



HAL
open science

Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications

Ali Jaber

► **To cite this version:**

Ali Jaber. Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications. Chimie analytique. Université d'Angers; Liban, 2017. Français. NNT : 2017ANGE0042 . tel-01798295

HAL Id: tel-01798295

<https://theses.hal.science/tel-01798295>

Submitted on 23 May 2018

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

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

2016-2017

Thèse de doctorat
Chimie Analytique

Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications

JABER ALI |

Sous la direction de M. SÉRAPHIN Denis
(FRANCE) & M. CHEBLE Edmond (LIBAN)

Membres du jury

M. RONDEAU David | Rapporteur

M. MOUNEIMNE Youssef | Rapporteur

Mme BOUDESOCQUE Leslie | Examineur

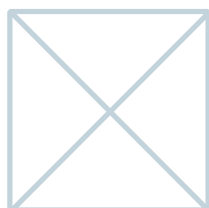
M. HABIB Jean | Examineur

M. Andreas Schinkovitz | Examineur

M. SÉRAPHIN Denis | Directeur

M. CHEBLE Edmond | Directeur

M. IBRAHIM Ghassan | Co-Encadrant



Soutenu publiquement le :
Le 12 Juillet 2017



سنكون يوماً ما نريدُ...
لا الرحلةُ ابتدأتْ ، ولا الدربُ انتهى
~ محمود درويش (1941-2008)

To live in hearts we leave behind is not to die.

~Thomas Campbell, *Hallowed Ground* (1825)

To more than one “Fatima”

**To all those who were martyred, and will be a martyr, for the
oppressed on earth.**

**To all those who preceded us and departed from this life to the
Supreme Kingdom, so that we may live with dignity and honor.**

To my father, my mother, my sisters...

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord M. Pascal Richomme pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire SONAS (Université d'Angers). Également, je remercie M. Jean Habib directeur du laboratoire RDMPN (Université Libanaise).

Cette thèse a été réalisée sous la direction du M. Denis Séraphin de l'Université d'Angers, M. Edmond Cheble et M. Ghassan Ibrahim de l'université Libanaise. Je tiens à leur remercier pour leur soutien, leur disponibilité et leurs qualités scientifiques.

Une pensée particulière au Pr Marie Tueini (Doyenne de la Faculté de Pharmacie, UL) qui est partie très tôt après s'être donnée à la Faculté de Pharmacie.

Je remercie également les membres du jury M. David Rondeau, M. Youssef Mouneinme, Mme Leslie Boudesocque et M. Jean Habib, M. Andreas Schinkovitz qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner et de juger ce travail.

Je souhaite remercier Mme Marylène Dias de l'Université d'Angers et Mme Hélène Rogniaux de l'Université de Nantes, d'avoir accepté d'être membres de mon comité de suivi de thèse, et pour les orientations qu'ils ont ainsi proposées de donner à mes travaux.

J'aimerais adresser toute ma gratitude aux membres du laboratoire SONAS, pour leur soutien et leur bonne humeur. J'ai une pensée plus particulière pour M. David Guillet et M. Andreas Schinkovitz, pour leur participation au projet. Un grand merci à M. Guillaume VIAULT, également à M. KHALED EI-SABIL.

Mes remerciements vont aussi aux membres du Laboratoire MOLTECH Anjou pour la bonne ambiance partagée les quelques mois pendant la thèse et leur accueil durant mes différentes visites.

Je tiens à remercier les nombreuses personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail:

- Les MM. Éric Levillain et Olivier Alévêque (MOLTECH-ANJOU), Jean-Jacques Helesbeux (SONAS), Daoud Naoufal (U. Libanaise) pour leurs réponses précieuses.

-Si les autres m'ont présenté seulement des soutiens scientifiques « toi » M. Lionel Sanguinet merci pour le soutien moral, avant celui scientifique, pendant les durs moments lorsque plus rien ne fonctionne.

-Les membres de la plateforme PIAM : le trio d'or « Ingrid, Sonia et Flavy » sans que j'oublie Benjamin.

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes du Lycée officiel de Ghoubeyri I (À Beyrouth, LIBAN) dirigé par Mme Layla Alameh, ainsi que mes élèves.

Je ne peux pas oublier mes amis qui m'ont supporté durant toute la durée de séjour en France notamment Bachar MOUGHAYT et Ali ABBAS.

Enfin, une pensée concerne bien évidemment tous mes proches et en particulier, mes parents et mes sœurs, merci à eux pour leur encouragement perpétuel et de supporter mes humeurs.

Production scientifique

Publications

Demande d'un brevet

JABER, A.; Séraphin, D.; Richomme, P.; Schinkovitz, A.; Guilet, D.; Dias, M.; Levillain, E. Matrice pour la détection spécifiques des alcaloïdes par spectométrie de masse MALDI-TOF. BTN222343FR00, 2017.

Accepté

A. Jaber, D. Séraphin, D. Guilet, J. Osuga, E. Cheble, G. Ibrahim, P. Richomme, A. Schinkovitz. Bithiophenic MALDI matrices as valuable leads for the selective detection of alkaloids. (Analytical and Bioanalytical Chemistry)

Communications orales et Posters

A. Jaber, E. Cheble, G. Ibrahim, D. Séraphin. Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes. 2014 LAAS, Beyrouth, LIBAN

A. Jaber, A. Schinkovitz, P. Richomme and D. Séraphin, Improved MALDI detection of alkaloids using a bithiophenic matrix, 1st Joint European Conference on Therapeutic Targets and Medicinal Chemistry (TTMC), 26-27 août 2015, Münster, Allemagne.

A. Jaber, A. Schinkovitz, D. Guilet, P. Richomme and D. Séraphin. Bithiophenic matrix for selective detection and quantification of toxic alkaloids by MALDI-TOF-Ms. 24rd European Conference of GP2A, 26-27 août 2016, Angers, France.



Sommaire

REMERCIEMENTS	I
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	III
SOMMAIRE	V
TABLE DES ILLUSTRATIONS	IX
TABLE DES TABLEAUX	XVII
TABLE DES SCHEMAS	XIX
PRINCIPALES ABREVIATIONS	XXI
INTRODUCTION GENERALE	3
CHAPITRE I : ÉTUDES BIBLIOGRAPHIQUES	9
1. Spectrométrie de masse MALDI	9
1.1. Introduction.....	9
1.2. La technique MALDI.....	9
1.2.1. Du LDI au MALDI	10
1.2.2. Principe général d'une source MALDI	11
1.3. Les matrices	13
1.3.1. État de l'art	13
1.3.2. Principe, rôle et critères de choix des matrices	13
1.4. Limitations de la méthode MALDI et améliorations envisagées.....	16
1.4.1. Limitations de la méthode	16
1.4.2. Les différentes stratégies élaborées	17
i. Les techniques de désorption/ionisation post-MALDI.....	18
ii. Développement de matrices organiques	24
1.5. L'analyseur TOF pour la détection d'ions gazeux produits par LDI	29
1.5.1. Introduction.....	29
1.5.2. Principe général de l'analyseur TOF	29
1.5.3. Equations ⁹⁷	30
1.5.4. Perfectionnements de l'analyseur TOF.....	31
i. L'extraction retardée.....	31
ii. Miroir électrostatique	32
iii. Trajectoire spirale.....	33
2. Les alcaloïdes	34
2.1. Généralités sur les métabolites secondaires.....	34
2.2. Généralités sur les alcaloïdes	34
2.2.1. Définitions et origine.....	34
2.2.2. Classification.....	35
2.3. Utilité et usages des alcaloïdes.....	35
2.4. Propriétés physico-chimiques.....	36
2.5. Détection des alcaloïdes	37
3. Les contributions des équipes angevines dans le domaine	39
CHAPITRE II : OPTIMISATION	45
1. Introduction	45
2. Généralités sur l'ionisation des alcaloïdes en MALDI	46
3. Pourquoi l'optimisation de la méthode de préparation ?	48

4.	Le MALDI-TOF Biflex III	50
4.1.	La source d'ionisation et le système d'introduction	50
4.2.	L'extraction et la déflexion des ions:	51
4.3.	L'analyseur de masse TOF et la détection des ions :	51
5.	Méthodes de dépôt	52
5.1.	Méthodes de dépôt classiques	52
5.2.	Quelques développements du mode de préparation.....	54
5.3.	Méthode adoptée dans ce chapitre	56
6.	Vers un traitement de données plus robuste	58
7.	Méthode et conditions d'acquisition des données	62
8.	Effet de la puissance de laser	65
9.	Effet du solvant	67
9.1.	Solubilité	68
9.2.	Effet du solvant et de l'état physique sur l'absorption de la matrice.....	70
9.2.1.	Mode opératoire	70
9.2.2.	Spectre UV des solutions	70
9.2.3.	Spectre à l'état solide	72
9.2.4.	Discussion	73
9.3.	Effet du solvant sur la réponse et la répétabilité.....	74
9.3.1.	Test descriptif : relation solvant réponse.....	75
9.3.2.	Analyse sans normalisation	77
9.3.3.	Analyse après normalisation	78
	i. Vérification de l'homogénéité des écarts-types.....	80
	ii. Calcul de l'écart-type de répétabilité et comparaison des méthodes.	81
	iii. Résultats	82
9.4.	Effet du solvant sur la morphologie des spots	84
10.	Conclusion	85

CHAPITRE III : MT3P POUR L'IDENTIFICATION ET/OU LE DOSAGE DES ALCALOÏDES 89

1.	Introduction	89
2.	Les plantes de référence étudiées	91
3.	Développements d'une nouvelle méthode de dosage en MALDI en utilisant MT3P comme matrice.	96
3.1.	Matériels et méthodes.....	97
3.1.1.	Les composés analysés	97
3.1.2.	Matériels	98
3.1.3.	Préparation de la matrice et des solutions (standards et échantillons)	98
3.1.4.	L'extraction des alcaloïdes	98
3.1.5.	Protocole de préparation de la solution de travail et de déposition	98
3.2.	Développements et optimisation de la méthode	99
3.2.1.	Choix de l'étalon interne	100
	i. Premier essai cocaéthylène.....	100
	ii. Deuxième essai l'émétine	101
	iii. Evaluation et résultats	101
3.2.2.	Performances de la méthode MALDI-TOF-MS pour la quantification	104
	i. Sélectivité	105
	ii. Paramètres de Fidélité	106
	iii. La répétabilité	106
	iv. La reproductibilité.....	107

v.	Linéarité	109
vi.	Limite de détection et limite de quantification	111
vii.	Justesse	112
4.	Application de la matrice en chromatographie sur couche mince couplée à la MALDI. 114	
4.1.	Résultats	115
4.2.	Discussion :	118
4.3.	Conclusion	119
5.	Application de MT3P dans l'imagerie MALDI-MS.	119
6.	Conclusion	122

CHAPITRE IV : SYNTHÈSE ET ÉVALUATION DE NOUVELLES MATRICES BITHIOPHÉNIQUES 125

1.	Introduction	125
2.	Les thiophènes utilisés comme matrices MALDI	126
3.	Synthèse des nouvelles matrices	127
3.1.	Synthèse de matrices bithiophéniques disubstituées par des groupements alkylthio ...	129
3.1.1.	synthèse de la matrice MT3P.	129
3.1.2.	Synthèse des matrices tétrasoufrées analogues de MT3P	130
3.1.3.	Analogue 2,2'-bithiophénique substitué en 3,3'	132
3.2.	Synthèse de matrices bithiophéniques monosubstituées par un groupement alkylthio	133
3.2.1.	Synthèse des matrices bithiophéniques disoufrées	133
3.2.2.	Synthèse de matrices bithiophéniques directement substituées par un groupement électroattracteur.....	134
3.2.3.	Synthèse de dérivés avec espaceur entre le groupement électroattracteur et le bithiophène.....	136
	i. Avec conjugaison.....	136
	ii. Sans conjugaison	140
3.3.	Synthèse de matrices bithiophéniques pentafluorophényle	141
3.3.1.	Synthèse des matrices pentafluorophényle bithiophéniques substituées par du soufre	142
3.3.2.	Synthèse des matrices pentafluorophényle bithiophéniques non substituées par du soufre	142
4.	Evaluation des matrices synthétisées	143
4.1.	Les composés analysés	144
4.2.	Préparation des solutions	144
4.3.	Les paramètres de l'instrument et l'enregistrement des données	145
5.	Premier test de quelques alcaloïdes.....	145
5.1.	Screening des BMs	146
5.2.	Absorbance UV.....	152
6.	Deuxième test : évaluation approfondie.....	156
6.1.	Analyse des composés standards	158
6.2.	Impact de la fragmentation de la matrice.....	161
6.3.	Analyse des alcaloïdes dans des mélanges reconstitués	166
6.4.	Analyse d'extraits bruts de plantes à alcaloïdes.....	167
6.5.	Analyse d'alcaloïdes chez la chenille de <i>Tyria jacobaeae</i>	172
6.6.	Analyse d'alcaloïdes dans un sérum enrichi	173
6.7.	Analyse d'alcaloïdes dans des solutions bioactives commerciales	175
6.8.	Criblage direct de drogues végétales	179
7.	Conclusion	181

CHAPITRE V : APPROCHE MÉCANISTIQUE 185

JABER Ali | Matrices MALDI bithiophéniques spécifiques aux alcaloïdes : étude des mécanismes fondamentaux et applications



1.	Introduction	185
2.	Généralités sur l'ionisation	186
3.	Affinité protonique de la matrice MT3P	186
3.1.	Méthode par calcul	188
3.2.	Méthode cinétique	190
3.3.	Bilan	193
4.	Mécanisme proposé	194
4.1.	L'ionisation primaire	196
4.1.1.	Photoexcitation (ionisation multiphotonique directe).....	197
4.1.2.	Mise en commun d'énergie (energy pooling).....	198
4.1.3.	Ionisation secondaire	200
	i. Transfert d'électron	201
	ii. Transfert de protons (protonation)	201
	iii. Transfert de cations.....	202
5.	Conclusion	204
	CONCLUSION	205
	GENERALE.....	205
	CONCLUSION GENERALE	207
	PARTIE EXPERIMENTALE	211
	BIBLIOGRAPHIE	239

Table des illustrations

Figure I-1 : Principe d'une source MALDI.....	12
Figure I-2 : Spectres ³¹ UV de l'acide sinapique en solution et à l'état solide (solution 32 μM , film 27 $\text{nm}\cdot\text{cm}^{-2}$).	14
Figure I-3 : Structures des matrices courantes (citées dans le tableau précédent).	16
Figure I-4 : Exemples de spectres de masse obtenus en DIOS pour l'analyse de stéroïdes et d'acides aminés. ³⁹	19
Figure I-5 : Couche de graphène.....	20
Figure I-6 : Structure du polymère de silice dopé DHB dans la couche sol-gel ⁶¹	20
Figure I-7 : Analyse SELDI du profil protéomique salivaire d'un sujet sain (haut) et d'un patient présentant un carcinome épidermoïde oral (bas). ⁶⁴	21
Figure I-8 : a) représentation schématique d'une matrice SAM utilisée en SAMDI b) structure de quelques motifs de répétition utilisés ⁶⁵	22
Figure I-9 : Illustration d'une nanoparticule dopée par un ligand de type 4-aminothiophénol ⁷³	23
Figure I-10 : Spectres de masse de l'asparagine obtenus avec une matrice organique classique (CHCA) et des nanofils de TiO_2 ⁷⁸	24
Figure I-11 : Structure de la matrice MPC ⁸⁵	25
Figure I-12 : 2,3,4,5-Tétrakis(3',4'-dihydroxyphényl)thiophène (DHPT).	25
Figure I-13 : Structure de la matrice NEDN.	26
Figure I-14 : (a) l'acide 2-amino-4,5-diphénylfurane-3-carboxylique (b) et l'acide méfénamique.....	26
Figure I-15 : Structures des coumarines testées comme matrice MALDI.	27
Figure I-16 : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique CHCA et ses dérivés ²⁵	27
Figure I-17 : Les structures de DHB et ADHB ⁸⁹	28
Figure I-18 : a) structure de la matrice boronique analogue au CHCA, b) structure de la norépinéphrine, c) spectre de masse montrant l'espèce ionique générée à partir de deux « matrices réactives » interagissant, au niveau des atomes de bore, avec la norépinéphrine pic à $m/z = 530,16 \text{ Da}$. ²⁷	28
Figure I-19 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire.	30
Figure I-20 : Schéma de principe d'un miroir électrostatique, ou réflectron, deux ions ont les mêmes rapports m/z , mais des vitesses initiales différentes.	32

Figure I-21 : Schéma ¹⁰³ du système d'optique ionique avec une trajectoire d'ions en spirale. (TES : Secteur Electrostatiques Toroïdaux).	33
Figure I-22 : La solenopsine, alcaloïde isolé de la fourmi de feu (<i>Solenopsis invicta</i>).	35
Figure I-23 : Structure de a) nicotine, b) (S)-coniine et c) mescaline.	35
Figure I-24 : Structure de la morphine, isolée en 1804 à partir du pavot à opium (<i>Papaver somniferum</i>) ¹¹⁴ . (Source de la photo Wikipédia) ¹¹⁵	36
Figure I-25 : Quelques noyaux de bases des alcaloïdes ¹¹⁹	38
Figure I-26 : Structure du complexe de zinc II utilisé comme sonde fluorescente.....	39
Figure I-27 : SAM utilisée dans la technique DIAMS ¹²⁵	40
Figure I-28 : Précurseur de monocouche DIAMS de structure de triazolobithiophène.	41
Figure I-29 : Structure du MT3P.....	41
Figure II-1 : Structures a) de l'acide caféoylquinique b) (+)-catéchine.	47
Figure II-2. Structures de la berbérine et de la palmatine.	47
Figure II-3. Spectres de masse de la berbérine obtenus en LDI (spectre du haut) et en MALDI en utilisant MT3P comme matrice (celui du bas) ; puissance laser 35% (58,8 µJ). 47	47
Figure II-4 : A- spectre de masse MALDI de la brucine avec les ions $[M-H_2+H]^+$, M^+ et $[M+H]^+$ en utilisant MT3P comme matrice ; puissance laser 35% (58,8 µJ); B- structure du norharmane utilisé comme matrice.	48
Figure II-5 : Histogramme montrant les moyennes d'intensités des pics moléculaires de colchicine analysée avec MT3P dans 3 jours différents. (Moyenne de 6 spectres, avec pour chacun d'entre eux 300 accumulations)	49
Figure II-6 : Représentation schématique du spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex III.	50
Figure II-7 : Illustration de la galette de micro-canaux ¹³⁵	52
Figure II-8 : Dispositif de sublimation adapté en imagerie MALDI ¹³⁹	54
Figure II-9 : Illustration ¹⁴¹ de la technique OASP.....	55
Figure II-10 : Illustration ¹⁴² a) procédé de séchage conventionnel illustrant le flux entraînant l'évaporation au sein de la goutte (figure du haut, flèches vertes) et la tache résultante après séchage dite <i>coffee stain</i> (en bas, à gauche) b) processus de séchage par e-MALDI avec flux interne (figure du haut à droite : flèches rouges) conduisant à un précipité plus petit et plus homogène (en bas, à droite). Image du bas: morphologie d'un spot avec e-MALDI.....	55

Figure II-11 : Moyennes et écarts-types sur les intensités des ions harmine, cocaéthylène et yohimbine obtenus en utilisant MT3P comme matrice et selon trois méthodes de déposition. Intensités moyennes sur 12 spectres de masse ; 150 accumulations/spectre.	57
Figure II-12 : Protocole de préparation et de dépôt de l'échantillon.	57
Figure II-13 : Moyennes pour six spectres des intensités absolues du pic moléculaire de l'analyte (A et C) et des ratios des intensités de l'ion moléculaire de l'analyte et de la matrice I_a/I_m (B et D) pour trois jours non consécutifs (jour 1 en bleu, jour 2 en rouge, jour 3 en vert). (A et B :matrice CHCA) (C et D : matrice MT3P).....	60
Figure II-14 : Illustration représentative pour comprendre le mode d'acquisition.	63
Figure II-15 : Moyenne des intensités normalisées (avec leurs écarts types) pour trois alcaloïdes selon trois modes d'acquisition (900, 300 et 150 tirs).	64
Figure II-16 : Schéma explicatif de l'atténuation de la puissance de laser.	66
Figure II-17 : Spectres de la brucine avec comme matrice MT3P, à différentes énergies du laser : atténuation à 25 % (haut), 30 % (milieu) et 35 % (bas) de puissance.	67
Figure II-18 : Solution à 10 mg.mL^{-1} de MT3P dans (de gauche à droite) un mélange ACN/eau (7/3), acétone, MeOH, DCM et THF.	69
Figure II-19 : Spectres d'absorption UV-visible de MT3P dans différents solvants.....	71
Figure II-20 : Schéma simplifié du procédé d'enduction centrifuge. (photo Wikipédia consulté le 20/05/2017) ¹⁶¹	72
Figure II-21 : Spectre d'absorption UV-visible de MT3P à l'état solide.	73
Figure II-22 : Relation entre solvant et l'aire du pic d'analyte (bradykinine) ¹⁶³	74
Figure II-23 : Spectres enregistrés pour un échantillon préparé avec le DCM. (*pics de matrice)	75
Figure II-24: Scores dans le plan des deux premières composantes principales obtenus par calcul ACP de données d'analyse de différents solvants (variables) issues de 100 échantillons décrits par le code couleur indiqué sur la gauche.....	76
Figure II-25 : Histogramme représentant la variation des intensités brutes pour trois alcaloïdes (moyenne des intensités absolues de 20 mesures) en utilisant trois différents solvants pour la matrice avec les écarts types. (Rq : pour des raisons de visualisation les valeurs de pilocarpine sont multipliées par 10).....	78
Figure II-26 : Histogramme représentant la variation des intensités normalisées pour trois alcaloïdes (moyenne des intensités absolues de 20 mesures) en utilisant trois différents	

solvants pour la matrice avec les écarts types. (Rq : pour des raisons de visualisation les valeurs de pilocarpine sont multipliées par 10).....	79
Figure II-27 : Histogrammes des moyennes avec les écart-types des intensités	84
Figure II-28 : Dépôts d'échantillon de yohimbine avec MT3P (10 mg.mL ⁻¹) dans différents solvants.....	84
Figure III-1 : Différentes fonctions des métabolites secondaires des plantes (traduit de l'anglais) ¹⁶⁷	89
Figure III-2 : Consommation de temps en fonction des différentes parties de la méthode d'analyse.....	90
Figure III-3 : De gauche à droite <i>Datura stomanium</i> , <i>Atropa belladonna</i> et <i>Hyoscamus niger</i> . (Source de photo Wikipedia.org)	91
Figure III-4 : Le colchique (<i>Colchicum autumnale</i>). (Source photo : www.panoramio.com)	92
Figure III-5 : Genêt à balais (détail de la fleur) (Source: www.ethnobotanical.info)	93
Figure III-6 : Les fleurs de <i>Senecio vulgaris</i> . (Source : Wikipedia.org).....	93
Figure III-7 : Écorces de quinquina rouge. (Source : www.herboristerie.com/produits/quinquina-rouge-en-vrac/).....	94
Figure III-8 : Protocole de préparation et de dépôt des solutions à analyser.....	99
Figure III-9 : Structure chimique de l'émétine et photo de la plante ipéca. (Source de la photo : www.toxiplante.fr)	101
Figure III-10: Spectre de masse d'extrait de belladone en utilisant cocaethylene comme étalon interne.	102
Figure III-11 : Droites d'étalonnage pour le dosage de la scopolamine et de l'hyoscyamine en utilisant le cocaéthylène comme étalon interne.....	102
Figure III-12 : Spectre de masse de l'extrait de <i>C. autumnale</i> (0,7 mg/mL dans le DCM) avec l'émétine comme étalon interne. (300 accumulations, laser 35 % (58,8 µJ)). (* : ions de matrices)	103
Figure III-13 : Spectre de masse de la sénécionine obtenu avec l'émétine comme étalon interne (150 accumulations, puissance laser 35 % correspondant à 58,8 µJ).....	103
Figure III-14 : Courbe d'étalonnage (ratios des intensités en fonction de la concentration) d'hyoscyamine en utilisant l'émétine comme étalon interne.....	104
Figure III-15 : Spectre MALDI-MS de la matrice MT3P sans aucun analyte. (* = pic généré par la plaque).	106
Figure III-16 : Tracé de la droite d'étalonnage de la colchicine.	108

Figure III-17 : Courbes d'étalonnages des ratios des intensités en fonction de la concentration des quatre alcaloïdes en utilisant l'émétine comme étalon interne.....	111
Figure III-18 : Structures chimiques des trois arborescidines analysées par CCM-MALDI-MS.....	114
Figure III-19 : Spectres de l'extrait de belladone en CCM-MALDI (somme de 120 tirs) de haut en bas : en utilisant CHCA (laser 60 %), avec MT3P (laser 30 %) et le dernier sans matrice (laser 60 %) ; *= pics correspondants aux ions de la matrice.....	116
Figure III-20 : Structures chimiques des alcaloïdes détectés dans l'extrait de quinquina.	116
Figure III-21 : Spectres d'extrait de quinquina en CCM-MALDI (somme de 90 tirs) de haut en bas : sans matrice (laser 60 %), avec CHCA (laser 30 %) et MT3P (laser 30 %) comme matrice ; *= pics correspondants aux ions de la matrice.....	117
Figure III-22 : Spectre de masse du spot de cocaéthylène obtenue par CCM-MALDI et MT3P comme matrice	118
Figure III-23 : Imagerie par spectrométrie de masse ²³¹	120
Figure III-24 : Images moléculaires reconstruites de la répartition de scopolamine au sein de la coupe de tige de <i>Datura stramonium</i> . À gauche, acquisition avec la matrice MT3P. À droite, acquisition avec CHCA.	121
Figure IV-1 : Position des bandes d'énergie pour un isolant, un semi-conducteur et un métal.	126
Figure IV-2 : Comparaison des spectres MALDI-MS d'une protéine en utilisant les matrices CHCA (bleu) et son ester propylique (rouge). ⁴⁴	139
Figure IV-3 : Protocole de préparation et de déposition des échantillons.	145
Figure IV-4 : Spectre de masse de la pilocarpine analysée par MALDI avec la matrice 15 (spectre A) et la matrice 28 (spectre B); puissance laser 50 % (78,0 µJ) et 35% (58,8 µJ) respectivement ; hormis les pics d'analyte (avec astérisque), tous les autres sont des pics des matrices.	148
Figure IV-5 : Spectre MALDI de la strychnine obtenu avec la matrice 17 ; puissance laser 30 % (52,4 µJ).....	148
Figure IV-6 : Diagramme des moyennes pour les sommes des intensités des ions moléculaires de 32 alcaloïdes analysés par MALDI, avec les matrices MT3P et son dérivé estérifié; valeurs des moyennes / 1000, en unité arbitraire (u.a.) ¹⁶	149
Figure IV-7 : Spectres UV de certaines BMs.....	154
Figure IV-8 : Spectres d'absorption des matrices 2 et 10-d (à gauche) et 13 et 15 (à droite).....	156

Figure IV-9 : Structures des analytes testés.	157
Figure IV-10 : Structures des matrices sélectionnées pour la deuxième phase de tests. .	158
Figure IV-11 : Spectre de la matrice CHCA analysée en LDI (A) ; harmine analysée avec CHCA comme matrice (B). Puissance laser 35% (58,8 μ J).....	162
Figure IV-12 : Spectres LDI des matrices PFPT3P (bas) et CHCA (haut); puissance laser 35% (58,8 μ J).....	163
Figure IV-13 : Spectres de masse de la pilocarpine analysée par MALDI, avec la matrice PFPT3P (haut) et CHCA (bas) ; *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	164
Figure IV-14 : Clivages principaux des BMs.	165
Figure IV-15 : Spectres d'analyse MALDI de l'extrait brut des bulbes de <i>C. autumnale</i> en utilisant PFPT3P (haut) et CHCA (bas) comme matrices ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	168
Figure IV-16 : Structures des alcaloïdes minoritaires de <i>C. autumnale</i>	169
Figure IV-17 : Spectre MALDI-MS de l'extrait DCM de <i>C. autumnale</i> en utilisant PFPT3P comme matrice et montrant la colchicine et un ou plusieurs des isomères suivants : 2- ou 3-déméthyl-démécolchicine (I), <i>N</i> -désacétyl- <i>N</i> -formylcolchicine, 2- ou 3-déméthylcolchicine (II). *=ions de matrice PFPT3P ; puissance laser 35% (58,8 μ J).....	169
Figure IV-18 : Spectres MALDI de l'extrait brut de <i>Cytisus scoparius</i> analysé avec PFPT3P (haut) et avec CHCA (bas). *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	170
Figure IV-19 : Spectre de masse de l'extrait de <i>Senecio vulgaris</i> , analysé par MALDI utilisant la matrice PFPT3P. *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	171
Figure IV-20 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés dans l'extrait de <i>Senecio vulgaris</i> par MALDI en utilisant PFPT3P comme matrice.	171
Figure IV-21 : La chenille et le papillon <i>Tyria jacobaea</i> . (Source http://aramel.free.fr/INSECTES13ter-5'.shtml , consulté le 25/04/2017)	172
Figure IV-22 : Spectre MALDI de l'extrait méthanolique de chenilles <i>Tyria jacobaea</i> en utilisant PFPT3P comme matrice. *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J)....	173
Figure IV-23 : Spectres MALDI avec PFPT3P de sérums non dopé (haut) et enrichi en strychnine à une concentration de 16 μ g.mL ⁻¹ (bas) ; puissance laser 40 % (65,2 μ J)....	174
Figure IV-24 : Illustration de deux solutions analysées.	175
Figure IV-25 : Structure et formule chimique de l'icaridine.	176
Figure IV-26 : Spectre MALDI des solutions de Rytmopasc® en LDI (A), en utilisant CHCA (B) et PFPT3P (C) comme matrice et visualisation du pic de spartéine à m/z = 235,88 Da. *= pics des matrices ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	177

Figure IV-27 : Structure de la rubijervine et spectre MALDI avec PFPT3P comme matrice montrant son pic dans une solution de Rytmopasc [®] (A). Spectre LDI de la même solution (B) ; puissance laser 35% (58,8 µJ).	178
Figure IV-28 : Structure de la vératridine et spectre MALDI avec PFPT3P comme matrice (en haut) montrant son pic dans une solution de Rytmopasc [®] . Spectre LDI de la même solution (en bas) ; puissance laser 35% (58,8 µJ).	178
Figure IV-29 : Spectre de masse MALDI d'une solution d'Autan [®] obtenu avec PFPT3P. * = ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 µJ).	179
Figure IV-30 : Spectres MALDI avec PFPT3P des poudres de plantes pulvérisées: la belladonne (haut) et <i>Senecio vulgaris</i> (bas). * = ions de la matrice ; puissance laser 35% (58,8 µJ).	180
Figure IV-31 : Spectres MALDI des extraits de belladonne (en haut) avec MT3P et <i>Senecio vulgaris</i> (en bas) avec PFPT3P. * = ions de la matrice ; puissance laser 35% (58,8 µJ). ..	180
Figure V-1 : Spectre des ions fils des dimères de la matrice MT3P avec l'aniline à une énergie de collision de 10 eV.	191
Figure V-2 : Logarithmes des ratios des produits de la dissociation des ions des dimères [A—H—B] ⁺ sur les AP des bases de référence pour une énergie de collision de 10 eV.	192
Figure V-3 : Représentation de la densité relative du plumeau en fonction de son temps d'expansion. Illustration des échelles de temps des deux phases d'ionisation ¹⁴⁷	194
Figure V-4 : Spectres LDI de MT3P en mode négatif (A) et positif (B). Les pics à $m/z = 335,03$ (spectre A) et $m/z = 312,15$ et $351,18$ (spectre B) sont des adduits de la matrice (avec un groupement méthyle et propionitrile). (150 accumulations, énergie du laser = 42,2 µJ).	195
Figure V-5 : Structures proposées des fragments les plus intenses en mode positif.	195
Figure V-6 : Massif isotopique du pic moléculaire de la matrice MT3P avec la distribution isotopique calculée (sur le site/www.sisweb.com) pour la molécule de formule C ₁₂ H ₁₁ NS ₄	196
Figure V-7 : Schéma de l'ionisation simple photon et ionisation multiphotonique à deux photons.	198
Figure V-8 : Illustration des processus unimoléculaire et bimoléculaire selon le modèle "pooling/photo-ionisation" d'après la littérature ³⁰²	199
Figure V-9 : Influence de l'effet mésomère attracteur du nitrile sur l'acidité du proton en position α.	201

Figure V-10 : Spectre d'émétine en utilisant MT3P comme matrice et avec ajout de NaI (5 mg.mL⁻¹). (150 accumulations, énergie du laser : 42,2 μJ en mode positif)202

Figure V-11 : Moyennes (*quadruplicate*) des intensités de pic [A+H]⁺ pour cinq alcaloïdes selon une préparation avec et sans ajout de NaH₂PO₄ (5 mg.mL⁻¹). (300 accumulations /spectre, matrice MT3P, énergie du laser : 42,2 μJ en mode positif)203

Figure 12 : Extraction des alcaloïdes par l'eau acide.215

Table des tableaux

Tableau I-1 : Les différentes techniques de désorption/ionisation.....	11
Tableau I-2 : Liste de quelques matrices commerciales ³³	15
Tableau II-1 : Différentes méthodes de préparation d'échantillons selon la nature des composés analysés.	45
Tableau II-2 : Les rapports des résultats entre les trois jours en utilisant la matrice MT3P.	61
Tableau II-3 : CV obtenus selon les trois modes d'acquisition.	64
Tableau II-4 : Solubilité de MT3P dans chaque solvant avec quelques caractéristiques importantes des solvants.....	69
Tableau II-5 : Maxima d'absorption (en nm) et coefficients d'extinction molaire	71
Tableau II-6 : Intensités moyennes normalisées des alcaloïdes et les écarts-types.	82
Tableau II-7 : Résultats du test de Cochran pour les trois méthodes et valeur critique tabulée.....	82
Tableau II-8 : Ecart types de répétabilité calculés pour les trois méthodes.	82
Tableau II-9 : Résultats du ratio pour les deux méthodes et valeur tabulée de Fisher....	83
Tableau II-10 : Options adoptées	85
Tableau III-1 : Vue d'ensemble sur les plantes toxiques étudiées, leurs toxines et toxicologie. Class I a: extrêmement dangereux; Ib: très dangereux;; II: modérément dangereux; III: danger faible. IN=inflammatoire; CT= cytotoxique; NT= neurotoxique; HP= poison cardiaque, MA= psychotrope (mind altering)(traduit de l'anglais) ¹⁶⁷	95
Tableau III-2 : Les alcaloïdes principalement connus dans les plantes étudiés.	96
Tableau III-3 : RSD (%) des essais inter et intra-journaliers obtenus avec l'extrait de <i>Datura stramonium</i>	107
Tableau III-4 : Concentrations en colchicine et RSD (%) correspondants	109
Tableau III-5 : Données de linéarité et coefficients de corrélation.	111
Tableau III-6 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des alcaloïdes analysés.	112
Tableau III-7 : Test de recouvrement pour le dosage de la scopolamine dans un extrait de datura.	113
Tableau IV-1 : Matrices thiophéniques et applications.....	127

Tableau IV-2 : Rapports r des intensités des ions moléculaires ou pseudomoléculaires des alcaloïdes obtenues le même jour en utilisant une matrice bithiophénique et CHCA ($r = I_{BM}/I_{CHCA}$), et valeur moyenne.	151
Tableau IV-3 : Coefficients d'extinction molaire ϵ à 337 nm, maxima d'absorption λ_{max} des matrices, et conditions d'enregistrement des spectres MALDI des alcaloïdes (pourcentage de puissance et énergie du laser).	154
Tableau IV-4 : Tableau récapitulatif des composés analysés par MALDI avec différentes BMs et matrices commerciales à une énergie de laser de 35 % (58,8 μ J) ;	159
Tableau IV-5 : Scores MSE de PFPT3P et de CHCA.	165
Tableau IV-6 : Étude de répétabilité en utilisant deux solvants différents avec PFPT3P comme matrice (les valeurs représentent les intensités normalisées) ; puissance laser 35% (58,8 μ J).	167
Tableau IV-7 : Rapports signal sur bruit S/N (moyennes pour 3 spots) à différentes concentrations de strychnine dans le sérum en utilisant PFPT3P comme matrice.	174
Tableau V-1 : Valeurs des pKa des alcaloïdes dans l'eau ³¹⁸	188
Tableau V-2 : AP et EI déterminées par calcul selon la méthode hybride B3LYP avec la base 6-311+G(2d,2p).	189
Tableau V-3 : Valeurs des affinités protoniques des bases de référence ³²⁵	192
Tableau V-4 : Détermination par calcul et expérimentale de l'AP de deux matrices selon Schultz ³²⁷ (en KJ.mol ⁻¹).	193
Tableau V-5 : Énergies de photons selon le type de laser (*=néodym-yttrium aluminium garnet).	197
Tableau V-6 : Énergie d'ionisation de certaines matrices ³⁰⁸ (*= acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque).	197

Table des schémas

Schéma III-1 : Synthèse du cocaéthylène ¹⁹⁹	100
Schéma IV-1: Les deux séries de matrices bithiophéniques synthétisées.	129
Schéma IV-2 : Synthèse de la matrice MT3P.	129
Schéma IV-3 : Protocole général de déprotection et fonctionnalisation d'un groupement thiolate.....	130
Schéma IV-4 : Synthèse de la matrice 4	131
Schéma IV-5 : Synthèse des matrices tétrasoufrées nouvelles 5-9	132
Schéma IV-6 : Synthèse de la matrice 10-d	133
Schéma IV-7 : Synthèse des matrices trisoufrées 11 et 12	133
Schéma IV-8 : Formylation du bithiophène selon Vilsmeier-Haack.....	135
Schéma IV-9 : Méthylation et formylation du bithiophène conduisant aux cibles 14 et 15	135
Schéma IV-10 : Oxydation du formylbithiophène 13 . ²⁵⁶	135
Schéma IV-11 : Synthèse de la matrice bithiophénique halogénée 17	136
Schéma IV-12 : Obtention du bromoformylbithiophène 18	136
Schéma IV-13 : Synthèse de la matrice cyanoacétique 19 ²⁶²	137
Schéma IV-14 : Synthèse du DCV 20 . ²⁵³	137
Schéma IV-15 : Synthèse de l'ylure de phosphore nitrilé 21-b	138
Schéma IV-16 : Synthèse du mononitrile 21-c	138
Schéma IV-17 : Préparation du diacide 22 par condensation de Knoevenagel avec l'acide malonique.	138
Schéma IV-18 : Synthèse de la matrice 23-c par une réaction de Wittig.	139
Schéma IV-19 : Obtention du diester 24 . ²⁶⁶	140
Schéma IV-20 : Hydrogénation de la matrice 21-c	140
Schéma IV-21 : Synthèse de la matrice 26 . ²⁶⁶	140
Schéma IV-22 : Méso-tétrakis(pentafluorophényl)porphyrine	141
Schéma IV-23 : Synthèse des dérivés pentafluorophényle 27 et 28	142
Schéma IV-24 : Synthèse de l'ylure de phosphore pentafluoré 29-b	143
Schéma IV-25 : Réaction de Wittig menant au bithiophène 29-c	143
Schéma IV-26 : Matrice bithiophénique comportant une fonction ester testée par Tsagué Kenfack ¹⁶	149

Schéma V-1 : Structure de MT3P et les sites ciblés (en rouge) pour le calcul de l'affinité protonique.....189

Schéma V-2 : Affinités protoniques des quelques amines tertiaires³²¹.....189

Principales abréviations

A	ACN	Acétonitrile
	AcOEt	Acétate d'éthyle
	AP	Affinité protonique
	ASE	Analyte Suppression Effect
B	BMs	Bithiophenic Matrices
C	CCM	Chromatographie sur Couche Mince
	CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
	CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
D	DCM	Dichlorométhane
	DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
	DMF	Diméthylformamide
E	EtOH	Ethanol
	Éq	Equivalent
	EP	Ether de pétrole
	Et ₂ O	Diéthyle éther
	ESI	Electrospray Ionization
L	LDI	Laser Desorption Ionization
	HABA	Acide 2-(4-hydroxyphénylazo) benzoïque
	NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimide
M	MALDI-MSI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging
	MeOH	Methanol
	MSE	Matrix Suppression Effect
	MT3P	3-(5'-(méthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio) propanenitrile
N	NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
R	rdt	Rendement
	RMN	Résonance magnétique nucléaire
T	THF	Tétrahydrofurane
	TOF	Time-Of-Flight
	TA	Température Ambiante
	TFA	Acide trifluoroacétique

Introduction générale

Introduction générale

La spectrométrie de masse (MS) est une technique d'analyse qui a connu un énorme développement en particulier en raison de ses applications à une vaste gamme d'échantillons biologiques, et de composés d'intérêt, tels que sucres¹, lipides², peptides et protéines³, nucléotides et nucléosides⁴ pour ne citer que les groupes de biomolécules les plus importants. C'est aussi une méthode essentielle pour l'analyse des métabolites secondaires qui peut, lorsqu'elle est couplée à des techniques chromatographiques adaptées⁵, fournir des informations qualitatives et quantitatives fiables.

Durant les dernières décennies, la MS moderne a évolué rapidement en raison de nombreux facteurs, mais surtout grâce au développement de deux méthodes « douces » d'ionisation : l'électrospray⁶ d'une part et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI = *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*) d'autre part⁷ générant relativement peu de fragments. Celles-ci ont eu un impact considérable dans de nombreux domaines et plus particulièrement dans celui de l'analyse des macromolécules, biologiques ou non.

Généralement regroupés sous la dénomination de « produit naturels », les métabolites secondaires constituent un groupe de 270 000 composés⁸ et ont à plus de 80 % d'origine végétale⁹. Ils sont aussi issus d'algues et de champignons microscopiques, ou pour une part plus minime d'animaux. Ils ont été étudiés pour leurs potentialités thérapeutiques, leur intérêt dans les domaines de la cosmétologie, de la parfumerie, de l'agrochimie ou bien encore de l'agro-alimentaire. Ainsi plus de 60 % des médicaments anticancéreux sont des produits naturels ou des dérivés hémisynthétiques obtenus à partir de ces derniers^{10,11}. La vinflunine (Javlor®) est par exemple un agent anticancéreux fluoré obtenu à partir des alcaloïdes de la pervenche tropicale¹². La recherche de nouveaux composés bioactifs est cependant complexe et lente. Elle inclut des étapes d'isolement, de purification, et d'élucidation structurale qui précèdent généralement les évaluations biologiques¹³. La chromatographie couplée à la spectrométrie de masse est souvent utilisée au cours de ces études. Les constituants d'un mélange complexe sont alors séparés et la comparaison des temps de rétention, des profils UV et des valeurs m/z relevés permet généralement d'identifier les composés déjà présents dans les bases. Cette méthodologie, le plus souvent associée à l'anglicisme d'« analyses déréplicatives » s'est considérablement développée avec l'utilisation de la MS tandem (MS/MS). Cette dernière technique consiste à sélectionner un

ion par une première MS, à le fragmenter, puis à effectuer une seconde MS sur les fragments ainsi générés. Toutefois, la séparation par des méthodes chromatographiques implique une préparation longue et éventuellement coûteuse de l'échantillon. Elle nécessite de plus un temps de développement d'une méthode spécifique.

Les chercheurs du domaine ont ainsi été conduits à développer des nouvelles techniques permettant l'identification directe des produits naturels à partir des extraits bruts, en évitant dans une très large mesure l'isolement de composés déjà connus^{14,13}. L'analyse des extraits des plantes ou des milieux biologiques complexes (plasma ou même coupe de tissus) par MALDI-TOF-MS, (TOF pour *time of flight*) qui peut fournir des données comparables à celles de la LC-MS avec une préparation des échantillons beaucoup plus simple, et plus courte, peut présenter un intérêt potentiel. Ainsi, ces mélanges peuvent aussi être analysés à partir d'une quantité infime d'échantillon, et sans séparation préalable.

L'analyse des métabolites secondaires par spectrométrie de masse nécessite leur ionisation qui, dans la technique MALDI, est obtenue par le biais d'une irradiation laser. Une matrice ajoutée à l'analyte protège de plus ce dernier, tout en favorisant à la fois sa vaporisation et son ionisation par transferts de charge. Contrairement à l'électrospray, cette méthode d'ionisation produit principalement des ions monochargés. Les lasers les plus couramment utilisés opérant dans l'UV, les matrices qui doivent elles-mêmes être aisément volatilisables, sont de petites molécules présentant un chromophore adapté à la longueur d'onde du faisceau employé. Parmi la gamme étendue de dérivés répondant à ces critères, le choix précis d'une matrice demeure toutefois complexe et bien souvent empirique.

Dans le cadre de l'analyse MALDI de métabolites secondaires, un nouveau concept a été proposé dans notre unité de recherche : l'utilisation de matrices spécifiques à certaines familles de produits naturels. Ainsi, contrairement aux matrices usuelles, les matrices bithiophéniques fonctionnalisées développées au laboratoire montrent une spécificité réelle pour les alcaloïdes¹⁵. Ces derniers peuvent donc être mis en évidence dans des mélanges complexes, sans aucun traitement préalable. Le travail de thèse présenté dans ce mémoire repose sur cette expertise du laboratoire, plus particulièrement développée lors de travaux collaboratifs menés avec l'UMR CNRS MolTech Anjou¹⁶. L'objectif de ce travail était donc d'étudier les mécanismes fondamentaux mis en jeu lors de l'analyse par MALDI-MS des alcaloïdes en présence de matrices bithiophéniques fonctionnalisées. À côté de cet aspect fondamental, il convenait également de mettre en place et de valider une méthode de dosage spécifique de différents alcaloïdes d'intérêt dans différents échantillons complexes tels que des extraits bruts de plantes ou des fluides

biologiques. Les alcaloïdes sont en effet des métabolites secondaires auxquels sont associées de nombreuses activités pharmacologiques. À ce titre, ils peuvent également présenter des effets biologiques particulièrement néfastes qui nécessitent une prise en charge médicale rapide. Leur détection dans les fluides biologiques, par une méthode simple et rapide présenterait donc un intérêt majeur en toxicologie d'urgence.

Ce manuscrit est divisé en cinq chapitres :

Le **chapitre I** présentera une étude bibliographique concernant la technique MALDI en général, ses avantages, ses inconvénients et les principales méthodes alternatives connues à ce jour. Nous présenterons également l'état de l'art des matrices et une généralité sur les alcaloïdes avant de terminer avec les contributions des équipes angevines dans la technique MALDI.

Afin de réaliser toutes ces analyses par MALDI, il convenait tout d'abord d'optimiser et de valider le protocole appliqué dans l'ensemble des études.

Le **deuxième chapitre** décrira donc l'étude de la relation « méthode de préparation /résultats » ayant conduit à valider un protocole efficace d'analyse, adapté à l'objectif de l'étude.

Le **troisième chapitre** de la thèse consistera à développer et étendre le champ des applications possibles de cette nouvelle matrice. La mise au point d'une méthode de dosages des alcaloïdes par MS dans des milieux complexes (extraits végétaux, fluides biologiques) et sans prétraitement préalable a été étudiée dans un premier temps. L'utilisation de matrices bithiophéniques fonctionnalisées pour réaliser des analyses en CCM-MALDI et en imagerie constitue un autre champ d'étude.

Le **quatrième chapitre** sera consacré à la synthèse et à l'évaluation de nouveaux composés bithiophéniques. Ces molécules seront synthétisées de manière à évaluer les facteurs favorisant l'interaction avec les alcaloïdes de façon à optimiser MT3P, la matrice bithiophénique mise au point au laboratoire lors des études antérieures précédemment citées. Cinq nouvelles matrices retenues par un premier criblage feront ainsi l'objet d'une étude plus détaillée.

Le **dernier chapitre** regroupera quant à lui les résultats obtenus dans l'étude de mécanismes fondamentaux, notamment en termes de paramètres thermodynamiques de la matrice MT3P. Les résultats de l'étude théorique et leur validation expérimentale seront présentés, ce qui permettra de proposer des hypothèses expliquant la sélectivité de la matrice bithiophénique fonctionnalisée pour les alcaloïdes.

Chapitre I : Études bibliographiques

Chapitre I : Études bibliographiques

1. Spectrométrie de masse MALDI

1.1. Introduction

La MS est une technique basée sur l'analyse de formes ioniques en phase gazeuse. Un spectre de masse, selon une échelle d'intensités relatives, présente ainsi une distribution de rapports entre la masse moléculaire m des ions générés dans l'instrument et leur charge z , noté m/z , dont on déduira les formules brutes et, éventuellement les structures.

Selon les propriétés de la molécule à ioniser et de son environnement, différents types d'ionisation sont accessibles. Le choix du principe physique capable de volatiliser et d'ioniser le composé étudié est alors fonction des caractéristiques intrinsèques de ce dernier. Parmi les principaux critères de choix, on citera :

- la volatilité et la stabilité thermique du composé à analyser,
- sa labilité chimique,
- les fonctions chimiques présentes et leur aptitude à induire une ionisation,
- la masse molaire des molécules,
- le type d'introduction souhaitée (directe ou par couplage chromatographique).

Nous nous intéresserons plus particulièrement à la technique d'ionisation MALDI, objet de ces travaux de thèse.

1.2. La technique MALDI

Le MALDI-MS est une technique introduite simultanément en 1988 par Karas et Hillenkamp¹⁷ en Allemagne d'une part, et par Tanaka¹⁸ (Prix Nobel de chimie en 2002) au Japon, d'autre part. Le MALDI appartient aux techniques d'ionisations dites « douces » qui produisent des fragmentations limitées. Dans son principe, le MALDI est basé sur la technique de désorption/ionisation par laser (LDI) qui est plus ancienne. Grâce à une large gamme d'application « biologiques » allant de la protéomique à l'imagerie, en passant par la reconnaissance de micro-organismes, cette technique est aujourd'hui très largement répandue.

1.2.1. Du LDI au MALDI

Avant tout, les techniques de désorption d'ions, dont LDI et MALDI font partie, ont été développées afin de pouvoir analyser des composés présentant de faibles tensions de vapeur ou un caractère de thermolabilité marqué. Le principe¹⁹ de la LDI ou laser désorption/ionisation consiste à bombarder l'échantillon d'une surface ou d'une matrice solide ou liquide par un faisceau incident de photons, ce qui conduit à l'éjection des molécules chargées destinées à être analysées, le plus souvent par un analyseur à temps-de-vol (TOF, pour time-of-flight) qui, comme son nom l'indique, permet de mesurer pour un ion donné le temps du parcours entre la source d'ionisation et le détecteur du spectromètre de masse.

Parmi ces méthodes de désorption/ionisation (Tableau I-1), on peut citer en premier lieu la désorption d'ions utilisant une ionisation secondaire (SIMS, pour *Secondary Ion Mass Spectrometry*)²⁰ très utile pour les études des surfaces. De fait, cette méthode est largement utilisée en analyse des solides (cartographie des alliages, localisation des impuretés). Dans la désorption de champ²¹, (FD pour *Field Desorption*) l'échantillon est tout d'abord déposé sur un filament recouvert d'aiguilles de carbone. Ensuite sous l'effet de chauffage et de la mise sous tension du filament, les ions générés migrent sur les aiguilles de carbone et où ils sont désorbés. Cette technique est relativement « douce » et permet d'obtenir des ions parents de molécules thermolabiles. Toutefois, elle est relativement délicate à mettre en œuvre et elle est pratiquement abandonnée à ce jour²⁰.

Dans la désorption de plasma (PDMS pour *Plasma Desorption Mass Spectrometry*), le solide analysé est bombardé par des particules issues de la fission d'un élément radioactif. Cette source est plus particulièrement utilisée lors des analyses de molécules organiques ou biologiques de masse moléculaire très élevée.

La développement des sources FAB²² (pour *Fast Atom Bombardment*) a apporté la première technique de désorption/ionisation douce permettant d'accéder à l'analyse de molécules polaires de masses s'élevant jusqu'à 2000 Da. L'ionisation réalisée au moyen d'un faisceau d'atomes rapides conduit par (dé)protonation à la formation d'ions quasi-moléculaires monochargés, et/ou par cationisation à celle d'adduits également monochargés.

Année d'apparition	Technique	Nature du faisceau incident (agent ionisant)	Remarque
1949	SIMS	Ions de quelques keV	Présence de pics de fragmentation
1960	FD	Electrodes à haut potentiel	Field Desorption
1968	LDI	Photons (UV/visible/IR)	Présence de pics de fragmentation
1976	PDMS	Particules de fission d'un élément radioactif	X
1981	FAB	Atomes neutres de quelques keV	X
1988	MALDI	Photons (UV/visible/IR)	X

Tableau I-1 : Les différentes techniques de désorption/ionisation.

En désorption/ionisation laser (LDI), la désorption et l'ionisation sont réalisées simultanément en irradiant avec un faisceau de laser pulsé de type UV, visible ou IR un échantillon sous forme d'un dépôt solide placé sur une plaque conductrice. La forte puissance de laser nécessaire à la désorption/ionisation des échantillons entraîne cependant une importante probabilité de fragmentation de la molécule rendant impossible la détection des ions quasi-moléculaires. La LDI est donc limitée à l'analyse des molécules les moins fragiles. Différentes modifications des conditions expérimentales, comme l'utilisation de glycérol ou d'oxyde de fer²³ ont par la suite tenté de pallier ces problèmes de fragmentation et ont permis d'étudier des molécules de haut poids moléculaires, ce qui aboutira finalement au développement de la technique MALDI.

L'apparition du MALDI apporte en effet une solution efficace et généralisable aux problèmes de fragmentation moléculaire. Alors qu'en FAB l'analyte est dilué dans une matrice organique, le plus souvent représentée par du glycérol, il est en MALDI co-cristallisé avec une molécule de faible PM absorbant fortement à la longueur d'onde du laser utilisé et le protégeant donc d'une irradiation directe. Ces molécules particulières jouent le rôle de matrices, et leurs caractéristiques seront abordées dans une autre partie de ce chapitre.

1.2.2. Principe général d'une source MALDI

Le principe du MALDI (Figure I-1) est semblable celui du FAB en ce sens qu'une solution de matrice et d'analyte, typiquement dans un ratio analyte/matrice d'environ 1/10000, est déposée sur un porte-échantillon. Ce support solide qui représentera la cible du laser est constitué d'une plaque métallique conductrice et résistante aux solvants, donc le plus souvent fabriquée en acier inoxydable. L'application d'une différence de potentiel élevée permettra une accélération adéquate des ions en sortie de source. L'évaporation du solvant fait apparaître au niveau des micro-puits de la plaque des dépôts solides formés de micro-cristaux de matrice au sein du

réseau cristallin desquels sont, au moins en partie, inclus les analytes. L'irradiation de ce dépôt par le faisceau laser conduit à l'absorption des photons par les molécules de matrice, et à l'excitation électronique de celles-ci. La relaxation de l'énergie au sein du solide se traduit par une éjection de matière (plume) qui se dilue progressivement sous vide (expansion). Plusieurs types de particules sont éjectées : une grande quantité est constituée de particules neutres accompagnées d'ions positivement ou négativement chargés qui, après accélération seront séparés en fonction de leur rapport m/z par l'analyseur du spectromètre. Les molécules de matrices utilisées jouent dans ce cas un rôle primordial en initiant le processus de désorption/ionisation laser, et en protégeant l'échantillon vis-à-vis d'une irradiation hautement énergétique. Le laser utilisé (traditionnellement monochromatique UV) émet des photons à une longueur d'onde qui permet d'exciter la matrice. La technique MALDI est généralement couplée à un analyseur en temps de vol ou TOF, parfaitement adapté à la séparation d'ions produits de façon impulsionnelle.

Le phénomène de désorption/ionisation demeure toujours un processus complexe et mal compris. De plus amples détails le concernant seront abordés ultérieurement dans le chapitre suivant.

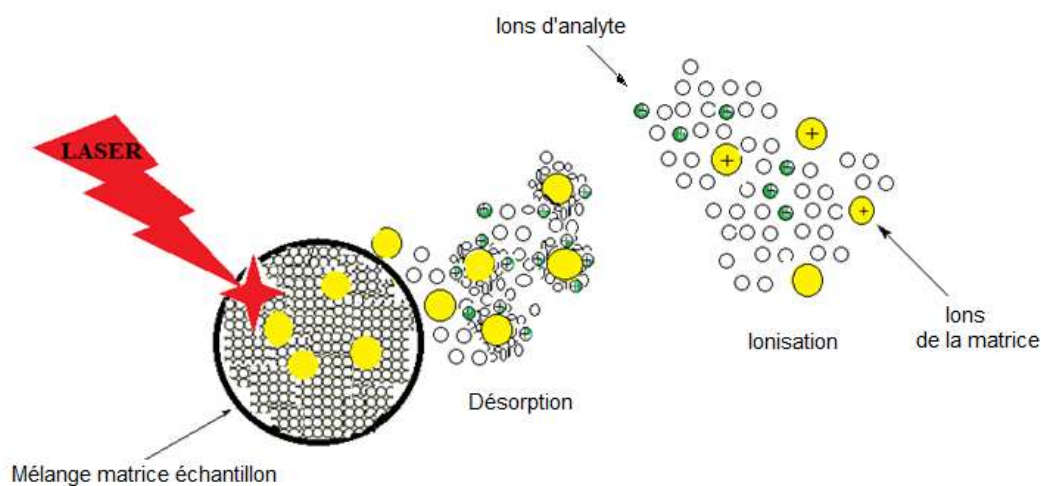


Figure I-1 : Principe d'une source MALDI.

La puissance de cette méthode réside dans la possibilité d'analyser une large variété d'échantillons ayant des natures, gammes de masses et polarités différentes. La source MALDI permet d'analyser aussi bien des solides inorganiques que des molécules organiques ou biologiques.

1.3. Les matrices

1.3.1. État de l'art

Les mécanismes régissant les processus de désorption-ionisation intervenant au cours du phénomène MALDI restent pour une large part mal connus. Ainsi, la sélection de « la première génération » de matrices a été principalement fondée sur des méthodes empiriques, les propriétés thermochimiques de ces molécules apparaissant expérimentalement difficiles à obtenir. Aujourd'hui, si plusieurs centaines de petites molécules, caractérisées par des faibles masses molaires et une absorption élevée à la longueur d'onde du laser utilisé²⁴ ont été testées, seules quelques-unes sont d'usage courant. Pour « la deuxième génération » de matrices, les structures des matrices préalablement retenues ont été systématiquement modifiées, en faisant varier - à l'image de la pharmacomodulation moléculaire développée en chimie thérapeutique - la nature, le nombre et la position de leurs groupes fonctionnels²⁵. L'objectif était d'obtenir une meilleure compréhension de la façon dont les processus physico-chimiques indispensables pour la matrice et l'ionisation de l'analyte sont affectés par la structure moléculaire de la matrice. Ces études ont marqué une grande étape dans le développement des matrices et la création de composés optimisés. La « troisième génération » est celle sur laquelle porte nos travaux, c'est à dire celle de matrices permettant l'ionisation sélective de différentes familles de composés²⁶⁻²⁹, ou de familles différentes mais présentant des propriétés chimiques semblables³⁰.

1.3.2. Principe, rôle et critères de choix des matrices

En se basant sur le principe plus ancien du LDI, le MALDI s'est développé pour répondre au problème le plus important de la désorption/ionisation par laser : la fragilité importante de nombreux composés, conduisant à une fragmentation excessive et donc à la « perte » des ions (quasi)moléculaires ou des adduits correspondants.

L'utilisation d'une matrice co-cristallisée avec l'analyte permet d'éviter les problèmes rencontrés en LDI. Cela nécessite d'utiliser une matrice qui a pour rôle :

- a- d'être un centre de transfert d'énergie : elle absorbe suffisamment l'énergie du laser après irradiation, en protégeant l'analyte de la fragmentation photochimique ou thermique.
- b- de favoriser l'ionisation : elle doit être susceptible de participer à la désorption et à l'ionisation de l'échantillon.
- c- d'être un agent de co-cristallisation homogène : idéalement la matrice doit jouer le rôle d'un agent dispersant, pour obtenir une couche cristalline homogène dont les cristaux ne doivent pas se dégrader, et doivent résister à l'évaporation sous vide.

De multiples critères seront ainsi pris en compte lors du choix d'une matrice convenable. Cette dernière devrait répondre à certains critères :³¹

1- L'absorption photonique : il n'existe pas une valeur précise de ce critère, définissant une « bonne » matrice, puisque l'absorption photonique dépend à la fois du coefficient d'extinction molaire (ϵ) et de la structure du film cristallisé de la matrice. Des études spécifiques ont montré que l'absorption des matrices varie suivant leur état physique (Figure I-2)³². Généralement les bonnes matrices présentent un ϵ d'extinction molaire élevé mais cela n'est pas toujours vérifié. La matrice doit par ailleurs être relativement stable vis à vis de l'irradiation laser.

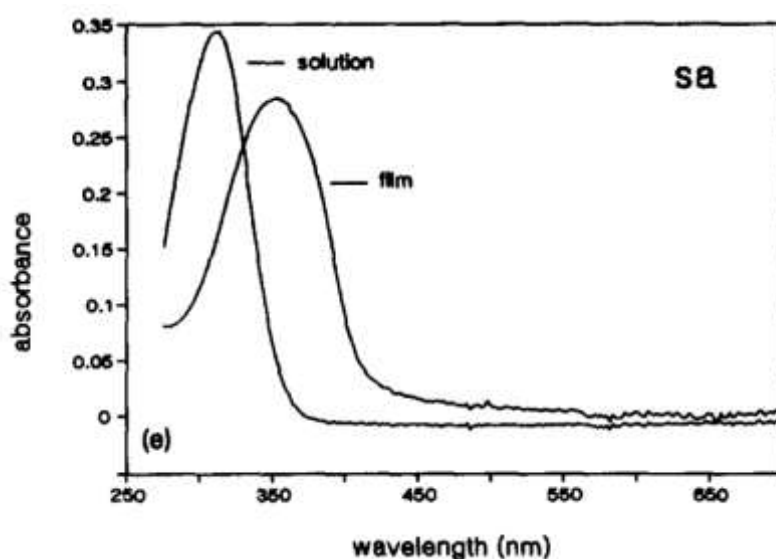


Figure I-2 : Spectres³¹ UV de l'acide sinapique en solution et à l'état solide (solution 32 μM , film 27 $\text{nm}\cdot\text{cm}^{-2}$).

2- La compatibilité physico-chimique : les analytes et la matrice doivent être solubles dans les mêmes solvants ou systèmes de solvants utilisés. Ceci est nécessaire à l'obtention d'une bonne dispersion des composés et pour former un spot homogène. Dans le cas où les solubilités sont assez différentes, certaines variantes de la méthode de préparation du dépôt permettent de trouver un compromis. Ces méthodes de préparation de dépôts seront abordées dans le chapitre suivant. Notons également qu'aucune réactivité ne doit intervenir entre la matrice et les molécules analysées.

3- La volatilité : afin de permettre la co-désorption des molécules, une vitesse d'ablation importante sera nécessaire.

4- La faible masse moléculaire : pour favoriser la volatilisation, il faut que la masse soit la plus faible possible.

5- Favorise l'ionisation: la matrice doit également être capable de capter ou de libérer des protons pour favoriser l'ionisation positive ou négative des analytes.

Considérant toutes ces caractéristiques, il apparaît évident que la conception d'une matrice universelle n'est pas envisageable. Dans la littérature, différentes matrices sont ainsi utilisées suivant les familles moléculaires que l'on cherche à détecter, identifier ou quantifier. En fonction des analytes ciblés, une liste d'exemples de matrices utilisables est répertoriée dans le Tableau I-2. Les structures de ces matrices sont regroupées dans la Figure I-3.

Composé	Abréviation	Utilisation
9-nitoanthracène	9-NA	Fullerènes
Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique	CHCA	Peptides de moins de 10 kDa Hydrates de carbone
Acide sinapique	SA	Protéines de plus de 10 kDa Fullerènes
Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque	HABA	Protéines de plus de 10 kDa
2,4,6-Trihydroxyacétophenone	THAP	Oligonucléotides de moins de 3,5 kDa Hydrates de carbone acide
Acide 3-hydroxypicolinique	HPA	Oligonucléotides de plus de 3,5 kDa
Acide anthranilique	---	Oligonucléotides de plus de 3,5 kDa
Acide nicotinique	---	Oligonucléotides de plus de 3,5 kDa
Acide trans-3-indoleacrylique	IAA	Polymères synthétiques non polaires
Dithranol	DIT	Polymères synthétiques non polaires, Lipides
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	DHB	Polymères synthétiques polaires, molécules organiques, hydrates de carbone.
1-isoquinolinol	---	Oligosaccharides
Acide picolinique	---	Oligonucléotides
2,5- dihydroxyacétophénone	DHAP	Protéines de plus de 10 kDa

Tableau I-2 : Liste de quelques matrices commerciales³³.

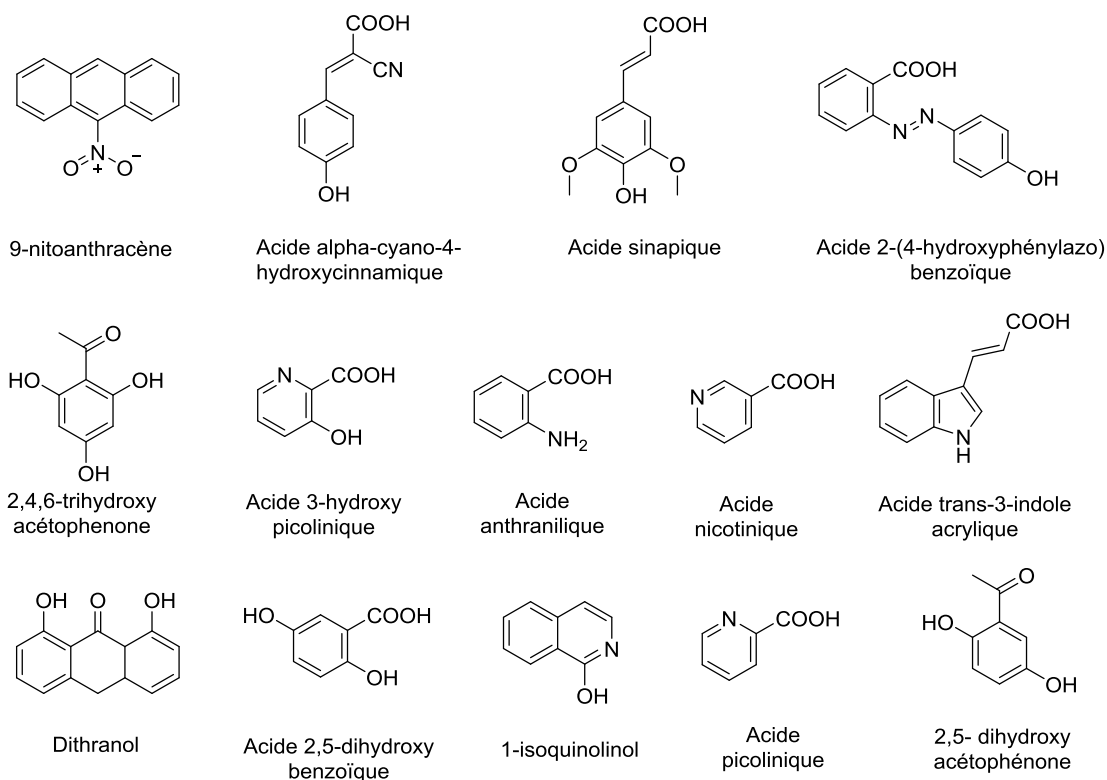


Figure I-3 : Structures des matrices courantes (citées dans le tableau précédent).

1.4. Limitations de la méthode MALDI et améliorations envisagées

1.4.1. Limitations de la méthode

Bien que les spectromètres de masse de type MALDI soient aujourd'hui très répandus grâce à leur facilité de mise en œuvre, douceur d'ionisation, sensibilité, robustesse et la diversité de composés (polymères, biomolécules...) ³⁴ analysés, la méthode MALDI souffre d'inconvénients qui peuvent gêner ou même limiter son utilisation dans certains cas. Ces principaux obstacles sont :

- au niveau du dépôt de l'échantillon, un problème d'inhomogénéité va causer un appauvrissement des informations données par le spectre final. Cette non-homogénéité peut être due à un mauvais système de solvants utilisés, si par exemple l'analyte et la matrice sont solubilisés dans des solvants non miscibles. Le choix du mode de déposition peut être une autre source de non homogénéité.

- une grande limitation du MALDI concerne les composés de bas poids moléculaire. Paradoxalement, la matrice utilisée pour protéger les analytes et faciliter leur ionisation est la cause de cette limitation. En effet, elle absorbe l'énergie du laser et est utilisée en large excès ce qui conduit à la formation d'ions matriciels abondants, pouvant masquer ceux issus de l'analyte.

- un facteur important qui peut affecter la performance du MALDI est associé au phénomène de suppression d'ions ³⁵ également observé en ESI ³⁶. Suite à des effets de compétitions pour

l'ionisation, ce phénomène conduit à une disparition complète des ions de matrice au profit de ceux de l'analyte, ou bien de l'inverse. Observé dans toutes les techniques de désorption laser, la suppression d'ion est particulièrement marquée dans une source MALDI. L'effet de suppression d'ions réduit la sensibilité, la précision et la reproductibilité de l'analyse MALDI TOF-MS pour les composés organiques cibles, ce qui limite son intérêt dans le cadre d'analyses quantitatives³⁷.

Il apparaît donc intéressant de proposer des solutions qui pourraient à la fois conserver les avantages du MALDI tout en s'affranchissant des inconvénients induits par les matrices. C'est dans cette logique que de nouveaux protocoles de préparation et de déposition d'échantillons ont été mis au point³⁸. De plus, des tentatives de développement de techniques de (MA)LDI-MS sur surface modifiée^{39,40} ou recourant à une matrice inorganique⁴¹⁻⁴³ sont apparues. En parallèle, la recherche constante de nouvelles matrices organiques est toujours d'actualité^{27,44,45}.

1.4.2. Les différentes stratégies élaborées

Dès lors, afin de remédier aux inconvénients inhérents à la technique MALDI, plusieurs groupes de chercheurs ont travaillé selon quatre grands axes qui seront détaillés dans la suite du chapitre :

- Le premier axe inclut tous les efforts visant à améliorer le mode de préparation des échantillons, sans que l'on n'introduise aucune variation dans la technique MALDI elle-même. Toutefois, ces essais n'ont pas à ce jour, permis d'obtenir des résultats permettant d'élargir la gamme d'application de la méthode, probablement en raison du nombre trop limité de paramètres pouvant être modifiés (nature du solvant et mode de dépôt, essentiellement).
- Un deuxième axe englobe le développement de la technique dite SALDI-MS, qui utilise des matrices, le plus souvent inorganiques, innovantes (nanoparticules métalliques ou oxydes de métaux) et alternatives aux matrices organiques traditionnelles.
- Le troisième axe comprend les techniques LDI, c'est à dire sans matrice, utilisant des surfaces modifiées par des gels, des films, des couches minces ou des monocouches de molécules organiques ou inorganiques, qui « jouent » le rôle de matrices.
- Enfin un quatrième axe d'expérimentation concerne le développement de nouvelles molécules organiques ou candidats-matrices.

Généralement, le deuxième et le troisième axe peuvent être regroupés sous le terme de techniques dites « alternatives au MALDI » ou « post-MALDI ».

Hormis le premier axe, qui concerne la mise au point de la préparation des échantillons et sera étudié dans le chapitre II, les développements réalisés selon les autres axes sont présentés ci-dessous.

i. Les techniques de désorption/ionisation post-MALDI

Ces méthodes de désorption/ionisation laser nommées aussi « sans matrices organiques » ont émergé postérieurement au MALDI^{46,47} et ont connu des progrès remarquables ces dernières décennies.

Les surfaces sont modifiées par des gels, des films, des couches minces ou des monocouches de molécules organiques ou inorganiques. Ces surfaces qui doivent être photosensibles afin de transférer l'énergie du laser à l'analyte incluent des nanostructures telles que des nanopores, des nanotubes, des nanofils ou des nanoparticules⁴⁸. Nous aborderons les techniques les plus importantes, de manière non-exhaustive.

i.1. Les techniques utilisant des surfaces modifiées

a. Le TGFA-LDI (*Thin Gold Film-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

Cette technique développée par Markus *et al.* est apparue en 1993⁴⁹. Ici l'échantillon est déposé sur une surface recouverte par un film d'or qui va absorber l'énergie du laser en entraînant la désorption et l'ionisation des molécules. Des nanoparticules d'or fonctionnalisées ou non par des molécules spécifiques ont été étudiées (voir paragraphe La technique SALDI-MS (*Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization*)).

b. DIOS (*Desorption/Ionization On Silicon*)

L'emploi d'une surface poreuse de silicium est associé à la technique DIOS³⁹. Cette surface est caractérisée par des propriétés physiques particulières : grande surface spécifique, absorption optique très élevée (coefficient d'extinction molaire ϵ de $10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ à la longueur d'onde de 337 nm)⁵⁰, inertie chimique. Cette technique permet l'étude d'une large gamme de composés, des peptides aux petites molécules organiques (stéroïdes, acides aminés, etc.) comme le montre la Figure I-4.

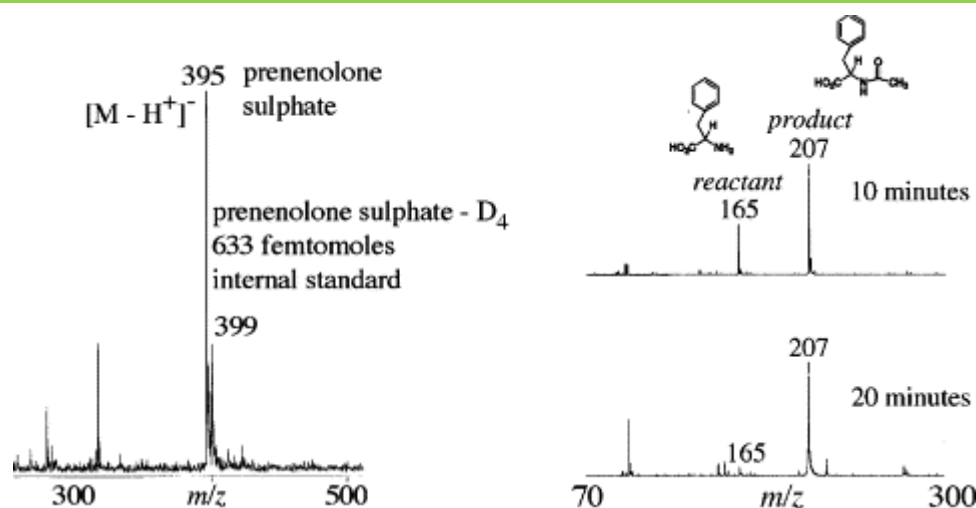


Figure I-4 : Exemples de spectres de masse obtenus en DIOS pour l'analyse de stéroïdes et d'acides aminés.³⁹

c. GPLDI (*Laser Desorption/Ionisation on Graphite Plate*)

La technique dite GPLDI utilise quant à elle une surface recouverte d'une couche de graphite. Différents matériaux à base de carbone (naturels ou synthétiques) ont trouvé des applications dans cette méthode. Ainsi, des particules⁵¹ ou des plaques⁵² de graphite, des suspensions de graphite dans différents solvants, du graphite emprisonné dans un polymère de silicone⁵³, des poudres de charbon actif, des nanotubes de carbone⁵⁴, les fullerènes C₆₀ et C₇₀⁵⁵ ont été suggérés comme « matrices alternatives ». Cette méthode est caractérisée par sa grande sensibilité, de faibles bruits de fond en raison de l'absence d'artefacts et la possibilité d'étudier des composés de faible poids moléculaire. Ces matériaux sont employés parfois seuls, parfois en combinaison avec des matrices liquides⁵⁶.

Le graphène qui correspond à un empilement de feuillets de graphite, (Figure I-5)⁵⁷ et présente des atomes de carbones hybridés sp² disposés en nid-d'abeilles (disposition hexagonale)⁵⁸ a été utilisé pour la première fois en 2010 dans l'analyse de composés de faible poids moléculaire. Toutefois, la sensibilité de la mesure n'apparaît pas encore très élevée⁵⁹. En 2013, des tentatives d'utilisation de graphène magnétique, c'est à dire un graphène associé à des particules de Fe₃O₄ sont apparues. Le graphène magnétique aurait en effet la capacité de piéger les analytes en agissant comme un récepteur d'énergie pour le rayonnement laser. En outre, les interférences causées par les matrices organiques classiques sont ici absentes, ce qui facilite l'analyse de petites molécules. Ainsi, la détection de crotonaldéhyde (H₃C-CH=CH-CHO) peut être réalisée dans des échantillons de salive de fumeurs et à partir d'autres « sources » telles que l'air, les aliments ou le tabac⁶⁰.

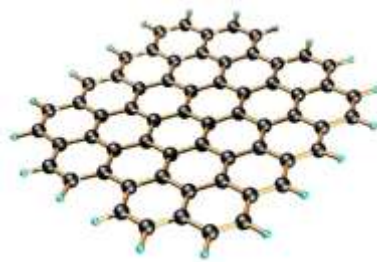


Figure I-5 : Couche de graphène.

d. **SGALDI (*Sol-Gel-Assisted Laser Desorption/Ionization*)**

La technique SGALDI utilisant des structures de type sol-gel encapsulant une matrice organique⁶¹ a été présentée par l'équipe de Chen en 2002. Un polymère de silice dopé par une matrice organique de DHB, est formé par la technique sol-gel (Figure I-6). Ce film sol-gel incorpore donc par des liaisons covalentes le DHB, une matrice classique utilisée en MALDI. Ce matériau conserve en fait les avantages de la matrice MALDI (absorption de l'énergie du laser), tout en limitant la quantité d'ions matriciels interférant avec ceux de l'échantillon. La limite de détection observée pour des petites molécules et des protéines apparaît très basse, avec un minimum mesuré à 81 fmol (dans le cas du cytochrome c)⁶¹.

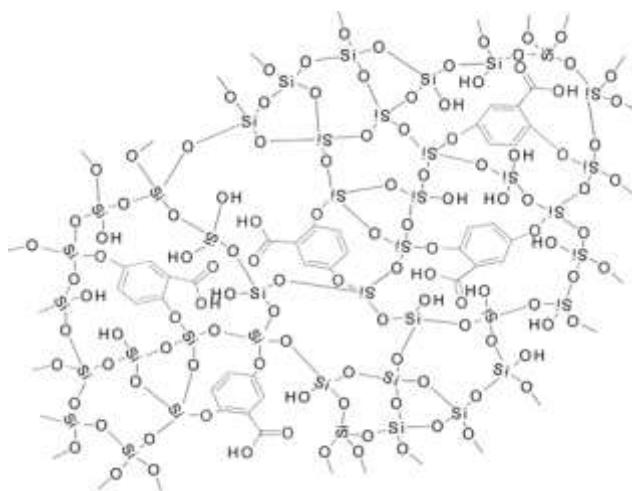


Figure I-6 : Structure du polymère de silice dopé DHB dans la couche sol-gel⁶¹.

e. **SEND (*Surface-Enhanced Neat Desorption*) et SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*)**

En 1993, Hutchens et Yip⁶² ont présenté deux nouvelles stratégies de désorption pour l'analyse par spectrométrie de masse des macromolécules. Ces dernières sont basées sur l'utilisation de surfaces modifiées d'où les acronymes SEND pour *Surface-Enhanced Neat Desorption* et SEAC pour *Surface-Enhanced Affinity-Capture*. La première technique est conçue pour améliorer la désorption des macromolécules intactes et présentées seules (« neat ») à la surface. La seconde technique vise à améliorer la désorption des macromolécules spécifiques capturées directement à

partir de fluides biologiques ou d'extraits non fractionnés. Différentes molécules organiques ont été accrochées à la surface par des liaisons covalente. Ces molécules présentent les propriétés des matrices organiques utilisées en MALDI et jouent donc le rôle de « matrice fixes ».

On regroupe aujourd'hui les techniques recourant à une surface modifiée ou non sous l'acronyme générique de SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*). Il convient de noter que le SELDI combine ainsi l'utilisation de surfaces inertes et leur éventuelle fonctionnalisation biochimiques pour la sélectivité, comme dans le cas des surfaces utilisées en protéomique pour la séparation des protéines selon leurs propriétés chimiques et/ou biologiques⁶³. Ainsi est-il possible de réaliser des purifications directement sur la surface⁴⁶.

La surface modifiée est la clé du SELDI, elle doit satisfaire à deux exigences :

- Etre capable de capturer sélectivement et d'enrichir les composés cibles qui se trouvent dans un milieu complexe.
- Faciliter le processus LDI dans la détection MS.

Le SELDI-MS s'est révélé d'une grande utilité dans le domaine de la protéomique. En 2016, une revue publiée dans *Oncology Letters* présentait ainsi la technique SELDI comme l'un des plus récents outils protéomiques (Figure I-7) développés dans l'optique de l'identification de nouveaux biomarqueurs⁶⁴.

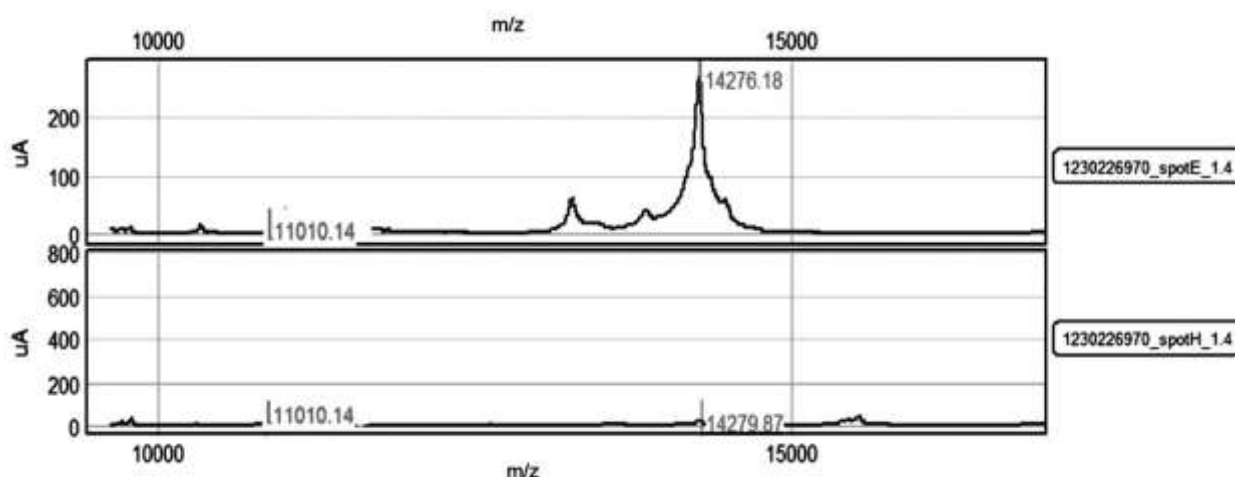


Figure I-7 : Analyse SELDI du profil protéomique salivaire d'un sujet sain (haut) et d'un patient présentant un carcinome épidermoïde oral (bas).⁶⁴

f. SAMDI (Self-Assembled Monolayers for Matrix assisted Laser Desorption/Ionization) et DIAMS (Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface)

Par analogie avec la méthode SEND, l'objectif est ici de synthétiser une surface photosensible « remplaçant » la matrice. Pour ce faire, des surfaces de monocouches auto-assemblées ou

SAMs (pour *Self-Assembled Monolayers*) sont élaborées en immobilisant sur une surface d'or des thiols aromatiques absorbant à la longueur d'onde du laser. Les premières surfaces sont testées en 1996 (Figure I-8) pour l'analyse de petites protéines et d'oligosaccharides⁶⁵. Plus récemment, la méthode SAMDI a été employée dans la recherche d'inhibiteurs de sirtuines SIRT 3 destinés au traitement de cancers⁶⁶.

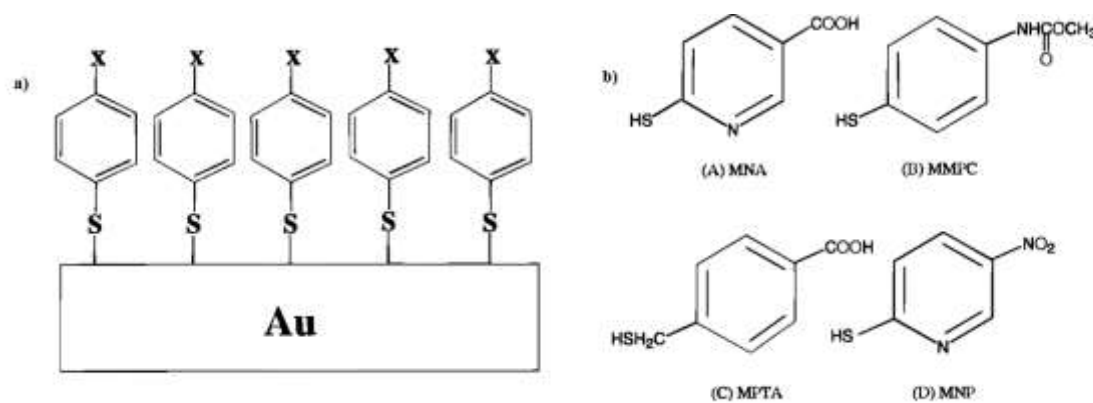


Figure I-8 : a) représentation schématique d'une matrice SAM utilisée en SAMDI
b) structure de quelques motifs de répétition utilisés⁶⁵.

En suivant une même approche, la technique DIAMS (*Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface*) a été développée et appliquée avec succès à l'université d'Angers. Egalement classée parmi les méthodes alternatives au MALDI, le DIAMS remplace les matrices classiques par une monocouche auto-assemblées accrochée sur une surface d'or par des liaisons covalentes.

Cette méthode sera plus particulièrement détaillée dans le paragraphe intitulé « Les contributions des équipes angevines dans le domaine » (en page 39).

i.2. La technique SALDI-MS (*Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization*)

La technique SALDI-MS a été développée en utilisant comme matrices des nanomatériaux, plutôt que des composés organiques. De manière identique au rôle joué par les matrices organiques, ces particules absorbent en effet l'énergie du rayonnement laser et la transfèrent efficacement aux analytes, induisant ainsi la désorption et l'ionisation. Le terme SALDI-MS a été introduit par le groupe de Sunner⁵² qui utilisait du graphite en tant que matrice. Ces travaux s'appuyaient sur des études préliminaires, menées par Tanaka,¹⁸ qui avait utilisé des nanoparticules de cobalt en suspension dans le glycérol pour analyser des protéines et des polymères. Les propriétés les plus remarquables du SALDI-MS sont l'absence d'interférence de la matrice dans la région de faible masse et la réalisation d'un dépôt d'échantillon homogène. Ainsi, le SALDI-MS étend la gamme de masse de petites molécules détectable à moins de $m/z = 500$ ⁶⁷.

Avec l'évolution rapide des travaux sur les nano-objets, les nanoparticules constituées d'oxydes métalliques ont eu un grand succès en raison de leur absorption à la longueur d'onde du laser utilisé, de leur grande stabilité au cours du processus d'irradiation et de leur grande surface de contact. Parmi elles, les oxydes de zinc (ZnO)⁴¹, de titane (TiO₂)⁶⁸, de fer (Fe₂O₃)⁴², les nanoparticules de platine (Pt)⁶⁹, d'or (Au)^{70,71}, d'argent (Ag)⁴³ et de zinc (Zn)⁷² sont le plus fréquemment cités. Contrairement à la plupart des matrices organiques, les nanoparticules produisent un faible nombre de signaux d'interférence. Des exemples de résultats probants sont ainsi exposés ci-après.

En 2007, Edward *et al.*⁷³ synthétisent des nanoparticules d'or dopées par des aminothiophénols (Figure I-9) pour analyser des peptides et des protéines. Ces nanoparticules d'or dopées augmentent les rendements d'ions, diminuent la fragmentation, et accroissent la gamme de masse d'analytes observables par rapport à d'autres systèmes.

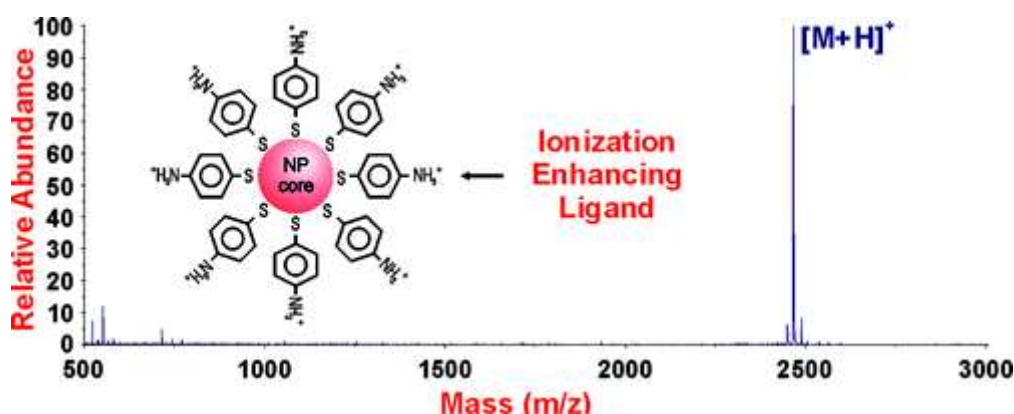


Figure I-9 : Illustration d'une nanoparticule dopée par un ligand de type 4-aminothiophénol⁷³.

Remarquons que des nanoparticules d'or dopées au citrate (AuNPs) servent aussi de co-matrices (utilisées avec DHB) en MALDI pour l'analyse des biomolécules dans une solution riche en sels⁷⁴. Chiang *et al.*⁷⁵ ont étudié l'intérêt de six nanomatériaux pour les analyses de peptides et de protéines en SALDI-MS. Les nanoparticules d'or étaient utiles pour les petits analytes (telles que le glutathion, un antioxydant naturel); les nano-éponges de platine et les nanoparticules de Fe₃O₄ apparaissaient efficaces pour l'analyse de protéines.

Comme d'autres matériaux, les oxydes de titane (TiO₂) ont été testés par différents groupes de recherche. Ils sont utilisés seuls⁶⁸ comme surface photosensible, ou en combinaison avec une matrice liquide⁷⁶. Dans le domaine des analyses protéomiques, l'oxyde de titane est particulièrement indiqué pour détecter les phosphopeptides en raison de la grande affinité des groupes phosphates pour les hydroxyles de surface de TiO₂⁷⁷.

Dans le prolongement de ces recherches menées sur les nano-objets de titane, Kim *et al.*⁷⁸ montrent en 2016 que les nanofils de TiO₂ constituent des matrices solides pour le SALDI. Ils sont par exemple utilisés avec succès pour la détection d'antibiotiques dans le lait. (Figure I-10)

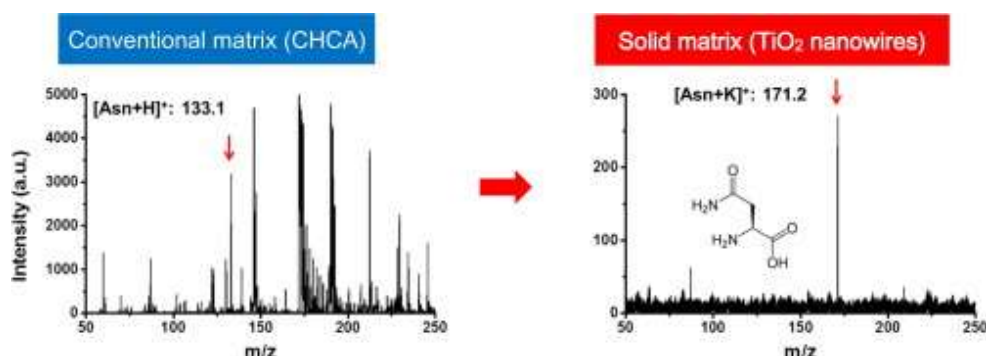


Figure I-10 : Spectres de masse de l'asparagine obtenus avec une matrice organique classique (CHCA) et des nanofils de TiO₂⁷⁸.

Chen *et al.*⁷⁹ ont développé un procédé rapide et sensible permettant la détection de médicaments immunosuppresseurs par SALDI. Des particules colloïdales de palladium ont été utilisées en tant que co-matrice avec le CHCA. La longueur d'onde maximale d'absorption de nanoparticules de Pd est de 320 nm⁸⁰, ce qui est proche de la longueur d'onde d'émission du laser à azote (337 nm) qui est le plus couramment utilisé en MALDI-MS.

ii. Développement de matrices organiques

Comme nous l'avons déjà présenté, la matrice est l'élément primordial dans la méthode d'ionisation MALDI. Elle a un rôle fondamental dans les processus de désorption/ionisation, ce qui détermine ensuite la résolution, la sensibilité, le rapport signal/bruit des spectres ainsi que son domaine d'application, *i. e.* le type d'analytes détectables. Dans le but de remédier aux inconvénients de la technique MALDI précédemment décrits, des recherches consistant à rechercher de nouvelles matrices mieux adaptées à l'analyse de certains échantillons ont été développées. Parmi elles, des matrices constituées de polymères organiques sont utilisées dans la technique dénommée PALDI (*Polymer-Assisted Laser Desorption/Ionization*)⁸¹. Les expériences PALDI ont montrés la possibilité d'ioniser certains analytes (métalocènes, hydrocarbures polycycliques, etc.) dans des conditions typiques de désorption laser et avec un faible taux de fragmentation des polymères matriciels et des analytes. Des matrices liquides ioniques ont aussi été étudiées. Ces matrices introduites par Armstrong *et al.*⁸² possèdent non seulement la propriété de donner un spot homogène mais sont aussi tout à fait appropriées pour l'ionisation des analytes⁸³. Des matrices de haut poids moléculaires ont aussi été utilisées. Ainsi, Ayorinde *et*

al. ont rapporté l'emploi de méso-tétrakis(pentafluorophényl)porphyrine (F20TPP, de masse 974,57 Da) pour l'analyse par MALDI-TOF de certains éthoxylates de nonylphénol et d'acides gras présents après saponification dans une huile végétale⁸⁴.

Nous aborderons à présent, de façon non-exhaustive, plusieurs nouvelles matrices décrites au cours de la dernière décennie. En 2009, Shu Zhang *et al.* ont développé une nouvelle matrice ou métal-phtalocyanine (MPC) (Figure I-11), utilisable en MALDI-TOF MS dans l'analyse des petites molécules. Avec un système π -conjugué conséquent, MPC présente une bande d'absorption entre 290 nm et 450 nm. Il permet aussi bien d'ioniser un peptide qu'un acide gras ou un phénol⁸⁵.

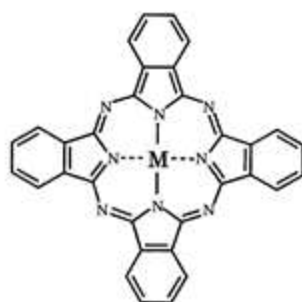
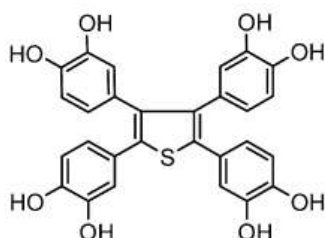


Figure I-11 : Structure de la matrice MPC⁸⁵.

En 2012, un nouveau composé à base de thiophène ou DHPT (2,3,4,5-tétrakis(3',4'-dihydroxyphényl)thiophène, Figure I-12) a été synthétisé et utilisé comme matrice dans l'analyse d'une large gamme d'amines de bas poids moléculaire. Ces expériences montrent dans ce cas une supériorité du DHPT par rapport aux matrices commerciales les plus employées (CHCA et DHB), aussi bien en termes de sensibilité (de l'ordre de picomole 10^{-12} /femtomole 10^{-15}), de sélectivité que d'interférence dans la gamme de masse étudiée. D'autres analyses révèlent l'intérêt de cette matrice dans la quantification de la créatinine dans les urines²⁸.



DHPT

Figure I-12 : 2,3,4,5-Tétrakis(3',4'-dihydroxyphényl)thiophène (DHPT).

En 2012, un sel organique, le dinitrate de *N*-(1-naphtyl)éthylènediamine (NEDN, Figure I-13)⁸⁶, a été utilisé comme matrice pour l'analyse de petites molécules ($m/z < 1000$) telles que des oligosaccharides et des peptides. NEDN présente un chromophore absorbant fortement dans l'UV

à 324 nm, la possibilité de former des liaisons d'hydrogène et de donneur d'anions nitrate. Comparé aux matrices classiques, NEDN améliore la sensibilité de détection et génère très peu de fragments matriciels.

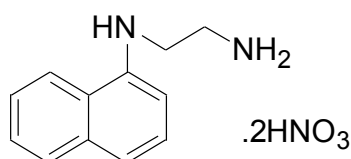


Figure I-13 : Structure de la matrice NEDN.

Deux autres nouvelles matrices,⁸⁷ l'acide 2-amino-4,5-diphénylfurane-3-carboxylique et l'acide méfénamique (MA) (Figure I-14) ont également été utilisées pour l'analyse de petites molécules. Elles présentent de nombreux avantages : un faible coût, donnent une cristallisation homogène, réduisent les interférences, limitent la fragmentation et présentent une grande stabilité sous vide poussé en MALDI-MS.

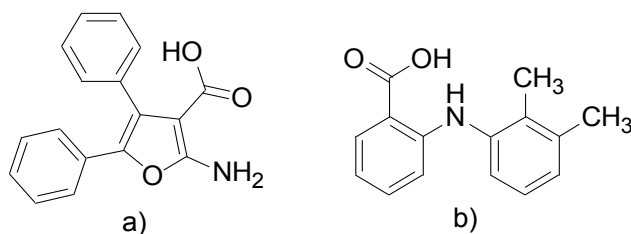


Figure I-14 : (a) l'acide 2-amino-4,5-diphénylfurane-3-carboxylique (b) et l'acide méfénamique.

Les coumarines sont des produits naturels rencontrés dans de nombreuses espèces végétales. Ces composés (Figure I-15) sont utilisés par Wang *et al.*⁸⁸ comme nouvelles matrices pour l'analyse d'une variété de composés hydrophobes tels que des stéroïdes, le coenzyme Q10, un lipopeptide cyclique et l'oléate de cholestérol, qui présentent tous par une faible efficacité d'ionisation avec les matrices classiques. L'acide 6,7-dihydroxycoumarin-3-carboxylique est ainsi utilisé pour la détection de stéroïdes par MALDI-MS, ce qui permet d'accélérer la recherche de nouveaux antifongiques.

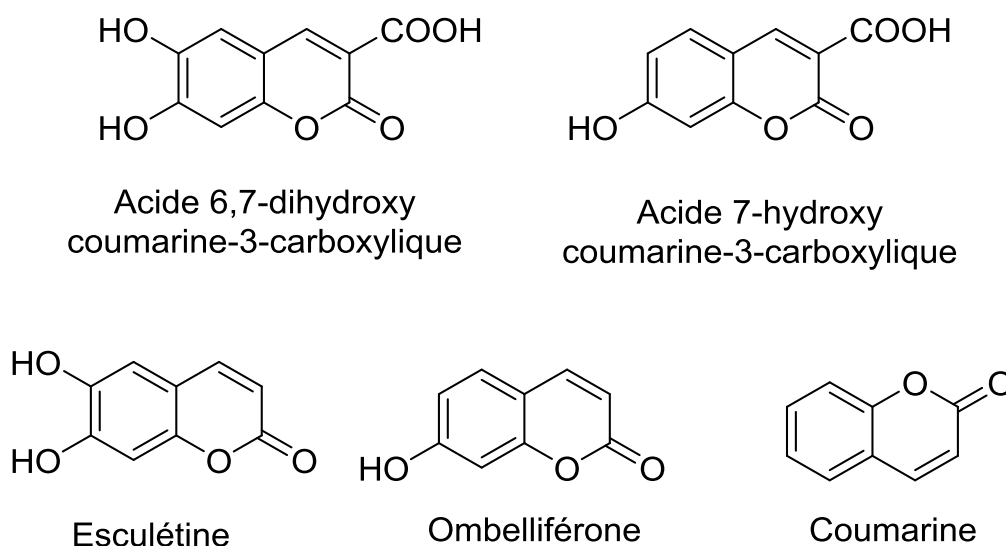


Figure I-15 : Structures des coumarines testées comme matrice MALDI.

Parallèlement à cette recherche de nouvelles matrices, certains travaux ont consisté à améliorer les matrices usuelles par modifications de leurs groupes fonctionnels. Ainsi Fülöp²⁵ développe des dérivés de l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique CHCA pour lesquels le remplacement de l'hydroxyle phénolique de CHCA par un phényle et la formation d'un amide (4-phényl- α -cyanocinnamide) permet l'analyse, en mode négatif et y compris par imagerie de différentes classes de lipides. La sensibilité est bonne avec cette matrice, et la reproductibilité est supérieure, comparée aux matrices couramment utilisées pour l'analyse des lipides (Figure I-16). Ces travaux²⁵ confirment que le remplacement du groupement carboxyle de CHCA par un groupe carboxamide améliore très nettement les performances de la matrice lors de l'analyse de lipides.

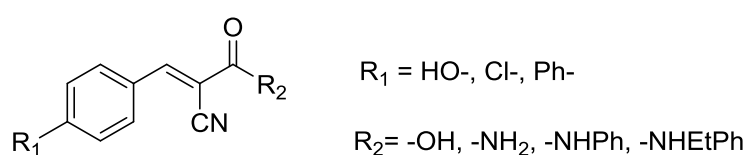


Figure I-16 : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique CHCA et ses dérivés²⁵.

Les peptides à caractères hydrophobes sont généralement difficiles à détecter par MALDI car la majorité des matrices MALDI sont hydrophiles et présentent donc une faible affinité pour ce type de composés. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque *O*-alkylé (ADHB) dérive directement de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) (Figure I-17) en incorporant une chaîne octyle hydrophobe sur un groupe hydroxyle. L'addition d'ADHB à la matrice conventionnelle CHCA entraîne alors un net gain de sensibilité pour la détection de peptides hydrophobes (de 2 à 100 fois) par MALDI-MS⁸⁹.

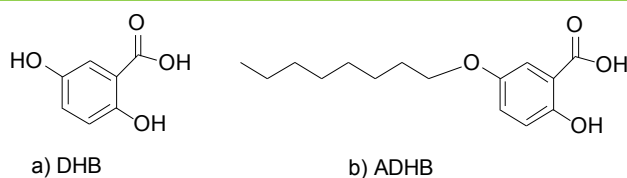


Figure I-17 : Les structures de DHB et ADHB⁸⁹.

Un autre groupe a quant à lui synthétisé un analogue boronique (Figure I-18) de CHCA conduisant à une nouvelle «matrice réactive» qui possède des propriétés de reconnaissance moléculaire. La matrice peut ainsi former des « liaisons caractéristiques » avec l'analyte (Figure I-18) et reconnaît sélectivement les diols vicinaux, les α -hydroxyacides et les aminols²⁷.

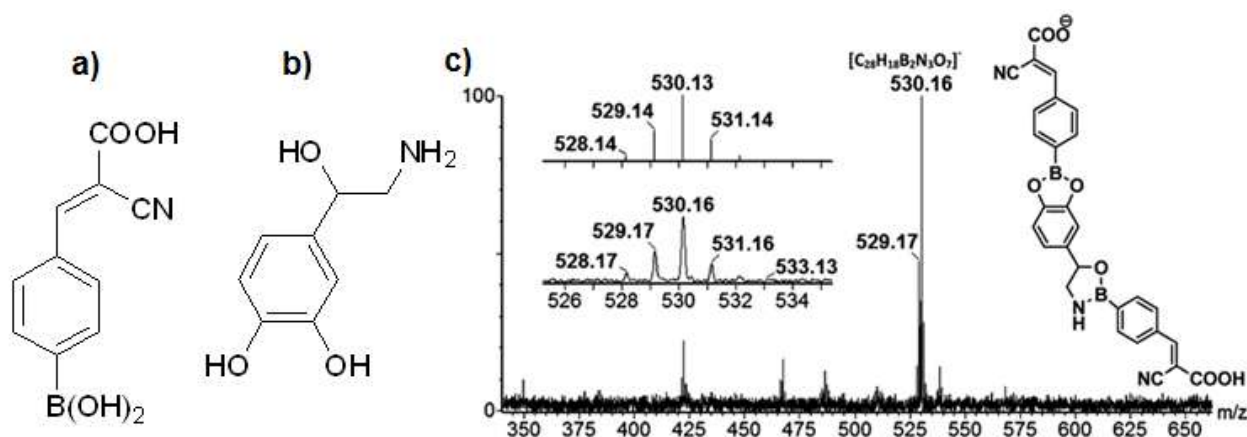


Figure I-18 : a) structure de la matrice boronique analogue au CHCA, b) structure de la norépinéphrine, c) spectre de masse montrant l'espèce ionique générée à partir de deux « matrices réactives » interagissant, au niveau des atomes de bore, avec la norépinéphrine
pic à $m/z = 530,16$ Da.²⁷

Plus récemment, Wang⁴⁴ *et al.* ont utilisé l'ester propylique de CHCA comme matrice. Celui-ci montre une grande tolérance en milieu hypersalé et une sensibilité élevée pour l'analyse des protéines par spectrométrie de masse MALDI.

Une autre approche permet aussi d'améliorer les performances des « anciennes matrices » par une utilisation combinée. En fait, ces mélanges apparaissent le plus souvent comme des systèmes binaires^{30,90,91}. L'exemple le plus connu est le « super DHB »⁹². Il s'agit d'un mélange 9/1 de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et de l'acide 2-hydroxy-5-méthoxybenzoïque, disponible commercialement. L'utilisation d'un mélange des deux matrices les plus couramment utilisées, le DHB et CHCA⁹³, améliore aussi la performance du MALDI pour la cartographie peptidique et l'analyse des protéines.

1.5. L'analyseur TOF pour la détection d'ions gazeux produits par LDI

1.5.1. Introduction

L'analyseur à temps de vol ou TOF (*Time Of Flight*) est l'analyseur le plus adapté à la discrimination des ions émis après impulsions laser, ce qui explique son utilisation classique dans les techniques LDI, MALDI et ses alternatives.

Ce type d'analyseur a été expérimenté par Cameron et Eggers dès 1948⁹⁴, puis amélioré par Wiley et McLaren en 1955⁹⁵. Les travaux de ces derniers ont permis de corriger la dispersion spatiale des ions en augmentant ainsi la puissance résolutive du TOF. C'est par la suite lors de l'apparition de la source MALDI et son application à l'analyse protéomiques des macromolécules, biologiques ou non⁹⁶, que les analyseurs TOF ont connu un essor considérable.

1.5.2. Principe général de l'analyseur TOF

Brièvement, les ions qui ont été expulsés de la source d'ionisation (MALDI) sous l'action d'une différence de potentiel élevée (V) présentent des énergies cinétiques ($1/2 mv^2$) et potentielles (qV) équivalentes, et évoluent dans le tube de vol, une longue zone libre de champ où il règne un vide poussé (de l'ordre de 10^{-7} mbar), avant qu'ils n'atteignent le détecteur. Plus la masse d'un ion ou d'un fragment sera élevée et moins sa vitesse dans le tube sera grande (Figure I-19). Les ions vont donc être spatialement séparés pendant leur vol dans la zone libre de champ et être détectés par paquets d'espèces de même rapport m/z au niveau du détecteur. C'est ainsi qu'ils arriveront séquentiellement au détecteur, des plus « petits » aux plus « gros ». Les analyseurs TOF mesurent donc le temps pris par un ion pour voyager d'un côté à l'autre du tube de vol et atteindre le détecteur. Une calibration avec des substances de PM précisément connus dans la gamme de masse d'intérêt permettra alors de relier temps de vols et valeurs m/z . Les analyseurs TOF sont très sensibles et présentent une gamme de masse illimitée.

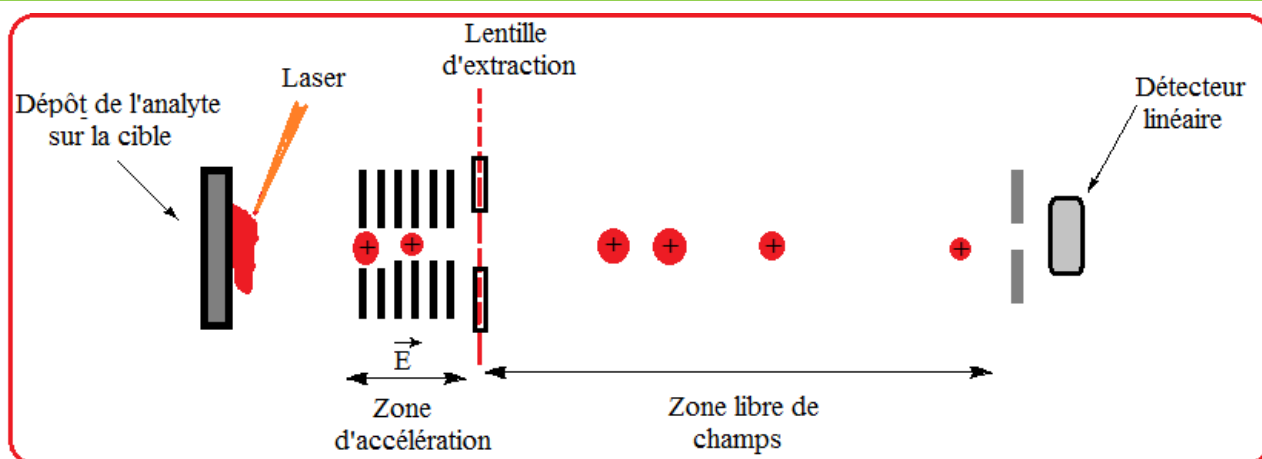


Figure I-19 : Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol en mode linéaire.

1.5.3. Equations⁹⁷

D'une manière simplifiée, on citera ici les équations les plus importantes qui gouvernent le mouvement des ions dans un spectromètre à temps de vol. Ainsi, après la grille d'extraction, les ions de masse m et de charge ze (Coulomb) qui rentrent dans un vide poussé, conservent l'énergie acquise durant l'accélération par une différence de potentiel V (volt). Leur énergie cinétique E_c est donc (joules) :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = zeV$$

Leur vitesse est donc égale à :

$$v = \left(\frac{2zeV}{m}\right)^{\frac{1}{2}}$$

Avec m : la masse exacte de l'ion

v : la vitesse de l'ion

z : état de charge de l'ion

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

V : potentiel d'extraction.

En exprimant la vitesse comme le rapport de la longueur du tube de vol L et de la durée du vol t , on peut finalement relier le temps t mis par un ion pour le traverser au rapport m/z :

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zeV}} = K \sqrt{\left(\frac{m}{z}\right)} \quad \text{avec } k = L \sqrt{\frac{1}{2eV}}$$

Cette équation établit donc le principe de l'analyseur TOF qui relie la mesure du temps de vol par l'appareil au rapport m/z de l'ion considéré.

La résolution en masse est définie par la capacité d'un MS à distinguer entre des ions de valeur m/z voisines. Sans passer par la déduction mathématique, on peut résumer que pour un analyseur à temps de vol la résolution est calculée par :

$$R = \frac{m/z}{\Delta(m/z)} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Où Δt : largeur à mi-hauteur de la distribution de temps de vol de l'ion.

Certains facteurs, intervenant lors du processus d'ionisation ou durant l'analyse, peuvent réduire la résolution en masse. Parmi ces facteurs, on compte la durée de l'impulsion de laser, la distribution en énergie cinétique initiale et la distribution dans l'espace des ions. Des ions de même rapport m/z arrivent alors au détecteur à des temps un peu différents, ce qui va limiter la résolution de l'instrument. Cette limitation se traduit par un élargissement des pics du spectre de masse.

1.5.4. Perfectionnements de l'analyseur TOF

Le problème majeur des premiers analyseurs à temps de vol était leur piètre résolution qui a été améliorée en diminuant l'impact des facteurs provoquant une dispersion temporelle, spatiale et cinétique lors de l'ionisation.

Au niveau de la cible, les ions ne sont en effet pas créés en un point précis de l'espace mais dans un volume donné. La dispersion temporelle observée est ainsi le résultat d'une diversité des temps de formation des ions qui, elle-même entraîne, une variabilité des temps de départ et donc des vitesses initiales. Ainsi des ions ou fragments de masses identiques ne parviendront donc pas exactement dans le même temps au détecteur, ce qui se traduira par un élargissement des raies spectrales. De façon pratique, une longueur de tube suffisante (longueur typique d'un mètre⁹⁸) permet au détecteur de « travailler » aux vitesses requises (en utilisant des tubes de vol de 1 m de longueur, même les ions les plus lourds prennent généralement moins de 50 μ s pour atteindre le détecteur⁹⁹) tandis que l'on corrige principalement les défauts de résolution au moyen de l'extraction retardée et des dispositifs de type miroir électrostatique ou « réflectron ».

i. L'extraction retardée

L'extraction retardée¹⁰⁰ (*Delayed Extraction DE* ou *Pulsed Ion Extraction PIE*) permet de corriger partiellement les disparités préalablement citées. Les ions sont en effet retenus dans la source (MA)LDI par un champ électrique de faible intensité puis, après un délai prédéterminé, extraits de cette dernière par application d'une impulsion de haute tension. En pratique, une lentille d'extraction est ajoutée, et sur celle-ci est appliquée pendant un délai de temps très court (de l'ordre de quelques nanosecondes) une tension supérieure à celle du champ électrique régnant au sein de la source. Ce potentiel légèrement supérieur ralentit ou stoppe la progression des ions

dans la source ce qui conduit à un « alignement » de ces derniers à l'entrée du tube de vol. Ainsi, l'extraction retardée sépare-t-elle temporellement les étapes de désorption et d'extraction des ions. Aujourd'hui, tous les spectromètres MALDI-TOF incluent cette option avec différentes valeurs de délais accessibles, soit 200, 400 ou 600 ns dans le cas du spectromètre Bruker Biflex III utilisé au cours de nos études.

ii. Miroir électrostatique

Une autre alternative est représentée par le recours à un miroir électrostatique (réflectron). Mise au point par le groupe de Mamyrin¹⁰¹ dans les années 70, le réflectron permet de compenser les dispersions en énergie cinétique initiale. Il permet de réaliser la refocalisations des ions. En effet, des électrodes soumises à des potentiels croissants et formant ainsi un champ électrostatique uniforme sont placées à la sortie du tube de vol. Ce champ va s'opposer au champ d'extraction, il va donc réfléchir le faisceau des ions et le refocaliser. Pour les ions de même rapport m/z et ayant des vitesses initiales légèrement différentes, ceux qui possèdent le plus d'énergie cinétique (les plus rapides) vont pénétrer plus profondément dans le miroir électrostatique. Comme ils pénètrent plus profondément dans le miroir électrostatique, cela permet de corriger par « effet trampoline » l'avance acquise dans le tube de vol. Les ions de même valeur m/z seront ainsi regroupés pour parvenir en même temps sur le détecteur (Figure I-20). Par cette méthode, le temps de vol parcouru et la résolution sont augmentés mais au détriment de la sensibilité. Il est donc courant d'utiliser consécutivement les modes linéaires (sans miroir électrostatique), plus sensible, et réflectron (mieux résolu), les spectromètres étant souvent équipés des deux détecteurs distincts.

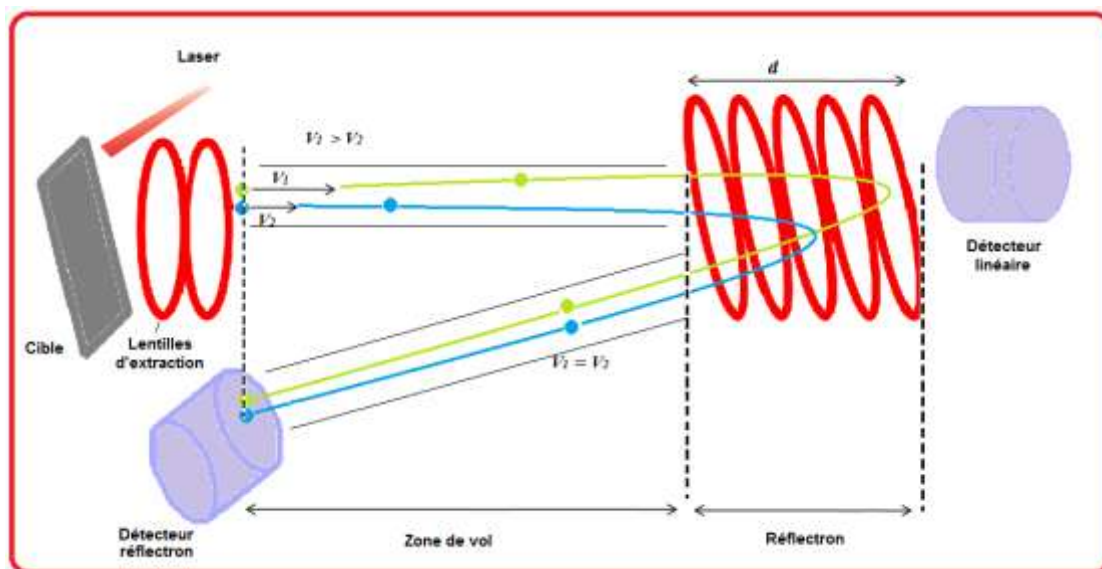


Figure I-20 : Schéma de principe d'un miroir électrostatique, ou réflectron, deux ions ont les mêmes rapports m/z , mais des vitesses initiales différentes.

iii. Trajectoire spirale

En 2005, Satoh *et al.*¹⁰² ont proposé un spectromètre de masse IE-TOF (source d'ionisation par impact électronique couplée à un TOF) dans lequel les ions suivaient une trajectoire en spirale. En 2007, le même groupe¹⁰³ présenta le couplage de ce même détecteur à une source MALDI. Le système d'optique ionique (Figure I-21) utilisé a été conçu sur la base de celui du MULTUM II développé à l'université d'Osaka et de son principe de « focalisation parfaite » (*perfect focusing*)¹⁰⁴. Un cycle de vol avec un trajet de 2,1 m est répété huit fois avant détection, soit une trajectoire ionique d'environ 17 m. Avec ce système, la résolution est portée à 80000 (largeur à mi-hauteur) pour un ion à $m/z = 2564$ (*Corticotropin-Like Intermediate Peptide*). De plus, une précision de masse élevée (moins de 2 ppm) est obtenue en utilisant une méthode d'étalonnage interne, et ce pour une gamme de m/z allant de 700 à 2800. La sensibilité élevée de ce type de spectromètre a également permis d'identifier des protéines jusqu'à un niveau de dilution atteignant 100 attomolaire (10^{-18} mol.L⁻¹).

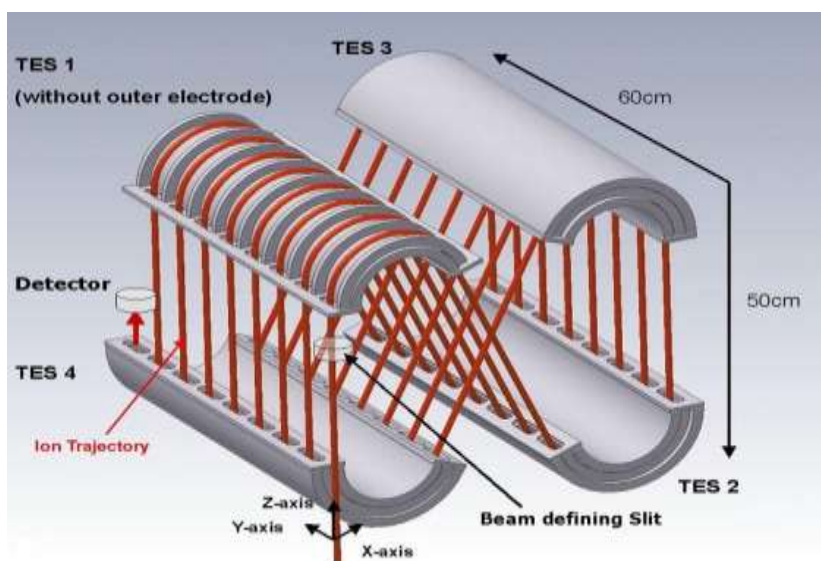


Figure I-21 : Schéma¹⁰³ du système d'optique ionique avec une trajectoire d'ions en spirale.

(TES : Secteur Electrostatiques Toroïdaux).

Ce système d'optique ionique plus récent et plus coûteux n'est pas encore très répandu. Actuellement, la plupart des spectromètres de type MALDI-TOF sont construits selon les principes précédemment décrits (mode linéaire/rélectron) avec des longueurs de tubes (TOF verticaux ou horizontaux) compatibles avec une installation en laboratoire ne requérant pas d'aménagements spécifiques, c'est à dire de l'ordre du mètre.

La spectrométrie de masse MALDI avec analyseurs TOF corrigés s'est imposée comme la méthode de choix pour l'analyse des métabolites secondaires, en raison de sa sensibilité élevée,

et sa capacité d'élucidation structurale. Ainsi l'analyse d'alcaloïdes peut se faire avec ce type d'appareil MALDI-TOF.

2. Les alcaloïdes

2.1. Généralités sur les métabolites secondaires

La croissance et le développement des végétaux sont associés à la production de métabolites primaires et secondaires¹⁰⁵. Les métabolites primaires sont directement impliqués dans les processus de développement, de fonctionnement de base et de la reproduction des cellules. Chimiquement, ce groupe des métabolites primaires est constitué par les glucides, les acides aminés, les protéines, les nucléotides...etc, qui sont des composés issus de la photosynthèse. Les métabolites secondaires (MII) ne sont pas produits directement lors de la photosynthèse, mais résultent de réactions chimiques ultérieures. Ils ne participent pas directement aux processus vitaux des cellules, mais assurent néanmoins des fonctions écologiques importantes, souvent en lien avec leur localisation *in planta*¹⁰⁶. Ils jouent différents rôles : phéromones, signaux chimiques permettant à la plante de s'adapter à un changement de l'environnement¹⁰⁷, moyens de défense contre les herbivores, pathogènes (phytoalexines) ou compétiteurs¹⁰⁸. D'autres MII protègent la plante des radiations solaires. Il existe trois grandes familles de MII chez les plantes : les alcaloïdes, les terpénoïdes et les (poly)phénols¹⁰⁹. Dans cette étude, nous nous intéresserons plus particulièrement aux alcaloïdes.

2.2. Généralités sur les alcaloïdes

2.2.1. Définitions et origine

Le terme « alcaloïde » (de l'arabe « al kaly » la soude, et du grec « eidos » aspect) a été introduit par W. Meissner au début du XIX^{ème} siècle pour désigner des substances naturelles réagissant comme des bases. Cependant, il n'existe pas de définition simple et précise des alcaloïdes et il est parfois difficile de situer les frontières qui séparent les alcaloïdes et les autres métabolites azotés d'origine naturelle. Ainsi, Bruneton définit un alcaloïde comme « un composé organique hétérocyclique d'origine naturelle (le plus souvent végétale), azoté, plus ou moins basique, de distribution restreinte et doué à faible dose de propriétés pharmacologiques marquées »¹¹⁰. À ce jour, si l'origine végétale est prépondérante, plus de 27683 alcaloïdes différents ont été isolés à partir de sources végétales, animales (Figure I-22) ainsi qu'à partir de micro-organismes¹¹¹.

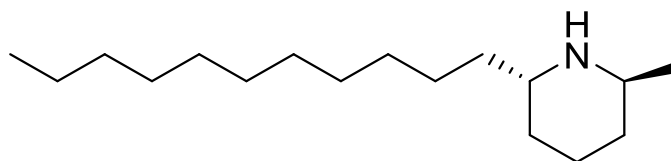


Figure I-22 : La solenopsine, alcaloïde isolé de la fourmi de feu (*Solenopsis invicta*).

2.2.2. Classification

On distingue généralement trois types d'alcaloïdes : les alcaloïdes vrais, les pseudo-alcaloïdes et les proto-alcaloïdes.

Alcaloïdes vrais : leur biosynthèse implique à l'origine un ou plusieurs acides aminés. Ils comportent au moins un atome d'azote hétérocyclique. Ils présentent une activité biologique même à faible dose. (nicotine du tabac, Figure I-23-a).

Pseudo-alcaloïdes : présentant les mêmes caractéristiques que les alcaloïdes vrais, ils ne dérivent toutefois pas des acides aminés. Ils dérivent plutôt d'isoterpénoïdes ou de la voie des acétates. (coniine de la ciguë, Figure I-23-b).

Proto-alcaloïdes : ceux-là sont des amines simples, dont l'azote n'est pas inclus dans le système hétérocyclique. De caractère basique, ils sont élaborés *in-vivo* à partir d'acides aminés. (Ex : mescaline de peyotl, Figure I-23-c).

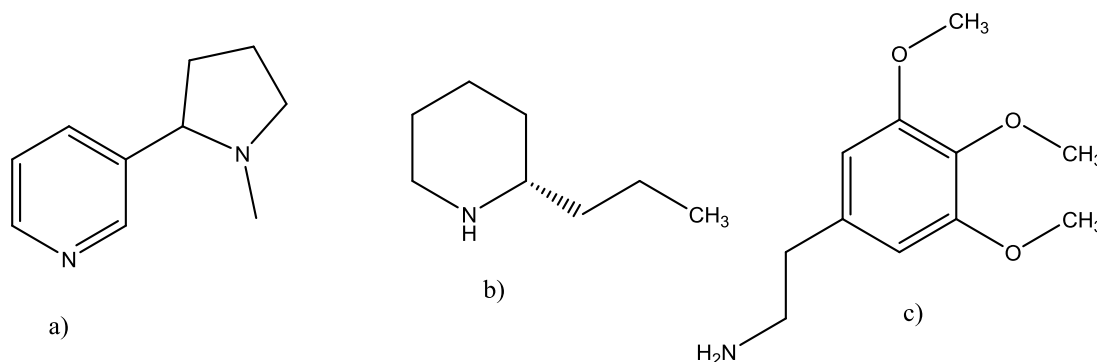


Figure I-23 : Structure de a) nicotine, b) (S)-coniine et c) mescaline.

2.3. Utilité et usages des alcaloïdes

Le patrimoine archéologique et historique montre qu'à travers l'Asie, l'Europe et l'Afrique les hommes utilisaient des plantes contenant des alcaloïdes dès 2000 avant J.-C.¹¹² Actuellement, les alcaloïdes présentent également des nombreuses applications en médecine moderne, en raison de leurs propriétés pharmacologiques. Certaines substances peuvent ainsi être analgésiques (morphine), antipaludiques (quinine), anticancéreuses (vinblastine, vincristine) ;

tandis que d'autres se révèlent toxiques (strychnine, nicotine). Les alcaloïdes jouent aussi le rôle d'antibiotique comme la clausenol et la squalamine.¹¹³

Compte tenu de cet éventail de propriétés, les plantes à alcaloïdes (Figure I-24) et les alcaloïdes eux-mêmes occupent une place de choix dans les pharmacopées tant traditionnelles que modernes.



Figure I-24 : Structure de la morphine, isolée en 1804 à partir du pavot à opium (*Papaver somniferum*)¹¹⁴.
(Source de la photo Wikipédia)¹¹⁵

2.4. Propriétés physico-chimiques

Généralement les alcaloïdes possèdent de faibles masses molaires (rarement > 1000 Da). La majorité sont des solides cristallisés, une minorité sont liquides à température ambiante (nicotine, mescaline,...). En outre, en raison de la présence de carbones asymétriques, la plupart d'entre eux sont souvent sous forme énantiomériquement pure et caractérisés par un pouvoir rotatoire¹¹⁶. Les alcaloïdes sont ordinairement insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques (alcools, chloroforme, acétone, etc.), alors que leurs sels ont des caractères de solubilité inverse.

La basicité des alcaloïdes est très variable et dépend de la disponibilité des doublets libres des atomes d'azote existants. Ainsi, elle est fortement influencée par la présence des groupements liés à l'atome d'azote : les groupements électro-attracteurs adjacents à l'atome d'azote diminuent la basicité, par contre ceux électro-donneurs la renforcent.

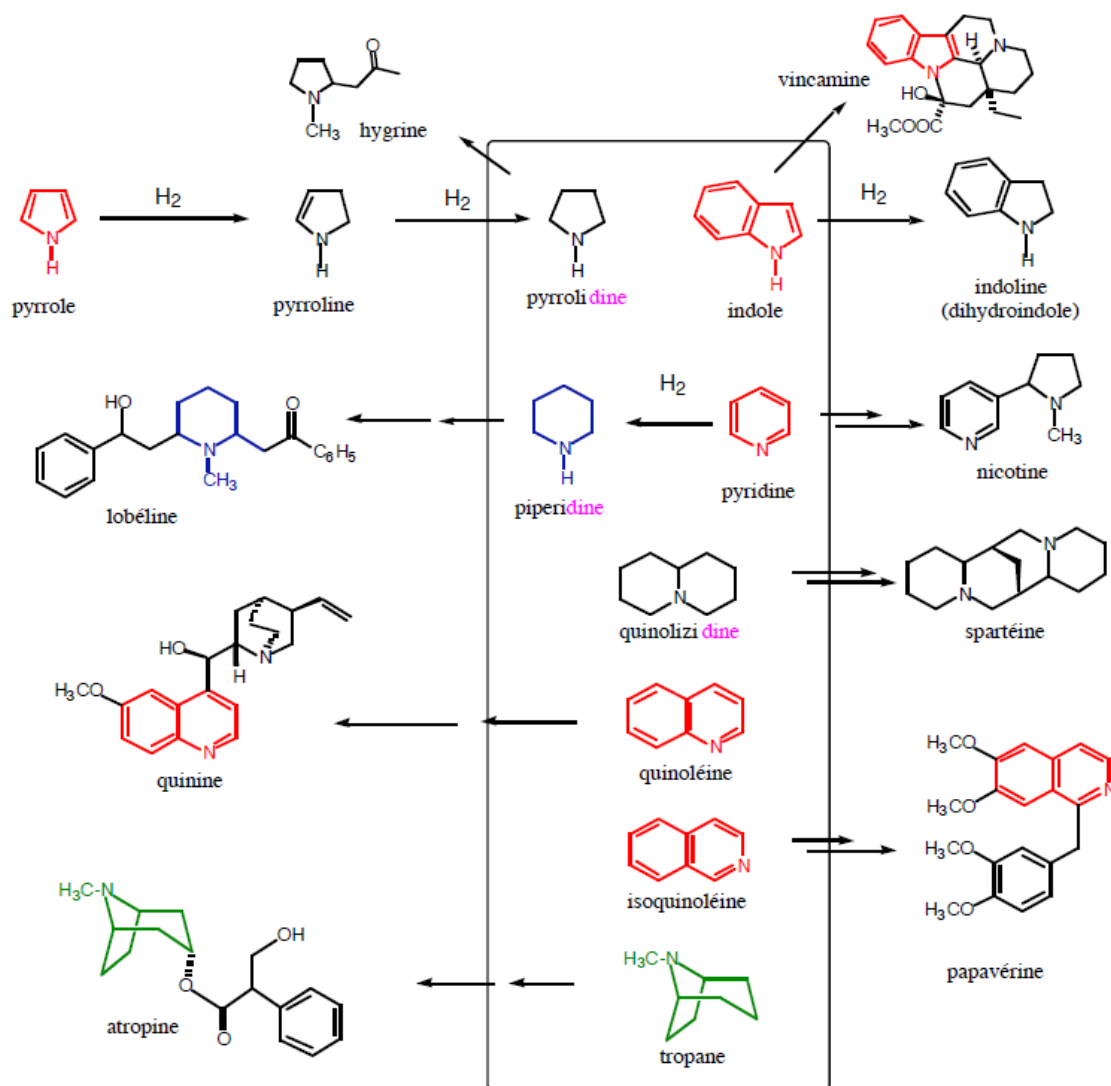
Le système hétérocyclique (Figure I-25) peut lui-même être de basicité variable. La basicité est également influencée par des contraintes stériques (au moins dans les molécules polycycliques complexes). La basicité peut être également un facteur d'instabilité pour ces molécules qui, à l'état de base et en solution, sont sensibles à la chaleur, à la lumière et à l'oxygène.

2.5. Détection des alcaloïdes

Les premières extractions d'alcaloïdes ont été réalisées au début du XIX^{ème} siècle. Derosne¹¹⁷ est un pharmacien français qui a extrait en 1803 un mélange de noscapine et de morphine de l'opium appelé sel de Derosne. En 1806, la morphine était isolée comme le principe somnifère de l'opium. Cela a conduit à une succession rapide d'isollements et de découvertes d'autres composés par plusieurs scientifiques européens : la strychnine en 1817, l'émétine en 1817, la brucine en 1819, la pipérine en 1819, etc. Ce phénomène scientifique a été décrit par Sneader en 2005, comme «la plus grande avancée dans le processus de découverte de médicaments »¹¹⁸.

En 2014, **27 683** alcaloïdes étaient cités dans le dictionnaire des produits naturels (*Dictionary of Natural Products*)¹¹¹.

L'importance de ces produits naturels dans les programmes de découverte de médicaments, ainsi que dans d'autres domaines d'application, est bien établie. Par conséquent, leur synthèse, leur détection, l'élucidation de leur structure, de leur mode d'action constituent des thèmes de recherches pour de nombreux groupes, et en particulier pour le laboratoire SONAS.


 Figure I-25 : Quelques noyaux de bases des alcaloïdes¹¹⁹.

La méthode classique pour détecter ou quantifier les alcaloïdes débute par une phase d'extraction sélective des alcaloïdes de la matrice végétale en exploitant généralement ses propriétés basiques, c'est à dire en réalisant une extraction liquide-liquide avec deux phases organique et aqueuse acide non-miscibles. Ensuite, la quantification est réalisée par CLHP couplée à une détection souvent UV.

Au cours des dernières années, l'électrophorèse capillaire (CE) couplée à la spectrométrie de masse a été développée comme un outil prometteur pour l'analyse d'une large gamme de classes chimiques, dont les métabolites secondaires des plantes. Une étude a résumé les analyses par CE de divers groupes d'alcaloïdes tels que les alcaloïdes de l'opium, du pilocarbe ou bien des protoalcaloïdes de l'éphédra¹²⁰. Plus récemment cette technique a permis la détection

d'harmanes¹²¹ dans des algues comestibles, ainsi que l'analyse des isoquinoléines de *Rhizoma coptidis* (*Ranunculaceae*), une plante de la médecine traditionnelle chinoise¹²².

Une sonde fluorescente¹²³ (Figure I-26) sensible aux alcaloïdes a été récemment développée avec succès. Ce complexe amphiphile de zinc II-base de Schiff se lie à certains alcaloïdes et devient alors fortement fluorescent. La coordination de l'alcaloïde est influencée par sa basicité de Lewis, ainsi que par ses caractéristiques stériques. Cette sonde utilisée en milieu apolaire (dichlorométhane) s'avère particulièrement efficace pour la détection d'alcaloïdes pyridiniques (nicotine) et quinoléiques (cinchonine) pour lesquels la limite de quantification (LOQ) est de l'ordre du micromolaire (*i.e.* 0,40 μM pour la nicotine). Cette approche constitue un procédé utile pour la détection d'alcaloïdes dans des solvants non polaires.

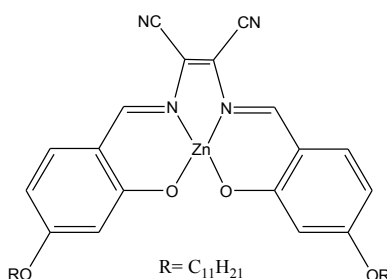


Figure I-26 : Structure du complexe de zinc II utilisé comme sonde fluorescente.

La méthode MALDI-TOF-MS utilisant CHCA et DHB comme matrices permet de détecter les alcaloïdes dans des plantes de la médecine traditionnelle chinoise. En effet, CHCA et DHB étant des acides faibles, ils peuvent même être utilisés pour mettre directement en évidence les alcaloïdes sur une coupe de la plante sans provoquer de dommages aux structures physiologiques de la plante.¹²⁴ Ainsi, après déposition d'une solution de matrice sur une coupe des racines d'*Aconitum carmichaeli* de 10 à 20 μm d'épaisseur placée sur une plaque cible, l'analyse MALDI de la surface entière de la coupe est convertie en une image (imagerie MALDI), ce qui permet de directement détecter les alcaloïdes à partir de cette coupe de plante et renseigne sur la localisation des alcaloïdes. Cette méthode permet donc de détecter de manière prospective des traces de composants ciblés directement à partir du matériel végétal.

3. Les contributions des équipes angevines dans le domaine

Des nombreux travaux de recherche visant l'amélioration de la technique MALDI ont été réalisés à l'Université d'Angers. À l'origine, la méthode DIAMS a ainsi été proposée comme alternative au MALDI⁴⁰. En se basant sur la technique SAMDI (*cf.* page 21), le principe du DIAMS repose sur

l'utilisation d'une monocouche auto-assemblée (Figure I-27) qui se comporte comme une matrice MALDI immobilisée sur une surface d'or. Ceci permet de conserver les avantages d'une matrice organique comme médiateur dans le processus de désorption/ionisation laser en MALDI, sans produire d'ions de matrice pouvant gêner l'analyse des composés de bas poids moléculaires (typiquement < 700 Da)

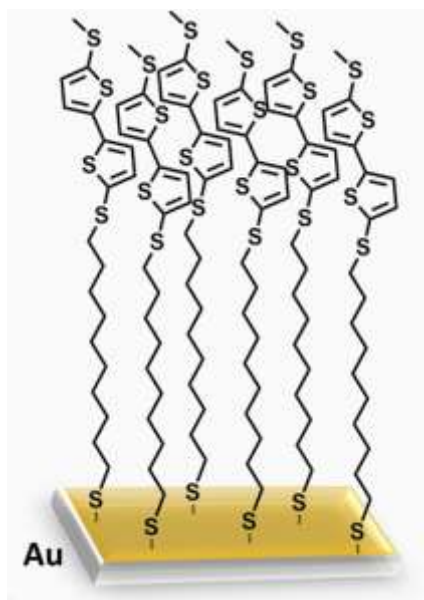


Figure I-27 : SAM utilisée dans la technique DIAMS¹²⁵.

Le précurseur de la monocouche choisi comporte une fonction thiol d'accroche à la surface d'or, un bras espaceur et un chromophore (système bithiophénique) qui absorbe fortement (ϵ à 337 nm = 20000 L.mol⁻¹.cm⁻¹) à la longueur d'onde du laser (Figure I-28¹²⁶). Les monocouches ainsi élaborées ont été utilisées avec succès pour l'analyse de peptides, de glycérides, et d'acides gras de bas poids moléculaires¹²⁵ mais aussi d'alcaloïdes tels que la quinine et la yohimbine¹⁶. L'un des avantages de cette technique est qu'elle peut être appliquée à l'analyse de petites molécules organiques dans des matrices biologiques complexes en s'affranchissant des méthodes de séparations chromatographiques, ce qui n'est pas très courant en MALDI en raison de l'interférence des substances au sein duquel se trouvent les analytes. Toutefois des études montrent que l'effet de la monocouche auto-assemblée utilisée en DIAMS pour favoriser l'ionisation est assez limité¹⁶. En effet, les surfaces dont le taux de recouvrement par le précurseur bithiophénique est le plus faible produisent le rendement en ions le plus élevé. L'ionisation est donc favorisée, non pas par un effet matrice, mais par un processus apparenté au LDI sur surface d'or. Les données de la littérature montrent en effet qu'un ratio optimal matrice/analyte en MALDI doit être supérieur à 1000. Dans le cas du DIAMS, le ratio matrice immobilisée/analyte est probablement plus proche de 200 pour les surfaces dont le taux de recouvrement est le plus élevé, ce qui explique très probablement les limites de cette technique. Afin de contourner ce problème et d'augmenter le ratio matrice bithiophénique/analyte, les

composés bithiophéniques préparés pour élaborer les monocouches furent ensuite directement utilisés comme matrice en MALDI, ce qui permettait d'améliorer les rendements d'ions durant les analyses.

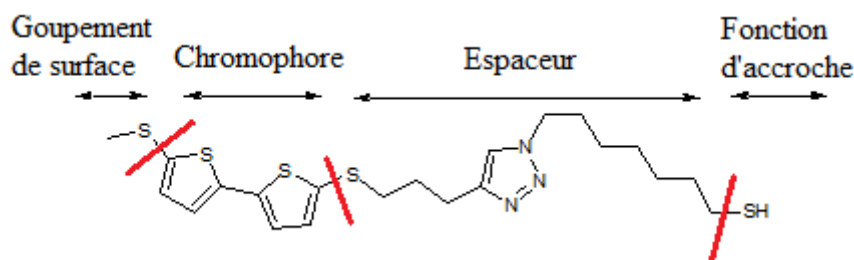


Figure I-28 : Précurseur de monocouche DIAMS de structure de triazolobithiophène.

C'est dans ce cadre que fut étudié le potentiel du motif 2,2'-bithiophène substitué par des chaînes courtes comme matrice en MALDI. Une petite chimiothèque de dérivés 2,2'-bithiophéniques portant en position 5 et 5' des atomes de soufre liés à des chaînes carbonées de longueurs variables a ainsi été préparée. Parmi ces composés, MT3P¹⁵ [ou (3-(5'-(méthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propanenitrile) (Figure I-29)] apparut le plus intéressant pour l'analyse des produits de type alcaloïdique. En effet, cette matrice fournit des intensités relatives d'ions élevées lors de l'analyse de ce type de composés, et des réponses faibles voire nulle, pour les autres groupes de métabolites secondaires testés. Son intérêt a aussi été démontré pour la détection spécifique d'alcaloïdes dans des mélanges complexes³³.

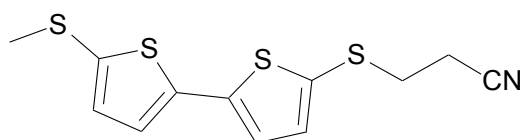


Figure I-29 : Structure du MT3P.

L'utilisation du MT3P comme matrice dédiée à la détection spécifique, l'identification et/ou la quantification d'alcaloïdes par spectrométrie de masse MALDI-TOF a été brevetée³³. C'est dans ce cadre que mes travaux de thèse ont été réalisés avec pour objectif, après avoir optimiser les performances de cette matrice notamment en termes de limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ), d'élaborer une méthode d'analyse quantitative des certains alcaloïdes toxiques et d'étudier les paramètres fondamentaux permettant d'expliquer la sélectivité du M3TP pour les substances alcaloïdes.

Par le biais de collaborations, nous avons par ailleurs tenté d'étendre le champ des applications de la matrice MT3P, tant en imagerie MALDI (Prof. Michael Spiteller, Institute of Environmental Research (INFU), Technical University of Dortmund) qu'en analyses toxicologiques (Prof. Olivier Laprévotte, Université René Descartes - Paris 5).

Chapitre II : Optimisation

Chapitre II : Optimisation

1. Introduction

La préparation des échantillons à analyser est une étape cruciale du processus d'analyse et peut influencer la réponse en MALDI. Ainsi, elle doit être optimisée selon les caractéristiques de l'échantillon (sa solubilité, sa stabilité) et le type d'informations attendues, selon la nature de la matrice organique, le pH et la nature du solvant, la présence de tensioactifs, et finalement selon les caractéristiques intrinsèques des analytes. Préparer un échantillon, c'est choisir la matrice et le solvant convenables, réaliser le dépôt, parfois ajouter des agents de cationisation pour promouvoir la formation des espèces ioniques (les composés dépourvus de sites suffisamment acides ou basiques, tels que les glucides et les polymères synthétiques, peuvent être ionisés par l'ajout de cations comme Na^+ , Ag^+ , K^+ , Cu^{2+})^{127,128} et/ou de co-matrices. La préparation de l'échantillon peut donc varier, et des conditions optimums ont empiriquement été déterminées pour l'analyse de différents groupes d'analytes et selon la méthode de dépôt¹²⁹ (cf paragraphe 5). (Tableau II-1)¹³⁰.

Matrice	Solvant de la matrice	Additif	Mode de dépôt	Analyse de
CHCA	Eau/ACN (4/6) + 0.1% TFA	---	Goutte séchée/ Sandwich	Peptides
CHCA	Acétone/Eau (99/1)	---	Couche mince	Peptides
DHB	Eau (+ 0.1 % TFA)	---	Goutte séchée	Peptides
DHB	10 % Ethanol	---	Goutte séchée	Oligosaccharides
ATT (6-aza-2-thiothymine)	ACN	Citrate d'ammonium	Goutte séchée	Oligonucléotides
HABA	THF	NaCl	Goutte séchée	polymères synthétiques

Tableau II-1 : Différentes méthodes de préparation d'échantillons selon la nature des composés analysés.

En ce qui concerne notre projet, nous avons pour objectif de mieux connaître les caractéristiques de MT3P, et cela nécessitera de réaliser un nombre important d'analyses MALDI. Avant de réaliser toutes ces analyses, il nous est apparu nécessaire de bien maîtriser et comprendre le fonctionnement et la réponse de l'instrument lors de l'utilisation de la matrice MT3P. Des études de répétabilité, de reproductibilité et des optimisations des différents paramètres expérimentaux (solvant, méthode de dépôt, paramètre du laser) ont été entreprises. Cette partie de chimométrie nous a permis de définir des protocoles expérimentaux capables de répondre aux différents besoins lors de l'analyse d'échantillons variés. Cette étude préliminaire facilitera aussi le développement de la méthode de dosage dans la deuxième partie de ce manuscrit. Nous étudierons donc différents paramètres (solvant de la matrice, méthode d'acquisition, méthode de déposition, l'énergie du laser) qui peuvent changer la qualité du spectre final de la technique MALDI. La marche à suivre consiste à choisir tout d'abord un paramètre à examiner en essayant de fixer les autres autant que possible. La même analyse sera ensuite réitérée et la répétabilité de la mesure, l'intensité du signal d'intérêt, l'allure du spectre, les fragmentations, la résolution seront évalués.

Les résultats des variations apportées dans le protocole d'expérience sont comparés aux résultats obtenus avec le protocole décrit précédemment, utilisé pendant les anciens travaux du laboratoire et pris comme référence. Les mêmes séries de mesures sont donc réalisées avec les différentes méthodes.

Pour une analyse statistique des différentes méthodes de réalisation des spectres, il faut une grandeur mesurable qui reflète et représente les informations offertes par les spectres. Deux possibilités se présentent : utiliser comme valeur l'intensité des pics d'intérêt ou leurs aires. Le calcul des aires par le logiciel d'acquisition étant approximatif (car l'intégration de l'aire par le logiciel dépend de la résolution de l'instrument et peut conduire à l'intégration de deux pics se chevauchant), le choix s'est porté sur l'intensité des pics.

2. Généralités sur l'ionisation des alcaloïdes en MALDI

Généralement, les produits naturels présentant des groupements acides tels qu'acide carboxylique (e.g., les dérivés de l'acide cafféoylquinique (Figure II-1-a)) ou phénol (e.g., les flavonoïdes (Figure II-1-b)) sont facilement déprotonés, ce qui permet en spectrométrie de masse la détection de leurs ions en mode négatif. Par contre, pour les produits naturels avec des groupements basiques comme les alcaloïdes, c'est le mode positif qui sera le plus adapté¹³¹.

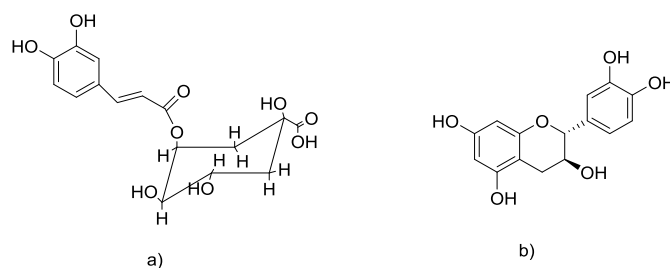


Figure II-1 : Structures a) de l'acide caféoylquinique b) (+)-catéchine.

Toutefois, les alcaloïdes eux-mêmes sont différemment ionisés selon leur caractéristique structurale. Par exemple, les alcaloïdes ayant un système conjugué et une charge positive permanente (les alcaloïdes isoquinoléiques quaternaires), tels que la berbérine et la palmatine (Figure II-2), sont facilement ionisés en LDI, sans la nécessité d'une surface ou d'une matrice aidant l'ionisation¹³². Bien évidemment, si une matrice est utilisée, l'ionisation est améliorée (Figure II-3).

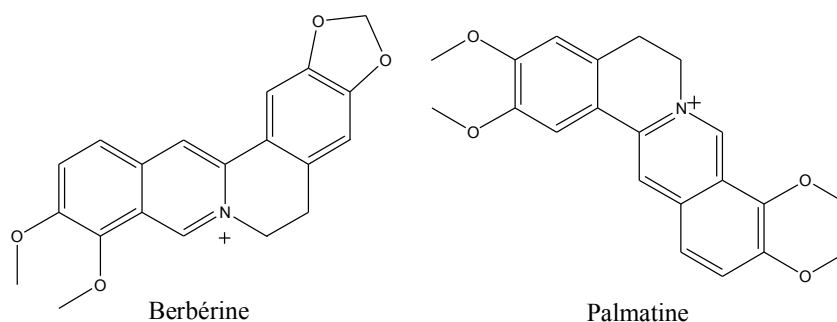


Figure II-2. Structures de la berbérine et de la palmatine.

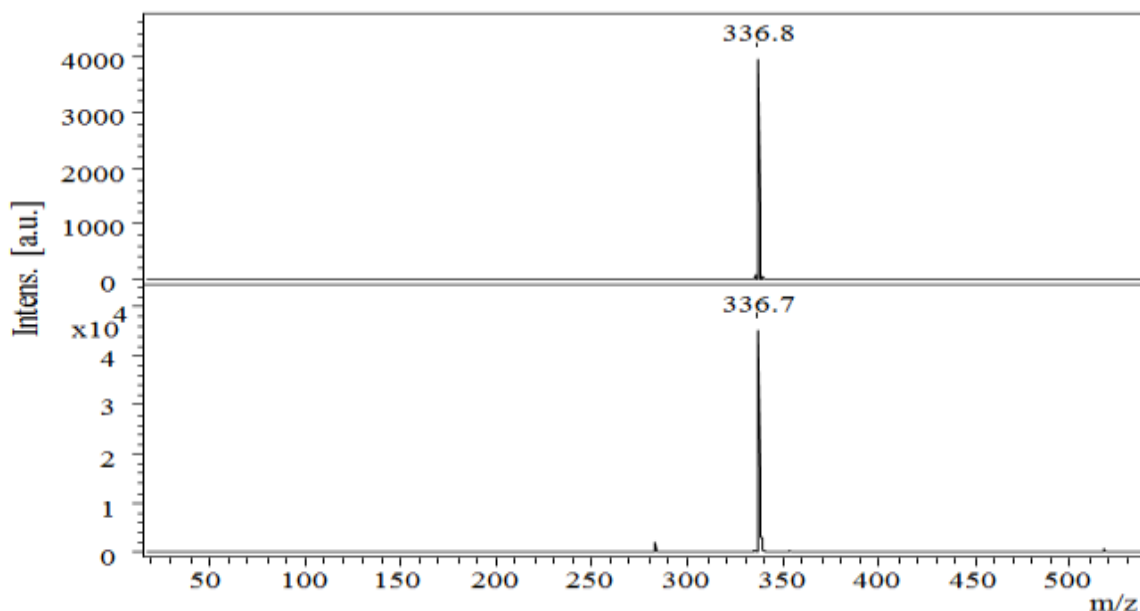


Figure II-3. Spectres de masse de la berbérine obtenus en LDI (spectre du haut) et en MALDI en utilisant MT3P comme matrice (celui du bas) ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

De plus, par analyse MALDI, les alcaloïdes donnent fréquemment des ions pseudomoléculaires cationisés : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$. Dans le cas d'alcaloïdes comme la colchicine, ces adduits avec des cations sont même très importants avec certaines matrices, et le pic de l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ est même absent. Toutefois, pour d'autres alcaloïdes comme la brucine (de masse 394,47 Da), le spectre MALDI est complexifié dans la zone de l'ion moléculaire (Figure II-4-A) avec les signaux à m/z 393,39, 394,42, 395,45 correspondant respectivement aux ions $[M-H_2+H]^+$, M^+ et $[M+H]^+$.

Remarquons aussi que les dérivés d'alcaloïdes de types β -carboline (*e.g.*, norharmane) ont été utilisés avec succès comme matrices MALDI^{133,134} pour l'analyse de protéines et de polysaccharides. Cette caractéristique est due d'une part à la présence de l'azote basique de la pyridine et l'autre acide de l'indole dans la structure β -carboline (Figure II-4-B) et d'autre part à la forte absorption de ces molécules dans le domaine UV utilisé dans les instruments MALDI.

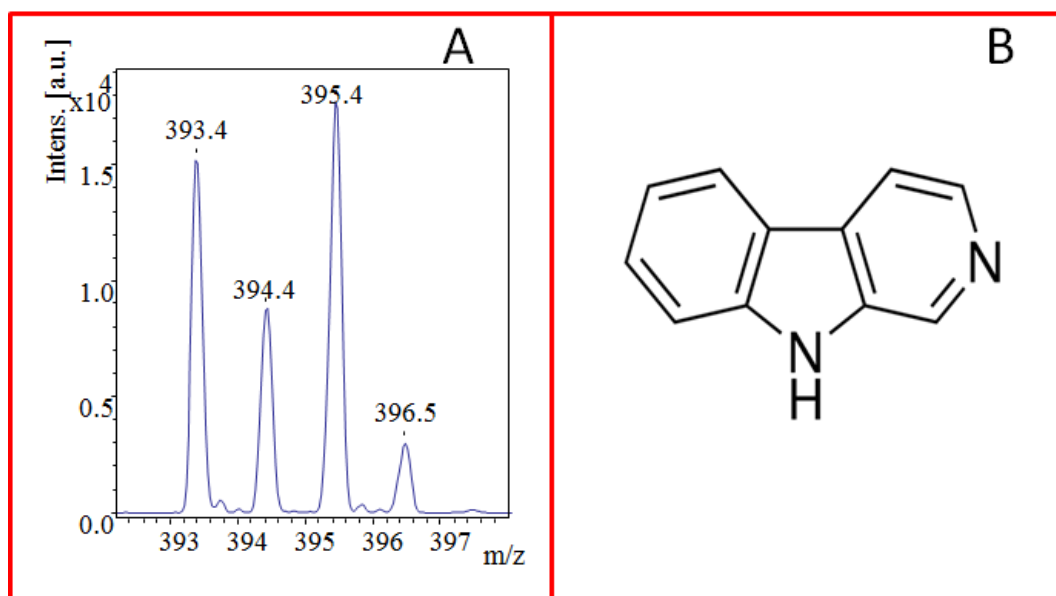


Figure II-4 : A- spectre de masse MALDI de la brucine avec les ions $[M-H_2+H]^+$, M^+ et $[M+H]^+$ en utilisant MT3P comme matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J); B- structure du norharmane utilisé comme matrice.

3. Pourquoi l'optimisation de la méthode de préparation ?

Avant de rentrer dans les détails, il convient de resituer les objectifs de cette thèse. Les travaux réalisés viseront à développer les matrices bithiophéniques pour l'analyse MALDI des alcaloïdes, ce qui passe par la synthèse de nouveaux dérivés bithiophéniques et la comparaison de leur efficacité (sélectivités, ionisation, etc...) par rapport à la matrice bithiophénique de référence (MT3P) et aux matrices commerciales. De plus, un deuxième axe de développement consistera à

évaluer l'intérêt de MT3P pour le dosage d'alcaloïdes. En d'autres termes, les résultats doivent être utilisés pour une étude qualitative et une autre quantitative.

Il convient donc de valider que le protocole choisi pour réaliser les spectres permette réellement une comparaison entre différents essais.

Des essais initiaux, montrent que les intensités du pic moléculaire $[M+H]^+$ de la colchicine enregistrés avec MT3P sont très variable d'un spot à un autre lorsque l'analyse est réalisée le même jour (*Intra-day*) et aussi différents jours (*Inter-day*). Par exemple, la moyenne des intensités du pic moléculaire de la colchicine varie presque d'un facteur 1 à 3 (Figure II-5) lorsque l'analyse utilisant MT3P est réalisée trois jours différents non consécutifs et selon la méthode initialement développée.

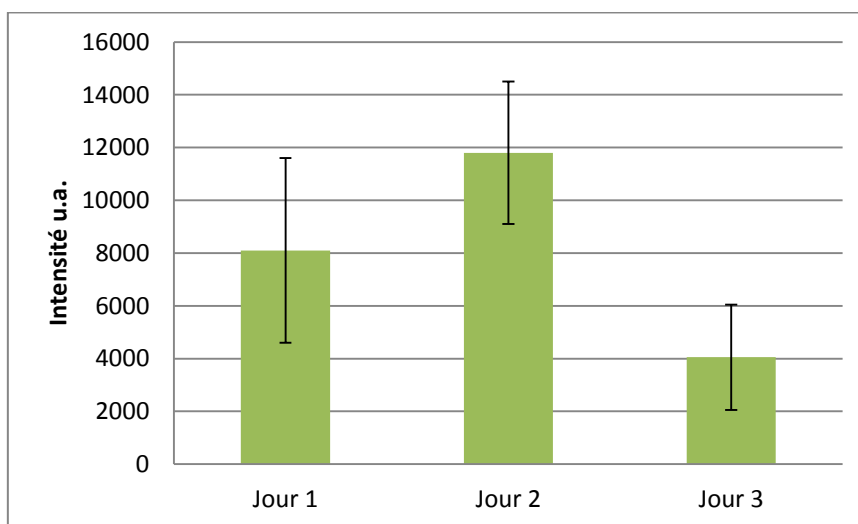


Figure II-5 : Histogramme montrant les moyennes d'intensités des pics moléculaires de colchicine analysée avec MT3P dans 3 jours différents. (Moyenne de 6 spectres, avec pour chacun d'entre eux 300 accumulations)

Par conséquent, la méthode utilisée montre une mauvaise répétabilité. Ce problème est un des défis les plus importants de la technique MALDI, les variations observées sont trop grandes pour permettre la poursuite de notre travail comparatif qui ne serait pas objectif et fiable. De ce fait, il est évident qu'une première étape va consister à optimiser la préparation de l'échantillon afin d'améliorer la répétabilité de la mesure.

Pour mener cette étude, la plupart des spectres ont été obtenus sur un appareil Biflex III, qui est le spectromètre de masse équipé d'une source MALDI utilisé par notre équipe, le cas échéant le nouveau type d'appareil sera indiqué. Ainsi, il convient de décrire l'appareil Biflex III et de présenter ses caractéristiques.

4. Le MALDI-TOF Biflex III

4.1. La source d'ionisation et le système d'introduction

Les mesures de masses par MALDI-TOF ont été réalisées et traitées principalement avec un instrument et logiciel de la société Bruker, flexAnalysis Version 2.0. Cet instrument est équipé des deux améliorations présentées précédemment : extraction retardée et détecteur réflectron (Figure II-6).

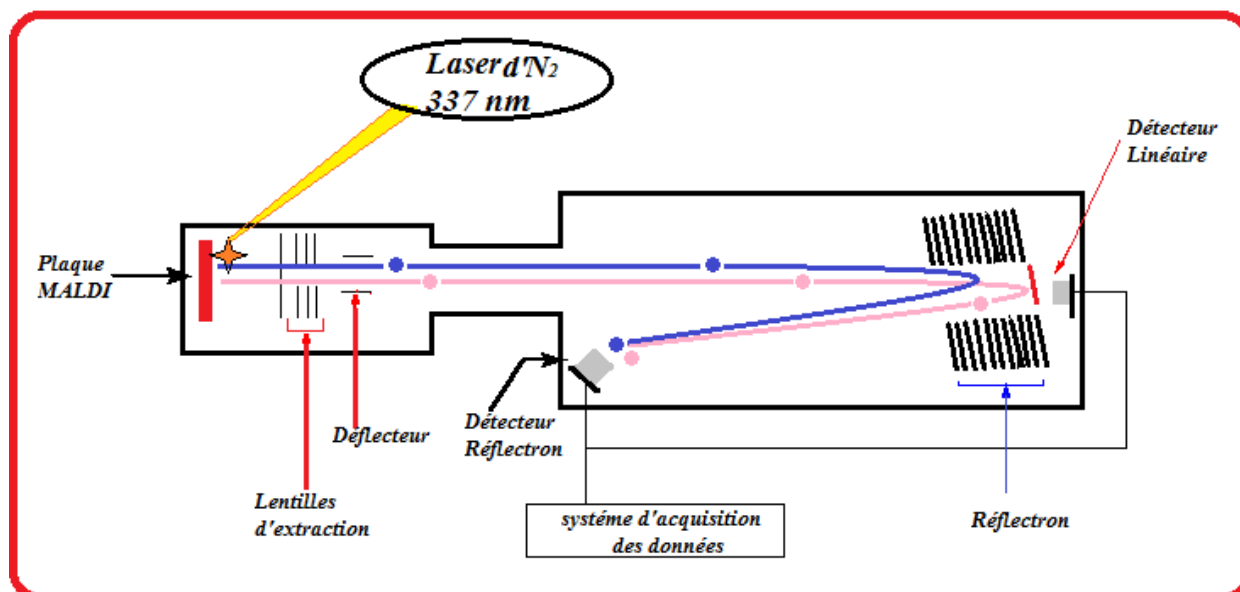


Figure II-6 : Représentation schématique du spectromètre de masse MALDI-TOF Bruker Biflex III.

La source est la partie de l'instrument dans laquelle l'échantillon à l'état solide est introduit, pour subir une désorption et l'ionisation par irradiation laser. Le Biflex III est muni d'un laser à azote (model VSL-337i, Laser Sciences Inc, Boston, MA) qui émet dans l'UV à la longueur d'onde de 337 nm, et délivre des pulsations de 3 ns avec une fréquence de tirs ajustable par un filtre atténuateur, jusqu'à 10 Hz. Un système optique focalise le faisceau laser, envoyé sous forme d'impulsions, vers la cible MALDI. Cette dernière joue le rôle du système d'introduction, c'est le porte-échantillon. C'est en fait une plaque d'acier inoxydable, qui est parfois polie (nos plaques ne le sont pas). Elle permet de déposer à sa surface jusqu'à 384 échantillons. L'entrée et la sortie de la plaque dans l'appareil où règne un vide poussé, se fait par un système de sas et de bras articulés. L'échantillon cible et la position de tir du laser, peuvent être réglés à l'aide d'un logiciel pilotant la séquence. De plus, un microscope muni d'une caméra CCD (*charge-coupled device*, ou en français dispositif à transfert de charge) est dirigée vers la zone irradiée sur la plaque. L'image fournie est affichée en temps réel dans le logiciel d'acquisition. Elle peut aussi être enregistrée. Le logiciel pilote entre autres la position de tir du laser sur la plaque, il

communiqué avec un plateau mobile dans les directions XY. Après son introduction dans l'appareil, la plaque est chargée sur ce plateau mobile. Le logiciel permet aussi de travailler des séries d'analyses entièrement automatisées (logiciel AutoXecute).

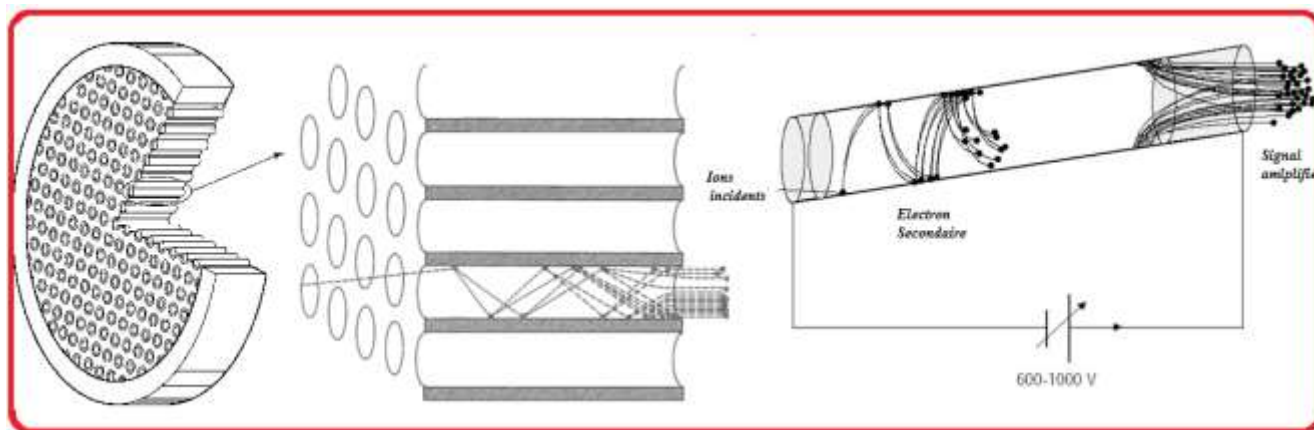
4.2. L'extraction et la déflexion des ions

L'extraction des ions est assurée par un jeu de différences de potentiel entre deux lentilles qui constitue deux zones d'accélération. L'instrument permet d'introduire un délai d'extraction τ de 200, 400 ou 600 ns entre l'ionisation et l'application du champ d'extraction. L'instrument est aussi muni à la sortie de la source d'un déflecteur qui a pour rôle de minimiser l'inconvénient de la fragmentation des matrices. En effet, ce système permet d'appliquer un champ électrique perpendiculaire au trajet des ions qui dévie ceux appartenant à la fourchette d'élimination choisie (zone de rapport m/z jugée non significative). Le déflecteur empêche donc les ions ciblés d'arriver au détecteur.

4.3. L'analyseur de masse TOF et la détection des ions

Le Biflex III offre les deux modes de vol présentés précédemment, le mode linéaire et le mode réflectron. L'utilisateur peut activer ou non la tension appliquée au miroir électrostatique et donc détecter les ions selon un de deux modes.

Le spectromètre possède deux détecteurs, un pour le mode linéaire et un pour le mode réflectron. Le système de détection équipant le spectromètre de masse est composé d'une galette de micro-canaux dont le principe est de convertir le nombre d'impacts d'ion qu'ils reçoivent en un courant électrique. Le Biflex III est armé d'un système de détection qui est composé d'une galette de micro-canaux suivi d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur. La galette de micro-canaux (Figure II-7) aussi appelé MCP¹³⁵ (*MicroChannel Plate*) joue un double rôle. Tout d'abord, elle convertit le flux d'ions en flux d'électrons. Plus précisément, elle convertit le nombre d'impacts d'ions en un courant électrique. De plus, elle amplifie le signal de la même façon qu'un photomultiplicateur.

Figure II-7 : Illustration de la galette de micro-canaux¹³⁵.

Une galette de micro-canaux est un dispositif constitué d'un disque en verre percé d'une multitude de micro-canaux et recouvert d'un alliage de nickel capable d'émettre un électron lors de l'impact d'un ion. Les micro-canaux sont des tubes de verre de quelques dizaines de micromètres de diamètre dont la surface intérieure est recouverte d'un matériau semi-conducteur (ex : du nickel) auquel est appliquée une haute tension de l'ordre du kilovolt. Chaque ion venant percuter la surface intérieure d'un canal entraîne l'émission d'un ou plusieurs électrons secondaires. Après qu'ils soient accélérés, les électrons résultants vont de nouveau frapper la paroi et engendrent l'émission d'électrons secondaires provoquant un effet d'avalanche. Les électrons sont au final collectés sur une anode qui produit un courant I dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ions incidents. La tension appliquée sur les micro-canaux permet non-seulement de ré-acceler les électrons secondaires, mais aussi de réapprovisionner en permanence la surface en électrons, ce qui assure la continuité du phénomène d'amplification par émission secondaire.

Le signal analogique à la sortie de détecteur est converti par un digitaliseur (numériseur) puis envoyé vers la station de travail qui enregistre et affiche les spectres de masse.

5. Méthodes de dépôt

5.1. Méthodes de dépôt classiques

Un dépôt MALDI idéal doit être représentatif de la composition de l'échantillon, ainsi il doit permettre la conservation de l'échantillon dans les conditions de l'analyse. Un dépôt est donc caractérisé par son homogénéité, que ce soit dans la composition ou la régularité de surface. Des efforts substantiels sont consacrés à trouver une méthode de préparation des échantillons optimale, ce qui passe par l'évaluation de différentes méthodes de dépôt idéales. De nombreuses

méthodes ont été élaborées depuis l'invention de MALDI pour répondre à la diversité des applications, et pour s'adapter à la nature de l'échantillon et de la matrice. On peut répertorier :

1- l'application manuelle (*hand spotting*) utilisant une seringue de pointe fine ou une micropipette. Trois modes existent :

- la méthode de préparation dite en **goutte séchée** (*dried droplet*) : une solution de matrice (saturée ou de concentration connue) est mélangée à l'échantillon à analyser et une goutte de cette préparation est déposée sur la surface métallique de la cible du spectromètre.

- la méthode de la **couche mince** (*thin layer*)¹³⁶ : la matrice qui est dissoute dans un solvant très volatil tel que l'acétone est déposée sur la plaque. Après évaporation, une solution de l'échantillon est déposée sur cette préparation. Les cristaux de matrice formés lors de l'évaporation du premier dépôt servent de germe de nucléation pour le mélange échantillon-matrice obtenu par les dépôts successifs.

- la méthode **sandwich** : elle consiste à déposer en premier lieu une couche de la solution de matrice, suivie d'une couche d'échantillon et sans laisser sécher la goutte précédente, puis à déposer de nouveau une solution de matrice. Le dépôt est alors séché à température ambiante.

2- L'application manuelle utilisant une micropipette, a initialement été utilisée dans le cas de l'imagerie MALDI. Toutefois, la solution de matrice déposée peut provoquer avant évaporation une délocalisation des analytes sur toute la surface de l'échantillon qui est préjudiciable à l'analyse. La fixation des analytes à leur position sur la coupe est essentielle pour une bonne analyse spatiale. L'application de la matrice est alors réalisée par des dispositifs automatisés qui limitent le volume de matrice déposé et ainsi évitent la délocalisation des analytes. L'électonébuliseur¹³⁷, l'aérographe¹³⁸ et le dispositif de sublimation¹³⁹ (Figure II-8) sont donc particulièrement adaptés dans l'imagerie MALDI-MSI et CCM-MALDI-MS.

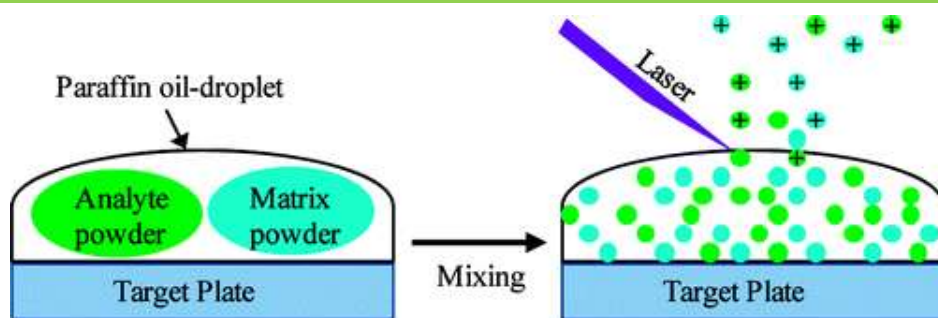


Figure II-8 : Dispositif de sublimation adapté en imagerie MALDI¹³⁹.

5.2. Quelques développements du mode de préparation

Le MALDI est de plus en plus l'outil standard en MS. Comme mentionné dans la partie bibliographique, les inconvénients principaux de cette technique sont une faible répétabilité, l'interférence avec des ions de matrice particulièrement dans la gamme des faibles masses moléculaire, ainsi que la suppression des ions d'analytes. Le problème de suppression souvent rencontré en MALDI, se manifeste par l'absence des pics que l'on s'attend à détecter normalement sur le spectre. Il existe deux phénomènes, l'effet de suppression des ions de matrice par les analytes (*Matrix Suppression Effect*, MSE) et l'effet de suppression des ions d'analyte (*Analyte Suppression Effect*, ASE) par d'autres d'analytes qui sont plus facilement ionisés.¹⁴⁰ L'insuffisance en répétabilité a plusieurs origines, elle est toutefois principalement causée par des facteurs liés à la préparation des échantillons¹³⁶. Différentes méthodes de préparation d'échantillon ont donc été rapportées dans la littérature.

Par exemple, la préparation des échantillons assistée par une huile (*oil-assisted sample preparation OASP*) consiste à mélanger la matrice solide et l'analyte solide dans une goutte d'huile comme l'huile de paraffine¹⁴¹ (Figure II-9). Cette méthode est applicable à une large gamme d'analytes, y compris des composés organiques peu solubles dans les solvants des matrices commerciales (eau, ACN et DCM), des polymères, des composés organométalliques, des peptides membranaires, et des échantillons solides biologiques.

Figure II-9 : Illustration¹⁴¹ de la technique OASP.

Récemment, une évolution de la méthode de séchage de la solution de matrice et d'analyte est proposée. En effet selon la technique classique, l'évaporation des solvants après la déposition des échantillons sur la plaque cible provoque un phénomène dit « *coffee stain* » causant l'hétérogénéité du spot. Dans la technique dite électro-mouillage (*electrowetting*)¹⁴², le solvant contenant la matrice et l'analyte est déposé sur une surface conductrice (plaques spécifiques dites plaques e-MALDI) se comportant comme une électrode. La plaque e-MALDI est constituée d'un réseau des bandes d'électrodes entrecroisées formées en oxyde d'indium dopé à l'étain (ITO de l'appellation anglaise : Indium Tin Oxide) sur une lame de microscope classique en verre¹⁴³. L'application d'une différence de potentiel permet de créer un flux au sein de la goutte favorisant l'évaporation du solvant. La tâche de dépôt résultante est plus petite et homogène.

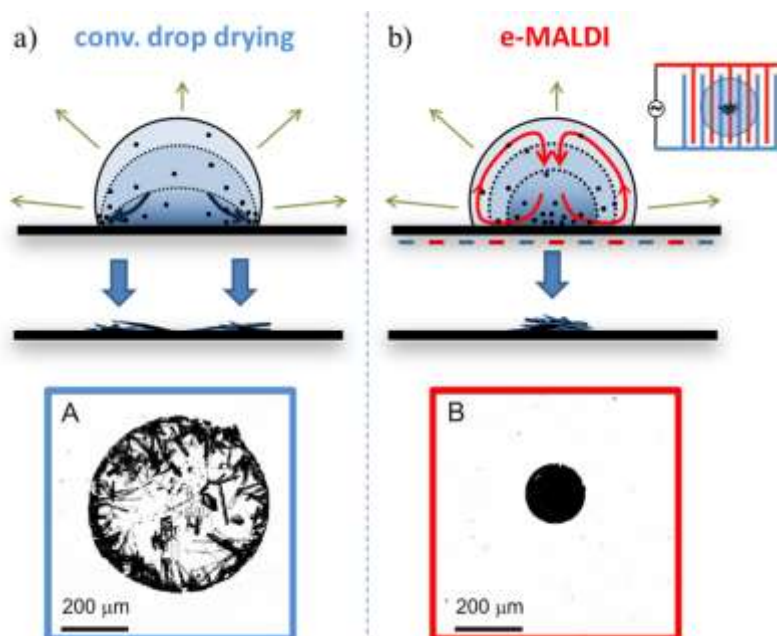


Figure II-10 : Illustration¹⁴² a) procédé de séchage conventionnel illustrant le flux entraînant l'évaporation au sein de la goutte (figure du haut, flèches vertes) et la tache résultante après séchage dite *coffee stain* (en bas, à gauche) b) processus de séchage par e-MALDI avec flux interne (figure du haut à droite : flèches rouges) conduisant à un précipité plus petit et plus homogène (en bas, à droite). Image du bas: morphologie d'un spot avec e-MALDI.

La méthode de dépôt dite couche mince a aussi été modifiée pour réduire considérablement l'effet de suppression des ions des analytes¹⁴⁴. Dans ce procédé, la matrice et l'analyte ne sont pas déposés simultanément sur le support métallique : une solution de matrice est tout d'abord préchargée sur la plaque. Cette première couche est ensuite recouverte par une solution de l'analyte (des peptides, des polymères synthétiques ou des lipides) en évitant de dissoudre la matrice. Cette méthode suggère que l'incorporation d'analytes dans les cristaux de la matrice a un effet contributif important en augmentant l'effet de suppression des analytes.

Ainsi, différentes approches¹²⁹ ont été développées pour trouver les conditions idéales de préparation de l'échantillon. Il n'existe toutefois probablement pas de solution universelle, et il convient donc de tester et d'optimiser les conditions d'analyse des alcaloïdes par MALDI avec des matrices bithiophéniques.

5.3. Méthode adoptée dans ce chapitre

Une partie importante de nos travaux a pour objectif de développer de nouvelles matrices MALDI bithiophéniques et de les utiliser pour l'analyse de produits naturels. Nous aurons donc à comparer l'efficacité d'un grand nombre de matrices pour la détection d'un large panel d'alcaloïdes. De plus, pour chaque alcaloïde analysé, il conviendra de répéter l'enregistrement du spectre de masse (*vide infra* paragraphe 6) pour obtenir des résultats significatifs de l'efficacité de chaque matrice. Pour ce type d'analyse, les dispositifs automatisés de dépôt plus adaptés à l'imagerie ne sont pas recommandés et sont donc écartés, la méthode manuelle est donc appropriée. Des tests ont été menés afin de choisir la méthode manuelle la plus convenable. Un mélange de trois alcaloïdes (harmine, cocaéthylène et yohimbine) est déposé sur la plaque suivant les trois méthodes de déposition goutte séchée, couche mince et sandwich (12 spots/chaque méthodes). La Figure II-11 montre les moyennes et les écart-types obtenues avec chacune de ces méthodes. En termes de rendement d'ions d'analyte formés, la méthode goutte séchée semble avoir une légère préférence par rapport aux deux autres modes de dépôts. Ceci est dû à des moyennes d'intensité allant de semblables dans certains cas (cocaéthylène) et arrivant à trois fois plus grandes dans d'autres (harmine). En outre, on remarque la grande dispersion des intensités dans chaque méthode en constatant les grands écart-types.

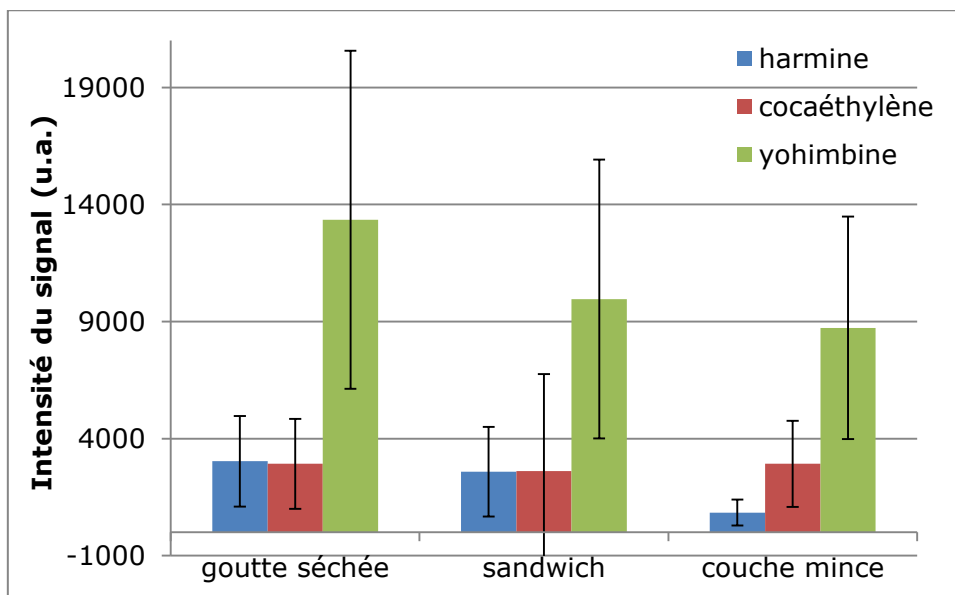


Figure II-11 : Moyennes et écarts-types sur les intensités des ions harmine, cocaéthylène et yohimbine obtenus en utilisant MT3P comme matrice et selon trois méthodes de dépôt. Intensités moyennes sur 12 spectres de masse ; 150 accumulations/spectre.

En se basant sur ces derniers résultats et dans le souci de facilitation des analyses, la méthode de dépôt par goutte séchée est retenue. En effet, cette méthode nécessite moins de manipulations que les méthodes sandwich ou couche mince passant par de multiples dépôts, et donc de fréquents changements de cônes de micropipettes. La Figure II-12 illustre le protocole de préparation suivi dans la totalité de ce chapitre.

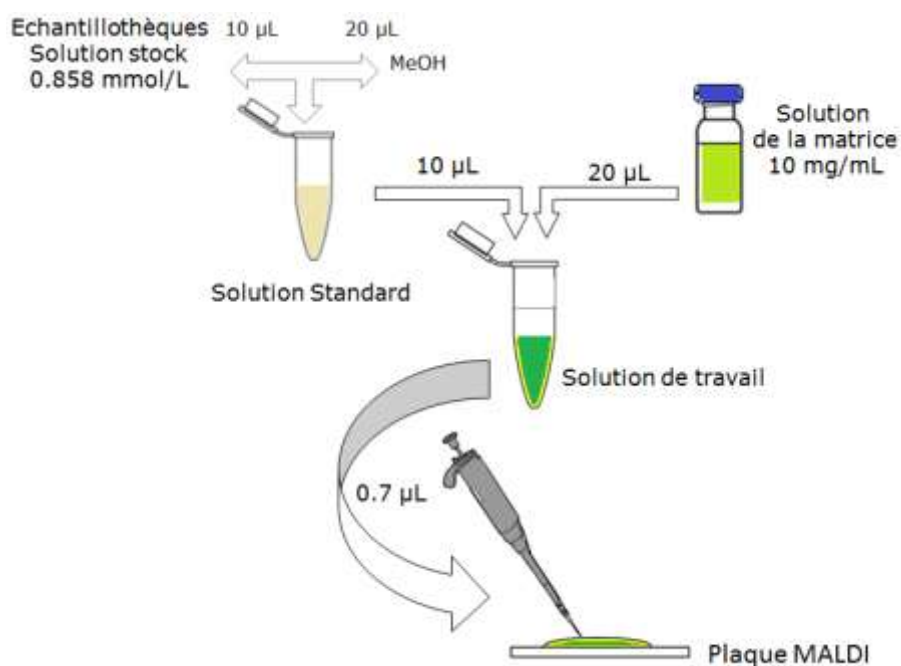


Figure II-12 : Protocole de préparation et de dépôt de l'échantillon.

6. Vers un traitement de données plus robuste

De manière à comparer ultérieurement MT3P avec d'autres matrices, la méthode de traitement des données est à considérer car plusieurs valeurs peuvent être extraites d'un spectre de masse MALDI. Jusqu'à présent dans notre laboratoire, c'est l'intensité de l'ion quasi-moléculaire de l'analyte qui était utilisée pour comparer les spectres. Cependant, les rapports des intensités de pic de l'analyte et de la matrice, ou de l'analyte et d'un étalon interne peuvent se présenter comme alternative.

Si la première valeur (intensité de l'ion quasi-moléculaire de l'analyte) est une donnée absolue du spectre, la seconde (rapports des intensités de pic de l'analyte et de la matrice) nécessite un traitement et son utilisation peut être faussée par le phénomène de suppression qui affecte les ions des analytes et/ou celles de la matrice. Pour la troisième option (rapports des intensités de l'analyte et d'un étalon interne), il conviendrait de choisir un étalon interne qui doit posséder des propriétés physiques et chimiques proches de l'analyte. Or, nos analyses seront réalisées avec des classes très différentes d'alcaloïdes et aussi avec des produits naturels non alcaloïdiques. Alors, il semble difficile de trouver un compromis pour la structure d'un étalon pour ces différentes substances naturelles à analyser en MALDI avec différentes matrices. Remarquons que par contre l'utilisation d'un étalon interne semble convenable pour le développement d'une méthode de dosage qui sera développée pour un nombre limitée des molécules et généralement de la même famille.

De manière à choisir la méthode de traitement la plus efficace, une étude sans étalonnage interne compare les intensités des pics quasi-moléculaires de l'aconitine, la brucine, l'émétine, la pilocarpine et la strychnine, avec le ratio entre ce pic de l'analyte et celui de la matrice MT3P. L'analyse est réalisée trois jours différents et les résultats sont présentés en Figure II-13. Les mêmes alcaloïdes sont aussi analysés avec CHCA de manière à confirmer que le traitement choisi est applicable à la matrice commerciale.

La première étape d'amélioration consiste à évaluer différents traitements pour les résultats donnés par les spectres. Dans cette partie, on se limitera aux deux premières méthodes de traitement. Ensuite ces méthodes peuvent être exploitées pour évaluer les résultats:

- 1- Utiliser l'intensité absolue du pic moléculaire de l'analyte.
- 2- Utiliser le ratio des intensités des signaux de l'ion moléculaire de l'analyte et de la matrice.

$$R = \frac{I_a}{I_m} \quad (II.1)$$

(R : ratio, I : intensité, a : analyte, m : matrice)

L'obstacle de ces deux choix dérive du phénomène de suppression (ASE et/ou MSE).

Expérimentalement, cinq alcaloïdes sont testés (aconitine, brucine, émétine, pilocarpine et strychnine), chaque composé est déposé en 6 spots (sextuplicate), en utilisant la méthode de déposition par goutte séchée. 600 tirs de laser sur chaque spot donnent un spectre. Le résultat final est la moyenne de six spectres donc de six spots. Ce travail est répété trois jours non consécutifs. Deux matrices ont été utilisées, MT3P, et une matrice classique CHCA.

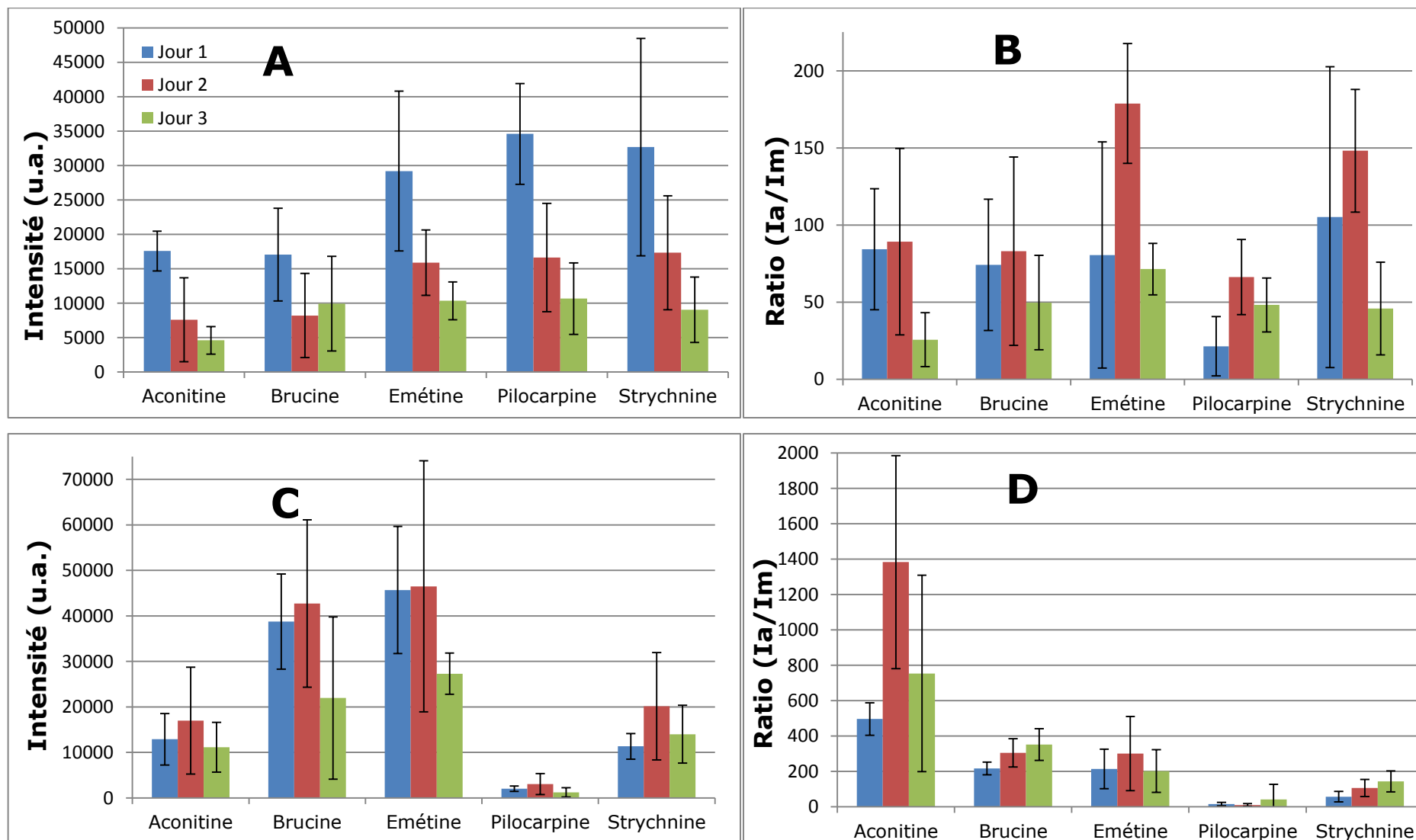


Figure II-13 : Moyennes pour six spectres des intensités absolues du pic moléculaire de l'analyte (A et C) et des ratios des intensités de l'ion moléculaire de l'analyte et de la matrice Ia/Im (B et D) pour trois jours non consécutifs (jour 1 en bleu, jour 2 en rouge, jour 3 en vert). (A et B :matrice CHCA) (C et D : matrice MT3P)

La Figure II-13 présente des histogrammes des résultats de trois jours avec les deux matrices et suivant les deux méthodes de traitement (selon l'intensité brute et selon le rapport d'intensité analyte/intensité matrice).

Plusieurs informations peuvent être tirées de ces histogrammes :

a- En premier lieu, une variation qui peut être importante est notée selon les jours pour les deux matrices CHCA et MT3P. Les moyennes des intensités ont diminué de moitié entre J1 et J2 avec CHCA, c'est qui est observable en utilisant MT3P entre J2 et J3. Cette variation n'est donc pas inhérente à MT3P, mais caractérise la technique MALDI.

b- Deuxièmement, on peut noter que les rapports I_a/I_m varient en moyenne entre 20-100 avec CHCA, et entre 20-1400 avec MT3P, ce qui illustre la meilleure sensibilité de la matrice bithiophénique et la grande intensité des pics des analytes par rapport à ceux de la matrice MT3P.

c- Troisièmement, on peut clairement observer la différence d'efficacité d'ionisation pour différents alcaloïdes, en utilisant MT3P comme matrice. Ainsi, le rendement d'ionisation de la pilocarpine est environ 40 fois plus petit que celui de l'émétine et de la brucine, et 10 fois que celui de l'aconitine et de la strychnine. Cependant en utilisant CHCA la pilocarpine est l'alcaloïde ayant le plus haut rendement d'ionisation. Cette différence est potentiellement due à différentes interactions entre la molécule de la matrice et les analytes.

d- Le Tableau II-2 ci-dessous récapitule pour chaque alcaloïde analysé avec MT3P les rapports des intensités des pics moléculaires d'analyte des jours 2 (I_{j2}) et 3 (I_{j3}) sur celle du jour 1 (I_{j1}) ensuite jour 3 (I_{j3}) sur celle du jour 2 (I_{j2}). La comparaison entre J1, J2 et J3 entre eux est aussi réalisée pour le ratio I_a/I_m .

	I_{j2}/I_{j1}	I_{j3}/I_{j1}	I_{j3}/I_{j2}	R_{j2}/R_{j1}	R_{j3}/R_{j1}	R_{j3}/R_{j2}
Aconitine	1,3	0,8	0,7	2,8	1,5	0,5
Brucine	1,1	0,6	0,5	1,4	1,6	1,2
Emétine	1,0	0,6	0,6	1,4	0,9	0,7
Pilocarpine	1,4	0,6	0,5	0,7	2,6	4,0
Strychnine	1,8	1,2	0,7	1,9	2,5	1,3
Moyennes	1,3	0,8	0,6	1,6	1,8	1,5
% RSTD	20	40	20	50	40	90

Tableau II-2 : Les rapports des résultats entre les trois jours en utilisant la matrice MT3P.

-pour les intensités absolues : en prenant les rapports de « I_{j3}/I_{j2} » pour tous les composés, on remarque que les intensités du jour 3 sont presque le deux tiers de celles du jour 2 avec une

tendance acceptable avec un % RSTD = 20 % (de l'anglais *relatif standard deviation*; en français écart type relatif). Cette observation est constatée de nouveau en prenant les rapports de « I_{j3}/I_{j1} », et hormis la strychnine, on remarque que les intensités du jour 3 sont presque le deux tiers de celles du jour 1.

-pour le ratio I_a/I_m : il n'y a pas une tendance de variation fixe (alors que le rapport est de 4 pour la pilocarpine, il est de 0,5 pour l'aconitine et devient presque de 1 pour les trois autres alcaloïdes) (% RSTD= 90 %).

Cette grande variabilité peut-être liée à l'effet de suppression des analytes (ASE), ainsi qu'à une hétérogénéité du spot.

e- Cinquièmement, bien qu'il y a moins de variation avec les rapports que les intensités (histogramme C et D dans la Figure II-13), la tendance de variation entre les différents alcaloïdes d'un jour à un autre reste aléatoire (colonne 4, 5 et 6, Tableau II-2) avec des % RSTD très élevées (de 40 à 90 %).

Se basant sur ces résultats, il apparaît alors plus pertinent de retenir l'intensité absolue lors de l'évaluation des différentes BMs. De plus, ayant observé une relative homogénéité pour les analyses réalisées un même jour, il conviendra de tester sur la même plaque (et le même jour) une matrice commerciale et les BMs à tester.

Cependant, la répétabilité d'un spot à un autre est le plus souvent un enjeu en relation avec la préparation de l'échantillon jusqu'à son dépôt. Une optimisation supplémentaire est nécessaire pour trouver des résultats cohérents.

7. Méthode et conditions d'acquisition des données

L'analyse des alcaloïdes par MALDI peut être envisagée comme test de « dépistage » permettant la détection rapide d'un métabolite secondaire particulier (application en analyse toxicologique) et dans ce cas, un bon mode d'acquisition des données est celui qui conduit à fournir un spectre final représentatif de l'échantillon. Par contre, si une méthode quantitative d'analyse des alcaloïdes par MALDI est développée, la répétabilité entre les spots sera un paramètre critique. Dans certains cas, les tirs donnent soit des signaux surchargés ou trop faibles en raison de l'hétérogénéité du spot. Ainsi le mode d'acquisition peut aider à faire face à cette hétérogénéité.

La méthode d'acquisition adoptée initialement dans notre laboratoire se déroule de la façon suivante : pour chaque échantillon, les données de 30 positions séparées et uniformément dispersées sur la surface de dépôt d'échantillon ont été acquises. Chaque point d'acquisition a été irradié par 30 tirs laser, et les données ont été additionnées et stockées sous forme de spectres individuels. Ce processus donne un spectre bilan de 900 acquisitions laser.

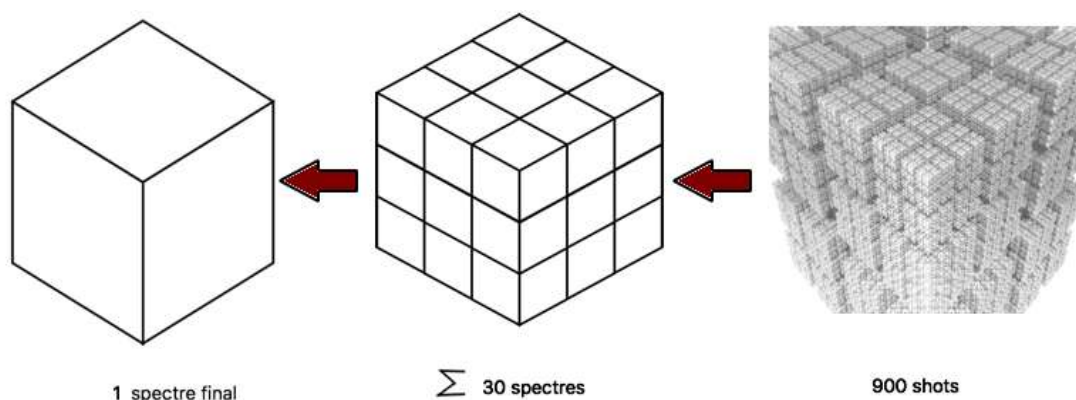


Figure II-14 : Illustration représentative pour comprendre le mode d'acquisition.

Ce processus d'acquisition même s'il est réalisé en mode automatique nécessite un temps d'expérience qui n'est toutefois pas assez court. L'instrument MALDI doit être réservé pour de longues durées chaque fois qu'une série d'essais doit être réalisée avec de nombreux alcaloïdes. Nous avons donc cherché à raccourcir la durée d'analyse par diminution du nombre de tirs, sans dégrader la répétabilité. La méthode initiale avec 900 tirs par spectre (a) a donc été comparée à des acquisitions avec 300 (b) et même 150 tirs (c) par spectre :

- a- 1 spectre final = 900 tirs ← 30 positions ← 30 tirs/position.
- b- 1 spectre final = 300 tirs ← 30 positions ← 10 tirs/position.
- c- 1 spectre final = 150 tirs ← 30 positions ← 5 tirs/position.

L'étude portera sur, un mélange de trois alcaloïdes (pilocarpine, spartéine et strychnine), et après mélange avec la solution de matrice, les mesures sont réalisées en mode automatique selon les trois modes d'acquisition retenus. 12 spots sont donc déposés sur la plaque MALDI en goutte séchée.

Pour comparer les différents modes, il n'est pas pertinent de se baser sur l'intensité des ions moléculaires $[M+H]^+$ des analytes dans la mesure où cette intensité est directement corrélée, entre autres, au nombre de tirs qui différera selon les acquisitions. Une méthode de normalisation qui consiste à diviser chaque variable par une constante qui est la somme de toutes les variables^{145,146} permettra de comparer les différentes méthodes d'acquisition :

$$In_i = \frac{I_i}{\sum I} \quad (II.2)$$

In_i = intensité normalisée du pic i.

I_i = intensité absolue du pic i

$\sum I$ = somme des intensités absolues de tous les pics d'intérêts dans le spectre.

Les résultats des mesures, qui ont été effectuées sur 36 dépôts, (12 spots pour chaque mode) normalisées sont présentés en Figure II-15 sous forme d'un diagramme.

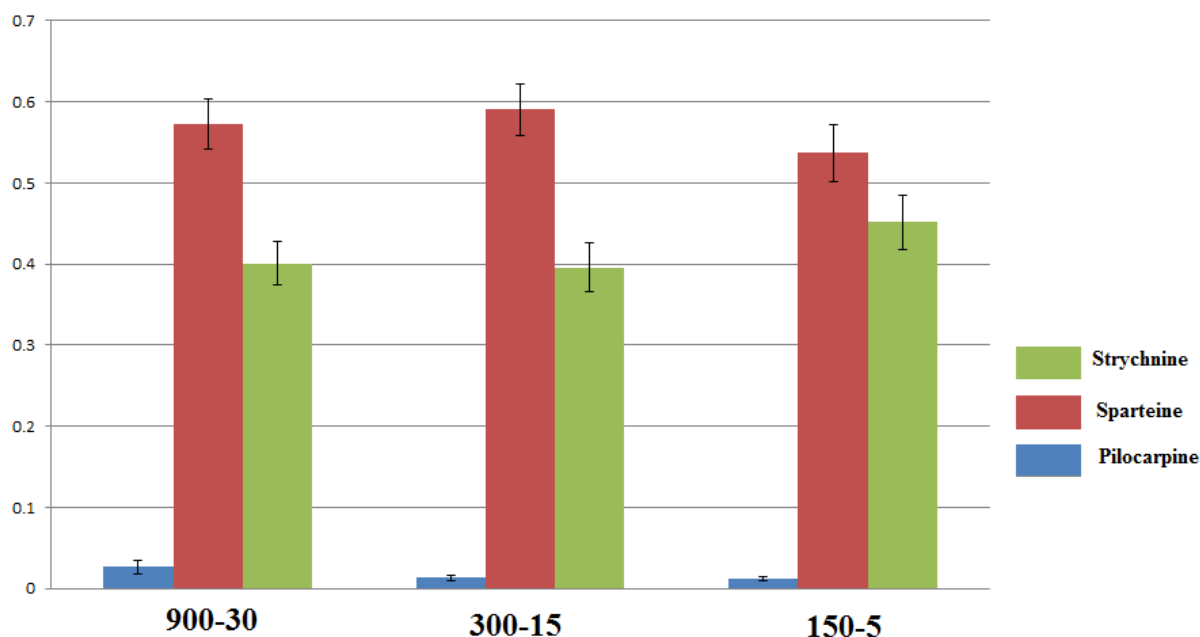


Figure II-15 : Moyenne des intensités normalisées (avec leurs écarts types) pour trois alcaloïdes selon trois modes d'acquisition (900, 300 et 150 tirs).

On constate que l'écart type est de même niveau pour chaque alcaloïde et pour chaque mode d'acquisition. Une autre comparaison de la dispersion des valeurs autour de la moyenne est aussi réalisée par une autre mesure, celle du coefficient de variation CV (également nommée écart type relatif) qui est défini comme le rapport entre l'écart-type σ et la moyenne μ : $CV = \sigma/\mu$. Les résultats (Tableau II-3) montrent l'absence d'une vraie différence de CV d'une méthode à l'autre. En dépit de la grande variation qui existe pour la pilocarpine, le CV reste proche durant les différents modes d'acquisition.

	Pilocarpine	Sparteine	Strychnine
900-30	0,312	0,053	0,067
300-10	0,241	0,054	0,077
150-5	0,240	0,065	0,074

Tableau II-3 : CV obtenus selon les trois modes d'acquisition.

En conséquence, le mode d'acquisition nécessitant seulement 150 tirs (150-5) 6 fois moins long (temps nécessaire pour l'acquisition d'un spectre) que la méthode initiale est retenue lors de la comparaison des nouvelles matrices. Pour le développement de la méthode quantitative,

l'intensité du pic d'analyte sera un paramètre important. Un compromis est donc trouvé en prenant en compte la durée de l'analyse et le mode 300-10 sera retenu.

8. Effet de la puissance de laser

La puissance de laser et son atténuation sont des paramètres qui n'affectent pas seulement la désorption et l'ionisation des molécules, mais aussi la qualité du spectre obtenu. Il existe deux régimes principaux d'éjection moléculaire, la désorption à faible fluence de laser et l'ablation à des fluences plus élevées. Il faut noter que l'éjection peut aussi se réaliser selon un troisième régime dénommé « la spallation » (le matériau se fracture et quitte la surface sous forme des blocs) qui conduit à des clusters froids et ne semble donc pas pertinents pour expliquer le spectre de masse final¹⁴⁷. En fonction de la quantité d'énergie, ainsi que de la profondeur de la pénétration du faisceau laser dans le réseau de la matrice, la nature du nuage gazeux ou plume va changer. A une forte irradiation (un terme qui quantifie la puissance d'un rayonnement électromagnétique frappant par unité de surface perpendiculaire à sa direction elle s'exprime en $W.m^{-2}$) du laser, l'ablation des composés devient le mécanisme prépondérant au lieu de la désorption. En effet, si l'énergie du laser est élevée, les molécules sont irradiées par une quantité d'énergie équivalente ou proche de leur énergie de cohésion favorisant les possibilités d'ionisation des espèces présentes, leurs fragmentations, ainsi que la formation d'adduits et de clusters (des agrégats ioniques). Finalement, l'augmentation des ions pulsés et des fragmentations peut entraîner une diminution de la résolution, une réduction parfois du signal de la molécule étudiée et une complexification du spectre de masse. S'il existe un seuil d'irradiance laser au-dessous duquel les tirs laser ne provoquent aucune ionisation au-delà de cette valeur, le processus d'ablation, la fragmentation des ions et la formation des adduits commencent. Après une certaine valeur de l'énergie de laser, l'intensité des ions formés se stabilise à cause de la saturation du détecteur.

Notre instrument MALDI est équipé d'un laser VSL-337i qui a une puissance théorique maximale, fournie par le constructeur, de 175 μJ . Cette puissance n'est pas utilisée totalement, elle doit être modulée par l'atténuateur (Figure II-16). Toutefois, la puissance théorique diminue avec le vieillissement du laser. Ainsi entre les premières expériences au cours de ma thèse et les dernières effectuées trois ans plus tard, pour obtenir un résultat identique, la puissance du laser devait être augmentée de 25 % à 35 %.

Afin d'étudier l'influence de la puissance du laser sur la qualité du spectre et ainsi de choisir la bonne atténuation, les spectres de masse de la brucine ont été enregistrés en mode positif en variant les valeurs d'atténuation.

Au-dessous de 25 % (42 μJ) de la gamme d'atténuation, le spectre de masse est presque dépourvu de pics (le massif à $m/z = 278$ est dû à l'instrument), et il n'y a pas d'ions attribués à la brucine. Avec une énergie plus importante, le signal à $m/z = 395,6$ correspondant à $[M+H]^+$ apparaît (Figure II-17, haut). 25 % d'énergie du laser correspond donc à l'atténuation seuil, qui fournit la quantité d'énergie laser suffisante pour générer des ions par désorption/ionisation des molécules de l'échantillon. En augmentant l'énergie laser utilisée à 30% (49 μJ) (Figure II-17, milieu), l'intensité des pics d'importance augmente sans perte de qualité du spectre. À 35 % d'énergie (Figure II-17, bas), les intensités des pics de la fragmentation de la matrice augmentent, la résolution est détériorée et le bruit de fond augmente.

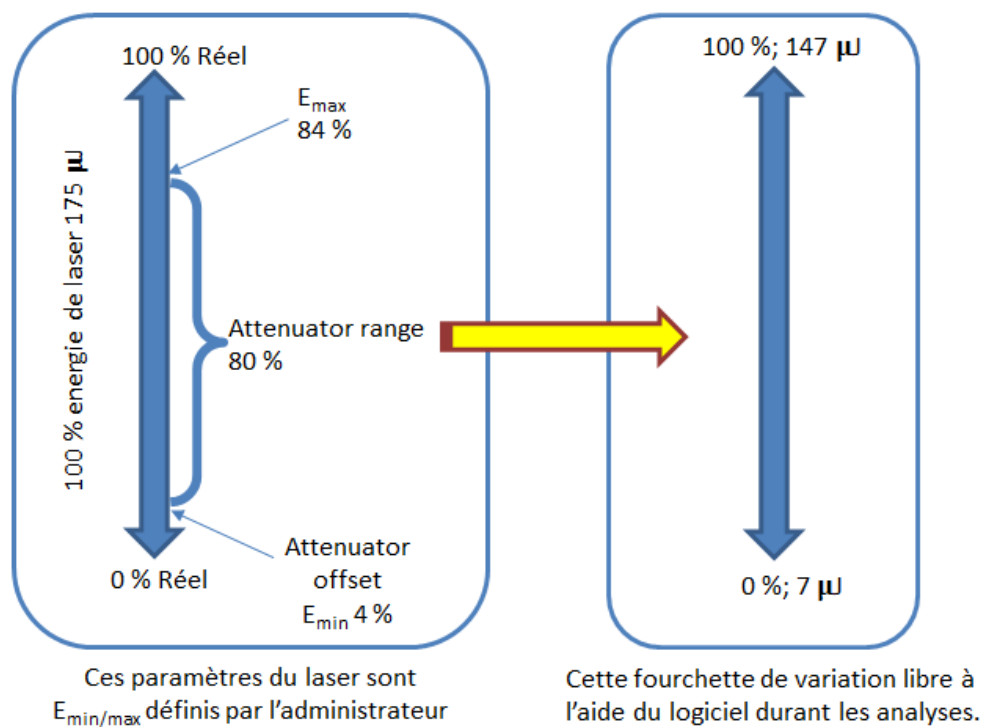


Figure II-16 : Schéma explicatif de l'atténuation de la puissance de laser.

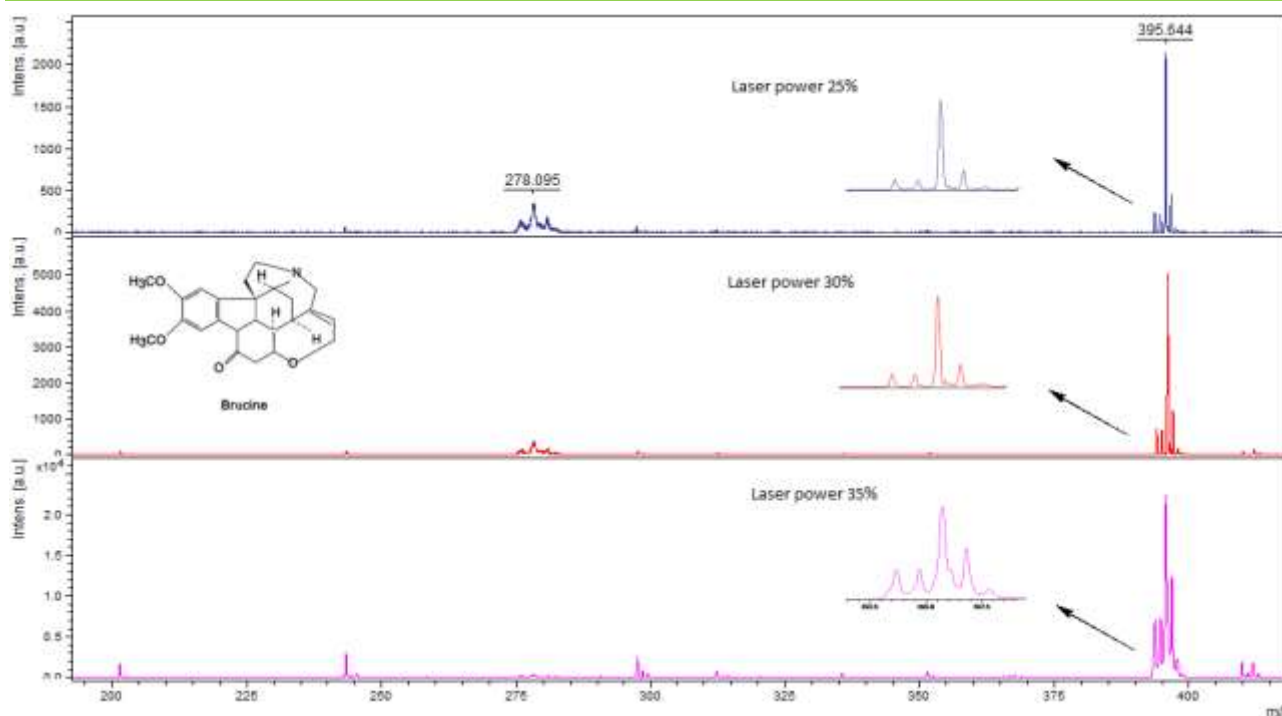


Figure II-17 : Spectres de la brucine avec comme matrice MT3P, à différentes énergies du laser : atténuation à 25 % (haut), 30 % (milieu) et 35 % (bas) de puissance.

Ces différents essais permettent donc de retenir généralement une atténuation du laser à 30 % de sa puissance pour la suite des travaux.

Il convient aussi de noter que :

- 1- cette étude est réalisée en utilisant la molécule MT3P comme matrice. Pour chacune des nouvelles matrices synthétisées, la valeur seuil et celle retenue pourraient varier et devront donc être recherchées.
- 2- cette étude a été réalisée en début de ma thèse, et des dérives sur la puissance du laser nous ont conduits à varier la puissance utilisée pour atteindre une valeur de 35 %.

9. Effet du solvant

Parmi plusieurs facteurs qui peuvent affecter les résultats obtenus dans l'analyse MALDI, la nature et la qualité du solvant utilisé lors du dépôt de l'analyte et de la matrice sur la plaque MALDI semblent être un paramètre important. De manière usuelle, l'analyte est dilué dans une grande quantité de matrice (ratio molaire matrice/analyte de 10^3 à 10^5) afin que les interactions entre les molécules d'analyte soient réduites, facilitant ainsi leur transfert en phase gazeuse¹⁴⁸. Pour la préparation du dépôt, la démarche générale consiste à utiliser un solvant qui solvate de manière similaire la matrice ainsi que le ou les analytes, ce qui permettra leur solubilisation et au final conduira à une co-cristallisation homogène et complète. Remarquons aussi que le choix du

solvant dépend aussi du support utilisé, dans la mesure où ce dernier impacte la tension entre la gouttelette et surface. Si le plus souvent un seul solvant est utilisé, l'utilisation de systèmes binaires de solvants miscibles s'est développée¹⁴⁹. Notons aussi que des méthodes de préparation sans solvants ont aussi été rapportées^{150,151}.

Outre le rôle dans la solubilisation et l'homogénéisation du dépôt, le solvant pourrait participer au mécanismes d'ionisation comme source de protons¹⁵², ce qui influe donc la qualité générale de l'analyse¹⁵³. Ainsi, le choix du solvant de la matrice conditionne le mode de dépôt et également la cristallisation de l'échantillon.

9.1. Solubilité

Si nous avons jusqu'à présent utilisé le dichlorométhane seul pour solubiliser MT3P et ensuite le mélanger avec la solution méthanolique des alcaloïdes, ce solvant présente une volatilité élevée qui pose des problèmes au niveau du nébuliseur, lors du dépôt de la matrice en modes automatiques.

Afin d'optimiser la procédure de préparation des échantillons, la solubilité de la matrice MT3P a été déterminée précisément dans différents solvants tels que le dichlorométhane (DCM), le tétrahydrofurane (THF), le dioxane, l'acétone, l'acétonitrile (ACN), méthanol (MeOH), un mélange eau/dioxane (1/1) et l'eau. La solubilité est déterminée en saturant 1 mL de chaque solvant avec la matrice MT3P et en utilisant un bain d'ultrason pour la dissolution. Le Tableau II-4 résume les valeurs obtenues durant cette expérience, en joignant aussi deux paramètres importants des solvants (l'énergie d'ionisation (EI) et l'affinité protonique (AP)) qui peuvent avoir un rôle lors de l'ionisation¹⁵⁴.

Polarité	Solvant	S (en mg.mL ⁻¹)	EI ¹⁵⁵ (en eV)	AP ¹⁵⁵ (en KJ.mol ⁻¹)	Solubilité
↑	Eau	Insoluble	-	690	↓
	Eau/dioxane (1/1)	6 mg	-	-	
	MeOH	8 mg	10,84	754	
	ACN	10 mg	12,2	779	
	Acétone	20 mg	9,7	812	
	Dioxane	60 mg	-	797,5	
	THF	190 mg	9,4	822	
	DCM	220 mg	11,33	628	

Tableau II-4 : Solubilité de MT3P dans chaque solvant avec quelques caractéristiques importantes des solvants.

Suite aux essais réalisés, nous pouvons tirer plusieurs points :

1- Cette matrice est très soluble dans les solvants apolaires, faiblement dans les solvants polaires protiques et pratiquement insoluble dans l'eau. Ceci est en accord avec les caractéristiques structurales de MT3P qui présente des nombreux groupements hydrophobe (cycle aromatique, plusieurs atomes de soufre lipophile) et un seul groupement nitrile polaire.

2- Dans un mélange d'eau et de dioxane (un bon et un mauvais), on observe au-delà d'une concentration de 6 mg.mL⁻¹ la formation d'un système biphasique type huile dans eau, correspond probablement à la formation de gouttelettes de matrice. Ce seuil limite ne devra donc dépasser lors des essais pour ne pas complexifier l'étude de ce système.

Nous avons aussi observé lors de ces essais de solubilité dans différents solvants que les solutions du même lot de MT3P présentaient des colorations variables (Figure II-18), ce qui nous a amené à étudier le solvatochromisme dans une partie ultérieure.

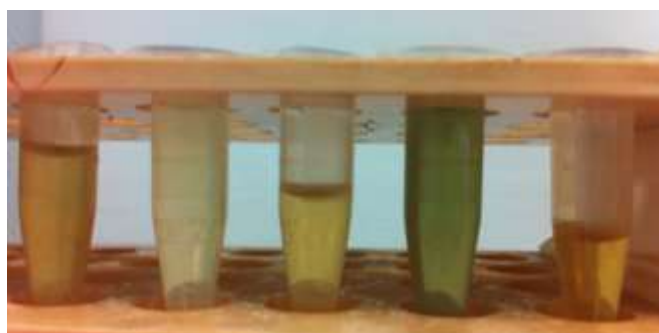


Figure II-18 : Solution à 10 mg.mL⁻¹ de MT3P dans (de gauche à droite) un mélange ACN/eau (7/3), acétone, MeOH, DCM et THF.

9.2. Effet du solvant et de l'état physique sur l'absorption de la matrice

Le chromisme, qui caractérise généralement les polymères conducteurs, est la capacité de molécules à changer de couleurs suite à différents stimuli physiques ou chimiques. Parmi les différents processus, le solvatochromisme caractérise une substance dont la couleur change selon la nature et donc la polarité du solvant dans lequel elle est dissoute¹⁵⁶. D'autre part, des propriétés de polychromisme ont été mises en évidence pour les polythiophènes¹⁵⁷ ce qui pourrait expliquer le comportement de MT3P et le changement de coloration en solution selon le solvant. Ainsi, ce changement peut affecter la bande d'absorption de ces composés dans le domaine UV-visible. Une étude de l'absorption de MT3P dans différents solvants doit donc être réalisée pour mettre en évidence ce phénomène.

En ce qui concerne les propriétés d'absorption des matrices MALDI, un autre point est à prendre en considération. En effet, la technique MALDI est basée sur une co-cristallisation de la matrice et de l'analyte, et ce sont donc les propriétés spectroscopiques de la matrice à l'état solide qui importent. Or, le spectre d'absorption d'un composé et donc de la matrice peut varier selon qu'il soit en solution ou à l'état solide¹⁵⁸: les bandes d'absorption à l'état solide tendent à être plus larges, avec un décalage batho/hypsochromique¹⁵⁹.

Nous évaluerons donc si les absorptions de MT3P sont similaires en solution et à l'état solide, et essaierons donc de mesurer l'absorption à l'état solide.

9.2.1. Mode opératoire

Les mesures de spectroscopie UV-Visible ont été enregistrées sur un spectrophotomètre de type Perkin-Elmer Lambda 950. Cet instrument est utilisé à la fois pour l'analyse des solutions, ainsi que pour l'enregistrement des spectres d'absorbance à l'état solide. Les cellules de mesures utilisées pour l'absorbance en solution sont des cuves de quartz standard. Le chloroforme, le THF, le DCM, le MeOH, l'acétone et un mélange binaire ACN/eau (7/3) sont les solvants qui ont été utilisés pour les mesures de spectroscopies UV. Les films étudiés ont été déposés sur lame de verre, à partir d'une solution de matrice 10^{-5} mol.mL⁻¹ dans le chloroforme.

9.2.2. Spectre UV des solutions

Les solutions des MT3P ont été préparées à une concentration voisine de 10^{-5} mol.L⁻¹. Les caractéristiques des maxima d'absorption sont récapitulées dans le Tableau II-5, et les spectres présentés en Figure II-19 représentant la superposition des spectres d'absorption dans différents solvants.

	λ_{\max}	ϵ_{337}
Acétone	340	17791
THF	342	17023
MeOH	340	19234
DCM	342	23484
CHCl ₃	342	19099
ACN/Eau	340	19147

Tableau II-5 : Maxima d'absorption (en nm) et coefficients d'extinction molaire à 337 nm ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) pour MT3P dans différents solvants.

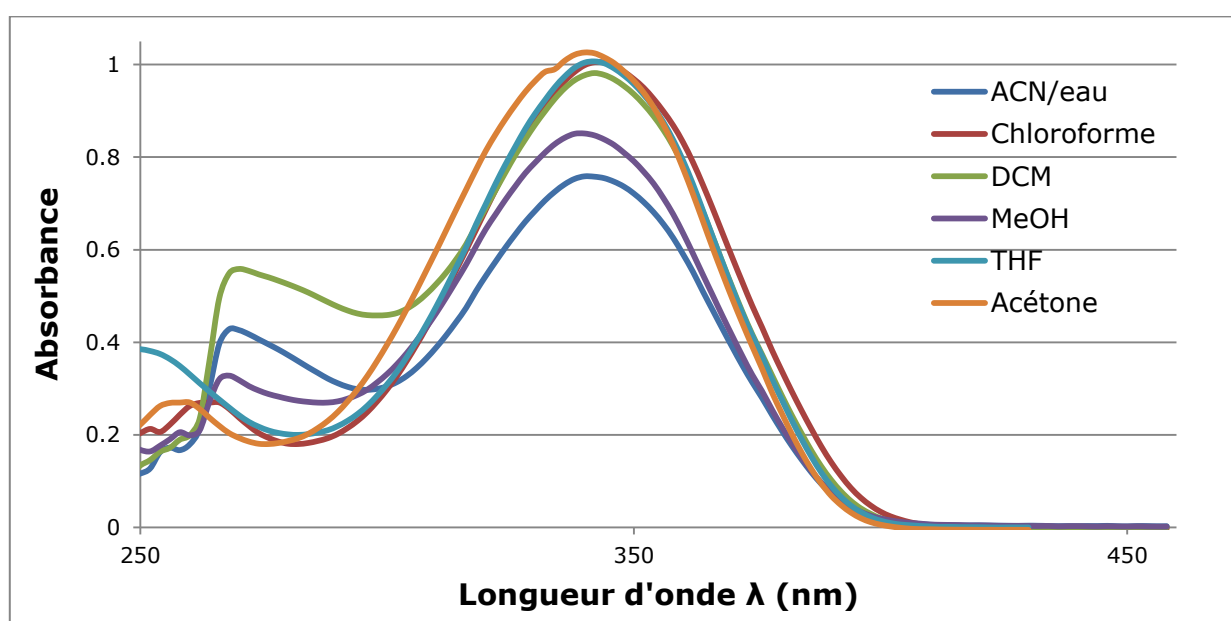


Figure II-19 : Spectres d'absorption UV-visible de MT3P dans différents solvants.

Les spectres d'absorption de MT3P dans les différents solvants, sont caractérisés par une bande intense ($\epsilon = 22100 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) à 340-342 nm et une bande faible ($\epsilon = 4100 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) vers 250-272 nm. Plus précisément, cette dernière bande d'absorption est globalement centrée à 272 nm avec les solvants DCM, MeOH et l'ACN/Eau, et subit un déplacement hypsochrome avec le THF, l'acétone et le chloroforme. Cette dernière bande a été attribuée au thiophène pour la transition $\pi-\pi^{*160}$. La bande plus intense à 340 nm correspond quant à elle à la transition $n-\pi^*$ du système n -conjugué plus étendu substitué par des soufres en 5 et 5'. Remarquons que cette bande d'absorption principale varie de quelques nanomètres seulement (λ_{\max} de 340 à 342 nm) selon les solvants. Hormis le DCM qui présente un coefficient d'extinction molaire à 337 nm nettement plus grand ($\epsilon_{337} = 23384 L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), cette valeur est plus faible et varie peu (ϵ_{337} de 17000 à 19200 $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$) pour les autres solvants (Tableau II-5).

9.2.3. Spectre à l'état solide

Dans la technique MALDI, l'irradiation de la matrice par le faisceau du laser est réalisée après évaporation du solvant. Les spectres UV de MT3P en solution dans différents solvants ne sont donc que des approximations, et il convient donc d'apprécier l'absorption à l'état solide de la matrice MT3P. Le dépôt d'un échantillon de MT3P sur plaque de verre est réalisé par enduction centrifuge (ou en anglais spin-coating). Brièvement, cette technique consiste à déposer une solution au centre d'un disque de verre en rotation à haute vitesse constante et sous vide à température ambiante. La force centrifuge permet un étalement uniforme pour finalement obtenir un dépôt de quelques nanomètres.

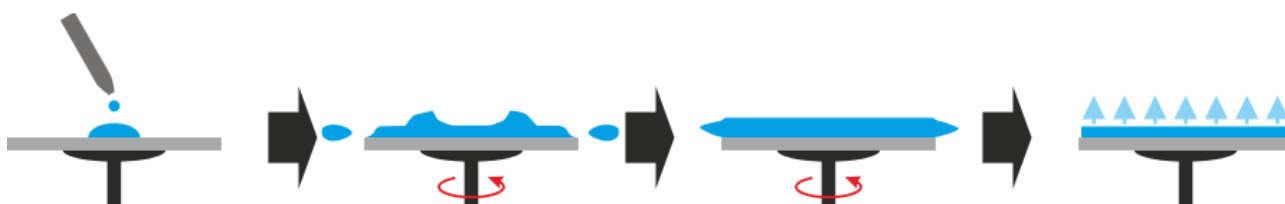


Figure II-20 : Schéma simplifié du procédé d'enduction centrifuge.

(source, https://fr.wikipedia.org/wiki/Enduction_centrifuge, consulté le 20/05/2017)

Dans la mesure où nous nous intéressons seulement à l'allure du spectre de MT3P à l'état solide, l'épaisseur de la couche n'est pas contrôlée, et l'utilisation d'une microbalance à quartz ne s'avère pas nécessaire. Suite à l'évaporation de la solution de MT3P dans le dichlorométhane, on peut observer l'apparition des fines particules sur la lame et non pas un film homogène, ce qui indique l'absence de pouvoir filmogène de ce composé bithiophénique. Cette observation est probablement à mettre en relation avec le problème rencontré par nos collègues en Allemagne (Pr Michael Spiteller, Technical University of Dortmund) dans le cadre de l'étude d'imagerie MALDI sur coupe de plantes (5.Application de MT3P dans l'imagerie MALDI-MS. Page : 119). En effet, lors de la nébulisation de la solution de MT3P dans le DCM, les particules formées après évaporation du solvant provoquaient une obstruction de l'aiguille.

Finalement, après plusieurs tentatives d'enduction centrifuge, un mode opératoire simple permet d'obtenir un dépôt solide sur surface de verre. Une solution dichlorométhanique de MT3P à $10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a tout simplement été évaporée sur la lame de verre et le spectre d'absorption UV-visible a été enregistré (Figure II-21).

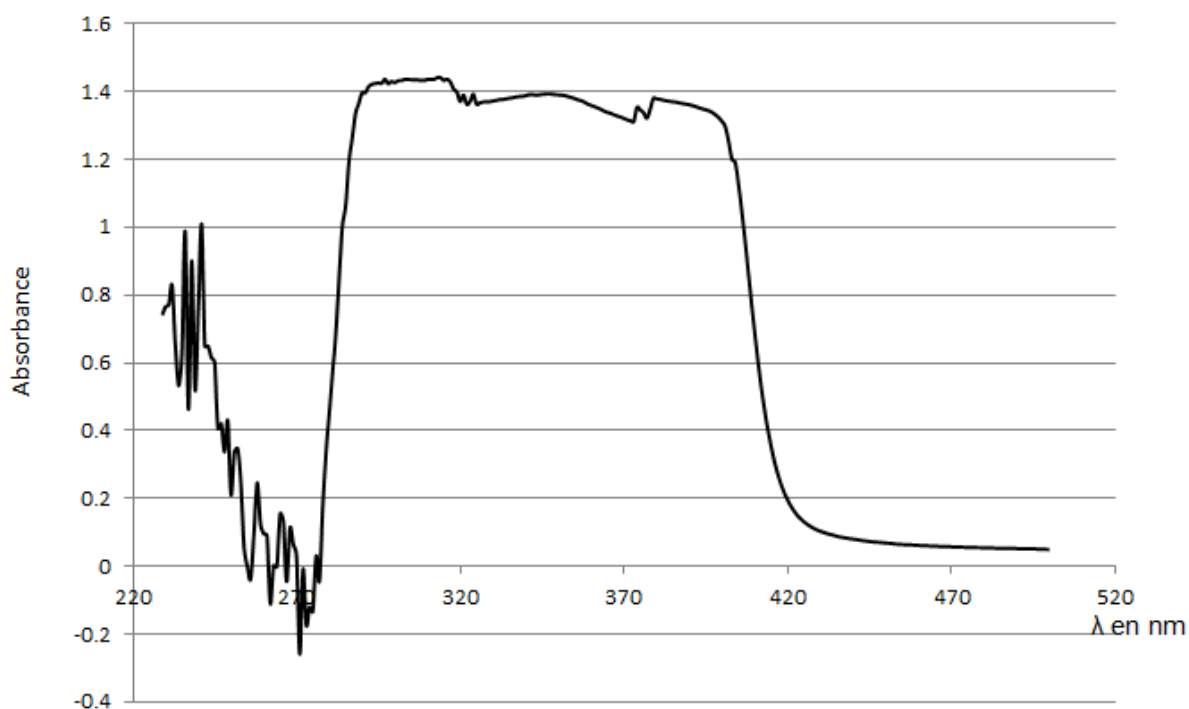


Figure II-21 : Spectre d'absorption UV-visible de MT3P à l'état solide.

Ce spectre d'absorption de MT3P à l'état solide présente des similitudes avec ceux en solution. Un maxima d'absorption de moindre intensité est aussi positionné pour le solide aux longueurs d'onde les plus faibles, et le maxima d'absorption est situé aux longueurs d'onde plus élevées. Sur le spectre du solide, le maximum d'absorption est toutefois étalé sur une zone plus large, de 280 à 420 nm. Ce spectre montre qu'à la longueur d'onde du laser (337 nm) correspond un maximum d'absorption pour MT3P à l'état solide.

9.2.4. Discussion

Les études menées dans des solvants de polarité différente révèlent que le solvant a très peu d'influence sur la longueur d'onde de la bande d'absorption la plus intense de MT3P. Nous pouvons déduire aussi de ces essais qu'a priori, la variation de couleur de la matrice selon le solvant ne traduit pas un phénomène de solvatochromisme impactant l'absorption dans le domaine de l'UV. Une explication possible nous ramène à la conformation de la molécule. En effet, le chromisme est relié au changement de conformation de la molécule. Pour observer un changement de couleur, la molécule de bithiophène doit subir un changement de conformation plan/non-plan suite à un stimulus physique, et qui est relié à la nature du solvant¹⁶².

Remarquons aussi qu'il ne faut pas exclure la participation d'impuretés non détectées dans ces observations.

Finalement, ces expériences permettent de tirer deux conclusions :

- l'étude de l'absorption de MT3P montre que la longueur d'onde du maximum d'absorption en solution (340 nm) correspond aussi pour l'état solide à un maximum d'absorption. Ceci valide l'utilisation de ce composé comme matrice MALDI avec un appareil dont le laser émet à 337 nm.
- Le DCM est le solvant à utiliser pour avoir un maximum d'absorbance de plus forte intensité.

9.3. Effet du solvant sur la réponse et la répétabilité.

Une variation de l'intensité du signal en MALDI de l'analyte selon le solvant utilisé a déjà été notée comme dans le cas des peptides, la bradykinine et l'angiotensine II¹⁶³. Il a été reporté que la présence de l'eau dans le solvant de la préparation de l'échantillon, augmente le rendement ionique pour les deux peptides testées (Figure II-22).

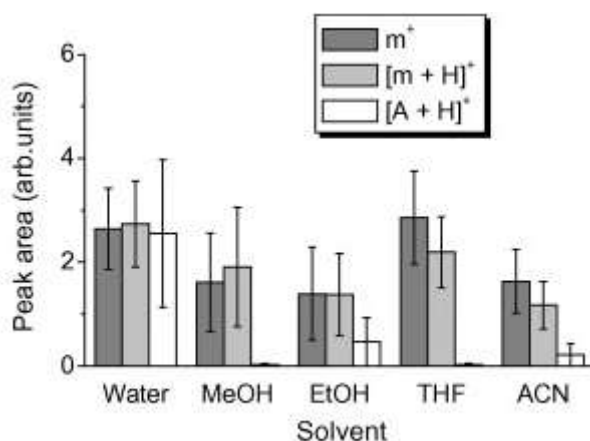


Figure II-22 : Relation entre solvant et l'aire du pic d'analyte (bradykinine)¹⁶³.

L'influence du solvant sera donc étudiée en utilisant MT3P pour l'analyse d'un mélange d'alcaloïdes, en mode positif. Les solvants retenus sont le DCM (la référence) et quatre autres solvants ou mélange binaire plus polaires : le THF qui a une faible polarité proche de celle du DCM, l'acétone qui est moyennement polaire, le MeOH qui est fortement polaire. Pour le choix du quatrième solvant, nous avons pris en considération le fait que la présence de l'eau, même en faible quantité, augmente la tenue de la goutte en augmentant la force de tension entre la plaque cible et l'échantillon déposé ce qui évite l'étalement rapide de l'échantillon. Ainsi, l'analyse des peptides¹⁶³, et la répétabilité¹⁵³ sont améliorés. Un mélange ACN/eau (7/3) est donc choisi comme quatrième système.

De plus, les solvants sélectionnés ont des énergies d'ionisation et affinités protoniques différentes, (Tableau II-4).

Hormis celle dans le MeOH préparée jusqu'à saturation ($S = 8 \text{ mg.mL}^{-1}$), toutes les solutions de la matrice MT3P sont à 10 mg.mL^{-1} dans les solvants testés, et 20 spectres sont enregistrés. Les intensités de chaque pic d'intérêt sont relevées, puis normalisées de façon à calculer l'intensité

normalisée moyenne correspondant à chacune des espèces protonées des analytes et les écarts-types associés.

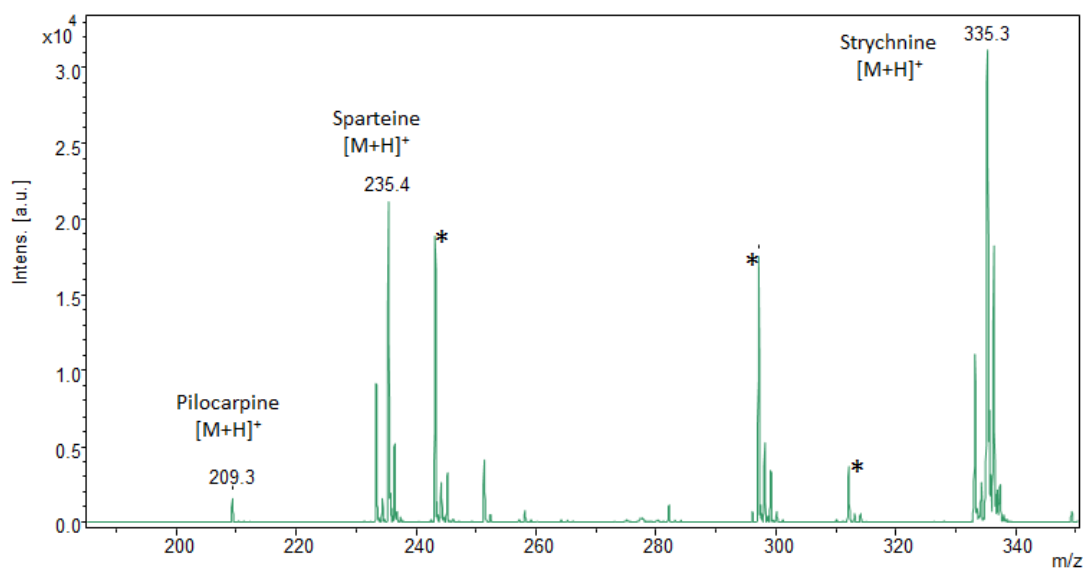


Figure II-23 : Spectres enregistrés pour un échantillon préparé avec le DCM. (*pics de matrice)

9.3.1. Test descriptif : relation solvant réponse

Les résultats obtenus seront ensuite traités selon une méthode d'analyse exploratoire/qualitative/descriptive très courante dite l'analyse en composantes principales (ACP ou PCA en anglais). Sans rentrer dans les détails mathématiques qui sont basés sur le calcul de « la matrice des covariances », cette méthode permet de distinguer si les échantillons forment des groupes distincts. En outre, on peut constater les échantillons non pertinents qui sont éloignés de la population. En d'autres termes, elle vise simplement à décrire les données contenues dans un tableau de n lignes (individus) et p colonnes (variables)¹⁶⁴. En se basant sur cette méthode une classification par ACP de solvant comme étape préliminaire avant l'analyse statistique élargie, semble judicieuse.

La variation qui existe entre les individus peut se résumer en une droite qui passe par le milieu du nuage de points, cette droite s'appelle composante principale. On va étudier les résultats sur un diagramme de deux composantes, la première composante correspond à un axe qui décrit la plus grande quantité de la variance du jeu de données donc il contient la quasi-totalité des informations, puis la seconde composante, par définition orthogonale à la première.

La Figure II-24 donne le diagramme des scores dans le plan engendré par les deux premières composantes principales (Ces opérations ont été réalisées à l'aide du Logiciel R). Ce diagramme vient de la matrice (100,3) 100 individus (5 x 20 spots pour chaque solvant), et 3 variables qui sont les intensités des trois alcaloïdes.

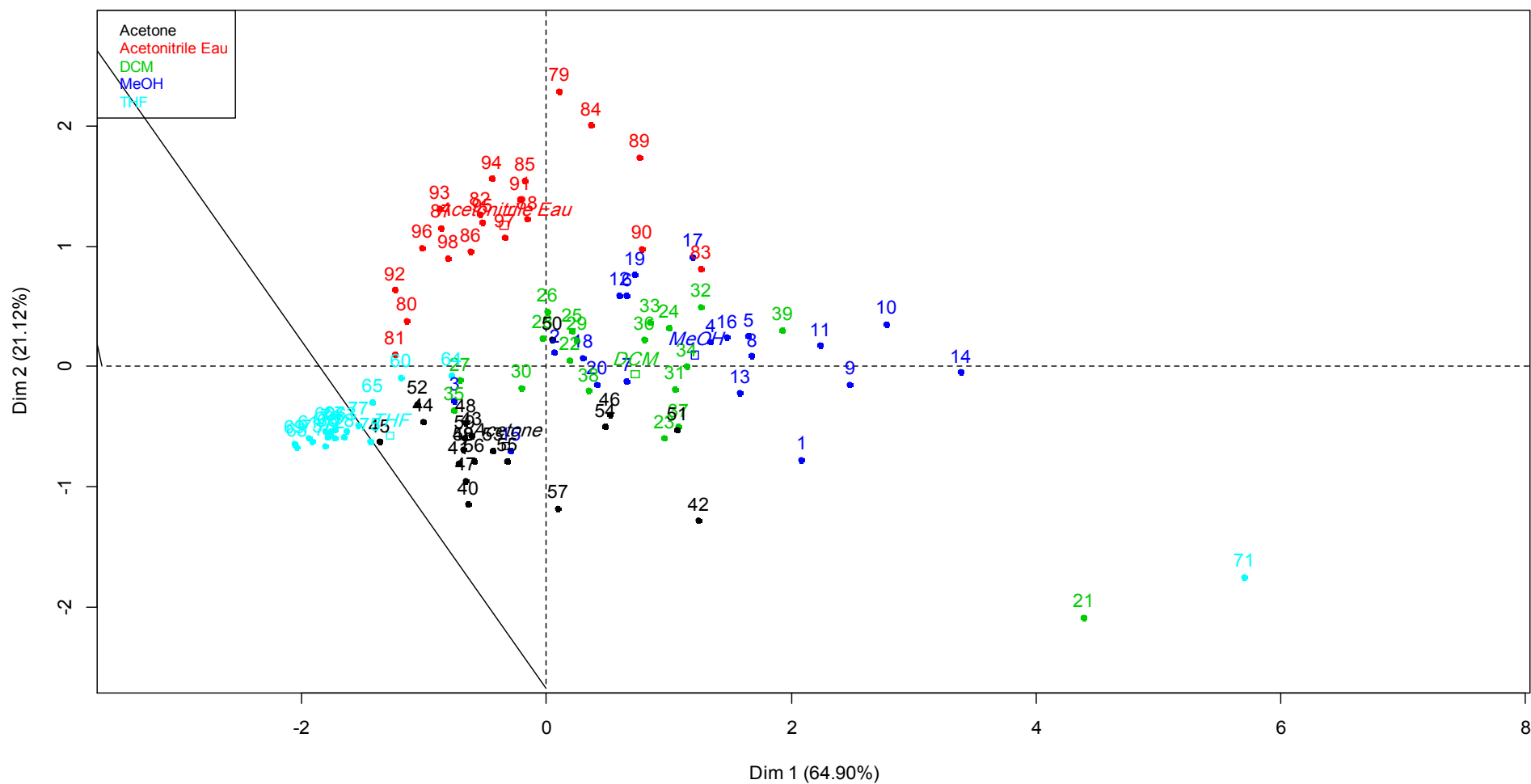


Figure II-24: Scores dans le plan des deux premières composantes principales obtenus par calcul ACP de données d'analyse de différents solvants (variables) issues de 100 échantillons décrits par le code couleur indiqué sur la gauche.

L'interprétation du diagramme se fait en regardant les corrélations des variables avec les axes principaux. Pour chaque axe, on regarde les variables qui lui sont les plus fortement corrélées et on compare la position de ces variables les unes par rapport aux autres. Par conséquent, ce diagramme nous permet de distinguer :

- a- La première composante explique 64,90% de la variabilité des données la deuxième explique 21,12% de la variance totale. Les deux premières composantes expliquent ensemble 86,02%.
- b- Quatre groupes d'échantillons formant quatre agglomérations bien distincts (1-rouge, 2-noir, 3-bleu clair et 4=vert + bleu foncé).
- c- Une discrimination claire entre les individus. En effet, on observe une séparation bien distincte des groupes notamment, les valeurs issues du THF, ACN/eau, acétone et un quatrième groupe composé des individus du DCM et du MeOH.
- d- A noter que le diagramme révèle l'existence d'une corrélation entre le DCM et le MeOH.
- e- Les individus de solvant DCM et MeOH se répartissent de part et d'autre de l'axe de composante principale, les autres groupes d'individu forment des amas au-dessus ou dessous de l'axe.
- f- On peut identifier la présence de quelques scores aberrants, les individus 21 et 71.

En fin de compte, l'ACP a mis en évidence l'existence d'une relation entre les résultats des analyses et les solvants d'une part, et d'autre part une certaine corrélation existe entre les spots issus de l'utilisation du DCM et de MeOH comme solvants. Comme précisé en introduction, ce test est qualitatif. Pour une réponse définitive, on a donc recours à des tests de statistique inférentielle afin de prendre une décision basée sur des arguments solides.

9.3.2. Analyse sans normalisation

Les intensités absolues des ions $[M+H]^+$ des alcaloïdes testés dans différents solvants présentent une grande variabilité qui caractérise la technique MALDI : par exemple dans le cas de l'analyse dans le THF, la variabilité est plus importante que la moyenne pour les trois alcaloïdes testés. Une comparaison appropriée par l'application d'un test statistique est difficile à cause de la grande fluctuation entre les valeurs des moyennes et des écarts types des intensités brutes, et ils ne suivent pas de lois précises. Cependant la représentation graphique, des moyennes et des écarts types, par un histogramme (Figure II-25) peut nous aider à affiner l'éventail des choix.

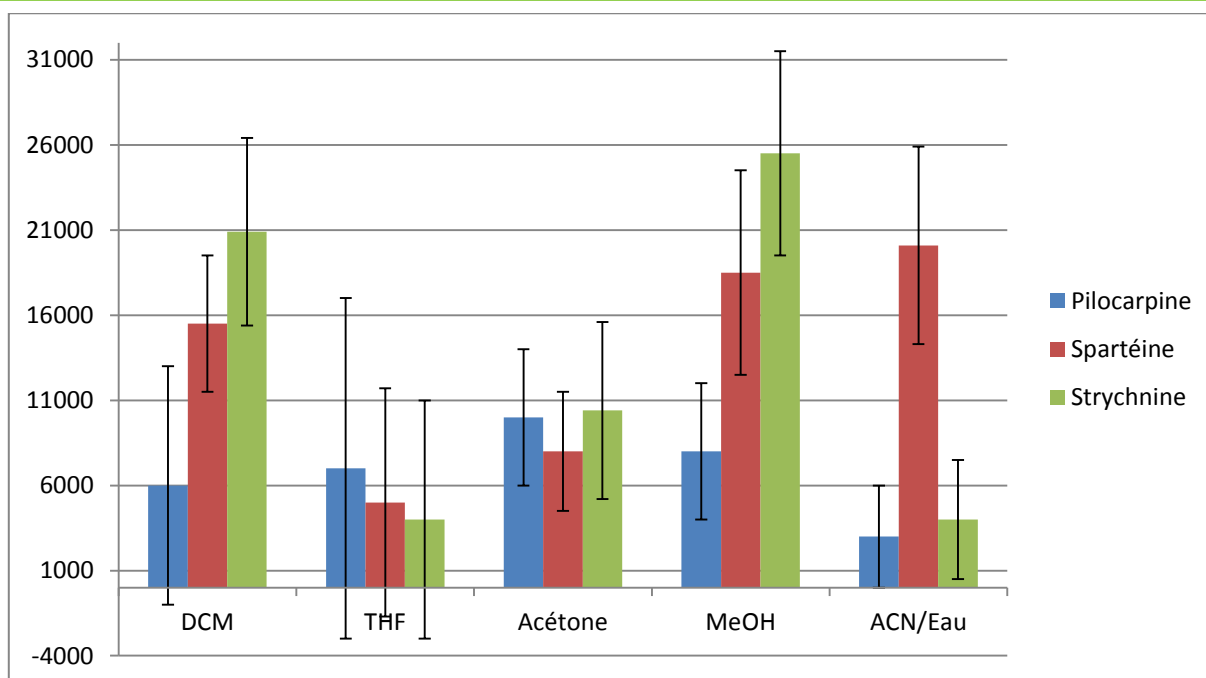


Figure II-25 : Histogramme représentant la variation des intensités brutes pour trois alcaloïdes (moyenne des intensités absolues de 20 mesures) en utilisant trois différents solvants pour la matrice avec les écarts types.

(Rq : pour des raisons de visualisation les valeurs de la pilocarpine sont multipliées par 10)

Observations :

- a- les solvants donnant les plus fortes intensités des ions d'analytes sont l'un très polaire (MeOH) et l'autre apolaire (DCM). Paradoxalement, ce qui semble exclure une relation entre polarité de solvants et réponse¹⁶³.
- b- le THF est le solvant donnant les plus faibles intensités, alors que sa polarité et sa capacité à solubiliser MT3P sont proches de celles d'un des meilleurs solvants, le DCM.
- c- Aucune relation significative et claire n'a été mise en évidence entre les EI et AP des solvants avec l'intensité.

9.3.3. Analyse après normalisation

Afin de s'affranchir l'irrégularité des valeurs brutes, une normalisation est appliquée. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure II-26). On peut remarquer l'impact de la normalisation dans le cas du THF : avec ce mode d'expression des résultats, les écarts types sont maintenant comparables aux autres.

Hormis le mélange ACN/eau qui montre une grande différence d'intensité entre spartéine et strychnine, les autres solvants montrent des résultats très proches avec des écarts-types assez bon. En prenant en considération les faibles intensités obtenues dans l'étude sans normalisation en utilisant THF solvant de la matrice, ce dernier et le mélange ACN/eau sont exclus de l'étude suivante.

À ce stade, l'analyse des résultats est réalisée par des tests statistiques qui ont pour but de mener à bien l'étude comparative entre les trois solvants DCM, acétone et MeOH, afin de vérifier s'il existe une vraie différence en termes de rendements d'ions produits avec les trois solvants ou bien un solvant de préférence.

Avant de définir la répétabilité, il est important de repreciser d'abord la définition de la fidélité qui est l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'un essai. Selon l'AFNOR, la répétabilité par définition, représente l'«Étroitesse de l'accord entre les mesurages successifs de la même quantité, effectués dans les mêmes conditions de mesurage»¹⁶⁵. Ainsi la répétabilité correspond à la fidélité dans les conditions des répétabilités. On peut l'obtenir par la répétition d'une mesure sur même échantillon, l'appareillage et l'opérateur sont aussi identiques et les mesures étant effectuées dans un faible intervalle de temps. Autrement dit, la répétabilité mesure la dispersion du mesurande pour une méthode de mesure effectuée par un opérateur précis sur un instrument précis. Ainsi, on peut étudier et quantifier le défaut de répétabilité dans des conditions INTRA-laboratoire par un « écart-type ». On va considérer les trois protocoles, avec différents solvants, comme trois méthodes différentes, et on comparera la répétabilité de ces trois méthodes. C'est pourquoi, il faut calculer un écart type global ou écart type de répétabilité, caractérisant l'écart type des résultats de chaque méthode.

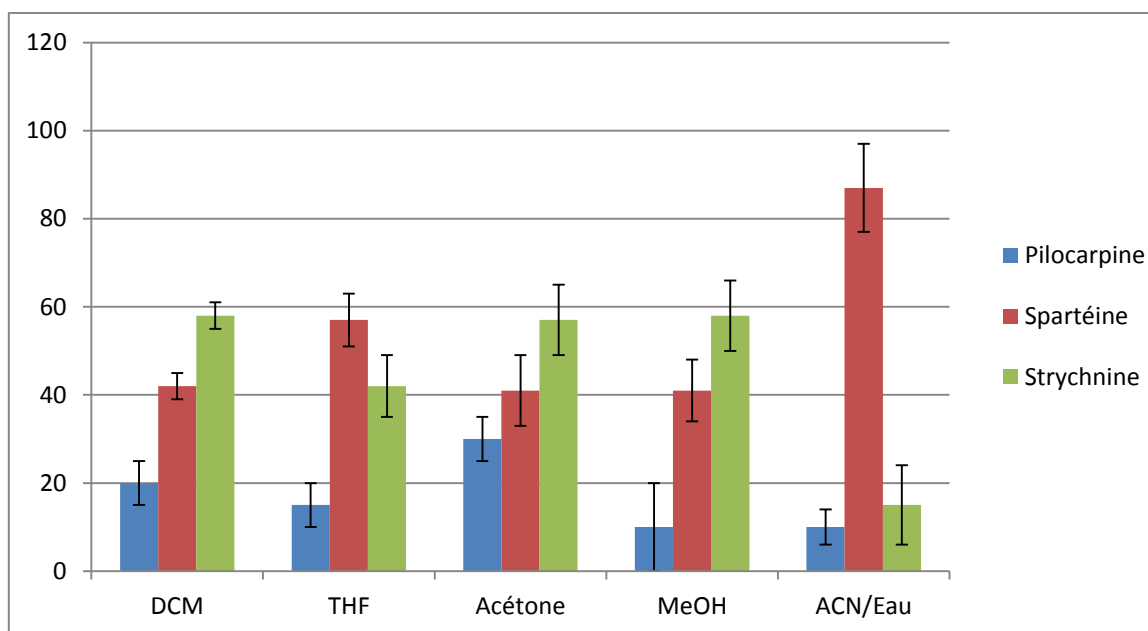


Figure II-26 : Histogramme représentant la variation des intensités normalisées pour trois alcaloïdes (moyenne des intensités absolues de 20 mesures) en utilisant trois différents solvants pour la matrice avec les écarts types. (Rq : pour des raisons de visualisation les valeurs de pilocarpine sont multipliées par 10)

Les formules pour calculer l'écart type (S ou σ_{n-1}) et la moyenne (\bar{X}) sont :

$$S = \sigma_{n-1} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad (II.3)$$

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (II.4)$$

i. Vérification de l'homogénéité des écarts-types

Une vérification de l'homogénéité des écarts-types est obligatoire avant le calcul de l'écart type de répétabilité de chaque méthode. Nous ferons appel ici au test C de Cochran qui est classiquement réalisé. Le test de Cochran consiste à comparer les différents écarts types (ou variances) calculés et permet de déterminer s'ils peuvent être considérés comme égaux. On a n répétitions de la même mesure qui est l'intensité de chaque pic et k écarts types. Ce test nous permet de vérifier si les écarts types sur les intensités normalisées moyennes de chacun des pics d'intérêts sont suffisamment proches pour autoriser le calcul de l'écart type de répétabilité.

$$C = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^k S_i^2} \quad (II.5)$$

Avec

S_{max} : l'écart-type le plus élevé,

S_i : l'écart type sur l'intensité normalisée moyenne du i-ème pic d'intérêt,

k : le nombre de pics d'intérêt pris en compte dans l'étude.

Le test C teste l'hypothèse nulle (H_0) contre l'hypothèse alternative (H_1):

H_0 : Tous les variances sont égales.

H_1 : au moins une valeur de variance est significativement plus grande que les autres valeurs de la variance. $C_{calculée}$ est comparée à $C_{tabulée}$.

ii. Calcul de l'écart-type de répétabilité et comparaison des méthodes.

Lorsque j'affirme l'homogénéité, le calcul de l'écart-type de répétabilité est autorisé :

$$S_r = \sqrt{\frac{1}{K} \sum_{j=1}^k S_j^2} \quad (II.6)$$

Avec S_r : l'écart-type de répétabilité,

S_j : l'écart type sur l'intensité normalisée moyenne du j-ème pic d'intérêt,

K : le nombre de pics d'intérêt pris en compte dans l'étude.

Pour l'étude actuelle, trois écarts types de répétabilité, notés respectivement $S_{r,DCM}$, $S_{r,MeOH}$ et $S_{r,acétone}$ pour les protocoles utilisant respectivement DCM, MeOH et acétone seront obtenus et permettront la comparaison de ces trois méthodes.

Dans la mesure où le DCM est le solvant initialement utilisé au laboratoire et considéré comme référence, et les valeurs de $S_{r,MeOH}$ et $S_{r,acétone}$ sont comparées à $S_{r,DCM}$.

Deux situations sont possibles :

- 1- soit $S_{r,MeOH}$ ou $S_{r,acétone}$ sont inférieurs à $S_{r,DCM}$, alors ces méthodes présentent une fidélité au moins aussi bonne que la méthode de référence.
- 2- soit S_r est supérieur à $S_{r,réf}$, il faut soumettre les écarts types à un test de Fisher qui permet de déterminer si les fidélités des deux méthodes sont équivalentes, ou si la méthode alternative est moins fidèle que la méthode de référence.

On peut tester l'égalité des deux variances par le test de Fisher. Ce test permet d'estimer si les deux variances peuvent être considérées comme identiques en calculant le rapport de ces deux variances, en prenant la variance la plus élevée et en comparant la valeur de ce rapport à une valeur critique issue des tables de Fisher-Snedecor $F_{tabulée}$ pour un risque d'erreur α fixé et $N-K$ et $N_{réf}-K$ degrés de liberté :

$$q = \frac{S_r^2}{S_{réf}^2} \quad (II.7)$$

avec k , le nombre d'échantillons, ici le nombre rapports m/z considérés et N , $N_{réf}$, les nombres totaux de mesures tous rapports m/z confondus pour, respectivement, la méthode étudiée et la méthode de référence.

- si q est inférieur ou égal à la valeur critique au risque choisi, il est possible de conclure que la méthode alternative présente une fidélité compatible avec la méthode de référence ;
- si q est supérieur à la valeur critique au risque choisi, la fidélité n'est pas satisfaisante.

iii. Résultats

Le Tableau II-6 regroupe les moyennes et les écart-types des trois méthodes à comparer. Chaque méthode possède un ensemble de trois couples correspondant aux trois pics d'intérêts.

Solvant		<i>m/z</i>		
		211,6	235,5	335,5
MeOH	Moyenne	1,28	40,73	57,98
	Ecart type	0,60	7,15	7,19
DCM	Moyenne	1,40	41,39	57,21
	Ecart type	1,34	4,19	4,51
Acétone	Moyenne	3,17	41,74	55,08
	Ecart type	0,95	8,49	8,34

Tableau II-6 : Intensités moyennes normalisées des alcaloïdes et les écarts-types.

En appliquant le test de Cochran aux trois séries de mesures en utilisant la valeur tabulée $C(k,n)$ avec $k = 3$, puisqu'il y a trois pics d'intérêt, et $n = 20$ correspond au nombre de spectres utilisés pour calculer les moyennes.

$C_{0.05(3,20)}$	0,528
MeOH	0,501
DCM	0,513
Acétone	0,506

Tableau II-7 : Résultats du test de Cochran pour les trois méthodes et valeur critique tabulée.

Etant donné que tous les $C_{calculée}$ sont tous inférieurs à la valeur $C_{tabulée}$, le test de Cochran valide l'homogénéité des écart-types, et on peut calculer les écarts types de répétabilité selon l'équation (II.6) et $K=3$ trois pics d'intérêts.

S_r MeOH	5,865572
S_r DCM	3,635619
S_r Acétone	6,895588

Tableau II-8 : Ecarts types de répétabilité calculés pour les trois méthodes.

Les résultats indiquent que le Sr de la méthode de référence (avec le DCM) est plus petit que les autres. Comme nous l'avons noté plus haut, dans ce cas il faut soumettre les écarts-types à un test de Fisher. Les valeurs de ratios calculés selon l'équation (II.7) sont comparées à la valeur tabulée de Fisher-Snedecor au risque 1%. La valeur critique est trouvée en considérant 57 degrés de liberté pour chaque deux études, puisque dans ce cas, $N = N_{\text{réf}} = 3 \times 20$ mesures effectuées pour chacun des cas et $k = 3$ rapports m/z différents.

$F_{0.01(57,57)}$	1,86
$q_{\text{MeOH/DCM}}$	1,61
$q_{\text{Acétone/DCM}}$	1,90

Tableau II-9 : Résultats du ratio pour les deux méthodes et valeur tabulée de Fisher.

Deux situations apparaissent :

- la premier ratio $q_{\text{MeOH/DCM}}$ est inférieur à la valeur critique, ce qui permet de conclure que la fidélité de la méthode utilisant le méthanol est du même ordre que celle de la méthode avec DCM.
- la deuxième ratio $q_{\text{Acétone/DCM}}$ est supérieur à la valeur critique. On peut conclure dans ce cas que la fidélité de la méthode où l'acétone était utilisée n'est pas satisfaisante.

Finalement, les analyses statistiques ne montrent pas de différences marquées entre le DCM et le MeOH en ce qui concerne les signaux des analytes.

Un des paramètres important lors de l'utilisation du MALDI pour l'analyse de composés de faible masse molaire est la possible superposition des signaux de la matrice et des analytes. Notre choix du meilleur solvant prend donc maintenant en compte l'intensité des ions de la matrice MT3P, en focalisant sur l'intensité de son ion moléculaire à $m/z = 297$. L'étude réalisée pour quatre solvants et en particulier MeOH et DCM montre de nettes différences (Figure II-27). Les ions des matrices sont environs six fois plus intenses avec MeOH comparé à DCM, et ce dernier est le solvant conduisant aux ions de matrice les moins intenses.

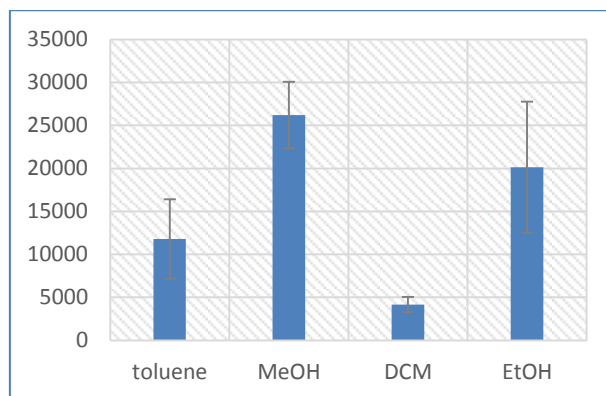


Figure II-27 : Histogrammes des moyennes avec les écart-types des intensités du pic moléculaire ($m/z = 297$) de MT3P (sans alcaloïdes) dans différents solvants. Intensités moyennes sur 6 spectres de masse ; 150 accumulations/spectre.

9.4. Effet du solvant sur la morphologie des spots

Bien que la méthode de déposition sur la plaque cible joue un rôle important, la morphologie cristalline du dépôt et l'incorporation de molécules d'analytes au sein du réseau des molécules de matrice (co-cristallisation analytes-matrice) dépend fortement du solvant adopté.

En effet l'évaporation du solvant conduit, comme nous l'avons observé lors des essais d'enduction centrifuge, à une surface inhomogène comportant des zones de co-cristallisation appelées points chauds, ou « *hot-spot* » dont la répartition est influencée par le solvant¹⁶⁶. Dans la mesure où la taille de ces cristaux peut affecter la reproductibilité des analyses, il est important d'étudier l'influence du solvant sur la morphologie du spot. La Figure II-28 montre les clichés de microscopie optique (stéréomicroscope modèle Leica Mz12) des surfaces après co-cristallisation de yohimbine et de MT3P dans différents solvants (MeOH, EtOH et DCM).

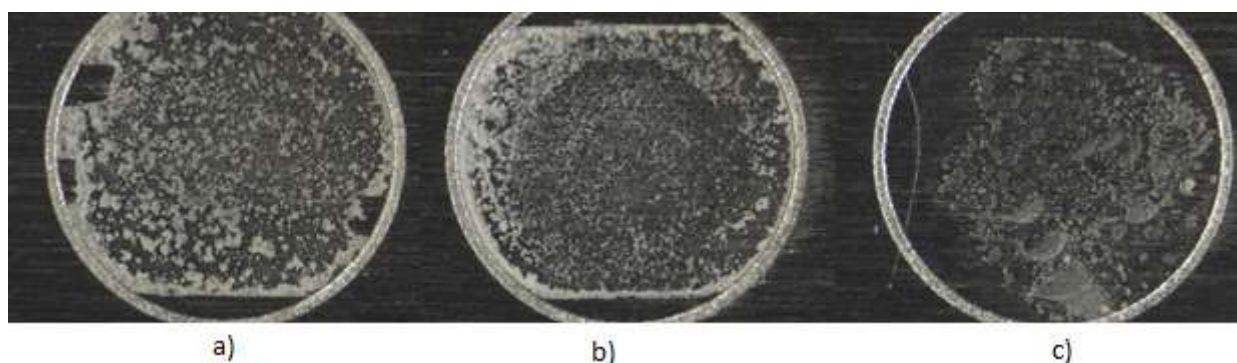


Figure II-28 : Dépôts d'échantillon de yohimbine avec MT3P (10 mg.mL^{-1}) dans différents solvants
a) MeOH b) EtOH et c) DCM

Alors qu'aucune différence significative de morphologie des spots n'a été observée pour chaque solvant avec ou sans analytes, on peut constater que l'utilisation d'un solvant hydroxylé (MeOH et EtOH, Figure II-28 respectivement a et b) conduit à des dépôts globalement de taille

homogène avec de nombreux cristaux de faible taille, tandis qu'avec le DCM la taille des amas est plus hétérogène et leur taille plus importante.

10. Conclusion

Dans la mesure où nos travaux ont pour objet de mieux connaître les processus mis en jeu lors de l'analyse d'alcaloïdes par MALDI avec des matrices bithiophéniques et de développer des applications, nous avons avant tout cherché à mieux comprendre l'influence des conditions de préparation et d'analyse des échantillons sur les résultats finaux. Ceci nous a conduits à étudier plusieurs facteurs (méthode de dépôts, solvant, puissance du laser et le traitement de données) pour finalement retenir des conditions résumées dans le Tableau II-10 suivant :

Facteur		Option retenue
Méthode de dépôts		Goutte séchée
Solvant		DCM
Puissance du laser		30 %
Traitements pour l'analyse	qualitative	Intensités brutes
	quantitative	Normalisation

Tableau II-10 : Options adoptées

Il faut noter que le DCM qui était le solvant initialement utilisé au laboratoire reste celui à privilégier. Toutefois, si sa faible polarité pose problème avec des analytes très polaires (e.g. chlorhydrate d'alcaloïdes) un mélange MeOH/DCM sera utilisé.

Chapitre III :

MT3P pour l'identification

et/ou le dosage des

alcaloïdes.

Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

1. Introduction

Les métabolites secondaires, également nommés métabolites spécialisés, assurent différentes fonctions pour la plante (protection contre les UV, stockage d'azote, attraction d'animaux/insectes, et défense). Ces activités expliquent qu'encore aujourd'hui, cette source reste une des principales pour des molécules actives (Figure III-1), et de nombreux médicaments importants dérivent directement ou indirectement de plantes.

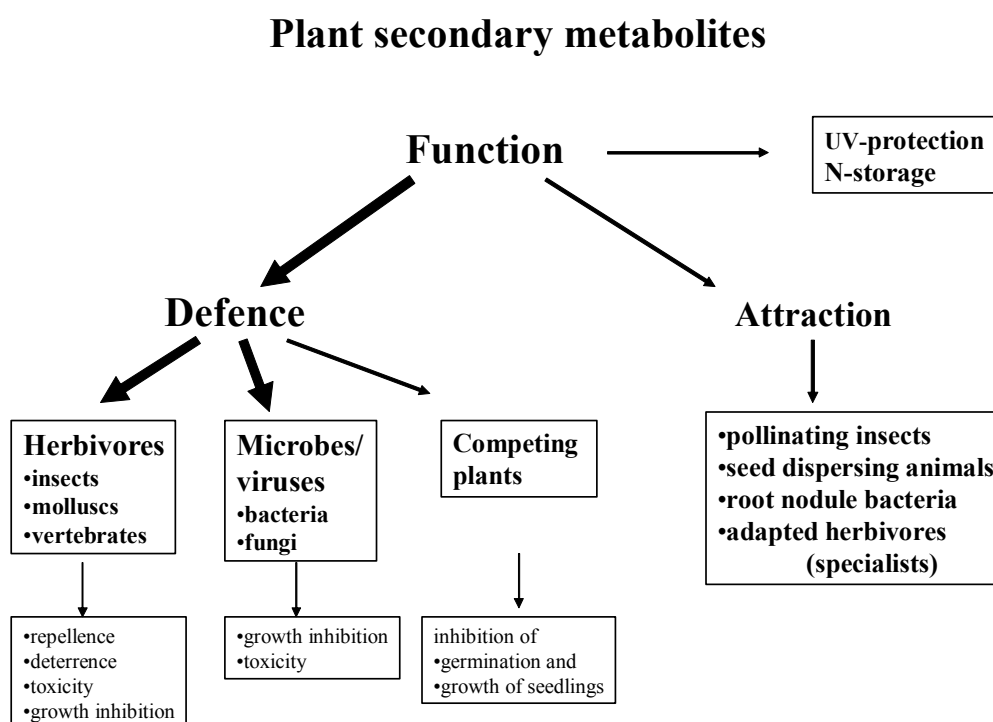


Figure III-1 : Différentes fonctions des métabolites secondaires des plantes (traduit de l'anglais)¹⁶⁷.

L'analyse phytochimique d'une plante est généralement difficile. En effet, l'extraction de différentes parties de plantes¹⁶⁸ par un solvant donne un mélange complexe au sein duquel se trouvent les substances d'intérêts, souvent en très faibles quantités. L'analyse de ces substances se fait généralement par une série de processus qui visent soit à les identifier ou soit à les doser. De nombreuses méthodes analytiques, peuvent être employées, et le choix de ces méthodes sera déterminé en fonction du contexte de l'analyse (qualitatif ou quantitatif), de la nature de l'échantillon analysé, des propriétés physico-chimiques des composés recherchés et du niveau de concentration de ces derniers. Les méthodes utilisées pour l'analyse des métabolites secondaires sont dans la plupart des cas des techniques couplées (combinaison entre une méthode de séparation chromatographique et une méthode de détection)¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Ces méthodes ne sont pas universelles, elles dépendent donc des propriétés physicochimiques des composés ciblés. Des

Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

optimisations sont généralement nécessaires pour chaque échantillon rencontré incluant un temps de préparation d'échantillon qui bien souvent représente la partie la plus chronophage de la méthode.

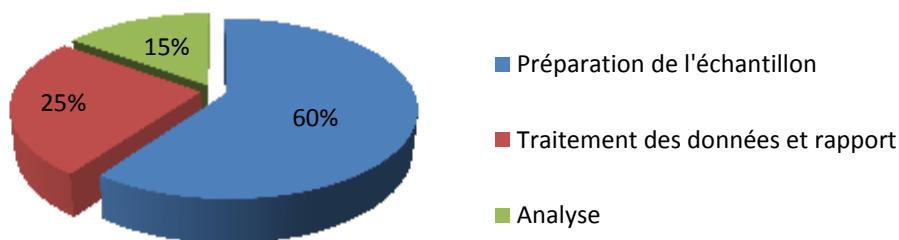


Figure III-2 : Consommation de temps en fonction des différentes parties de la méthode d'analyse.

Le développement d'une méthode de haute sensibilité, qui autorise l'identification ou la détection des substances contenues dans un extrait végétal, ou dans d'autres milieux biologiques complexes, sans aucune préparation préliminaire, serait d'un grand intérêt. Les études précédentes réalisées au laboratoire ont montré que les BMs permettent, par analyse MALDI, d'ioniser sélectivement les alcaloïdes d'un extrait végétal reconstitué ou classique¹⁶.

Cette technique présente comme avantage de permettre l'analyse directe d'un mélange complexe, sans passer par des étapes de préparation de l'échantillon et sans association d'une séparation chromatographique en amont. Par conséquent, à la fois la durée de la méthode et la consommation de solvants pourront être réduites. Cette méthode exploite la sensibilité très élevée des spectromètres de masse de type MALDI et conduit à des limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) très basses. Toutefois, certains problèmes déjà cités dans les parties précédentes (les pics d'interférences avec la matrice, le phénomène de suppression de pics,...) constituent des obstacles à l'utilisation du MALDI pour l'analyse des petites molécules¹⁷². D'autre part, le MALDI n'est pas considéré comme la méthode de choix pour la quantification. En effet, les signaux d'ions d'analytes générés par cette technique montrent une faible reproductibilité échantillon-à-échantillon, spot-à-spot et tir-à-tir^{153,166}.

Il apparaît donc important d'aller déterminer le potentiel (avantages et limites) des BMs pour l'analyse (quantitative ou qualitative) par MALDI des alcaloïdes dans différents extraits végétaux ou milieux biologiques. Les applications de cette technique sont en effet nombreuses : dans le domaine pharmaceutique (contrôle qualité des spécialités constituées d'alcaloïdes, ou d'extraits de plantes à alcaloïdes) et toxicologique, tant sur l'aspect clinique que médicolegal.

Dans ce chapitre, une méthode d'analyse quantitative par MALDI des alcaloïdes toxiques dans des extraits bruts de plantes est présentée en utilisant la matrice MT3P. Cette étude portera sur quatre alcaloïdes : scopolamine, hyoscyamine, colchicine et sénécionine. La méthode ainsi développée sera ensuite validée sur quelques paramètres. Dans un deuxième temps, cette

matrice sera utilisée en situation de couplage avec la chromatographie sur couche mince couplée avec MALDI (CCM-MALDI-MS). Pour finir, cette même matrice sera employée en imagerie MALDI-IMS sur des coupes des plantes grâce à une collaboration avec des collègues Allemands.

2. Les plantes de référence étudiées

Les plantes de référence pour cette étude sont des plantes médicinales à alcaloïdes, soit de type tropanique (*datura*, *belladonne* et *jusquiame*), de type isoquinoléique (colchique), de type quinolizidinique (genêt à balais) ou soit de type pyrrolizidinique (sénéçon commun).

a- La belladone (*Atropa belladonna*), le datura (*Datura stramonium*) et la jusquiame noire (*Hyoscyamus niger*) appartiennent, tous les trois, à la grande famille des solanaceae (environ 2000 espèces). Grâce aux alcaloïdes tropaniques présentant des activités biologiques marquées, ces plantes sont utilisées de nos jours en allopathie, en homéopathie mais également pour des usages récréatifs. Dans ce dernier cas, des cas d'intoxication par ces plantes sont régulièrement rapportés¹⁷³. Par exemple, dans l'enquête sur la consommation de drogues réalisée en 2002 chez les jeunes gens de 17 à 19 ans par l'observatoire français des drogues et des toxicomanies, le datura est cité en sixième position parmi les principales drogues¹⁷⁴. Ces plantes (Figure III-3) sont caractérisées par la présence de deux alcaloïdes tropaniques : l'hyoscyamine et la scopolamine (Tableau III-2). L'atropine est le mélange racémique de deux énantiomères de l'hyoscyamine. Chez l'homme, ces alcaloïdes exercent une action parasympholytique pouvant conduire en cas d'intoxication à un syndrome atropinique ou anticholinergique¹⁷⁵.



Figure III-3 : De gauche à droite *Datura stramonium*, *Atropa belladonna* et *Hyoscyamus niger*.

(Source de photo Wikipedia.org)

Les alcaloïdes tropaniques possèdent une structure comportant un noyau tropane. Ce dernier est un noyau bicyclique (*N*-méthyl-8-azabicyclo[3.2.1]octane) résultant de la condensation d'un cycle *N*-méthylpyrrolidine et d'un cycle *N*-méthylpipéridine. Ces alcaloïdes ont aussi été identifiés dans des plantes d'autres familles : Erythroxylaceae (*Erythroxylum coca*), Convolvulaceae, Proteaceae et Rhizophoraceae.¹⁷⁶

b- Le colchique (*Colchicum autumnale*, de la famille des liliaceae), communément connu sous le nom de crocus d'automne ou safran sauvage, est une plante toxique dont un des principaux constituants est la colchicine (Tableau III-2). Cet alcaloïde à noyau tropolone, est traditionnellement utilisé comme médicament contre la goutte, mais est également connu pour ses effets toxiques¹⁷⁷. Une variété d'alcaloïdes ont été isolés de la plante : la colchicine, et ses dérivés, la colchicérine, la colchamine, le colchicoside, la 3-déméthylcolchicine, la cornigérine, et la 2-déméthylcolchifoline¹⁷⁸. Des intoxications mortelles par ingestion accidentelle de *C. autumnale* sont parfois rapportées¹⁷⁹ puisque la plante est parfois confondue avec l'ail sauvage (*Allium ursinum*, Amaryllidaceae). En outre *C. autumnale* est également un contaminant du foin causant régulièrement de sévères intoxications qui peuvent être mortelles pour des bovins et des chevaux en Europe¹⁸⁰.



Figure III-4 : Le colchique (*Colchicum autumnale*).

(Source photo : www.panoramio.com)

C- Le genêt à balais (*Cytisus scoparius*, de la famille de Fabaceae) est une espèce arbustive à fleurs, contenant plusieurs alcaloïdes toxiques qui peuvent déprimer le cœur et le système nerveux¹⁸¹. En particulier, cette plante est une source connue de spartéine (Tableau III-2), un alcaloïde quinolizidinique présentant des effets anti-arythmiques bénéfiques, et toxiques à doses plus élevées^{182,183}.



Figure III-5 : Genêt à balais (détail de la fleur)

(Source: www.ethnobotanical.info)

D- Le séneçon commun (*Senecio vulgaris*, de la famille des Astreaceae) contient des alcaloïdes pyrrolizidiniques¹⁸⁴. La sénécionine¹⁸⁵ (Tableau III-2) et la sénéciphylline¹⁸⁶ en sont les principaux représentants¹⁸⁷. Ces alcaloïdes sont des composés chimiques de défense qui sont inhibiteurs ou toxiques pour les herbivores et les pathogènes^{188,189}. Plus particulièrement, la toxicité hépatique de ces dérivés est bien établie.



Figure III-6 : Les fleurs de *Senecio vulgaris*.

(Source : Wikipedia.org)

E- Le quinquina (*Cinchona officinalis*, de la famille des Rubiaceae), dont la drogue est constituée par les écorces de tronc. Elle contient au minimum 6,5 % d'alcaloïdes totaux dont 30 à 60 % d'alcaloïdes de type quinine¹⁹⁰. Les alcaloïdes extraits des écorces de quinquina continuent à être très utilisés comme médicaments (effet antipyrétique, antiarythmique, antimalarique, etc.)¹⁹¹, additifs de boissons gazeuses¹⁹². Parmi les alcaloïdes contenus dans le quinquina, on peut citer la

Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

quinidine, la cinchonine, la quinine (Tableau III-2) et l'hydroquinidine. L'usage thérapeutique de certains de ces alcaloïdes conduit en cas de surdoses prolongées à différents signes cliniques incluant troubles auditif ou cardiaque par exemple.



Figure III-7 : Écorces de quinquina rouge.

(Source : www.herboristerie.com/produits/quinquina-rouge-en-vrac/)

Nom scientifique (nom courant), famille	Parties dangereux de la plante	Principe actif	Classe de toxicité	Mode d'action, symptômes
<i>Atropa belladonna</i> (deadly night shade) et les espèces apparentées, Solanacées	toutes les parties	hyoscyamine, scopolamine, et autres alcaloïdes tropaniques	Ia NT, MA, MP	mAChR antagoniste avec des propriétés parasympholytiques, hallucinogènes sous diverses formes, aphrodisiaque, mydriase, hyperthermie, l'inhibition de la salivation, mort par arrêt respiratoire
<i>Genêt à balais (balai)</i> et les espèces apparentées avec spartéine / lupanine alcaloïdes principales, Fabacées	toutes les parties	spartéine et d'autres quinolizidine alcaloïdes	II NT, GI, MP	spartéine est un agoniste mAChR et inhibe les canaux Na ⁺ , l'ingestion importante provoque une diurèse, les contractions de l'utérus, des vomissements, la diarrhée, des douleurs abdominales, de la tachycardie, l'irrégularité cardiaque, toxicité similaire à la nicotine.
<i>Datura stramonium</i> (Thornapple) et les espèces apparentées, Solanacées	toutes les parties, notamment grains et racines	hyoscyamine, scopolamine, atropine	Ia NT, MA, MP	alcaloïdes tropaniques inhibent mAChR et présentent des propriétés parasympholytiques causant de fortes hallucinations, largement utilisés comme hallucinogène et aphrodisiaque

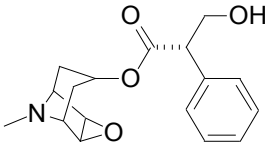
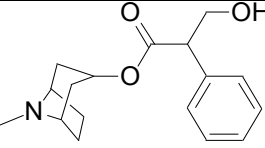
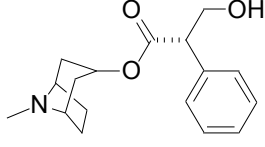
Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

<i>Hyoscyamus Niger</i> (jusquiame), <i>H. muticus</i> , <i>H. albus</i> , <i>H. aurea</i> , <i>H. reticulatus</i> et les espèces apparentées, Solanacées	toutes les parties, notamment racines et bulbes	hyoscyamine, atropine, scopolamine et autres alcaloïdes tropaniques	Ia NT, MA, MP	alcaloïdes tropaniques bloquent les mAChR et sont parasympholytic, fort hallucinogène et aphrodisiaque, des doses plus élevées, mydriatique, stimulation cardiaque, le coma, la mort par arrêt respiratoire
<i>Colchicum autumnale</i> (<i>Crocus d'automne</i>), <i>C. speciosum</i> et les espèces apparentées, liliacées	toutes les parties, notamment grains et bulbes	colchicine et des alcaloïdes dérivant	Ia, CT, NT, MP, GI	les symptômes incluent la nausée, des étourdissements, sensation de brûlure de la gorge et de l'estomac, la purge, la douleur d'estomac, des spasmes, des hémorragies internes, forte diurèse, collapsus cardiovasculaire, arrêt respiratoire
<i>Senecio jacobaea</i> (<i>séneçon jacobée</i>), <i>S. latifolius</i> (y compris <i>S. sceleratus</i>), <i>S. douglasii</i> , <i>S. vulgaris</i> , <i>S. verna</i> , <i>S. retrorsus</i> , <i>S. isatidis</i> et <i>S. burchellii</i> et autres espèces de séneçon, Astéracées	toutes les parties, notamment les fleurs	sénécionine et autres alcaloïdes pyrrolizidiniques	II CT, MU, NT, MP	Les PAs, sont hépatotoxiques (maladie veino-occlusive), l'ADN alkylate et sont donc mutagène et cancérigène, inhibe les nerfs périphériques, intoxication fréquentes des cheptels

Tableau III-1 : Vue d'ensemble sur les plantes toxiques étudiées, leurs toxines et toxicologie. Class I a:

extrêmement dangereux; Ib: très dangereux; II: modérément dangereux; III: danger faible.

IN=inflammatoire; CT= cytotoxique; NT= neurotoxique; HP= poison cardiaque, MA= psychotrope (mind altering)(traduit de l'anglais)¹⁶⁷.

Substances	Structure chimique	Formules	MW (g.mol ⁻¹)	Masses exactes
(S)-(-)-Scopolamine (= Hyoscine)		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,353	303,147
Atropine		C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	289,369	289,168
(S)-(-)-Hyoscyamine		C ₁₇ H ₂₃ NO ₃	289,369	289,168

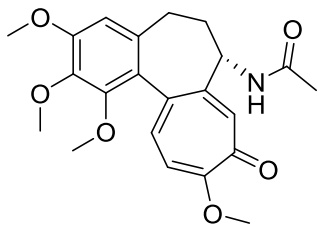
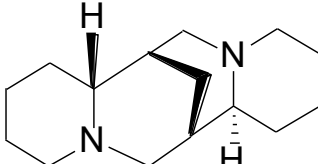
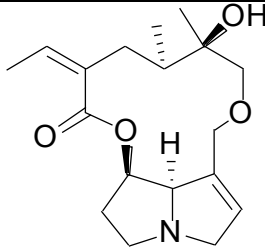
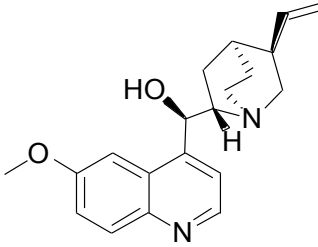
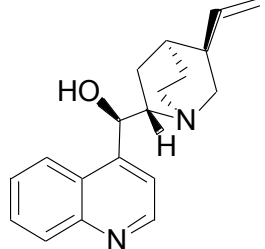
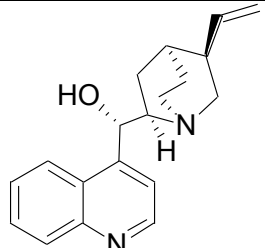
Colchicine		$C_{22}H_{25}NO_6$	399,437	399,168
Spartéine		$C_{15}H_{26}N_2$	234,380	234,210
Sénécionine		$C_{18}H_{25}NO_5$	335,395	335,173
Quinine		$C_{20}H_{24}N_2O_2$	324,417	324,184
Cinchonidine		$C_{19}H_{22}N_2O$	294,391	294,173
Cinchonine		$C_{19}H_{22}N_2O$	294,391	294,173

Tableau III-2 : Les alcaloïdes principaux des plantes étudiées.

3. Développements d'une nouvelle méthode de dosage en MALDI en utilisant MT3P comme matrice.

Il existe deux objectifs de quantification d'alcaloïdes dans une drogue : le dosage des alcaloïdes totaux et le dosage d'un (d') alcaloïde(s) particulier(s).

Après extraction, le dosage des alcaloïdes totaux peut être réalisé par méthode gravimétrique (dosage pondéral) mais la précision est faible, par dosage volumétrique (acidimétrie directe ou en retour). À titre d'exemple, la méthode de dosage adoptée par la Pharmacopée européenne pour le dosage des alcaloïdes totaux de la belladone (feuille) est un dosage acidimétrie¹⁹³ en retour, après dissolution du résidu dans un excès d'acide.

Pour le dosage d'une classe d'alcaloïdes ou d'un alcaloïde purifié, différentes techniques sont utilisées. Les méthodes spectrophotométriques ou fluorométriques sont souvent employées. Par exemple, le dosage des alcaloïdes de type quinine et cinchonine est réalisé dans les écorces de quinquina par mesure de l'extinction à 316 et 348 nm dans la Pharmacopée européenne¹⁹³.

Bien que des telles méthodes restent en vigueur, elles sont actuellement supplantées par d'autres méthodes de dosage couplées incluant la CLHP (avec différents détecteurs et particulièrement des spectromètres de masse), qui présente beaucoup d'avantages (discrimination chromatographique, spécificité de détection, seuil de détection...).

Par ailleurs, le dosage des alcaloïdes n'est pas confiné à des échantillons d'extraits des plantes. Ainsi ledit échantillon pouvant être constitué de phanères (qui accumulent de manière préférentielle certains toxiques comme le plomb, la cocaïne notamment dans les cheveux) ou d'un liquide biologique tel que le sang, le plasma, les liquides des muqueuses génitales, les liquides de la peau, les liquides d'épanchement et des cavités closes, les liquides du système digestif et urinaire. La quantification dans de tels milieux complexes nécessite généralement des temps de préparation d'échantillon longs, une maîtrise des effets de matrice, un contrôle des taux de recouvrement des molécules d'intérêt au cours du processus de préparation.

Ces contraintes de développement incitent beaucoup de laboratoires à développer des méthodes de dosage alternatives qui peuvent fournir des améliorations sur le procédé de quantification.

Dans cette partie, on a décidé de développer une méthode qualitative et quantitative d'alcaloïdes, connus pour leurs toxicités, dans des extraits bruts des plantes. Cette méthode MALDI-TOF-MS est basée sur l'utilisation de la matrice MT3P sélective.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Les composés analysés

Cette étude se porte sur 4 substances issues de trois classes d'alcaloïdes :

- L'hyoscyamine et la scopolamine : deux composés de la famille des alcaloïdes tropaniques.
- La colchicine, alcaloïde au noyau tropolonique.
- La sénécionine appartenant à la famille des alcaloïdes pyrrolizidiniques.

A côté de ces composés deux autres alcaloïdes sont testés afin de choisir l'étalon interne convenable: le cocaéthylène (tropanique) et l'émétine (bêta-carboline).

3.1.2. Matériels

Les solvants organiques (qualité HPLC), méthanol (MeOH), dichlorométhane (DCM), & l'acétonitrile (ACN) ont été fournis par Carlo Erba Reagents (Val-de-Reuil, France). L'eau a été purifiée sur système milliQ (Waters). La colchicine, quinidine, quinine et émétine ont été obtenues de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), et la scopolamine et hyoscyamine d'Extrasynthèse (Genay, France). La sénécionine a été isolée durant différents projets de recherches au SONAS. Le cocaéthylène a été synthétisé par estérification à partir de benzoylécgonine (mode opératoire indiqué en partie expérimentale).

Les analyses sont réalisées grâce à l'instrument MALDI-TOF-MS BIFLEX III décrit dans le chapitre deux (4.Le MALDI-TOF Biflex III, en page 50).

3.1.3. Préparation de la matrice et des solutions (standards et échantillons)

La solution de la matrice MT3P est préparée dans le DCM à une concentration de 10 mg.mL^{-1} . Les 6 standards (pureté > 95%) ont été dissous dans le méthanol afin d'obtenir les solutions de réserve à 1 mg.mL^{-1} . Ces dernières ont été préparées dans des flacons CLHP et chaque solution a été ensuite homogénéisée au vortex puis conservée au congélateur à -20°C . Les jours d'expériences, les solutions de réserve sont ramenées à température ambiante avant d'être utilisées pour préparer la série de dilutions. Hormis le cocaéthylène et l'émétine qui sont préparés à une concentration de $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$ et utilisés comme standard interne toujours à la même concentration, les gammes d'étalonnage des alcaloïdes étudiés ont été réalisées par dilution des solutions stock dans un mélange méthanol/eau (7/3).

3.1.4. L'extraction des alcaloïdes

L'extraction des alcaloïdes sont faites suivants les protocoles indiqués dans la partie expérimentale à la fin de la thèse (2.2 Préparation des extraits de plantes, en page 215).

3.1.5. Protocole de préparation de la solution de travail et de déposition

Pour préparer la solution de travail, $10 \mu\text{L}$ de la solution d'analyte à la concentration désirée (préparée par dilution de la solution stock) sont mélangés avec $10 \mu\text{L}$ de la solution de la matrice (à 10 mg.mL^{-1}) puis avec $10 \mu\text{L}$ de la solution d'étalon interne (à $0,12 \text{ mg.mL}^{-1}$). La solution obtenue est agitée au vortex, ensuite $1 \mu\text{L}$ de cette solution est déposé via une micropipette automatique sur la plaque MALDI (Figure III-8).

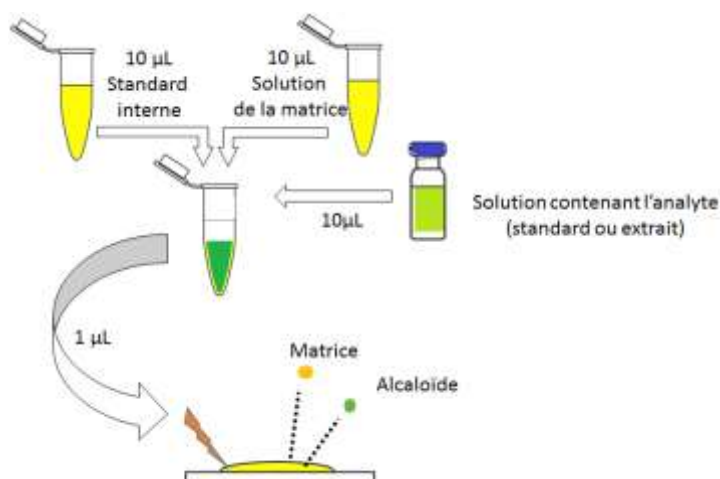


Figure III-8 : Protocole de préparation et de dépôt des solutions à analyser.

3.2. Développements et optimisation de la méthode

Comme évoqué dans la partie bibliographie, la technique MALDI peut présenter un certain nombre d'inconvénients en situation de quantification (suppression d'ions, faible répétabilité,..). Afin de développer une méthode quantitative, des solutions ont été proposées pour améliorer les données finales en particulier sur l'exclusion de certaines mesures. Ainsi, dans certain cas, les tirs de laser fournissent des pics parfois très grands ou au contraire très petits dû à l'hétérogénéité des spots, l'utilisation de tels pics conduit à des erreurs sur la quantification et nécessite leur exclusion¹⁹⁴. Les critères de sélection du spectre incluent une réponse élevée, une bonne résolution, bon rapport signal-bruit, et la cohérence en réponse relative par rapport aux autres spectres¹⁹⁵.

En ce qui nous concerne, la nécessité de la normalisation des résultats obtenus afin d'homogénéiser les valeurs a déjà été établie dans le chapitre II (Méthode et conditions d'acquisition des données, en page 62). De plus, s'agissant d'une méthode quantitative par technique MALDI, l'addition d'un étalon interne nous a semblé particulièrement appropriée pour améliorer les paramètres de répétabilité¹⁹⁶. Le choix de l'étalon interne approprié est une étape critique pour la réussite d'une telle analyse¹⁹⁷. L'étalon interne doit avoir la capacité de mimer les propriétés chimiques et physiques de l'analyte d'intérêt dans toutes les étapes du processus d'analyse. Le candidat doit posséder les groupements fonctionnels de même nature que les analytes d'intérêt ainsi qu'un point d'ébullition comparable¹⁹⁸. En outre, il ne doit pas être naturellement présent dans l'échantillon. Il doit également être stable et inerte vis-à-vis des protocoles appliqués à l'échantillon.

3.2.1. Choix de l'étalon interne

Généralement en spectrométrie de masse l'étalon interne choisi est un des isotopes stables du composé analysé, par exemple un analogue deutéré. Or, notre étude concernera différents alcaloïdes parfois en mélange, ce qui rend le choix des isotopes comme étalon interne non judicieux. D'autre part, leur coût est élevé, ou leur préparation difficile à réaliser, c'est pourquoi cette stratégie impliquant les isotopes stables en tant qu'étalon interne n'a pas été retenue. Deux types d'étalon interne ont été envisagés, le premier implique un analogue structural des alcaloïdes étudiés et obtenu par synthèse (par exemple, le cocaéthylène), le second implique un alcaloïde à disposition dans la chimiothèque du laboratoire (l'émétine).

i. Premier essai cocaéthylène

Pour la première série d'essais portant sur l'analyse de composés tropaniques, le cocaéthylène a été choisi comme étalon interne puisqu'également élément de la série tropanique et dont la masse ($m/z=317,16$) n'interfère pas avec les masses des alcaloïdes analysés. Les autres alcaloïdes tropaniques comme la benzoylcgonine (289,13 Da) et la cocaïne (303,14 Da), à disposition dans la chimiothèque du laboratoire, interfèrent avec les pics pseudomoléculaire des alcaloïdes à analyser. Le cocaéthylène a été synthétisé¹⁹⁹ au laboratoire à partir de la benzoylcgonine (commerciale). La fonction acide de ce composé est transformée en ester éthylique par une séquence réactionnelle en deux étapes. L'acide est tout d'abord activé en un chlorure d'acide sous l'action de chlorure d'oxalyle. Le dérivé chloré instable n'est pas isolé mais directement engagé dans l'estérification avec de l'éthanol pour fournir le cocaéthylène avec un rendement de 75 % (Schéma III-1).

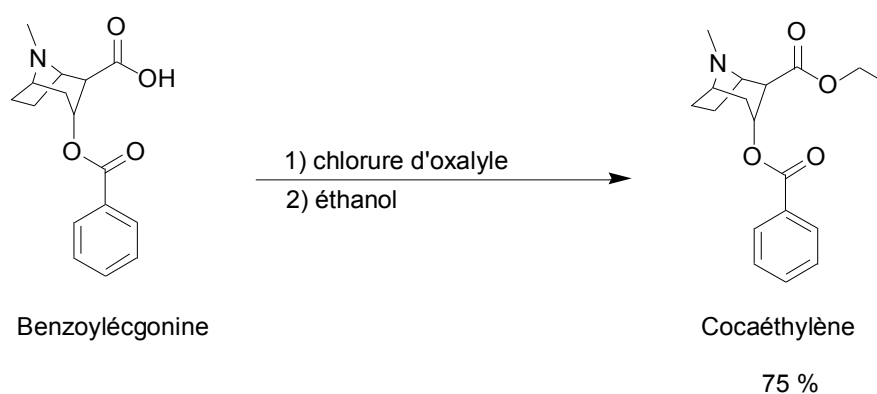


Schéma III-1 : Synthèse du cocaéthylène¹⁹⁹.

Après la préparation du cocaéthylène comme étalon interne, le dosage d'alcaloïdes de même série tropanique (scopolamine et l'hyoscyamine) est réalisé. Une série de dilution de la solution stock de ces alcaloïdes est préparée (concentrations finales entre 50 et 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Les spectres MALDI sont enregistrés (300 accumulations, 58,8 μJ) avec MT3P comme matrice et en utilisant le cocaéthylène (0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) comme étalon interne.

Le ratio des intensités a été calculé selon l'équation suivante:

$$\text{Ratio des intensités (RI)} = \frac{\text{Intensité du pic d'analyte}}{\text{Intensité du pic du standard interne}}$$

ii. Deuxième essai l'émétine

Le deuxième choix est porté sur l'émétine ayant une masse exacte de 480,29 Da, relativement loin des pics attendus des alcaloïdes analysés ainsi que ceux de la matrice utilisée. L'émétine (Figure III-9) est aussi un alcaloïde toxique aussi, tiré de l'ipéca (*Carapichea ipecacuanha*, famille des Rubiaceae). Pour information, il possède des propriétés émétiques, par conséquent il est utilisé comme vomitif.

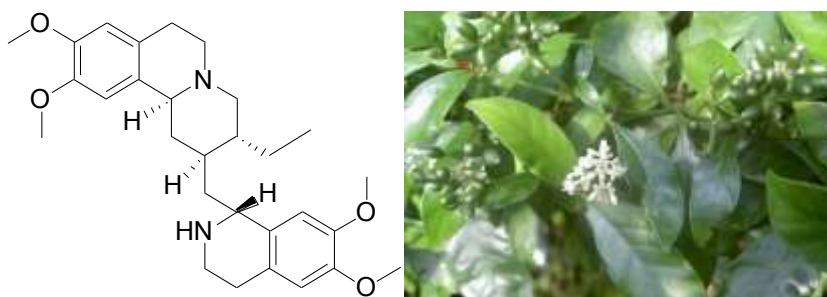


Figure III-9 : Structure chimique de l'émétine et photo de la plante ipéca.

(Source de la photo : www.toxiplante.fr)

iii. Evaluation et résultats

La mesure est répétée trois fois pour tracer la droite d'étalonnage. Les coefficients de corrélations linéaires (R^2) des droites de régression, en utilisant le cocaéthylène, (Figure III-11) obtenus varient entre $0,92 \pm 0,05$ pour la scopolamine et $0,89 \pm 0,09$ pour l'hyoscyamine. Les graphes si dessous (Figure III-11) illustrent les meilleures régressions obtenues pour les deux alcaloïdes étudiés.

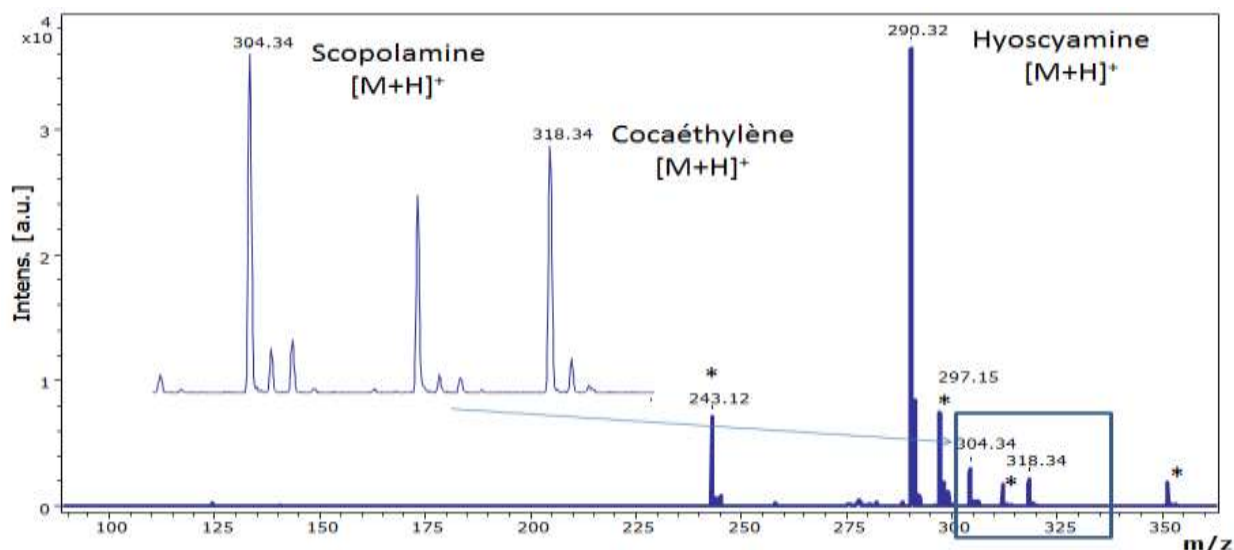


Figure III-10: Spectre de masse d'extrait de belladone en utilisant cocaethylene comme etalon interne.

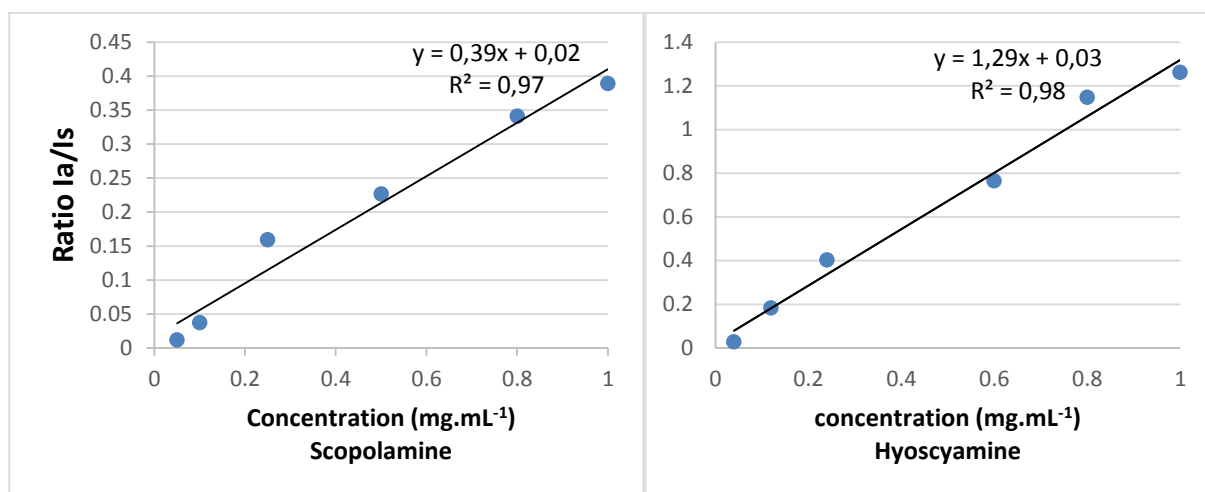


Figure III-11 : Droites d'étalonnage pour le dosage de la scopolamine et de l'hyoscyamine en utilisant le cocaéthylène comme étalon interne.

Cependant les coefficients ont été améliorés en utilisant l'émétine comme étalon interne (Figure III-12, Figure III-13). En effet, le coefficient de corrélations linéaires (R^2) de la droite de regression obtenue pour le dosage de l'hyoscyamine est égal à $0,99 \pm 0,007$ (Figure III-14).

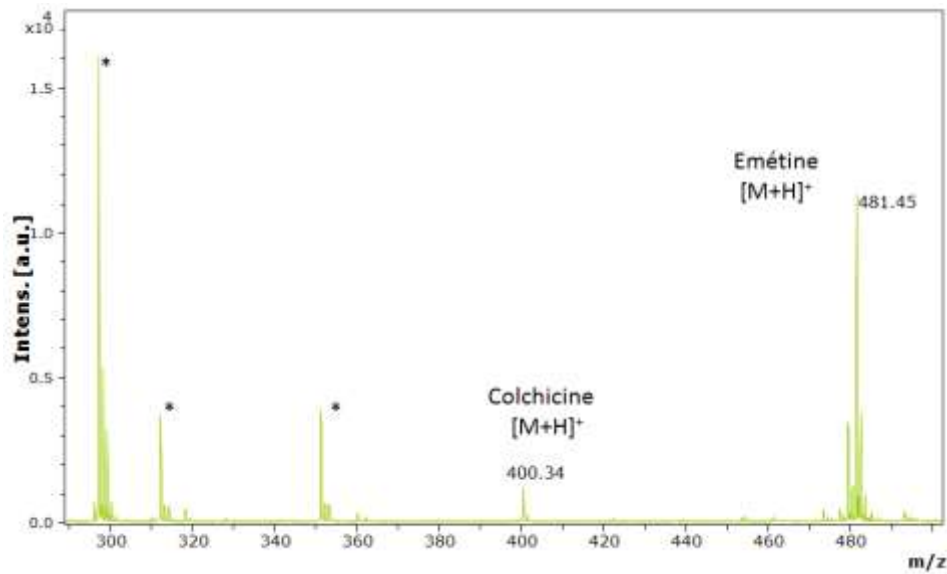


Figure III-12 : Spectre de masse de l'extrait de *C. autumnale* (0,7 mg.mL⁻¹ dans le DCM) avec l'émétine comme étalon interne. (300 accumulations, laser 35 % (58,8 μJ)). (* : ions de matrices)

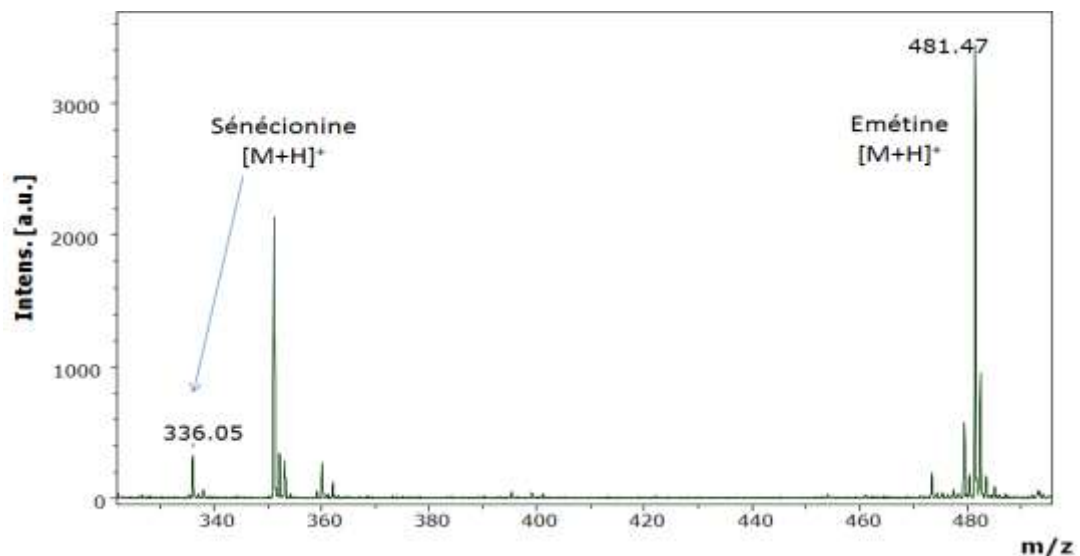


Figure III-13 : Spectre de masse de la sénécionine obtenu avec l'émétine comme étalon interne (150 accumulations, puissance laser 35 % correspondant à 58,8 μJ).

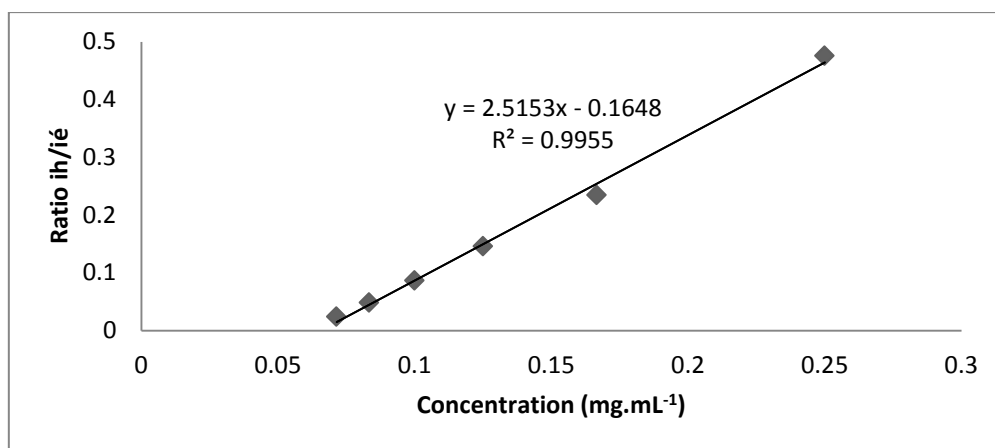


Figure III-14 : Courbe d'étalonnage (ratios des intensités en fonction de la concentration) d'hyoscyamine en utilisant l'émétine comme étalon interne.

Une proposition d'explication de la variation des coefficients de corrélation nous a amenés à l'hypothèse que si l'étalon interne et l'analyte étudiés possèdent tous les deux des structures proches, alors une compétition est très probable d'autant que, comme précisé en introduction, les alcaloïdes s'ionisent sous une forme protonée permettant probablement des échanges de protons entre deux alcaloïdes et ceux de la matrice. Dans un mélange, certains analytes auront des affinités plus élevées que d'autres pour les protons disponibles²⁰⁰.

Avec l'émétine, le « complexe » protoné est clairement défini et probablement sans compétition vis-à-vis d'autres entités. Si des études thermodynamiques conforteraient cette hypothèse, il n'en reste pas moins que l'émétine est un étalon interne idéal pour étudier le dosage des alcaloïdes tels que l'hyoscyamine par MT3P.

Ainsi les critères de choix sont modifiés pour trouver une molécule témoin interne pour le dosage :

1- de la famille des alcaloïdes, mais pas nécessairement ayant une structure similaire aux analytes, pour qu'elle s'ionise dans les mêmes conditions des molécules étudiées tout en minimisant le plus possible la compétition probable envers les protons.

2- son m/z et ceux de ses fragments (s'ils existent) n'interfèrent pas avec les ions des analytes.

Les premiers essais en utilisant l'émétine ont montré des bons résultats, ainsi on a décidé d'étudier la performance de la méthode afin de l'appliquer ultérieurement dans l'étude des extraits.

3.2.2. Performances de la méthode MALDI-TOF-MS pour la quantification

Après avoir présenté l'impact sur la méthode de certains solvants, du procédé de dépôt (chapitre II), et du choix de de l'étalon interne, abordons maintenant quelques éléments de validation de la méthode de quantification. Cela sera réalisé en évaluant les performances de la méthode selon plusieurs critères : la sélectivité, la répétabilité inter et intra-journalières, la linéarité, les limites

de détection et de quantification et la précision. En outre, pendant tous les tests effectués, le test de Grubbs est appliqué pour le traitement des valeurs aberrantes et ainsi homogénéiser les valeurs²⁰¹. Grubbs²⁰² définit une valeur aberrante comme étant une observation qui semble dévier de façon marquée par rapport à l'ensemble des autres membres de l'échantillon dans lequel il apparaît. Par ailleurs, nous appliquons également un traitement analogue à ceux rapportés dans la littérature concernant les protocoles MALDI avec élimination systématiquement des valeurs extrêmes.

i. Sélectivité

La sélectivité peut se définir comme étant la capacité de la méthode à permettre la mesure univoque de la substance à analyser, en présence de composés susceptibles de l'accompagner²⁰³. On peut aussi décrire cette notion comme la capacité de la méthode à quantifier une substance sans subir l'influence de composés endogènes ou exogènes tels que les impuretés²⁰⁴, la matrice (le milieu et l'environnement de l'analyte), le standard interne, les produits de dégradation....La détermination de la spécificité se fonde sur une absence d'interférences²⁰⁵. Selon le principe du MALDI, le spectre de masse est réalisé avec un mélange des analytes et de la matrice MT3P. Il convient donc de s'assurer que les pics de la matrice ne masquent pas ceux de l'alcaloïde. Pour cela des témoins (six échantillons), contenant seulement la matrice, ont été analysés afin d'examiner la présence de pics d'interférences avec les alcaloïdes étudiés²⁰⁶. Aucun des pics de la matrice observés à $m/z = 351,20, 312,17, 297,15$ et $243,14$ ne présente un risque d'interférence avec les ions moléculaires attendus des alcaloïdes (hyoscyamine $[M+H]^+ = 290,17$, scopolamine $[M+H]^+ = 304,15$, sénécionine $[M+H]^+ = 336,18$, colchicine $[M+H]^+ = 400,18$) (Figure III-15).

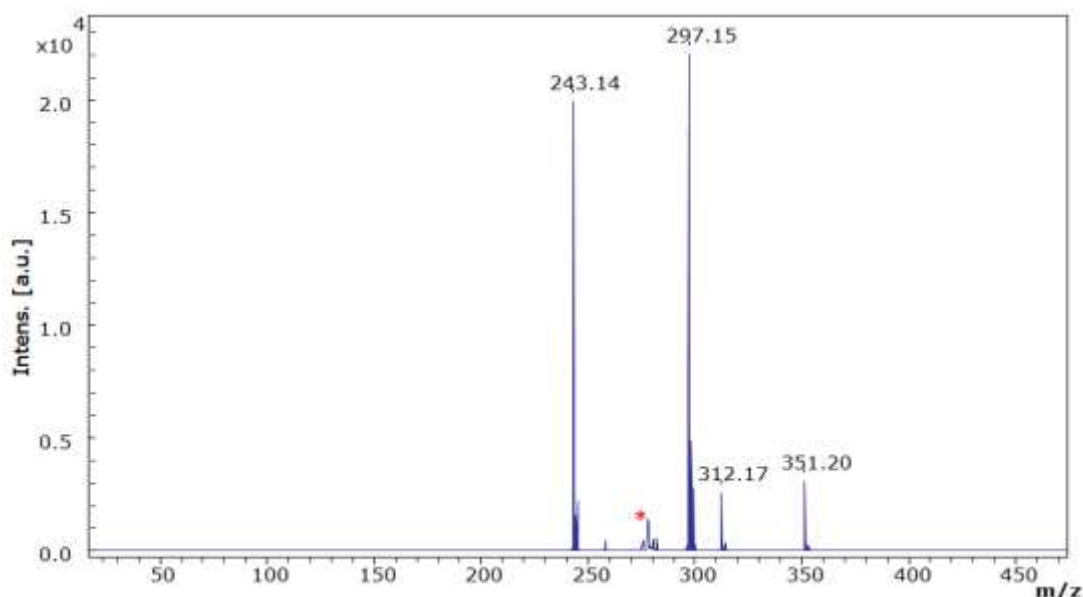


Figure III-15 : Spectre MALDI-MS de la matrice MT3P sans aucun analyte.

(* = pic généré par la plaque).

La sélectivité a donc été évaluée dans un premier temps vis-à-vis de la matrice. Elle a également été étudiée sur des échantillons ne comportant pas les composés ciblés (échantillon sans hyoscyamine par exemple). Aucun massif lié aux analytes d'intérêt n'a été enregistré sur l'échantillon, après préparation et dépôt selon la procédure développée, sur le spectre MALDI-MS.

ii. Paramètres de Fidélité

La fidélité de mesure décrit l'étroitesse de l'accord entre les valeurs mesurées obtenues par une répétition d'analyse de la même cible dans des conditions spécifiées²⁰⁷. Elle comprend la répétabilité et la reproductibilité des mesures. La définition de la répétabilité a déjà été abordée dans le chapitre II mais d'une façon rapide. Ce concept décrit la fidélité des valeurs mesurées répétées de la même variable, obtenues dans les mêmes conditions expérimentales (procédure de mesure, mêmes opérateurs, même instrumentations, etc.) pendant une courte période (le même jour) pour la répétabilité intra-jour ou dans une période de temps étendue pour la répétabilité inter-jour. Tandis que la reproductibilité de mesure décrit la fidélité de mesure obtenue pour un échantillon donné dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents.

iii. La répétabilité

La répétabilité de la méthode développée a été évaluée pour l'analyse des alcaloïdes d'un extrait de grains *Datura stramonium*, et sur la base de l'examen de l'écart type standard (RSD pour *relative standard deviation*) des mesures de 10 répétitions pour l'intra-jour et deux jours

Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

successives pour évaluer l'inter-jour. Les RSD ont été calculés pour les rapports des intensités analyte/étalon interne (émétine) pour chacun de deux alcaloïdes présents majoritairement (hyoscyamine et scopolamine). Les résultats sont rapportés dans le Tableau III-3 pour les deux alcaloïdes étudiés. Ces résultats indiquent une répétabilité tout à fait correcte de cette méthode MALDI avec des RSD (ou CV) inférieurs à 10 % pour la répétabilité intra-journalière et inférieurs à 13 % pour la répétabilité inter-journalière.

Composés	Concentration de l'extrait (mg.mL ⁻¹)	RSD (%)	
		Intrajour ^a	Interjour ^b
Hyoscyamine	5,01.10 ⁻¹	9,3	12,6
Scopolamine	8,23.10 ⁻²	8,9	8,8

^a n=10 ; ^b n=2

Tableau III-3 : RSD (%) des essais inter et intra-journaliers obtenus avec l'extrait de *Datura stramonium*.

Les valeurs de RSD tolérées selon la FDA (Food and Drug Administration)²⁰⁸ ne doivent pas dépasser 15 % pour l'élaboration des méthodes bio-analytiques. Les RSD intra-journalière et inter-journalières trouvées sont toutes inférieures à 15%, ce qui atteste de répétabilités satisfaisantes des analyses effectuées.

iv. La reproductibilité

Une étude de reproductibilité implique la participation de différents laboratoires, chacun reçoit un ou plusieurs échantillons sur lesquels sont répétées plusieurs fois les mêmes mesures selon le même protocole. Or le changement d'instrument MALDI va mener bien évidemment à un changement dans l'ionisation. De nombreux paramètres intervenant dans le mécanisme d'ionisation, il est presque impossible que deux instruments MALDI fournissent les mêmes conditions (par exemple, l'énergie de laser fourni dépend de son âge). De plus, ce type d'appareil n'est pas un appareil de routine et ils diffèrent bien souvent dans leur conception (pas le même type analyseur, le même laser, la plaque de dépôt, ...). Puisque la méthode est conçue pour différents alcaloïdes, nous avons diversifié le choix des alcaloïdes cibles lors de la validation de chaque paramètre. La qualité de l'analyse avec MT3P est déterminée pour une gamme de concentration de colchicine. Les solutions et les dépôts sont réalisés selon le protocole expérimental retenu. Dans le cadre d'une collaboration avec la société JEOL, la plaque MALDI préparée à Angers est envoyée à Paris et l'analyse est réalisée sur un nouvel instrument « SpiralTOF™ MALDI-TOF/TOF-MS » ayant le même type de laser d'azote (mais tout neuf), avec un analyseur TOF Spiral (présenté dans le premier chapitre).

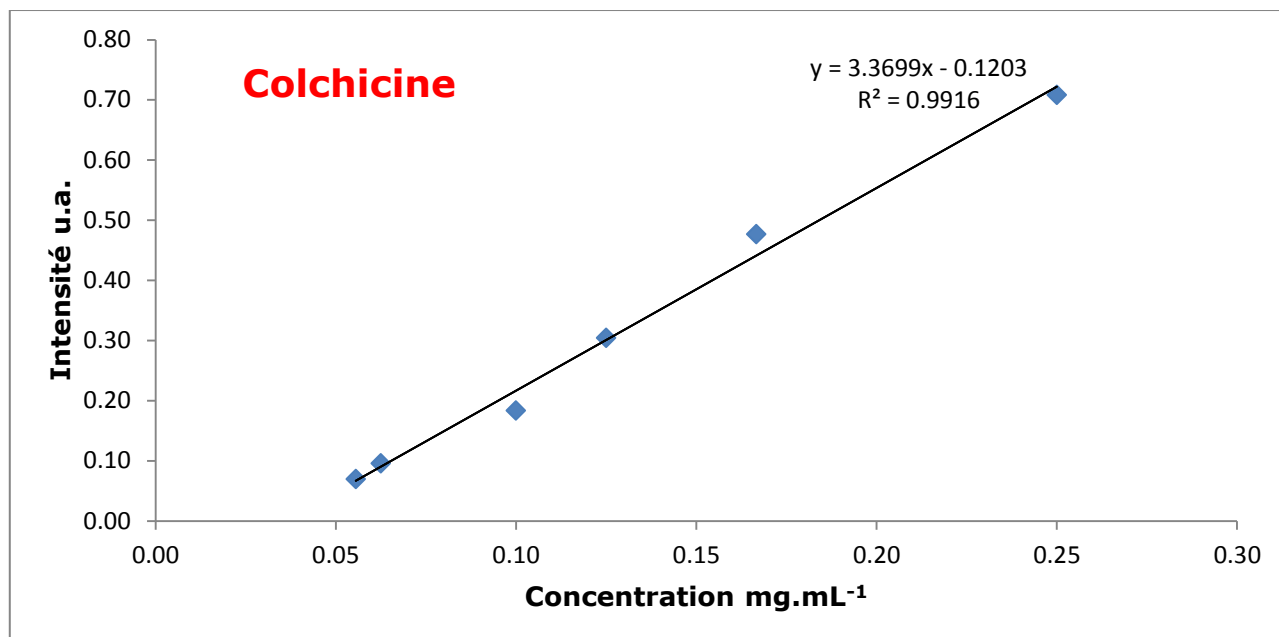


Figure III-16 : Tracé de la droite d'étalonnage de la colchicine.

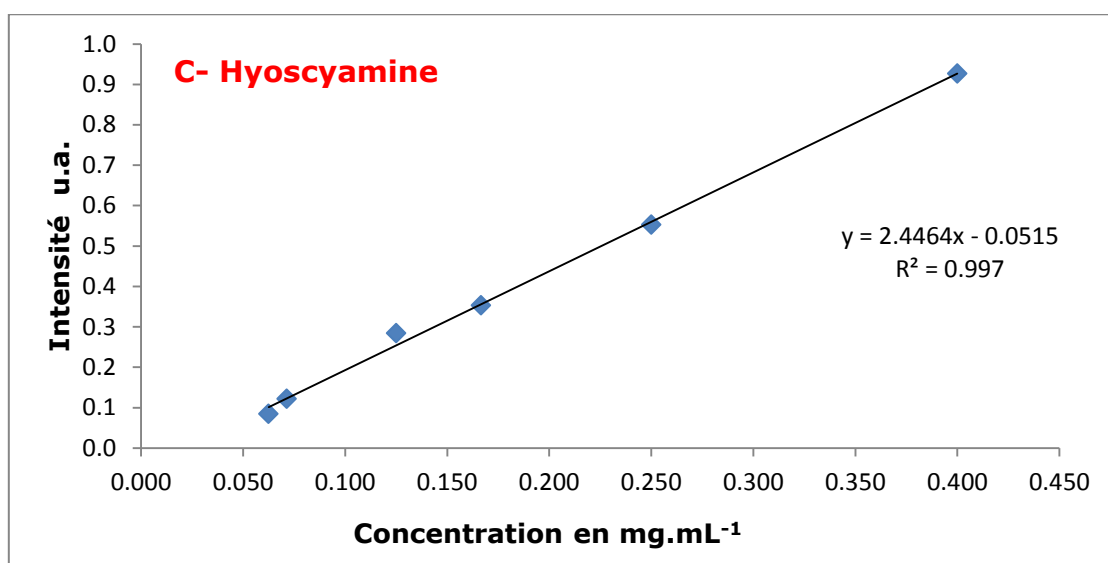
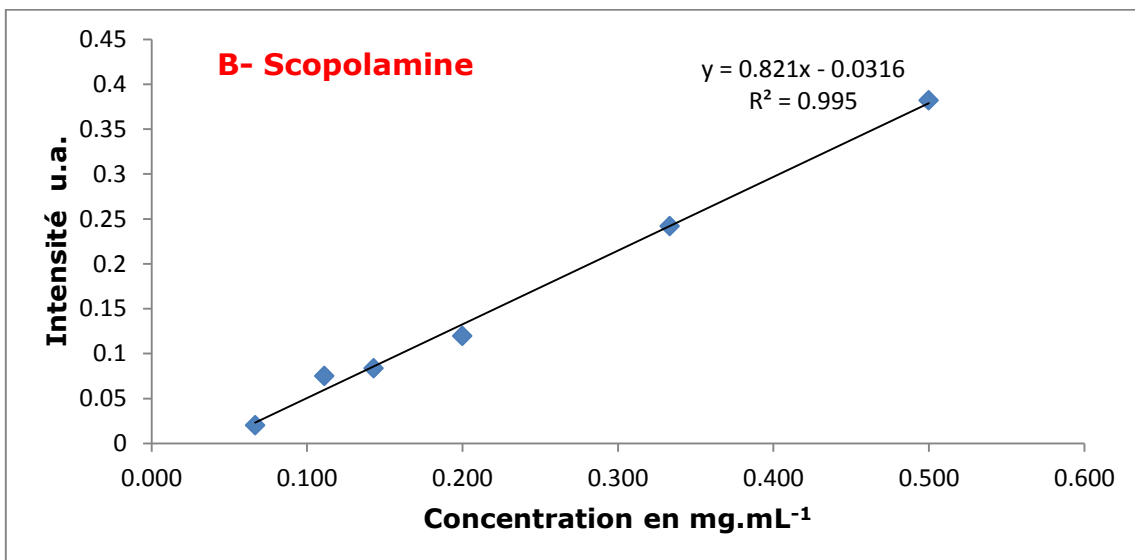
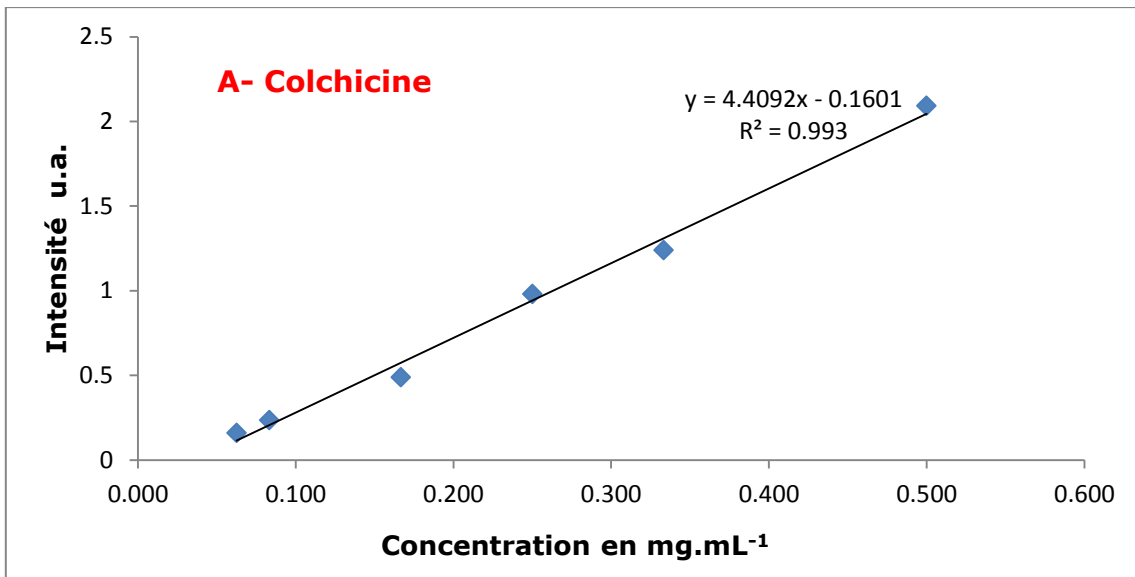
L'intensité correspondante à chaque concentration est la moyenne de quatre spectres issus de quatre spots. Le tracé de la droite d'étalonnage pour le dosage en MALDI de la colchicine avec MT3P comme matrice montre clairement que la linéarité est conservée avec le nouvel instrument SpiralTOF. Bien que cela ne corresponde pas véritablement à un essai d'évaluation de la robustesse de la méthode, la mesure de la déviation relative standard des répétitions des différents points de gamme a également été réalisée sur ces données. Nous n'avons malheureusement pas eu l'opportunité d'évaluer sur une série plus importante des échantillons de validation plus complexes tels que ceux utilisés précédemment pour l'essai de répétabilité intra- et inter- journalière. Les valeurs de RSD intra-jour enregistrées avec ce second équipement sont plus élevées pour cet alcaloïde comparées à celle obtenues pour l'hyoscyamine et la scopolamine (Tableau III-4). La moyenne de RSD obtenue est de 12,8 %, en-dessous du seuil toléré de 15 %. Toutefois, l'écart type est élevé, avec des valeurs qui dépassent 20% (23,7%) et d'autres très faibles, 5% et moins (2,29 %). Ceci peut être expliqué par le fait que l'optimisation de dépôt était réalisée sur une plaque métallique différente que celle utilisée dans cet essai (il est prouvé que le substrat métallique intervient dans l'ionisation²⁰⁹). Ainsi pour être homogène, il fallait faire une optimisation sur la même plaque.

Concentration en colchicine (mg.mL ⁻¹)	RSD (%)
0,25	18,2
0,17	5,2
0,13	23,7
0,10	15,2
0,06	2,3
0,06	12,2
Moyenne RSD	12,8

Tableau III-4 : Concentrations en colchicine et RSD (%) correspondants

v. Linéarité

La linéarité d'une procédure analytique donnée est sa capacité (à l'intérieur d'un intervalle donné) à fournir des résultats directement proportionnels à la concentration (quantité) de substance présente dans l'échantillon²¹⁰. La linéarité de la réponse a été vérifiée pour chacun des alcaloïdes testés dans des domaines de concentrations variables (Tableau III-5). Nous avons préparé une gamme d'étalonnage comprenant 6 concentrations. Les alcaloïdes à chacune de ces concentrations sont mélangés à MT3P selon la méthode décrite (Figure III-8), et 10 dépôts sont réalisés sur le support MALDI (on a recours à l'élimination des extrêmes et des points aberrants). La relation entre les intensités des pics des alcaloïdes et la concentration est décrite par une régression linéaire. L'équation correspondante donne l'intensité en u.a. (Y), en fonction de la concentration en mg.mL⁻¹(X) (On notera que l'expression considérée prenant en compte la concentration est celle de la solution de travail, et non de la concentration réellement déposée). Les coefficients de corrélation des courbes d'étalonnages obtenus sont supérieurs à 0,99, montrant une bonne linéarité pour cette méthode d'analyse des 4 alcaloïdes dans les domaines de concentrations considérés. Les résidus (différence entre la concentration nominale et la concentration calculée par le modèle linéaire) et leurs distributions aléatoires ont été contrôlés sur les domaines de linéarité définis.



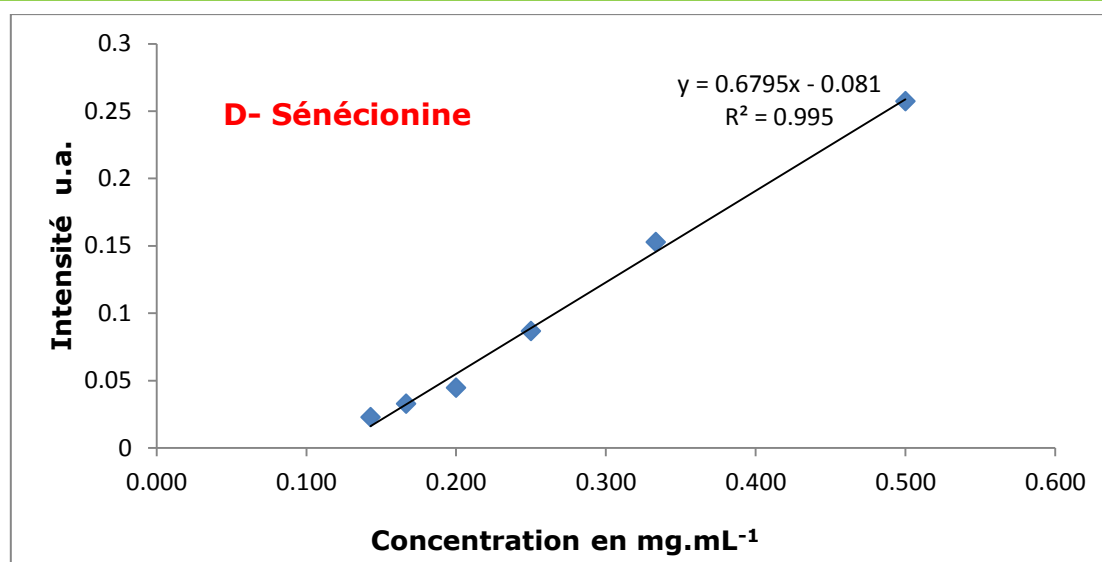


Figure III-17 : Courbes d'étalonnages des ratios des intensités en fonction de la concentration des quatre alcaloïdes en utilisant l'émétine comme étalon interne.

Composés	Equation de la droite de régression ^a	Coefficient de corrélation (R ²)	Gamme de linéarité ^b
Hyoscyamine	Y = 2,446 X - 0,052	0,998	0,062-0,400
Scopolamine	Y = 0,821 X - 0,032	0,995	0,067-0,500
Colchicine	Y = 4,409 X - 0,160	0,993	0,063-0,500
Sénécionine	Y = 0,680 X - 0,081	0,995	0,143-0,500

^a y = Ratio analyte / Std Int; x = concentration de composé (mg .mL⁻¹)
^b mg .mL⁻¹, n = 5 (nombre de spots pour chaque concentration)

Tableau III-5 : Données de linéarité et coefficients de corrélation.

Remarquons que les écart-types de valeurs sont considérés dans l'étude de répétabilité.

vi. Limite de détection et limite de quantification

Par terminologie, la limite de détection d'une méthode d'analyse est la plus petite quantité de l'analyte pouvant être détectée dans un échantillon, mais non quantifiée, tandis que la limite de quantification est la plus petite quantité de l'analyte dans un échantillon pouvant être dosée dans les conditions expérimentales décrites par la méthode élaborée. Les limites de détection (LOD) et les limites de quantification (LOQ) ont été déterminées pour quatre alcaloïdes (Tableau III-6). Avec cette méthode d'analyse instrumentale, elles ont été déterminées par une série de dilution jusqu'à atteindre un rapport signal/bruit (S/N) respectivement égal à 3 et à 10 pour la LOD et la LOQ²¹¹. Les LOD sont calculées à la fois dans l'échantillon avant mélange avec la matrice et dépôt, et également exprimées en tant que quantité déposée sur la plaque. Les limites de

quantification ainsi exprimées atteignent des valeurs situées entre 0,21 et 12 picomoles déposées sur la plaque.

	Colchicine	Hyoscyamine	Scopolamine	Sénécionine
LOD ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	1	0,2	2	12
LOQ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	8	5	4	22
LOD/spot (picomoles)	0,8	0,2	2,2	11,9
LOD (picomoles) dans la littérature	0,06 ²¹²	8,6 ²¹³	125 ²¹⁴	1,8 ²¹⁵
LOQ (picomoles) dans la littérature	0,6 ²¹²	17 ²¹³	422 ²¹⁴	6,6 ²¹⁵

Tableau III-6 : Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) des alcaloïdes analysés.

Remarquons que les valeurs de LOD que nous avons déterminées à l'aide de notre méthode en utilisant MT3P sont parfois plus grandes (colchicine et sénécionine), parfois plus petites (hyoscyamine et scopolamine) que celles décrites pour ces mêmes alcaloïdes dans la littérature, basées sur des méthodes combinant préparation d'échantillons, séparations chromatographiques puis mesure par spectrométrie de masse. Par ailleurs, les LOD et LOQ caractérisent la méthode d'analyse, il n'y a pas de valeur seuil à atteindre. Néanmoins, d'après les données présentées, la méthode de caractérisation des alcaloïdes par la matrice MT3P, ne permet pas d'atteindre les valeurs les plus basses sur ces critères LOD et LOQ. Les points forts de la méthode développée avec MT3P sont bien évidemment la rapidité et la simplicité de la mise en œuvre de la méthode (préparation réduite de l'échantillon et absence de chromatographie), ce qui lui confère, selon le contexte, un avantage indéniable par rapport à d'autres méthodes.

vii. Justesse

C'est l'écart entre valeur trouvée et valeur acceptée comme vraie (valeur de référence). Plus précisément, selon la définition de la norme NF ISO 3534, la justesse est définie comme l'écart entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essais et une valeur de référence acceptée (valeur vraie)²¹⁶. Pour évaluer la justesse, il faut donc disposer de références. Les valeurs de référence acceptées peuvent provenir d'un matériau de référence, d'une valeur fournie par une méthode de référence, d'un essai inter-laboratoire (essai d'aptitude) et éventuellement de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés ou de la méthode de recouvrement²¹⁷.

Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes

Pour les alcaloïdes tropaniques, une évaluation de la justesse de la méthode MALDI utilisant MT3P a été réalisée par la méthode de recouvrement. On ajoute une quantité déterminée d'un composé dans un échantillon précédemment dosé, puis cet échantillon dopé est analysé, pour ensuite comparer l'écart entre les mesures et la quantité réellement ajoutée de l'analyte. Cette étude a été réalisée sur un extrait de datura, et deux niveaux d'ajout de scopolamine ont été effectués (+25 % et +50 %). La scopolamine est quantifiée dans les trois échantillons par MALDI avec MT3P, à la fois dans son état d'origine et après ajout de la masse connue (Tableau III-7). Le taux de recouvrement moyen T de la méthode (en %) est donné par la formule (1) dans laquelle Q_m désigne la quantité calculée dans l'échantillon enrichi (ou fortifié). Le biais relatif (ou erreur de justesse relative) exprimant l'erreur de justesse pour une solution entre sa valeur retrouvée et sa valeur de référence est aussi déterminé par la relation (2) :

$$\text{Taux de recouvrement} = 100 \cdot \frac{(Q_m - Q_i)}{Q_a} \quad (1)$$

$$\text{Biais relatif} = 100 \cdot \frac{((Q_m - Q_i) - Q_a)}{Q_a} \quad (2)$$

En fait, les trois analyses sont réalisées et les résultats sont illustrés dans le tableau suivant :

	0	25%	50%
Concentration Scopolamine moyenne	0,2041	0,2496	0,3071
Écart type	0,0158	0,0452	0,0362
RSD (%)	7,8%	18,0%	11,7%
Qimoy µg dans 10µl	2,041	-	-
Qa µg	-	0,500	1,000
Qmmoy µg dans 10µL	-	2,496	3,071
Taux de recouvrement		90,9%	104,6%
Biais relatif		-9,1	4,6%

Tableau III-7 : Test de recouvrement pour le dosage de la scopolamine dans un extrait de datura.

Les biais étant inférieurs à 10 % et les taux de recouvrement évalués respectivement à 90,9 % et 104,6 % pour les ajouts de 25 % et 50 %, attestent d'une justesse tout à fait acceptable de la méthode.

4. Application de la matrice en chromatographie sur couche mince couplée à la MALDI.

La CCM est une méthode classique de caractérisation par chromatographie, facile à mettre en œuvre et peu onéreuse. Elle est très largement utilisée dans la plupart des laboratoires de chimie organique et de phytochimie. Si elle peut être utilisée comme méthode de dosage semiquantitatif, elle est plus souvent, remplacée par des méthodes chromatographiques liquides (CLHP) ou gazeuses (GC) plus performantes. Toutefois, la CCM conserve son intérêt comme méthode de dépistage rapide nécessitant peu de moyens à la fois humain et technique. Par ailleurs, l'utilisation en CCM de systèmes de dépôts automatiques, de développement chromatographique plus répétables (HPTLC) également associés à un système de détection de spectrométrie de masse (CCM-MS) permet alors une quantification fiable^{132,206}. Des études récentes ont ainsi démontré la possibilité de coupler la technique CCM et l'analyse MALDI-TOF. Ces travaux ont porté sur l'analyse de divers types de molécules et matrices : des lipides dans différents milieux (matrices végétales²¹⁸, cellules souches²¹⁹ et bactéries²²⁰), des oligosaccharides²²¹, des médicaments^{206,222}, ainsi que des matériaux synthétisés²²³. Les alcaloïdes quaternaires dérivés de la berbérine ont déjà été analysés et quantifiés par CCM/LDI-MS par Shariatgorji *et al.*¹³². Santos *et al.*²²⁴ ont étudié les bromocarbolines antiparasitaires d'origine marine (arborescines A-C) en CCM-MALDI-MS (Figure III-18).

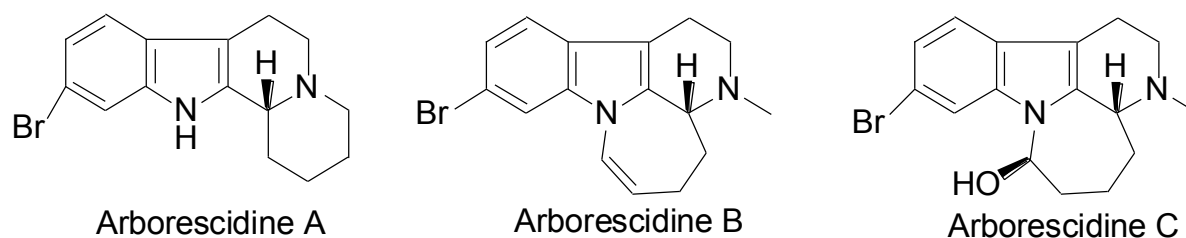


Figure III-18 : Structures chimiques des trois arborescines analysées par CCM-MALDI-MS.

En général, les plantes à alcaloïdes ne renferment que très rarement^{225,226} un seul dérivé de cette famille, le plus souvent elles contiennent un mélange complexe d'alcaloïdes dont un composé est majoritaire. Ce mélange d'alcaloïdes peut être séparé par CCM, et nous envisageons d'utiliser la matrice MT3P spécifique des alcaloïdes pour la procédure de détection. Les études CCM-MALDI n'étant pas nombreuses et en particulier pour les alcaloïdes, nous envisageons en effet de profiter de la spécificité de la matrice MT3P pour ce groupe de produits naturels et d'évaluer la faisabilité de la combinaison de la CCM avec le MALDI pour l'analyse des alcaloïdes dans les extraits bruts de trois plantes. Actuellement, les nouveaux instruments MALDI-TOF, spécialement conçus pour les études d'imagerie et de CCM sont équipés d'une plaque cible adaptée à la taille

des plaque CCM (ou à la lame pour l'imagerie), ainsi que des logiciels dédiés qui permettent le criblage automatisé de l'ensemble de la plaque²¹⁹ selon un plan XY, par balayage bidimensionnel. L'équipement à disposition au laboratoire ne possédant ce dispositif, nous avons eu recours à des méthodes alternatives qui ne nécessitent aucune pièce auxiliaire pour faire de tels essais. Le mode de préparation est indiqué dans la partie expérimentale à la fin de la thèse.

4.1. Résultats

Des essais préliminaires ont été réalisés pour prouver la faisabilité de la méthode avec notre instrument qui n'avait jamais été associé à une analyse par CCM auparavant. Une première expérience a consisté à simplement déposer des échantillons d'extraits de belladone et de quinquina sur une plaque CCM (en aluminium), sans réaliser de développement chromatographique, et d'analyser, ensuite, la plaque avec le spectromètre de masse. Le premier dépôt était uniquement constitué par l'extrait sans matrice, tandis que les dépôts suivants ont été préparés en recouvrant l'extrait par une matrice, (MT3P ou CHCA). La puissance du laser a été modulée en fonction du seuil d'apparition d'ions de chaque tache de la plaque. Dans ces conditions, le laser a réussi à ioniser les analytes de la plaque CCM au niveau des dépôts essentiellement en présence d'une des deux matrices. En effet, les spectres de l'extrait de belladone (Figure III-19, haut et milieu) montrent le pic de l'hyoscyamine $[M+H]^+ = 290,6$ Da, et ceux de l'extrait de quinquina (Figure III-21, milieu et bas) mettent en évidence la quinine $[M+H]^+ = 325,5$ Da, les deux diastéréoisomères, chinconidine et cinchonine, à $[M+H]^+ = 295,4$ Da (Figure III-19). Les pics des alcaloïdes sont aussi accompagnés par quelques pics de matrice. Pour l'analyse des deux spots sans matrice de type LDI, une énergie de laser de 60 % est nécessaire pour détecter les alcaloïdes du quinquina (Figure III-21, haut). Cette puissance n'est pas suffisante pour détecter les alcaloïdes tropaniques de la belladone (Figure III-19, bas).

Notons que si l'on analyse le spectre du spot de l'extrait de belladone (avec CHCA ou MT3P), le pic de l'hyoscyamine $[M+H]^+ = 290,5$ Da est détecté, tandis que le pic de scopolamine n'est pas observé. L'absence de scopolamine peut être expliquée par le fait que cet alcaloïde est minoritaire, avec un ratio 9:1 hyoscyamine : scopolamine dans l'extrait²²⁷, et probablement par la plus faible sensibilité de la détection sur plaque de silice.

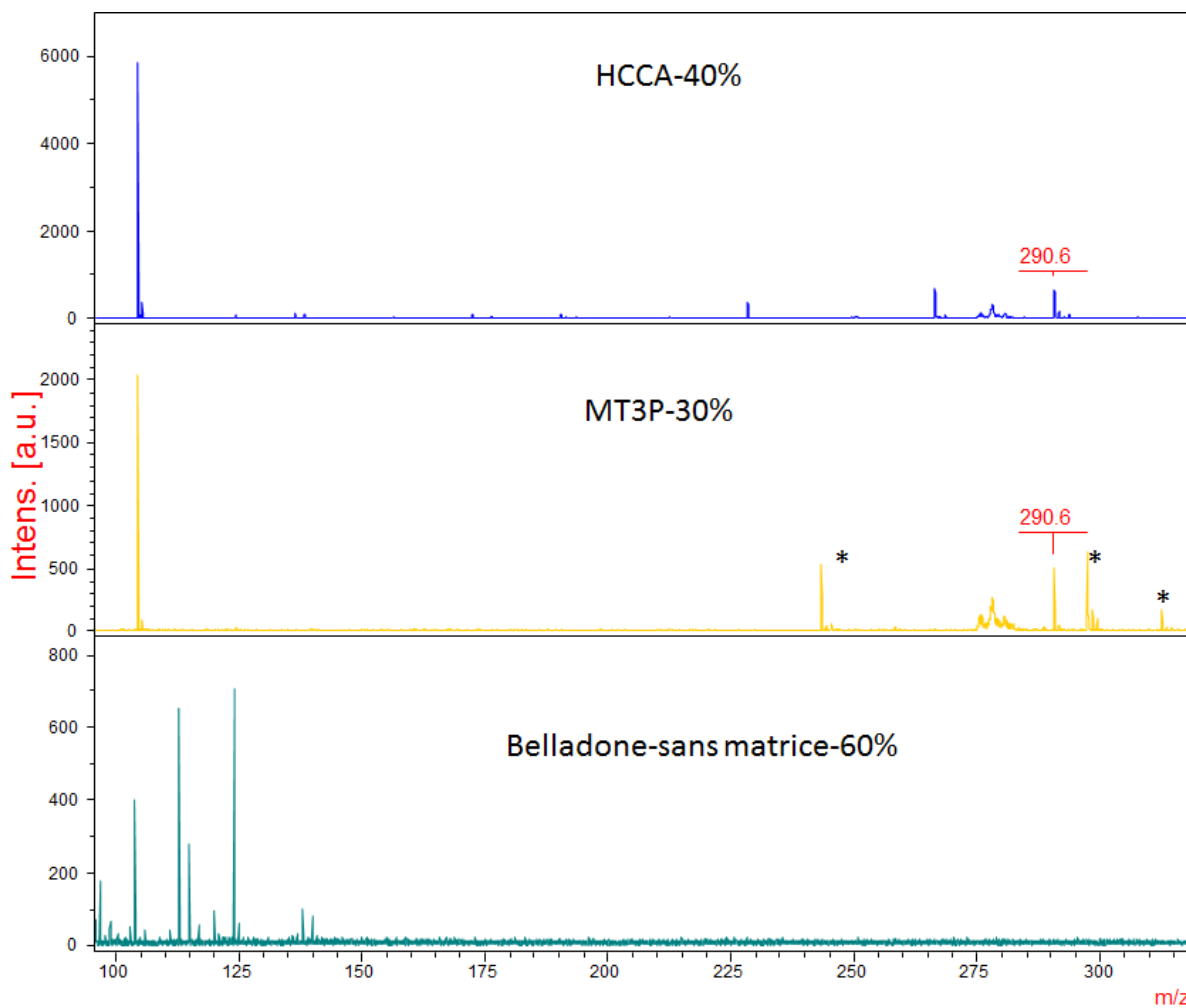


Figure III-19 : Spectres de l'extrait de belladone en CCM-MALDI (somme de 120 tirs) de haut en bas : en utilisant CHCA (laser 60 %), avec MT3P (laser 30 %) et le dernier sans matrice (laser 40 %) ;

*= pics correspondants aux ions de la matrice.

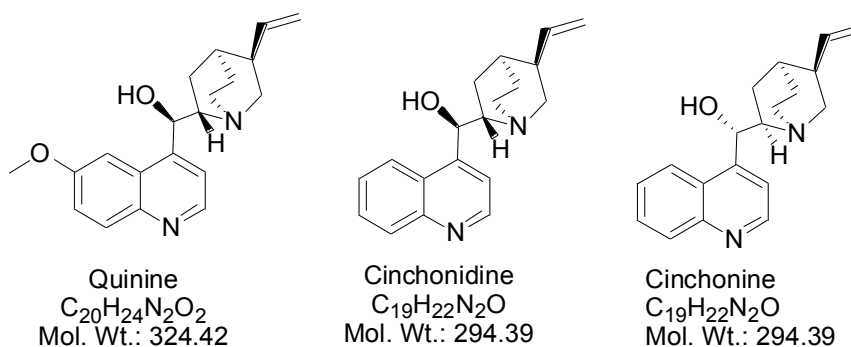


Figure III-20 : Structures chimiques des alcaloïdes détectés dans l'extrait de quinquina.

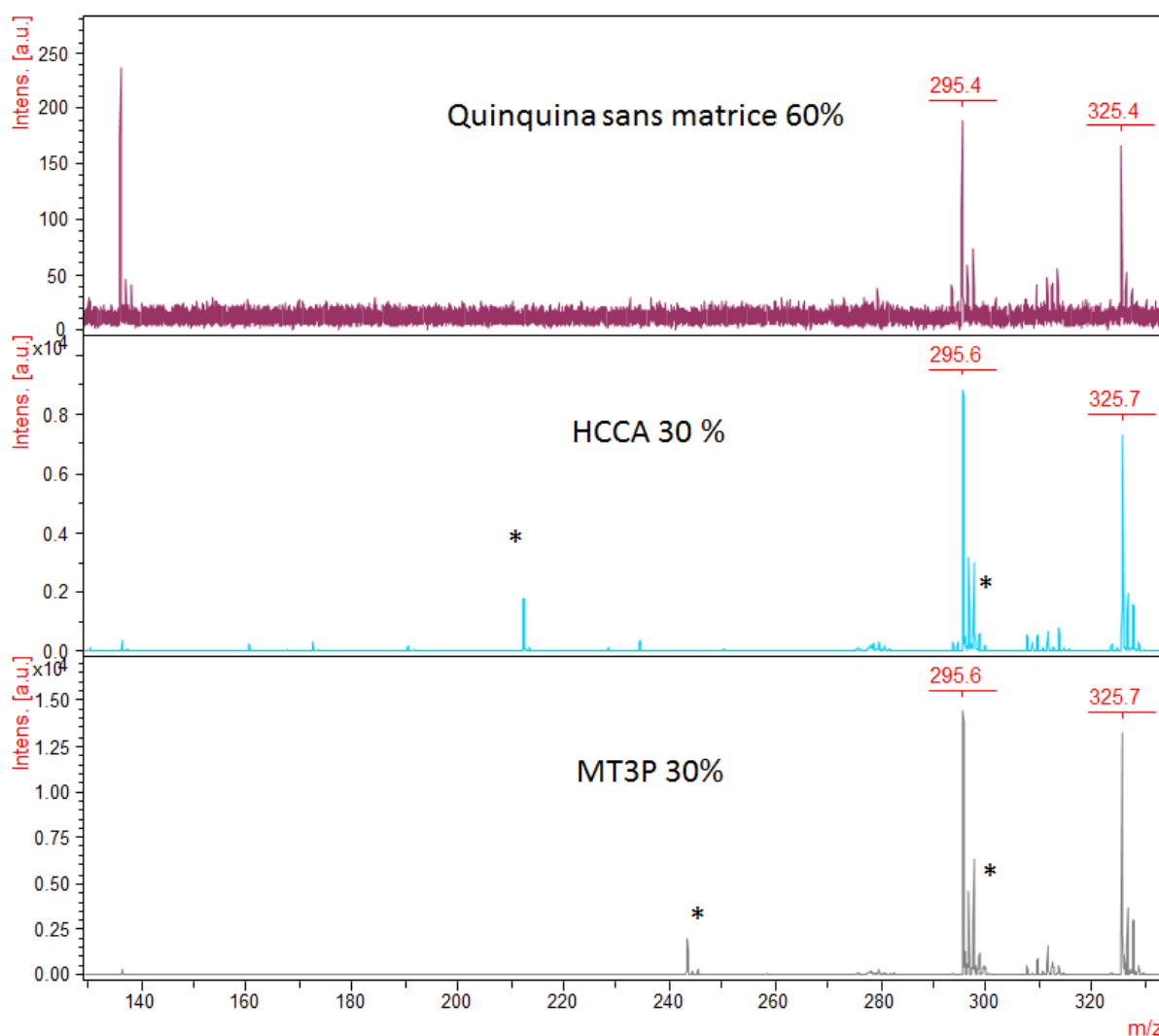


Figure III-21 : Spectres d'extrait de quinquina en CCM-MALDI (somme de 90 tirs) de haut en bas : sans matrice (laser 60 %), avec CHCA (laser 30 %) et MT3P (laser 30 %) comme matrice ;
 *= pics correspondants aux ions de la matrice.

Avec l'utilisation d'une matrice (MT3P ou CHCA), une amélioration bien significative de la détection des alcaloïdes est ainsi mise en évidence. Ces essais initiaux confirment donc l'intérêt d'une matrice comme MT3P pour analyser rapidement les alcaloïdes par CCM-MALDI. Les plaques CCM ont ensuite été analysées après développement, toutefois les résultats actuels sont négatifs. Malgré plusieurs tentatives, l'ionisation des molécules n'a pu être obtenue.

Cependant, il était judicieux d'essayer avec un autre type d'échantillon (extrait brut). À cette fin, un autre essai CCM-MALDI a été réalisé pour le suivi de réaction en synthèse organique. Par exemple, nous avons précédemment détaillé la préparation par hémisynthèse du cocaéthylène à partir de benzoylcgonine, et son utilisation comme étalon interne. Un suivi de la réaction est alors effectué par CCM-MALDI. Après élution du milieu réactionnel sur support de silice, (phase mobile : ammoniacque concentrée, eau, acétone (0,3 :0,7:9 V/V/V)), le spot d'intérêt révélé sous UV à $R_f = 0,6$ est recouvert par une solution de matrice MT3P et analysé en MALDI. Le spectre

obtenu (Figure III-22) montre un seul pic à $m/z = 318,25$ Da (laser 40 %) qui correspond à l'alcaloïde attendu, le cocaéthylène. Cette technique donne des informations sur la nature du nouveau produit formé dans le milieu réactionnel. Cette technique analytique permet donc rapidement de mettre en évidence en cours de réaction les produits formés sans nécessiter de traiter le milieu réactionnel. Cette méthode est dans cet essai appliquée à une réaction maîtrisée, ce qui illustre son intérêt en synthèse pour des réactions conduisant à des composés originaux. Sous réserve d'avoir la possibilité d'enregistrer des spectres de masse à partir d'une CCM, cette méthode semble avantageuse par rapport à une analyse RMN qui nécessitera un traitement du milieu réactionnel.

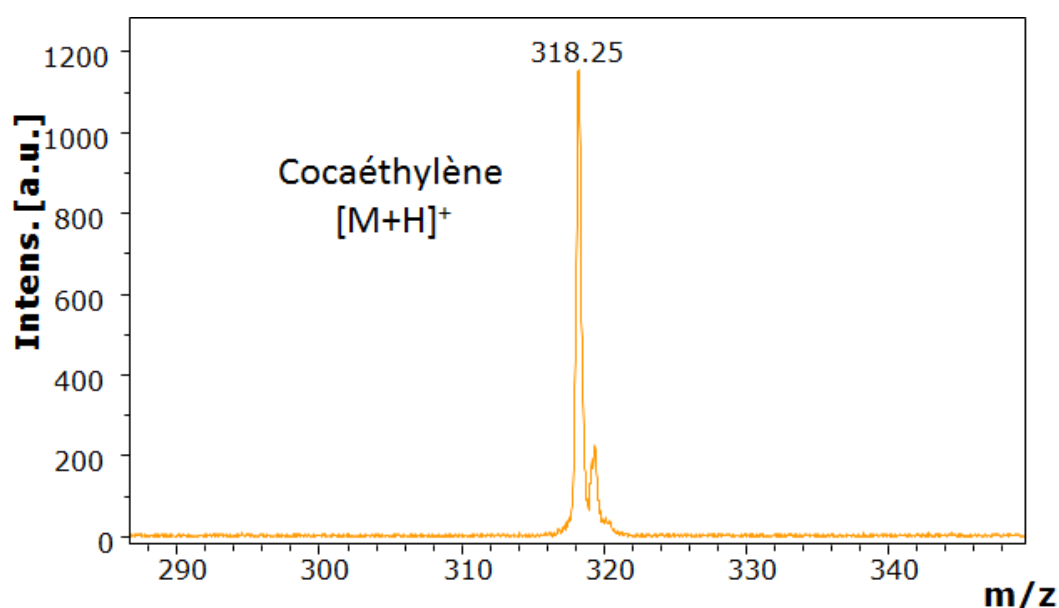


Figure III-22 : Spectre de masse du spot de cocaéthylène obtenue par CCM-MALDI et MT3P comme matrice

4.2. Discussion :

Les résultats en CCM-MALDI semblent contrastés dans la mesure où l'un des deux essais réalisés n'a pas permis la détection des alcaloïdes, même en utilisant MT3P qui dans la technique MALDI usuelle favorise leur détection. Une des explications potentielles peut être la qualité des plaques CCM utilisées. En effet, lors de la migration, les molécules entraînées par l'éluant pénètrent profondément à l'intérieur de la couche de silice. Cette distribution de l'analyte dans toute l'épaisseur de la couche de silice constitue un problème majeur étant donné que les photons du laser UV (337 nm) ne pénètrent pas profondément dans la couche de silice²²⁸. L'épaisseur de la couche d'adsorbant est donc un paramètre important de la qualité spectrale²²⁹, il existe en effet des fabricants de matériel chromatographique proposant des plaques spécifiques CCM-MALDI. Ces plaques CCM « grade SM » (spectrométrie de masse) sont d'une épaisseur de 100 μm ,

tandis qu'elle est de 200 μm pour les plaques usuelles²³⁰. L'utilisation de telles plaques fines favorise la transmission de l'énergie du laser aux molécules de matrice et d'analytes, elles doivent donc être testées pour l'analyse des extraits de plantes (quinquina et belladone) qui restent infructueux.

4.3. Conclusion

Le but de cette étude était d'évaluer la faisabilité de la combinaison de la CCM et du MALDI-TOF MS pour l'analyse des alcaloïdes, directement à partir de leurs empreintes sur la plaque et en utilisant la matrice MT3P. En se basant sur les résultats obtenus, on peut dire que la matrice MT3P présente de grandes potentialités dans la technique CCM-MALDI. Il faut toutefois optimiser les conditions de préparations (concentration des solutions, mode de dépôt de la matrice,...) et la qualité des matériels utilisés (par ex : des plaques HPTLC). Les avantages combinés CCM - MALDI (rapidité, faible volume de solvant, efficacité) rendent cette technique attrayante pour l'analyse des alcaloïdes.

5. Application de MT3P dans l'imagerie MALDI-MS.

Récemment, une nouvelle application du MALDI a été développée pour le profilage direct (localisation et visualisation de la distribution de certains analytes) et l'imagerie (*MALDI imaging mass spectrometry* ; MALDI-IMS) des composants dans les tissus constitutifs des organes et des plantes^{90,137,231}. La technique MALDI est appliquée après le processus de préparation des échantillons qui est généralement complexes, et qui conduit à l'obtention de coupes de tissus congelés. Les sections congelées sont montées sur plaque métallique, enduites de matrice et placées dans le spectromètre de masse. Le balayage de la coupe avec le laser et la mesure de l'intensité des pics pour un rapport masse/charge donné permet alors de reconstituer l'image du spectre de masse obtenu pour chaque composé détecté (Figure III-23)²³¹.

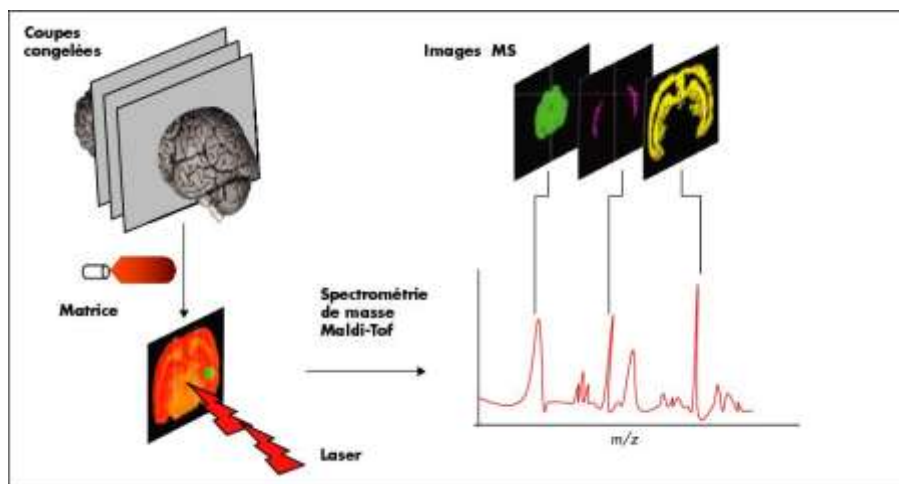


Figure III-23 : Imagerie par spectrométrie de masse²³¹.

Prenant en considération les caractéristiques de la matrice MT3P qui permet de détecter les alcaloïdes dans les mélanges complexes tels que les extraits végétaux et surtout les fluides biologiques (sérum), il semble pertinent d'utiliser cette matrice pour détecter les alcaloïdes dans les tissus végétaux par MALDI-IMS. Ces travaux d'imagerie avec la matrice MT3P ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration avec le groupe du Pr Michael Spiteller (Technical University of Dortmund), avec pour objectif de détecter les alcaloïdes dans les tissus de *Datura stramonium*. Une coupe de la tige de cette plante est aspergée par une solution de matrice, placée sur la plaque cible et soumise à une analyse MALDI-MS. La Figure III-24 présente les images MALDI pour deux coupes de datura utilisant deux matrices distinctes MT3P et CHCA. Pour élaborer ces images colorées, l'intensité du pic de la scopolamine est corrélée à une coloration allant de rouge pour une concentration élevée à bleu pour la plus faible teneur.

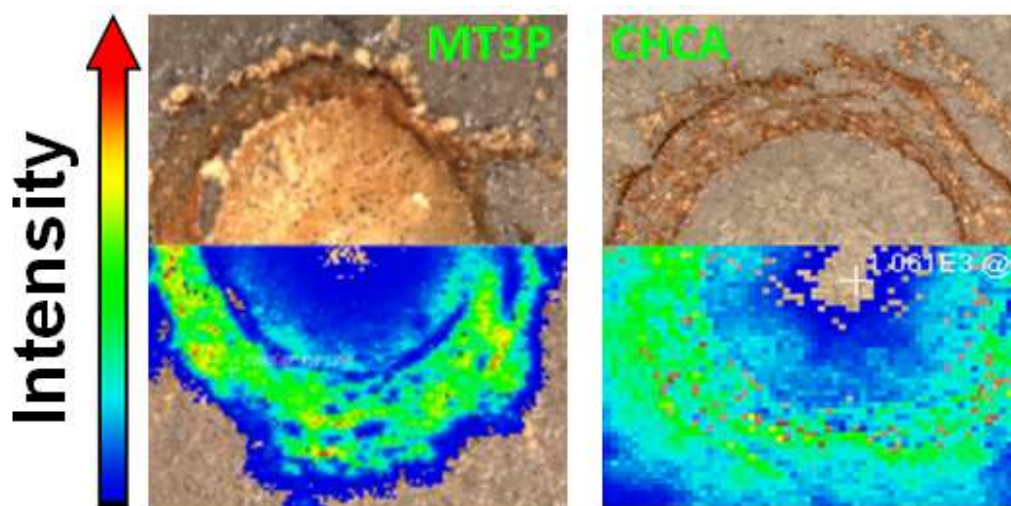


Figure III-24 : Images moléculaires reconstruites de la répartition de scopolamine au sein de la coupe de tige de *Datura stramonium*. À gauche, acquisition avec la matrice MT3P. À droite, acquisition avec CHCA.

Une meilleure résolution est visiblement obtenue avec MT3P, le problème réside dans la faible sensibilité de MT3P par rapport à CHCA en imagerie MALDI-MS. En fait, malgré ces résultats, cette piste d'application des BMs reste encore jeune et de nombreuses améliorations sont attendues. Ainsi, l'élaboration d'une nouvelle matrice bithiophénique de haute sensibilité et son application en imagerie par spectrométrie de masse pourra par sa haute spécificité et sa rapidité être un nouvel outil d'investigation pour la détection, l'analyse et l'imagerie moléculaire sélective des alcaloïdes.

6. Conclusion

Dans ce chapitre, trois méthodes analytiques (quantification par MALDI, CCM-MALDI et MALDI-IMS) ont été présentées et évaluées comme applications potentielles pour la matrice MT3P. Les caractéristiques de la méthode d'analyse par MALDI utilisant MT3P comme matrice ont fait l'objet d'une étude préliminaire de validation de méthode, en utilisant d'abord le cocaéthylène ensuite l'émétine comme étalon interne. La sélectivité, la linéarité, la répétabilité inter et intra jour, les limites de détection et de quantification et la justesse ont été déterminés. Des résultats encourageants ont été obtenus selon les critères acceptés par les organisations internationales. Étant donné que le temps d'analyse, la fiabilité des techniques ou encore le coût d'analyse sont autant de facteurs importants pour le choix d'un processus d'analyse, la méthode proposée de détection et de quantification rapide des alcaloïdes dans des extraits des plantes toxiques présente ici un véritable intérêt. Avec cette méthode réduisant les étapes préliminaires généralement fastidieuses de préparation des échantillons et la combinaison avec un système chromatographique, la durée d'analyse est diminuée drastiquement en comparaison des techniques généralement décrites dans la littérature. Par ailleurs, la méthode développée nous a permis de quantifier différents alcaloïdes dans les matrices complexes tels que les extraits végétaux bruts. Ce travail initial pourrait être étendu à l'analyse des alcaloïdes appartenant à différents groupes chimiques, afin de développer une méthodologie complète de quantification dans différents matrices biologiques (plasma, sérum, extrait végétal, alimentation,...).

Bien que les résultats actuels pour les deux techniques CCM-MALDI et MALDI-IMS mettent en évidence la nécessité de réaliser des optimisations, ces travaux préliminaires démontrent l'intérêt des matrices bithiophéniques pour la détection de ces composés à propriétés biologiques marquées que sont les alcaloïdes.

Chapitre IV :

Synthèse et évaluation de

nouvelles matrices

bithiophéniques

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

1. Introduction

La chimie du thiophène a connu de grands progrès, et ces composés font l'objet de recherches intensives depuis plusieurs décennies. L'importance de ce type de composés est confirmée en 2000, par l'attribution du prix Nobel de chimie à Alan Heeger, Alan MacDiarmid et Hideki Shirakawa²³², pour leurs travaux portant sur « la découverte et le développement de polymères conducteurs ».

En plus de l'énorme potentiel de variations structurales qui permettent le réglage des propriétés électroniques des dérivés thiophéniques, ces matériaux présentent des propriétés chimiques et physiques remarquables expliquant leur succès. Ils sont généralement stables²³³, à la fois lors de leur préparation et à l'état semi-conducteur, et peuvent être facilement caractérisés par de nombreuses méthodes. Leurs propriétés électroniques, optiques, rédox, de transport de charge et les capacités d'auto-assemblage expliquent leur succès²³⁴. De plus, les propriétés d'empilage (*stacking*) et les arrangements qu'ils réalisent sur des surfaces solides en font des candidats utiles pour l'électronique organique. Enfin, la forte polarisabilité de l'atome de soufre du thiophène permet de stabiliser une chaîne latérale insaturée conjuguée, et de tels dérivés présentent d'excellentes propriétés de transport de charges²³⁵. En effet, les composés thiophéniques sont facilement ionisés soit par éjection des électrons des plus hauts niveaux électroniques occupés de la molécule (HOMO ou *Highest Occupied Molecular Orbital*), soit par capture d'électrons dans les plus bas niveaux électroniques inoccupés (LUMO ou *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). La différence d'énergie entre ces deux niveaux peut d'ailleurs être modulée : par une extension de la conjugaison, le niveau énergétique de l'HOMO est abaissé, tandis que celui de la LUMO est augmenté. Ainsi, selon l'importance de la conjugaison, les propriétés de conduction électronique seront plus ou moins marquées et peuvent donc être réglées. Selon la différence d'énergie séparant les deux niveaux (aussi désigné bande interdite), le composé organique sera considéré comme isolant, conducteur ou semi-conducteur (Figure IV-1). Par exemple, certains oligothiophènes comportant un enchaînement d'au moins trois cycles thiophéniques constituent, lorsqu'ils sont correctement fonctionnalisés, des transistors à effet de champ OFET²³⁶ (*Organic Field Effect Transistor*).

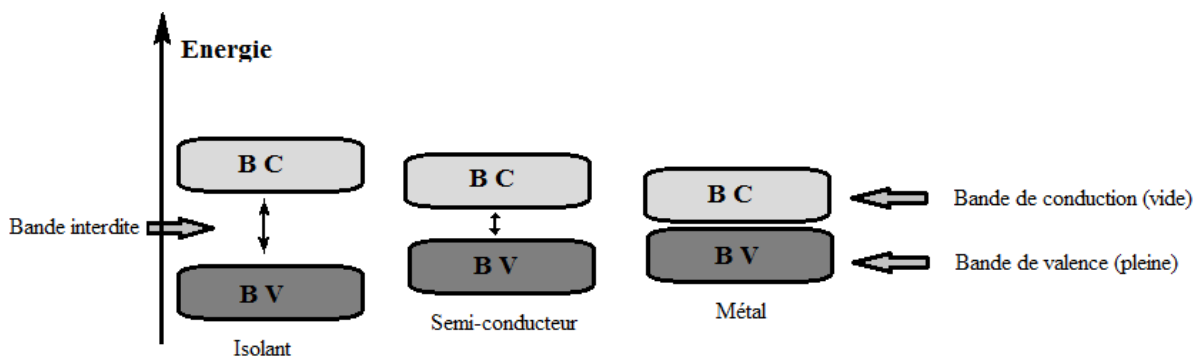


Figure IV-1 : Position des bandes d'énergie pour un isolant, un semi-conducteur et un métal.

De plus, ces propriétés des composés thiophéniques expliquent les applications dans les domaines des diodes électroluminescentes organiques OLED^{237,238} (*Organic Light-Emitting Diode*) et des chimio²³⁹ ou biocapteurs²⁴⁰.

2. Les thiophènes utilisés comme matrices MALDI

En raison de leur stabilité chimique et leur excellente propriété d'absorption aux longueurs d'ondes des lasers courants, les dérivés du thiophène ont attiré l'attention des chercheurs développant des matrices MALDI. Ainsi, plusieurs composés mono ou polythiophéniques ont été synthétisés et testés comme matrices en MALDI (Tableau IV-1). Woldegiorgis *et al.* ont analysé des composés de faibles masses molaires, par la technique PALDI (*polymer-assisted laser desorption/ionization*) qui utilise des petits polymères non polaires comportant des motifs thiophéniques⁸¹. Les propriétés des composés thiophéniques ont aussi permis leur utilisation en spectrométrie de masse dans une méthode alternative au MALDI dénommée DIAMS^{40,126}. En effet, comme exposé dans le premier chapitre (paragraphe 3- les contributions des équipes angevines dans le domaine), cette technique de spectrométrie de masse développée conjointement par les laboratoires angevins SONAS et MOLTECH-Anjou consiste à éviter les ions de matrices qui perturbent l'étude des analytes de bas poids moléculaire en utilisant une monocouche bithiophénique immobilisée sur une surface d'or, le motif bithiophène étant choisi comme chromophore pour capter l'énergie du laser. La poursuite de ces travaux a conduit à développer des matrices MALDI bithiophéniques pour la détection sélective des alcaloïdes.³³

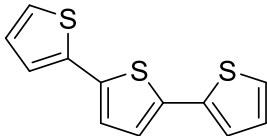
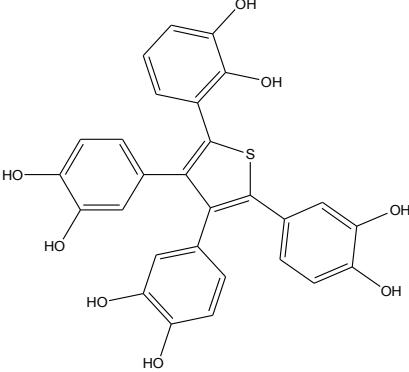
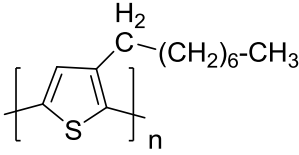
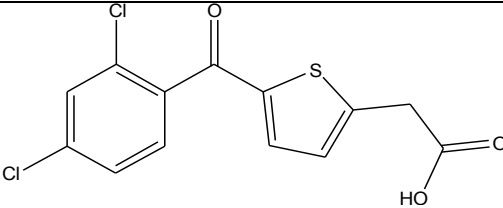
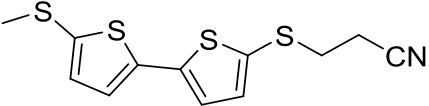
Noms	Structures	Applications MALDI
Terthiophène ²⁴¹		analytes non polaires
2,3,4,5-Tétrakis(3',4'-dihydroxyphényl)thiophène, (DPHT) ²⁸		analyse d'amines
Poly(3-octylthiophène-2,5-diyl) ²⁴²		petites molécules organiques
Acide 2-[5-(2,4-dichlorobenzoyl)-2-thiényl]acétique, (DCBTA) ²⁴		détection de peptides, α-cyclodextrine, testostérone et caféine.
3-(5'-(méthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propanenitrile (MT3P) ¹⁵		détection sélective des alcaloïdes

Tableau IV-1 : Matrices thiophéniques et applications.

3. Synthèse des nouvelles matrices

Si les conditions d'utilisation de la matrice bithiophénique de référence MT3P ont été optimisées (chapitre II), l'amélioration des performances pour la détection d'alcaloïdes passe aussi par la modification structurale de MT3P. Bien que cette voie d'amélioration apparaisse simple, cette méthode représente en fait une étape délicate étant donné que toute modification de la structure doit rester compatible avec les caractéristiques d'une bonne matrice. Cette dernière doit en effet

comporter un chromophore absorbant à la longueur d'onde du laser qui transfère l'énergie des photons du laser à l'analyte. Elle doit aussi comporter des groupes fonctionnels qui permettent d'autres types d'interactions avec l'analyte. Ainsi, elle est souvent substituée par des groupes polaires présentant éventuellement un caractère acido-basique marqué, ce qui facilite le transfert d'un proton à l'analyte^{87,243}. Pour le design des matrices nouvelles à synthétiser, plusieurs points importants seront pris en considération :

1- Les travaux antérieurs du laboratoire ont montré l'importance du groupement bithiophénique, les matrices de ce type détectant sélectivement les alcaloïdes. Tsagué Kenfack a toutefois essentiellement limité ses investigations à des matrices 2,2'-bithiophéniques disubstituées par deux groupements alkylthio en position 5 et 5'. Des variations portant sur la position de substitution du système bithiophénique et sur le nombre de groupements alkylthio seront donc proposées.

2- En ce qui concerne la partie de la matrice qui ne constitue pas son chromophore, nous chercherons à favoriser plus spécifiquement l'interaction avec les alcaloïdes de manière à renforcer la sélectivité de la matrice pour ce groupe de métabolites secondaires. Dans les conditions de l'analyse MALDI, les alcaloïdes sont placés en milieu acide (TFA) et sont donc sous forme de sels d'ammonium. L'interaction de ces composés polaires sera donc favorisée avec une matrice portant des groupements eux aussi polaires. Si les fonctions polaires à caractère acido-basique (hydroxyle, acide carboxylique, nitrile) retrouvées dans les matrices MALDI courantes sont de bons candidats, nous envisageons aussi d'augmenter la polarité de la matrice en la substituant par des atomes de fluor fortement électronégatif.

Les nouvelles matrices synthétisées conserveront donc un noyau 2,2'-bithiophène. Une première série sera constituée de composés qui, comme lors des travaux précédents, comportent des atomes de soufre en positions 5 et/ou 5' du bithiophène (Schéma IV-1 a). Si Tsagué Kenfack a élaboré une série de composés bithiophéniques de ce type, certaines variations restent à explorer. La seconde série sera constituée de dimères du thiophène non substitués en 5 et 5' par des atomes de soufre (Schéma IV-1 b). L'examen de la littérature montre que l'absorption UV à la longueur du laser qui est un paramètre essentiel pour le succès d'une matrice est importante pour ce type de composés. En effet, le maxima d'absorption du 2,2'-bithiophène²⁴⁴ à 304 nm ($\epsilon = 10232 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans CH_2Cl_2) est proche de la longueur d'onde du laser.

Pour ces deux séries, les modifications structurales porteront aussi sur la nature des groupes fonctionnels portés par R_1 et R_2 comme exposé au point 2 précédent.

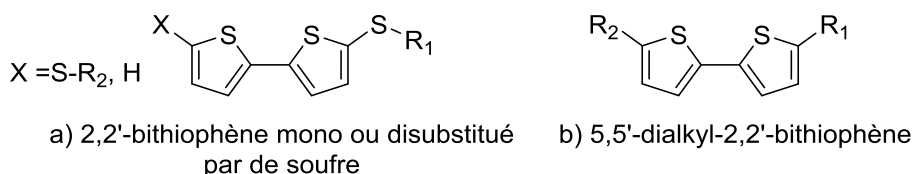


Schéma IV-1: Les deux séries de matrices bithiophéniques synthétisées.

Si le chromophore de la matrice est un point important pour faciliter le transfert de l'énergie des photons à l'analyte, certains groupements fonctionnels de la matrice ont aussi pour rôle de faciliter l'ionisation de l'analyte. Généralement les matrices les plus courantes comportent des fonctions capables de libérer des protons (acides, hydroxyle, ammonium,...).

3.1. Synthèse de matrices bithiophéniques disubstituées par des groupements alkylthio

3.1.1. synthèse de la matrice MT3P.

La matrice MT3P **3** qui sera utilisée comme matrice de comparaison en complément des deux matrices commerciales (CHCA et DHB) et comme intermédiaire pour la synthèse de certaines matrices est synthétisée. Son obtention nécessite de préparer les précurseurs bithiophène **1** et bithiophène disubstitué **2** selon le schéma réactionnel décrit ci-dessous (Schéma IV-2)⁴⁰.

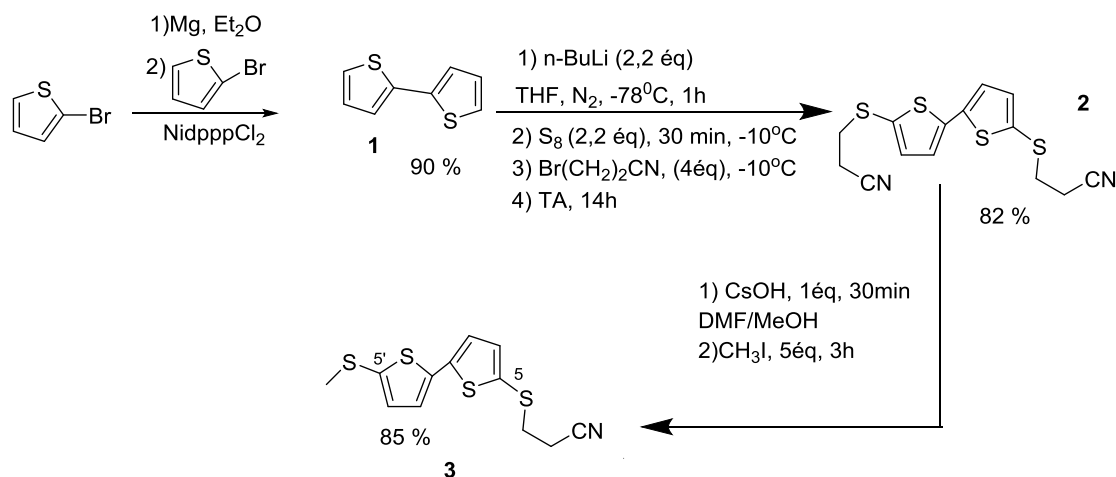


Schéma IV-2 : Synthèse de la matrice MT3P.

La préparation du 2,2'-bithiophène **1** (Schéma IV-2) est basée sur la méthode de Kumada²⁴⁵. Cette réaction fait appel au couplage d'un réactif de Grignard et d'un halogénure d'aryle, le 2-bromothiophène. Elle est catalysée par un complexe de nickel, Ni(dppp)Cl₂ (dppp = 1,3-diphénylphosphinopropane), et se réalise avec un excellent rendement de 90 %. La réaction suivante consiste à substituer les sommets 2 et 2' du bithiophène **1** par un groupement cyanoéthylthio pour former **2**. Cette transformation n'est pas directe, elle est

réalisée en trois étapes consécutives. La première étape est la déprotonation du bithiophène à basse température à l'aide de 2,2 équivalents de *n*-butyllithium. Seuls les protons les plus acides en position α du bithiophène (en 2, 2') sont arrachés par la base forte, et sont substitués par du soufre lors de la deuxième étape. Le dithiolate formé *in situ* réagit avec le 3-bromopropionitrile en excès pour donner le dicyanoéthyle **2**, avec un rendement de 82 %. Cette réaction est basée sur une méthode de synthèse mise en point en 1994 pour accéder aux dérivés TTF (tétrathiafulvalène-2,3,6,7-tétrathiolate) en utilisant le groupement cyanoéthyle comme groupe protecteur des fonctions thiolates²⁴⁶. Cette nouvelle méthodologie a été également adaptée à d'autres composés tels que le motif bithiophène²⁴⁷. Elle permet en effet, par une réaction de rétro-Mickael, la transformation d'un motif cyanoéthylthio en thiolate après l'addition du nombre d'équivalents approprié d'hydroxyde de césium. Ainsi à partir du bithiophène porteur de deux groupements cyanoéthylthio **2**, l'accès sélectif et quantitatif au monothiolate est possible. Le thiolate ainsi généré peut être ensuite alkylé par des composés halogénés, ce qui permet l'accès à des molécules dissymétriques (Schéma IV-3).

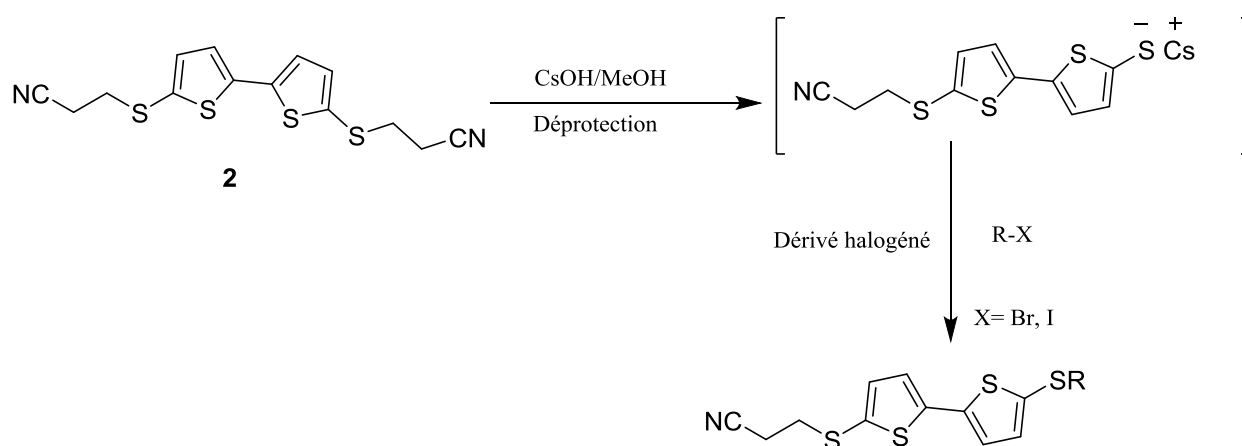


Schéma IV-3 : Protocole général de déprotection et fonctionnalisation d'un groupement thiolate.

Selon la complexité de l'agent alkylant, MT3P **3** ($RX = \text{iodométhane}$, rdt = 85 %) et ses analogues sont synthétisés (*vide infra*).

3.1.2. Synthèse des matrices tétrasoufrées analogues de MT3P

Tsagué Kenfack a synthétisé une série de matrices bithiophéniques analogues de MT3P, et les différences structurales avec MT3P consistaient essentiellement à remplacer le groupement nitrile de cette matrice par d'autres fonctions polaires. Pour comparer ces matrices de Kenfack aux nouvelles qui seront synthétisées, il convient de les tester à une même période en évitant ainsi une dérive importante de puissance par vieillissement du laser. Par exemple, la matrice **4** qui n'était plus disponible est à nouveau synthétisée. Elle est préparée à partir de MT3P, par

substitution du groupe cyanoéthyle par traitement basique, puis alkylation du thiolate intermédiaire par le 2-bromoéthanol (rdt = 71 %) (Schéma IV-4).

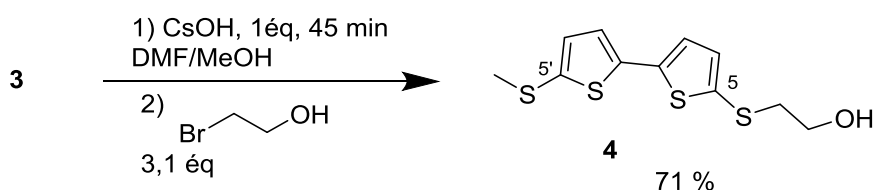


Schéma IV-4 : Synthèse de la matrice **4**.

L'influence de la nature du substituant de l'atome de soufre en C5' n'a pas été explorée précédemment. Une série de matrices différant de MT3P par le remplacement du méthyle porté par le soufre en position C5 est alors préparée. Ayant remarqué que les spectres MALDI réalisés avec MT3P montrent la présence d'un ion de matrice à $m/z = 242,94$ Da qui résulte de la rupture de la liaison entre l'atome de soufre et le bras propionitrile, il est intéressant de préparer des matrices dont le soufre en C5' porte des groupements exerçant un effet inductif donneur d'électron moins intense (**5**, Schéma IV-5, R=H) ou plus intense (**6**, Schéma IV-5, R=éthyle et **7**, R=*iso*-propyle) que le méthyle de MT3P. Ces variations impactent probablement la formation du radical cationique précité par clivage de la liaison C-S, et pourraient en conséquence modifier l'ionisation des alcaloïdes.

Les composé **8** et **9** (Schéma IV-5) comportant respectivement une fonction nitrile et ester dans la chaîne latérale en C5' sont quant à eux synthétisés de manière à évaluer l'effet d'une fonction polaire supplémentaire. Tsagsué Kenfack avait en effet montré que le remplacement du nitrile de MT3P par un groupement carboxyméthyle n'entraînait pas une disparition de la sélectivité de la matrice pour les alcaloïdes.

La synthèse de ces dérivés **5-9** est similaire à celle de MT3P et consiste à désymétriser le précurseur dicyanoéthylthio **2**. Cette transformation débute donc par une réaction de rétro-Michael réalisée en traitant **2** par 1 équivalent de base (CsOH), faisant apparaître un monothiolate intermédiaire. Celui-ci sera alors protoné pour donner le thiol **5** correspondant, ou alkylé par un ester sulfonique (diéthylsulfate) ou des halogénures d'alkyles (2-bromopropane, bromoacétonitrile, bromoacétate d'éthyle), ce qui conduit respectivement aux composés **6-9** avec de bons rendements (Schéma IV-5).

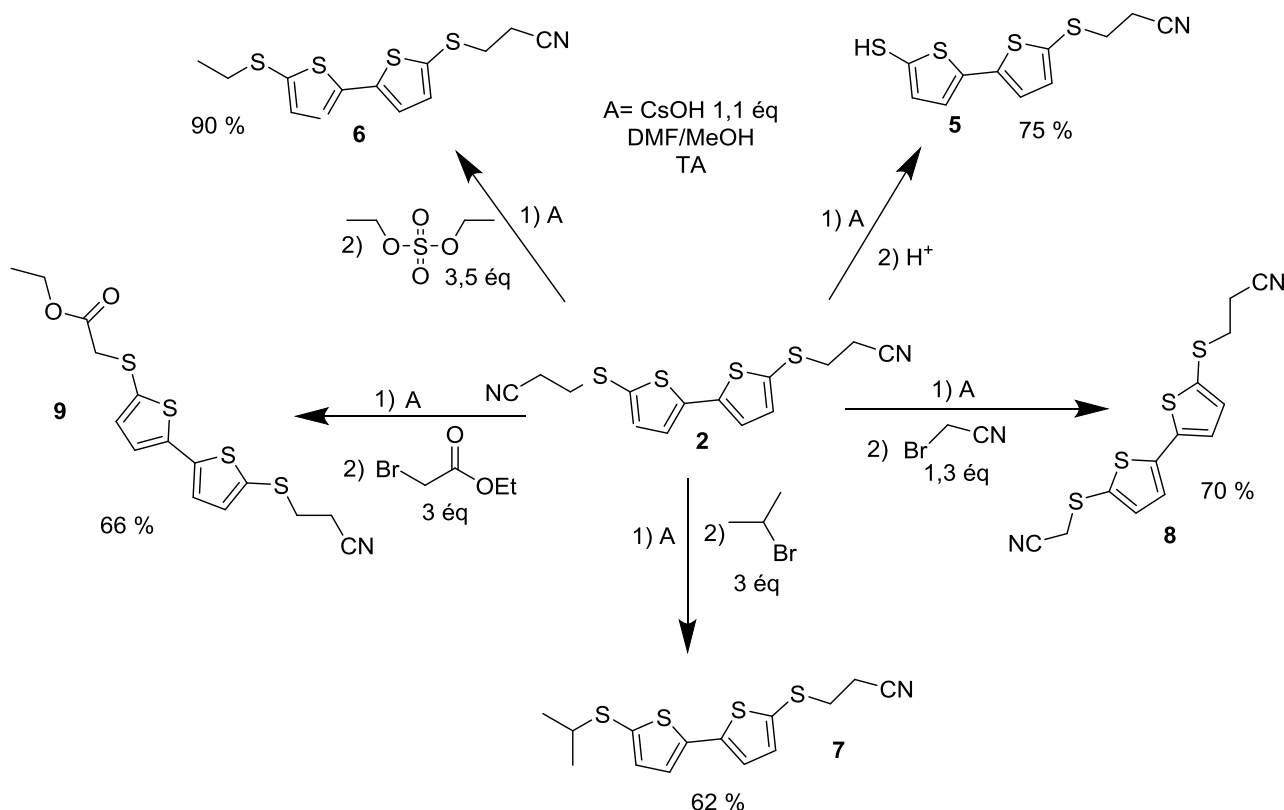


Schéma IV-5 : Synthèse des matrices tétrasoufrées nouvelles **5-9**.

3.1.3. Analogue 2,2'-bithiophénique substitué en 3,3'

Les travaux antérieurs réalisés au SONAS ont permis d'identifier MT3P comme matrice MALDI présentant une spécificité pour la détection des alcaloïdes. Une étude des relations structure/propriétés en tant que matrice a alors été initiée, mais celle-ci portait uniquement sur les dérivés 2,2'-bithiophéniques substitués en positions 5 et 5'. Afin d'étudier l'effet de la position des substituants sur le bithiophène, un dérivé portant comme MT3P deux bras de type alkylthio est préparé. Ces substituants sont toutefois positionnés sur les sommets C-3 et C-3', et non en C-5 et C-5' comme MT3P. De manière à simplifier la préparation de ce type de composés, un dérivé symétrique **10-d** portant deux groupements propionitrilethio est synthétisé. Son homologue **2** de série 5,5' avait été testé par Tsagué Kenfack et permettait la détection des alcaloïdes. La conception de **10-d** est basée sur des anciens travaux au laboratoire Moltech-Anjou²⁴⁸. L'étape clé de cette synthèse (Schéma IV-6) est un couplage de Stille entre le 3,3'-dibromo-2,2'-bithiophène et un réactif stannique substitué par le motif propionitrilethio **10-c**²⁴⁹. Cette réaction permet de fixer sélectivement en position C-3 et C-3' du bithiophène et dans des conditions douces les groupements alkylthio. Catalysée par un complexe de palladium(0) (10 % molaire de palladium tétrakis Pd(PPh₃)₄), cette substitution des atomes de brome se réalise avec un rendement de 54 %.

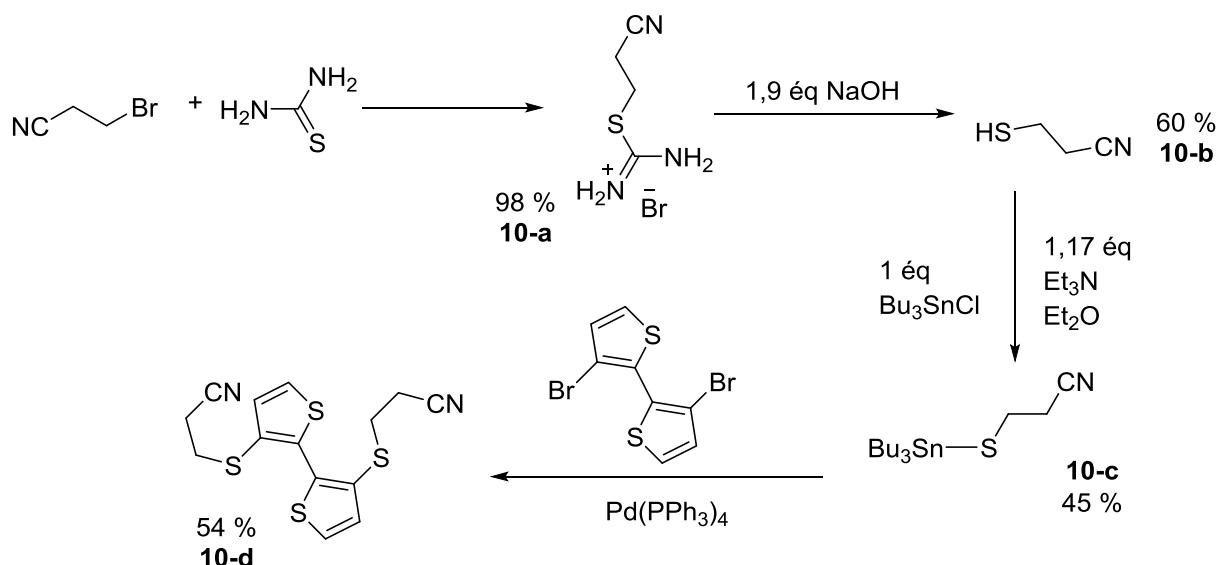


Schéma IV-6 : Synthèse de la matrice **10-d**.

3.2. Synthèse de matrices bithiophéniques monosubstituées par un groupement alkylthio

Les composés **11** et **12**, déjà testés par Tsagué Kenfack¹⁶, ont été préparés à nouveau pour les mêmes raisons que l'alcool **4**. Ces deux composés peuvent être obtenus en modifiant la synthèse du bithiophène disubstitué **2**. En effet, un seul équivalent de *n*-BuLi et de soufre sont nécessaires pour former *in situ* le mono-thiolate intermédiaire. Il est ensuite alkylé par 1 équivalent de 3-bromopropionitrile/iodométhane pour conduire respectivement aux composés trisoufrés **11** et **12** (Schéma IV-7).

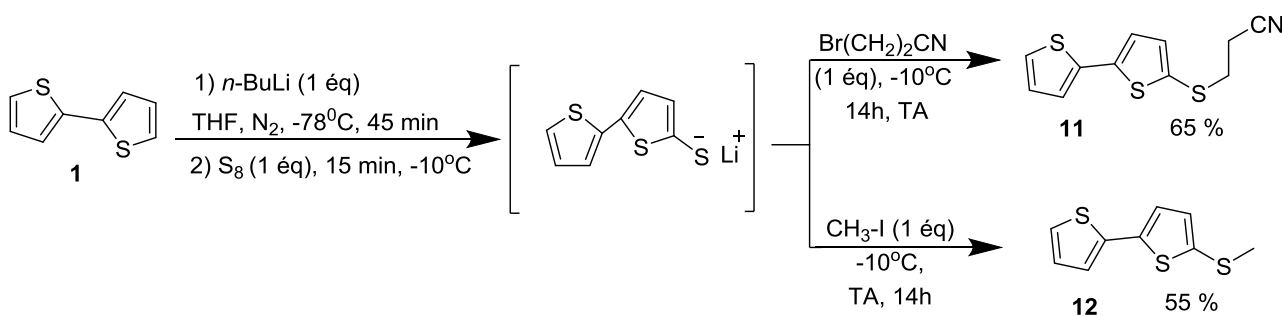


Schéma IV-7 : Synthèse des matrices trisoufrées **11** et **12**.

3.3. Synthèse de matrices bithiophéniques disoufrées

Pour poursuivre l'étude des relations structure-propriétés des matrices bithiophéniques, il apparaît important de tester des dérivés du bithiophène non substitués par des substituants soufrés. En effet, les composés 2,2'-bithiophéniques de ce type absorbent dans l'UV à la longueur d'onde du laser, ce qui permet de les utiliser comme matrice MALDI^{160,250,251}. De plus, l'ionisation

des analytes en MALDI est un phénomène complexe, nécessitant la participation de la matrice. L'ionisation de cette dernière influe sur la formation des ions de l'analyte. Sachant que la nature des substituants du motif bithiophénique permet de moduler le potentiel d'oxydation de ces dérivés, et la formation d'espèces radicalaires correspondantes, il apparaît judicieux de remplacer les groupements alkylthio donateurs d'électrons de MT3P par des groupements attracteurs d'électrons (CN, -COOH, -CHO). Cette modification structurale augmente le potentiel d'oxydation du bithiophène et conduit à des radicaux cations très réactifs capables de réagir avec le solvant et/ou l'analyte²⁴⁸. Ainsi dans ce paragraphe, nous présenterons la synthèse de dérivés bithiophéniques dissymétriques, fonctionnalisés par un substituant comportant une ou deux fonctions électroattractrices (nitrile, acide, ester ou aldéhyde). Les groupements introduits ont été inspiré des travaux concernant l'élaboration des systèmes dits push-pull (donneur- π -accepteur) pour les colorants organiques²⁵² et les cellules photovoltaïques^{250,253}. Nous avons aussi élaboré des composés pour lesquels la fonction électro-attractrice est éloignée du noyau bithiophène par une double liaison carbone-carbone. L'effet bathochrome résultant de cette augmentation de la conjugaison favorise l'absorption de l'énergie du laser à 337 nm. De ce fait, la plupart des composés synthétisés sont de ce type et présentent une liaison double carbone-carbone dans la chaîne latérale.

Leur synthèse est réalisée par une des deux méthodes classiques de formation d'alcènes, la condensation de Knoevenagel ou bien la réaction de Wittig.

3.3.1. Synthèse de matrices bithiophéniques directement substituées par un groupement électroattracteur

Le 5-formyl-2,2'-bithiophène²⁵⁴ **13** qui, dans cette série, est un précurseur de la plupart des molécules synthétisées, est obtenu en traitant le 2,2'-bithiophène dans les conditions de Vilsmeier-Haack employée pour des arènes riches en électrons. Plus précisément, le chloroiminium formé par réaction d'un équivalent d'oxychlorure de phosphore (POCl₃) et de DMF dans le 1,2-dichloroéthane subit une attaque nucléophile du bithiophène pour conduire après hydrolyse à l'aldéhyde **13** avec un rendement de 87 % (Schéma IV-8).

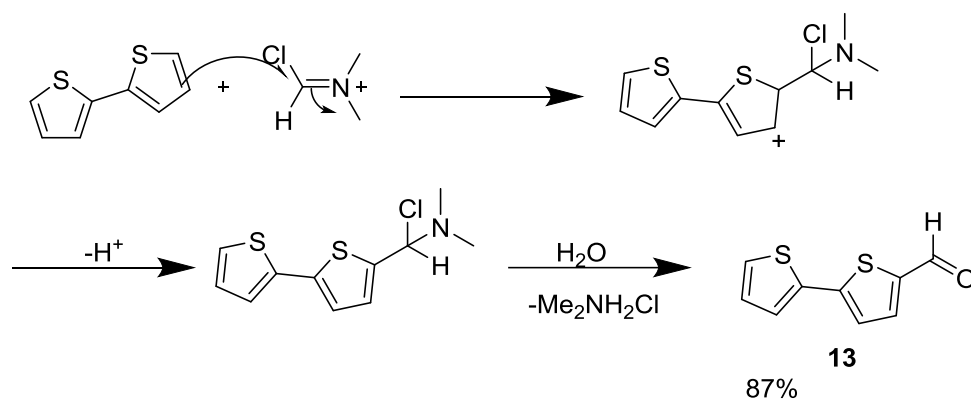


Schéma IV-8 : Formylation du bithiophène selon Vilsmeier-Haack.

En parallèle, il a semblé intéressant de voir l'incidence que pouvait avoir la substitution du composé **13** par un groupement méthyle donneur. Plusieurs tentatives infructueuses pour alkyler l'aldéhyde **13** nous conduisent à inverser les réactions, et à débiter la synthèse par l'alkylation du bithiophène²⁵⁵ conduisant au composé méthylé **14** (70 %). Sa formylation selon les conditions de Vilsmeier-Haack mène ensuite à l'aldéhyde cible **15** avec un rendement de 72 % (Schéma IV-9).

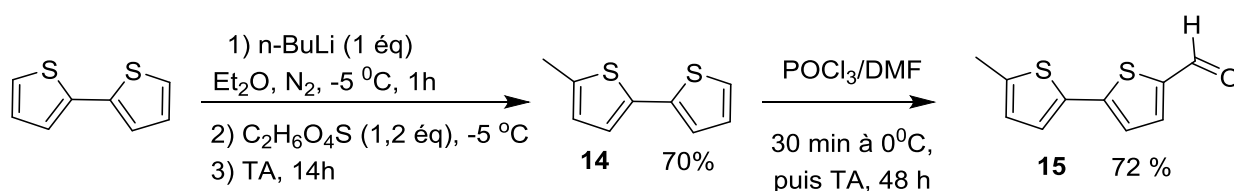


Schéma IV-9 : Méthylation et formylation du bithiophène conduisant aux cibles **14** et **15**.

Pour l'analyse de biomolécules par MALDI, les matrices couramment utilisées sont généralement de petites molécules organiques possédant un noyau aromatique ainsi que des fonctions chimiques susceptibles de pouvoir fournir des protons⁴⁴. Ainsi nous préparerons un dérivé bithiophénique directement substitué par un groupement acide carboxylique tel que **16**. Un oxydant classique (oxyde d'argent)²⁵⁶ permet de transformer le 5-formyl-2,2'-bithiophène en acide carboxylique **16** avec un rendement de 75 % (Schéma IV-10).

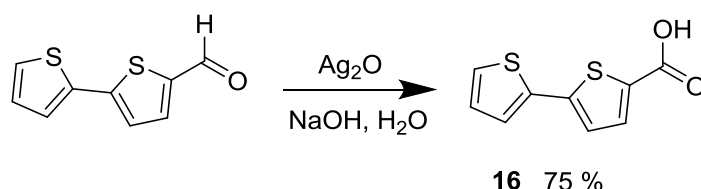


Schéma IV-10 : Oxydation du formylbithiophène **13**.²⁵⁶

Par ailleurs, une étude montre que le remplacement du groupement hydroxyle de CHCA

par un atome de chlore qui présente un fort effet inductif attracteur augmente l'acidité du dérivé cinnamique, affaiblit la stabilisation de la forme protonée $[\text{Cl-CCA+H}]^+$ par rapport à $[\text{CHCA+H}]^+$, abaisse l'affinité protonique, et favorise la protonation de l'analyte²⁵⁷.

D'autre part, Huang et Russell ont montré que la réactivité des matrices peut être influencée par la présence d'atomes lourds tels que Cl, Br et I²⁵⁸. Ces études ont montré que les atomes lourds augmentent la probabilité de conversions intersystèmes à partir de l'état singulet excité vers l'état triplet, ce qui prolonge la durée de vie de l'espèce photoexcitée et la probabilité de transfert de protons à l'analyte²⁵⁹. En conséquence, nous avons préparé différentes matrices bithiophéniques halogénées. La bromation du composé **16** subit est ainsi réalisée en utilisant le *N*-bromosuccinimide (NBS) pour donner la matrice **17** (87 %) (Schéma IV-11).

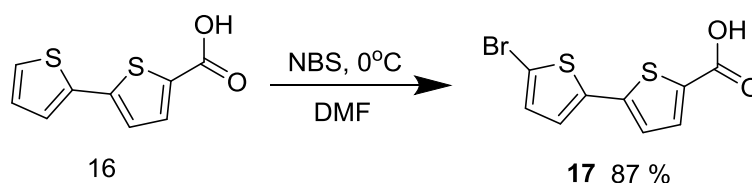


Schéma IV-11 : Synthèse de la matrice bithiophénique halogénée **17**.

Nous avons aussi préparé un autre dérivé bithiophénique substitué par du brome, le bromoformylbithiophène **18**. Il est aussi obtenu en une étape par traitement de l'aldéhyde **13** par le *N*-bromosuccinimide NBS et avec une activation par ultrason²⁶⁰ qui permet de réduire le temps de réaction à quelques minutes seulement, et conduit au dérivé bromé **18** avec un rendement de 75 % (Schéma IV-12).

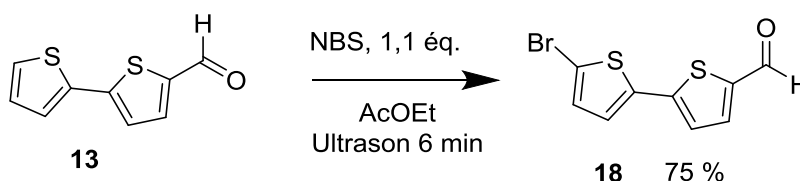


Schéma IV-12 : Obtention du bromoformylbithiophène **18**.

3.3.2. Synthèse de dérivés avec espaceur entre le groupement électroattracteur et le bithiophène

i. Avec conjugaison

Le groupement acide cyanoacétique est un groupement électroattracteur qui est retrouvé dans les constituants de cellules photovoltaïques^{261,262} et de certains colorants²⁵². C'est aussi un motif important en MALDI : une des matrices les plus fréquemment utilisée (CHCA) est un dérivé

cynoacétique. L'analogue bithiophénique **19**²⁶² de CHCA est donc préparé par une réaction de condensation classique de Knoevenagel entre le bithiophène formylé **13** et l'acide cyanoacétique avec un rendement de 68 % (Schéma IV-13).

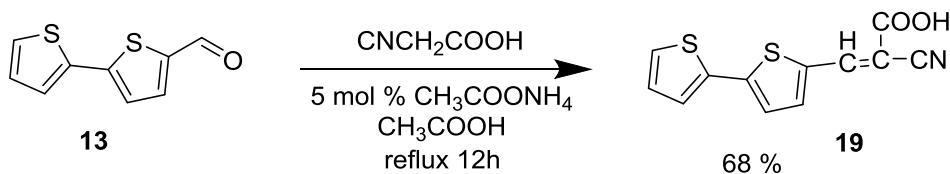


Schéma IV-13 : Synthèse de la matrice cyanoacétique **19**²⁶².

Ensuite, le groupement dicyanovinyle (DCV) a joué un rôle crucial dans l'amélioration significative de la stabilité thermique et la solubilité des oligothiophènes. Les mesures électrochimiques suggèrent aussi que les molécules bithiophéniques présentant ce motif sont à la fois faciles à oxyder et réduire²⁶³. De plus, pour ce qui concerne la détection en MALDI des alcaloïdes avec les matrices bithiophéniques, le groupement fonctionnel de la chaîne latérale le plus efficace est le nitrile, ce qui avait conduit à retenir MT3P comme chef de file. Nous poursuivrons donc la synthèse de nitrile en série du bithiophène, et sans atome de soufre dans la chaîne latérale. Par conséquent, nous avons décidé d'introduire le groupe accepteur DCV et le groupe monocyanovinyle dans la chaîne latérale substituant le bithiophène. De manière à évaluer l'intérêt de la conjugaison entre le noyau aromatique et le nitrile, un dérivé bithiophénique substitué par un propanonitrile est préparé.

Comme précédemment, la synthèse du composé dicyanovinyle est réalisée par condensation de Knoevenagel du formylbithiophène et d'un excès de malonodinitrile et en présence de pyridine dans le dichlorométhane. À température ambiante, le dinitrile²⁵³ attendu **20** est formé avec un rendement de 67 %. (Schéma IV-14)

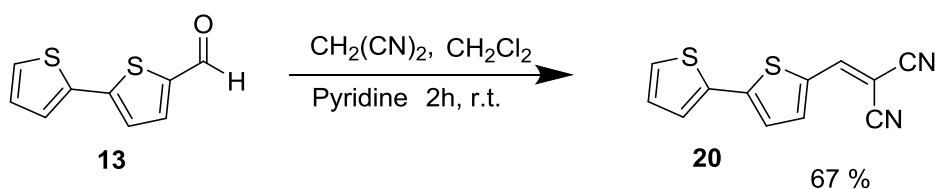


Schéma IV-14 : Synthèse du DCV **20**.²⁵³

L'analogue monocyané de **20** ne pouvant être préparé par réaction de Knoevenagel à partir de l'aldéhyde **13**, le composé carbonylé sera transformé en alcène par une réaction de Wittig avec un ylure de phosphore **21-b** stabilisé par un groupement nitrile. Ce réactif est obtenu par déprotonation (*n*-BuLi à -78°C dans le THF) du sel de phosphonium **21-a** correspondant. Ce

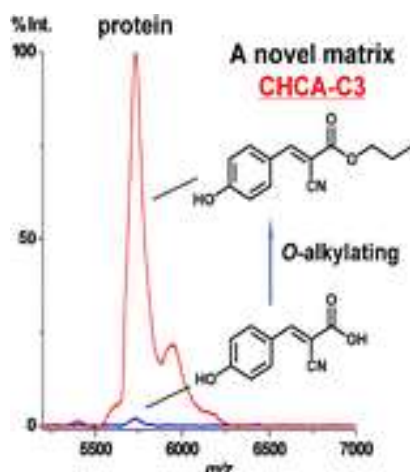


Figure IV-2 : Comparaison des spectres MALDI-MS d'une protéine en utilisant les matrices CHCA (bleu) et son ester propylique (rouge).⁴⁴

Nous avons donc préparé les matrices dérivant du 5-formyl-2,2'-bithiophène et comportant un ou deux groupements ester dans la chaîne latérale conjuguée au bithiophène.

Le monoester **23-c** est préparé par une réaction de Wittig du 5-formylbithiophène avec l'ylure de phosphore **23-b**, classiquement obtenu par déprotonation du sel de phosphonium **23-a** par une base (hydroxyde de sodium) (Schéma IV-18).

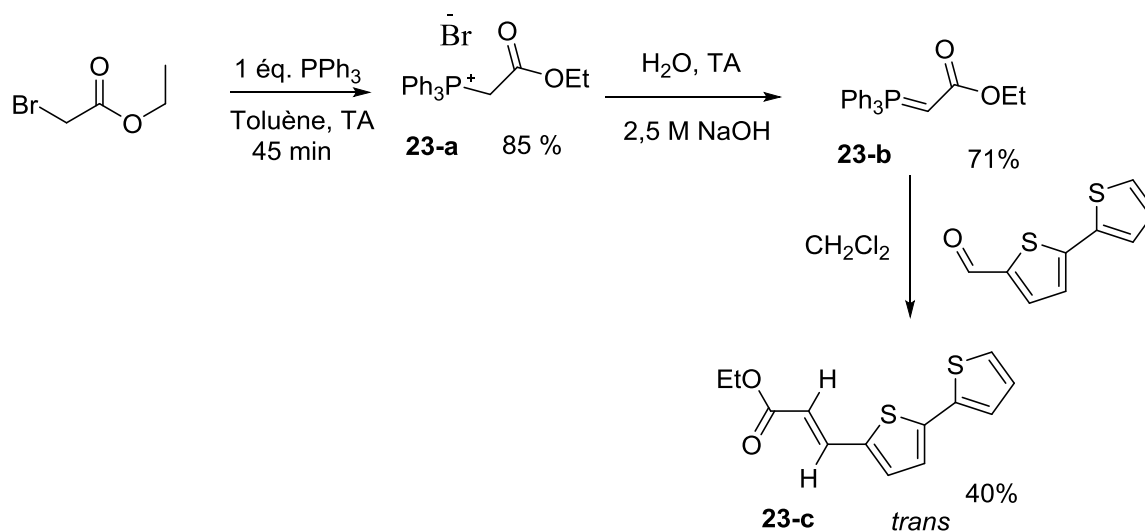


Schéma IV-18 : Synthèse de la matrice **23-c** par une réaction de Wittig.

Par ailleurs, le diester **24** analogue de **23-c** est quant à lui préparé par une condensation de Knoevenagel entre le malonate de diéthyle et le formylbithiophène **13** avec un rendement de 64 % (Schéma IV-19).

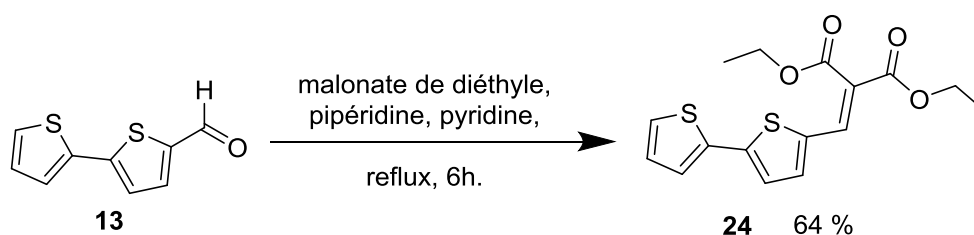


Schéma IV-19 : Obtention du diester **24**.²⁶⁶

ii. Sans conjugaison

Tout en conservant l'idée d'incorporer des groupements électroattracteurs à la structure de la matrice, les deux molécules **21-c** et **24** ont été hydrogénées afin de supprimer la conjugaison entre ces groupements et le noyau bithiophénique. Ainsi, le mononitrile **25** non conjugué au niveau de la chaîne latérale est obtenu par réduction sélective de la double liaison du groupement cyanovinyle du composé **21-c**, par hydrogénation catalytique en présence de palladium sur charbon (Pd/C) à température ambiante²⁶⁵. Dans ces conditions qui permettent une réduction chimiosélective, la cinétique de la réaction est assez lente puisqu'il faut prolonger la réaction 48 h pour consommer la totalité du produit de départ et former **25**²⁶⁵ avec un rendement de 82 %. (Schéma IV-20)

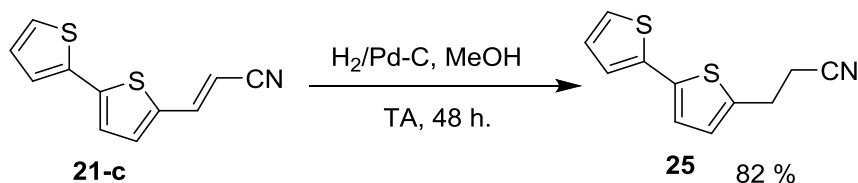


Schéma IV-20 : Hydrogénation de la matrice **21-c**.

La réduction de l'alkylidène malonate **24** plus réactif est quant à elle réalisée avec un donneur d'hydrure, en présence du tétrahydroborate de sodium²⁶⁶ (Schéma IV-19). Le diester **26** est alors obtenu avec un rendement de 61 %.

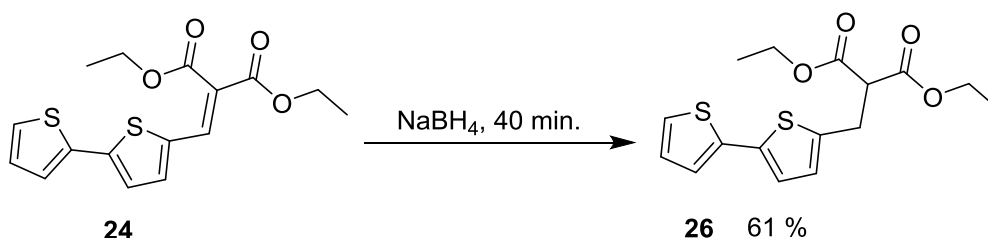


Schéma IV-21 : Synthèse de la matrice **26**.²⁶⁶

3.4. Synthèse de matrices bithiophéniques pentafluorophényle

Une des caractéristiques importantes de la matrice MT3P est son intérêt pour la détection des alcaloïdes dans des mélanges complexes. Si les raisons de l'affinité de MT3P pour ce groupe de métabolites secondaires ne sont pas clairement établies, la structure et donc les groupements fonctionnels de MT3P y contribuent. La molécule de MT3P est de structure assez simple puisqu'elle comporte un bithiophène, des groupements thioéther et une fonction nitrile. Cette fonction nitrile joue un rôle important dans la mesure où les travaux antérieurs de Kenfack¹⁶ ont mis en évidence que la matrice substituée par le groupement propionitrile est la plus efficace parmi celle élaborées pour l'analyse des alcaloïdes. Dans un autre domaine que la spectrométrie de masse, cette affinité des alcaloïdes pour des molécules peu polaires et comportant une fonction nitrile est aussi avancée pour expliquer l'intérêt en chromatographie de phase inverse des phases greffées par des chaînes propionitrile. Ainsi ce type de phases stationnaires permet à Petruczynik²⁶⁷ de séparer d'une manière efficace différents alcaloïdes. Petruczynik²⁶⁸ et d'autres groupes^{269,270} ayant aussi montré l'efficacité de colonnes greffées par des substituants pentafluorophényle (PFP) dans l'analyse d'alcaloïdes, nous avons fait l'hypothèse que des matrices bithiophéniques portant un tel groupement seraient efficaces. Ayorinde *et al.* ont d'ailleurs utilisé aussi des matrices fluorées (Schéma IV-22) pour l'analyse des acides gras d'huiles végétales²⁷¹.

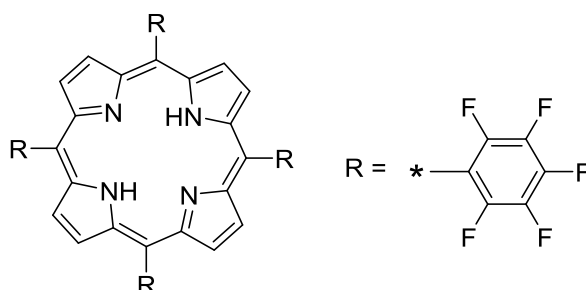


Schéma IV-22 : Méso-tétrakis(pentafluorophényl)porphyrine

Par hypothèse, l'introduction de ce groupe présentant un caractère fortement accepteur du fait de la présence des atomes de fluor très électronégatifs²⁷² peut affecter l'absorption de l'énergie du laser.

Nous avons donc entrepris la synthèse de trois matrices bithiophéniques portant un groupement perfluorobenzène. Ces composés diffèrent par la nature des substituants du bithiophène qui comportent (comme MT3P) ou non des atomes de soufre. En conséquence, deux voies de synthèse se distinguant par le produit de départ qui comporte plus ou moins de soufre sont mises en place.

3.4.1. Synthèse des matrices pentafluorophényle bithiophéniques substituées par du soufre

La synthèse des analogues perfluorobenzène **27** et **28** de MT3P est envisagée. Le premier composé **27** ne comporte qu'un groupement (pentafluorophényle) supposé favoriser une interaction avec les alcaloïdes, tandis que le second **28** lui associe un groupement nitrile réminiscent de MT3P.

Leurs synthèses se déroulent selon la stratégie explicitée précédemment (paragraphe 3.1.1. synthèse de la matrice MT3P.) pour accéder à MT3P. Elle consiste à réaliser la substitution d'un groupement propionitrile par le groupement pentafluorobenzyle. Ceci-ci débute par un traitement basique par l'hydroxyde de césium (1,2 éq) du dinitrile **2** ou de MT3P **3** qui, par une réaction de rétro-Michael, permet de faire apparaître les thiolates correspondants. Ceux-ci sont ensuite engagés dans une réaction d'alkylation par substitution nucléophile avec un excès d' α -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène, pour former les deux composés cibles **27** et **28** avec un rendement de 63 % et 74 % respectivement. (Schéma IV-23)

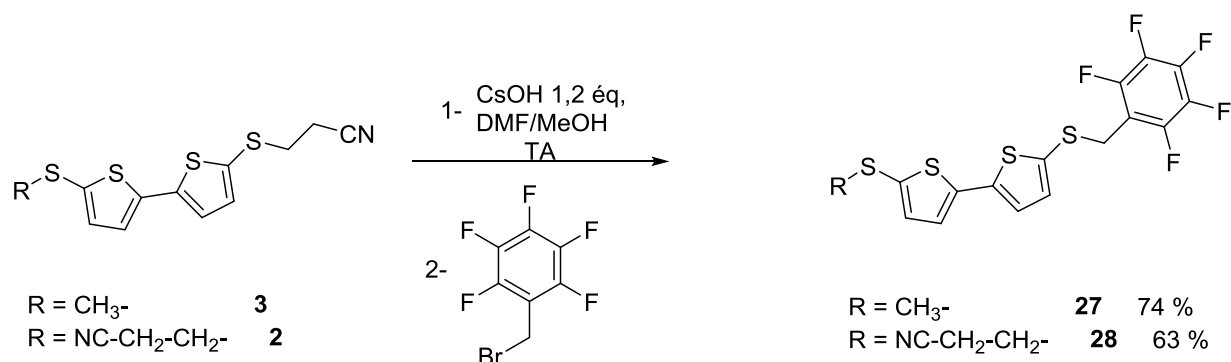


Schéma IV-23 : Synthèse des dérivés pentafluorophényle **27** et **28**.

3.4.2. Synthèse des matrices pentafluorophényle bithiophéniques non substituées par du soufre

Comme les dérivés de cette série précédemment préparés, la matrice pentafluorophényle **29-c** ne comportant que deux atomes de soufre est obtenue par une réaction de Wittig du formylbithiophène avec un phosphorane portant le groupement pentafluorobenzène. Le sel de phosphonium nécessaire pour la préparation du réactif de Wittig n'est pas commercial, il a été synthétisé par alkylation de la triphénylphosphine par l' α -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène. Après 12 heures²⁷³ de réaction à température ambiante dans l'acétone, le phosphonium **29-a** est isolé sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 76 % (Schéma IV-24).

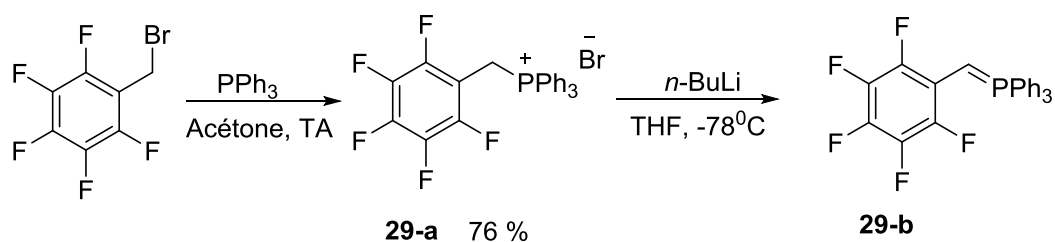


Schéma IV-24 : Synthèse de l'ylure de phosphore pentafluoré **29-b**.

L'ylure **29-b** est généré par traitement basique (*n*-BuLi à -78°C dans le THF)²⁷⁴ du sel de phosphonium **29-a**. Il est ensuite additionné à l'aldéhyde bithiophénique **13** pour former, après expulsion d'oxyde de triphénylphosphine, le composé jaune fluorescent **29-c** avec un rendement de 80 % (Schéma IV-25).

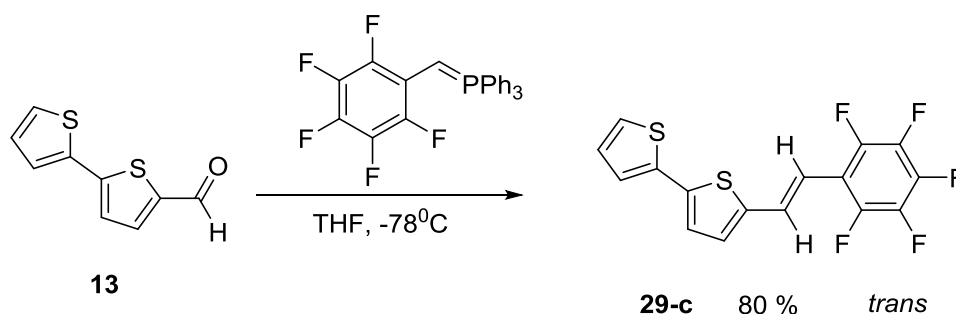


Schéma IV-25 : Réaction de Wittig menant au bithiophène **29-c**.

Nos travaux de synthèse ont permis de préparer 28 matrices bithiophéniques dont 22 seront testées pour la première fois. Ces molécules sont conçues et évaluées dans le but de poursuivre dans la partie suivante l'étude des relations structure-propriétés qui évalue l'efficacité de la matrice et la sélectivité pour les alcaloïdes.

4. Evaluation des matrices synthétisées

Afin de compléter l'étude structure-propriétés initiée au laboratoire, nous avons procédé à l'évaluation des nouvelles molécules synthétisées au cours de cette thèse en deux étapes. Une première phase de sélection permet d'identifier rapidement les meilleures matrices conçues pour ioniser sélectivement les alcaloïdes. Les quelques candidats matrice retenus pour la seconde phase seront testés sur un large panel de composés. Toutes les expériences ont été réalisées avec une acquisition automatique afin de faciliter une comparaison non biaisée des intensités du signal acquis. Nous utilisons notre instrument en mode ions positifs et en mode linéaire. Les

essais dans la phase de screening sont réalisés sans duplication (différents jours), tandis que les analyses sont répétées trois jours successifs dans la seconde phase.

4.1. Les composés analysés

Le Tableau IV-2 (page 151) récapitule toutes les molécules évaluées comme matrice durant ces travaux. Dans la première étape, les BMs (*Bithiophenic matrices*) sont testées uniquement pour l'ionisation d'alcaloïdes. En effet, un des objectifs de ces travaux consiste à élaborer des matrices qui comme MT3P, présentent une efficacité et une sélectivité dans l'analyse des alcaloïdes. Une première évaluation avec des alcaloïdes est donc réalisée, et la sélectivité sera évaluée dans un second temps. Trois à cinq alcaloïdes ont été choisis comme analytes lors de ce screening. Leur choix est basé sur les résultats antérieurs du laboratoire qui montraient que leur niveau d'ionisation par les matrices bithiophéniques n'est pas identique. Nous avons par exemple retenu en screening une molécule qui s'ionise fortement comme la strychnine, moyennement comme la colchicine et faiblement comme la pilocarpine.

Dans la deuxième phase d'évaluation, les performances des matrices retenues seront évaluées avec un plus grand nombre et une plus grande diversité chimique d'alcaloïdes, et aussi avec d'autres familles de produits naturels. Ceci permettra d'évaluer plus précisément la performance dans la détection des alcaloïdes, et aussi la sélectivité des matrices. Ainsi la quercétine (flavonoïde), la coumarine (benzopyrone), la curcumine (curcuminoïde), l'acétate de dexaméthasone (stéroïde), la gramicidine (cyclopeptide antibiotique) et finalement un mélange standard pour CLHP en masse approximativement égale d'angiotensine II (1046,2 Da), de Leu-enképhaline (555,6 Da), de Met-enképhaline (573,7 Da), du tripeptide Val-Tyr-Val (379,5 Da) et du dipeptide Gly-Tyr (238,2 Da) seront utilisés. Les structures de ces analytes sont rassemblées dans une figure (Figure IV-9, Page 157).

4.2. Préparation des solutions

En premier lieu, il faut solubiliser la matrice qui, hormis la molécule **20** qui est huileuse à température ambiante, est toujours sous forme solide. Afin de conserver des conditions semblables, toutes les solutions des BMs ont été préparées à une concentration de 10 mg.mL⁻¹. Du fait de la diversité structurale et donc des propriétés physicochimiques des matrices bithiophéniques testées, il n'est pas possible de conserver un même solvant de dissolution pour tous les composés testés. Par conséquent, le DCM est le premier solvant utilisé pour solubiliser les BMs. En cas d'échec, un mélange DCM/MeOH (1/1) est le second choix (ex : **22** et **25**). Les solutions stocks des alcaloïdes ont été préparées dans le MeOH à 0,86 mmol.L⁻¹, et la solution de

travail est obtenue en mélangeant l'échantillon à analyser avec la solution de matrice dans le rapport 2:1, avant de déposer 1 μL sur la plaque MALDI. La Figure IV-3 résume le protocole de préparation des échantillons jusqu'à leur déposition.

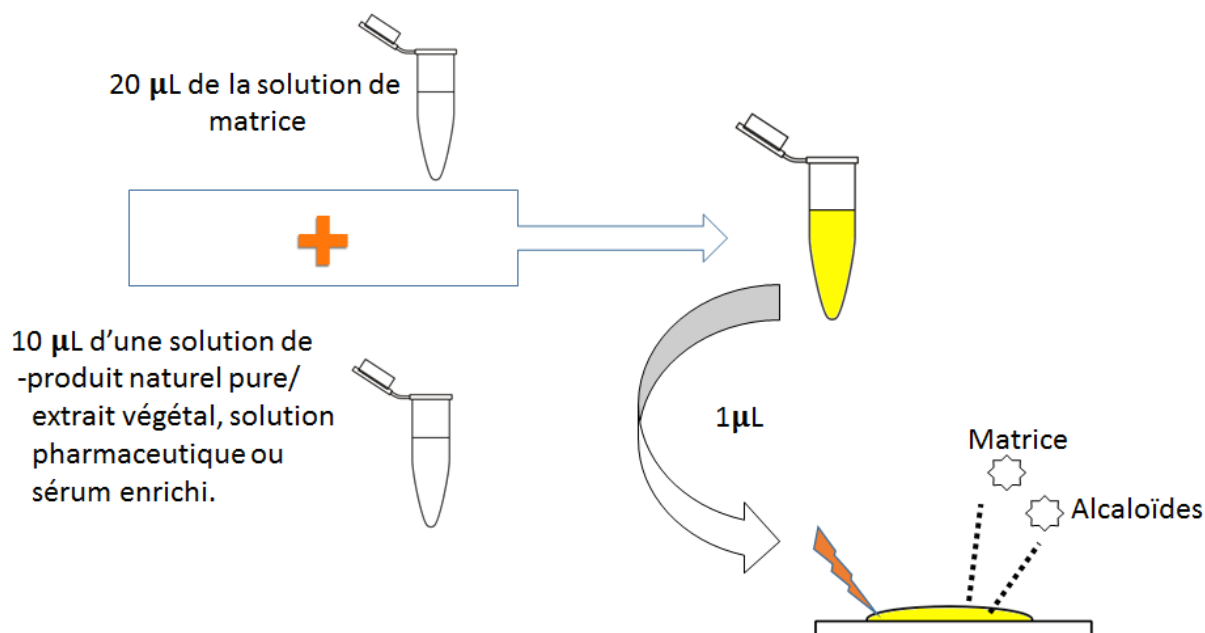


Figure IV-3 : Protocole de préparation et de déposition des échantillons.

4.3. Les paramètres de l'instrument et l'enregistrement des données

Hormis l'énergie du laser, les paramètres de l'instrument (dans la partie expérimentale) sont maintenus constants durant toutes les analyses. Pour l'enregistrement, toutes les expériences sont réalisées en mode automatique afin de faciliter une comparaison des intensités, et les analyses sont réalisées en tétraplicate. Les spectres sont acquis au niveau de 30 sites répartis (déterminés d'une manière aléatoire par le logiciel) dans le spot, chaque position est irradiée par 5 tirs laser. Au total 150 acquisitions sont additionnées pour chacun des quatre exemplaires. L'intensité qui est prise en compte résulte de la moyenne des intensités des pics de masse d'intérêt relevés dans les 4 spectres de masse, c'est à dire la moyenne de 600 valeurs, comme déjà défini dans le chapitre II (7.Méthode et conditions d'acquisition des données, en page 62). Enfin, tous les spectres de masse comparant les performances des matrices synthétisées sont enregistrés en mode linéaire positif.

5. Premier test de quelques alcaloïdes

La première étape d'évaluation consiste à tester les matrices candidats pour évaluer la potentialité de chaque molécule à ioniser les alcaloïdes. Ces résultats de spectrométrie de masse,

seront complétés par l'évaluation de l'absorbance des molécules qui est un paramètre important pour l'efficacité de la matrice.

5.1. Screening des BMs

Dans cette étape initiale de screening, l'évaluation du potentiel des BMs synthétisées est réalisée par l'analyse d'un panel restreint d'alcaloïdes (3 à 5) par MALDI. De manière à limiter les biais lors de cette comparaison et à éviter les variations inter-journalières, les matrices sont testées en plusieurs séries en utilisant chaque fois la matrice CHCA comme matrice de référence. Le traitement des résultats se déroule donc en comparant les rapports des intensités des ions d'analytes obtenues le même jour en utilisant différentes BMs, avec les intensités obtenues avec la matrice CHCA. Le nombre de matrices analysées sur une même plaque est limité par la capacité de la plaque à accueillir seulement 384 dépôts. D'autre part, certains dépôts se caractérisant par un étalement, les puits voisins ont été intentionnellement laissés vides.

La réalisation d'un spectre MALDI nécessite de régler la puissance laser pour chaque échantillon. Le seuil d'ionisation et d'ablation de chaque matrice a donc été déterminé en tant que puissance laser minimale nécessaire pour produire un pic d'ions moléculaires de la matrice avec un rapport signal sur bruit de fond de 3 à 4 après 20 tirs²⁷⁵. Des tests ont été menés afin que nous puissions déterminer la valeur d'ionisation seuil, cette valeur varie en fonction du mode de préparation du dépôt, de la nature de la matrice, de sa cristallisation²⁷⁶ et de l'analyte. Les nombreux tests conduits avec les BMs ont montré que la valeur seuil d'observation des ions de matrice est plus faible que celle nécessaire pour observer les ions de l'analyte. Cela peut être expliqué par le ratio élevé des molécules de matrice par rapport à celle d'analyte. Par conséquent, les analyses ont été réalisées à des puissances 5 % supérieures à la valeur seuil (Tableau IV-3, page 154) de manière à ne pas dégrader la qualité du spectre par l'augmentation du bruit du fond, de la fragmentation des ions et de la formation des adduits.

Pour ce screening visant à sélectionner quelques matrices, nous avons comparé l'intensité des ions d'analytes formés ainsi que la qualité spectrale, c'est-à-dire la présence d'ions fragments de la matrice et des analytes.

Plus précisément en ce qui concerne l'intensité des ions des analytes (Tableau IV-2, page 151), nous avons comparées les BMs sur la base des rapports r des intensités des ions moléculaires des alcaloïdes obtenues le même jour en utilisant une matrice bithiophénique et CHCA ($r = I_{BM}/I_{CHCA}$), et les valeurs moyennes M pour les alcaloïdes testés. On constate que l'ionisation des alcaloïdes est souvent plus faible (86/95), parfois similaire ($0,7 < r < 1,4$ /92), et moins fréquemment (2/92, pilocarpine, matrices **2** et **9**) plus intense en utilisant une BM plutôt que

CHCA. Si l'on considère les valeurs moyennes M des rapports r des intensités des ions des analytes obtenues avec les matrices bithiophéniques sur celle avec CHCA, il apparaît que les matrices que nous avons élaborées présentent au maximum environ 75 % de l'activité de CHCA. Un tel constat n'est toutefois pas surprenant puisque cette caractéristique avait été mise en évidence pour MT3P¹⁶. Les matrices synthétisées ayant une forte absorption à 337 nm permettent dans la plupart des cas d'ioniser aisément les alcaloïdes. Ainsi, les matrices bithiophéniques portant deux substituants soufrés en 5,5' (**2-9**, **27** et **28**), ou 3,3' (**10-d**) présentent les valeurs moyennes des ratios r les plus élevées, comprises entre 0,14 et 0,75. En effet, les valeurs moyennes M du rapport r des matrices ne comportant que deux (**13** et **26**) ou trois (**11-12**) atomes de soufre sont, hormis l'acide **16** ($M = 0,68$), plus faible, comprises entre 0,02 et 0,20.

Dans la plupart des cas, l'ionisation des alcaloïdes est plus de dix fois moins intense avec les BMs non substituées par deux atomes de soufre qu'avec CHCA. L'optimisation des conditions d'enregistrement a conduit à utiliser pour ces matrices une puissance plus élevée que pour les matrices comportant quatre atomes de soufre, c'est à dire une énergie du laser supérieure à 71,85 μJ . Cette augmentation de puissance du laser ne permet pas de classer ces matrices parmi les meilleures, bien au contraire. Quelques matrices de ce groupe font toutefois exception : les composés **16**, **19** ainsi que **29-c**, dont les valeurs moyennes M du rapport r sont respectivement de 0,68, 0,20 et 0,28, ce qui met en évidence l'intérêt d'une fonction acide carboxylique et du groupement pentafluorophényle. Toutefois la substitution du groupement nitrile de la matrice **19** par un carboxyle pour donner le diacide **22**, s'avère défavorable ($r = 0,06$).

De plus, en ce qui concerne la qualité des spectres, on constate que lorsque le laser est réglé à la puissance la plus élevée utilisée (limitée de 45 à 55 % pour **13**, **15** et **22**), de nombreux pics de fragments (de l'analyte et de la matrice) apparaissent sur le spectre (Figure IV-4). Par exemple le spectre de la pilocarpine réalisé avec la matrice **15** montrent de nombreux pics, et même à ce niveau d'énergie élevé, le rendement d'ionisation reste faible ($r = 0,05$) (Figure IV-4). À des niveaux d'énergie élevés, l'ionisation directe des analytes (LDI) devient probable²⁷⁷. Remarquons que la puissance élevée du laser n'est pas la seule explication à la mauvaise qualité d'un spectre : même avec une faible puissance de 30 %, un nombre élevé des pics est détecté sur le spectre de la strychnine réalisé avec la matrice **17** (Figure IV-5).

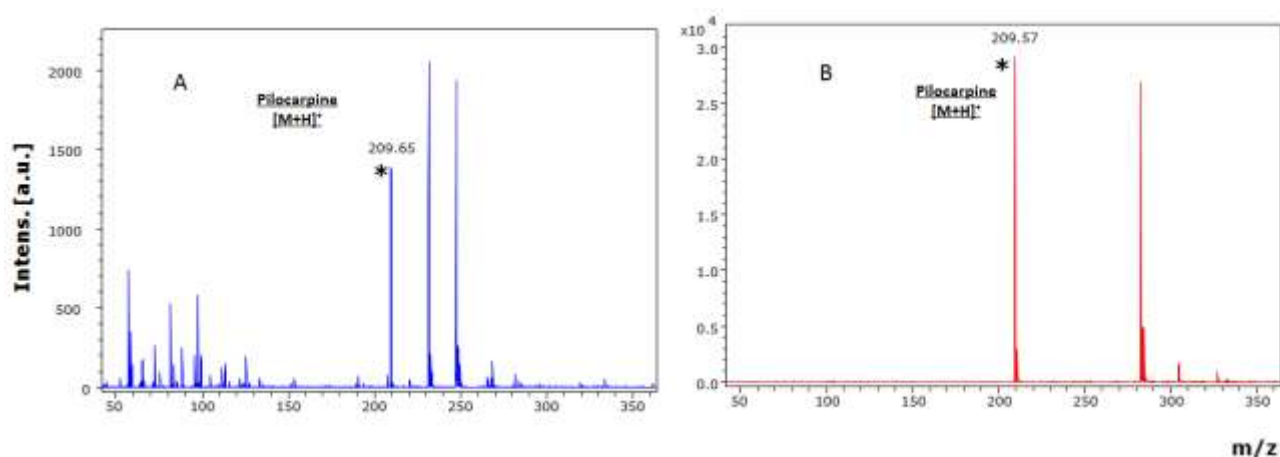


Figure IV-4 : Spectre de masse de la pilocarpine analysée par MALDI avec la matrice **15** (spectre A) et la matrice **28** (spectre B); puissance laser 50 % (78,0 μ J) et 35% (58,8 μ J) respectivement ; hormis les pics d'analyte (avec astérisque), tous les autres sont des pics des matrices.

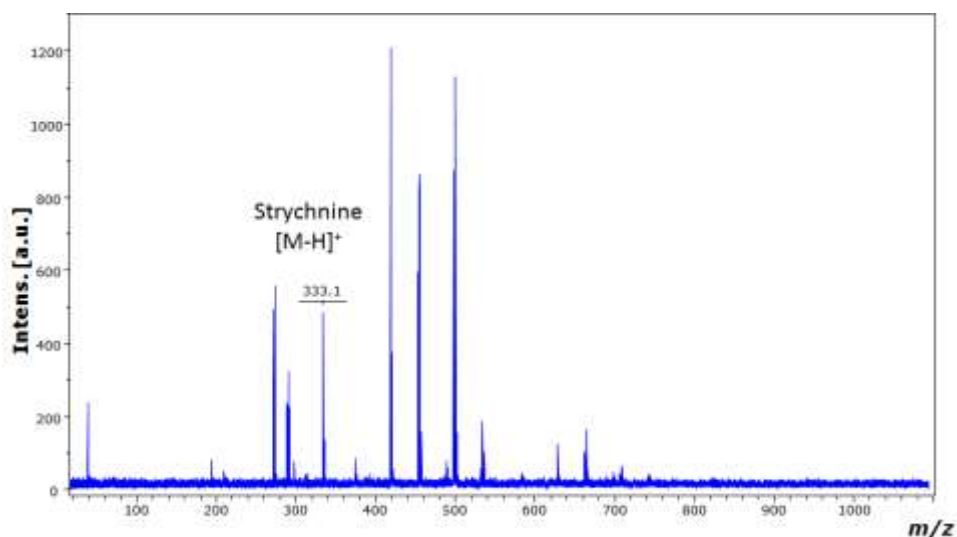


Figure IV-5 : Spectre MALDI de la strychnine obtenu avec la matrice **17** ; puissance laser 30 % (52,4 μ J).

Parmi les matrices sans atome de soufre comme substituant du bithiophène, seul l'acide **16** ionise facilement les alcaloïdes ($M = 0,68$), et sans nécessiter plus d'énergie du laser que MT3P.

Parmi l'ensemble des matrices testées, les dérivés **9**, **16** et **28** donnent les rendements en ions des alcaloïdes les plus élevés, avec des valeurs approximativement un quart inférieures (M compris en 0,68 et 0,75) aux résultats avec CHCA. La bonne performance de la matrice **9** n'est pas surprenante, cette matrice rassemble structurellement la chaîne propionitrile d'une part et d'autre part un bras qui se termine par un ester, et Tsagué¹⁶ avait montré que le remplacement du nitrile de MT3P par un ester (Schéma IV-26) fournit de bons résultats (Figure IV-6).

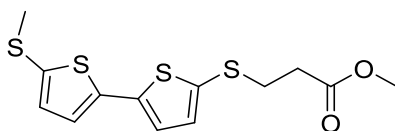


Schéma IV-26 : Matrice bithiophénique comportant une fonction ester testée par Tsagué Kenfack¹⁶.

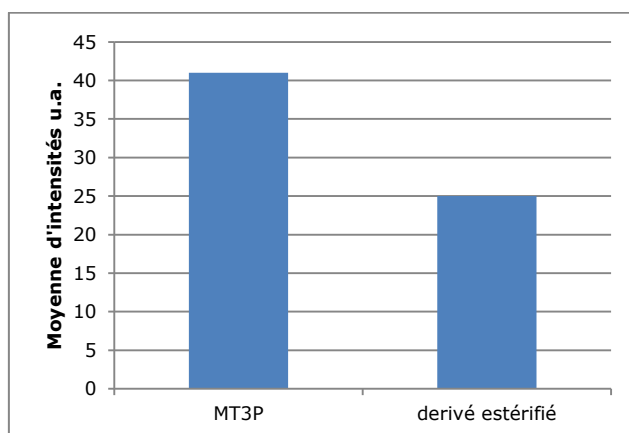


Figure IV-6 : Diagramme des moyennes pour les sommes des intensités des ions moléculaires de 32 alcaloïdes analysés par MALDI, avec les matrices MT3P et son dérivé estérifié; valeurs des moyennes / 1000, en unité arbitraire (u.a.)¹⁶.

La suite de l'évaluation des performances des matrices qui permettra d'apprécier la sélectivité pour la détection des alcaloïdes sera menée en retenant aussi en complément de ces matrices **16** et **28** les plus efficaces, d'autres matrices nouvelles (**6**, **7** et **8**) qui ont donné de bons résultats à la même énergie de laser et des spectres peu chargés en ions de matrice. Elles seront évaluées en comparaison à MT3P et à deux matrices commerciales, CHCA et DHB comme références. Remarquons toutefois que la synthèse tardive d'un composé comme la molécule **9** ne nous a pas permis de l'inclure dans le protocole d'évaluation plus étendu.

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

N ^o	Structure	Brassinine (r)	Brucine (r)	Colchicine (r)	Pilocarpine (r)	Strychnine (r)	Moyenne M des rapports r des alcaloïdes testés
2		-	-	0,14	1,2	0,15	0,5
MT3P		0,06	0,66	0,32	0,20	0,74	0,45
4		-	-	0,07	0,15	0,2	0,14
5		-	-	0,17	0,22	0,23	0,20
6		0,001	0,38	0,26	0,20	0,32	0,29
7		0,01	0,38	0,26	0,47	0,45	0,31
8		0,09	0,30	0,58	0,68	0,37	0,41
9		0,07	0,57	0,9	1,16	0,79	0,70
10-d		-	-	0,14	0,39	0,67	0,40
11		-	-	0,12	0,09	0,2	0,14
12		-	-	0,03	0,03	0,04	0,03
13		-	-	0,004	0,03	0,08	0,04
15		-	-	0,09	0,05	0,10	0,08
16		-	-	0,80	0,68	0,57	0,68

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

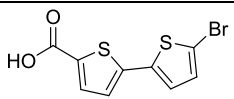
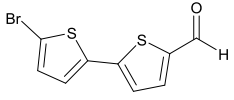
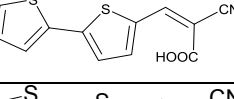
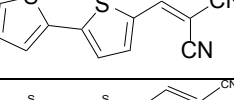
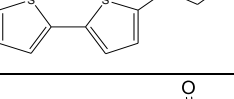
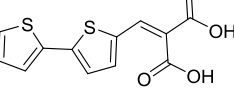
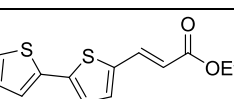
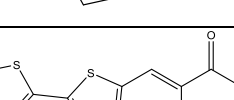
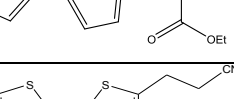
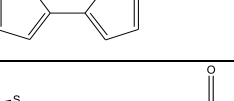
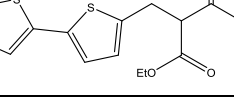
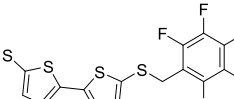

17		-	-	0,10	0,05	0,09	0,08
18		-	-	0,03	0,05	0,07	0,05
19		-	-	0,05	0,06	0,50	0,20
20		-	-	0,07	0,03	0,02	0,04
21-c		-	-	0,001	0,02	0,04	0,02
22		-	-	0,02	0,07	0,1	0,06
23-c		-	-	0,004	0,03	0,06	0,03
24		-	-	0,04	0,01	0,10	0,05
25		-	-	0,03	0,01	0,05	0,03
26		-	-	0,03	0,02	0,12	0,06
27		-	0,50	0,37	0,35	0,18	0,35
28		-	0,87	0,50	0,73	0,91	0,75
29-c		0,02	0,40	0,20	0,18	0,6	0,28

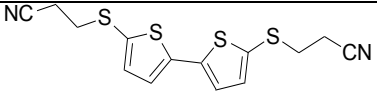
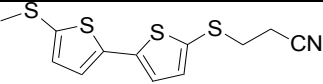
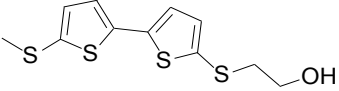
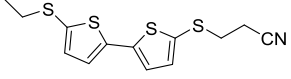
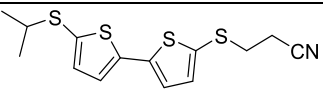
Tableau IV-2 : Rapports r des intensités des ions moléculaires ou pseudomoléculaires des alcaloïdes obtenues le même jour en utilisant une matrice bithiophénique et CHCA ($r = I_{BM}/I_{CHCA}$), et valeur moyenne.

5.2. Absorbance UV

L'une des exigences fondamentales d'une bonne matrice est son absorption à la longueur d'onde d'émission du laser MALDI. En effet, l'absorption de l'énergie apportée par les photons du laser est un prérequis pour la matrice, avant qu'elle ne transmette cette énergie à l'analyte. L'absorption de la matrice est donc un paramètre crucial : la qualité d'un spectre augmente généralement avec l'absorption de la matrice²⁷⁸. Dès lors, les résultats du test de screening des matrices vis à vis des cinq alcaloïdes testés sont influencés par l'absorptivité molaire des matrices synthétisées. Nous avons donc déterminé les coefficients d'extinction molaire ϵ ($L.cm^{-1}.mol^{-1}$) à la longueur d'onde du laser d'azote utilisé (337 nm), et les maxima d'absorption λ (nm) des composés étudiés.

D'après la littérature, les chromophores bithiophéniques présentent une bande d'absorption caractéristique à 304 nm²⁴⁴. Cependant, des auxochromes liés à ce chromophore bithiophène, modifient les propriétés d'absorption.

Ainsi les nouveaux composés synthétisés ont été étudiés par spectroscopie UV-visible. Les résultats de tous les spectres d'absorption sont regroupés dans le Tableau IV-3. De plus, afin d'élucider la relation entre l'ionisation et l'absorption UV, le seuil d'énergie du laser nécessaire pour déclencher l'ionisation de chaque molécule est aussi rapporté.

N°	Structure	ϵ ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$) à 337 nm	λ_{max} en nm	Seuil d'ionisation	
				% laser utilisé	Énergie du laser en μJ
2		21600	338	35	58,8
3		22100	342	35	58,8
4		12100	328	35	58,8
6		15600	340	35	58,8
7		11400	345	35	58,8

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

8		21600	340	35	58,8
9		24000	342	35	58,8
10-d		2100	272	50	78,0
11		15600	342	35	58,8
12		8900	331	45	71,8
13		17300	354	55	84,4
15		5200	370	50	78,0
16		18000	342	35	58,8
17		6500	346	30	52,4
18		11600	366	35	58,8
19		5800	407	40	65,2
20		6000	375	45	71,8
21-c		11300	376	40	65,2
22		6100	390	50	78,0
24		9100	386	45	71,8
27		16700	342	35	58,8

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

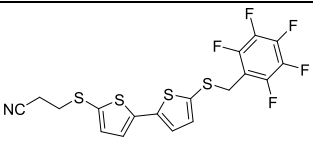
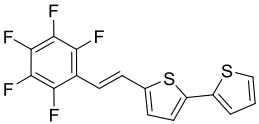
28		20400	345	35	58,8
29-c		5400	314	35	58,8

Tableau IV-3 : Coefficients d'extinction molaire ϵ à 337 nm, maxima d'absorption λ_{\max} des matrices, et conditions d'enregistrement des spectres MALDI des alcaloïdes (pourcentage de puissance et énergie du laser).

Les spectres d'absorption enregistrés dans la plupart des cas dans le DCM montrent une intense bande d'absorption d'énergie de transfert de charge dans le domaine de l'UV (Figure IV-7). La position de cette bande dépend de la nature et de la position des substituants sur le noyau bithiophénique. Les dérivés bithiophéniques portant un atome de soufre en 5 et 5' (**2-9**, **27** et **28**), présentent un maximum d'absorption positionné à 340 ± 5 nm. La variation des substituants n'a pas causé de déplacement notable du maxima d'absorption dans la mesure ou la conjugaison reste identique pour tous ces dérivés, et c'est la molécule **9** qui possède le coefficient d'absorption le plus élevé à 337 nm.

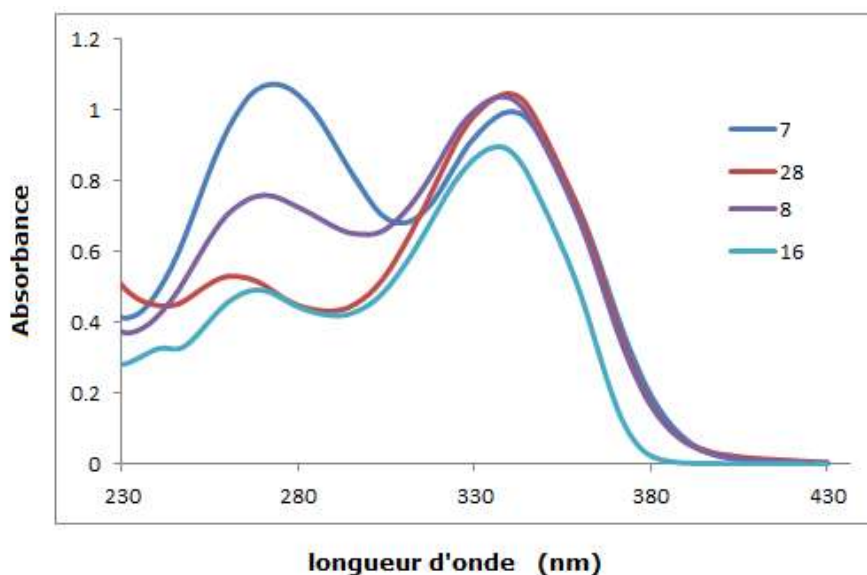


Figure IV-7 : Spectres UV de certaines BMs.

Le chromophore est fortement modifié lorsque les deux groupements S-alkyle sont positionnés sur les sommets 3,3' du bithiophène (composé **10-d**), et l'on constate la disparition totale de la bande d'absorption vers 340 nm (Figure IV-8). Ce changement du spectre d'absorption peut être expliqué par le changement de conformation du bithiophène : les groupements S-propionitrile

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

de **10-d** encombrant les sommets 3 et 3' en ortho des sommets 2 et 2' reliant les deux cycles aromatiques. La conformation coplanaire des deux thiophènes n'est donc pas favorisée, et dans cette situation comparable à l'atropoisomérisation des biphényles, les deux cycles aromatiques adoptent une conformation éloignant au maximum les substituants encombrants S-propionitrile. En conséquence, la conjugaison n'est plus comme dans MT3P étendue sur les deux cycles aromatiques (plus précisément, de l'atome de soufre en 5 à celui en 5'), et les deux thiophènes sont électriquement indépendants l'un de l'autre. Le recouvrement des orbitales π du système conjugué est donc plus limité avec **10-d**, et cette diminution de la conjugaison se traduit par une absorption à des longueurs d'onde λ plus énergétiques, donc plus courtes¹⁶².

Pour les autres molécules (**13**, **15-22**, **24** et **29-c**) sans soufre substituant le bithiophène, la longueur d'onde du maxima d'absorption varie beaucoup selon la nature du substituant, ou plus précisément, selon l'étendue de la conjugaison dans la chaîne latérale : les dérivés **13**, **15** et **18** comportant uniquement un carbonyle conjugué au bithiophène présentent des maxima d'absorption à des longueurs d'onde plus faibles (354 - 370 nm) que ceux (**19-22** et **24**) avec un système accepteur de Michaël dans la chaîne latérale. L'effet bathochrome est dans ce dernier cas plus marqué, avec par exemple un maxima d'absorption à 407 nm pour la molécule **19**.

Remarquons que bien que le composé **19** porte un substituant styrényle qui permettrait une conjugaison du bithiophène avec 4 doublets π ou non liant n , son maximum d'absorption à 314 nm est très proche de celui du bithiophène²⁷⁹ ($\lambda_{\max} = 304$ nm), ce qui laisse supposer que ce composé adopte aussi une conformation particulière.

Le maximum d'absorption des composés bithiophéniques thioakylés en 3,3' (**10-d**) ou non substitué par du soufre en 2,2' (**13,15-22**, **24** et **29-c**) ne coïncidant pas avec la longueur d'onde du laser N_2 à 337 nm, leurs coefficients d'extinction molaire sont environ trois à quatre fois inférieurs à ceux de MT3P. À puissance égale du laser, l'énergie photonique absorbée par ces matrices est donc bien moindre qu'avec MT3P ou ses analogues S-alkyle en 5,5'. Par conséquent, alors que le laser est limité à 35 % de puissance (58,8 μ J) avec MT3P, l'énergie délivrée est augmentée jusqu'à 84 μ J (55 % de puissance) avec les matrices absorbant moins d'énergie du laser de manière à atteindre le seuil d'ionisation. Ces différences d'absorbance entre les séries de dérivés bithiophéniques contribuent aussi à expliquer que les matrices thioakylées en 3,3' sont les plus efficaces pour ioniser les alcaloïdes.

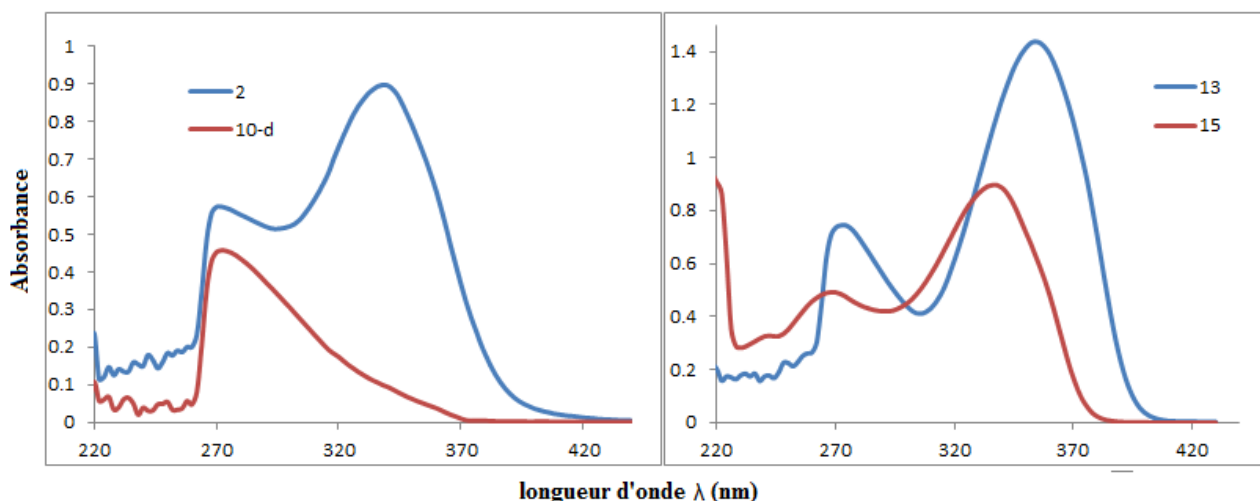
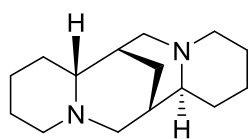


Figure IV-8 : Spectres d'absorption des matrices **2** et **10-d** (à gauche) et **13** et **15** (à droite).

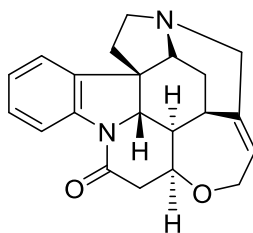
6. Deuxième test : évaluation approfondie

L'objectif de cette deuxième phase de tests consiste à réaliser une évaluation approfondie du potentiel des BMs retenues à l'issue de la première phase de test. Ainsi, l'analyse des alcaloïdes sera complétée en choisissant de tester toutes ces matrices avec cinq métabolites secondaires biologiquement très actifs et/ou toxiques : la colchicine, la spartéine, la pilocarpine, l'harmine et la strychnine. Par exemple, la dose létale de strychnine pour les adultes est de 50 à 100 mg, et elle diminue à environ 5-10 mg pour les enfants²⁸⁰. En outre, la sélectivité de l'ionisation a été évaluée avec des composés appartenant à différentes familles chimiques de produits naturels telles que les curcuminoïdes (curcumine), benzopyrones (coumarine), flavonoïdes (quercétine), stéroïdes (dexaméthasone 21-acétate), ainsi que certains dérivés du métabolisme primaire de structure peptidique. Les structures des analytes testés sont récapitulées dans la Figure IV-9, tandis que la Figure IV-10 illustre celles des matrices utilisées pour lesquelles des acronymes ont été définis pour faciliter la discussion ultérieure.

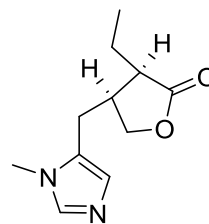
Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques



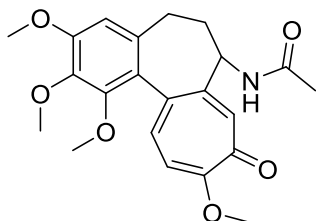
Sparteine
C₁₅H₂₆N₂
MW: 234.38



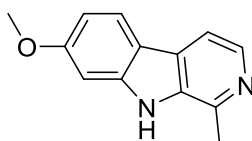
Strychnine
C₂₁H₂₂N₂O₂
MW: 334.41



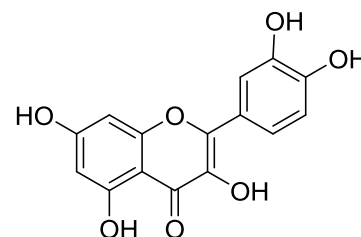
Pilocarpine
C₁₁H₁₆N₂O₂
MW: 208.26



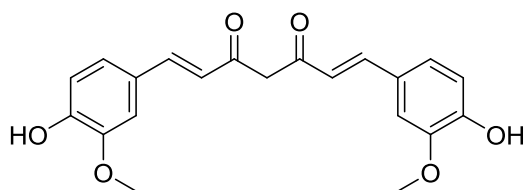
Colchicine
C₂₂H₂₅NO₆
MW: 399.44



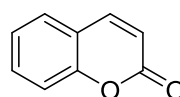
Harmine
C₁₃H₁₂N₂O
MW: 212.25



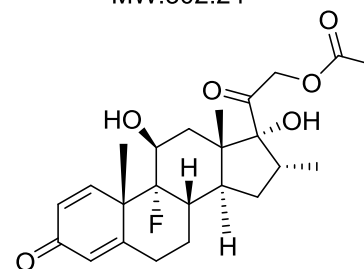
Quercetin
C₁₅H₁₀O₇
MW: 302.24



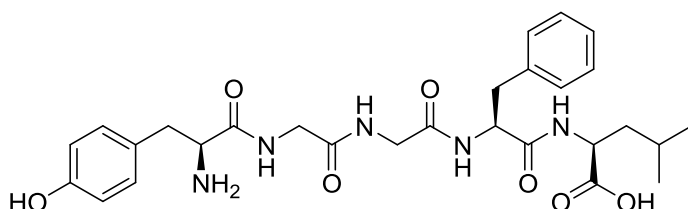
Curcumin
C₂₁H₂₀O₆
MW: 68.38



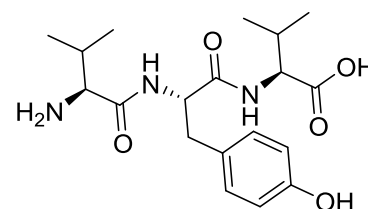
Coumarin
C₉H₆O₂
MW: 146.14



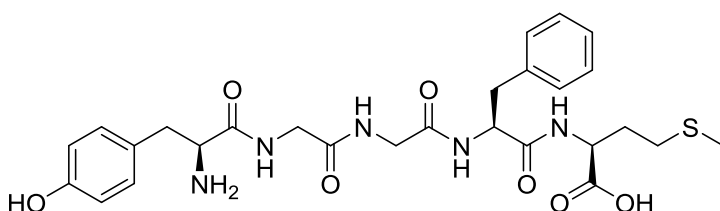
Dexamethasone 21-acetate
C₂₄H₃₁FO₆
MW: 434.50



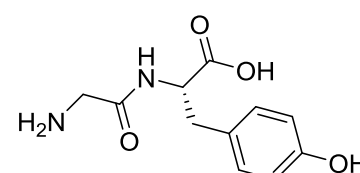
Leu-Enkephalin
C₂₈H₃₇N₅O₇
Mol. Wt.: 555.62



Val-Tyr-Val
C₁₉H₂₉N₃O₅
Mol. Wt.: 379.45



Met-Enkephaline
C₂₇H₃₅N₅O₇S
Mol. Wt.: 573.66



Gly-Tyr
C₁₁H₁₄N₂O₄
Mol. Wt.: 238.24

Figure IV-9 : Structures des analytes testés.

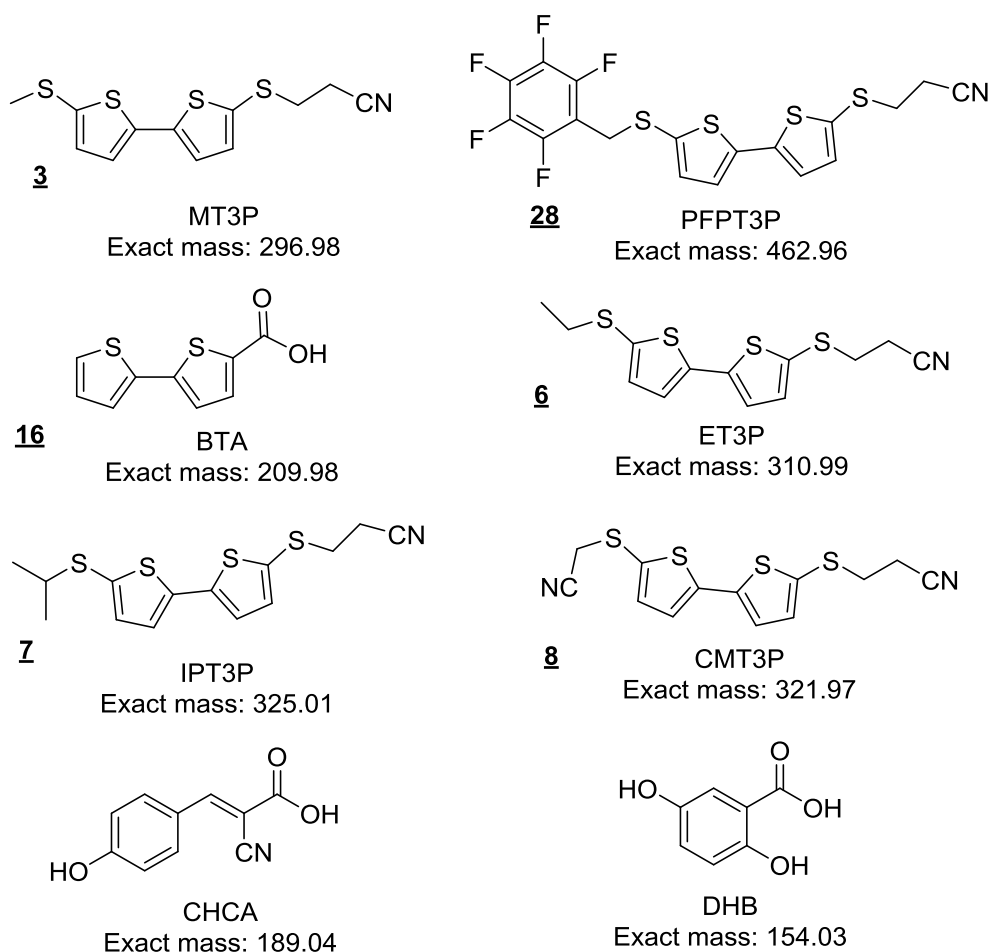


Figure IV-10 : Structures des matrices sélectionnées pour la deuxième phase de tests.

6.1. Analyse des composés standards

Les matrices retenues sont donc tout d'abord testées pour l'analyse de différents produits naturels (5 alcaloïdes et 10 composés d'autres groupes chimiques) qui ne sont pas les constituants de mélanges plus ou moins complexes, mais des composés simples. Remarquons qu'afin de s'assurer que la formation des ions a pour unique origine l'ionisation par la matrice, chaque analyte est tout d'abord exposé au laser en absence de composé bithiophénique. Dans cette analyse de LDI direct, la puissance du laser retenue (58,8 μJ) est celle qui sera utilisée pour tester les matrices. Dans ces conditions, aucune ionisation des analytes n'a été observée. Notons que la curcumine qui a déjà été utilisée comme une matrice²⁸¹ a montré une auto-ionisation à une énergie laser de 45 % (71,8 μJ).

Les résultats de l'évaluation sont présentés dans le Tableau II-4 suivant :

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

Composé	PFPT3P	EPT3P	CMPT3P	IPT3P	BTA	MT3P	CHCA	DHB
Acétate de dexaméthasone	0	0	0	0,1±0,3	7,7±2,3	0,2±0,1	2,4±1,1	0
Coumarine	0	0	0	0	0	0	69,6±18,4	0
Curcumine	36,8 ±33,5	1,3 ±1,6	2,1±2,8	0	55,4±12,3	13,9±14,0	346,6±38,1	0
Gramicidine	1,0±0,9	0,4±0,2	2,7±1,0	1,3±1,0	46,9±64,0	16,1±21,6	7,5±7,0	0
Quercétine	1,7±2,2	0	0	0	7,1±4,0	1,8±1,3	322,8±30,5	0
Angiotensine II [#]	3,6±6,3	0	0,4±0,7	0	5,3±2,5	0	194,2±39,9	0
Gly-Tyr [#]	0	0	0	0	0,3±0,1	0	7,3±4,4	0
Leu-Enképhaline [#]	0,05±0,1	0	0	0	0,9±0,4	0	12,3±6,3	0
Met-Enképhaline [#]	0	0	0	0	4,9±2,7	0	11,3±8	0
Val-Tyr-Val [#]	0	0	0	0	0	0	167,2±78,9	0
Colchicine*	137,3±113,9	36,2±30,9	77,7±100,8	89,7±86,4	218,4±79,1	98,3±39,0	370,7±15,8	0
Harmine*	241,9 ± 29,0	6,1±4,9	139,2±59,1	21,3±8,1	167,3±88,5	23,9±17,1	378,4±5,3	0
Pilocarpine*	130,6±146,6	1,8±1,4	67,3±25,6	8,7±8,0	41,9±13,8	13,5±6,6	267,8±40,1	0
Spartéine*	348,6±48,9	8,7±5,3	359,2±4,3	75,9±19,4	85,9±41,9	120,5±104,7	326,1±23,9	0
Strychnine*	281,0±67,6	11,3±12,1	191,5±68,3	94,2±24,1	96,9±62,4	116,4±141,4	368,8±12,8	0

Tableau IV-4 : Tableau récapitulatif des composés analysés par MALDI avec différentes BMs et matrices commerciales à une énergie de laser de 35 % (58,8 µJ) ; valeur des rendements d'ions/100, en unité arbitraire (u.a.). * alcaloïdes; # composés du mélange standard de peptides.

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

On constate que toutes les matrices bithiophéniques provoquent l'ionisation des alcaloïdes. Toutefois bien que les structures de ces matrices présentent une forte similitude (5 des 6 matrices comportent quatre soufres), une grande disparité est observée : les intensités varient de 180 u.a. pour la pilocarpine analysée avec EP3T à 35920 u.a. pour la spartéine avec CMPT3P. Parmi tous les BMs testées, l'ionisation des alcaloïdes est la plus forte avec PFPT3P (ionisation moyenne = 22790 u.a.), tandis que la plus faible est avec EPT3P (ionisation moyenne = 1280 u.a.).

Si l'on examine la réponse MALDI vis à vis de différentes classes de produits naturels, BTA se distingue des autres matrices bithiophéniques. En effet, il s'agit de la matrice bithiophénique qui permet l'ionisation du plus grand nombre de dérivés non alcaloïdiques : sur les dix composés testés, huit sont détectés, alors que seulement deux à cinq dérivés non alcaloïdiques sont mis en évidence avec les autres matrices. L'intensité des signaux obtenus avec BTA est toutefois plus faible pour les composés non alcaloïdiques (de 530 à 5540 u.a., et la moyenne des intensités : 1280 u.a.) comparés aux alcaloïdes (de 4190 à 21840 u.a. et moyenne des intensités : 12200 u.a.), ce qui illustre pour cette BM ionisant le plus grand nombre de produits naturels une plus grande efficacité vis des alcaloïdes. Cette sélectivité est encore plus marquée avec les cinq BMs comportant quatre atomes de soufre : la moyenne des intensités est environ 65 fois plus importante pour les alcaloïdes (u.a. moyenne = 10800) que pour les autres groupes de produits naturels (u.a. moyenne = 170). Plus précisément, le rapport des intensités moyennes des alcaloïdes sur celles des composés non alcaloïdiques sont respectivement de 53, 75, 321, 414 et 23 pour PFPT3P, EPT3P, CMPT3P, IPT3P et MT3P. Même si le nombre de matrices bithiophéniques testé est limité, ces résultats montrent que celles substituées par deux soufres présentent le plus d'intérêt.

Parmi ces matrices, PFPT3P retient notre attention : la moyenne des intensités des ions d'alcaloïdes est trois fois supérieure avec ce nouveau composé (moyenne des alcaloïdes = 22790 u.a.) comparé au dérivé de référence MT3P (moyenne des alcaloïdes = 7450 u.a.). De plus, si parmi les matrices comportant quatre atomes de soufre PFPT3P semble être la matrice la moins sélective, il convient de remarquer que la valeur moyenne élevée d'ionisation des composés non alcaloïdiques est surtout due au comportement de la curcumine qui est particulièrement bien ionisé par cette matrice. Cette sélectivité limitée devrait donc être confirmée en testant un nombre plus important de composés.

Si l'on compare maintenant ces matrices bithiophéniques à CHCA, il s'avère qu'avec cette matrice non bithiophénique les signaux de tous les alcaloïdes sont plus importants : l'intensité moyenne des alcaloïdes est de 34240 u.a. pour CHCA vs 22790 u.a. pour la matrice bithiophénique la plus

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

efficace, PFPT3P. L'ionisation des dérivés non alcaloïdiques est quant à elle bien plus efficace avec CHCA (moyenne = 11400 u.a.) qu'avec PFPT3P (moyenne = 430 u.a.). Si l'on compare le rapport des intensités moyennes des alcaloïdes sur celles des composés non alcaloïdiques de PFPT3P (53) à celui de CHCA (3), ces deux matrices présentent donc un comportement différent vis à vis des deux groupes de produits naturels, ce qui met en évidence la sélectivité de PFPT3P envers les alcaloïdes.

Il est intéressant de remarquer que BTA présente un profil d'ionisation similaire à celui de CHCA bien que les intensités globales des signaux soient plus faibles. D'un point de vue structural, ces deux matrices comportent un groupement carboxyle COOH, ce qui n'est pas le cas des autres BMs. Par conséquent, on peut supposer que la présence du groupement acide carboxylique facilite l'ionisation d'un panel plus large d'analyte et une moins bonne sélectivité. Pour DHB, qui contient également une fonction acide COOH, l'absence d'ionisation de tous les analytes est expliquée par la faible absorption de DHB à 337 nm ($\epsilon = 3340 \text{ L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$)²⁸² : l'énergie apportée par le laser dans les conditions retenues lors de l'analyse est trop faible, et la puissance du laser devrait être augmentée pour cette matrice. Parmi toutes les BMs testées, PFPT3P provoque la plus forte ionisation des alcaloïdes. Les intensités des signaux des analytes obtenus avec cette matrice sont toutefois légèrement inférieures à ceux obtenus avec CHCA.

Ces analyses de cinq alcaloïdes et de dix autres produits naturels avec six matrices bithiophéniques ont permis de retenir PFPT3P qui s'avère plus performant que MT3P. La comparaison de cette BM fluorée avec CHCA montre des différences en termes d'intensité et de sélectivité. Dans le cadre de l'analyse de composés de bas poids moléculaire, il convient aussi d'évaluer ces matrices au regard de leur aptitude à former des ions, des adduits et à se fragmenter.

6.2. Impact de la fragmentation de la matrice

Un des problèmes posé par la technique MALDI lors de l'analyse de composé de bas poids moléculaire est la superposition des signaux des analytes avec ceux de la matrice. Ainsi, on constate par exemple que lors de l'analyse d'une petite molécule comme l'harmine (212,25 Da), le pic d'intérêt est superposé avec des ions de matrice : CHCA présente²⁸³ un pic à $m/z = 212,2 \text{ Da}$ (Figure IV-11) provenant de l'ion $[M+Na]^+$.

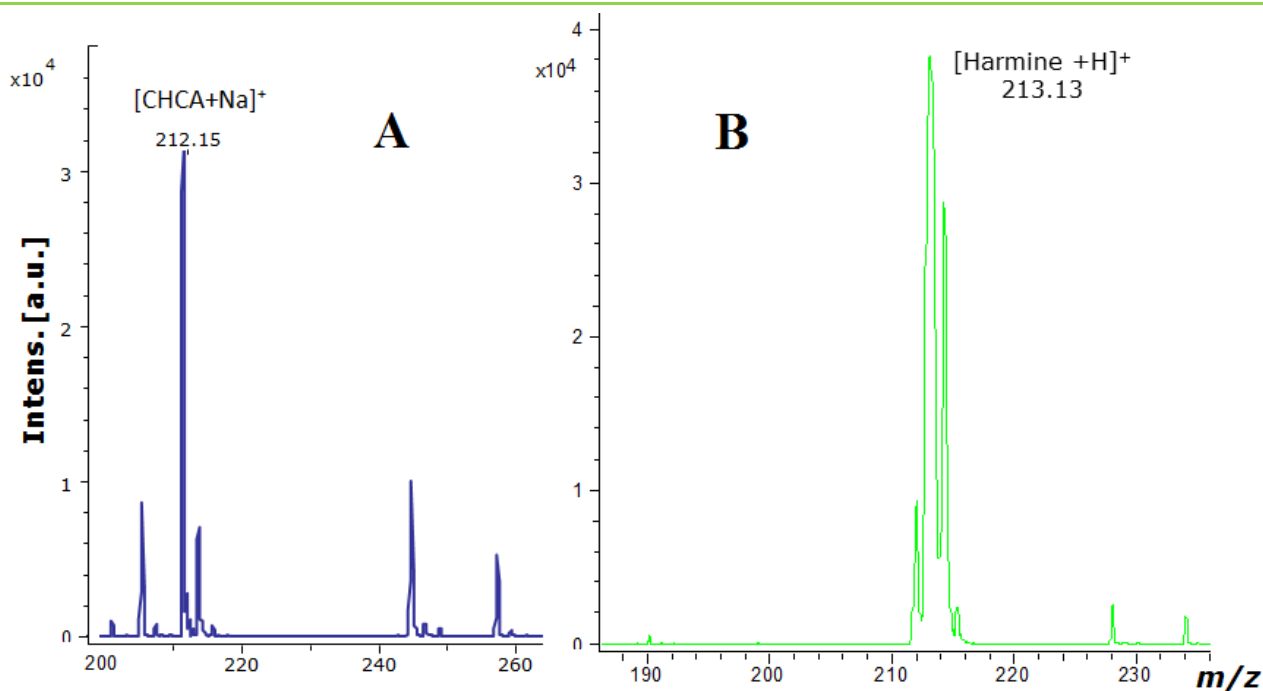


Figure IV-11 : Spectre de la matrice CHCA analysée en LDI (A) ; harmine analysée avec CHCA comme matrice (B). Puissance laser 35% (58,8 μ J).

Alors, pour compléter la comparaison de PFPT3P et de CHCA, il faut donc examiner les ions que ces matrices génèrent. Un spectre de type LDI réalisé en absence d'analyte (Figure IV-12) montre une complexité plus importante du spectre de CHCA qui présente quatre signaux importants, comparé à celui de PFPT3P qui ne montre qu'un signal important correspondant à l'ion radicalaire $[M-C_7H_2F_5]^+$ issu de la perte du bras portant PFP.

L'utilisation de PFPT3P pour l'analyse de molécules de faible poids moléculaire minimise donc le risque de superposition entre les signaux de la matrice et des analytes. Ceci est par exemple illustré dans le spectre MALDI de la pilocarpine qui ne présente que deux signaux en utilisant PFPT3P (Figure IV-13), alors que le spectre est plus complexe avec CHCA.

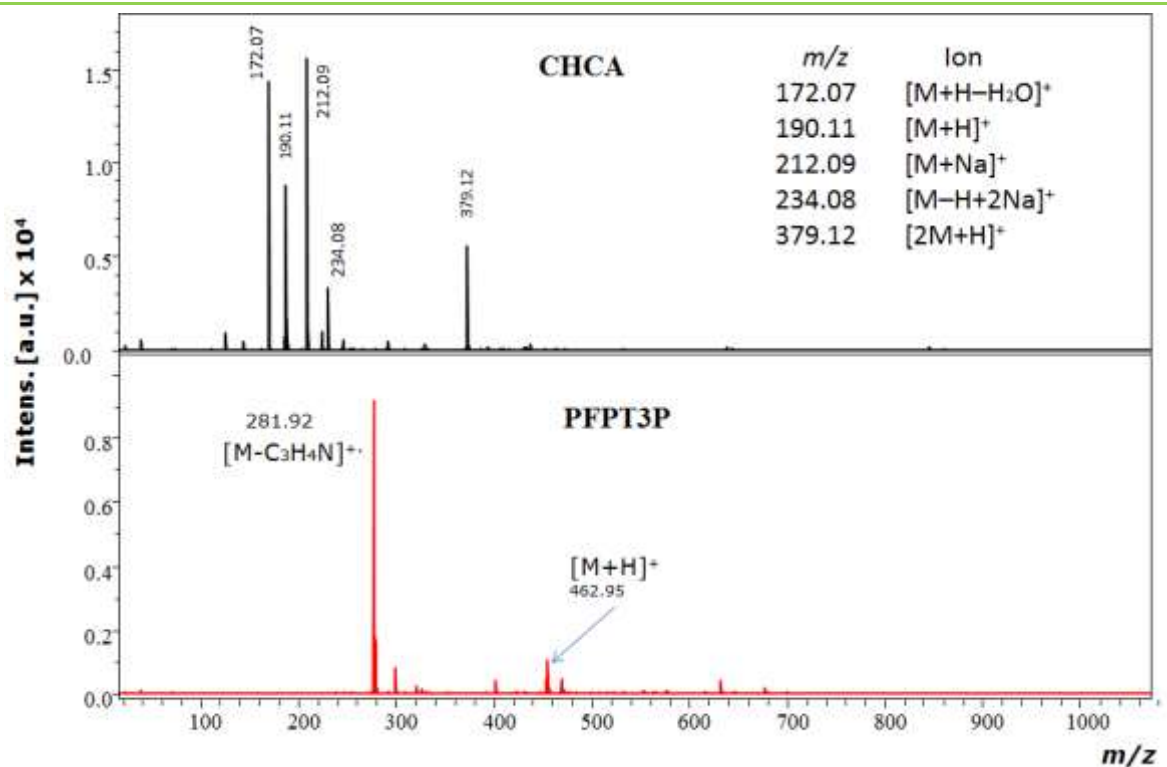


Figure IV-12 : Spectres LDI des matrices PFPT3P (bas) et CHCA (haut); puissance laser 35% (58,8 μ J).

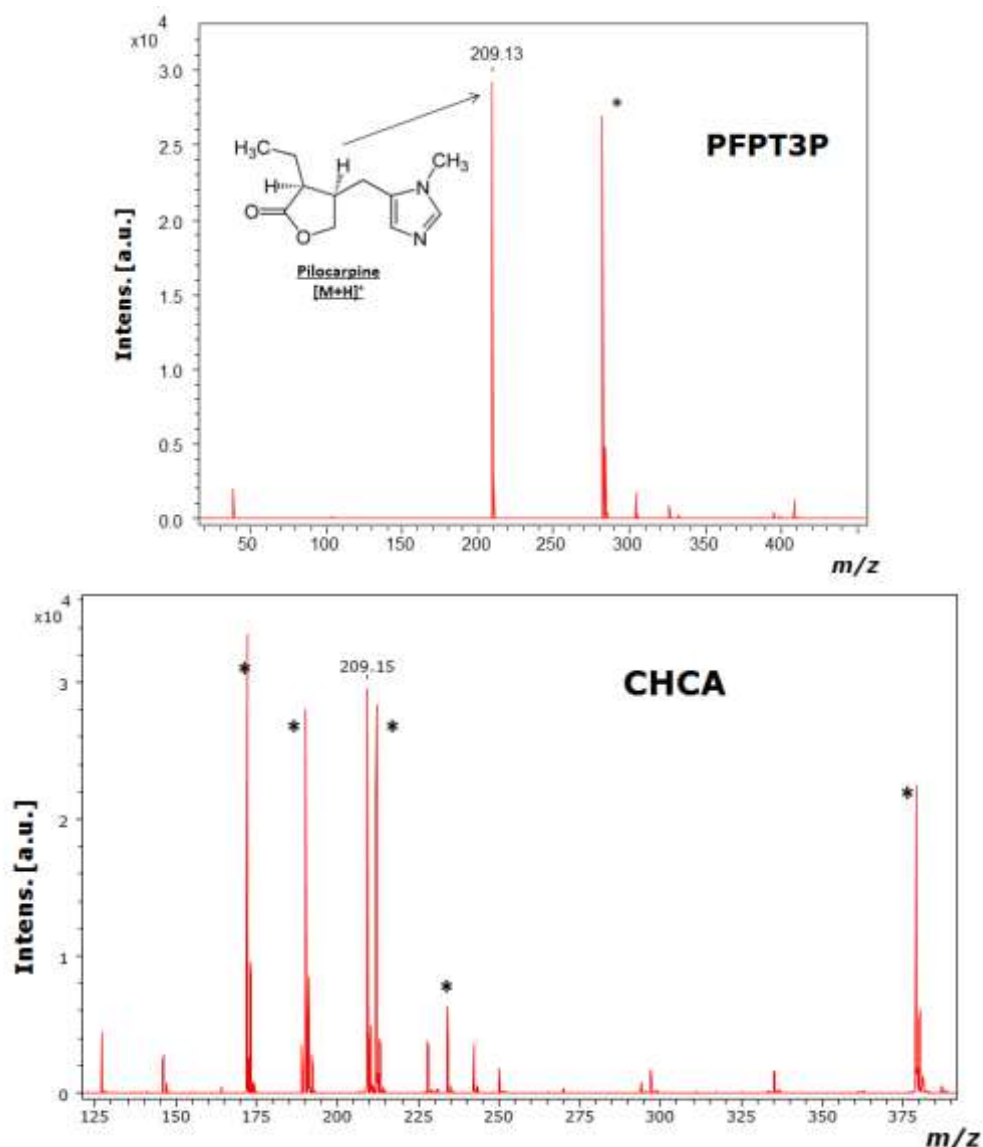


Figure IV-13 : Spectres de masse de la pilocarpine analysée par MALDI, avec la matrice PFPT3P (haut) et CHCA (bas) ; *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

Pour comparer encore plus précisément l'impact de la fragmentation de ces deux matrices sur la qualité du spectre, nous avons pour chacune d'elles calculé le score MSE qui est défini par :

$$\text{Score MSE} = \frac{\sum \text{intensités des pics d'analyte}}{\sum \text{intensités des pics d'analyte} + \sum \text{intensités des pics de matrice}}$$

Ce score est déterminé lors de l'analyse des cinq alcaloïdes précédents selon un protocole publié récemment²⁸⁴. Les signaux de faible intensité (inférieure à 5% du pic de base) ne sont pas pris en compte. Remarquons qu'en ce qui concerne PFPT3P et plus généralement pour l'ensemble des BMs, les ions de matrice sont principalement les ions moléculaires et quasi-moléculaires, ainsi

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

que ceux dus au clivage de la liaison soufre-carbone en position 5 et/ou 5' (Figure IV-14). Pour PFPT3P, ces signaux se présentent à $m/z = 282,8$, $411,0$ et $463,0$.

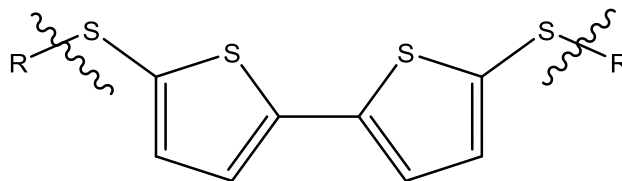


Figure IV-14 : Clivages principaux des BMs.

Alcaloïdes	CHCA	PFPT3P
Colchicine	$0,445 \pm 0,063$	$0,558 \pm 0,046$
Harmine	$0,773 \pm 0,211$	$0,369 \pm 0,023$
Pilocarpine	$0,187 \pm 0,017$	$0,173 \pm 0,039$
Spartéine	$0,177 \pm 0,021$	$0,493 \pm 0,046$
Strychnine	$0,225 \pm 0,053$	$0,385 \pm 0,024$
Moyenne	$0,361 \pm 0,073$	$0,395 \pm 0,036$

Tableau IV-5 : Scores MSE de PFPT3P et de CHCA.

Si les moyennes des scores MSE sont similaires pour CHCA (moyenne MSE = $0,361$) et PFPT3P (moyenne MSE = $0,395$), on constate toutefois que PFPT3P donne de meilleurs scores pour trois des cinq alcaloïdes (colchicine, spartéine et strychnine). De plus, pour la pilocarpine les scores de MSE sont de même niveau, tandis que CHCA présente le meilleur score uniquement pour l'harmine. Remarquons toutefois que pour cet alcaloïde, un adduit avec du sodium $[M+Na]^+$ est uniquement observé avec CHCA, ce qui explique probablement la différence importante du score MSE.

Au bilan, comparé à CHCA, la matrice bithiophénique fluorée (et de manière plus générale les BMs) présentent moins de signaux de matrice, ce qui minimise le risque de superposition du signal de la matrice et d'analyte. Cette caractéristique a été mise en évidence lors de l'analyse de composés simples et elle prendrait d'autant plus d'importance pour des spectres comportant de nombreux ions d'analytes. De plus, ayant confirmé avec la matrice fluorée la sélectivité vis à vis des alcaloïdes, la suite de notre étude consistera donc à évaluer la performance de PFPT3P pour l'analyse d'alcaloïdes dans des mélanges plus ou moins complexes. Par exemple, la répétabilité de la réponse sera évaluée par la détermination de l'écart type relatif des intensités des pics normalisés des trois alcaloïdes (colchicine, harmine et strychnine). En outre, une analyse des

propriétés d'ionisation et de sélectivité sera réalisée avec différents mélanges complexes : extraits bruts végétaux (*Cholchicum autumnale*, *Cytisus scoparius* et *Senecio vulgaris*) ou d'animal (chenille, *Tyria jacobaea*), un plasma humain enrichi en strychnine, ainsi qu'un médicament composés de mélanges d'extraits riches en alcaloïdes (spécialité Rytmopasc®) et un mélange répulsif d'insecte (Autun®).

De plus, l'intérêt de la matrice pour une rapide analyse des alcaloïdes dans les matières végétales seulement broyées et sans aucune extraction préliminaire sera évaluée.

6.3. Analyse des alcaloïdes dans des mélanges reconstitués

Comme toutes les techniques d'analyse, il convient d'évaluer la capacité de celle-ci à donner des résultats similaires lorsque la mesure est réalisée à différents moments. Nous avons donc déterminé, la variation de la réponse lors de l'analyse avec PFPT3P d'un mélange synthétique de trois alcaloïdes (colchicine, harmine et strychnine) à différents moments de la journée. La répétabilité intra-journalière a donc été évaluée par la mesure le même jour des intensités des pics normalisés des alcaloïdes du mélange déposé en quatorze spots (à la même concentration). Cette expérience a été réalisée en deux séries, en variant le solvant de la matrice (DCM ou un mélange ACN/eau (7/3)) dans le but de simuler différentes situations. En effet, si des échantillons issus de milieux biologiques devaient être analysés, ceux-ci ne sont pas compatibles avec l'utilisation de DCM.

Après normalisation de l'intensité du pic pseudomoléculaire de chaque alcaloïde, l'écart-type relatif est déterminé pour les deux séries et se situent entre 3 % et 9,5 % (Tableau IV-6). Pour rappel : $I_{\text{norm}} = I / \sum(I_{\text{harmine}} + I_{\text{strychnine}} + I_{\text{colchicine}})$.

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

	Dichlorométhane			Acétonitrile/Eau ; 7/3		
	Harmine	Strychnine	Colchicine	Harmine	Strychnine	Colchicine
1	0,374	0,378	0,248	0,285	0,505	0,211
2	0,373	0,405	0,221	0,264	0,507	0,229
3	0,405	0,394	0,201	0,259	0,513	0,228
4	0,402	0,385	0,213	0,245	0,537	0,218
5	0,380	0,379	0,241	0,263	0,513	0,224
6	0,374	0,402	0,224	0,248	0,539	0,213
7	0,381	0,397	0,223	0,241	0,538	0,221
8	0,434	0,376	0,190	0,284	0,503	0,213
9	0,387	0,386	0,227	0,223	0,556	0,221
10	0,409	0,380	0,211	0,238	0,531	0,232
11	0,432	0,380	0,189	0,232	0,539	0,229
12	0,396	0,385	0,218	0,271	0,497	0,232
13	0,388	0,435	0,177	0,276	0,511	0,213
14	0,398	0,396	0,206	0,241	0,534	0,225
Moyenne	0,395	0,391	0,214	0,255	0,523	0,222
Ecart-type	0,020	0,016	0,020	0,020	0,018	0,007
% RSTD	5	4	9,3	7,7	3,4	3,4

Tableau IV-6 : Étude de répétabilité en utilisant deux solvants différents avec PFPT3P comme matrice (les valeurs représentent les intensités normalisées) ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

Ces valeurs sont inférieures à 20 %, le maximum de RSTD toléré par les réglementations européennes²⁰⁷. Ainsi, elles sont prometteuses dans la mesure où elles montrent que la variation de la réponse est maîtrisée pour la réalisation de l'analyse à différents moments de la journée. En effet, le MALDI est une technique qui étant basée sur une cristallisation de la matrice crée une hétérogénéité au niveau du spot analysé par le faisceau du laser, ce qui conduit, contrairement aux analyses chromatographiques par exemple, à des variations importantes de la réponse.

6.4. Analyse d'extraits bruts de plantes à alcaloïdes

Pour rappel, les plantes retenues dans la suite de cette étude (*Cytisus scoparius*, *Colchicum autumnale* et *Senecio vulgaris*) sont des plantes contenant des alcaloïdes de différents groupes chimiques et qui sont à l'origine de graves intoxications¹⁶⁷. L'extraction de ces alcaloïdes est accomplie selon le protocole décrit dans le chapitre trois. Les extraits bruts sont analysés en MALDI en utilisant les deux matrices PFPT3P et CHCA (à l'exception de *S. vulgaris*). Concernant

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

l'extrait brut des bulbes de *C. autumnale*, les spectres obtenus avec les deux matrices diffèrent au niveau de l'intensité et, comme lors de l'étude des composés standards, CHCA donne un spectre où les intensités sont plus élevées qu'avec PFPT3P. On constate aussi que le spectre de l'extrait brut réalisé avec CHCA est beaucoup plus complexe qu'avec PFPT3P (Figure IV-15).

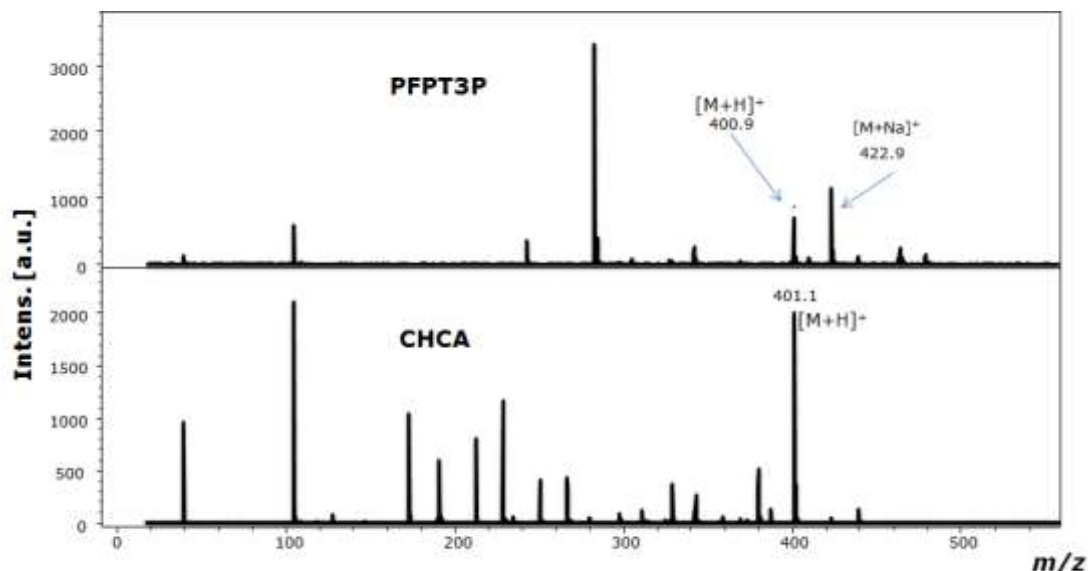


Figure IV-15 : Spectres d'analyse MALDI de l'extrait brut des bulbes de *C. autumnale* en utilisant PFPT3P (haut) et CHCA (bas) comme matrices ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

La sélectivité de PFPT3P pour les composés azotés explique cette simplification du spectre de cet extrait et facilite l'obtention des informations relatives au groupe de métabolites secondaires d'intérêt, les alcaloïdes. Sur les spectres de l'extrait réalisés avec les deux matrices, on identifie à côté du signal de la colchicine, des pics attribués à des alcaloïdes mineurs (Figure IV-16), tels que 2 ou 3-déméthyl-démécolcine ($[MH]^+$ à $m/z = 356,2$), ainsi qu'un ou plusieurs des trois isomères à savoir la *N*-désacétyl-*N*-formylcolchicine ou la 2 ou 3-déméthylcolchicine ($[M+H]^+$ à $m/z = 386,2$) (Figure IV-17). Bien que l'intensité des ions des alcaloïdes est généralement plus importante avec CHCA qu'avec les matrices bithiophénique, PFPT3P est suffisamment sélectif pour détecter ces alcaloïdes minoritaires dans un extrait complexe.

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

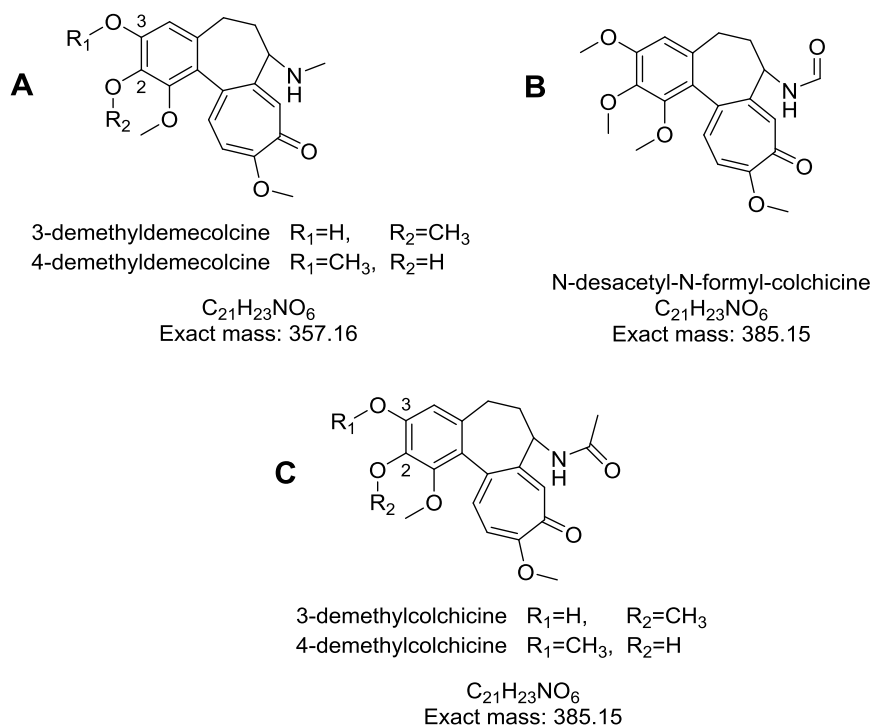


Figure IV-16 : Structures des alcaloïdes minoritaires de *C. autumnale*.

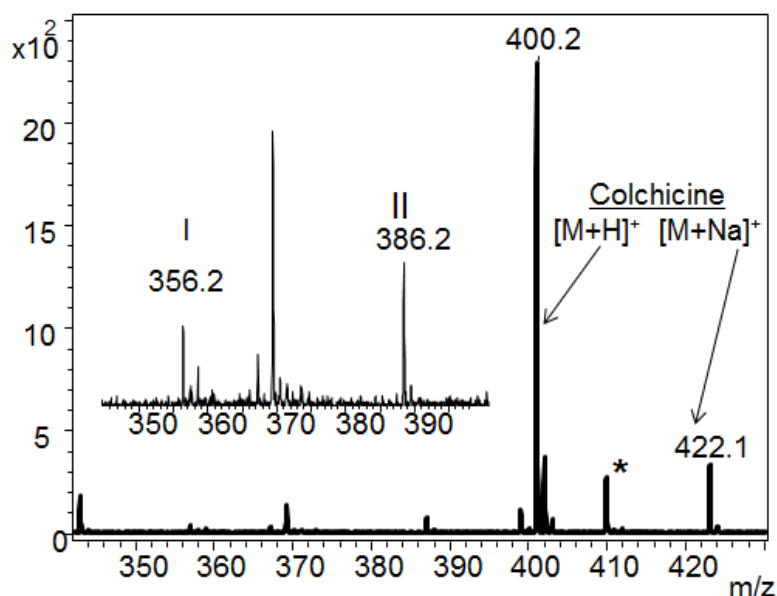


Figure IV-17 : Spectre MALDI-MS de l'extrait DCM de *C. autumnale* en utilisant PFPT3P comme matrice et montrant la colchicine et un ou plusieurs des isomères suivants : 2- ou 3-déméthylcolchicine (I), N-désacétyl-N-formylcolchicine, 2- ou 3-déméthylcolchicine (II). *=ions de matrice PFPT3P ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

On peut d'autre part remarquer l'intérêt du MALDI pour cette analyse : aucun pic n'est détecté en absence de matrice par LDI directe.

Pour l'analyse de l'extrait de *Cytisus scoparius*, les résultats illustrés dans la Figure IV-18, prouvent encore une fois la performance de la nouvelle matrice bithiophénique. Par rapport à CHCA, PFPT3P présente moins de signaux dans un milieu complexe comme l'extrait brut de

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

Cytisus scoparius. Cette fois-ci à la différence de l'extrait de colchique, les intensités des pics d'intérêt des spartéine ($[M+H]^+$, $m/z = 235,29$) et spartéine-*N*-oxyde ($[M+H]^+$, $m/z = 251,29$) sont d'intensités similaires avec les deux matrices.

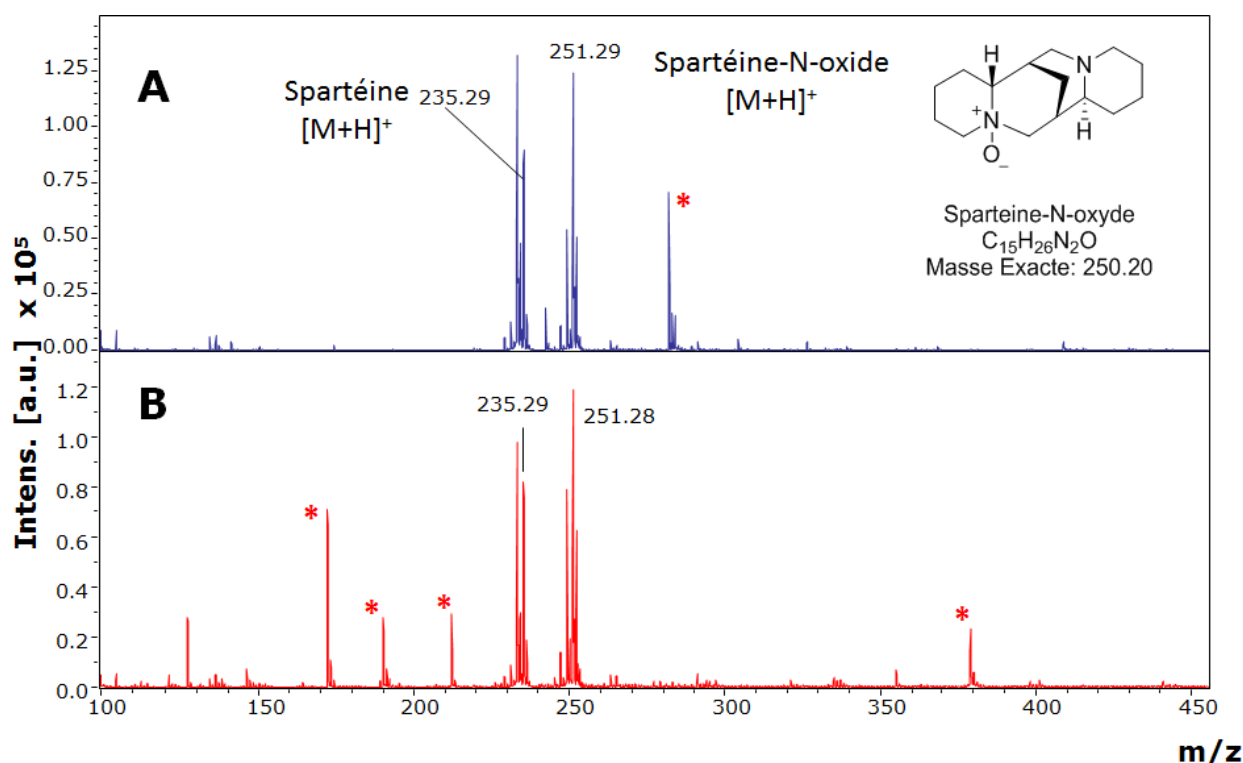


Figure IV-18 : Spectres MALDI de l'extrait brut de *Cytisus scoparius* analysé avec PFPT3P (haut) et avec CHCA (bas). *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

Le spectre MALDI de l'extrait de *Senecio vulgaris* utilisant comme matrice PFPT3P est relativement simple (Figure IV-19). Il met en évidence la présence des ions des *N*-oxydes de sénéciphylline et de sénécionine²⁸⁵, deux alcaloïdes pyrrolizidiniques de structures voisines. Au regard de l'intensité des ions de ces deux alcaloïdes, le spectre MALDI avec PFPT3P met en évidence que dans l'extrait, la quantité de sénéciphylline-*N*-oxyde est supérieure à celle de sénécionine-*N*-oxyde, dans un rapport 2:1. Si d'autres travaux sont nécessaires pour valider l'utilisation du MALDI pour déterminer ce ratio, certaines études antérieures ont révélé que la sénécionine¹⁸⁵, ou la sénéciphylline¹⁸⁶ était l'alcaloïde dominant, tandis que d'autres ont trouvé que ces deux alcaloïdes étaient considérés comme alcaloïdes principaux de *Senecio vulgaris*¹⁸⁷. D'autres part, un article publié récemment²⁸⁶ a indiqué que les alcaloïdes pyrrolizidiniques-*N*-oxydés sont dominants par rapport à ceux sous forme base (environ 10 fois) (Figure IV-20).

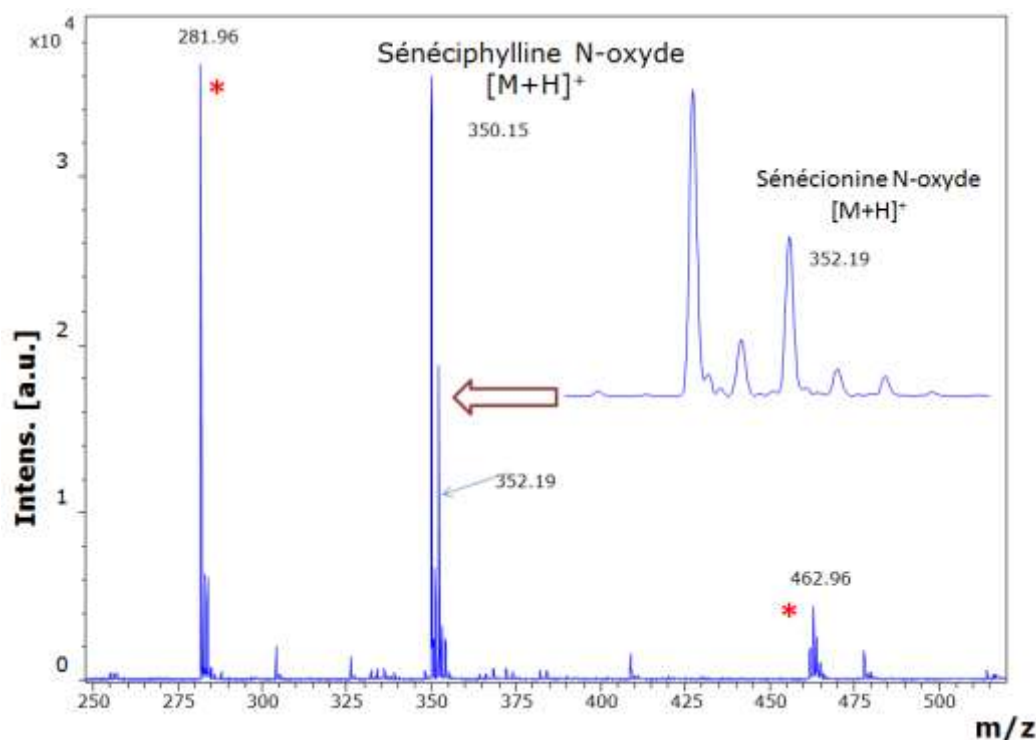
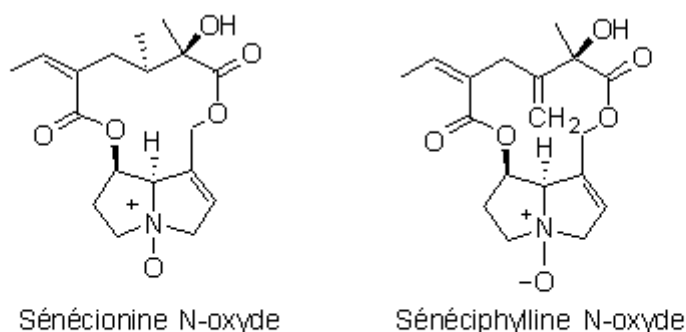


Figure IV-19 : Spectre de masse de l'extrait de *Senecio vulgaris*, analysé par MALDI utilisant la matrice PFPT3P. *=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).



	Formule	Masse exacte	[M+H] ⁺ trouvé
Sénécionine N-oxyle	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351.168	352.190
Sénéciphylline N-oxyle	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	349.152	350.154

Figure IV-20 : Alcaloïdes pyrrolizidiniques détectés dans l'extrait de *Senecio vulgaris* par MALDI en utilisant PFPT3P comme matrice.

Les résultats précédents portant sur différents extraits bruts indiquent que PFPT3P est une matrice appropriée pour l'analyse des alcaloïdes dans les plantes. En effet, les spectres des extraits sont généralement peu complexes, bien que l'analyse de l'extrait soit directe, sans aucune étape de purification supplémentaire. Les spectres générés renseignent également sur la

composition de la plante en alcaloïdes de la même classe chimique, sans nécessiter de technique séparative.

6.5. Analyse d'alcaloïdes chez la chenille de *Tyria jacobaeae*

Tyria jacobaeae encore appelé la "Goutte de sang" est un papillon rouge et noir dont la chenille annelée de jaune et de noir se développe principalement sur les séneçons (*Senecio jacobaea* et *Senecio vulgaris*)²⁸⁷, et qui peut séquestrer les alcaloïdes pyrrolizidiniques de sa plante hôte²⁸⁸ (Figure IV-21). En effet, après ingestion, les alcaloïdes passent dans l'hémolymphe et la chenille de *T. jacobaeae* les stocke jusqu'au stade adulte, ce qui en raison de la toxicité de ces alcaloïdes la protège des agresseurs éventuels²⁸⁹.



Figure IV-21 : La chenille et le papillon *Tyria jacobaea*.

(Source <http://aramel.free.fr/INSECTES13ter-5'.shtml>, consulté le 25/04/2017)

T. jacobaeae se nourrissant de séneçons, son utilisation peut donc être envisagée dans le cadre de la réglementation visant à diminuer les intrants chimiques en agriculture, comme moyen biologique pour prévenir le développement de ces herbes toxiques pour l'homme dans les cultures^{290,291}. L'idée est donc d'élever *T. jacobaeae* pour ensuite relâcher des chenilles dans les sites fortement infestés par l'herbe toxique. Les premiers travaux montrent que l'application de *T. jacobaeae* seule ne semble pas réduire de façon significative les densités de séneçon jacobée mais réduit le nombre de capitules par plantes, et de graines par capitules²⁹².

Dans le cadre d'une collaboration avec l'ITEPMAI (un institut technique assurant une mission de recherche appliquée finalisée au service des filières plantes aromatiques, médicinales et à parfum ; Chemillé-en-Anjou, France), une étude préliminaire vise à détecter par MALDI avec PFPT3P les alcaloïdes pyrrolizidiniques dans différentes matrices biologiques, et en particulier dans les chenilles. L'ion à $m/z = 352,16$ sur le spectre de l'extrait méthanolique de chenille correspond au pic $[M+H]^+$ de l'alcaloïde pyrrolizidinique sénécionine-*N*-oxyde, ce qui prouve l'intérêt de cette matrice pour mettre en évidence ce groupe de métabolites secondaires dans des mélanges complexes (Figure IV-22).

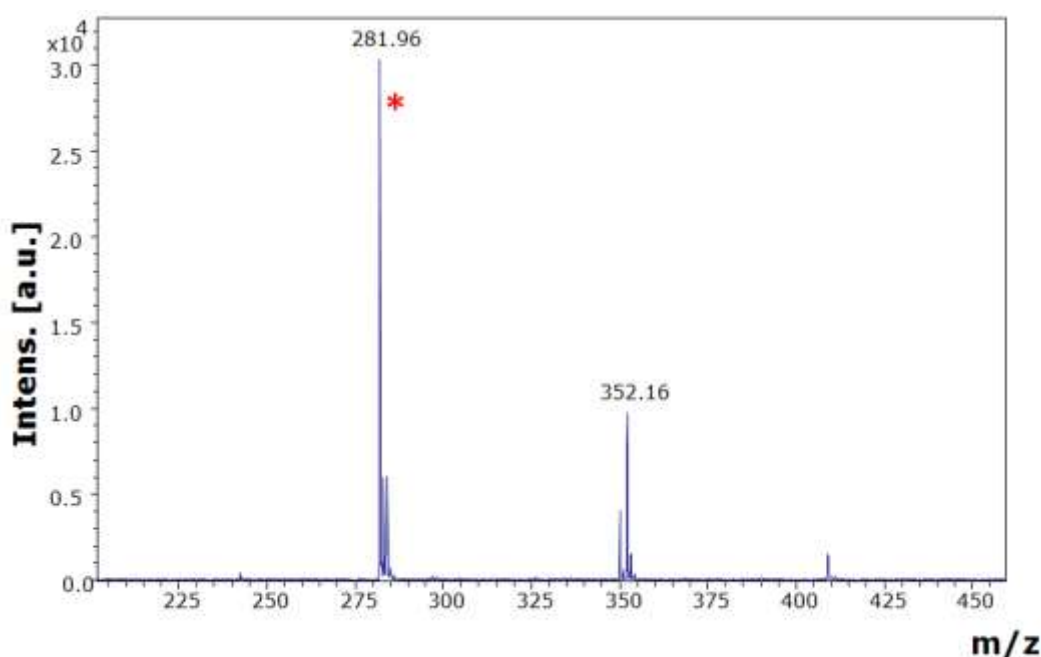


Figure IV-22 : Spectre MALDI de l'extrait méthanolique de chenilles *Tyria jacobaeae* en utilisant PFPT3P comme matrice.

*=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

6.6. Analyse d'alcaloïdes dans un sérum enrichi

La strychnine est un alcaloïde pharmacologiquement actif et toxique. Il est classé parmi les substances dopantes et représente un contaminant de compléments alimentaires. La détection de cet alcaloïde dans des mélanges complexes est donc une question importante pour la qualité alimentaire, le contrôle du dopage²⁹³ ou dans le cadre d'analyses toxicologiques. Comme de nombreux alcaloïdes, leur contrôle dans des matrices biologiques complexes tel qu'un sérum est principalement mené par des méthodes de LC ou GC-MS qui nécessitent généralement une ou plusieurs étapes de pré-purification de l'échantillon. Nous pensons donc utiliser la spectrométrie de masse pour identifier rapidement un plasma compromis. Les matrices CHCA et PFPT3P ont donc été utilisées pour l'analyse directe d'échantillons de plasma dopés en strychnine.

Les sérums non dopé et enrichis en strychnine à différentes concentrations sont analysés avec les deux matrices CHCA et PFPT3P. La matrice commerciale CHCA n'a pas permis de détecter l'alcaloïde à la plus forte concentration testée (200 μ g.mL⁻¹) et ce, même en augmentant la puissance du laser à 65 % (90,8 μ J). Par contre, l'utilisation de PFPT3P comme matrice permet d'ioniser la strychnine dans ce milieu biologique. La figure ci-dessous (Figure IV-23) illustre les deux spectres obtenus avec la matrice PFPT3P de sérum non dopé et celui du sérum enrichi. À la concentration de 200 μ g.mL⁻¹, l'ion à $m/z = 335,6$ correspondant à $[M+H]^+$ n'est détecté qu'avec

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

la matrice bithiophénique. Plutôt que d'étudier l'intensité absolue du pic d'intérêt, nous avons déterminé le rapport signal sur bruit du fond (S/N) qui permet de définir la limite de détection de la strychnine par cette méthode. Ainsi le tableau suivant (Tableau IV-7) rassemble les moyennes des rapports signal sur bruit déterminées pour trois spots à différentes concentrations.

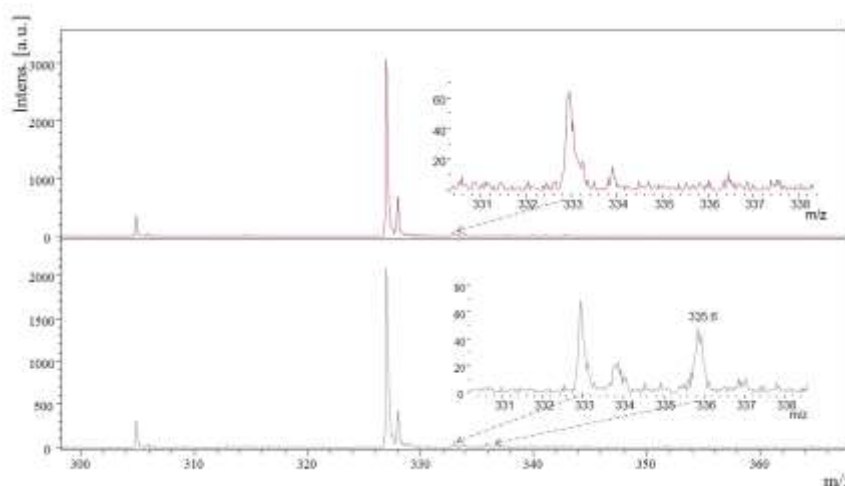


Figure IV-23 : Spectres MALDI avec PFPT3P de sérums non dopé (haut) et enrichi en strychnine à une concentration de $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (bas) ; puissance laser 40 % (65,2 μJ).

$\mu\text{g.mL}^{-1}$	rapport S/N
200	60,4
150	58,5
120	50,2
75	41,6
31	32,9
19	24,7
17	16,6
9	12,6
1	8,3
0,7	3,2

Tableau IV-7 : Rapports signal sur bruit S/N (moyennes pour 3 spots) à différentes concentrations de strychnine dans le sérum en utilisant PFPT3P comme matrice.

La limite de détection (LOD) étant déterminée pour un rapport signal sur bruit du pic d'intérêt égal à trois, la LOD de la strychnine par MALDI a donc été évaluée à $0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Cette valeur de LOD est certes supérieure à la plage de linéarité des techniques LC-MS ($0,5\text{-}500 \text{ ng.mL}^{-1}$), mais la simplicité de la méthode en fait un outil intéressant pour le criblage rapide de mélanges complexes²⁹⁴. De plus, cette valeur pourrait probablement être diminuée en optimisant la méthode de préparation (en variant le mode de déposition, le système de solvant, le rapport matrice : analyte, etc.).

6.7. Analyse d'alcaloïdes dans des solutions bioactives commerciales

Du fait de leurs propriétés pharmacologiques, les alcaloïdes constituent un groupe de produits naturels particulièrement représenté dans l'arsenal thérapeutique. De nos jours, ils sont le plus souvent utilisés comme actifs pharmaceutiques après extraction et purification de la plante. Toutefois des extraits de plantes à alcaloïdes entrent parfois dans la composition de certaines spécialités.

De plus, à côté d'un usage pharmaceutique, certains dérivés rattachés au groupe des alcaloïdes pipéridiniques (e.g. conine) sont utilisés comme répulsif d'insectes. Nous analyserons les solutions complexes contenant des dérivés de type alcaloïdique : Rytmopasc® et Autan® (Figure IV-24).



Figure IV-24 : Illustration de deux solutions analysées.

Rytmopasc® est une solution homéopathique utilisée principalement en Allemagne pour le traitement des arythmies modérées. Cette préparation à base de teintures de plantes contenant notamment 9,5 % d'un extrait éthanolique de *Cytisus scoparius*. Cette dernière est une source connue de spartéine qui présente une activité anti-arythmique par blocage des canaux sodiques. Toutefois, sa toxicité¹⁸² cardiaque et son faible index thérapeutique expliquent que cet alcaloïde n'est pas approuvé par les autorités de santé comme anti-arythmique. Associé à l'extrait de *Spartium scoparium* (9,5 %), la solution Rytmopasc® contient également en quantités importantes des extraits de différentes espèces de *Crataegus* (38,7 %), *Lilium lancifolium* (24%) et *Apocynum cannabinum* (9,5 %). Une dilution homéopathique D2 de vétrate vert (extrait éthanolique à 1 % de *Veratrum viride*) entre aussi dans la composition du Rytmopasc®. Un très grand nombre d'alcaloïdes stéroïdiques ont été isolés de cette plante (ex : vératridine,

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

rubijervine, rubivirine, jervine,...)²⁹⁵. Parmi eux, la rubijervine présente par exemple une forte toxicité cardiovasculaire²⁹⁶.

Autan[®] est quant à lui utilisé sous forme de spray pour des propriétés insectifuges. Son effet est dû à la présence d'un dérivé pipéridinique dénommé icaridine qui se lie à un récepteur²⁹⁷ des molécules odorante de l'insecte, la protéine AgamOBP1 (pour *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1). L'icaridine n'est donc pas un insecticide,²⁹⁸ et ses propriétés insectifuges sont de même niveau que celles du DEET (*N,N*-diéthyl-3-méthylbenzamide), mais sans provoquer d'irritations²⁹⁹. Ce composé de synthèse que l'on peut rattacher au groupe des alcaloïdes possède deux stéréocentres (Figure 25). Ainsi dans les produits commerciaux, il se trouve sous forme d'un mélange de 4 stéréoisomères. Depuis quelques années, l'épidémie due au virus Zika propagée par les insectes du genre *Aedes* a stimulé l'utilisation accrue des icaridines³⁰⁰. Remarquons que dans le spray, l'icaridine est aussi associée à l'acide citrique, l'alcool dénaturé et des parfums.

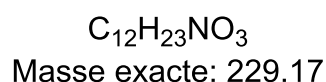
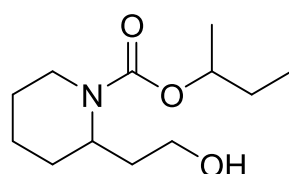


Figure IV-25 : Structure et formule chimique de l'icaridine.

La solution de Rytmopasc[®] est tout d'abord analysée sans utiliser de matrice par LDI afin de vérifier la spécificité du signal obtenu par MALDI. Aucun signal n'est détecté tant que l'énergie du laser n'atteint pas 60% (91 μ J), et les signaux apparus ne correspondent pas à ceux de la spartéine. Alors que CHCA induit une forte ionisation d'un standard de spartéine (6.1 Analyse des composés standards, Page 158), cette matrice ne provoque pas l'apparition de l'ion quasi-moléculaire de cet alcaloïde lorsque la solution de Rytmopasc[®] est analysée avec une puissance laser de 35 %. Par contre, à la même puissance laser et en utilisant PFPT3P comme matrice, un ion à $m/z = 235,88$ Da correspondant à l'ion quasi-moléculaire $[M+H]^+$ de la spartéine est clairement détecté (Figure IV-26). Sur le même spectre, un signal à $m/z = 414,4$ Da, indiquant potentiellement la présence de rubijervine (Figure IV-27) a été détecté. Un autre pic à $m/z = 673,73$ Da correspondant à la vératridine est observé (Figure IV-28). Notons toutefois que ce pic correspond à l'ion $[M]^+$ (avec un décalage de 0,32 Da), ce qui n'est pas habituellement

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

détecté pour les alcaloïdes. Ainsi, une analyse avec un standard de référence est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Ces essais mettent en évidence l'intérêt de la matrice bithiophénique PFPT3P pour détecter des alcaloïdes de différents groupes chimiques dans des solutions complexes pharmaceutiques. Pour ces préparations composées d'extraits plus ou moins dilués, la quantification spécifique des alcaloïdes n'est à ce stade pas établie et des travaux complémentaires seraient donc nécessaires pour définir les limites de notre technique d'analyse.

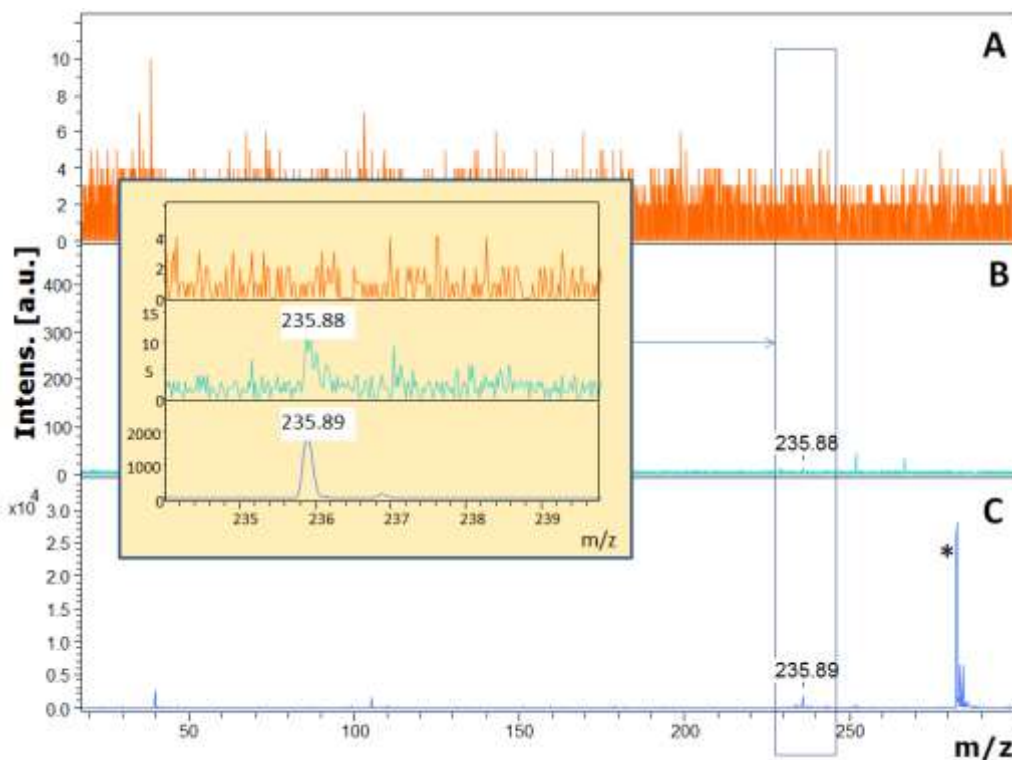


Figure IV-26 : Spectre MALDI des solutions de Rytmopasc® en LDI (A), en utilisant CHCA (B) et PFPT3P (C) comme matrice et visualisation du pic de spartéine à $m/z = 235,88$ Da. *= pics des matrices ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

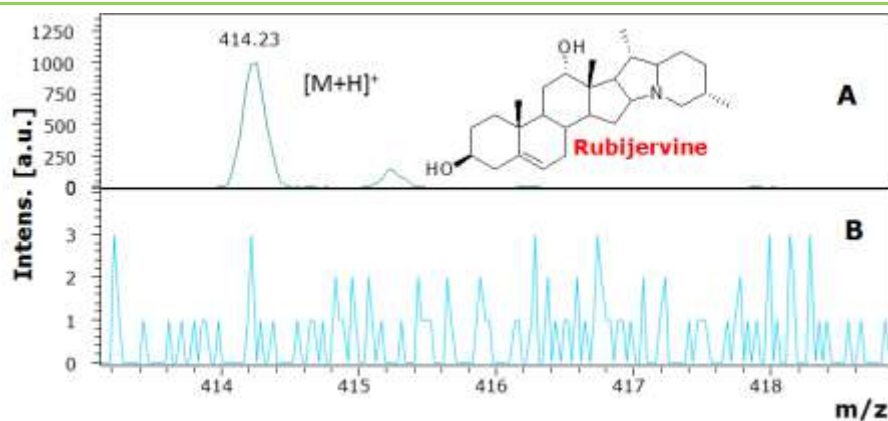


Figure IV-27 : Structure de la rubijervine et spectre MALDI avec PFPT3P comme matrice montrant son pic dans une solution de Rytmopasc® (A). Spectre LDI de la même solution (B) ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

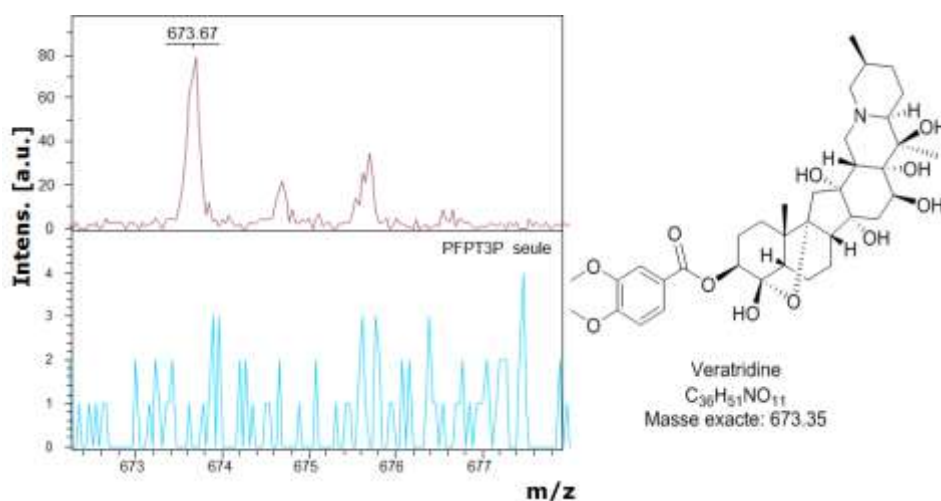


Figure IV-28 : Structure de la vératridine et spectre MALDI avec PFPT3P comme matrice (en haut) montrant son pic dans une solution de Rytmopasc®. Spectre LDI de la même solution (en bas) ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

En ce qui concerne la solution du spray répulsif Autan®, son analyse en MALDI avec PFPT3P comme matrice avec une énergie de laser de 35 % (58,8 μ J) montre des signaux à $m/z = 230,15$ et $268,14$ respectivement associés aux ions pseudo-moléculaires $[M+H]^+$ et à l'adduit $[M+K]^+$ de l'icaridine. Dans ces conditions, le spectre est assez simple et on n'observe pas de fragmentations pour ce dérivé alcaloïdique (Figure IV-29). Un pic (avec une intensité de 20 % du pic de base) à $m/z = 242,72$ est observée dans le spectre d'Autan®. Ce pic n'existant pas dans le profil de PFPT3P seul, il peut être attribué à un adduit de l'alcaloïde ou bien à un autre composant du répulsif.

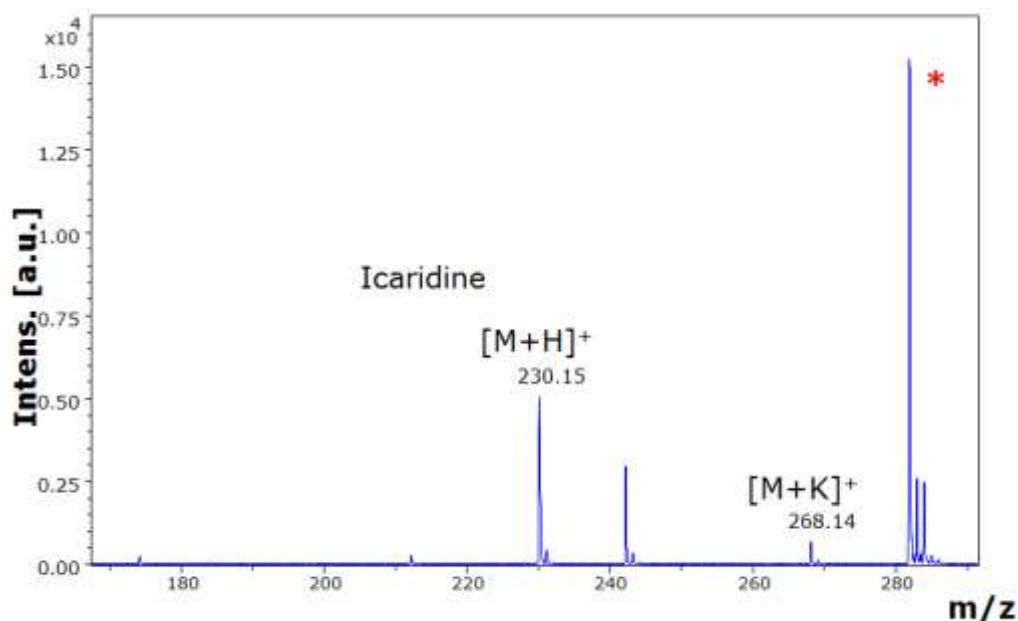


Figure IV-29 : Spectre de masse MALDI d'une solution d'Autan[®] obtenu avec PFPT3P.

*=ions de matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

6.8. Criblage direct de drogues végétales

Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du professeur Michael Spiteller à l'université technique de Dortmund, la matrice bithiophénique MT3P a été utilisée pour mettre en évidence la présence et la localisation d'alcaloïdes au niveau de la coupe de la tige de *Datura stramonium*. Si les caractéristiques du spectre de masse utilisé à Angers ne permettent pas d'analyser des coupes de tissu, nous avons toutefois pensé l'utiliser pour analyser un matériel végétal broyé. Plus précisément, nous évaluerons l'intérêt la matrice PFPT3P pour mettre en évidence la présence d'alcaloïdes dans des drogues, sans extraction préalable, c'est à dire sans autre préparation préalable qu'un simple broyage.

Ainsi, les spectres de masse MALDI de poudre de plante entière d'*Atropa belladonna* et de *Senecio vulgaris* sont représentés Figure IV-30. Ils sont similaires aux spectres obtenus pour les extraits méthanolique des mêmes plantes (Figure IV-31). L'hyoscyamine et la scopolamine qui se trouvent dans l'extrait de belladonne dans un rapport 9/1 respectivement sont tous deux détectés. De même les *N*-oxyde de sénécionine et de sénéciphylline sont mis en évidence dans la poudre de séneçon. Toutefois les rendements ioniques sont plus faibles que ceux obtenus après extraction, ce qui semble logique en tenant en compte que les analytes cibles se trouvent cette fois-ci dans des milieux plus complexes et nécessitant une plus forte intensité du laser pour les ioniser.

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

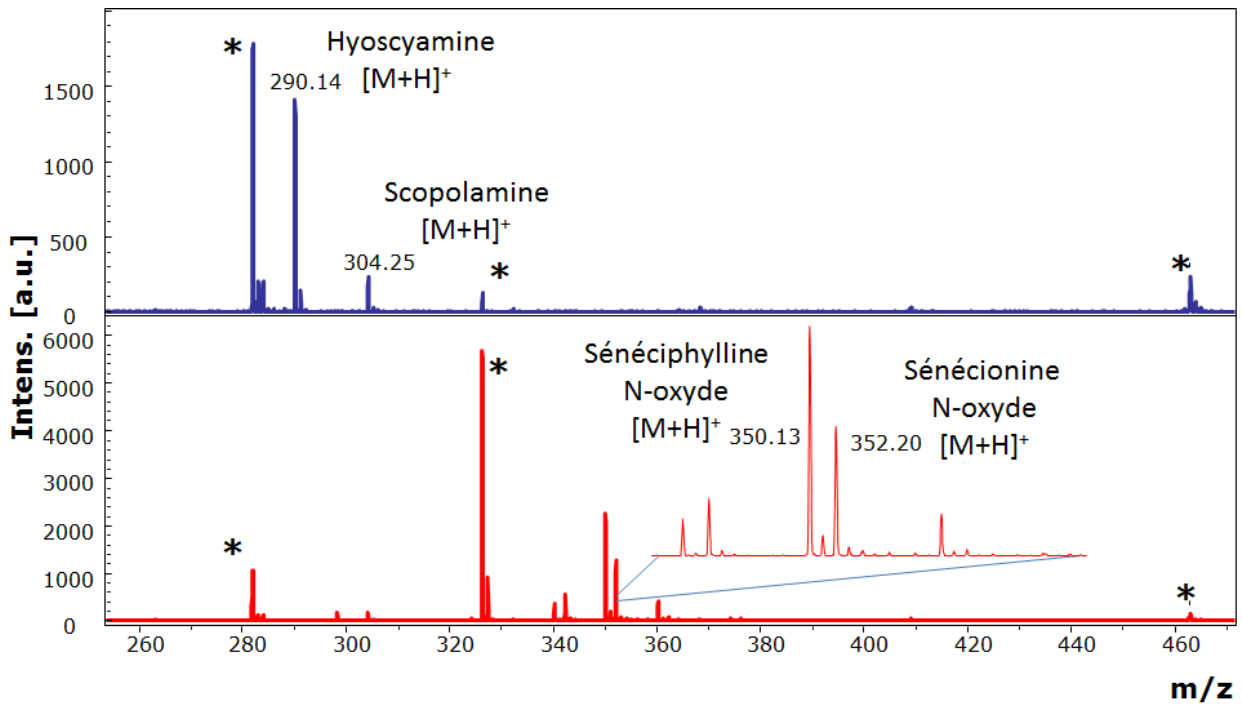


Figure IV-30 : Spectres MALDI avec PFPT3P des poudres de plantes pulvérisées: la belladonne (haut) et *Senecio vulgaris* (bas). * =ions de la matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

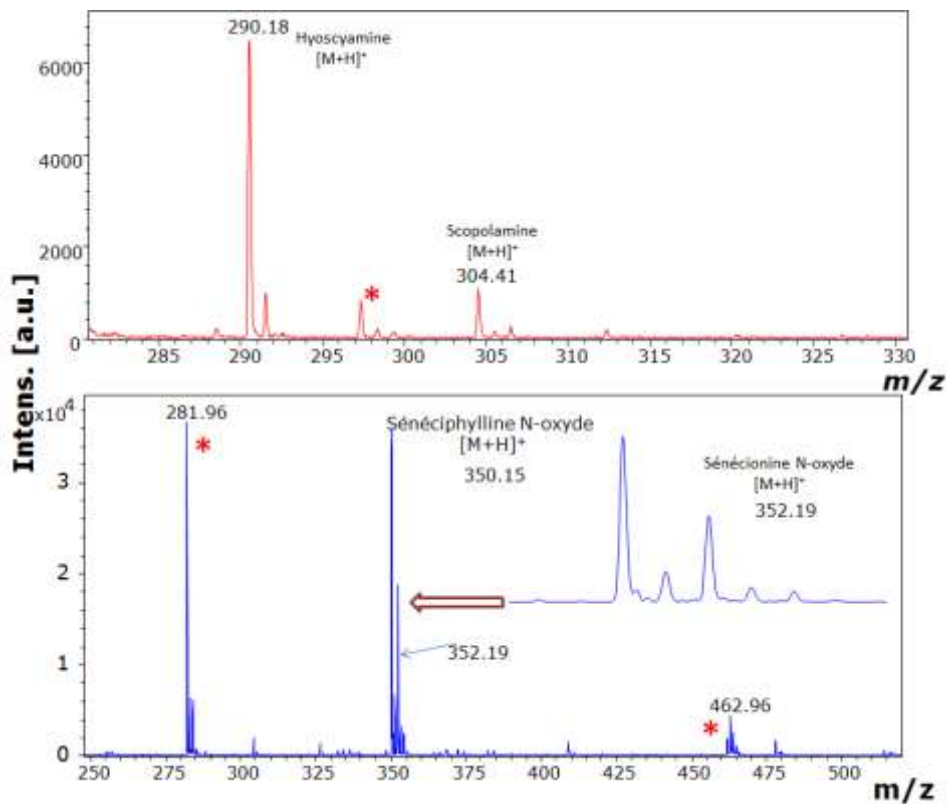


Figure IV-31 : Spectres MALDI des extraits de belladonne (en haut) avec MT3P et *Senecio vulgaris* (en bas) avec PFPT3P. * =ions de la matrice ; puissance laser 35% (58,8 μ J).

Ainsi, ces résultats préliminaires démontrent que le profil d'alcaloïdes peut être obtenu directement à partir des drogues en évitant les processus complexes et multi-étapes de préparation des échantillons. Les résultats suggèrent que PFPT3P peut être utilisée en MALDI-MS comme une méthode alternative pour la caractérisation et le criblage direct des alcaloïdes dans les plantes. Cette méthode complète donc les techniques d'analyse non destructives comme le proche infra-rouge.

7. Conclusion

Nous avons synthétisé et testé un large panel de molécules (28 molécules) bithiophéniques comme matrices pour l'analyse sélective des alcaloïdes, l'objectif étant de trouver une nouvelle BM plus performante que celle de référence, MT3P. Parmi les dérivés préparés, 22 sont testés en MALDI pour la première fois. Au regard de la diversité structurale qui pourrait être créée en série bithiophénique, seule une partie limitée a été explorée. Le design de nouvelles matrices s'est en fait appuyé sur les données de la littérature concernant les matrices courantes ou récentes, et aussi en intégrant les données concernant les interactions de certaines phases stationnaires avec les alcaloïdes dans le cadre de chromatographies. Les matrices synthétisées ont été comparées à une matrice courante (CHCA) dans un premier criblage portant uniquement sur des composés simples de structure alcaloïdiques, et en prenant aussi en compte les caractéristiques spectroscopiques des matrices qui sont importantes pour assurer le transfert de l'énergie des photons aux analytes. Ce premier criblage permet d'identifier cinq composés (IPT3P, PFPT3P, CMT3P, ET3P et BTA) qui fournissent de bons rendements d'ions d'alcaloïdes et sont retenus pour une deuxième phase d'évaluation qui couvre diverses familles de produits naturels et différents milieux biologiques (ou mélanges). Parmi les matrices bithiophéniques, le dérivé fluoré PFPT3P s'avère le plus efficace. Il présente comme l'ensemble des BMs testées une meilleure sélectivité que CHCA vis à vis des alcaloïdes. Son utilisation pour analyser les alcaloïdes dans différents mélanges complexes est alors évaluée, d'autant que cette matrice génère peu d'ions fragments qui pourraient se superposer à ceux des analytes dans la zone des bas poids moléculaires ($m/z < 500$ Da). PFPT3P s'avère plus performant que CHCA pour analyser les alcaloïdes dans différents mélanges complexes tels que des extraits bruts de plantes, des insectes, et des solutions bio-actives commerciales (médicament et répulsif).

Cette matrice comporte un motif 2,2'-bithiophène disubstitué par du soufre en 5 et 5' qui favorise l'absorption des photons du laser, et des bras pentafluorophényle et 2-cyanoéthyle. La conception de cette molécule a été inspirée par les travaux de Petruczynik²⁶⁷ qui a constaté que

Chapitre IV : Synthèse et évaluation de nouvelles matrices bithiophéniques

les phases stationnaires greffées de groupements cyanoalkyle et pentafluorophényle sont efficaces dans la rétention des alcaloïdes en chromatographie liquide. L'affinité de ces phases stationnaires pour les alcaloïdes est expliquée par :

- des interactions π - π grâce au noyau aromatique entre les molécules d'alcaloïdes et ces fonctions. Les atomes de fluor très électronégatifs appauvrissent le cycle en électrons. Le noyau aromatique PFP agit alors comme un acide de Lewis capable d'interagir avec les donneurs d'électrons (base de Lewis).
- les liaisons carbone-fluor du cycle PFP polarisées permettent des interactions dipôle-dipôle et des liaisons hydrogènes entre les alcaloïdes et l'atome de fluor électronégatif.

Les groupements nitrile et pentafluorophényle de PFPT3P favorisent donc une interaction de la matrice avec les alcaloïdes, et donc le transfert de l'énergie apportée par le laser. D'autre part, les molécules possédant ce groupement aromatique possèdent une bonne performance en transport de charge, ce qui peut expliquer l'utilisation de matrice fluorées pour l'analyse par MALDI de composés pharmaceutiques³⁰¹. Comparé à la matrice bithiophénique MT3P référence au départ de cette étude, PFPT3P conduit en moyenne à une ionisation des alcaloïdes trois fois supérieure. De plus, l'analyse des alcaloïdes avec cette nouvelle matrice est aussi réalisée avec une meilleure répétabilité intrajour. Notons aussi que cette matrice a aussi permis l'ionisation des alcaloïdes dans des milieux biologiques, alors que les matrices courantes ne sont pas aussi efficaces dans des tels milieux.

Les caractéristiques de cette matrice conduisent à choisir PFPT3P comme nouvelle matrice bithiophénique de référence, et ouvrent de nouvelles pistes d'application pour l'analyse qualitative ou quantitative d'alcaloïdes par MALDI.

Chapitre V : Approche mécanistique

Chapitre V : Approche mécanistique

1. Introduction

Malgré le vaste domaine d'application du MALDI, ses aspects mécanistiques et la nature du processus d'ionisation manquent encore de clarté. Si différentes théories portent sur le processus d'ionisation en MALDI et plus particulièrement sur la formation des ions, la désorption, le comportement dans la plume,³⁰²⁻³⁰⁴ celle qui fait le plus consensus est le modèle d'ionisation à deux étapes (*two-step framework*) proposé par R. Zenobi³⁰⁵ et R. Knochenmuss aussi dénommé modèle dynamique chimique et physique couplé CPCD (de l'anglais : *Coupled Chemical and Physical Dynamics Model*)^{306,307}. Dans ce modèle, la première étape correspond au mécanisme d'ionisation primaire à partir de la matrice. Elle débute au moment où l'impulsion du laser atteint la surface du mélange matrice-analyte cristallisé, et ne dure que quelques nanosecondes (3 à 5 ns, c'est à dire la durée d'impulsion d'un laser N₂ ou Nd-YAG) et s'étend sur une très faible distance (10 à 15 μm). Cette première étape est suivie d'une ionisation secondaire, cette fois-ci plus longue, et qui dure une dizaine de microsecondes. Cette seconde phase implique l'interaction en phase gazeuse des ions primaires actifs et des molécules d'analyte non-ionisées. Les différents modèles pour la génération d'ions primaires sont encore divergents. Par contre, le mécanisme d'ionisation secondaire est moins sujet à controverse.

Contrairement aux techniques d'ionisation par spray (en phase condensée), celles en phase gazeuse reposent toutes sur le fait que la formation des ions a lieu après la vaporisation de l'échantillon. L'ionisation est de ce fait majoritairement dépendante des propriétés thermodynamiques en phase gazeuse des composés, telles que l'énergie d'ionisation (EI) ou l'affinité protonique (AP). De ce fait, quel que soit le mécanisme de formation et de libération des ions dans l'étape d'ionisation primaire, les ions sont soumis éventuellement à des réactions secondaires, et la réaction de transfert de proton est probablement la plus importante parmi les réactions secondaires. Dans le cadre de la détection des analytes, le transfert qui présente le plus d'intérêt est celui réalisé de la matrice protonée vers l'analyte :

Analyte + Matrice-H⁺ → Analyte-H⁺ + Matrice.

2. Généralités sur l'ionisation

Pour une molécule existant à l'état neutre, plusieurs processus peuvent conduire à son ionisation :

- L'apport d'énergie à une molécule possédant un nuage électronique polarisable peut éjecter un ou plusieurs électrons. Si l'énergie est trop forte, cela peut même aboutir à générer des ions de fragmentation de la molécule.
- La capture d'électrons permet aussi d'ioniser une molécule. Ce mode d'ionisation dépend du caractère électrophile et de l'électronégativité des atomes constituant la molécule.
- La protonation/déprotonation conduit aussi à l'ionisation et ce gain/perte de proton conduit à des entités chargées positivement/négativement.
- Finalement, une molécule peut aussi s'ioniser par le phénomène de formation des adduits : un ion chargé se « lie » par interaction ion-dipôle à la molécule (ex : $[M+Na]^+$).

Selon le mode d'ionisation, certains types d'ions sont plus probables dans une technique que dans une autre. Par exemple en impact électronique, l'ionisation se déroule uniquement par éjection d'électrons seulement, tandis qu'en ESI l'ionisation se fait par protonation, déprotonation ou formations d'adduits. Concernant le MALDI, plusieurs types d'ions formés par transfert d'électrons, de protons et de cations³⁰⁸ peuvent être détectés, ce qui signifie que plusieurs réactions d'ionisations sont observées selon cette technique.

Le phénomène d'ionisation est donc en spectrométrie et plus particulièrement en MALDI très complexe et dépendant des propriétés thermochimiques³⁰⁹ des composés présents (matrices et analytes) et par conséquent nous étudierons, parmi ces propriétés, l'affinité protonique et l'énergie d'ionisation de la matrice MT3P.

3. Affinité protonique de la matrice MT3P

L'acidité et la basicité de molécules sont des concepts fondamentaux de la chimie et sont au cœur de la compréhension de la réactivité chimique³¹⁰. La cinétique et la thermodynamique des réactions de transfert de protons en phase gazeuse sont essentielles pour analyser le site préféré de la protonation de molécules polyfonctionnelles, ce qui facilite la compréhension de leur réactivité chimique³¹¹.

L'AP est l'énergie à fournir (en phase gazeuse) à un analyte déjà protoné afin qu'il cède son proton pour revenir à l'état neutre. Par exemple pour les alcaloïdes, c'est l'énergie fournie à la forme protonée ammonium $(R)_3NH^+$ pour reformer la base $(R)_3N$. Pour certains auteurs, l'AP est

proportionnelle à la basicité des substances dans la phase gazeuse³¹². Ainsi les alcaloïdes sont des composés azotés à caractère généralement basique qui forment des espèces protonées ammoniums stables. Leur AP est donc assez grande, il faut leur fournir une quantité importante d'énergie pour déstabiliser ces ammoniums et qu'ils expulsent un proton. En d'autres termes, plus leur AP est grande, plus ils sont aptes à capter un proton et à s'ioniser. L'AP de grandes familles de composés organiques a été déterminée par différentes méthodes, puis répertoriée par Harrison³¹³, et celles des amines aliphatiques, aromatiques (anilines) et des pyridines sont situées entre 853-983 KJ.mol⁻¹, et sont des AP élevées. Le transfert de proton est favorable avec la majorité des composés contenant un atome d'azote qui ont généralement des AP supérieures à celles des matrices courantes³⁰⁵.

La matrice est une partie clé de l'ionisation, de sorte que les propriétés de la matrice telles que l'affinité du proton a été examinée³⁰⁶. La matrice MT3P récemment développée n'a jamais fait l'objet d'études portant sur ses propriétés thermochimiques, qui restent ainsi indisponibles. Une telle étude permettra de situer MT3P par rapport aux autres matrices courantes et par rapport aux alcaloïdes.

Nous allons donc déterminer l'AP de MT3P par deux méthodes : la première est théorique par calcul, l'autre est expérimentale, par la méthode cinétique de Cooks^{314,315}. Une telle étude peut aider à mieux comparer MT3P avec les matrices courantes, et à analyser la spécificité de MT3P vis-à-vis des alcaloïdes. Le Tableau V-1 ci-dessous donne les valeurs de pKa de certains alcaloïdes utilisés dans mes travaux. Bien que cette constante est en relation avec un comportement en solution dans l'eau et non en phase gazeuse, elle caractérise les alcaloïdes étudiés dont les AP, à l'exception de celle de la nicotine (AP = 963,4 KJ.mol⁻¹),³¹⁶ ne sont pas connues dans la littérature. L'ordre de basicité des simples amines aliphatiques dans des solutions aqueuses est NH₃ < primaire < secondaire < tertiaire. Des mesures de basicité et des affinités protoniques en phase gazeuse par Aue et *al.*³¹⁷ ont établi le même ordre : NH₃ < CH₃NH₂ < (CH₃)₂NH < (CH₃)₃N pour Ces deux paramètres.

Alcaloïdes	pKa ₁	pKa ₂	Température (°C)
Atropine	9,85	18	
Benzoylécgonine	11,80		25
Berbérine	11,73		18
Brucine	8,16	2,50	15
Cocaïne	8,39		24
Codéine	8,21		25
Colchicine	1,85		15
Emétine	8,43	7,56	15
Harmine	7,61		20
<i>l</i> -Hyoscyamine	9,65		21
Nicotine	8,02	3,12	25
Pilocarpine	6,87		30
Quinidine	8,77	4,2	15
Quinine	8,34	4,3	20
<i>l</i> -Scopolamine	7,55		23
Spartéine	11,96	4,8	15
Strychnine	8,26	2,5	25
Yohimbine	7,45	3,0	23

Tableau V-1 : Valeurs des pKa des alcaloïdes dans l'eau³¹⁸.

3.1. Méthode par calcul

Au cours des dernières années, la chimie théorique a joué un rôle important en renforçant et complétant la recherche expérimentale. Nous avons donc réalisé une détermination théorique de l'affinité protonique de MT3P par les calculs d'orbitales moléculaires fondés, sur la méthode *ab-initio*.

Bourcier et Hoppilliard³⁰⁹ ont montré que le calcul des orbitales moléculaires, employant la méthode hybride B3LYP avec la base 6-311+G(2d,2p), permet de calculer les propriétés thermochimiques des matrices MALDI. Une étude très récente³¹⁹ a prouvé aussi l'efficacité de cette méthode pour le calcul d'AP d'une nouvelle matrice. Nous avons utilisé la même approche pour calculer l'AP de MT3P, CHCA et DHB. Etant donné que CHCA et DHB ont été étudié par plusieurs groupes, nous avons décidé de calculer l'AP et l'EI d'une de ces deux dernières matrices pour valider la méthode utilisée, avant de l'appliquer dans notre travail. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire MOLTECH-Anjou par Thomas CAUCHY qui évalue l'AP du DHB à 854 KJ.mol⁻¹, soit une valeur proche de celle de la littérature (AP DHB = 852 KJ.mol⁻¹)³⁰⁹, ainsi que l'EI à 7,85 eV avec un écart de 0,01 eV de la littérature (7,86 eV)³⁰⁹. Ces résultats valident la méthode de calcul retenue. L'affinité protonique de MT3P a ensuite été calculée en ciblant plus particulièrement le comportement des atomes les plus susceptibles de capter un proton, à savoir l'azote et le soufre portant le bras propionitrile (Schéma V-1). Les résultats montrent que l'AP de

MT3P au niveau du soufre est légèrement inférieur à ceux des matrices CHCA et DHB (Tableau V-2), ainsi que l'AP de MT3P est supérieure au niveau du soufre comparée à l'azote. En outre, la matrice MT3P possède une AP certainement plus faible que celle des alcaloïdes, les amines simples³²⁰ (Tableau V-3, Schéma V-2) et donc par extrapolation les alcaloïdes étant des composés présentant une AP élevée. Cette hiérarchie des affinités protoniques contribue à expliquer le rôle de matrice de MT3P pour détecter les alcaloïdes : l'AP de MT3P étant inférieure à celle des alcaloïdes, une forme protonée de MT3P transfèrera sa charge à l'analyte alcaloïdique en phase gazeuse permettant ainsi sa détection, probablement sous forme $[M+H]^+$. De plus, les AP déterminées par le calcul pour MT3P sont inférieures à celle des matrices classiques CHCA et DHB. L'ionisation des alcaloïdes est donc plus facile en présence de MT3P, ce qui contribue à expliquer l'efficacité de MT3P comparé aux autres matrices dans l'analyse de ce groupe particulier de métabolites secondaires.

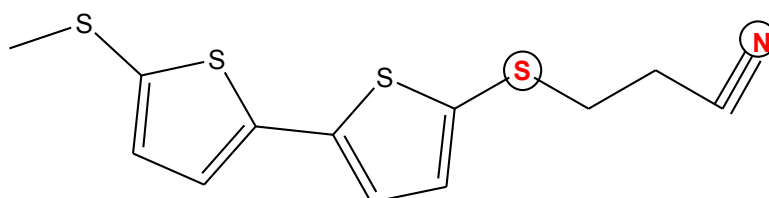


Schéma V-1 : Structure de MT3P et les sites ciblés (en rouge) pour le calcul de l'affinité protonique.

	2,5-DHB	CHCA	N/MT3P	S/MT3P
AP (KJ.mol ⁻¹)	854	858	818	849
EI (eV)	7,85	8,31	6,71	

Tableau V-2 : AP et EI déterminées par calcul selon la méthode hybride B3LYP avec la base 6-311+G(2d,2p).

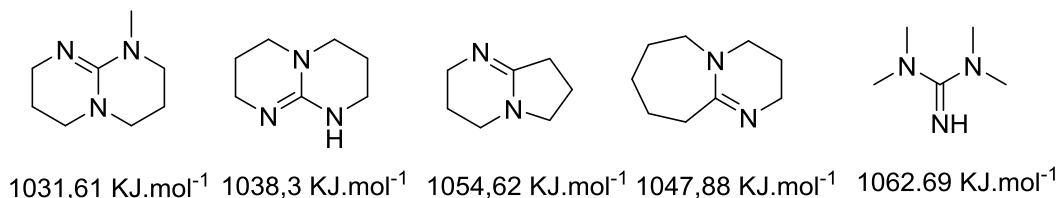


Schéma V-2 : Affinités protoniques des quelques amines tertiaires³²¹.

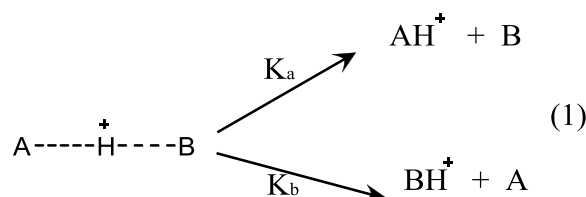
Il faut noter que la valeur de l'énergie d'ionisation de MT3P déterminée par calcul (6,71 eV) est aussi plus faible que celle des autres matrices étudiées (7,85 eV pour 2,5-DHB et 8,31 eV pour CHCA), et aussi de la plupart des matrices dont la littérature rapporte des EI dans la gamme de 7 à 10 eV^{302,322}. Une explication de cette valeur basse d'EI de MT3P est à relier avec la présence

dans la même molécule de nombreux hétéroatomes (quatre soufres) combinés dans un système π ³²³. L'intérêt de l'EI dans le mécanisme MALDI sera étudié dans la suite de ce chapitre.

3.2. Méthode cinétique

Afin de confirmer les résultats obtenus par la méthode de calcul, une méthode expérimentale a été utilisée. La méthode cinétique dite de Cooks³¹⁵ est une méthode permettant de déterminer certaines grandeurs telles que les affinités protoniques, électroniques ou cationiques ainsi que les basicités et les acidités en phase gazeuse à partir d'expériences faites sur différents types de spectromètres de masse (ESI dans notre cas).

L'affinité protonique d'un composé A n'est pas déterminée par l'enregistrement d'un spectre de masse du composé A seul, mais par celui du mélange de A avec un composé B dont l'affinité protonique est connue. En effet dans ce cas, un dimère protoné $[A-H-B]^+$ se forme initialement et se décompose ensuite en ions fils AH^+ et BH^+ selon l'équation (1) suivante et avec des constantes de vitesse k_A et k_B .



Pour ce processus cinétique, Cooks a montré que le logarithme du rapport des constantes de vitesse k_A et k_B pour la dissociation compétitive d'un ion de cluster comprenant le composé A à étudier (ici MT3P) et d'un composé de référence B, dont l'AP est connue, est égal au logarithme du rapport des intensités des signaux des ions AH^+ et BH^+ . Cette valeur qui peut être déduite expérimentalement de l'enregistrement du spectre de masse est reliée à la différence d'affinité protonique entre les deux composés A et B (respectivement AP_A et AP_B) selon la relation suivante (2) pour laquelle R est la constante des gaz parfaits, et T_{eff} est la température effective du dimère protoné.

$$\ln \frac{k_A}{k_B} = \ln \frac{[AH]^+}{[BH]^+} = \frac{AP_A - AP_B}{RT_{eff}} \quad (2)$$

Dans cette relation (2), les effets d'entropie sont considérés comme négligeables. Jorgensen *et al.*³²⁴ ont utilisé cette méthode pour trouver l'AP en phase gazeuse de cinq matrices, par bombardement avec des atomes rapides ou FAB. Mirza *et al.*³²⁵ l'ont aussi utilisé pour évaluer les

AP de quinze matrices MALDI avec ionisation par électronébuliseur ou ESI. Ces résultats étaient en accord avec ceux obtenus par d'autres groupes sur la base de calculs théoriques.

La matrice MT3P a été développée pour analyser des alcaloïdes. Toutefois, les affinités protoniques de ces produits naturels, de structures complexes, ne sont pas connues : nous remplaçons donc dans cette expérience les alcaloïdes par plusieurs molécules de référence (proposées par Edward et Lias³¹⁶). Après la sélection du pic d'intérêt (celui du dimère $[A-H-B]^+$) par le premier analyseur quadripôle (MS_1), les pics des produits de dissociation sont obtenus par le deuxième quadripôle (Figure V-1). Les données expérimentales ont été recueillies à une énergie de collision de 10 eV, l'acquisition était enregistrée sur une durée de 40 s, et le spectre moyen des valeurs a été retenu.

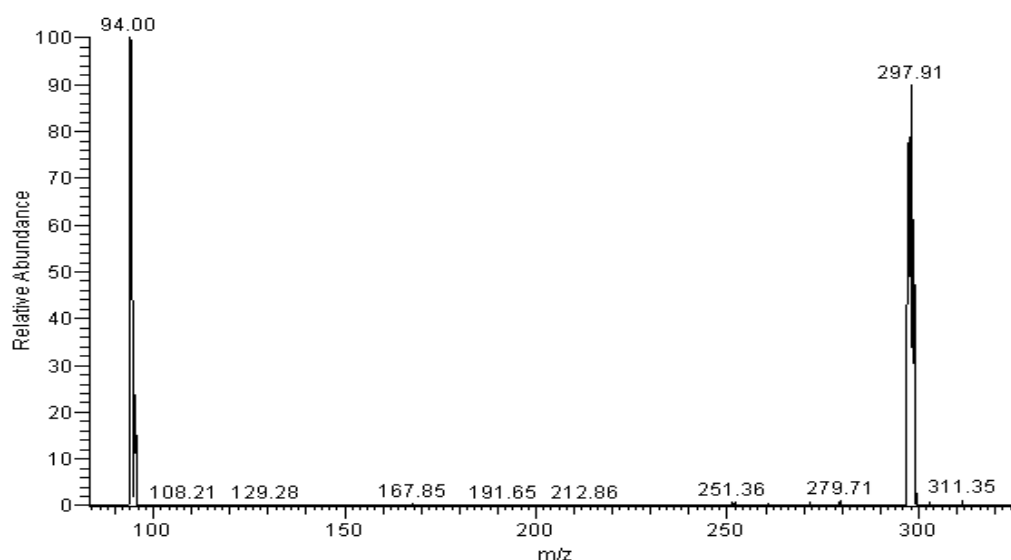


Figure V-1 : Spectre des ions fils des dimères de la matrice MT3P avec l'aniline à une énergie de collision de 10 eV.

Le Tableau V-3 regroupe les composés de références utilisés³²⁵, tandis que la Figure V-2 montre le tracé obtenu à partir des résultats avec une énergie de collision de 10 eV.

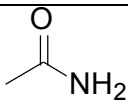
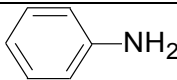
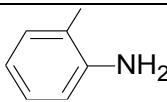
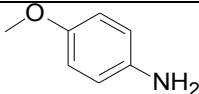
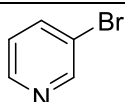
Substances	Affinité protonique KJ.mol ⁻¹	Structure
Acétamide	863,6	
Aniline	882,4	
o-Toluidine	890,8	
4-Anisidine	900,4	
3-Bromopyridine	910,1	

Tableau V-3 : Valeurs des affinités protoniques des bases de référence³²⁵.

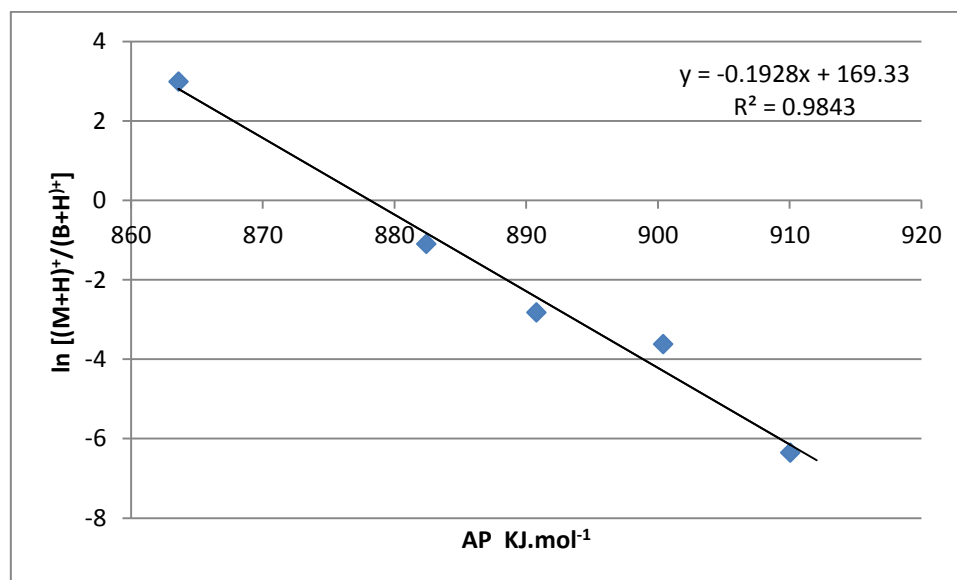


Figure V-2 : Logarithmes des ratios des produits de la dissociation des ions des dimères [A—H—B]⁺ sur les AP des bases de référence pour une énergie de collision de 10 eV.

La valeur apparente de l'AP de MT3P est obtenue par extrapolation de la valeur de $\ln([\text{MH}]^+ / [\text{RefH}]^+)$ à zéro (l'abscisse à l'origine). Par conséquent, la valeur de l'AP de MT3P déterminée expérimentalement est de 878 KJ.mol⁻¹.

3.3. Bilan

L'AP de MT3P a été déterminé par deux méthodes, et la valeur obtenue par la méthode théorique (AP = 849 KJ.mol⁻¹) diffère de celle par la méthode expérimentale (AP = 878 KJ.mol⁻¹). Toutefois, de telles différences ont été observées lors de l'étude de différentes matrices.³²⁶ Schultz *et al.*³²⁷ par exemple étudient CHCA et l'acide sinapique SA et observent une différence d'environ 30 KJ.mol⁻¹ lors des déterminations expérimentale et par calcul de l'AP (Tableau V-4). Dans notre cas, la méthode de détermination de l'AP par calcul théorique doit probablement être affinée dans la mesure où elle ne prend pas en compte le comportement de la totalité des ions en phase gazeuse. En outre, MT3P contient quatre atomes de soufre, ce qui complexifie son étude théorique comparé aux matrices de la littérature ne comportant qu'oxygène et azote comme des hétéroatomes. Une telle situation nécessite une optimisation de la méthode de calcul³⁰⁹.

Matrices	AP calculée	AP expérimentale ³²⁵
CHCA	812	841,5
SA	905	876

Tableau V-4 : Détermination par calcul et expérimentale de l'AP de deux matrices selon Schultz³²⁷ (en KJ.mol⁻¹).

Pour valider nos résultats expérimentaux, il faudrait aussi les répéter et essayer d'autres composés de références. Même si des différences existent entre les déterminations expérimentale et basée uniquement sur le calcul, la valeur de l'AP de MT3P la plus élevée (MT3P_{exp} déterminée expérimentalement = 878 KJ.mol⁻¹) est plus faible que celles de la majorité des amines qui selon la littérature sont au-delà de 853 KJ.mol⁻¹. De plus, parmi ces valeurs de la littérature, les plus faibles sont principalement celles d'amines primaires. Par conséquent, l'AP de MT3P est certainement plus faible que celles de la majorité des alcaloïdes qui dans la plupart des cas comportent des fonctions amines tertiaires ou secondaires. En d'autres termes, en complément de la capacité de MT3P à capter l'énergie des photons du laser, cette matrice aide l'ionisation des alcaloïdes en phase gazeuse et particulièrement leur protonation. L'AP de MT3P étant plus faible que celle des alcaloïdes, la compétition entre les deux entités à capter les protons dans le milieu est en faveur de l'analyte, ce qui favorise sa détection par spectrométrie de masse.

4. Mécanisme proposé

Aujourd'hui, afin de développer la technique MALDI, il convient de mieux appréhender le mécanisme qui régit cette source d'ionisation. Dans cette partie, en se basant sur les résultats et les observations obtenus avec MT3P et d'autres BMs testées, nous ferons des propositions pour élucider le mécanisme et les réactions menant à l'ionisation des alcaloïdes dans la source. Comme déjà mentionné dans l'introduction, le modèle d'ionisation en deux étapes est le modèle le moins controversé. Ce processus est caractérisé par deux intervalles de temps différents. La première étape de moins de 20 ns après l'irradiation du laser, suivie par l'étape d'ionisation secondaire qui dure environ quelques microsecondes après l'irradiation (Figure V-3).

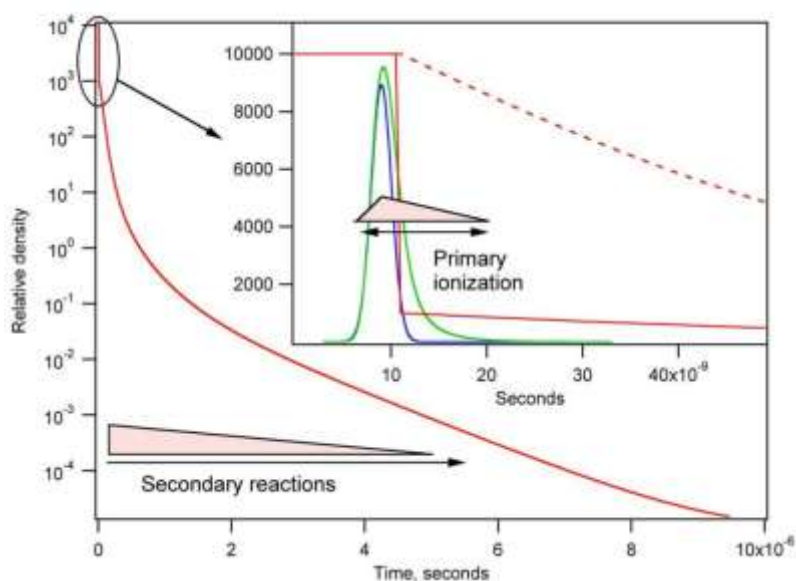


Figure V-3 : Représentation de la densité relative du plumeau en fonction de son temps d'expansion.

Illustration des échelles de temps des deux phases d'ionisation¹⁴⁷.

Pour débiter et bien comprendre les phénomènes en cours lors de l'analyse des alcaloïdes en présence de MT3P, il est intéressant d'étudier le comportement de la matrice seule. Sur le spectre de MT3P filtré en mode positif, on peut noter la présence du pic moléculaire qui correspond au cation radical ($M^{+\bullet}$) de masse égale à $m/z = 296,94$ Da, accompagné d'un deuxième pic, qui correspond à la perte du bras propionitrile, le plus souvent de même intensité que le pic moléculaire à $m/z = 242,94$ Da, et d'autres pics d'intensité moins importante à $m/z = 312,15$ et $351,20$ Da (Figure V-4). Lorsque l'analyse est réalisée en sélectionnant les ions négatifs (mode négatif), le spectre (Figure V-4) contient davantage de pics de fragmentation. La plus forte intensité correspond au signal de $m/z = 281,93$ attribué à $[M-CH_3]^{-\bullet}$. Les structures proposées, des fragments ayant les grandes intensités, sont dans la Figure V-5.

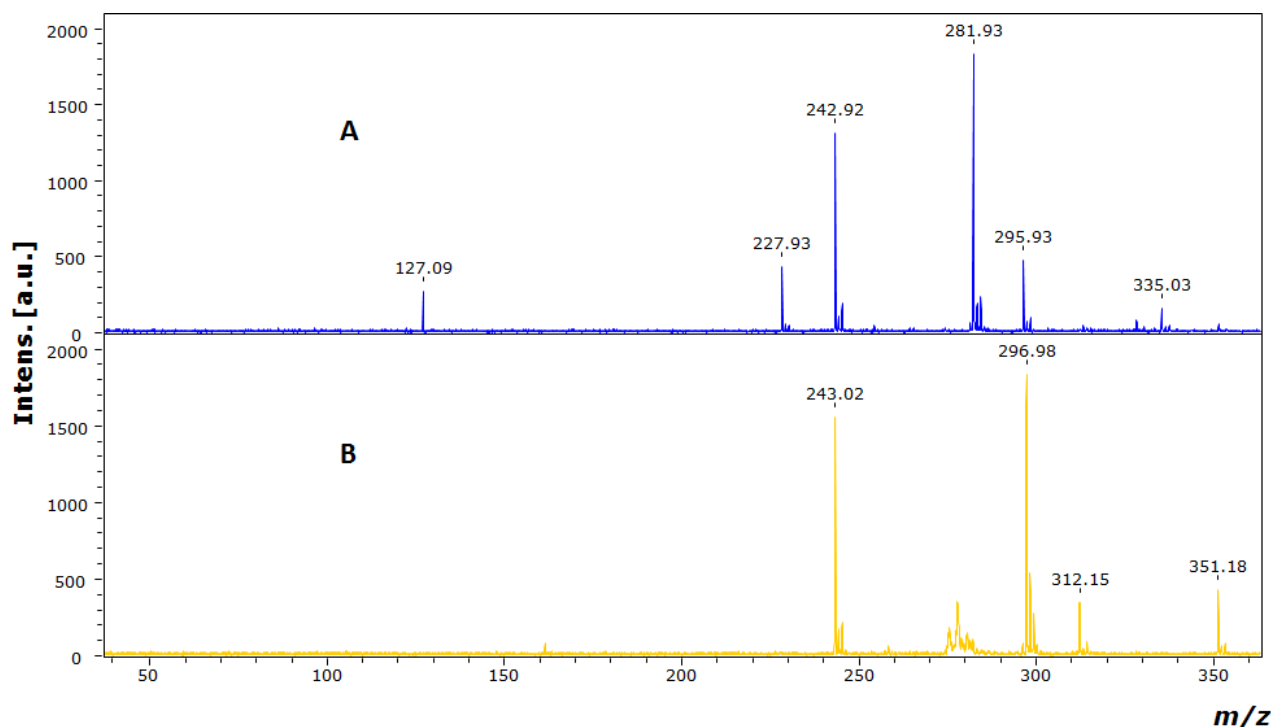


Figure V-4 : Spectres LDI de MT3P en mode négatif (A) et positif (B). Les pics à $m/z = 335,03$ (spectre A) et $m/z = 312,15$ et $351,18$ (spectre B) sont des adduits de la matrice (avec un groupement méthyle et propionitrile). (150 accumulations, énergie du laser = 42,2 μJ).

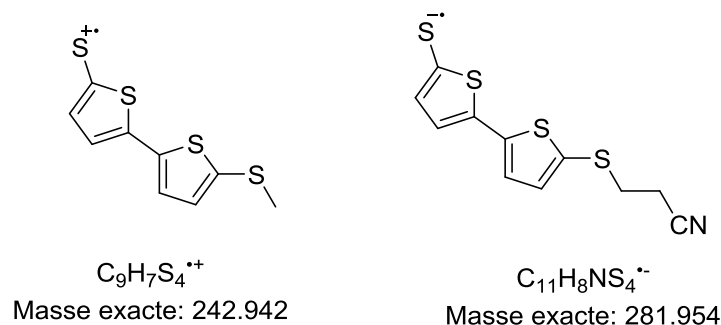


Figure V-5 : Structures proposées des fragments les plus intenses en mode positif.

Par ailleurs, en SM les isotopes naturels produisent des pics de masse à $m+1$ et $m+2$ d'abondance caractéristique de la composition atomique de l'entité correspondant.

Théoriquement, le massif isotopique du cation radicalaire de MT3P doit avoir un pic à $M+1$ avec une intensité environ de 1,1 % pour chaque carbone de la pic moléculaire (pour MT3P 12 C x 1,1 % environ 13,2 %) et un pic à $M+2$ pour les isotopes des sulfures d'intensité 4,2 % pour chaque atome de soufre (4 S x 4,2 environ 16,8 %).

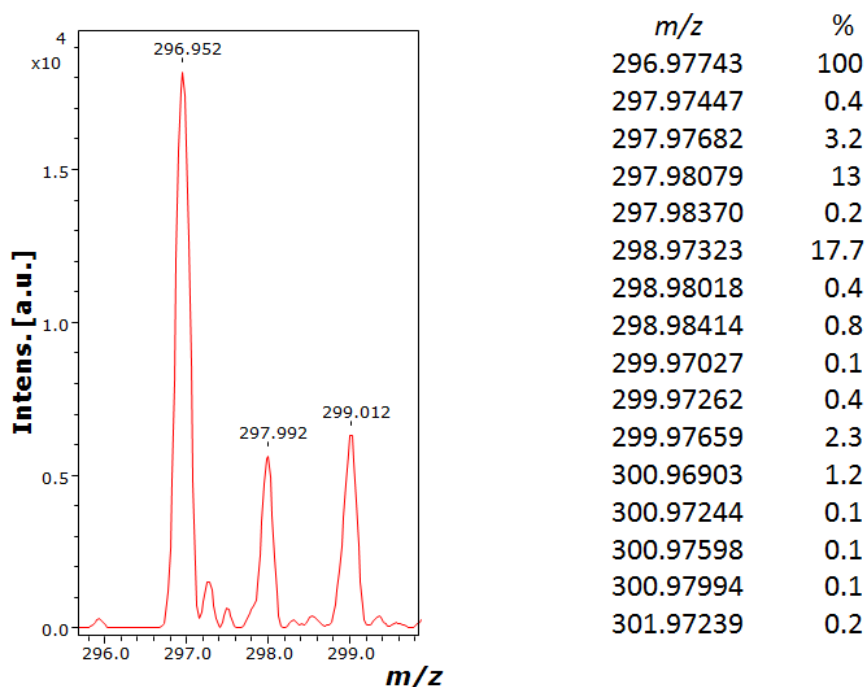


Figure V-6 : Massif isotopique du pic moléculaire de la matrice MT3P avec la distribution isotopique calculée (sur le site/www.sisweb.com) pour la molécule de formule $C_{12}H_{11}NS_4$.

D'après l'amas isotopique obtenu (en mode positif) (Figure V-6), le pic à $M+1$ n'est pas simplement dus aux isotopes, mais plutôt à une combinaison avec $[M+H]^+$, c'est à dire à la somme de deux pics qui se superposent. D'autre part, l'intensité de ce pic varie toujours entre 30 et 35 % de celle du pic moléculaire isotopique (M^+).

Pour résumer, l'ionisation de la matrice MT3P génère des ions $[M]^{+\bullet}$ et $[M+H]^+$ en mode positif ainsi que des pics de fragmentation et des adduits. En mode négatif, le pic $[M-H]^-$ est le pic pseudo-moléculaire, et des fragments sous formes des anions radicalaires sont aussi présents. Notons dans ce cas l'absence de l'ion moléculaire $[M]^{-\bullet}$.

Les alcaloïdes sont les partenaires des molécules de la matrice dans l'ionisation, et ils sont détectés sous forme des pics quasi-moléculaires $[M+H]^+$. Pour certains, un pic $[M-H]^{+\bullet}$ est présent.

4.1. L'ionisation primaire

L'ionisation primaire correspond à la formation des premiers ions, générés à partir d'espèces neutres simultanément ou immédiatement après l'irradiation laser. Les ions de cette étape dérivent le plus souvent des molécules de matrices les plus abondantes. Plusieurs modèles sont utilisés pour décrire l'ionisation primaire. Les principaux suggèrent que la photo-ionisation par « photoexcitation » et/ou « la mise en commun d'énergie » (en anglais *energy pooling*) sont les

deux mécanismes majeurs responsables de l'apparition des ions à cette étape. L'énergie d'ionisation est, par définition, l'énergie à fournir à la substance afin de lui arracher un électron. L'absorption d'un photon dont l'énergie est supérieure au seuil d'ionisation peut conduire à l'ionisation ou à la formation d'une espèce neutre excitée. En principe en MALDI-UV, l'énergie des photons du laser UV est beaucoup plus faible (Tableau V-5) que celle nécessaire pour l'ionisation des matrices (Tableau V-6).

Type de laser	Milieu actif		Longueur d'onde, en nm	Energie des photons, en eV
Laser à solide	Nd-YAG*	Triplet	355	3,53
		quadruplet	266	4,71
Laser à gaz	N ₂		337	3,72

Tableau V-5 : Énergies de photons selon le type de laser (*=néodym-yttrium aluminium garnet).

Matrices	EI (eV)
Acide sinapique	7,72
DHB	8,19
DCTB*	8,22
HABA	8,32
CHCA	8,50
Acide nicotinique	9,63

Tableau V-6 : Énergie d'ionisation de certaines matrices³⁰⁸ (*= acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque).

4.1.1. Photoexcitation (ionisation multiphotonique directe)

Contrairement à la théorie simple de l'effet photoélectrique d'Einstein³²⁸, un atome peut être photo-ionisé même si l'énergie des photons incidents est plus petite que son EI. Il peut en effet absorber, non pas un seul, mais deux³²⁹ ou plusieurs photons lui fournissant une énergie globale supérieure à l'EI (Figure V-7). Ce phénomène est appelé ionisation multiphotonique MPI.

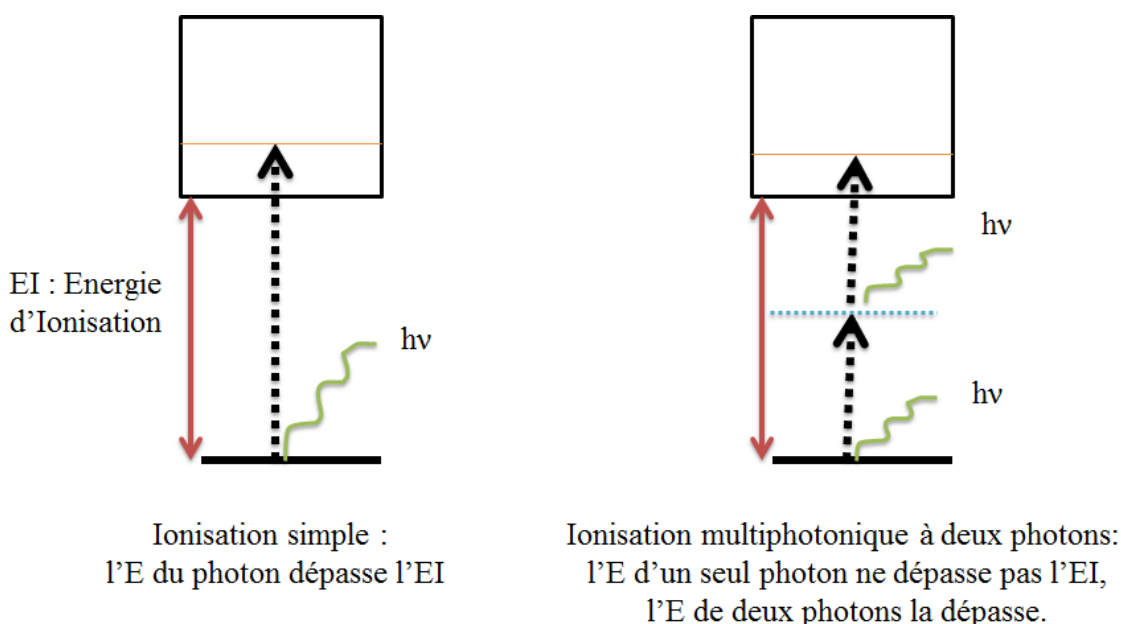


Figure V-7 : Schéma de l'ionisation simple photon et ionisation multiphotonique à deux photons.

4.1.2. Mise en commun d'énergie (energy pooling)

Se basant aussi sur la photoexcitation, le modèle de *pooling* se traduit par la redistribution de l'énergie d'excitation électronique avec transfert ou mise en commun de quantum d'énergie dit «exciton» entre deux molécules voisines^{330,331}. Ce modèle a été mis au point pour surmonter les problèmes du modèle d'ionisation multiphotonique MPI³²². Ainsi, si l'énergie de MPI directe n'est pas suffisante pour provoquer une ionisation efficace des composés, elle peut provoquer des mécanismes de transfert d'énergie entre ces espèces. En principe, lorsque deux molécules voisines sont excitées au premier état d'excitation simultanément, l'un de ces deux composés peut revenir à son état fondamental S_0 en transférant son énergie à son voisin qui atteindra donc un état d'excitation supérieur S_1 , pour engendrer un état isoénergétique (Figure V-8). Le *pooling* $S_1 + S_1$ ne génère pas d'ions, cependant il mène à un état excité plus haut S_n ³⁰². La possibilité de migration d'énergie des états excités S_1 vers d'autres molécules adjacentes, via des sauts «*hopping*», augmente ainsi la possibilité d'un deuxième *pooling*, S_n-S_1 qui conduit à l'ionisation d'une molécule alors que l'autre se retrouve à l'état fondamental S_0 .

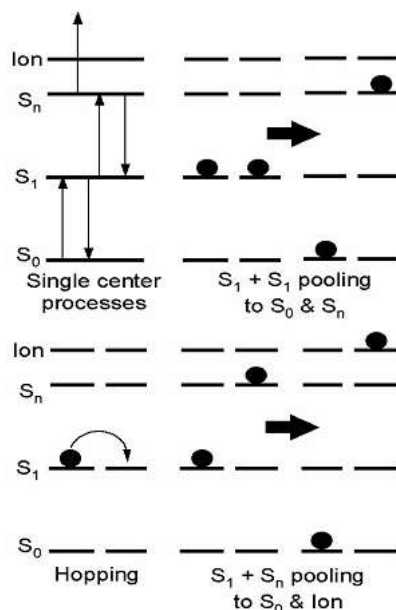
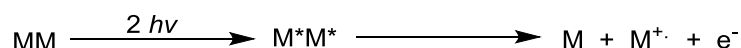


Figure V-8 : Illustration des processus unimoléculaire et bimoléculaire selon le modèle "pooling/photo-ionisation" d'après la littérature³⁰².

Ces transferts peuvent survenir si les molécules voisines sont suffisamment proches pour que leurs états électroniques interagissent. Dans les matrices MALDI, ces interactions se déroulent par contact des systèmes conjugués tout au long des molécules à l'état solide³⁰⁷.

Tout comme dans les modèles de photo-ionisation, une caractéristique du modèle de mise en commun d'exciton, est que le processus génère M^+ et non pas $[M+H]^+$.³³² Pour l'espèce $[M-H]^-$ observée en mode négatif, sa formation est expliquée par la capture d'un électron par M pour produire M^- .³³³, et ce dernier se convertit dans l'étape suivante en $[M-H]^-$ par perte d'un atome d'hydrogène. L'efficacité de ces réactions différant largement, il est peu probable que les cations et anions primaires aient des abondances similaires³²².

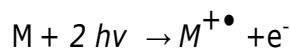


Concernant les radicaux de MT3P :

L'une des caractéristiques les plus importantes de la photo-ionisation avec la matrice MT3P est la présence d'ions radicaux M^+ .

Les calculs théoriques que nous avons réalisés ont montré que de la valeur de l'énergie d'ionisation de MT3P est de $EI = 6,71$ eV, valeur plus basse que certaines matrices courantes dont les valeurs d'EI sont respectivement de 7,85 et 8,31 eV pour 2,5-DHB et CHCA. D'autre part, il est établi dans la littérature que le potentiel d'ionisation des dérivés aromatiques est le double de l'énergie du premier état d'excitation S_1 .³³⁴ Généralement, si le premier photon parvient à favoriser le passage de la matrice à l'état excité S_1 , le deuxième photon est probablement suffisant pour ioniser la matrice. En effet, deux photons émis par le laser N_2 de

notre appareil fournissent une énergie de $2 \times 3,72$ eV, c'est à dire une énergie supérieure à l'énergie d'ionisation de MT3P (6,71 eV), ce qui autorise l'adoption d'un mécanisme d'ionisation directe des molécules de la matrice.



De plus, il faut noter que le caractère condensé de l'échantillon et la formation de clusters de molécules de matrice réduisent l'EI qui est alors plus faible que celle de la molécule à l'état libre³⁰⁵, ce qui favorise d'autant plus la photo-ionisation multiphotonique.

Si l'ionisation multiphotonique n'est pas efficace pour ioniser les molécules de la matrice, les propriétés des bithiophènes et particulièrement le phénomène d'empilement du type π - π *stacking*^{335,336} favorise l'intervention du deuxième modèle d'ionisation par *pooling*. De plus, les travaux de Xiao *et al.* ont montré qu'à l'état solide, des interactions S-S s'ajoutaient aux interactions Π - Π pour renforcer les contacts intermoléculaires³³⁷. En outre les travaux de Luschnitz et Seifert³³⁶ ont été basés sur le transport de charge par *hopping* entre les empilements lamellaire des molécules à base de thiophènes. Ces caractéristiques améliorent la possibilité de transmission d'excitons entre les différents molécules. De plus, l'évaluation des nouvelles molécules testées montre l'importance des deux soufres substituant le bithiophène en positions 5 et 5' pour l'ionisation des analytes : ces atomes jouent probablement un rôle essentiel dans le mécanisme d'ionisation.

En fait, en l'état de nos connaissances, il est difficile de choisir un des deux modèles sans des études plus spécialisées car avec les données présentes, les deux modèles sont possibles sans que l'un soit privilégié par rapport à l'autre. Une observation qui peut prouver l'exactitude de notre point de vue, c'est à dire de l'ionisation par photoionisation avec la molécule MT3P est le fait que l'ionisation des molécules de matrice et d'analytes est moins importante lorsqu'elle est réalisée avec un appareil MALDI TOF/TOF (Autoflex Speed, Bruker, 2013) dont le laser émet à la longueur d'onde de 355 nm (INRA, Nantes), c'est à dire avec des photons moins énergétiques. Cette observation suggère que la photo-ionisation a diminué lors du changement de la longueur d'onde du laser. Cette hypothèse pourrait être vérifiée aussi par des essais sur un instrument muni par exemple d'un laser à 266 nm, ou utilisant un laser multiphotoniques.

4.1.3. Ionisation secondaire

Lors de cette deuxième étape, des collisions entre les molécules d'analyte et celles de la matrice déjà ionisées ou excitées dans l'expansion du plumeau produisent les ions d'analytes dont la plupart sont produits par protonation ou déprotonation. En effet, les ions radicalaires des

analytes sont difficiles à observer étant donné que l'EI des matrices est généralement inférieure à l'EI des analytes.

i. Transfert d'électron

En principe dans ce processus, un électron est transféré vers un radical cation de matrice à partir d'une molécule d'analyte. Ce phénomène n'est possible que si les EI des analytes sont inférieures à celle de la matrice. Cette situation est toutefois peu probable dans la mesure où le calcul de l'EI de MT3P (6,71 eV) avait montré que cette valeur était faible. Sachant que l'énergie d'ionisation de la plupart des amines tertiaires se situe entre 7,2 et 8,5 eV³³⁸, MT3P n'est probablement capable d'ioniser qu'un nombre restreint de composés organiques selon ce mécanisme. Si cette hypothèse doit être confirmée en disposant des EI de chaque analyte, il n'est toutefois pas déraisonnable de proposer qu'il n'y a pas de réactions de transfert d'électron qui se déroulent, suite à l'absence des ions d'analyte sous forme A⁺.

ii. Transfert de protons (protonation)

D'une manière générale et quel que soit l'analyte, si l'AP de la matrice est inférieure à celle de l'analyte alors la réaction de transfert d'un proton est exothermique et sera favorable. Nous avons précédemment déterminé l'AP de la matrice MT3P par méthode cinétique et par calcul, les résultats suggèrent que le transfert d'un proton entre MT3P et les analytes alcaloïdiques est probablement la réaction prépondérante dans cette étape d'ionisation secondaire. Ceci est confirmé sur les spectres montrant des ions des alcaloïdes [A+H]⁺ probablement formés par transfert de protons. Si ce transfert peut se réaliser d'une forme protonée de MT3P vers l'alcaloïde, il faut aussi considérer la structure particulière de MT3P, et en particulier le fait que le proton porté par le méthylène en α du groupement nitrile de MT3P est le plus acide de la molécule en raison du caractère électro-attracteur du nitrile, et de la stabilisation de l'anion correspondant grâce à l'effet mésomère attracteur du nitrile (Figure V-9). MT3P est donc facilement ionisé en libérant un H⁺ ce qui favorise le transfert de protons entre la matrice et de l'analyte et finalement l'ionisation des analytes en phase gazeuse. .

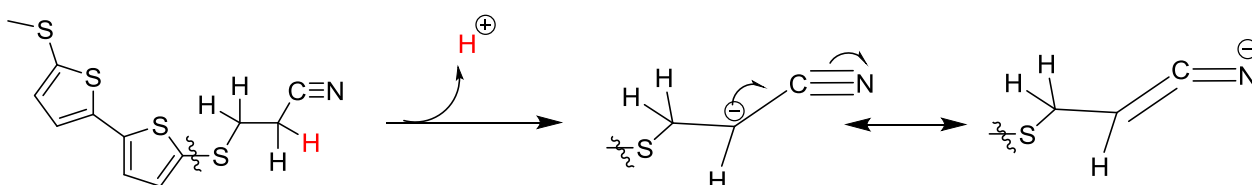


Figure V-9 : Influence de l'effet mésomère attracteur du nitrile sur l'acidité du proton en position α .

Ces caractéristiques structurales de MT3P facilitent le transfert d'un proton de la matrice vers les analytes alcaloïdiques d'autant que ce transfert sera favorable pour la plupart des composés

organiques contenant de l'azote qui ont généralement une AP supérieure à celles des matrices³⁰⁵. Pour les analytes avec une AP élevée, la réaction de transfert de proton sera très exothermique et cet excès d'énergie cause une excitation interne augmentant la possibilité de fragmentation de l'analyte.

iii. Transfert de cations

Certains alcaloïdes comme la colchicine présentent une affinité pour les métaux alcalins, en particulier Na^+ et K^+ . Généralement, les métaux alcalins sont présents à l'état de trace sur les supports utilisés lors de l'analyse MALDI, en quantité plus abondante dans les solutions de l'échantillon et également dans la solution de la matrice MT3P comme impuretés résiduelles de la synthèse. Ainsi, des ions cationisés au sodium et/ou au potassium sont rencontrés dans les spectres, si les échantillons n'ont pas été dessalés. De plus, il est possible de favoriser l'apparition du pic pseudo-moléculaire de l'analyte en ajoutant une source de cation telle que l'iodure de sodium NaI lors de la préparation de l'échantillon. Dans ce cas, outre l'augmentation des ions pseudo-moléculaires, on observe sur le spectre une augmentation du nombre de pics correspondants à la matrice, ce qui met en évidence une affinité cationique assez importante de MT3P (l'intensité du pic moléculaire de la matrice $[\text{M}]^+$ diminue fortement). Dans d'autres cas, l'affinité cationique de MT3P est même supérieure à celle de l'alcaloïde (Figure V-10), Cette compétition a déjà été observée dans la littérature³³⁹. En fait, ce processus de cationisation peut se produire lors de la préparation de l'échantillon avant l'analyse, et aussi en phase gazeuse dans le plumeau³⁴⁰.

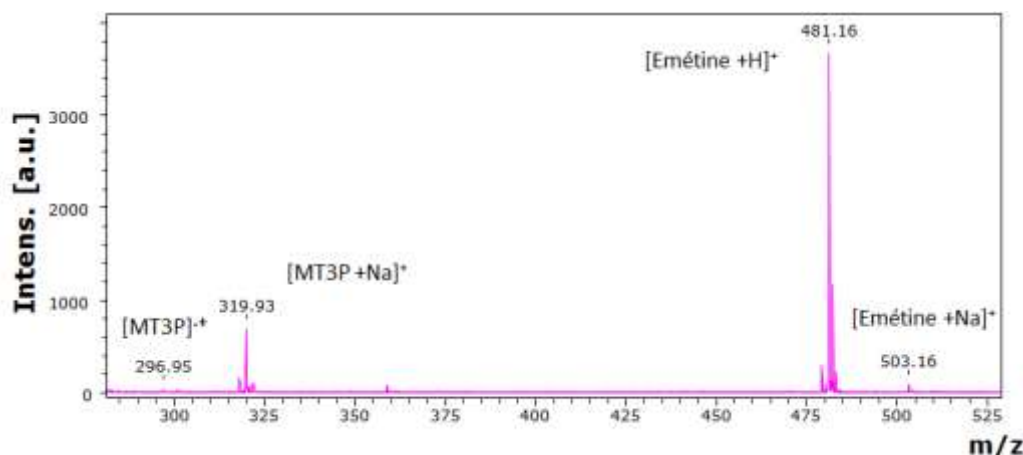


Figure V-10 : Spectre d'émétine en utilisant MT3P comme matrice et avec ajout de NaI (5 mg.mL⁻¹).
(150 accumulations, énergie du laser : 42,2 μJ en mode positif)

Afin d'augmenter l'abondance des cations dans l'échantillon, l'ajout d'une source de Na^+ a été évalué en utilisant le dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4 à une concentration de 5 mg.mL⁻¹) avec cinq alcaloïdes. À chaque fois, cet ajout augmente l'intensité des pics moléculaires

des alcaloïdes. Cette augmentation varie de plus 3 fois (brucine) à plus 19 fois (colchicine). Toutefois, on constate pour chaque alcaloïde testé que l'écart type de la variation de l'intensité est plus important que lors de l'analyse sans ajout de sel puisqu'il est augmenté de 2 fois (yohimbine) à plus 50 fois (camalexine), ce qui limite l'intérêt de cette méthode.

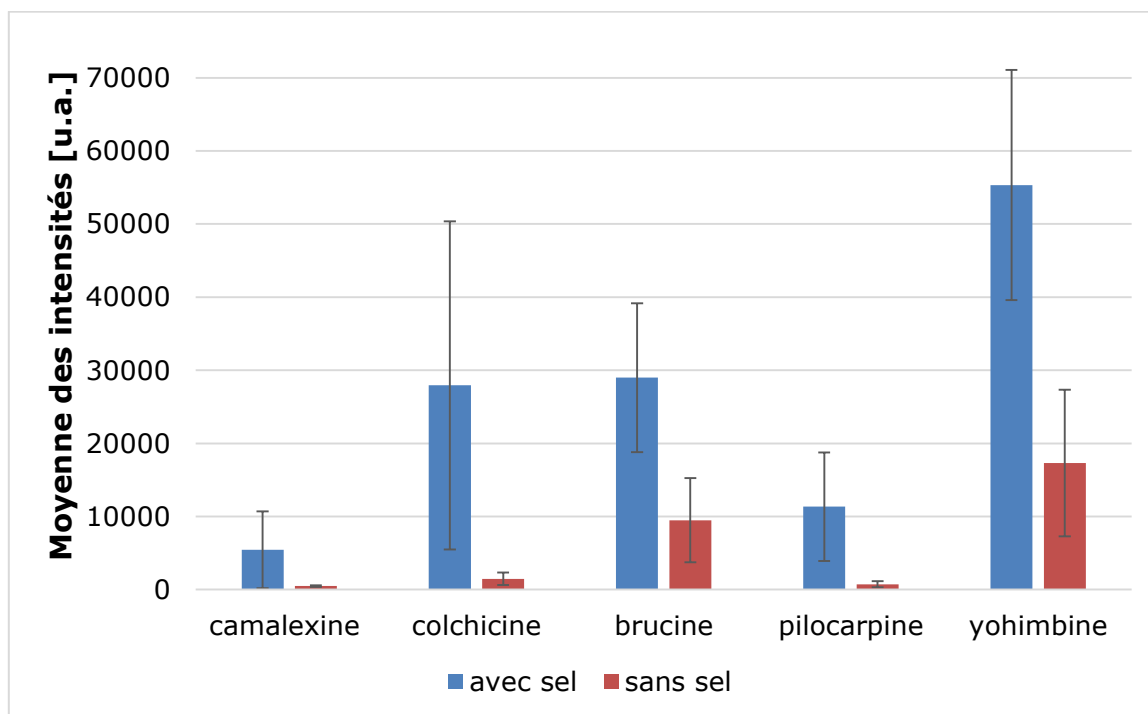


Figure V-11 : Moyennes (*quadruplicate*) des intensités de pic $[A+H]^+$ pour cinq alcaloïdes selon une préparation avec et sans ajout de NaH_2PO_4 (5 mg.mL^{-1}).
(300 accumulations /spectre, matrice MT3P, énergie du laser : $42,2 \mu\text{J}$ en mode positif)

5. Conclusion

Nous avons tout d'abord déterminé au début de ce chapitre certains paramètres (l'affinité protonique et l'énergie d'ionisation) qui sont cruciaux pour l'explication des performances de MT3P comme matrice MALDI adaptée à l'analyse d'alcaloïdes. Alors que l'AP déterminée est de même niveau que celles de matrices courantes, l'EI est quant à elle de niveau inférieur. L'AP et l'EI de MT3P sont inférieures à celles des alcaloïdes. Des propositions concernant le mode de photoionisation de MT3P durant l'ionisation primaire ont été suggérées, et il est probable que d'autres matrices substituées par deux soufres en 5 et 5' du noyau bithiophénique aient le même comportement. La réaction de transfert de proton se déroule lors de la deuxième phase de l'expansion du plumeau, et les caractéristiques physicochimiques de la matrice bithiophénique, en particulier au niveau du bras S-propionitrile facilitent probablement le transfert de proton vers les alcaloïdes. Cependant, d'autres paramètres expliquent probablement l'efficacité de MT3P pour l'analyse des alcaloïdes. Les travaux en particulier de relation structure-propriétés ont mis en évidence l'importance de la substitution du bithiophène par des soufres en positions 5 et 5', tant pour l'ionisation que la sélectivité. L'AP de la matrice MT3P qui est comparable à celle des autres matrices commerciales, et sa bande d'absorption qui est idéale pour le domaine d'émission du laser d'azote ne sont toutefois pas des arguments qui permettent d'expliquer que contrairement aux autres matrices, MT3P montre une sélectivité dans la détection des alcaloïdes. En outre, les AP de certaines familles des composés testés, qui ne répondent pas avec MT3P, sont similaires à celles des alcaloïdes, comme les petits peptides ayant des AP entre $(870 \text{ et } 953 \text{ KJ.mol}^{-1})$ ³⁴¹

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de recherche effectués à la Plateforme d'Ingénierie et Analyses Moléculaires de l'Université d'Angers par Bounichou³⁴² et par Tsagué Kenfack¹⁶ qui avaient entre autres buts de développer une méthode d'analyse par spectrométrie de masse, alternative au MALDI, la technique DIAMS. Lors de ces travaux, Tsagué Kenfack¹⁶ a montré que des composés bithiophéniques comme MT3P pouvaient être utilisés comme matrice MALDI présentant une spécificité pour l'ionisation des alcaloïdes.

Dans la continuité de ces travaux, le premier objectif de ma thèse a été tout d'abord de poursuivre l'évaluation de l'intérêt de MT3P dans différentes applications MALDI.

Ce travail a nécessité tout d'abord une partie optimisation, qui a porté sur les étapes de préparation de l'échantillon en amont de l'introduction de l'échantillon dans l'instrument, étapes qui sont la plupart du temps décisives. Nous avons démontré par cette étude que le DCM constitue le meilleur solvant pour la matrice MT3P. En outre, en ce qui concerne le traitement des données, nous avons prouvé l'efficacité de la normalisation des intensités pour réduire l'hétérogénéité lors de l'étude comparative des matrices.

L'étude de développement de l'analyse quantitative des alcaloïdes dans plusieurs extraits de plantes toxiques (*Colchicum autumnale* et les plantes de la famille des solanacées) par spectrométrie MALDI avec MT3P montre l'intérêt de l'utilisation d'un étalon interne. La méthode proposée a été validée en évaluant sa répétabilité, les LOD et les LOQ, la linéarité et la précision. Selon l'alcaloïde testé, la linéarité se situe dans un intervalle de concentration entre 50 et 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, avec un coefficient de corrélation $R^2 \geq 0,993$. Les variations intra et inter-jours varient respectivement de 8,9 % à 9,3 % et de 8,8 % à 12,6 %. Étant donné qu'aucun processus séparatif n'est mis en œuvre avec cette technique, elle s'avère complémentaire aux techniques chromatographiques classiques comme la LC-MS. En effet, bien que moins sensible, la technique MALDI-TOF MS utilisant MT3P comme matrice est très rapide et peut donc être envisagée comme une approche quantitative pour l'analyse des alcaloïdes toxiques dans des échantillons complexes.

L'utilisation de MT3P en CCM et imagerie MS a été développée. Si la faisabilité et l'intérêt de la matrice bithiophénique dans ces techniques de détection directe des alcaloïdes dans des matrices complexes (surface de silice, et coupe de tissu végétal) a été démontrée, des études complémentaires doivent être menées en optimisant les conditions des préparations (concentration des solutions, mode de dépôt de la matrice,...) et la qualité des matériels utilisés (par ex : des plaques HPTLC).

D'autre part, dans la deuxième partie de la thèse, nous avons optimisé le potentiel des matrices bithiophéniques en MALDI. Une trentaine des molécules bithiophéniques ont ainsi été synthétisées (dont 22 sont des composés originaux) et ensuite engagées dans une étude comparative en deux étapes. Une première étude générale se basant sur l'intensité et la qualité des spectres d'alcaloïdes témoins a permis de sélectionner cinq dérivés. Des études comparatives complémentaires montrent que PFPT3P s'avère le plus efficace. Son potentiel est alors aussi étudié et comparé en particulier à la matrice CHCA pour la détection d'alcaloïdes contenus dans différents mélanges complexes (mélanges reconstitués, sérum enrichi en strychnine, mélanges bio-actifs commerciaux). Alors que la matrice courante produit des spectres de qualités médiocres, PFPT3P s'avère plus efficace et permet la détection d'alcaloïdes à faibles concentrations dans des mélanges complexes (ex : LOD de la strychnine dans le plasma humain $0,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Au bilan, si les intensités obtenues avec CHCA dépassent celles avec PFPT3P lors de l'analyse de standards d'alcaloïdes, la sélectivité qui caractérise les dérivés bithiophéniques reste la propriété qui les distingue des autres matrices, et explique leur intérêt lors de l'analyse de mélange complexe.

Présentant comme propriétés de permettre l'analyse d'une grande variété de classes d'alcaloïdes, de présenter des pics de matrice en nombre limité et de faible intensité (hormis un pic à $m/z = 282,7$ Da), et une efficacité qui dépasse celle des molécules commerciales pour les applications dans différents milieux complexes, la molécule PFPT3P constitue à ce stade la meilleure matrice pour l'analyse qualitative des alcaloïdes³⁴³. Au vu du potentiel de cette matrice, il convient évidemment de poursuivre par des études quantitatives et son utilisation dans d'autres applications MALDI-MS. On peut légitimement s'attendre dans ces situations à une efficacité supérieure à celle de MT3P.

Une troisième partie de la thèse porte sur l'étude des mécanismes d'ionisation en utilisant les BMs et la matrice MT3P plus spécifiquement. Les résultats obtenus suggèrent que la réaction de transfert de proton se déroule lors de la deuxième phase de l'expansion du plumeau, et les caractéristiques physicochimiques de la matrice bithiophénique, en particulier au niveau du bras S-propionitrile facilitent probablement le transfert de proton vers les alcaloïdes. Cependant, la sélectivité d'ionisation des alcaloïdes reste encore à expliquer. Les travaux en particulier de relation structure-propriétés ont mis en évidence l'importance de la substitution du bithiophène par des sulfures en positions 5 et 5', tant pour l'ionisation que la sélectivité. Une hypothèse peut être avancée. La matrice doit jouer lors de l'ionisation différents rôles : en plus qu'elle doit exciter les molécules d'analytes pour faciliter la protonation de ces derniers et qu'elle doit être source des protons, des interactions spécifiques basant sur la structure des matrices doivent

avoir lieu entre la matrice et les analytes ce qui aide leurs ionisations. Dans nos BMs, ces interactions sont fournies par le motif 2,2'-bithiophène disubstitué par du soufre en 5 et 5'. Ces travaux doivent être consolidés ultérieurement par une étude portant sur la nouvelle matrice PFPT3P, ce qui peut apporter des éclairages en se basant sur la haute performance de ce dérivé bithiophénique.

Ces différents travaux portant sur les matrices bithiophéniques constituent des perspectives encourageantes pouvant fournir des options pour le développement de méthodes analytiques avancées comme solutions aux problèmes souvent rencontrés dans les études des métabolites secondaires en MALDI. Ainsi, il est possible de développer des méthodes de dosage spécifique des alcaloïdes exploitant la sensibilité très élevée des spectromètres de masse de type MALDI-TOF conduisant à des limites de détection (LOD) ou de quantification (LOQ) très basses. En outre, la molécule **9** (portant la chaîne propionitrile d'une part et d'autre part un bras qui se termine par un ester) qui a donné des résultats prometteurs dans la première évaluation, devrait être soumise à l'analyse d'un large panel de composés dans le but d'améliorer le rendement d'ionisation et la sensibilité vis-à-vis des alcaloïdes en MALDI.

Partie Expérimentale

1. Conditions générales

I.1. Les spectres de RMN ont été enregistrés à température ambiante, sur des spectromètres Bruker AV DRX 500 (^1H 500 MHz et ^{13}C 125,7 MHz), Bruker AV III 300 (^1H 300 MHz et ^{13}C 75,4 MHz), Jeol AV III 270 (^1H 270 MHz et ^{13}C 67,5 MHz) et JEOL ECZ (^1H 400 MHz, ^{13}C 101 MHz). Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport au tétraméthylsilane (TMS). Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Les multiplicités sont exprimées par les abréviations suivantes : s : singulet, d : doublet, dd : doublet dédoublé, t : triplet, dt : triplet dédoublé, q : quadruplet, qu : quintuplet, m : multiplet. Les spectres ^1H sont décrits selon : δ (multiplicité, nombre de protons, constante de couplage) et les ^{13}C mentionnent les déplacements chimiques δ en ppm.

I.2. Les spectres de masse : Les spectres de masse MALDI ont été enregistrés sur un appareil BRUKER Biflex-III Bruker-Daltonics, équipé d'un laser N2 à 337 nm (modèle VSL-337i, Laser Science Inc.), à analyseur fonctionnant en mode linéaire ou réflectron. Les matrices utilisées sont : l'CHCA, le DHB ou les dérivés bithiophéniques synthétisés. Ces analyses ont été effectuées à la Plateforme d'Ingénierie et Analyses Moléculaires à Angers (PIAM). Les masses à haute résolution ont été réalisées avec un spectromètre SpiralTOF™ MALDI TOF/TOF (JEOL, Tokyo, Japan). Concernant le paramétrage du Biflex-III Bruker-Daltonics, utilisée pour toutes les analyses de la thèse, les spectres de masse sont enregistrés dans la gamme de 20-2000 m/z . Hormis la puissance laser qui varie, l'ensemble des spectres est enregistré avec les mêmes paramètres : tension d'accélération (19 kV), délais d'extraction (200 ns), tension d'amplification appliquée au détecteur (1,3 kV), fréquence laser (5 ns), refocalisation des ions par le miroir électrostatique et pas de déflexion des ions de basse masse.

I.4. Les spectres d'absorption UV-Visible ont été enregistrés en solution sur des spectrophotomètres Perkin Elmer Lambda 19 ou 950. Les positions des bandes d'absorption sont exprimées en nanomètre (nm) et les coefficients d'extinction molaire ϵ en $\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$.

I.5. Chromatographies : Les réactions ont été suivies par chromatographie sur couche mince (CCM) utilisant des feuilles d'aluminium recouvertes de gel de silice 60 (Merck silica gel 60 F254) et les composés ont été visualisés sous lampe UV (254/366 nm). Certains composés ont été révélés par immersion dans un bain de permanganate de potassium, ou par pulvérisation du réactif de Dragendorff.

Les produits de réaction ont été purifiés par chromatographie sur gel de silice de granulométrie 35-70 μm .

I.6. Réactif de révélation CCM :

- Réactif de Dragendorff : pour les alcaloïdes.

0,85 g de nitrate de bismuth et 10 g d'acide tartrique sont dissous dans 40 ml d'eau (solution A). La solution B est obtenue en solubilisant 16 g d'iodure de potassium dans 40 ml d'eau. Le réactif est préparé extemporanément en mélangeant 5 ml de solution A, 5 ml de solution B et 20 g d'acide tartrique dans 100 ml d'eau.

- Réactif au permanganate de potassium (KMnO_4)

1,5 g de KMnO_4 , 10 g de K_2CO_3 et 1,25 ml d'une solution aqueuse de NaOH à 10% dans 200 ml d'eau déminéralisée.

I.7. Solvants et réactifs : Les solvants de synthèse ont été purifiés et/ou séchés suivant les protocoles usuels (sodium/benzophénone pour le THF et l'éther diéthylique, sodium pour le toluène). Le MeOH a été séchés sur tamis moléculaire 4 Å et dégazés (à l'aide de l'azote) juste avant leur utilisation. Le DMF utilisé est fourni par Sigma Aldrich sur tamis moléculaires 4 Å. Les réactifs commerciaux ont été utilisés tels qu'obtenus des fournisseurs.

I.8. Matière première pour extraits :

La matière végétale (plantes médicinales) utilisée au cours de ces études nous a été fournie par la société pharma-et-plantes (Etiau, Valanjou, 49670), à l'exception de *Senecio vulgaris* et de *Tyria jacobaeae* fournis par l'Iteipmai (Institut Technique Interprofessionnel des Plantes à parfum, Médicinales et Aromatiques, Chemillé-en-Anjou).

I.9. Procédure de nettoyage de la plaque MALDI :

Le nettoyage de la plaque en acier inoxydable est réalisé selon la procédure suivante :

- Lavage de la plaque à l'eau et séchage doux avec des papiers non abrasifs (Kimwipes).
- Puis sonication 10 minutes dans un mélange ACN/Eau (1/1), et 5 minutes dans de l'eau distillée, puis rinçage à l'acétone. Lors de l'utilisation de certaines matrices, un rinçage au DCM peut précéder celui à l'acétone.
- séchage à l'air libre une nuit.

2. Chapitre III : MT3P pour l'identification et/ou le dosage des alcaloïdes.

2.1. Préparations des solutions des matrices

La matrice CHCA est solubilisée jusqu'à saturation dans de l'ACN à 70 % (aq) contenant 0,1 % de TFA. La solution mère est ensuite diluée avec 30 % d'ACN (aq) contenant 0,1 % de TFA dans un rapport de 1:2. La matrice MT3P est solubilisée dans le DCM (ou un autre solvant) à une concentration de 10 mg.mL⁻¹.

2.2. Préparation des extraits de plantes

Les différents extraits, utilisés au cours des études MALDI (tests CCM et analyse de nouvelles matrices), ont tous été préparés par macération ou percolation adaptées aux alcaloïdes puis concentrés sous pression réduite.

2.2.1. Généralités

L'extraction des alcaloïdes à partir du matériel végétal est classiquement réalisée par extraction liquide-liquide, basée sur la différence de solubilité des alcaloïdes dans un solvant organique ou aqueux selon le pH. La plante est d'abord broyée et la première étape d'extraction, commence par une macération sous agitation mécanique à température ambiante (ou à l'aide d'un bain d'ultrasons) pendant 15 à 20 min, par de l'eau acidifiée (H₂SO₄ 0,05 N). Après filtration, le filtrat est alcalinisé par de l'ammoniaque concentrée permettant ainsi aux alcaloïdes de passer de la forme sel à la forme base.

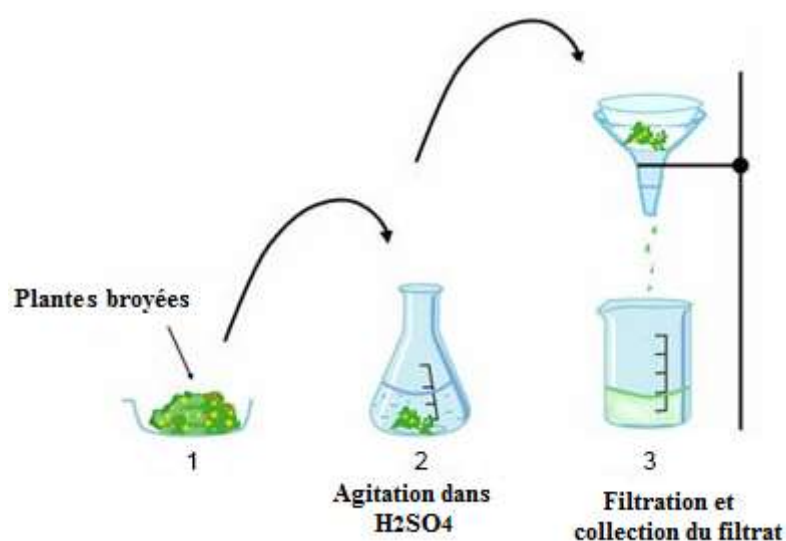


Figure 12 : Extraction des alcaloïdes par l'eau acide.

Les alcaloïdes bases sont alors extraits par un solvant organique non miscible à l'eau dans une ampoule à décanter. La phase organique est récupérée, séchée avec Na₂SO₄ puis concentrée.

L'extraction des alcaloïdes totaux de la drogue est aussi réalisée dans un appareil de Soxhlet avec un solvant organique. De manière à s'assurer de l'efficacité de l'extraction le milieu est alcalinisé de manière à transformer les alcaloïdes protonés dans la plante en une forme non ionisée soluble dans le solvant dichlorométhane (DCM).

2.2.2. Mode opératoire

i. Extraction rapide des alcaloïdes pour le dépistage

La plante pulvérisée (2,0 g de feuille de *Hyoscyamus niger*, 0,6 g de feuille d'*Atropa belladonna*, 5 g de graines de *Datura stramonium*, 5 g de la plante totale de *Senecio vulgaris*, 3 g de la plante totale de *Cytisus scoparius*, 0,6 g d'écorce de *Cinchona officinalis*) est agitée pendant 15 min dans 20 mL d' H_2SO_4 0,05 N, puis filtré. Le marc est lavé avec H_2SO_4 0,05 N, jusqu'à obtention de 25 mL de filtrat. La solution est alcalinisée par 1 mL d'ammoniaque concentrée et extraite dans une ampoule à décanter par 2x10 mL de DCM. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées et évaporées sous vide pour fournir respectivement 3 mg (0,15 %), 2 mg (0,33 %), 13 mg (0,26 %), 12 mg (0,4 %) et 1,3 mg (0,21 %) d'extraits d'alcaloïdes pour chacun des échantillons initiaux.

ii. Extraction des alcaloïdes totaux

21,6 g du bulbe pulvérisé et alcalinisé par l'ammoniaque concentrée (8 mL), de *Colchicum autumnale* sont extraits dans un appareil à extraction continue de Soxhlet par 500 mL de DCM. Après 6 cycles d'extraction (environ 2 heures), l'extrait brut est lavé dans une ampoule à décanter par 3 x 50 mL d'une solution d'acide sulfurique (0,25 M). Les solutions acides sont rassemblées et alcalinisées (jusqu'à environ pH = 9) par ajout de quelques mL d'ammoniaque (0,5 M) puis extraites par 3 fois 50 mL de DCM. Les phases organiques sont réunies, séchées sur sulfate de sodium anhydre, filtrées pour fournir après évaporation 1,45 g (rendement = 6,7 %) de résidu sec qui représente les alcaloïdes totaux.

2.3. CCM-MALDI

2.3.1. Matériel

Deux extraits de plantes (belladone et quinquina), quatre témoins : (scopolamine, hyoscyamine, quinidine et quinine) et deux matrices (CHCA et MT3P) sont utilisés.

2.3.2. Instrumentation

Pour l'application de la solution de matrice sur la plaque CCM, une micropipette volume variable 1-10 μL (Thermo Fisher Scientific, Finland) a été utilisée. Les spectres de masse ont été enregistrés directement à partir de bandes de CCM en mode linéaire positif avec l'instrument Biflex III. Le mode d'acquisition est manuel et les spectres de masse acquis à partir de chacun des dépôts de CCM sont le résultat de l'acquisition cumulée d'un nombre variable de tirs.

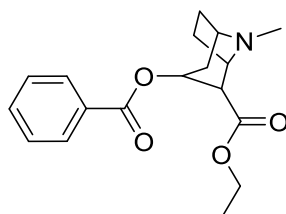
2.3.3. Préparations des échantillons

Les solutions témoins sont préparées dans le méthanol (qualité HPLC) à une concentration de 10 mg/mL. Les extraits sont préparés selon le protocole décrit dans la partie précédente. La solution de la matrice MT3P est préparée à 10 mg.mL⁻¹ dans le DCM.

2.3.4. Préparation des plaques CCM

Un aliquot de 5 ou 10 μL d'extrait et de témoins correspondants sont déposés sur une plaque CCM, chaque plaque étant préparée en deux exemplaires. Les plaques sont ensuite développées sur un parcours de 8 cm environ avec le même système d'élution, composé d'ammoniaque concentrée/eau/acétone (0,3/0,7/9 ; v/v/v). Après séchage, les plaques sont révélées pour l'une par observation UV (254 et 365 nm), et pour l'autre par pulvérisation du réactif de Dragendorff. Les alcaloïdes sont identifiés par comparaison des rapports frontaux avec les standards correspondants (hyoscyamine $R_f = 0,4$ et scopolamine $R_f = 0,9$). 10 μL de matrice en solution sont déposés au niveau des spots révélés en UV. Après séchage, les zones d'intérêt, peuvent être découpées (ou non) et collées sur la cible MALDI à l'aide d'un ruban adhésif double-face ou d'une pâte de carbone placée sur la face arrière de la plaque CCM.

2.4. Synthèse du cocaéthylène¹⁹⁹



À une solution de benzoylcgonine (140 mg, 0,48 mmol, 1 éq) dans du chlorure d'oxalyle pur (2 mL) est ajouté du DMF (500 μL). Après agitation pendant 30 min à TA, le réactif en excès est évaporé sous vide et l'éthanol anhydre (2 mL) est ajouté. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant 12 h, concentré puis dilué avec du DCM (10 mL) et extrait avec une solution aqueuse d' H_2SO_4 0,25 M (3 x 15 mL). Les phases aqueuses sont rassemblées puis le pH de la solution est ajusté à 9 avec de l'ammoniaque concentrée, et la phase aqueuse est extraite avec

du DCM (3 x 20 mL). Les différentes phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ puis évaporées sous pression réduite. Le produit attendu (141 mg) est obtenu pur sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 92 %.

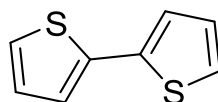
- ✓ **RMN ¹H (CD₃OD/300 MHz)** : δ 8,05 – 7,98 (m, 1H), 7,69 (t, *J* = 7,4 Hz, 3H), 7,54 (t, *J* = 7,8 Hz, 1H), 5,62 (dt, *J* = 11,0, 7,2 Hz, 1H), 4,28 (t, *J* = 6,7 Hz, 1H), 4,22 – 4,06 (m, 3H), 3,64 (dd, *J* = 7,2, 2,4 Hz, 1H), 2,93 (s, 3H), 2,62 – 2,35 (m, 4H), 2,34 – 2,17 (m, 2H), 0,96 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₈H₂₃NO₄ ([M+H]⁺) 318,170, trouvé 318,127.

3. Chapitre IV : synthèse et évaluation des nouvelles des nouvelles matrices bithiophéniques

3.1. Partie A : synthèse des matrices

3.1.1. Synthèse des précurseurs et de la matrice MT3P.⁴⁰

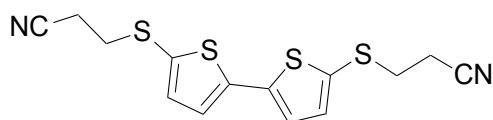
i. Synthèse du 2,2'-bithiophène (1).



Le 2-bromothiophène (4 g, 24,3 mmol, 1 éq) est additionné goutte à goutte sous atmosphère d'azote à une suspension de magnésium (0,74 g, 36,5 mmol, 1,5 éq) dans 10 mL d'Et₂O anhydre. Après addition, le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 1 h. Le magnésien ainsi formé est additionné goutte à goutte sous atmosphère inerte (N₂) à une solution de 2-bromothiophène (3,3 g, 20,2 mmol, 0,8 éq) en présence de Ni(dppp)Cl₂ (0,1 g, 0,2 mmol, 0,01 éq) dans 15 mL d'Et₂O anhydre. Le milieu réactionnel est porté à reflux toute la nuit puis 12 mL d'une solution aqueuse d'HCl 1 M sont additionnés. Le mélange est ensuite extrait avec de l'éther diéthylique (2 x 15 mL) puis les différentes phases organiques sont rassemblées, lavées avec de l'eau (25 mL), séchées sur MgSO₄ puis concentrées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant EP 100 %) pour conduire au 2,2'- bithiophène **1** (4,35 g) obtenu sous forme de cristaux blancs avec un rendement de 90 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)**: δ 7,02 (dd, *J* = 5,2, 3,5 Hz, 2H), 7,18 (dd, *J* = 3,5, 1,0 Hz, 2H), 7,22 (dd, *J* = 5,2, 1,0 Hz, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/75 MHz)**: δ 123,7, 124,2, 127,2, 137,3.

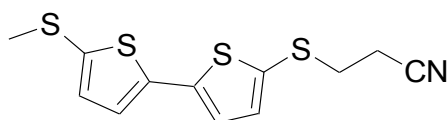
ii. Synthèse du 5,5'-bis(3-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène (2)



Une solution de *n*-BuLi (2,5 M dans l'hexane) (15,8 mL, 40 mmol, 2,2 éq) est ajoutée goutte à goutte sous atmosphère d'azote à une solution de 2,2'-bithiophène (3 g, 18,1 mmol, 1 éq) dans 55 mL de THF anhydre et refroidi à -78 °C. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation pendant 1 h en laissant remonter progressivement la température à -10 °C avant d'ajouter en une portion S₈ (1,4 g, 40 mmol, 2,2 éq). Après dissolution totale du soufre, le milieu réactionnel est maintenu à -10°C, puis le 3-bromopropionitrile (6 mL, 72,2 mmol, 4 éq) est additionné goutte à goutte pendant environ 2 minutes. Le mélange réactionnel est ensuite agité pendant 12 h à température ambiante puis le solvant est évaporé. De l'eau (250 mL) est ajoutée, et le mélange est agité pendant 15 min supplémentaires. Une filtration sur fritté suivie d'un lavage à l'éther diéthylique (20 mL) conduit à un résidu marron-noir qui est purifié par recristallisation dans l'EtOH (250 mL) pour donner le composé **2** sous forme d'un solide jaunâtre (4,5 g, rdt = 82 %).

- ✓ RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz) δ 7,14 – 7,11 (m, 2H), 7,06 – 7,03 (m, 2H), 3,08 – 2,88 (m, 4H), 2,62 (dt, *J* = 22,7, 11,2 Hz, 4H).
- ✓ RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz) δ 141,6, 136,8, 131,0, 124,8, 117,8, 33,8, 18,4.
- ✓ MALDI-TOF-MS : Calculé pour C₁₄H₁₂N₂S₄ ([M]⁺) 335,988, trouvé 335,921.

iii. Synthèse du 3-(5'-(méthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (3) (MT3P)



Une solution dégazée d'hydroxyde de césium 0,54 g (3,2 mmol, 1,1 éq) dans du MeOH anhydre (15 mL) est additionnée goutte à goutte sous atmosphère d'azote à une solution dégazée du composé **2** (1 g, 2,98 mmol, 1 éq) dans du DMF (30 mL) anhydre. Après 30 min d'agitation à température ambiante, l'iodométhane (0,93 mL, 14,8 mmol, 5 éq) est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation pendant 3 h à température ambiante, puis les solvants sont évaporés. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice

(éluant CH₂Cl₂/EP : 60/40) pour fournir le dérivé bithiophénique **3** sous forme d'un solide vert (0,750 g, rdt = 90 %).

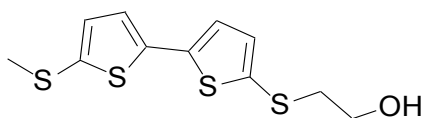
- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)** δ 7,10 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 6,99 (d, *J* = 4,2 Hz, 2H), 6,95 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 2,97 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,63 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 2,50 (s, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** δ 142,4, 138,3, 137,8, 136,9, 131,6, 129,9, 124,6, 124,1, 117,9, 33,9, 22,1, 18,4.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₂H₁₁NS₄ ([M]⁺) 296,977, trouvé 296,952.

3.1.2. Synthèse des matrices (4) à (9)

i. Protocole général pour la préparation

Sous atmosphère d'azote, une solution dégazée d'hydroxyde de césium dans le méthanol anhydre est additionnée goutte à goutte à une solution dégazée du précurseur porteur du groupement cyanoéthylsulfanyl dans le DMF. Après 1 h d'agitation à température ambiante, l'agent alkylant est additionné (hormis pour le composé **5**), et le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante, avant d'être traité pour obtenir les produits attendus.

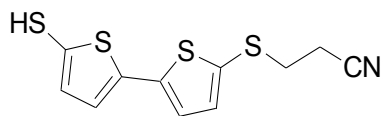
ii. 2-(5'-(Méthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio)éthanol (**4**)¹⁶



A une solution de MT3P **3** (50 mg, 0,17 mmol, 1 éq) dans du DMF (5 mL) anhydre est ajoutée une solution d'hydroxyde de césium (35 mg, 0,19 mmol, 1,1 éq) dans du MeOH (3 mL). Après une heure d'agitation à TA, le 3-brométhanol (66 mg, 0,53 mmol, 3,1 éq) est additionné. Une coloration jaune claire du milieu réactionnel est observée. Après une nuit d'agitation, de l'eau (25 mL) est ajoutée. Le mélange est extrait avec du DCM (25 mL), puis la phase organique est lavée avec de l'eau (2 × 25 mL) et séchée sur MgSO₄. Après évaporation, une chromatographie sur gel de silice (éluant DCM 100 %) permet d'isoler le composé **4** (35 mg) sous forme d'un solide jaune avec 71 % de rendement.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/500 MHz)** : δ 6,95 – 7,06 (m, 2H), 3,78 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2,51 (s, 3H), 2,98 (t, *J* = 6 Hz, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/125 MHz)** : δ 140,9, 138,6, 137,3, 135,3, 131,9, 131,6, 124,1, 123,8, 60,2, 41,7, 21,9.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₁H₁₂OS₄ ([M]⁺) 281,977, trouvé 287,881.

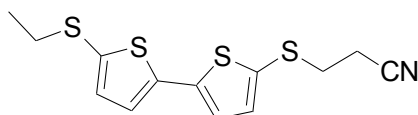
iii. 3-(5'-Mercapto-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (5)



Voir la procédure générale, avec le composé **2** (50 mg, 0,15 mmol, 1 éq) dans le DMF (5 mL) et de l'hydroxyde de césium (29 mg, 0,17 mmol, 1,1 éq) dans le MeOH (3 mL). Après 10 min d'agitation, une solution aqueuse d'HCl 1 % (2 mL) est ajoutée, puis de l'eau (30 mL) est additionné. Le mélange est ensuite extrait avec du DCM (30 mL), puis la phase organique est lavée avec l'eau distillée (2 × 25 mL) et séchée sur Na₂SO₄. Après évaporation, une purification par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 7/3) conduit au composé **7** sous forme d'un solide jaunâtre (30 mg, rdt = 75 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)** : δ 2,67 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 3,02 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 7,09 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,13 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H), 7,17 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** δ 143,0, 141,7, 136,8, 136,7, 135,4, 131,3, 125,0, 124,7, 117,7, 33,9, 18,4.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₁H₉NS₄ ([M-H]⁺) 281,953, trouvé 281,985.

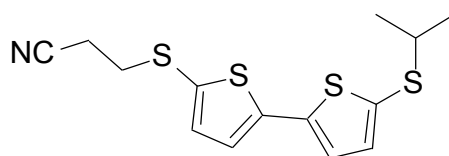
iv. 3-(5'-Éthylthio-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (6)



Voir la procédure générale pour la préparation, avec le composé **2** (100 mg, 0,3 mmol) dans le DMF (5 mL) et l'hydroxyde de césium (55,3 mg, 0,33 mmol, 1,1 éq) dans le MeOH (3 mL). Après une heure d'agitation à TA, le diéthylsulfate (162 mg, 3,5 éq, 1,05 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Après une nuit d'agitation à TA, les solvants sont évaporés, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 7/3) pour donner le composé **6** sous forme d'un solide jaune. (85 mg, rdt = 90 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)** : δ 7,12 (d, *J* = 3,7 Hz, 1H), 7,03 – 7,00 (m, 3H), 2,99 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 2,84 (q, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,65 (t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,30 (t, *J* = 7,3 Hz, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** : δ 142,4, 139,5, 136,9, 135,0, 134,3, 130,0, 124,6, 124,2, 117,9, 33,9, 33,0, 18,4, 14,9.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₃H₁₃NS₄ ([M]⁺) 310,9930, trouvé 310,9756.

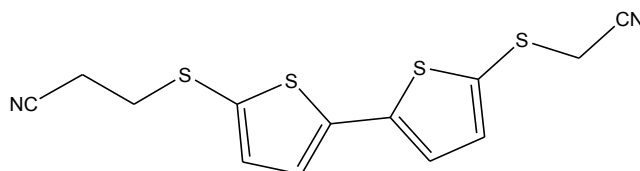
v. 3-(5'-Isopropylthio-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (7)



Voir la procédure générale pour la préparation, avec le composé **2** (200 mg, 0,6 mmol, 1 éq) dans le DMF (8 mL) et de l'hydroxyde de césium, (111 mg, 0,66 mmol, 1,1 éq) dans le MeOH (5 mL). Après une heure d'agitation à TA, le 2-bromopropane (220 mg, 3 éq, 1,8 mmol) est ajouté au milieu réactionnel. Après une nuit d'agitation à TA, les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt : 7/3) pour donner le composé **7** sous forme d'un solide jaune. (120 mg, rdt= 62 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)** : δ 7,13 – 7,11 (m, 1H), 7,06 – 7,01 (m, 3H), 3,24 – 3,11 (m, 1H), 3,03 – 2,95 (m, 2H), 2,65 (td, *J* = 7,1, 2,2 Hz, 2H), 1,30 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** : δ 142,4, 140,3, 136,8, 136,0, 133,7, 130,1, 124,6, 124,3, 117,9, 42,0, 33,9, 23,1, 18,4.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₄H₁₅NS₄ ([M]⁺) 325,0087, trouvé 324,9964.

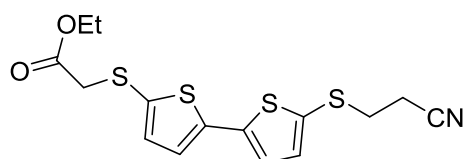
vi. 3-(5'-Cyanométhylthio-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (8)



Voir la procédure générale pour la préparation, avec le composé **2** (110 mg, 0,33 mmol, 1 éq) dans le DMF (8 mL) et de l'hydroxyde de césium (63 mg, 0,41 mmol, 1,2 éq) dans le MeOH (5 mL). Après une heure d'agitation à TA, le bromoacétonitrile (50 mg, 1,8 mmol, 1,3 éq) est ajouté au milieu réactionnel. Après une nuit d'agitation à TA, les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 6/4) pour donner le composé **8** sous forme d'un solide jaune. (75 mg, rdt =70 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)**: δ 7,32 – 7,30 (m, 1H), 7,14 – 7,07 (m, 3H), 3,50 (s, 2H), 3,01 (t, 2H), 2,65 (t, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)**: δ 143,0, 141,4, 138,3, 136,8, 131,4, 128,8, 125,3, 125,0, 117,8, 116,2, 33,8, 24,9, 18,8.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₃H₁₀N₂S₄ ([M]⁺) 321,9727, trouvé 321,9626.

vii. Acide [5'-(2-cyanoéthylthio)-2,2'-bithiophène-5-ylthio]acétique éthyle ester (9)

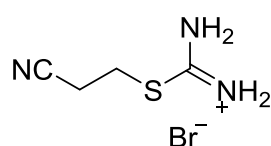


Voir la procédure générale pour la préparation, avec le composé **2** (250 mg, 0,75 mmol, 1 éq) dans le DMF (7 mL) et de l'hydroxyde de césium (135 mg, 0,8 mmol) dans le MeOH (4 mL). Après une heure d'agitation à TA, le bromoacétate d'éthyle (376 mg, 2,25 mmol, 3 éq) est ajouté. Après une nuit d'agitation à TA, les solvants sont évaporés et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/hexane: 7/3) pour donner le composé **9** sous forme d'un solide vert. (183 mg, rdt = 66 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)** : δ 1,25 (t, *J* = 7,5 Hz, 3H), 2,64 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,97(t, *J* = 7,2 Hz, 2H), 3,51 (s, 2H), 4,18 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 7,00 (m, 2H), 7,11 (m, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** : δ 169,3, 141,9, 140,9, 136,8, 136,0, 132,6, 130,6, 124,6, 124,5, 117,8, 61,8, 40,9, 33,8, 18,3, 14,2.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₅H₁₅NO₂S₄ ([M]⁺) 368,998, trouvé 321,890.

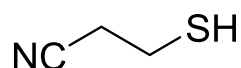
3.1.3. Synthèse du 3,3'-bis(2-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène (10-d)

i. Sel d'isothiuronium (10-a)²⁴⁸

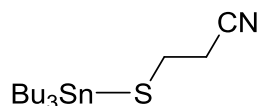


À une solution de thiourée (2,4 g, 15,4 mmol, 1 éq) dans de l'eau (3 mL) est ajouté le 3-bromopropionitrile (4,5 g, 17 mmol, 1,1 éq). Le mélange réactionnel est vivement agité pendant une heure à 68 °C, puis deux heures à 100 °C. Le milieu est refroidi à l'aide d'un bain de glace jusqu'à 45 °C, et après arrêt de l'agitation, des cristaux blancs se forment. Les cristaux obtenus sont filtrés, lavés avec l'acétone froide puis séchés à température ambiante. Le sel d'isothiuronium **10-a** (3,1 g) est obtenu avec un rendement de 98 %.

- ✓ **RMN ¹H (D₂O/300 MHz)** : δ 3,29 (t, *J* = 6,2 Hz, 2H), 2,84 (t, *J* = 6,2, 2H).

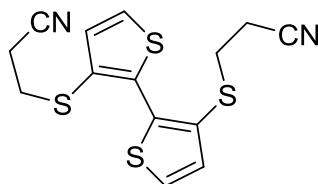
ii. 3-Mercaptopropionitrile (**10-b**)²⁴⁸

A une suspension de sel d'isothiuronium **10-a** (3 g, 14,3 mmol, 1 éq) dans de l'eau (5 mL) est ajouté goutte à goutte une solution aqueuse de NaOH 10 M (3,2 mL, 31,4 mmol, 2,2 éq). Le milieu est agité et chauffé à 45 °C pendant 1 heure, puis une solution concentrée de H₂SO₄ est ajoutée jusqu'à pH = 6. Le produit est ensuite extrait par de l'éther diéthylique (20 mL), puis séché avec MgSO₄, filtré et évaporé sous pression réduite. Le produit **10-b** (750 mg) est obtenu sans purification avec un rendement de 60 %.

iii. 3-(Tributylstannylsulfanyl)propanenitrile (**10-c**)²⁴⁸

A une solution de 3-mercaptopropionitrile **10-b** (0,75 g, 8,62 mmol, 1 éq) dans l'éther diéthylique anhydre (25 mL) sont ajoutés goutte à goutte et sous forte agitation la triéthylamine (0,87 g, 8,62 mmol, 1 éq) puis le chlorure de tributylétain (2,8 g, 8,62 mmol, 1 éq). Après deux heures d'agitation à température ambiante, un précipité de chlorhydrate de triéthylamine est formé. Le milieu est filtré et le filtrat est lavé avec 30 mL d'une solution aqueuse d'acide acétique 5 %, puis avec 25 mL d'une solution aqueuse saturée de NaCl. La phase organique est séchée avec Na₂SO₄ puis évaporée sous pression. Le produit **10-c** (1,46 g) est obtenu sous forme d'une huile incolore avec un rendement de 45 %. (Ce produit doit être conservé à basse température -84 °C).

- ✓ RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz) : 2,82 (t, J = 7,5 Hz, 2H), 2,61 (t, J = 7,5 Hz, 2 H), 1,63 – 1,57 (m, 6H), 1,41 – 1,34 (m, 6H), 1,32 – 1,19 (m, 6H), 0,94 (t, J = 7,5 Hz, 9H).

iv. 3,3'-Bis(2-cyanoéthylsulfanyl)-2,2'-bithiophène (**10-d**)

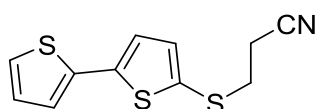
A une solution de Bu₃SnSCH₂CH₂CN **10-c** (1,46 g, 3,9 mmol, 3,9 éq) dans du toluène anhydre (20 mL) sont ajoutés le 3,3'-dibromo-2,2'-bithiophène (325 mg, 1 mmol, 1 éq) et le Pd(PPh₃)₄ (25 mg, 0,2 mmol, 0,2 éq). Le mélange est porté à reflux pendant 12 h. Après concentration, le résidu est repris par le DCM (5 mL). La phase organique est lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (10 mL), avec de l'eau (10 mL), séchée sur MgSO₄ et évaporée. Le produit

est purifié par chromatographie sur gel de silice pour obtenir le composé **10-d** sous forme d'une huile de couleur orangée qui cristallise pendant la nuit (masse = 180 mg, rdt = 54 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/500 MHz)** : δ 7,46 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 7,12 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 2,94 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,49 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/126 MHz)** : δ 134,5, 131,1, 128,9, 127,2, 117,6, 31,1, 18,3.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₄H₁₂N₂S₄ ([M]⁺) 335,988, trouvé 335,973.

3.1.4. Synthèse de matrices bithiophéniques monosubstituées par des groupements alkylthio

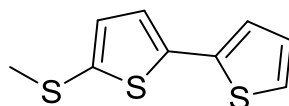
i. 3-(2,2'-Bithiophène-5-ylthio)propionitrile (**11**)¹⁶



Même mode opératoire que pour le composé **2**, avec le 2,2'-bithiophène (290 mg, 1,75 mmol, 1 équ), le *n*-BuLi (2,5 M dans l'hexane) (0,7 mL, 1,75 mmol, 1 équ), du soufre (56 mg, 1,75 mmol, 1 équ) et le 3-bromopropionitrile (234 mg, 1,75 mmol, 1 équ). Après une nuit d'agitation à température ambiante, le THF est évaporé et le produit brut est directement purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 30/70) pour donner le composé **11** sous forme d'un solide vert (286 mg, rdt = 65 %).

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)** : δ 7,21 (dd, *J* = 5,1, 1,2 Hz, 1H), 7,13 (dd, *J* = 3,6, 1,2 Hz, 1H), 7,02 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 7,00 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,83 (dt, *J* = 3,6, 0,9 Hz, 1H), 3,15 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 2,68 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** δ 139,1, 137,1, 136,7, 127,9, 126,6, 124,6, 123,8, 123,7, 118,7, 26,2, 19,8.

ii. 5-Méthylthio-2,2'-bithiophène (**12**)¹⁶

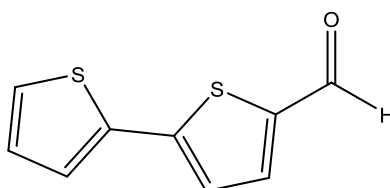


Même mode opératoire que pour le composé **2**, avec le 2,2'-bithiophène (150 mg, 0,9 mmol, 1 équ), le *n*-BuLi (2,5 M dans l'hexane) (0,36 mL 0,9 mmol, 1 équ), du soufre (29 mg, 0,9 mmol, 1 équ) et l'iodométhane (0,06 mL, 0,9 mmol, 1 équ). Après une nuit d'agitation à température ambiante, le solvant est évaporé et le produit brut est directement purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 10/90) pour donner le composé **12** sous forme d'un solide jaune (105 mg, rdt = 55 %).

- ✓ **RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/500 \text{ MHz}$):** δ 2,51 (s, 3H), 6,97 – 6,99 (m, 1H), 7,01 – 7,02 (m, 2H), 7,13 (dd, $J = 1,2$ Hz, 1H), 7,21 (dd, $J = 1,2$ Hz, 1H).
- ✓ **RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/125 \text{ MHz}$):** δ 22,2, 123,7, 123,8, 124,5, 127,8, 131,8, 136,2, 137,0, 139,6.
- ✓ **MALDI-TOF-MS :** Calculé pour $\text{C}_9\text{H}_8\text{S}_3$ ($[\text{M}-\text{H}]^+$) 211,979, trouvé 210,907.

3.1.5. Synthèse de matrices bithiophéniques non substituées par des groupements alkylthio

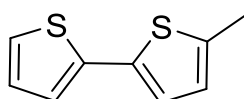
i. 5-Formyl-2,2'-bithiophène (**13**)²⁵⁴



Le DMF anhydre (0,24 g, 3,31 mmol, 1,1 éq) et l'oxychlorure de phosphore POCl_3 (0,51 g, 3,31 mmol, 1,1 éq.) sont additionnés à une solution de 2,2'-bithiophène **1** (0,5 g, 3,01 mmol, 1 éq) dans le 1,2-dichloroéthane (30 mL), et le mélange est porté à reflux pendant 3 heures. Après retour à température ambiante, le milieu réactionnel est hydrolysé par une solution aqueuse saturée d'acétate de sodium (50 mL). L'hydrolyse se poursuit sous agitation pendant 12 heures, puis le mélange est dilué avec du DCM (50 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (3 x 75 mL), séchées sur MgSO_4 , filtrées et évaporées. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant 5/5 : DCM/EP). Le 5-formyl-2,2'-bithiophène **13** (0,51 g) est obtenu avec un rendement de 87%.

- ✓ **RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/400 \text{ MHz}$):** δ 9,86 (s, 1H), 7,67 (d, $J = 4,0$ Hz, 1H), 7,36 (dd, $J = 2,4, 1,1$ Hz, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,25 (d, $J = 3,9$ Hz, 1H), 7,09 – 7,05 (m, 1H).
- ✓ **RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/101 \text{ MHz}$):** δ 182,7, 147,3, 141,8, 137,5, 136,1, 128,5, 128,5, 128,5, 127,2, 127,2, 127,2, 126,3, 124,4, 124,4, 124,4.
- ✓ **MALDI-TOF-MS :** Calculé pour $\text{C}_9\text{H}_6\text{S}_2\text{O}$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) 194,994, trouvé 195,175.

ii. 5-Méthyl-2,2'-bithiophène (**14**)²⁵⁵

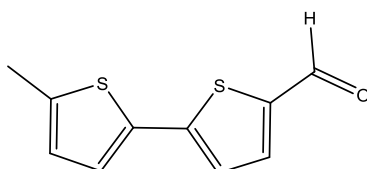


A une solution de bithiophène **1** (1 g, 6 mmol, 1 éq) dans 10 mL d'éther diéthylique à -5 °C est ajouté goutte à goutte le $n\text{-BuLi}$ (1,9 M dans l'hexane) (3,2 mL, 6 mmol, 1 éq). Le milieu réactionnel est agité une heure à -5 °C, puis une solution de diméthylsulfate (908 mg, 7,2 mmol,

1,2 éq) dans de l'éther diéthylique (2 mL) est ajouté goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à TA pendant 12 h, puis versé sur une solution aqueuse de chlorure d'ammonium 10 % (25 mL). Le mélange est extrait avec de l'éther diéthylique (3 x 15 mL). Les phases organiques sont rassemblées et lavées avec de l'eau (3 x 10 mL), séchées avec MgSO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut réactionnel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane 100 %). Le composé attendu **14** (674 mg) est obtenu sous forme d'une huile verdâtre avec un rendement de 70 %.

- ✓ **RMN ¹H (300 MHz/CDCl₃)** : δ 7,35 – 7,22 (m, 1H), 7,16 – 7,03 (m, 2H), 6,79 (dd, *J* = 3,5, 1,0 Hz, 2H), 2,62 (s, 3H).

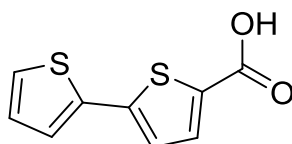
iii. 5-Formyl-5'-méthyl-2,2'-bithiophène (**15**)



À une solution de 5-méthyl-2,2'-bithiophène **14** (0,5 g, 2,78 mmol, 1 éq) dans du DMF anhydre (1,5 mL) est ajouté goutte à goutte à 0 °C POCl₃ (0,24 mL, 2,78 mmol, 1 éq). Après 48 heures d'agitation à TA, le milieu devient orange. De l'eau glacée (20 mL) est ajoutée, et le mélange est extrait au DCM (3 x 20 mL). Les phases organiques sont rassemblées, lavées avec une solution aqueuse saturée de chlorure de sodium (3 x 75 mL), séchées sur MgSO₄, filtrées et évaporées. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant 5/5 : DCM/EP). Le composé attendu **15** (420 mg) est obtenu sous forme d'un solide orange avec un rendement de 72 %.

- ✓ **RMN ¹H (500 MHz/CDCl₃)** : δ 9,83 (s, *J* = 13,2 Hz, 1H), 7,64 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,18 – 6,98 (m, 2H), 6,72 (d, *J* = 2,6 Hz, 1H), 2,50 (s, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (126 MHz/CDCl₃)** : δ 182,6, 147,9, 142,6, 141,1, 137,6, 133,8, 126,8, 126,4, 123,6, 15,6.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₀H₈OS₂ ([M-H]⁺) 206,994, trouvé 207,080.

iv. Acide 2,2'-bithiophényl-5-carboxylique (**16**)²⁵⁶

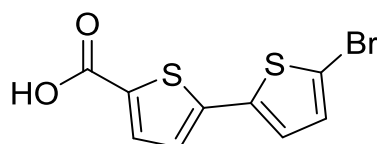


À une solution d'hydroxyde de sodium (123 mg, 3,08 mmol, 4 éq) dans 560 µL d'eau est ajoutée une solution de nitrate d'argent (262 mg, 1,54 mmol, 2 éq) dans 560 µL d'eau. L'agitation continue durant l'addition assure une réaction complète, un semi-solide marron est obtenu. Le milieu réactionnel est refroidi à 0 °C, et l'aldéhyde **13** (150 mg, 0,77 mmol, 1 éq) est ajouté en

petites portions toujours avec agitation. Après 10 min de réaction, le milieu est filtré et le résidu est lavé avec de l'eau chaude (2 x 5 mL). Le solvant de lavage et le filtrat sont combinés et acidifiés avec une solution d'acide chlorhydrique concentrée. Le précipité jaune formé est filtré, puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant 8/2 : DCM/EP). Le composé désiré **16** (118 mg) est obtenu avec un rendement de 75 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/270 MHz)**: δ 7,76 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,30 (dd, *J* = 3,8, 2,9 Hz, 2H), 7,15 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,04 (dd, *J* = 5,0, 3,7 Hz, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)**: δ 167,1, 146,0, 136,3, 136,0, 130,5, 128,4, 126,6, 125,7, 124,3.
- ✓ **SMHR (MALDI)** : Calculé pour C₁₃H₁₀N₂S₄ [M]⁺: 209,981, trouvé 209,971.

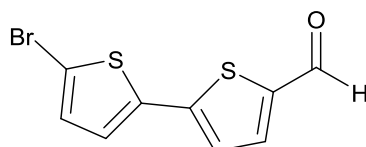
v. Acide 5'-bromo-2,2'-bithiophényl-5-carboxylique (**17**)



À une solution d'acide **16** (50 mg, 0,24 mmol, 1 éq) dans le DMF (5 mL) à 0 °C est ajouté par petites portions le NBS (47 mg, 0,26 mmol, 1,05 éq). Le milieu réactionnel est agité en laissant revenir à TA, et de l'eau glacée (20 mL) est ajoutée après 12h d'agitation. Le précipité formé est filtré, et le composé attendu **17** (58 mg) est obtenu sous forme d'un solide beige avec un rendement de 87 %.

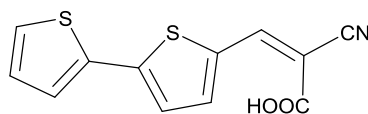
- ✓ **RMN ¹H (DMSO-d₆/400 MHz)** : δ 7,65 (dd, *J* = 3,9, 0,6 Hz, 1H), 7,37 – 7,32 (m, 2H), 7,28 (dd, *J* = 3,9, 0,7 Hz, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (DMSO-d₆/101 MHz)** : δ 163,1, 141,8, 137,6, 134,6, 132,4, 127,0, 125,7, 112,6.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₉H₅BrO₂S₂ ([M]⁺) 287,891, trouvé 288,002.

vi. 5-Bromo-5'-formyl-2,2'-bithiophène (**18**)



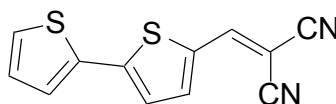
À une solution d'aldéhyde **13** (100 mg, 0,5 mmol, 1 éq) dans 2 mL d'acétate d'éthyle est ajouté le NBS (98 mg, 0,55 mmol, 1,1 éq). Le mélange réactionnel est placé pendant 6 min sous irradiation ultrasons à TA. Le solvant est ensuite évaporé sous pression réduite et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant 3/7 : AcOEt/hexane). Le composé attendu **18** (103 mg) est obtenu avec un rendement de 75 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)** : δ 9,87 (s, 1H), 7,66 (d, *J* = 4 Hz, 1H), 7,17 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,10 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,03 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** : δ 182,5, 145,6, 142,1, 141,9, 138,2, 137,1, 127,3, 124,6, 75,4.

vii. Acide 3-(2,2'-bithiophène-5-yl)-2-cyanoacrylique (**19**)²⁶²

À une solution de 5-formyl-2,2'-bithiophène **13** (50 mg, 0,26 mmol, 1 éq) dans l'acide acétique (2,2 mL) sont ajoutés l'acide cyanoacétique (25 mg, 0,28 mmol, 1,1 éq) et l'acétate d'ammonium (1 mg, 0,01 mmol, 0.05 éq). Le mélange est chauffé à reflux pendant 2 h. Le précipité obtenu est lavé avec de l'eau (5 mL), de l'hexane (5 mL) et un mélange 10 % (acétate d'éthyle/hexane) (5 mL) pour obtenir le composé **19** (47 mg) sous forme d'un solide rouge avec un rendement de 68%.

- ✓ **RMN ¹H (DMSO-d₆/300 MHz)** : δ 8,48 (s, 1H), 7,97 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,71 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,56 (m, 2H), 7,18 (m, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (DMSO-d₆/101 MHz)** : δ 163,7, 146,6, 145,9, 141,4, 135,8, 134,0, 129,1, 128,7, 127,0, 125,2, 116,6, 97,5.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₂H₇NO₂S₂ ([M]⁺) 260,992, trouvé 261,116.

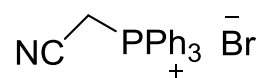
viii. 5-Dicyanovinyl-2,2'-bithiophène (**20**)²⁵³

À une solution d'aldéhyde **13** (50 mg, 0,26 mmol, 1 éq) dans du DCM (7 mL) sont ajoutés la pyridine (24 mg, 0,03 mmol, 0,1 éq) et le malonitrile (17 mg, 0,26 mmol, 1 éq). Le mélange réactionnel est agité sous atmosphère d'azote pendant 12 h. Après évaporation du solvant, le résidu est lavé avec de l'éther diéthylique froid (10 mL). Après séchage, le composé **20** (42 mg) est obtenu sous forme d'un solide rouge avec un rendement de 67 %.

- ✓ **RMN ¹H (DMSO-d₆/500 MHz)** : δ 8,61 (s, 1H), 7,89 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,78 (dd, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,67 (dd, *J* = 3,8 Hz, 1H), 7,62 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 7,18 – 7,22 (m, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (DMSO-d₆/101 MHz)** : δ 152,3, 147,8, 142,3, 134,5, 133,2, 129,4, 129,1, 127,7, 125,4, 114,5, 113,7, 74,3.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₂H₆S₂N₂ ([M-H]⁺) 241,997, trouvé 242,040.

ix. 5-Cyanovinyl-2,2'-bithiophène (21-c)

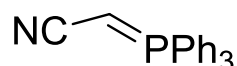
Sel de (cyanométhylène)triphénylphosphonium (21-a)



À une solution de bromoacétonitrile (1 g, 16,7 mmol, 1 éq) dans le toluène (15 mL) est ajoutée une solution de triphénylphosphine (2,19 g, 16,7 mmol, 1 éq) dans le toluène (5 mL), et le milieu réactionnel est agité 48 h à TA. Le précipité blanc est filtré sous vide, puis lavé avec du toluène (2 x 5 mL) et de l'hexane (3 x 5 mL). Le solide est séché sous vide pour donner le composé **21-a** (2,9 g) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 92 %.

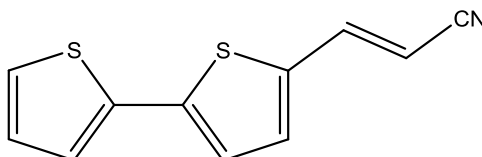
- ✓ RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300 \text{ MHz}$) : δ 8,00 – 7,93 (m, 6H), 7,80 (t, $J = 7,1 \text{ Hz}$, 3H), 7,71 – 7,67 (m, 6H), 6,42 (d, $J = 15,4 \text{ Hz}$, 2H).

Cyanométhylène triphénylphosphorane (21-b)



À une solution sous N_2 de sel de phosphonium **21-a** (387 mg, 1,28 mmol, 1 éq) dans du THF anhydre (10 mL) à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ est ajouté goutte à goutte le $n\text{-BuLi}$ (2,5 M dans l'hexane) (0,55 mL, 1,3 mmol, 1,1 éq). Le milieu initialement blanc devient jaune. Le mélange est maintenu à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 40 minutes. L'ylure généré est utilisé *in situ* (voir réaction suivante).

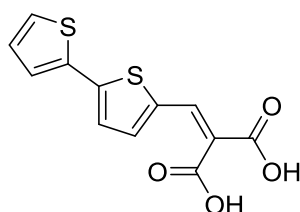
(E)-5-Cyanovinyl-2,2'-bithiophène (21-c)



À une solution d'aldéhyde **13** (250 mg, 1,3 mmol, 1,1 éq) dans du THF anhydre (5 mL) à $-78 \text{ }^\circ\text{C}$ est ajouté l'ylure **21-b** préalablement formé. Après une heure d'agitation à cette température, le milieu réactionnel est laissé revenir à TA. Après 12 h d'agitation, le solvant est évaporé et le résidu est repris par du DCM (30 mL). La phase organique est lavée à l'eau (3 x 50 mL), séchée sur MgSO_4 et filtrée. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant 9/1 : hexane/ AcOEt). Le composé **21-c** est ainsi obtenu sous forme d'un solide jaune (225 mg, 84 % rdt).

- ✓ RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300 \text{ MHz}$) : δ 7,30 (d, $J = 16,2 \text{ Hz}$, 1H), 7,23 – 7,13 (m, 2H), 7,02 (d, $J = 0,6 \text{ Hz}$, 2H), 6,96 (dd, $J = 5,0, 3,7 \text{ Hz}$, 1H), 5,46 (d, $J = 16,2 \text{ Hz}$, 1H).
- ✓ MALDI-TOF-MS : Calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_7\text{NS}_2$ ($[\text{M}]^+$) 217,002, trouvé 217,081.

x. Acide (2,2'-bithiophène-5-ylméthylène)malonique (**22**)

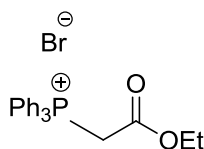


À une solution d'aldéhyde **13** (500 mg, 2,6 mmol, 1 éq) dans 6 mL d'éthanol sont ajoutés l'acide malonique (322 mg, 3,1 mmol, 1,2 éq) et l'acétate d'ammonium (140 mg, 1,82 mmol, 0,7 éq). Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 5 h, puis 12 h à TA. Après évaporation du solvant, le composé attendu **22** (655 mg) est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 90 % après recristallisation dans l'éthanol.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/500 MHz)** : δ 8,30 (s, 1H), 7,53 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 7,45 – 7,37 (m, 2H), 7,26 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 7,08 (dd, *J* = 5,1, 3,7 Hz, 1H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/126 MHz)** : δ 171,1, 170,2, 146,9, 140,9, 140,4, 136,5, 135,8, 127,7, 125,7, 124,5, 122,5, 106,5.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₂H₈O₄S₂ ([M]⁺) 279,986, trouvé 279,925.

xi. Synthèse de la molécule (23-c)

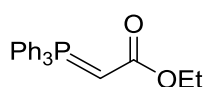
Synthèse du bromure de triphénylcarbéthoxyméthylphosphonium (**23-a**)



À une solution de triphénylphosphine (3,14 g) dans du toluène (6 mL) est ajouté goutte à goutte une solution de bromoacétate d'éthyle (2 g) dans du toluène (6 mL). Après 45 minutes d'agitation, le solide formé est filtré puis lavé avec de l'hexane (10 mL). Le composé **23-a** (4,3 g) est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 85 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz)** δ 7,93 – 7,59 (m, 15H), 5,52 (d, *J* = 13,8 Hz, 2H), 4,02 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,04 (t, *J* = 7,2 Hz, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** δ 164,7, 164,6, 135,3, 135,2, 134,2, 134,1, 130,4, 130,3, 118,5, 117,6, 63,0, 33,6, 33,0, 13,8.

Synthèse du triphénylcarbéthoxyméthylphosphorane (**23-b**)

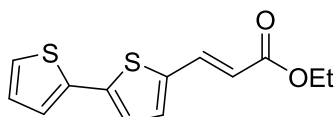


Le produit **23-a** (0,5 g) est solubilisé dans une quantité minimum d'eau puis un volume égal de toluène est ajouté, ainsi qu'une goutte de solution de phénolphtaléine. Ensuite une solution

aqueuse de NaOH (2,5 M) est ajouté jusqu' au point d'extrémité. La phase organique est ensuite récupérée et évaporée sous pression réduite. L'ajout d'EP provoque la précipitation du phosphorane. Après filtration et séchage le composé **23-b** (0,31 g) est obtenu sous forme d'un solide beige avec un rendement de 71 %.

- ✓ **RMN ¹H (300 MHz/CDCl₃):** δ 7,66 – 7,39 (m, 15H), 6,81 (s, 1H), 4,08 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,21 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H).

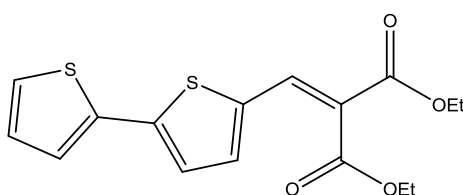
Synthèse de la molécule (*E*)-3-([2,2'-bithiophen]-5-yl)éthylacrylate (**23-c**)



À une solution d'aldéhyde **13** (25 mg, 0,13 mmol, 1 éq) dans le DCM (5 mL) à 0 °C est ajouté le phosphorane **23-b** (58 mg, 0,13 mmol, 1 éq). L'agitation est maintenue 20 min à cette température, puis 10 min à température ambiante. Après évaporation sous pression réduite, le solide est lavé par 2 fois 20 mL d'hexane. Le composé **23-c** (11 mg) est obtenu avec un rendement de 35 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/400 MHz):** δ 8,10 – 7,95 (m, 1H), 7,82–7,78 (m, 4H), 7,32 – 7,28 (m, 1H), 6,41 (d, *J* = 15,1 Hz, 1H), 4,08 (q, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,21 (t, *J* = 7,6 Hz, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz):** δ 166,9, 146,1, 140,3, 138,2, 136,9, 132,2, 128,2, 125,7, 124,8, 124,4, 116,7, 60,6, 14,4.
- ✓ **MALDI-TOF-MS:** Calculé pour C₁₃H₁₂O₂S₂ ([M-H]⁺) 264,028, trouvé 264,166.

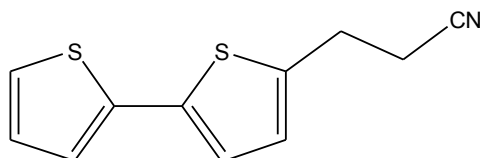
xii. (2,2'-Bithiophène-5-ylméthylène)diéthyle malonate (**24**)²⁶⁶



À une solution d'aldéhyde **13** (100 mg, 0,52 mmol, 1 éq) dans la pyridine (0,5 mL) sont ajoutés le malonate de diéthyle (92 mg, 0,57 mmol, 1,1 éq) et la pipéridine (0,15 mL). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 6 h dans un appareil avec un piège de Dean-Stark. Après refroidissement, une solution aqueuse de HCl 0,1 N (10 mL) est ajoutée, et la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3 x 25 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur MgSO₄ et filtrées. Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant DCM/EP : 3/7) pour conduire au composé **24** (114 mg) sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 64 %.

- ✓ **RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$)** : δ 7,77 (d, $J = 0,5\text{ Hz}$, 1H), 7,29 – 7,23 (m, 3H), 7,12 (d, $J = 3,9\text{ Hz}$, 1H), 7,02 (dd, $J = 5,1, 3,7\text{ Hz}$, 1H), 4,42 (q, $J = 7,1\text{ Hz}$, 2H), 1,38 (t, $J = 7,1\text{ Hz}$, 3H).
- ✓ **RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/101\text{ MHz}$)** : δ 166,4, 164,6, 143,9, 136,4, 136,2, 135,1, 134,7, 128,2, 126,2, 125,3, 124,0, 121,5, 62,0, 61,6, 14,3, 14,1.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{S}_2$ ($[\text{M}]^+$) 336,049, trouvé 336,176.

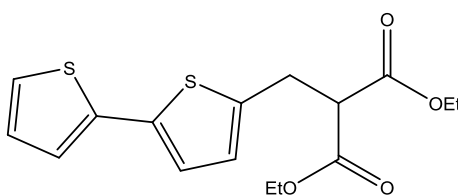
xiii. 3-(2,2'-Bithiophène-5-yl)propionitrile (25)



À une solution du composé **21-c** (50 mg, 0,23 mmol) dans MeOH (5 mL) est ajouté du Pd/C (10 %) (122 mg, 1,15 mmol). Après saturation du milieu réactionnel par un flux de dihydrogène pendant 30 min, l'agitation est poursuivie à TA pendant 48 h sous atmosphère de dihydrogène. Le mélange est filtré sur célite, le solvant est évaporé et le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/DCM : 7/3). Le composé **25** (42 mg) est obtenu sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 42 %.

- ✓ **RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$)** δ 7,21 (dd, $J = 5,1, 1,2\text{ Hz}$, 1H), 7,13 (dd, $J = 3,6, 1,2\text{ Hz}$, 1H), 7,01 (dd, $J = 5,2, 3,6\text{ Hz}$, 2H), 6,83 (dt, $J = 3,6, 0,9\text{ Hz}$, 1H), 3,15 (td, $J = 7,2, 0,7\text{ Hz}$, 2H), 2,68 (t, $J = 7,3\text{ Hz}$, 2H).
- ✓ **RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/101\text{ MHz}$)** δ 139,1, 137,2, 136,8, 127,9, 126,6, 124,6, 123,8, 123,8, 118,8, 26,3, 19,9.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{NS}_2$ ($[\text{M}]^+$) 219,020, trouvé 219,150.

xiv. (2,2'-Bithiophényl-5-ylméthyl)diéthyle malonate (26)²⁶⁶

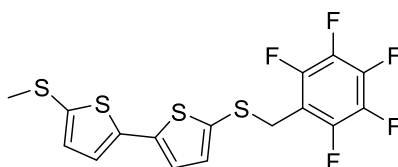


À une solution de **24** (80 mg, 0,24 mmol, 1 éq) dans d'éthanol (4 mL) à 0 °C est ajouté par portion le borohydrure de sodium (0,7 mg, 0,12 mmol, 0,5 éq). Le milieu réactionnel est agité pendant 40 min à TA puis quelques goutte d'acide acétique sont ajoutés jusqu'à pH = 6. Le précipité blanc formé est éliminé par filtration et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans de l'eau (25 mL) et de l'éther diéthylique (15 mL). La phase organique est lavée avec de l'eau (3 x 5 mL), une solution aqueuse saturée de NaCl (10 mL) et séchée sur MgSO_4 puis concentrée. Le produit **26** (50 mg) est obtenu sous forme d'une huile verte avec un rendement de 61 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)** : δ 7,15 (dd, *J* = 5,1, 1,0 Hz, 1H), 7,08 (dd, *J* = 3,6, 1,0 Hz, 1H), 7,00 – 6,92 (m, 2H), 6,73 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 4,18 (q, *J* = 7,1 Hz, 4H), 3,65 (t, *J* = 7,6 Hz, 1H), 3,38 (d, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,23 (t, *J* = 7,1 Hz, 6H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** : δ 168,5, 139,2, 137,5, 136,4, 128,7, 127,8, 126,9, 124,2, 123,5, 61,8, 54,0, 29,2, 14,1.
- ✓ **MALDI-TOF-MS** : Calculé pour C₁₆H₁₈O₄S₂ ([M]⁺) 338,065, trouvé 338,186.

3.1.6. Synthèse des matrices pentafluorées

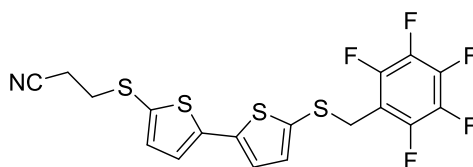
i. 5-Méthylthio-5'-(2,3,4,5,6-pentafluorophényl)méthylthio-2,2'-bithiophène (27)



À une solution du composé **3** (50 mg, 0,17 mmol, 1 éq) dans le DMF (6 mL) est ajouté une solution d'hydroxyde de césium (42 mg, 0,25 mmol, 1,5 éq) dans le MeOH (3 mL). Après une heure d'agitation à TA, l' α -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène (50 mg, 0,19 mmol, 1,1 éq) est ajouté. Une solution jaune claire est obtenue. Après 12 h d'agitation à TA, le solvant est évaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/AcOEt : 95/5) pour donner le composé **27** (45 mg) sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 63 %.

- ✓ **RMN ¹H (CDCl₃/300 MHz)** 6,98 (d, *J* = 3,6 Hz, 1H), 6,95 (d, *J* = 3,9 Hz, 2H), 6,90 (d, *J* = 3,9 Hz, 1H), 3,99 (s, 2H), 2,51 (s, 3H).
- ✓ **RMN ¹³C (CDCl₃/101 MHz)** δ 142,8, 138,6, 137,6, 137,0, 131,6, 124,5, 123,9, 123,8, 22,1.
- ✓ **MALDI-TOF** : Calculé pour C₁₆H₉F₅S₄ ([M-H]⁺) 422,943, trouvé 422,796.

ii. 3-(5'-(2,3,4,5,6-Pentafluorophényl)méthylthio-2,2'-bithiophène-5-ylthio)propionitrile (28)



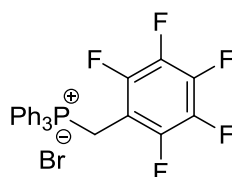
À une solution de composé diprotégé **2** (50 mg, 0,15 mmol, 1 éq) dans le DMF (5 mL) est ajouté une solution d'hydroxyde de césium (28 mg, 0,16 mmol, 1,05 éq) dans le MeOH (3 mL). Après une heure d'agitation à TA, l' α -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène (56 mg, 0,21 mmol, 1,4 éq) est ajouté. Une solution jaune claire est obtenue. Après agitation 12 h à TA, le solvant est

éaporé et le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant hexane/DCM : 1/1) pour donner le composé **28** (51 mg) sous forme d'un solide jaune avec un rendement de 74 %.

- ✓ RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$) δ 7,09 (dd, $J = 3,3, 3,7\text{ Hz}$, 2H), 6,96 (dd, $J = 3,1, 3,7\text{ Hz}$, 2H), 4,00 (s, $J = 8,1\text{ Hz}$, 2H), 3,00 (t, $J = 7,2\text{ Hz}$, 2H), 2,66 (t, $J = 7,2\text{ Hz}$, 2H).
- ✓ RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/101\text{ MHz}$) δ 142,1, 141,8, 137,1, 136,8, 131,3, 130,9, 124,8, 124,7, 117,8, 33,9, 30,5, 18,4.
- ✓ SMHR (MALDI) : Calculé pour $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{F}_5\text{N}_2\text{S}_4 [\text{M}]^+$ 462,9616, trouvé 462,9541.

iii. 5-(2-(2,3,4,5,6-Pentafluorophényl)vinyl)-2,2'-bithiophényl (29-c)

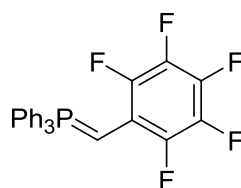
Sel du (2,3,4,5,6-pentafluorobenzylidène)triphénylphosphonium (29-a)²⁷³



À une solution d' α -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotoluène (0,25 g, 1 mmol, 1 éq) dans l'acétone (10 mL) est ajouté la triphénylphosphine (0,5 g, 2 mmol, 2 éq). Le mélange est agité à TA pendant 12 h sous N_2 . Le solvant est évaporé jusqu'à obtention d'une huile blanchâtre qui précipite par ajout d'éther de pétrole. Le solide blanc obtenu est filtré sur fritté pour donner le composé **29-a** (0,8 g) sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 76 %.

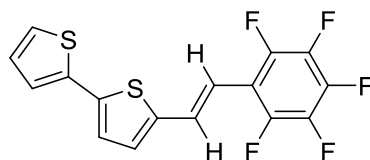
- ✓ RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/300\text{ MHz}$) : δ 7,91 – 7,63 (m, 15H), 5,65 (d, $J = 14,0\text{ Hz}$, 2H).
- ✓ RMN ^{19}F ($\text{CDCl}_3/283\text{ MHz}$) : δ -138,42 (m, 2F), -153,30 (t, 1F), -162,25 (m, 2F).

(2,3,4,5,6,-Pentafluorobenzylidène)triphénylphosphorane (29-b)²⁷³



À une suspension de sel de phosphonium **29-a** (400 mg, 0,765 mmol, 1 éq) dans le THF anhydre (20 mL) sous N_2 est ajouté goutte à goutte à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ le $n\text{-BuLi}$ (1,5 M dans l'hexane) (0,4 mL, 0,85 mmol, 1,1 éq). Le mélange est maintenu à $-78\text{ }^\circ\text{C}$ pendant 30 min sous agitation. L'ylure généré est utilisé *in situ* (voir ci-après).

(E)-5-(2-(2,3,4,5,6,-Pentafluorophényl)vinyl)-2,2'-bithiophényl (29-c)²⁷⁴



À la solution d'ylure préalablement formé **29-b** est ajouté à $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ et sous atmosphère inerte une solution d'aldéhyde **13** (150 mg, 0,77 mmol, 1 éq) dans le THF anhydre (10 mL). Le mélange est maintenu à cette température pendant 1 h, puis agité jusqu'à TA pendant 12 h. Le solvant est ensuite évaporé et le résidu est repris par du DCM (30 mL). La phase organique est lavée à l'eau (3 x 100 mL), séchée sur MgSO_4 , filtrée et évaporée. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant cyclohexane/AcOEt : 97/3) et le composé **29-c** (221 mg) est obtenu avec un rendement de 80 %.

- ✓ **RMN ^1H ($\text{CDCl}_3/400\text{ MHz}$)** δ 7,48 (d, $J = 16,4\text{ Hz}$, 1H), 7,26 – 7,20 (m, 2H), 7,09 (d, $J = 3,8\text{ Hz}$, 1H), 7,05 – 7,01 (m, 2H), 6,72 (d, $J = 16,5\text{ Hz}$, 1H).
- ✓ **RMN ^{13}C ($\text{CDCl}_3/101\text{ MHz}$)** δ 140,9, 140,7, 138,4, 137,1, 129,9, 129,9, 129,5, 128,1, 127,9, 125,2, 124,6, 124,4, 124,3, 123,8, 123,6, 111,7.
- ✓ **MALDI-TOF** : Calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_7\text{F}_5\text{S}_2$ ($[\text{M}]^+$) 357,991, trouvé 358,012.

3.2. Partie B : évaluation des matrices

3.2.1. Absorbance UV

Les spectres sont enregistrés avec un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 950, et les solutions de concentration de l'ordre de 0,1 mM sont préparées dans le DCM (à l'exception de **14**, **22** et **25** dans le THF).

3.2.2. Préparations des solutions des matrices

La matrice non bithiophénique CHCA est solubilisée jusqu'à saturation dans de l'ACN à 70 % (aq) contenant 0,1 % de TFA, et ensuite diluées avec 30 % d'ACN (aq) contenant 0,1 % de TFA dans un rapport de 1:2. Concernant la deuxième matrice commerciale, la solution de DHB est préparée à $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans une solution aqueuse d'acétonitrile à 70 %.

Deux volumes de chaque solution de matrice ont été mélangés avec un volume de solution de travail standard (WS).

3.2.3. Procédure de préparation et d'analyse des solutions stocks et des solutions de travail

Les solutions stocks (SS) de tous les standards sont préparées dans du MeOH à une concentration de $2,6\text{ }\mu\text{M}$ et stockées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation ultérieure.

Les solutions de travail (WS) ont été fraîchement préparées pour chaque essai par dilution de la SS avec du MeOH à 70 % (+ 0,1 % de TFA) dans un rapport de 1:2. Les WS sont ensuite mélangées avec des solutions de la matrice avec un ratio 1:2 et $1\text{ }\mu\text{L}$ du mélange est finalement déposé sur la plaque MALDI, puis laissé à sécher à température ambiante. La quantité finale des

composés est environ 200 nmol/spot de l'échantillon. Avec ce protocole le ratio matrice/analyte dans le mélange déposé est environ égal à 100. Les échantillons ont été déposés en quatre exemplaires. Il reste à préciser que pour préparer la solution du mélange standard des peptides HPLC, 0,5 mg du précipité lyophilisé est dissous dans 500 μL de 70 % de $\text{MeOH}_{(\text{aq})}$. L'énergie du laser utilisé pour analyser ces solutions a été fixée à 35% (58,8 μJ).

1.1.2. Pour le sérum enrichi en strychnine

Le sérum d'un individu sain stocké à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ est décongelé à la température ambiante avant l'analyse. Afin d'éviter de dégrader le sérum après plusieurs cycles de congélation/décongélation, ce test est réalisé trois jours successifs.

La strychnine a été dissoute dans du MeOH à une concentration de $0,6\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. 10 μL de cette solution ont été mélangés avec 900 μL de plasma produisant un WS à une concentration de 0,16 mM.

Cette dernière (WS) a ensuite été mélangée avec 20 μL de la solution de matrice (CHCA ou PFPT3P) à un rapport de 1:2. Pour la détermination de la LOD, une série de dilution était faite aussi, les solutions de travail obtenues ont encore été diluées avec du plasma produisant une concentration finale de $2,1\text{ }\mu\text{M}$. Pour faciliter une miscibilité suffisante avec le WS aqueux avec la solution matricielle organique, le PFPT3P a été dissous exceptionnellement dans un mélange de MeOH et de DCM (v/v ; 7/3) pour cette expérience. L'énergie du laser lors de l'analyse de sérum est de 40 % (65,2 μJ).

3.2.4. Analyse d'alcaloïdes dans des solutions bioactives commerciales

Les solutions commerciales des produits pharmaceutiques RYTMOPASC[®], Autan[®] sont diluées 1:1 avec du MeOH pour obtenir les WS. Ensuite 10 μL de ces dernières solutions sont mélangées avec 20 μL de la solution de la matrice. 1 μL du mélange est déposé sur la plaque MALDI et l'énergie du laser utilisé est fixée à 35 % (58,8 μJ).

3.2.5. Criblage direct de drogues végétales

1 mg de plante pulvérisée est mélangée avec 20 μL de la matrice PFPT3P ($10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le DCM) dans un tube eppendorf, et agité au vortex. 1 μL est ensuite déposé sur la plaque MALDI. Durant ces essais, l'énergie du laser est fixée à 35 % (58,8 μJ).

Bibliographie

- (1) Kailemia, M. J.; Ruhaak, L. R.; Lebrilla, C. B.; Amster, I. J. Oligosaccharide analysis by mass spectrometry: a review of recent developments. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 196–212.
- (2) Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W. Advances in mass spectrometry for lipidomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2010**, *3* (1), 433–465.
- (3) Chapman, J. D.; Goodlett, D. R.; Masselon, C. D. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33* (6), 452–470.
- (4) Dudley, E.; Bond, L. Mass spectrometry analysis of nucleosides and nucleotides. *Mass Spectrom. Rev.* **2014**, *33* (4), 302–331.
- (5) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26* (1), 51–78.
- (6) Yamashita, M.; Fenn, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J. Phys. Chem.* **1984**, *88* (20), 4451–4459.
- (7) Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (14), 2935–2939.
- (8) CHEMnetBASE Chemical Databases & Dictionaries - Presented by CRCnetBASE <http://www.chemnetbase.com/> (consulté le 16, Oct, **2016**).
- (9) Rao, S. R.; Ravishankar, G. A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol. Adv.* **2002**, *20* (2), 101–153.
- (10) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70* (3), 461–477.
- (11) Harvey, A. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today* **2008**, *13* (19–20), 894–901.
- (12) Jacquesy, J. C.; Jouannetaud, M. P. La vinflunine, nouvel agent anticancéreux fluoré dérivé des alcaloïdes de Vinca. *Ann. Pharm. Fr.* **2005**, *63* (1), 28–34.
- (13) Konishi, Y.; Kiyota, T.; Draghici, C.; Gao, J.-M.; Yeboah, F.; Acoca, S.; Jarussophon, S.; Purisima, E. Molecular formula analysis by an MS/MS/MS technique to expedite dereplication of natural products. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (3), 1187–1197.
- (14) Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. The influence of natural products upon drugdiscovery. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17* (3), 215–234.
- (15) Schinkovitz, A.; Kenfack, G. T.; Seraphin, D.; Levillain, E.; Dias, M.; Richomme, P. Selective detection of alkaloids in MALDI-TOF: the introduction of a novel matrix molecule. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403* (6), 1697–1705.
- (16) Tsague Kefnack, G. élaboration de mounocouches auto-assemblées pour la spectrométrie de masse DIAMS- synthèses et évaluations de matrices bithiophéniques en MALDI, Angers, **2011**.
- (17) Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (20), 2299–2301.
- (18) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T.; Matsuo, T. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2* (8), 151–153.
- (19) Busch, K. L. Special feature: Tutorial. Desorption ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **1995**, *30* (2), 233–240.
- (20) Botter, R.; Bouchoux, G. Spectrométrie de masse. Techniques de l'ingénieur, Analyse et caractérisation. **1995**, *PE 2615*, 1–39.

- (21) Beckey, H. D.; Schuelten, D. Instrumentelle probleme der feldionisationsmassenspektrometrie. *Z instr* **1960**, *68*, 302–307.
- (22) Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. N. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectrometry. *Nature* **1981**, *293* (5830), 270–275.
- (23) Kusano, M.; Kawabata, S.-I.; Tamura, Y.; Mizoguchi, D.; Murouchi, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R.; Tanaka, K. Laser desorption/ionization mass spectrometry (LDI-MS) of lipids with iron oxide nanoparticle-coated targets. *Mass Spectrom. Tokyo Jpn.* **2014**, *3* (1), A0026.
- (24) Yasuda, A.; Ishimaru, T.; Nishihara, S.; Sakai, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R.; Shigeri, Y. A thiophene-containing compound as a matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and the electrical conductivity of matrix crystals. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2013**, *19* (1), 29–37.
- (25) Fülöp, A.; Porada, M. B.; Marsching, C.; Blott, H.; Meyer, B.; Tambe, S.; Sandhoff, R.; Junker, H.-D.; Hopf, C. 4-Phenyl- α -cyanocinnamic acid amide: screening for a negative ion matrix for MALDI-MS imaging of multiple lipid classes. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (19), 9156–9163.
- (26) Wan, W.; Han, Q.; Zhang, X.; Xie, Y.; Sun, J.; Ding, M. Selective enrichment of proteins for MALDI-TOF MS analysis based on molecular imprinting. *Chem Commun* **2015**, *51* (17), 3541–3544.
- (27) Monopoli, A.; Calvano, C. D.; Nacci, A.; Palmisano, F. Boronic acid chemistry in MALDI MS: a step forward in designing a reactive matrix with molecular recognition capabilities. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (33), 4322–4324.
- (28) Chen, S.; Chen, L.; Wang, J.; Hou, J.; He, Q.; Liu, J.; Wang, J.; Xiong, S.; Yang, G.; Nie, Z. 2,3,4,5-Tetrakis(3',4'-dihydroxyphenyl)thiophene: a new matrix for the selective analysis of low molecular weight amines and direct determination of creatinine in urine by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (23), 10291–10297.
- (29) Jiao, J.; Yang, L.; Zhang, Y.; Lu, H. Hydrazinonicotinic acid derivatization for selective ionization and improved glycan structure characterization by MALDI-MS. *The Analyst* **2015**, *140* (16), 5475–5480.
- (30) Guo, Z.; He, L. A binary matrix for background suppression in MALDI-MS of small molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387* (5), 1939–1944.
- (31) Calba, P. J.; Muller, J.-F. *Contribution à l'étude du mécanisme MALDI par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques*; Université de Metz: Metz, France, **1998**.
- (32) Heise, T. W.; Yeung, E. S. Dynamics of matrix-assisted laser desorption as revealed by the associated acoustic signal. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *299* (3), 377–385.
- (33) Dias, M.; Levillain, E.; Richomme, P.; Schinkovitz, A.; Seraphin, D. New use for a compound as a matrix in the specific detection, identification and/or quantification of alkaloids by maldi-tof mass spectrometry. WO2013011234 A8, February 27, **2014**.
- (34) Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, *78*, 53–68.
- (35) Knochenmuss, R.; Karbach, V.; Wiesli, U.; Breuker, K.; Zenobi, R. The matrix suppression effect in matrix-assisted laser desorption/ionization: application to negative ions and further characteristics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12* (9), 529–534.
- (36) Annesley, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2003**, *49* (7), 1041–1044.
- (37) Wang, H.; Zhao, Z.; Guo, Y. Chemical and biochemical applications of MALDI TOF-MS based on analyzing the small organic compounds. In *Applications of MALDI-TOF Spectroscopy*; Topics in Current Chemistry; Springer Berlin Heidelberg, **2012**; pp 165–192.

- (38) Cohen, L.; Go, E. P.; Siuzdak, G. Small-molecule desorption/ionization mass analysis. In *MALDI MS*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2007**; pp 299–337.
- (39) Lewis, W. G.; Shen, Z.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. Desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry: background and applications. *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226* (1), 107–116.
- (40) Sanguinet, L.; Alévêque, O.; Blanchard, P.; Dias, M.; Levillain, E.; Rondeau, D. Desorption/ionization on self-assembled monolayer surfaces (DIAMS). *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (6), 830–833.
- (41) Watanabe, T.; Kawasaki, H.; Yonezawa, T.; Arakawa, R. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (SALDI-MS) of low molecular weight organic compounds and synthetic polymers using zinc oxide (ZnO) nanoparticles. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43* (8), 1063–1071.
- (42) Chen, W.-Y.; Chen, Y.-C. Affinity-based mass spectrometry using magnetic iron oxide particles as the matrix and concentrating probes for SALDI MS analysis of peptides and proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (3), 699–704.
- (43) Sherrod, S. D.; Diaz, A. J.; Russell, W. K.; Cremer, P. S.; Russell, D. H. Silver nanoparticles as selective ionization probes for analysis of olefins by mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (17), 6796–6799.
- (44) Wang, S.; Xiao, Z.; Xiao, C.; Wang, H.; Wang, B.; Li, Y.; Chen, X.; Guo, X. (E)-Propyl α -Cyano-4-Hydroxyl Cinnamylate: A high sensitive and salt tolerant matrix for intact protein profiling by MALDI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, *27* (4), 709–718.
- (45) Calvano, C. D.; Monopoli, A.; Ditaranto, N.; Palmisano, F. 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalene/9-aminoacridine: A new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *798*, 56–63.
- (46) Afonso, C.; Budimir, N.; Fournier, F.; Tabet, J.-C. Activated surfaces for laser desorption mass spectrometry: application for peptide and protein analysis. *Curr. Pharm. Des.* **2005**, *11* (20), 2559–2576.
- (47) Kuzema, P. A. Small-molecule analysis by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Anal. Chem.* **2011**, *66* (13), 1227–1242.
- (48) Nemes, P.; Vertes, A. Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure Molecular Imaging Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry Imaging*; Humana Press: Totowa, NJ, **2010**; Vol. 656, pp 159–171.
- (49) Wahl, M. C.; Kim, H. S.; Wood, T. D.; Guan, S.; Marshall, A. G. Thin gold film-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of biomolecules. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (24), 3669–3676.
- (50) Kovalev, D.; Polisski, G.; Ben-Chorin, M.; Diener, J.; Koch, F. The temperature dependence of the absorption coefficient of porous silicon. *J. Appl. Phys.* **1996**, *80*, 5978–5983.
- (51) Zumbühl, S.; Knochenmuss, R.; Wülfert, S.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R. A graphite-assisted Laser desorption/ionization study of light-induced aging in triterpene dammar and mastic varnishes. *Anal. Chem.* **1998**, *70* (4), 707–715.
- (52) Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y.-C. Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (23), 4335–4342.
- (53) Li, X.; Wilm, M.; Franz, T. Silicone/graphite coating for on-target desalting and improved peptide mapping performance of matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry targets in proteomic experiments. *PROTEOMICS* **2005**, *5* (6), 1460–1471.

- (54) Huang, X.; Liu, Q.; Fu, J.; Nie, Z.; Gao, K.; Jiang, G. Screening of toxic chemicals in a single drop of human whole blood using ordered mesoporous carbon as a mass spectrometry probe. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (7), 4107–4113.
- (55) Deacon, G. B.; Field, L. D.; Fisher, K.; Jaroschik, F.; Kay, D. L.; Maschmeyer, T.; Masters, A. F. Fullerene matrices in the MALDI-TOF mass spectroscopic characterisation of organometallic compounds. *J. Organomet. Chem.* **2014**, *751*, 482–492.
- (56) Chen, Y.-C.; Tsai, M.-F. Sensitivity enhancement for nitrophenols using cationic surfactant-modified activated carbon for solid-phase extraction surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (23), 2300–2304.
- (57) Characterization of Graphene by Raman Spectroscopy - OpenStax CNX <http://cnx.org/contents/f06226c5-c2a4-4798-9c75b016acea73cd@3/Characterization-of-Graphene-b> (consulté le 13, Avr, **2016**).
- (58) Graphene & Graphite - How Do They Compare? <http://www.graphenea.com/pages/graphene-graphite> (consulté le 13, Avr, 2016).
- (59) Dong, X.; Cheng, J.; Li, J.; Wang, Y. Graphene as a novel matrix for the analysis of small molecules by MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (14), 6208–6214.
- (60) Sha, Y.; Huang, D.; Zheng, S.; Deng, C. Development of magnetic graphene as an adsorbent and matrix for selective enrichment and detection of crotonaldehyde in saliva by MALDI-TOF-MS. *Anal. Methods* **2013**, *5* (18), 4585–4590.
- (61) Lin, Y.-S.; Chen, Y.-C. Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry on Sol–Gel-Derived 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Film. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (22), 5793–5798.
- (62) Hutchens, T. W.; Yip, T.-T. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7* (7), 576–580.
- (63) Weinberger, S. R.; Morris, T. S.; Pawlak, M. Recent trends in protein biochip technology. *Pharmacogenomics* **2000**, *1* (4), 395–416.
- (64) Ardito, F.; Perrone, D.; Cocchi, R.; Lo Russo, L.; De Lillo, A.; Giannatempo, G.; Lo Muzio, L. Novel possibilities in the study of the salivary proteomic profile using seldi-TOF/MS technology (Review). *Oncol. Lett.* **2016**.
- (65) Mouradian, S.; Nelson, C. M.; Smith, L. M. A self-assembled matrix monolayer for UV-MALDI mass spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (36), 8639–8645.
- (66) Patel, K.; Sherrill, J.; Mrksich, M.; Scholle, M. D. Discovery of SIRT3 inhibitors using SAMDI mass spectrometry. *J. Biomol. Screen.* **2015**, *20* (7), 842–848.
- (67) Popović, I.; Nešić, M.; Vranješ, M.; Šaponjić, Z.; Petković, M. TiO₂ nanocrystals – assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of steroid hormones, amino acids and saccharides. Validation and comparison of methods. *RSC Adv.* **2016**, *6* (2), 1027–1036.
- (68) Chen, C.-T.; Chen, Y.-C. Molecularly imprinted TiO₂-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for selectively detecting α -cyclodextrin. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 1453–1457.
- (69) Kawasaki, H.; Yonezawa, T.; Watanabe, T.; Arakawa, R. Platinum nanoflowers for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biomolecules. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111* (44), 16278–16283.
- (70) Huang, Y.-F.; Chang, H.-T. Analysis of adenosine triphosphate and glutathione through gold nanoparticles assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (13), 4852–4859.
- (71) McLean, J. A.; Stumpo, K. A.; Russell, D. H. Size-selected (2–10 nm) gold nanoparticles for matrix assisted laser desorption ionization of peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (15), 5304–5305.

- (72) Kailasa, S. K.; Kiran, K.; Wu, H.-F. Comparison of ZnS semiconductor nanoparticles capped with various functional groups as the matrix and affinity probes for rapid analysis of cyclodextrins and proteins in surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (24), 9681–9688.
- (73) Castellana, E. T.; Russell, D. H. Tailoring Nanoparticle Surface Chemistry to Enhance Laser Desorption Ionization of Peptides and Proteins. *Nano Lett.* **2007**, *7* (10), 3023–3025.
- (74) Wu, H.-P.; Yu, C.-J.; Lin, C.-Y.; Lin, Y.-H.; Tseng, W.-L. Gold nanoparticles as assisted matrices for the detection of biomolecules in a high-salt solution through laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (5), 875–882.
- (75) Chiang, C.-K.; Chiang, N.-C.; Lin, Z.-H.; Lan, G.-Y.; Lin, Y.-W.; Chang, H.-T. Nanomaterial-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides and proteins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (7), 1204–1207.
- (76) Kinumi, T.; Saisu, T.; Takayama, M.; Niwa, H. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using an inorganic particle matrix for small molecule analysis. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (3), 417–422.
- (77) Ke, Y.; Kailasa, S. K.; Wu, H.-F.; Nawaz, M. Surface-modified TiO₂ nanoparticles as affinity probes and as matrices for the rapid analysis of phosphopeptides and proteins in MALDI-TOF-MS. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (21), 3400–3408.
- (78) Kim, J.-I.; Park, J.-M.; Noh, J.-Y.; Hwang, S.-J.; Kang, M.-J.; Pyun, J.-C. Analysis of benzylpenicillin in milk using MALDI-TOF mass spectrometry with top-down synthesized TiO₂ nanowires as the solid matrix. *Chemosphere* **2016**, *143*, 64–70.
- (79) Chen, P.-S.; Cheng, Y.-H.; Lin, S.-Y.; Chang, S. Y. Determination of immunosuppressive drugs in human urine and serum by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *408* (2), 629–637.
- (80) Bhat, A. R.; Wu, H.-F. Synthesis, characterization and application of modified Pd nanoparticles as preconcentration probes for selective enrichment/analysis of proteins via hydrophobic interactions from real-world samples using nanoparticle-liquid-liquid microextraction coupled to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (24), 3547–3552.
- (81) Woldegiorgis, A.; Kieseritzky, F. von; Dahlstedt, E.; Hellberg, J.; Brinck, T.; Roeraade, J. Polymer-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecular weight compounds. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (8), 841–852.
- (82) Armstrong, D. W.; Zhang, L. K.; He, L.; Gross, M. L. Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (15), 3679–3686.
- (83) Li, Y. L.; Gross, M. L. Ionic-liquid matrixes for quantitative analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (12), 1833–1837.
- (84) Ayorinde, F. O.; Hambright, P.; Porter, T. N.; Keith, Q. L. Use of meso-tetrakis(pentafluorophenyl)porphyrin as a matrix for low molecular weight alkylphenol ethoxylates in laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13* (24), 2474–2479.
- (85) Zhang, S.; Chen, Y.; Liu, J. A.; Xiong, S. X.; Wang, G. H.; Chen, J.; Yang, G. Q. New matrix of MALDI-TOF MS for analysis of small molecules. *Chin. Chem. Lett.* **2009**, *20* (12), 1495–1497.
- (86) Chen, R.; Chen, S.; Xiong, C.; Ding, X.; Wu, C.-C.; Chang, H.-C.; Xiong, S.; Nie, Z. N-(1-Naphthyl) Ethylenediamine Dinitrate: A new matrix for negative Ion MALDI-TOF MS analysis of small molecules. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23* (9), 1454–1460.

- (87) Nasser Abdelhamid, H.; Wu, H.-F. Furoic and mefenamic acids as new matrices for matrix assisted laser desorption/ionization-(MALDI)-mass spectrometry. *Talanta* **2013**, *115*, 442–450.
- (88) Wang, H.; Dai, B.; Liu, B.; Lu, H. 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*, 49–57.
- (89) Fukuyama, Y.; Tanimura, R.; Maeda, K.; Watanabe, M.; Kawabata, S.-I.; Iwamoto, S.; Izumi, S.; Tanaka, K. Alkylated dihydroxybenzoic acid as a MALDI matrix additive for hydrophobic peptide analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (9), 4237–4243.
- (90) Shanta, S. R.; Kim, T. Y.; Hong, J. H.; Lee, J. H.; Shin, C. Y.; Kim, K.-H.; Kim, Y. H.; Kim, S. K.; Kim, K. P. A new combination MALDI matrix for small molecule analysis: application to imaging mass spectrometry for drugs and metabolites. *Analyst* **2012**, *137* (24), 5757–5762.
- (91) Calvano, C. D.; Monopoli, A.; Ditaranto, N.; Palmisano, F. 1,8-bis(dimethylamino)naphthalene/9-aminoacridine: a new binary matrix for lipid fingerprinting of intact bacteria by matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *798*, 56–63.
- (92) Karas, M.; Ehring, H.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Grehl, M.; Krebs, B. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with additives to 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28* (12), 1476–1481.
- (93) Laugesen, S.; Roepstorff, P. 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* (9), 992–1002.
- (94) Cameron, A. E.; Eggers, D. F., Jr. An Ion "Velocitron". *Rev. Sci. Instrum.* **1948**, *19*, 605–607.
- (95) Wiley, W. C.; McLaren, I. H. Time-of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26* (12), 1150–1157.
- (96) Tabet, J. C.; Cotter, R. J. Laser desorption time-of-flight mass spectrometry of high mass molecules. *Anal. Chem.* **1984**, *56* (9), 1662–1667.
- (97) Cotter, R. J. Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules. *Anal. Chem.* **1992**, *64* (21), 1027A–1039A.
- (98) Le, L.-A.; Hunter, R. J.; Preedy, V. R. *Nanotechnology and Nanomedicine in Diabetes*; CRC Press, **2012**.
- (99) Thomas, R. A beginner's guide to ICP-MS. *Spectroscopy* **2001**, *16* (4), 38–42.
- (100) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9* (11), 1044–1050.
- (101) Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. J. Exp. Theor. Phys.* **1973**, *37*, 45.
- (102) Satoh, T.; Tsuno, H.; Iwanaga, M.; Kammei, Y. The design and characteristic features of a new time-of-flight mass spectrometer with a spiral ion trajectory. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (12), 1969–1975.
- (103) Satoh, T.; Sato, T.; Tamura, J. Development of a High-Performance MALDI-TOF Mass Spectrometer Utilizing a Spiral Ion Trajectory. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (7), 1318–1323.
- (104) Toyoda, M.; Okumura, D.; Ishihara, M.; Katakuse, I. Multi-turn time-of-flight mass spectrometers with electrostatic sectors. *J. Mass Spectrom. JMS* **2003**, *38* (11), 1125–1142.
- (105) Hartmann, T. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22–24), 2831–2846.

- (106) Pathak, M. A.; Daniels, F.; Fitzpatrick, T. B. The Presently Known Distribution of Furocoumarins (Psoralens) in Plants. *J. Invest. Dermatol.* **1962**, 39 (3), 225–239.
- (107) Chaudhary, S. K.; Ceska, O.; Warrington, P. J.; Ashwood-Smith, M. J. Increased furocoumarin content of celery during storage. *J. Agric. Food Chem.* **1985**, 33 (6), 1153–1157.
- (108) Hale, A. L.; Meepagala, K. M.; Oliva, A.; Aliotta, G.; Duke, S. O. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (11), 3345–3349.
- (109) Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. *Biologie végétale*; De Boeck Supérieur, **2000**.
- (110) Jean, B. *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e ed.)*; Lavoisier, 2009.
- (111) Amirkia, V.; Heinrich, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis. *Phytochem. Lett.* **2014**, 10, xlviii–liii.
- (112) Wink, M. A short history of alkaloids. In *Alkaloids*; Roberts, M. F., Wink, M., Eds.; Springer US, **1998**; pp 11–44.
- (113) Cushnie, T. P. T.; Cushnie, B.; Lamb, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, 44 (5), 377–386.
- (114) Luch, A. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology: Volume 1: Molecular Toxicology*; Springer Science & Business Media, **2009**.
- (115) Opio. *Wikipedia, la enciclopedia libre*; **2017**.
- (116) POISSON, J. E. Universalis: Alcaloïdes <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/alcaloïdes/> (consulté le 5, Avr, **2016**).
- (117) Annales de chimie <http://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k6572505r> (consulté le 25, Sep, **2016**).
- (118) Sneader, W. *Drug discovery: a history*; Wiley: Hoboken, N.J, **2005**.
- (119) Vercauteren, j. 2009_Montpellier_Vercauteren_Pharmacognosie.pdf http://unt-ori2.crihan.fr/unspf/2009_Montpellier_Vercauteren_Pharmacognosie.pdf (consulté le 5, Avr, **2016**).
- (120) Tomás-Barberán, F. A. Capillary electrophoresis: A new technique in the analysis of plant secondary metabolites. *Phytochem. Anal.* **1995**, 6 (4), 177–192.
- (121) Tascon, M.; Benavente, F.; Sanz-Nebot, V. M.; Gagliardi, L. G. Fast determination of harmala alkaloids in edible algae by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407 (13), 3637–3645.
- (122) Hou, J.; Li, G.; Wei, Y.; Lu, H.; Jiang, C.; Zhou, X.; Meng, F.; Cao, J.; Liu, J. Analysis of five alkaloids using surfactant-coated multi-walled carbon nanotubes as the pseudostationary phase in nonaqueous capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1343, 174–181.
- (123) Pietro Oliveri, I.; Di Bella, S. Highly sensitive fluorescent probe for detection of alkaloids. *Tetrahedron* **2011**, 67 (48), 9446–9449.
- (124) Wu, W.; Liang, Z.; Zhao, Z.; Cai, Z. Direct analysis of alkaloid profiling in plant tissue by using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42 (1), 58–69.
- (125) Bounichou, M.; Sanguinet, L.; Elouarzaki, K.; Alévêque, O.; Dias, M.; Levillain, E.; Rondeau, D. Evaluation of a new matrix-free laser desorption/ionization method through statistic studies: comparison of the DIAMS (desorption/ionization on self-assembled monolayer surface) method with the MALDI and TGFA-LDI techniques. *J. Mass Spectrom.* **2008**, 43 (12), 1618–1626.
- (126) Schinkovitz, A.; Kenfack, G. T.; Levillain, E.; Dias, M.; Helesbeux, J.-J.; Derbré, S.; Séraphin, D.; Richomme, P. Free and immobilized matrix molecules: impairing ionization by quenching secondary ion formation in laser desorption MS. *J. Mass Spectrom.* **2011**, 46 (9), 884–890.

- (127) Castro, J. A.; Köster, C.; Wilkins, C.; Cotter, R. J. Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by Fourier-transform mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6* (4), 239–241.
- (128) Deery, M. J.; Jennings, K. R.; Jasieczek, C. B.; Haddleton, D. M.; Jackson, A. T.; Yates, H. T.; Scrivens, J. H. A study of cation attachment to polystyrene by means of matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11* (1), 57–62.
- (129) O'Rourke, M. B.; Djordjevic, S. P.; Padula, M. P. The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **2016**.
- (130) Rusconi, F.; Schmitter, J. M. Sample preparation for analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analisis* **1998**, *26* (10), 13–17.
- (131) Jnior, H.; de Melo, N. I.; Miller Crotti, A. E. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview. In *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*; Prasain, J., Ed.; InTech, **2012**.
- (132) Shariatgorji, M.; Spacil, Z.; Maddalo, G.; Cardenas, L. B.; Ilag, L. L. Matrix-free thin-layer chromatography/laser desorption ionization mass spectrometry for facile separation and identification of medicinal alkaloids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (23), 3655–3660.
- (133) Nonami, H.; Tanaka, K.; Fukuyama, Y.; Erra-Balsells, R. beta-Carboline alkaloids as matrices for UV-matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in positive and negative ion modes. Analysis of proteins of high molecular mass, and of cyclic and acyclic oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12* (6), 285–296.
- (134) Erra-Balsells, R.; Nonami, H. Nor-Harmane (9H-Pyrido [3, 4-b] indole) as Outstanding Matrix for UV-Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Synthetic and Bio-Polymers. *Environ. Control Biol.* **2002**, *40* (1), 55–73.
- (135) Ladislav Wiza, J. Microchannel plate detectors. *Nucl. Instrum. Methods* **1979**, *162*, 587–601.
- (136) Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. Improved Resolution and Very High Sensitivity in MALDI TOF of Matrix Surfaces Made by Fast Evaporation. *Anal. Chem.* **1994**, *66* (19), 3281–3287.
- (137) Jurchen, J. C.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. MALDI-MS Imaging of Features Smaller than the Size of the Laser Beam. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (10), 1654–1659.
- (138) Ahlf Wheatcraft, D. R.; Liu, X.; Hummon, A. B. Sample Preparation Strategies for Mass Spectrometry Imaging of 3D Cell Culture Models. *J. Vis. Exp. JoVE* **2014**, No. 94.
- (139) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18* (9), 1646–1652.
- (140) Lou, X.; van Dongen, J. L. J.; Vekemans, J. A. J. M.; Meijer, E. W. Matrix suppression and analyte suppression effects of quaternary ammonium salts in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: an investigation of suppression mechanism. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (19), 3077–3082.
- (141) So, P.-K.; Yao, Z.-P. Oil-Assisted Sample Preparation: A Simple Method for Analysis of Solid Samples Using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (13), 5175–5181.
- (142) Mampallil, D.; Eral, H. B.; van den Ende, D.; Mugele, F. Control of evaporating complex fluids through electrowetting. *Soft Matter* **2012**, *8* (41), 10614.
- (143) Kudina, O.; Eral, B.; Mugele, F. e-MALDI: An Electrowetting-Enhanced Drop Drying Method for MALDI Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (9), 4669–4675.

- (144) Lou, X.; de Waal, B. F. M.; Milroy, L.-G.; van Dongen, J. L. J. A sample preparation method for recovering suppressed analyte ions in MALDI TOF MS. *J. Mass Spectrom.* **2015**, *50* (5), 766–770.
- (145) Beebe, K. R.; Pell, R. J.; Seasholtz, M. B. *Chemometrics: a practical guide*; Wiley, 1998.
- (146) Johnson, G. W.; Ehrlich, R. State of the art report on multivariate chemometric methods in environmental forensics. *Environ. Forensics* **2002**, *3* (1), 59–79.
- (147) Knochenmuss. MALDI ionization mechanisms tutorial, primary ionization http://www.rknochenmuss.ch/MALDI/MALDIpage_3a.html#IPs (consulté le 13, Aout, **2015**).
- (148) Horneffer, V.; Glückmann, M.; Krüger, R.; Karas, M.; Strupat, K.; Hillenkamp, F. Matrix-analyte-interaction in MALDI-MS: Pellet and nano-electrospray preparations. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, *249–250*, 426–432.
- (149) Yalcin, T.; Dai, Y.; Li, L. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for polymer analysis: solvent effect in sample preparation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9* (12), 1303–1310.
- (150) Trimpin, S.; Rouhanipour, A.; Az, R.; Räder, H. J.; Müllen, K. New aspects in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a universal solvent-free sample preparation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15* (15), 1364–1373.
- (151) Trimpin, S.; Grimsdale, A. C.; Räder, H. J.; Müllen, K. Characterization of an Insoluble Poly(9,9-diphenyl-2,7-fluorene) by Solvent-Free Sample Preparation for MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2002**, *74* (15), 3777–3782.
- (152) Wong, C. K.; So, M. P.; Chan, T. D. Origins of the proton in the generation of protonated polymers and peptides in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Eur. Mass Spectrom.* **1998**, *4* (3), 223–232.
- (153) Park, K. M.; Moon, J. H.; Kim, J. H.; Song, U. T.; Lee, S. H.; Kim, M. S. Discovery of a solvent effect preventing quantitative profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization and its treatment. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2016**, *30* (3), 386–392.
- (154) Karas, M.; Glückmann, M.; Schäfer, J. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (1), 1–12.
- (155) Robb, D. B.; Blades, M. W. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *627* (1), 34–49.
- (156) Bouas-Laurent, H.; Dürr, H. Organic photochromism (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2001**, *73* (4).
- (157) Gallazzi, M. C.; Toscano, F.; Montoneri, E. Chromic effects and molecular weight in poly(3-alkylthiophenes). *J. Mater. Sci. Lett.* **1999**, *18* (12), 971–973.
- (158) Puretzky, A. A.; Geohegan, D. B. LIF imaging and gas-phase diagnostics of laser desorbed MALDI-matrix plumes. *Appl. Surf. Sci.* **1998**, *127–129*, 248–254.
- (159) Soltwisch, J.; Jaskolla, T. W.; Hillenkamp, F.; Karas, M.; Dreisewerd, K. Ion yields in UV-MALDI mass spectrometry as a function of excitation laser wavelength and optical and physico-chemical properties of classical and halogen-substituted MALDI matrixes. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (15), 6567–6576.
- (160) Potratz, S.; Mishra, A.; Bäuerle, P. Thiophene-based donor-acceptor co-oligomers by copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 683–692.
- (161) Enduction centrifuge. *Wikipédia*; 2017.
- (162) Blondin, P. Synthèse et caractérisation de polymères thermochromes dérivés du fluorène, Laval - Canada, **2000**.
- (163) Hazama, H.; Furukawa, S.; Awazu, K. Effect of solvent on ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of peptides. *Chem. Phys.* **2013**, *419*, 196–199.

- (164) Bouroche, J. M.; Saporta, G. *L'analyse des données*; PUF Presses Universitaires de France: Paris, **1994**.
- (165) AFNOR certification. Validation des méthodes d'analyse Application à la microbiologie des eaux-NF148. October **2013**.
- (166) Duncan, M. W.; Roder, H.; Hunsucker, S. W. Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2008**, 7 (5), 355–370.
- (167) Wink, M. Mode of action and toxicology of plant toxins and poisonous plants. *Julius-Kühn-Arch.* **2010**, No. 421, 93–112.
- (168) Kinghorn, D.; Balandrin, M. Human medicinal agents from plants.; American Chemical Society (ACS), **1993**; Vol. 534, p 356 pp.
- (169) Beyer, J.; Peters, F. T.; Kraemer, T.; Maurer, H. H. Detection and validated quantification of toxic alkaloids in human blood plasma--comparison of LC-APCI-MS with LC-ESI-MS/MS. *J. Mass Spectrom.* **2007**, 42 (5), 621–633.
- (170) Mudge, E. M.; Jones, A. M. P.; Brown, P. N. Quantification of pyrrolizidine alkaloids in North American plants and honey by LC-MS: single laboratory validation. *Food Addit. Contam. Part A* **2015**, 32 (12), 2068–2074.
- (171) Schenk, A.; Siewert, B.; Toff, S.; Drewe, J. UPLC TOF MS for sensitive quantification of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids in *Petasites hybridus* extract (Ze 339). *J. Chromatogr. B* **2015**, 997, 23–29.
- (172) Bergman, N.; Shevchenko, D.; Bergquist, J. Approaches for the analysis of low molecular weight compounds with laser desorption/ionization techniques and mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 406 (1), 49–61.
- (173) ANSM: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé. Comptes rendus de la 86^{ième} réunion du 15 décembre 2009 Adopté le 18 février 2010 [http://www.ansm.sante.fr/searchengine/general_search/\(offset\)/240/\(sort\)/meta_publiched_dt?SearchText=liste+des+plantes](http://www.ansm.sante.fr/searchengine/general_search/(offset)/240/(sort)/meta_publiched_dt?SearchText=liste+des+plantes) (consulté le 1, Aout, **2016**).
- (174) Beck, F.; Legleye, S. Tabac à l'adolescence: résultats de l'enquête Escapad 2002. *Numéro Thématique Journ. Mond. Tab.* **2003**, 101–102.
- (175) Goullé, J.-P.; Pépin, G.; Dumestre-Toulet, V.; Lacroix, C. Botanique, chimie et toxicologie des solanacées hallucinogènes : belladone, datura, jusquiame, mandragore. *Ann. Toxicol. Anal.* **2004**, 16 (1), 22–35.
- (176) Lounasmaa, M.; Tamminen, T. Chapter 1 The Tropane Alkaloids. In *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Cordell, G. A., Ed.; Academic Press, **1993**; Vol. 44, pp 1–114.
- (177) Klintschar, M.; Beham-Schmidt, C.; Radner, H.; Henning, G.; Roll, P. Colchicine poisoning by accidental ingestion of meadow saffron (*Colchicum autumnale*): pathological and medicolegal aspects. *Forensic Sci. Int.* **1999**, 106 (3), 191–200.
- (178) Malichová, V.; Potěšijová, H.; Preininger, V.; Šantavý, F. Alkaloids from leaves and flowers of *Colchicum autumnale* L. *Planta Med.* **1979**, 36 (6), 119–127.
- (179) Brncić, N.; Visković, I.; Perić, R.; Dirlić, A.; Vitezić, D.; Cuculić, D. Accidental plant poisoning with *Colchicum autumnale*: report of two cases. *Croat. Med. J.* **2001**, 42 (6), 673–675.
- (180) Cortinovis, C.; Caloni, F. Alkaloid-containing plants poisonous to cattle and horses in Europe. *Toxins* **2015**, 7 (12), 5301–5307.
- (181) Pojar, J.; MacKinnon, A.; Alaback, P. *Plants of Coastal British Columbia: Including Washington, Oregon and Alaska*; Lone Pine Publishing, **1994**.
- (182) Zetler, G.; Strubelt, O. Antifibrillatory, cardiovascular and toxic effects of sparteine, butylsparteine and pentylsparteine. *Arzneim. Forsch.* **1980**, 30 (9), 1497–1502.
- (183) Maurer, H. H. Identification of antiarrhythmic drugs and their metabolites in urine. *Arch. Toxicol.* **1990**, 64 (3), 218–230.

- (184) Yang, X.; Yang, L.; Xiong, A.; Li, D.; Wang, Z. Authentication of *Senecio scandens* and *S. vulgaris* based on the comprehensive secondary metabolic patterns gained by UPLC-DAD/ESI-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56* (2), 165–172.
- (185) Hartmann, T.; Zimmer, M. Organ-specific distribution and accumulation of pyrrolizidine alkaloids during the life history of two annual senecio species. *J. Plant Physiol.* **1986**, *122* (1), 67–80.
- (186) Lüthy, J.; Heim, T.; Schlatter, C. Transfer of [3H]pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris* L. and metabolites into rat milk and tissues. *Toxicol. Lett.* **1983**, *17* (3–4), 283–288.
- (187) Frischknecht, P. M.; Schuhmacher, K.; Müller-Schärer, H.; Baumann, T. W. Phenotypic plasticity of *Senecio vulgaris* from contrasting habitat types: growth and pyrrolizidine alkaloid formation. *J. Chem. Ecol.* **2001**, *27* (2), 343–358.
- (188) Mácel, M. On the evolution of the diversity of pyrrolizidine alkaloids: the role of insects as selective forces. **2003**.
- (189) Molyneux, R. J.; Gardner, D. L.; Colegate, S. M.; Edgar, J. A. Pyrrolizidine alkaloid toxicity in livestock: a paradigm for human poisoning? *Food Addit. Contam. Part A* **2011**, *28* (3), 293–307.
- (190) Ghedira, K.; Goetz, P. Quinquina rouge: *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotsch (ou *Cinchona pubescens*), Rubiaceae. *Phytothérapie* **2012**, *10* (5), 319–323.
- (191) Paris, M.; Hurabielle, M. *Abrégé de matière médicale (pharmacognosie). Tome 1*; Masson: Paris; New York, **1981**.
- (192) Bauer, M.; Untz, G. Analyse des alcaloïdes du quinquina par chromatographie liquide haute performance. *J. Chromatogr. A* **1980**, *192* (2), 479–484.
- (193) European Pharmacopoeia Online 8.0 <http://online6.edqm.eu/ep800/> (consulté le 13, Oct, **2016**).
- (194) Wittmann, C.; Heinzle, E. MALDI-TOF MS for quantification of substrates and products in cultivations of *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *72* (6), 642–647.
- (195) Frison-Norrie, S.; Sporns, P. Identification and quantification of flavonol glycosides in almond seedcoats using MALDI-TOF MS. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (10), 2782–2787.
- (196) Bucknall, M.; Fung, K. Y. C.; Duncan, M. W. Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (9), 1015–1027.
- (197) Wilkinson, W. R.; Gusev, A. I.; Proctor, A.; Houalla, M.; Hercules, D. M. Selection of internal standards for quantitative analysis by matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) time-of-flight mass spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357* (3), 241–248.
- (198) Kory, K. Comment choisir un étalon interne <http://www.phenomenex.com/Info/Page/internalstandardfr> (consulté le 12, Sep, **2016**).
- (199) Karlsen, M.; Liu, H.; Johansen, J. E.; Hoff, B. H. Economical synthesis of ¹³C-labeled opiates, cocaine derivatives and selected urinary metabolites by derivatization of the natural products. *Molecules* **2015**, *20* (4), 5329–5345.
- (200) Krause, E.; Wenschuh, H.; Jungblut, P. R. The dominance of arginine-containing peptides in MALDI-derived tryptic mass fingerprints of proteins. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (19), 4160–4165.
- (201) Planchon, V. Traitement des valeurs aberrantes: concepts actuels et tendances générales. *Biotechnol Agron Soc Env.* **2005**, *9* (1), 19–34.
- (202) Grubbs, F. E. Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics* **1969**, *11* (1), 1–21.
- (203) *The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics*, Engl. ed. 1.0.; Eurachem, Ed.; LGC: Teddington, Middlesex, **1998**.

- (204) Swiss guidelines committee for drugs of abuse testing, SCDAT. Directives pour l'analyse de substances psychotropes. November 15, **2012**.
- (205) AFNOR certification. Analyse des produits agricoles et alimentaires - Terminologie - FD V01-000. Décembre **1999**.
- (206) Anna Crecelius; Clench, M. R.; Don S. Richards; Vic Parr. Quantitative determination of Piroxicam by TLC-MALDI TOF MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 35 (1), 31-39.
- (207) ANSES. Guide de validation des méthodes d'analyses des laboratoires de référence | Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail <https://www.anses.fr/fr/content/guide-de-validation-des-m%C3%A9thodes-danalyses-des-laboratoires-de-r%C3%A9f%C3%A9rence> (consulté le 28, Sep, **2016**).
- (208) Gao, J. Bioanalytical method validation for studies on pharmacokinetics, bioavailability and bioequivalence: Highlights of the FDA's Guidance. *Asian J Drug Metab Pharmacokinet* **2004**, 4 (1), 5-13.
- (209) McCombie, G.; Knochenmuss, R. 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 (5), 737-745.
- (210) Direction Européenne de la Qualité du Médicament & Soins de Santé. *Guide technique pour l'élaboration des monographies*, 7e Edition.; **2015**.
- (211) Saito, T.; Umebachi, R.; Namera, A.; Oikawa, H.; Miyazaki, S.; Fujita, Y.; Inokuchi, S. Identification and quantification of aconitines and colchicine in serum, urine, and plants using MonoSpin C18 and LC-MSMS. *Chromatographia* **2015**, 78 (15-16), 1041-1048.
- (212) Abe, E.; Lemaire-Hurtel, A.-S.; Duverneuil, C.; Etting, I.; Guillot, E.; de Mazancourt, P.; Alvarez, J.-C. A novel LC-ESI-MS-MS method for sensitive quantification of colchicine in human plasma: application to two case reports. *J. Anal. Toxicol.* **2006**, 30 (3), 210-215.
- (213) Bahmanzadegan, A.; Sefidkon, F.; Sonboli, A. Determination of hyoscyamine and scopolamine in four hyoscyamus species from iran. *Iran. J. Pharm. Res.* **2010**, 8 (1), 65-70.
- (214) Hosseini, N.; Ebrahimi, S. N.; Salehi, P.; Asghari, B.; Ahmadi, M. Simultaneous determination of atropine and scopolamine in different parts of Hyoscyamus arachnoideus Pojark plants by high-performance liquid chromatography (HPLC). *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5 (15), 3552-3557.
- (215) Mroczek, T.; Glowniak, K.; Wlaszczyk, A. Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2002**, 949 (1-2), 249-262.
- (216) ISO 3534-2:2006(fr), Statistique — Vocabulaire et symboles — Partie 2: Statistique appliquée <https://www.iso.org/obp/ui/fr/#iso:std:iso:3534:-2:ed-2:v1:fr> (consulté le 13, Sep, **2016**).
- (217) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Fajgelj, A.; Willetts, P.; Wood, R. Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure Appl. Chem.* **1999**, 71 (2), 337-348.
- (218) Krüger, S.; Bürmann, L.; Morlock, G. E. Comparison and characterization of soybean and sunflower lecithins used for chocolate production by high-performance thin-layer chromatography with fluorescence detection and electrospray mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (11), 2893-2901.
- (219) Fuchs, B.; Schiller, J.; Süß, R.; Zscharnack, M.; Bader, A.; Müller, P.; Schürenberg, M.; Becker, M.; Suckau, D. Analysis of stem cell lipids by offline HPTLC-MALDI-TOF MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 392 (5), 849-860.
- (220) Kondakova, T.; Merlet-Machour, N.; Chapelle, M.; Preterre, D.; Dionnet, F.; Feuilloley, M.; Orange, N.; Duclairoir Poc, C. A new study of the bacterial lipidome: HPTLC-MALDI-

- TOF imaging enlightening the presence of phosphatidylcholine in airborne *Pseudomonas fluorescens* MFAF76a. *Res. Microbiol.* **2015**, *166* (1), 1–8.
- (221) Nimptsch, K.; Süß, R.; Riemer, T.; Nimptsch, A.; Schnabelrauch, M.; Schiller, J. Differently complex oligosaccharides can be easily identified by matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry directly from a standard thin-layer chromatography plate. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217* (23), 3711–3715.
- (222) Kuwayama, K.; Tsujikawa, K.; Miyaguchi, H.; Kanamori, T.; Iwata, Y. T.; Inoue, H. Rapid, simple, and highly sensitive analysis of drugs in biological samples using thin-layer chromatography coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *402* (3), 1257–1267.
- (223) Leriche, E.-D.; Hubert-Roux, M.; Grossel, M. C.; Lange, C. M.; Afonso, C.; Loutelier-Bourhis, C. Direct TLC/MALDI-MS coupling for modified polyamidoamine dendrimers analyses. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *808*, 144–150.
- (224) Santos, L. S.; Haddad, R.; Höehr, N. F.; Pilli, R. A.; Eberlin, M. N. Fast screening of low molecular weight compounds by thin-layer chromatography and “on-spot” MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (7), 2144–2147.
- (225) Pieters, L. A.; Vlietinck, A. J. Spartioidine and Usaramine, Two Pyrrolizidine Alkaloids from *Senecio vulgaris*. *Planta Med.* **1988**, *54* (2), 178–179.
- (226) Wink, M.; Heinen, H. J.; Vogt, H.; Schiebel, H. M. Cellular localization of quinolizidine alkaloids by laser desorption mass spectrometry (LAMMA 1000). *Plant Cell Rep.* **1984**, *3* (6), 230–233.
- (227) Wink, M. *Annual plant reviews, biochemistry of plant secondary metabolism*; John Wiley & Sons, **2011**.
- (228) Hillenkamp, F.; Peter-Katalinic, J. In *MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*; John Wiley & Sons, **2013**; pp 29–30.
- (229) Kowalska, T.; Sajewicz, M.; Sherma, J. *Planar chromatography - mass spectrometry*; CRC Press, 2015.
- (230) Griesinger, H.; Fuchs, B.; Süß, R.; Matheis, K.; Schulz, M.; Schiller, J. Stationary phase thickness determines the quality of thin-layer chromatography/matrix-assisted laser desorption and ionization mass spectra of lipids. *Anal. Biochem.* **2014**, *451*, 45–47.
- (231) Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* **2001**, *7* (4), 493–496.
- (232) The Nobel Prize in Nobel Chemistry 2000 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/ (consulté le 19, Sep, **2015**).
- (233) Tourillon, G.; Garnier, F. Effect of dopant on the physicochemical and electrical properties of organic conducting polymers. *J. Phys. Chem.* **1983**, *87* (13), 2289–2292.
- (234) Yamamoto, T. Molecular assembly and properties of polythiophenes. *NPG Asia Mater.* **2010**, *2* (2), 54–60.
- (235) Perepichka, I. F.; Perepichka, D. F. *Handbook of thiophene-based materials: applications in organic electronics and photonics*; Wiley: Chichester, U.K, **2009**.
- (236) Horowitz, G.; Fichou, D.; Peng, X.; Xu, Z.; Garnier, F. A field-effect transistor based on conjugated alpha-sexithienyl. *Solid State Commun.* **1989**, *72* (4), 381–384.
- (237) Geiger, F.; Stoldt, M.; Schweizer, H.; Bäuerle, P.; Umbach, E. Electroluminescence from oligothiophene-based light-emitting devices. *Adv. Mater.* **1993**, *5* (12), 922–925.
- (238) Kumar, A.; Welsh, D. M.; Morvant, M. C.; Piroux, F.; Abboud, K. A.; Reynolds, J. R. Conducting poly(3,4-alkylenedioxythiophene) derivatives as fast electrochromics with high-contrast ratios. *Chem. Mater.* **1998**, *10* (3), 896–902.
- (239) Swager, T. M. The molecular wire approach to sensory signal amplification. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31* (5), 201–207.

- (240) Röckel, H.; Huber, J.; Gleiter, R.; Schuhmann, W. Synthesis of functionalized poly(dithienylpyrrole) derivatives and their application in amperometric biosensors. *Adv. Mater.* **1994**, *6* (7–8), 568–571.
- (241) Macha, S. F.; McCarley, T. D.; Limbach, P. A. Influence of ionization energy on charge-transfer ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *397* (1–3), 235–245.
- (242) Soltzberg, L. J.; Patel, P. Small molecule matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using a polymer matrix. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (13), 1455–1458.
- (243) Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M. Basic matrixes for the matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins and oligonucleotides. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (22), 3204–3211.
- (244) Danko, M.; Andicsová, A.; Hrdlovič, P.; Račko, D.; Végh, D. Spectral characteristics of carbonyl substituted 2,2'-bithiophenes in polymer matrices and low polar solvents. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12* (7), 1210–1219.
- (245) Tamao, K.; Kodama, S.; Nakajima, I.; Kumada, M.; Minato, A.; Suzuki, K. Nickel-phosphine complex-catalyzed Grignard coupling—II. *Tetrahedron* **1982**, *38* (22), 3347–3354.
- (246) Svenstrup, N.; Rasmussen, K. M.; Hansen, T. K.; Becher, J. The chemistry of TTFTT. I: New efficient synthesis and reactions of tetrathiafulvalene-2,3,6,7-tetrathiolate (TTFTT): an important building block in TTF-syntheses. *Synthesis* **1994**, No. 8, 809–812.
- (247) Blanchard, P.; Jouselme, B.; Frère, P.; Roncali, J. 3- and 3,4-Bis(2-cyanoethylsulfanyl)thiophenes as building blocks for functionalized thiophene-based π -conjugated systems. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (11), 3961–3964.
- (248) Demeter, D. Nouveaux systèmes conjugués fonctionnels dérivés du thiophène, Université d'Angers, **2008**.
- (249) Bierer, D. E.; Dener, J. M.; Dubenko, L. G.; Gerber, R. E.; Litvak, J.; Peterli, S.; Peterli-Roth, P.; Truong, T. V.; Mao, G.; Bauer, B. E. Novel 1,2-dithiins: synthesis, molecular modeling studies, and antifungal activity. *J. Med. Chem.* **1995**, *38* (14), 2628–2648.
- (250) Han, L.; Islam, A.; Chen, H.; Malapaka, C.; Chiranjeevi, B.; Zhang, S.; Yang, X.; Yanagida, M. High-efficiency dye-sensitized solar cell with a novel co-adsorbent. *Energy Environ. Sci.* **2012**, *5* (3), 6057–6060.
- (251) Ritzert, N. L.; Truong, T.-T.; Coates, G. W.; Abruña, H. D. Electrogenerated chemiluminescence of bithiophenes with methylthio functionalities. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118* (2), 924–932.
- (252) Mishra, A.; Fischer, M. K. R.; Bäuerle, P. Metallfreie organische farbstoffe für farbstoffsensibilisierte solarzellen – von struktur-eigenschafts-beziehungen zu designregeln. *Angew. Chem.* **2009**, *121* (14), 2510–2536.
- (253) Yassar, A.; Videlot, C.; Jaafari, A. Synthesis and photovoltaic properties of mono-substituted quaterthiophenes bearing strong electron-withdrawing group. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2006**, *90* (7–8), 916–922.
- (254) Kuo, C.-Y.; Liu, Y.; Yarotski, D.; Li, H.; Xu, P.; Yen, H.-J.; Tretiak, S.; Wang, H.-L. Synthesis, electrochemistry, STM investigation of oligothiophene self-assemblies with superior structural order and electronic properties. *Chem. Phys.* **2016**, *481*, 191–197.
- (255) Eurkart, S. E.; Phillips, R. B.; Roush, D. M. 2-Substituted ethynyl thiophene pesticides. US4826829 A, May 2, **1989**.
- (256) Romines, W. H.; Varney, M. D.; Palmer, C. L.; Bleckman, T. M. (4-oxo-2-pyrimidinyl)thioalkyl compounds useful as AICARFT inhibitors. US6525050 B1, February 25, **2003**.

- (257) Jaskolla, T. W.; Lehmann, W.-D.; Karas, M. 4-Chloro- α -cyanocinnamic acid is an advanced, rationally designed MALDI matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (34), 12200–12205.
- (258) Preston-Schaffter, L. M.; Kinsel, G. R.; Russell, D. H. Effects of heavy-atom substituents on matrices used for matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1994**, *5* (9), 800–806.
- (259) Huang, Y.; Russell, D. H. Photochemistry and proton transfer reaction chemistry of selected cinnamic acid derivatives in hydrogen bonded environments. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1998**, *175* (1), 187–204.
- (260) Arsenyan, P.; Paegle, E.; Belyakov, S. A novel method for the bromination of thiophenes. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (1), 205–208.
- (261) Demeter, D.; Roncali, J.; Jungstittiwong, S.; Melchiorre, F.; Biagini, P.; Po, R. Linearly π -conjugated oligothiophenes as simple metal-free sensitizers for dye-sensitized solar cells. *J. Mater. Chem. C* **2015**, *3* (29), 7756–7761.
- (262) Yu, J.; Shen, T.-L.; Weng, W.-H.; Huang, Y.-C.; Huang, C.-I.; Su, W.-F.; Rwei, S.-P.; Ho, K.-C.; Wang, L. Molecular design of interfacial modifiers for polymer-inorganic hybrid solar cells. *Adv. Energy Mater.* **2012**, *2* (2), 245–252.
- (263) Bader, M. M.; Pham, P.-T. T.; Elandaloussi, E. H. Dicyanovinyl-substituted oligothiophenes. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10* (12), 5027–5030.
- (264) Burling, S.; Paine, B. M.; Nama, D.; Brown, V. S.; Mahon, M. F.; Prior, T. J.; Pregosin, P. S.; Whittlesey, M. K.; Williams, J. M. J. CH activation reactions of ruthenium N-heterocyclic carbene complexes: application in a catalytic tandem reaction involving CC bond formation from alcohols. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (7), 1987–1995.
- (265) Kawai, K.; Sugimoto, A.; Yoshida, H.; Tojo, S.; Fujitsuka, M.; Majima, T. Synthesis and properties of terthiophene-modified oligodeoxynucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (20), 4547–4549.
- (266) Åberg, O.; Lindhe, Ö.; Hall, H.; Hellman, P.; Kihlberg, T.; Långström, B. Synthesis and biological evaluation of [carboxyl- ^{11}C]eprosartan. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2009**, *52* (8), 295–303.
- (267) Petruczynik, A. Effect of chromatographic conditions on the separation and system efficiency for HPLC of selected alkaloids on different stationary phases. *J. AOAC Int.* **2011**, *94* (1), 77–89.
- (268) Petruczynik, A. Effect of ionic liquid additives to mobile phase on separation and system efficiency for HPLC of selected alkaloids on different stationary phases. *J. Chromatogr. Sci.* **2012**, *50* (4), 287–293.
- (269) Mathon, C.; Edder, P.; Bieri, S.; Christen, P. Survey of pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas on the Swiss market using HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (28), 7345–7354.
- (270) Hoofnagle, A. N.; Laha, T. J.; Rainey, P. M.; Sadrzadeh, S. M. H. Specific detection of anabasine, nicotine, and nicotine metabolites in urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Am. J. Clin. Pathol.* **2006**, *126* (6), 880–887.
- (271) Ayorinde, F. O.; Garvin, K.; Saeed, K. Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14* (7), 608–615.
- (272) Facchetti, A.; Yoon, M.-H.; Stern, C. L.; Katz, H. E.; Marks, T. J. Building blocks for n-type organic electronics: regiochemically modulated inversion of majority carrier sign in perfluoroarene-modified polythiophene semiconductors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42* (33), 3900–3903.
- (273) Papagni, A.; Maiorana, S.; Buttero, P. D.; Perdicchia, D.; Cariati, F.; Cariati, E.; Marcolli, W. Synthesis and spectroscopic and NLO properties of “push-pull” structures

- incorporating the inductive electron-withdrawing pentafluorophenyl group. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2002 (8), 1380–1384.
- (274) Ripaud, E. Synthèse et étude de Systèmes Conjugués pour le photovoltaïque organique, Angers, **2011**.
- (275) Gusev, A. I.; Wilkinson, W. R.; Proctor, A.; Hercules, D. M. Improvement of signal reproducibility and matrix/comatrix effects in MALDI analysis. *Anal. Chem.* **1995**, 67 (6), 1034–1041.
- (276) Grant, D. C.; Helleur, R. J. Simultaneous analysis of vitamins and caffeine in energy drinks by surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, 391 (8), 2811–2818.
- (277) Hölscher, D.; Shroff, R.; Knop, K.; Gottschaldt, M.; Crecelius, A.; Schneider, B.; Heckel, D. G.; Schubert, U. S.; Svatoš, A. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J.* **2009**, 60 (5), 907–918.
- (278) Horneffer, V.; Dreisewerd, K.; Lüdemann, H.-C.; Hillenkamp, F.; Läge, M.; Strupat, K. 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 acid². *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, 185–187, 859–870.
- (279) Zhang, T.-G.; Zhao, Y.; Asselberghs, I.; Persoons, A.; Clays, K.; Therien, M. J. Design, synthesis, linear, and nonlinear optical properties of conjugated (porphinato)zinc(II)-based donor–acceptor chromophores featuring nitrothiophenyl and nitrooligothiophenyl electron-accepting moieties. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (27), 9710–9720.
- (280) Palatnick, W.; Meatherall, R.; Sitar, D.; Tenenbein, M. Toxicokinetics of acute strychnine poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **1997**, 35 (6), 617–620.
- (281) Francese, S.; Bradshaw, R.; Flinders, B.; Mitchell, C.; Bleay, S.; Cicero, L.; Clench, M. R. Curcumin: a multipurpose matrix for MALDI mass spectrometry imaging applications. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (10), 5240–5248.
- (282) Luo, G.; Marginean, I.; Vertes, A. Internal energy of ions generated by matrix-assisted laser desorption/ionization. *Anal. Chem.* **2002**, 74 (24), 6185–6190.
- (283) Grant, D. C.; Helleur, R. J. Surfactant-mediated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM* **2007**, 21 (6), 837–845.
- (284) McCombie, G.; Knochenmuss, R. Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect To Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences. *Anal. Chem.* **2004**, 76 (17), 4990–4997.
- (285) Ramsdell, H. S.; Kedzierski, B.; Buhler, D. R. Microsomal metabolism of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio jacobaea*. Isolation and quantification of 6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizine and N-oxides by high performance liquid chromatography. *Drug Metab. Dispos.* **1987**, 15 (1), 32–36.
- (286) Cheng, D.; Nguyen, V.-T.; Ndiokubwayo, N. *Variation of pyrrolizidine alkaloids in Senecio vulgaris plants from native and invasive ranges*; e2013v1; PeerJ Preprints, **2016**.
- (287) Ecaille du séneçon ou goutte de sang (*Tyria jacobaeae*), biologie et développement; <https://www.insectes-net.fr/jacobaeae/tyria2.htm> (consulté le 10, Sep, **2016**).
- (288) Rothschild, M.; Aplin, R. T.; Cockrum, P. A.; Edgar, J. A.; Fairweather, P.; Lees, R. Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths (Lep.) with a discussion on host plant relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. *Biol. J. Linn. Soc.* **1979**, 12 (4), 305–326.
- (289) Blanche, L. P. Intoxications du cheval par les séneçons, Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE, **2005**.

- (290) Jean-francois, B.; Dercourt, J. Libres points de vue d'Académiciens sur la biodiversité. Institut de France Académie des sciences juillet **2010**.
- (291) Akesson, M. T. Avant-projet de code d'usages pour le contrôle des mauvaises herbes afin de prévenir et de réduire la contamination par les alcaloïdes des pyrrolizidine de l'alimentation de consommation humaine et de consommation animale. *Commision du codex alimentarius* **2013**.
- (292) Roberts, P. D.; Pullin, A. S. The effectiveness of management interventions used to control ragwort species. *Environ. Manage.* **2007**, *39* (5), 691–706.
- (293) Deventer, K.; Van Thuyne, W.; Mikulčíková, P.; Van Eenoo, P.; Delbeke, F. T. Detection of selected stimulants as contaminants in solid nutritional supplements by liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *103* (4), 1508–1513.
- (294) Xu, Y.; Si, D.; Liu, C. Determination of strychnine and brucine in rat plasma using liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2009**, *49* (2), 487–491.
- (295) Chandler, C. M.; McDougal, O. M. Medicinal history of North American Veratrum. *Phytochem. Rev. Proc. Phytochem. Soc. Eur.* **2014**, *13* (3), 671–694.
- (296) Wang, G.; Rong, M.-Q.; Li, Q.; Liu, Y.-P.; Long, C.-B.; Meng, P.; Yao, H.-M.; Lai, R.; Luo, X.-D. Alkaloids from veratrum taliense exert cardiovascular toxic effects via cardiac sodium channel Subtype 1.5. *Toxins* **2015**, *8* (1), 12.
- (297) Drakou, C. E.; Tsitsanou, K. E.; Potamitis, C.; Fessas, D.; Zervou, M.; Zographos, S. E. The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, *74* (2), 319–338.
- (298) National Pesticide information center. Picaridin General Fact Sheet <http://npic.orst.edu/factsheets/PicaridinGen.html> (consulté le 28, Sep **2016**).
- (299) Md, N. S. Picaridin: A New Insect Repellent. *J Drugs Dermatol* **2004**, *3* (1), 59.
- (300) Zika, Mosquitoes and How to Not Get Bitten (video) <https://www.acs.org/content/acs/en/pressroom/newsreleases/2016/february/zika-mosquitoes-and-how-to-not-get-bitten-video.html> (consulté le 2, Aout, **2016**).
- (301) van Kampen, J. J. A.; Burgers, P. C.; de Groot, R.; Luider, T. M. Qualitative and quantitative analysis of pharmaceutical compounds by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (15), 5403–5411.
- (302) Knochenmuss, R. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966–986.
- (303) Knochenmuss, R.; Zenobi, R. MALDI Ionization: the role of in-plume processes. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 441–452.
- (304) Karas, M.; Krüger, R. Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 427–440.
- (305) Zenobi, R.; Knochenmuss, R. Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (5), 337–366.
- (306) Knochenmuss, R. The coupled chemical and physical dynamics model of MALDI. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2016**, *9* (1), 365–385.
- (307) Kirmess, K. M.; Knochenmuss, R.; Blanchard, G. J.; Kinsel, G. R. MALDI ionization mechanisms investigated by comparison of isomers of dihydroxybenzoic acid. *J. Mass Spectrom.* **2016**, *51* (1), 79–85.
- (308) Hoteling, A. J.; Nichols, W. F.; Giesen, D. J.; Lenhard, J. R.; Knochenmuss, R. Electron transfer reactions in laser desorption/ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization: factors influencing matrix and analyte ion intensities. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2007**, *12* (6), 345–358.

- (309) Bourcier, S.; Hoppilliard, Y. B3LYP DFT molecular orbital approach, an efficient method to evaluate the thermochemical properties of MALDI matrices. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *217* (1–3), 231–244.
- (310) Smith, B. J.; Radom, L. Ethynamine: the remarkable acid-strengthening and base-weakening effect of the acetylenic linkage. A comparison with ethenamine and methylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (1), 36–41.
- (311) Rao, J. S.; Sastry, G. N. Proton affinity of five-membered heterocyclic amines: Assessment of computational procedures. *Int. J. Quantum Chem.* **2006**, *106* (5), 1217–1224.
- (312) Rusconi, F. *Manuel de spectrométrie de masse à l'usage des biochimistes*; Lavoisier, **2011**.
- (313) Harrison, A. G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry, Second Edition*; CRC Press, 1992.
- (314) Graham Cooks, R.; Patrick, J. S.; Kotiaho, T.; McLuckey, S. A. Thermochemical determinations by the kinetic method. *Mass Spectrom. Rev.* **1994**, *13* (4), 287–339.
- (315) Cooks, R. G.; Kruger, T. L. Intrinsic basicity determination using metastable ions. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99* (4), 1279–1281.
- (316) Hunter, E. P. L.; Lias, S. G. Evaluated gas phase basicities and proton affinities of molecules: an update. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1998**, *27* (3), 413–656.
- (317) Aue, D. H.; Webb, H. M.; Bowers, M. T. Quantitative relative gas-phase basicities of alkylamines. Correlation with solution basicity. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94* (13), 4726–4728.
- (318) Popl, M.; Fährnich, J.; Tatar, V. *Chromatographic analysis of alkaloids*; Chromatographic science; M. Dekker: New York, **1990**.
- (319) Musharraf, S. G.; Ameer, M.; Ali, A. MALDI-MS analysis and theoretical evaluation of olanzapine as a UV laser desorption ionization (LDI) matrix. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *132*, 190–194.
- (320) Jenkins, A.; Mcgann, W. J. Method of operation of an ion mobility spectrometer for enhanced detection of narcotics. EP0692712 B1, October 2, **2002**.
- (321) Julian, R. R.; Beauchamp, J. L. The unusually high proton affinity of aza-18-crown-6 ether: implications for the molecular recognition of lysine in peptides by lariat crown ethers. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (5), 493–498.
- (322) Bae, Y. J.; Kim, M. S. A thermal mechanism of ion formation in MALDI. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2015**, *8* (1), 41–60.
- (323) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2011**.
- (324) Jørgensen, T. J. D.; Vulpius, T.; Bojesen, G. 13th International Mass Spectrometry Conference. *ASMS, Santa Fe, USA*, **1994**, p. 175.
- (325) Mirza, S. P.; Raju, N. P.; Vairamani, M. Estimation of the proton affinity values of fifteen matrix-assisted laser desorption/ionization matrices under electrospray ionization conditions using the kinetic method. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15* (3), 431–435.
- (326) Burton, R. D.; Watson, C. H.; Eyler, J. R.; Lang, G. L.; Powell, D. H.; Avery, M. Y. Proton affinities of eight matrices used for matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11* (5), 443–446.
- (327) Schulz, E.; Karas, M.; Rosu, F.; Gabelica, V. Influence of the matrix on analyte fragmentation in atmospheric pressure MALDI. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (7), 1005–1013.
- (328) Einstein, A. Über einen die erzeugung und verwandlung des lichtes betreffenden heuristischen gesichtspunkt. *Ann. Phys.* **1905**, *322* (6), 132–148.
- (329) Kaiser, W.; Garrett, C. G. B. Two-photon excitation in CaF₂: Eu²⁺. *Phys. Rev. Lett.* **1961**, *7* (6), 229–231.

- (330) Karbach, V.; Knochenmuss, R. Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12* (14), 968–974.
- (331) Knochenmuss, R. A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37* (8), 867–877.
- (332) Knochenmuss, R.; Zhigilei, L. V. Molecular dynamics model of ultraviolet Matrix-assisted laser desorption/ionization including ionization processes. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109* (48), 22947–22957.
- (333) Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27* (4), 472–480.
- (334) Schlag, E. W. *ZEKE SPECTROSCOPY. Edition anglaise*; Cambridge University Press, 1998.
- (335) Scherlis, D. A.; Marzari, N. π -stacking in thiophene oligomers as the driving force for electroactive materials and devices. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (9), 3207–3212.
- (336) Lushtinetz, R.; Seifert, G. Theoretical studies on the structural and electronic properties of π -stacked cyano-thiophene-based molecules. *Comput. Theor. Chem.* **2013**, *1023*, 65–73.
- (337) Xiao, K.; Liu, Y.; Qi, T.; Zhang, W.; Wang, F.; Gao, J.; Qiu, W.; Ma, Y.; Cui, G.; Chen, S.; et al. A highly π -stacked organic semiconductor for field-effect transistors based on linearly condensed pentathienoacene. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (38), 13281–13286.
- (338) Zapka, W.; Schäfer, F. P. Excited-state absorption and two-step photo-ionization of tertiary amines. *Appl. Phys.* **1979**, *20* (4), 287–290.
- (339) Hoteling, A. J.; Owens, K. G. Cationization of polymers in MALDI/ToFMF investigations of salt-to-analyte ratio. *53rd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics* **2005**.
- (340) Erb, W. J.; Hanton, S. D.; Owens, K. G. A study of gas-phase cationization in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20* (14), 2165–2169.
- (341) Nold, M. J.; Cerda, B. A.; Wesdemiotis, C. Proton affinities of the N- and C-terminal segments arising upon the dissociation of the amide bond in protonated peptides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10* (1), 1–8.
- (342) Bounichou, M. LA METHODE DIAMS : Desorption/Ionization on self-Assembled Monolayer Surface Une nouvelle technique de désorption ionisation laser sans matrice pour la Spectrométrie de Masse, Université d'Angers, **2010**.
- (343) JABER, A.; Seraphin, D.; Richomme, P.; Schinkovitz, A.; Guilet, D.; Dias, M.; Levillain, E. Matrice pour la détection spécifiques des alcaloïdes par spectométrie de masse MALDI-TOF. *BTN222343FR00*, **2017**.

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e)**JABER ALI**.....
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **01/ 06 /2017**



**Cet engagement de non plagiat doit être signé et
joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



RÉSUMÉ

Mon travail de thèse a consisté à poursuivre le développement et l'application des matrices bithiophéniques spécifique aux alcaloïdes. Après l'optimisation d'un protocole efficace d'analyse, adapté à l'objectif de l'étude, la mise au point d'une méthode de dosage des alcaloïdes par MALDI dans des extraits végétaux et sans prétraitement préalable a été étudiée. Cette méthode a pu être validée en étudiant des alcaloïdes existant dans différents extraits des plantes toxiques. Ensuite, la synthèse et l'évaluation de nouveaux composés bithiophéniques ont été présentés de manière à évaluer les facteurs favorisant l'interaction avec les alcaloïdes. Ultérieurement, cinq nouvelles matrices intéressantes furent l'objet d'une étude plus détaillée. Sur la base des résultats obtenus, le dérivé fluoré PFPT3P s'avère le plus efficace. Il présente une meilleure sélectivité que la matrice courante CHCA vis-à-vis des alcaloïdes et plus performant pour analyser les alcaloïdes dans différents mélanges complexes tels que des extraits bruts de plantes, des insectes, et des solutions bioactives commerciales (médicament et répulsif). À la fin, ces sont regroupés les résultats de l'étude des paramètres thermodynamiques de la matrice MT3P, ce qui permettra de proposer des hypothèses expliquant la sélectivité de la matrice bithiophéniques fonctionnalisée pour les alcaloïdes.

mots-clés : MALDI, Alcaloïdes, Matrice, Spectrométrie de masse, Bithiophènes, Métabolites secondaires.

ABSTRACT

My thesis work consisted of pursuing the development and application of bithiophenic maldi matrices specific for alkaloids. After optimization of an efficient analysis protocol adapted to the objective of the study, a method for the determination of alkaloids in vegetable extracts by MALDI was developed. This method was validated by studying many alkaloids existing in extracts of different toxic plants. Subsequently, synthesis and evaluation of novel bithiophenic compounds were presented in order to evaluate the factors favoring the interaction with alkaloids. Then, five matrices among the molecules tested and having produced interesting results are chosen and were the subject of a more detailed study. On the basis of the results obtained, the fluorinated derivative PFPT3P proves to be the most effective molecules. It has a better selectivity with respect to alkaloids than the current matrix HCCA and performs better to analyze these metabolites in different complex mixtures such as crude extracts of plants, insects and commercial bioactive solutions (drug and repellent). At the end, the results of the study of the thermodynamic parameters of MT3P matrix are grouped. This will make possible to propose hypotheses explaining the selectivity of the functionalized bithiophene matrices for alkaloids.

keywords : MALDI, Alkaloids, Matrix, Mass spectrometry, Bithiophene, Secondary metabolites