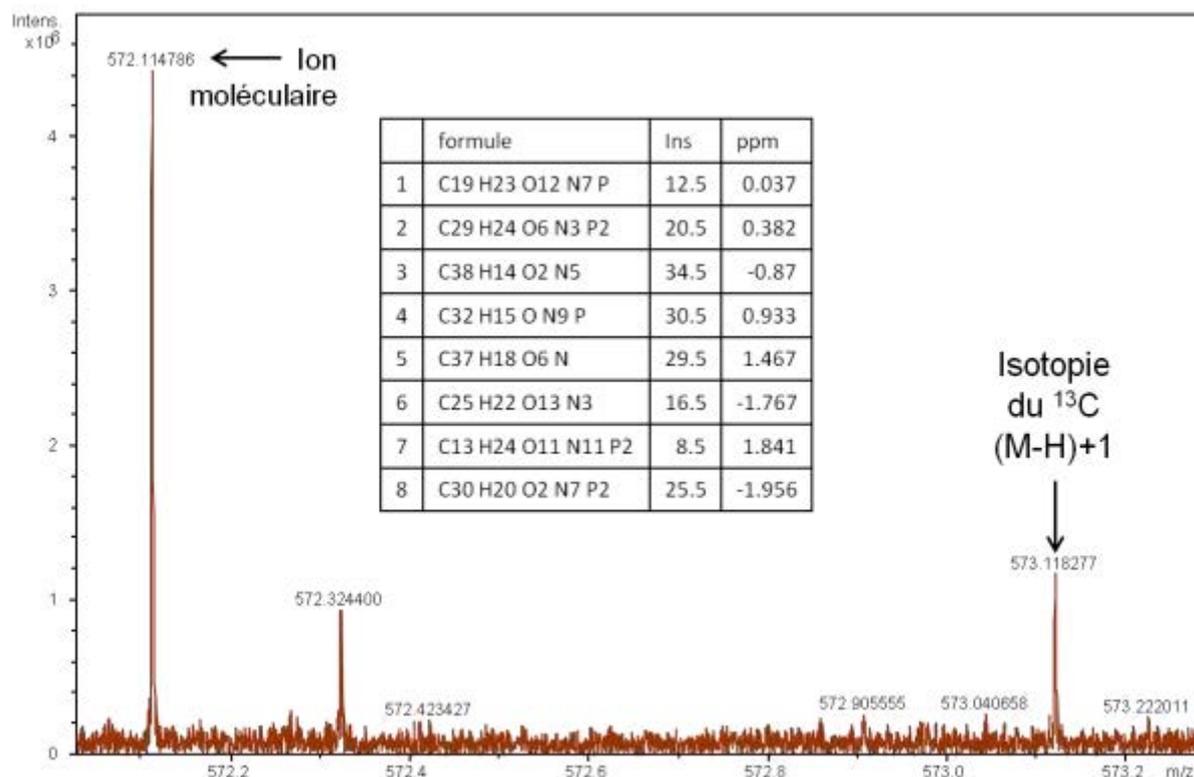


Figure 57 et Tableau 10 : Spectre de masse obtenu en ESI FT-ICR, en mode négatif. Agrandissement de la gamme de masse comportant l'ion. Tableau reportant les formules potentiellement attribuables à l'ion intact.

On fragmente ensuite l'espèce moléculaire intacte produisant un spectre MS/MS afin de déterminer la structure de la molécule. Grâce à l'ultra haute résolution on peut de nouveau attribuer une formule brute aux ions fragments obtenus, comme cela fut fait pour l'ion intact.

Cette étape d'attribution est plus aisée, puisqu'on connaît la composition de l'espèce moléculaire intacte, elle sert aussi de vérification. En effet les formules des ions fragments sont obligatoirement limitées aux éléments contenus dans l'espèce moléculaire intacte : au cas où l'attribution d'une formule d'un seul des ions fragments n'est pas possible dans la limite de la formule  $C_{19}H_{23}O_{12}N_7P$ , ion parent présumé, cela signifie que l'hypothèse initiale était erronée. (Les tableaux résumant les masses exactes des ions mesurés ainsi que les diverses proposition de formule associées à ces masses sont données à la fin de cette annexe, sur la Figure 59.

Les ions issus de la fragmentation de l'espèce moléculaire intacte, l'ion parent, ne permettent pas de déterminer la structure de la molécule.

Il fut donc nécessaire de réaliser des expériences de fragmentations consécutives, permettant de fragmenter les ions fragments observés lors de la première étape de fragmentation. Les spectres obtenus sont appelés MS<sup>3</sup>. Cette procédure permet non seulement d'obtenir des ions encore plus petits que les ions détectés en MS/MS, mais aussi d'établir la filiation des ions.

Ces opérations de fragmentations consécutives ne peuvent pas être réalisées sur l'appareil SolarX-FT-ICR, ils ont donc été enregistrés sur le LTQ-Orbitrap. On a même poursuivi les expériences de fragmentations en enregistrant des spectres MS<sup>4</sup>.

Tous ces résultats (présentés en fin de cette annexe) nous permettent d'établir un arbre de fragmentation représenté en Figure 58 menant à la détermination de la structure de l'ion parent.

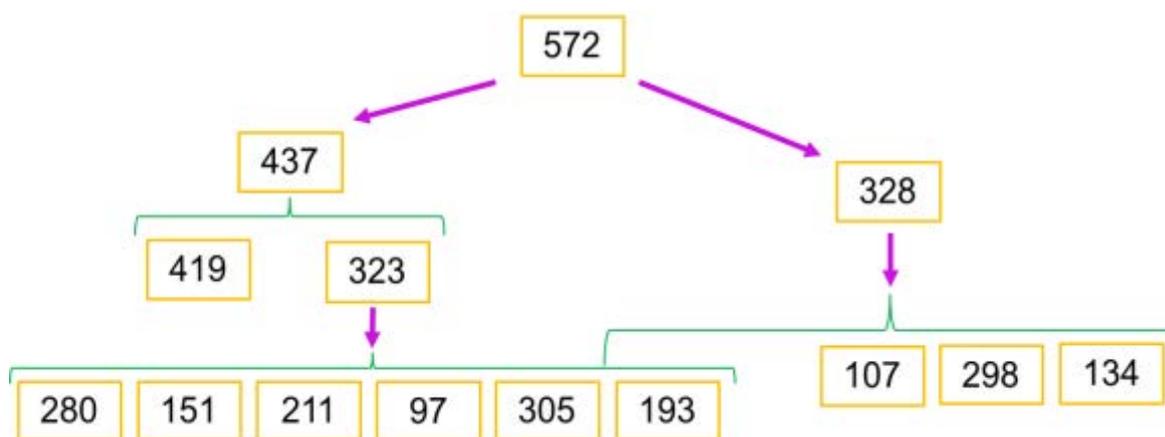


Figure 58 : Arbre de fragmentation de l'ion m/z 572 tiré des spectres de la Figure 61

A ce stade de nos analyses, la détermination de la structure de ce composé n'a pas pu être établie entièrement mais a été approché dans sa plus grande partie. On propose sur la Figure 60 une attribution de structure de tous les ions observés.

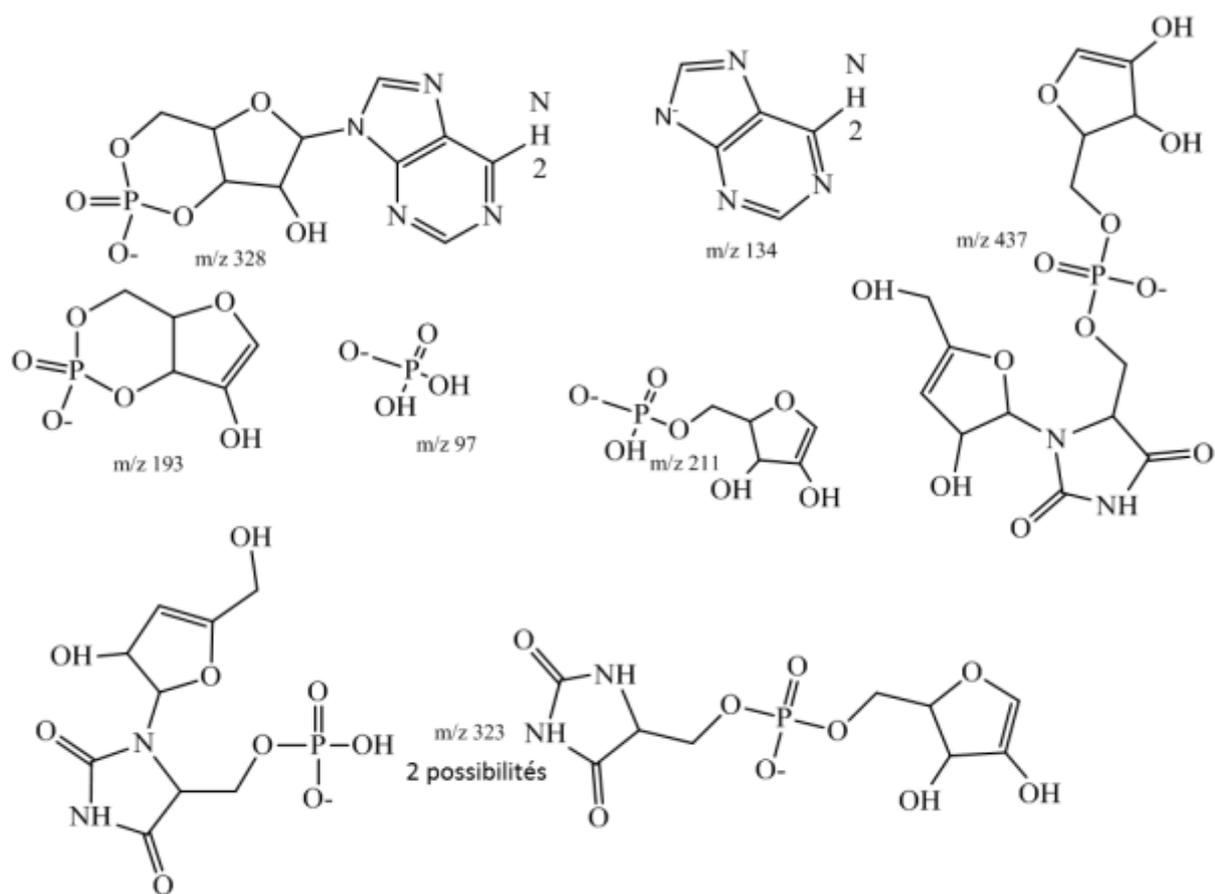


Figure 59 : proposition d'attribution de formule pour certains ions observés.

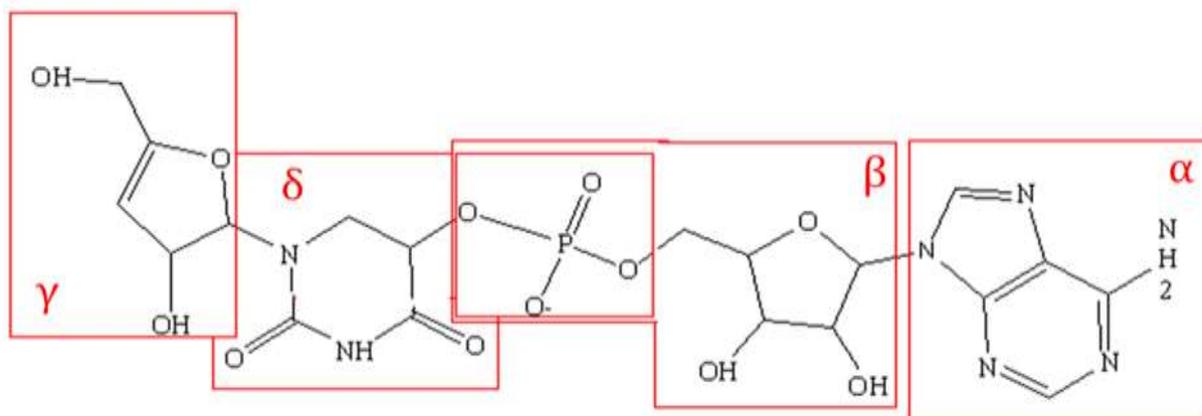


Figure 60 : Proposition de structure de l'ion  $m/z$  572.

La structure finale n'est pas certaine, nous ne sommes sûrs que des compositions élémentaires au sein des quatre parties de la Figure. Seul le phosphate central est certain puisqu'on obtient

un ion  $m/z$  97 qui ne peut être différent. La structure de chaque partie est basée sur des suppositions. La structure des groupements  $\alpha$  et  $\beta$  semble très probable car ils ressemblent à des structures classiques. En revanche les structures des deux entités  $\delta$  et  $\gamma$  sont plus incertaines. Si l'enchaînement des parties  $\alpha$ - $\beta$ -phosphate est certain, les blocs  $\delta$  et  $\gamma$  peuvent être intervertis sans que nos spectres ne puissent déterminer quelle est la forme à retenir.

Afin d'obtenir plus d'informations il aurait été nécessaire de réaliser des expériences de fragmentation supplémentaires concernant notamment les ions fragments dont les structures n'ont pas été déterminées (les ions de  $m/z$  [280, 151]). Malheureusement nous n'avions plus d'échantillon à analyser et il n'a pas été possible d'en obtenir davantage.

Il n'est pas évident que ce composé soit digne d'intérêt puisque les spécialistes du domaine l'ont écarté. En effet le groupe du Pr Lantz était étonné de la structure trouvée et jugea qu'un composé d'une telle formule n'était assurément pas celui qui provoquait l'activité des cellules MAIT. La structure proposée leur parut trop ordinaire pour être une molécule permettant de déclencher une réponse immunitaire de la part de ces cellules. Il fut envisagé un moment de synthétiser la molécule décrite mais le manque de temps et de moyens empêchèrent l'aboutissement du projet.

Au-delà de ces considérations d'intérêt biologique, il aurait été possible de mieux optimiser cette analyse en s'organisant différemment et permettant ainsi de gagner du temps d'analyse et donc de préserver une quantité d'échantillon permettant de mener des expériences supplémentaires. A titre d'exemple, sans vouloir décrire un protocole qui ne pourrait être applicable à d'autres cas, les spectres de fragmentations auraient pu être réalisés lors de la première analyse par ESI alors même que la masse exacte du composé n'était pas encore mesurée. D'ordre général il est indispensable d'organiser une feuille de route des différentes expériences à réaliser et une fois qu'elle est définie, il est pertinent de remettre en cause l'enchaînement des opérations sans prendre en compte la logique permettant d'aboutir à la structure complète. Seul le temps d'analyse doit être considéré, quel que soit l'enchaînement des opérations. Les expériences de fragmentations consécutives ont été réalisées très efficacement dans notre cas, il en manque pourtant certaines qui nous auraient aidés à finaliser la détermination de la structure.

Tableau A0	
masse exacte	raccourci d'appelation
437,057983	437
328,045706	328
323,029219	323
192,99137	193
134,047428	134
211,002528	211
305,019058	305
280,0237	280
419,049773	419
394,053628	394

Tableau A1		
328 formule	RDB	ppm
1 C10 H11 O6 N5 P	8,5	-0,5
2 C9 H15 O10 N P	3,5	3,6
3 C16 H10 O7 N	12,5	-3,6
4 C12 H6 O5 N7	13,5	4,6
5 C17 H6 O3 N5	17,5	-7,7
6 C11 H10 O9 N3	8,5	8,6
7 C5 H11 O8 N7 P	4,5	11,8
8 C15 H11 O4 N3 P	12,5	-12,7
9 C5 H10 O10 N7	4,5	-13,3
10 C4 H15 O12 N3 P	-0,5	15,9
11 C16 H7 N7 P	17,5	-16,8
12 C17 H7 O N5 P	17,5	17,4
13 C3 H15 O11 N5 P	-0,5	-18,4

Tableau A2		
211 formule	RDB	ppm
1 C5 H8 O7 P	2,5	-1,6
2 C2 O N10 P	8,5	4,8
3 C7 H3 O6 N2	7,5	6,3
4 C6 H4 O3 N4 P	7,5	-7,9

Tableau A3		
134 formule	RDB	ppm
1 C5 H4 N5	6,5	-4,0
2 C4 H8 O4 N	1,5	6,0
3 C3 H9 O N3 P	1,5	-16,3

Tableau A4		
437 formule	RDB	ppm
1 C16 H13 O11 N4	12,5	-1,4
2 C14 H18 O12 N2 P	7,5	-5,2
3 C15 H14 O8 N6 P	12,5	-8,3
4 C19 H18 O10 P	11,5	-14,4
5 C16 H14 O9 N4 P	12,5	17,4
6 C18 H9 O8 N6	17,5	21,2

Tableau A5		
323 formule	RDB	ppm
1 C9 H12 O9 N2 P	5,5	-0,3
2 C11 H7 O8 N4	10,5	4,9
3 C10 H8 O5 N6 P	10,5	-4,4
4 C16 H7 O6 N2	14,5	-7,6
5 C10 H11 O12	5,5	9,0
6 C14 H12 O7 P	9,5	-12,7
7 C15 H8 O3 N4 P	14,5	-16,8
8 C6 H7 O10 N6	6,5	17,3

Tableau A6		
280 formule	RDB	ppm
1 C8 H11 O8 N P	4,5	-1,4
2 C10 H6 O7 N3	9,5	4,5
3 C9 H7 O4 N5 P	9,5	-6,2
4 C5 H6 O9 N5	5,5	18,9

Tableau A7		
323 formule	RDB	ppm
1 C9 H12 O9 N2 P	5,5	-0,3
2 C10 H8 O5 N6 P	10,5	-4,4
3 C11 H7 O8 N4	10,5	4,9
4 C16 H7 O6 N2	14,5	-7,6
5 C10 H11 O12	5,5	9,0
6 C17 H3 O2 N6	19,5	-11,7
7 C4 H12 O11 N4 P	1,5	12,2
8 C14 H12 O7 P	9,5	-12,7
9 C17 H4 N6 P	19,5	13,8
10 C15 H8 O3 N4 P	14,5	-16,8
11 C6 H7 O10 N6	6,5	17,3
12 C16 H8 O4 N2 P	14,5	17,9

Tableau A8		
394 formule	RDB	ppm
1 C13 H17 O11 N P	6,5	0,5
2 C14 H13 O7 N5 P	11,5	-2,9
3 C15 H12 O10 N3	11,5	4,7
4 C10 H12 O12 N5	7,5	14,9
5 C7 H17 O12 N5 P	2,5	-17,8

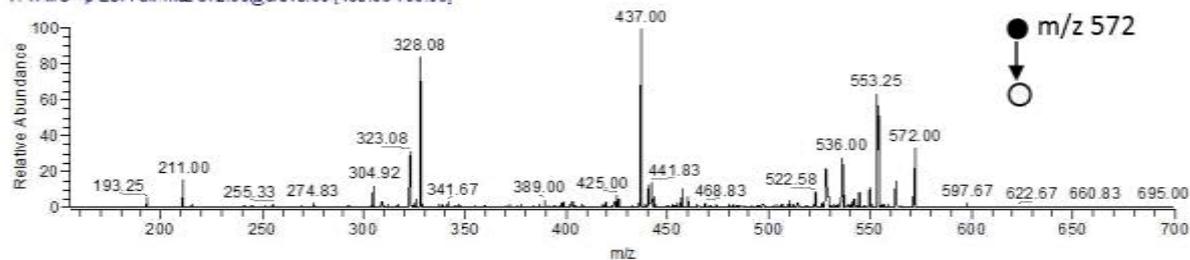
Tableau A9		
193 formule	RDB	ppm
1 C7 H O5 N2	8,5	4,2
2 C5 H6 O6 P	3,5	-4,3
3 C H2 O4 N6 P	4,5	9,6
4 C6 H2 O2 N4 P	8,5	-11,3
5 H6 O8 N2 P	-0,5	16,5
6 C12 H O3	12,5	-16,6

Figure 11 : tableaux des masses et formules possibles pour les ions observés en MS/MS de l'ion  $m/z$  572 sur le spectre de masse obtenu avec l'appareil SolarX FT-ICR. Tableau A0 : Masses exactes mesurées. Tableaux A1 à A9 : Formules possibles pour chaque masse exacte mesurée avec un écart maximum accepté de 20 ppm. Renseignement du nombre d'insaturations (RDB) pour chaque formule proposée.

Les spectres présentés dans la suite ont été enregistrés sur le LTQ-Orbitrap. Ils rassemblent les expériences de fragmentations séquentielles

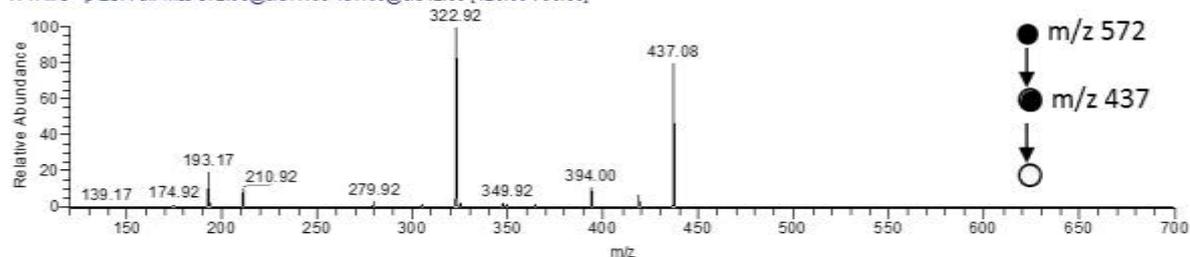
Jean Curie\_1 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 8.66E1

T: ITMS - p ESI Full ms2 572.00@cid13.00 [155.00-700.00]



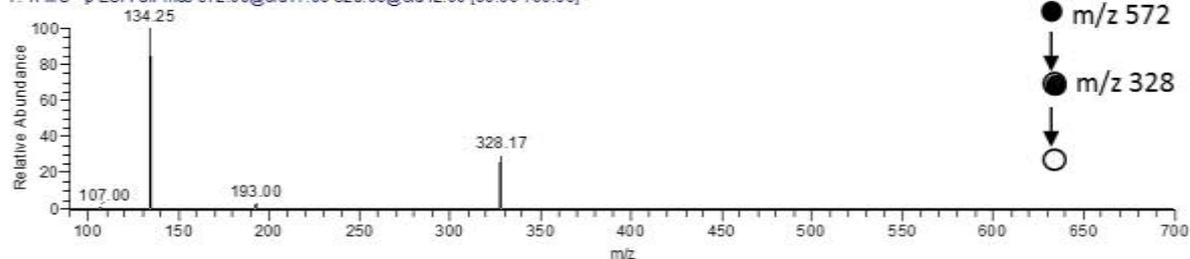
jean curie\_2 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.87E1

T: ITMS - p ESI Full ms3 572.00@cid17.00 437.00@cid12.00 [120.00-700.00]



jean curie\_328 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 2.73E1

T: ITMS - p ESI Full ms3 572.00@cid17.00 328.00@cid12.00 [90.00-700.00]



jean curie\_323 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 6.32

T: ITMS - p ESI Full ms4 572.00@cid17.00 437.00@cid16.00 323.00@cid14.00 [85.00-700.00]

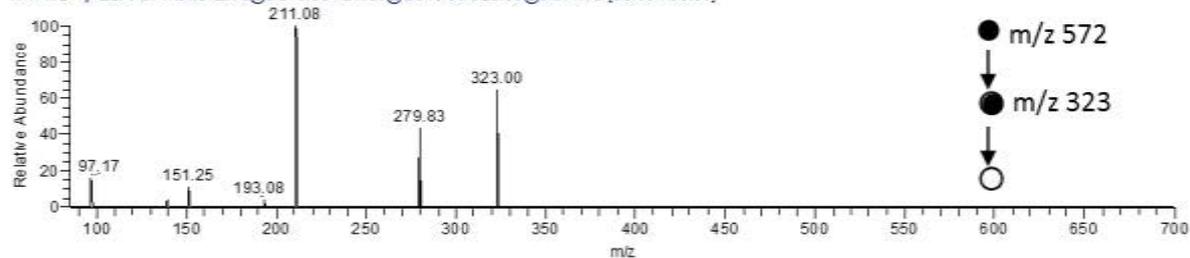


Figure 61 : Spectres ESI et spectres de fragmentation séquentielle de l'ion  $m/z$  572

Les spectres suivants ont porté sur la détermination de la nature de l'ion  $m/z$  553 qui a été identifié comme une pollution, fragment ne provenant pas de l'ion 572,11 mais pouvant venir de l'ion 572,32 observé sur le FT-ICR, sélectionné en même temps que l'ion 572,11 lors des expériences menées sur le LTQ-Orbirap.

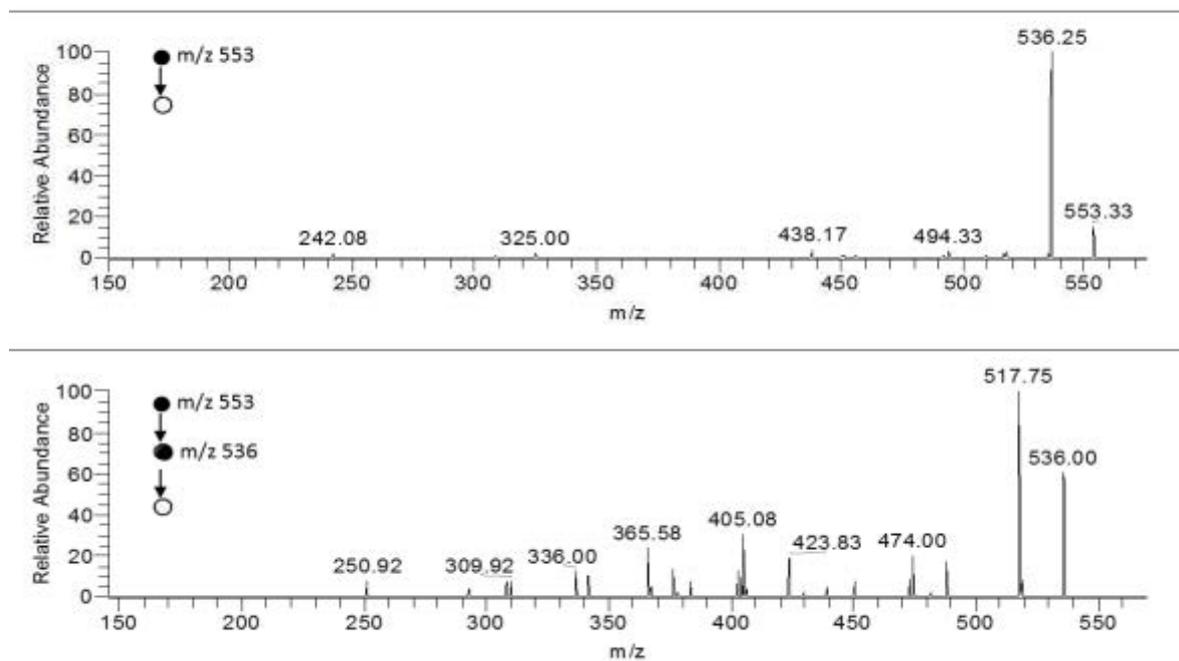


Figure 62 : Spectres ESI et spectres de fragmentation séquentielle d'un polluant présumé de l'ion  $m/z$  572

## Table des abréviations

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

LDI : Laser Desorption/Ionization

ESI : ElectroSpray Ionization

TOF : Time Of Flight

ISD : In Source Decay

PSD : Post Source Decay

LIFT : Appellation du constructeur Bruker, méthode de fragmentation mettant en jeu la fragmentation métastable des

POM/POMs : Polyoxométallate(s)

POMc12 : Polyoxométallate de formule  $[\text{SiW}_{10}\text{O}_{38}\text{P}_2\text{C}_{24}\text{H}_{50}]^{4-}$  dont la structure est représentée en Figure 14

POMv : Polyoxométallate de formule  $[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$  dont la structure est représentée en Figure 15

CNA : 9-cyanoanthracène, matrice représentée dans le Tableau 4

CHCA :  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, matrice représentée dans le Tableau 4

DCTB : , matrice représentée dans le Tableau 4

DHB : Dihydroxybenzoic acid, matrice représentée dans le Tableau 4

SA : Sinapic acid, matrice représentée dans le Tableau 4

SDS : Sodium dodécylsulfate, tensioactif représenté dans le Tableau 4

PAC : PreSpotted Anchorchip, plaque pour le dépôt des échantillons en polymère électriquement isolant

PTFE : Poly(tétrafluorure) d'éthylène, ou téflon

## Bibliographie

- [1] J. H. Moon, S. Yoon, Y. J. Bae, M. S. Kim. Formation of gas-phase peptide ions and their dissociation in MALDI: insights from kinetic and ion yield studies. *Mass Spectrom Rev* **2015**, 34, 94.
- [2] W. L. Weaver. *A Decade of Innovation : Technology from the First Decade of the 21st Century*. BookTango, **2013**.
- [3] K. Tanaka. 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.
- [4] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **1987**, 78, 53.
- [5] E. D. Hoffmann, V. Stroobant. *Mass spectrometry: Principles and applications*. **2002**.
- [6] R. A. Zubarev, P. Håkansson, B. Sundqvist, V. L. Talrose. Enhancement of the molecular ion yield in plasma desorption mass spectrometry using explosive matrices. *Rapid Commun mass Spectrom* **1997**, 11, 63.
- [7] K. Strupat, M. Karas, F. Hillenkamp. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **1991**, 111, 89.
- [8] R. C. Beavist, B. T. Chait. Cinnamic Acid Derivatives as Matrices for Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1989**, 3, 432.
- [9] R. Beavis, T. Chaudhary, B. Chaid.  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix- assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry. *Org Mass Spectrom* **1992**, 27, 156.
- [10] L. Ulmer, J. Mattay, H. Torres-Garcia, H. Luftmann. Letter: The use of 2-[(2E)-3-(4-tert-butylphenyl)-2- methylprop-2-enylidene]malononitrile as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom* **2000**, 6, 49.
- [11] C. Robins, P. a Limbach. The use of nonpolar matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of high boiling crude oil fractions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, 17, 2839.
- [12] H. Wang, B. Dai, B. Liu, H. Lu. Coumarins as new matrices for matrix-assisted laser-desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometric analysis of hydrophobic compounds. *Anal Chim Acta* **2015**, 882, 49.
- [13] K. Teuber, J. Schiller, B. Fuchs, M. Karas, T. W. Jaskolla. Significant sensitivity improvements by matrix optimization: A MALDI-TOF mass spectrometric study of lipids from hen egg yolk. *Chem Phys Lipids* **2010**, 163, 552.
- [14] M. Wiegelmann, J. Soltwisch, T. W. Jaskolla, K. Dreisewerd. Matching the laser wavelength to the absorption properties of matrices increases the ion yield in UV-MALDI mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2012**, 405, 6925.
- [15] V. Horneffer, K. Dreisewerd, H.-C. Lüdemann, F. Hillenkamp, M. Läge, K. Strupat. Is the incorporation of analytes into matrix crystals a prerequisite for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry? A study of five positional isomers of dihydroxybenzoic acid. *Int J Mass Spectrom* **1999**, 185, 859.
- [16] V. Horneffer, A. Forsmann, K. Strupat, F. Hillenkamp, U. Kubitscheck. Localization of Analyte Molecules in MALDI Preparations by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Anal Chem* **2001**, 73, 49.
- [17] C. Chendo, M. Rollet, T. N. T. Phan, S. Viel, D. Gigmes, L. Charles. Successful MALDI

- mass spectrometry of poly(4-vinylpyridine) using a solvent-free sample preparation. *Int J Mass Spectrom* **2015**, 376, 90.
- [18] V. Horneffer, M. Glückmann, R. Krüger, M. Karas, K. Strupat, F. Hillenkamp. Matrix–analyte-interaction in MALDI-MS: Pellet and nano-electrospray preparations. *Int J Mass Spectrom* **2006**, 249, 426.
- [19] F. Ayorinde. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of cod liver oil and the effect of analyte/matrix concentration on signal intensities. ... *Mass Spectrom* **1999**, 1769, 1762.
- [20] D. M. Price, S. Bashir, P. R. Derrick. Sublimation properties of x, y-dihydroxybenzoic acid isomers as model matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) matrices. *Thermochim Acta* **1999**, 327, 167.
- [21] S. L. Cohen, B. T. Chait. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Anal Chem* **1996**, 68, 31.
- [22] S. J. Hattan, J. Marchese, M. Albertinetti, S. Krishnan, N. Khainovski, P. Juhasz. Effect of solvent composition on signal intensity in liquid chromatography–matrix-assisted laser desorption ionization experiments. *J Chromatogr A* **2004**, 1053, 291.
- [23] I. D. Figueroa, O. Torres, D. H. Russell. Effects of the water content in the sample preparation for MALDI on the mass spectra. *Anal Chem* **1998**, 70, 4527.
- [24] R. Knochenmuss. MALDI and Related Methods: A Solved Problem or Still a Mystery? *Mass Spectrom (Tokyo, Japan)* **2013**, 2, S0006.
- [25] J. Kemptner, M. Marchetti-Deschmann, R. Mach, I. S. Druzhinina, C. P. Kubicek, G. Allmaier. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) preparation techniques for surface characterization of intact *Fusarium* spores by MALDI linear time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, 23, 877.
- [26] M. Stoeckli, P. Chaurand, D. E. Hallahan, R. M. Caprioli. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* **2001**, 7, 493.
- [27] K. Dreisewerd. Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **2014**, 406, 2261.
- [28] A. Thomas, J. L. Charbonneau, E. Fournaise, P. Chaurand. Sublimation of new matrix candidates for high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: Enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Anal Chem* **2012**, 84, 2048.
- [29] S. Nitta, H. Kawasaki, T. Suganuma, Y. Shigeri, R. Arakawa. Desorption/Ionization Efficiency of Common Amino Acids in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) with Nanostructured Platinum. **2013**.
- [30] S. R. Weinberger, E. Boschetti, P. Santambien, V. Brenac. Surface-enhanced laser desorption-ionization retention chromatography mass spectrometry (SELDI-RC-MS): a new method for rapid development of process chromatography conditions. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, 782, 307.
- [31] M. Rainer, M. N. Qureshi, G. K. Bonn. Matrix-free and material-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry for the analysis of low molecular weight compounds. *Anal Bioanal Chem* **2011**, 400, 2281.
- [32] M. F. Wyatt, S. Ding, B. K. Stein, a G. Brenton, R. H. Daniels. 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.
- [33] M. V Ugarov, T. Egan, D. V Khabashesku, J. A. Schultz, H. Peng, V. N. Khabashesku, H. Furutani, K. S. Prather, H.-W. J. Wang, S. N. Jackson, A. S. Woods. MALDI matrices for biomolecular analysis based on functionalized carbon nanomaterials. *Anal Chem* **2004**, *76*, 6734.
- [34] H. Kawasaki, K. Nakai, R. Arakawa, E. K. Athanassiou, R. N. Grass, W. J. Stark. Functionalized Graphene-Coated Cobalt Nanoparticles for Highly Efficient Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Analysis. *Anal Chem* **2012**, *84*, 9268.
- [35] C. W. Liang, C. H. Lee, Y. Lin, Y. T. Lee, C. K. Ni. MALDI Mechanism of Dihydroxybenzoic Acid Isomers : Desorption of Neutral Matrix and Analyte. **2013**, DOI 10.1021/jp4015492.
- [36] M. C. Bernier, V. H. Wysocki, S. Dagan. Laser desorption ionization of small molecules assisted by tungsten oxide and rhenium oxide particles. *J Mass Spectrom* **2015**, *50*, 891.
- [37] Z. Wu, F. a Fernandez-Lima, L. M. Perez, D. H. Russell. A new copper containing MALDI matrix that yields high abundances of [peptide + Cu]<sup>+</sup> ions. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 1263.
- [38] S. Zhang, J. Liu, Y. Chen, S. Xiong, G. Wang, J. Chen, G. Yang. A Novel Strategy for MALDI-TOF MS Analysis of Small Molecules. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 154.
- [39] R. J. Wenzel, U. Matter, L. Schultheis, R. Zenobi. Analysis of megadalton ions using cryodetection MALDI time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **2005**, *77*, 4329.
- [40] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann. Fundamental aspects of postsource decay in matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. 1. Residual gas effects. *J Phys Chem* **1992**, *96*, 9678.
- [41] 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* **2003**, *376*, 952.
- [42] K. Dreisewerd. *The Desorption Process in MALDI*. **2003**.
- [43] L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, Y. G. Yingling, M. I. Zeifman. Computer simulations of laser ablation of molecular substrates. *Chem Rev* **2003**, *103*, 321.
- [44] I. Fournier, A. Brunot, J. C. Tabet, G. Bolbach. Delayed extraction experiments using a repulsing potential before ion extraction: evidence of non-covalent clusters as ion precursor in UV matrix-assisted laser desorption/ionization. Part II--Dynamic effects with alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. *J Mass Spectrom* **2005**, *40*, 50.
- [45] I.-C. Lu, C. Lee, Y.-T. Lee, C.-K. Ni. Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization. *Annu Rev Anal Chem* **2015**, *8*, 21.
- [46] S. Alves, F. Fournier, C. Afonso, F. Wind, J. C. Tabet. Gas-phase ionization/desolvation processes and their effect on protein charge state distribution under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions. *Eur J Mass Spectrom* **2006**, *12*, 369.
- [47] R. Knochenmuss. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyt* **2006**, *131*, 966.
- [48] T. W. Jaskolla, M. Karas. Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism. *J Am Soc Mass Spectrom* **2011**, *22*, 976.
- [49] E. Moskovets, H.-S. Chen, A. Pashkova, T. Rejtar, V. Andreev, B. L. Karger. Closely spaced external standard: a universal method of achieving 5 ppm mass accuracy over the entire

- MALDI plate in axial matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17*, 2177.
- [50] S. H. Ahn, K. M. Park, Y. J. Bae, M. S. Kim. Quantitative reproducibility of mass spectra in matrix-assisted laser desorption ionization and unraveling of the mechanism for gas-phase peptide ion formation. *J Mass Spectrom* **2013**, *48*, 299.
- [51] R. Knochenmuss. MALDI ionization mechanisms: The coupled photophysical and chemical dynamics model correctly predicts “temperature”-selected spectra. *J Mass Spectrom* **2013**, *48*, 998.
- [52] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas, F. Hillenkamp. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **1995**, *141*, 127.
- [53] M. Schürenberg, K. Dreisewerd. Influence of the sample temperature on the desorption of matrix molecules and ions in matrix-assisted laser desorption ionization. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **1998**, *172*, 89.
- [54] A. A. Puretzky, D. B. Geohegan. Gas-phase diagnostics and LIF-imaging of 3-hydroxypicolinic acid MALDI-matrix plumes. *Chem Phys Lett* **1998**, *286*, 425.
- [55] R. Knochenmuss, L. V Zhigilei. Molecular dynamics simulations of MALDI: laser fluence and pulse width dependence of plume characteristics and consequences for matrix and analyte ionization. *J mass Spectrom* **2010**, *45*, 333.
- [56] X. Chen, J. A. Carroll, R. C. Beavis. Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *J Am Soc Mass Spectrom* **1998**, *9*, 885.
- [57] A. Vogel, V. Venugopalan. Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chem Rev* **2003**, *103*, 577.
- [58] V. Chagovets, V. Frankevich, R. Zenobi. Initial Velocity Distribution of MALDI/LDI Ions Measured by Internal MALDI Source Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2014**, *25*, 1991.
- [59] G. McCombie, R. Knochenmuss. Enhanced MALDI ionization efficiency at the metal-matrix interface: practical and mechanistic consequences of sample thickness and preparation method. *J Am Soc Mass Spectrom* **2006**, *17*, 737.
- [60] S. Berkenkamp, C. Menzel, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd. Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 209.
- [61] T. Huth-Fehre, C. H. Becker, R. C. Beavis. Energetics of gramicidin S after UV laser desorption from a ferulic acid matrix. *Rapid Commun mass Spectrom* **1991**, *5*, 378.
- [62] R. Knochenmuss, R. Zenobi. MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chem Rev* **2003**, *103*, 441.
- [63] I. Fournier, J. . Tabet, G. Bolbach. Irradiation effects in MALDI and surface modifications. *Int J Mass Spectrom* **2002**, *219*, 515.
- [64] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker, R. Zenobi. The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: Application to negative ions and further characteristics. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1998**, *12*, 529.
- [65] H. Ehring, C. Costa, P. A. Demirev, B. U. R. Sundqvist. Photochemical versus thermal mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization probed by back side desorption.

- Rapid Commun Mass Spectrom* **1996**, *10*, 821.
- [66] S. Chakrabarty, J. L. DeLeeuw, D. W. Woodall, K. Jooss, S. B. Narayan, S. Trimpin. Reproducibility and Quantification of Illicit Drugs Using Matrix-Assisted Ionization (MAI) Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2015**, *87*, 8301.
- [67] J. Li, E. D. Inutan, B. Wang, C. B. Lietz, D. R. Green, C. D. Manly, A. L. Richards, D. D. Marshall, S. Lingenfelter, Y. Ren, S. Trimpin. Matrix assisted ionization: new aromatic and nonaromatic matrix compounds producing multiply charged lipid, peptide, and protein ions in the positive and negative mode observed directly from surfaces. *J Am Soc Mass Spectrom* **2012**, *23*, 1625.
- [68] B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas, F. Hillenkamp. Gas-Phase cationization and protonation of neutrals generated by matrix-assisted laser desorption. *J Am Soc Mass Spectrom* **1993**, *4*, 393.
- [69] L. Charles. MALDI of synthetic polymers with labile end-groups. *Mass Spectrom Rev* **2014**, *33*, 523.
- [70] X. Zhang, C. J. Cassady. Apparent gas-phase acidities of multiply protonated peptide ions: ubiquitin, insulin B, and renin substrate. *J Am Soc Mass Spectrom* **1996**, *7*, 1211.
- [71] K. Shrivastava, H.-F. Wu. Oxidized multiwalled carbon nanotubes for quantitative determination of cationic surfactants in water samples using atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* **2008**, *628*, 198.
- [72] M. Karas, M. Gluckmann, J. Schafer, M. Glückmann, J. Schäfer. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*, 1.
- [73] R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Gluckmann, M. Karas. Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Anal Chem* **2001**, *73*, 5812.
- [74] I. Fournier, A. Marie, D. Lesage, G. Bolbach, F. Fournier, J. C. Tabet. Post-source decay time-of-flight study of fragmentation mechanisms of protonated synthetic polymers under matrix-assisted laser desorption/ionization conditions. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2002**, *16*, 696.
- [75] P. Kebarle, U. H. Verkerk. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev* **2009**, *28*, 898.
- [76] R. Zenobi, R. Knochenmuss. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **1998**, *17*, 337.
- [77] J. Zhang, R. Zenobi. Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 808.
- [78] G. Westmacott, W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd, M. Schürenberg. The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* **2002**, *221*, 67.
- [79] R. Knochenmuss, L. V Zhigilei. Molecular dynamics model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes. *J Phys Chem B* **2005**, *109*, 22947.
- [80] Q. Min, X. Zhang, X. Chen, S. Li, J.-J. Zhu. N-doped graphene: an alternative carbon-based matrix for highly efficient detection of small molecules by negative ion MALDI-TOF MS. *Anal Chem* **2014**, *86*, 9122.
- [81] J. Amano, D. Sugahara, K. Osumi, K. Tanaka. Negative-ion MALDI-QIT-TOFMSn for

- structural determination of fucosylated and sialylated oligosaccharides labeled with a pyrene derivative. *Glycobiology* **2009**, *19*, 592.
- [82] M. Dashtiev, E. Wäfler, U. Röhling, M. Gorshkov, F. Hillenkamp, R. Zenobi. Positive and negative analyte ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *268*, 122.
- [83] F. Hillenkamp, E. Wäfler, M. C. Jecklin, R. Zenobi. Positive and negative analyte ion yield in matrix-assisted laser desorption/ionization revisited. *Int J Mass Spectrom* **2009**, *285*, 114.
- [84] M. Stano, H. D. Flosadottir, O. Ingolfsson. Effective quenching of fragment formation in negative ion oligonucleotide matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry through sodium adduct formation. *Rapid Commun mass Spectrom* **2006**, *20*, 3498.
- [85] B. Guan, R. B. Cole. MALDI linear-field reflectron TOF post-source decay analysis of underivatized oligosaccharides: determination of glycosidic linkages and anomeric configurations using anion attachment. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1119.
- [86] B. Fuchs, A. Bischoff, R. Süß, K. Teuber, M. Schürenberg, D. Suckau, J. Schiller. Phosphatidylcholines and -ethanolamines can be easily mistaken in phospholipid mixtures: a negative ion MALDI-TOF MS study with 9-aminoacridine as matrix and egg yolk as selected example. *Anal Bioanal Chem* **2009**, *395*, 2479.
- [87] N. L. Clipston, J. Jai-nhuknan, C. J. Cassady. A comparison of negative and positive ion time-of-flight post-source decay mass spectrometry for peptides containing basic residues. *Int J Mass Spectrom* **2003**, *222*, 363.
- [88] M. C. Fitzgerald, G. R. Parr, L. M. Smith. Basic matrices for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal Chem* **1993**, *65*, 3204.
- [89] R. Knochenmuss. Positive/negative ion ratios and in-plume reaction equilibria in MALDI. *Int J Mass Spectrom* **2008**, *273*, 84.
- [90] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, V. A. Zagulin. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov Phys JETP* **1973**, *37*, 45.
- [91] T. a Zimmerman, D. Debois, G. Mazzucchelli, V. Bertrand, M.-C. De Pauw-Gillet, E. De Pauw. An analytical pipeline for MALDI in-source decay mass spectrometry imaging. *Anal Chem* **2011**, *83*, 6090.
- [92] G. Moneti, S. Francese, G. Mastrobuoni, G. Pieraccini, R. Seraglia, G. Valitutti, P. Traldi. Do collisions inside the collision cell play a relevant role in CID-LIFT experiments? *J mass Spectrom* **2007**, *42*, 117.
- [93] E. Sachon, G. Clodic, T. Blasco, G. Bolbach. Protein desolvation in UV matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 1880.
- [94] X. Lou, J. L. J. van Dongen, E. W. Meijer. Generation of CsI cluster ions for mass calibration in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 1223.
- [95] K. Sládková, J. Houška, J. Havel. Laser desorption ionization of red phosphorus clusters and their use for mass calibration in time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 3114.
- [96] O. Šedo, J. Havliš. Comments on “Laser desorption ionization of red phosphorus clusters and their use for mass calibration in time-of-flight mass spectrometry.” *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**, *24*, 849.

- [97] T. M. Annesley. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* **2003**, *49*, 1041.
- [98] R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale, R. Zenobi. The matrix suppression effect and ionization mechanism in MALDI. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1996**, *10*, 871.
- [99] A. Emin-Atik, M. Zeynep-Guray, T. Yalcin, Investigation the extent of in vitro methylation of glutamic acid or aspartic acid containing model peptides by electrospray ionization-Mass Spectrometry. 3rd MEDMS Conference, Athens, **2015**.
- [100] A. G. Marshall, C. L. Hendrickson. High-resolution mass spectrometers. *Annu Rev Anal Chem* **2008**, *1*, 579.
- [101] M. Glückmann, M. Karas. The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Mass Spectrom* **1999**, *34*, 467.
- [102] S. M. Grayson, B. K. Myers, J. Bengtsson, M. Malkoch. Advantages of Monodisperse and Chemically Robust “SpheriCal” Polyester Dendrimers as a “Universal” MS Calibrant. *J Am Soc Mass Spectrom* **2014**, *25*, 303.
- [103] V. Jallet. Conception de polyoxométallates amphiphiles pour la catalyse d'oxydation en microémulsion. *Thèse Dr UPMC (Paris VI)* **2014**.
- [104] A. Proust, R. Thouvenot, P. Gouzerh. Functionalization of polyoxometalates: towards advanced applications in catalysis and materials science. *Chem Commun* **2008**, 1837.
- [105] M. Misono. Catalytic chemistry of solid polyoxometalates and their industrial applications. *Mol Eng* **1993**, *3*, 193.
- [106] A. Proust, B. Matt, R. Villanneau, G. Guillemot, P. Gouzerh, G. Izzet. Functionalization and post-functionalization: a step towards polyoxometalate-based materials. *Chem Soc Rev* **2012**, *41*, 7605.
- [107] V. Jallet, G. Guillemot, J. Lai, P. Bauduin, V. Nardello-Rataj, A. Proust. Covalent amphiphilic polyoxometalates for the design of biphasic microemulsion systems. *Chem Commun (Camb)* **2014**, *50*, 6610.
- [108] C. Rinfray, S. Renaudineau, G. Izzet, A. Proust. A covalent polyoxomolybdate-based hybrid with remarkable electron reservoir properties. *Chem Commun* **2014**, 8575.
- [109] A. Yokoyama, T. Kojima, K. Ohkubo, M. Shiro, S. Fukuzumi. Formation of a hybrid compound composed of a saddle-distorted Tin(IV)-porphyrin and a Keggin-type heteropolyoxometalate to undergo intramolecular photoinduced electron transfer. *J Phys Chem A* **2011**, *115*, 986.
- [110] A. Hiskia, A. Mylonas, E. Papaconstantinou. Comparison of the photoredox properties of polyoxometalates and semiconducting particles. *Chem Soc Rev* **2001**, *30*, 62.
- [111] P. Lubal, H. Koprivová, O. Sedo, J. Havel, S. Lis, S. But. Simultaneous determination of molybdenum(VI) and tungsten(VI) and its application in elemental analysis of polyoxometalates. *Talanta* **2006**, *69*, 800.
- [112] L. Zhang, R. Clérac, C. I. Onet, C. Healy, W. Schmitt. Towards Nanoscopic Mn-Containing Hybrid Polyoxomolybdates: Synthesis, Structure, Magnetic Properties, and Solution Behavior of a {Mn<sub>6</sub>Mo<sub>10</sub>} Cluster. *Eur J Inorg Chem* **2013**, *2013*, 1654.
- [113] R. Mayer, M. Hervé, H. Lavanant, J.-C. Blais, F. Sécheresse. Hybrid cyclic dimers of divacant heteropolyanions: synthesis, mass spectrometry (MALDI-TOF and ESI-MS) and NMR multinuclear characterisation. *Eur J Inorg Chem* **2004**, 973.
- [114] R. M. Smith. *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. John Wiley & Sons,

2004.

- [115] C. Dablemont, A. Proust, R. Thouvenot, C. Afonso, F. Fournier, J.-C. Tabet. Functionalization of Polyoxometalates: From Lindqvist to Keggin Derivatives. 1. Synthesis, Solution Studies, and Spectroscopic and ESI Mass Spectrometry Characterization of the Rhenium Phenylimido Tungstophosphate [PW11O39 {ReNC6H5}] 4. *Inorg Chem* **2004**, *43*, 3514.
- [116] M. M. Lorion, B. Matt, S. Alves, A. Proust, G. Poli, J. Oble, G. Izzet. Versatile post-functionalization of polyoxometalate platforms by using an unprecedented range of palladium-catalyzed coupling reactions. *Chem - A Eur J* **2013**, *19*, 12607.
- [117] L. Zhu, G. R. Parr, M. C. Fitzgerald, C. M. Nelson, L. M. Smith. Oligodeoxynucleotide Fragmentation in MalDi/ToF Mass-Spectrometry Using 355-Nm Radiation. *J Am Chem Soc* **1995**, *117*, 6048.
- [118] M. Nazim Boutaghou, R. B. Cole. 9,10-Diphenylanthracene as a matrix for MALDI-MS electron transfer secondary reactions. *J Mass Spectrom* **2012**, *47*, 995.
- [119] K. Demeure, V. Gabelica, E. A. De Pauw. New advances in the understanding of the in-source decay fragmentation of peptides in MALDI-TOF-MS. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 1906.
- [120] D. Asakawa, L. C. Chen, K. Hiraoka. Negative-mode MALDI mass spectrometry for the analysis of pigments using tetrathiafulvalene as a matrix. *J mass Spectrom* **2008**, *43*, 1494.
- [121] G. a Breaux, K. B. Green-church, A. France, P. a Limbach. Desorption / Ionization Mass Spectrometry of Hydrophobic and Hydrophilic Peptides. **2000**, *72*, 1169.
- [122] D. C. Grant, R. J. Helleur. Simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal Bioanal Chem* **2008**, *391*, 2811.
- [123] P. Yau, T. W. Dominic Chan, P. G. Cullis, A. Colburn, P. J. Derrick. Threshold fluences for production of positive and negative ions in matrix-assisted laser desorption/ionisation using liquid and solid matrices. *Chem Phys Lett* **1993**, *202*, 93.
- [124] F. Hillenkamp, M. Karas. The MALDI Process and Method. *MALDI MS A Pract Guid to Instrumentation, Methods Appl* **2007**, *1*.
- [125] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2, 5-dihydroxybenzoic acid. *Org Mass Spectrom* **1993**, *28*, 1476.
- [126] A. I. Gusev, W. R. Wilkinson, A. Proctor, D. M. Hercules. Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis. *Anal Chem* **1995**, *67*, 1034.
- [127] S. Laugesen, P. Roepstorff. Combination of two matrices results in improved performance of MALDI MS for peptide mass mapping and protein analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, *14*, 992.
- [128] T. M. Billeci, J. T. Stults. Tryptic mapping of recombinant proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* **1993**, *65*, 1709.
- [129] M. Laštovičková, J. Chmelik, J. Bobalova. The combination of simple MALDI matrices for the improvement of intact glycoproteins and glycans analysis. *Int J Mass Spectrom* **2009**, *281*, 82.
- [130] B. Brahim, S. Alves, R. B. Cole, J.-C. Tabet. Charge enhancement of single-stranded dna in negative electrospray ionization using the supercharging reagent meta-nitrobenzyl alcohol.

- J Am Soc Mass Spectrom* **2013**, *24*, 1988.
- [131] T. Baer, P. M. Mayer. Statistical Rice-Ramsperger-Kassel-Marcus quasiequilibrium theory calculations in mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **1997**, *8*, 103.
- [132] A. Vertes, G. H. Luo, L. Ye, Y. Chen, I. Marginean. Laser pulse length dependence of internal energy transfer in UV-MALDI-MS. *Appl Phys* **2004**, *79*, 823.
- [133] S. J. Gabriel, R. F. Steinhoff, M. Pabst, C. Schwarzingler, R. Zenobi, U. Panne, S. M. Weidner. Improved analysis of ultra-high molecular mass polystyrenes in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using DCTB matrix and caesium salts. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2015**, *29*, 1039.
- [134] P. Terrier, W. Buchmann, G. Cheguillaume, B. Desmazières, J. Tortajada. Analysis of poly(oxyethylene) and poly(oxypropylene) triblock copolymers by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal Chem* **2005**, *77*, 3292.
- [135] D. a. Allwood, R. W. Dreyfus, I. K. Perera, P. E. Dyer. UV optical absorption of matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1996**, *10*, 1575.
- [136] A. Hoteling, W. Nichols, D. Giesen, J. Lenhard, R. Knochenmuss. Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: factors influencing matrix and analyte ion intensities. *Eur J Mass Spectrom* **2006**, *12*, 345.
- [137] V. Gabelica, E. Schulz, M. Karas. Internal energy build-up in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 579.
- [138] K. Demeure, L. Quinton, V. Gabelica, E. De Pauw. Rational selection of the optimum MALDI matrix for top-down proteomics by in-source decay. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8678.
- [139] V. Frankevich, R. Knochenmuss, R. Zenobi. The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR. *Int J Mass Spectrom* **2002**, *220*, 11.
- [140] M. Dashtiev, V. Frankevich, R. Zenobi. Kinetic energy of free electrons affects MALDI positive ion yield via capture cross-section. *J Phys Chem A* **2006**, *110*, 926.
- [141] M. Schuerenberg, C. Luebbert, H. Eickhoff, M. Kalkum, H. Lehrach, E. Nordhoff. Prestructured MALDI-MS sample supports. *Anal Chem* **2000**, *72*, 3436.
- [142] T. L. Cottrell. The Strengths of Chemical Bonds, 2nd Ed. *Prop atoms, radicals, Bond* **1966**, *372*, 41.
- [143] D. Asakawa, M. Takayama. Fragmentation processes of hydrogen-deficient peptide radicals in matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay mass spectrometry. *J Phys Chem B* **2012**, *116*, 4016.
- [144] S. Chakrabarty, V. S. Pagnotti, E. D. Inutan, S. Trimpin, C. N. McEwen. A new matrix assisted ionization method for the analysis of volatile and nonvolatile compounds by atmospheric probe mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2013**, *24*, 1102.
- [145] Valeurs prises sur le site web [www.webbook.nist.gov/chemistry/](http://www.webbook.nist.gov/chemistry/) ou sur <https://labs.chem.ucsb.edu/zakarian/armen/11---bonddissociationenergy.pdf>. **n.d.**
- [146] R. D. Shannon. Revised Effective Ionic Radii and Systematic Studies of Interatomic Distances in Halides and Chaleogenides. *Acta Cryst* **1976**, *A32*, 751.
- [147] Z. Liu, K. L. Schey. Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 482.
- [148] D. Debois, V. Bertrand, L. Quinton, M.-C. De Pauw-Gillet, E. De Pauw. Supporting info: MALDI-In Source Decay Applied to Mass Spectrometry Imaging: A New Tool for

Protein Identification. *Anal Chem* **2010**, xxx, 787.

- [149] D. Suckau, D. S. Cornett. Protein sequencing by ISD and PSD MALDI-TOF MS. *Analisis Mag* **1998**, 26, M18.
- [150] D. Asakawa, D. Calligaris, N. Smargiasso, E. De Pauw. Ultraviolet laser induced hydrogen transfer reaction: study of the first step of MALDI in-source decay mass spectrometry. *J Phys Chem B* **2013**, 117, 2321.
- [151] M. Sakakura, M. Takayama. In-source decay and fragmentation characteristics of peptides using 5-aminosalicylic acid as a matrix in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, 21, 979.
- [152] D. Asakawa. Principles of hydrogen radical mediated peptide/protein fragmentation during matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **2014**.
- [153] T. Köcher, Å. Engström, R. a. Zubarev. Fragmentation of peptides in MALDI in-source decay mediated by hydrogen radicals. *Anal Chem* **2005**, 77, 172.
- [154] E. Sachon, G. Clodic, T. Blasco, Y. Jacquot, G. Bolbach. In-source fragmentation of very labile peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **2009**, 81, 8986.
- [155] R. Knochenmuss. MALDI mechanisms: wavelength and matrix dependence of the coupled photophysical and chemical dynamics model. *Analyst* **2014**, 139, 147.
- [156] Z. Wu, K. Biemann. The MALDI mass spectra of carbosilane-based dendrimers containing up to eight fixed positive or 16 negative charges. *Int J Mass Spectrom Ion Process* **1997**, 165-166, 349.
- [157] V. E. Frankevich, J. Zhang, S. D. Friess, M. Dashtiev, R. Zenobi. Role of Electrons in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem* **2003**, 75, 6063.

## Table des Figures

<i>Figure 1 : Simulations des phénomènes de désorption laser de la matrice. A gauche : (a) à faible puissance laser, (b) à puissance laser supérieure à la valeur seuil. A droite : désorption à différents temps (nanosecondes) au moment de l'application de l'impulsion laser<sup>[55]</sup>.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 2 : Schéma des deux principaux modèles proposant le mécanisme d'ionisation MALDI<sup>[48]</sup>.....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 3 : Photographie des plaques de dépôts (gauche). Plaque « Prespoted AnchorChip » (α), plaque acier inoxydable (β), plaque adaptatrice pour plaque de tout type (γ). Photographie de l'Autoflex III Smartbeam de Bruker Daltonics (droite).....</i>	<i>27</i>
<i>Figure 4 : Schéma de principe de l'appareil MALDI-TOF et photographie d'un réflectron (pris sur le site web du National Institute of scientific material).....</i>	<i>28</i>
<i>Figure 5 : Schéma illustrant l'AutoflexIII en mode LIFT. Des barrières électrostatiques sont placées sur la trajectoires des ions pour dans un premier temps sélectionner l'ion précurseur (PCIS : PreCursor Ion Selector), dans un second temps éliminer le précurseur non fragmenté avant la cellule LIFT (PLMS : Post LIFT metastable suppressor). Schéma inspiré de celui présenté par le constructeur Bruker Daltonics. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figure 6 : Schéma de l'appareil LTQ-Orbitrap avec une source ESI (image prise sur le site du constructeur ThermoScientific).....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 7 : Schéma de l'appareil Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer en mode CID TOF-TOF. (Schéma inspiré d'une publication de Sachon et ses collaborateurs<sup>[93]</sup>).....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 8 : Spectre MALDI du mélange CNA+POMc12 en présence d'Al<sup>3+</sup>, laser 1,5*valeur seuil, 60 tirs. Tableau 2 : détails des formules et masses des ions fragments utilisés pour étalonner l'appareil.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 9 : Structures de bases des POMs à 12 ou 18 centres métalliques, et un ou deux centre(s) structurant utilisés pour la synthèse de nombreux composés hybrides. La dénomination Keggin et Dawson est l'appellation de ces deux familles de composés. ....</i>	<i>38</i>
<i>Figure 10 : POMs 1, 2, 3 annotés de leurs formules brutes et de leurs contre-ions. (Figures utilisées avec autorisation, où demandées expressément auprès de membres de l'équipe E-POM de l'IPCM).....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 11 : Structures de différents POMs détectés sous forme d'espèces moléculaires intactes. La molécule 4 fut observée sous forme de cation en 2004<sup>[114]</sup> POMc8 est un composé présenté dans ce rapport. La molécule 5 fut observée en LDI en 2013<sup>[112]</sup>, et 6 fut observée avec CHCA en 2011<sup>[109]</sup>.....</i>	<i>41</i>
<i>Figure 12 : Spectre ESI acquis sur le LTQ-Orbitrap de [SiW<sub>10</sub>O<sub>38</sub>P<sub>2</sub>C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>]<sup>4+</sup> (POMc8) en ultra haute résolution avec un pouvoir résolutif théorique de 100 000 à m/z 400. ....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 13 : Spectre MALDI du composé de formule [P<sub>2</sub>W<sub>17</sub>O<sub>63</sub>SnC<sub>36</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Ir]<sup>7-</sup> (masse 5038 Da) dans 5 matrices différentes. Agrandissement du signal d'un ion non résolu et inconnu. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 14 : Spectres MALDI et structures de POMc8, POMc10 et POMc12 dans CNA. Observation de signaux séparés de 28Da (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) et de 56Da (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-)<sub>2</sub>. Enregistrés à la puissance laser seuil. ....</i>	<i>49</i>
<i>Figure 15 : Spectres MALDI de POMv préparé dans CNA avec ajout de SDS, enregistrés à la puissance laser 55u.a. et 100 tirs. ....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 16 : Spectres MALDI de POMc12 préparés dans CNA en présence de cations (rapport molaires 1500/150/1 CNA/cation/POM) enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 17 : Graphiques reportant l'intensité de l'espèce moléculaire intacte de m/z 2902 (POMc12+Al) obtenu du mélange de CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12. Le graphique de gauche le rapport matrice/cation est fixé à 10. Le graphique de droite a sa prportion matrice/analyte</i>	

<i>fixée à 600. Dans les graphiques sont présentées les valeurs moyennes obtenues de 6 séries de 200 tirs sur 3 dépôts différents.</i>	54
<i>Figure 18 : Photographies de dépôts de matrice dans le solvant ternaire MeCN/THF/eau 5/4/1 sur plaque « Prespotted AnchorChip » (α) ou sur plaque inox (β, γ, δ). CNA (α et β), HABA (γ) et DHB (δ).</i>	56
<i>Figure 19 : Profils isotopiques théoriques simulés à une résolution de 10000 pour l'apamine (neurotoxine du venin d'abeille) et d'un POM. Annotation du pic contenant l'ion mono-isotopique par @. Graphique (à droite) représentant les masses exactes les plus abondantes contenues dans le pic de m/z 2860.</i>	61
<i>Figure 20 : Agrandissement de spectres de masse sur des ions (a et b en MALDI, c en ESI) avec leur simulation en dessous en prenant en compte la résolution. En a : signal détecté en utilisant une puissance laser très forte, b : même composé à puissance laser seuil, c : signal détecté après l'ionisation en ESI.</i>	62
<i>Figure 21 : Agrandissement des spectres MALDI de différents ions intacts, enregistrés à des puissances de laser variables, montrant différentes valeurs de rapport signal/bruit.</i>	63
<i>Figure 22 : Intégration de pics des massifs isotopiques d'ions présentant un massif isotopique complexe. L'aire sélectionnée pour chaque massif correspondant à 50% de la surface totale théorique calculée (note <sup>2</sup>).</i>	65
<i>Figure 23 : Spectre MALDI du mélange POMc12+Al<sup>3+</sup> dans les matrice DHB et SA enregistré à la puissance laser 80 et 90 (u.a.). L'espèce moléculaire intacte [POMc12Al]<sup>-</sup> est annoté @.</i>	69
<i>Figure 24 : Spectre MALDI du mélange DHB+POMc12+Al<sup>3+</sup> enregistré à laser 80(u.a.)</i>	70
<i>Figure 25 : Spectres MALDI du mélange POMc12+Al<sup>3+</sup> dans les différentes matrices du second groupe, enregistrés aux puissances laser seuil de chaque échantillon. Agrandissement du signal de l'ion contenant l'espèce intacte et comparaison avec le massif isotopique théorique de formule [SiW<sub>10</sub>O<sub>38</sub>P<sub>2</sub>C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>Al]<sup>-</sup> modélisé à une résolution de 12000.</i>	72
<i>Figure 26 : Spectre MALDI de POMc12+Al<sup>3+</sup> avec les matrices du second groupe à une puissance laser équivalente à 1,5*(valeur seuil). Agrandissement de la région de l'ion fragment m/z 1278 de composition [SiW<sub>6</sub>O<sub>22</sub>Al]<sup>-</sup>. Les ions fragments de m/z [1046-1278-1510-1742] contiennent de l'aluminium.</i>	73
<i>Figure 27 : Graphique représentant le taux de fragmentation (TdF) en fonction de la puissance laser (puissance laser/puissance laser seuil), pour 7 matrices différentes en mélange avec POMc12+Al<sup>3+</sup>.</i>	76
<i>Figure 28 : Graphique représentant l'intensité et la résolution du signal de l'espèce moléculaire intacte et des ions fragments enregistré à laser 1,5*valeur seuil.</i>	77
<i>Figure 29 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Al<sup>3+</sup> déposé sur sept supports différents dans des conditions expérimentales identiques. Les spectres ont été enregistrés à une puissance laser de 75 (u.a.).</i>	81
<i>Figure 30 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Li<sup>+</sup> enregistré à une intensité laser de 97 (u.a.). Le mélange est déposé sur une plaque en acier ou en polymère (PAC).</i>	83
<i>Figure 31 : Spectres MALDI du mélange POMc12+CNA+Cu<sup>2+</sup>+Li<sup>+</sup> enregistré à laser 97 u.a. Le mélange est déposé sur une plaque en acier (inox) ou en polymère (PAC). Les ions annotés d'une étoile ont capté un électron.</i>	84
<i>Figure 32 : Spectre de masse du mélange POMv+Li<sup>+</sup> en LDI (bas) ou en MALDI dans les matrices CNA ou dans SA enregistré à aux puissances laser décrites.</i>	86
<i>Figure 33 : Spectre MALDI de POMc12+Al<sup>3+</sup> dans des mélanges de matrices, enregistrés à la puissance laser 1,5*valeur seuil. (a) : méthylantracène, (b) : méthylantracène+TCNQ (9/1), (c) : CNA.</i>	87

<i>Figure 34 : Spectre MALDI de POMc12+Al<sup>3+</sup> dans des mélanges de matrices enregistré à laser de forte puissance. (haut) : SA, (bas) : SA+TCNQ (9/1). Les agrégats de matrice sont annotés#.</i>	88
<i>Figure 35 : Spectres MALDI (60 tirs, laser 40 u.a.) du mélange CHCA+Angiotensine I en présence de POMv (a) et sans ajout de POMv (b). Les agrégats de matrice sont annotés #.</i>	91
<i>Figure 36 : Agrandissement des spectres MALDI des mélanges CNA+POMc12 préparés sans sel ajouté, ou en présence de Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Li<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.</i>	97
<i>Figure 37 : Spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 préparé avec deux espèces cationiques différentes. (a) : Fe<sup>3+</sup>+Al<sup>3+</sup>, (b) : Al<sup>3+</sup>+Li<sup>+</sup>, (c) : Li<sup>+</sup>+Ga<sup>3+</sup>, (d) : Ga<sup>3+</sup>+Co<sup>2+</sup>, (e) : Co<sup>2+</sup>+Cu<sup>2+</sup>, enregistré à la valeur seuil de puissance laser.</i>	99
<i>Figure 38 : Spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 préparés avec des mélanges de cations divalents et monovalents. (a) : Li<sup>+</sup> +Cu<sup>2+</sup>, (b) Co<sup>2+</sup>+ K<sup>+</sup>. Spectres enregistrés à la valeur seuil.</i>	100
<i>Figure 39 : Agrandissements des spectres MALDI du mélange de CNA+POMc12 dopé avec deux espèces cationiques différentes. (a) : Fe<sup>3+</sup>+Al<sup>3+</sup>, (b) : Al<sup>3+</sup>+Li<sup>+</sup>, (c) : Li<sup>+</sup>+Co<sup>2+</sup>, (d) : Co<sup>2+</sup>+Cu<sup>2+</sup>, enregistré a la puissance laser 80 u.a</i>	101
<i>Figure 40 : Spectre MALDI du mélange CNA+POMc12+Li enregistré à la valeurs seuil (b) comparé aux simulations de massifs isotopiques de la seule espèce moléculaire intacte [POM+3Li]<sup>-</sup> (a) et d'un mélange de plusieurs espèces (c).</i>	105
<i>Figure 41 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 préparé en présence du mélange de Al<sup>3+</sup>+Li<sup>+</sup> (haut) ou de Fe<sup>3+</sup>+Li<sup>+</sup> (bas) accompagnés des simulations de profils isotopiques (encarts), enregistrés à la valeur seuil de puissance laser.</i>	106
<i>Figure 42 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 préparé avec un mélange des deux sels de fer(III) FeCl<sub>3</sub> et Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, enregistré à la valeur seuil de puissance laser.</i>	107
<i>Figure 43 : Spectres MALDI du mélange CNA+POMc12 en présence de Cu<sup>2+</sup> ou de Co<sup>2+</sup> ou sans sel ajouté, enregistré à forte puissance laser (97 u.a.). Les pics sont annotés de leurs formules. Les espèces ayant pturé un élecron sont annotés d'une étoile.</i>	108
<i>Figure 44 : Spectres MALDI du POMc12 dans la matrice CNA en présence de différents cations, enregistré à fort laser (75 u.a.). Le taux de fragmentation est annoté sur chaque spectre. Les formules des fragments sont décrites en Tableau 9.</i>	111
<i>Figure 45 : Spectres MALDI du mélange CNA-Al<sup>3+</sup>-POMc12 à haute puissance laser avec des temps de délai d'extraction variant de 0 à 1000ns. La gamme de masse basse est agrandie.</i>	113
<i>Figure 46 : Spectre MALDI du mélange CNA-POMc12-Al<sup>3+</sup> enregistré à forte puissance laser, 30 tirs. Agrandissement de la gamme m/z où se trouvent des ions fragments de haute masse.</i>	115
<i>Figure 47 : Agrandissements des spectres MALDI du mélange POMc12+Al<sup>3+</sup> dans quatre matrices différentes, enregistrés à haute puissance laser.</i>	116
<i>Figure 48 : Spectre LIFT de l'ion [POM+Al]<sup>-</sup> obtenu en MALDI à partir du mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12.</i>	118
<i>Figure 49 : Spectres MS/MS (LIFT) des ions précurseurs (encadrés sur la figure) obtenus en MALDI par sélection de fragments ISD à partir du mélange CNA-POMc12-Al<sup>3+</sup> enregistrés à forte puissance laser (80 u.a.)</i>	119
<i>Figure 50 : Spectre MS/MS en mode CID<sub>basse énergie</sub> de l'ion précurseur m/z 2902 de composition [SiW<sub>10</sub>O<sub>38</sub>P<sub>2</sub>C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>+Al]<sup>-</sup> formé en MALDI à partir d'un mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12. (voir condition en partie 2.1.2)</i>	120
<i>Figure 51 : Spectre MS/MS en mode CID<sub>haute énergie</sub> de l'ion précurseur m/z 2902 de composition [SiW<sub>10</sub>O<sub>36</sub>P<sub>2</sub>C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>+Al]<sup>-</sup> formé en MALDI à partir d'un mélange CNA+Al<sup>3+</sup>+POMc12 (voir conditions expérimentales partie 2.1.3)</i>	121

<i>Figure 52 : Spectre MS/MS en CID (basse énergie) de l'ion [POMc12+Na]<sup>3-</sup> obtenu en ESI. Attribution des formules aux ions observés.</i>	122
<i>Figure 53 : Haut : Spectre MS/MS en TOF-TOF CID de l'ion m/z 2902 obtenu en MALDI. Bas : spectre MALDI du mélange CNA+POMc12+Al<sup>3+</sup> à fort laser. Les ions annotés de leurs masses contiennent un atome d'aluminium. Les ions qui contiennent un H<sup>+</sup> sont annotés H. Les ions qui ont capté un électron sont annotés d'une étoile*.</i>	125
<i>Figure 54 : Schéma représentant les fragmentations en source observées. Les formules annotées sont non exhaustives et sont données à titre d'exemples d'ions fragments.</i>	126
<i>Figure 55 : Schéma du principe d'une source ESI opérée en mode positif (le mode négatif étant exactement l'inverse, c'est-à-dire que l'anode devient la cathode, les charges « + » sont remplacées par des charges « - »).</i>	136
<i>Figure 56 : Spectre MALDI présentant deux ions détectés contenant 10 ou 5 tungstènes accompagnés des profils isotopiques théoriques enregistrés à forte puissance laser.</i>	138
<i>Figure 57 et Tableau 10 : Spectre de masse obtenu en ESI FT-ICR, en mode négatif. Agrandissement de la gamme de masse comportant l'ion. Tableau reportant les formules potentiellement attribuables à l'ion intact.</i>	143
<i>Figure 58 : Arbre de fragmentation de l'ion m/z 572 tiré des spectres de la Figure 61</i>	144
<i>Figure 59 : proposition d'attribution de formule pour certains ions observés.</i>	145
<i>Figure 60 : Proposition de structure de l'ion m/z 572.</i>	145
<i>Figure 61 : Spectres ESI et spectres de fragmentation séquentielle de l'ion m/z 572</i>	148
<i>Figure 62 : Spectres ESI et spectres de fragmentation séquentielle d'un polluant présumé de l'ion m/z 572</i>	149

## Table des Tableaux

<i>Tableau 1: Mélange peptides et masse mono-isotopique</i> .....	34
<i>Figure 8 : Spectre MALDI du mélange CNA+POMc12 en présence d'Al<sup>3+</sup>, laser 1,5* valeur seuil, 60 tirs. Tableau 2 : détails des formules et masses des ions fragments utilisés pour étalonner l'appareil</i> .....	36
<i>Tableau 3 : POMs testés et donnant des pics abondants avec leurs interprétations</i> .....	43
<i>Tableau 4 : Matrices et co-matrices testées pour l'ionisation de POMs</i> .....	45
<i>Tableau 5 : Valeurs de puissance laser (u.a.) utilisée en fonction de la matrice pour l'observation de l'espèce moléculaire intacte [POMc12+Al]<sup>-</sup> ou d'ions de matrice en négatif</i> .....	59
<i>Tableau 6: Isotopes du tungstène</i> .....	61
<i>Tableau 7: Sels utilisés pour obtenir la cationisation et principaux ions détectés sur le spectre de masse MALDI négatif (voir partie 2.2.4 pour la description des conditions expérimentales. (POM étant POMc12 de composition SiW<sub>10</sub>O<sub>34</sub>POC<sub>12</sub>H<sub>25</sub><sup>4+</sup>)</i> .....	94
<i>Tableau 8 : Rayon cationique des cations utilisés<sup>[146]</sup> et force de la liaison de ces cations avec l'oxygène<sup>[145]</sup></i> .....	103
<i>Tableau 9 : Nature des ions abondants observés en ISD et classés par nombre de tungstènes qu'ils contiennent et en fonction des cations, ou mélanges de cations, utilisés. Les espèces soulignées contiennent un électron supplémentaire. Les espèces en italique sont minoritaires. Chaque cation de valence différente représente les cations de même valence (par exemple Al<sup>3+</sup> représente les cations X<sup>3+</sup>). Les espèces obtenues sans adjonctions de cations sont présentes sur tous les spectres, même ceux obtenus en présence de cations ajoutés. (POMc12 étant de formule SiW<sub>10</sub>O<sub>34</sub>POC<sub>12</sub>H<sub>25</sub><sup>4+</sup>)</i> .....	114
<i>Figure 57 et Tableau 10 : Spectre de masse obtenu en ESI FT-ICR, en mode négatif. Agrandissement de la gamme de masse comportant l'ion. Tableau reportant les formules potentiellement attribuables à l'ion intact</i> .....	143
<i>Figure 11 : tableaux des masses et formules possibles pour les ions observés en MS/MS de l'ion m/z 572 sur le spectre de masse obtenu avec l'appareil SolarX FT-ICR. Tableau A0 : Masses exactes mesurées. Tableaux A1 à A9 : Formules possibles pour chaque masse exacte mesurée avec un écart maximum accepté de 20 ppm. Renseignement du nombre d'insaturations (RDB) pour chaque formule proposée</i> .....	147





## **Mécanismes d'ionisation MALDI en mode négatif à travers l'étude de polyoxométallates**

### Résumé :

La technique d'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) est l'une des plus fréquemment utilisées lors des analyses de spectrométrie de masse. Découverte il y a 28 ans, elle est encore activement développée. Malgré son vaste domaine d'utilisation et de nombreux travaux menés à ce sujet, les mécanismes de formation des ions restent toutefois vivement discutés.

La grande majorité de ces études, visant notamment à rationaliser les principes qui régissent la formation des ions, sont réalisés sur des peptides en mode ion positif. Le travail de cette thèse vise à combler cette lacune et s'attache à explorer le mode ion négatif par l'étude de l'ionisation de polyoxométallates hybrides, qui sont des oxydes métalliques assemblés et greffés de fonctions organiques.

Les polyoxométallates portent plusieurs charges négatives en solution et, à la suite de l'ionisation MALDI, ont été détectés sous forme d'ions mono-chargés, donc comme des adduits avec divers cations. En se basant sur les deux principaux modèles décrivant les mécanismes de formation des ions, nous avons proposé un modèle pour l'ionisation de nos composés fondé sur nos observations expérimentales.

Le grand nombre de cations utilisés a permis d'établir une classification relative de l'affinité cationique en phase gazeuse pour nos composés, à travers des expériences MALDI. Enfin, l'étonnante capacité des polyoxométallates testés à s'ioniser dans douze matrices très diverses, alliée à la possibilité d'observer des fragmentations en source de manière variable, a permis d'effectuer une classification fine de sept matrices en fonction des taux de fragmentation mesurés.

### Mots clés :

spectrométrie de masse ; MALDI ; mode négatif ;  
polyoxométallates ; mécanismes d'ionisation ; fragmentation

## **MALDI ionization mechanism in negative ion mode through the study of polyoxometalates**

Abstract:

The matrix assisted laser desorption ionization technique (MALDI) is one of the most used for mass spectrometry analyses. Discovered over 28 years ago, MALDI is still actively developed. However, in spite of its wide utilization and several researches works describing the ion formation mechanisms, it does not exist an unequivocal and clear description of the whole process yet. The majority of those studies destined to rationalize ion formation were carried out in positive ion mode using peptides. Our work is aimed at bridging the gap, performing the MALDI technique in negative ion mode and testing the ionization of hybrid polyoxometalates, i.e. structured metallic oxides functionalized by organic moieties.

Based on the two main ion formation mechanisms models, we suggested a model for the ionization of our compounds based on our experimental observations. In fact, polyoxometallic species present in solution several negative charges and have been detected in MALDI as singly charged species under cationic adducts. The numerous cations tested proved the possibility to use MALDI to build a relative gaseous cationic affinity classification. The astonishing capacity of polyoxometalates to be ionized through a wide variety of matrixes allowed to finely classify seven matrices, according to their different ability to induce in source fragmentation.

Keywords :

mass spectrometry ; MALDI ; negative ion mode ; polyoxometalates ;  
ionization mechanisms ; fragmentation