



HAL
open science

Fonctionnalisation chimique du silicium nanoporeux pour la détection de métabolites spécifiques du sepsis par spectrométrie de masse

Antonin Lavigne

► **To cite this version:**

Antonin Lavigne. Fonctionnalisation chimique du silicium nanoporeux pour la détection de métabolites spécifiques du sepsis par spectrométrie de masse. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2023. Français. NNT : 2023ECDL0017 . tel-04296406

HAL Id: tel-04296406

<https://theses.hal.science/tel-04296406>

Submitted on 20 Nov 2023

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.



ÉCOLE
CENTRALE LYON

N° d'ordre NNT : 2023ECDL0017

THÈSE de DOCTORAT DE L'ÉCOLE CENTRALE DE LYON
membre de l'Université de Lyon

École Doctorale 34
École Doctorale Matériaux

Spécialité de doctorat : Chimie des matériaux

Soutenance prévue publiquement le 16 mai 2023, par :

Antonin LAVIGNE

**Fonctionnalisation chimique du silicium nanoporeux pour la
détection de métabolites spécifiques du sepsis par spectrométrie
de masse**

Devant le jury composé de :

Didier Léonard	Professeur des Universités	ISA, Université de Lyon	Président du jury
Rodolphe Antoine	Directeur de Recherche	ILM, CNRS	Rapporteur
Vincent Humblot	Directeur de Recherche	Institut FEMTO-ST, CNRS	Rapporteur
Benoit Gilquin	Ingénieur	CLINATEC, CEA	Examineur
Magali Phaner-Goutorbe	Professeure des Universités	INL, École Centrale de Lyon	Directrice de thèse
Christelle Yeromonahos	Maitresse de Conférences	INL, École Centrale de Lyon	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury, en particulier les rapporteurs Dr Rodolphe Antoine et Dr Vincent Humblot pour leur lecture approfondie et leurs commentaires pertinents sur mon manuscrit. Vos remarques ont permis d'approfondir certains points de ma recherche qui nécessitaient des clarifications. Également, je voudrais remercier Pr Didier Léonard d'avoir accepté d'être président de mon jury de thèse et pour ses propositions pour compléter mon manuscrit et ma recherche en général. Je remercie aussi Dr Benoit Gilquin d'avoir accepté d'examiner ma thèse.

Ensuite, je voudrais remercier Bruno Masseneli, directeur de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon de m'avoir accepté au sein du laboratoire, et Stéphane Benayoun, directeur de l'école doctorale Matériaux. Je remercie l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) d'avoir accepté de financer le projet ANR JR JR PORIDG au sein duquel s'inscrit ma thèse.

Je remercie Christelle Yeromonahos, porteuse du projet, de m'avoir fait confiance pour cette thèse malgré mon parcours qui ne me destinait pas à travailler dans la chimie des matériaux. Cette confiance m'a permis de découvrir un monde de la recherche différent de celui que je connaissais, la recherche expérimentale, et qui me suivra dans la suite de mon travail. Je remercie également mon autre directrice de thèse, Magali Phaner-Goutorbe pour l'aide pendant ma thèse. Même lorsque mon travail n'était pas ta spécialité, ton aide a toujours été précieuse pour ne pas m'égarer dans mes recherches. De plus, ton envie de diffuser le savoir à tout le monde, scientifique ou non, a été très inspirant.

Un grand merci au personnel de l'INL pour leur aide pendant ma thèse : Yann Chevolut, chef de l'équipe des dispositifs pour la santé et l'environnement, pour qui la fonctionnalisation de surface n'a aucun secret, Thomas Géhin pour la construction des fours et l'aide au développement des protocoles de silanisation, Isabel Nabeth pour l'aide sur l'ensemble des produits chimiques et la bonne humeur dans l'équipe, Claude Botella pour les expériences d'XPS, Cécile Jamois pour la formation en MEB et Céline Chevalier pour l'introduction à la gravure électrochimique du silicium. Mais cette recherche n'aurait pas été possible sans également des personnes extérieures au laboratoire. En particulier, merci Benoit Gilquin pour la formation en spectrométrie de masse MALDI et ta disponibilité. Merci Vincent Jausseume et Marc Veillerot pour l'aide avec leToF-SIMS. Et merci à Jules Gallipaud pour les mesures XPS complémentaires.

Je remercie aussi l'ensemble des doctorants avec qui j'ai pu partager mes années de thèse et qui m'ont accompagné pendant ces trois années où se sont enchaînés pandémie de Covid-19 et travaux de rénovation du bâtiment. En particulier, merci Ana María pour ta bonne humeur, nos conversations en anglais puis en français dans le bureau et de m'avoir pardonné d'avoir réservé ma place avant d'arriver. Merci Paule pour ta gentillesse et les moments passés au laboratoire mais aussi en dehors. Merci Harris et Oleh, sans qui les discussions pendant les pauses déjeuner seraient bien plus mornes. Merci Jesús, Greta, Panteha, Marko et Gaukhar pour les temps passés ensembles et votre bonne humeur contagieuse. Ce multiculturalisme au sein du laboratoire a été très enrichissant. Merci Alestair et Jérémy pour les temps passés lors de l'organisation des PhD Days avec Paule malgré les conditions compliquées et l'organisation en distanciel. Enfin, merci Solène pour ta réactivité et ton aide lors de mon arrivée dans l'équipe mais aussi dans l'ensemble de ma thèse.

J'ai également une pensée particulière à mes amis et les personnes qui ont suivies mon parcours jusqu'à ma thèse : la prépa, le bobilehome, la DaLiLa et la 32e en particulier. Enfin, un grand merci à mes frères et sœur, Guilhem, Mathis et Garance et nos parties endiablées de ping-pong pendant le confinement. Et merci à mes parents pour le soutien pendant ces trois dernières années et avant, même lors des moments difficiles. Merci à tous.

Table des matières

Remerciements	iii
Table des figures	ix
Liste des tableaux	xix
Liste des abréviations	xxiii
Introduction	1
1 Etat de l'art	5
1.1 Introduction	5
1.2 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice . . .	6
1.2.1 Fonctionnement du MALDI	7
1.2.2 Le choix de la matrice	12
1.2.3 Le substrat de silicium	13
1.2.4 Amélioration de la sensibilité et de la sélectivité par la modification chimique de surface	14
1.2.5 Détection d'analytes en milieu complexe	15
1.2.6 Limitations du MALDI	17
1.3 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par la surface .	20
1.3.1 Fonctionnement du SALDI	20
1.3.2 Les matériaux des substrats	21
1.4 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation sur silicium	25
1.4.1 Avantage du DIOS-MS par rapport au MALDI-MS	26
1.4.2 Influence des pores	26
1.4.3 Fonctionnalisation du substrat pour l'analyse de solutions modèles	27
1.4.4 Substrats fonctionnalisés et échantillons physiologiques	30
1.5 La silanisation de surface	35

1.5.1	Processus de silanisation	35
1.5.2	Influence du nombre de groupes hydrolysables de la molécule de silane sur la silanisation	36
1.5.3	Techniques de caractérisation des SAMs	36
1.5.4	Les types de procédé de silanisation	40
1.6	La dynamique moléculaire	41
1.6.1	Principe et fonctionnement	41
1.6.2	Interactions entre les acides aminés et une surface	48
1.7	Les métabolites caractéristiques du sepsis	53
1.8	Conclusion du chapitre	58
2	Développement des procédés de silanisation - Création de fours pour une silanisation en phase gazeuse	61
2.1	Introduction	61
2.2	Matériel et méthodes de caractérisation	62
2.2.1	Les fours de silanisation développés	62
2.2.2	Substrats élaborés et utilisés	62
2.2.3	Silanes et solvants utilisés	63
2.2.4	Présentation des techniques de caractérisation des monocouches de silanes	63
2.3	Développement et caractérisation des protocoles de silanisation	64
2.3.1	Silanisation en phase liquide	67
2.3.2	Silanisation en phase gazeuse : COO^-	71
2.3.3	Silanisation en phase gazeuse avec le four 1 : CH_3 long	72
2.3.4	Silanisation en phase gazeuse avec le four 2 : CH_3 court	81
2.3.5	Silanisation en phase gazeuse avec le four 2 : NH_3^+	84
2.3.6	Silanisation en phase gazeuse avec le four 3 : CH_3 court	89
2.4	Conclusion	96
3	Dynamique Moléculaire - Simulation de métabolites adsorbées sur des surfaces de silice fonctionnalisée	99
3.1	Introduction	99
3.2	Matériel et méthodes	100
3.2.1	Présentation des métabolites	100
3.2.2	Définition des systèmes initiaux	101
3.2.3	Paramètres des simulations	105
3.2.4	Paramètres d'analyse des simulations	107
3.3	Interactions entre les silanes et les métabolites	110
3.3.1	Effet d'un pore sur la distribution 2D des silanes	110
3.3.2	Validation des systèmes aux regards de leurs limitations	112
3.3.3	Analyse des interactions métabolites/silanes dans le cas de la silice poreuse.	113
3.4	Conclusion	119

4	Détection des métabolites spécifiques au sepsis en MALDI-MS - Effet des surfaces fonctionnalisées	121
4.1	Introduction	121
4.2	Matériels et méthodes	122
4.3	Effect of Silane Monolayers and Nanoporous Silicon Surfaces on the Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Mass Spectrometry Detection of Sepsis Metabolites Biomarkers Mixed in Solution.	122
4.3.1	Résumé	122
4.3.2	Reproduction de l'article	123
	Abstract	124
	Introduction	124
	Material and methods	128
	Results and discussion	130
	Conclusion	140
4.4	Résultats complémentaires à l'article	142
4.4.1	Suppression d'un pic de matrice	142
4.4.2	Étude en milieu salin	142
4.4.3	Comparaison avec la dynamique moléculaire	144
4.4.4	Limite de détection des métabolites	145
4.5	Conclusion	147
5	Étude en DIOS-MS - Détection du LysoPC	149
5.1	Introduction	149
5.2	Effects of Silane Monolayers on Lysophosphatidylcholine (LysoPC) Detection by Desorption Ionization on Silicon Mass Spectrometry (DIOS-MS) from Solution and Plasma.	150
5.2.1	Résumé	150
5.2.2	Reproduction de l'article	151
	Abstract	151
	Introduction	151
	Material and methods	153
	Results and discussion	155
	Conclusion	164
5.3	Résultats complémentaires à l'article	165
5.3.1	Influence des propriétés des pores	165
5.3.2	Détection du LysoPC en solution sur des surfaces chargées	169
5.3.3	Détection du LysoPC dans le plasma sur des surfaces chargées	172
5.4	Conclusion	174
6	Étude en DIOS-MS - Détection des 25 métabolites mélangés en solution	175
6.1	Introduction	175
6.2	Matériel et méthodes	176

6.2.1	Préparation des échantillons	176
6.2.2	Analyse DIOS-MS	176
6.3	Résultats et discussion	178
6.3.1	Les lipides	178
6.3.2	Les acides organiques	184
6.3.3	Les autres métabolites	186
6.3.4	Perspectives : la détection des métabolites dans le plasma	192
6.4	Conclusion	192
Conclusion		195
Annexes		198
A Adsorption des métabolites sur de la silice en dynamique moléculaire		199
A.1	Analyse des interactions sur les surfaces silanisées	199
A.1.1	Capture des métabolites sur la silice plane	199
A.1.2	Capture des métabolites sur la silice en feuillets	204
A.2	Résultats sur les surfaces de silice non fonctionnalisées	210
B Informations supplémentaires de l'article : Effect of Silane Monolayers and Nanoporous Silicon Surfaces on the Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Mass Spectrometry Detection of Sepsis Metabolites in Complex Solution		213
C Informations supplémentaires de l'article : Effects of Silane Monolayers on Lysophosphatidylcholine (LysoPC) Detection by Desorption Ionization on Silicon Mass Spectrometry (DIOS-MS) from Solution and Plasma		221
Bibliographie		229

Table des figures

1.1	Schéma de fonctionnement de la spectrométrie de masse MALDI.	8
1.2	Trajectoire d'un ion dans un analyseur en temps de vol équipé d'un réflectron dans le cas d'une analyse des ions positifs.	12
1.3	Images MEB d'une goutte séchée de matrice DHB avec du paracétamol (ratio molaire de 10 :1) avec (a) une plaque de MALDI classique et (b) une plaque de e-MALDI. La bande blanche sur fond noir mesure 1 mm. Image issue de [70]. . .	18
1.4	Spectre de masse MALDI de la matrice HCCA sur la gamme de masse 0-800 m/z.	19
1.5	Courant ionique total du vérapamil sur du silicium poreux avec plusieurs profondeurs. 10 pmol sont déposés sur tous les films et la même énergie de laser a été utilisée pour toutes les expériences. L'insert correspond à l'absorbance UV du substrat à 337 nm en fonction de la profondeur. Image issue de [122].	27
1.6	Processus de fonctionnalisation par une molécule de silane monofonctionnel sur une surface de silice avec des groupement silanol. Le silane est d'abord hydrolysé puis lié à la surface avec une liaison covalente Si-O.	35
1.7	Mesure de l'angle de contact d'un liquide sur un substrat.	37
1.8	Profondeur de l'analyse en XPS en fonction de l'angle entre le substrat et le détecteur.	38
1.9	Système initial de dynamique moléculaire. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau par des points.	42
1.10	Géométrie des liaisons entre atomes pour une molécule linéaire. r_{23} représente la distance entre les atomes 2 et 3, θ_{234} l'angle de flexion et ϕ_{1234} l'angle de torsion. Image issue de [183].	43
1.11	Surface de silice fonctionnalisée par les silanes (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) COO^- , et (d) NH_3^+ . Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène. Image issue de [185]	53
1.12	Nom et formule chimique des métabolites utilisés dans l'étude à pH 7 dans les conditions physiologiques	55

2.1	Spectres XPS d'un substrat de silicium plan nettoyé 30 min à l'UV-ozone : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	65
2.2	Spectres XPS d'un substrat de silicium poreux nettoyé 30 min à l'UV-ozone : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	66
2.3	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH ₃ court obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	69
2.4	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH ₃ long obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	69
2.5	Spectres XPS d'une monocouche de silanes COO ⁻ obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	70
2.6	Spectres XPS d'une monocouche de silanes NH ₃ ⁺ obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. Le N 1s n'était pas visible, comme dans la Figure 2.1. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°	70
2.7	Spectres XPS d'une monocouche de silanes COO ⁻ sur du silicium plan obtenue avec le protocole de Phaner-Goutorbe <i>et al.</i> [157] : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	72
2.8	Spectres XPS d'une monocouche de silanes COO ⁻ sur du silicium poreux obtenue avec le protocole de Phaner-Goutorbe <i>et al.</i> [157] : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	73
2.9	Image du four n°1 et schéma simplifié de son fonctionnement.	74
2.10	Pression dans le four lors de la silanisation dans le cas (a) d'un flux continu et (b) de cycles de remplissage. Dans les deux cas, le temps pour lequel la pression dans le four est équilibrée à 20 Torr est de 2h.	77
2.11	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH ₃ long sur du silicium plan obtenue avec le four n°1 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	79
2.12	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH ₃ long sur du silicium poreux obtenue avec le four n°1 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	80
2.13	Analyse en profondeur en ToF-SIMS d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH ₃ long à droite et d'un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à gauche. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de ³⁰ Si ⁻ dans le Si bulk, c'est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.	81
2.14	Image du four n°2 et schéma simplifié de son fonctionnement.	82

2.15	Spectres XPS d'une monocouche de silanes NH_3^+ sur du silicium plan obtenue avec le four n°2 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	86
2.16	Spectres XPS d'une monocouche de silanes NH_3^+ sur du silicium poreux obtenue avec le four n°2 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	87
2.17	Analyse en profondeur en ToF-SIMS d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes NH_3^+ à gauche et d'un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à droite. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de $^{30}\text{Si}^-$ dans le Si bulk, c'est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.	88
2.18	Image du four n°3 et schéma simplifié de son fonctionnement.	90
2.19	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH_3 court sur du silicium plan obtenue avec le four n°3 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	94
2.20	Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH_3 court sur du silicium poreux obtenue avec le four n°3 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°	94
2.21	Analyse en profondeur en ToF-SIMS d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH_3 court à gauche et d'un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à droite. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de $^{30}\text{Si}^-$ dans le Si bulk, c'est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.	95
3.1	Système initial de la silice plane avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- , les molécules d'eau et le mur de Lennard-Jones. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau par des points.	101
3.2	Molécule d'eau selon le modèle TIP4P. La molécule comporte 2 atomes d'hydrogène (blanc), un atome d'oxygène (rouge) et un atome virtuel portant la charge partielle de l'oxygène (cyan).	102
3.3	Système initial de la silice en feuillets avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- et les molécules d'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les molécules d'eau sont représentées par des points.	103
3.4	Distribution des molécules d'eau dans le système de silice en feuillet avec les silanes COO^- en fonction de la hauteur. Les hauteurs inférieures à 2 nm et supérieures à 13 nm correspondent au substrat de silice.	103
3.5	Système initial de la silice poreuse avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- et les molécules d'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les molécules d'eau sont représentées par des points.	104
3.6	Aspect du pore de silice amorphe avant la minimisation de l'énergie du système (gauche) et après la minimisation de l'énergie (droite).	105

3.7	Profil en énergie des trois groupes de métabolites en fonction de leur contact avec la surface : (a) capturé, (b) non capturé, et (c) alternance entre les deux états précédents.	108
3.8	Nombre moyen de métabolites capturés par les surfaces au cours de la simulation pour (a, trait plein) la silice plane, (b, tiret long) la silice en feuillets, et (c tiret court) la silice poreuse. En rouge, les surfaces fonctionnalisées par des silanes CH ₃ court, en bleu par des CH ₃ long, en vert par des COO ⁻ et en magenta par des NH ₃ ⁺ . Les courbes sont lissées avec des courbes de Bézier.	109
3.9	Monocouche de silanes (a) CH ₃ court, (b) CH ₃ long, (c) COO ⁻ , et (d) NH ₃ ⁺ sur une surface de silice plane. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène.	110
3.10	Monocouche de silanes (a) CH ₃ court, (b) CH ₃ long, (c) COO ⁻ , et (d) NH ₃ ⁺ sur un des côtés d'une surface de silice poreuse. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène.	111
3.11	Schéma de l'organisation des silanes CH ₃ long pour un pore circulaire de 10 nm de diamètre.	111
3.12	Interaction indirecte entre les silanes CH ₃ long et la carnitine (en bleu) par l'intermédiaire de l'acide urique (en violet). Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone, et les blancs l'hydrogène.	113
3.13	Énergie d'interaction moyenne sur de la silice poreuse entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ . Les moyennes sont effectuées sur les répliques pour lesquels les métabolites sont capturés et les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.	114
3.14	Système de pore de silice circulaire avec ajout des silanes CH ₃ court à gauche et CH ₃ long à droite et de l'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène. Les molécules d'eau sont représentées par des points.	120
4.1	The 25 metabolites studied. The 23 metabolites specific of sepsis are underlined. The 9 metabolites detected simultaneously in this study using CHCA as a matrix are marked by a star (*). The reference numbers are indicated after the name of metabolites. Lysophosphatidylcholine, Lysophosphatidylglycerol, and Glycerophosphocholine are respectively named LysoPC, LysoPG, and GPC in this study.	127
4.2	XPS spectra of the CH ₃ long monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s, and Si 2p core levels). XPS spectra of the other monolayers studied and of the bare porous silicon substrate are presented in Supporting Information (Appendix B).	131
4.3	Depth profiling by ToF-SIMS of porous silicon functionalized by (solid) CH ₃ short, (dash) CH ₃ long and (dot) NH ₃ ⁺ silane monolayers, and on (dash dot) bare porous silicon are presented. The intensities of the C ⁻ ions (12 amu) and ³⁰ Si ⁻ (30 amu) ions as a function of sputtering are displayed in black and red, respectively. ³⁰ Si ⁻ ion in Si bulk (sputtering time greater than 4300s) was used for normalization.	132

4.4	MALDI-ToF MS spectra of the mix of metabolites on stainless steel target plate with CHCA matrix. LysoPC is observed at 524.4 m/z ($[M+H]^+$) with fragments at 86.1 m/z, 104.1 m/z, and 184.2 m/z. The other metabolites detected are identified in the insert. Peaks were identified by comparison with the MALDI-ToF MS spectra of each metabolite alone in solution (results not shown). Matrix peaks are identified by a star.	133
4.5	$[M+H]^+$ peak of LysoPC (524.4 m/z) for different concentrations of the CHCA matrix: 0 mg/mL (black solid), 1 mg/mL (red dash), 5 mg/mL (blue dot), 10 mg/mL (green dash dot), and 20 mg/mL (magenta dash dot dot).	134
4.6	Mass spectra of the solution containing the mix of 25 metabolites, using CH_3 short, CH_3 long, COO^- , and NH_3^+ monolayers on plane silicon surfaces, and using the bare plane silicon surface. Total ion count (TIC) normalization is used. Matrix peaks are identified by a star.	135
4.7	Mass spectra of the solution containing the mix of 25 metabolites, using CH_3 short, CH_3 long, COO^- , and NH_3^+ monolayers on porous silicon surfaces, and using the bare porous silicon surface. Total ion count (TIC) normalization is used. Matrix peaks are identified by a star.	136
4.8	Depth profiling of C^- , H^- , Si^- , and P^- ions by ToF-SIMS on porous silicon functionalized by CH_3 short (left), CH_3 long (right) silane monolayers, and on bare porous silicon (below). P^- ions are specific to the LysoPC molecule.	141
4.9	Spectres de masse MALDI de la matrice HCCA, de la caféine (195 m/z) avec la matrice HCCA et de l'arginine (175 m/z) avec la matrice HCCA. Les échelles sont identiques pour les trois spectres.	143
4.10	Spectres de MALDI-MS du LysoPC avec la matrice HCCA. Le pic à 524 m/z correspond au pic $[M+H]^+$ du LysoPC. Les pics à 172 m/z et 379 m/z sont des pics de matrice.	143
4.11	Gel view obtenue à partir du logiciel Clinprotool (Bruker Daltonics). Pour chaque milieu, de l'eau ultrapure, du PBS sans NaCl et du PBS avec NaCl, deux spectres ont été faits. Le nombre de pics indiqué à droite est le nombre moyen de pics détectés sur les deux spectres (S/N supérieur à 5).	144
4.12	Goutte d'un mélange métabolites/matrice séchée sur une surface de silicium plan à gauche et de silicium poreux à droite.	145
4.13	S/N et écart type à différentes concentrations, obtenus en MALDI-MS sur une monocouche de CH_3 court, pour les métabolites détectés sur cette surface en MALDI-MS : créatinine (114 m/z), valine (118 m/z), phénylalanine (166 m/z), arginine (175 m/z), caféine (195 m/z), α -GPC (258 m/z) et LysoPC (524 m/z). Les écarts types sont obtenus à partir de 3 répliques. La valeur au niveau de la "Matrice" correspond au S/N à la même masse lorsque la matrice est déposée seule sur la surface.	147
5.1	DIOS mass spectra of LysoPC in RP ion mode, alone in solution at 1 mg/mL using the CH_3 short and the CH_3 long monolayers on porous silicon substrates and on the bare porous silicon substrate. The peak of LysoPC is detected at 524.3 m/z and the main fragments (86.0 m/z, 104.0 m/z, 184.1 m/z, and 198.2 m/z) are presented. Peaks corresponding to the substrates are indicated by stars (*). The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.3 and C.5). Total ion current (TIC) normalization is used.	157

5.2	Depth profiling of Si ⁻ and P ⁻ ions by ToF-SIMS on porous silicon (300 nm in pore depth) functionalized by CH ₃ short and CH ₃ long silane monolayers (left), and on bare porous silicon (1 μm in pore depth) (right). P ⁻ ions (30.9682 amu) are specific to the LysoPC molecule. ³⁰ Si ⁻ in Si bulk is used for normalization.	158
5.3	Location of the positively and negatively charged fragments of LysoPC detected in RP and RN ion mode in DIOS-MS.	158
5.4	DIOS mass spectra of LysoPC in RN ion mode, alone in solution at 1 mg/mL using the CH ₃ short and CH ₃ long monolayers on porous silicon substrate and on bare porous silicon substrate. The main fragments (79.0 m/z, 123.1 m/z, 153.1 m/z and 283.6 m/z) are presented. There is no peak of LysoPC at [M-H] ⁻ (522.3 m/z). Peaks corresponding to the substrates are indicated by stars (*). The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.4 and C.5). TIC normalization is used.	159
5.5	DIOS mass spectra in RN ion mode of plasma spiked with LysoPC (at 50 μg/mL) on the CH ₃ short and the CH ₃ long monolayers, and on the bare silicon. Fragments of LysoPC are indicated (at 79.0, 123.1 and 153.1 m/z). Stars (*) indicate peaks related to the surface. No peaks are observed above 300 m/z. The 5x5 washing protocol is used. The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.4 and C.5). TIC normalization is used.	162
5.6	DIOS mass spectra in RN ion mode on the CH ₃ short monolayer at (a) 79.0 m/z, (b) 123.1 m/z, and (c) 153.1 m/z, corresponding to fragments of LysoPC. Black solid line corresponds to unmodified plasma, the red long dashed line to the spiked plasma at 50 μg/mL, and the green short dashed line to the spiked plasma at 500 μg/mL. The 5x5 washing protocol is used. TIC normalization is used.	163
5.7	DIOS mass spectra of unmodified plasma on the CH ₃ short silane monolayer in RP ion mode. No peaks corresponding to the substrate are detected. TIC normalization is used.	163
5.8	Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC à 1 mg/mL sur du silicium plan et du silicium poreux fonctionnalisés avec une monocouche de silanes CH ₃ court. Les principaux fragments du LysoPC sont indiqués. La normalisation TIC a été utilisée. Attention aux échelles différentes sur le silicium plan et le silicium poreux.	166
5.9	Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC à 50 μg/mL sur des échantillons de silicium poreux avec 60 % et 35 % de porosité. Les principaux fragments du LysoPC sont indiqués. L'étoile indique un pic de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.	166
5.10	Spectres du LysoPC à 50 μg/mL obtenus en DIOS-MS en RP et en RN sur des échantillons de silicium poreux avec 35 % de porosité avec les nouvelles caractéristiques du laser. Les principaux fragments du LysoPC sont identifiés. Les étoiles indiquent des pics de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.	167
5.11	Spectres du LysoPC à 50 μg/mL obtenus en DIOS-MS en RP sur des échantillons de silicium poreux de trois profondeurs : 300 nm, 1 μm et 2 μm. Les principaux fragments du LysoPC sont identifiés. Les étoiles indiquent les pics de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.	168

5.12	Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC en solution à 1 mg/mL sur du silicium poreux fonctionnalisé par des monocouches de CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Le pic du LysoPC est détecté à 524,3 m/z et les principaux fragments (86,0 m/z, 104,0 m/z, 184,1 m/z et 198,2 m/z) sont indiqués. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*). Les spectres de références sont présentés dans les Figures C.1 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.	170
5.13	Spectres de masse DIOS en RN du LysoPC en solution à 1 mg/mL sur du silicium poreux fonctionnalisé par des monocouches de CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments du LysoPC (79,0 m/z, 123,1 m/z, 153,1 m/z et 283,6 m/z) sont indiqués mais aucun pic du LysoPC à [M-H] ⁻ (522,3 m/z) n'est visible. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*). Les spectres de références sont présentés dans les Figures C.2 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.	171
5.14	Spectres de masse DIOS en RN du LysoPC spiké dans du plasma sur les substrats de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments du LysoPC (79,0 m/z, 123,1 m/z, et 153,1 m/z) sont indiqués. Le lavage 5x5 a été utilisé. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*) et les spectres de référence des surfaces sont présentés dans les Figures C.2 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.	173
6.1	Spectres de masse DIOS en RP de la solution multiplexée sur les surfaces fonctionnalisées par les silanes CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments des lipides sont identifiés. La normalisation TIC a été utilisée.	182
6.2	Spectres de masse DIOS en RN de la solution multiplexée sur les surfaces fonctionnalisées par les silanes CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments des lipides sont identifiés. Les pics issus de la surfaces sont identifiés par une étoile. La normalisation TIC a été utilisée.	183
6.3	Spectres de DIOS-MS en RP des pics à [M+H] ⁺ de l'α-GPC à gauche et du LysoPC à droite sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH ₃ court, (tirets rouges) CH ₃ long, (points verts) COO ⁻ , et (points-tirets bleus) NH ₃ ⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée. Le léger décalage des masses peut venir d'un défaut de planéité des échantillons sur la plaque MALDI modifiée. La normalisation TIC a été utilisée.	184
6.4	Spectres de DIOS-MS en RN des pics à [M+H] ⁺ de l'acide pyruvique, de l'acide urique et de l'acide citrique sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH ₃ court, (tirets rouges) CH ₃ long, (points verts) COO ⁻ , et (points-tirets bleus) NH ₃ ⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.	185

6.5	Pic principal détecté en RP en DIOS-MS de la valine, la créatine, la glutamine, la citrulline, la phénylalanine, l'arginine et la caféine en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH ₃ court, (tirets rouges) CH ₃ long, (points verts) COO ⁻ , et (points-tirets bleus) NH ₃ ⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. Ce pic correspond au pic [M+H] ⁺ pour la créatine, la glutamine, la phénylalanine, l'arginine et la caféine et au fragment principal pour la valine et la citrulline. La normalisation TIC a été utilisée.	188
6.6	Principal pic de détection de la taurine, la cystéine, le glucose, et le glutathion en RN en DIOS-MS en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH ₃ court, (tirets rouges) CH ₃ long, (points verts) COO ⁻ , et (points-tirets bleus) NH ₃ ⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.	190
6.7	À gauche, pic [M+H] ⁺ de la créatinine en RP en DIOS-MS et à droite pic [M-H] ⁻ de la créatinine en RN en DIOS-MS en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH ₃ court, (tirets rouges) CH ₃ long, (points verts) COO ⁻ , et (points-tirets bleus) NH ₃ ⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.	191
A.1	Énergie d'interaction moyenne sur de la silice plane entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de (a) CH ₃ court, (b) CH ₃ long, (c) COO ⁻ , et (d) NH ₃ ⁺ , et entre les métabolites et la silice pour (e) la silice non fonctionnalisée. Seuls les répliques pour lesquels il y a contact entre les silanes et les métabolites sont pris en compte. Les écarts types sont obtenus à partir de ces répliques.	200
A.2	À gauche, monocouche de silanes CH ₃ long sur une surface de silice et à droite interaction indirecte entre les silanes CH ₃ long et la carnitine (en bleu) par l'intermédiaire de l'acide urique (en violet). Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone, et les blancs l'hydrogène.	203
A.3	Énergie d'interaction moyenne sur de la silice en feuillets entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de CH ₃ court, CH ₃ long, COO ⁻ , et NH ₃ ⁺ . La moyenne est faite sur les productions pour lesquelles le métabolite est capturé à la fin des 300 ns. Les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.	206
A.4	Énergie d'interaction moyenne des métabolites sur (a) de la silice plane, (b) de la silice en feuillets, et (c) de la silice poreuse non fonctionnalisées. Les moyennes sont effectuées sur les répliques pour lesquels les métabolites sont capturés et les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.	211
B.1	XPS spectra of the porous SiO ₂ surface (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).	213
B.2	XPS spectra of the CH ₃ short monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).	214
B.3	XPS spectra of the COO ⁻ monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).	214
B.4	XPS spectra of the NH ₃ ⁺ monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, N 1s, O 1s and Si 2p core levels).	215

B.5	Depth profiling of silicon (black) and NH (red) ions by ToF-SIMS on (solid) porous silicon functionalized by NH ₃ ⁺ silane monolayer and on (dash) bare porous silicon. Silicon ion in Si bulk (sputtering time greater than 4300 s was used for normalization).The NH ⁻ appears to be greater than on the NH ₃ ⁺ sample than on the bare silicon sample, confirming the presence of the silane molecule on the surface.	215
B.6	SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with CH ₃ short silane monolayer. The 4 droplets are similar with big crystals and small 2D crystals (darker on the surface).	216
B.7	SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with CH ₃ long silane monolayer. The 4 droplets are similar with big crystals and small 2D crystals (darker on the surface).	216
B.8	SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with COO ⁻ silane monolayer. The droplets are similar except the third one with fibres on the surface which seem to have all the same length. The other droplets have big crystals and smaller 2D crystal (darker on the surface).	217
B.9	SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with NH ₃ ⁺ silane monolayer. The droplets are all different. The first one is with big crystals and smaller 2D ones (darker on the surface). The second have fibres and big crystals. The third one have medium crystals but denser on the surface. And the fourth one is similar to the second one.	217
B.10	SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with CH ₃ short silane monolayer. The droplets are similar except the third one for which the crystals are located mainly on one side of the droplet.	218
B.11	SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with CH ₃ long silane monolayer. The droplets are similar with a surface area smaller than with CH ₃ short silane monolayer, making a denser layer of crystals.	218
B.12	SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with COO ⁻ silane monolayer. The type of crystals is similar but the shape of the droplets is different. This is due to the drying process : the second droplet didn't dry uniformly on the surface.	219
B.13	SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with NH ₃ ⁺ silane monolayer. The droplets are similar except the last which resemble to a droplet on plane silicon. NH ₃ ⁺ silane monolayer on plane silicon was already the surface with the most disparities between the droplets.	219
B.14	SEM photograph of CHCA matrix deposition on bare porous silicon. The droplets are highly similar.	220
C.1	DIOS mass spectra of LysoPC (at 50 µg/mL) on the CH ₃ short monolayer, for three different pore depths (300 nm, 1 µm, and 2 µm). Fragments of LysoPC are indicated (at 86.0m/z, 104.0m/z, and 184.1 m/z). Stars indicate peaks related to the surface. The 5x5 washing protocol is used. TIC normalization is used.	222
C.2	S/N ratio and standard deviation (from 3 replicate samples) of (a) the LysoPC fragment at 86.0 m/z and (b) the [M+H] ⁺ peak of LysoPC, at different concentrations, on the CH ₃ short monolayer on porous silicon substrate, in RP ion mode.	223

C.3	Normalized DIOS mass spectra in RP ion mode of the CH ₃ short and CH ₃ long monolayers on porous silicon, and the bare porous silicon surface. Total ion current normalization is used.	224
C.4	Normalized DIOS mass spectra in RN ion mode of the CH ₃ short and CH ₃ long monolayers on porous silicon, and the bare porous silicon surface. Total ion current normalization is used.	225
C.5	DIOS mass spectra of 10 % of a mix of chloroform/methanol (2/1 v:v) on bare porous silicon in RN and RP ion modes. Peaks corresponding to the silicon substrate are indicated by a star (*). Total ion current normalization is used.	226
C.6	Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH ₃ short monolayer, in RN ion mode, for different water washing protocols (no washing, 1x1, 3x1, 10x1).	227
C.7	Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH ₃ short monolayer, in RN ion mode, for the different water washing protocols (10x1, 5x2, 2x5).	228
C.8	Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH ₃ short monolayer, in RN ion mode, for the different water washing protocols (2x5, 3x5, 5x5).	228
C.9	ToF-SIMS depth profiling of porous silicon functionalized by CH ₃ short monolayer, after LysoPC adsorption, with (red) and without (black) water washings. The intensities of the P ⁻ ions (30.9682 amu) and ³⁰ Si ⁻ (29.9717 amu) ions as a function of sputtering are displayed. ³⁰ Si ⁻ in Si bulk (time > 900 s) is used for normalization.	229

Liste des tableaux

1.1	Formules brutes et topologiques des quatre silanes utilisés dans la suite.	34
1.2	Tableau récapitulatif des angles de contact de la littérature des silanes de notre étude ou proche de ceux de notre étude.	37
1.3	Premier groupe des métabolites de l'étude avec leurs propriétés physico-chimiques et leur charge dans le système.	54
1.4	Propriétés physico-chimiques du panel de 25 métabolites, les ordres de grandeurs de leur concentration moyenne dans le sang et la tendance de la concentration pour les patients atteints de sepsis. Les cases sont laissées blanches si la valeur n'est pas connue.	56
1.5	Évolution de la concentrations (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) des acides aminés après l'admission des patients en soins intensifs pour les patients qui survivent au sepsis (survivant, $n = 20$) et ceux qui en meurent (non survivant, $n = 15$). Données issues de [4]. .	58
2.1	Énergies de liaison en eV des pics de déconvolution des substrats de silicium plan et poreux passés à l'UV-Ozone 30 min.	64
2.2	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation en phase liquide sur du silicium plan.	67
2.3	Pourcentages atomiques et énergies de liaison (eV) obtenus en XPS pour les quatre monocouches de silane sur du silicium plan avec la fonctionnalisation en phase liquide.	68
2.4	Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes COO^-	73
2.5	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus en fonctionnalisant des échantillons de silicium avec des silanes CH_3 long en phase gazeuse avec le four n°1, en changeant le nettoyage des échantillons avant la silanisation.	76
2.6	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus en fonctionnalisant des échantillons de silicium avec des silanes CH_3 long en phase gazeuse avec le four n°1, en changeant la température du bulleur de silanes.	76
2.7	Angle de contact moyen d'une goutte d'eau et quantité de silane consommée lors de la fonctionnalisation par des silanes CH_3 long pour une silanisation avec un flux continu et une silanisation par cycle avec le four n°1.	77

2.8	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus lors du test de reproductibilité de la fonctionnalisation du silicium plan avec les CH ₃ long avec le four n°1.	78
2.9	Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes CH ₃ long dans le four n°1.	79
2.10	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes CH ₃ court avec le four n°2 et injection des silanes dans le réacteur à 150°C.	83
2.11	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes CH ₃ court dans le four n°2, en injectant les silanes dans le réacteur à température ambiante.	84
2.12	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes NH ₃ ⁺ dans le four n°2 avec le protocole des silanes CH ₃ court.	85
2.13	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes NH ₃ ⁺ dans le four n°2, avec augmentation de la température du four par palier.	85
2.14	Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes NH ₃ ⁺ dans le four n°1.	87
2.15	Silane consommé et angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes CH ₃ court dans le four n°3 pour deux températures de bulleur différentes.	91
2.16	Silane consommé, pression en silane dans le four à 150°C pendant la silanisation et angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus après la silanisation de silicium plan avec des silanes CH ₃ court avec le four n°3.	91
2.17	Silane consommé, pression en silane dans le four à 150°C pendant la silanisation et angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus après la silanisation de silicium plan avec des silanes CH ₃ court dans le four n°3.	92
2.18	Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus lors du test de reproductibilité du protocole de silanisation du silicium avec les silanes CH ₃ court dans le four n°3.	92
2.19	Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes CH ₃ court dans le four n°1.	95
2.20	Récapitulatif de la densité de silanes pour chaque surface. Les écarts types sont obtenus à partir de mesures sur trois échantillons différents.	97
2.21	Surface de silicium silanisable et consommation en silanes par cycle de fonctionnalisation pour chaque four par rapport au protocole en phase liquide.	97
3.1	Métabolites de l'étude de dynamique moléculaire avec leurs propriétés physico-chimiques et leur charge dans le système. Les valeurs de LogP ont été obtenues à partir du site Chemicalize [205].	100
3.2	Nombre de captures de chaque métabolite sur trois répliques par les quatre surfaces poreuses fonctionnalisées.	115

3.3	Tableau récapitulatif des meilleures surfaces pour l'adsorption des métabolites de l'étude de dynamique moléculaire. * Le choix est basé sur le nombre de captures et l'énergie d'interaction avec la configuration de silice poreuse.	118
3.4	Nombre de métabolites capturés pour tous les réplicas et dans aucun réplica pour les différents types de silice et les quatre silanes.	120
4.1	Silane molecules used in this study and their structural formula.	126
4.2	XPS atomic percentages of C 1s, O 1s, Si 2p, and N 1s for porous SiO ₂ surface and for the four silane monolayers on porous silicon.	131
4.3	Surface coverage obtained by XPS for the 4 silane monolayers on porous silicon. The standard deviations are obtained from the measurement of three different samples.	132
4.4	S/N ratio and associated STD _{mean} (%) and intra-substrates uniformity (%), for all the metabolites simultaneously detected on the different surfaces studied, using CHCA as a matrix. m/z, logP, and the isoelectric point (IP) are indicated for each metabolite. For a given metabolite, a substrate leading both to the highest S/N ratio and to the best compromise for STD _{mean} and uniformity is identified by red values, if such a substrate does not exist, the substrate leading to the highest S/N value is identified by bold black values and the substrate leading to the best compromise for STD _{mean} and uniformity is identified by green values. ND means not detected	137
4.5	Énergies d'interaction (en kJ/mol) entre les métabolites et les silanes lors des simulations de dynamique moléculaire avec la silice poreuse.	145
5.1	Developed formula of the silane molecules used in this study	153
5.2	Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, in RP and RN ion modes, in solution, for the different surfaces studied. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data).	158
5.3	Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, in RN ion mode, in spiked plasma (50 µg/mL), for the different surfaces studied. No peaks are detected by using CH ₃ long, and no peaks are detected at 283.6 m/z. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data). (Spectra are in Figure 5.5)	161
5.4	Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, for the CH ₃ short monolayer, in RN ion mode in unmodified plasma, in spiked plasma at 50 µg/mL, in spiked plasma at 500 µg/mL, and in RP ion mode in unmodified plasma. No peaks are detected at 283.6 m/z in RN ion mode, and no peaks are detected at 104.0 m/z and at 198.2 m/z in RP ion mode. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data). (Spectra are in Figures 5.5-5.7)	161
5.5	Intensités relatives des fragments du LysoPC en solution en RP et en RN pour les différentes surfaces poreuses.	172
5.6	Intensités relatives des fragments du LysoPC dans du plasma spiké à 50 µg/mL en DIOS-MS en mode RN pour les cinq surfaces étudiées. Aucun pic n'est détecté sur le CH ₃ long et à 283,6 m/z.	172

6.1	Propriétés physico-chimiques des métabolites présents dans la solution multiplexée. Les cases sont laissées blanches si la valeur n'est pas connue. La charge à pH 7 est indiqué entre parenthèse dans la colonne sur le point isoélectrique lorsqu'elle est non nulle. Dans ce tableau, les métabolites sont triés selon leur ordre d'apparition dans la discussion.	177
6.2	Intensités relatives des principaux pics de détection des lipides en solution non multiplexée. Pour chaque lipide, la somme des intensités des pics est égale à 1. . .	179
6.3	Rapports S/N des principaux pics (fragments et molécules protonées) des lipides en DIOS-MS en solution multiplexée en mode RP et RN. Les écarts types sont calculés à partir de 3 répliques. Les principaux fragments des lipides, lorsque ceux-ci représentent plus de 10 % du signal total (Tableau 6.2) sont soulignés en rouge pour l' α -GPC, en vert pour le LysoPC, en bleu pour la sphingomyéline, et en magenta pour le LysoPG.	181
6.4	Rapports S/N des trois acides à $[M-H]^-$ dans la solution multiplexée en RN en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents. . .	184
6.5	Rapports S/N pour le pic $[M+H]^+$ de la créatine, la glutamine, la phénylalanine, l'arginine, et la caféine et le principal fragment de la valine et la citrulline dans la solution multiplexée en RP en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.	187
6.6	Rapports S/N pour le pic $[M-H]^-$ de la taurine, le glucose et le glutathion et le principal adduit de la cystéine dans la solution multiplexée en RN en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.	189
6.7	Rapports S/N pour les pics $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$ de la créatinine en RP et en RN dans la solution multiplexée en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.	191
6.8	Meilleurs modes (RP ou RN) et surfaces pour la détection des 25 métabolites dans la solution multiplexée en DIOS-MS. Les lignes blanches correspondent aux métabolites qui ne sont jamais détectés.	194
A.1	Nombre de captures de chaque métabolite sur cinq répliques par les quatre surfaces planes.	201
A.2	Nombre de captures de chaque métabolite sur trois répliques par les quatre surfaces en feuillets.	205
A.3	Nombre de captures de chaque métabolite sur sur la silice plane, la silice en feuillets et la silice poreuse non fonctionnalisées.	210
C.1	S/N values for LysoPC fragments in MALDI-MS analysis in RP ion mode on three different substrates, and in DIOS-MS analysis with the CH_3 short monolayer both in RP and in RN ion modes. Each S/N value corresponds to an average over 100 measurement spots. The spot-to-spot relative standard deviations, over 100 measurement spots, are indicated in parentheses.	229

Liste des abréviations

9AA	9-Aminoacridine
α-GPC	L- α -glycérophosphocholine
ACN	Acétonitrile
AFM	Microscopie à force atomique (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
AP	Affinité protonique
APDMES	3-Aminopropyldiméthyléthoxysilane
APMDES	3-Aminopropylméthyl-diéthoxysilane
APTES	3-Aminopropyltriéthoxysilane
BSA (ou ASB)	Albumine de sérum bovin (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
DAHC	Di-ammonium hydrogénéocitrate
DAN	1,5-Diaminonaphthalène
DHAP	5-Dihydroxyacétophénone
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DIOS	Désorption-ionisation sur silicium (<i>Desorption/Ionization On Silicon</i>)
DIUTHAME	<i>Desorption/Ionization Using Through-Hole Alumina Membrane</i>
GLAD	Dépôt à angle rasant (<i>Glancing Angle Deposition</i>)
HCCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HPHC	<i>Hierarchically Porous Hybrid Monoliths</i>
IR	Infrarouge
LoD	Limite de détection (<i>Limit of Detection</i>)
LysoPC	1-stéaroyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phosphocholine ou Lysophosphatidylcholine 18:0
LysoPG	1-stéaroyl-2-hydroxy-sn-glycéro-3-phospho-(1'-rac-glycérol) ou lysophosphatidylglycérol 18:0
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)

MDMA	4-Méthylènedioxy-N-méthylamphétamine
MEB	Microscope électronique à balayage
MOPS	Acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass Spectrometry</i>)
NALDI	<i>Nanoassisted Laser Desorption/Ionization</i>
Nd-YAG	<i>Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
NEDC	N-(1-naphtyl)-éthylènediamine dichlorhydrate
NP	Nanoparticule
OTS	Octadécyltrichlorosilane
PMMA	Poly(méthacrylate de méthyle) (<i>Poly(methyl methacrylate)</i>)
PSA	Antigène prostatique spécifique (<i>Prostate Specific Antigen</i>)
RMN	Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire
RN	Rélectron négatif
RP	Rélectron positif
S/N	Rapport signal sur bruit (<i>Signal-to-noise ratio</i>)
SA	Acide sinapique (<i>Sinaptic Acid</i>)
SALDI	Désorption-ionisation laser assistée par la surface (<i>Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
SAM	Monocouche auto-assemblée (<i>Self-Assembled Monolayer</i>)
TFA	Acide trifluoroacétique (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
THAP	2,4,6-Trihydroxyacétophénone
THF	Tétrahydrofurane
TIC	Courant ionique total (<i>Total Ion Current</i>)
ToF	Temps de vol (<i>Time of Flight</i>)
ToF-SIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaire (<i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>)
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
VHB	Virus de l'hépatite B
XPS	Spectroscopie de photoélectrons X (<i>X-ray Photoelectron Spectroscopy</i>)

Le sepsis, anciennement appelé septicémie (littéralement infection du sang), est une infection grave, généralement bactérienne, mais pouvant être d'origine virale ou fongique, pouvant provoquer la mort du patient. La dernière définition du sepsis, datée de 2016 et mise au point par un consortium de scientifiques et de médecins, le décrit comme un dysfonctionnement d'organes potentiellement mortel causé par la dérégulation de la réponse immunitaire d'un hôte à une infection [1].

Cette maladie, assez peu connue du grand public, est la cause de 20 % des décès dans le monde d'après l'OMS [2], soit environ 11 millions de personnes chaque année. En France, ce sont environ 60 000 patients qui en meurent tous les ans, principalement des nouveaux-nés et des personnes âgées dont le système immunitaire est plus faible que pour le reste de la population. Elle touche également les personnes dont le système immunitaire a été artificiellement diminué, à la suite d'une intervention chirurgicale par exemple, ce qui lui vaut également le nom d'infection nosocomiale, c'est-à-dire, d'infection contractée dans un établissement de santé. Ce nombre va certainement augmenter dans les années à venir à cause du vieillissement de la population, de l'augmentation du nombre de personnes présentant des comorbidités ainsi que d'une meilleure reconnaissance de la maladie.

Aujourd'hui, on classe les états septiques en deux catégories : le sepsis et le choc septique, le second étant une suite du premier. Il est défini comme un sepsis avec des anomalies circulatoire et cellulaire suffisamment graves pour augmenter substantiellement la mortalité. Cela se traduit par une diminution de la pression sanguine et une nécessité de passage en soins intensifs pour prendre le relais artificiellement sur les organes dysfonctionnants.

La principale méthode de diagnostic est l'hémoculture suivi d'un antibiogramme [3]. L'hémoculture consiste à mettre en culture du sang, issu d'un prélèvement sanguin d'un patient, pour que les microorganismes présents se développent. La culture peut être faite pendant une quinzaine de jours. Ce temps est nécessaire pour que l'agent infectieux, le plus souvent une bactérie, puisse se développer dans le milieu et être en quantité suffisante pour être détecté. Une fois la présence de la bactérie validée, il reste à trouver un antibiotique efficace. Pour cela, une deuxième étape, appelée antibiogramme, est nécessaire. Elle consiste à mettre en contact la

culture bactérienne avec un ou plusieurs antibiotiques pour analyser sa réponse et sélectionner un traitement à l'infection.

En pratique, ce diagnostic est trop long pour pouvoir être fait avant le début du traitement du patient, dont l'état de santé peut se dégrader rapidement (les chances de survies diminuent de 7 % toutes les heures). En attendant les résultats de l'hémoculture, des antibiotiques à large spectre sont donnés au patient, et dans le cas d'un sepsis aggravé, un choc septique, une admission en soins intensifs peut être nécessaire pour maintenir les fonctions vitales, grâce notamment à la transfusion sanguine et la ventilation artificielle. Le traitement dure une quinzaine de jours et peut-être adapté une fois que l'origine de l'infection est trouvée.

Cependant, cette solution n'est pas viable sur le long terme : les bactéries développent des résistances au contact des antibiotiques et l'utilisation d'antibiotiques à large spectre ne fait qu'accélérer cette résistance. Il est donc nécessaire de trouver un outil de diagnostic rapide ou un traitement efficace contre la maladie. De nombreux essais de traitement ont été menés depuis plusieurs années mais ont quasiment tous échoué. Le seul médicament autorisé en France pour traiter le sepsis, le Xigris, uniquement prescrit pour l'adulte, a finalement été retiré du marché en 2011 par manque d'efficacité [3].

Le diagnostic plus rapide des sepsis d'origine bactérienne, majoritaires parmi l'ensemble des sepsis, permettrait de commencer un traitement antibiotique spécifique rapidement pour traiter les patients sans passer par les antibiotiques à large spectre. Cependant, les méthodes actuelles qui se basent sur les hémocultures et la détection des bactéries sont limitées par la sensibilité des appareils. Il est nécessaire de développer la culture pendant plusieurs jours avant d'avoir suffisamment de bactéries pour pouvoir les détecter et les étudier.

Ces dernières années, des études sur le profil métabolique des patients atteints de sepsis ou de choc septique ont été menées [4,5]. Elles montrent que certaines catégories de métabolites, en particulier les acides aminés, les acides et les lipides sont des biomarqueurs de la maladie. Par exemple, la concentration dans le sang de certains métabolites, comme la méthionine augmente quand la concentration des lipides, comme les céramides diminue avec l'état d'avancement de la maladie. Pouvoir détecter et quantifier ces variations dans le profil métabolique d'un patient permettrait de pouvoir diagnostiquer le sepsis et le traiter.

Les techniques de détection actuelles basées sur la spectrométrie de masse sont prometteuses grâce à leur grande sensibilité. Cependant, ces techniques sont souvent couplées à d'autres comme la chromatographie en phase liquide à haute performance ou la spectrométrie de masse en tandem. Ces techniques, très sensibles, sont toutefois longues à mettre en place et sont difficilement réalisables dans des échantillons sanguins sans traitement préalable pour retirer les espèces abondantes non spécifiques comme les protéines.

La technique de spectrométrie de masse par Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI-MS), développée dans les années 1980 est une technique de spectrométrie de masse créée pour l'analyse d'échantillons biologiques comme les tissus ou des liquides biologiques (urine, plasma, sang...). Cependant, pour des molécules à faible poids moléculaire comme les métabolites, la présence de pics de matrice, utilisée pour aider à l'ionisation des analytes interfère avec le signal. Pour cela, d'autres techniques sans matrice ont été développées, en parti-

culier la technique de spectrométrie de masse avec désorption ionisation sur silicium (DIOS-MS), qui utilise la structuration du silicium poreux pour ioniser les analytes. De plus, la fonctionnalisation de la surface par des silanes peut améliorer la sensibilité des mesures pour s'approcher des concentrations physiologiques. Cette absence de matrice permet de travailler dans la gamme de masse des métabolites (inférieure à 1000 Da). Notons que l'efficacité de la détection en DIOS-MS est très complexe et repose à la fois sur les propriétés d'adsorption des métabolites, mais aussi de désorption, d'ionisation, de protonation, de transport et de fragmentation. Toutes ces propriétés sont liées aux propriétés physico-chimiques des métabolites et des surfaces, de la fluence du laser, de la conductivité thermique du substrat, de ses propriétés géométriques ou encore de son absorbance à la longueur d'onde du laser.

Le projet ANR PORIDG a pour objectif de créer un système de diagnostic du sepsis en 15 min à partir d'un échantillon sanguin déposé sur une puce chimique de silicium poreux et analysé en spectrométrie de masse. Les principaux axes de recherche de ce projet sont la création de surfaces de silicium poreux fonctionnalisées reproductibles et conformes, la modélisation de ces surfaces par dynamique moléculaire et l'étude de l'adsorption de molécules sur les silanes, la détection de métabolites biomarqueurs du sepsis en DIOS-MS en milieu complexe et biologique et enfin l'étude d'échantillons cliniques pour développer un modèle de détection de patients malades.

La technique de fonctionnalisation de surface par monocouches de silanes est une technique couramment utilisée dans l'équipe de Dispositif pour la Santé et l'Environnement (DSE) de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) sur des échantillons de silicium plan. Plusieurs protocoles, en phase liquide et gazeuse ont été développés et répondent aux problématiques actuelles de fonctionnalisation reproductible et d'immobilisation de protéines et d'anticorps.

Un travail de modélisation des surfaces fonctionnalisées au sein de l'équipe a aussi été mené récemment. En 2020, Lecot *et al.* ont comparé quatre couches de silanes auto-assemblées, qui diffèrent par la longueur de leur chaîne alkyle (entre 3 et 18 atomes de carbone) et par leur groupement terminal (chargé ou non chargé) sur une surface de silice modélisée en dynamique moléculaire avec les résultats expérimentaux obtenus dans l'équipe en spectroscopie à photoélectrons X (XPS) et en spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) [6]. Ces surfaces, développées dans l'équipe, ont permis d'analyser théoriquement les interactions protéine-ligand sur une surface et l'influence de la monocouche de silanes à la surface sur les énergies d'interaction et les déformations de la protéine. Ces surfaces, qui font seulement l'objet de très rares publications en dynamique moléculaire, peuvent aussi être utilisées pour d'autres molécules biologiques comme les métabolites pour étudier leur adsorption sur une surface dans l'objectif de comprendre fondamentalement les résultats de détection en spectrométrie de masse.

Dans ma thèse, je me suis intéressé à la détection de métabolites biomarqueurs du sepsis en DIOS-MS et ce travail peut être séparé en trois parties. La première partie porte sur la fonctionnalisation des surfaces de silicium avec quatre silanes, à partir de fours conçus dans le laboratoire. Une deuxième partie est dédiée à une étude de dynamique moléculaire sur les interactions entre les métabolites et les surfaces silanisées, grâce à leur énergie d'interaction et à l'orientation des métabolites à la surface. Enfin, une dernière partie s'intéresse à la détection

des métabolites en spectrométrie de masse. Cette étude a été faite en MALDI-MS, technique classique d'analyse de biomolécules puis en DIOS-MS pour surmonter les difficultés de détection des métabolites à faible concentration et pouvoir travailler dans du plasma.

Le manuscrit est séparé en 6 chapitres :

Le **Chapitre 1** présente tout d'abord le fonctionnement de la spectrométrie de masse MALDI et DIOS ainsi que les applications pour la détection de métabolites. Le procédé de silanisation est ensuite décrit, suivi de la théorie de la dynamique moléculaire et de ses applications pour l'étude de l'interaction entre les métabolites et une surface. Enfin, les métabolites utilisés dans l'étude sont présentés.

Le **Chapitre 2** est dédiée à la fonctionnalisation en phase gazeuse de surfaces de silicium par des silanes. Nous présentons le développement du protocole de silanisation sur les trois fours de l'étude ainsi que la caractérisation des surfaces par angle de contact, XPS et spectrométrie de masse des ions secondaires par temps de vol (ToF-SIMS).

Le **Chapitre 3** présente les résultats de dynamique moléculaire. Nous modélisons trois surfaces de silice : une silice plane, une silice en feuillet et une silice poreuse, avec chacune des avantages et des inconvénients, et qui permettent de s'approcher au mieux de l'expérience. Les quatre silanes sont ensuite greffés sur ces surfaces et les interactions entre les métabolites et les silanes sont étudiées.

Ensuite, le **Chapitre 4** s'intéresse à la détection des métabolites en MALDI-MS. Nous commençons par analyser l'effet de six matrices différentes sur la détection des métabolites, puis nous étudions la détection des métabolites en solution que nous mettons en relation avec le type de silane, la cristallisation de la matrice et les propriétés des métabolites.

Dans le **Chapitre 5**, nous étudions la détection de la lysophosphatidylcholine (LysoPC) sur les surfaces de silicium poreux fonctionnalisées en DIOS-MS. Nous analysons tout d'abord son comportement sur les surfaces lorsque le métabolite est en solution, puis nous montrons qu'il est possible de le détecter dans du plasma sans pré-traitement, uniquement en lavant la surface à l'eau avant la mesure.

Enfin, le **Chapitre 6** présente les résultats de la détection des métabolites en DIOS-MS lorsque ceux-ci sont mélangés ensemble en solution. Nous essayons de rapprocher les observations aux propriétés physico-chimiques des métabolites, en particulier leur affinité protonique, leur énergie d'ionisation et leur charge.

1.1 Introduction

Les études récentes, permises en partie grâce à l'augmentation des capacités de calcul des ordinateurs, s'intéressent de plus en plus au métabolome humain, c'est-à-dire à l'ensemble des petites molécules, les métabolites, dans un milieu biologique comme le sang. Ces molécules sont en nombre important et en concentrations variées, ce qui rend leur étude complexe. Avec le développement des statistiques, de nouvelles études ont été possibles pour identifier des tendances dans le profil métabolique de patients. Ce domaine de la médecine porte le nom de métabolomique. La meilleure compréhension de ces profils, en particulier dans le sang, a permis de mieux comprendre l'effet de maladies sur le corps humain. En effet, les études montrent que le profil métabolique d'une personne est influencé par son état de santé. Une bactérie ou un virus dans le sang ou la présence d'un cancer modifient la concentration des métabolites dans le sang, principalement à cause du dysfonctionnement de certains organes et de la dénaturation de protéines [5,7–9]. On appelle alors ces métabolites des biomarqueurs de la maladie. Dans le cas du sepsis, dont les causes peuvent être multiples, plusieurs études se sont intéressées à trouver des biomarqueurs parmi les métabolites du sang [5,10–18]. Il a été montré récemment, en 2021, qu'il est possible de regrouper les métabolites biomarqueurs du sepsis en trois familles : les acides aminés et leurs dérivés, les acides organiques et les lipides [5]. Ces métabolites, naturellement présents dans le sang, sont en concentration de quelques $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour les moins abondants chez un patient sain, et dans le cas d'un patient atteint de sepsis, la concentration de ces biomarqueurs peut doubler, quadrupler ou au contraire chuter drastiquement suivant le stade de la maladie et le type de métabolite. [4,18–20]. Les défis actuels sont de pouvoir détecter les variations de concentrations d'un panel de métabolites spécifiques du sepsis noyés dans le sang parmi une abondance de molécules de haut poids moléculaire. Cela permettrait de développer des outils de diagnostic et accélérer la prise d'antibiotiques spécifiques.

La spectrométrie de masse est largement utilisée à l'hôpital pour l'identification de petites molécules (vitamines, molécules actives de médicaments ou toxiques) dans le sang. Cependant, pour l'étude des métabolites, il est nécessaire de coupler une identification en spectrométrie de masse avec une première étape de chromatographie pour séparer les métabolites d'intérêt du reste des molécules. Ce sont des protocoles expérimentaux longs et complexes qui peuvent engendrer des artefacts et la détérioration des métabolites. Il est donc nécessaire de développer des techniques innovantes de spectrométrie de masse pour aller vers le diagnostic du sepsis. Parmi ces techniques, la spectrométrie de masse par désorption-ionisation sur silicium (DIOS) sur du silicium poreux fonctionnalisé est très prometteur mais peu d'études ont été réalisées sur des milieux biologiques. L'efficacité du DIOS-MS repose sur la capacité des substrats à adsorber/désorber/ioniser/protoner les métabolites. Il est très difficile de décorréler tous ces phénomènes et cela n'a jamais été fait. La dynamique moléculaire pourrait être appropriée pour avoir une idée des énergies d'adsorption relatives des différents métabolites sur différentes surfaces.

Dans cette étude bibliographique, nous présentons le fonctionnement général de la technique de MALDI-MS avec ses avantages et ses inconvénients pour la détection de métabolites dans un échantillon liquide. Ensuite, nous présentons les principes de spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par la surface (SALDI-MS), ainsi que les principaux travaux sur la détection des métabolites. Ces techniques permettent de s'affranchir de la matrice organique utilisée en MALDI et de pouvoir détecter des métabolites avec un meilleur rapport signal sur bruit (S/N) que le MALDI. Nous faisons ensuite une étude plus approfondie sur les surfaces de silicium poreux et leur fonctionnalisation, en particulier par des silanes, largement utilisées en SALDI-MS de fait de leurs bonnes propriétés optiques. Une deuxième partie de cette étude bibliographique se concentre sur la fonctionnalisation des surfaces de silicium par des silanes et de la caractérisation des surfaces. Enfin, la dernière partie est consacrée aux simulations de dynamique moléculaire. Ces simulations permettent une étude fondamentale des interactions entre les métabolites et la surface à l'échelle atomique. Le modèle théorique sur lequel se base la dynamique moléculaire est présenté, ainsi que les principaux travaux consacrés à l'étude des interactions entre des métabolites et des surfaces.

1.2 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par matrice

La spectrométrie de masse MALDI est la spectrométrie de masse basée sur la désorption-ionisation laser la plus commune. Cette méthode, apparue dans les années 1980, utilise les propriétés de cristallisation et de transfert de charge d'une molécule de matrice organique pour ioniser les analytes et pouvoir les analyser par spectrométrie de masse. Elle est régulièrement utilisée pour l'analyse de biomolécules parce qu'elle dénature peu les protéines et fragmente moins les molécules que d'autres techniques de spectrométrie de masse grâce à son ionisation douce.

Dans cette partie, nous présentons le fonctionnement du MALDI-MS, puis nous regardons ses applications pour la détection de biomolécules, et en particulier les métabolites. Nous nous concentrons principalement sur les surfaces de silicium qui sont des surfaces fréquemment utilisées en dehors des plaques de MALDI industrielles en acier inoxydable, et qui sont les surfaces qui nous intéressent dans le cadre de ce projet. Nous finissons cette partie sur les limites du MALDI-MS en particulier pour les métabolites.

1.2.1 Fonctionnement du MALDI

La spectrométrie de masse MALDI est présentée en Figure 1.1. Les échantillons à analyser sont mélangés à une matrice, une molécule ayant la propriété de cristalliser sous forme solide, et sont déposés sur une surface. Avec l'évaporation du solvant, la matrice va co-cristalliser avec les analytes. L'échantillon est ensuite placé sous vide et des pulsations laser de quelques nanosecondes sont envoyées sur la surface. En chauffant la surface, le laser va désorber les cristaux et ioniser la matrice et les analytes. Pour récupérer les ions, la principale méthode est l'utilisation d'un tube en temps de vol (ToF pour *Time of Flight*) qui consiste à accélérer les ions en fonction du rapport entre leur masse et leur charge (m/z) grâce à un champ électrique. Les ions sont ainsi triés selon leur rapport m/z et un spectre de masse peut être obtenu. Dans la suite, nous nous intéressons plus en détails aux différents éléments du MALDI-MS. Un schéma détaillé du ToF est donné dans la section 1.2.1.e dédiée.

1.2.1.a La matrice

La matrice est une molécule organique qui a la particularité de cristalliser lorsque son solvant s'évapore. Elle est la plupart du temps mélangée à l'échantillon à analyser et déposée sur une plaque. La goutte déposée sèche et la matrice co-cristallise avec les molécules de l'échantillon. Lors de l'irradiation laser, la matrice se désorbe et s'ionise. Cette ionisation permet ensuite de transférer des charges aux analytes qui s'ionisent à leur tour pour ensuite être détectés. La matrice a donc un double rôle : la protection des analytes pour éviter une irradiation directe du laser, et ainsi éviter leur fragmentation, et le transfert de charge vers les analytes pour les ioniser et qu'ils puissent passer dans le tube ToF [21]. Comme nous le verrons dans la suite, le transfert de charge est un phénomène complexe dont tous les détails ne sont pas connus. En particulier, on observe que certaines matrices sont plus efficaces pour l'ionisation de certaines molécules par rapport à d'autres [22–25] mais ces résultats ne sont pour le moment qu'empiriques. Il est souvent nécessaire de tester plusieurs matrices sur un échantillon avant de l'analyser.

En MALDI-MS, il est possible d'étudier les ions positifs et les ions négatifs. En fonction des ions que l'on cherche à détecter, le choix de la matrice et de son solvant peut être différent. Par exemple, la matrice HCCA (acide α -cyano-4-hydroxycinnamique) [26], la matrice SA (acide sinapique) [27] et la matrice DHB (acide 2,5-dihydroxybenzoïque) [28] sont largement utilisées pour la détection d'ions positifs. Au contraire, les matrices 9AA (9-aminoacridine) [29] et NEDC (N-(1-naphtyl)-éthylènediamine dichlorhydrate) [30] sont principalement utilisées pour les ions négatifs. Dans le cas de l'analyse des ions positifs, un acide est souvent ajouté au solvant de la matrice (principalement de l'acide trifluoroacétique ou TFA) pour acidifier le milieu et ioniser

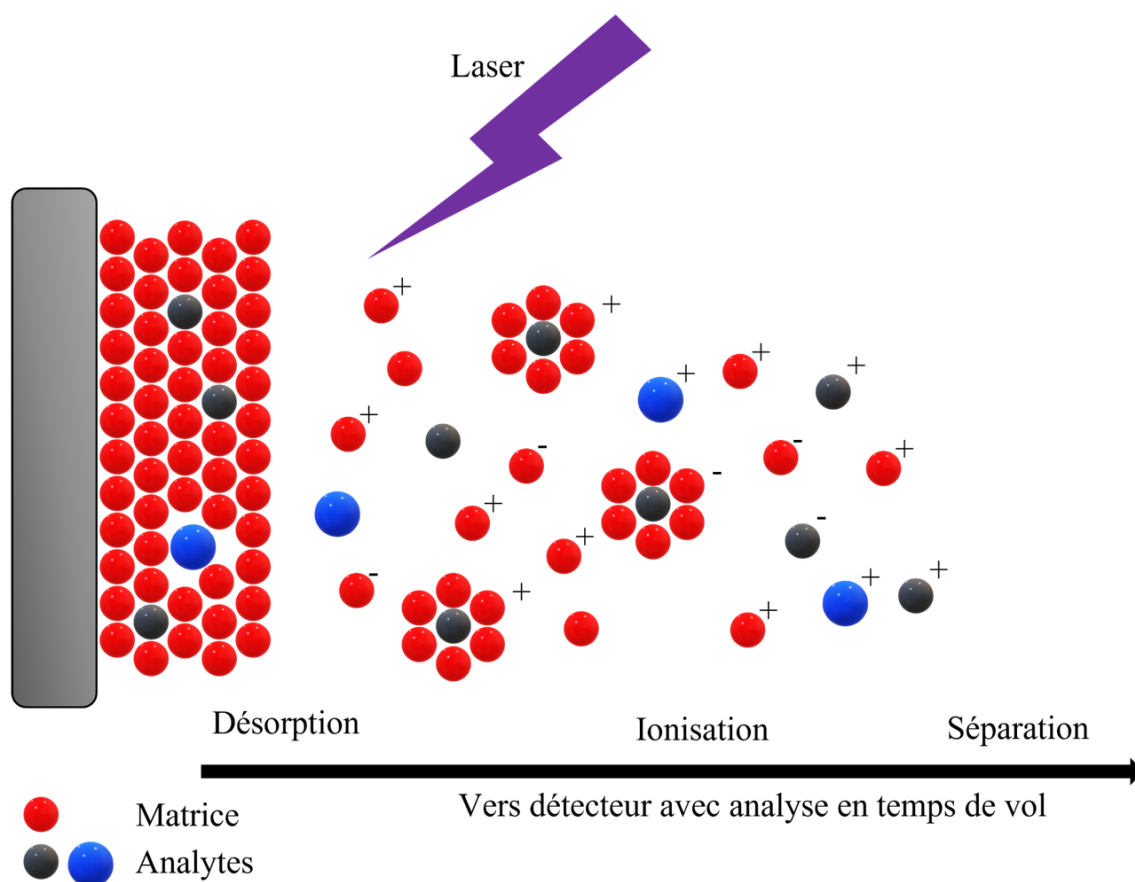


Figure 1.1 – Schéma de fonctionnement de la spectrométrie de masse MALDI.

la matrice. Lors de nos expériences de spectrométrie de masse, nous avons utilisé six matrices différentes : HCCA, DHB et THAP (2,4,6-trihydroxyacétophénone) pour les ions positifs et 9AA, NEDC et DAN (1,5-diaminonaphthalène) pour les ions négatifs.

1.2.1.b Le laser

Le laser est ici l'outil permettant d'ioniser les molécules. Il est possible d'utiliser des lasers ultraviolet (UV) et infrarouge (IR). Les premiers étant plus communs que les seconds et étant aussi ceux que nous utilisons dans ce projet, nous nous concentrons exclusivement sur les lasers UV dans la suite.

Les sources lasers sont multiples et le choix des matrices peut se faire en fonction de ce laser. En UV, on retrouve principalement deux sources aujourd'hui : le laser azote à 337 nm et le laser Nd-YAG (pour *Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet*) à 355 nm [31]. Le paramètre principal du laser pour la détection des biomolécules est la fluence du laser. La fluence est définie comme l'intensité du rayonnement par unité de surface et est exprimée en J/m^2 . Une bonne fluence permet de désorber et d'ioniser un maximum d'analytes et de matrice à la surface. Cependant, plus la fluence est élevée, plus la fragmentation des molécules est élevée. Il est donc nécessaire de trouver un compromis pour maximiser le signal tout en réduisant au maximum

la fragmentation. Pour une application MALDI pour la désorption et l'ionisation de la couche supérieure d'un échantillon, la fluence nécessaire avec un laser UV est de l'ordre de 50-500 J/m².

À l'intérieur d'un échantillon, l'évolution de la fluence suit la loi de Beer-Lambert [32] :

$$H(z) = H_0 \cdot e^{-\alpha z} \quad (1.1)$$

où $H(z)$ et H_0 sont respectivement la fluence du laser à une profondeur z et à la surface de l'échantillon et α est le coefficient d'absorption de la matrice. Dans la gamme 300-400 nm, la longueur d'onde des laser UV, l'absorption est principalement due à des cycles aromatiques avec des groupes donneurs d'électrons comme des résidus hydroxyles [33-35]. Les matrices utilisées ont donc toutes ces fonctions chimiques. Sous forme solide cristallisée, le coefficient d'absorption pour les matrices classiques à 337 nm (laser azote) se trouve dans la gamme $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5 \text{ cm}^{-1}$, soit une profondeur de pénétration de l'ordre de 20 à 200 nm, pour une fluence égale à 30 % de la fluence du laser à la surface de l'échantillon. Classiquement, la profondeur d'analyse est donc de 20 à 200 nm.

1.2.1.c La désorption

La désorption est la première étape du phénomène de "désorption-ionisation" caractéristique de la spectrométrie de masse MALDI. Le terme de désorption est cependant mal choisi. En effet, l'exposition d'une surface à un laser implique une destruction de cette surface [35] au minimum sur quelques monocouches. Un terme plus adéquat serait ablation de la surface, c'est-à-dire le retrait d'une partie du solide, par le laser. Dans la suite, par souci de clarté avec les termes habituellement utilisés dans la littérature, nous continuerons de parler de désorption mais il est important de se souvenir que cette description peut être vue comme un abus de langage.

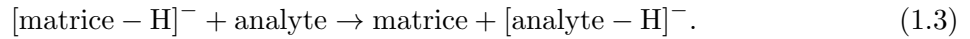
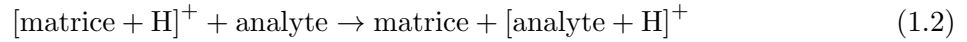
Comme mentionné dans la partie sur le laser, la quantité d'analyte et de matrice désorbée dépend de la fluence du laser : plus la fluence sera élevée, plus la quantité de matière désorbée sera importante. Il est très probable qu'une partie de la matrice s'ionise lors de ce processus de désorption également mais la majorité de ce qui est désorbé reste neutre. Habituellement, lors de mesures MALDI-MS avec un laser UV, les pulsations du laser sont de l'ordre de 3 ns. La conduction thermique est un phénomène minoritaire lors de la désorption car pour une pénétration de l'ordre de 100 nm, la constante de conduction est de 10 ns. On parle alors de régime avec confinement thermique. Le processus se déroule également dans un régime de confinement acoustique, c'est-à-dire que la durée des pulsations laser est grande devant le temps acoustique caractéristique qui est de l'ordre de 50 ps [35]. L'ablation n'est donc due ni à des contraintes thermiques, ni à des contraintes acoustiques dans le milieu mais uniquement à la fluence du laser.

D'après des études de dynamique moléculaire, il semblerait que lorsque la fluence du laser est faible, les molécules désorbées sont principalement des molécules seules sans liaison intermoléculaire (avec quelques dimères et trimères). En augmentant la fluence, on voit apparaître des clusters de molécules [36], ce qui est nécessaire dans le cas du MALDI comme nous le verrons dans la partie suivante sur l'ionisation.

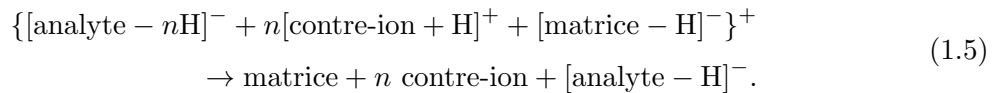
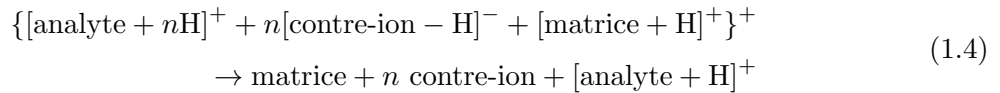
1.2.1.d L'ionisation

L'ionisation est un processus extrêmement complexe et très difficile à observer expérimentalement. Pour cela, à ce jour, aucun modèle général n'existe. Plusieurs hypothèses essaient d'expliquer ce phénomène pour le MALDI-MS. Premièrement, et comme nous l'avons évoqué dans la partie précédente, la première partie de l'ionisation se déroule en même temps que la désorption, lors de l'impulsion laser. À ce moment, seules les molécules de matrice, dont l'affinité protonique est élevée, sont ionisées sous la forme $[M+H]^+$ et $[M-H]^-$. Ces ions se trouvent dans de la matière condensée et non isolés dans le vide, ils interagissent donc encore avec les autres molécules de matrice et les analytes [33].

Il existe aujourd'hui deux principaux modèles pour l'ionisation des analytes en MALDI-MS. Le premier, appelé le modèle CPCD (pour *Coupled Physical Chemical Dynamics*), suppose que les analytes sont neutres dans le cristal ou qu'ils sont neutralisés par des contre-ions. Dans ce cas, l'ionisation secondaire des analytes se fait grâce à un transfert de protons, soit de la matrice vers l'analyte, soit l'inverse, en fonction de la charge de la matrice [37] :



Un autre modèle, qui ne fait pas l'hypothèse que l'analyte est neutre dans la matrice est le modèle du *lucky survivor* ou "survivant chanceux" [38]. Cette fois, le processus, qui se déroule au sein d'un cluster, est plus complexe et fait intervenir des contre-ions, généralement de la matrice ou un acide. L'hypothèse de ce modèle est que la pulsation laser crée des clusters de molécules. L'ionisation secondaire des analytes se fait alors à l'intérieur des clusters selon l'un des schémas suivants :



où $\{\}$ désigne des molécules d'un même cluster. Ce modèle, pour lequel les analytes seraient encore chargés dans les cristaux est issu d'une observation de Krüger *et al.* qui ont montré grâce à des indicateurs colorés que des molécules pouvaient garder leur charge même après la co-cristallisation avec la matrice [39].

Il a été montré que ces deux phénomènes, avec et sans contre-ions avaient lieu simultanément lors de l'ionisation en MALDI [38]. La part de chacun sur l'ionisation global des analytes dépend de la fluence du laser, de la différence d'affinité protonique entre la matrice et l'analyte, ou encore du pH de la solution. De plus, il n'est pas exclu que d'autres phénomènes comme l'ionisation multi-photons directe de la matrice [40] ou le modèle de fluide polaire [41] aient aussi une importance sur le processus d'ionisation. À ce jour, plusieurs modèles tentent d'expliquer l'ionisation en MALDI mais aucun modèle ne semble en mesure de pouvoir répondre à toutes les spécificités

du processus. L'ionisation en MALDI est donc un domaine de recherche en développement pour essayer de trouver un modèle permettant de regrouper l'ensemble des phénomènes qui ont lieu après la pulsation du laser.

1.2.1.e L'analyseur

La dernière étape est la détection des molécules ionisées. L'analyseur couramment utilisé en MALDI-MS est l'analyse en temps de vol, présenté en Figure 1.2. Les ions sont tout d'abord accélérés dans une chambre d'accélération traversée par un champ électrique constant. Le potentiel électrique peut être légèrement différé de la pulsation de quelques dizaines de nanosecondes pour que les ions se stabilisent avant d'être accélérés. Leur vitesse en sortant du tube d'accélération de potentiel électrique U est égale à

$$v = \frac{U}{\sqrt{2}} \sqrt{\frac{z}{m}} \quad (1.6)$$

où m est la masse de l'ion et z sa charge. La vitesse dépend donc uniquement du rapport m/z . Les ions finissent leur course dans une chambre de vol avec un champ nul qu'ils traversent à des vitesses différentes. Ils sont ainsi séparés selon leur rapport m/z et arrivent à des temps différents au détecteur. Avec cette technique, deux ions ayant le même rapport m/z auront le même temps de vol et arriveront au même moment au niveau du détecteur. Cependant, en pratique, on observe un étalement des vitesses en sortie du tube d'accélération. Pour remédier à ce problème, l'analyseur peut être équipé d'un réflectron, ou miroir électrostatique, permettant une meilleure précision dans la mesure (Figure 1.2). En effet, le réflectron est composé d'un champ électrique opposé à celui du tube d'accélération des ions. Il permet de compenser les légères différences d'énergie cinétique pour des ions de même rapport m/z qui aurait des trajectoires de longueur légèrement différentes pour qu'ils arrivent au même moment au détecteur. En modifiant le sens du champ d'accélération avant le tube de temps de vol, il est possible de détecter soit des ions positifs soit des ions négatifs selon l'objet de l'étude. Dans la suite, nous parlerons d'analyse en mode linéaire (positif ou négatif) dans le cas où le réflectron n'est pas utilisé et de réflectron positif (RP) et réflectron négatif (RN) lorsque le réflectron est utilisé pour l'analyse respectivement des ions positifs et négatifs.

Comme nous le verrons dans la suite, cette technique de spectrométrie de masse est adaptée pour la détection de biomolécules. En effet, grâce à la matrice, les molécules comme les peptides, protéines, ou autres macromolécules, sont protégées du faisceau laser direct, ce qui permet d'éviter leur décomposition et leur fragmentation, ce qui n'est pas le cas de la majorité des autres techniques de spectrométrie de masse. Aujourd'hui la gamme de masse pour la spectrométrie MALDI commence à quelques Da pour les molécules les plus petites à plus de 300 kDa pour les plus grosses protéines.

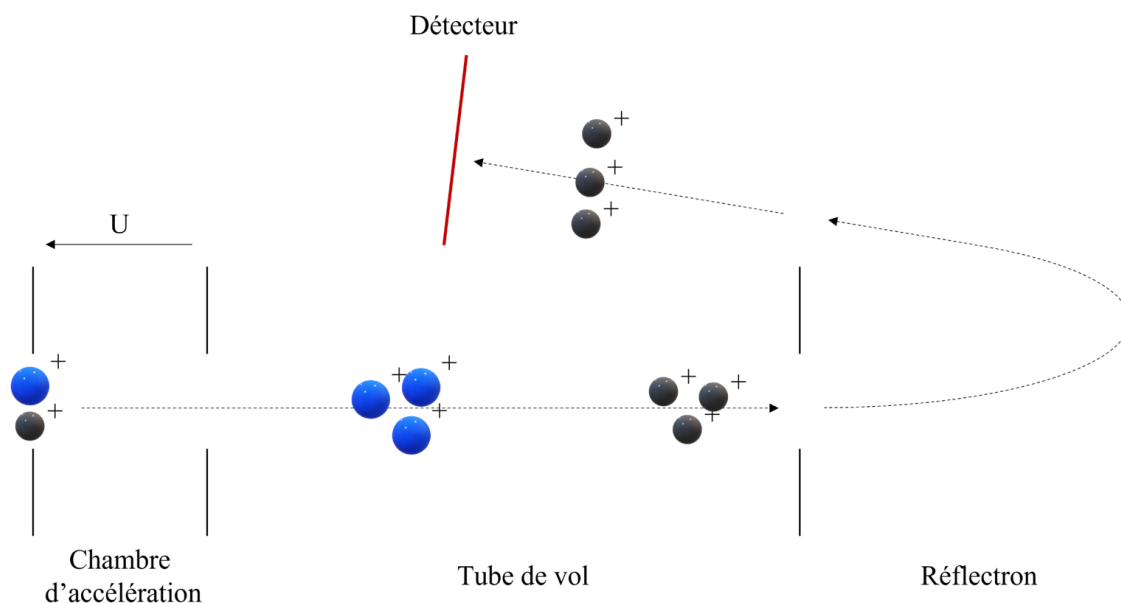


Figure 1.2 – Trajectoire d'un ion dans un analyseur en temps de vol équipé d'un réflectron dans le cas d'une analyse des ions positifs.

1.2.2 Le choix de la matrice

Comme il en a été discuté dans la section précédente, le choix de la matrice est primordial pour l'étude MALDI [42]. En fonction des propriétés physico-chimiques des analytes, la meilleure matrice peut être différente, même au sein d'un même échantillon. Une matrice couramment utilisée est la matrice **HCCA** car elle offre de bons résultats pour un grand nombre de molécules différentes. Krause *et al.* l'utilisent par exemple pour étudier les peptides extraits de la purification d'une culture de bactéries *Mycobacterium tuberculosis* [43]. Ils montrent que l'utilisation de la matrice HCCA permet de détecter préférentiellement les peptides contenant de l'arginine par rapport aux autres peptides dans le milieu mais aussi des métabolites. La comparaison à deux autres matrices, l'acide sinapique et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque montre que le signal de détection des peptides contenant de l'arginine est multiplié par un coefficient entre 4 et 18 avec la matrice HCCA par rapport aux peptides contenant de la lysine à la place de l'arginine alors que ce coefficient est compris entre 2 et 3,2 pour les deux autres matrices. La matrice HCCA est donc la meilleure pour la détection de ces peptides dans ces conditions.

D'autres matrices organiques peuvent être utilisées pour d'autres molécules ou d'autres types de molécules. C'est le cas par exemple pour Chen *et al.* qui utilisent la matrice **NEDC** pour la détection du glucose [44]. Grâce à cette matrice, ils détectent le glucose jusqu'à une concentration inférieure à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. À la différence de l'étude précédente dans laquelle les ions des peptides sont créés à partir de l'ajout d'un proton, dans l'étude de Chen *et al.*, l'ion qui est détecté est un adduit du glucose avec un ion Cl^- , présent dans le milieu.

Kinumi *et al.* étudient aussi la meilleure matrice pour détecter des peptides en MALDI-MS [25]. Pour cela, ils utilisent plusieurs matrices différentes : **HCCA**, **THAP** 2,5-dihydroxyacétophénone (**DHAP**), et du di-ammonium hydrogénéocitrate (**DAHC**). Ils montrent

que la meilleure matrice pour détecter des peptides contenant un acide cystéine-sulfonique est un mélange entre THAP et DAHC. C'est la solution qui forme les cristaux les plus stables dans le temps et le meilleur signal.

Pour chaque étude, il est donc nécessaire de faire un travail préalable sur le choix de la matrice pour optimiser les intensités des analytes. Toutefois, la molécule de matrice n'est pas le seul paramètre que l'on peut modifier. Le solvant de la matrice est aussi important pour les analyses. En effet, en fonction de l'affinité du solvant avec l'analyte et sa mouillabilité de la surface, les résultats peuvent être très différents. C'est le cas par exemple de Cerruti *et al.* qui, en plus de tester différentes matrices pour la détection de lipides, testent aussi deux solvants différents avec la matrice **9AA** : un mélange éthanol/eau (70/30 v:v) ou du méthanol pur [29]. L'utilisation du mélange éthanol/eau permet la formation de petits cristaux comparés à ceux obtenus avec le méthanol pur. De plus, un plus grand nombre de lipides sont détectés avec le premier solvant. Le mélange est donc plus approprié que le méthanol pur pour l'étude des lipides dans ces conditions.

Enfin, les matrices peuvent également être utilisées pour dériver des analytes difficilement ionisables. En couplant la cible à une molécule chargée ou facilement ionisable, il est ainsi possible de détecter des molécules qui ne le serait pas avec une matrice classique [45]. Cela provoque également un décalage en masse de l'analyte permettant éventuellement de séparer deux analytes de masses proches.

1.2.3 Le substrat de silicium

Un autre paramètre intéressant est le substrat sur lequel l'analyte est déposé et la matrice cristallise [46]. Le substrat habituellement utilisé sur les plaques MALDI est l'acier mais il est également possible de prendre un autre matériau avec des propriétés d'absorption de l'énergie du laser ou de transfert de protons différentes et qui peuvent influencer le signal de détection des molécules. De plus, la mouillabilité du substrat par le solvant des molécules à analyser et par celui de la matrice peut influencer la cristallisation de la matrice, la répartition des analytes, et le signal final. Le silicium est un matériau qui est utilisé régulièrement pour remplacer les plaques d'acier.

Parmi les substrats de silicium, le silicium poreux améliore le signal. En plus de diminuer la mouillabilité de la surface, le poreux permet d'augmenter la surface spécifique et donc la quantité d'analytes adsorbés. Mengistu *et al.* étudient l'amélioration du signal en utilisant du silicium poreux par rapport à du silicium plan [47]. Ils montrent que l'utilisation du silicium poreux obtenu par électrogravure chimique permet d'obtenir un signal de détection pour des protéines comprises entre 6 et 66 kDa (l'insuline, l'albumine de sérum bovin, l' α -caséine...) multiplié par 6 par rapport au silicium plan. Les mesures sont faites avec des protéines à une concentration de 1 mg/mL en solution.

1.2.4 Amélioration de la sensibilité et de la sélectivité par la modification chimique de surface

L'utilisation d'un substrat peut être complétée par une fonctionnalisation de la surface. Cette fonctionnalisation permet de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface et ainsi changer les propriétés d'adsorption, de désorption et d'ionisation des analytes [48, 49]. Dans cette partie, nous présentons plusieurs pistes de modification d'une surface de silicium pour améliorer la sensibilité de la mesure MALDI.

1.2.4.a Les polymères

Un premier type de fonctionnalisation de la surface pour modifier ses propriétés chimiques et favoriser l'adsorption de certaines molécules est l'utilisation de polymères. Ma *et al.* [50] ont montré que l'utilisation de polymère époxy pour fonctionnaliser du silicium nanostructuré (*hierarchically porous hybrid monoliths* ou HPHC) permet de détecter plusieurs N-glycopeptides dans différents fluides biologiques.

Récemment, des chercheurs ont montré que l'utilisation de poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA), un polymère hydrophobe, permet une distribution plus uniforme des analytes (peptides et protéines) sur la surface [51, 52]. Cette distribution donne une mesure inter- et intra-échantillon plus reproductible (environ 10 % d'écart type relatif). Ce phénomène est très recherché pour une analyse quantitative d'un échantillon car l'une des difficultés de l'analyse MALDI est la non uniformité de la co-cristallisation entre la matrice et les analytes. Cette non-uniformité implique l'apparition de "sweet spots", des zones où l'analyte s'agrège au sein d'un cristal, ce qui donne un fort signal localisé et des variations de plus de 50 %. En utilisant ce polymère en nanopoint sur une surface de silicium plane ou avec des nanopiliers, il est possible d'améliorer la reproductibilité mais aussi d'améliorer la limite de détection (LoD) de trois ordres de grandeur par rapport à la plaque de MALDI classique en acier pour la détection de peptides et de protéines.

1.2.4.b Le procédé sol-gel

Pour essayer d'augmenter la sensibilité de la mesure, il est aussi possible d'utiliser le procédé sol-gel pour encapsuler les analytes et ainsi enrichir la surface pour la détection. Lee *et al.* [53] ont utilisé ce procédé, combiné à du silicium poreux pour détecter l'antigène prostatique spécifique (PSA). Pour cela, ils mélangent un anticorps anti-PSA dans le sol-gel, qu'ils déposent ensuite sur du silicium poreux. Le PSA est ensuite déposé sur le système macroporeux et capturé par les anticorps. Cette technique permet de détecter l'antigène à une concentration de 48 µg/mL sans que le signal de l'anticorps ne vienne perturber le spectre de masse. Ce résultat obtenu en solution modèle est une première étape avant de travailler avec des échantillons plus complexes comme nous le verrons ensuite.

1.2.4.c Les silanes

Les silanes sont très largement utilisés pour la fonctionnalisation de surface de silicium parce qu'ils forment des monocouches auto-assemblées (SAM) et ils existent sous différentes formes avec différentes longueurs de chaîne alkyle et différents groupements terminaux, ce qui permet de modifier facilement les propriétés chimiques de la surface [54,55]. Ce n'est pas étonnant que ces molécules soient aussi utilisées en MALDI-MS pour améliorer la sélectivité de la détection en modifiant les propriétés de la surface. Nous présentons ici quelques exemples significatifs de l'utilisation des silanes pour la détection de biomolécules.

Hsieh *et al.* ont montré que la présence d'une monocouche de 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) permettait d'améliorer la limite de détection de la bradykinine (900 g/mol) et de la gramicidine D (1882 g/mol) par rapport à une surface non fonctionnalisée respectivement de 11 nM à 0,93 nM et de 110 μ M à 0,33 μ M dans une solution modèle [26].

Parfois, les silanes ne sont qu'une étape intermédiaire dans la fonctionnalisation de la surface. Zhou *et al.* ont utilisé une surface de silicium poreux fonctionnalisée par des silanes APTES qu'ils ont modifiée pour arriver à une surface de phosphate de zirconium [56]. Celle-ci permet de détecter de manière sélective les phosphopeptides par rapport aux autres peptides. L'étude de la caséine β , qui contient également du phosphore, montre que celle-ci peut être détectée dans une solution tampon contenant un rapport caséine/albumine de sérum bovin (ASB ou BSA en anglais pour *Bovine Serum Albumine*) allant jusqu'à 1:100.

1.2.5 Détection d'analytes en milieu complexe

Lors de l'étude d'échantillons complexes comme des milieux biologiques, il est souvent nécessaire de commencer par des étapes de pré-traitement de l'échantillon pour en retirer les espèces qui pourraient empêcher la bonne détection des molécules d'intérêt. C'est le cas en MALDI-MS où le simple dépôt d'un échantillon de plasma sur une plaque et une cristallisation n'est pas suffisant pour étudier certaines espèces, en particulier celles présentes en faible quantité dans le milieu [57]. Plusieurs techniques existent pour purifier le milieu, la centrifugation étant la plus commune. On retrouve également la chromatographie en phase liquide [58,59] ou l'usage de nanoparticules (NPs) [60] pour séparer l'analyte du milieu dans lequel il se trouve. Il est aussi possible de combiner plusieurs méthodes, la centrifugation est par exemple régulièrement utilisée comme première étape avant une séparation plus précise par une autre technique. Dans la suite, nous présentons différentes techniques basées sur l'interaction analyte-surface pour la séparation dans l'optique d'une analyse en MALDI-MS.

1.2.5.a Séparation par des nanoparticules

Ces surfaces modifiées (pores, polymères, silanes...) ont permis une étude d'échantillons plus complexes allant jusqu'aux échantillons biologiques comme le plasma. Une technique commune pour la séparation des analytes d'un milieu est la séparation avec des nanoparticules. Ces nanoparticules permettent d'adsorber les analytes d'intérêt. Puis, grâce à un aimant, il est possible de séparer ces NPs du milieu complexe. Enfin, une étape d'élution grâce à un solvant organique

permet de récupérer les analytes et d'en analyser la composition en spectrométrie de masse [61]. En effet, l'un des principaux problèmes lors de l'analyse MALDI d'échantillons sanguins est l'albumine qui est présente en grande quantité dans le sang et qui est très bien détectée en MALDI-MS. L'objectif de Terraciano *et al.* est donc de trouver une méthode permettant de supprimer l'albumine du signal [62]. Pour cela, ils utilisent des nanoparticules de silice poreuse qu'ils mélangent à un échantillon de sérum. Après un temps de réaction, les NPs sont séparées du milieu par centrifugation puis les protéines adsorbées à la surface des NPs sont extraites dans un mélange eau/méthanol et analysées en MALDI-MS. Cette technique permet de diminuer sensiblement le signal de l'albumine par rapport à un échantillon de plasma directement déposé sur une plaque. Une augmentation du signal pour les masses comprises entre 800 et 10 000 Da est visible grâce aux NPs de silice.

Xu *et al.* [63] ont aussi utilisé des particules de silice pour détecter spécifiquement des glycopeptides. Cette silice est fonctionnalisée par un acide di-boronique pour capturer spécifiquement ces glycopeptides dans un milieu complexe de digestion tryptique. Les NPs sont ensuite séparées du milieu par centrifugation et une élution permet de récupérer ce qui est resté adsorbé à la silice, qui est ensuite analysé en MALDI-MS. Ce pré-traitement de la solution permet de diminuer le signal de la BSA et de s'intéresser spécifiquement aux glycopeptides. Ils sont ainsi détectés jusqu'à une concentration inférieure au pmol/mL, soit environ deux ordres de grandeur meilleurs que sans l'étape d'enrichissement avec la silice fonctionnalisée.

Dans le cas d'une séparation avec un aimant, il peut être intéressant d'utiliser un cœur pour la nanoparticule différent de la surface. Chen *et al.* [64] utilisent un cœur d'oxyde de fer recouvert de silice mésoporeuse. La silice permet d'adsorber des peptides d'un extrait de cerveau de rat et le cœur de fer permet grâce à un aimant de séparer les peptides adsorbés sur les NPs du reste du milieu. Cette configuration permet de détecter de l'angiotensine II (1046 Da) à une concentration de 5 ng/mL dans une solution de cerveau de rat ce qui n'est pas possible sans les NPs.

Il est aussi possible d'utiliser directement des nanoparticules sur une plaque MALDI, sans passer par l'étape d'élution lors de la préparation des échantillons. Wang *et al.* [65] utilisent des nanoparticules fonctionnalisées par des anticorps pour la détection de l'insuline. Grâce à la fonctionnalisation par des anticorps anti-insuline, ils arrivent à détecter l'insuline dans un échantillon de plasma préalablement centrifugé. Les NPs sont ensuite rincées pour ne garder que ce qui est capturé par la surface puis déposées sur une plaque MALDI avec la matrice HCCA et analysées. Grâce à cette méthode il est possible de détecter l'insuline naturellement présente dans le plasma et le sérum.

1.2.5.b Séparation par des substrats de silice

Dans un autre contexte, certains chercheurs se sont intéressés à un peptide ou une protéine d'intérêt. L'hepcidine par exemple est un peptide connu pour être un biomarqueur de la quantité de fer dans le sang et qui peut donc être utilisé pour surveiller une anémie [66]. Le groupe de Fan *et al.* [67] s'est donc intéressé à ce peptide : grâce à une surface de silicium mésoporeux, ils ont pu extraire l'hepcidine d'échantillons de sérum et d'urine préalablement centrifugés. L'hepcidine

est ensuite éluée de la surface poreuse grâce à un solvant à base d'acétonitrile (ACN) et déposée sur une plaque de MALDI classique avec de la matrice HCCA. Dans ce cas, la mesure n'est pas directement faite sur la surface de silicium mais les propriétés physico-chimiques de la surface sont tout de même utilisées pour extraire l'hepcidine du milieu. Cette technique a ensuite été utilisée pour étudier des échantillons de patients infectés par le virus de l'hépatite B (VHB). Certains de ces patients avaient aussi contracté une cirrhose ou un carcinome hépatocellulaire, deux conséquences possibles de l'infection au VHB. Les chercheurs montrent que le suivi de ce peptide dans du sérum est possible et permet de différencier les groupes de patients infectés par le VHB et ayant contracté un carcinome hépatocellulaire des patients sains. En revanche, les patients atteints de cirrhose ne sont pas différenciables des patients sains avec cette méthode [7].

Liang *et al.* [68] étudient la détection d'un peptide synthétique standard ajouté dans du sérum de rat grâce à une surface de silicium poreux avec des pores de diamètre 5,2 nm. De même que précédemment, l'échantillon de sérum pré-traité est déposé sur la surface de silice puis retiré et les analytes, présents à la surface après rinçage, sont élués pour être analysés sur une plaque de MALDI classique. Cette méthode montre qu'il est possible de détecter un peptide standard (1338 Da) artificiellement ajouté dans du sérum de rat jusqu'à une concentration de 10 ng/mL.

Notons que ces deux techniques de séparation présentent un pré-traitement complexe de l'échantillon (séparation par des solvants, élution...), ce qui peut engendrer des artefacts expérimentaux et allonger le temps d'analyse. Par ailleurs, à notre connaissance, aucune étude MALDI-MS sans pré-traitement pour la détection d'un métabolite spécifique en milieu physiologique n'a été menée.

1.2.6 Limitations du MALDI

Malgré sa grande sensibilité, le MALDI-MS peut être limitant dans certains cas en milieu complexe, en particulier pour la reproductibilité et l'étude de petites molécules comme des acides aminés.

1.2.6.a Problème de reproductibilité

L'ionisation en MALDI se fait grâce à un transfert de proton entre la matrice et l'analyte et dépend donc fortement de la co-cristallisation entre les deux molécules. Cette co-cristallisation n'est cependant pas tout le temps uniforme sur la surface, avec par exemple une cristallisation en anneau et une concentration plus importante de la matrice sur les bords de la goutte par rapport au centre. Ce phénomène diminue la reproductibilité de la mesure. Pour résoudre ce problème, plusieurs méthodes plus ou moins complexes ont été développées ces dernières années pour rendre le dépôt plus uniforme et ainsi augmenter la reproductibilité point à point [69]. Kudina *et al.* ont mis au point un procédé de dépôt de la goutte contenant la matrice par électromouillage [70]. L'électromouillage est une technique permettant de diminuer l'angle de contact d'une goutte de liquide sur une surface sur laquelle le mouillage est normalement faible en imposant une tension électrique. Ici, les auteurs ont utilisé une plaque de verre sur laquelle ils ont déposé un réseau

d'électrodes planes. Ensuite, les électrodes ont été recouvertes par une couche de parylène C puis une couche mince de Teflon™ pour rendre la surface hydrophobe. Après le dépôt de la goutte, une tension est appliquée sur le substrat, ce qui fait circuler l'analyte et la matrice dans la goutte et évite leur précipitation. En séchant, la goutte diminue sa surface de contact avec la surface et la cristallisation n'a lieu qu'en fin de séchage, à la différence du MALDI classique pour lequel la surface de la goutte séchée est la surface lors du dépôt initial et un anneau de cristaux apparaît autour de la goutte. Une comparaison en MEB (Microscopie Électronique à Balayage) des gouttes séchées est présentée en Figure 1.3. La surface occupée par les cristaux est plus petite avec cette technique, appelée e-MALDI, avec l'électromouillage qu'avec la technique de MALDI classique.

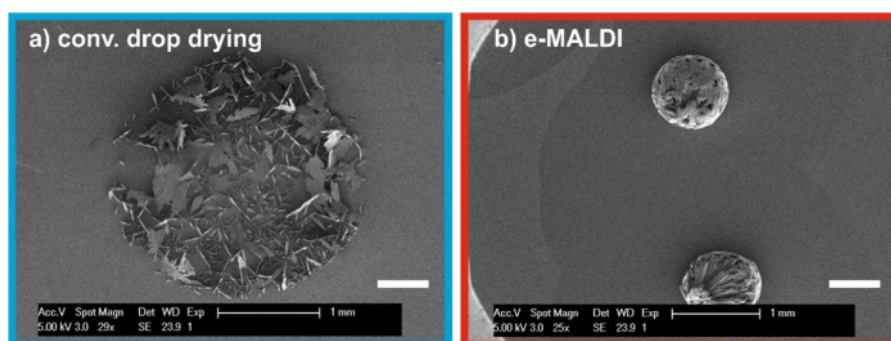


Figure 1.3 – Images MEB d'une goutte séchée de matrice DHB avec du paracétamol (ratio molaire de 10:1) avec (a) une plaque de MALDI classique et (b) une plaque de e-MALDI. La bande blanche sur fond noir mesure 1 mm. Image issue de [70].

La réduction de la taille de la goutte et la plus grande uniformité de la cristallisation leur a permis de détecter des petits molécules avec un signal pouvant aller jusqu'à 30 fois le signal de MALDI classique et avec des variations relatives de l'ordre de 10 % alors qu'elles peuvent atteindre plus de 50 % dans le cas du MALDI classique.

1.2.6.b Problèmes de détection aux faibles masses

Le MALDI-MS est couramment utilisé pour des molécules de masse supérieure à 1000 Da. En dessous de cette masse, la matrice peut gêner la bonne détection des molécules. En effet, les matrices sont des molécules qui s'ionisent facilement et le transfert de charge vers les analytes n'est pas complet dans la majorité des cas. Les matrices passent donc dans le tube ToF et arrivent jusqu'au détecteur. Leur masse étant de quelques centaines de Da, leur spectre se concentre sur les faibles masses. À cause de cela, certains pics peuvent concomiter avec des pics des analytes. Par exemple, la matrice HCCA a un pic à 190,2 m/z correspondant à la molécule avec un proton supplémentaire ($[HCCA+H]^+$). Toute molécule ayant la même masse que la matrice et étant détectée avec le pic $[M+H]^+$ ne pourra pas être détectée avec cette matrice. Dans le cas d'une étude de plusieurs molécules, le choix d'une matrice convenant à toutes les molécules peut s'avérer compliqué car le spectre d'une matrice comporte souvent une grande quantité de pics issus d'adduits et de groupements de molécules, comme pour la matrice HCCA en Figure 1.4.

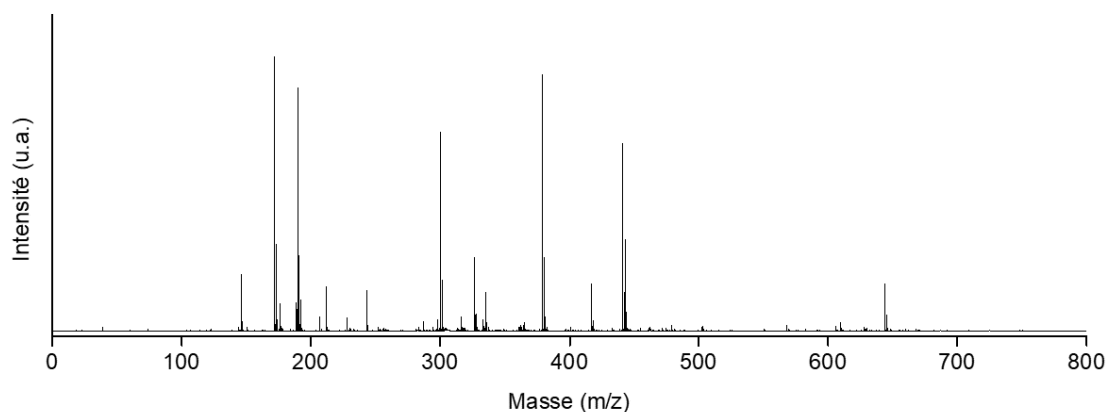


Figure 1.4 – Spectre de masse MALDI de la matrice HCCA sur la gamme de masse 0-800 m/z.

À ce jour, les quelques études en MALDI-MS menées sur les métabolites en milieu complexe sont des études statistiques pour évaluer un profil métabolique général d'un échantillon [71]. Il est par exemple possible, grâce à du silicium poreux sur lequel est déposé une goutte de périlymphe (liquide présent dans l'oreille interne), d'étudier la surdité de perception [72]. L'analyse en spectrométrie de masse MALDI permet de séparer les patients en trois groupes en fonction de leur profil métabolique, les groupes pouvant être différenciés par d'autres caractéristiques cliniques comme la concentration des protéines. Cependant, le périlymphe ne peut être obtenu que pour des patients atteints de surdité car l'opération présente un risque de perte auditive dans le cas d'un patient sain. Il n'a donc pas été possible de réaliser un contrôle avec un patient sain dans cette étude.

1.2.6.c Des solutions pour améliorer la reproductibilité et la détection aux faibles masses

Plusieurs pistes ont été examinées pour résoudre le problème de reproductibilité. Une récente étude concerne le remplacement des matrices organiques par des nanoparticules [73]. L'avantage de ces nanoparticules est qu'elles ne sont pas détectées sur le spectre comme cela peut être le cas avec les matrices organiques. Elle sont donc plus adaptées pour la détection de petites molécules de masse semblable à la masse des matrices. Sakurai *et al.* ont testé deux types de nanoparticules : en tellure de cadmium (CdTe) ou en oxyde de cuivre (CuO) [74]. Ces deux nanoparticules sont utilisées pour détecter des molécules contenant un groupement carboxyle : la tyrosine (181 Da), l'acide salicylique (138 Da), l'acide glucuronique (194 Da) et l'ibuprofène (206 Da). Les deux NPs permettent de détecter ces quatre molécules à une concentration de 1 mg/mL. L'étude sur la tyrosine montre que la détection de cet acide aminé avec les NPs de CuO donne une intensité de signal 6,3 fois plus importante qu'avec les NPs de CdTe en réflectron négatif. Cette différence est expliquée par le potentiel zêta des NPs. En effet, le CuO est plus apte à capter des électrons seuls car son potentiel zêta est de l'ordre de 25 mV alors que celui du CdTe est proche de 0.

Une autre idée pour une meilleure analyse en MALDI-MS de petites molécules est de limiter la détection des pics de matrice. Park *et al.* [11] proposent d'utiliser un polymère de parylène pour empêcher la détection des pics de matrice. Pour cela, ils déposent une goutte de matrice DHB sur une plaque MALDI. Après séchage de la goutte, ils déposent une couche mince de 50 nm de parylène sur la surface par dessus la goutte séchée de matrice. Ils étudient ensuite les analytes en déposant une goutte sur le parylène au dessus de l'emplacement de la goutte. Le parylène ayant une structure poreuse, il permet à l'analyte de pénétrer à l'intérieur et de se trouver en contact avec la matrice DHB tout en évitant que le laser irradie directement la matrice, ce qui diminue considérablement la quantité de matrice détectée sur le spectre de masse.

Enfin, la principale méthode pour résoudre ces deux problèmes est l'utilisation d'un autre groupe de techniques : le SALDI-MS. Dans ce cas, la matrice est supprimée complètement et l'ionisation se fait grâce à la surface, souvent nanostructurée, dont les propriétés optiques sont favorables au transfert d'énergie et de protons vers les analytes. Ce groupe de techniques est présenté dans la section suivante.

1.3 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser assistée par la surface

La technique de spectrométrie de masse MALDI offrant des limites pour la détection de petites molécules, de nouvelles méthodes de détection, issues du même phénomène d'ionisation par laser, mais sans matrice organique, ont émergé [75]. Les premières mesures de spectrométrie de masse avec ionisation par laser ont été publiées pour la première fois par Tanaka *et al.* en 1988 [76] pour la détection de peptides grâce à un mélange de poudre de cobalt et de glycérol à la place de la matrice organique. Quelques années plus tard, en 1995, le groupe de Sunner *et al.* est le premier à employer le terme de SALDI pour *Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization* (Désorption-ionisation laser assistée par la surface) dans son étude pour la détection de petits peptides, de l'ordre de 1000 Da, grâce à des flocons de graphites [77].

1.3.1 Fonctionnement du SALDI

Aujourd'hui, le SALDI englobe un grand nombre de techniques basées sur une nanostructuration de la surface. En 2013, l'IUPAC (Union internationale de chimie pure et appliquée) donne comme définition pour le SALDI : "Classe de techniques de désorption-ionisation laser sans matrice pour des macromolécules biologiques". Cette définition, qui ne donne pas d'information sur le substrat à utiliser, est donc très large et englobe un vaste ensemble de techniques. Sa définition étant liée à la non-utilisation d'une matrice organique, elle se situe principalement en opposition à la technique plus couramment utilisée de MALDI-MS, dont la présence de cette matrice est nécessaire pour le processus.

Alors que les phénomènes présents dans la désorption et l'ionisation commencent à être appréhendés pour la technique de MALDI-MS, ce n'est pas encore le cas pour le SALDI. À ce jour, il n'existe pas de consensus scientifique permettant d'expliquer au moins partiellement la

désorption et l'ionisation. Ces deux processus dépendent du laser, des analytes et de la surface et de sa géométrie, ce dernier point étant problématique pour une analyse poussée car il existe autant de surfaces différentes que de groupes travaillant sur cette technique, les surfaces étant souvent fabriquées par le groupe de recherche en amont des analyses. Le point sur lequel s'accorde la communauté scientifique est que le substrat a un rôle majeur en absorbant l'énergie du laser, ce qui augmente rapidement la température de surface et qu'il existe des processus thermiques et non-thermiques pour la désorption et l'ionisation en SALDI-MS [78, 79].

De bonnes propriétés thermiques de la surface, permettent une bonne désorption des molécules à la surface : la technique de SALDI est basée sur la capacité d'un substrat à augmenter rapidement en température et à garder cette chaleur après la pulsation laser. Cette chaleur, localisée à l'endroit de l'impact du laser, permet de désorber les analytes présents à la surface. Pour cela, la surface doit avoir une forte absorbance dans la région UV-visible, autour de la longueur d'onde du laser (337 nm pour un laser azote), une faible capacité thermique et une faible conductivité thermique [80]. Ces paramètres sont directement reliés à la nature du substrat, à sa nanostructuration et à sa fonctionnalisation chimique. Ils seront détaillés dans le cas des substrats de silicium dans la section 1.4.

Les propriétés non-thermiques permettent également la désorption des analytes mais aussi leur ionisation pour leur détection. Pour la désorption, il y a aussi la possibilité que le laser détruise légèrement la surface, ce qui permettrait aux analytes de se "désorber" de la surface, comme c'était le cas en MALDI-MS où nous avons une ablation de la surface et de la matrice par le laser. Pour ce qui est de l'ionisation, nous pouvons penser, en faisant une autre analogie avec le MALDI, qu'il existe des ions déjà présents dans le milieu qui permettent d'ioniser les analytes ou qu'il y ait un transfert de protons ou d'électrons entre la surface et l'analyte [79, 81]. Il est possible que l'ablation de la surface puisse avoir un rôle dans l'ionisation, des ions provenant de la surface étant parfois détectés en SALDI-MS.

Un point qui a permis de développer rapidement les techniques de SALDI-MS est qu'un appareil de MALDI-MS est suffisant pour faire des mesures de ce type. Il suffit en général d'attacher le substrat nanostructuré de SALDI sur une plaque MALDI grâce à une bande adhésive conductrice. L'analyse des ions se fait donc également en temps de vol avec éventuellement un réflectron pour une meilleure précision des mesures.

1.3.2 Les matériaux des substrats

Les substrats pour le SALDI-MS sont nombreux et plusieurs types de matériaux sont possibles : les métaux, le carbone, le silicium... [82–86] Dans cette partie, nous présentons les principaux substrats utilisés pour les mesures en SALDI-MS.

1.3.2.a Les métaux

L'aluminium poreux Les propriétés de l'aluminium lui permettent d'être utilisé comme un substrat de SALDI. Il est en particulier utilisé pour une technique appelée DIUTHAME (*Desorption/Ionization Using Through-Hole Alumina Membrane*). La membrane est constituée

d'aluminium poreux d'une profondeur d'environ 5 μm et de diamètre de pores de 200 nm [87,88]. Il n'existe pas de caractérisation de la conductivité thermique de ce type d'aluminium mais d'autres études montrent que l'aluminium poreux a une conductivité thermique de l'ordre de 15 $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ (porosité de 40 % et profondeur de 5 μm) et que cette valeur diminue avec la porosité du substrat [89]. L'absorbance dans l'UV est de l'ordre de 1 % à 350 nm [90]. Les pores du DIUTHAME permettent de détecter les peptides d'une solution de calibration standard (Bruker Peptide Calibration Standard II). Cette surface est aussi efficace pour des molécules plus petites comme les phospholipides [91]. Le DIUTHAME donne des intensités 10 fois plus faibles que la matrice DHB pour la phosphatidylcholine (18:2) en solution. En revanche, lorsque l'on regarde une extraction de cerveau de souris et les principaux lipides présents, l'intensité avec le DIUTHAME est multipliée par six par rapport au MALDI-MS, avec également des variations d'intensité au sein d'un même échantillon environ deux fois plus petites, un paramètre important dans l'objectif d'une étude systématique et une comparaison d'échantillons.

Les couches minces métalliques Dans le cas de l'étude de tissus biologiques, il est possible d'imiter la méthode de MALDI-MS qui consiste à pulvériser une couche de matrice sur le tissu [92–94] en pulvérisant une couche mince (de quelques nm) de métal avant d'analyser le tissu en spectrométrie de masse. Ce dépôt à la surface du tissu permet un meilleur transfert de charge, tout en protégeant la surface des impacts du laser. C'est le cas par exemple de Ràfols *et al.* [95] qui pulvérisent une couche d'or sur une coupe de cerveau de souris pour étudier les métabolites présents. Cette méthode leur permet d'étudier la localisation de ces métabolites dans le cerveau grâce à une imagerie de la coupe.

Lauzon *et al.* [96] utilisent l'argent pour détecter des biomolécules sur des empreintes digitales. Pour cela, ils pulvérisent une couche mince d'argent de 14 nm sur les empreintes qu'ils analysent ensuite en spectrométrie de masse [97]. Cette méthode sans matrice permet de détecter différents acides gras, comme l'acide oléique directement sur les empreintes digitales et ainsi détecter des petites molécules de quelques centaines de Da parce que la couche mince de d'argent est peu détectée en spectrométrie de masse.

Il est aussi possible de pulvériser du platine pour la détection en SALDI [98,99]. Ce métal permet la détection de molécules comme l'acéphate (184 Da) et l'acétamipride (223 Da) qui ne sont pas visibles en MALDI-MS. Comme pour la plupart des métaux, la pulvérisation du platine permet une meilleure évacuation des charges, ce qui permet une meilleure résolution lors de la mesure.

Les nanoparticules métalliques Enfin, comme nous l'avons vu précédemment, il est possible d'utiliser ces nanoparticules comme matrices pour la détection en spectrométrie de masse [74, 100–103]. Dans ce cas, les NPs sont mélangées aux analytes sur une plaque MALDI avant d'être analysées. Elles ont donc le même rôle que la matrice organique en MALDI-MS. Dans la suite, nous nous concentrerons sur les substrats solides sur lesquels les échantillons sont déposés et analysés. Dans le cas où des nanoparticules sont utilisées, elle le seront pour fonctionnaliser la surface pour changer ses propriétés et ne seront pas directement mélangées aux analytes.

1.3.2.b Le carbone

Les propriétés du carbone sont aussi utilisées pour le SALDI-MS. Sa conductivité thermique est plus élevée que pour l'aluminium. Le graphite a une conductivité thermique entre 100 et 400 $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ [104] et les nanotubes de carbone entre 2000 et 6000 $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ en fonction de leur longueur, de leur densité ou de leur structure (monocouches ou multicouches) [104,105]. L'absorbance dans l'UV autour de 350 nm est de l'ordre de 0,5 % et a tendance à diminuer avec la concentration en nanotubes [106].

Kim *et al.* utilisent par exemple une surface d'oxyde de carbone sur laquelle sont déposés des nanotubes de carbone multicouches pour la détection de métabolites [107]. Cette surface nanostructurée permet de détecter le glucose (180 Da) jusqu'à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De plus, grâce à l'absence de matrice organique, le bruit de fond est plus faible et il n'y a pas l'apparition de "sweet spots", un problème récurrent du MALDI-MS.

Abdelhamid et Wu [108] utilisent des nanofeuilles de graphène pour la détection de drogues, en particulier l'acide flufénamique (281 Da). Alors que l'acide n'est pas détectable avec la méthode de MALDI-MS, ils arrivent à une limite de détection inférieure à 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sans matrice grâce aux nanofeuilles de graphène.

Lee *et al.* [109] ont utilisé le procédé sol-gel pour emprisonner de l'oxyde de graphène. Ce procédé permet d'améliorer la détection des métabolites naturellement présents dans une solution complexe (mélange d'algues) par rapport à une mesure sans le procédé sol-gel en diminuant la fluence du laser nécessaire pour une bonne détection et ainsi diminuer le risque de fragmentation des métabolites. En comparaison au MALDI-MS avec la matrice 9AA, le mélange sol-gel et l'oxyde de graphène permettent d'avoir un profil plus complet de la solution avec un bruit de fond moins important.

Les nanomurs de carbone peuvent aussi être utilisés en spectrométrie de masse SALDI. Pour une meilleure efficacité de ces nanomurs, il est préférable d'en avoir en densité importante à la surface. Sakai *et al.* [110] montrent une meilleure détection de l'arginine (174 Da) pour une distance entre les murs de 142 nm (plus grande densité testée), probablement grâce à une diminution de la fragmentation de l'analyte par rapport aux nanomurs plus espacés. En effet, le rapport signal sur bruit est multiplié par 12 par rapport à celui obtenu pour des nanomurs séparés de 467 nm.

1.3.2.c Le silicium

Les substrats de silicium sont largement utilisés en SALDI. Peu chers et facilement modifiables, et ayant de bonnes propriétés optiques, ils offrent une large variété de possibilités pour un substrat de spectrométrie de masse [111].

L'ensemble des substrats de silicium, en particulier ceux appartenant à la catégorie de DIOS-MS seront discutés dans la partie suivante. Aucune nomenclature précise n'existant à ce jour, le nom de la technique est laissé à l'appréciation des chercheurs, ce qui implique que certaines dénominations ne soient pas exclusives. Dans la suite, nous ne nous concentrerons donc pas uniquement sur le DIOS-MS mais sur les substrats de silicium nanostructuré (pores, nanopiliers,

nanofils...) dans leur ensemble. Nous verrons dans la section 1.4 les formes de silicium que nous pouvons utiliser, les fonctionnalisations de la surface possibles et les applications pour l'étude d'échantillons complexes biologiques.

1.3.2.d Les autres matériaux

D'autres substrats sont aussi possibles pour les mesures de SALDI-MS. On retrouve par exemple le semi-conducteur disulfure de molybdène (MoS_2), dont la conductivité thermique d'une monocouche est estimée à $35 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ [112]. Le MoS_2 peut être préparé sous forme de nanoflocons et utilisé de deux manières différentes : soit en le mélangeant directement à l'analyte, soit en déposant plusieurs couches de nanoflocons sur la surface puis en déposant une goutte d'analyte sur les couches de MoS_2 [113]. La première méthode ressemble à la méthode traditionnelle MALDI de mélanger une matrice (ici les nanoflocons de MoS_2) directement dans la solution et de laisser l'ensemble sécher sur une surface. Dans le deuxième, on modifie les propriétés de la surface en ajoutant un matériau avec des propriétés physico-chimiques différentes. Ces nanoflocons permettent d'étudier plusieurs métabolites de différentes familles : des acides aminés (comme l'histidine, 155 Da), des saccharides (comme le sorbitol, 182 Da) et des acides gras (comme l'acide stéarique, 284 Da). La meilleure configuration est avec 3 couches de MoS_2 déposées sur la surface, cela permet de détecter ces métabolites jusqu'à une concentration de 40 ng/mL pour l'histidine, 2 $\mu\text{g/mL}$ pour le sorbitol et 30 ng/mL pour l'acide stéarique.

Enfin, il est possible de mélanger différents types de substrats pour obtenir les propriétés désirées. C'est le cas par exemple de Bian et Olesik [114] qui utilisent des nanofibres de polymère de polyvinylpyrrolidone qu'ils fonctionnalisent ensuite par des NPs d'argent ou des nanotubes de carbone pour la détection de drogues. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la fonctionnalisation de nanotubes de carbone. Cela permet par exemple de détecter du vérapamil (455 Da) jusqu'à une concentration de 0,5 ng/mL donc du même ordre de grandeur que les autres surfaces avec des variations entre les gouttes d'environ 10 %, meilleur que pour le MALDI-MS avec des matrices organiques.

Cette possibilité de mélanger les types de matériaux pour créer des substrats pour le SALDI-MS rend cette technique très personnalisable en fonction des besoins de l'étude mais aussi des ressources des groupes de recherche. Ces plaques peuvent ensuite être directement accrochées à une plaque de MALDI classique et être utilisées avec un appareil MALDI-ToF-MS. Cependant, cette grande variabilité dans les substrats rend la compréhension des phénomènes de désorption et d'ionisation complexe, ce qui explique pourquoi, à ce jour, ces processus ne sont pas totalement compris. Dans la partie suivante, nous parlons plus en détail des substrats de silicium pour les mesures en SALDI-MS.

1.4 La spectrométrie de masse par désorption-ionisation sur silicium

Le substrat le plus largement utilisé en SALDI-MS reste le silicium. Ses propriétés optiques, sa possibilité de nanostructuration et de fonctionnalisation chimique à haut rendement avec des procédés industriels, et sa disponibilité commerciale dans le milieu de la microélectronique le rendent idéal pour la spectrométrie de masse. Dans cette partie, nous présentons les différentes formes utilisées pour la spectrométrie de masse.

Premièrement apparu en 1999 pour la détection de petites molécules comme la des-Arg-bradykinine [115], le DIOS-MS se réfère en général à un substrat de silicium nanoporeux obtenu à partir d'une gravure électrochimique de la surface. Ici, nous engloberons tous les substrats à base de silicium nanostructuré, pas uniquement par gravure électrochimique. On retrouve par exemple des échantillons avec des nanopiliers de silicium obtenus par dépôt à angle rasant (GLAD pour *Glancing Angle Deposition*) [116] ou les nanofils. Ces substrats, pour certains, sont fonctionnalisés par des silanes, des anticorps ou des nanoparticules pour une étude spécifique de certains métabolites ou autres molécules, en particulier dans des milieux complexes.

Le type de substrat utilisé a une influence sur la conductivité thermique du substrat et ses propriétés optiques. Le silicium plan a une conductivité thermique de $149 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ et la silice de $1 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ [117]. En porosifiant le substrat, cette conductivité peut être grandement modifiée et dépend des caractéristiques des pores. Elle est par exemple très liée à la largeur des pores : plus le pore est large, plus la conductivité thermique est grande. Alvarez *et al.* [118] montrent que la conductivité d'un substrat de silicium poreux passe de $1,2 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ lorsque les pores ont un diamètre inférieur à 5 nm à $31,2 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ lorsque les pores ont un diamètre de 100 nm. On observe l'effet inverse avec la porosité. À profondeur de pore égale, la conductivité thermique diminue lorsque la porosité augmente [119] : elle peut perdre quasiment un ordre de grandeur lorsque la porosité passe de 20 % à 60 % [120]. Enfin, l'absorbance dans l'UV du silicium est aussi dépendante de sa porosité. Behzad *et al.* [121] montrent que l'absorbance autour de 350 nm augmente avec la durée de la gravure électrochimique pour la préparation du silicium poreux : elle est multipliée par deux entre une gravure de 10 min et une gravure de 60 min. La gravure électrochimique permet d'augmenter la profondeur des pores et la porosité et il n'est pas possible de décorréler l'effet ces deux caractéristiques sur l'absorbance. Il semble tout de même que l'absorbance UV reste constante à partir d'une profondeur de 500 nm [122]. L'augmentation de l'absorbance serait donc principalement due à l'augmentation de la porosité à des profondeurs élevées. Les lasers les plus communs en DIOS-MS sont les mêmes que les lasers de MALDI-MS, soit avec une longueur d'onde de 337 nm ou de 355 nm. Dans ces deux cas, on voit que le choix des pores et de leur profondeur est primordial pour optimiser les mesures. En effet, l'idéal semblerait une porosité élevée, une profondeur faible (quelques nanomètres) et une profondeur de plus de 500 nm. Cependant il faut également un diamètre suffisant pour capturer les analytes à l'intérieur des pores. Comme nous le verrons dans la suite, notre choix de pores de 1 μm de profondeur et 10 nm de diamètre avec une porosité de 60 % remplit ces conditions et permet une bonne détection des analytes. Les grandeurs standards de la bibliographie sur la détection de métabolites en DIOS-MS seront rediscutés dans la section 1.4.2.

1.4.1 Avantage du DIOS-MS par rapport au MALDI-MS

Plusieurs études ont montré que le DIOS-MS permet la détection de métabolites non détectés en MALDI-MS, probablement grâce à la suppression des interférences entre les métabolites et la matrice et des pics de matrice aux mêmes masses que les métabolites. Le cas de Budimir *et al.* [123] sur l'analyse d'acides gras en solution est caractéristique. Alors qu'aucun signal n'est observable pour les lipides comme l'acide hénécicosylique (326 Da) avec la matrice de 5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole, la détection du lipide complet et de certains adduits métalliques est bonne en DIOS-MS. En testant plusieurs concentrations, ils arrivent à détecter l'acide hénécicosylique jusqu'à 200 µg/mL.

Korte *et al.* présentent une surface de silicium avec un réseau de nanopiliers appelés *nanopost* [124, 125]. Ils s'intéressent au nombre de métabolites qu'il est possible de détecter grâce à ces piliers dans deux milieux : une extraction de cellule et de l'urine, et ils comparent ces résultats au MALDI-MS. Ils montrent que cette surface de silicium permet de détecter environ la même quantité de métabolites dans l'extraction de cellule qu'en MALDI-MS mais des métabolites différents. En revanche, dans l'urine, 137 métabolites sont détectés avec les nanopiliers contre seulement 62 avec le MALDI. Cette surface offre donc un vrai avantage dans l'analyse de molécules à faible poids moléculaire dans certains milieux. Dans une analyse ciblée avec les nanopiliers, il est possible de détecter les 20 acides aminés à une concentration de l'ordre de 100 µg/mL en solution aqueuse [126].

Enfin, l'absence de matrice diminue considérablement le bruit du fond, ce qui permet une étude plus simple des spectres [127], en évitant par exemple le recours aux statistiques.

1.4.2 Influence des pores

Les paramètres essentiels pour un bon signal en DIOS-MS viennent des pores, en particulier leur profondeur et leur diamètre. Il est nécessaire d'utiliser des pores suffisamment profonds pour capturer les molécules à l'intérieur et avoir des propriétés optiques intéressantes mais le risque de pores trop profonds est qu'il peut être difficile pour les métabolites de sortir des pores après leur ionisation. Pour cela, Jemere *et al.* [122] ont regardé quelle profondeur de pore était optimale pour absorber le maximum de lumière d'un laser à 337 nm utilisé dans le cas du DIOS-MS. Ils montrent que l'intensité de signal pour la détection de la dopamine (153 Da) atteint un plateau à partir d'une profondeur de 500 nm (Figure 1.5). C'est aussi à cette profondeur que l'absorbance du substrat dans l'UV, à 337 nm, atteint un plateau, ce qui prouve que l'absorbance du substrat est essentielle pour un bon signal en DIOS-MS et plus généralement en SALDI-MS.

En ce qui concerne la largeur des pores, on retrouve dans la littérature des pores de quelques nanomètres jusqu'à des pores de plusieurs dizaines de nanomètres de diamètre, allant jusqu'à la centaine de nanomètres. Cette large gamme de taille de pores offre aussi une variété dans l'exclusion stérique possible des protéines par les pores. Bouamrani *et al.* [128] ont étudié l'influence de la taille des pores sur l'exclusion de protéines comme l'albumine, facilement détectable en spectrométrie de masse. Ils montrent que pour un diamètre de pores supérieur à 9 nm, l'albumine (65 kDa) est légèrement détectable malgré un lavage de la surface, ce qui n'est pas le cas pour

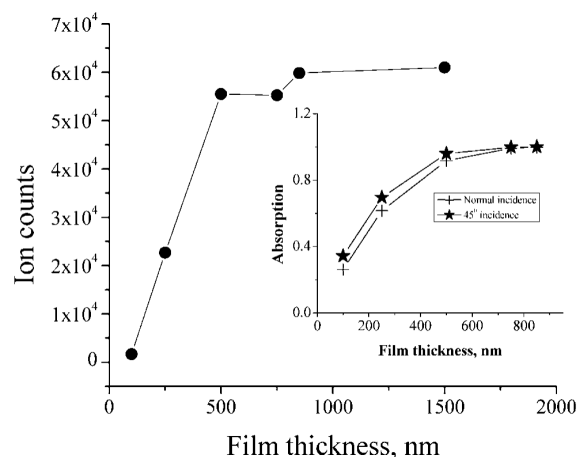


Figure 1.5 – Courant ionique total du vérapamil sur du silicium poreux avec plusieurs profondeurs. 10 pmol sont déposés sur tous les films et la même énergie de laser a été utilisée pour toutes les expériences. L’insert correspond à l’absorbance UV du substrat à 337 nm en fonction de la profondeur. Image issue de [122].

des diamètres inférieurs. De plus, il semble y avoir une corrélation entre le diamètre des pores et le signal de détection des analytes en solution : plus les pores sont petits, plus cela favorise la détection des petits analytes, au détriment des plus grands (entre 1 et 10 kDa).

À partir des discussions précédentes, on en déduit que les substrats de silicium poreux avec un diamètre inférieur à 9 nm, une profondeur de l’ordre de 1 μm et une porosité élevée permettent d’optimiser la détection des métabolites en DIOS-MS. Cependant, il faut noter que ces résultats sont obtenus avec une surface de silicium poreux non modifiée. En effet, l’ajout de silanes par exemple modifie la taille des pores mais aussi l’hydrophobie générale de la surface, ce qui a une influence sur la pénétration du solvant et des molécules à l’intérieur des pores et sur les propriétés thermiques et optiques du substrat.

1.4.3 Fonctionnalisation du substrat pour l’analyse de solutions modèles

La fonctionnalisation de la surface permet de protéger la surface de contamination et de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface dans une optique de détection de certains analytes [127]. En particulier, la fonctionnalisation chimique du silicium, qui est utilisée dans un grand nombre de domaines, s’est beaucoup développée ces dernières années [129]. Dans la suite, nous étudions plusieurs types de fonctionnalisation et leurs effets sur la détection de biomolécules en solution modèle.

1.4.3.a Les silanes

Comme évoqué précédemment, le silicium ou la silice peuvent facilement être fonctionnalisés par des silanes pour changer leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobie/hydrophilie, charge électrique, rugosité, affinité chimique) et ainsi capturer et détecter spécifiquement certaines molécules dans un milieu [79,111]. Leur groupement terminal peut avoir un rôle important dans la détection de certaines molécules [130]. Trauger *et al.* [131] ont testé du silicium poreux

avec plusieurs silanes de taille de chaîne alkyle et de terminaison différentes : un avec une terminaison amine plutôt hydrophile et un perfluoré hydrophobe. Ces deux groupes offrent des résultats différents pour la détection de métabolites. En particulier, l'utilisation d'un groupement amine permet de détecter les métabolites les plus hydrophiles alors que le silane hydrophobe permet de détecter une plus grande quantité de métabolites, quelle que soit leur hydrophilie.

Les silanes fluorés ou perfluorés (lorsque tous les atomes de carbone de la chaîne alkyle sont liés à un atome de fluor) sont souvent utilisés pour fonctionnaliser la surface de silicium grâce à leur caractère hydrophobe. En effet, cela permet de réduire la surface de la goutte sur la surface ce qui permet d'enrichir le signal de spectrométrie de masse. [132]. L'utilisation des silanes perfluorés permet de détecter la des-Arg⁹-bradykinine (903 Da) jusqu'à une concentration de 0,1 ng/mL, inférieure à ce qui est habituellement obtenu avec du silicium non-fonctionnalisé, probablement parce que le silane hydrophobe permet une meilleure localisation de la goutte sur la surface, ce qui intensifie le signal à l'endroit du dépôt [131].

À notre connaissance, aucune étude sur l'influence des silanes sur la conductance thermique de la surface de silicium n'a été menée. En revanche, il a été montré que les terminaisons Si-H et Si-OH sur une surface de silicium modifient sa conductance thermique : elle est de 220 MW.m⁻².K⁻¹ dans le cas d'une surface avec des terminaisons Si-H hydrophobes et augmente de 50 % à 330 MW.m⁻².K⁻¹ avec des groupements Si-OH hydrophiles à la surface [133]. Cette observation est encore vraie lorsque qu'une monocouche se trouve à la surface de l'échantillon : lorsque cette monocouche est terminée par un acide carboxylique, la conductance thermique est triplée, passant de 65 MW.m⁻².K⁻¹ avec une chaîne alkyle sans groupement terminal à 190 MW.m⁻².K⁻¹ lorsque la même chaîne se termine par un groupement carboxyle [134]. La conductance thermique est donc plus grande lorsque la surface est hydrophile [135]. En revanche, par analogie avec les monocouches de thiols sur une surface d'or, on peut supposer que la longueur de la chaîne alkyle du silane a peu d'influence sur la conductance thermique pour des chaînes comprises entre 4 et 18 carbones [134,136]. Une couche de silanes sans groupement terminal pourrait donc être favorable d'un point de vue thermique pour les analyses en DIOS-MS. Cependant, nous ne savons pas si l'échelle de ces variations a un effet significatif.

1.4.3.b Les polymères

D'autres composés perfluorés peuvent être utilisés, comme les polymères : pour uniformiser les couches et rendre les dépôts plus reproductibles, Minhas *et al.* [137] ont utilisé une polymérisation plasma de composés perfluorés (C₄F₈, CF₄ et CHF₃). Ils permettent d'obtenir des résultats équivalents aux silanes que ce soit pour la détection des métabolites (ils détectent de la cocaïne dans de l'eau à 100 ng/mL) ou pour la conservation des substrats (ils peuvent se conserver plusieurs mois sans perdre en efficacité en spectrométrie de masse).

1.4.3.c Les nanofils

Ces silanes fluorés ou perfluorés sont régulièrement utilisés pour la détection de petites biomolécules à cause de leur caractère hydrophobe [138]. Ils permettent par exemple de détecter des

drogues à des concentrations faibles. Guinan *et al.* [139] ont testé trois substrats de silicium nanostructurés et silanisés : un avec des pores de 100 nm de largeur et 450 nm de profondeur, un avec des pores de 10 nm de largeur et 13 μm de profondeur et un dernier (NALDI pour *Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization*) avec des nanofils de 10 nm de diamètre et entre 100 et 500 nm de longueur. Chaque surface était ensuite fonctionnalisée par des silanes fluorés (chaque surface avec un silane différent). En testant ces surfaces sur des drogues en solution : méthadone (309 Da), oxycodone (315 Da), flunitrazépam (313 Da), 3,4-méthylènedioxy-N-méthylamphétamine (MDMA, 193 Da) et cocaïne (303 Da) à une concentration de 100 ng/mL, ils montrent que les surfaces offrant les meilleurs résultats en termes de S/N et de répétabilité goutte à goutte sont les deux surfaces poreuses par rapport aux nanofils. Les deux surfaces poreuses sont équivalentes : certaines molécules sont mieux détectées avec les pores fins et d'autres avec les pores plus larges.

Dupré *et al.* [140] ont étudié des nanofils plus grands. Avec des fils de diamètre compris entre 50 et 100 nm et une longueur de 12 μm , ils ont comparé ces fils à des échantillons de DIOS classique avec des pores de quelques centaines de nm de profondeur et de quelques dizaines de nm de diamètre. Les surfaces sont ensuite silanisées par des perfluorosilanes ou des octadecyltrichlorosilanes (OTS), des silanes composés d'une chaîne alkyle de 18 carbones, les deux étant des silanes hydrophobes. Ces surfaces sont testées sur des mélanges de peptides, de masse comprise entre 500 Da et 1500 Da, à différentes concentrations. À la concentration la plus faible étudiée (10^{-7} mol/L, soit entre 50 et 150 ng/mL en fonction du peptide), parmi les 35 peptides, séparés en 7 groupes de 5, c'est la surface DIOS avec les silanes OTS qui permet de détecter le plus de peptides (23/35), les autres surfaces permettant d'en détecter au maximum 20 et avec des intensités plus faibles.

Les nanofils semblent donc donner de bons résultats pour la spectrométrie de masse mais inférieurs aux surfaces de DIOS poreuses pour les molécules étudiées, c'est-à-dire des petites molécules de quelques centaines de Da.

1.4.3.d Les thiols

Il est possible d'utiliser d'autres molécules pour fonctionnaliser les surfaces comme les thiols utilisés par Tsao *et al.* [141]. Les thiols nécessitant de l'or pour se greffer, des nanoparticules d'or sont greffées à la surface de silicium nanostructurée et les thiols sont fonctionnalisés directement sur les NPs. Les thiols se terminent soit par un groupement amine chargé positivement, soit par un groupement carboxyle chargé négativement. Ils étudient ensuite des peptides dérivés de la bradykinine, de masses aux alentours de 1000 Da. Les peptides étudiés étant globalement chargés positivement, l'augmentation à la surface de la concentration de thiols avec une terminaison NH_2 diminue le signal des peptides alors que le signal augmente avec l'augmentation du nombre de thiols avec une terminaison COOH . Le fait que les thiols NH_2 soient chargés positivement à pH 7 alors que les thiols COOH sont chargés négativement explique ce résultat. En effet, un thiol de charge opposé à la charge du peptide promeut l'adsorption et l'ionisation des peptides.

1.4.3.e Les nanoparticules

Enfin, les NPs peuvent être utilisées pour fonctionnaliser la surface de silicium poreuse [142, 143]. Par exemple, Yan *et al.* [144] utilisent des nanoparticules d'argent qu'ils déposent dans des pores de silicium. Cette fonctionnalisation permet d'améliorer la limite de détection jusqu'à plus de deux ordres de grandeur, passant pour la molécule de tétrapyridinoporphyrine (618 Da) de 0,8 µg/mL avec un substrat de DIOS sans fonctionnalisation à 5 ng/mL avec la fonctionnalisation par les nanoparticules d'argent.

1.4.4 Substrats fonctionnalisés et échantillons physiologiques

Dans le cas d'une solution complexe, l'analyse directe d'un échantillon sans étape de filtration avant ou après le dépôt sur la surface offre peu d'informations sur la composition de l'échantillon. En effet, une grande quantité de molécules différentes se trouvent dans le milieu, certaines plus abondantes que d'autres (comme l'albumine) ce qui empêche une analyse correcte de l'échantillon. Il est par exemple possible d'effectuer une série de centrifugations pour éliminer les plus grosses molécules ou une séparation par affinité sur une surface suivie d'une élution pour récupérer les molécules d'intérêt comme il a été vu dans la partie sur le MALDI-MS. Ici, nous présentons des techniques, plus ou moins coûteuses en temps, utilisant les propriétés du silicium poreux pour simplifier le milieu et ainsi rendre l'étude de l'échantillon biologique possible.

1.4.4.a Le cas des sels

L'un des principaux défis dans l'étude de fluides biologiques comme le sérum est la présence de sels qui s'agrègent à la surface et qui diminuent le signal de spectrométrie de masse. L'utilisation d'un substrat poreux par rapport à un substrat plan est un premier élément permettant de diminuer le bruit dû aux sels dans le milieu.

Des auteurs ont travaillé sur ce problème avec une solution tampon de liquide cébrospinal artificiel [145]. Ils ont trouvé que, pour le silicium poreux créé avec la technique GLAD et fonctionnalisé par des silanes perfluorés, la meilleure méthode pour limiter l'effet des sels est de faire sécher lentement la goutte d'analyte à 4°C pendant plusieurs heures pour éviter la cristallisation des sels et les interférences sur le signal.

Cependant, dans le cas d'échantillons complexes sur du silicium poreux, le lavage de la surface après le dépôt peut être suffisant pour le dessalage et les conditions de stockage des échantillons a dans ce cas peu d'importance sur le résultat final. C'est ce que montrent Duan *et al.* [146] en analysant des peptides de masse autour de 1000 Da dans des milieux salins (des solutions tampon et de l'urée à 8 M). Les échantillons sont composés de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes OTS, très hydrophobes. Alors que peu ou pas de signal est observable dans le cas du MALDI-MS et du DIOS-MS sans lavage, le lavage de la surface par de l'eau avec 0,1 % d'acide trifluoroacétique (TFA) après le dépôt des peptides en milieu salin permet d'améliorer sensiblement le signal et ainsi de détecter certains des peptides à faible concentration (1 ng/mL).

1.4.4.b Analyse avec pré-traitement des fluides

Suite aux résultats et aux limites de détection pour les métabolites en milieu modèle, des études ont commencé à apparaître, principalement pendant ces 10 dernières années, sur la détection de métabolites dans des milieux biologiques complexes. Pour aider à la détection des métabolites, une ou plusieurs étapes de pré-traitement du liquide sont effectuées pour en retirer les molécules pouvant gêner l'analyse, en particulier les protéines. Dans cette section, nous présentons les techniques de séparation les plus étudiées dans la littérature. Ces techniques ont l'avantage de réduire le temps nécessaire pour le pré-traitement, par rapport aux méthodes de chromatographie classiquement utilisés dans les examens cliniques (qui peuvent prendre plusieurs heures, voire plusieurs jours).

Le marquage des molécules d'intérêt lors du pré-traitement offre plusieurs avantages lors d'une analyse d'une solution complexe en SALDI-MS. Premièrement, certains marquages peuvent aider à la détection car ils s'ionisent plus facilement que l'analyte [147]. Deuxièmement, toujours en fonction du marquage choisi, celui-ci peut aider les analytes à s'adsorber de manière privilégiée sur la surface et ainsi permettre à l'analyte de rester à la surface après le lavage. C'est ce que montrent Go *et al.* [148]. Ils ont utilisé du silicium poreux fonctionnalisé par des silanes fluorés et ont ensuite marqué les acides aminés présents dans le plasma avec des molécules fluorées liées aux acides carboxyliques des acides aminés. Pour cela, ils ont fait précipiter les protéines du plasma pour ne garder que les plus petites molécules et rendre l'analyse moins complexe. Après le dépôt de la goutte avec les molécules marquées, les auteurs ont lavé la surface pour retirer tout ce qui ne serait pas lié avec une solution de méthanol à 50 %. Cela leur permet de détecter une grande partie des acides aminés, ce qui n'est pas le cas sans lavage. De plus, le marquage avec un composé fluoré est plus efficace qu'un marquage simple avec un butanol, le fluor aide donc à la capture et à la détection des molécules.

Une autre méthode que l'on retrouve souvent dans la littérature est la précipitation des protéines suivie d'une séparation entre les molécules polaires et apolaires. Il est par exemple possible de détecter des métabolites dans un échantillon de plasma pré-traité avec une précipitation des protéines et une séparation des milieux organiques et aqueux [124]. Les deux phases sont ensuite déposées séparément sur un réseau de nanopiliers de silicium fluorés et analysés en spectrométrie de masse. Au total, parmi les deux phases, 108 métabolites sont détectés, en particulier des acides aminés et des acides organiques dans la phase aqueuse et des phospholipides et des acides gras dans la phase organique.

Zhou *et al.* [145] étudient aussi un milieu complexe, du sérum, pour essayer de détecter et quantifier certains métabolites. Pour cela, ils utilisent la technique GLAD pour faire croître des nanocolonnes de 500 nm de hauteur sur la surface qu'ils fonctionnalisent avec des perfluorosilanes. Le sérum est d'abord pré-traité par ultrafiltration et plusieurs étapes de centrifugation avant d'ajouter de l'acide pour faire précipiter les protéines encore présentes et abondantes dans le milieu. À la différence de l'étude précédente, le filtrat n'est pas séparé en deux phases. Grâce à la méthode de l'addition standard qui consiste à ajouter plusieurs concentrations d'analytes connues dans un échantillon inconnu, ils arrivent à quantifier la taurine (125 Da), l'acide aspartique (133 Da) et d'autres molécules avec des valeurs proches de celles obtenues en spectroscopie

de résonance magnétique nucléaire (RMN) : 72 μM contre 80,0 μM en RMN pour la taurine et 55,3 μM contre 62,7 μM en RMN pour l'acide aspartique.

Pour essayer de diminuer le temps de pré-traitement des échantillons avant analyse, Wang *et al.* [149] proposent d'utiliser la microextraction sur phase solide pour extraire les molécules d'intérêt rapidement. Pour cela, ils ont créé un échantillon de silicium porosifié sur les deux faces et dont l'une des faces a été fonctionnalisée par des silanes OTS. Les deux faces ont donc une mouillabilité différente (faible pour la face silanisée et élevée pour l'autre). Ces échantillons sont ensuite plongés dans une solution contenant du plasma ou de l'urine pendant 2 min et l'échantillon est analysé en spectrométrie de masse sur la surface silanisée. Grâce à cette extraction rapide, ils arrivent à détecter le vérapamil ajouté dans une solution de plasma et très peu soluble dans l'eau jusqu'à une concentration inférieure à 0,05 ng/mL. Il faut noter que cette concentration, plus faible que les concentrations habituellement détectées dans un fluide biologique est obtenue pour un volume de 1 mL, soit 1000 fois plus important que le volume de 1 μL habituellement utilisé pour les dépôts de goutte sur la surface.

1.4.4.c Analyse sans pré-traitement des échantillons

L'étude de métabolites en milieu biologique en DIOS-MS sans pré-traitement est beaucoup plus rare. Néanmoins, elles ont un intérêt clinique clair : la simplification des protocoles expérimentaux grâce à moins d'artefacts et un protocole plus rapide. Aucune protéine n'est retirée du fluide et l'étude doit prendre en compte la grande quantité de molécules pouvant interférer avec le signal. Dans cette partie, nous présentons les rares études dans des milieux biologiques en spectrométrie de masse laser sur un substrat de silicium et sans pré-traitement.

Tsao et Yang [150] étudient ainsi le glucose (181 Da) dans l'urine. Pour cela, ils utilisent du silicium nanostructuré sur lequel sont greffées des nanoparticules d'or. Le glucose étant difficile à ioniser, les auteurs s'intéressent à un dérivé du glucose : l'acide gluconique (196 Da) qui est catalysé par l'or. Alors que le signal est très faible pour la détection du glucose à 20 mg/mL sans le greffage des NPs d'or, il est possible de détecter le glucose sous forme d'acide gluconique en analysant les ions négatifs (jusqu'à une concentration inférieure à 0,1 ng/mL dans l'eau). Cette sensibilité permet aussi de détecter le glucose, grâce à l'acide gluconique, dans l'urine sans pré-traitement, soit à une concentration de l'ordre de 1 mg/mL. L'interférence des autres molécules dans l'urine est présente mais suffisamment faible pour que le pic de l'acide gluconique ressorte.

Ces NPs d'or greffées sur du silicium poreux permettent aussi de détecter des molécules de glutathion. En effet, la fonction -SH du glutathion interagit facilement avec l'or (comme dans le cas des thiols) et il est ainsi possible de capturer spécifiquement ces molécules et d'éliminer les protéines et autres molécules. Wang *et al.* [142] analysent le glutathion dans un lysat cellulaire grâce à du silicium poreux avec des NPs d'or de 10 nm de diamètre. Cela leur permet de détecter le glutathion naturellement présent avec juste un rinçage de la surface avec de l'eau avant la mesure.

Guinan *et al.* [151] montrent la possibilité de détecter des drogues dans la salive. Ils utilisent un substrat de silicium poreux qu'ils fonctionnalisent avec un silane perfluoré. Ils ajoutent ensuite artificiellement de la cocaïne (303 Da), de la métamphétamine (149 Da) et du MDMA (193 Da)

dans la salive qu'ils déposent sur le silicium poreux et analysent en spectrométrie de masse. Les trois drogues sont détectées dans la salive à des concentrations de l'ordre de 100 ng/mL. L'étude de la limite de détection de la cocaïne dans la salive donne une LoD d'environ 4 ng/mL, légèrement meilleure que les tests salivaires actuels aux alentours de 10 ng/mL.

Alhmoud *et al.* [152] se sont intéressés à la méthadone (309 Da) qu'ils ont détectée avec des échantillons de silicium poreux fonctionnalisés avec des silanes fluorés et des nanopiliers de silicium. La méthadone se trouve dans le sang de patients traités par cette drogue. En étudiant des prélèvements d'urine, de plasma et de salive de ces personnes, les auteurs ont montré qu'il était possible de détecter la méthadone et un dérivé, l'EDDP (2-éthylidène-1,5-diméthyl-3,3-diphénylpyrrolidine, un métabolite de la méthadone), sans modification des échantillons avant la mesure, juste en lavant la surface après le dépôt d'une goutte des fluides testés avec 5 μL d'une solution tampon de citrate d'ammonium à 10 mM.

Une nouvelle méthode qui a été proposée récemment est d'inverser la procédure en déposant le substrat sur une goutte de milieu à analyser [153]. Pour cela, Jiang *et al.* [154] ont utilisé un substrat de silicium avec des nanofils qu'ils ont fonctionnalisés avec de l'éthylène-propylène fluoré, un polymère fluoré. Ils ont ensuite déposé une goutte de 20 μL d'urine sur une lame de verre et ont ensuite déposé le substrat sur la lame. Le volume de la goutte est alors plus grand que le volume habituellement utilisé dans le cas d'un dépôt d'une goutte sur le substrat, en général 1 μL . Une analyse statistique en composantes principales a permis de distinguer les patients atteints d'un cancer du foie d'un groupe témoin. De plus, l'étude des profils métaboliques a permis d'identifier des métabolites biomarqueurs de ce cancer, comme la sérine et la créatinine. Cette technique peut aussi s'adapter à d'autres maladies comme le diabète de type 2 [155].

Ainsi, à notre connaissance, une seule étude a été publiée dans le plasma, qui est un fluide largement plus complexe que la salive ou l'urine (pour lesquels quelques rares études ont été publiées). La détection directement dans le plasma sans pré-traitement serait très prometteuse pour le diagnostic clinique. Il semble urgent d'approfondir cet axe de recherche.

Conclusion sur la spectrométrie de masse

La détection de petites molécules en spectrométrie de masse est un sujet attirant l'intérêt de plus en plus de chercheurs. La grande variété de substrats possibles et la possibilité de les modifier en fonction des besoins offrent un domaine d'étude très large pour la détection de polluants dans de l'eau, la détection de protéines ou encore l'analyse du profil métabolique d'un individu.

Des recherches récentes montrent qu'une maladie, qu'elle soit due à un virus ou à une bactérie modifie l'équilibre métabolique d'une personne [4,5,7,8] : la concentration de certains métabolites dans le sang comme les acides aminés est modifiée à cause principalement du dysfonctionnement de certains organes, comme c'est le cas avec le sepsis, et de la dénaturation de protéines. Une meilleure analyse de ces variations permettrait de mieux appréhender ces maladies et à terme de pouvoir les diagnostiquer et prévoir leurs conséquences sur le patient. Pour cela, il est nécessaire de développer un outil sensible pour la détection de métabolites en très faible quantité parmi

d'autres molécules comme les protéines de tailles beaucoup plus importantes. Les résultats à ce jour en DIOS-MS semblent prometteurs pour cela : des études ont montré qu'il est possible de détecter des molécules jusqu'à des concentrations inférieures au ng/mL, concentration inférieure à la concentration de la plupart des métabolites dans le sang comme les acides aminés [4]. Par ailleurs, une étude a montré la possibilité de détecter un métabolite spécifique dans le plasma sans pré-traitement.

Pour obtenir des informations précises sur le profil d'un patient, il est nécessaire de pouvoir capturer sélectivement certaines molécules par rapport à d'autres. Les études montrent que les silanes sur une surface de silicium permettent de réaliser cela. Les silanes hydrophobes, largement étudiés dans le cas du DIOS-MS permettent d'exclure plus facilement les protéines d'un milieu en se concentrant principalement sur les petites molécules alors que les surfaces moins hydrophobes comme les silanes avec une terminaison amines ont tendance à être meilleures pour les métabolites hydrophiles. De plus, une surface chargée permet de détecter préférentiellement des molécules de charge opposée. C'est pour cela que nous nous sommes concentrés sur quatre surfaces de silanes différentes : 3-aminopropyldiméthyléthoxysilane (NH_3^+ dans la suite), n-propyldiméthylmétoxysilane (CH_3 court dans la suite) octadécyldiméthylmétoxysilane (CH_3 long dans la suite), et tert-butyl-11-(diméthylamino(diméthyl)silyl)undécanoate (COO^- dans la suite) avec des propriétés différentes. Les silanes CH_3 court et CH_3 long sont des silanes plutôt hydrophobes avec une terminaison qui n'est pas chargée. Les deux autres, COO^- et NH_3^+ , sont plus hydrophiles et sont chargés respectivement négativement et positivement à pH 7,4, le pH du sang (Tableau 1.1).

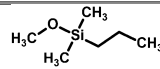
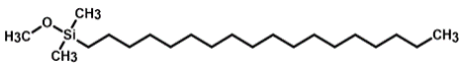
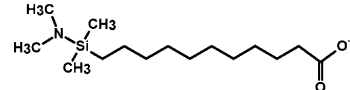
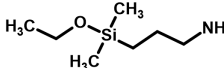
Code du silane	Formule brute	Formule topologique
CH_3 court	$\text{C}_7\text{H}_{18}\text{OSi}$	
CH_3 long	$\text{C}_{21}\text{H}_{46}\text{OSi}$	
COO^-	$\text{C}_{15}\text{H}_{32}\text{NO}_2\text{Si}$	
NH_3^+	$\text{C}_7\text{H}_{20}\text{NOSi}$	

Tableau 1.1 – Formules brutes et topologiques des quatre silanes utilisés dans la suite.

Ces dernières années, des études dans un milieu complexe comme le plasma commencent à émerger mais restent éparées. Il a été montré qu'il est possible de détecter des molécules artificiellement ajoutées dans un fluide biologique et certaines naturellement présentes avec un simple lavage de la surface avec une solution tampon avant la mesure. Néanmoins, une seule étude sur du plasma sur un seul métabolite spécifique a été publiée [152]. Il est nécessaire d'étendre ces études en plasma et investiguer la possibilité de discriminer des échantillons sains d'échantillons pathologiques en cherchant à identifier des panels de biomarqueurs dans un même échantillon.

1.5 La silanisation de surface

Pour les mesures en spectrométrie de masse, nous avons choisi d'utiliser des échantillons de silicium poreux fonctionnalisés par des silanes. Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'utilisation de silanes permet une meilleure détection des métabolites et, en modifiant les propriétés des silanes, il est possible d'améliorer la détection de certains métabolites. Dans cette partie nous présentons le processus de silanisation ainsi que différentes techniques de caractérisation utilisées pour étudier la conformité de la couche de silane en spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (ToF-SIMS) et la densité de surface des silanes en spectroscopie de photoélectrons X (XPS).

1.5.1 Processus de silanisation

La fonctionnalisation d'une surface de silicium par des silanes, ou silanisation, est un procédé permettant la création d'une SAM de molécules de silanes sur une surface de silice grâce à la formation d'une liaison covalente Si-O entre la molécule de silane et la surface. La formule générale d'une molécule de silane est $R_{4-n}SiX_n$ où n est un entier entre 1 et 3. X est un groupement hydrolysable, souvent $Cl-$, CH_3O- ou CH_3CH_2O- , et R est un groupement non hydrolysable (dans le cas où $n \neq 3$, les groupements R peuvent être différents). On parle de silane monofonctionnel lorsque $n = 1$ et de silane trifonctionnel lorsque $n = 3$. Le processus de silanisation est présenté en Figure 1.6.

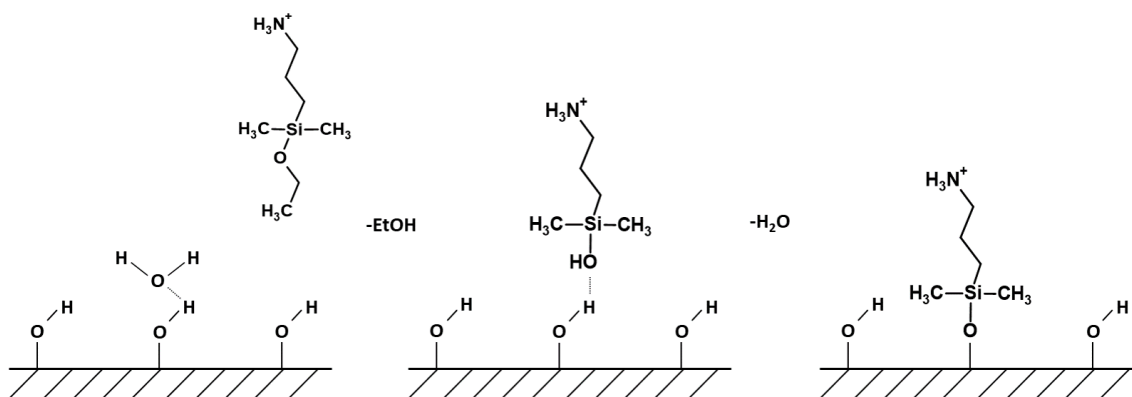


Figure 1.6 – Processus de fonctionnalisation par une molécule de silane monofonctionnel sur une surface de silice avec des groupement silanol. Le silane est d'abord hydrolysé puis lié à la surface avec une liaison covalente Si-O.

La composition du groupement non hydrolysable est très variée, en particulier sur sa longueur et sa terminaison. Cela permet de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface comme son caractère hydrophobe ou sa charge. De plus, les silanes formant une monocouche auto-assemblée, la rugosité de la surface est peu modifiée par la fonctionnalisation comme le montre les mesures de microscopie à force atomique (AFM) [156, 157]. Les substrats sont aussi moins sujets à contamination, plus stables dans le temps (sur plusieurs mois) et protégés de la corrosion. [158]. Les applications de ces surfaces silanisées sont très larges [159]. Les silanes sont

particulièrement intéressants pour l'analyse de biomolécules grâce à leur capacité à immobiliser certaines molécules comme des protéines [160, 161].

1.5.2 Influence du nombre de groupes hydrolysables de la molécule de silane sur la silanisation

Les silanes trifonctionnels sont majoritairement utilisés pour la fonctionnalisation de surface parce qu'ils sont plus réactifs que les silanes monofonctionnels. Cela permet en général une meilleure couverture de la surface avec une SAM plus dense [162]. En revanche, ils présentent l'inconvénient de pouvoir polymériser à la surface sous certaines conditions. En effet, les silanes trifonctionnels contiennent trois groupements hydrolysables et deux silanes peuvent donc réticuler en formant des liaisons Si-O tout en se liant à la surface [163, 164]. Il est possible de créer la monocouche par des liaisons latérales Si-O avec peu de liaisons Si-O-Si avec la surface. Au contraire, les silanes monofonctionnels sont tous liés à la surface ce qui permet de créer une couche plus robuste [165]. Dans le cas des silanes monofonctionnels, deux silanes peuvent également former un dimère mais celui-ci ne pourra pas se lier de manière covalente à la surface et pourra donc être retiré avec un lavage de la surface. Dans le cas d'un substrat poreux, il y a donc le risque avec un silane trifonctionnel de combler les pores. Dans notre cas, pour éviter ce risque, nous avons choisi d'utiliser des silanes monofonctionnels. En revanche, étant moins réactifs, les silanes monovalents ont moins été étudiés dans la littérature que les silanes trifonctionnels.

1.5.3 Techniques de caractérisation des SAMs

Différentes techniques de caractérisation de surface permettent d'étudier les monocouches de silanes [160, 166–170]. Pour obtenir une caractérisation complète de la surface, il est nécessaire de combiner plusieurs techniques. Dans la suite, nous nous concentrons sur la mesure de l'angle de contact de l'eau, qui donne une information qualitative sur la couverture de la surface par les silanes, la technique XPS pour étudier la composition chimique de la surface et le ToF-SIMS pour localiser les groupements chimiques dans les pores.

1.5.3.a Angle de contact

Une des propriétés des couches de silane à la surface des substrats est de modifier leur mouillabilité. L'angle de contact d'une goutte d'eau sur la surface, c'est-à-dire l'angle θ entre l'interface solide/liquide et l'interface liquide/gaz (Figure 1.7), dépend de la longueur de la chaîne alkyle du silane et de sa terminaison. Il donne aussi une information sur la densité de la monocouche de silane à la surface : la surface de silice hydroxylée étant très hydrophile (angle de contact proche de 0°), plus la couche de silane est dense, plus l'angle de contact est élevé. Il faut cependant tenir compte de la possibilité des silanes à réticuler à la surface : dans ce cas, l'angle de contact peut aussi être modifié. Dans le cas de silanes monofonctionnels, il n'y a pas à prendre en compte ce phénomène.

Pour le silane NH_3^+ , la littérature s'accorde sur un angle de contact sur une surface de silicium compris entre 60° et 65° [55, 165]. Aucune étude sur les silanes CH_3 court et CH_3 long n'a été

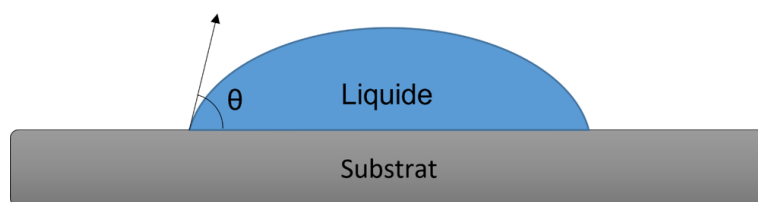


Figure 1.7 – Mesure de l’angle de contact d’un liquide sur un substrat.

faite. En revanche, les angles de contact de l’eau sur une surface de silicium fonctionnalisée par des silanes OTS contenant une chaîne alkyle de la même longueur que le silane CH_3 long a été publiée et la valeur de l’angle est de l’ordre de 95° [171]. Il existe également une étude de l’évolution de l’angle de contact de surfaces d’or fonctionnalisées par des thiols en fonction de la longueur de leur chaîne alkyle. Il est montré que le thiol contenant une chaîne de trois atomes de carbone (comme le CH_3 court) induit un angle de contact de 80° . La mesure n’a pas été faite avec une chaîne de dix-huit carbones comme le silane CH_3 long mais il semble que l’angle de contact atteint un plateau entre 100 et 110° à partir d’une chaîne de huit carbones [166]. Enfin, l’angle de contact d’une goutte d’eau sur une surface de silicium fonctionnalisée par des silanes COO^- est de 75° [172]. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 1.2.

Silane	Angle de contact	Référence
NH_3^+	$60\text{-}65^\circ$	[55, 165]
COO^-	75°	[172]
Thiol avec 3 C	80°	[166]
Thiol avec plus de 8 C	$100\text{-}110^\circ$	[166]
OTS (18 C)	95°	[171]

Tableau 1.2 – Tableau récapitulatif des angles de contact de la littérature des silanes de notre étude ou proche de ceux de notre étude.

1.5.3.b XPS

La technique XPS est une technique apparue dans les années 1960 pour étudier la composition chimique des surfaces. Un faisceau de photons X est envoyé sur un échantillon qu’il pénètre sur quelques micromètres. Les photons sont absorbés et leur énergie permet d’arracher des électrons de cœur des atomes de l’échantillon. L’énergie des photons est suffisante pour éjecter des électrons de cœur si elle est supérieure à l’énergie dite de liaison E_{liaison} , qui décrit la force liant l’électron à son noyau. Les électrons réussissant à sortir du solide sont ensuite récupérés et séparés en fonction de leur énergie cinétique E_c . Dans le cas où l’électron atteint le détecteur sans perte d’énergie, c’est-à-dire quand il n’entre pas en collision avec une autre particule, il est possible de lier son énergie cinétique à son énergie de liaison au noyau selon la formule :

$$E_c = h\nu - E_{\text{liaison}} - \Phi \quad (1.7)$$

où $h\nu$ est l'énergie du rayon X et Φ est la constante de la fonction de travail de l'échantillon. Il est alors possible d'analyser ces électrons qui n'ont pas subi de perte d'énergie et de remonter à leur environnement chimique dans la surface, les autres électrons se trouvant dans le bruit de fond du spectre. La source du spectromètre est souvent une source Al $K\alpha$ (1486,6 eV) ou Mg $K\alpha$ (1253,6 eV) dont l'énergie est suffisante pour éjecter les électrons de cœur de la majorité des éléments chimiques.

Comme les électrons ont un libre parcours moyen faible dans la matière (distance moyenne entre deux collisions), seuls ceux issus des atomes proches de la surface pourront sortir du matériau et être collectés. Ainsi, même si les photons X pénètrent dans l'échantillon sur plusieurs micromètres, la technique XPS est une technique d'analyse de surface. On définit la profondeur d'analyse comme étant égale à trois fois le libre parcours moyen d'un électron dans le matériau qu'il traverse, soit une dizaine de nanomètres. Il est possible de réduire cette profondeur d'analyse en inclinant le détecteur par rapport à la surface. En effet, si on définit θ l'angle du détecteur par rapport à la surface et l_0 la profondeur d'analyse lorsque que le détecteur est à la verticale par rapport à la surface ($\theta = 90^\circ$) alors, $l_\theta = l_0 \sin(\theta)$ est la profondeur d'analyse à l'angle θ (Figure 1.8). Par exemple, pour $\theta = 30^\circ$, alors $l_{30} = l_0/2$.

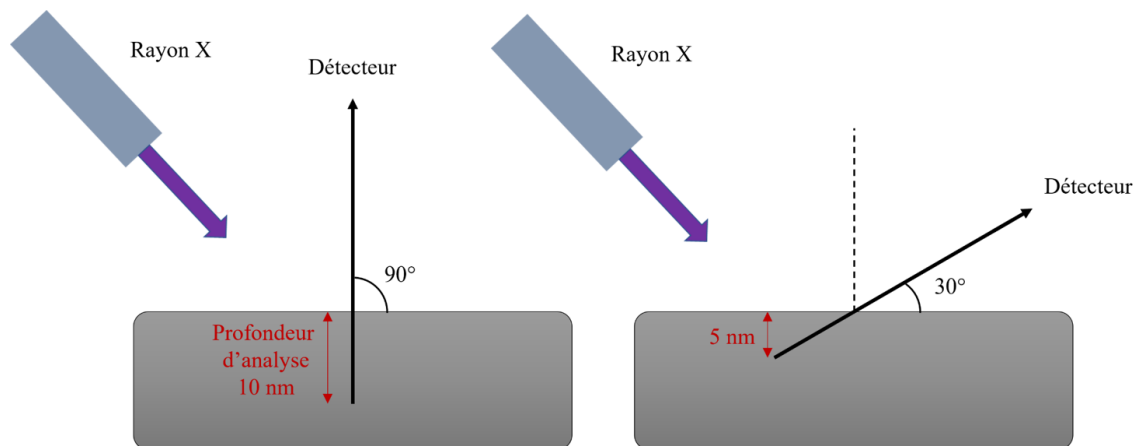


Figure 1.8 – Profondeur de l'analyse en XPS en fonction de l'angle entre le substrat et le détecteur.

Les énergies de liaison étant propres à chaque atome, il est possible de déterminer la composition de la surface grâce à la mesure des énergies cinétiques. De plus, l'environnement chimique d'un atome modifie légèrement les énergies de liaisons de ses électrons, il est donc possible d'obtenir des informations sur ses proches voisins et donc sur les liaisons chimiques à la surface. Dans la gamme d'énergie étudiée, les électrons proviennent de plusieurs couches électroniques des atomes (1s, 2s, 2p...) Pour un spectre haute résolution, il est possible d'observer deux pics d'énergies légèrement différentes correspondant à des électrons de même environnement chimique (en dehors des couches s). Cela est dû à l'interaction spin-orbite qui provoque un décalage énergétique des électrons [173]. Pour des électrons issus de la couche électronique 2p, en notant les deux pics 2p_{1/2} et 2p_{3/2}, alors le rapport de leurs aires est de 1:2.

Dans le cas d'une monocouche de silanes sur une surface de silice, Shircliff *et al.* [174] ont développé une formule permettant d'estimer la densité des silanes sur la surface :

$$\Gamma_{\text{silanes}} = \frac{A_{\text{Si silane}}}{A_{\text{Si oxyde}}} n_{\text{SiO}_2} z \quad (1.8)$$

où $A_{\text{Si silane}}$ et $A_{\text{Si oxyde}}$ correspondent respectivement aux aires normalisées du pic de l'atome de silicium présent sur le silane et à l'ensemble du silicium oxydé, n_{SiO_2} est la concentration moléculaire de la silice (22 nm^{-3}) et z la profondeur d'analyse (3 fois le libre parcours moyen multiplié par $\sin \theta$). Dans la silice, le libre parcours moyen est d'environ 3,7 nm [175]. La fonctionnalisation de la surface modifie probablement légèrement cette valeur mais cette différence n'est pas connue. Dans la suite, nous supposons qu'elle est identique à la silice.

1.5.3.c ToF-SIMS

La spectrométrie de masse des ions secondaires (SIMS) est une technique de spectrométrie de masse basée sur l'ionisation de la surface d'un échantillon par l'envoi d'un faisceau focalisé d'ions primaires. Le faisceau pulvérise la surface et ionise certains atomes ou groupes d'atomes. Ces ions issus de l'échantillon sont appelés ions secondaires. Ils sont ensuite détectés par un spectromètre de masse, c'est-à-dire triés en fonction de leur rapport m/z . Dans le cas du ToF-SIMS, l'analyse des ions secondaires se fait en temps de vol. Il est possible d'étudier les ions positifs et les ions négatifs en changeant le signe du champ d'accélération avant le tube ToF.

Les ions primaires peuvent avoir plusieurs origines, on retrouve par exemple les ions O_2^+ , Cs^+ , Ar^+ , Ga^+ , des clusters d'ions Bi (Bi^+ , Bi^{2+} , Bi^{3+})..., d'une énergie comprise entre 150 eV et 30 keV. Le faisceau d'ions primaires provoque d'autres phénomènes que l'ionisation de la surface comme la rétrodiffusion des ions primaires ou leur implantation dans la surface ou encore le déplacement des atomes du substrat à l'intérieur de l'échantillon par une cascade de collisions. De plus des ions secondaires, la pulvérisation de la surface provoque l'éjection d'atomes neutres et d'électrons. Pour ces raisons, la spectrométrie ToF-SIMS est destructrice : un léger cratère se forme à l'impact du faisceau d'ions.

Le ToF-SIMS peut être utilisé en mode statique, c'est-à-dire en analysant l'extrême surface d'un échantillon (quelques monocouches) ou en mode dynamique pour une analyse en profondeur du substrat avec un canon d'ions (O^+) en flux continu. Pour cela, la source primaire est couplée à un autre faisceau d'ions (souvent des ions Cs^+ avec une énergie de 500 eV). Cette deuxième source, plus large que la première, permet de pulvériser la surface autour de la zone pulvérisée par la source primaire et en retirer quelques monocouches. De plus, son énergie permet de garder un maximum d'informations moléculaires. En alternant les deux faisceaux, il est possible d'obtenir un profil des éléments de l'échantillon en profondeur. L'analyse en profondeur n'est plus une analyse de la surface mais peut être utilisée dans le cas d'un substrat de silicium poreux. En effet, grâce à la pulvérisation de la surface avec la deuxième source, il est possible d'analyser la composition des pores et l'évolution des éléments en fonction de la profondeur. Dans le cas d'une surface silanisée, on peut alors observer l'évolution de la couverture des silanes à l'intérieur des pores.

1.5.4 Les types de procédé de silanisation

On retrouve deux méthodes de silanisation d'une surface de silicium, en fonction du milieu dans lequel se trouve l'échantillon lors de la fonctionnalisation : la silanisation en phase liquide et celle en phase gazeuse.

1.5.4.a Silanisation en phase liquide

Dans le cas de la silanisation en phase liquide, l'échantillon est immergé dans un solvant contenant des silanes. Ce solvant est organique et anhydre pour éviter que les silanes ne puissent réagir avec des molécules d'eau qui pourraient être présentes. Le toluène est le solvant le plus souvent utilisé lors de la silanisation en phase liquide [165] mais on en retrouve d'autres comme le pentane [170] ou le chloroforme [176]. Ce sont des solvants qui dissolvent la plupart des silanes utilisés pour la fonctionnalisation de surface

1.5.4.b Silanisation en phase gazeuse

La fonctionnalisation en phase gazeuse permet de s'affranchir des solvants. Comme pour la silanisation en phase liquide, les silanes se condensent selon le processus présenté en Figure 1.6. Par rapport à la méthode précédente, aucun solvant, souvent polluant et toxique n'est utilisé. Il est donc plus facile de transférer ce procédé à grande échelle parce qu'il n'est pas nécessaire de prendre en compte la consommation de solvant et son recyclage. De plus, l'absence de solvant permet de ne pas avoir à étudier la solubilité des silanes et la mouillabilité de la surface, pour savoir si le solvant pénètre dans les pores dans le cas d'une surface poreuse par exemple.

La fonctionnalisation en phase gazeuse peut être réalisées soit avec un appareil de dépôt chimique en phase vapeur (CVD), soit grâce à un réacteur non-industriel créé spécifiquement pour la silanisation. Les protocoles suivent toujours la même structure, identique pour tous les silanes monofonctionnels ou plurifonctionnels : un nettoyage des échantillons et un chauffage dans le réacteur, l'introduction des silanes suivi d'un temps de plusieurs heures pour que la réaction se produise et enfin un nettoyage des échantillons. Dans le cas de la fonctionnalisation avec des silanes monofonctionnels, la température est comprise généralement entre 100°C et 150°C [177–179]. Dans ce cas, la silanisation est laissée pendant une douzaine d'heure. Il est possible de diminuer cette température jusqu'à 70°C mais cela implique de laisser la réaction de silanisation plus longtemps, sur plusieurs jours [180]. Les échantillons sont placés à pression atmosphérique dans un environnement neutre pour éviter les contaminations dues à l'air. Dans le cas de la CVD, il est possible de travailler sous vide pour minimiser ces risques [180].

1.5.4.c Avantages et inconvénients des deux méthodes

Ces deux méthodes permettent d'obtenir des densités surfaciques de silane sur du silicium plan équivalentes [181]. En revanche, des disparités peuvent apparaître au niveau de l'uniformité de la couche. Yadav *et al.* [165] se sont intéressés à trois aminosilanes, donc terminant avec une fonction amine, contenant entre 1 et 3 groupements hydrolysables : l'aminopropyltriéthoxysilane

(APTES, 3 groupements), l'aminopropylméthyl-diéthoxysilane (APMDES, 2 groupements) et l'aminopropyl-diméthyl-éthoxysilane (APDMES, 1 groupement). Les mesures AFM après la silanisation en phase liquide montrent l'apparition d'îlots rugueux avec les silanes APTES et dans une moindre mesure avec les silanes APMDES. Ces îlots ne sont pas présents avec les silanes APDMES et sont dus à la polymérisation des silanes sur la surface. Après une silanisation en phase gazeuse, les trois surfaces sont moins rugueuses et il n'y a plus d'îlots : la polymérisation a ainsi été évitée et la couche de silanes est plus uniforme.

De plus, plusieurs études utilisent la phase liquide pour la fonctionnalisation du silicium poreux mais pas de caractérisation des SAM élaborées. En particulier, il n'a jamais été prouvé que les silanes étaient présents dans les pores. De même, il n'existe pas d'étude sur la conformité des couches ni de la densité des silanes.

La silanisation est un procédé couramment utilisé dans l'équipe de Chimie et Nanobiotechnologie de l'INL pour des applications en microfluidique et en biologie [182]. Un protocole en phase liquide a été développé et s'adapte à une grande quantité de silanes qu'ils soient monofonctionnels ou trifonctionnels. Un autre protocole de silanisation en phase gazeuse a été développé pour le silane COO^- . Les protocoles en phase gazeuse donnent des résultats très proches de ceux obtenus lors d'une silanisation en phase liquide sur l'uniformité de la couche d'après des mesures AFM [157]. Notre objectif est de développer des protocoles de silanisation en phase gazeuse pour trois autres silanes : NH_3^+ , CH_3 court et CH_3 long. Ces silanes ainsi que le silane COO^- ont chacun des propriétés physico-chimiques différentes afin de pouvoir étudier leurs effets différentiels sur la détection des métabolites en spectrométrie de masse.

1.6 La dynamique moléculaire

Nous utilisons les simulations de dynamique moléculaire pour analyser les interactions entre les métabolites et les surfaces de silicium silanisées, à l'échelle atomique. Dans cette partie, nous commençons par présenter le principe de la dynamique moléculaire et son fonctionnement puis nous continuons sur les principales études des interactions entre des métabolites, en particulier les acides aminés, et une surface.

1.6.1 Principe et fonctionnement

La dynamique moléculaire permet de calculer la trajectoire de chaque atome au cours du temps en résolvant les équations du mouvement de Newton. Les forces mises en jeu sont les forces intramoléculaires de contact et intermoléculaires à distance. À cause des limitations liées aux temps de calcul, un système contient typiquement 50 000 atomes dans une boîte de simulation de taille $10 \times 10 \times 15 \text{ nm}^3$ (Figure 1.9).

1.6.1.a Équations à résoudre

La dynamique moléculaire est basée sur la résolution des équations du mouvement. Si nous considérons un système à N atomes de positions $r = (r_1, \dots, r_N)$, la trajectoire de l'atome i en

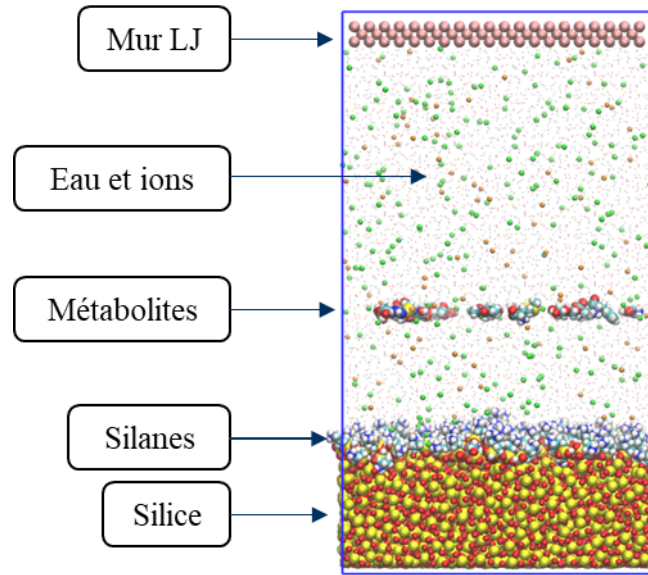


Figure 1.9 – Système initial de dynamique moléculaire. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l’oxygène, les bleus l’azote, les cyans le carbone, les blancs l’hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d’eau par des points.

fonction du temps peut être obtenue à partir de l’équation de Newton :

$$m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2} = F_i \quad (1.9)$$

avec m_i la masse de l’atome i et F_i l’ensemble des forces s’exerçant sur cet atome [183].

L’ensemble des forces formant F_i peut être exprimé comme le gradient de l’énergie potentielle du système $\mathcal{U}(r_1, \dots, r_N)$:

$$F_i = - \frac{\partial \mathcal{U}(r_1, \dots, r_n)}{\partial r_i}. \quad (1.10)$$

Pour pouvoir résoudre les équations du mouvement pour tous les atomes et étudier l’évolution temporelle du système, il est donc nécessaire d’explicitier les termes composant l’énergie potentielle.

1.6.1.b Description des termes de potentiel

Les interactions entre les atomes dans le système peuvent être séparées en deux catégories : les forces intramoléculaires ou de contact et les forces intermoléculaires ou à courte distance, chacune de ces forces ayant plusieurs composantes. Dans cette partie, nous décrivons les formes analytiques des interactions utilisées en dynamique moléculaire.

Les interactions intramoléculaires Les interactions entre atomes issues des liaisons covalentes sont décrites par trois termes : l’élongation, la flexion et la torsion. La géométrie de ces

trois termes est présentée en Figure 1.10. Il est aussi possible d'ajouter un quatrième terme associé aux angles impropres qui est une déformation par rapport à une structure plane.

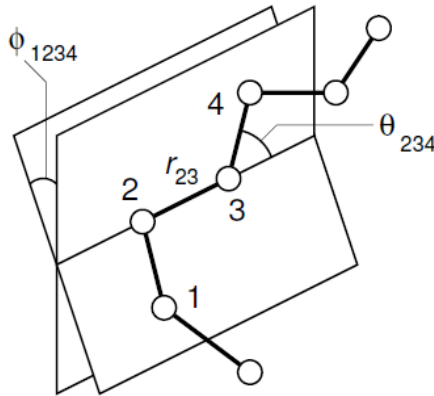


Figure 1.10 – Géométrie des liaisons entre atomes pour une molécule linéaire. r_{23} représente la distance entre les atomes 2 et 3, θ_{234} l'angle de flexion et ϕ_{1234} l'angle de torsion. Image issue de [183].

Élongation L'élongation de la liaison entre les atomes i et j peut être décrite par le potentiel :

$$v(r_{ij}) = \frac{1}{2}k_{ij}^r(r_{ij} - r_{eq})^2 \quad (1.11)$$

où $r_{ij} = |r_i - r_j|$ est la distance entre les atomes i et j , r_{eq} est la distance d'équilibre entre les deux atomes et k_{ij}^r est la constante d'élongation en $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{nm}^{-2}$.

Flexion L'angle entre trois atomes i , j et k peut être décrit par le potentiel :

$$v(\theta_{ijk}) = \frac{1}{2}k_{ijk}^\theta(\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \quad (1.12)$$

où θ_{ijk} est l'angle entre les atomes i , j et k , θ_{eq} est l'angle d'équilibre et k_{ijk}^θ est la constante de flexion en $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$.

Torsion ou angle dièdre propre L'angle de torsion représente la déformation autour d'une liaison simple. Son potentiel décrit les barrières énergétiques associées. Dans le cas de quatre atomes i , j , k et l liés linéairement, l'énergie potentielle associée à la torsion est décrite comme une somme de potentiels :

$$v(\phi_{ijkl}) = \frac{1}{2} \sum_m k_{ijkl}^{\phi,m} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m)) \quad (1.13)$$

où ϕ_{ijkl} est l'angle de torsion, m la multiplicité, c'est-à-dire le nombre de minima (sans unité), γ_p est le facteur de phase et $k_{ijkl}^{\phi,m}$ est la hauteur de la barrière de potentiel en kJ.mol^{-1} .

Angle dièdre impropre Dans le cas où il est nécessaire de garder une planéité entre plusieurs atomes (cycle aromatique par exemple), un terme associé à l'angle dièdre impropre peut être ajouté au potentiel. Il est alors décrit par la formule [184] :

$$v(\omega) = \frac{1}{2}k_{imp}(\omega - \omega_0)^2 \quad (1.14)$$

où ω est l'angle impropre, c'est-à-dire la déviation par rapport à une structure plane, ω_0 est l'angle à l'équilibre et k_{imp} est la constante de l'angle dièdre impropre en $\text{kJ.mol}^{-1}.\text{rad}^{-2}$.

Les interactions à distance Elles sont souvent séparées en deux termes : les forces de van der Waals et les forces électrostatiques. Parfois, un terme associé à un potentiel externe ou à un mur peut être ajouté [183]. Les autres interactions, par exemple prenant en compte plus de deux atomes, sont négligées.

Forces de van der Waals Les interactions de van der Waals sont modélisées par un potentiel de Lennard-Jones :

$$v(r_{ij}) = 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (1.15)$$

où r_{ij} est la distance entre les atomes i et j , ε_{ij} est la profondeur du puits de potentiel en kJ.mol^{-1} et σ_{ij} son diamètre en nm.

À très faible distance, le potentiel positif a un effet répulsif entre les atomes. En augmentant la distance, il devient négatif et attractif. Il modélise alors les interactions entre dipôles induits (forces de London et de Debye).

Forces électrostatiques Le potentiel électrostatique entre deux charges ponctuelles, ou dipôles permanents, i et j est décrit par la loi de Coulomb :

$$v_{ij} = \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (1.16)$$

où q_i et q_j sont les valeurs respectives des charges des atomes i et j , r_{ij} la distance les séparant, $\varepsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F.m}^{-1}$ et ε_r sont respectivement la permittivité du vide et la permittivité relative du milieu ($\varepsilon_r = 1$ dans le vide et $\varepsilon_r = 80$ dans l'eau).

Énergie potentielle totale du système On définit alors la fonction d'énergie potentielle du système à N atomes comme la somme de toutes les contributions précédentes :

$$\begin{aligned} \mathcal{U}(r) = & \sum_{\text{liaisons}} \frac{k_{ij}^r}{2} (r_{ij} - r_{eq})^2 + \sum_{\text{angles}} \frac{k_{ijk}^\theta}{2} (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 + \sum_{\text{dièdres}} \sum_m \frac{k_{ijkl}^{\phi,m}}{2} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m)) + \\ & \sum_{\text{impropres}} \frac{k_{imp}}{2} (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{i=1}^N \sum_{j=i+1}^N \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r r_{ij}} \quad (1.17) \end{aligned}$$

1.6.1.c Le champ de force

Pour pouvoir calculer ce potentiel, plusieurs paramètres nécessitent d'être explicités. Pour cela, l'énergie potentielle est modélisée par un champ de force qui donne les valeurs des différents paramètres. Ces valeurs sont définies pour chaque atome et dépendent de son environnement chimique : deux atomes de carbone impliqués dans une liaison C-C et C-O n'auront pas les mêmes valeurs pour leurs paramètres. Ces valeurs sont obtenues à partir de calculs théoriques de mécanique quantique ou de résultats expérimentaux (spectroscopie Raman, diffraction de rayons X...). On parle de champs de force semi-empiriques [185].

Dans le cas des forces de van der Waals, les valeurs ε_{ij} et σ_{ij} pour chaque paire d'atomes ne sont pas données. Pour chaque atome, on donne uniquement ε_i et σ_i . À partir de ces paramètres, on remonte aux valeurs ε_{ij} et σ_{ij} à partir des relations suivantes :

$$\varepsilon_{ij} = \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_j} \quad (1.18)$$

$$\sigma_{ij} = \frac{1}{2}(\sigma_i + \sigma_j) \quad (1.19)$$

Plusieurs champs de forces existent en fonction des besoins de la simulation et des molécules étudiées (protéine, sucres, ADN...). Les plus communs sont les champs de force CHARMM, AMBER, GROMOS et OPLS. La silice et les molécules de silane ne sont pas décrites dans les champs de force classiques, cependant, des adaptations du champ de force OPLS ont déjà été développées pour ces molécules, et des études au sein de notre équipe ont été menées pour rendre compatibles les molécules de notre étude comme les silanes avec ce champ de force [185]. Le reste des atomes issus des métabolites, des ions et des molécules d'eau sont déjà pris en compte.

1.6.1.d Interactions longue distance

Pour un calcul précis des interactions entre les atomes, les interactions non liantes devraient être calculées entre toutes les paires d'atomes du système car elles sont non nulles quelle que soit la distance entre les atomes. Cela impose une grande quantité de calculs, avec une complexité en $O(N^2)$. Étant donné que les forces électrostatiques et de van der Waals tendent vers 0 quand la distance entre les atomes augmente, les calculs sont en réalité simplifiés à longue distance pour diminuer le temps de calcul. Pour déterminer la distance à partir de laquelle les calculs sont simplifiés, on définit un rayon appelé *cut-off* d'une valeur généralement comprise entre 8 et 14 Å. Les calculs précis ne sont faits que lorsque la distance entre deux atomes est inférieure au *cut-off*.

Dans le cas des forces de van der Waals, avec une décroissance en $(1/r)^6$ les forces convergent rapidement vers 0. Si on considère r_c comme le rayon de *cut-off*, on tronque le potentiel et on obtient :

$$v(r_{ij}) = \begin{cases} 4\varepsilon_{ij} \left[\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] & \text{si } r_{ij} < r_c \\ 0 & \text{si } r_{ij} \geq r_c \end{cases} \quad (1.20)$$

La décroissance des forces électrostatiques est en revanche beaucoup plus lente, elles ne peuvent donc pas être tronquées. Pour diminuer le temps de calcul, lorsque la distance entre deux atomes est supérieure au *cut-off*, un calcul moins détaillé est effectué [186]. Dans notre cas, nous utilisons la méthode PME (pour *particle mesh Ewald*) qui permet de calculer les interactions électrostatiques à longue distance avec une complexité en $O(N \log(N))$. Cette méthode repose sur une interpolation des charges et l'utilisation d'un algorithme FFT (*Fast Fourier Transform*) [187, 188].

1.6.1.e Conditions périodiques

En dynamique moléculaire, l'étude se fait dans une boîte de simulation dont les dimensions sont de quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres pour les plus grandes. Un nombre non négligeable d'atomes se trouve donc sur les faces de la boîte, ce qui pourrait créer des effets de bords importants. Pour éviter ces problèmes, des conditions périodiques sont imposées au système [183]. Le système total peut être vu comme un ensemble infini de répliques de la boîte de simulation : chaque atome sortant par une face de la boîte entre par la face opposée à une vitesse identique [184].

Ce quadrillage infini des boîtes de simulation nécessite une limite dans le calcul des forces entre les atomes. Pour cela, la convention de l'image minimale est utilisée : les forces ne sont calculées qu'avec la réplique de l'atome la plus proche [183]. Cela signifie que les effets longue distance à des échelles supérieures à la taille de boîte ne sont pas pris en compte par ce modèle [184].

1.6.1.f Résolution des équations du mouvement

Grâce à la définition du champ de force, la composante de force de l'équation du mouvement (équation 1.9 à la page 42) est connue. Il est donc possible de résoudre l'équation pour l'ensemble des atomes du système et étudier son évolution dans le temps.

Méthode des différences finies La complexité de l'énergie potentielle et le nombre d'atomes dans le système rendent peu probable l'existence d'une solution analytique de l'équation du mouvement. Les équations sont donc résolues numériquement grâce à la méthode des différences finies [186]. En dynamique moléculaire, cela passe par le développement de Taylor qui permet de mettre en relation la position, la vitesse et l'accélération :

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t)\delta t + \frac{1}{2}a(t)\delta t^2 + \dots \quad (1.21a)$$

$$v(t + \delta t) = v(t) + a(t)\delta t + \dots \quad (1.21b)$$

avec $r(t)$, $v(t)$ et $a(t)$ respectivement la position, la vitesse, et l'accélération à l'instant t . Ce développement est utilisé pour la résolution avec la méthode d'Euler explicite.

Il est possible d'améliorer cette méthode en la rendant plus précise et en s'assurant de conserver l'énergie totale du système en utilisant l'algorithme de Verlet qui calcule la position à

l'instant $t + \delta t$ à partir des positions aux instants t et $t - \delta t$ et à l'accélération à l'instant t . En effet, si on écrit le développement de Taylor aux instants $t - \delta t$ et $t + \delta t$:

$$r(t - \delta t) = r(t) - v(t) \delta t + \frac{1}{2} a(t) \delta t^2 - \dots \quad (1.22a)$$

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t) \delta t + \frac{1}{2} a(t) \delta t^2 + \dots \quad (1.22b)$$

En sommant les deux équations et en ne gardant que les termes jusqu'à la dérivée troisième, on obtient la position à l'instant $t + \delta t$:

$$r(t + \delta t) = 2r(t) - r(t - \delta t) + a(t)\delta t^2 \quad (1.23)$$

Les termes en dérivée troisième s'annulent lors de l'addition des deux égalités, l'algorithme est donc plus précis qu'un développement de Taylor simple. Pour les vitesses qui ne sont pas explicitement calculées à partir de cette méthode, on soustrait les deux égalités de Taylor et, en ne gardant que les termes jusqu'à la dérivée seconde, on obtient la vitesse à l'instant t :

$$v(t) = \frac{r(t + \delta t) - r(t - \delta t)}{2\delta t}. \quad (1.24)$$

Encore une fois, les termes d'accélération s'annulent, ce qui rend cet algorithme plus précis que l'expression classique de la vitesse en fonction des positions aux instants t et $t + \delta t$.

Dans notre cas, nous avons utilisé l'algorithme de *leap-frog* ou saut de grenouille, qui suit la même logique que l'algorithme de Verlet mais en calculant les positions et les vitesses à des instants décalés. La position à l'instant $t + \delta t$ est obtenue à partir de la position à l'instant t et de la vitesse à l'instant $t + \frac{1}{2}\delta t$. Les expressions sont alors [186] :

$$r(t + \delta t) = r(t) + v(t + \frac{1}{2}\delta t) \delta t \quad (1.25a)$$

$$v(t + \frac{1}{2}\delta t) = v(t - \frac{1}{2}\delta t) + a(t) \delta t. \quad (1.25b)$$

Les conditions initiales La méthode des différences finies est déterministe, c'est-à-dire que la position et la vitesse peuvent être calculées à n'importe quel temps dès que les conditions initiales de position et de vitesse sont connues. La topologie du système donne les positions initiales des atomes. Les vitesses initiales sont elles déterminées selon une distribution de Maxwell-Boltzmann centrée sur la température T , c'est-à-dire que la densité de probabilité de la vitesse dans un milieu à l'équilibre thermodynamique vaut [184] :

$$p(v) = \left(\frac{m}{2\pi k_B T} \right)^{3/2} e^{-\frac{mv^2}{2k_B T}}. \quad (1.26)$$

De plus, la distribution initiale des vitesses est telle que le moment global P est nul [185] :

$$P = \sum_{i=1}^N m_i v_i = 0. \quad (1.27)$$

Nous étudions la variabilité de l'évolution du système en réalisant plusieurs répliques de simulation en gardant le même système initial des positions et en modifiant aléatoirement les vitesses initiales.

Le pas de temps Le pas de temps δt de la simulation permet de modifier la précision de l'évolution en temps du système et les variations de position et de vitesse des atomes. Plus le pas de temps est petit, plus les résultats sont précis mais plus les calculs sont longs. En revanche, si le pas de temps choisi est trop grand, certains mouvements comme les vibrations intra-moléculaires ne peuvent pas être pris en compte. En général le pas de temps pour ce type de simulation est de l'ordre de la femtoseconde [184], dans notre cas, il sera de 1 fs.

1.6.2 Interactions entre les acides aminés et une surface

L'objectif de la dynamique moléculaire dans notre projet est d'étudier les interactions entre une surface de silice silanisée et des métabolites. Ce domaine de recherche sur les interactions métabolites/surface est peu développé et se concentre principalement sur les acides aminés. D'avantage d'études (mais qui reste peu nombreuses) préfèrent s'intéresser aux protéines. On trouve tout de même quelques études sur les acides aminés principalement dans une optique de mieux comprendre les phénomènes en lien avec des protéines complètes.

Dans la suite, nous présentons les principales études sur les acides aminés. Cela commence par la vérification du champ de force avec l'analyse de leur comportement dans un solvant. Ensuite, nous présentons des recherches concernant l'adsorption des acides aminés sur une surface. Cette adsorption peut être caractérisée de plusieurs façons, en particulier grâce aux énergies de liaison et à l'orientation des molécules sur la surface. La dernière partie est consacrée à l'influence du solvant sur l'adsorption des molécules sur les surfaces de silice.

1.6.2.a Influence du champ de force sur le comportement des acides aminés

Chaque champ de force ayant ses particularités, il est possible que certains ne soient pas adaptés à l'étude de certaines molécules. Il peut donc être nécessaire de commencer par vérifier que les champs de forces s'accordent sur certains résultats expérimentaux vérifiables avant d'étudier plus en détails les comportements des molécules [189, 190]. Ces comparaisons peuvent être de différents ordres en fonction des besoins. Ici, nous présentons deux études de champ de force, la première sur la relaxation de Debye des acides aminés et la seconde sur les énergies de solvation des acides aminés dans l'eau.

Relaxation de Debye Pour sélectionner le champ de force le plus adapté pour l'étude des acides aminés, Průša et Cifra [191] ont caractérisé l'influence de différents champs de force sur la relaxation de Debye des acides aminés, c'est-à-dire le temps nécessaire pour revenir à un équilibre après avoir été soumis à un champ électrique. En comparant les valeurs obtenues aux valeurs expérimentales, ils montrent que le champ de force OPLS est celui donnant les résultats

les plus proches, et est toujours meilleurs que les champs de force AMBER et CHARMM. Ce champ de force est également celui qui sera utilisé dans notre étude.

Énergie de solvation Certaines études, pour simplifier les calculs et les interactions entre les atomes du système, préfèrent ne prendre en compte qu'une partie des acides aminés à la place de l'acide aminé complet, en particulier les groupes amine et carboxyle (la partie $\text{H}_2\text{N-CH-COOH}$) sont retirés de la molécule. On parle alors d'analogues des acides aminés. L'analogue le plus simple est celui de l'alanine (qui peut s'écrire sous la forme $\text{H}_3\text{C-C}(\text{NH}_2)\text{-COOH}$) : c'est une molécule de méthane. Karino *et al.* [192] ont utilisé ces analogues pour valider l'utilisation du champ de force OPLS et les méthodes de calcul de l'énergie de solvation pour les acides aminés. Les calculs sont comparés à des valeurs expérimentales et les variations sont inférieures à 1 kcal/mol, soit une erreur de moins de 10 %. Le champ de force semble donc bien adapté.

1.6.2.b Interactions acides aminés/surface

Il est possible ensuite d'étudier les interactions entre les acides aminés et une surface, en particulier leur adsorption sur cette surface pour comparer les propriétés des différents acides aminés. Plusieurs matériaux ont été testés pour étudier les interactions entre les acides aminés et la surface, en particulier ceux utilisés en biochimie comme la silice [193], l'or [194], les oxydes de métaux [195], ou les nanotubes de carbone [196]. Dans notre projet, la surface choisie est une surface de silice, cependant, peu d'études s'intéressent à caractériser un grand nombre d'acides aminés sur une surface de silice dans un milieu aqueux. Cette partie, consacrée aux interactions entre les acides aminés et la surface n'est donc pas exclusivement dédiée à la silice, d'autres surfaces seront présentées pour compléter les analyses faites sur de la silice. Nous verrons que les comportements des acides aminés sont proches d'une surface à l'autre.

Acide aminés sur de la silice Rimola *et al.* [197] ont étudié les interactions entre des acides aminés et une surface de silice amorphe dans le vide. Pour cela, ils ont divisé les acides aminés en cinq groupes selon leur polarité et leur acidité/basicité. Ils montrent ainsi que les molécules polaires ont des interactions plus fortes avec la surface de SiO_2 car elles peuvent former plus de liaisons hydrogène avec les atomes d'oxygène de la surface et les fonctions Si-OH. De plus, les acides aminés basiques, donc chargés positivement, ont une énergie d'interaction plus forte que les autres acides aminés car la surface de silice est chargée négativement.

Certains acides aminés sont étudiés individuellement, c'est le cas de la glycine [198] et de l'alanine [199] en particulier. En revanche, à notre connaissance il n'existe aucune étude comparative de l'adsorption des acides aminés sur de la silice dans de l'eau. Les études se rapprochant le plus de ce système n'étudient pas les acides aminés directement mais leurs analogues. Wright et Walsh [200] ont par exemple comparé l'adsorption de plusieurs analogues sur une surface de quartz hydrophobe et non chargée. Les auteurs ont étudié l'adsorption d'analogues plutôt que les acides aminés complets parce que dans le cas d'une étude d'interaction entre un peptide et un surface, ce sont principalement les chaînes latérales des acides aminés qui interagissent avec la surface. Ils montrent que l'affinité des analogues d'acides aminés est plus grande dans le cas d'un

cycle aromatique hydrophobe (analogue de la phénylalanine). Les analogues polaires et chargés ont une affinité plus faible avec la surface. Cette étude comporte cependant des limites : l'absence de la partie $\text{H}_2\text{N-CH}_2\text{-COOH}$ sur les analogues supprime les contraintes physico-chimiques qui pourraient exister dues à sa présence. De plus, dans le modèle utilisé, la silice a été définie comme neutre, ce qui n'est pas le cas dans la réalité. La présence des charges négatives peut influencer l'adsorption des acides aminés.

Pour compléter sur l'adsorption des acides aminés sur une surface et confirmer les résultats obtenus sur la silice, nous présentons dans la suite deux études menées, l'une sur une surface d'or neutre et la seconde sur une surface d'oxyde de titane (également chargée négativement à pH 7). L'objectif est de déterminer et de comparer les énergies d'adsorption des acides aminés et de déterminer les orientations privilégiées des acides aminés sur la surface.

Acides aminés sur TiO_2 et or

Orientation des métabolites Comme cela peut être le cas pour les protéines, l'orientation d'un acide aminé sur une surface n'est pas unique et, selon l'évolution de la simulation, l'orientation finale du métabolite peut varier. C'est ce qu'ont regardé Xue *et al.* [201] avec différents acides aminés dans de l'eau et sur une surface d'oxyde de titane (TiO_2). Les acides aminés ont tous une ou deux orientations sur le TiO_2 , modifiant ainsi leur surface de contact. En fonction de l'orientation, la mobilité de l'acide aminé n'est pas la même et l'énergie libre de liaison est aussi modifiée. Une surface de contact plus grande du métabolite sur le substrat augmente l'énergie libre de liaison, ce qui réduit les chances pour l'acide aminé de se désorber. En revanche, dans le cas d'une surface de TiO_2 hydroxylée, une seule orientation est observée, les liaisons hydrogène imposant un placement sur la surface.

Énergie d'adsorption Feng *et al.* [194] ont étudié les énergies d'adsorption de 20 acides aminés dans de l'eau sur une surface d'or. Les forces électrostatiques sont un paramètre important dans la valeur de l'énergie d'adsorption et cette composante est majoritaire dans l'énergie totale. Les énergies d'interactions entre les acides aminés et la surface sont comprises entre -12 kJ/mol pour l'alanine et -92 kJ/mol pour l'arginine (plus les énergies sont basses plus les forces sont attractives). Les énergies d'interaction sont directement liées à la taille de la molécule : plus la molécule est grande, plus l'énergie est négative. De plus, la présence d'un cycle aromatique ou de groupements hybridés sp^2 permet de diminuer l'énergie. À l'inverse, les acides aminés plus petits et comprenant un groupement tétraédrique sont ceux ayant l'énergie d'interaction avec l'or la plus proche de 0 parce que leur surface de contact est diminuée. Dans le cas des acides aminés avec un atome de soufre comme la cystéine, on observe que l'atome de soufre se dépose sur la surface en suivant la maille de l'or, les auteurs parlent alors d'adsorption épitaxiale.

Xue *et al.* [201] complètent cette observation sur les énergies, avec une surface de TiO_2 , globalement chargée négativement, en s'intéressant à l'influence de la charge d'un acide aminé et la conséquence sur l'énergie libre de liaison avec la surface. Ils montrent que l'interaction entre la surface et une molécule chargée positivement (l'arginine et la lysine) est plus forte qu'avec une molécule chargée négativement (l'acide aspartique), à cause des interactions électrostatiques. Ce

phénomène était aussi observé sur la silice qui est également chargée négativement dans le cas des interactions dans le vide [197].

1.6.2.c Influence du milieu sur l'adsorption des acides aminés

L'eau est un solvant adapté à l'étude des acides aminés parce qu'ils y sont tous solubles. Cependant, dans certains cas, il peut être intéressant de modifier légèrement le milieu pour étudier l'influence sur l'adsorption des molécules car en solution, les acides aminés sont rarement seuls. Dans cette dernière partie, nous présentons deux études s'intéressant à des solvants aqueux modifiés.

Influence du pH Dans une première étude, Li *et al.* [193] modélisent la variation du pH sur une surface de silice en modifiant le nombre de groupements silanols ionisés (0 % à pH 3, 9 % à pH 5, soit $0,4 \text{ nm}^{-2}$ et 18 % à pH 7, soit $0,8 \text{ nm}^{-2}$) et regardent l'influence sur la capture de petits peptides de quelques acides aminés. Ils observent qu'en fonction du pH, l'orientation du peptide sur la surface change. Dans le cas d'un peptide contenant des chaînes se terminant avec des molécules d'arginine dont la charge globale est positive sur cette gamme de pH, on observe une augmentation du nombre de molécules d'arginine adsorbées avec l'augmentation du pH. L'augmentation de la quantité de silanols, qui crée une surface plus négative, modifie l'orientation du peptide sur la silice et favorise l'adsorption de l'arginine. Pour le peptide avec des chaînes contenant de l'histidine, protonée à pH 3 et déprotonée pour les autres pH, on ne voit pas de modification de l'orientation du peptide sur la surface lorsque l'on fait varier le pH. L'augmentation de silanols n'a pas d'influence sur l'adsorption de cet acide aminé sur la surface. Il est donc nécessaire de correctement modéliser les silanols à la surface pour que le pH soit bien pris en considération.

Influence de la solution Dans une deuxième étude, Bag *et al.* [202] se sont intéressés à l'adsorption sur une surface de silice de molécules d'arginine et de lysine, de charges positives, dans deux solutions tampon. La première est la solution TRIS (pour tris(hydroxyméthyl)aminométhane) qui se trouve soit chargée positivement soit sous forme neutre (pKa de 8,2) : à pH élevé, la forme neutre est majoritaire. Comme la surface de silice est chargée négativement, à pH bas, un nombre plus important de TRIS positifs va occuper les sites d'adsorption de la silice car leur affinité avec la surface est plus grande que pour les TRIS neutres. En conséquence, un faible nombre de molécules d'arginine et de lysine s'adsorbent à la surface lorsque le pH est bas. Ce nombre augmente lorsque le pH augmente grâce de la diminution du nombre de TRIS positifs et l'augmentation du nombre de sites d'adsorption libres.

Dans le deuxième cas d'un tampon neutre ou négatif (ici MOPS, de l'acide 3-morpholino-1-propanesulfonique), le comportement des acides aminés sur la surface est plus complexe : le nombre d'acide aminés adsorbés commence par diminuer avec l'augmentation du pH puis, à partir d'un pH de 7,2, ce nombre augmente rapidement. Plusieurs phénomènes entrent donc en compétition. Le pKa du MOPS est 7,2 alors pour un pH inférieur au pKa, la forme neutre est majoritaire. Cette forme neutre a une plus grande affinité avec la surface de silice que la forme

chargée négativement et occupe un nombre important de sites d'adsorption. En augmentant le pH mais en restant sous un pH de 7,2, la quantité de MOPS neutres reste importante et le nombre de sites libres est toujours faible. Le nombre d'acides aminés adsorbés sur la surface diminue parce que la quantité de MOPS négatifs augmente et il y a une compétition d'affinité entre la surface de silice et les MOPS négatifs pour les acides aminés : il peut être plus facile pour un acide aminé de se lier à un MOPS négatif que de trouver un site d'adsorption libre. Pour un pH supérieur au pKa du MOPS, le nombre de MOPS neutres devient minoritaire et la quantité de sites libres pour l'adsorption des acides aminés augmente. Le nombre de MOPS négatifs augmente également mais il est possible pour le complexe acide aminé/MOPS négatif de s'adsorber sur la surface, ce qui fait augmenter le nombre total d'acides aminés adsorbés sur la surface.

Ces deux études montrent que comme lors d'un travail expérimental, le choix du solvant est primordial. De plus, la visualisation de la position des molécules par rapport à la surface permet de comprendre les phénomènes se déroulant à l'échelle atomique. Ces modélisations sont encore rares et les systèmes étudiés sont simples : les surfaces sont principalement composées d'un seul matériau. Cela laisse entrevoir un large domaine d'études pour mieux comprendre les phénomènes se déroulant à cette échelle. Dans l'application à la spectrométrie de masse qui a été présentée précédemment, l'étude de l'adsorption des molécules sur la surface, l'orientation de la molécule ou le choix du solvant, sont des paramètres à prendre en compte pour le signal final et la dynamique moléculaire peut permettre de mieux comprendre et éventuellement prédire certains phénomènes.

1.6.2.d Notre système

Les études par dynamique moléculaire des interactions entre des métabolites et un substrat sont rares et se concentrent sur la caractérisation des acides aminés, maillons des protéines, pour comprendre certains comportements des protéines à plus grande échelle. Les études montrent que les énergies d'adsorption des acides aminés sur une surface sont très dépendantes des propriétés d'hydrophobie et de charge des acides aminés et de la surface : il est donc nécessaire de trouver un modèle au plus proche de la réalité pour prendre en compte tous les phénomènes à l'échelle atomique et pouvoir en tirer des conclusions à l'échelle macroscopique. Il en est de même avec le solvant : la prise en compte des conséquences du pH et de la solution est primordial lors des études de dynamique moléculaire.

Nous avons élargi le groupe des métabolites étudiés en incluant d'autres métabolites que les acides aminés comme le glucose ou la caféine (voir le Tableau 1.3 pour l'ensemble des métabolites de l'étude), qui sont des molécules présentes dans le sang et donc qui ont une influence sur le comportement des autres métabolites. Notre hypothèse est qu'en spectrométrie de masse, nous avons besoin d'une bonne adsorption et d'une bonne désorption des métabolites. Il doit donc y avoir un équilibre entre les deux, qu'il est difficile de situer. L'étude de dynamique moléculaire a pour but de savoir s'il est possible de mieux comprendre cet équilibre en comparant les résultats de spectrométrie de masse à ceux des simulations, en particulier l'intensité de détection des métabolites en fonction de leur énergie d'adsorption, de leur surface de contact,

du nombre de contacts... Pour cela, nous avons repris les substrats de silice fonctionnalisés utilisés précédemment dans l'équipe (Figure 1.11) [185], que nous avons modifiés pour étudier plusieurs formes de silice : plane, en feuillets et poreuse avec un diamètre de 10 nm comme pour les substrats utilisés en spectrométrie de masse. Pour chaque système de silice, les quatre silanes, CH_3 court, CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ , présentés dans la section 1.4.4.c ont été greffés pour étudier les différences d'adsorption des métabolites en fonction des propriétés de la surface. Les systèmes et les résultats obtenus sont présentés dans le Chapitre 3.

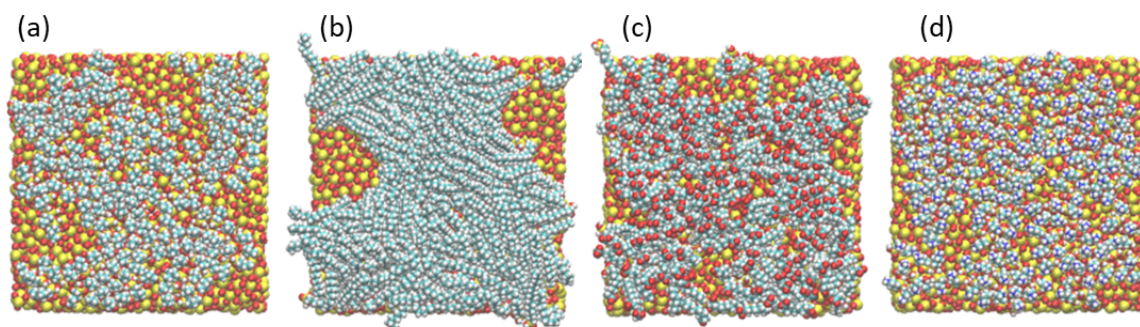


Figure 1.11 – Surface de silice fonctionnalisée par les silanes (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) COO^- , et (d) NH_3^+ . Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène. Image issue de [185]

1.7 Les métabolites caractéristiques du sepsis

Le choix des métabolites dans l'étude est important pour essayer de représenter au mieux les familles de biomarqueurs du sepsis. Nous avons commencé par sélectionner 14 métabolites, 11 sont biomarqueurs du sepsis et 3 sont communs dans le sang. Ces trois derniers métabolites ont été choisis car leurs propriétés physico-chimiques sont proches de celles des biomarqueurs, et donc seront probablement détectés en spectrométrie de masse si les métabolites biomarqueurs le sont. Ces 14 métabolites sont présentés dans le Tableau 1.3.

Métabolite	Statut	Masse (g/mol)	Charge globale à pH 7	LogP	Référence
Glycine	Sepsis	75,1	0	-3.41	[4, 5]
Cystéine	Sepsis	121,2	0	-2.79	[4, 5]
Carnitine	Commun	161,2	0	-5.48	
Acide urique	Sepsis	168,1	0	-1.54	[5]
Glucose	Sepsis	180,2	0	-2.93	[203, 204]
Caféine	Commun	194,2	0	-0.55	
Acide myristique	Sepsis	228,4	0	6,10	[17]
Glutathion	Sepsis	307,3	0	-4.89	[5]
Glutamine	Sepsis	146,1	-0,11	-4.00	[4, 5]
Méthionine	Sepsis	149,2	-0,11	-2,19	[4, 5, 18]
Phénylalanine	Sepsis	165,2	-0,11	-1,18	[4, 5]
Tryptophane	Sepsis	204,2	-0,11	-1.10	[5]
Créatine	Commun	131,1	-1	-2.86	
Arginine	Sepsis	174,2	0,89	-3.16	[4]

Tableau 1.3 – Premier groupe des métabolites de l'étude avec leurs propriétés physico-chimiques et leur charge dans le système.

Ces métabolites sont ceux que nous avons utilisés lors des simulations de dynamique moléculaire pour étudier les interactions avec les silanes (Chapitre 3). Cependant, ceux étudiés en spectrométrie de masse diffèrent légèrement. Parmi les 14, 12 ont été analysés en spectrométrie de masse. Les deux qui n'ont pas été utilisés dans cette étude sont la carnitine et l'acide myristique pour des problèmes logistiques de transport jusqu'à l'appareil de spectrométrie de masse à Grenoble. Le premier ne pouvait être transporté à cause des problèmes de stock et le deuxième n'était pas transportable jusqu'à Grenoble parce qu'il devait être conservé à -20°C . De plus, 13 nouveaux métabolites ont été ajoutés à l'étude suite à la publication de nouveaux papiers sur les biomarqueurs du sepsis, en particulier une revue basée sur une méta-analyse des études sur le sepsis [5]. Les analyses de spectrométrie de masse (Chapitres 4 à 6) ont donc été faites sur un panel de 25 échantillons, qu'il est possible de séparer en quatre groupes :

- les lipides ou fragment de lipides : α -glycérophosphocholine (α -GPC), C18 céramide, lysophosphatidylcholine 18:0 (LysoPC), lysophosphatidylglycérol 18:0 (LysoPG) et sphingomyéline ;
- les acides organiques : acide citrique, acide pyruvique et acide urique ;
- les acides aminés et leurs dérivés : alanine, arginine, citrulline, créatine, cystéine, glutamine, glycine, leucine, méthionine, phénylalanine, taurine, tryptophane et valine
- les autres : caféine, créatinine, glucose et glutathion.

Les 25 métabolites avec leur formule à pH 7 sont présentés dans Figure 1.12 et leurs propriétés physico-chimiques, ainsi que leur concentration sanguine pour les patients sains et leur évolution pour les patients atteints de sepsis sont présentés dans le Tableau 1.4.

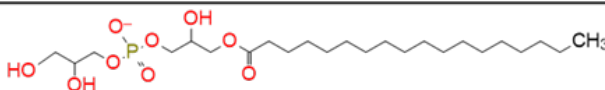
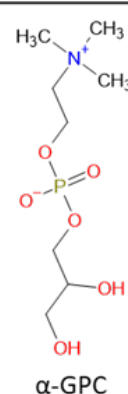
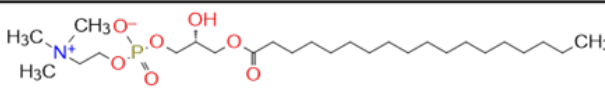
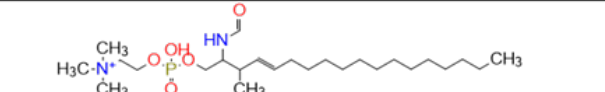
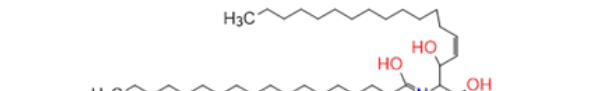
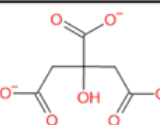
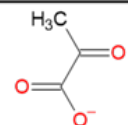
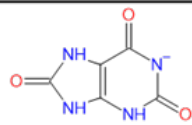
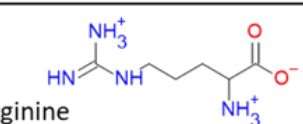
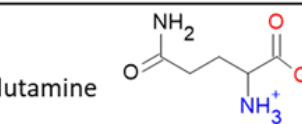
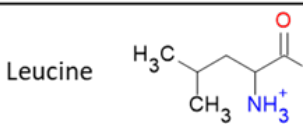
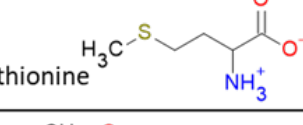
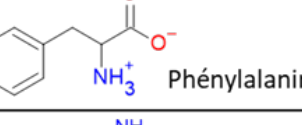
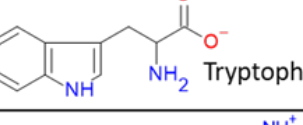
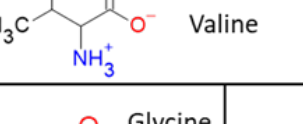
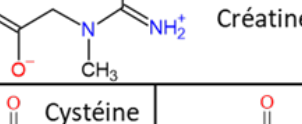
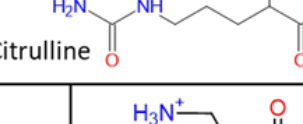
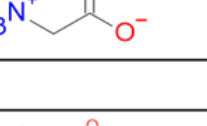
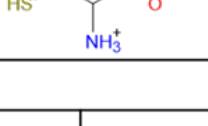
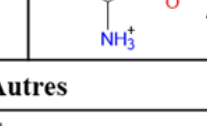
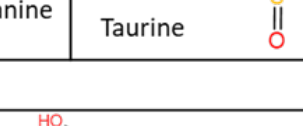
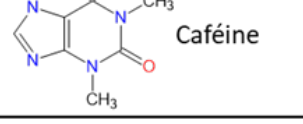
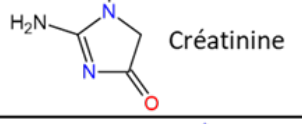
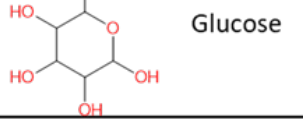
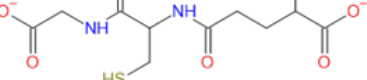
Lipides			
	Lyso PG		
	Lyso PC		
	Sphingomyéline		
	Céramide		
Acides			
	Acide citrique		Acide pyruvique
			Acide urique
Acides aminés et dérivés			
	Arginine		Glutamine
			Leucine
	Méthionine		Phénylalanine
			Tryptophane
	Valine		Créatine
			Citrulline
	Glycine		Cystéine
			Alanine
			
Autres			
	Caféine		Créatinine
			
			Glutathion

Figure 1.12 – Nom et formule chimique des métabolites utilisés dans l'étude à pH 7 dans les conditions physiologiques

Métabolite	Masse (g/mol)	LogP	Affinité protonique (kJ/mol)	Point isoléctrique	Charge globale à pH 7	Énergie d'ionisation (eV)	C° sain (µg/mL)	Tendance
α -GPC	257,2	-5,5	-	-	0	-	1,2	↘
Céramides	566,0	12,6	-	-	0	-	0,1	↘
LysolPC	523,7	2,1	-	-	0	-	26	↘
LysolPG	534,6	4,9	-	-	-1	-	34	
Sphingomyéline	764,1	0,4	-	7,8	0	-	-	
Acide citrique	192,1	-1,3	872,9	-	-3	-	-	
Acide pyruvique	88,1	0,1	-	-	-1	9,9	-	
Acide urique	168,1	-1,5	-	-	-0,5	8,2	50	
Alanine	89,1	-2,8	901,6	6,1	0	8,8	36	↘
Arginine	174,2	-3,2	1051,0	10,8	+1	9,1	4,7	↘
Citrulline	175,2	-3,9	-	6,1	0	-	6	↘
Créatine	131,2	-2,9	-	8,5	0	-	13	↘
Cystéine	121,2	-2,8	903,2	5,9	0	9,5	4	
Glutamine	146,1	-4,0	937,8	6,1	0	8,6	24	↘
Glycine	75,1	-3,4	886,5	5,8	0	8,8	21	↘
Leucine	131,2	-1,6	914,6	6,5	0	8,5	21	↘
Méthionine	149,2	-2,2	935,4	6,3	0	8,3	3	
Phénylalanine	165,2	-1,2	922,9	6,3	0	8,4	11	↘
Taurine	125,2	-2,6	-	3,8	0	-	7,8	↘
Tryptophane	204,2	-1,1	948,9	6,4	0	7,5	12	↘
Valine	117,2	-2,0	910,6	6,4	0	8,7	39	↘
Caféine	194,2	-0,5	-	-	0	8,0	5,3	
Créatine	113,1	-1,5	-	9,0	+0,7	-	10	↘
Glucose	180,2	-2,9	-	-	0	-	1800	
Glutathion	307,3	-4,9	-	2,8	-1	-	288	

Tableau 1.4 – Propriétés physico-chimiques du panel de 25 métabolites, les ordres de grandeurs de leur concentration moyenne dans le sang et la tendance de la concentration pour les patients atteints de sepsis. Les cases sont laissées blanches si la valeur n'est pas connue.

Nous considérons la grandeur LogP telle que $\text{LogP} = \text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$, avec C_{oct} et C_{eau} les solubilités d'une espèce chimique respectivement dans l'octane et dans l'eau. Elle caractérise l'hydrophilie d'une molécule : plus le LogP est petit (ou négatif), plus la molécule est hydrophile. Le point isoélectrique (pI) est le pH pour lequel la charge nette de la molécule est nulle. Ces deux valeurs sont obtenues à partir de *chemicalize* (Chemaxon) [205]. L'affinité protonique (AP) correspond à l'énergie de la réaction de captation d'un proton dans du gaz et permet d'estimer la basicité d'une espèce chimique en phase gazeuse (plus l'affinité protonique est élevée, plus la protonation de la molécule sera favorable). Les valeurs sont celles référencées sur le WebBook de chimie NIST [206], sauf pour l'acide citrique dont la valeur est issue de [207]. L'énergie d'ionisation est l'énergie nécessaire pour arracher un électron (de la plus haute énergie) d'une molécule en phase gazeuse (plus cette énergie est élevée, plus il sera difficile d'ioniser la molécule). Les valeurs sont aussi issues du WebBook du NIST [206] ou de l'article [208]. Les concentrations peuvent être variables et dépendantes de la méthode d'analyse. Ce sont donc des moyennes et la valeur varie d'un patient à un autre en fonction de son âge, de son sexe, de son poids, etc. De plus, en fonction de l'avancée de la maladie, les différences entre un patient sain et malade peuvent changer. Il est donc souvent nécessaire de comparer les résultats à un échantillon de référence. Enfin, dans le Tableau 1.5, nous présentons une étude faite par Su *et al.* [4] sur l'évolution de la concentration des acides aminés dans le plasma pour les patients atteints de sepsis après leur admission en soins intensifs. Les patients sont séparés en fonction de l'issue de la maladie : s'ils sont guéris ou non. Ces concentrations varient d'un jour à l'autre et l'évolution dépend des acides aminés. Pour certains métabolites comme la glycine, les différences sont principalement visibles au moment de l'admission en soins intensifs puis les deux groupes voient leur moyenne se rapprocher. À l'inverse pour des métabolites comme la taurine, la différence se fait principalement après plusieurs jours. Dans tous les cas, les différences restent assez faibles entre ces deux groupes, nous observons principalement des différences entre les patients sains et les patients malades en général. D'autres études se sont également intéressées à l'influence d'un traitement sur le profil des métabolites dans le plasma [209]. Ils ont montré qu'il était possible de déterminer dès 48h après le début du traitement si celui-ci allait être efficace grâce à la concentration de certains métabolites.

		Jour 1	Jour 3	Jour 5	Jour 7	Jour 10	Jour 14
Alanine	Survivant	28	37	29	30	28	30
	Non survivant	32	30	31	31	32	31
Arginine	Survivant	13	13	14	20	15	15
	Non survivant	11	13	14	12	13	11
Citrulline	Survivant	3	3	3	3	4	4
	Non survivant	2	2	3	3	3	3
Glutamine	Survivant	61	66	65	71	62	61
	Non survivant	65	61	60	64	61	59
Glycine	Survivant	19	20	22	24	23	22
	Non survivant	29	22	23	21	21	20
Leucine	Survivant	16	16	16	19	17	17
	Non survivant	14	16	17	18	16	16
Méthionine	Survivant	3	3	3	3	3	3
	Non survivant	3	3	3	3	2	3
Phénylalanine	Survivant	19	19	18	17	17	19
	Non survivant	19	27	24	24	24	23
Taurine	Survivant	13	13	13	15	18	19
	Non survivant	10	12	11	11	10	12
Tryptophane	Survivant	8	9	9	9	9	10
	Non survivant	7	7	8	8	8	7
Valine	Survivant	28	33	31	36	33	32
	Non survivant	25	30	27	30	29	29

Tableau 1.5 – Évolution de la concentrations (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) des acides aminés après l’admission des patients en soins intensifs pour les patients qui survivent au sepsis (survivant, $n = 20$) et ceux qui en meurent (non survivant, $n = 15$). Données issues de [4].

1.8 Conclusion du chapitre

Mon projet de thèse est donc la détection de métabolites biomarqueurs du sepsis en spectrométrie de masse grâce à des surfaces de silicium fonctionnalisées. Nous avons sélectionné 25 métabolites pour ce travail, 23 sont des biomarqueurs du sepsis et 2 sont des métabolites communs dans le sang. Ces métabolites, de propriétés physico-chimiques différentes peuvent être séparés en quatre groupes : les lipides, les acides organiques, les acides aminés et les autres ne rentrant dans aucun des trois catégories précédentes.

La détection des métabolites se fait par spectrométrie de masse, et en particulier avec deux méthodes ; le MALDI-MS et le DIOS-MS qui se basent sur l’ionisation des analytes grâce à un laser. La première a l’avantage d’être bien connue mais peut poser des problèmes pour l’étude de biomolécules de faible poids moléculaire à cause de la présence de la matrice organique pour aider l’ionisation. Le DIOS-MS n’utilise pas cette matrice mais uniquement la nanostructuration pour ioniser les analytes tout en gardant des performances proches du MALDI-MS. En revanche,

très peu d'études ont été faites sur la détection de biomolécules en milieu complexe et encore moins sans pré-traitement des échantillons.

Pour extraire les métabolites nous utilisons du silicium poreux fonctionnalisé par quatre silanes différents : CH_3 court, CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ dont il a été montré que la présence permettait d'améliorer la sensibilité et parfois la sélectivité des mesures en spectrométrie de masse. Leurs propriétés physico-chimiques, comme leur longueur de chaîne alkyle et leur terminaison chimiques, ont pour objectif d'adsorber et de détecter des métabolites différents en fonction des surfaces et d'obtenir un profil élargi de l'échantillon.

Enfin, en parallèle, nous modélisons le système métabolites/silanes pour étudier les interactions et l'adsorption des métabolites pour essayer de relier ce phénomène aux résultats de spectrométrie de masse, ce qui n'a jamais été fait.

Développement des procédés de silanisation - Création de fours pour une silanisation en phase gazeuse

2.1 Introduction

La fonctionnalisation de surface, en particulier par des silanes, est une méthode largement utilisée pour améliorer la sensibilité des mesures de spectrométrie de masse MALDI et DIOS. La modification de la chimie de la surface permet de cibler certaines propriétés des métabolites et ainsi de mieux détecter un groupe plutôt qu'un autre. Nous avons donc choisi plusieurs silanes, CH_3 court CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ , avec différentes propriétés (longueur de la chaîne alkyle et groupement terminal) pour étudier leur influence sur la détection de métabolites. Ces silanes sont présentés dans le chapitre précédent, dans le Tableau 1.1 à la page 34.

À l'INL, dans l'équipe DSE, la silanisation est un procédé connu et utilisé pour fonctionnaliser des surfaces et développer des capteurs biologiques. Un protocole de silanisation en phase liquide, qui peut se décliner pour plusieurs silanes, dont ceux de notre étude, existe et un four de silanisation en phase gazeuse permet de fonctionnaliser des surfaces avec des silanes COO^- spécifiquement. Développer des protocoles en phase gazeuse permet de s'affranchir des solvants, en particulier pour des échantillons de grande taille pour lesquels la quantité de solvant nécessaire peut être importante.

Le premier objectif de ma thèse a été de développer des protocoles de silanisation en phase gazeuse, afin de fonctionnaliser pour la première fois dans l'équipe du silicium poreux (pores de $1 \mu\text{m} \times 10 \text{nm}$) de façon reproductible et conforme. Pour cela, j'ai commencé par développer les protocoles sur le silicium plan. J'ai cherché à obtenir les mêmes angles de contact pour une goutte d'eau et la même densité surfacique en silanes sur les substrats fonctionnalisés en phase liquide et en phase gazeuse. Les protocoles en phase liquide m'ont donc servi de référence. Ensuite, les procédés ont été transférés sur du silicium poreux.

Les contraintes nous ont amenés à créer trois fours, chacun avec des propriétés différentes, et chacun dédié à un silane différent pour leur utilisation finale, chaque four pouvant être mis sous vide pour travailler en atmosphère contrôlée. Dans ce chapitre, nous présentons les trois fours avec à chaque fois le développement du protocole de silanisation associé et la caractérisation des surfaces fonctionnalisées (planes et poreuses) par angle de contact, XPS et ToF-SIMS. L’XPS a permis d’estimer la densité surfacique des silanes et le ToF-SIMS la conformité des pores. Les limites de chaque four et les idées ayant mené à la création du four suivant sont ensuite discutées. Nous montrons que les trois fours permettent de créer une monocouche de silane reproductible et conforme pouvant ensuite être utilisée pour les mesures de spectrométrie de masse.

2.2 Matériel et méthodes de caractérisation

2.2.1 Les fours de silanisation développés

Trois fours ont été créés avec Thomas Géhin (Ingénieur de recherche CNRS à l’INL) dans le cadre du projet de l’ANR PORIDG et de ma thèse. L’objectif de ces fours est de pouvoir créer des monocouches de silane conformes à la surface d’échantillons de silicium poreux : il faut que la monocouche soit la plus uniforme possible sur toute la surface spécifique interne des pores. Ils ont été imaginés dans une optique de pouvoir potentiellement industrialiser le procédé. Pour cela, les critères que nous nous sommes fixés pour les fours sont :

- Pouvoir être mis sous vide pour éviter les contaminations dues à l’air lors du processus de silanisation et avoir une silanisation conforme ;
- Avoir une arrivée d’azote, un gaz neutre, pour pouvoir remplir la chambre et mettre le four à pression atmosphérique ;
- Avoir une arrivée de silane qui limite son contact avec l’air. Le silane réagit en présence d’eau, il est donc nécessaire qu’il ne soit pas en contact avec les molécules d’eau présentes dans l’air ;
- Pouvoir être chauffé à 200°C, une température supérieure à la température de silanisation de 150°C, permettant le nettoyage du four avant son utilisation ;
- Avoir une température uniforme dans la chambre ;
- Utiliser la quantité de silane la plus faible possible.

2.2.2 Substrats élaborés et utilisés

Sauf indication contraire, les échantillons de silicium plan sont issus de wafers de silicium Si(100) polis. Les wafers de silicium poreux ont été achetés chez SiLiMiXT (Tours, France). Les pores (10 nm de diamètre, 1 µm de profondeur et 60 % de porosité) ont été obtenus par gravure électrochimique de substrats de silicium (150 mm de diamètre, type P, 10-20 mOhms.cm et 508 µm d’épaisseur).

Pour le Chapitre 5, nous avons créé nos propres échantillons pour une étude sur l’influence de la porosité en DIOS-MS. Ces échantillons ont été fabriqués à partir de wafers de silicium (50 mm de diamètre, type P, 1-5 mOhms.cm et 300 µm d’épaisseur) par gravure électrochimique

avec l'aide de Céline Chevalier à l'INL. Les pores mesurent également 10 nm de diamètre mais ils ont une porosité de 35 %. Trois profondeurs ont été fabriquées : 0,3 μm , 1 μm et 2 μm . Il sera précisé en préambule du paragraphe lorsque ces échantillons seront utilisés.

2.2.3 Silanes et solvants utilisés

Les silanes 3-aminopropyldiméthyléthoxysilane (NH_3^+), n-propyldiméthylmétoxysilane (CH_3 court) et octadécyldiméthylmétoxysilane (CH_3 long) ont été achetés chez ABCR (Karlsruhe, Germany). Le Tert-butyl-11-(diméthylamino(diméthyl)silyl)undécanoate (COO^-) a été synthétisé selon le protocole de Dugas *et al.* [182]. Le tétrahydrofurane (THF), le pentane, l'éthanol, l'acétone, le dichlorométhane, l'isopropanol, l'acide sulfurique, l'acide formique, le peroxyde d'hydrogène, et l'ammoniaque ont été achetés chez Sigma-Aldrich.

Les silanes étaient conservés sous atmosphère neutre dans une boîte à gant. Lorsque nécessaire, nous avons prélevé la quantité de silane requise pour l'injecter soit dans le four, soit dans le récipient servant de stockage intermédiaire de silanes (dénommé "bulleur" par la suite).

2.2.4 Présentation des techniques de caractérisation des monocouches de silanes

2.2.4.a Angle de contact

La mesure des angles de contact a été réalisée à l'aide du logiciel WinDrop de GBX. Des gouttes de 1 μL d'eau ultrapure ont été déposées sur les surfaces fonctionnalisées et l'angle de contact avec ces dernières a été mesuré. Pour chaque échantillon, une moyenne des angles de contact mesurés sur quatre gouttes déposées aléatoirement a été calculée, et c'est cette valeur qui est présentée dans la suite.

2.2.4.b XPS

Les mesures ont été réalisées avec un spectromètre VSW équipé d'une source X monochromatique ($\text{Al K}\alpha$ 1486,6 eV) pour lequel l'angle entre le rayon incident et le détecteur est l'angle magique. La résolution angulaire est de 3° . L'angle entre la surface et le détecteur était fixé soit à 90° , soit à 30° . L'angle de 30° permet une analyse plus en surface de l'échantillon (environ 5 nm contre 10 nm avec un angle de 90°). La résolution en énergie est de 0,2 eV.

Dans les deux cas, l'analyse des données a été effectuée avec le logiciel CasaXPS. L'énergie de liaison du $\text{Si}(-\text{O})_4$ était fixée à 104 eV. Une base de type Shirley a été retirée sur les spectres de Si 2p et O 1s, lorsque les éléments viennent du solide et une base linéaire a été retirée pour le spectre de C 1s et N 1s correspondant à des éléments de surface. Les pics ont été déconvolués avec des courbes de Gauss-Lorentz de répartition 70/30. Nous avons également fixé des contraintes sur le pic du Si métallique sur le spectre fin haute résolution du niveau de cœur Si 2p : le doublet Si 2p_{1/2} et Si 2p_{3/2} est séparé en énergie de 0,6 eV, les deux pics ont la même largeur à mi-hauteur et le premier a une aire égale à la moitié de celle du deuxième. Les énergies des sous-oxydes ont

été obtenues dans [210] et celle du pic Si(-O)₁ est issue de [174] avec un intervalle de fluctuation de ±0,3 eV. Enfin, l'aire du Si(-O)₁ a été encadrée pour vérifier le rapport C/Si des silanes avec une erreur inférieure à 10 %.

2.2.4.c ToF-SIMS

Les mesures ToF-SIMS ont été réalisées au CEA Leti (Grenoble) par Vincent Jousseume et Marc Veillerot. Elles ont été obtenues avec un ToF-SIMS V de ION-TOF. Des ions Bi³⁺ à 15 keV ont été utilisés comme source primaire pour l'analyse (sur une surface de 80 x 80 μm²) et la pulvérisation cathodique a été obtenue en utilisant des ions Cs⁺ à faible énergie (500 eV, balayage d'une aire de 400 x 400 μm²).

2.3 Développement et caractérisation des protocoles de silanisation

Nous allons maintenant étudier la mise en place des protocoles de silanisation en phase gazeuse. Dans un premier temps, nous présentons la fonctionnalisation en phase liquide et la caractérisation des surfaces qui nous serviront de référence lors de la fonctionnalisation en phase gazeuse. Ensuite, nous présentons les différents fours, la mise au point des protocoles, leurs avantages et leurs inconvénients et ce qui nous a amené à créer plusieurs designs pour améliorer la fonctionnalité du réacteur.

Avant de commencer la présentation des différents protocoles de silanisation, nous commençons par présenter les spectres d'XPS de surfaces de silicium non modifiées qui serviront de référence dans la suite. Dans les figures 2.1 et 2.2, le survol et le spectre fin des niveaux de cœur C 1s, O 1s, N 1s et Si 2p pour des substrats de silicium respectivement plan et poreux sont présentés. La localisation des pics est donnée dans le Tableau 2.1.

		O 1s			Si 2p		
		O-Si	Si 2p3/2	Si 2p1/2	Si ₂ O	SiO	SiO ₂
Plan	E (eV)	533,3	99,9	100,5	100,9	102,7	104,0
	% at	40,5	23,3	11,7	5,8	1,8	16,9
Poreux	E (eV)	533,4	99,7	100,3	100,8	102,2	104,0
	% at	51,1	10,8	5,4	3,2	1,2	28,3

Tableau 2.1 – Énergies de liaison en eV des pics de déconvolution des substrats de silicium plan et poreux passés à l'UV-Ozone 30 min.

Dans les deux cas, le survol nous indique la présence d'oxygène et de silicium. Des spectres fins haute résolution des éléments présents sur les silanes (N 1s et C 1s) ont ensuite été effectués. Dans les deux cas, aucun signal n'apparaît, nous pouvons donc conclure que la surface n'est pas contaminée. Le spectre fin du O 1s indique la présence de l'oxygène qui compose la couche de

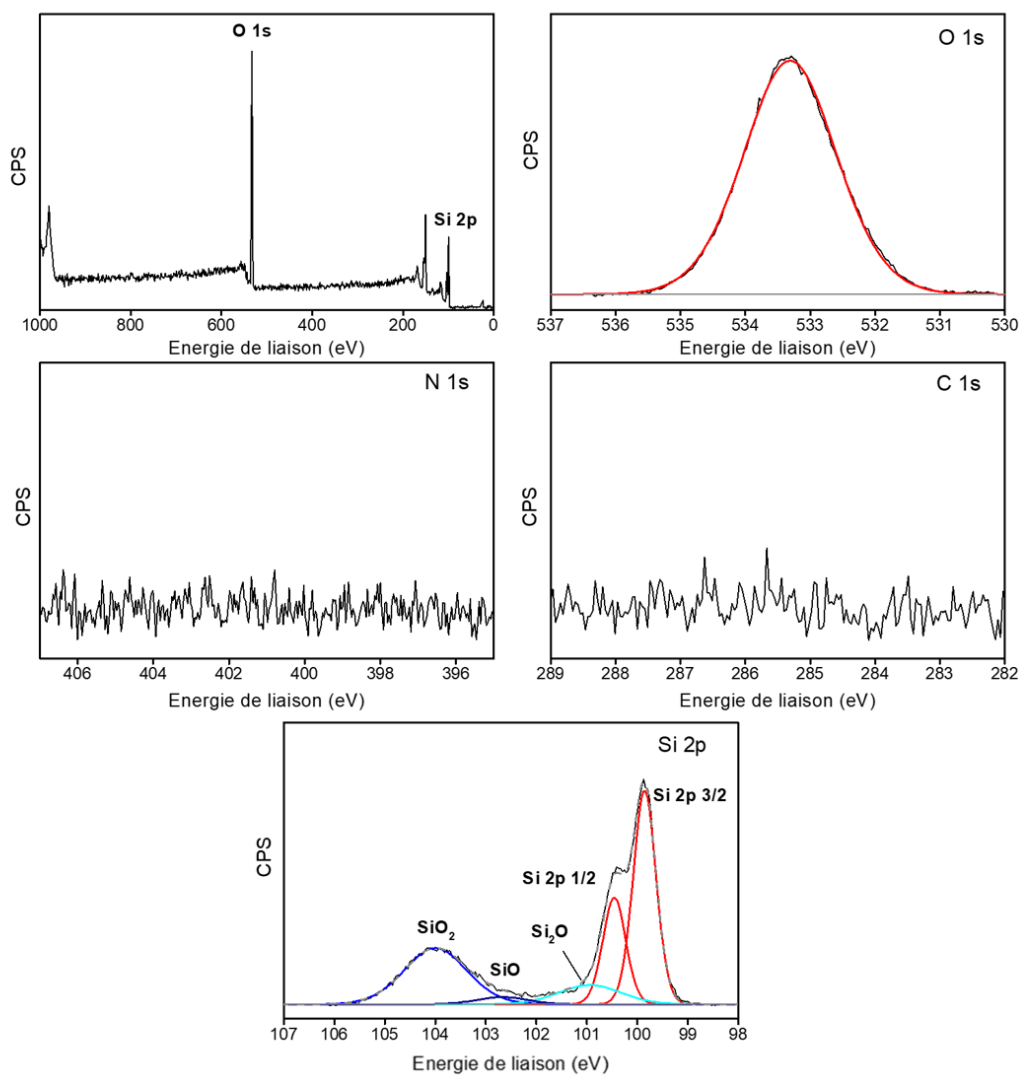


Figure 2.1 – Spectres XPS d’un substrat de silicium plan nettoyé 30 min à l’UV-ozone : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 90°.

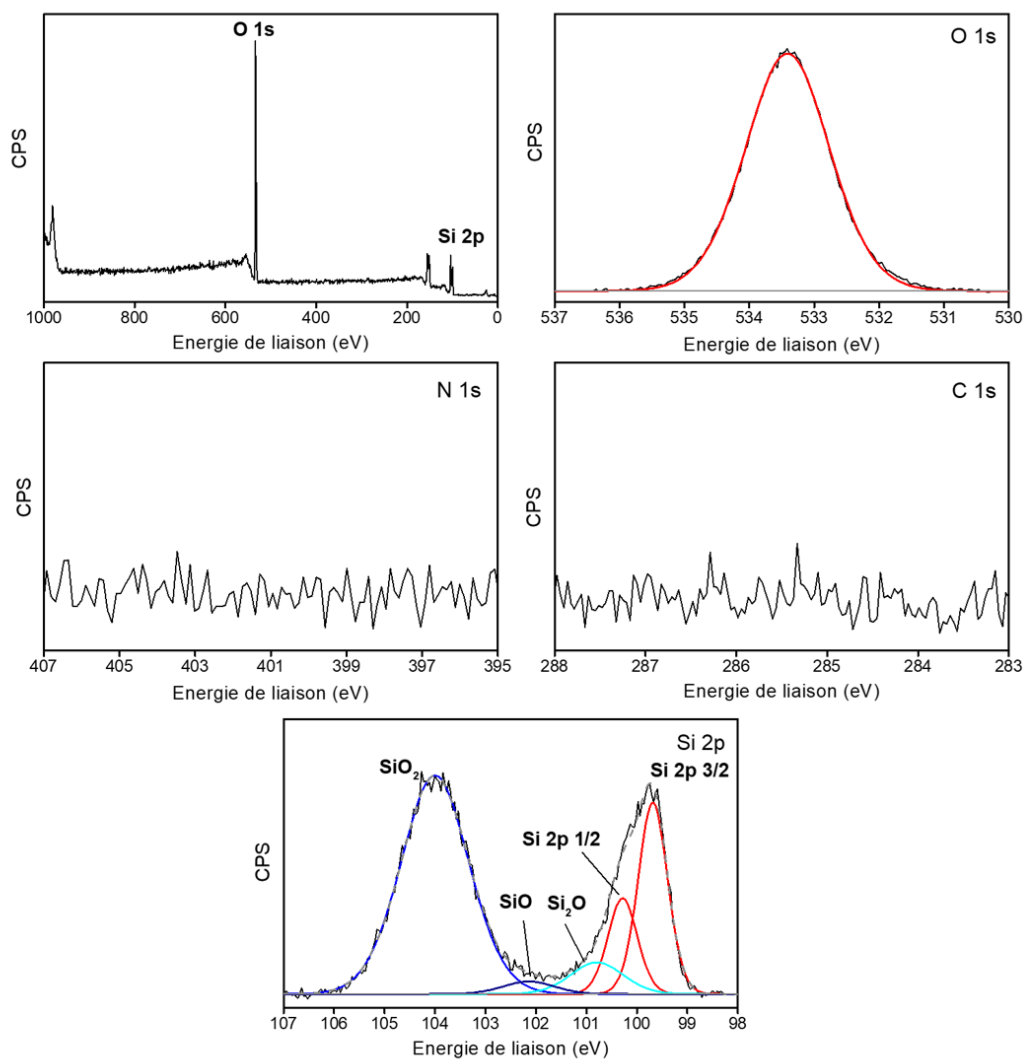


Figure 2.2 – Spectres XPS d'un substrat de silicium poreux nettoyé 30 min à l'UV-ozone : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 90°.

silice à la surface de l'échantillon. Enfin, la déconvolution du spectre Si 2p permet d'identifier le doublet du silicium métallique (Si 2p_{1/2} et Si 2p_{3/2}) et des oxydes du silicium, en particulier composant le SiO₂ (104,0 eV), le SiO (102,7 pour le plan et 102,2 pour le poreux) et le Si₂O (100,9 pour le plan et 100,8 pour le poreux).

2.3.1 Silanisation en phase liquide

2.3.1.a Protocole de silanisation

Le protocole de fonctionnalisation en phase liquide est un protocole utilisé à l'INL par l'équipe DSE. Les substrats sont d'abord nettoyés à la solution piranha (mélange d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène 7:3) pendant 30 min puis sont traités à l'UV-ozone sous un flux de dioxygène à 25°C pendant 30 min. Ces deux nettoyages permettent de retirer les contaminations organiques et d'activer la surface en créant des groupements hydroxyles. Les substrats sont ensuite placés dans un réacteur sous flux d'azote et chauffés à 150°C pendant 4 heures. Ensuite, les substrats sont refroidis puis immergés dans une solution de pentane anhydre contenant 90 µL de silanes pour des échantillons de 10 cm². Après évaporation du pentane, les échantillons sont chauffés à 150°C pendant la nuit pour que la réaction ait lieu. Enfin, après le refroidissement des échantillons, ceux-ci sont rincés sous ultrasons dans une solution de THF pendant 10 min puis dans une solution d'eau ultrapure pendant 10 min également.

2.3.1.b Caractérisation des échantillons

Angle de contact L'angle de contact permet une première analyse qualitative des échantillons pour estimer si la silanisation a fonctionné. Dans la suite, pour le développement des protocoles en phase gazeuse, l'angle de contact sera la première caractérisation des échantillons lors de leur sortie du réacteur. Pour cela, nous avons pris comme référence les angles obtenus lors de la fonctionnalisation en phase liquide. Les angles de contact sont présentés dans la figure 2.2. Ces angles sont en accord avec les angles de contacts de la littérature présentés à la page 37.

CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	SiO ₂
80°	98°	78°	62°	0°

Tableau 2.2 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation en phase liquide sur du silicium plan.

XPS La caractérisation des surfaces de silicium plan obtenues avec la silanisation en phase liquide a été réalisée avec l'XPS de la plateforme Nanolyon à l'INL sur des substrats SiO₂ (20 nm)/aluminium (200 nm)/silicium préparés par dépôt physique par phase vapeur (PVD) grâce à une plateforme 200 mm Applied Materials Endura 500 (CEA-LETI). Les mesures sont donc légèrement différentes de celles présentés précédemment, avec en particulier, l'absence du doublet de silicium dû à l'épaisseur de la couche de silice. Les échantillons ont ensuite été fonctionnalisés avec les quatre silanes puis analysés en XPS. Les résultats sont présentés dans les Figures 2.3

à 2.6. Les pourcentages atomiques et les énergies de liaison sont résumés dans le Tableau 2.3. Ces résultats ont été publiés dans Lecot *et al.* en 2020 : Arrangement of Monofunctional Silane Molecules on Silica Surfaces : Influence of Alkyl Chain Length, Head-Group Charge, and Surface Coverage, from Molecular Dynamics Simulations, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy dans le Journal of Physical Chemistry C [6].

Sur chaque surface silanisée, trois pics distincts correspondant à C 1s, O 1s et Si 2p sont présents. La déconvolution du spectre haute résolution de Si 2p permet de faire apparaître deux pics, le premier à 104,0 eV correspond à l'oxyde SiO₂ et le deuxième, plus petit, à l'oxyde Si(-O)₁, l'atome de silicium présent sur les silanes est lié à un atome d'oxygène. À la différence du spectre de SiO₂ pur (Figure 2.1), le doublet du silicium métallique n'est pas visible parce que la profondeur d'analyse (environ 10 nm) est plus petite que la couche de silice déposée en PVD (20 nm). La présence du pic de Si(-O)₁ permet de vérifier la bonne fonctionnalisation des échantillons, le rapport C 1s/Si(-O)₁ est cohérent avec les valeurs théoriques obtenues à partir des formules chimiques des silanes (5 atomes de carbone pour le CH₃ court et le NH₃⁺, 20 pour le CH₃ long et 13 pour le COO⁻). Le rapport Si 2p/O 1s est autour de 1,6 (±3 %) pour toutes les surfaces. Ce rapport est inférieur à la valeur stœchiométrique qui est de 2. La différence pourrait en partie venir de la présence de sous-oxydes dans le pic de silicium, qu'il n'est pas possible de déconvoluer simplement du reste du pic de SiO₂. Dans le cas d'une surface fonctionnalisée par des silanes NH₃⁺, la déconvolution permet de séparer le signal du C 1s en deux pics, probablement dus aux liaisons C-C et C-N sur le silane. En revanche, aucun pic n'était visible autour de 400 eV pour le niveau de cœur N 1s, un niveau qui est difficilement observable avec notre XPS sur ce type de surfaces fonctionnalisées. De même, il n'a pas été possible de déconvoluer la fonction COOH des silanes COO⁻ sur le spectre du niveau de cœur O 1S.

		O 1s		C 1s		Si 2p	
		O-Si	C-C	C-N	SiO ₂	Si(-O) ₁	
CH₃ court	E(ev)	533,3	285,2	-	104,0	102,1	
	% at	55,5	7,5	-	35,6	1,4	
CH₃ long	E(ev)	533,2	285,4	-	104,0	102,1	
	% at	53,4	10,5	-	35,6	0,5	
COO⁻	E(ev)	533,3	285,4	-	104,0	102,0	
	% at	54,8	9,4	-	35,1	0,7	
NH₃⁺	E(ev)	533,2	285,4	286,3	104,0	102,0	
	% at	52,8	9,0	2,2	33,8	2,2	

Tableau 2.3 – Pourcentages atomiques et énergies de liaison (eV) obtenus en XPS pour les quatre monocouches de silane sur du silicium plan avec la fonctionnalisation en phase liquide.

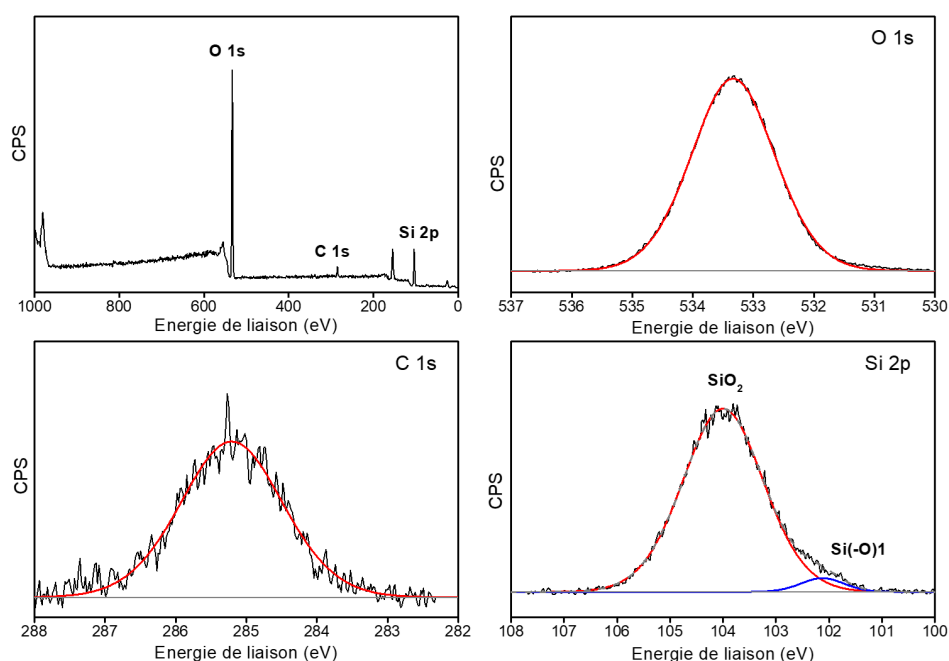


Figure 2.3 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes CH_3 court obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 90° .

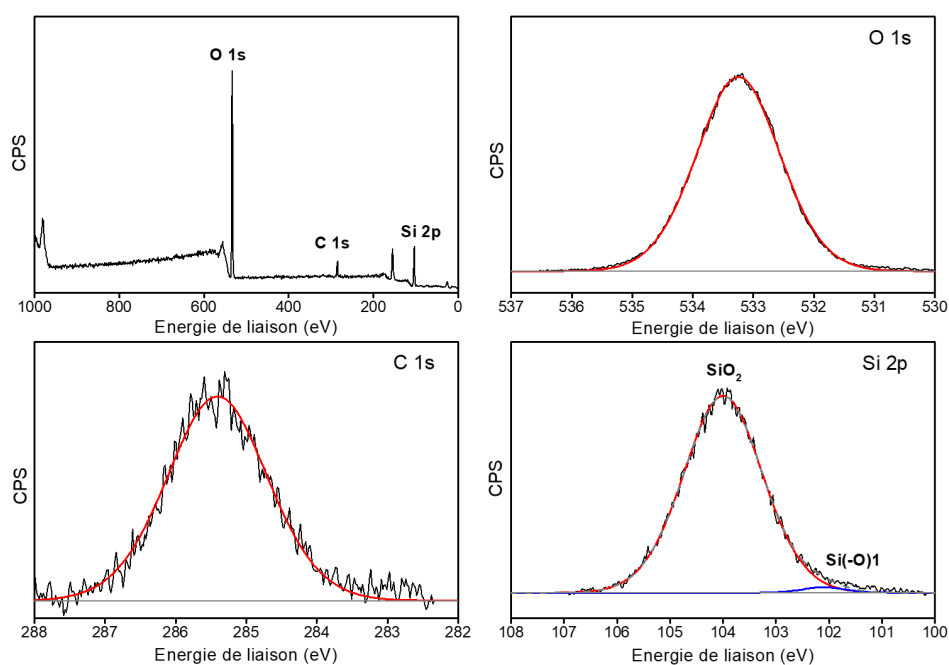


Figure 2.4 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes CH_3 long obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 90° .

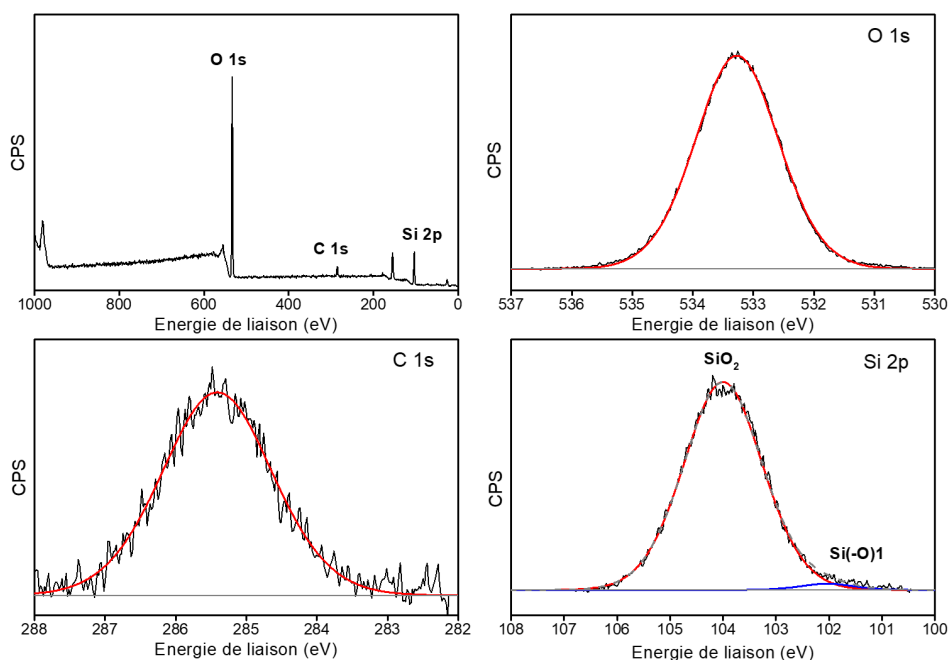


Figure 2.5 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes COO^- obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 90° .

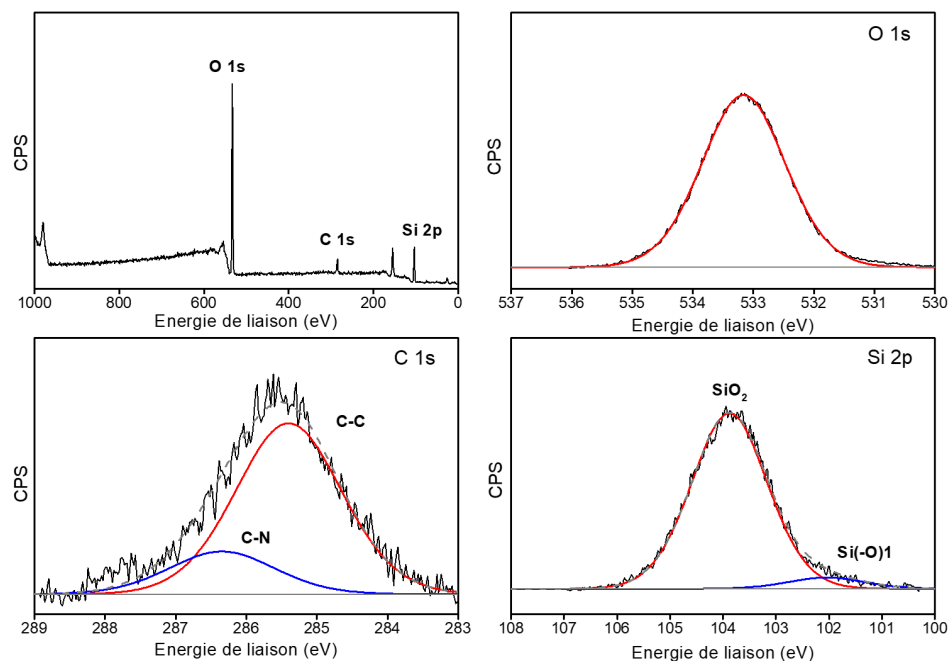


Figure 2.6 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes NH_3^+ obtenue par fonctionnalisation en phase liquide sur de la silice plane : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. Le N 1s n’était pas visible, comme dans la Figure 2.1. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 90° .

La couverture en silanes de la surface peut être estimée à partir de la formule [Shircliff] :

$$\Gamma_{\text{silanes}} = \frac{A_{\text{Si(-O)}_1}}{A_{\text{Si } 2p}} n_{\text{SiO}_2} z \quad (2.1)$$

où $A_{\text{Si(-O)}_1}$ et $A_{\text{Si } 2p}$ correspondent respectivement aux aires normalisées du pic de Si(-O)_1 et de $(\text{Si(-O)}_1 + \text{Si(-O)}_4)$, n_{SiO_2} est la concentration moléculaire de la silice (22 nm^{-3}) et z la profondeur d'analyse qui peut être approximée par $3\lambda \sin \theta$ avec λ le libre parcours moyen de la silice, soit environ $3,7 \text{ nm}$ [175] et θ l'angle entre le détecteur et la surface. On trouve une couverture de la surface autour de 3 nm^{-2} pour le CH_3 court, le CH_3 long et le COO^- et autour de 8 nm^{-2} pour le NH_3^+ . Il semble donc que la couverture en silane soit indépendante de la longueur de la chaîne alkyle. En revanche, avec la terminaison amine, la densité est près de trois fois plus élevée que pour le reste des silanes. Les paramètres de silanisation (protocole de silanisation et quantité de silane) étant identiques pour tous les silanes, cette différence ne vient pas d'une modification du protocole. Cela pourrait être expliqué par un effet catalytique de la terminaison amine qui favorise la réaction de condensation sur la surface de silice et ainsi augmente la densité de silanes [180]. Une densité de 3 nm^{-2} sur une surface de silice est une valeur classique de densité pour une monocouche de silanes [211].

2.3.2 Silanisation en phase gazeuse : COO^-

2.3.2.a Protocole de silanisation

La fonctionnalisation en phase gazeuse utilisée dans l'équipe DSE pour les échantillons de silicium est la suivante : premièrement les échantillons sont immergés dans une solution piranha pendant 30 min puis rincés à l'eau ultrapure. Ensuite, les substrats sont chauffés dans un four sous vide à 140°C . 1 mL de silane COO^- est introduit dans la chambre réglée à une pression de 8.10^{-2} mbar et la réaction est laissée pendant 12h à 140°C . Les échantillons sont ensuite rincés au THF puis à l'eau ultrapure pendant 10 min. Pour la déprotection des échantillons et l'activation du groupe carboxyle, l'échantillon fonctionnalisé est immergé dans de l'acide formique pendant 7h. Les échantillons sont ensuite rincés au dichlorométhane puis à l'eau pendant 10 min. La déprotection est réalisée la veille pour la caractérisation et au maximum une semaine avant les mesures de spectrométrie de masse.

2.3.2.b Caractérisation des échantillons fonctionnalisés

XPS sur du silicium plan Nous avons comparé la couverture en silane obtenue avec cette fonctionnalisation par rapport à la fonctionnalisation en phase liquide. Le survol et le spectre fin du Si 2p sont présentés dans la figure 2.7. Les spectres fins des niveaux de cœur C 1s et Si 2p ne sont pas montrés ici. Aucune pollution n'est observée pour ces deux éléments. Nous avons placé le détecteur à 30° de la surface pour sonder une profondeur moins grande (environ 5 nm contre 10 nm dans le cas d'un détecteur à la verticale) afin de maximiser le signal venant des silanes et limiter le signal du substrat de silicium. Dans la suite, tous les spectres d'XPS présentés ont été réalisés avec cet angle de détecteur.

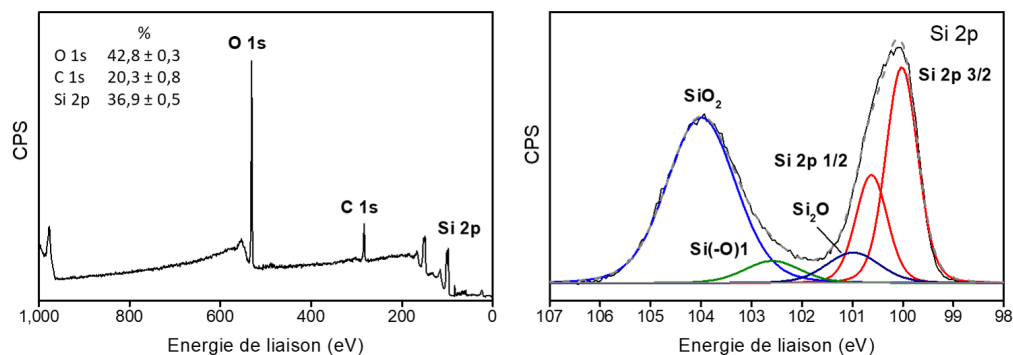


Figure 2.7 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes COO^- sur du silicium plan obtenue avec le protocole de Phaner-Goutorbe *et al.* [157] : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

On observe le doublet du silicium métallique Si 2p_{1/2} et Si 2p_{3/2} correspondant au Si bulk et trois pics correspondants à des oxydes du silicium SiO_2 , Si_2O et $\text{Si}(-\text{O})_1$. Les deux premiers sont la contribution de la couche de silice en surface du substrat et le dernier à l’atome de silicium présent sur le silane. À partir de l’équation 2.1 à la page 71, on peut estimer la couverture en silane avec cette méthode de 4 nm^{-2} , légèrement supérieure à la valeur de 3 nm^{-2} obtenue en phase liquide. Ce protocole permet donc une fonctionnalisation des échantillons plans aussi bonne, peut-être meilleure que celle en milieu liquide. Il est cependant difficile d’affirmer que cette différence est significative car plusieurs approximations sont faites dans l’équation 2.1, en particulier, l’effet d’atténuation des électrons dans la couche de SiO_2 n’est pas prise en compte et le libre parcours moyen des électrons dans la monocouche de silanes est supposé identique à celui dans la silice.

XPS sur du silicium poreux Les résultats sont présentés en figure 2.8. Les pourcentages atomiques et les énergies de liaison associées à chaque pic sont donnés dans le Tableau 2.4.

On observe des pics pour le C 1s, le O 1s et le Si 2p. Dans le cas du Si 2p, comme avec le silicium plan, la déconvolution du spectre indique la présence du silicium métallique et de deux oxydes. Ces pics sont attribués au SiO_2 et au $\text{Si}(-\text{O})_1$ correspondant au silicium du silane. Le rapport C 1s/ $\text{Si}(-\text{O})_1$ de 13,1 est en accord avec la stœchiométrie du silane pour lequel le rapport C/Si est égal à 13, il n’y a donc pas de contamination organique sur la surface. Enfin, la densité de silane est estimée à $5,4 \pm 0,1 \text{ nm}^{-2}$, une valeur supérieure à celles obtenues sur le silicium plan, le protocole de silanisation est donc adapté à notre étude.

2.3.3 Silanisation en phase gazeuse avec le four 1 : CH_3 long

2.3.3.a Présentation du four n°1

La photo du four n°1, ainsi qu’un schéma de son fonctionnement sont présentés en Figure 2.9. Le système est composé d’un four commercial Vacutherm Vacuum oven (Thermo Scientific) sur lequel ont été ajoutées une arrivée d’azote et une sortie vers une pompe. Les vapeurs de silane

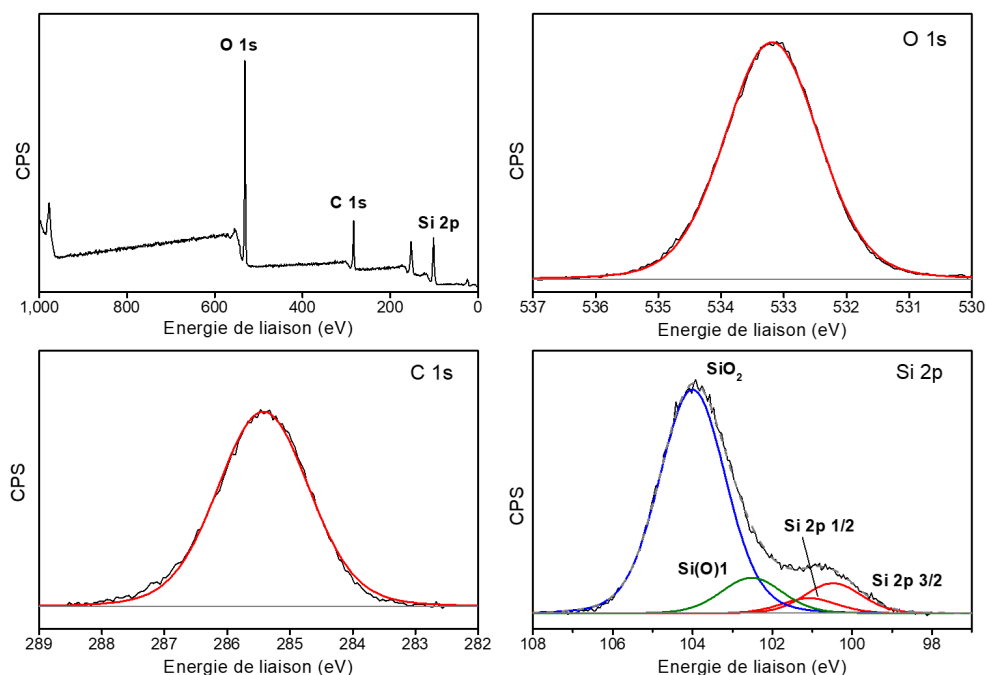


Figure 2.8 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes COO^- sur du silicium poreux obtenue avec le protocole de Phaner-Goutorbe *et al.* [157] : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

	O 1s	C 1s	Si 2p			
	O-Si	C-C	Si 2p _{3/2}	Si 2p _{1/2}	Si(-O) ₁	SiO ₂
E (eV)	533,2	285,4	100,0	100,6	102,5	104,0
% at	44,3	30,9	2,2	1,1	2,8	18,9

Tableau 2.4 – Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d’un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes COO^- .

sont mélangées à l'azote grâce à un système de bulleur avant d'être injectées dans la chambre : l'azote traverse un tube contenant le silane liquide chauffé (le bulleur), créant ainsi des bulles de silane qui sont ensuite entraînées dans la chambre. Il est possible de contourner le bulleur pour remplir le four d'azote. La tuyauterie est maintenue à la température voulue grâce à des cordons chauffants enveloppés dans de l'aluminium. Dans la version initiale du four, deux bulleurs étaient présents avec pour objectif de pouvoir mélanger les silanes dans la chambre. Cette fonctionnalité a finalement été retirée pour se concentrer sur la création d'une monocouche uniforme et limiter le nombre de tuyaux à chauffer.

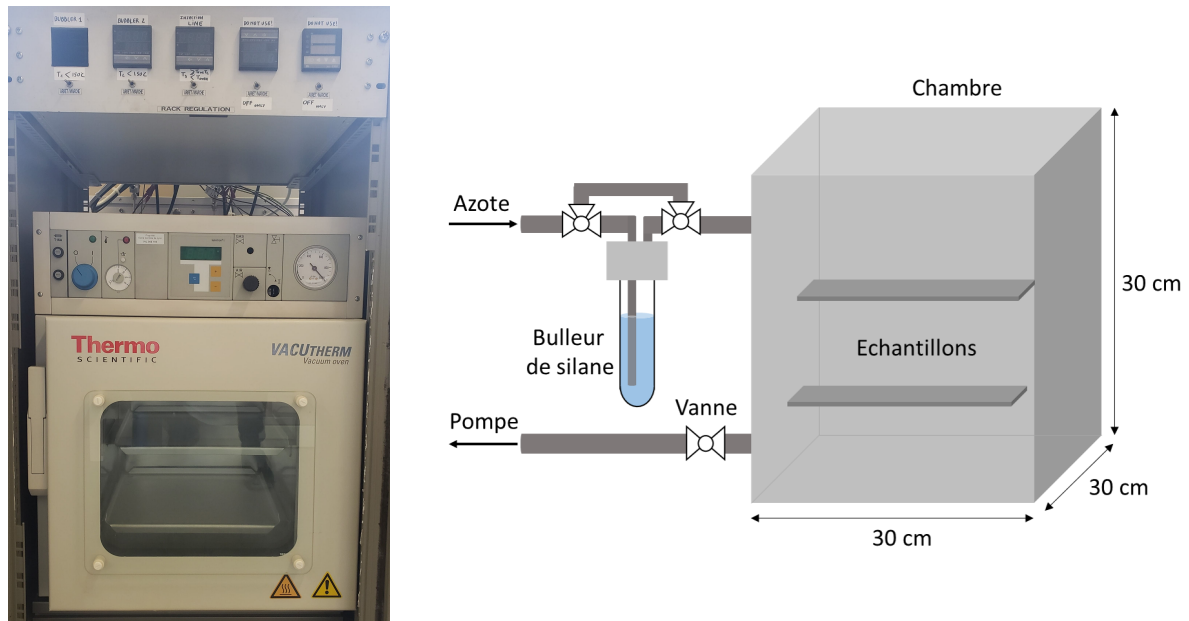


Figure 2.9 – Image du four n°1 et schéma simplifié de son fonctionnement.

La pression est régulée grâce à un vacuomètre placé à la sortie du four et la température grâce à des sondes de température placées au niveau des cordons chauffants autour du bulleur et de la ligne d'injection entre le bulleur et le four. Le four a un système de chauffage intégré et la régulation de sa température peut être faite grâce à ce système.

Le four a une capacité de silanisation d'une surface totale d'environ $0,2 \text{ m}^2$, pour un volume total de $0,03 \text{ m}^3$ et le volume du bulleur est de 5 mL . Dans la suite, nous essayons de minimiser la quantité de silane utilisée lors de la silanisation.

2.3.3.b Développement du protocole de silanisation

Structure générale du protocole Pour créer un protocole de silanisation efficace, il a fallu ensuite déterminer les paramètres lors des différentes étapes :

- Étape 1 : Dégazage du four à vide à une température supérieure à 180°C pendant plus d'une heure pour nettoyer le four et retirer les éventuelles contaminations ;
- Étape 2 : Traitement des échantillons pour enlever les contaminations organiques et hydroxyler la surface (choix du protocole de nettoyage des échantillons parmi la solution piranha et le traitement UV-ozone présenté ci-dessous) ;

Étape 3 : Dégazage des échantillons dans le four à 150°C pendant 15 min pour retirer les éventuelles contaminations dues à l'air et retirer la majorité de l'eau présente à la surface des échantillons (nous avons choisi de faire trois mises à vide du four à une pression inférieure à 1 Torr après l'introduction des échantillons. La température de 150°C est la température utilisée dans les autres protocoles de silanisation de l'équipe DSE [182] et ne sera pas modifiée) ;

Étape 4 : Injection des silanes dans le four et fonctionnalisation de la surface par condensation des silanes selon le schéma présenté dans la Figure 1.6 page 35 (C'est l'étape avec le plus d'inconnues : il faut déterminer la température du bulleur (la température de la ligne d'injection est fixée comme la moyenne entre la température du four (150°C) et la température du bulleur), la pression dans le four, le débit de l'azote dans le bulleur, le type de silanisation (arrivée continue ou périodique du silane dans le four) et le temps de silanisation. Pour simplifier les tests, nous avons fixé la pression dans le four à 20 Torr, le débit d'azote à 30 NL/h et la durée de la silanisation à 2h. Nous avons fait varier la température du bulleur entre 40 et 100°C et le protocole d'arrivée des silanes en continu ou par cycles. Ces deux tests sont présentés ci-dessous).

Étape 5 : Nettoyage du four grâce au pompage pour retirer les vapeurs de silane restantes et refroidissement du réacteur (Pour le nettoyage du four, nous avons choisi de faire trois cycles de pompage du four de 30 min chacun en remettant le four à pression atmosphérique entre chaque cycle) ;

Étape 6 : Nettoyage des échantillons pour retirer les silanes qui ne sont pas liés avec des liaisons covalentes à la surface (Aucun nettoyage des échantillons à la sortie du four n'a été effectué en plus des cycles de pompage lors de l'étape précédente).

Influence du protocole de nettoyage des échantillons avant la silanisation (Étape 2)

Le traitement des échantillons avant la silanisation permet de retirer les contaminations organiques, mais aussi d'hydroxyler la surface de silice pour créer des fonctions silanols nécessaires à la silanisation. Plus le nombre de silanols est important à la surface, plus il est possible de greffer un nombre important de silanes. Pour caractériser cette quantité de silanes, nous utilisons l'angle de contact. En effet, la surface hydroxylée est très hydrophile (angle de contact proche de 0°) et les silanes hydrophobes, nous supposons donc que plus l'angle de contact d'une goutte d'eau est élevé, plus la quantité de silanes à la surface est importante.

Dans cette partie, les paramètres sont :

- Température du four : 150°C.
- Température du bulleur : 40°C (donc température de la ligne d'injection de 95°C).
- Débit : 30 NL/h.
- Pression dans le four : 20 Torr.
- Silanisation : flux continu de silane dans la chambre avec une pression équilibrée à 20 Torr grâce à un léger pompage de la chambre.
- Durée de la silanisation : 2h.

Nous avons choisi de tester trois méthodes de nettoyage et de mesurer les angles de contact après la silanisation. Les angles sont résumés dans le Tableau 2.5.

Numéro	Nettoyage	Angle de contact
1	Solution piranha pendant 30 min puis rinçage à l'eau	$84,0^\circ \pm 2,0$
2	Plasma UV-ozone avec flux de dioxygène pendant 30 min à 25°C	$87,8^\circ \pm 1,2$
3	Plasma UV-ozone avec flux de dioxygène pendant 30 min à 25°C puis rinçage à l'eau	$82,6^\circ \pm 1,2$

Tableau 2.5 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus en fonctionnalisant des échantillons de silicium avec des silanes CH_3 long en phase gazeuse avec le four n°1, en changeant le nettoyage des échantillons avant la silanisation.

Les angles sont légèrement supérieurs ($87,8^\circ$) avec le deuxième nettoyage, qu'avec les deux autres ($84,0^\circ$ et $82,6^\circ$), c'est-à-dire avec le passage à l'ozone mais sans rinçage à l'eau. Il semble donc que la monocouche de silane soit plus dense avec ce nettoyage, ce qui est l'objectif de cette silanisation. En revanche, les angles sont bien inférieurs à 98° , l'angle obtenu lors de la silanisation en phase liquide. Pour s'approcher de cet angle de contact, nous avons gardé le deuxième nettoyage et nous avons fait varier la température du bulleur.

Influence de la température du bulleur (Etape 4) Augmenter la température des bulleurs, en maintenant un débit d'azote constant, permet d'augmenter la pression partielle de silanes dans le réacteur et ainsi faciliter la fonctionnalisation des surfaces par les silanes. Les paramètres sont donc identiques à l'expérience précédente avec une silanisation de 2h à 150°C , un flux continu d'azote à 30 NL/h et une pression d'équilibre dans le réacteur de 20 Torr. À la différence de l'expérience précédente, la température du bulleur a été fixée à 100°C , et celle de ligne d'injection à 125°C . Les résultats d'angle de contact sont présentés dans le Tableau 2.6.

Température bulleur	40°C	100°C
Angle de contact	$87,8^\circ \pm 1,2$	$97,4^\circ \pm 0,7$

Tableau 2.6 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus en fonctionnalisant des échantillons de silicium avec des silanes CH_3 long en phase gazeuse avec le four n°1, en changeant la température du bulleur de silanes.

En augmentant la température du bulleur à 100°C , on obtient un angle de contact moyen d'une goutte d'eau sur la surface silanisée de $97,4^\circ \pm 0,7$, proche de la valeur de 98° obtenue lors de la silanisation en phase liquide. Ce paramètre semble donc approprié pour approcher la silanisation en phase liquide. Cependant, cette méthode est assez consommatrice en silane. En effet, l'arrivée en silane est continue sur l'ensemble des deux heures de silanisation et environ 2,5 mL de silane sont utilisés. Pour essayer de limiter la consommation en silane, nous avons modifié le protocole avec une arrivée par cycle.

Influence du protocole de silanisation avec arrivée des silanes par cycle (Etape 4)

Le protocole en injectant les silanes par cycle dans le réacteur est présenté sur la Figure 2.10. Pour la silanisation précédente en flux continu, le silane arrivait en continu dans le réacteur et la pression était équilibrée à 20 Torr en pompant le gaz du réacteur en même temps. Avec une arrivée par cycle, la concentration en silane est amenée à 20 Torr puis l'arrivée d'azote, ainsi que la pompe, sont fermées. La silanisation dans le réacteur fermé est laissée pendant 30 minutes, puis le vide est fait dans le réacteur. Cette opération est répétée quatre fois au total, pour arriver à un temps de silanisation de 2h, équivalent à celui avec le flux continu. Le temps total du procédé est légèrement plus long à cause des pompages entre les cycles de silanisation. Les angles de contact obtenus et la quantité de silane consommée sont donnés dans le Tableau 2.7.

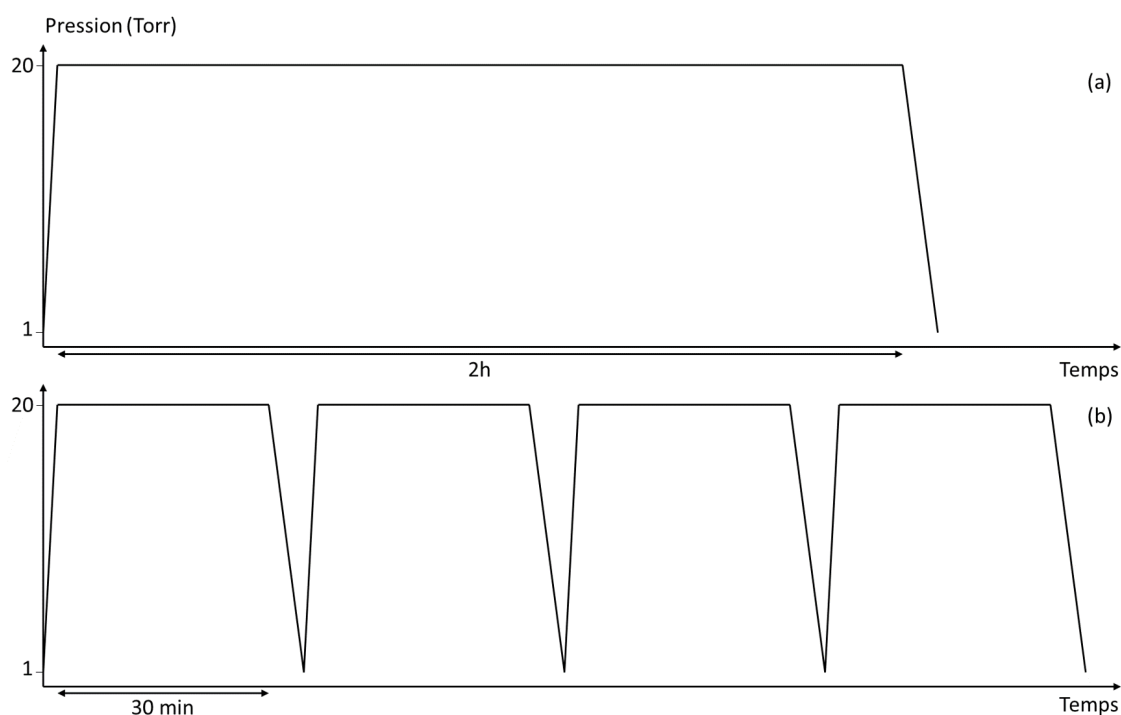


Figure 2.10 – Pression dans le four lors de la silanisation dans le cas (a) d'un flux continu et (b) de cycles de remplissage. Dans les deux cas, le temps pour lequel la pression dans le four est équilibrée à 20 Torr est de 2h.

Silanisation	Continue	Par cycle
Angle de contact	$97,4^\circ \pm 0,7$	$97,5^\circ \pm 2,0$
Silane consommé	2,5 mL	1,7 mL

Tableau 2.7 – Angle de contact moyen d'une goutte d'eau et quantité de silane consommée lors de la fonctionnalisation par des silanes CH_3 long pour une silanisation avec un flux continu et une silanisation par cycle avec le four n°1.

Les angles de contact obtenus par les deux méthodes sont similaires, supérieurs à 97° , et très proches de ceux mesurés après la silanisation en phase liquide. Par la suite, on choisira la silanisation par cycle car elle permet de réduire d'un tiers la consommation de silanes.

Reproductibilité du protocole Pour finir, nous avons vérifié que le protocole était reproductible pour la silanisation de substrats de silicium avec les silanes CH_3 long. Pour cela, nous avons répété trois fois l'expérience et nous avons mesuré les angles de contact à chaque fois. Les angles obtenus sont présentés dans le Tableau 2.8.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3
Angle de contact	$97,5^\circ \pm 2,0$	$98,0^\circ \pm 0,6$	$97,4^\circ \pm 0,4$

Tableau 2.8 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus lors du test de reproductibilité de la fonctionnalisation du silicium plan avec les CH_3 long avec le four n°1.

Les angles sont reproductibles et systématiquement proches de 98° , l'angle de contact moyen obtenu avec la silanisation en phase liquide.

Protocole de fonctionnalisation avec le four n°1 L'ensemble de ces tests nous a permis de mettre au point un protocole de silanisation en phase gazeuse d'échantillons de silicium avec des silanes CH_3 long. Les paramètres retenus sont :

- Dégazage du four à vide : plus d'une heure à 180°C ;
- Nettoyage des échantillons : traitement UV-ozone avec flux de dioxygène pendant 30 min à 25°C ;
- Dégazage des échantillons dans le four : 3 cycles de pompage du four jusqu'à une pression de 1 Torr puis remplissage partiel du four à l'azote jusqu'à 400 Torr, le tout avec un four à 150°C ;
- Température du four lors de la silanisation : 150°C ;
- Température du bulleur : 100°C ;
- Température de la ligne d'injection : 125°C ;
- Silanisation : 4 cycles de 30 min à 20 Torr avec pompage du réacteur à une pression inférieure à 1 Torr entre chaque cycle ;
- Nettoyage du réacteur : 3 cycles de pompage de 30 min chacun ;
- Nettoyage des échantillons après silanisation : pas de nettoyage.

Ces paramètres nous permettent de reproduire les angles de contact obtenus lors de la silanisation en phase liquide pour le silane CH_3 long.

2.3.3.c Caractérisation des surfaces

Caractérisation par XPS du silicium plan Comme dans le cas des silanes COO^- , une caractérisation XPS d'un échantillon de silicium plan fonctionnalisé avec les silanes CH_3 long a été effectuée. Le survol et le spectre fin du Si 2p sont présentés dans la Figure 2.11. On

observe trois pics d'oxyde, provenant du SiO_2 , du Si_2O et de l'atome de silicium sur le silane. Les spectres fins des niveaux de cœur C 1s et Si 2p ne sont pas montrés ici. Aucune pollution n'est observée pour ces deux éléments. La densité en silane est estimée à 4 nm^{-2} , supérieure à la densité obtenue avec la fonctionnalisation en phase liquide (3 nm^{-2}), ce qui était l'objectif recherché.

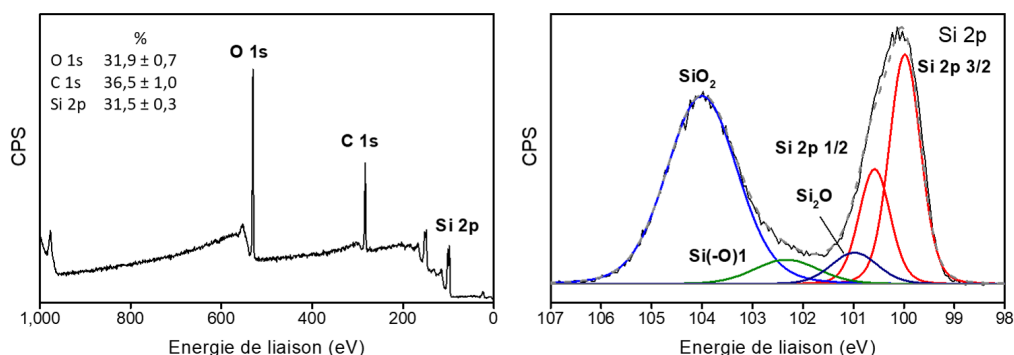


Figure 2.11 – Spectres XPS d'une monocouche de silanes CH_3 long sur du silicium plan obtenue avec le four n°1 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30° .

Caractérisation par XPS du silicium poreux Les spectres obtenus pour la fonctionnalisation avec le four n°1 d'une surface de silicium poreux avec les silanes CH_3 long sont présentés en Figure 2.12, les pourcentages atomiques et les énergies de liaison de la déconvolution dans le Tableau 2.9.

	O 1s	C 1s	Si 2p					
	O-Si	C-C	Si 2p3/2	Si 2p1/2	Si_2O	SiO	Si(-O) ₁	SiO_2
E (ev)	533,3	285,4	99,7	100,3	100,9	101,7	102,4	104,0
% at	30,4	40,5	3,5	1,8	2,0	1,0	2,0	18,8

Tableau 2.9 – Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes CH_3 long dans le four n°1.

On observe des pics pour le C 1s, le O 1s et le Si 2p. Dans le cas du Si 2p, la déconvolution du spectre indique la présence du silicium métallique grâce au doublet Si 2p1/2 et Si 2p3/2. Les autres pics correspondent à des atomes de silicium oxydés et la contribution majeure à 104,0 eV provient du SiO_2 . Parmi les autres contributions, on retrouve les deux sous-oxydes SiO et Si_2O et le Si(-O)₁ issu du silicium présent sur le silane. Le pourcentage atomique du Si(-O)₁ est de 2,0 % ce qui donne un rapport C 1s/Si(-O)₁ de 19,8, proche de 20 la valeur théorique. La stœchiométrie est bien respectée et aucune pollution organique n'est présente à la surface. Enfin, la densité de silane, obtenue à partir de l'équation 2.1, est égale à $4,1 \pm 0,1 \text{ nm}^{-2}$, donc supérieure à la valeur en phase liquide, et reproductible, ce qui était recherché.

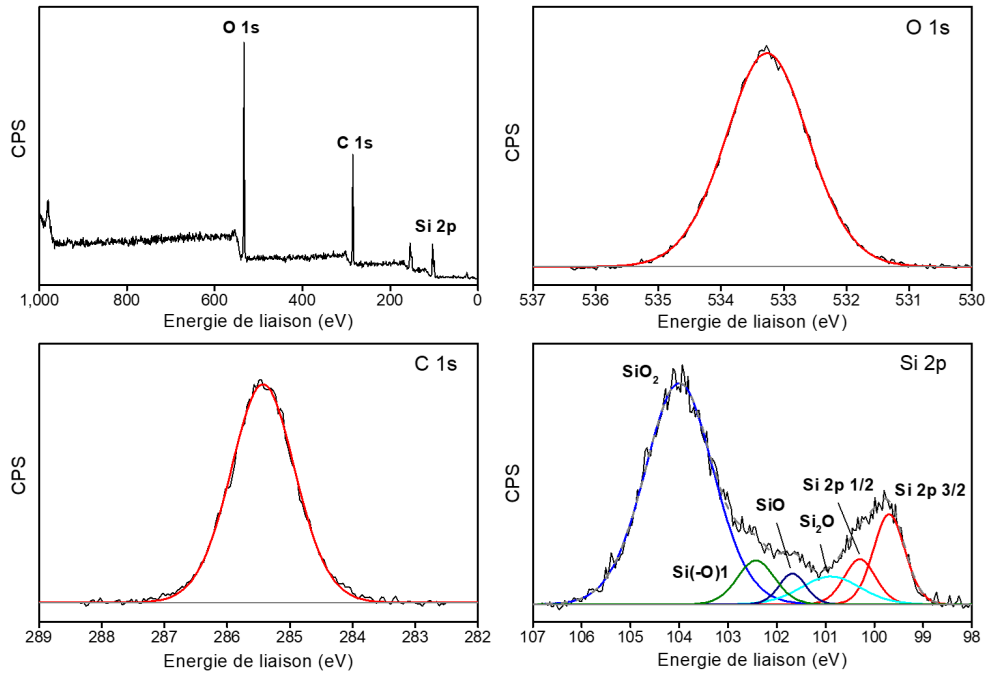


Figure 2.12 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes CH_3 long sur du silicium poreux obtenue avec le four n°1 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

Cette silanisation en phase gazeuse avec le four n°1 valide la condition initiale d’obtenir une densité de silane équivalente ou supérieure à celle de la silanisation en phase liquide.

Caractérisation par ToF-SIMS du silicium poreux L’XPS permet de donner une information sur la couverture moyenne de l’échantillon à la surface, en revanche, il ne permet pas d’étudier si la quantité de silanes varie en fonction de la profondeur dans le pore. Le ToF-SIMS, avec la possibilité de pulvériser la surface entre deux mesures, permet de faire une analyse en profondeur et d’évaluer l’évolution des principaux ions. Les résultats sur la surface obtenue avec le four n°1 sont présentés dans la figure 2.13 avec en référence une surface de silicium poreux non fonctionnalisé.

On observe un profil constant des différents ions puis une décroissance de la quantité de tous les ions, excepté le Si^- . Cette décroissance correspond très probablement au fond du pore et à l’analyse du Si bulk. On remarque que le profil de C^- et de H^- sont constants sur toute la longueur du pore. Ces éléments correspondent principalement aux silanes. L’intensité de ces deux ions est plus grande dans le cas de l’échantillon silanisé par rapport à l’échantillon de référence, ce qui confirme la présence des silanes sur l’ensemble des pores. De plus, la quantité de silane est uniforme : on a bien une silanisation conforme.

On peut remarquer que le profil du carbone est non nul sur l’ensemble du pore de l’échantillon non fonctionnalisé, il y a donc une légère contamination organique. Cependant, elle est suffisamment faible pour ne pas être visible en XPS, le ToF-SIMS ne permettant pas une analyse

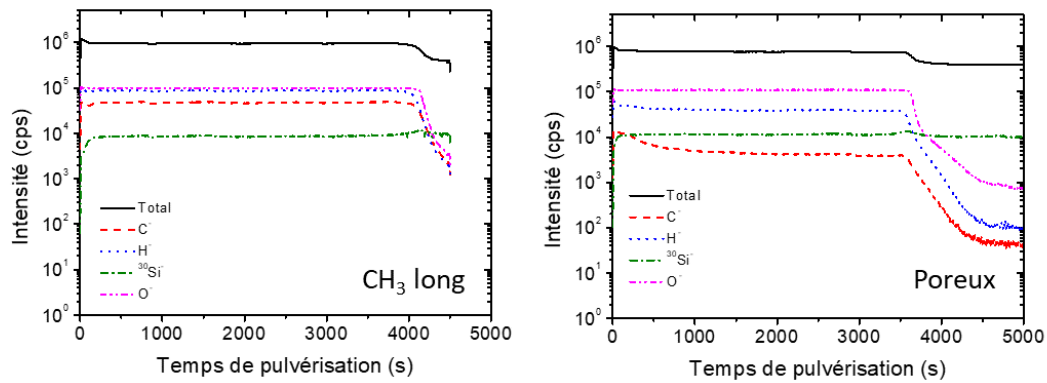


Figure 2.13 – Analyse en profondeur en ToF-SIMS d’un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH_3 long à droite et d’un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à gauche. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de $^{30}\text{Si}^-$ dans le Si bulk, c’est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.

quantitative. De plus, les ions ne reviennent pas à zéro après la décroissance. Cela pourrait éventuellement venir d’un déplacement des atomes à l’intérieur du substrat.

2.3.3.d Conclusion

Nous avons développé un protocole de fonctionnalisation de substrats de silicium avec ce four qui permet de reproduire les surfaces obtenues avec la silanisation en phase liquide en termes de densité des silanes CH_3 long et de l’angle de contact. Les caractérisations XPS en triplicatas de ces surfaces montrent que la silanisation est uniforme sur les échantillons et les analyses ToF-SIMS montrent que dans le cas du poreux, la fonctionnalisation est conforme à l’intérieur des pores.

Ce four a l’avantage de pouvoir silaniser une grande quantité d’échantillons en même temps grâce à son grand volume. Cependant, il n’est pas possible d’adapter la quantité de silanes utilisée en fonction de la taille des échantillons : pour chaque test, 1,7 mL de silanes sont consommés alors que les échantillons ne mesurent que quelques cm^2 . De plus, le système de tuyauterie est long et il est difficile de maintenir une température homogène sur l’ensemble de la ligne. L’apparition d’un point froid sur la ligne augmente la quantité de silane utilisée lors de la fonctionnalisation car celui-ci se liquéfie dans les parties plus froides et un silane liquéfié ne peut plus être utilisé. De plus, la viscosité du silane augmente et peut bloquer les tuyaux. Pour répondre à ces problèmes, nous avons mis au point un autre four, que nous appelons four n°2, plus petit et avec une quantité minimale de tuyau.

2.3.4 Silanisation en phase gazeuse avec le four 2 : CH_3 court

Dans cette partie, nous nous intéressons à la mise au point d’un protocole de silanisation avec ce four pour les silanes CH_3 court. Le silane CH_3 long n’a pas été utilisé ici pour privilégier le développement d’un protocole de fonctionnalisation avec un autre silane.

2.3.4.a Présentation du four n°2

Le four n°2 est plus petit, avec un diamètre intérieur de 8 cm, il ne permet pas de silaniser des gros échantillons mais a l'avantage d'être plus facile d'utilisation et de moins consommer de silane pour chaque fonctionnalisation (environ 100 μ L au lieu de 1,7 mL avec le four précédent). Le four est composé d'une chambre dans laquelle on place les échantillons et où se trouve également le récipient contenant le silane. Cette chambre se ferme avec un capot sur lequel ont été placées une arrivée d'azote et une sortie vers une pompe. Une troisième vanne a été ajoutée pour pouvoir injecter le silane directement dans la chambre lors de la silanisation. Le four est présenté en Figure 2.14. La chambre est chauffée grâce à une plaque chauffante placée en dessous et l'ensemble du système est enveloppé dans de l'aluminium pour maintenir la température constante et homogène. Le suivi de la pression à l'intérieur du réacteur est assuré grâce à un manomètre placé en sortie du réacteur vers la pompe. Une vanne est également présente pour pouvoir isoler le manomètre du reste du système.

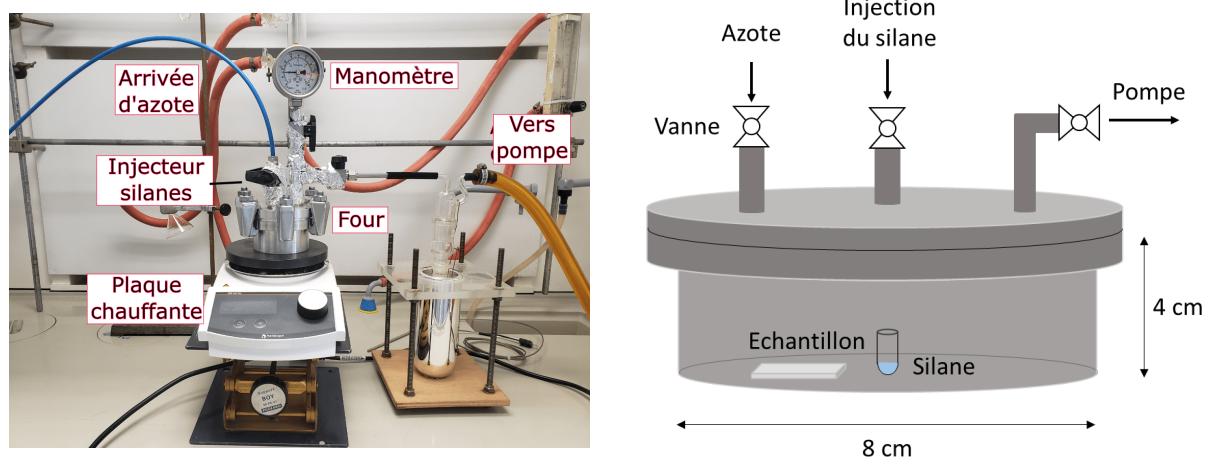


Figure 2.14 – Image du four n°2 et schéma simplifié de son fonctionnement.

2.3.4.b Développement du protocole de silanisation

Structure générale du protocole Le protocole choisi pour la silanisation est une adaptation du protocole du four n°1 :

1. Dégazage du four à 200°C ;
2. Nettoyage des échantillons de silicium à l'UV-ozone 30 min à 25°C avec flux de dioxygène ;
3. Dégazage des échantillons dans le four 30 min à 150°C ;
4. Injection des silanes liquides dans le réacteur (étape détaillée ci-dessous) ;
5. Mise à vide du réacteur et silanisation pendant 1h à 150°C ;
6. Nettoyage du réacteur avec 10 cycles de pompage du réacteur et refroidissement ;
7. Ouverture du réacteur et nettoyage des échantillons au THF 10 min puis à l'eau 10 min dans un bain à ultrason.

Il faut toutefois noter quelques différences avec le protocole précédent : la durée de la silanisation a été fixée à une heure au lieu de deux, le silane est complètement évaporé dans la chambre sans

être renouvelé et le nettoyage du four et des échantillons après la silanisation est différente : au lieu d'effectuer 4 cycles de pompage de 30 min comme avec le premier four nous avons préféré faire 10 cycles d'une minute. Le nettoyage du premier four n'a pas pu être transféré au deuxième parce que la mesure de la pression était moins précise et il n'était pas possible de vérifier que le pompage était efficace. En contrepartie, nous avons ajouté une étape de nettoyage des échantillons aux ultrasons pour obtenir des surfaces propres et enlever les molécules qui ne sont pas liées avec des liaisons covalentes.

Injection des silanes à chaud Nous avons réalisé trois tests identiques selon le protocole suivant : nous avons injecté 90 μL de silane dans le réacteur chaud (150°C) avant de faire le vide et de laisser la silanisation se faire dans le réacteur pendant 1h à 150°C . Les angles de contact avant et après le nettoyage par le THF et l'eau des échantillons silanisés sont présentés dans le Tableau 2.10.

	Test 1	Test 2	Test 3
Avant nettoyage	$90,2^\circ \pm 1,4$	$80,1^\circ \pm 0,8$	$78,2^\circ \pm 0,7$
Après nettoyage	$80,7^\circ \pm 1,0$	$66,4^\circ \pm 2,0$	$63,2^\circ \pm 0,7$

Tableau 2.10 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus par silanisation d'un échantillon de silicium avec des silanes CH_3 court avec le four n°2 et injection des silanes dans le réacteur à 150°C .

On obtient une mauvaise reproductibilité des mesures aussi bien avant le nettoyage des échantillons qu'après. Le protocole n'est donc pas adapté à la silanisation par des silanes CH_3 court et nécessite des modifications.

Injection des silanes à température ambiante et reproductibilité Suite à ces premiers résultats, nous avons voulu tester l'influence de la température du réacteur au moment de l'injection des silanes sur la valeur de l'angle de contact obtenue à la fin de la réaction. En effet, la température d'ébullition du silane à pression atmosphérique est de 95°C , une température inférieure à la température du four au moment de l'injection. Il y a donc un risque que l'évaporation du liquide de silane se fasse avant que le pompage commence, ce qui peut réduire notablement la quantité de silane présente dans le réacteur après l'arrêt du pompage et le début de la silanisation dans le réacteur fermé. Un changement de quelques secondes dans la mise à vide peut donc avoir une grande influence sur les angles de contact finals. Pour essayer de résoudre ce problème, nous avons ajouté une étape dans le protocole, entre les étapes 3 et 4, de refroidissement du four à température ambiante. 100 μL de silane sont ensuite injectés dans la chambre qui est mise à vide puis chauffée à 150°C . Les angles obtenus avant et après nettoyage des échantillons sur trois essais identiques sont présentés dans le Tableau 2.11.

La reproductibilité n'est toujours pas bonne pour les angles de contact mesurés avant le nettoyage des échantillons aux ultrasons mais elle s'améliore après le nettoyage. La présence plus ou moins importante de dimères de silanes à la surface des échantillons pourraient expliquer cette

	Test 1	Test 2	Test 3
Avant nettoyage	$83,4^\circ \pm 0,7$	$85,2^\circ \pm 3,3$	$92,5^\circ \pm 2,0$
Après nettoyage	$78,2^\circ \pm 0,5$	$81,7^\circ \pm 1,4$	$82,0^\circ \pm 1,1$

Tableau 2.11 – Angles de contact moyens d’une goutte d’eau obtenus par silanisation d’un échantillon de silicium avec des silanes CH_3 court dans le four n°2, en injectant les silanes dans le réacteur à température ambiante.

variabilité : avec le nettoyage aux ultrasons, les dimères sont retirés et on observe une couche plus reproductible. Cette reproductibilité montre que le refroidissement du four avant l’injection des silanes est une étape importante. De plus, un nettoyage des échantillons semble nécessaire pour enlever les molécules qui pourraient être adsorbées à la surface et non liées de façon covalente. Cette étape n’était pas nécessaire avec le four n°1 grâce aux cycles de pompage longs. Les angles de contact obtenus sont proches de la silanisation en phase liquide pour laquelle nous avons des angles de 80° .

2.3.4.c Conclusion

Finalement, cette étude nous a permis de définir le protocole optimal pour la fonctionnalisation du silicium par les silanes CH_3 court avec le four n°2. Ce protocole diffère de celui présenté au début de la section 2.3.4.b à la page 82 par l’ajout du refroidissement du réacteur entre les étapes 3 et 4.

2.3.5 Silanisation en phase gazeuse avec le four 2 : NH_3^+

Après la mise au point du protocole de silanisation pour les silanes CH_3 court, nous avons transféré ce protocole de silanisation pour NH_3^+ avec le même four. Pour cela, nous avons commencé par nettoyer l’ensemble des parois du four et des tuyaux afin de retirer les silanes pouvant être liés à la surface. Ensuite, nous avons repris les tests en utilisant les mêmes paramètres qu’avec le silane CH_3 court, le silane NH_3^+ ayant une température d’ébullition similaire à celle du CH_3 court.

2.3.5.a Développement du protocole

Problème de reproductibilité Les résultats des angles de contact obtenus pour les silanes NH_3^+ avec le protocole des silanes CH_3 court sont présentés dans le Tableau 2.12.

Les angles de contact ne sont pas reproductibles et sont trop élevés par rapport à ceux obtenus en phase liquide (63°). Il y a également une forte dispersion des angles, sur chaque échantillon. Tout cela pourrait être lié à des traces de matière brûlée, visibles au fond du récipient à silanes, et parfois sur le capot du four, probablement des silanes.

	Test 1	Test 2	Test 3
Après nettoyage	$74,5^\circ \pm 2,7$	$80,8^\circ \pm 3,9$	$73,8^\circ \pm 2,3$

Tableau 2.12 – Angles de contact moyens d’une goutte d’eau obtenus par silanisation d’un échantillon de silicium avec des silanes NH_3^+ dans le four n°2 avec le protocole des silanes CH_3 court.

Augmentation graduelle de la température du four et reproductibilité Le chauffage du four lors de la silanisation se fait grâce à une plaque chauffante placée en dessous du réacteur. Le silane est lui placé au fond du réacteur et est séparé de la plaque chauffante uniquement par la paroi du réacteur, il se trouve donc à l’endroit où l’évolution de la température entre 20°C et 150°C est la plus rapide, ce que le silane ne semble pas supporter. Pour éviter de brûler les silanes et éventuellement de les dénaturer, nous avons décidé d’augmenter graduellement la température du four pour ne pas que le bas du réacteur chauffe trop rapidement. Nous avons donc augmenté la température de la plaque entre 50°C et 150°C par paliers de 10°C toutes les 3 minutes. Pour s’assurer de la bonne fonctionnalisation des échantillons, nous avons aussi allongé la durée de la silanisation à 2h à partir du moment où le four atteint 150°C . Les résultats des angles de contact sont présentés dans le Tableau 2.13.

	Test 1	Test 2	Test 3
Après nettoyage	$64,8^\circ \pm 0,1$	$63,5^\circ \pm 2,3$	$63,5^\circ \pm 0,7$

Tableau 2.13 – Angles de contact moyens d’une goutte d’eau obtenus par silanisation d’un échantillon de silicium avec des silanes NH_3^+ dans le four n°2, avec augmentation de la température du four par palier.

Les résultats sont meilleurs avec ce protocole, l’augmentation graduelle de la température permet d’éviter la présence de silane brûlé dans le réacteur et les angles de contact sont proches de ceux obtenus avec la silanisation en phase liquide.

Protocole de fonctionnalisation avec le four n°2 pour les silanes NH_3^+ Dans la suite, c’est ce protocole avec l’augmentation lente de la température jusqu’à 150°C qui a été gardé pour la fonctionnalisation avec les silanes NH_3^+ dans le four n°2. Le protocole complet est le suivant :

- Dégazage du four à 200°C au moins une heure ;
- Nettoyage des échantillons avec traitement UV-ozone avec un flux de dioxygène pendant 30 min à 25°C ;
- Dégazage des échantillons dans le réacteur à 150°C pendant 30 min ;
- Refroidissement du four à température ambiante ;
- Injection de $100\ \mu\text{L}$ de silanes NH_3^+ dans le réacteur avec contre-flux d’azote ;
- Mise à vide du four (pression inférieure à 1 Torr) ;

- Chauffage graduel du four jusqu'à 150°C. La température est augmentée par paliers de 10°C, et les augmentations sont séparées de 3 min pour que la température s'équilibre dans le réacteur ;
- Silanisation dans le réacteur fermé pendant 2h ;
- Nettoyage du four avec 10 cycles de pompage d'une minute puis pompage pendant 15 min et refroidissement du four ;
- Nettoyage des échantillons dans un bain à ultrasons dans du THF pendant 10 min puis dans de l'eau ultrapure pendant 10 min supplémentaires.

2.3.5.b Caractérisation des surfaces

Caractérisation par XPS du silicium plan Le spectre haute résolution du niveau Si 2p ainsi que le survol d'un échantillon de silicium plan fonctionnalisé par des silanes NH_3^+ avec le four n°2 sont présentés dans la figure 2.15. Comme pour le four n°1, on observe le doublet du silicium métallique avec trois pics d'oxydes, dont le pic de $\text{Si}(-\text{O})_1$ correspondant à l'atome de silicium sur le silane. Les spectres fins des niveaux de cœur C 1s et Si 2p ne sont pas montrés ici. Aucune pollution n'est observée pour ces deux éléments. La densité en silanes sur la surface est estimée à $5,2 \text{ nm}^{-2}$ d'après l'équation 2.1, inférieure aux 8 nm^{-2} obtenus avec la fonctionnalisation en phase liquide mais toujours supérieure aux autres surfaces silanisées.

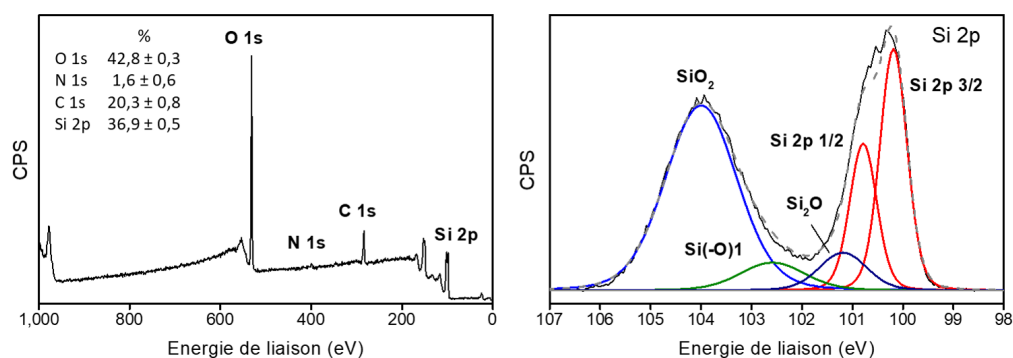


Figure 2.15 – Spectres XPS d'une monocouche de silanes NH_3^+ sur du silicium plan obtenue avec le four n°2 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L'angle entre la surface et l'analyseur est de 30°.

Caractérisation par XPS du silicium poreux Les valeurs XPS étant bonnes pour le silicium plan, nous avons caractérisé des échantillons de silicium poreux fonctionnalisés par le four n°2 avec des silanes NH_3^+ . Les spectres sont présentés en Figure 2.16, les pourcentages atomiques et les énergies de liaison sont donnés dans le Tableau 2.14.

On observe des pics pour le C 1s, le N 1s, le O 1s et le Si 2p. Deux contributions sont visibles sur le spectre fin du C 1s à 285.4 et 286.8 eV provenant respectivement des liaisons C-C et C-N sur le silane. Le doublet Si 2p1/2 et Si 2p3/2 est visible sur le spectre du Si 2p ainsi que quatre pics correspondant aux oxydes du silicium. Ces oxydes sont identiques à ceux sur le substrat fonctionnalisé par des silanes CH_3 long et la contribution $\text{Si}(-\text{O})_1$ (2,9 %) venant du silane vérifie

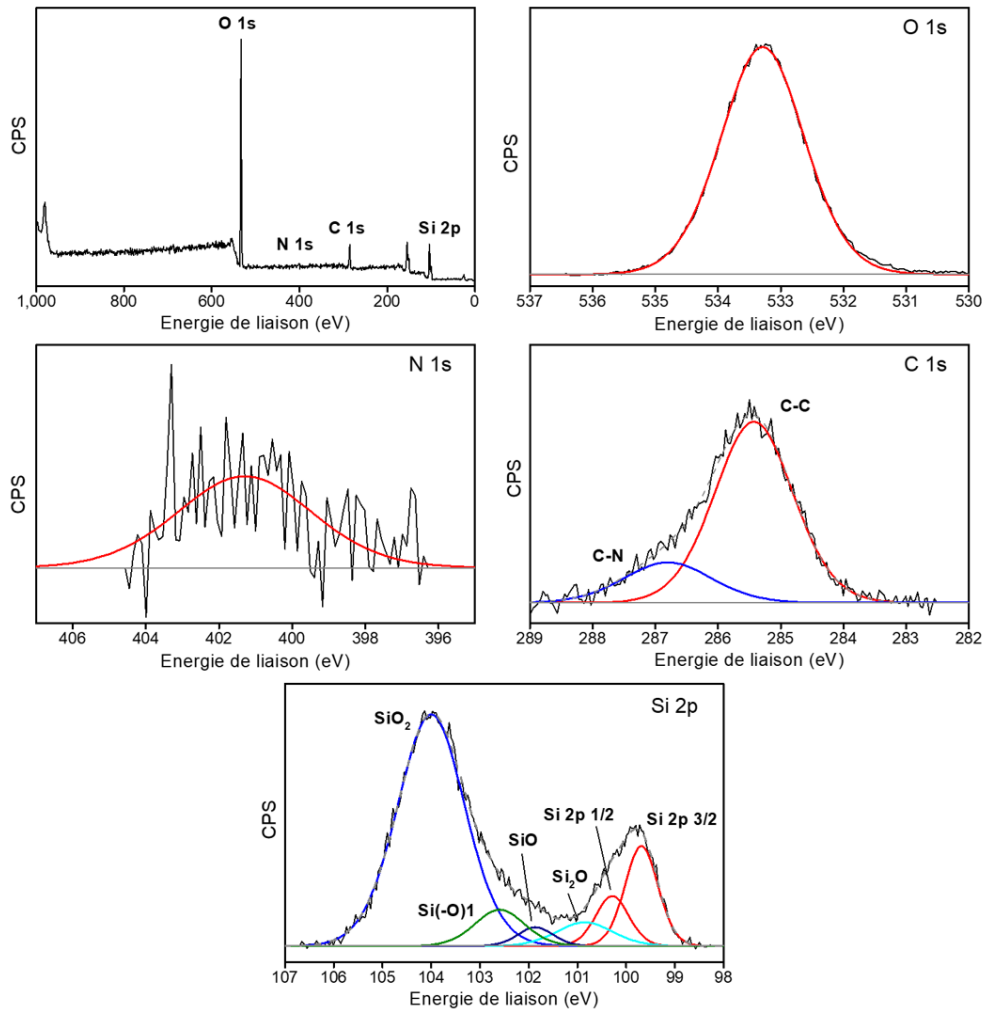


Figure 2.16 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes NH_3^+ sur du silicium poreux obtenue avec le four n°2 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, N 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

	O 1s		N 1s		C 1s		Si 2p			
	O-Si	N-C	C-C	C-N	Si 2p3/2	Si 2p1/2	Si ₂ O	SiO	Si(-O) ₁	SiO ₂
E (eV)	533,3	401,3	285,5	286,8	99,7	100,3	100,8	101,8	102,5	104,0
% at	43,8	3,4	11,4	2,8	5,2	2,6	2,1	1,0	2,9	24,7

Tableau 2.14 – Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d’un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes NH_3^+ dans le four n°1.

la stœchiométrie de la molécule de silane avec le rapport $C\ 1s/Si(-O)_1$ égal à 5,0, soit la valeur attendue. Enfin, la densité de silane est de $4,4 \pm 0,1\ \text{nm}^{-2}$, inférieure à la densité de $8\ \text{nm}^{-2}$ obtenue lors de la silanisation en phase liquide. Une hypothèse pour expliquer cette différence serait le temps de silanisation. En effet, lors de la silanisation en phase liquide, la réaction est faite sur une nuit alors qu'elle est laissée pendant 2 heures avec le four n°2. En augmentant la durée de la réaction, il serait peut-être possible d'atteindre une densité de silane proche de celle obtenue en phase liquide. De plus, cette valeur est également légèrement inférieure à celle sur le silicium plan, ce qui pourrait également venir du temps de silanisation trop court parce que la surface à silaniser est plus importante. Cependant, la densité obtenue avec 2h de réaction est bonne, supérieure à $3\ \text{nm}^{-2}$ et semblable à celles des autres silanes. La densité est également reproductible avec une erreur de 2 %. Pour ces deux raisons, nous avons gardé ce protocole de silanisation sans en allonger la durée.

Caractérisation par ToF-SIMS La caractérisation ToF-SIMS des pores silanisés, avec une référence non fonctionnalisée sont présentées dans la figure 2.17.

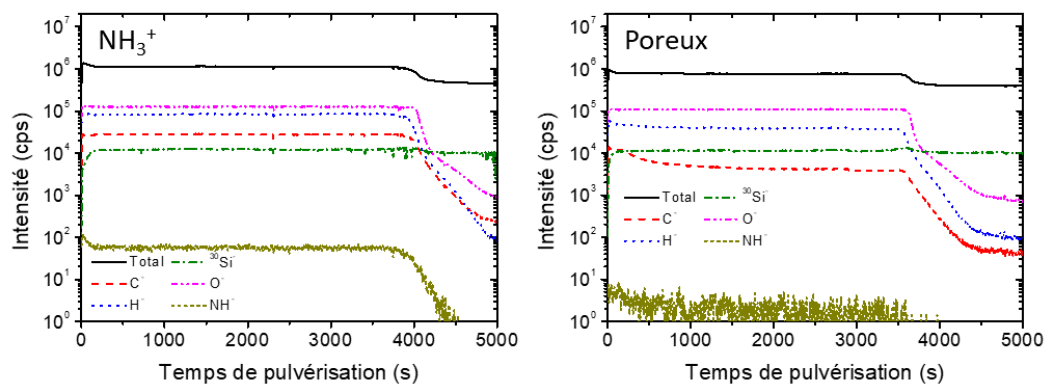


Figure 2.17 – Analyse en profondeur en ToF-SIMS d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes NH_3^+ à gauche et d'un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à droite. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de $^{30}Si^-$ dans le Si bulk, c'est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.

Comme dans le cas du silane CH_3 long avec le four n°1, le profil du C^- et du H^- indiquent la présence des silanes dans les pores avec une silanisation uniforme sur toute la profondeur. Cette présence est également confirmée par le profil de l'ion NH^- spécifique au groupement amine du silane avec une valeur constante supérieure au silicium poreux de référence.

2.3.5.c Conclusion

Dans cette partie, nous avons développé le protocole de fonctionnalisation avec des silanes NH_3^+ grâce au four n°2. En adaptant le protocole utilisé avec les silanes CH_3 court, nous avons réussi à créer des surfaces silanisées conformes et reproductibles, comme le montrent les caractérisations en XPS et en ToF-SIMS.

En revanche, il faut noter que lors de la fonctionnalisation d'échantillons avec le four n°2, il est nécessaire d'ouvrir le réacteur pour introduire le silane alors que les échantillons sont déjà placés à l'intérieur. Pour limiter la contamination du réacteur pendant cette étape, la chambre de silanisation est placée en légère surpression : lors de l'ouverture de la vanne d'introduction des silanes, nous créons ainsi un contre-flux d'azote s'échappant du réacteur. Cette ouverture pourrait à terme être problématique pour la reproductibilité des échantillons et leur propreté. Cependant, dans le cadre de ma thèse, la reproductibilité des monocouches CH_3 court et NH_3^+ (élaborées avec ce four) est très bonne et similaire à celles obtenues avec les autres fours (pour les silanes CH_3 long et COO^-). En effet, la reproductibilité a été systématiquement évaluée en calculant la densité de silanes sur trois répliques et les variations sont toujours inférieures à 5 %. Pour éliminer ce risque dans la suite, nous avons développé un troisième four s'inspirant des deux premiers.

2.3.6 Silanisation en phase gazeuse avec le four 3 : CH_3 court

Le troisième four a été créé pour répondre au problème de l'ouverture de la chambre juste avant la silanisation. Nous avons donc sorti la réserve de silane du réacteur, ce qui a aussi l'avantage de ne pas introduire de liquide dans la chambre mais uniquement des vapeurs. Nous nous sommes inspirés des deux fours précédents pour le design de celui-ci.

2.3.6.a Présentation du four n°3

Le troisième four est présenté en Figure 2.18. Il est petit et aplati pour diminuer son volume et ainsi diminuer la quantité de silane nécessaire pour remplir le réacteur, et le silane est conservé à l'extérieur de la chambre pour pouvoir ajuster la quantité utilisée lors de la silanisation. De plus, cela permet de ne pas introduire de liquide dans la chambre, ce qui peut poser des problèmes comme nous l'avons vu avec le silane NH_3^+ dans le four n°2. L'arrivée d'azote et la sortie vers la pompe ont été déplacées du capot vers le bas du réacteur pour faciliter son ouverture lors de l'introduction des échantillons. Une troisième ouverture sur la chambre est dédiée à l'arrivée des vapeurs de silane et une quatrième a été prévue dans l'objectif de pouvoir ajouter un deuxième silane et de modifier la monocouche à la surface des échantillons. Malgré la présence du bulleur à l'extérieur du réacteur, la longueur totale de tuyaux pour ce four est proche de celle du deuxième four pour limiter le risque d'apparition de points froids.

La température du four est régulée grâce à une plaque chauffante placée directement sous la chambre. Il est également possible de faire chauffer le silane en le plaçant dans un bain marie avec une autre plaque chauffante. Les tuyaux et la partie supérieure de la chambre sont maintenus à la température souhaitée grâce à des cordons chauffants maintenus par des feuilles d'aluminium. La pression dans le four est mesurée par un vacuomètre à la sortie du réacteur vers la pompe et la pression dans le bulleur peut également être mesurée par un manomètre en sortie de bulleur.

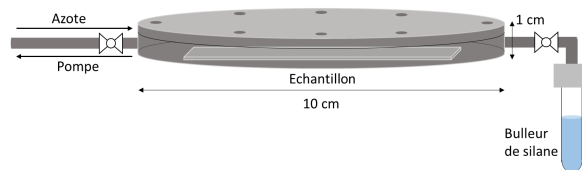
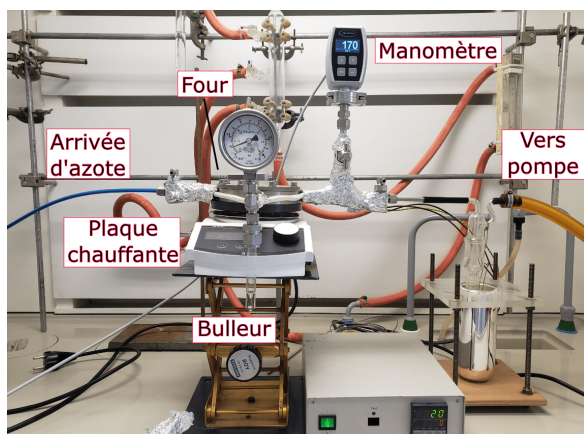


Figure 2.18 – Image du four n°3 et schéma simplifié de son fonctionnement.

2.3.6.b Développement du protocole de silanisation

Structure générale du protocole Les essais sur ce four ont été faits avec les silanes CH_3 court. Le protocole utilisé est un mélange entre ceux des deux premiers fours :

1. Dégazage du four à 200°C , pendant plus d'une heure ;
2. Nettoyage des échantillons à l'UV-ozone 30 min à 25°C avec flux de dioxygène ;
3. Dégazage des échantillons pendant 30 min à 150°C . Le bulleur est chauffé dans un bain marie jusqu'à la température souhaitée ;
4. Pompage du réacteur puis ouverture de la vanne du bulleur pour équilibrer la pression en silane dans l'ensemble de la chambre avec celle du bulleur. Nous détaillerons ci-dessous les pressions testées ;
5. Silanisation à 150°C , à pression constante en système fermé ;
6. Pompage du réacteur pendant 15 min et refroidissement ;
7. Nettoyage des échantillons au THF puis à l'eau dans un bain à ultrasons, pendant 10 min à chaque fois.

Influence de la température du bulleur Grâce au bain marie, il est possible de choisir la température du bulleur lors de la silanisation. Une température plus élevée conduit à une pression dans le four, qui correspond à la pression de vapeur saturante du silane, plus élevée. Nous avons testé 2 températures : 50°C et la température ambiante. Pour chacune des températures du bulleur, le four est chauffé à 150°C et mis sous vide. Puis la vanne du silane est ouverte pour équilibrer la pression dans le réacteur. Une fois que la pression est équilibrée, la vanne du bulleur est fermée et la réaction est laissée pendant 1h. Enfin, les échantillons sont sortis du réacteur et nettoyés 10 min au THF puis 10 min à l'eau ultrapure dans un bain ultrason. Les angles de contact ainsi que la quantité de silane consommée sont présentés dans le Tableau 2.15.

L'élévation de la température du bulleur augmente de manière significative l'angle de contact de l'eau après la silanisation, passant de $36,1^\circ$ à température ambiante à $63,4^\circ$ avec un bulleur à 50°C . Cependant, même pour une température de 50°C , les angles de contact sont inférieurs à ceux obtenus en phase liquide (80°). De plus, la quantité de silane utilisée à 50°C est de

Température bulleur	T° ambiante	50°C
Silane consommé	< 0,1 mL	0,75 mL
Angle de contact	36,1° ± 0,4	63,5° ± 0,4

Tableau 2.15 – Silane consommé et angles de contact moyens d’une goutte d’eau obtenus par silanisation d’un échantillon de silicium avec des silanes CH₃ court dans le four n°3 pour deux températures de bulleur différentes.

0,75 mL, trop importante par rapport à la taille des échantillons. Augmenter la température du bulleur n’est pas une piste d’amélioration acceptable parce que cela impliquerait d’augmenter la quantité de silane nécessaire à la fonctionnalisation, ce qui n’est pas une option dans notre cas. Nous avons préféré modifier la température du four lors de l’introduction des silanes.

Influence de la température du four Un deuxième paramètre que nous avons étudié est la température du four lors de l’ouverture de la vanne des silanes. Lors de l’ouverture de la vanne à 150°C, comme c’était le cas dans le paragraphe précédent, la pression s’équilibre avec l’ensemble de four. Si la température du four est plus basse au moment de l’ouverture du four, la quantité de silane va augmenter pour arriver à la même pression : selon la relation $PV=nRT$, à pression et volume constants, si la température diminue alors la quantité de matière augmente en conséquence. Nous avons testé deux températures : 150°C et la température ambiante. Dans le deuxième cas, à température ambiante, après l’équilibre des pressions entre le four et le bulleur, et fermeture du bulleur, le four est chauffé à 150°C et la silanisation est faite pendant une heure comme précédemment. Les résultats des angles de contact sont présentés dans le Tableau 2.16.

Température four	T° ambiante	150°C
Silane consommé	< 0,1 mL	< 0,1 mL
Pression four à 150°C	33 Pa	58 Pa
Angle de contact	36,1° ± 0,4	48,3° ± 0,4

Tableau 2.16 – Silane consommé, pression en silane dans le four à 150°C pendant la silanisation et angles de contact moyens d’une goutte d’eau obtenus après la silanisation de silicium plan avec des silanes CH₃ court avec le four n°3.

Dans les deux cas, la consommation en silane est inférieure à 0,1 mL (probablement quelques dizaines de microlitres mais nos graduations sur le bulleur ne nous permettent pas des mesures aussi précises). C’est un point positif par rapport à l’essai avec un bulleur à 50°C. Pour les deux températures, la pression s’équilibre à 33 Pa, puis, lorsque le four est chauffé à 150°C dans le deuxième cas, la pression est multipliée par 1,75. Les angles de contact augmentent aussi, passant de 36,1° à 48,3°, soit plus de 10° de plus qu’avec les conditions initiales. Ces angles sont encore trop faibles par rapport aux valeurs des protocoles précédents (80°). Dans la suite, nous avons fait des essais en allongeant le temps de silanisation tout en gardant cette étape de refroidissement du réacteur avant l’introduction des silanes.

Influence du temps de silanisation Un dernier paramètre étudié est le temps de silanisation. Dans l'ensemble des tests précédents, la silanisation était fixée à 1h, mais cette durée semble insuffisante pour ce four. Avec le premier four, la réaction était de 2h et pour le four du silane COO^- utilisé dans l'équipe, la silanisation se fait sur une nuit [182], comme pour la silanisation en phase liquide. Nous avons alors essayé de laisser la réaction avec les vapeurs de silane dans le four plus longtemps. Les résultats sont présentés dans le Tableau 2.17.

Temps silanisation	1 heure	4 heures
Silane consommé	< 0,1 mL	< 0,1 mL
Pression four à 150°C	58 Pa	63 Pa
Angle de contact	$48,3^\circ \pm 0,4$	$62,6^\circ \pm 0,3$

Tableau 2.17 – Silane consommé, pression en silane dans le four à 150°C pendant la silanisation et angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus après la silanisation de silicium plan avec des silanes CH_3 court dans le four n°3.

Encore une fois, les angles de contacts augmentent en fin silanisation et dépassent les 60°. Ils restent cependant toujours inférieurs à ceux obtenus lors de la silanisation en phase liquide (80°).

Reproductibilité de la silanisation Pour estimer la reproductibilité de notre protocole, malgré des angles inférieurs à ceux attendus (80°), nous avons répété cinq fois l'expérience en introduisant les silanes dans le four à température ambiante et pour 4h de silanisation. Les angles de contact obtenus sont présentés dans le Tableau 2.18.

	Essai 1	Essai 2	Essai 3	Essai 4	Essai 5
Angle de contact	$62,6^\circ \pm 0,3$	$60,5^\circ \pm 0,3$	$72,9^\circ \pm 0,2$	$78,4^\circ \pm 0,5$	$84,1^\circ \pm 1,0$

Tableau 2.18 – Angles de contact moyens d'une goutte d'eau obtenus lors du test de reproductibilité du protocole de silanisation du silicium avec les silanes CH_3 court dans le four n°3.

Une tendance dans les angles de contact ressort : après être restés constants lors des deux premiers essais, ils augmentent à chaque essai pour finalement atteindre plus de 80°, la valeur que l'on obtenait avec les autres fours.

À ce jour, nous n'avons pas d'explication certaine sur la faible reproductibilité des angles de contact. Notre hypothèse serait une pollution lors du nettoyage par l'UV-ozone avant la fonctionnalisation des échantillons, ce qui provoquerait une mauvaise hydroxylation de la surface de silicium. Cette hypothèse vient d'une expérience parallèle que nous avons menée lors des tests de silanisation avec ce four. Lors des premiers essais, nous avons préparé deux types d'échantillons pour la silanisation. Le premier comme pour les fours précédents avec l'UV-ozone et le second était nettoyé avec une solution de SC-1 (mélange de NH_4OH , H_2O_2 et eau). Comme les angles de contacts étaient différents avec ces deux méthodes, nous avons gardé les deux protocoles sur deux échantillons différents à chaque expérience pour essayer de trouver une tendance et une

explication. Or, au fur et à mesure des expériences avec un temps de réaction de 4h, les angles de contact obtenus avec le nettoyage UV-ozone augmentaient alors que ceux avec le nettoyage SC-1 restaient stables. Il semblerait donc que l'utilisation répétée de l'UV-ozone a permis de nettoyer la pollution qui se trouvait à l'intérieur pour finalement retrouver des angles de contact attendus pour la silanisation par des silanes CH₃ court. Si cette hypothèse est validée, cela signifie que le protocole présenté précédemment permet une bonne silanisation des échantillons. Il faudrait refaire une étude de reproductibilité pour vérifier cette hypothèse. Dans la suite, les mesures en spectrométrie de masse ont été faites sur les substrats issus de l'essai n°5.

Protocole de silanisation avec le four n°3 Le protocole retenu pour la fonctionnalisation avec les silanes CH₃ court dans le four n°3 est le suivant :

1. Dégazage du four à 200°C, pendant plus d'une heure ;
2. Nettoyage des échantillons à l'UV-ozone 30 min à 25°C avec flux de dioxygène ;
3. Dégazage des échantillons pendant 30 min à 150°C. Le bulleur est maintenu à température ambiante ;
4. Refroidissement du réacteur à température ambiante ;
5. Pompage du réacteur puis ouverture de la vanne du bulleur pour équilibrer la pression en silane dans l'ensemble de la chambre avec celle du bulleur ;
6. Chauffage de la chambre à 150°C et réaction pendant 4h en système fermé ;
7. Pompage du réacteur et refroidissement ;
8. Nettoyage des échantillons au THF puis à l'eau dans un bain à ultrasons, pendant 10 min à chaque fois.

2.3.6.c Caractérisation des surfaces

Caractérisation par XPS du silicium plan Une caractérisation XPS de l'échantillon donnant l'angle de contact le plus élevé lors du test de reproductibilité (Essai 5) a été faite. Le survol et le spectre fin du niveau de cœur Si 2p sont présentés dans la figure 2.19. Le pic Si(-O)₁ caractéristique du silane est bien visible sur le spectre du Si 2p et d'après l'équation 2.1, la densité de la couche de silane est estimée à 4 nm⁻², soit la valeur attendue, égale à celle de la fonctionnalisation en phase liquide.

Caractérisation par XPS du silicium poreux La caractérisation des échantillons plans donne de bons résultats, nous avons ensuite caractérisé par XPS une monocouche de silanes CH₃ court sur une surface de silicium poreux. Les spectres sont présentés dans la figure 2.20, les pourcentages atomiques et les énergies de liaison sont données dans le tableau 2.19.

On observe des pics correspondant aux niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. Dans le cas du Si 2p, les quatre sous-oxydes sont présents comme pour les autres surfaces silanisées ainsi que le doublet métallique. Le rapport C 1s/Si(-O)₁ de 5,0 vérifie la stœchiométrie de la molécule de silane et la densité finale de silane, obtenue à partir de l'équation 2.1 à la page 71, est de 3,8±0,4 nm⁻² soit la même densité que lors de la silanisation en phase liquide. Les variations de cette

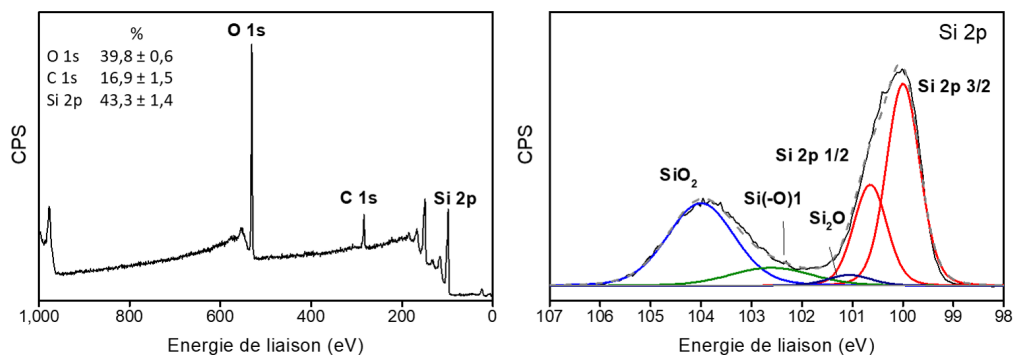


Figure 2.19 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes CH_3 court sur du silicium plan obtenue avec le four n°3 : survol et spectre fin du niveau de cœur Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

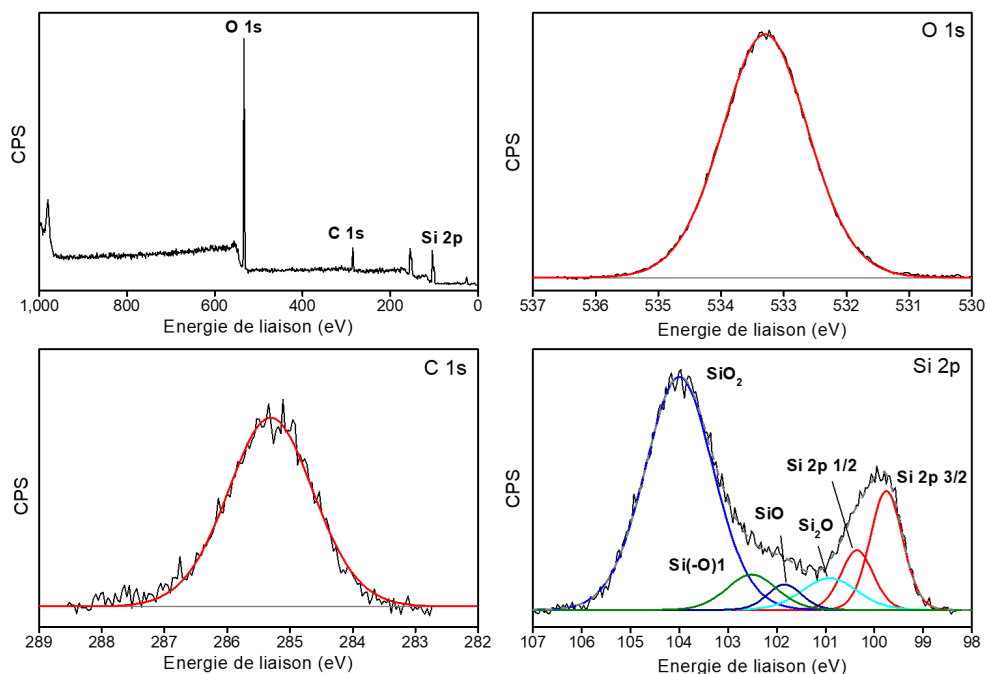


Figure 2.20 – Spectres XPS d’une monocouche de silanes CH_3 court sur du silicium poreux obtenue avec le four n°3 : survol et spectres fins haute résolution des niveaux de cœur C 1s, O 1s et Si 2p. L’angle entre la surface et l’analyseur est de 30° .

densité sont supérieures à celles obtenues avec les autres silanes (10 % pour les silanes CH_3 court contre 2 ou 3 % pour les autres) mais restent dans l’intervalle des variations attendues [212]. Il semble donc que la fonctionnalisation sur les derniers essais soit bonne, malgré le manque de reproductibilité.

	O 1s	C 1s	Si 2p					
	O-Si	C-C	Si 2p3/2	Si 2p1/2	Si ₂ O	SiO	Si(-O) ₁	SiO ₂
E (eV)	533,3	285,3	99,7	100,3	100,8	101,8	102,5	104,0
% at	46,2	13,5	6,0	3,0	2,7	1,3	2,7	24,7

Tableau 2.19 – Énergies de liaison (en eV) et pourcentages atomiques des pics de déconvolution d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé avec des silanes CH₃ court dans le four n°1.

Caractérisation par ToF-SIMS L'analyse en profondeur par ToF-SIMS est présentée en Figure 2.21 avec comme référence un échantillon non fonctionnalisé. Comme pour les fours précédents, les profils des ions C⁻ et H⁻ confirment la présence des silanes sur toute la profondeur des pores avec une silanisation conforme de la surface.

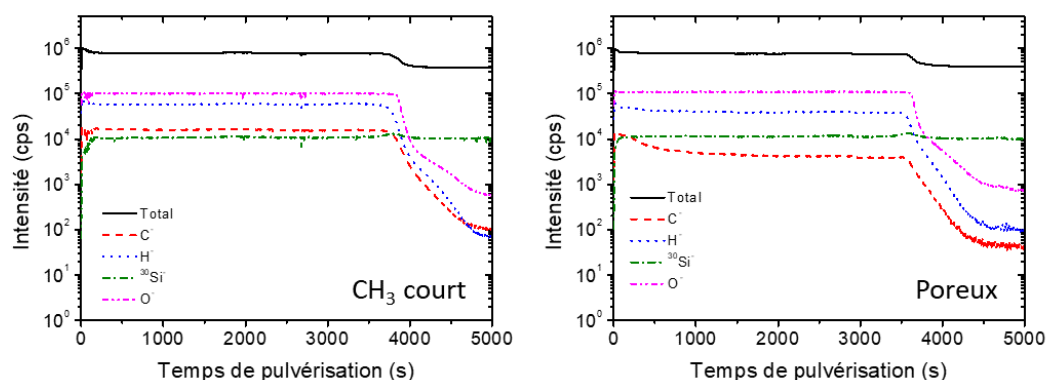


Figure 2.21 – Analyse en profondeur en ToF-SIMS d'un échantillon de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH₃ court à gauche et d'un échantillon de silicium poreux non fonctionnalisé à droite. Les principaux ions sont présentés. Les courbes sont normalisées par la valeur de ³⁰Si⁻ dans le Si bulk, c'est-à-dire pour un temps supérieur à 4300 s.

2.3.6.d Conclusion

Ce four, qui a été créé en s'inspirant des deux fours précédents, pour travailler uniquement avec des vapeurs de silanes comme le premier et limiter au maximum les tuyaux entre les différents composants pour éviter l'apparition de points froids dans le système, a permis de fonctionnaliser efficacement des échantillons de silicium avec les silanes CH₃ court.

Dans la suite, il sera intéressant d'essayer de créer des couches mixtes de silanes en ajoutant un deuxième bulleur. Il sera possible de régler la température de ce bulleur indépendamment du premier, ce qui permettrait de créer des couches de silane dont les proportions peuvent varier. Dans l'optique de travailler sur la détection de métabolites en spectrométrie de masse comme nous le faisons dans la suite, l'utilisation d'une couche mixte permettrait de modifier les propriétés physico-chimiques de la surface et ainsi modifier les paramètres de détection de certains métabolites.

2.4 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté les protocoles pour la silanisation du silicium plan et poreux en phase gazeuse. En plus du four précédemment utilisé dans le laboratoire, trois nouveaux réacteurs ont été créés, de différentes tailles et avec un système d'injection des silanes dans la chambre différent (par vapeur ou directement en injectant le liquide). Ces fours répondaient chacun à un cahier des charges visant à améliorer la silanisation grâce aux résultats obtenus avec les fours précédents. La phase gazeuse permet de fonctionnaliser des surfaces plus grandes que la silanisation en phase liquide et permet également de ne pas utiliser des solvants.

Le premier avait pour objectif de pouvoir fonctionnaliser une grande quantité d'échantillons et, à terme, de pouvoir créer des couches mixtes de silanes. Un protocole d'injection des silanes par cycle dans le four nous a permis d'obtenir des résultats d'angle de contact identiques à la fonctionnalisation en phase liquide.

Cependant, la quantité de silane consommée est importante par rapport à la taille des échantillons fonctionnalisés (1,7 mL), en particulier lorsque les échantillons sont petits car la quantité de silanes utilisée est indépendante de la taille des échantillons. De plus, il était difficile de garder une température homogène dans les longs tuyaux d'injection ce qui pouvait créer des points froids où le silane pouvait se liquéfier. Ces deux problèmes nous ont amené à mettre au point un deuxième four, plus petit pour lequel le silane est directement injecté dans la chambre. Dans ce four, 100 μL de silane (CH_3 court et NH_3^+) sont suffisants pour fonctionnaliser les échantillons dans le réacteur (environ 40 cm^2). Nous avons cependant remarqué que pour obtenir une monocouche reproductible de silanes, il est nécessaire que le four soit à température ambiante lors de l'introduction des silanes dans la chambre pour éviter son évaporation trop rapide lors de l'injection.

Placer le silane directement dans le four présente l'inconvénient de devoir ouvrir le réacteur lors de l'introduction, ce qui peut contaminer les échantillons. Pour supprimer ce risque, nous avons développé un troisième four, pour lequel le bulleur est de nouveau placé en dehors de la chambre mais pour lequel la ligne d'injection est plus petite que sur le premier four. De plus, sa forme a également été optimisée pour minimiser la quantité de silane nécessaire pour remplir la chambre. Les derniers résultats montrent que la quantité de silane pour fonctionnaliser un substrat (jusqu'à 80 cm^2) est faible (quelques dizaines de μL) mais il est important de laisser la réaction plusieurs heures, plus longtemps que pour le four n°2 où une ou deux heures étaient suffisantes, pour obtenir les angles de contact attendus.

Les fours utilisés pour chaque silane ainsi que la densité de silane sur les surfaces poreuses sont résumés dans le Tableau 2.20. Le four 0 correspond à celui déjà utilisé dans l'équipe pour la fonctionnalisation avec les silanes COO^- . Les valeurs présentées sont issues d'un même lot d'échantillons pour les silanes COO^- , CH_3 long et CH_3 court pour lesquels les fours étaient suffisamment grands pour silaniser une quantité d'échantillons suffisante pour les mesures de spectrométrie de masse. Dans le cas du silane NH_3^+ qui a été utilisé avec le four n°2, plus petit, plusieurs lots d'échantillons ont été préparés et la reproductibilité en XPS présentée a été obtenue sur des échantillons de différents lots.

	COO ⁻	CH ₃ long	NH ₃ ⁺	CH ₃ court
Four	0	1	2	3
Densité de silanes (nm⁻²)	5,4 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,4 ± 0,1	3,8 ± 0,4

Tableau 2.20 – Récapitulatif de la densité de silanes pour chaque surface. Les écarts types sont obtenus à partir de mesures sur trois échantillons différents.

Une première analyse sur des échantillons de silicium plan permet de confirmer la bonne silanisation des surfaces avec des densités de silanes équivalentes à celles de la fonctionnalisation en phase liquide (environ 4 nm⁻²). L'étude XPS plus approfondie des échantillons poreux montre que la silanisation est reproductible pour tous les silanes et qu'aucune contamination n'est visible à la surface. L'estimation de la densité de silanes donne les mêmes valeurs autour de 4 nm⁻² pour tous les silanes, sauf pour le silane COO⁻ pour lequel la densité est estimée à plus de 5 nm⁻². Cette différence par rapport aux autres surfaces pourrait être expliquée par une silanisation plus longue dans le cas des silanes COO⁻ (12h) par rapport aux autres silanes (maximum 4h).

De plus, la consommation de silane pour une même surface de silicium est divisée par au minimum un facteur 3 (Tableau 2.21). Cette consommation de silanes plus faible pour une fonctionnalisation équivalente était un des objectifs recherchés et valide les protocoles développés dans ce chapitre.

	Surface max (cm ²)	Consommation en silanes	Silanes pour 10 cm ²
Phase liquide	10	100 µL	100 µL
Four 1	1500	1,7 mL	12 µL
Four 2	30	100 µL	33 µL
Four 3	70	< 100 µL	< 15 µL

Tableau 2.21 – Surface de silicium silanisable et consommation en silanes par cycle de fonctionnalisation pour chaque four par rapport au protocole en phase liquide.

Ces protocoles développés ont un temps de réaction assez bas comparé aux protocoles habituellement utilisés dans la littérature, de quelques heures alors que d'autres peuvent durer une journée. Nous avons obtenus cependant des résultats équivalents pour la couverture de silane. Cette différence pourrait venir de la température de la réaction qui est souvent plus basse que la nôtre.

Ces résultats sur le silicium poreux sont confortés par les analyses en profondeur en ToF-SIMS. Elles montrent une silanisation uniforme des pores avec un profil des principaux éléments présents sur la surface constant sur toute la profondeur. À partir des résultats d'XPS et de ToF-SIMS, nous pouvons conclure que la silanisation des échantillons est conforme pour l'ensemble des silanes.

Maintenant que les protocoles de silanisation ont été développés pour les trois fours, il peut être intéressant de créer des couches mixtes de silane, en ajoutant un deuxième bulleur sur le four n°3, ce qui n'a jamais été fait. Les deux bulleurs sont indépendants et il est possible de choisir deux températures pour les silanes. Grâce à cela, nous pourrions choisir deux pressions partielles différentes dans le réacteur et créer une couche mixte de silanes, combinant leurs propriétés.

Il serait également intéressant de s'intéresser au procédé de silanisation en lui-même. En particulier, lors de la réaction (Figure 1.6), il est nécessaire de bien contrôler la quantité d'eau car elle permet que la réaction ait lieu, mais une quantité d'eau trop importante dans le milieu peut détériorer la silanisation. Il a été montré qu'en chauffant à une température supérieure à 190°C, il était possible de totalité de l'eau sur une surface, même la monocouche de surface [213, 214]. Notre travail se faisant à 150°C, cette monocouche est donc encore au moins partiellement présente et la silanisation fonctionne. Il existe probablement une température limite pour que la réaction se déroule correctement et une température optimale pour que la silanisation soit la plus efficace. L'objectif de la thèse était de trouver un protocole reproductible mais dans le futur, l'étude plus théorique de ces procédés et l'étude fine de ce paramètre pourrait permettre de continuer l'optimisation de la silanisation en phase gazeuse.

Dans la suite de l'étude, nous avons utilisé ces différents protocoles pour créer des monocouches uniformes avec un silane pour fonctionnaliser de façon reproductible nos surfaces de silicium poreux et permettre l'adsorption des métabolites. Nous avons ainsi pu tester la détection des métabolites en fonction des propriétés chimiques des silanes. Des analyses approfondies de ces mesures sont présentés dans les Chapitres 4 à 6 qui présentent nos résultats sur la détection des métabolites en MALDI-MS et en DIOS-MS sur des substrats de silicium poreux fonctionnalisés.

Dynamique Moléculaire - Simulation de métabolites adsorbées sur des surfaces de silice fonctionnalisée

3.1 Introduction

En parallèle des travaux expérimentaux de silanisation de substrats de silicium, nous avons modélisé le comportement de notre panel de métabolites en présence des surfaces de silanes. L'objectif est de caractériser les interactions des métabolites avec une surface de silice fonctionnalisée par des silanes, afin de déterminer s'il est possible d'adsorber sélectivement certains métabolites. Les monocouches de silanes sont issues du travail de thèse de Solène Lecot et les systèmes ont été adaptés pour modéliser des surfaces de silice poreuse. C'est le sujet de ce chapitre : une adsorption sélective pourrait aider à diminuer le bruit de fond en spectrométrie de masse et améliorer la détection.

Les 4 silanes, CH_3 court, CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ ont été étudiés dans trois configurations différentes : silice plane, silice en feuillets et silice poreuse. Nous présentons la création des différents systèmes contenant les métabolites sur chacune des surfaces et les paramètres des simulations réalisées sur le ordinateur Newton de l'École Centrale de Lyon. Nous discutons également les avantages de chaque système et leurs limites pour la modélisation des phénomènes physiques comme la concentration en ions et la densité du solvant dans le système. En couplant le tout, nous espérons nous approcher plus fidèlement de la réalité.

Dans un second temps, nous présentons les résultats de la modélisation. Nous étudions l'influence de la configuration de la silice sur le positionnement des silanes sur la surface. Ensuite, nous validons les systèmes en comparant globalement le comportement des métabolites en fonction des configurations de la silice et des silanes. Enfin, nous présentons en détail l'adsorption des métabolites sur les surfaces de silice poreuse fonctionnalisée. Pour cela nous calculons les énergies d'interaction et nous regardons l'orientation des métabolites sur la surface et nous mettons cela

en relation avec les propriétés physico-chimiques des silanes et des métabolites, en particulier les charges, le caractère hydrophobe des métabolites et la longueur de la chaîne alkyle des silanes.

3.2 Matériel et méthodes

3.2.1 Présentation des métabolites

Dans cette étude, nous reprenons le panel de 14 métabolites présentés à la page 54. Ceux-ci sont redonnés dans le Tableau 3.1 avec leurs propriétés.

Métabolite	Statut	Masse (g/mol)	Charge	LogP	Référence
Glycine	Sepsis	75,1	0	-3.41	[4, 5]
Cystéine	Sepsis	121,2	0	-2.79	[4, 5]
Carnitine	Commun	161,2	0	-5.48	
Acide urique	Sepsis	168,1	0	-1.54	[5]
Glucose	Sepsis	180,2	0	-2.93	[203, 204]
Caféine	Commun	194,2	0	-0.55	
Acide myristique	Sepsis	228,4	0	6,10	[17]
Glutathion	Sepsis	307,3	0	-4.89	[5]
Glutamine	Sepsis	146,1	-0,11	-4.00	[4, 5]
Méthionine	Sepsis	149,2	-0,11	-2,19	[4, 5, 18]
Phénylalanine	Sepsis	165,2	-0,11	-1,18	[4, 5]
Tryptophane	Sepsis	204,2	-0,11	-1.10	[5]
Créatine	Commun	131,1	-1	-2.86	
Arginine	Sepsis	174,2	0,89	-3.16	[4]

Tableau 3.1 – Métabolites de l'étude de dynamique moléculaire avec leurs propriétés physico-chimiques et leur charge dans le système. Les valeurs de LogP ont été obtenues à partir du site Chemicalize [205].

Les métabolites ont des masses similaires, comprises entre 75 et 308 g/mol. Dix d'entre eux ont une masse comprise entre 100 et 200 g/mol. Huit métabolites ne sont pas chargés à pH 7, le pH physiologique qui sera utilisé pour l'étude. Un métabolite a une charge globale positive égale à 0,89, l'arginine et cinq sont chargés négativement, entre $-0,11$ et -1 (phénylalanine, tryptophane, méthionine, glutamine et créatine). Enfin, une information sur l'hydrophilie des molécules est donnée avec le LogP ($= \text{Log}(C_{\text{oct}}/C_{\text{eau}})$) où C_{oct} et C_{eau} sont respectivement la solubilité de la molécule dans l'octane et dans l'eau). Plus la valeur est négative, plus la molécule sera relativement soluble dans l'eau par rapport à l'octane. Dans l'étude, seul l'acide myristique a une valeur positive, le deuxième métabolite étant la caféine avec un LogP de $-0,55$.

3.2.2 Définition des systèmes initiaux

Dans la suite, nous présentons les trois systèmes utilisés dans cette étude, la silice plane, la silice en feuillets, et la silice poreuse, ainsi que leur création. Nous exposons également les limites de chaque système qui nous ont amenés à en créer plusieurs.

3.2.2.a Silice plane

Afin de modéliser les interactions entre les métabolites et une surface plane de silice silanisée, nous avons créé le système présenté dans la Figure 3.1, issu de celui utilisé par Solène Lecot *et al.* dans [6]. Nous ne gardons dans ce système que la couche de silice amorphe et la monocouche de silanes. Ces systèmes étant issus des résultats d'une première simulation, les couches de silanes sont déjà équilibrées à la surface. Dans la suite, les quatre couches de silanes étudiées sont les monocouches de CH_3 court, CH_3 long, COO^- et NH_3^+ , chacune avec une densité de 3 nm^{-2} correspondant aux densités obtenues lors des études précédentes de silanisation en phase liquide [6]. Les dimensions selon les axes x et y varient entre 8,20 nm pour le silane NH_3^+ et 8,24 nm pour le silane CH_3 court. Cela est dû à l'équilibre lors de la création des monocouches qui dilate légèrement la taille de la boîte. La dimension de l'axe vertical z est de 15,00 nm.

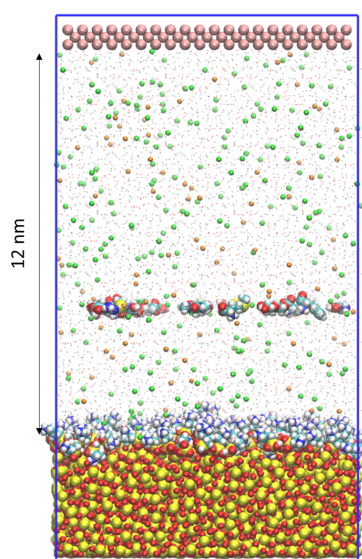


Figure 3.1 – Système initial de la silice plane avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- , les molécules d'eau et le mur de Lennard-Jones. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les atomes du mur de Lennard-Jones sont représentés en rose et les molécules d'eau par des points.

Métabolites Les 14 métabolites sont ajoutés aléatoirement, dans un plan à mi-hauteur de la boîte, grâce au code Python `position_metabolites_aleatoire.py`. Ce code permet de positionner les 14 métabolites sur le même plan, tous les métabolites étant séparés d'au moins 0,5 nm.

Mur de Lennard-Jones Les conditions de la boîte étant périodiques, pour bloquer les interactions dans le système entre le haut et le bas de la boîte, nous avons ajouté un mur de Lennard-Jones en haut de la boîte de simulation. Il est composé d'atomes arrangés de manière cubique centrée avec un paramètre de maille de 0,4 nm. Les paramètres du champ de force utilisé sont ceux publiés par Kitabata *et al.* [215]. Le code Python *LJ.layer.py* a été utilisé pour placer le mur de Lennard-Jones dans le système.

Molécules d'eau Les molécules d'eau sont ajoutées dans la boîte avec la fonction Gromacs *solvate*. Le modèle de l'eau est le TIP4P avec quatre atomes : l'atome d'oxygène et ceux d'hydrogène, et un atome virtuel portant la charge partielle associée à l'atome d'oxygène (Figure 3.2). Une deuxième étape consiste à enlever les molécules d'eau qui pourraient se trouver dans la silice ou au dessus du mur de Lennard-Jones à l'aide du code Python *remove_water_tip4p.py*.

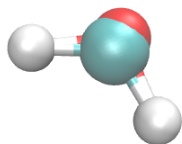


Figure 3.2 – Molécule d'eau selon le modèle TIP4P. La molécule comporte 2 atomes d'hydrogène (blanc), un atome d'oxygène (rouge) et un atome virtuel portant la charge partielle de l'oxygène (cyan).

Ions Na^+ et Cl^- Enfin, des ions Na^+ et Cl^- sont ajoutés au système pour équilibrer les charges dues aux métabolites et éventuellement aux silanes (dans le cas des silanes NH_3^+ et COO^-). Des ions Na^+ et Cl^- sont aussi ajoutés à une concentration de 0,150 mol/L pour s'approcher des conditions physiologiques. Cela se fait grâce à la fonction Gromacs *genion*.

Dans ce système, un mur de Lennard-Jones en haut de la boîte permet de bloquer la périodicité selon l'axe z. Cependant, lors de l'équilibre du système, une légère couche de vide apparaît entre l'eau et le mur. Cette configuration est classiquement utilisée pour l'étude des interactions analyte/surface en dynamique moléculaire. Cependant, comme nous le verrons dans la suite, cela a des conséquences sur l'adsorption de certains métabolites qui seront plus attirés par le vide que par la surface. Pour se rapprocher des conditions expérimentales, nous avons créé un deuxième système, plus original, constitué de deux couches de silice en feuillets.

Silice en feuillets Avec un système composé de deux surfaces de silice silanisée, plus proche de l'étude expérimentale, nous pouvons supprimer le mur de Lennard-Jones (Figure 3.3). Nous nous attendons à ce que ce système augmente la vitesse d'adsorption des métabolites (car la probabilité de contact métabolite/silane est plus élevée qu'avec le système précédent). Dans ce système, le pore est infini dans deux directions.

Pour obtenir les deux surfaces de silice amorphe fonctionnalisées, nous avons fait un miroir de la surface inférieure. Les deux surfaces sont donc identiques, avec la même densité de silanes. Pour cela, nous avons utilisé la fonction Gromacs *editconf*. Les deux surfaces sont ensuite fusionnées

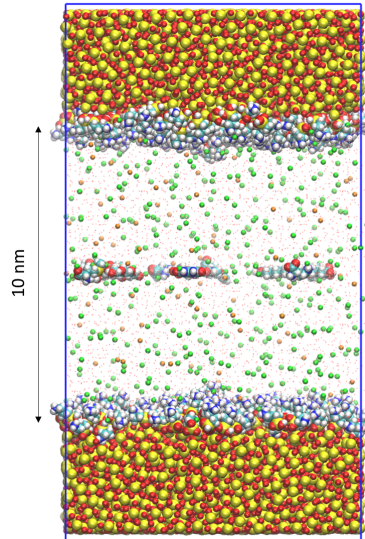


Figure 3.3 – Système initial de la silice en feuillets avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- et les molécules d'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les molécules d'eau sont représentées par des points.

avec le code Python *fusionner_fichier_gro.py*. Les dimensions finales de la boîte sont les mêmes que pour le système plan : entre 8,20 et 8,24 nm selon les axes x et y et 15,00 nm selon l'axe z. La distance entre les deux feuillets a été fixée à 10 nm pour s'accorder avec le pore expérimental dont le diamètre est de 10 nm également.

La création du reste de la boîte avec les métabolites, l'eau et les ions est identique à celle de la silice plane. En revanche, le mur de Lennard-Jones n'est pas ajouté au système.

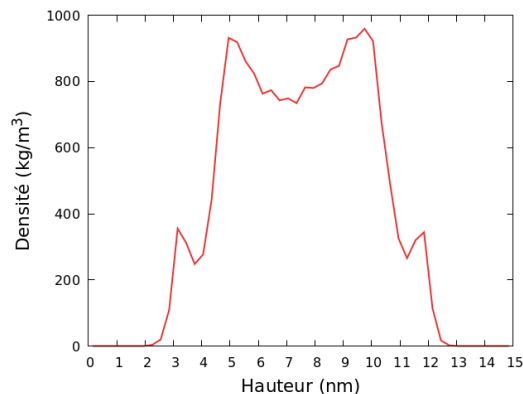


Figure 3.4 – Distribution des molécules d'eau dans le système de silice en feuillet avec les silanes COO^- en fonction de la hauteur. Les hauteurs inférieures à 2 nm et supérieures à 13 nm correspondent au substrat de silice.

Avec le feuillet supérieur, nous n'observons plus de couche de vide mais l'apparition d'une zone dans l'eau dans laquelle la densité est plus faible que le reste du bulk (Figure 3.4), dont il est difficile d'estimer les conséquences sur les interactions aux interfaces. Pour avoir un élément de comparaison, nous avons créé un troisième système en bloquant un nouvel axe de périodicité.

Silice poreuse Afin de se rapprocher davantage de la structure d'un pore, nous avons créé un troisième système présenté dans la figure 3.5. Par rapport au système précédent, celui-ci a l'avantage d'être infini suivant une seule direction. Néanmoins, il présente des zones angulaires à prendre en compte dans les analyses (voir la section sur les limitations à la page 107). On notera dans la suite x l'axe du pore et y et z les axes sur lesquels se trouvent les surfaces. Les dimensions de la boîte sont $10 \times 15 \times 15 \text{ nm}^3$.

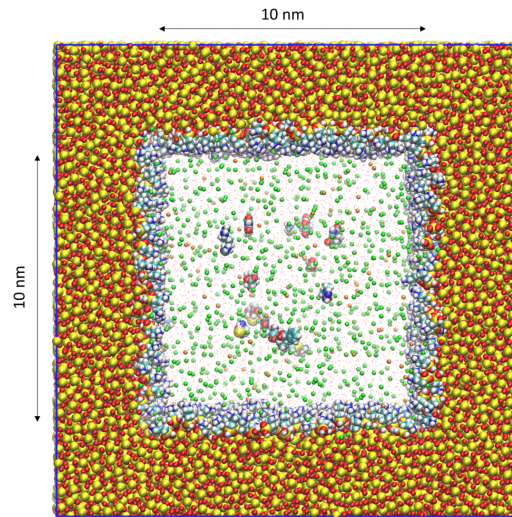


Figure 3.5 – Système initial de la silice poreuse avec la monocouche de silanes NH_3^+ , les 14 métabolites, la silice, les ions Na^+ et Cl^- et les molécules d'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyans le carbone, les blancs l'hydrogène, les dorés le soufre, les verts les ions Cl^- et les orange les ions Na^+ . Les molécules d'eau sont représentées par des points.

La création du pore a été faite grâce à la fonction Gromacs *editconf*. Les surfaces inférieure et supérieure mesurent $10 \text{ nm} \times 15 \text{ nm}$ de côté et ont une épaisseur de $2,5 \text{ nm}$. Les faces gauche et droite sur la Figure 3.5 mesurent $10 \text{ nm} \times 10 \text{ nm}$ avec une épaisseur de $2,5 \text{ nm}$. Les surfaces sont assemblées avec le script Python *fusionner_fichiers_gro.py*. Le système obtenu n'est cependant pas utilisable comme cela car un espace de $0,5 \text{ nm}$ est nécessaire entre surfaces pour éviter la superposition des atomes lors de la fusion des fichiers (image à gauche sur la figure 3.6). Pour créer un solide uniforme sur tout le pore, nous avons ajouté une étape de minimisation de l'énergie. Les détails de cette minimisation seront présentés dans le paragraphe 3.2.3 du protocole de simulation. La boîte avant et après minimisation est présentée en Figure 3.6. Comme pour les feuillets, la distance entre deux faces opposées du pore a été fixée à 10 nm .

Monocouche de silane Dans le cas de la silice plane et de la silice en feuillets, les couches de silanes étaient celles issues des systèmes déjà développés dans l'équipe [6]. Pour la silice poreuse, il était nécessaire de retirer les silanes pour créer la surface à cause des possibles superpositions des atomes dans les angles. Les silanes ont donc été ajoutés dans un second temps.

Nous les avons ajoutés en deux temps : en haut et en bas, puis à gauche et à droite. On place les silanes à la densité souhaitée (3 nm^{-2}) grâce aux codes Python *couche_aleatoire_python_pore_z.py*, *add_silane.py* et *fusionner_fichiers_gro.py* qui utilisent la fonc-

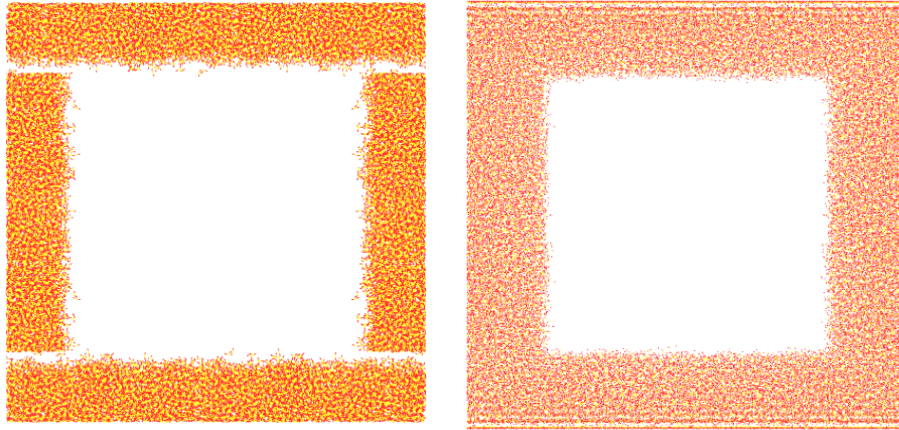


Figure 3.6 – Aspect du pore de silice amorphe avant la minimisation de l'énergie du système (gauche) et après la minimisation de l'énergie (droite).

tion Gromacs *editconf*. Les silanes sont disposés aléatoirement à 0,3 nm de l'une des deux surfaces de silice. De l'eau est ensuite ajoutée au système avec *solvate* et enlevée de la silice avec les codes *remove_water_tip4p-y.py* et *remove_water_tip4p-z.py*. La neutralité du système est assurée par l'ajout éventuel d'ions Na^+ et Cl^- . L'équilibre du système est fait en minimisant l'énergie puis grâce à des équilibres NVT (nombre d'atome, volume et température constants) et NPT (nombre d'atomes, pression et température constants). Les détails de ces trois étapes sont présentés dans la section sur les paramètres de simulation (page 105). Dans ces deux équilibres, une restriction de mouvement est ajoutée aux atomes d'oxygène à la base des silanes selon l'axe z. Les mouvements des silanes lors de ces étapes ne peuvent se faire que latéralement.

Nous avons procédé de même pour les surfaces latérales. L'eau et les ions ont été enlevés du système équilibré et les silanes sur les surfaces latérales ont été ajoutés grâce aux codes Python *couche_aleatoire-python-pore-y.py*, *add_silane.py* et *fusionner_fichiers-gro.py*. Les étapes suivantes sont identiques à celles développées pour les premières couches de silanes. Pour les équilibres NVT et NPT, la base des silanes est bloquée selon l'axe y, ils ne peuvent bouger que dans le plan (x,z).

Métabolites Avec la silice poreuse, les métabolites ne peuvent pas être mis sur un plan. Nous avons donc créé un nouveau script Python *position_metabolites_aleatoire_3D.py* qui, avec la fonction Gromacs *editconf*, permet de placer les métabolites aléatoirement dans un cylindre ayant le même axe que le pore et de diamètre 5 nm.

L'eau et les ions sont ensuite ajoutés comme pour les configurations de silice précédentes.

3.2.3 Paramètres des simulations

Le protocole de simulation peut être séparé en quatre étapes : la minimisation de l'énergie, un équilibre NVT, un équilibre NPT et la production.

Minimisation de l'énergie La première étape de minimisation de l'énergie permet de modifier légèrement les positions des atomes constituant le système afin d'équilibrer le système et minimiser les forces appliquées à chaque atome. Cela permet donc de diminuer les contraintes pouvant être exercées. Pour la minimisation, nous fixons la température à 300 K et la pression à 1 bar. L'intégrateur utilisé est l'intégrateur steep. La minimisation continue jusqu'à ce que la force maximale exercée sur chaque atome soit inférieure à $1000 \text{ kg.mol}^{-1}.\text{nm}^{-1}$. Des restrictions de mouvement sont appliquées sur la silice, le mur de Lennard-Jones et les atomes d'oxygène à la base des silanes qui se lient avec la silice (seulement selon l'axe z pour cet atome).

Dans le cas de silice poreuse, cette étape a été répétée plusieurs fois : lors de la création de la surface de silice et lors de l'ajout des silanes. Une dernière minimisation a été effectuée lorsque l'ensemble des atomes de l'étude ont été ajoutés au système. Il en sera de même pour les équilibres NVT et NPT.

Équilibre NVT Après la minimisation de l'énergie, l'équilibre NVT permet l'équilibre des molécules (solvant et métabolites) à la bonne température et à la bonne pression. Dans l'ensemble NVT, le nombre de particules, le volume et la température restent constants. L'équilibre NVT est fait avec un intégrateur MD qui résout les équations du mouvement avec l'algorithme *leap-frog*. Nous réalisons un équilibre NVT de 100 ps avec un pas de temps de 2 fs. La température est maintenue à 300 K avec un thermostat de Nosé-Hoover. Les vitesses initiales des atomes sont déterminées avec une distribution de Maxwell-Boltzmann. Des contraintes sont appliquées sur les liaisons hydrogènes (algorithme LINCS).

Équilibre NPT L'ensemble NPT, pour équilibrer la pression et la densité du système, est à nombre de particules, pression et température constants. Les paramètres sont identiques à ceux de l'équilibre NVT : même intégrateur MD, simulation sur 100 ps avec un pas de temps de 2 fs, 300 K maintenus avec thermostat de Nosé-Hoover et contraintes sur les liaisons hydrogènes. Le barostat est de Parrinello-Rahman et permet de maintenir la pression à 1 bar. Les vitesses initiales des atomes sont les vitesses finales obtenues lors de l'équilibre NVT.

Production L'étape de production, sur une durée beaucoup plus longue que celles des équilibres NVT et NPT, permet d'étudier les interactions des métabolites avec leur environnement en les laissant se déplacer librement dans la boîte selon les équations du mouvement. Les contraintes de mouvement sont les mêmes que pour les autres étapes, tout comme les contraintes sur les liaisons hydrogènes. La durée des productions est comprise entre 100 ns et 300 ns avec un pas de temps de 1 fs. Le barostat de Parrinello-Rahman permet de maintenir la pression constante et le thermostat de Nosé-Hoover la température constante.

Les vitesses initiales des atomes dans le premier réplica correspondent aux vitesses finales de l'équilibre NPT. Dans le cas de la silice en plane et de celle en feuillets, pour les autres réplicas, les vitesses initiales sont fixées de manière aléatoire selon une distribution de Maxwell-Boltzmann. La préparation était légèrement différente pour la silice poreuse. En effet, étant donné que les métabolites sont placés aléatoirement dans un cylindre, certains des métabolites sont initialement plus proches de la surface que d'autres. Pour limiter ce biais, l'ajout aléatoire

des métabolites dans la boîte est répété dans chaque réplique. Lors de la production, la vitesse initiale des atomes correspond à leur vitesse finale à l'issue de l'équilibre NPT.

Dans la suite, nous présenterons les résultats sur cinq répliques pour la silice plane et trois répliques pour les configurations de silice en feuillets et poreuse.

3.2.3.a Limites de la méthode

Les simulations (minimisation, équilibres et production) ne peuvent être lancées que si la charge globale dans la boîte est nulle. Il est donc nécessaire de compenser les charges des silanes par le même nombre d'ions de charge opposée (des Cl^- pour les silanes NH_3^+ et des Na^+ pour les silanes COO^-). Cela crée une sur-représentation de ces ions dans le système qui peut être non négligeable dans l'étude. En effet, dans le cas des silanes NH_3^+ , les ions Cl^- sont 3 fois plus nombreux que les ions Na^+ dans le système de silice plane, 5 fois plus nombreux avec la silice en feuillets et 11 fois plus nombreux pour le pore. Pour les surfaces non chargées CH_3 court et CH_3 long, les ions sont en même nombre et pour le silane COO^- , le rapport est inversé entre Na^+ et Cl^- . L'effet des ions (qui sera discuté dans les résultats) peut donc être influencé par leur nombre dans le cas des surfaces chargées.

Notre modélisation du pore conduisant à l'apparition d'angles ne reflètent pas vraiment la réalité. Par conséquent, nous ne considérons pas les interactions qui peuvent avoir lieu au niveau des angles entre les surfaces de silice. Nous prendrons comme seuil la valeur de 1 nm qui est également celle du seuil de *cut-off* pour le calcul des interactions à courte distance entre deux atomes du système.

De plus, nous étudions un pore infini, nous ne regardons donc pas les effets de bords. En particulier, nous ne nous intéressons pas à la fluidique de l'entrée des métabolites dans les pores. Nos pores expérimentaux ayant une profondeur de 1 μm , l'hypothèse d'un pore infini est toutefois valable pour l'étude des métabolites à l'intérieur des pores.

3.2.4 Paramètres d'analyse des simulations

Cette partie présente les différents paramètres d'analyse pour caractériser les simulations. Ils ont pu être obtenus grâce aux logiciels Gromacs et VMD et grâce à des codes Python que nous avons écrits.

3.2.4.a Énergies d'interaction

Le logiciel Gromacs permet de calculer les énergies d'interaction entre deux groupes de molécules au cours du temps. Il est par exemple possible d'obtenir les énergies d'interaction entre un métabolite et la surface de silanes. Ces énergies, associées aux interactions non liantes, sont séparées en deux groupes : les interactions coulombiennes et celles de Lennard-Jones, toutes les deux à courte portée, et nommées respectivement Coul-SR et LJ-SR, SR pour *Short Range*. Elles sont obtenues avec la fonction Gromacs *energy*. Même si les énergies permettent d'évaluer les interactions entre deux groupes de molécules, les valeurs du logiciel ne correspondent pas à

des quantités physiques comme l'énergie libre ou l'énergie de liaison parce que ni l'entropie, ni l'énergie de solvatation ne sont prises en compte.

3.2.4.b Définition d'un contact

En dynamique moléculaire, on définit généralement un contact entre deux molécules du système lorsque leur distance est inférieure à 0,3 nm. Notre première piste a donc été d'étudier la position du centre de masse des métabolites dans la boîte de simulation, en particulier selon l'axe vertical. Nous avons essayé de définir un contact entre les métabolites et les silanes en comparant la position verticale du métabolite avec celle du centre de masse des silanes. Cependant, les tests n'ont pas été concluants parce que cela ne permettait pas de différencier les contacts avec la surface de silice de ceux avec les silanes.

Nous avons alors défini un contact au cours de la simulation entre les métabolites et les silanes grâce à leur énergie d'interaction définie précédemment : il y a contact entre les deux molécules lorsque leur énergie d'interaction (négative) passe en dessous d'un seuil. Ce seuil a été fixé pour être en accord avec la visualisation en fin de simulation. Il a donc été pris à -20 kJ/mol.

Nos observations ont permis de séparer les métabolites en trois classes de comportement : ceux qui, à partir d'un certain temps, sont capturés et ne se désorbent pas, ceux qui ne sont jamais capturés par la surface, et enfin ceux qui alternent entre les deux états. Un profil d'énergie pour chacun des trois groupes est donné dans la Figure 3.7. Dans la suite, on définira une molécule comme capturée si elle l'est à la fin de la simulation. Dans le cas du troisième groupe, l'étude de plusieurs réplicas permet d'estimer cette variabilité : si un métabolite est en contact avec la surface pendant 50 % du temps alors il sera en moyenne capturé à la fin de la simulation dans la moitié des réplicas.

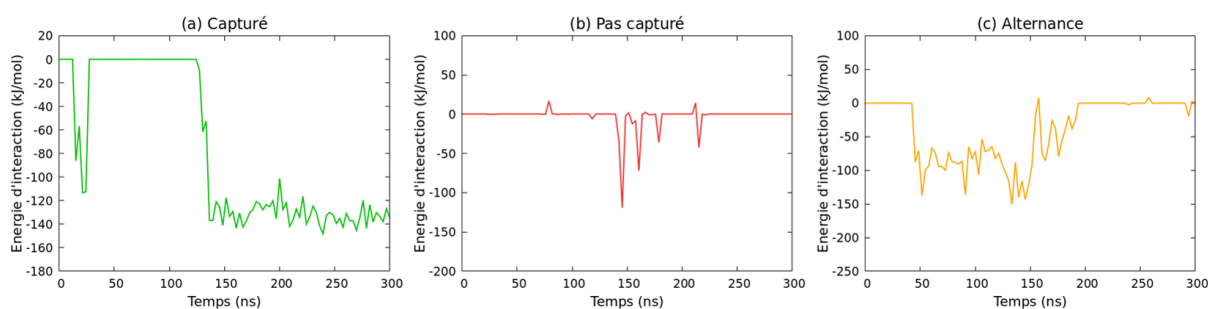


Figure 3.7 – Profil en énergie des trois groupes de métabolites en fonction de leur contact avec la surface : (a) capturé, (b) non capturé, et (c) alternance entre les deux états précédents.

3.2.4.c Durée de la simulation

La durée de la simulation a été fixée à 300 ns. Des essais jusqu'à 500 ns ont été faits et il a été observé que le nombre de métabolites capturés n'évoluait plus à partir de 300 ns pour tous les systèmes (Figure 3.8). Les graphes montrent qu'une durée de 100 ns n'est pas suffisante pour les systèmes de silice plane. En effet, si nous prenons l'exemple des silanes NH_3^+ (magenta),

avec la silice plane, 9,2 métabolites sont capturés après 100 ns contre 12,7 pour la silice en feuillets et poreuse. En augmentant ce temps à 300 ns, le nombre de métabolites adsorbés avec la silice plane passe à 11,6 contre 12,6 avec la silice en feuillets et poreuse. La diminution du temps nécessaire pour arriver à l'état final des captures par les silanes peut être expliquée par l'augmentation de la surface de silice silanisée avec la silice en feuillets et la silice poreuse. En effet, dans les deux cas, la probabilité pour les métabolites d'entrer en contact avec la surface est plus importante que pour la surface plane (la surface est deux fois plus grande pour la silice en feuillets et quatre fois plus pour la silice poreuse). Si la simulation est laissée suffisamment longtemps, la probabilité d'interagir avec la surface va augmenter, ce qui explique que le nombre de métabolites capturés par un silane semble converger vers la même valeur pour les trois types de silice.

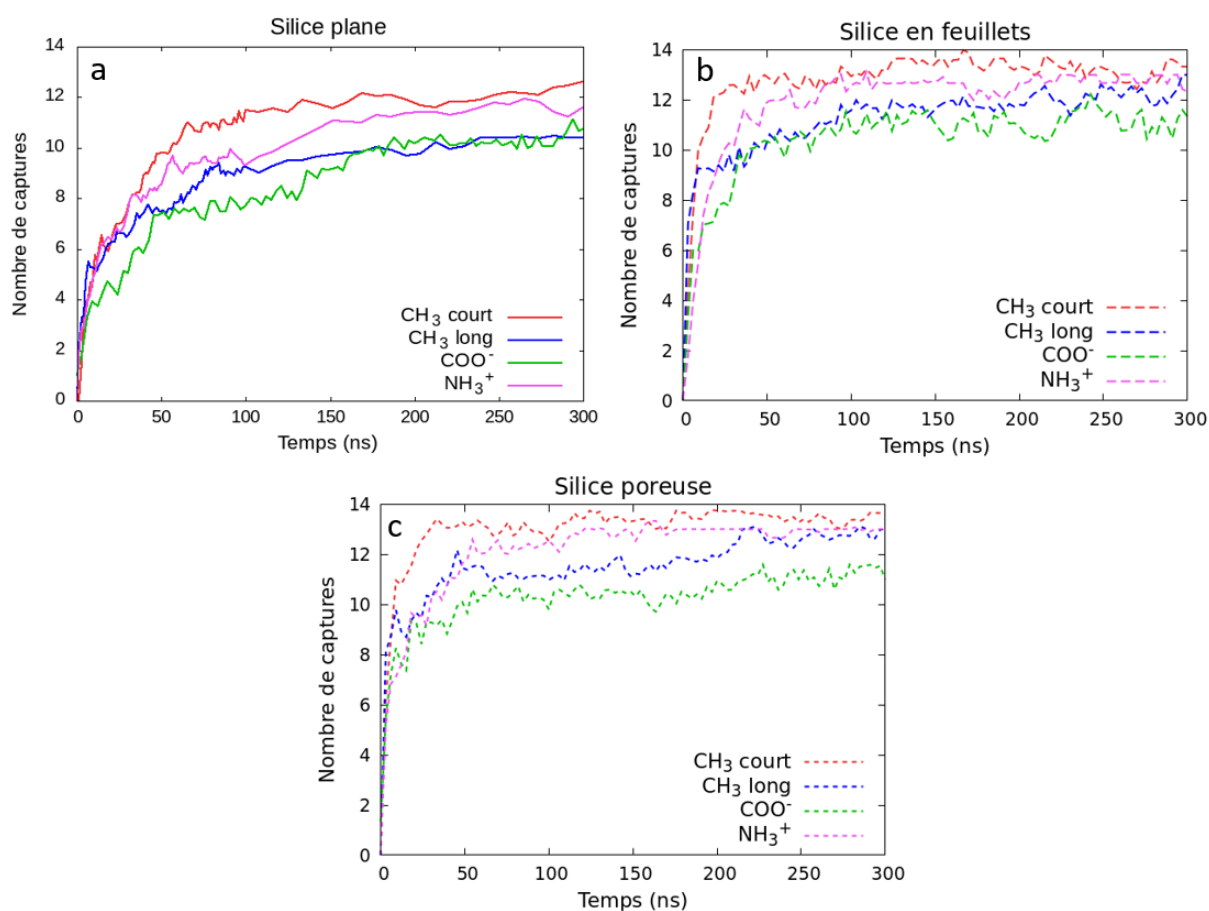


Figure 3.8 – Nombre moyen de métabolites capturés par les surfaces au cours de la simulation pour (a, trait plein) la silice plane, (b, tiret long) la silice en feuillets, et (c tiret court) la silice poreuse. En rouge, les surfaces fonctionnalisées par des silanes CH_3 court, en bleu par des CH_3 long, en vert par des COO^- et en magenta par des NH_3^+ . Les courbes sont lissées avec des courbes de Bézier.

3.2.4.d Visualisation de l'état final

Pour visualiser l'état final des simulations et observer les comportements des métabolites sur les silanes (orientation, placement et déformation), nous utilisons le logiciel VMD.

3.3 Interactions entre les silanes et les métabolites

3.3.1 Effet d'un pore sur la distribution 2D des silanes

La configuration de la surface et le confinement dû au pore peut avoir une influence sur l'organisation de la couche de silanes sur la silice. Dans la Figure 3.9 et la Figure 3.10, nous présentons l'organisation des silanes sur une surface de silice respectivement plane et poreuse. Dans le cas de la silice poreuse, une seule des quatre surfaces est présentée, les trois autres ayant une organisation similaire. Pour les couches CH_3 court, COO^- et NH_3^+ il ne semble pas y avoir de changement majeur de la répartition des molécules de silanes à la surface. Certaines zones sont moins denses ou vides dans les deux cas parce que les silanes ont la possibilité de bouger latéralement sur la surface lorsqu'il sont ajoutés. En revanche, une différence notable est visible pour les silanes CH_3 long. Alors que sur la surface de silice plane, on observe un trou dans la couche de silanes, ce trou n'est plus présent sur la silice poreuse.

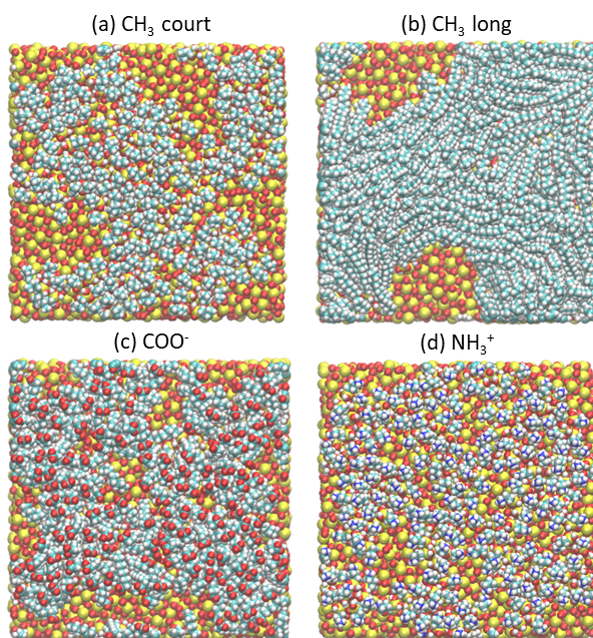


Figure 3.9 – Monocouche de silanes (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) COO^- , et (d) NH_3^+ sur une surface de silice plane. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les bleus l'azote, les cyanes le carbone et les blancs l'hydrogène.

L'origine de cette absence de zone sans silane provient probablement du confinement du pore et de l'encombrement stérique des silanes. Imaginons un pore circulaire de 10 nm de diamètre sur lequel sont greffés des silanes avec une certaine densité (Figure 3.11). Cette densité est définie comme le nombre de molécules de silane par unité de surface sur la surface de silice (le cercle extérieur sur le schéma). Imaginons maintenant la surface formée par les fonctions terminales CH_3 des silanes CH_3 long (le cercle intérieur sur le schéma). Les silanes ayant une longueur d'environ 2,5 nm, le diamètre du cylindre intérieur est donc deux fois plus petit que le diamètre du pore et l'aire du cylindre intérieur est également divisée par 2. La densité des fonctions terminales des silanes sur ce cylindre intérieur est donc deux fois plus importante que la densité sur la surface de silice. Ce doublement de la densité diminue la liberté de mouvement

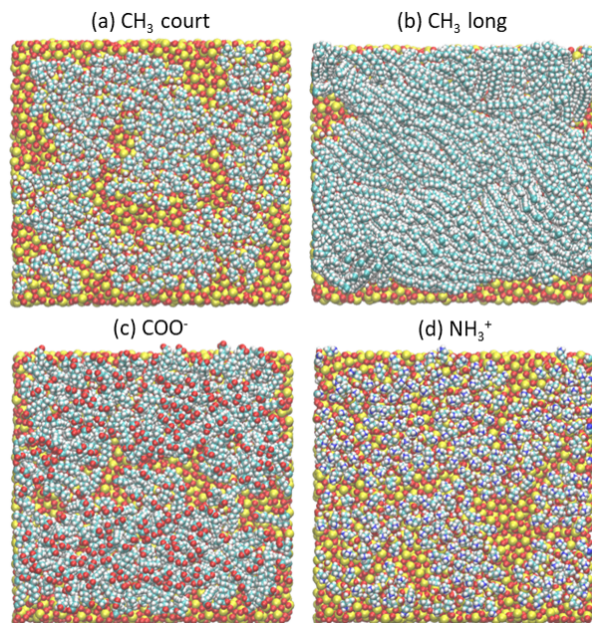


Figure 3.10 – Monocouche de silanes (a) CH_3 court, (b) CH_3 long, (c) COO^- , et (d) NH_3^+ sur un des côtés d’une surface de silice poreuse. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l’oxygène, les bleus l’azote, les cyans le carbone et les blancs l’hydrogène.

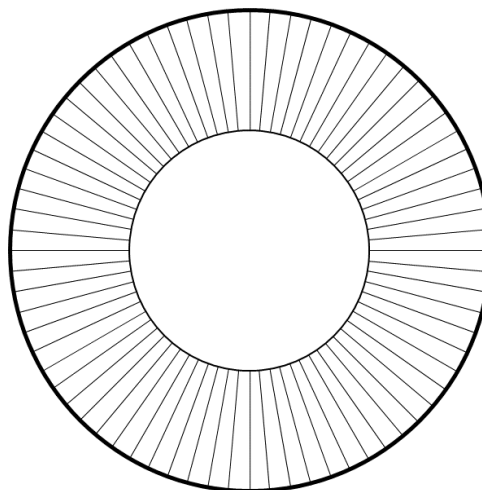


Figure 3.11 – Schéma de l’organisation des silanes CH_3 long pour un pore circulaire de 10 nm de diamètre.

des fonctions terminales et les oblige à s’orienter tous dans le même sens. Il n’est alors plus possible pour les silanes de se coucher sur la surface de silice et une organisation en ”brosse” apparaît. Dans le cas de notre pore de dynamique moléculaire qui n’est pas circulaire mais carré, ce phénomène est principalement présent sur les arêtes où les silanes des deux faces perpendiculaires se bloquent entre eux à cause du changement d’orientation, ce qui diminue leur densité à cet endroit. Cela se répercute sur l’ensemble des pores où les zones sans silane disparaissent par rapport aux autres configurations de silice.

3.3.2 Validation des systèmes aux regards de leurs limitations

Outre l'orientation des silanes dans les pores, d'autres phénomènes apparaissent à cause des caractéristiques et des limites de chaque système. Nous avons donc regardé si les résultats étaient cohérents entre eux et si les différences pouvaient venir de problèmes dans la modélisation. Comme cela peut se voir sur la Figure 3.8, après 300 ns, il semble qu'il y ait plus de métabolites liés à la surface lorsque la silice est poreuse ou en feuillet par rapport à la silice plane. Nous allons voir que ces différences peuvent être expliquées à partir de l'organisation des systèmes et de leurs limitations.

3.3.2.a Couche de vide au niveau du mur de Lennard-Jones

Dans l'étude des interactions sur de la silice plane, nous avons ajouté un mur de Lennard-Jones en haut de la boîte qui permet de bloquer la périodicité selon l'axe vertical. Cet ajout nécessite de retirer des molécules d'eau autour du mur ce qui fait apparaître une couche de vide entre le haut du milieu aqueux et le mur lors de l'équilibre du système. Cette interface peut modifier les observations en fin de simulation dans le cas des métabolites hydrophobes. En effet, la couche de vide hydrophobe permet de minimiser la surface de contact entre l'eau et les métabolites hydrophobes, c'est donc une position privilégiée pour certains métabolites. C'est le cas en particulier de l'**acide myristique** et de la **caféine**, les deux métabolites les plus hydrophobes que l'on s'attendrait à voir interagir fortement avec les silanes CH₃ court et CH₃ long également hydrophobes. On observe cependant que pour la moitié des répliques, ces métabolites ne sont pas fixés à la surface mais se trouvent à l'interface entre l'eau et le vide. L'ajout d'une autre surface, avec la silice en feuillets et la silice poreuse, et la suppression du mur de Lennard-Jones permettent de résoudre ce problème et l'acide myristique et la caféine se lient systématiquement à la surface.

3.3.2.b Organisation des silanes

Comme indiqué précédemment, la distribution des silanes CH₃ long est modifiée en présence des pores, par rapport aux autres configurations de silice. En conséquence, dans le cas de la silice poreuse, un métabolite va principalement interagir avec le groupe terminal du silane plutôt qu'avec la chaîne alkyle entière ou la base des silanes proche de la silice. Certains métabolites qui se fixaient donc principalement sur ces parties des silanes avec les autres configurations de silice peuvent être moins capturés avec la silice poreuse. C'est le cas par exemple de la carnitine qui était fixée sur la surface sur tous les répliques, grâce en partie à une bonne affinité avec la silice, sur la silice plane et la silice en feuillets, et qui n'est pas capturée sur une des productions avec la silice poreuse lorsque celle-ci est fonctionnalisée avec les silanes CH₃ long.

3.3.2.c Capture indirecte des métabolites grâce à un autre métabolite

Enfin, certains métabolites ont peu d'affinité avec une surface de silane et sont pourtant capturés sur tout ou une partie des répliques selon notre définition de la capture avec les énergies

(et également en mesurant les distances entre les atomes à la fin de la simulation). C'est en particulier le cas pour les métabolites hydrophiles sur les silanes CH_3 long hydrophobes. Dans certains cas, on observe que ces métabolites ne sont pas réellement fixés sur la surface mais un autre métabolite plus hydrophobe fait l'intermédiaire entre les silanes et le premier métabolite (Figure 3.12). Cet intermédiaire permet donc au métabolite d'être proche des silanes et de ne pas s'en détacher après un certain temps tout en gardant une énergie d'interaction faible.

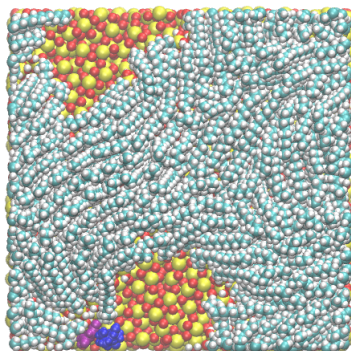


Figure 3.12 – Interaction indirecte entre les silanes CH_3 long et la carnitine (en bleu) par l'intermédiaire de l'acide urique (en violet). Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone, et les blancs l'hydrogène.

Les différences majeures peuvent donc être expliquées et la silice poreuse semble être adaptée pour l'étude des interactions entre les métabolites et les silanes. Dans la partie suivante, nous présentons donc les résultats détaillés de l'adsorption des 14 métabolites sur les surfaces de silice poreuse fonctionnalisée. Les résultats présentés sont obtenus après une simulation de 300 ns et sur trois répliques. Les résultats et interprétations pour les autres configurations de silice (plane et en feuillets) sont présentés en Annexe A.

3.3.3 Analyse des interactions métabolites/silanes dans le cas de la silice poreuse.

Le nombre de captures de chaque métabolite (sur 3) et leur énergie d'interaction avec les surfaces sont donnés dans le Tableau 3.2 et dans la Figure 3.13.

3.3.3.a Silane CH_3 court

La grande majorité des métabolites est capturée par la surface fonctionnalisée par les silanes CH_3 court (12 sur les 14 métabolites). Seules la glutamine et la créatine ne sont pas capturées pour un réplica.

Pour la **glutamine**, dans la simulation où le métabolite n'est pas capturé par les silanes, il l'est par la silice. L'affinité entre la silice et la glutamine est forte, grâce à la forte hydrophilie de la glutamine, ce qui explique pourquoi la molécule ne se détache pas de la surface pour se coller aux silanes. Il en est de même pour la **créatine** : dans le cas où elle n'est pas capturée par les silanes, elle l'est par la silice.

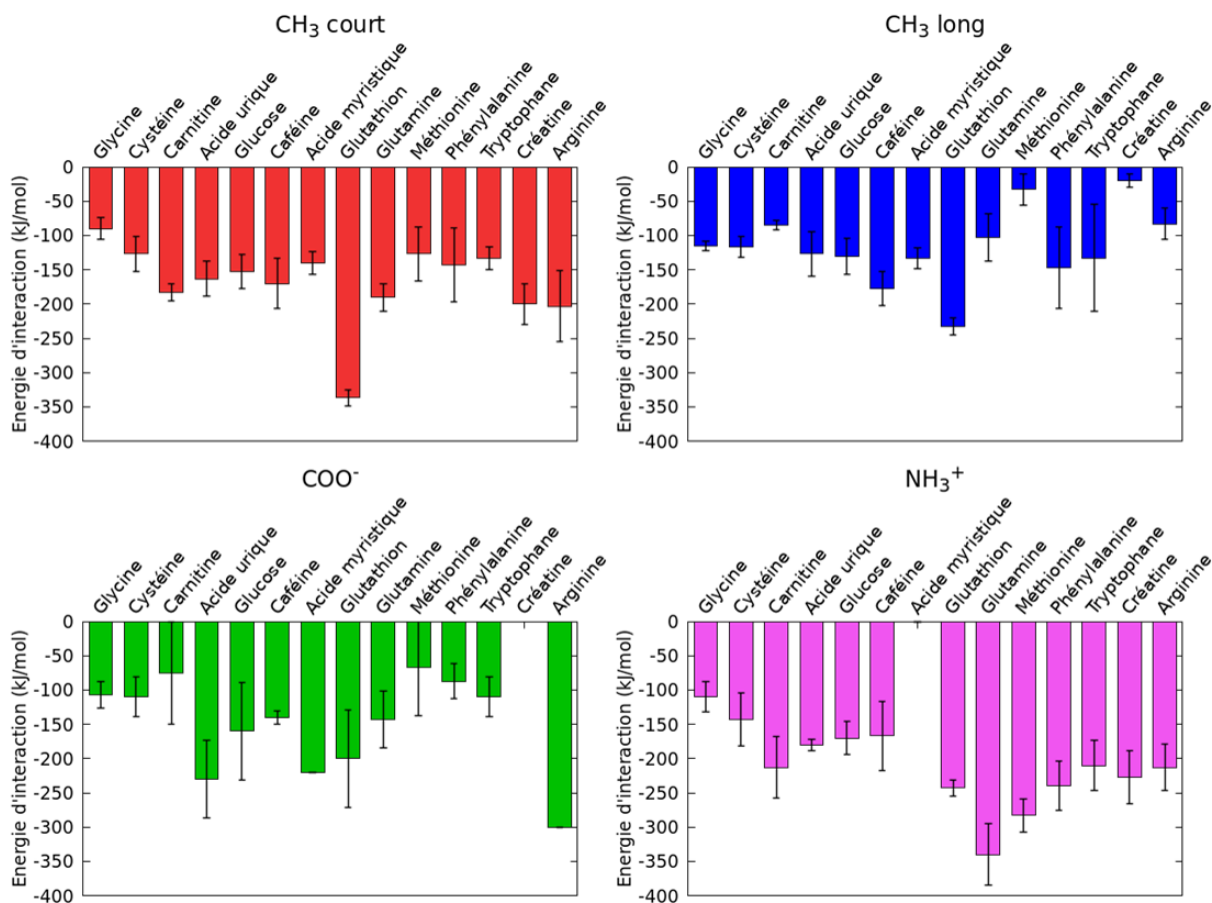


Figure 3.13 – Énergie d'interaction moyenne sur de la silice poreuse entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺. Les moyennes sont effectuées sur les répliques pour lesquels les métabolites sont capturés et les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.

Métabolite	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺
Glycine	3	2	3	3
Cystéine	3	3	3	3
Carnitine	3	2	1	3
Acide urique	3	3	3	3
Glucose	3	3	3	3
Caféine	3	3	2	3
Acide myristique	3	3	1	0
Glutathion	3	3	3	3
Glutamine	2	3	3	3
Méthionine	3	3	3	3
Phénylalanine	3	3	3	3
Tryptophane	3	3	3	3
Créatine	2	3	3	3
Arginine	3	3	3	3

Tableau 3.2 – Nombre de captures de chaque métabolite sur trois répliques par les quatre surfaces poreuses fonctionnalisées.

Finalement, tous les métabolites sont capturés à la fin de la simulation, soit par les silanes, soit par la silice. La **créatine** est particulière : alors que pour les deux autres configurations de silice, les énergies sont proches de 0 kJ/mol (Annexe A), elles passent à -200 kJ/mol avec la silice poreuse. Ce résultat est étonnant parce que la capture de la créatine ne se fait pas avec l'aide d'un autre métabolite comme cela peut être le cas parfois et la position de la molécule sur la surface ne semble pas être différente des autres simulations, elle ne se trouve par exemple pas au contact de deux surfaces. Les ions Na⁺ et Cl⁻ ne sont pas responsables non plus de cette différence car ils ne se trouvent pas à proximité de la molécule de créatine à la fin de la simulation.

3.3.3.b Silane CH₃ long

Dans le cas des silanes CH₃ long, 12 métabolites sont capturés sur les trois répliques et 2 ne le sont pas à chaque fois après les 300 ns : la carnitine et la glycine.

La **glycine** est capturée pendant la majorité de la simulation mais semble se décrocher dans les dernières nanosecondes. En comparant aux autres répliques et aux autres surfaces de silice, il est probable que ce décrochage ne soit que temporaire, comme cela arrive pour certains métabolites.

Le cas de la **carnitine** est différent. Pour que le métabolite soit capturé par la surface, il faut qu'il soit proche de la silice en plus d'être proche des silanes (d'après les observations

sur les autres silices). Or, comme nous l'avons vu, à la différence des autres configurations de silice, l'orientation des silanes CH_3 long est plus ordonnée et uniformément répartie avec la silice poreuse. Cette orientation limite la possibilité des métabolites à se rapprocher de la silice et de la base des silanes. Cela a pour conséquence de diminuer l'énergie d'interaction entre la carnitine et les silanes ce qui provoque une adsorption moins stable et des détachements possibles comme dans l'une des productions.

Cela peut se voir aussi avec la **méthionine** qui interagit en partie avec la chaîne alkyle des silanes et en partie avec leur base, l'énergie d'interaction est ici l'une des plus faibles de l'étude avec ces silanes. Le seul métabolite avec une énergie plus proche de 0 est la **créatine** (comme avec les autres configurations de silice). La créatine est juste déposée sur les silanes ce qui explique cette faible interaction car c'est un métabolite chargé et hydrophile alors que les silanes sont hydrophobes. Cet équilibre est obtenu grâce aux ions qui neutralisent les charges de la créatine, ce qui lui permet de rester sur les silanes.

3.3.3.c Silane COO^-

Les métabolites qui ne sont pas systématiquement capturés avec la silice poreuse fonctionnalisée par les silanes COO^- sont la carnitine, la caféine et l'acide myristique, les 11 autres étant capturés dans toutes les productions à l'issue des 300 ns.

Dans le cas de l'**acide myristique**, les interactions avec les silanes ne sont pas nulles mais restent faibles car la molécule est très hydrophobe. Le métabolite est capturé par les chaînes alkyles des silanes mais dans certains cas les conditions ne sont pas réunies et la molécule reste dans le solvant malgré sa forte hydrophobie.

La **carnitine** est globalement neutre à pH 7, comme la majorité des métabolites de l'étude qui sont eux adsorbés sur les silanes COO^- dans toutes les productions. La différence peut s'expliquer par le fait que sa charge partielle positive est due à un ammonium quaternaire, la charge étant portée par l'azote centrale. Cet "emprisonnement" de la charge positive alors que la charge négative reste accessible rend la capture par les silanes COO^- chargés négativement difficile, ce qui pourrait expliquer pourquoi la molécule n'est pas capturée dans chaque réplica.

Le résultat le plus étonnant est obtenu pour la **caféine** qui n'est pas capturée dans chaque réplica alors qu'elle l'est avec la silice plane et la silice en feuillets. Il semblerait que l'organisation des silanes dans le cas d'une silice poreuse ne soit pas optimale pour la capture de la caféine par les chaînes alkyles des silanes.

Enfin, on peut remarquer que même si la **créatine** se trouve systématiquement à une distance inférieure à 0,3 nm des silanes, aucune énergie d'interaction n'est visible sur la Figure 3.13. En réalité, cette énergie existe mais elle est positive, donc répulsive. Pour expliquer pourquoi, malgré cette énergie répulsive, la créatine se trouve à proximité des silanes, et sur la couche de silane plus exactement, il faut regarder la position des ions Na^+ dans le système. En effet, ces ions sont très abondants pour équilibrer les charges des silanes et travailler dans un système globalement neutre. Ces ions entourent donc les molécules de créatine qui se neutralisent et peuvent se poser sur la surface. Ce sont donc les ions qui font le pont entre la créatine et les silanes et qui lui

permettent d'être "capturée" même si l'affinité avec les silanes COO^- est faible. Ce résultat est identique à ce que l'on observait avec les silanes CH_3 long.

3.3.3.d Silane NH_3^+

Avec les silanes NH_3^+ sur la silice poreuse, tous les métabolites sont capturés, excepté l'**acide myristique**, le métabolite le plus hydrophobe. Sa longue chaîne alkyle n'est pas favorable à sa capture. Ce résultat est identique aux autres configurations de silice avec ces silanes. Tous les autres métabolites sont capturés par les silanes avec des énergies légèrement plus fortes en valeur absolue par rapport aux autres silanes grâce, en partie, aux interactions électrostatiques qui ne sont pas présentes avec les silanes CH_3 court et CH_3 long qui ne sont pas chargés.

Pour résumer, le Tableau 3.3 présente les meilleures surfaces pour l'adsorption des 14 métabolites. Ces résultats se basent sur le nombre de captures et l'énergie d'interaction entre les silanes et les métabolites.

Métabolite	Choix 1		Choix 2		Commentaire
	Silane*	Énergie	Silane*	Énergie	
Métabolites hydrophobes non chargés	Caféine	CH ₃ long -177 ± 25	CH ₃ court -170 ± 37		Métabolite hydrophobe sur surface hydrophobe
	Acide myristique	CH ₃ court -140 ± 16	CH ₃ long -133 ± 15		Métabolite hydrophobe sur surface hydrophobe
	Glycine	NH ₃ ⁺ -110 ± 22	COO ⁻ -107 ± 19		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes
Métabolites hydrophiles peu ou non chargés	Cystéine	NH ₃ ⁺ -143 ± 39	CH ₃ court -127 ± 25		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes
	Carnitine	NH ₃ ⁺ -213 ± 24	CH ₃ court -183 ± 12		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes et charge "++" bloquée
	Acide urique	COO ⁻ -230 ± 57	NH ₃ ⁺ -180 ± 8		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes
	Glucose	NH ₃ ⁺ -170 ± 24	CH ₃ court -153 ± 25		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes
	Glutathion	CH ₃ court -337 ± 12	CH ₃ long -233 ± 12		Atome de soufre hydrophobe qui favorise les interactions avec les silanes hydrophobes
Glutamine	NH ₃ ⁺ -340 ± 45	CH ₃ court -190 ± 20		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes	
Méthionine	NH ₃ ⁺ -283 ± 24	CH ₃ court -127 ± 39		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes	
Phénylalanine	NH ₃ ⁺ -240 ± 36	CH ₃ long -147 ± 60		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes	
Tryptophane	NH ₃ ⁺ -210 ± 37	CH ₃ court -133 ± 17		Métabolite hydrophile sur les silanes les moins hydrophobes	
Métabolite "-"	Créatine	NH ₃ ⁺ -227 ± 37	CH ₃ court -200 ± 30		Métabolite - sur surface +
Métabolite "+"	Arginine	COO ⁻ -300 ± 0	NH ₃ ⁺ -213 ± 34		Métabolite + sur surface -

Tableau 3.3 – Tableau récapitulatif des meilleures surfaces pour l’adsorption des métabolites de l’étude de dynamique moléculaire. * Le choix est basé sur le nombre de captures et l’énergie d’interaction avec la configuration de silice poreuse.

3.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les résultats de la capture d'une sélection de 14 métabolites, certains étant biomarqueurs du sepsis, d'autres présents naturellement dans le sang. Dans un premier temps, nous avons créé les systèmes d'étude : une surface de silice fonctionnalisée par des silanes. Quatre silanes différents ont été testés : les silanes CH_3 court, CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ et plusieurs configurations de la surface ont été choisies : une silice plane, une silice en feuillets et une silice poreuse. À chaque fois, la surface de silice est multipliée par deux par rapport au cas précédent. Les 14 métabolites ont ensuite été placés au centre de la boîte et la production a été lancée pour 300 ns.

Premièrement, les observations sont similaires sur les trois configurations de la silice. Cela nous permet donc de valider le modèle. Il existe toutefois quelques différences avec le silane CH_3 long pour lequel l'orientation des silanes est modifiée par le confinement dû au pore : la distribution des silanes est plus uniforme sur la surface et les chaînes alkyles sont parallèles avec un léger angle par rapport à la normale à la surface. Cela provoque de légères différences dans l'adsorption de certains métabolites qui ne peuvent plus se placer entre les chaînes des silanes ou proche de la surface de silice. On observe également cela dans une moindre mesure avec les silanes COO^- , également avec une longue chaîne alkyle. Avec ces silanes, par exemple, la caféine ne s'adsorbe pas facilement dans la configuration de silice poreuse par rapport aux autres surfaces de silice.

Pour toutes les surfaces de silice, nous avons vu que le silane CH_3 court est toujours celui qui capture le plus de métabolites à la fin de la simulation. À l'inverse, sauf dans le cas de la silice plane, les silanes COO^- sont ceux capturant le moins de métabolites.

Dans le détail, nous avons vu que la charge du métabolite a une influence sur sa capture. La créatine, qui a une charge totale de $-0,89$ n'est capturée qu'avec les silanes NH_3^+ qui sont chargés positivement. L'arginine, métabolite chargé $+1$, est capturée par le silane COO^- chargé négativement, mais aussi par le silane de même charge, le silane NH_3^+ . En revanche, l'énergie d'interaction est nettement plus faible avec le second. Cette différence entre ces deux métabolites, l'un capturé uniquement avec les silanes de charge opposée et l'autre avec tous les silanes mais préférentiellement avec ceux de charge opposée, peut venir de leur géométrie. L'arginine est une molécule plus grosse que la créatine et contient une partie de sa molécule qui peut interagir avec les silanes sans que cette interaction ne soit répulsive à la différence de la créatine dont les charges partielles sont réparties sur toute la molécule.

L'hydrophobie des métabolites est aussi importante dans leur capture par les silanes. Si nous prenons l'exemple de l'acide myristique, métabolite le plus hydrophobe de l'étude, les silanes sur lesquels l'adsorption est la meilleure sont les silanes CH_3 long et CH_3 court. Ensuite, nous retrouvons les silanes COO^- et enfin NH_3^+ , sur lesquels l'acide myristique ne s'adsorbe jamais. Cet ordre correspond à l'ordre d'hydrophobie des silanes : les silanes non chargés puis le COO^- avec une chaîne alkyle longue et enfin le NH_3^+ avec une plus petite chaîne. Cette observation est légèrement différente pour la silice plane à cause de la couche de vide en haut de la boîte qui attire également l'acide myristique.

À l'inverse, les métabolites hydrophiles comme la créatine ou la glutamine sont bien capturés par les silanes hydrophiles NH_3^+ . Cependant, mise à part la créatine, ces métabolites sont également capturés par les silanes non chargés CH_3 court et CH_3 long même si l'interaction est moins forte. Le glutathion est un métabolite particulier, il est parmi les plus hydrophiles de l'étude et interagit fortement avec les surfaces hydrophiles et pourtant, grâce à son atome de soufre, il s'accroche aussi très bien aux silanes hydrophobes. Le type de silane a donc peu d'importance sur sa capture.

Silice	Plane		En feuillets		Poreuse	
	5/5	0/5	3/3	0/3	3/3	0/3
CH_3 court	10	0	13	0	12	0
CH_3 long	6	0	12	0	12	0
COO^-	9	2	11	1	11	0
NH_3^+	10	1	11	1	13	1

Tableau 3.4 – Nombre de métabolites capturés pour tous les réplicas et dans aucun réplica pour les différents types de silice et les quatre silanes.

Pour l'étude de la silice et de la fonctionnalisation de surfaces, il pourrait être intéressant de s'intéresser à un pore circulaire, physiquement plus proche de la réalité du silicium poreux. Ce pore circulaire permet de supprimer les angles et l'orientation des silanes ne dépendra plus de la surface silice, mais uniquement des interactions avec les autres silanes. Des prototypes de ce type de pores avec des silanes CH_3 court à gauche et CH_3 long à droite sont présentés en Figure 3.14. Les difficultés principales de ce type de surface sont de creuser un trou dans une surface de silice tout en gardant la stœchiométrie du SiO_2 puis d'éviter la superposition des silanes lors de leur placement aléatoire en monocouche au dessus de la surface. En effet, tous les silanes sont orientés vers le centre du cylindre, ce qui implique que le rayon du cercle formé par les têtes des silanes est plus petit que le rayon formé par la surface de silice. Les surfaces précédentes donnant des résultats satisfaisants et reproductibles, les simulations avec ce pore circulaire n'ont pas été poursuivies mais il pourrait être intéressant de les étudier dans le futur.

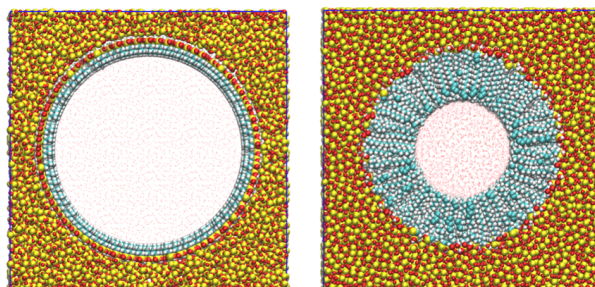


Figure 3.14 – Système de pore de silice circulaire avec ajout des silanes CH_3 court à gauche et CH_3 long à droite et de l'eau. Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone et les blancs l'hydrogène. Les molécules d'eau sont représentées par des points.

Détection des métabolites spécifiques au sepsis en MALDI-MS - Effet des surfaces fonctionnalisées

4.1 Introduction

L'objectif du travail de spectrométrie de masse est la détection de métabolites biomarqueurs du sepsis. Pour cela, nous avons choisi la spectrométrie avec désorption-ionisation laser couramment utilisée pour étudier des échantillons biologiques. Les études sur le sujet présentées dans le Chapitre 1 montrent que les surfaces poreuses et les silanes permettent d'améliorer la détection des analytes, que ce soit pour le MALDI-MS, comme pour le DIOS-MS. En revanche, il existe peu d'études de l'influence des propriétés physico-chimiques des silanes sur la détection des métabolites. Notre étude se concentre donc sur cette partie : comprendre l'influence des silanes sur la détection des analytes en spectrométrie de masse.

Dans un premier temps, nous nous concentrons sur l'analyse en MALDI-MS, plus classique et mieux documentée que le DIOS. Nous commençons également par travailler dans des milieux modèles pour simplifier les analyses et supprimer les paramètres extérieurs autres que les silanes qui pourraient modifier la détection. C'est le travail qui est présenté dans ce chapitre.

Le chapitre commence par un article actuellement en *Peer-review* dans le Journal of Physical Chemistry. Cet article est dédié à la sélection de la meilleure matrice pour détecter les métabolites biomarqueurs du sepsis, c'est-à-dire la matrice permettant de détecter le maximum de métabolites simultanément avec les rapports S/N les plus élevés. Après cette étude, nous continuons sur l'impact de la porosité de la surface et des silanes sur la détection des métabolites et la reproductibilité des mesures. Nous comparons les résultats à des mesures de ToF-SIMS et de MEB pour essayer d'expliquer les tendances que l'on observe. Un résumé en français de la méthode et des principaux résultats est donné en préambule de l'article. Les informations supplémentaires de l'article sont données en Annexe B. Dans un second temps, nous complétons l'article avec des observations sur la suppression des pics de matrice liée à la présence de certains

métabolites et l'influence de l'ajout de sels sur le signal de détection. Nous discutons également du lien entre les résultats de spectrométrie de masse et les simulations de dynamique moléculaire du chapitre précédent. Enfin, nous évaluons les limites de détection des principaux métabolites détectés en MALDI-MS.

4.2 Matériels et méthodes

Les matériels et les méthodes utilisés dans ce chapitre sont présentés dans l'article. Rapidement, les substrats de silicium silanisés ont été obtenus à partir des fours présentés dans le Chapitre 2, les métabolites utilisés sont les 25 métabolites présentés à la page 55 (et rappelés dans l'article à la page 127) et les solutions de métabolites sont obtenues en mélangeant tous les métabolites ensemble à une concentration de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Le solvant est composé à 84 % d'eau ultrapure et à 16 % d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1), ce qui permet de dissoudre également les lipides. Le mélange final est appelé solution multiplexée.

Les mesures de spectrométrie de masse MALDI ont été faites à Clinattec, à Grenoble avec l'aide de Benoit Gilquin ingénieur-chercheur. 1 μL de solution de métabolite et 1 μL de matrice sont déposés à chaque fois sur le substrat, mélangés et laissés cristalliser. Si le dépôt est réalisé sur une plaque MALDI d'acier inoxydable, alors une moyenne de 500 spectres est faite sur un point de mesure aléatoire. Dans le cas des échantillons fonctionnalisés, une imagerie de la goutte est effectuée (environ 30 points de mesure) et 500 spectres sont moyennés pour chaque point. Une calibration des masses était effectuée grâce aux pics $[\text{HCCA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ (172,1 m/z), $[\text{HCCA}+\text{H}]^+$ (190,1 m/z) et $[2\text{HCCA}+\text{H}]^+$ (379,1 m/z) de la matrice HCCA avant chaque session de mesures (de 2 ou 3 jours maximum). Aucune déviation significative des masses n'a été observée sur ces durées. En revanche, il était possible d'observer un décalage au sein d'une même série de mesure lorsque des échantillons de différentes natures et de différentes épaisseurs étaient utilisées (en particulier des échantillons plan et poreux). Dans ce cas, un alignement des pics était effectué après la mesure grâce aux pics de la matrice HCCA lorsque cela était possible ou grâce à au minimum trois pics représentatifs du spectre de masse avec des masses recouvrant la gamme 0-800 m/z utilisée dans le cas où la matrice n'était pas utilisée.

4.3 Effect of Silane Monolayers and Nanoporous Silicon Surfaces on the Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Mass Spectrometry Detection of Sepsis Metabolites Biomarkers Mixed in Solution.

4.3.1 Résumé

Le MALDI-MS permet une analyse efficace et très sensible de biomolécules à haut poids moléculaire. En revanche, la détection d'analytes à faible poids moléculaire, en particulier les métabolites, est limitée à cause de la matrice qui implique un fort bruit de fond dans la gamme des faibles masses, une mauvaise reproductibilité inter et intra-échantillon et une ionisation

hétérogène. L'objectif de cet article est d'étudier l'impact de quatre monocouches de silane sur du silicium poreux sur la reproductibilité et le rapport S/N de métabolites à faible poids moléculaire en MALDI-MS. Pour décorrélérer l'effet des silanes et de la porosité, nous avons comparé des échantillons de silicium plan avec des échantillons de silicium poreux. Les quatre silanes de l'étude sont les silanes CH₃ court, CH₃ long, COO⁻ et NH₃⁺ et les métabolites étudiés sont les 25 présentés précédemment et mélangés dans une solution dite multiplexée.

Tout d'abord, nous montrons que la matrice HCCA permet la détection simultanée de 9 des 25 métabolites de la solution multiplexée sur une plaque MALDI d'acier inoxydable, la meilleure parmi les six matrices organiques testées, HCCA, DHB, NEDC, THAP, 9AA et DAN. L'utilisation de substrats de silicium poreux permet une meilleure uniformité de la cristallisation de la matrice et la silanisation sur ces substrats n'a pas d'influence sur la cristallisation. En revanche, sur du silicium plan, la monocouche de NH₃⁺ diminue l'uniformité de la distribution des cristaux de matrice. Ces observations se retrouvent sur la reproductibilité des mesures en MALDI-MS, avec généralement une meilleure uniformité des S/N sur le silicium poreux et une reproductibilité mauvaise sur le silicium plan fonctionnalisé par les silanes NH₃⁺. Ce n'est cependant pas le cas avec les métabolites chargés positivement pour lesquels la reproductibilité est bonne avec les silanes NH₃⁺. En présence des silanes, les propriétés hydrophobe ou hydrophile des métabolites et leur localisation en dehors ou à l'intérieur des pores n'a pas de grande influence sur le rapport S/N et sur la reproductibilité. Néanmoins, pour les métabolites les plus hydrophobes, le plus grand S/N a été obtenu sur le silicium non fonctionnalisé (hydrophile), probablement grâce à une désorption laser favorable combiné à un effet des pores qui pourrait agir comme un bon réceptacle de l'énergie laser. Étonnamment, pour les métabolites les plus hydrophiles, le plus grand S/N et la meilleure reproductibilité sont obtenus avec le silicium plan non fonctionnalisé. On peut noter que les plaques MALDI en acier donnent presque systématiquement le pire rapport S/N, confortant notre choix de travailler sur des surfaces de silicium. Enfin, pour l'ensemble du panel de métabolites et parmi toutes les surfaces testées, la monocouche de silanes CH₃ court semble être un bon compromis pour optimiser le S/N et la reproductibilité.

4.3.2 Reproduction de l'article

Effect of Silane Monolayers and Nanoporous Silicon Surfaces on the Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Mass Spectrometry Detection of Sepsis Metabolites Biomarkers Mixed in Solution.

Antonin Lavigne¹, Thomas Géhin², Benoît Gilquin³, Vincent Jousseau³, Marc Veillerot³,
Claude Botella², Céline Chevalier⁴, Cécile Jamois⁴, Yann Chevolut², Magali
Phaner-Goutorbe¹, Christelle Yeromonahos¹

¹ Univ Lyon, Ecole Centrale de Lyon, CNRS, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69134 Ecully Cedex, France ; ² Univ Lyon, CNRS, Ecole Centrale de Lyon, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69134 Ecully Cedex, France ; ³ Univ Grenoble Alpes, CEA, LETI, F-38000 Grenoble, France ; ⁴ Univ Lyon, INSA Lyon, CNRS, Ecole Centrale de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69621 Villeurbanne Cedex, France

ABSTRACT

Matrix-assisted-laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) is a promising strategy for clinical diagnosis based on metabolites detection. However, several bottlenecks (such as the lack of reproducibility in analysis, the presence of an important background in low-mass range, and the lack of organic matrix for some molecules) prevent its transfer to clinical cases. These limitations can be addressed by using nanoporous silicon surfaces chemically functionalized with silane monolayers.

In the present study, sepsis metabolite biomarkers, were used to investigate the effects of silane monolayers and of porous silicon substrates on MALDI-ToF MS analysis (signal-to-noise value (S/N), relative standard deviation of the mean S/N of each replicate sample (STD_{mean}), and intra-substrates uniformity). Also, the impact of the physico-chemical properties of metabolites, with different isoelectric points and hydrophobic-hydrophilic balances, were assessed. Four different silane molecules, with various alkyl chain lengths and head-group charges, were self-assembled in monolayers on plane and porous silicon surfaces. Their surface coverage and conformity were investigated by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). All the metabolites detected on the stainless steel target plate are also detected on the silanized and bare, plane and porous, silicon surfaces. Moreover, two metabolites, Glycine and Alanine, which are not detected on the stainless steel target plate, are detected on all silanized surfaces excepted glycine which is not detected on CH_3 short modified porous silicon and on the bare plane silicon substrate. In addition, whatever the metabolites (except Phenylalanine and Valine) at least one of the silicon surface allows to increase the S/N value in comparison with the stainless steel target plate. Also, the uniformity of matrix crystallization is linked to the STD_{mean} which is poor on the NH_3^+ monolayer on plane substrate and better on the NH_3^+ monolayer on porous than on plane substrate, for most of metabolites. Nevertheless matrix crystallization features are not sufficient to systematically get high STD_{mean} and uniformity in MALDI-ToF MS analysis. Indeed, the physico-chemical properties of metabolites and surfaces, limitations in metabolites extraction from the pores, and improvement in metabolite desorption due to the pores are shown to significantly impact MS analysis. In particular, in the case of the most hydrophobic metabolites studied, the highest S/N values and the best STD_{mean} and uniformity (the lowest values) are reached by using porous substrates, while in the case of the most hydrophilic metabolites studied plane substrates demonstrated the highest S/N and the lowest STD_{mean} . No clear trend of surface chemistry were evidenced.

Introduction

Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-ToF MS) is a widely investigated strategy for the detection of low molecular weight metabolites (such as amino acids, lipids, sugars, organic acids...), from fluids and biological tissues, with potential real-case clinical applications [216–218]. The matrix is central to the MALDI process, and the analyte incorporation, the desorption, and the ionization efficiencies can vary between given matrix/analyte pairs or from one shot to another due to the inhomogeneity of the spotted

sample. Furthermore, the matrix generates an important background in the low mass range of the mass spectra that limits the detection of low molecular weight ions [111]. The presence of “hot spots” where the analyte/matrix concentration is high can lead to repeatability issues which can be partially solved by developing matrix deposition methods that improve the uniformity of the matrix surface coverage [86]. Another concern of MALDI-ToF MS is the ion suppression caused for example by the presence of phospholipids that can impede the detection of some other metabolites such as neutral lipids [86]. Furthermore, for several metabolites, an efficient organic matrix is still lacking [218]. Therefore, the high throughput metabolite investigation of human fluids, for clinical diagnosis by MALDI, is still a challenge as it requires the simultaneous detection of a panel of species characterized by a large diversity of physico-chemical properties, such as electrical charges, hydrophobic-hydrophilic balance...

To overcome these limitations, surface-assisted laser desorption/ionization (SALDI) techniques were developed. These matrix-free approaches are highly promising in clinical diagnosis based on metabolite profiling. Indeed, high repeatability of analysis, low background in the low-mass range, and the simultaneous ionization of a large variety of analytes have been demonstrated [219]. Desorption/ionization on silicon (DIOS), is one of the most successful SALDI techniques to desorb and ionize metabolites. However, DIOS-MS signals are dramatically lower than MALDI-ToF MS signals. Based on the original DIOS method, Siuzdak *et al.* have developed nanostructured initiator mass spectrometry (NIMS) [220]. NIMS differs from MALDI in that the analytes are not co-crystallized with the initiator and the UV energy is absorbed by the porous silicon leading to a rapid surface heating, vaporization of the trapped initiator, and desorption/ionization of the adsorbed analyte [221]. This strategy has demonstrated improved performance over DIOS-MS for metabolite detection.

Other authors have worked on hybrid techniques, combining MALDI and SALDI techniques. They have been proven highly efficient to maximize both ion intensity and the intra- and inter-substrate reproducibility in metabolite analysis, while decreasing the background in the low mass range [222]. In particular matrix-enhanced NIMS (ME-NIMS), carried out by coating the functionalized porous silicon substrate with a layer of organic matrix, was shown to be a good alternative for the detection of phospholipids and small peptides [223]. Furthermore, several studies have also shown that the MALDI-ToF signal is influenced by the surface chemistry of the substrate [48, 50–52, 56, 60, 63, 224]. In particular, self-assembled monolayers of silane molecules on porous silicon surfaces seem to be well adapted to improve the MALDI-ToF MS detection of metabolites. For instance, Hsieh *et al.* have shown that 3-aminopropyltriethoxysilane functionalization increased the detection limit of bradykinin (904 g/mol) and of gramicidin D (1882 g/mol), from 11 nM to 0.93 nM and from 110 μ M to 0.33 μ M respectively, in model solution [26]. Moreover, previous studies have shown that porous silicon substrates, with pore diameters in the range 2 – 10 nm, enable the steric exclusion of large molecules from complex biological fluids, allowing direct MALDI-ToF MS analysis of plasma droplets, without any pre-treatment steps. It allowed the discrimination of pathological samples (e.g. cardiovascular diseases) from non-pathological samples (through statistical analysis of the metabolite spectral pattern) [71, 72, 128, 149, 225]. A wide range of silane molecules are commercially available allowing to tune silicon surface physico-chemical properties [6, 226–228]. Furthermore, silanization processes can

be industrialized at low cost and at high throughput. Consequently, silanized porous silicon surfaces are highly promising for the development of clinical diagnosis tools based on metabolites trapping and MALDI-ToF MS detection, in few minutes.

Nevertheless, to the best of our knowledge, the impact of porous silicon substrates versus plane silicon substrates and the impact of the alkyl chain length and head-group charges of silane molecules on MALDI-ToF MS detection of metabolites, characterized by various physico-chemical properties, have never been investigated.

Herein, we aimed to address the impact of various silane monolayers on porous silicon on the signal-to-noise ratio (S/N), on the relative standard deviation of the mean S/N of each replicate sample (STD_{mean}), and on the intra-substrate uniformity of low molecular weight metabolites detected by MALDI-MS. To this aim, plane silicon substrates and porous silicon substrates were functionalized with four different silane molecules. Plane and porous silicon substrates are compared to decorrelate the effect of porosity and surface chemistry. The four silane molecules have long and short alkyl chains and the head-groups were varied (Table 4.1). These molecules are 3-aminopropyldimethylethoxysilane (named NH_3^+ in this study), n-propyldimethylmetoxysilane (named CH_3 short), octadecyldimethylmetoxysilane (named CH_3 long), and tert-butyl-11-(dimethylamino(dimethyl)silyl)undecanoate (leading to COO^- after deprotection). Seven different metabolites, with different physico-chemical properties (electrical charges and hydrophobic-hydrophilic balance) were analyzed by MALDI-ToF MS. The S/N ratio, inter-substrates reproducibility, and intra-substrates uniformity were evaluated as a function of surface chemistry and porosity vs plane substrate.

Firstly, the uniformity of the different silane monolayers, as well as their conformity, are characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS). Then, six different organic matrices were compared. The preponderant discriminant criterion was the ability of the selected matrix to ionize the largest span of metabolites among the 25 metabolites studied (23 of which are relevant sepsis biomarkers and 2 of which are commonly found in blood) (Table 4.1). Indeed, profiling simultaneously metabolites can be regarded as a fingerprint of a specific illness [5].

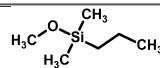
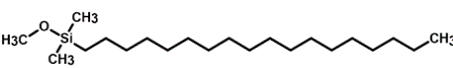
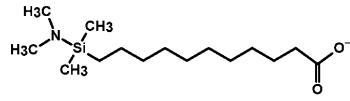
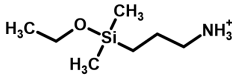
Silane denomination	Structural formula
CH_3 short	
CH_3 long	
COO^-	
NH_3^+	

Table 4.1 – Silane molecules used in this study and their structural formula.

Among the six organic matrices studied, CHCA is shown to be the one that allows for the simultaneous detection of the largest group of the metabolites studied. Then, the S/N ratio,

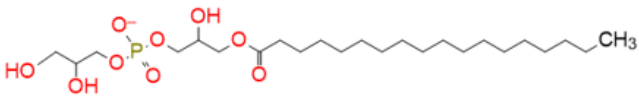
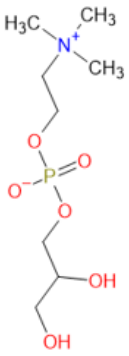
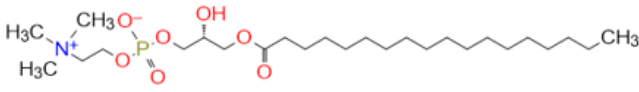
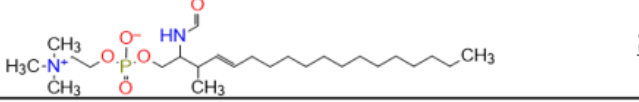
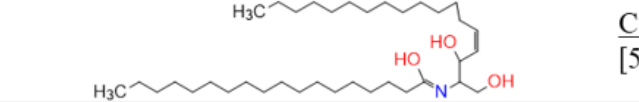
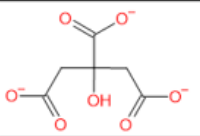
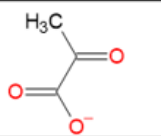
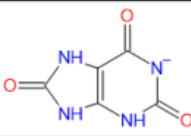
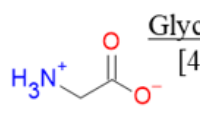
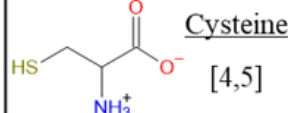
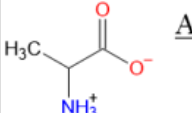
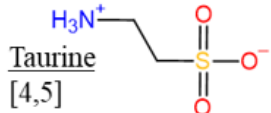
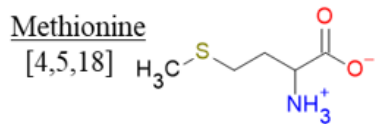
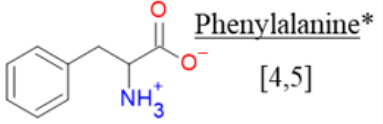
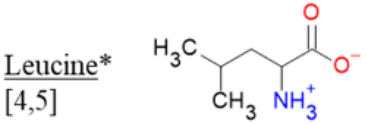
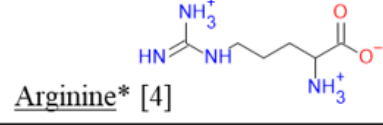
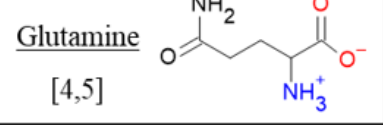
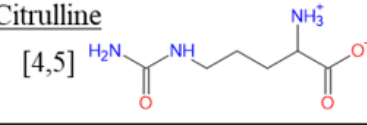
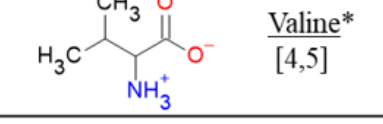
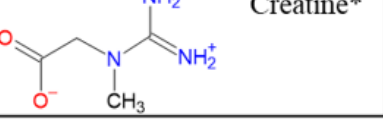
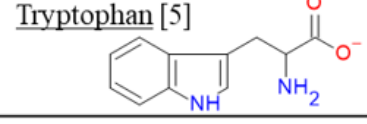
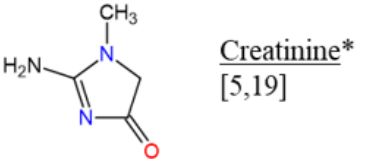

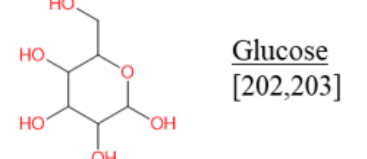
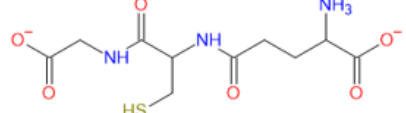
Lipids							
	<u>Lyso PG</u> [5,16]	 <u>GPC*</u> [5,16]					
	<u>Lyso PC*</u> [5,11,16,20,227]						
	<u>Sphingomyelin</u> [5,16]						
	<u>C18 Ceramide</u> [5,11,16,20,227]						
Acids							
	<u>Citric Acid</u> [5,17]		<u>Pyruvic Acid</u> [5,17]		<u>Uric acid</u> [5]		
Amino acids and derivatives							
	<u>Glycine</u> [4,5]		<u>Cysteine</u> [4,5]		<u>Alanine</u> [4,5]		<u>Taurine</u> [4,5]
	<u>Methionine</u> [4,5,18]		<u>Phenylalanine*</u> [4,5]		<u>Leucine*</u> [4,5]		
	<u>Arginine*</u> [4]		<u>Glutamine</u> [4,5]		<u>Citrulline</u> [4,5]		
	<u>Valine*</u> [4,5]		<u>Creatine*</u>		<u>Tryptophan</u> [5]		
Others							
	<u>Creatinine*</u> [5,19]		<u>Caffeine*</u>		<u>Glucose</u> [202,203]		
				<u>Glutathione</u> [5]			

Figure 4.1 – The 25 metabolites studied. The 23 metabolites specific of sepsis are underlined. The 9 metabolites detected simultaneously in this study using CHCA as a matrix are marked by a star (*). The reference numbers are indicated after the name of metabolites. Lysophosphatidylcholine, Lysophosphatidylglycerol, and Glycerophosphocholine are respectively named LysoPC, LysoPG, and GPC in this study.

STD_{mean}, and intra-substrates uniformity for the different metabolites studied, on the different surfaces, were investigated and correlated to the uniformity of the CHCA matrix crystallization. Finally, the impact of the physico-chemical properties of metabolites (the octanol-water partition coefficient (logP) and electrical charge) are evaluated by comparing the results obtained for the different metabolites detected simultaneously with CHCA.

Materials and methods

Chemical and Reagents. Porous silicon substrates were purchased from SiLiMiXT (Tours, France). Pores (10 nm in diameter and 1 μm in depth) were obtained through electrochemical etching of silicon substrates (150 mm in diameter, type P, 10-20 mOhms.cm, and 508 μm in thickness). The silane molecules studied were purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany). Tert-butyl-11-(dimethylamino(dimethyl)silyl)undecanoate was synthesized according to a protocol previously reported [182]. The 25 metabolites considered in this study were obtained from Sigma-Aldrich. The six organic matrices studied (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 2,5-Dihydroxybenzoic acid (DHB), 9-Aminoacridine (9AA), N-(1-naphthyl)ethylenediaminedihydrochloride (NEDC), 5-Diaminonaphthalene (DAN), 2,4,6-Trihydroxyacetophenone monohydrate (THAP)), as well as the different solvents used (tetrahydrofuran 99 % (THF), methanol, ethanol, chloroform, and trifluoroacetic acid (TFA)) were also obtained from Sigma-Aldrich. Acetonitrile (ACN) was purchased from Honeywell Riedel-de Haën.

Gas Phase Chemical Surface Functionalization. COO^- monolayers were prepared using the protocol previously reported by Phaner-Goutorbe *et al.* [157]. For the 3 other silanes, the substrates were cleaned by ozone/ultraviolet treatment under an oxygen flow for 30 minutes at room temperature. Next, the substrates were placed under vacuum for 30 min at 150°C and then cooled down at room temperature under nitrogen atmosphere. 100 μL of silane were injected in the reaction chamber and the substrates were placed under vacuum while the temperature gradually increased to 150°C (120°C for NH_3^+). After one hour of silanization, the chamber was cleaned thanks to a 15 minutes pumping, then the substrates were cooled down and put under nitrogen. Finally, the samples were washed for 10 minutes in THF and for 10 minutes in ultrapure water.

Matrix Preparation. The matrix solutions contain 10 mg/mL of CHCA dissolved in a 0.1 % solution of TFA in ACN/ultrapure water (60:40 v/v), 20 mg/mL of DHB dissolved in 0.1 % TFA in ACN/ultrapure water (30:70 v/v), 7 mg/mL of NEDC in a solution of methanol/ultrapure water (50:50 v/v), 10 mg/mL of THAP in a solution of ACN/ultrapure water (50:50 v/v) with diammonium hydrogen citrate 25 nM, and 10 mg/mL of 9AA in an ethanol/ultrapure water solution (70:30 v/v). In the case of the 9AA matrix, the choice of solvent was based on the quality of crystals obtained, by Cerruti *et al.*, for mass spectrometry imaging of metabolites [29]. For the test at different CHCA concentrations, 20 mg/mL of CHCA were dissolved in a 0.1 %

solution of TFA in ACN/ultrapure water (60:40 v/v) before being diluted in the same solution to obtain the final concentrations (0 mg/mL, 1 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, and 20 mg/mL).

Preparation of metabolites. LysoPC, LysoPG, sphingomyelin, and ceramide were dissolved in a chloroform/methanol solution (2:1 v/v) at 1 mg/mL. The 21 other metabolites were dissolved in ultrapure water at 1 mg/mL. The metabolites were mixed in equal volume. The final concentration of each metabolite was 40 µg/mL.

MALDI-ToF MS Analysis. MALDI mass spectra were obtained using an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipped with a laser at 355 nm. Ions were detected in reflectron positive (RP) or reflectron negative (RN) ion mode at ± 20 kV accelerating potential. The laser was set on medium size with a grid voltage of 80 % in RP and 100 % in RN ion mode. Samples were studied on an m/z range of 10-800. Analyses were done both on a classical stainless steel MALDI target plate and on silanized silicon substrates held on a modified target plate. 1 µL of the metabolite solution and 1 µL of matrix solution were mixed, deposited on the MALDI plate or on the silanized surfaces, and let crystallized in air before measurement. In the case of functionalized samples, an imagery of the evaporated droplet was performed using the FlexImaging 3.0 software (Bruker Daltonics) with a spatial resolution of 200 µm (40 spots per droplet). For each spot, 500-satisfactory laser shots were averaged to obtain a mass spectrum. The spectra were analysed using the FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics) for peaks detection and for measuring the signal-to-noise ratios.

Statistical analysis of MALDI-MS spectra. Each type of sample was done in triplicate. For each substrate, the S/N ratio of each metabolite at $[M+H]^+$ and the intra-substrate uniformity of the S/N ratio were respectively determined by (i) averaging each S/N value obtained on the 40 measurement spots and on 3 replicate samples, and by (ii) calculating the relative standard deviation of the S/N values over the 40 spots within one matrix droplet and by averaging the three replicate samples. S/N, intra-substrate uniformity, and the relative standard deviation of the mean S/N of each replicate (STD_{mean}) are indicated in Table 4.4, for each metabolite and each substrate. Each type of sample was done in triplicate. For each replicate of a given triplicate, the mean S/N ratio of each metabolite at $[M+H]^+$ was calculated from 40 different areas. Then the mean of the mean of the three replicates was calculated as follow and reported in Table 4.4: $S/N = [(\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_1} + (\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_2} + (\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_3}]/3$. Moreover, the standard deviation of the means of the three replicates was calculated as follow: $STD_{\text{mean}} = STD[(\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_1} ; (\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_2} ; (\text{mean of the 40 S/N values})_{\text{sample}_3}]$. Furthermore, for each replicate, the standard deviation of the 40 data points was calculated and averaged over the three replicates which is in the following described as uniformity: $\text{uniformity} = (STD[S/N]_{40_points_sample_1} + STD[S/N]_{40_points_sample_2} + STD[S/N]_{40_points_sample_3})/3$. The STD_{mean} and uniformity are reported in Table 4.4.

ToF-SIMS profiling. High resolution mass depth profiles were acquired by ToF-SIMS (ToF-SIMS V from ION-TOF). A bunched 15 keV Bi³⁺ ions was used as the primary probe for analysis (rastered area 80 × 80 μm²) and sputtering obtained using Cs⁺ ions at low energy (500 eV, rastered area 400 × 400 μm²). The sputter and analysis beams were turned on alternatively, giving in result a series of spectra acquired all along the depth of the sample.

XPS analysis. Spectra were obtained using a VSW spectrometer equipped with a monochromatized X-ray source (Al Kα 1486.6 eV) in which the angle between the incident beam and the detector was the magic angle. The angular resolution was 3°. Take-off angle was 30° relative to the substrate surface. The energetic resolution was 0.2 eV. The data analysis was performed with CasaXPS software. Si(-O)₄ binding energy was set at 104 eV. A Shirley background was subtracted on Si 2p and O 1s spectra when coming from bulk elements while a linear background was subtracted on C 1s spectra as surface elements. Peaks were fitted by a Gauss-Lorentz curve.

SEM imagery. SEM imaging of the matrix crystals was performed using a Mira 3 LMH (Tescan) with a Schottky tip and SE and BSE detectors. High vacuum mode was used for the images with an accelerating voltage of 2 kV. Spot size was around 8 nm with a current of 260 pA. On each surface, 1 μL of CHCA matrix at 10 mg/mL was deposited and let dry before SEM analysis. Four different droplets of the CHCA matrix were deposited on four different substrates (four replicates).

Results and discussion

Characterization of the inter-substrate uniformity and conformity of the different silane monolayers XPS spectra of the bare porous silicon surface and of the four different monolayers are presented in Figure 4.2 and Figure B.1-B.4 (Supporting Information). On the bare porous silicon surface, O 1s and Si 2p peaks are observed. On the high-resolution Si 2p spectra, the Si 2p_{1/2} and 2p_{3/2} contributions are associated to the bulk metal silicon, while the other contributions (SiO₂, Si₂O, and SiO) come from the oxidized layer at the silicon surface [229]. C 1s, O 1s, and Si 2p core levels are observed in the case of the four different silane monolayers, as well as the N 1s core level for the NH₃⁺ monolayer. The Si(-O)₁ contribution observed on the Si 2p spectra is associated to the Si atom of the silane molecules. In the case of the NH₃⁺ monolayer, a small contribution likely due to the C-N bond is observed on the C 1s spectra. The atomic percentages of each element are presented in Table 4.2. For each monolayer, the C 1s /Si(-O)₁ ratio is in accordance with the stoichiometric one.

An estimation of the surface coverage is obtained from the formula [174]:

$$\Gamma_{\text{silanes}} = \frac{A_{\text{Si(-O)}_1}}{A_{\text{Silica}}} n_{\text{SiO}_2} z \quad (4.1)$$

Where z is the silica thickness (2 nm for native oxidation of the silicon surface), n_{SiO_2} is the molecular concentration of silica (22 SiO₂ molecules/nm³). $A_{\text{Si(-O)}_1}$ and A_{Silica} are the areas of the Si(-O)₁ peak and of the total area of silica. The surface coverages obtained for each

monolayer are presented in Table 4.3. This coverage is around 4 silane molecules/nm² except for the COO⁻ monolayer, for which the surface coverage is higher (5.4 molecules/nm²). This could come from the longer silanisation process for this silane molecule compared to the other silane molecules (12 hours for COO⁻ and 1 hour for the other silane molecules). The uniformity of the surface coverage was estimated by analysing three different samples for each type of silane molecule. High uniformity was systematically obtained as figured out by the standard deviations indicated in Table 4.2.

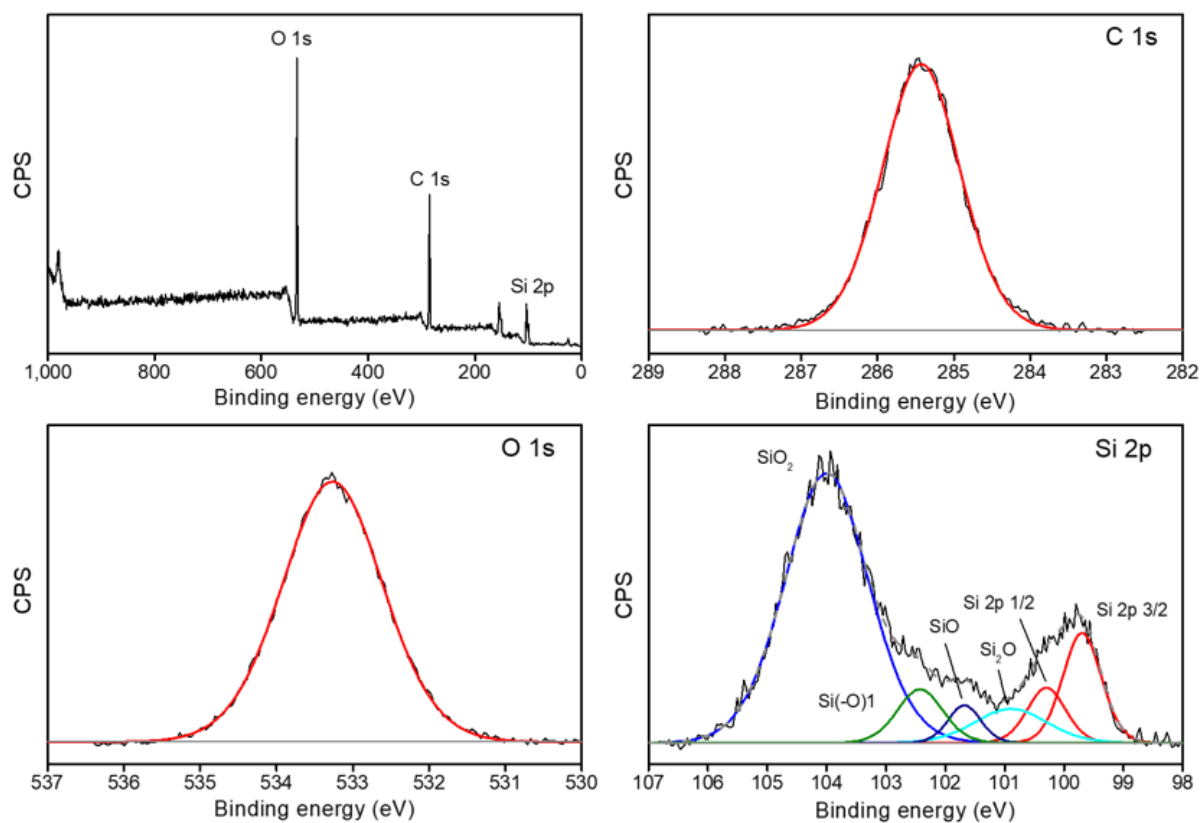


Figure 4.2 – XPS spectra of the CH₃ long monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s, and Si 2p core levels). XPS spectra of the other monolayers studied and of the bare porous silicon substrate are presented in Supporting Information (Appendix B).

	C 1s	O 1s	N 1s	Si 2p	C/Si(-O) ₁	Stoichiometric C/Si(-O) ₁
SiO ₂	1.6	50.7	-	47.7	-	-
CH ₃ short	13.5 ± 0.5	46.2 ± 1.0	-	40.4 ± 0.6	5.0	5
CH ₃ long	40.5 ± 1.3	30.4 ± 0.1	-	30.1 ± 1.3	19.8	20
COO ⁻	30.9 ± 0.7	44.3 ± 0.5	-	24.9 ± 0.4	13.1	13
NH ₃ ⁺	14.7 ± 1.9	43.8 ± 1.4	3.4 ± 1.0	38.3 ± 0.8	5.0	5

Table 4.2 – XPS atomic percentages of C 1s, O 1s, Si 2p, and N 1s for porous SiO₂ surface and for the four silane monolayers on porous silicon.

	CH ₃ short	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺
Surface coverage (silane/nm ²)	3.8 ± 0.4	4.1 ± 0.1	5.4 ± 0.1	4.4 ± 0.1

Table 4.3 – Surface coverage obtained by XPS for the 4 silane monolayers on porous silicon. The standard deviations are obtained from the measurement of three different samples.

Atomic percentages and surface coverage on plane silicon surfaces, functionalized with the four silane molecules studied, are similar to those obtained on porous silicon surfaces. Results have already been previously published by Lecot *et al.* [6].

ToF-SIMS depth profiling was used to characterize the conformity of the different silane monolayers on porous silicon surfaces. The depth profile of the negative ion C⁻ (12.000 atomic mass unit [amu]) and ³⁰Si⁻ (29.9737 amu) are presented in Figure 4.3. While the intensity of ³⁰Si⁻ as a function of sputtering time is similar for the four surfaces (i.e. CH₃ short, CH₃ long, and NH₃⁺ silane monolayers, and bare porous silicon), the peak intensity of the C⁻ ion at 12 amu diverges depending on the surface. All along the depth profile and for all functionalized surfaces, its intensity was higher than on bare porous silicon suggesting the presence of the silane molecules inside the pores. Moreover, the NH⁻ ion profile confirms the presence of NH₃⁺ silane molecules in the pore on NH₃⁺ functionalized surface (Figure B.5). Finally, for all four silanes, the intensity of C⁻ ion remains steady until 4300 seconds of sputtering time which suggest that the silane monolayers are evenly distributed inside the pores.

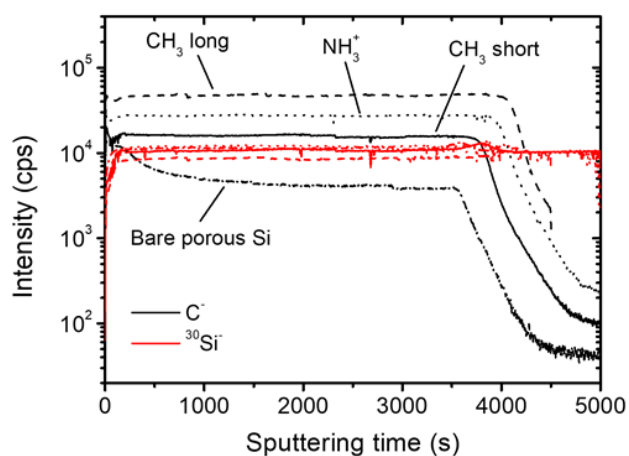


Figure 4.3 – Depth profiling by ToF-SIMS of porous silicon functionalized by (solid) CH₃ short, (dash) CH₃ long and (dot) NH₃⁺ silane monolayers, and on (dash dot) bare porous silicon are presented. The intensities of the C⁻ ions (12 amu) and ³⁰Si⁻ (30 amu) ions as a function of sputtering are displayed in black and red, respectively. ³⁰Si⁻ ion in Si bulk (sputtering time greater than 4300s) was used for normalization.

Detection of sepsis metabolites on stainless steel industrial plates using different organic matrices Classical stainless steel MALDI target plates were used to select the matrix that allows the detection of the highest number of metabolites from the mixture solution

containing 25 different metabolites. Six different matrices were studied: CHCA, DHB, 9AA, NEDC, THAP, and DAN. CHCA was shown to be the matrix that allows the simultaneous detection of the highest number of metabolites. Indeed, as shown in Figure 4.4, nine metabolites were detected at $[M+H]^+$. Among these nine metabolites, LysoPC yields the highest S/N ratio at $[M+H]^+$ ($S/N = 1304$ at 524.4 m/z). Also, two of them (Creatine and Leucine) cannot be distinguished since they have the same mass and no fragments are detected. Consequently, the matrix CHCA was selected for the following analysis. Several fragments of some metabolites, in particular of LysoPC are also detected, especially at 86.1 m/z ($(CH_3)N^+ - CH=CH_2$), at 104.1 m/z (choline) and at 184.2 m/z (phosphocholine) [230]. Nevertheless, in the following only the peaks at $[M+H]^+$ for each metabolite are considered. It can be noticed that some metabolites, like LysoPC, are also well detected at $[M+H]^+$ using the DHB matrix. However, the S/N ratio of all the metabolites detected using the CHCA matrix remain stable after a one-hour sample storage under vacuum, as well as after a one-hour sample storage in ambient conditions. On the contrary, the S/N ratio obtained using the DHB matrix decreases by more than 70 % after one-hour storage.

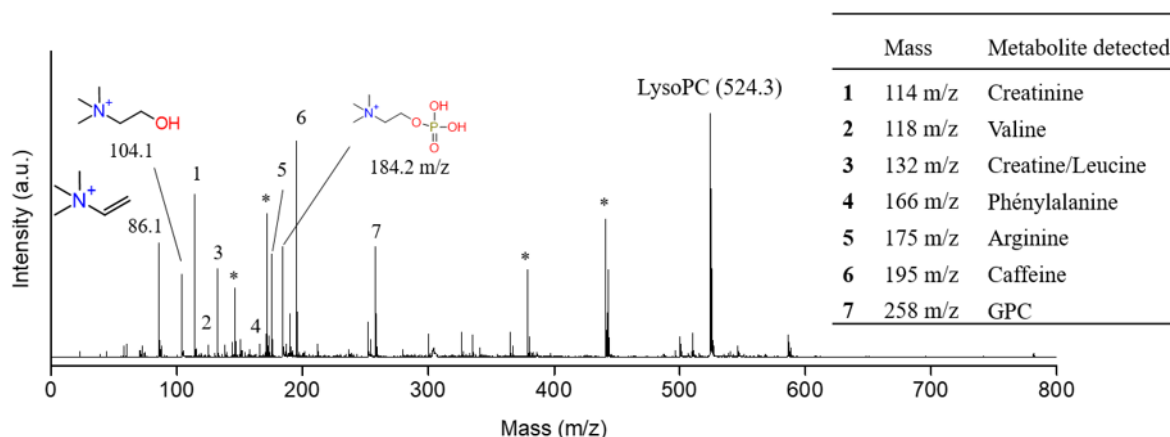


Figure 4.4 – MALDI-ToF MS spectra of the mix of metabolites on stainless steel target plate with CHCA matrix. LysoPC is observed at 524.4 m/z ($[M+H]^+$) with fragments at 86.1 m/z, 104.1 m/z, and 184.2 m/z. The other metabolites detected are identified in the insert. Peaks were identified by comparison with the MALDI-ToF MS spectra of each metabolite alone in solution (results not shown). Matrix peaks are identified by a star.

The effects of the concentration of the CHCA matrix on the detection of LysoPC are presented in Figure 4.5. Five different concentrations were studied from 0 mg/mL to 20 mg/mL. While no signal is obtained without matrix, the $[M+H]^+$ peak intensity increases as the CHCA concentration increases up to 10 mg/mL. Same $[M+H]^+$ peak intensities are obtained at 10 mg/mL and 20 mg/mL of CHCA. So, in the following a CHCA matrix at 10 mg/mL was used.

Sepsis metabolites detection with and without silane monolayers on plane and porous silicon substrates The effects of the different silane monolayers, on plane and porous silicon substrates, on the detection of sepsis metabolites, detected using the CHCA matrix, were investigated. Results were compared to the ones obtained with the bare plane and porous silicon surfaces, and to the ones obtained using the classical stainless steel MALDI target plate. The

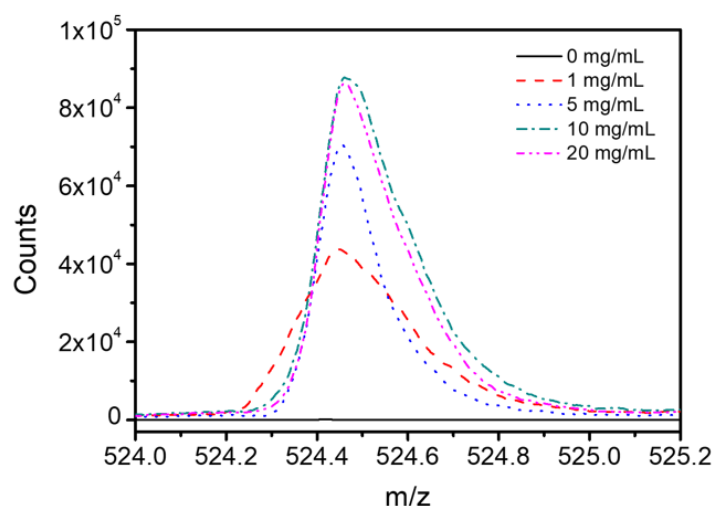


Figure 4.5 – $[M+H]^+$ peak of LysoPC (524.4 m/z) for different concentrations of the CHCA matrix: 0 mg/mL (black solid), 1 mg/mL (red dash), 5 mg/mL (blue dot), 10 mg/mL (green dash dot), and 20 mg/mL (magenta dash dot dot).

corresponding mass spectra are presented in Figure 4.6 and Figure 4.7. The $[M+H]^+$ peaks of the different metabolites are present on all the surfaces studied with different intensities. To assess these differences, the S/N ratios, as well as the STD_{mean} and the intra-substrates uniformity obtained from the analysis of three different replicate samples, are determined for each surface (Table 4.4). The metabolites detected are presented in Table 4.4. Their octanol-water partition coefficient ($\log P$) is in the range -5.5 to 2.08 (for the most hydrophilic metabolite studied, to the most hydrophobic one). Also, three of the detected metabolites have no global charge, while two of them have a high isoelectric point (10.77 and 8.99), and two of them have an isoelectric point at 6.4 and 6.33. Since Creatine and Leucine have the same mass and no fragments, they cannot be distinguished in the mass spectra. Also, these two molecules have very different isoelectric points and $\log P$. Consequently, they are not considered in the following.

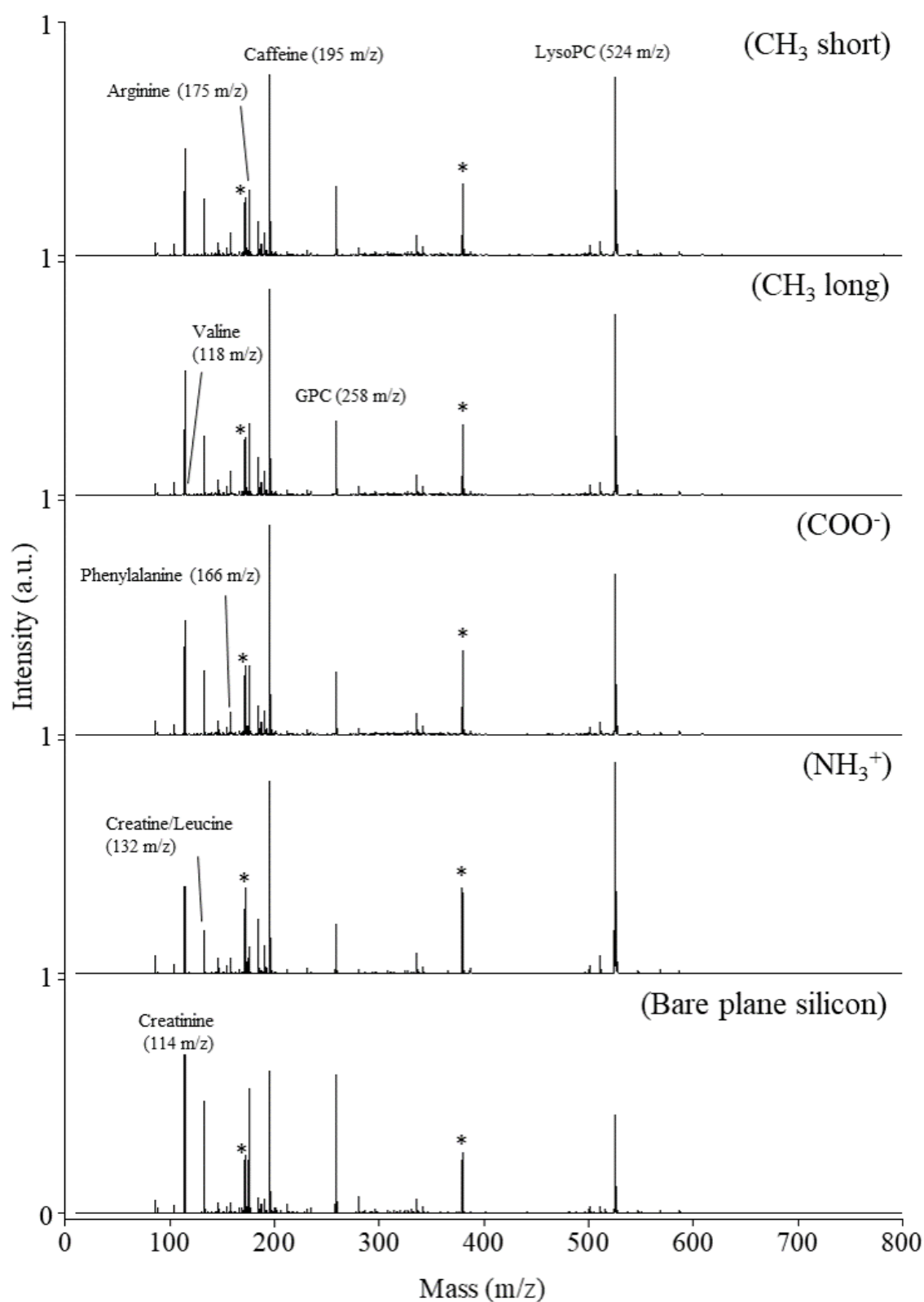


Figure 4.6 – Mass spectra of the solution containing the mix of 25 metabolites, using CH₃ short, CH₃ long, COO⁻, and NH₃⁺ monolayers on plane silicon surfaces, and using the bare plane silicon surface. Total ion count (TIC) normalization is used. Matrix peaks are identified by a star.

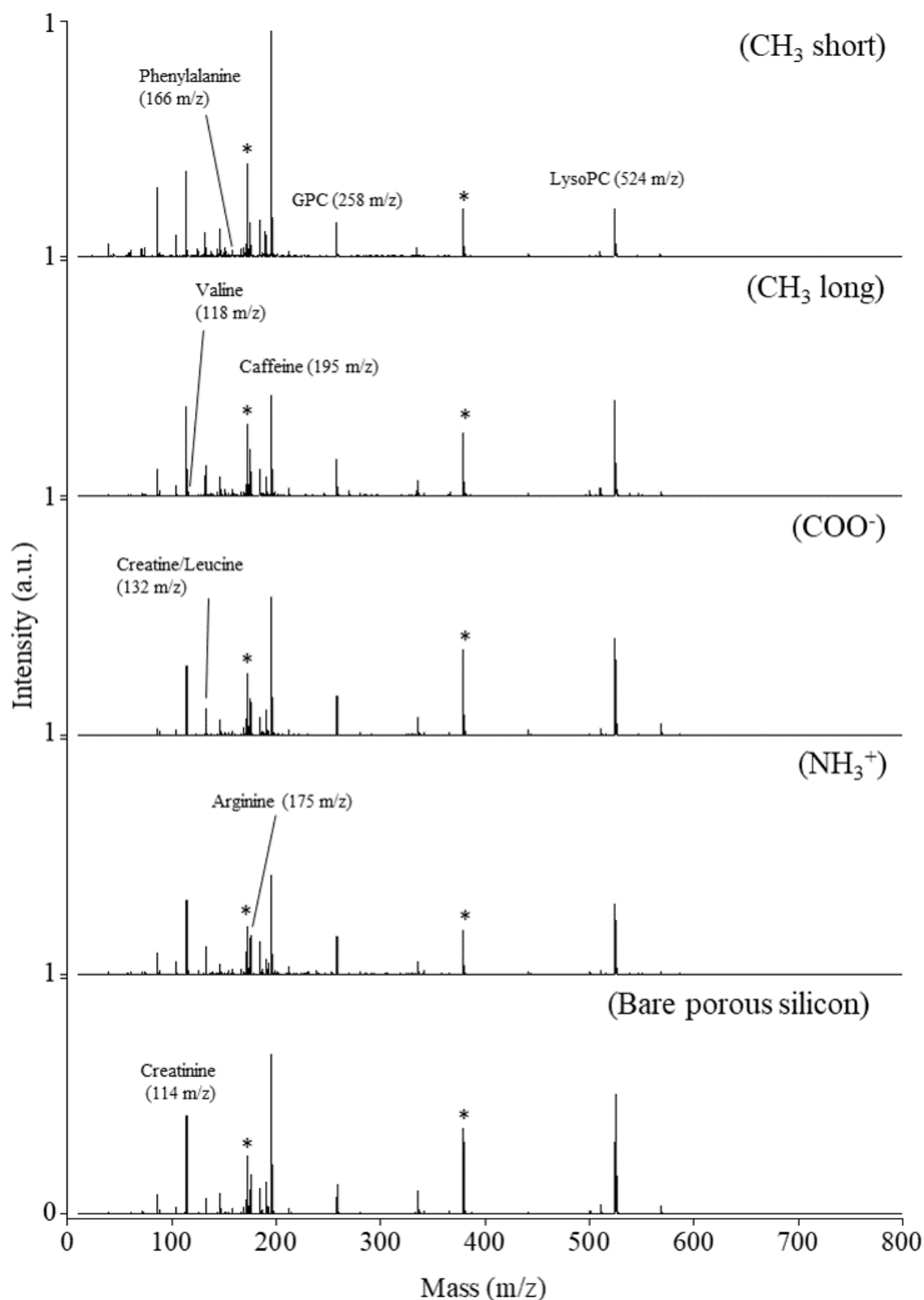


Figure 4.7 – Mass spectra of the solution containing the mix of 25 metabolites, using CH₃ short, CH₃ long, COO⁻, and NH₃⁺ monolayers on porous silicon surfaces, and using the bare porous silicon surface. Total ion count (TIC) normalization is used. Matrix peaks are identified by a star.

m/z	LogP	IP	S/N Stain- less steel	Plane substrate					Porous substrate					
				CH ₃ short	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	Bare Si	CH ₃ short	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	Bare Si	
LysoPC 524	2.08	NA	678	S/N	563	531	540	640	319	536	666	596	461	806
				Unif.	16	18	17	20	28	15	26	24	35	17
				STD_{mean}	4	7	3	20	15	3	5	9	17	15
Caffeine 195	-0.1	NA	521	S/N	562	563	570	618	506	632	430	379	370	763
				Unif.	25	27	24	32	30	23	33	46	41	25
				STD_{mean}	5	6	4	18	23	5	6	21	8	4
Phenyl- alanine 166	-1.2	6.33	34	S/N	12	11	10	14	14	22	16	8	20	13
				Unif.	29	28	27	38	34	17	23	33	35	24
				STD_{mean}	7	3	5	28	25	1	5	14	6	8
Creati- nine 114	-1.4	8.99	566	S/N	885	870	830	753	924	756	588	632	513	1027
				Unif.	28	29	29	30	35	33	37	49	57	28
				STD_{mean}	7	2	1	10	13	22	6	21	12	15
Valine 118	-1.9	6.4	8	S/N	7	5	5	8	5	3	6	3	5	3
				Unif.	47	59	67	71	72	135	64	128	132	114
				STD_{mean}	4	6	11	51	23	34	17	12	67	40
Alanine 89	-2.8	6.1	-	S/N	8	7	6	10	6	3	8	4	3	4
				Unif.	47	47	73	75	79	155	80	91	149	80
				STD_{mean}	11	6	13	66	31	45	15	8	13	20
Arginine 175	-3.1	10.77	256	S/N	299	270	235	228	596	280	228	163	171	395
				Unif.	28	36	30	32	31	35	36	43	40	23
				STD_{mean}	14	72	7	20	1	27	11	19	17	3
Glycine 75	-3.4	5.8	-	S/N	4	4	3	6	ND	ND	5	4	3	3
				Unif.	77	73	116	113	ND	ND	75	80	188	72
				STD_{mean}	16	10	20	89	ND	ND	21	10	18	26
GPC 258	-5.5	NA	249	S/N	245	234	205	204	426	200	158	127	134	173
				Unif.	28	31	29	33	30	27	24	30	36	27
				STD_{mean}	8	4	8	17	5	16	6	13	4	11

Table 4.4 – S/N ratio and associated STD_{mean} (%) and intra-substrates uniformity (%), for all the metabolites simultaneously detected on the different surfaces studied, using CHCA as a matrix. m/z, logP, and the isoelectric point (IP) are indicated for each metabolite. For a given metabolite, a substrate leading both to the highest S/N ratio and to the best compromise for STD_{mean} and uniformity is identified by red values, if such a substrate does not exist, the substrate leading to the highest S/N value is identified by bold black values and the substrate leading to the best compromise for STD_{mean} and uniformity is identified by green values. ND means not detected

Firstly, our results demonstrate that all the metabolites detected on the stainless-steel target plate are also detected on the silanized and bare, plane and porous, silicon substrates. In addition, two metabolites, Glycine and Alanine, not detected on the stainless-steel target plate can be detected by using silicon substrates. Indeed, Alanine was detected on all silicon-based surfaces, while Glycine was not detected on CH₃ short modified porous silicon and bare plane silicon. Moreover, whatever the metabolite, except Phenylalanine and Valine, at least one of the silicon surfaces (plane or porous, bare or silanized) allows for improving the S/N value in comparison with the stainless-steel target plate. This first confirms that the choice of our silicon surfaces was appropriated. Secondly, these results demonstrate that there is no ideal silicon surface which proposes the best compromise for S/N, STD_{mean}, and intra-substrates uniformity for all the metabolites. Depending on the chosen metabolite, planar or porous surfaces, bare or silanized silicon surfaces are more suitable. Thus, the choice of a silicon surface allows to target the specificity to one of the metabolites. However, a mix of different silicon surfaces would be necessary to detect all the metabolites for the development of a sensing device. Nevertheless, it appears on Table 4.4, that substrates, planar or porous, functionalized with COO⁻ monolayers never present the best S/N ratio in comparison with the other silicon surfaces. Then, it appears as a candidate that should not be chosen. However, the uniformity and STD_{mean} values are often low and then induce a detection of the metabolites well controlled.

In details, if we consider the STD_{mean}, results demonstrate that, when comparing the plane surfaces, out of the nine detected metabolites, NH₃⁺ modified surfaces showed the worst STD_{mean} for seven metabolites (LysoPC, phenylalanine, valine, alanine, arginine, glycine, and GPC). Still on plane substrates, bare silicon had the worst STD_{mean} for the remaining two metabolites (caffeine and creatinine). Using NH₃⁺ porous silicon instead of NH₃⁺ plane surfaces, the STD_{mean} was improved for all metabolites excepted for creatinine and valine.

To explain these results, the features of matrix crystallisation on the different surfaces was studied by SEM. Figures B.6-B.14 present the SEM images of four replicates of the matrix droplets crystallized on each plane and porous substrate studied. Crystallization patterns on the plane substrates functionalized with the CH₃ short, CH₃ long, COO⁻ monolayers, and on the bare plane silicon surface were roughly similar from one replicate to another. However, matrix crystallisation features on the plane NH₃⁺ monolayers varied. So, matrix crystallisation could explain the poor STD_{mean} of MALDI analysis in the case of the NH₃⁺ monolayer on plane silicon surface. Contrary to plane silicon surfaces, the shape of crystals on porous substrates appears to be similar whatever the type of silane monolayer, with the presence of dendrites. Also, the matrix crystallization features are similar on the four porous NH₃⁺ monolayers studied. Consequently, matrix crystallisation could explain the better STD_{mean} in MALDI analysis using the porous substrates functionalized with a NH₃⁺ monolayer than the plane substrates.

In addition, CH₃ short monolayer on porous substrates in the case of Creatinine and Arginine leads to a worse STD_{mean} than the NH₃⁺ monolayer on plane silicon substrate, which is not correlated to the heterogeneity of matrix crystallization features. Thus, matrix crystallization features are not sufficient to systematically get high STD_{mean} and uniformity in MALDI analysis. Also, on porous substrates, the CH₃ short monolayer leads to better STD_{mean} and uniformity than the bare porous silicon substrate for LysoPC and Phenylalanine, while the CH₃ long mono-

layer leads to better STD_{mean} and uniformity than the bare porous silicon substrate for Valine, and the COO^- monolayer leads to better STD_{mean} than the bare porous silicon substrate for LysoPC, Valine, Alanine and Glycine. Thus, STD_{mean} and uniformity of analysis are likely due to a combination between the quality of matrix crystallization, the physico-chemical properties of metabolites and surfaces, limitations in metabolites extraction from the pores because of mechanical constraints, and improvement in metabolite desorption due to the pores that could act as optimized laser energy receptacles.

If we consider the S/N ratios, the best ones are obtained on NH_3^+ monolayers and bare Si for planar surfaces and on CH_3 short and long monolayers and bare Si for porous silicon surfaces. If the bare Si surface is a good candidate for the detection of many metabolites on planar and porous surfaces, it seems that the presence of pores modifies the detection ability of silanized surfaces. Indeed, NH_3^+ monolayer is no more good candidate on porous surfaces compared to planar surfaces, despite CH_3 short and long monolayers became more appropriate. It is such as the physico-chemical properties of the surface are not the only determinant factors.

The most hydrophobic metabolites (LysoPC and Caffeine) lead to higher S/N values by using the hydrophilic porous bare silicon substrate. These metabolites could be easily desorbed from hydrophilic surfaces and pores could act as optimized laser energy receptacles improving desorption. In the case of LysoPC, STD_{mean} and uniformity of the S/N values are demonstrated to be improved by using porous and plane CH_3 short monolayers.

Contrary to hydrophobic metabolites, the two most hydrophilic metabolites with the highest molecular masses (GPC and Arginine) lead to higher S/N values using bare plane silicon substrates than any other substrates. This result is in line with a previous study that has demonstrated that the MALDI-MS signal of hydrophilic analytes is higher on hydrophilic surfaces than on hydrophobic surfaces [26, 131]. Also, hydrophilic pores could affect the extraction of hydrophilic metabolites, decreasing the S/N values in comparison with plane silicon substrate.

In line with the results obtained for the most hydrophobic and hydrophilic metabolites, metabolites with intermediate logP (Phenylalanine and Creatinine) yield similar S/N values using plane and porous bare silicon substrates. In addition, STD_{mean} and uniformity of S/N values are improved by using hydrophobic monolayer on porous substrate (CH_3 short for Phenylalanine) or on plane substrate (CH_3 long for Creatinine).

Finally, hydrophilic metabolites with the lowest molecular mass (Glycine, Alanine, and Valine) lead to poor S/N values, both on plane and porous substrates. Nevertheless, higher repeatability and uniformity in S/N are obtained by using the most hydrophobic plane substrates (CH_3 short and CH_3 long monolayers). Thus, hydrophobic surfaces could facilitate desorption of the smallest hydrophilic metabolites.

Finally, hydrophilic metabolites with the lowest molecular mass (Glycine, Alanine, and Valine) lead to poor S/N values, both on plane and porous substrates while improved STD_{mean} and uniformity are obtained by using the most hydrophobic plane substrates. Indeed, in the case of Valine, the best uniformity and STD_{mean} are obtained on plane silicon substrates modified with CH_3 short monolayer (47 and 4 respectively). In the case of Alanine, the best uniformity is obtained on the plane silicon substrates modified with CH_3 short and CH_3 long monolayers

(47 in both cases), while the best STD_{mean} is obtained on plane silicon substrates modified with CH_3 long monolayer (6). In the case of Glycine, the CH_3 long modified plane silicon surface is the best compromise to optimize both the STD_{mean} and the uniformity. Indeed, this substrate leads to the best STD_{mean} (10), even if an identical uniformity is obtained with the COO^- modified porous silicon substrate, and a uniformity of 73, very close to the best uniformity (72) obtained with the bare porous silicon substrate. Beyond the effects of matrix crystallisation and of the physico-chemical properties of the substrates and of metabolites, the effect of metabolite trapping inside the pores was evaluated. LysoPC molecules were shown, by ToF-SIMS depth profiling analysis, to be trapped inside the pores of the CH_3 short substrate, and in the pores of the bare silicon substrate, while they stay at the surface of the CH_3 long substrate (Figure 4.8). However, LysoPC trapping inside the pores seems to have only a little impact on the STD_{mean} and intra-substrates uniformity, which are slightly better for CH_3 short (LysoPC inside the pores) than for CH_3 long monolayers (LysoPC outside the pores), despite a lower S/N ratio in the case of CH_3 short monolayers. In addition, our results suggest that hydrophobic pores may act as optimized energy receptacles improving the S/N values for LysoPC molecules when localize on the surface outside the pores, while this effect is counterbalanced by mechanical constraints impeding LysoPC molecules when the molecules are trapped inside the pores. Indeed, the S/N value for LysoPC is higher on the CH_3 long modified porous substrates than on the CH_3 long modified plane substrates (666 and 531 respectively). Also, the S/N value for LysoPC is lower on the CH_3 short modified porous substrate than on the CH_3 long modified porous substrates (536 and 666 respectively). Finally, the difference between the S/N values for LysoPC on the CH_3 short modified plane and porous substrates (563 and 536 respectively) is lower than the difference between the S/N values for LysoPC on the CH_3 long modified plane and porous substrates (531 and 666 respectively).

Conclusion

The CHCA matrix was shown to allow the simultaneous detection, on the classical stainless steel MALDI target plate, of nine metabolites among the 25 metabolites studied, while two more metabolites are detected on the silanized and bare silicon substrates. LysoPC, is the metabolite which leads to the highest signal intensity. The features of the CHCA matrix crystals were demonstrated to vary further on plane substrates than on porous substrates, and especially on plane NH_3^+ substrates. Nevertheless, in the case of porous substrates, the presence and the type of silane monolayers do not impact the matrix crystallisation. The quality of matrix crystals is demonstrated to be in line with the poor STD_{mean} of MALDI analysis obtained with the NH_3^+ monolayer on plane silicon substrates and also with the higher STD_{mean} obtained on the NH_3^+ monolayer on porous substrates than on plane substrates. Nevertheless, in the case of the other monolayers, no correlation was found between the STD_{mean} of the S/N values and matrix crystal features. Thus, results suggest that MALDI analysis depend on a complex combination of several factors such as the quality of matrix crystallization, the physico-chemical properties of metabolites and surfaces, limitations in metabolites extraction from the pores because of mechanical constraints, and improvement in metabolite desorption due to the pores that could act as optimized laser energy receptacles. Indeed, in the case of the most hydrophobic metabolites

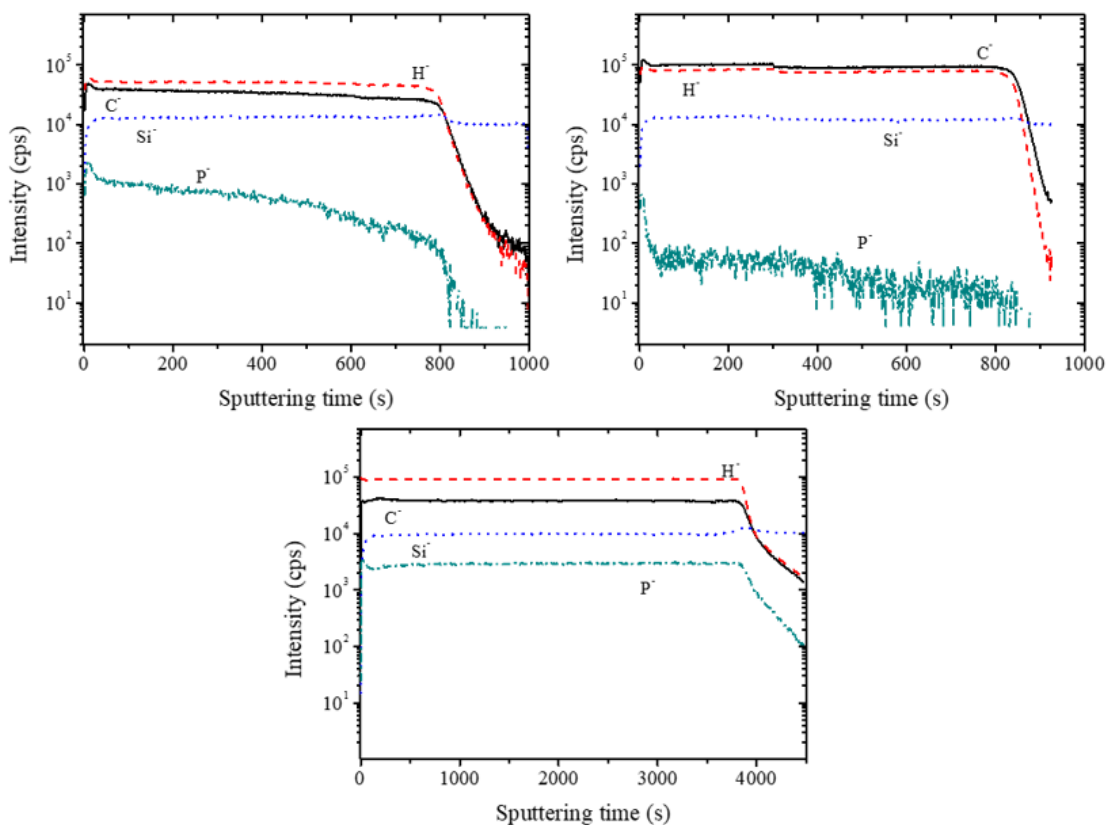


Figure 4.8 – Depth profiling of C⁻, H⁻, Si⁻, and P⁻ ions by ToF-SIMS on porous silicon functionalized by CH₃ short (left), CH₃ long (right) silane monolayers, and on bare porous silicon (below). P⁻ ions are specific to the LysoPC molecule.

studied, LysoPC and Caffeine, the highest S/N ratio were obtained using the bare (hydrophilic) porous silicon substrates. However, CH₃ short monolayer on porous substrates could be a good trade-off to optimize both the S/N ratio of LysoPC and the associated intra-substrate uniformity and STD_{mean}. In the case of the most hydrophilic metabolites with the highest molecular masses (GPC and Arginine), the highest S/N ratio was observed on bare plane silicon. For the lowest molecular weight (Valine, Alanine, and Glycine), the S/N ratio was lower than 11 on all surfaces but the STD_{mean} or the uniformity was improved on CH₃ long or CH₃ short silane modified plane substrates. Finally, metabolites with intermediate logP (Phenylalanine and Creatinine) yield the best MALDI analysis by using hydrophobic monolayer on porous substrate (CH₃ short for Phenylalanine) or on plane substrate (CH₃ long for Creatinine).

These results would need to be extended in plasma samples, where the abundant large molecules will be sterically excluded from the pores and remove from the surface by water washing. Then, a reduced number of substrates could be selected to improve the MALDI-ToF MS detection of the panel of sepsis metabolites. In addition, to further increase the number of metabolites detected among the 25 metabolites studied, and also to further improve the limit of detection, DIOS-MS strategy, based on silanized porous silicon substrates, could be investigated [231]. Indeed, for instance, a slight CHCA matrix peak interferes with the [M+H]⁺ peak of LysoPC, limiting its detection around 0.5 ng/mL in the mix of metabolites studied. However the physiological

concentration of LysoPC is far above this detection limit, around 40 ng/mL, and decreases in case of sepsis. So, the substrates studied, easily marketable at low cost and high throughput, could be promising to develop a strategy for sepsis diagnosis in few minutes, without any pre-treatment protocols of the samples, based on sepsis metabolites MALDI-ToF MS analysis.

4.4 Résultats complémentaires à l'article

Plusieurs points qui n'ont pas été discutés dans l'article sont exposés dans la suite. Ces résultats viennent compléter ceux présentés dans la section précédente. Ils concernent la suppression des pics de matrice lors de la détection des métabolites, l'étude des métabolites en milieu salin et la limite de détection des métabolites sur un substrat de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH_3 court avec la matrice HCCA.

4.4.1 Suppression d'un pic de matrice

Une particularité peut apparaître avec certaines molécules, c'est la suppression d'un pic de matrice lors de la mesure. On retrouve cela avec la caféine et la matrice HCCA. Comme on peut le voir sur la Figure 4.9, avec l'ajout de la caféine, un pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ (195 m/z) apparaît alors que le pic à 190 m/z, correspondant à $[\text{HCCA}+\text{H}]^+$ et le pic à 172 m/z correspondant à $[\text{HCCA}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ disparaissent. Le troisième pic le plus important de la matrice ($[\text{2HCCA}+\text{H}]^+$ à 379 m/z) reste toutefois visible. Ce phénomène est aussi visible pour le LysoPC (Figure 4.10), pour lequel, les trois pics principaux de matrice sont négligeables par rapport au pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ du LysoPC (524 m/z). Cependant, ce phénomène n'est pas systématique et la caféine et le LysoPC sont les deux seuls métabolites de notre panel provoquant la suppression de pics de matrice. Dans le cas de l'arginine, qui est détectée à 175 m/z, la matrice reste visible à toutes les masses (Figure 4.9). Cet effet de suppression des ions de matrice peut être observé avec certaines molécules (souvent des petites molécules) et pour des concentrations particulières, en particulier pour la matrice HCCA [232–234]. Une modélisation de la pulsation laser et du transfert de charges créée au début des années 2000 par R. Knochenmuss a permis de montrer que cette suppression de matrice est bien due au transfert de charge entre la matrice et l'analyte [235,236]. En revanche, ce modèle ne prenait pas en compte tous les phénomènes pouvant amener à l'ionisation des analytes (comme le transfert de charge dans des clusters) et il ne permet pas de prédire quelles molécules ont la propriété de supprimer un ou plusieurs pics de matrice. À notre connaissance, à ce jour, les conditions nécessaires pour observer une suppression de matrice ne sont pas connues.

4.4.2 Étude en milieu salin

Afin de détecter des métabolites dans des milieux biologiques, qui sont extrêmement plus complexes que le mélange de métabolites utilisé dans l'article, une étude sur l'influence du milieu sur la détection des métabolites a été menée. Pour cela, nous avons mélangé la solution multi-plexée à une solution tampon PBS (Phosphate-buffer saline en anglais ou tampon phosphate) sans NaCl, puis à du PBS avec NaCl (1 pour 1 en volume à chaque fois). La concentration finale

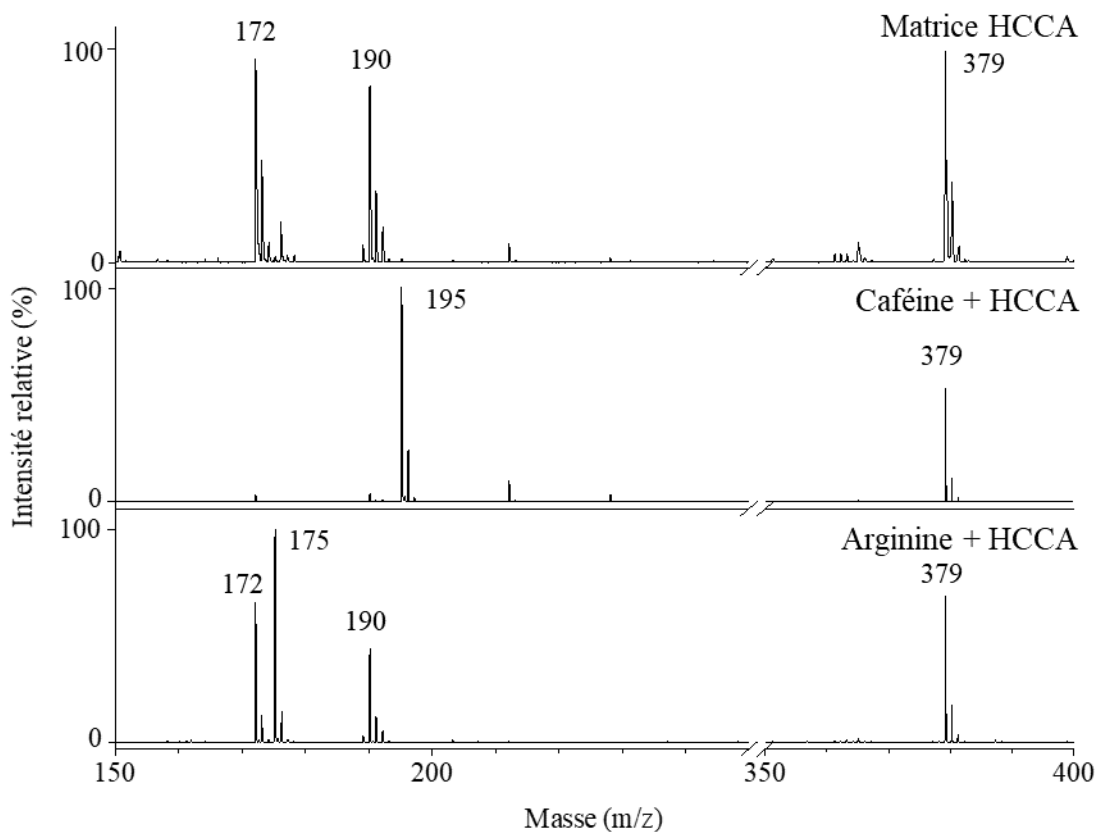


Figure 4.9 – Spectres de masse MALDI de la matrice HCCA, de la caféine (195 m/z) avec la matrice HCCA et de l’arginine (175 m/z) avec la matrice HCCA. Les échelles sont identiques pour les trois spectres.

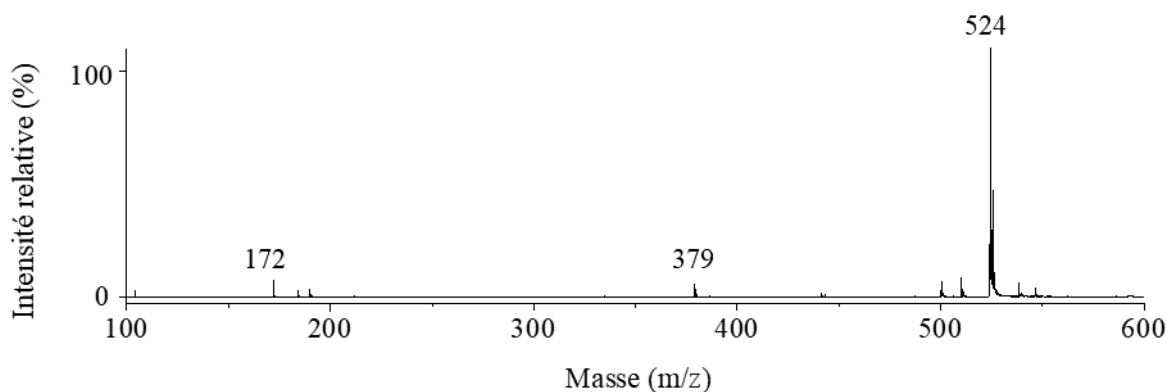


Figure 4.10 – Spectres de MALDI-MS du LysoPC avec la matrice HCCA. Le pic à 524 m/z correspond au pic $[M+H]^+$ du LysoPC. Les pics à 172 m/z et 379 m/z sont des pics de matrice.

en métabolite est donc de 25 µg/mL, au lieu de 50 µg/mL dans la solution sans sel. Une solution de référence a aussi été réalisée en diluant la solution multiplexée dans de l'eau pour arriver à la même concentration (1 pour 1 en volume).

Deux dépôts pour chaque milieu ont été réalisés sur une plaque MALDI, les résultats sont présentés en Figure 4.11 sous forme de gel view pour les 3 milieux. En complexifiant le milieu, le nombre de pics augmente sur les spectres, passant de 48 pics pour la dilution avec de l'eau à 59 pics pour la dilution avec du PBS avec des ions Na⁺ et Cl⁻. Cette augmentation du nombre de pics s'explique par la présence d'adduits des molécules qui apparaissent en présence d'ions Na⁺ et K⁺ par exemple. Les pics des molécules de solution multiplexée sont toujours présents avec des intensités comparables au milieu sans sel, la présence de ces sels a donc une influence limitée sur la détection des métabolites mais rend les spectres plus complexes, ce qui peut impacter leur analyse.

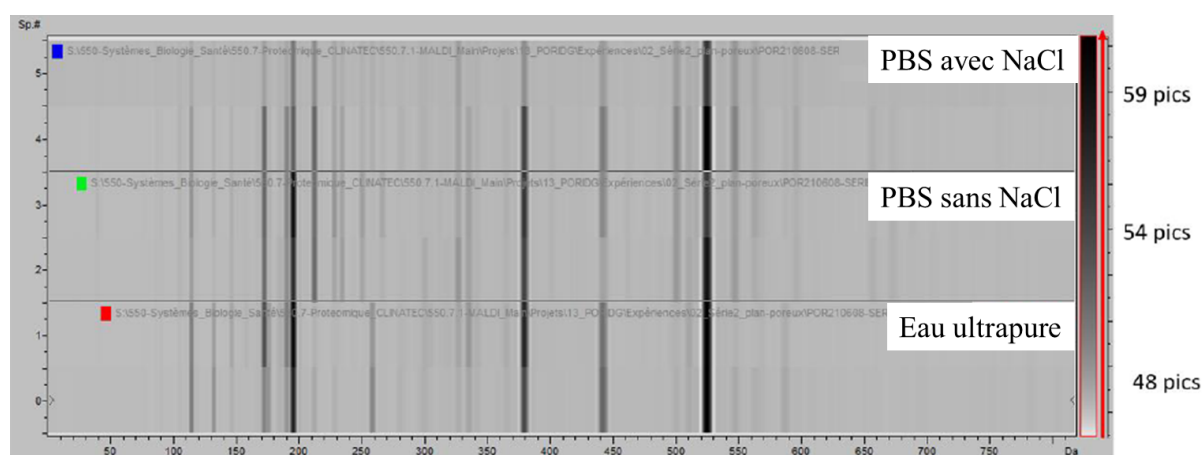


Figure 4.11 – Gel view obtenue à partir du logiciel Clinprotol (Bruker Daltonics). Pour chaque milieu, de l'eau ultrapure, du PBS sans NaCl et du PBS avec NaCl, deux spectres ont été faits. Le nombre de pics indiqué à droite est le nombre moyen de pics détectés sur les deux spectres (S/N supérieur à 5).

4.4.3 Comparaison avec la dynamique moléculaire

Dans l'article présenté précédemment, nous avons corrélé les résultats de MALDI-MS avec des observations faites en MEB et en ToF-SIMS. Pour compléter cette étude, nous comparons les résultats obtenus en spectrométrie de masse avec les énergies d'interaction de dynamique moléculaire du chapitre précédent. Celles-ci sont présentées dans le Tableau 4.5, extraite des valeurs données dans la Figure 3.13 à la page 114, pour les trois métabolites de cette étude qui sont détectés dans la solution multiplexée : la caféine, la phénylalanine et l'arginine.

Pour rappel, la caféine est uniformément détectée en MALDI-MS sur l'ensemble des surfaces planes (Tableau 4.4). Dans le cas des surfaces poreuses, on observe une augmentation du S/N sur la surface de SiO₂ par rapport aux surfaces silanisées (+ 65 %). Dans le cas de la dynamique moléculaire, la caféine ne s'adsorbe pas sur la surface de SiO₂ alors qu'elle s'adsorbe avec des énergies comprises entre -140 kJ/mol et -177 kJ/mol sur les surfaces silanisées. Ces deux résultats semblent cohérents : les S/N sur les surfaces silanisées sont similaires, de même que les énergies

Énergies (kJ/mol)	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	SiO ₂
Phénylalanine	-143 ± 54	-147 ± 60	-87 ± 26	-240 ± 36	-120 ± 40
Caféine	-170 ± 37	-177 ± 25	-140 ± 10	-167 ± 60	0
Arginine	-203 ± 52	-83 ± 23	-300 ± 0	-213 ± 34	-210 ± 10

Tableau 4.5 – Énergies d’interaction (en kJ/mol) entre les métabolites et les silanes lors des simulations de dynamique moléculaire avec la silice poreuse.

d’interaction. Dans le cas de la surface de SiO₂, la caféine se trouve sur la surface parce que la goutte est séchée mais elle n’interagit pas, elle co-cristallise uniquement avec la matrice. Étant plus facile à désorber que sur les autres surfaces, elle est mieux détectée. Le fait que ce ne soit pas le cas avec la surface plane pourrait s’expliquer par l’hydrophilie de la surface. En effet, dans le cas d’une surface plane, l’étalement de la goutte de métabolites est plus grand que pour la surface poreuse car elle est plus hydrophile (Figure 4.12). En conséquence, la caféine est répartie sur une plus grande surface et le signal moyen est plus faible et s’aligne avec celui des surfaces silanisées.

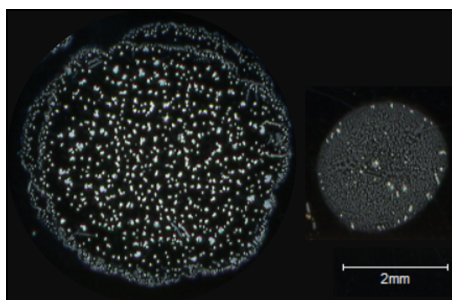


Figure 4.12 – Goutte d’un mélange métabolites/matrice séchée sur une surface de silicium plan à gauche et de silicium poreux à droite.

Avec la phénylalanine, l’effet inverse est observé : la force la plus attractive est obtenue avec la monocouche de NH₃⁺ et c’est également la surface qui génère le plus grand S/N. L’énergie d’adsorption semble donc avoir peu d’influence sur le signal de détection, mais plutôt la capacité de la molécule de s’adsorber ou non. L’arginine valide également cette hypothèse : ni la surface de silanes CH₃ long avec une énergie d’interaction de -83 kJ/mol, ni celle des silanes COO⁻ avec une énergie d’interaction de -300 kJ/mol ne se démarquent dans le S/N en MALDI-MS.

Pour conclure, l’énergie d’interaction entre les métabolites et la surface ne semble pas corrélée aux intensités de détection en MALDI-MS.

4.4.4 Limite de détection des métabolites

Pour finir, la limite de détection des métabolites détectés en MALDI-MS dans la solution multiplexée a été étudiée, en diluant cette solution dans de l’eau ultrapure à différentes concentrations entre 40 µg/mL et 0,5 ng/mL. Les concentrations sont les suivantes : 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 2,5 µg/mL, 625 ng/mL, 160 ng/mL, 40 ng/mL, 10 ng/mL, 2,5 ng/mL, 1 ng/mL et 0,5 ng/mL. Pour chaque concentration, trois dépôts sur un substrat de silicium po-

reux fonctionnalisés par des silanes CH_3 court ont été effectués. La matrice HCCA a été déposée après le séchage de la goutte et les mesures ont été faites en RP. Dans la suite, nous regardons les 7 métabolites étudiés dans l'article : le LysoPC, la caféine, la phénylalanine, la créatinine, la valine, l'arginine et l' α -GPC. Les valeurs de S/N pour ces métabolites à chaque concentration sont données dans la Figure 4.13. La valeur "Matrice" correspond au S/N à la masse du métabolite lorsque la matrice est déposée seule. Lorsque cette valeur est non nulle (pour la valine, la phénylalanine et le LysoPC), la limite de détection a été définie comme la concentration minimale en analyte pour laquelle le S/N est supérieur à trois fois celui de la matrice seule. Les limites de détection pour chaque métabolite sont :

- 10 ng/mL pour la créatinine,
- 2,5 $\mu\text{g/mL}$ pour la valine,
- 160 ng/mL pour la phénylalanine,
- 10 ng/mL pour l'arginine,
- 10 ng/mL pour la caféine,
- 160 ng/mL pour l' α -GPC,
- 0,5 ng/mL pour le LysoPC.

Comme dans le cas de la matrice, il est possible d'observer une suppression (complète ou partielle) d'un analyte. Ce phénomène peut apparaître lorsque plusieurs analytes sont mélangés et analysés en MALDI-MS. Ces deux molécules peuvent être bien détectées lorsqu'elles sont seules en solution, mais lorsqu'elles sont mélangées, si l'une d'elles s'ionise plus facilement (parce qu'elle a une affinité protonique plus élevée ou parce que le transfert de charge entre la matrice et l'analyte est plus facile), alors la répartition des signaux des deux analytes peut ne pas être égal et un des pics peut être diminué, voire supprimé. C'est peut-être ce phénomène que l'on observe lorsque la concentration en métabolites passe de 40 $\mu\text{g/mL}$ à 20 $\mu\text{g/mL}$. En diminuant la concentration en métabolites (et à concentration de matrice constante), les métabolites pour lesquels l'ionisation est la meilleure (la caféine et le LysoPC) sont les seuls pour lesquels le rapport S/N diminue. Pour les autres, il semble que ces deux métabolites provoquent une suppression partielle du pic à 40 $\mu\text{g/mL}$. Ce n'est plus le cas à des concentrations plus basses parce que la concentration en matrice est trop grande par rapport à la concentration en analyte et le LysoPC et la caféine ne sont plus en quantité suffisante pour que l'on observe la suppression. On peut noter que la caféine et le LysoPC sont également les deux métabolites pour lesquels on observait une suppression de la matrice.

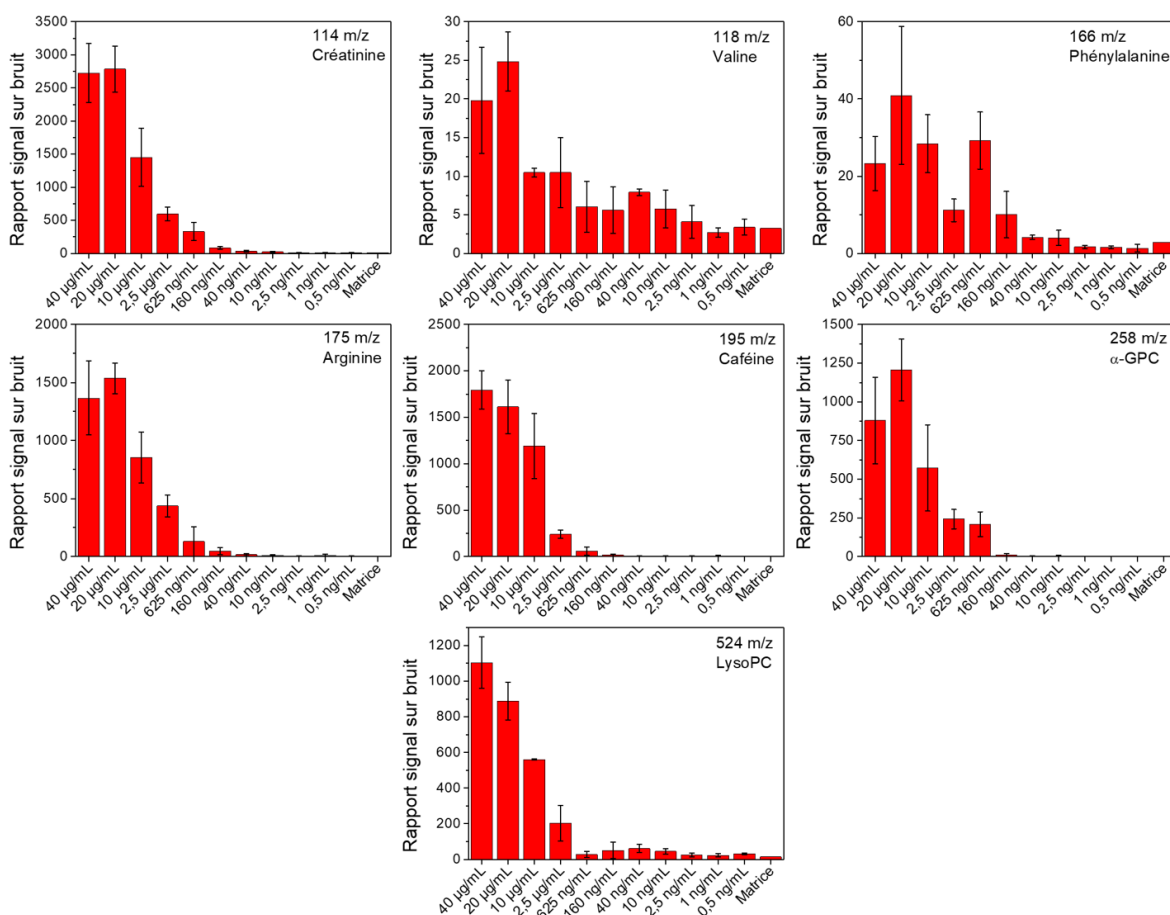


Figure 4.13 – S/N et écart type à différentes concentrations, obtenus en MALDI-MS sur une monocouche de CH_3 court, pour les métabolites détectés sur cette surface en MALDI-MS : créatinine (114 m/z), valine (118 m/z), phénylalanine (166 m/z), arginine (175 m/z), caféine (195 m/z), α -GPC (258 m/z) et LysoPC (524 m/z). Les écarts types sont obtenus à partir de 3 répliques. La valeur au niveau de la "Matrice" correspond au S/N à la même masse lorsque la matrice est déposée seule sur la surface.

4.5 Conclusion

Cette étude de spectrométrie de masse MALDI avait pour objectif de déterminer les conditions permettant de détecter le maximum de métabolites dans un mélange. Nous avons montré que la matrice la plus adaptée pour cela est la matrice HCCA à 10 mg/mL. Elle permet de détecter sept métabolites simultanément dans un mélange : le LysoPC, la caféine, la phénylalanine, la créatinine, la valine, l'arginine et l' α -GPC sur une plaque MALDI en acier.

Nous avons montré que les silanes avaient également un effet sur la détection des métabolites et la reproductibilité des mesures. En effet, la surface de silicium plan fonctionnalisée avec des silanes NH_3^+ est toujours celle donnant la plus grande variabilité lorsque les métabolites ne sont pas chargés. De plus, les substrats de silicium poreux non fonctionnalisés donnent les S/N les plus élevés par rapport aux surfaces silanisées pour les métabolites hydrophobes (LysoPC et caféine), ce qui n'est pas le cas pour les métabolites chargés (créatinine et arginine) pour qui la fonctionnalisation ou non de la surface a peu d'influence sur le signal de détection. Enfin, dans

le cas des métabolites hydrophiles (arginine et α -GPC), ce sont les substrats de silicium plan non fonctionnalisés qui offrent le meilleur S/N.

Ces effets peuvent avoir plusieurs origines, en particulier l'adsorption, la position dans les pores, la cristallisation de la matrice, la désorption ou le transfert de protons. Il est difficile de décorrélérer tous ces phénomènes pour évaluer la contribution de chacun.

Nous avons tout de même montré grâce au ToF-SIMS que la pénétration des analytes dans les pores semble avoir une influence limitée sur la détection des métabolites en MALDI-MS : le S/N du LysoPC, qui pénètre dans les pores fonctionnalisés par les silanes CH_3 court et pas dans ceux silanisés par les CH_3 long, est similaire sur les deux surfaces. En revanche, la dynamique moléculaire montre que le signal plus fort de la caféine avec la surface de SiO_2 poreux peut venir du fait que la molécule n'est pas adsorbée sur la surface mais juste déposée et séchée. Cela permet d'expliquer pourquoi le SiO_2 poreux donne les S/N les plus élevés pour les molécules hydrophobes par rapport aux surfaces silanisées. Enfin, la meilleure reproductibilité des mesures sur le silicium poreux par rapport au silicium plan est expliquée par la cristallisation plus uniforme de la matrice HCCA sur ces substrats comme le montrent les observations MEB. À l'inverse, la mauvaise reproductibilité de la cristallisation de la matrice sur la monocouche de NH_3^+ sur le silicium plan mène à une mauvaise reproductibilité avec ce silane. À partir de ces résultats, le silane offrant le meilleur compromis entre un signal sur bruit élevé et une bonne reproductibilité est le silane CH_3 court sur du silicium poreux.

Pour finir, les limites de détection des métabolites détectés dans la solution multiplexée sont toutes inférieures à 1 $\mu\text{g/mL}$, exceptée celle de la valine, dont le S/N était déjà inférieur à celui des autres métabolites à 40 $\mu\text{g/mL}$. Le métabolite le mieux détecté avec cette méthode est le LysoPC dont la limite de détection est estimée à 0,5 ng/mL . Toutefois, pour trois métabolites (valine, phénylalanine, et LysoPC), un pic dû à la matrice à la même masse que la molécule empêche leur détection à des concentrations plus faibles.

Cette dernière observation est problématique dans le cas d'une étude des métabolites dans un contexte clinique, où les concentrations sont également faibles. Il serait donc intéressant de pouvoir travailler sans matrice, ce qui permettrait également de réduire le nombre d'étapes avant la mesure et ainsi de réduire les sources d'erreur et d'obtenir une meilleure reproductibilité. Ces limites nous obligent à trouver une autre méthode pour analyser ces métabolites. Il est par exemple possible d'utiliser une matrice organique qui serait plus adaptée à ce métabolite [237] mais avec le risque qu'elle ne permette pas de détecter les autres métabolites. Nous avons donc préféré utiliser une autre méthode de spectrométrie de masse : le DIOS, qui ne se base plus sur la matrice organique pour l'ionisation des analytes mais sur la nanostructuration de la surface, ce qui sera l'objet du Chapitre 5 et du Chapitre 6.

Étude en DIOS-MS - Détection du LysoPC

5.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié la détection de notre panel de métabolites en MALDI-MS. Nous avons montré que le silane CH_3 court associé à du silicium poreux et à la matrice HCCA permet de détecter le plus grand nombre de métabolites simultanément et avec une grande reproductibilité. Cependant, comme expliqué dans le Chapitre 4, l'utilisation d'une matrice organique limite le transfert de la méthode vers le domaine clinique. En conséquence, nous cherchons à développer une méthode DIOS-MS sans matrice pour la détection de notre panel de métabolites. Nous avons montré dans le chapitre précédent que le LysoPC est le métabolite qui ressort avec le plus de signal dans toutes les conditions testées. Ainsi, afin de développer notre méthode, nous nous sommes concentrés sur la détection DIOS-MS du LysoPC.

C'est l'objet de ce Chapitre 5, divisé en deux parties. Dans la première, qui est actuellement en *Peer-review* dans ACS Applied Materials & Interfaces, nous étudions les effets de deux silanes, CH_3 court et CH_3 long, non chargés et de longueur de chaîne alkyle différente, sur la détection du LysoPC en DIOS-MS en solution en mode RP et RN. Les résultats sont corrélés à la localisation du LysoPC dans ou hors des pores. Puis nous démontrons qu'il est possible de détecter le LysoPC directement dans du plasma en utilisant un substrat de silicium poreux fonctionnalisé par des silanes CH_3 court (Les informations supplémentaires de l'article sont données en Annexe C). Dans une seconde partie, nous présentons les résultats complémentaires à ceux publiés : les effets des silanes chargés NH_3^+ et COO^- sur la détection du LysoPC en solution et dans du plasma et l'influence du silicium poreux (porosité et profondeur) sur le signal.

5.2 Effects of Silane Monolayers on Lysophosphatidylcholine (LysoPC) Detection by Desorption Ionization on Silicon Mass Spectrometry (DIOS-MS) from Solution and Plasma.

5.2.1 Résumé

La spectrométrie de masse DIOS permet d'analyser efficacement les biomolécules de faible poids moléculaire. Cependant, la détection de métabolites biomarqueurs dans des fluides complexes comme le plasma est subordonnée à un pré-traitement de échantillons, ce qui limite les applications cliniques. Cet article s'intéresse au LysoPC, un phospholipide bien détecté en spectrométrie de masse en solution modèle. Nous étudions la détection du LysoPC en DIOS-MS sur deux monocouches de silane différentes : avec les silanes CH_3 court et CH_3 long, sur du silicium poreux. Dans un premier temps, nous mettons en relation les résultats obtenus en solution modèle avec la localisation des molécules de LysoPC en dehors ou à l'intérieur des pores et les propriétés physico-chimiques de la surface et des analytes. Ensuite, nous étudions la possibilité de détecter le LysoPC dans une goutte de plasma en DIOS-MS sans pré-traitement de l'échantillon sur un substrats de silicium poreux fonctionnalisé par les silanes CH_3 court.

La détection du LysoPC en DIOS-MS, en solution et dans du plasma, est possible principalement grâce aux fragments de la molécule. L'utilisation de silicium poreux est essentiel pour obtenir un signal. De plus, les substrats de silicium poreux modifiés chimiquement par des monocouches de silanes permettent une intensité plus grande que le silicium poreux non fonctionnalisé. En solution, le bruit de fond, est moins grand en mode RN qu'en RP, que ce soit sur les substrats fonctionnalisés ou non fonctionnalisés. De plus, en RN, les molécules de LysoPC en dehors des pores sont mieux détectés que celles à l'intérieur des pores. Au contraire, dans du plasma, le lavage de la surface après le dépôt du plasma est nécessaire pour la détection du LysoPC. En conséquence, seules les molécules de LysoPC piégées à l'intérieur des pores sont détectées en DIOS-MS. En effet, aucun signal n'est obtenu en utilisant du silicium poreux fonctionnalisé par des silanes avec de longues chaînes alkyles qui empêchent le LysoPC de pénétrer dans les pores, quel que soit le lavage testé. La monocouche de silanes CH_3 court en revanche est adaptée à la détection du LysoPC en mode RN et permet de détecter le LysoPC naturellement présent dans le plasma sans pré-traitement. Il permet également d'observer des variations de concentration dans le plasma quand le LysoPC est ajouté artificiellement, ou spiké, dans une solution de plasma. Ainsi, le silicium poreux fonctionnalisé par les silanes CH_3 court pourrait être prometteur pour le diagnostic du sepsis, une maladie inflammatoire caractérisée par une chute drastique des phospholipides sanguins, en quelques minutes, à partir d'une goutte de plasma. Plus de recherches sur l'effet des substrats (facilement commercialisable et peu cher) sur la détection en DIOS-MS d'autres métabolites sanguins biomarqueurs du sepsis pourrait permettre le développement d'une plate-forme pour le diagnostic clinique du sepsis.

5.2.2 Reproduction de l'article

Effects of Silane Monolayers on Lysophosphatidylcholine (LysoPC) Detection by Desorption Ionization on Silicon Mass Spectrometry (DIOS-MS) from Solution and Plasma

Antonin Lavigne¹, Benoît Gilquin², Thomas Géhin³, Vincent Jousseau², Marc Veillerot², Yann Chevolut³, Magali Phaner-Goutorbe¹, Christelle Yeromonahos¹

¹ Univ Lyon, École Centrale de Lyon, CNRS, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69134 Ecully Cedex, France ; ² Univ Grenoble Alpes, CEA, LETI, F-38000 Grenoble, France ; ³ Univ Lyon, CNRS, École Centrale de Lyon, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CPE Lyon, INL, UMR5270, 69134 Ecully Cedex, France

Abstract

Desorption ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS) enables the high throughput analysis of low molecular weight biomolecules. However, the detection of metabolites biomarkers from complex fluids, like plasma, is subordinated to sample pre-treatments which limit clinical applications. Herein, we show that porous silicon chemically modified using monolayers of n-propyldimethylmetoxysilane molecules, can be a good candidate for the fingerprinting of Lysophosphatidylcholine (LysoPC) in plasma, without any pre-treatment of the sample, for DIOS-MS-based diagnosis like sepsis diagnosis. Results are correlated to the location of LysoPC molecules inside/outside the pores, determined by time of flight - secondary ions mass spectrometry profiling, and to their physico-chemical properties.

Keywords: Desorption ionization on silicon mass spectrometry; Silane monolayer; Porous silicon; Lysophosphatidylcholine; Blood plasma; Time-of-flight secondary ion spectrometry; Sepsis

Introduction

Several metabolites, such as amino acids and fatty acids, are biomarkers of a large range of inflammatory diseases. Indeed their blood concentrations are highly correlated to the type and to the stage of the illness [5, 7, 8]. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-ToF MS), a soft ionization process, is widely used to detect and analyse high molecular weight species with a very high sensitivity, as low as few ng/mL [31, 35]. However, in the case of low molecular weight molecules, like metabolites, matrix peaks induce an important background noise that can interfere with the analyte peaks and limit their signal-to-noise (S/N) ratio. Moreover, to allow MALDI-ToF MS detection of metabolites from blood samples, long pre-treatment protocols of blood samples are required to remove abundant high molecular weight species. These limitations may induce artefacts and prevent the use of MALDI-ToF MS for the rapid detection of blood metabolites, as required for instance in the case of sepsis diagnosis.

In this context, a set of surface-assisted laser desorption ionization-MS (SALDI-MS) methods, which are matrix free strategies, has been developed [77]. These techniques use the nanos-

tructuration of the substrate to desorb and ionize analytes. Even though, for now, no consensus has been found on the exact mechanism involved [79], it is well established that the substrates need a strong absorbance in the UV region, a low heat capacity and a reduced thermal conductivity to allow the desorption and the ionization of the analytes [78]. Several type of nanostructured substrates, such as gold [146,238], silver [96,97] and alumina [88,97,238], have been used in SALDI-MS due to their optical properties. Carbon-based nanostructure [107,108] and silicon [116,122,123,131,139,140,145] have also been reported. Moreover, several types of nanoporous films, prepared on indium-tin oxide substrates, have recently been shown to enhance SALDI-MS analysis in plasma, without tedious sample pre-treatment. In particular, large-area, uniform, and stable covalent organic framework nanofilms (crystalline porous polymer) were demonstrated to enable the SALDI-MS detection of 5-fluorouracil (130 Da) in mouse plasma, at a concentration as low as 100 pg/mL [239]. Also, metal-organic framework nanofilms were shown to allow for distinguishing patients with cardiovascular diseases from healthy controls thanks to enhanced serum metabolic profiling [240]. Finally, functionalized metal-organic frameworks have been developed, leading to improved LDI process attributed in part to the presence of carboxyl- and hydroxyl- functional groups [241].

Desorption Ionization On Silicon-MS (DIOS-MS), first introduced by Wei *et al.* [115], is one of these technics using the porosity of porous silicon substrate for the ionization of the analytes, decreasing drastically the background noise in the metabolite mass range (0-1000 Da) compared to MALDI-ToF MS. Also, by tuning the size of the pores, it is possible to sterically exclude high molecular weight species from the sample, avoiding long pre-treatment protocols [128, 149]. This would, for instance, prevent the need for several solvents for the extraction of high molecular weight molecules [170,242] or the labelling of the analytes of interest with more easily ionisable molecules [242] for human sample analysis. So, DIOS-MS seems to be promising for the metabolite detection in a clinical diagnosis context.

Silane molecules are widely used to functionalize the surface of bio-analytical devices [6, 54, 226–228]. In addition, silane monolayers allow to prevent from uncontrolled oxidation porous silicon surfaces and allow to improve the DIOS-MS limit of detection (LoD) of specific metabolites [111]. For instance, amino-silane monolayers, with hydrophilic head groups, were shown to be well suited for the specific detection of hydrophilic molecules, whereas hydrophobic monolayers were shown to improve the detection of any molecules whatever their hydrophobicity [131]. Also, Guinan *et al.* have shown that tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrooctyldimethylchlorosilane (F13) onto porous silicon enhances the detection of cocaine and methadone from water, down to 100ng/mL [139]. Moreover, scarce studies have shown that silanized porous silicon surfaces enable the detection of specific metabolites from complex human fluids, without any pre-treatments of the sample: a drop of fluid is deposited on the silanized porous silicon surface, high molecular weight species are washed from the surface with solvent, and then metabolites are analysed by DIOS-MS. In particular, Alhmod *et al.* have shown, using this protocol, that porous silicon surfaces functionalized with F13 allow methadone detection from saliva, urine, and plasma for patients treated with this drug [152]. Consequently, it is hypothesized that porous silicon substrates functionalized with silane monolayers provide a better selective metabolite adsorption, desorption, and/or ionization. Nevertheless, to the best of our knowledge, metabolites trapping

inside the pores of bare and silanized silicon substrates has never been demonstrated, and the effects of metabolite trapping on DIOS-MS analysis have never been investigated. In addition, there is only one previous DIOS-MS study, the one of Alhmould *et al.*, which has shown the possibility to detect a specific metabolite from plasma without any pre-treatment of the sample. Lysophosphatidylcholine (LysoPC) is a biomarker for most of inflammatory diseases that is very well detected by mass spectrometry in model solutions [5,11]. The present study investigates the effects of two different silane monolayers on the LysoPC trapping inside porous silicon substrates, and on its detection by DIOS-MS in solution and in plasma. The two silane molecules studied are n-propyldimethylmetoxysilane (named CH₃ short in this study) and octadecyldimethylmetoxysilane (named CH₃ long) (Table 5.1). Those silane molecules are monovalent, they have different alkyl chain lengths, and they were self-assembled in monolayers on porous silicon surfaces (pores of 10 nm in diameter and 1 μm in depth). The effects of the silane monolayers, and of the bare silicon substrate, on the LysoPC detection from solution, were correlated both to the chemical properties of LysoPC and to its location inside/outside the pores. Then, the possibility of detecting LysoPC, by DIOS-MS, from a drop of plasma, using silanized porous silicon substrate without any pre-treatment of the sample, is demonstrated.

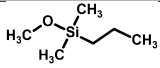
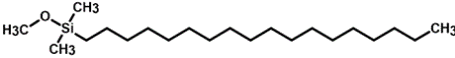
Silane name	Structural formula
CH ₃ short	
CH ₃ long	

Table 5.1 – Developed formula of the silane molecules used in this study

Materials and methods

Chemical and Reagents. Porous silicon substrates were purchased from SiLiMiXT (Tours, France). Pores (10 nm in diameter and 1 μm in depth) were obtained through electrochemical etching of silicon substrates (150 mm in diameter, type P, 10-20 mOhms.cm, and 508 μm in thickness). Porous silicon substrates were purchased from SiLiMiXT (Tours, France). Pores were obtained through electrochemical etching of silicon substrates (150 mm in diameter, type P, 10-20 mOhms.cm, and 508 μm in thickness). For all the DIOS-MS analysis, pore dimensions were 10 nm in diameter and 1 μm in depth. The size of the pores was chosen to allow the sterical exclusion of high molecular weight species present in plasma without using any pre-treatment of samples, while maximizing the absorption of the substrate at the laser wavelength (355 nm) and minimizing its thermal conductivity, for optimizing DIOS-MS signal. Bouamrani *et al.* have shown that pore diameters below 10 nm are required to prevent the detection, by MALDI-MS, of high molecular weight species from plasma [128]. Moreover, Alvarez *et al.* have investigated the thermal conductivity of porous silicon substrates, with pore diameters in the range 2 nm – 200 nm and porosity in the range 40 % - 89 %, and they have demonstrated that diameters of 10 nm and porosity of 89 % lead to the lowest thermal conductivity [118]. Also, Jemere *et al.* have proven that the UV absorption of porous silicon substrate increases with pore depth,

up to 500 μm and then remains constant [122]. In addition, we have investigated (Supplement Information) the impact of pore depth (300 nm, 1 μm , and 2 μm) on LysoPC detection by DIOS-MS in blood plasma spiked with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LysoPC. Our results have shown that pores of 1 μm and 2 μm increase the intensity of LysoPC signal, in comparison with the pores of 300 nm in depth (Figure C.1). Consequently, taking into account technological constraints, we have chosen pores of 10 nm in diameter, 1 μm in depth, and a porosity of 60 %. The thickness of the studied silane monolayer was estimated to be around 0.5 nm (in the case of the CH₃ short monolayer), and around 1.6 nm (in the case of the CH₃ long monolayer), from molecular dynamics simulations [6]. Thus, the effective pore diameters of the different silicon substrate studied should be 10 nm, 9.0 nm, and 6.8 nm (bare silicon, CH₃ short monolayer, CH₃ long monolayer respectively). For ToF-SIMS analysis, pores of 10 nm in diameter and 300 nm in depth were used, as specified in the discussion.

The silane molecules were purchased from ABCR (Karlsruhe, Germany). LysoPC molecules were obtained from Avanti Polar Lipid (reference #855775P). The solvents (tetrahydrofuran 99 % (THF), methanol, ethanol and chloroform) and the plasma (reference #P9523-1ml) were obtained from Sigma-Aldrich.

Gas Phase Chemical Surface Functionalization. The porous silicon substrates were cleaned by ozone/ultraviolet treatment at room temperature under an oxygen flow for 30 minutes. Next, the substrates were placed in a vacuum chamber at 150°C for 30 minutes and then allowed to cool at room temperature under nitrogen atmosphere. 100 μL of silane were injected in the reaction chamber and put under vacuum while the temperature was gradually increased to 150°C. After one hour of silanisation, the chamber was pumped for 15 minutes, then the substrates were allowed to cool under nitrogen atmosphere until room temperature was reached. Finally, the samples were washed for 10 minutes in THF and 10 minutes in ultrapure water.

LysoPC preparation. For LysoPC detection in solution, LysoPC was dissolved in a solution of chloroform/methanol (2:1 v/v) at 1 mg/mL. For LysoPC detection in plasma, LysoPC was spiked in plasma at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Spiked plasma was prepared from a solution of LysoPC at 10 mg/mL in chloroform/methanol (2:1 v/v).

DIOS-MS Analysis. DIOS mass spectra were obtained using an UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) equipped with a laser (355 nm). The silicon substrates were held on a modified MALDI target plate using copper tape. Ions were detected in reflectron positive (RP) or reflectron negative (RN) ion mode at ± 20 kV accelerating potential. The laser was set on the large size with a grid voltage of 100 % for RP and RN ion modes. The m/z range was 10-800 Da. A 1 μL droplet of the solution, or of the spiked plasma, was deposited on the surface for 1 min. In the case of the plasma samples, the surface was washed with water, one minute after plasma deposition. The washing was done by pipetting 5 μL of ultrapure water on the surface. Surface imaging was performed using the FlexImaging 3.0 software (Bruker Daltonics) with a spatial resolution of 200 μm (40 spots per droplet in solution and 100 spots per droplet in plasma). For each spot, 500-satisfactory laser shots were averaged to obtain a mass spectrum.

The spectra were analysed using the FlexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics) for peaks detection. The mass spectra of each spot are averaged to determine the peak intensities. To evaluate the error bars, spots are randomly divided in two sets, and mass spectra are averaged inside each set. The difference in peak intensity between the two half sets of data corresponds to the error bars.

Time of flight - secondary ions mass spectrometry (ToF-SIMS) profiling. High resolution mass depth profiles were acquired by ToF-SIMS (ToF-SIMS V from ION-TOF). A bunched Bi^{3+} ion gun operation at 15 keV was used as the primary probe for analysis (rastered area $80 \times 80 \mu\text{m}^2$). For depth profiling, sputtering was performed using Cs^+ ions at low energy (500 eV, rastered area $400 \times 400 \mu\text{m}^2$). Spectra were normalized using the intensity of the $^{30}\text{Si}^-$ ions in the silicon bulk region.

Results and Discussions

LysoPC detection in solution LysoPC was firstly studied alone in solution, to identify its m/z characteristic peaks in DIOS-MS, and to investigate the effects of silane monolayers on its detection. Firstly, in the absence of matrix, no signal was obtained using non porous substrates (bare silicon, silanized silicon or even the classical stainless steel MALDI target plate).

The spectra obtained in RP ion mode, using the two silanized porous surfaces and the bare porous silicon surface, are presented in Figure 5.1. The relative intensities for each fragment peak are presented in Table 5.2. Only a slight peak is detected at $[\text{M}+\text{H}]^+$ (524.3 m/z). The main peaks observed correspond to fragments of the molecule at 86.0 m/z , 104.0 m/z , 184.1 m/z , and 198.2 m/z . They are representative of $(\text{CH}_3)_3\text{N}-\text{CH}=\text{CH}_2$, choline, phosphocholine, and a phosphocholine-related ion (phosphocholine + CH_2) respectively [230]. The main fragment is the one at 86.0 m/z , whatever the surface studied. The silanized surfaces lead to higher intensities, for each fragment peak, than the bare silicon surface. Moreover, the highest intensities are mainly obtained in the case of the CH_3 short monolayer. Indeed the relative intensities for the peaks at 86.0 m/z , 104.0 m/z , 184.1 m/z , and 198.2 m/z are 1, 0.31, 0.18, 0.12 respectively (in the case of the CH_3 short monolayer), 0.77, 0.24, 0.07, 0.17 respectively (in the case of the CH_3 long monolayer), and 0.46, 0.12, 0.17, 0.04 respectively (in the case of the bare silicon substrate).

To explain these results, the location of LysoPC, inside/outside the pores of the three different substrates, was investigated by depth profiling ToF-SIMS analysis of the P^- ion (characteristic of LysoPC, 30.9682 amu) along the pores. Our ToF-SIMS spectra (Figure 5.2) demonstrate a significant intensity of P^- ions issued from inside the pores of the bare silicon substrate (1 μm in depth) and CH_3 short monolayer functionalized porous silicon (300 nm in depth). In the case of the CH_3 long monolayer modified porous silicon (300 nm in depth), the P^- ion intensity was higher at the top surface rather than inside the pores. These results suggest that the trapping of LysoPC inside the pores improves the effective local and direct ionization of LysoPC molecules, leading to fragment peaks with high intensity in DIOS-MS analysis. In the case of silicon substrates functionalized with long alkyl chains silane, LysoPC molecules remain outside the pores and are likely indirectly ionized thanks to the transfer of the laser energy accumulated

inside the pores. Indeed, electron transfer was recently shown to be a fundamental ionization pathway in laser desorption ionization [243]. In particular, some previous studies, based on finite difference time domain (FDTD) have shown that photoexcited electrons escape from the tips of silicon nanowires, improving the ionization yield of analytes near the tips [153]. Thus, such a process might occur with porous silicon substrates, contributing to indirect ionization of LysoPC molecules outside the pores, in addition to other processes such as laser-induced heating and charge transfer. So, even if the laser energy transfer to the surface is sufficient to get a signal, a higher signal is obtained through local ionization when the molecules are trapped inside the pores. Also, LysoPC is a highly hydrophobic zwitterionic molecule containing two functional groups that are charged at pH 7 (a quaternary ammonium positively charged and a phosphate negatively charged in the phosphocholine side of the molecule), as shown in Figure 5.3. Consequently, it seems reasonable to assume that the positively charged groups of LysoPC will be more easily fragmented when LysoPC is adsorbed on the CH₃ short monolayer than on the negatively charged bare silicon surface, explaining the lower intensity of fragment peaks on the bare silicon surface than on CH₃ short modified porous silicon. On the contrary to fragment peaks, the peak at [M+H]⁺ has a higher intensity on the CH₃ long monolayer and on the bare silicon surface than on the CH₃ short monolayer. This result could be explained by an improved desorption of the entire LysoPC molecules outside the pores of hydrophobic substrates (case of CH₃ long monolayer), as well as from the pores of hydrophilic surfaces (case of bare silicon surface), than from the pores of hydrophobic substrates (case of CH₃ short monolayer).

In RN ion mode, depicted in Figure 5.4, no peak is detected at [M-H]⁻ (522.3 m/z). However, several fragments are visible, mainly at 79.0 m/z, 123.1 m/z, 153.1 m/z, and 283.6 m/z. Their relative intensities are presented in Table 5.2. Those peaks correspond to the PO₃⁻, O₃P(CH₂)₂O⁻, CH₃CH(OH)CH₂PH₂O₄⁻, and CH₃(CH₂)₁₆COO⁻ fragments respectively [244]. The intensity of these fragments is higher on the CH₃ long monolayer than on the CH₃ short monolayer and on the bare silicon surface. Indeed, the relative intensities of the peaks at 79.0 m/z, 123.1 m/z, 153.1 m/z, and 283.6 m/z are 0.28, 0.02, 0.03, 0.01 respectively (in the case of the CH₃ short monolayer), 0.61, 0.08, 0.24, 0.38 respectively (in the case of the CH₃ long monolayer), and 0.34, 0.07, 0.04, 0.02 respectively (in the case of the bare silicon substrate). These results suggest that LysoPC trapping inside the pores strongly decreases the detection signal. Thus, it could be more difficult to extract the negatively charged fragments from the pores than the positively charged fragments. Moreover, the larger the fragments, the more difficult it will be to extract them. Indeed, the largest fragment (at 283.6 m/z) is poorly detected on the CH₃ short monolayer (relative intensity 0.01) and on the bare silicon surface (relative intensity 0.02), while the smallest fragment (at 79.0 m/z) is detected (relative intensities 0.28 and 0.34 on CH₃ short and on the bare silicon substrate respectively), and the intermediate fragments (at 123.1 m/z and 153.1 m/z) are slightly detected (relative intensities 0.02 and 0.03 respectively on CH₃ short and 0.07 and 0.04 respectively on the bare silicon substrate).

Consequently, for the detection of LysoPC from a model solution, the CH₃ short and the CH₃ long monolayers are more promising than the bare silicon surface, since these monolayers lead to the highest fragment peak intensities (in RP and RN ion mode respectively). Moreover, in model solution, the RP ion mode should be privileged since it allows the detection of LysoPC

at $[M+H]^+$ contrary to the RN ion mode. However, the RN ion mode allow to decrease the background signal in comparison to the RP ion mode. Consequently, in the following, the RN ion mode was used to investigate the effect of silane monolayers on the detection of LysoPC in plasma.

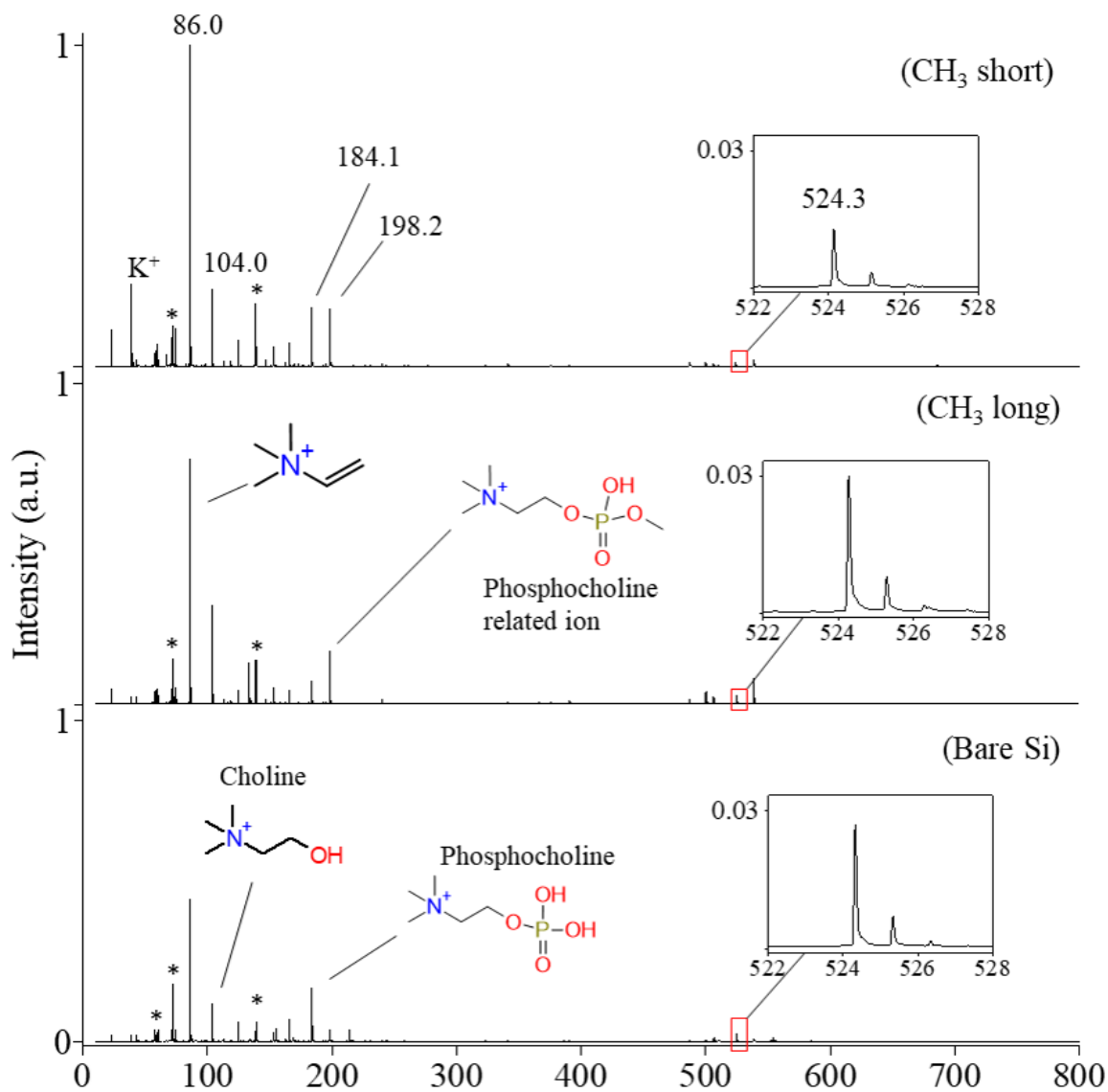


Figure 5.1 – DIOS mass spectra of LysoPC in RP ion mode, alone in solution at 1 mg/mL using the CH₃ short and the CH₃ long monolayers on porous silicon substrates and on the bare porous silicon substrate. The peak of LysoPC is detected at 524.3 m/z and the main fragments (86.0 m/z, 104.0 m/z, 184.1 m/z, and 198.2 m/z) are presented. Peaks corresponding to the substrates are indicated by stars (*). The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.3 and C.5). Total ion current (TIC) normalization is used.

m/z	RP ion mode					RN ion mode			
	86.0	104.0	184.1	198.2	524.3	79.0	123.1	153.1	283.6
CH ₃ court	1	0.31	0.18	0.12	0.01	0.28	0.02	0.03	0.01
CH ₃ short	0.77	0.24	0.07	0.17	0.03	0.61	0.08	0.24	0.38
Bare silicon	0.46	0.12	0.17	0.04	0.02	0.34	0.07	0.04	0.02

Table 5.2 – Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, in RP and RN ion modes, in solution, for the different surfaces studied. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data).

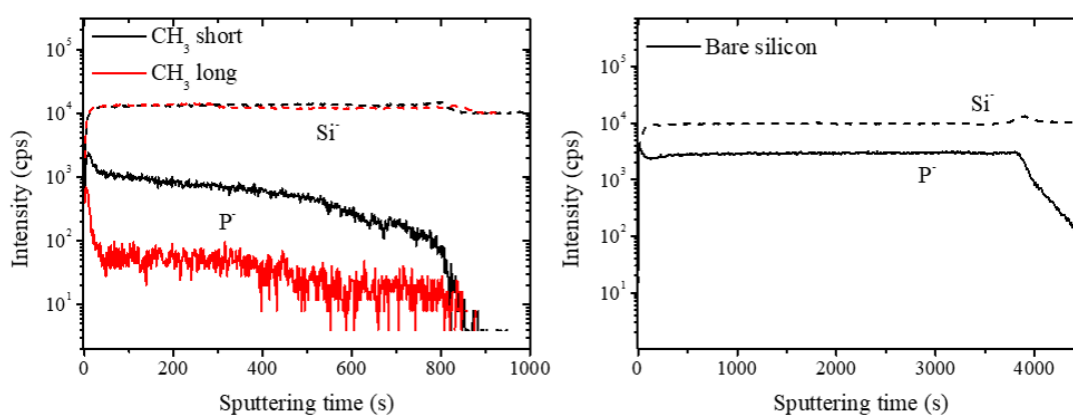


Figure 5.2 – Depth profiling of Si⁻ and P⁻ ions by ToF-SIMS on porous silicon (300 nm in pore depth) functionalized by CH₃ short and CH₃ long silane monolayers (left), and on bare porous silicon (1 μm in pore depth) (right). P⁻ ions (30.9682 amu) are specific to the LysoPC molecule. ³⁰Si⁻ in Si bulk is used for normalization.

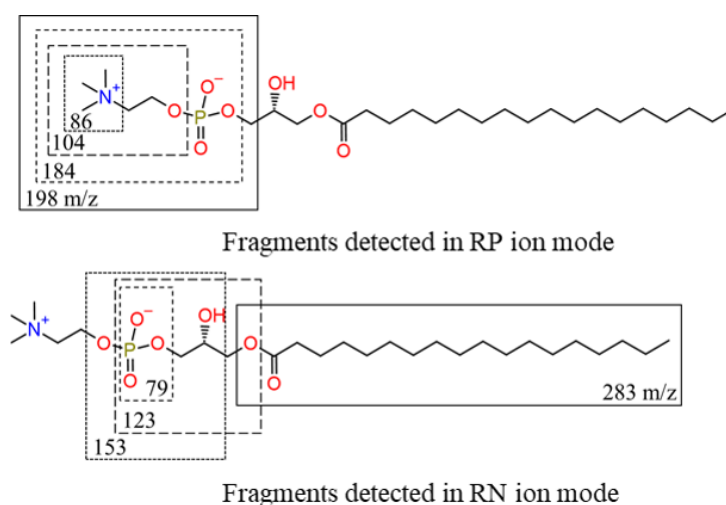


Figure 5.3 – Location of the positively and negatively charged fragments of LysoPC detected in RP and RN ion mode in DIOS-MS.

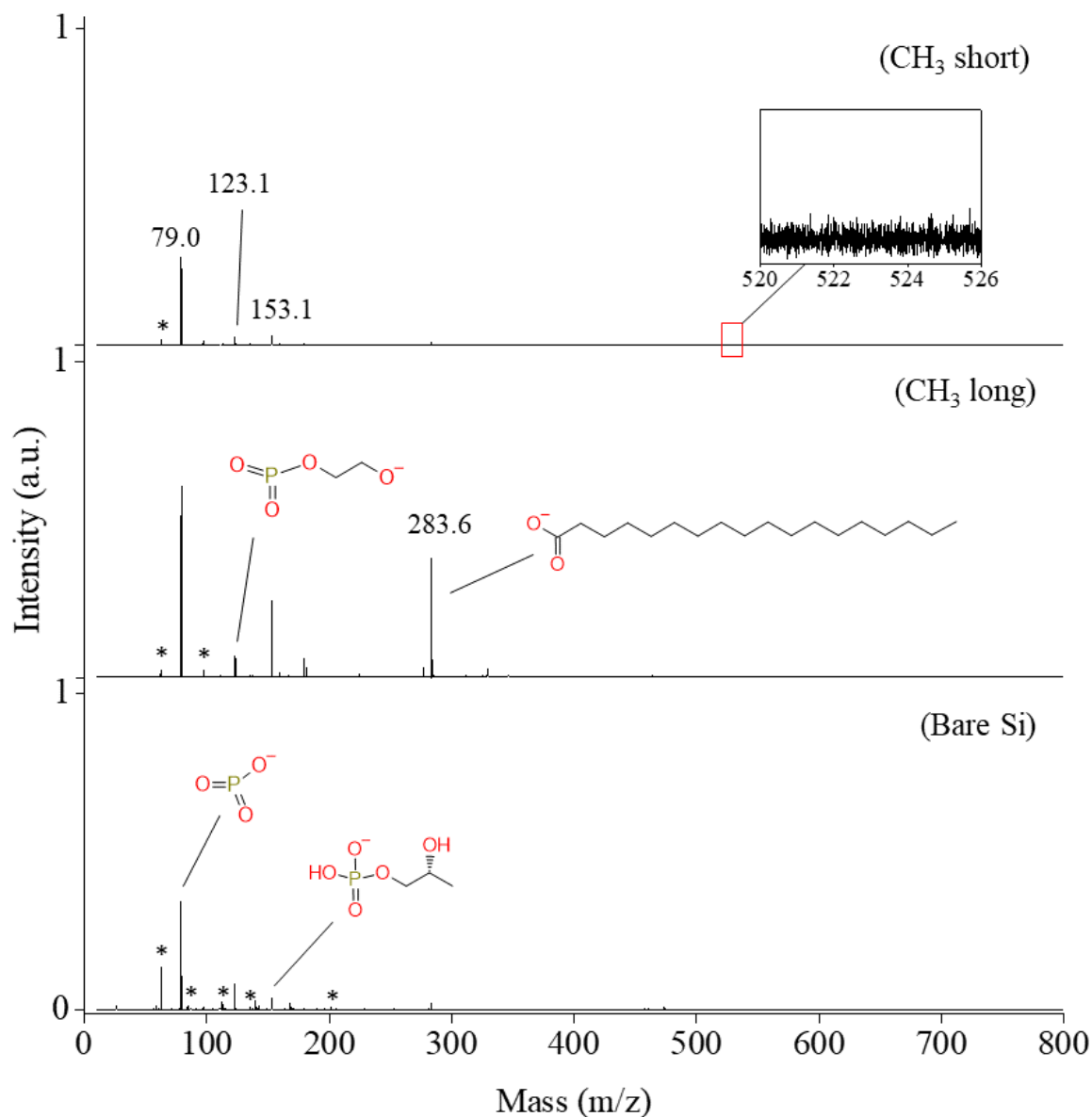


Figure 5.4 – DIOS mass spectra of LysoPC in RN ion mode, alone in solution at 1 mg/mL using the CH₃ short and CH₃ long monolayers on porous silicon substrate and on bare porous silicon substrate. The main fragments (79.0 m/z, 123.1 m/z, 153.1 m/z and 283.6 m/z) are presented. There is no peak of LysoPC at [M-H]⁻ (522.3 m/z). Peaks corresponding to the substrates are indicated by stars (*). The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.4 and C.5). TIC normalization is used.

The Limit of Detection (LoD) of LysoPC was studied on the porous silicon substrate functionalized with the CH₃ short monolayer, in RP ion mode. The concentration of LysoPC was varied from 40 µg/mL to 0.5 ng/mL. The [M+H]⁺ peak and the peak at 86.0 m/z were studied. For the latter, a LoD at 0.5 ng/mL (Figure C.2a) was obtained while the [M+H]⁺ peak is detected until 160 ng/mL (Figure C.2b). This result is in line with the higher signal intensity obtained for the peak at 86.0 m/z than for the [M+H]⁺ peak, at 1 mg/mL of LysoPC in solution (Table 5.2). A similar LoD, 200 ng/mL, for the [M+H]⁺ peak of LysoPC has recently been reported using Black-Phosphorous Assisted Laser Desorption-Ionization (BPALDI) MS, while LoD of 500 ng/mL have been reported by using MALDI-MS analysis with DHB and CHCA matrices [245].

LysoPC detection from Blood Plasma LysoPC is present in plasma under physiological conditions at 26 µg/mL [20]. To assess its DIOS-MS detection, 50 µg/mL and 500 µg/mL of LysoPC were spiked in plasma, and mass spectra of the spiked plasma were compared to the ones of the unmodified plasma. It ensures that the panel of fragments analysed is related to the ones of LysoPC.

Spiked plasma was firstly investigated in RN ion mode, since this mode is expected to yield a lower signal background than the RP ion mode. It should be noted that, after plasma deposition, no peak was detected (Figure C.6) if the samples were to be analysed as deposited. Several washing protocols were evaluated on the CH₃ short monolayer surface: one, three, and ten water droplets (5 µL) were pipetted one time on the surface (1x1, 3x1, 10x1 protocols) ; two, three, and five water droplets (5 µL) were pipetted five times on the surface (2x5, 3x5, 5x5 protocols) ; and five water droplets (5 µL) were pipetted two times on the surface (5x2 protocol). The normalized intensity of each fragment peak obtained in RN ion mode, for the different washing protocols are presented in Figures C.6, C.7 and C.8. The 5x5 protocol seems to be the best compromise when considering the intensity improvement of the four fragments. Mass spectra of the spiked plasma on the three different surfaces studied in the RN ion mode, by using the 5x5 washing protocol, are presented Figure 5.5. The relative intensities for each fragment peak are presented in Table 5.3. For all surfaces, no peaks are detected above 300 m/z. Moreover, the CH₃ short monolayer leads to the highest intensity for most of the LysoPC fragments (the relative intensities of the peaks at 79.0 m/z and 123.1 m/z are $2.46 * 10^{-2}$ and $2.50 * 10^{-3}$ respectively on CH₃ short, and $3.28 * 10^{-3}$ and $1.80 * 10^{-3}$ respectively on the bare silicon substrate), except the one at 153.1 m/z that has a slightly higher intensity on the bare porous silicon ($1.52 * 10^{-2}$ on CH₃ short and $2.13 * 10^{-2}$ on the bare silicon substrate). No significant peak was observed on the CH₃ long monolayer. The absence of signal on the CH₃ long monolayer could be explained by the removal of LysoPC molecules, which are mainly outside the pores, during the water washing (using the 5x5 protocol as well as any other protocol). In the case of the CH₃ short monolayer and of the bare silicon surface, LysoPC molecules trapped into the pores are protected from washing. Indeed, ToF-SIMS profiling analysis have shown that the presence of P⁻ ions along the pores is not impacted by water washing (Figure C.9). Figure 5.6 presents the peaks of LysoPC fragments detected in RN ion mode, in plasma with and without spiking of LysoPC (spiking at 50 µg/mL and at 500 µg/mL) on the CH₃ short monolayer, by using the 5x5 washing protocol. Same fragments of LysoPC are detected in the spiked plasma as in the unmodified plasma, with

higher intensity in the spiked plasma. Indeed, the relative intensities of the peaks at 79.0 m/z, 123.1 m/z, and 153.1 m/z are $8.00 * 10^{-2}$, $1.61 * 10^{-2}$, $6.59 * 10^{-2}$ respectively in the 500 $\mu\text{g/mL}$ spiked plasma, $2.46 * 10^{-2}$, $2.50 * 10^{-3}$, $1.52 * 10^{-2}$ respectively in the 50 $\mu\text{g/mL}$ spiked plasma, and $1.13 * 10^{-2}$, $1.67 * 10^{-2}$, $8.61 * 10^{-2}$ respectively in the unmodified plasma (Table 5.4). These results demonstrate the possibility to detect LysoPC in the unmodified plasma sample, by using the CH_3 short monolayer, in RN ion mode. Also, as demonstrated in Figure 5.5, no significant peak is observed above 300 m/z and adducts are not detected. Nevertheless, a fragment peak attributed to the silane molecules is observed, with high relative intensity ($5.00 * 10^{-2}$ on CH_3 short, and $3.30 * 10^{-2}$ on the bare silicon substrate). In the context of clinical diagnosis, it could be relevant to maximize the number of LysoPC fragments analysed (for sensitivity optimization). Consequently, the possibility to detect LysoPC in RP ion mode using the CH_3 short monolayer was investigated. Mass spectra of the unmodified plasma on the CH_3 short monolayer in the RP ion mode, by using the 5x5 washing protocol, is presented Figure 5.7. The 86.0 m/z and the 184.1 m/z fragments are detected (relative intensities $1.93 * 10^{-2}$ and $9.88 * 10^{-3}$ respectively as shown in Table 5.4). Also, no signal is obtained above 300 m/z, adducts and substrates are not detected.

RN ion mode - spiked plasma (50 $\mu\text{g/mL}$)				
m/z	79.0	123.1	153.1	283.6
CH_3 court	$2.46 * 10^{-2}$	$2.50 * 10^{-3}$	$1.52 * 10^{-2}$	-
CH_3 short	-	-	-	-
Bare silicon	$3.28 * 10^{-3}$	$1.80 * 10^{-3}$	$2.13 * 10^{-2}$	-

Table 5.3 – Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, in RN ion mode, in spiked plasma (50 $\mu\text{g/mL}$), for the different surfaces studied. No peaks are detected by using CH_3 long, and no peaks are detected at 283.6 m/z. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data). (Spectra are in Figure 5.5)

CH_3 short				
m/z	79.0	123.1	153.1	283.6
RN ion mode - unmodified plasma	$1.13 * 10^{-2}$	$1.67 * 10^{-3}$	$8.61 * 10^{-3}$	-
RN ion mode - spiked plasma (50 $\mu\text{g/mL}$)	$2.46 * 10^{-2}$	$2.50 * 10^{-3}$	$1.52 * 10^{-2}$	-
RN ion mode - spiked plasma (500 $\mu\text{g/mL}$)	$8.00 * 10^{-2}$	$1.61 * 10^{-2}$	$6.59 * 10^{-2}$	-
m/z	86.0	104.0	184.1	198.2
RP ion mode - unmodified plasma	$1.93 * 10^{-2}$	-	$9.88 * 10^{-3}$	-

Table 5.4 – Relative intensities of the LysoPC fragment peaks, for the CH_3 short monolayer, in RN ion mode in unmodified plasma, in spiked plasma at 50 $\mu\text{g/mL}$, in spiked plasma at 500 $\mu\text{g/mL}$, and in RP ion mode in unmodified plasma. No peaks are detected at 283.6 m/z in RN ion mode, and no peaks are detected at 104.0 m/z and at 198.2 m/z in RP ion mode. Error bars are below 10 % (calculated from two half sets of data). (Spectra are in Figures 5.5-5.7)

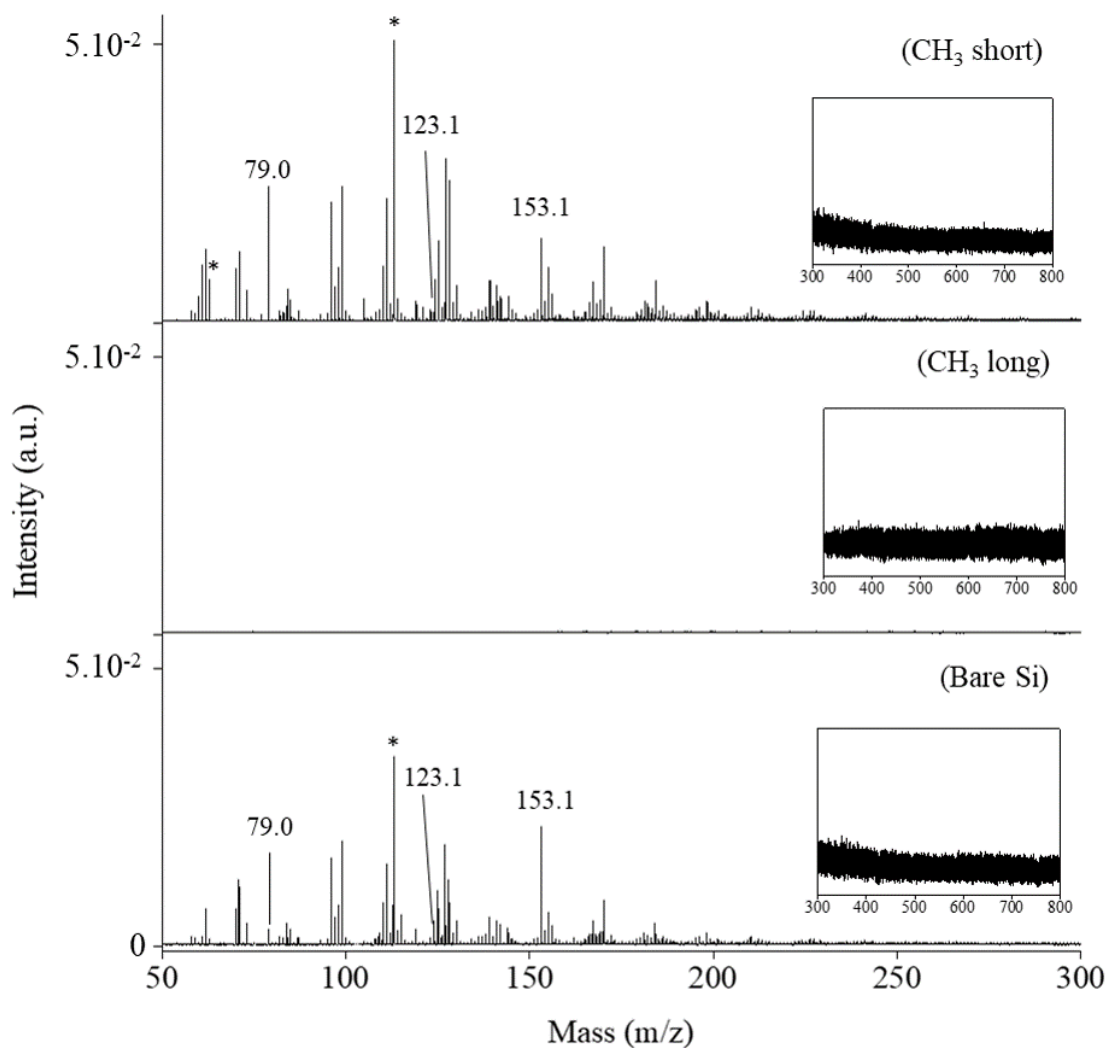


Figure 5.5 – DIOS mass spectra in RN ion mode of plasma spiked with LysoPC (at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the CH₃ short and the CH₃ long monolayers, and on the bare silicon. Fragments of LysoPC are indicated (at 79.0, 123.1 and 153.1 m/z). Stars (*) indicate peaks related to the surface. No peaks are observed above 300 m/z. The 5x5 washing protocol is used. The reference mass spectra of the different surfaces studied, and of the chloroform/methanol solution, without LysoPC, are presented in Supplement Information (Figures C.4 and C.5). TIC normalization is used.

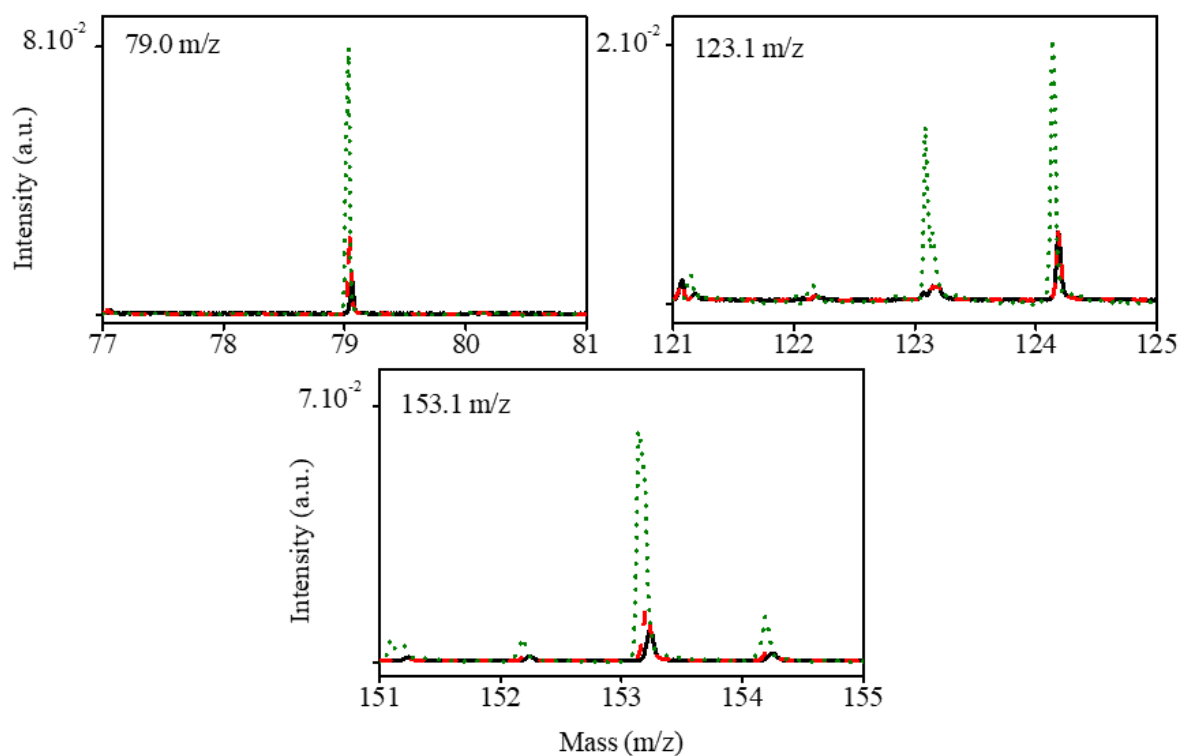


Figure 5.6 – DIOS mass spectra in RN ion mode on the CH_3 short monolayer at (a) 79.0 m/z, (b) 123.1 m/z, and (c) 153.1 m/z, corresponding to fragments of LysoPC. Black solid line corresponds to unmodified plasma, the red long dashed line to the spiked plasma at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the green short dashed line to the spiked plasma at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The 5x5 washing protocol is used. TIC normalization is used.

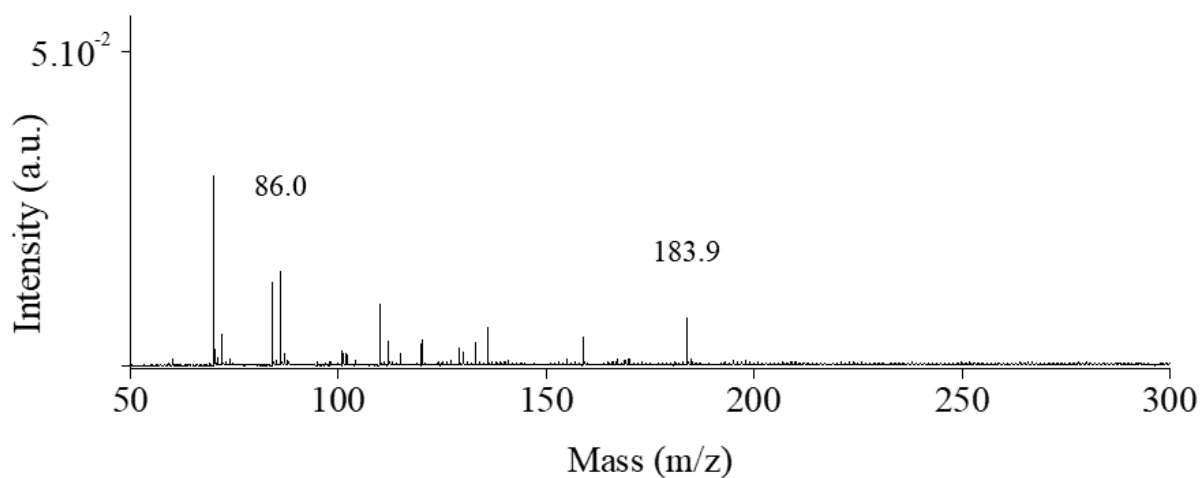


Figure 5.7 – DIOS mass spectra of unmodified plasma on the CH_3 short silane monolayer in RP ion mode. No peaks corresponding to the substrate are detected. TIC normalization is used.

Finally, the efficiencies of DIOS-MS and MALDI-MS analysis for LysoPC detection from unmodified plasma samples were compared. The CHCA matrix, in RP ion mode, was chosen, among five different organic matrices (CHCA, DHB, NEDC, THAP, 9AA), for its ability to simultaneously ionize, the largest range of sepsis metabolite biomarkers (Chapter 4). Results show that, whatever the substrate studied (bare or silanized porous silicon substrates), LysoPC in unmodified plasma samples, is not detected at $[M+H]^+$ neither by MALDI-MS nor by DIOS-MS. Nevertheless, DIOS-MS analysis on CH_3 short monolayer allow the detection, in unmodified plasma samples, of three LysoPC fragments (with a S/N value above 3), while MALDI-MS on CH_3 short monolayer leads to the detection of only one fragment (Table C.1). In addition, the S/N values obtained in DIOS-MS (S/N = 9.1 at 79.0 m/z, S/N = 23.9 at 123.1m/z, and S/N = 20.0 at 153.1m/z) are higher than the value obtained in MALDI-MS (S/N = 7.5 at 86.0m/z), and the spot-to-spot repeatability of the S/N values is also better in DIOS-MS (44 %, 32 %, and 43 % at 79m/z, 123m/z, and 153m/z) than in MALDI-MS (46 % at 86.0m/z).

These results demonstrate the possibility to detect LysoPC in the unmodified plasma sample, by using the CH_3 short monolayer, both in RP and in RN ion modes. This method might be used to detect the drastic decrease in phospholipids concentration in case of sepsis diagnosis.

Conclusion

The DIOS-MS detection of LysoPC, both in solution and in plasma, is demonstrated through the analysis of LysoPC fragments. Also, porous silicon substrates chemically modified by silane monolayers lead to higher signal intensity, up to one order of magnitude, than bare porous silicon substrates. Indeed, the CH_3 short monolayer, in RN ion mode, enables to increase the intensity of the DIOS-MS signal of LysoPC fragments up to 19 times in solution (19 times at 283.6 m/z and 6 times at 153.1 m/z), and up to 7.5 times, in blood plasma at 79.0 m/z.

In solution, the signal background, is shown to be lower in RN ion mode than in RP ion mode, both by using chemically functionalized substrates and bare silicon substrates. Moreover, in RN ion mode LysoPC molecules outside the pores are better detected than the ones trapped inside the pores.

On the contrary, in plasma, water washing of the surface, after plasma deposition, is required for LysoPC detection. Consequently, only LysoPC molecules trapped inside the pores are detected by DIOS-MS in plasma. Indeed, no signal is obtained by using plane silicon surfaces, or porous surfaces functionalized with long alkyl chain silane monolayers which prevent LysoPC trapping inside the pores, whatever the washing protocols used. The CH_3 short monolayer is demonstrated to be well suited for the detection, in RN ion mode, of LysoPC molecules which are physiologically present in unmodified plasma samples. In addition, this monolayer allows the detection of LysoPC fragments also in RP ion mode. Moreover, the detection does not require any pre-treatment of plasma samples. Thus, porous silicon surfaces functionalized with CH_3 short monolayer could be highly promising for clinical diagnosis of sepsis, an inflammatory disease partly characterized by a drastic decrease in blood phospholipids, in few minutes, from a drop of plasma. Further investigations of the effect of the different substrates (and in particular of monolayers of silane molecules with carboxyl head-groups [241]), easily marketable at low

cost and high throughput, on the DIOS-MS detection of the others blood metabolites specific for sepsis, could lead to the development of a platform for clinical diagnosis of sepsis.

5.3 Résultats complémentaires à l'article

5.3.1 Influence des propriétés des pores

En DIOS-MS, les caractéristiques des pores sont le premier paramètre à prendre en compte pour optimiser la détection des analytes. L'ajustement de leur profondeur, de leur diamètre et/ou de la porosité du matériau est nécessaire pour des analyses. Dans la suite, nous étudions l'effet de la porosité et de la profondeur. L'effet du diamètre a déjà été étudié dans la littérature et les études convergent vers un diamètre de 10 nm, diamètre que nous avons choisi pour nos échantillons [71, 72]. Dans cette section, les résultats en RN ne sont pas montrés mais les conclusions sont identiques au mode RP. Pour commencer, nous montrons l'importance des pores sur la détection des métabolites en DIOS-MS.

5.3.1.a DIOS-MS sur des échantillons de silicium plan

Pour évaluer la nécessité des pores, nous avons commencé par déposer une goutte de LysoPC à 1 mg/mL sur des échantillons de silicium plan fonctionnalisés par des silanes CH_3 court que nous avons comparés à des échantillons poreux. Sur le spectre présenté en Figure 5.8, le LysoPC est bien identifié grâce à ses fragments et également grâce à son pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ visible sur le silicium poreux. En revanche, sur le silicium plan, les seuls pics visibles ne correspondent à aucun pic spécifique du LysoPC mais uniquement à la surface. La présence des pores est donc nécessaire pour une analyse en DIOS-MS.

5.3.1.b Influence de la porosité

Pour étudier l'influence de la porosité du silicium, nous avons comparé les échantillons élaborés au laboratoire et présentés à la page 62 (avec une profondeur de 1 μm et une porosité de 35 %) avec les substrats utilisés en général (avec une profondeur de 1 μm et une porosité de 60 %). Le LysoPC a été déposé sur les deux substrats à une concentration de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et analysé en DIOS-MS sur trois répliques. Les résultats en RP sont présentés dans la Figure 5.9.

En diminuant la porosité, le signal disparaît. Il est donc nécessaire de modifier les paramètres de laser pour pouvoir analyser les échantillons. Nous voyons qu'il faut augmenter la fluence du laser et sa zone de focalisation pour obtenir un signal (passage d'une fluence *Large* à *Ultra*, sans donnée quantitative). Les résultats avec ces nouveaux paramètres dans les deux modes RP et RN sont présentés dans la Figure 5.10. L'augmentation de la fluence permet de mieux désorber et ioniser les analytes. En revanche, cela fragmente plus les molécules et le LysoPC n'est plus détecté à $[\text{M}+\text{H}]^+$ en RP. Il est donc préférable de travailler avec des échantillons avec une porosité plus élevée et ainsi utiliser une fluence de laser qui fragmente moins les analytes à la surface.

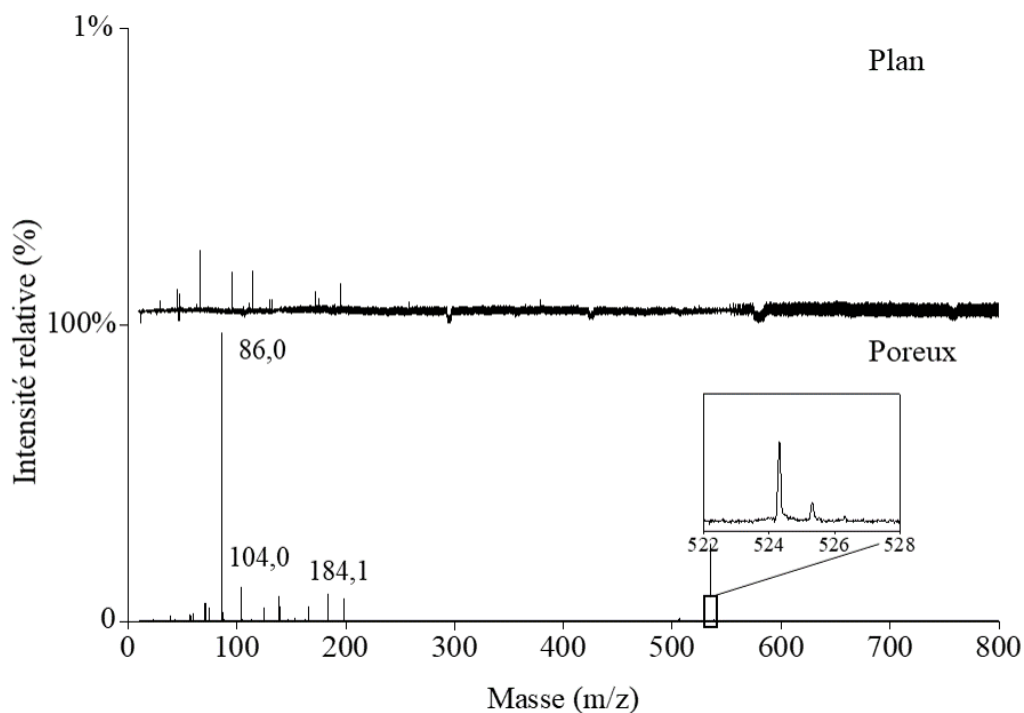


Figure 5.8 – Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC à 1 mg/mL sur du silicium plan et du silicium poreux fonctionnalisés avec une monocouche de silanes CH_3 court. Les principaux fragments du LysoPC sont indiqués. La normalisation TIC a été utilisée. Attention aux échelles différentes sur le silicium plan et le silicium poreux.

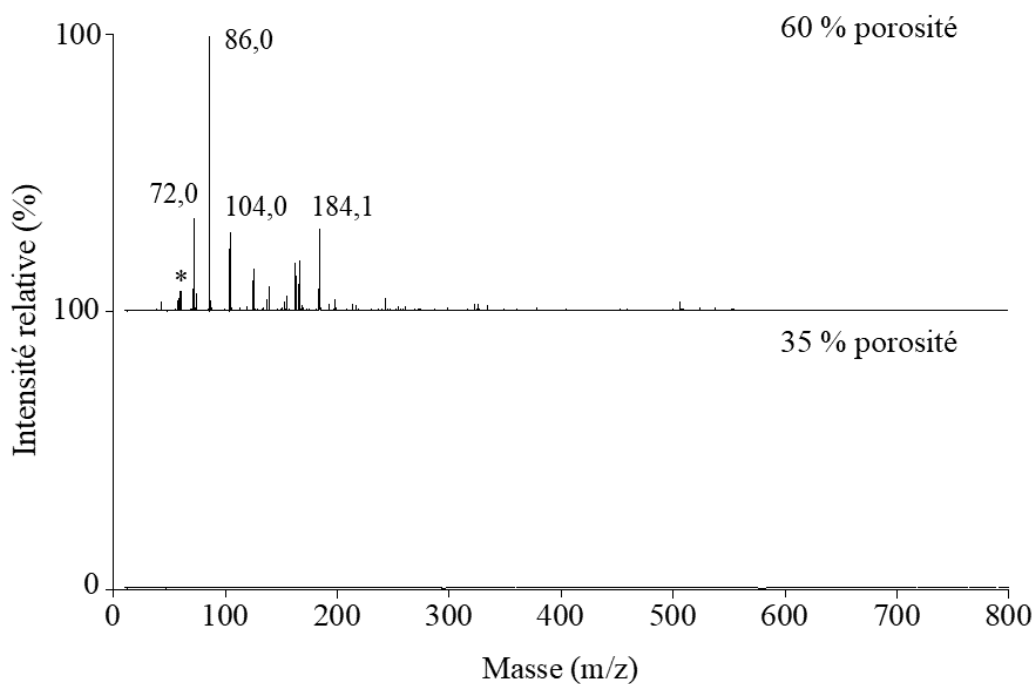


Figure 5.9 – Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur des échantillons de silicium poreux avec 60 % et 35 % de porosité. Les principaux fragments du LysoPC sont indiqués. L'étoile indique un pic de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.

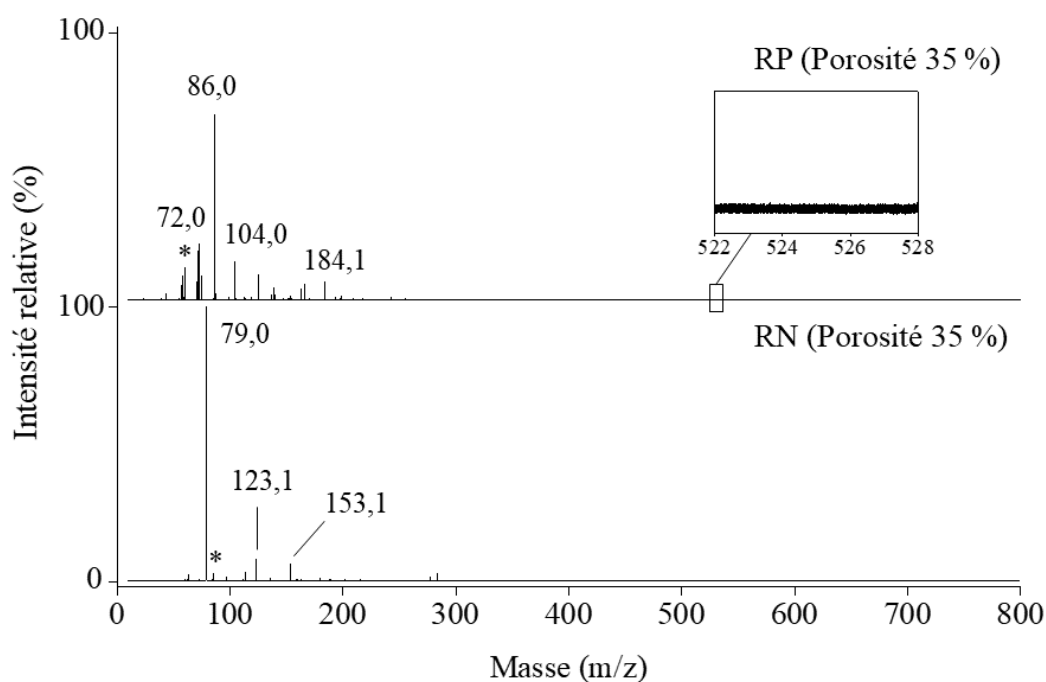


Figure 5.10 – Spectres du LysoPC à 50 µg/mL obtenus en DIOS-MS en RP et en RN sur des échantillons de silicium poreux avec 35 % de porosité avec les nouvelles caractéristiques du laser. Les principaux fragments du LysoPC sont identifiés. Les étoiles indiquent des pics de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.

5.3.1.c Influence de la profondeur des pores

Dans ce paragraphe, nous utilisons de nouveau les échantillons de silicium poreux fabriqués à l'INL. Nous avons testé trois profondeurs de pore différentes : 300 nm, 1 µm et 2 µm. Pour chacun des échantillons, du LysoPC en solution à 50 µg/mL a été déposé et analysé en DIOS-MS. Les résultats en RP sont présentés dans la Figure 5.11. Les mesures ont été faites sur les échantillons avec 35 % de porosité donc les paramètres du laser sont les mêmes que dans le paragraphe précédent.

Les fragments du LysoPC sont visibles avec les trois profondeurs et la molécule de LysoPC protonée $[M+H]^+$ n'est jamais visible, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. De plus, le signal du principal fragment à 86,0 m/z augmente légèrement lorsque la profondeur des pores augmente : 7 % d'augmentation en moyenne (respectivement 17 %) pour 1 µm de profondeur (respectivement 2 µm) par rapport au signal avec les pores de 300 nm de profondeur. Pour les autres fragments à 72,0 m/z, 104,0 m/z et 184,1 m/z, les variations sont du même ordre de grandeur. L'influence de la profondeur des pores entre 0,3 µm et 2 µm sur le signal de détection du LysoPC est donc faible, ce qui est en accord avec la littérature [122]. Dans la suite, nous avons continué à utiliser les échantillons avec une profondeur de 1 µm (par contraintes commerciales) et 60 % de porosité.

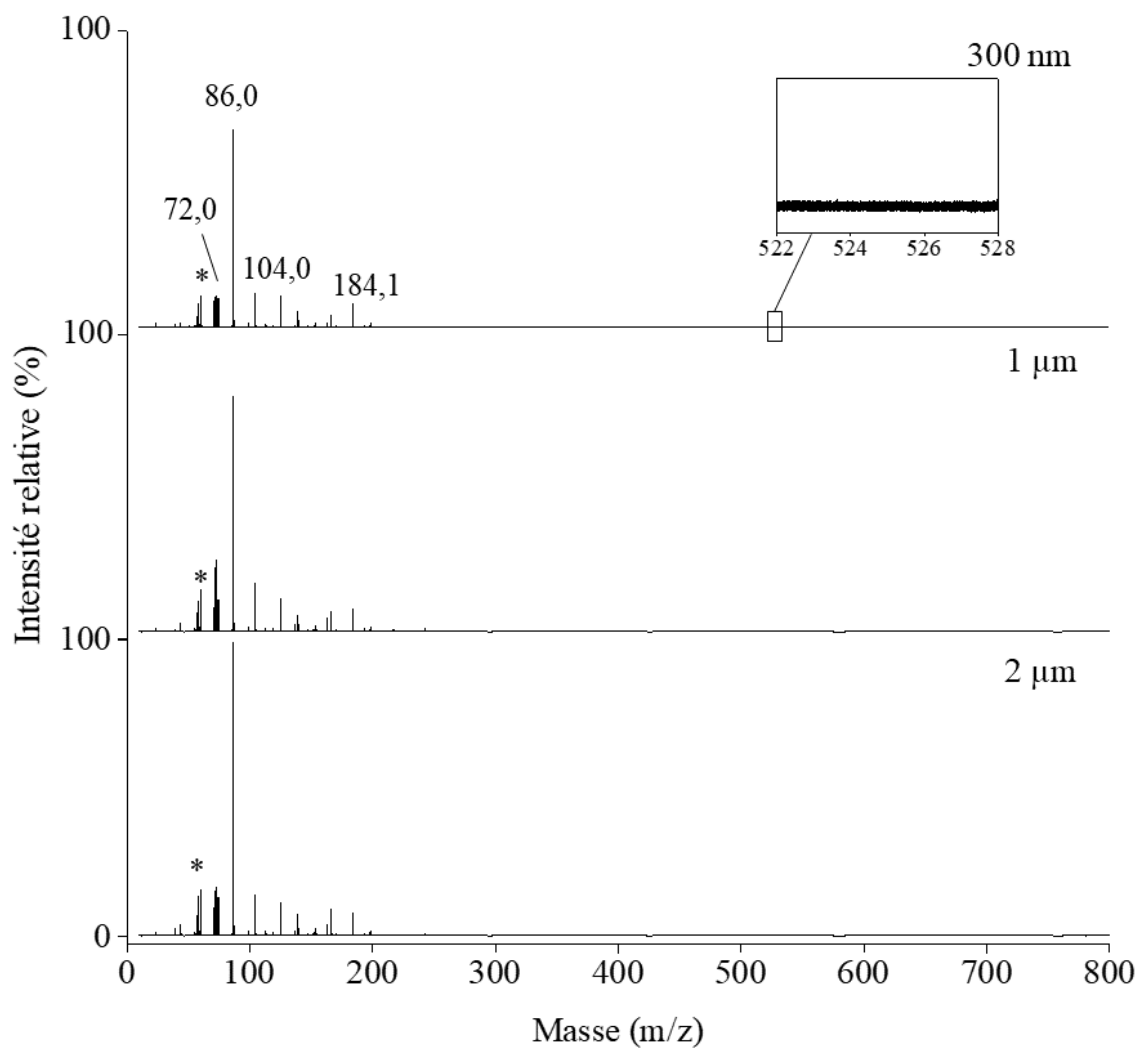


Figure 5.11 – Spectres du LysoPC à 50 µg/mL obtenus en DIOS-MS en RP sur des échantillons de silicium poreux de trois profondeurs : 300 nm, 1 µm et 2 µm. Les principaux fragments du LysoPC sont identifiés. Les étoiles indiquent les pics de la surface. La normalisation TIC a été utilisée.

5.3.2 Détection du LysoPC en solution sur des surfaces chargées

En plus des surfaces de CH₃ court et CH₃ long présentées dans l'article, le LysoPC a également été étudié seul en solution sur les surfaces de silicium poreuses fonctionnalisées par les silanes COO⁻ et NH₃⁺. Les spectres en RP sur ces quatre surfaces et sur le silicium poreux non modifié sont présentés dans la Figure 5.12 et les intensités relatives des principaux fragments sont présentés dans le Tableau 5.5. Un léger pic est détecté à [M+H]⁺ (524,3 m/z) et les principaux pics observés sont des fragments de la molécule à 86,0 m/z, 104,0 m/z, 184,1 m/z, et 198,2 m/z. Ils sont représentatifs respectivement du (CH₃)₃N-CH=CH₂, de la choline, de la phosphocholine et d'un adduit de la phosphocholine (phosphocholine + CH₂) [230]. Quelle que soit la surface, le fragment principal est celui à 86,0 m/z. Les intensités sont plus grandes pour les surfaces silanisées par rapport au silicium non modifié sauf pour le silane COO⁻ qui mène à des intensités plus faibles que pour toutes les autres surfaces. Les intensités de la surface de NH₃⁺ se situent entre le CH₃ court et le CH₃ long. Comme nous l'avons vu avec les monocouches de CH₃ court et CH₃ long, l'ionisation directe à l'intérieur des pores permet d'augmenter le signal de détection du LysoPC. Cela explique que le signal avec les silanes NH₃⁺ soit comparable à celui avec les silanes CH₃ court, car nous pouvons supposer que leur petite chaîne alkyle permet aux molécules de LysoPC de pénétrer à l'intérieur des pores. Le signal obtenu sur la monocouche de COO⁻ est aussi en accord avec les résultats de ToF-SIMS sur la pénétration des métabolites dans les pores discutés dans l'article. En effet, nous pouvons supposer que la longue chaîne des silanes empêche le LysoPC de pénétrer dans les pores comme dans le cas des silanes CH₃ long. De plus, les fragments chargés positivement du LysoPC pourraient s'adsorber sur la surface de silanes chargée négativement, ce qui diminuerait encore plus le signal, comme on l'observe sur le spectre.

Dans le cas du RN, présenté dans la Figure 5.13, plusieurs fragments sont visibles, principalement à 79,0 m/z, 123,1 m/z, 153,1 m/z, et 283,6 m/z. En revanche, aucun pic n'est détecté à 522,3 m/z ([M-H]⁻). Les intensités relatives des fragments sont données dans le Tableau 5.5. Les pics de fragments sont identiques pour toutes les surfaces et correspondent respectivement au PO₃⁻, au O₃P(CH₃)₂O⁻, au CH₃CH(OH)CH₂PH₂O₄⁻ et au CH₃(CH₂)₁₆COO⁻ [244]. À la différence du RP, la monocouche de silanes CH₃ long donne des intensités plus élevées par rapport aux autres surfaces pour l'ensemble des fragments. (61 %, 8 %, 24 % et 38 % pour les fragments respectivement à 79,0 m/z, 132,1 m/z, 153,1 m/z et 283,6 m/z). Les surfaces chargées COO⁻ et NH₃⁺ ont des intensités plus élevées que la surface non chargée CH₃ court. Dans le cas du silane COO⁻, sa longue chaîne empêche probablement la pénétration des molécules de LysoPC à l'intérieur des pores, comme pour les silanes CH₃ long ce qui permet une bonne détection. En revanche, dans le cas des silanes NH₃⁺, pour lesquels, le LysoPC peut probablement pénétrer dans les pores, il est possible que le transfert de charges entre les analytes et les silanes permettent la bonne détection des analytes malgré des silanes avec une chaîne alkyle plus petite que celle des silanes CH₃ long et COO⁻.

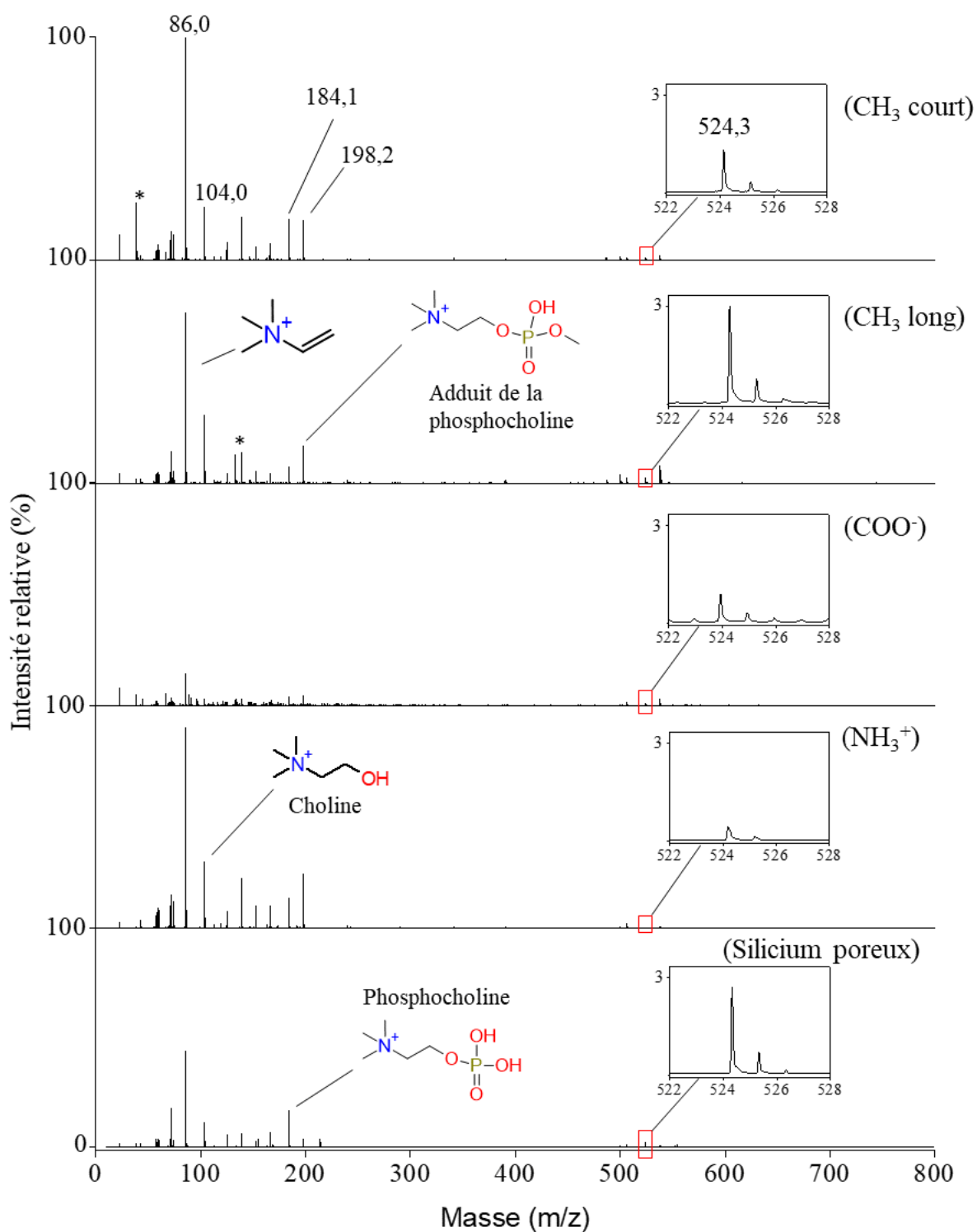


Figure 5.12 – Spectres de masse DIOS en RP du LysoPC en solution à 1 mg/mL sur du silicium poreux fonctionnalisé par des monocouches de CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Le pic du LysoPC est détecté à 524,3 m/z et les principaux fragments (86,0 m/z, 104,0 m/z, 184,1 m/z et 198,2 m/z) sont indiqués. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*). Les spectres de références sont présentés dans les Figures C.1 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.

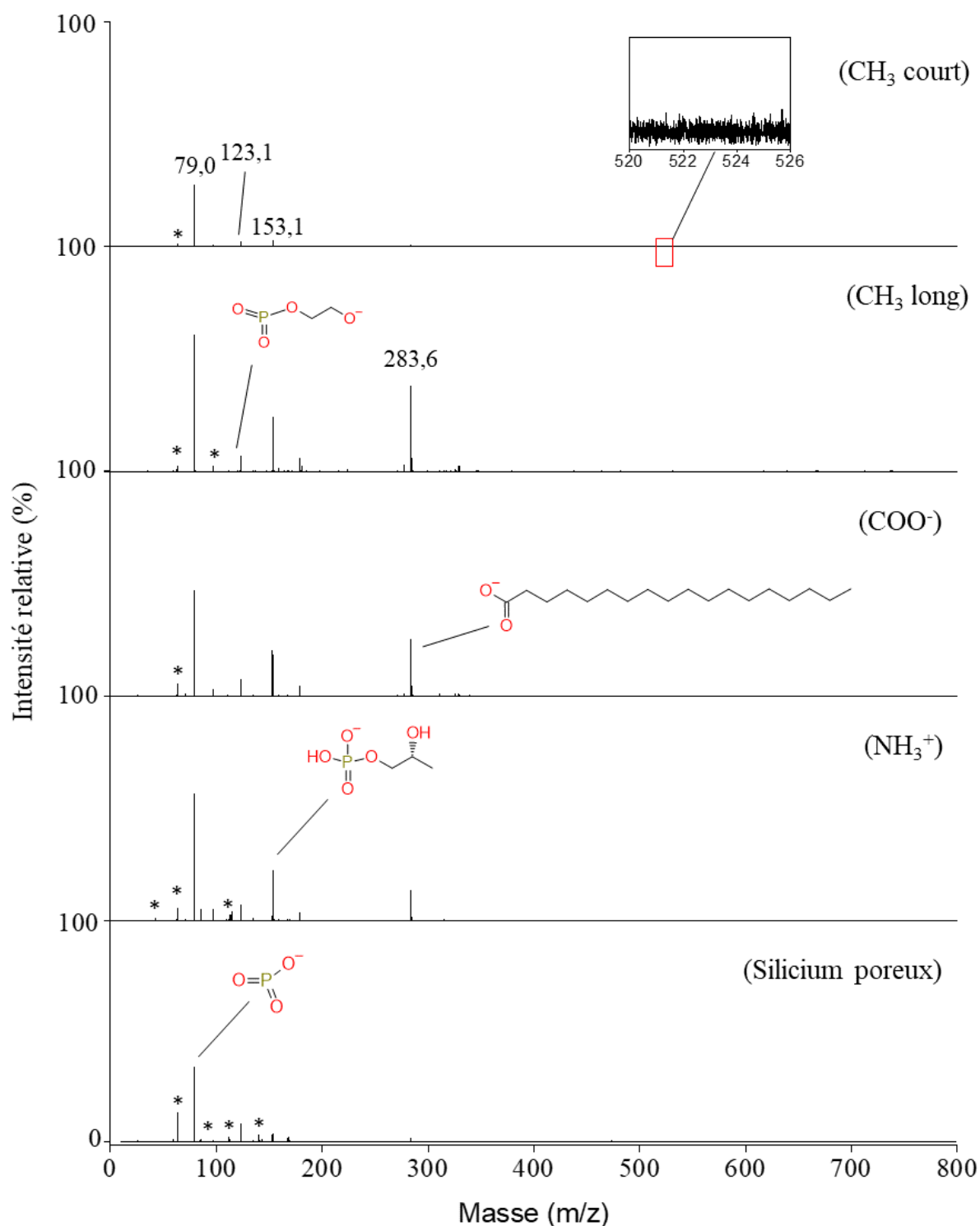


Figure 5.13 – Spectres de masse DIOS en RN du LysoPC en solution à 1 mg/mL sur du silicium poreux fonctionnalisé par des monocouches de CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments du LysoPC (79,0 m/z, 123,1 m/z, 153,1 m/z et 283,6 m/z) sont indiqués mais aucun pic du LysoPC à [M-H]⁻ (522,3 m/z) n'est visible. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*). Les spectres de références sont présentés dans les Figures C.2 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.

	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	Silicium
RP					
86,0 m/z	100	77	8	90	46
104,0 m/z	31	24	3	30	12
184,0 m/z	18	7	4	13	17
198,2 m/z	12	17	4	24	4
524,3 m/z	1	3	1	0,4	2
RN					
79,0 m/z	28	61	47	57	34
123,1 m/z	2	8	7	7	7
153,1 m/z	3	24	21	23	4
283,6 m/z	1	38	25	13	2

Tableau 5.5 – Intensités relatives des fragments du LysoPC en solution en RP et en RN pour les différentes surfaces poreuses.

5.3.3 Détection du LysoPC dans le plasma sur des surfaces chargées

De même que pour l'étude en solution modèle, nous avons également étudié le LysoPC dans du plasma sur les surfaces fonctionnalisées par les silanes COO⁻ et NH₃⁺ en RN. Les spectres et les intensités relatives des pics de fragments du LysoPC sont présentés respectivement dans la Figure 5.14 et le Tableau 5.6. Les résultats évoqués dans l'article sur les surfaces non chargées et le silicium poreux sont encore vrais pour les autres silanes : aucun pic n'est détecté à partir de 300 m/z, ni le pic du fragment de LysoPC à 283,6 m/z. De plus, les monocouches de silanes COO⁻ et NH₃⁺ donnent des intensités plus faibles que le silane CH₃ court. Les intensités des surfaces chargées sont du même ordre de grandeur que le silicium non fonctionnalisé, soit un ordre de grandeur de moins que la monocouche de CH₃ court. Le silane CH₃ court est donc le silane le plus adapté pour détecter le LysoPC dans du plasma parmi les cinq surfaces testées.

	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	Silicium
79,0 m/z	2,5	-	0,3	0,1	0,3
123,1 m/z	0,3	-	0,1	-	0,2
153,1 m/z	1,5	-	0,6	0,2	2,1

Tableau 5.6 – Intensités relatives des fragments du LysoPC dans du plasma spiké à 50 µg/mL en DIOS-MS en mode RN pour les cinq surfaces étudiées. Aucun pic n'est détecté sur le CH₃ long et à 283,6 m/z.

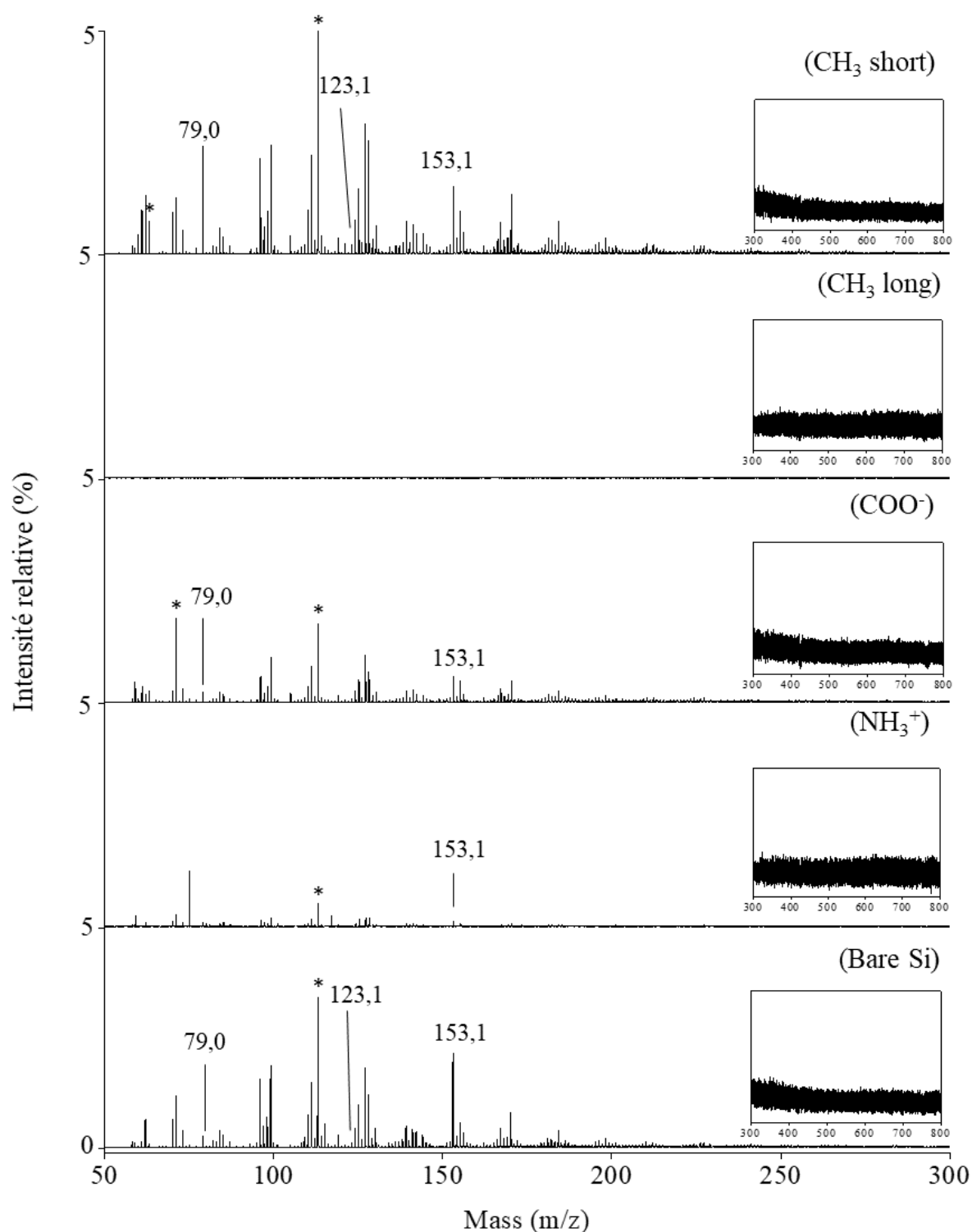


Figure 5.14 – Spectres de masse DIOS en RN du LysoPC spiké dans du plasma sur les substrats de silicium poreux fonctionnalisés par des silanes CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments du LysoPC (79,0 m/z, 123,1 m/z, et 153,1 m/z) sont indiqués. Le lavage 5x5 a été utilisé. Les pics correspondant aux substrats sont notés d'une étoile (*) et les spectres de référence des surfaces sont présentés dans les Figures C.2 et C.3. La normalisation TIC a été utilisée.

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté le DIOS-MS comme une alternative au MALDI-MS pour la détection de LysoPC en solution et dans du plasma. La structure des pores est un paramètre primordial pour optimiser le signal lorsque l'on n'utilise pas de matrice organique. Sur des échantillons de silicium plan, aucun signal n'est visible. De plus, en augmentant la porosité, il est possible de diminuer la fluence du laser nécessaire pour la détection du LysoPC, ce qui diminue les chances de fragmentation des analytes. À l'inverse, la profondeur des pores, entre 300 nm et 2 μm , influence peu le signal de détection. Suite à ces expériences, nous avons choisi des échantillons de silicium poreux avec une profondeur de 1 μm , un diamètre de 10 nm et une porosité de 60 % pour les analyses en DIOS-MS.

Le LysoPC est bien détecté en solution, principalement grâce à ses fragments, majoritaires sur le spectre en RP et en RN. En RP, un pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ (524,3 m/z) est également visible. Avec ce mode, la meilleure surface pour détecter le LysoPC est celle fonctionnalisée par le silane CH_3 court. Ce silane permet de capturer les molécules de LysoPC à l'intérieur des pores, d'après les résultats de ToF-SIMS, ce qui n'est pas le cas avec le silane CH_3 long, et probablement en partie avec le COO^- . Avec ces silanes, le LysoPC reste en surface et ne peut être ionisé que par un transfert d'énergie indirect, ce qui réduit son signal de détection. En revanche, les résultats en RN sont différents : la surface la plus adaptée pour la détection du LysoPC est la monocouche de CH_3 long, ce qui indique que la pénétration des molécules dans les pores n'est pas aussi importante qu'en mode RP.

Toutefois, dans l'étude du plasma sans pré-traitement, il est nécessaire de laver la surface avant la mesure, il faut donc que les molécules de LysoPC pénètrent dans les pores. C'est ce que nous voyons lors de l'étude RN du LysoPC spiké à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans du plasma. En effet, la monocouche de silane CH_3 long ne donne aucun signal, à la différence des autres surfaces. De plus, la monocouche de silane CH_3 court est la plus adaptée pour la détection du LysoPC dans du plasma, et permet également d'observer des variations de concentrations entre 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Des études en RP à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ montrent qu'il est également possible de détecter le LysoPC avec ce mode.

Cependant, dans les deux modes, la molécule entière de LysoPC (protonée ou déprotonée) n'est jamais détectée dans le plasma, ce qui peut être problématique lors d'une étude globale des métabolites sanguins, dans le cas d'un diagnostic par exemple. L'objectif du Chapitre 6 est donc d'étendre l'analyse DIOS-MS à l'ensemble de notre panel de métabolites en solution multiplexée, comme c'était le cas dans le chapitre précédent.

Étude en DIOS-MS - Détection des 25 métabolites mélangés en solution

6.1 Introduction

Dans le chapitre précédent nous nous sommes intéressés à la détection du LysoPC en DIOS-MS. Nous avons montré qu'il est possible de détecter ce lipide dans du plasma en RP et en RN, à plusieurs concentrations et sans pré-traitement, uniquement en lavant la surface à l'eau avant la mesure de spectrométrie de masse. Cependant, le LysoPC n'est détecté dans le plasma que par l'intermédiaire de ses fragments, fragments qui peuvent avoir une autre origine que le LysoPC. Dans l'optique d'un diagnostic en milieu sanguin, il est donc nécessaire d'étendre le nombre de métabolites biomarqueurs détectés.

Nous avons ainsi repris le panel de 25 métabolites du Chapitre 4 que nous avons maintenant étudiés en DIOS-MS en solution. Les métabolites étant, pour certains, très différents du LysoPC en termes de propriétés physico-chimiques, nous nous attendions à obtenir des interactions et des détections différentes de celles du LysoPC et l'objectif était de mettre ces résultats en relation avec les propriétés des métabolites et des silanes.

Ce travail est l'objet de ce dernier chapitre. Nous y présentons la détection des métabolites en solution multiplexée (mélange des 25 métabolites à une concentration de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nous tentons d'expliquer la détection DIOS-MS des métabolites en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, en particulier leur énergie d'ionisation, leur affinité protonique, leur charge électrique et leur balance hydrophile/hydrophobe. Nous montrons également que les silanes, en fonction de leur longueur et de leur charge peuvent favoriser la détection de certains métabolites. Enfin, nous présentons les perspectives de ces résultats pour une étude dans du plasma.

6.2 Matériel et méthodes

Les métabolites sont identiques à ceux du Chapitre 4, et présentés à la page 55. Dans la suite, nous les séparons en trois groupes selon leurs propriétés (Tableau 6.1) : les lipides, les acides organiques et les autres, qui comprennent les acides aminés. Dans le détail, nous avons :

- les lipides ou fragment de lipides : α -GPC, céramide, LysoPC, LysoPG et sphingomyéline ;
- les acides organiques : acide citrique, acide pyruvique et acide urique ;
- les autres : alanine, arginine, caféine, citrulline, créatine, créatinine, cystéine, glucose, glutamine, glutathion, glycine, leucine, méthionine, phénylalanine, taurine, tryptophane et valine.

6.2.1 Préparation des échantillons

Les substrats utilisés dans ce chapitre sont les échantillons de silicium poreux silanisés (par les silanes CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺) présentés dans le Chapitre 2, avec une profondeur de pore 1 μ m, un diamètre de 10 nm et une porosité de 60 %.

L'affinité protonique des silanes n'est pas connue. En revanche, il existe des études sur l'évolution de l'AP des alcanes, amines et acides carboxyliques en fonction de la longueur de leur chaîne carbonée. Dans ces trois cas, l'affinité protonique augmente avec la longueur de la chaîne alkyle, passant par exemple de 637,1 kJ/mol pour le propane (C₃H₈, même longueur de chaîne que les silanes CH₃ court) à 677,2 kJ/mol pour l'heptane (C₇H₁₆) [246]. Nous pouvons donc nous attendre à ce que cette valeur soit encore supérieure pour l'octadécane avec 18 atomes de carbone, comme le silane CH₃ long. Dans le cas des amines, le propylamine (C₃H₉N), dont la longueur de la chaîne est la même que pour le silane NH₃⁺, a une AP de 917,8 kJ/mol [247]. Enfin, pour les acides carboxyliques, nous n'avons pas la valeur pour une chaîne de 11 carbones comme le silane COO⁻, mais nous pouvons nous attendre à ce que cette valeur soit supérieure à 806 kJ/mol, la valeur pour l'acide propanoïque (C₃H₆O₂) [248]. Ces valeurs ne sont qu'indicatives et peuvent principalement être utilisées l'une relativement à l'autre car la base des silanes avec l'atome de silicium n'est pas prise en compte. Enfin, pour une surface non silanisée, le groupement silanol Si-OH a une AP de 732,6 kJ/mol [247].

Les solutions non multiplexées sont composées des métabolites seuls en solution à 1 mg/mL. Le solvant est composé d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1) pour le LysoPG, le LysoPC, la sphingomyéline et la céramide et d'eau ultrapure pour les 21 autres métabolites. Les métabolites sont mélangés à volume égal pour former la solution multiplexée. La concentration finale de chaque métabolite est 40 μ g/mL. Des gouttes de 1 μ L sont ensuite déposées sur chaque surface et 3 répliques sont effectués pour les mesures. Les mesures en RP et en RN sont faites sur des échantillons différents.

6.2.2 Analyse DIOS-MS

Les spectres de masse DIOS sont obtenus avec un MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme (Bruker Daltonics) équipé d'un laser UV (355 nm). Les échantillons de silicium fonctionnalisés sont maintenus sur une plaque MALDI modifiée grâce à du ruban de cuivre adhésif. Les ions sont

Métabolite	Masse (g/mol)	LogP	Affinité protonique (kJ/mol)	Point isoélectrique (charge)	Énergie d'ionisation (eV)	Enthalpie de déprotonation (kJ/mol)
LysoPC	523,7	2,1	-	-	-	-
Sphingomyéline	764,1	0,4	-	7,8	-	-
α -GPC	257,2	-5,5	-	-	-	-
LysoPG	534,6	4,9	-	- (-1)	-	-
Céramides	566,0	12,6	-	-	-	-
Acide citrique	192,1	-1,3	872,9	- (-3)	-	-
Acide pyruvique	88,1	0,1	-	- (-1)	9,9	1395
Acide urique	168,1	-1,5	-	- (-0,5)	8,2	-
Méthionine	149,2	-2,2	935,4	6,3	8,3	1405
Tryptophane	204,2	-1,1	948,9	6,4	7,5	1409
Glycine	75,1	-3,4	886,5	5,8	8,8	1429
Alanine	89,1	-2,8	901,6	6,1	8,8	1425
Leucine	131,2	-1,6	914,6	6,5	8,5	1418
Valine	117,2	-2,0	910,6	6,4	8,7	1420
Créatine	131,2	-2,9	-	8,5	-	-
Glutamine	146,1	-4,0	937,8	6,1	8,6	1487
Citrulline	175,2	-3,9	985,3	6,1	-	-
Phénylalanine	165,2	-1,2	922,9	6,3	8,4	1408
Arginine	174,2	-3,2	1051,0	10,8 (+1)	9,1	1388
Caféine	194,2	-0,5	-	-	8,0	-
Taurine	125,2	-2,6	-	3,8	-	-
Cystéine	121,2	-2,8	903,2	5,9	9,5	1399
Glucose	180,2	-2,9	-	-	-	-
Glutathion	307,3	-4,9	-	2,8 (-1)	-	-
Créatinine	113,1	-1,5	-	9,0 (+0,7)	-	-

Tableau 6.1 – Propriétés physico-chimiques des métabolites présents dans la solution multiplexée. Les cases sont laissées blanches si la valeur n'est pas connue. La charge à pH 7 est indiquée entre parenthèse dans la colonne sur le point isoélectrique lorsqu'elle est non nulle. Dans ce tableau, les métabolites sont triés selon leur ordre d'apparition dans la discussion.

détectés en mode RP et RN avec un potentiel d'accélération de ± 20 kV. La gamme de masse est 10-800 Da. L'imagerie des gouttes est effectuée avec le logiciel FlexImaging 3.0 (Bruker Daltonics) avec une résolution spatiale de 200 μm . Pour chaque spot de mesure, 500 coups sont moyennés pour obtenir le spectre de masse. Les spectres sont analysés avec le logiciel FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics) pour la détection des pics et le calcul des rapports S/N. Le S/N indiqué dans le chapitre correspond au S/N maximal sur l'ensemble des spots d'une goutte. Les barres d'erreur correspondent à l'écart type des S/N sur 3 répliques.

6.3 Résultats et discussion

Une première étude non présentée ici était dédiée à observer la détection des métabolites en solution non multiplexée sur les surfaces poreuses silanisées en RP et en RN. Pour chaque surface, les principaux pics de détection (molécule protonée ou déprotonée, fragments et adduits) ont été identifiés. Dans les cas où le métabolite est détecté grâce à un pic à $[\text{M}+\text{H}]^+$ en RP ou $[\text{M}-\text{H}]^-$ en RN, avec un signal relatif fort par rapport aux pics de fragments et d'adduits, c'est ce pic qui sera étudié dans la suite dans la solution multiplexée, sinon, le pic principal du spectre sera utilisé pour la détection dans le mélange.

6.3.1 Les lipides

Les quatre lipides étudiés et l' α -GPC (fragment du LysoPC) sont présentés dans la Figure 1.12. Leurs propriétés physico-chimiques sont données dans le Tableau 6.1. Le **LysoPC** et la **sphingomyéline** présentent une longue chaîne alkyle (respectivement 18 et 16 carbones) et un groupe chargé négativement (PO_4^-) lié à un groupe terminal chargé positivement ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Ils sont tous les deux hydrophobes avec un LogP respectif de 2,1 et 0,4. Le **LysoPG** contient également une longue chaîne alkyle (18 carbones) et un groupe chargé négativement (PO_4^-) lié à un groupe glycérol terminal. Son LogP est de 4,9. La **céramide**, avec ses chaînes alkyles de 16 et 18 carbones et un LogP de 12,6, est le lipide le plus hydrophobe de cette étude et ne contient pas de groupement chargé. L' α -GPC, métabolite hydrophile (LogP = -5,5), a été placée dans le groupe des lipides parce que c'est la partie hydrophile du LysoPC sans la chaîne alkyle. La molécule contient deux groupes chargés, négativement et positivement (respectivement PO_4^- et $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$).

Afin d'identifier chaque lipide dans les spectres DIOS issus d'un milieu multiplexé, une étude préalable en milieu non multiplexé a été nécessaire. Elle montre plusieurs comportements en fonction des groupes chimiques des lipides. Ceux contenant un groupe négatif et un positif (*i.e.* le **LysoPC**, la **sphingomyéline** et l' α -GPC) sont détectés en RP et en RN. De plus, les molécules sont principalement détectées grâce à leurs fragments, qui sont en RP à 86,0 m/z ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), à 72,0 m/z (perte de CH_2), à 104,1 m/z (choline), à 184,1 m/z (phosphocholine), et à 198,2 m/z (phosphocholine + CH_2) [230]. De plus, l' α -GPC et le LysoPC sont également détectés à $[\text{M}+\text{H}]^+$, respectivement à 258,0 m/z et à 524,2 m/z, en revanche, la sphingomyéline n'est pas détectée à sa masse. En RN, ces lipides sont détectés principalement à 79,1 m/z (PO_3^-), mais aussi à 123,1 m/z ($\text{O}_3\text{P}(\text{CH}_2)_2\text{O}^-$), à 153,1 m/z ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{PH}_2\text{O}_4^-$),

et à 283,6 m/z ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COO}^-$) [244]. Aucun lipide n'est détecté à sa masse en RN. Dans les deux modes, les trois molécules sont détectées à toutes ou une majorité des masses mais leur profil de fragmentation est différent. En effet, le Tableau 6.2 ci-dessous donne les intensités relatives de chaque fragment pour chacun des trois métabolites seuls en solution. En RP, on observe que l' α -GPC est principalement détectée par des fragments de masse faible et la sphingomyéline par des fragments de masse plus élevée. Aucune tendance n'est visible pour le LysoPC. En RN, le fragment principal détecté a une masse de 79,1 m/z et les autres fragments dépendent de la molécule, en particulier, le pic à 283,6 m/z n'est pas présent pour l' α -GPC et la sphingomyéline car il correspond à la chaîne alkyle du LysoPC (et du LysoPG).

Le **LysoPG** est détecté uniquement en RN, avec les mêmes fragments que les trois lipides précédents et un pic principal à 79,1 m/z (voir le Tableau 6.2 pour les intensités relatives). Enfin, la **céramide** n'est jamais détectée, ni en RN, ni en RP. En comparant ces résultats aux propriétés des lipides, nous pouvons en conclure qu'en solution non multiplexée, un lipide est détecté dans le mode RP s'il contient un groupe chargé positivement et en mode RN s'il contient un groupe chargé négativement.

Masse	α -GPC	LysoPC	Sphingomyéline	LysoPG
RP				
72,0 m/z	0,19	0,09	0,03	-
86,0 m/z	0,55	0,54	0,47	-
104,1 m/z	0,17	0,18	0,05	-
184,1 m/z	0,04	0,07	0,23	-
198,2 m/z	0,03	0,11	0,22	-
258,0 m/z	0,02	-	-	-
524,3 m/z	-	0,01	-	-
RN				
79,1 m/z	0,76	0,53	0,70	0,51
123,1 m/z	0,08	0,06	0,30	-
153,1 m/z	0,16	0,16	-	0,26
283,6 m/z	-	0,25	-	0,22

Tableau 6.2 – Intensités relatives des principaux pics de détection des lipides en solution non multiplexée. Pour chaque lipide, la somme des intensités des pics est égale à 1.

Ensuite, en solution multiplexée, les rapports S/N pour chaque pic de lipides en RP et en RN sont présentés dans le Tableau 6.3, les spectres de masses sur chaque surface sont donnés dans la Figure 6.1 et la Figure 6.2 et un focus sur les pics $[\text{M}+\text{H}]^+$ du LysoPC et de l' α -GPC (respectivement à 524,2 m/z et 258,0 m/z) en RP est présenté dans la Figure 6.3.

En RP, aucun pic n'est détecté à la masse du **LysoPG** et de la **céramide**, comme dans les solutions non multiplexées. Seuls les lipides avec un groupe terminal chargé positivement sont

bien détectés (*i.e.* le **LysoPC**, la **sphingomyéline** et l' **α -GPC**). Les lipides détectés à $[M+H]^+$ en solution non multiplexée (**LysoPC** et **α -GPC**) le sont encore en solution multiplexée. De plus, la nature chimique de la monocouche de silane a un impact sur le S/N. En effet, le **LysoPC** est mieux détecté à 524,2 m/z avec une monocouche de silanes NH_3^+ (S/N = 34 ± 17) qu'avec les silanes CH_3 court (S/N = 27 ± 9), la silice non fonctionnalisée (S/N = 12 ± 5) et les silanes longs (S/N = 14 ± 5 avec les silanes CH_3 long et 8 ± 3 avec les silanes COO^-). En ce qui concerne les fragments, il y a peu de différences entre les monocouches NH_3^+ et CH_3 court, qui sont le meilleur compromis pour la détection de l'ensemble des fragments. Les résultats montrent une diminution significative du S/N dans le cas des monocouches de silanes CH_3 long et COO^- pour tous les fragments par rapport aux trois autres surfaces, sauf celui à 104,1 m/z. Cette chute drastique du signal dans le cas des longues chaînes alkyles pourrait être liée à la localisation des lipides en surface ou dans les pores. En effet, nos analyses ToF-SIMS réalisées sur le **LysoPC** ont montré que ce lipide est piégé dans les pores avec les silanes CH_3 court et sans silane (SiO_2) mais ne l'est pas avec les silanes CH_3 long. En extrapolant ces résultats aux autres lipides et aux silanes COO^- et NH_3^+ , on peut supposer que les lipides (sauf l' **α -GPC**) sont dans les pores avec les silanes CH_3 court et NH_3^+ et avec la surface non fonctionnalisée et restent en surface pour les silanes avec de longues chaînes alkyles CH_3 long et COO^- . En revanche, l' **α -GPC**, plus petit que les lipides, pourrait pénétrer dans les pores, ce qui pourrait expliquer le signal fort pour le fragment à 104,1 m/z important dans son profil de fragmentation (Tableau 6.2). Enfin, les bons résultats obtenus sur le silicium non fonctionnalisé pourrait venir d'une bonne détection de l' **α -GPC** sur cette surface. En effet, comme nous l'avons vu avec les métabolites seuls en solution, l' **α -GPC** est détectée principalement avec des fragments de masse faible, les mêmes qui sont majoritaires pour la solution multiplexée sur cette surface.

Quatre lipides sont détectés en RN dans la solution multiplexée : le **LysoPG**, le **LysoPC**, la **sphingomyéline** et l' **α -GPC**. Dans l'ensemble, les signaux sont plus faibles qu'en RP pour l'ensemble des surfaces. En revanche, il n'est pas possible d'extraire la contribution de chaque molécule pour les S/N des fragments parce que ceux-ci sont identiques d'un lipide à l'autre. Nous pouvons toutefois supposer que la **sphingomyéline** est peu détectée par rapport aux autres lipides. En effet, le S/N du pic à 123,1 m/z, principalement présent sur le spectre de la **sphingomyéline**, est faible comparé aux S/N des autres pics. Comme pour le mode RP, les signaux sont moins élevés pour les silanes CH_3 long et COO^- , probablement parce que les lipides ne pénètrent pas dans les pores avec ces monocouches. De plus les rapports S/N sont meilleurs pour les silanes CH_3 court et la surface non fonctionnalisée SiO_2 que les silanes NH_3^+ . Les groupements positifs des silanes NH_3^+ peuvent attirer les fragments chargés négativement des lipides, ce qui diminuerait leur détection. Enfin, le SiO_2 donne un signal systématiquement supérieur aux silanes NH_3^+ , ce qui n'était pas le cas en RP. Cela pourrait venir du fait que la silice négative pourrait repousser les fragments négatifs de la surface, ce qui faciliterait leur détection en RN.

Pour résumer, il n'existe pas une meilleure surface pour la détection des lipides, mais il est nécessaire d'en utiliser plusieurs pour une détection optimale. Pour le **LysoPC** et l' **α -GPC**, il est préférable d'utiliser le mode RP avec une surface respectivement de NH_3^+ et CH_3 court parce que ce sont les deux surfaces qui permettent la meilleure détection des deux molécules

à leur masse en RP tout en permettant une bonne détection de leurs fragments. Dans le cas de **sphingomyéline**, il est préférable d'utiliser le mode RP avec les silanes NH_3^+ parce que cette surface offre les meilleurs S/N pour les fragments principaux du lipide en solution non multiplexée. Le **LysoPG** est détectable uniquement en RN et les meilleurs résultats pour les fragments sont observés avec la surface de silicium poreux non fonctionnalisé. Enfin, la **céramide** n'est jamais détectée avec cette méthode.

Masse	CH_3 court	CH_3 long	COO^-	NH_3^+	SiO_2
RP					
<u>72,0 m/z</u>	337 ± 97	169 ± 21	170 ± 85	181 ± 14	645 ± 251
<u>86,0 m/z</u>	3652 ± 112	1716 ± 193	1348 ± 347	3557 ± 219	3254 ± 60
<u>104,1 m/z</u>	947 ± 189	1124 ± 108	933 ± 356	857 ± 80	972 ± 124
<u>184,1 m/z</u>	1525 ± 329	374 ± 76	306 ± 55	1571 ± 260	1274 ± 367
<u>198,2 m/z</u>	1476 ± 245	163 ± 22	112 ± 21	1188 ± 145	770 ± 68
<u>258,0 m/z</u>	51 ± 15	25 ± 4	14 ± 5	42 ± 13	36 ± 16
<u>524,2 m/z</u>	27 ± 9	14 ± 9	8 ± 3	34 ± 17	12 ± 5
RN					
<u>79,1 m/z</u>	624 ± 131	205 ± 64	117 ± 66	274 ± 20	851 ± 126
<u>123,1 m/z</u>	225 ± 71	18 ± 6	21 ± 13	81 ± 81	245 ± 36
<u>153,1 m/z</u>	143 ± 52	54 ± 23	26 ± 16	98 ± 13	186 ± 55
<u>283,6 m/z</u>	371 ± 147	122 ± 60	76 ± 39	317 ± 42	402 ± 102

Tableau 6.3 – Rapports S/N des principaux pics (fragments et molécules protonées) des lipides en DIOS-MS en solution multiplexée en mode RP et RN. Les écarts types sont calculés à partir de 3 répliques. Les principaux fragments des lipides, lorsque ceux-ci représentent plus de 10 % du signal total (Tableau 6.2) sont soulignés en rouge pour l' α -GPC, en vert pour le LysoPC, en bleu pour la sphingomyéline, et en magenta pour le LysoPG.

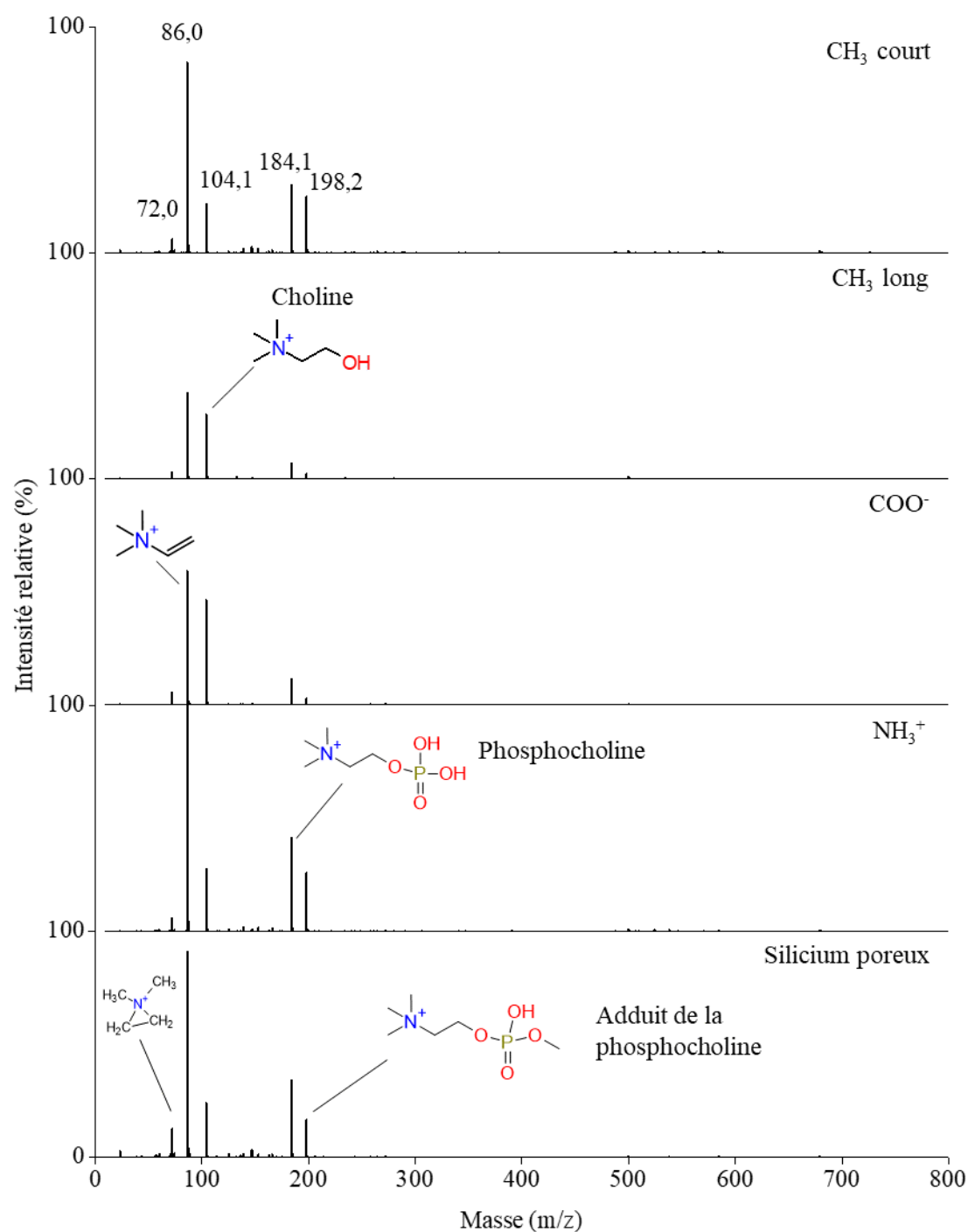


Figure 6.1 – Spectres de masse DIOS en RP de la solution multiplexée sur les surfaces fonctionnalisées par les silanes CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments des lipides sont identifiés. La normalisation TIC a été utilisée.

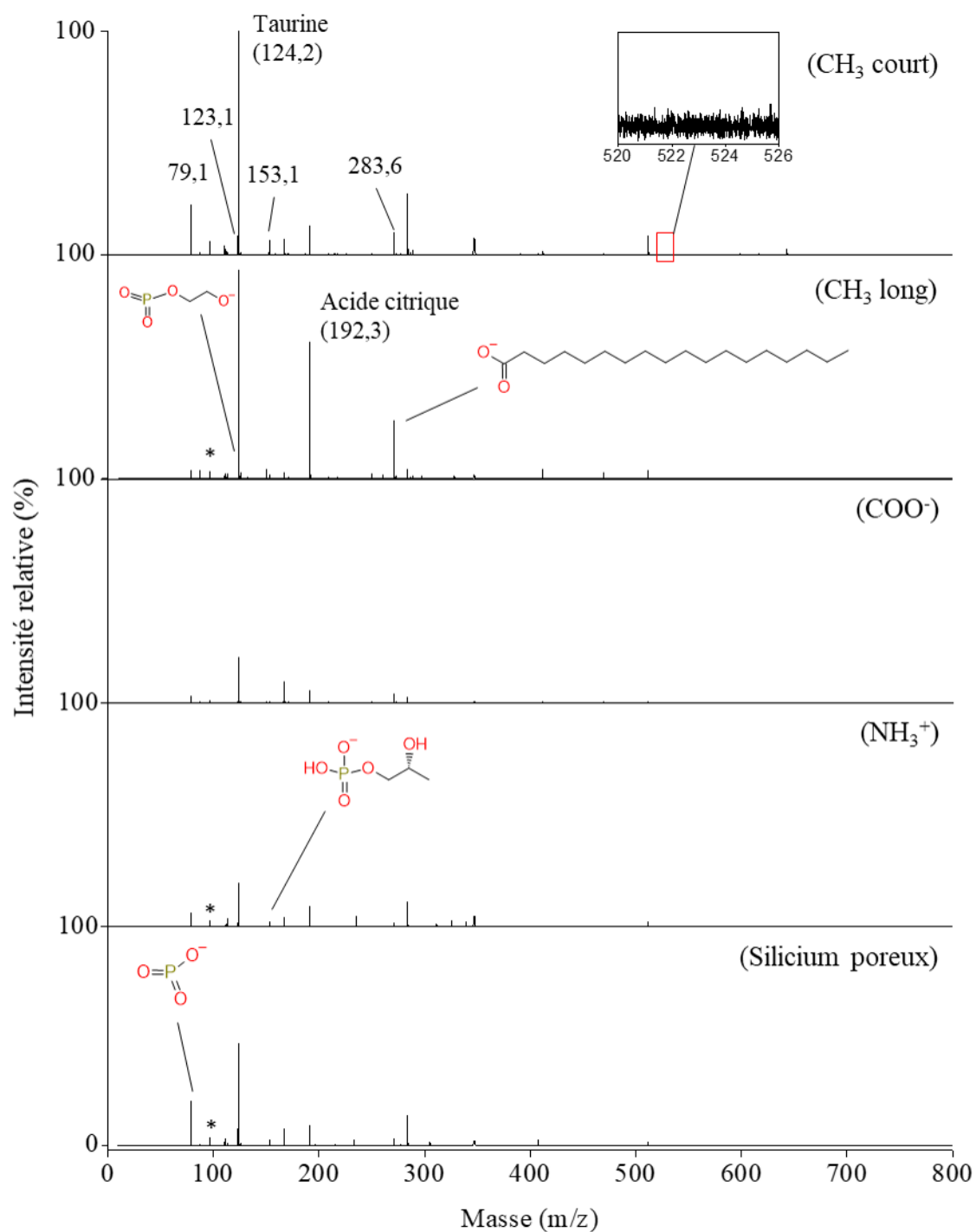


Figure 6.2 – Spectres de masse DIOS en RN de la solution multiplexée sur les surfaces fonctionnalisées par les silanes CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺ et sur du silicium poreux non fonctionnalisé. Les principaux fragments des lipides sont identifiés. Les pics issus de la surfaces sont identifiés par une étoile. La normalisation TIC a été utilisée.

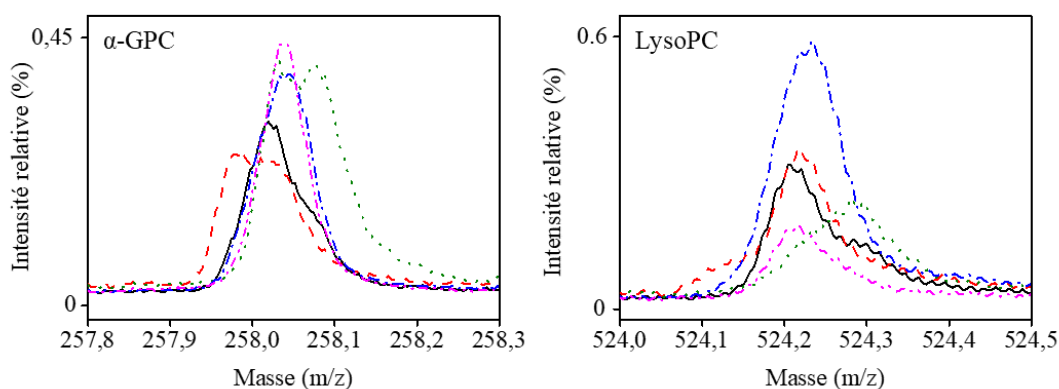


Figure 6.3 – Spectres de DIOS-MS en RP des pics à $[M+H]^+$ de l' α -GPC à gauche et du LysoPC à droite sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH_3 court, (tirets rouges) CH_3 long, (points verts) COO^- , et (points-tirets bleus) NH_3^+ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée. Le léger décalage des masses peut venir d'un défaut de planéité des échantillons sur la plaque MALDI modifiée. La normalisation TIC a été utilisée.

6.3.2 Les acides organiques

Les trois acides sont l'**acide pyruvique**, l'**acide citrique** et l'**acide urique** (Figure 1.12, Tableau 6.1). L'**acide pyruvique** contient un groupe carboxyle et un groupe cétone, et a une charge de -1 à pH 7. L'**acide citrique** contient trois groupes carboxyles et un groupe alcool, et a une charge de -3 à pH 7. Enfin, l'**acide urique** contient un groupe $\text{O}-\text{C}(\text{NH}-)_2$ et a une charge proche de -0,5 à pH 7. Ces trois acides sont bien détectés en mode RN à $[\text{M}-\text{H}]^-$, en revanche, ils ne sont pas détectés en RP. Les rapports S/N dans la solution multiplexée en RN sont présentés dans le Tableau 6.4 et les spectres de masse correspondant aux acides sont donnés dans la Figure 6.4.

Acide	Masse	CH_3 court	CH_3 long	COO^-	NH_3^+	SiO_2
Pyruvique	87,1	70 ± 10	121 ± 43	23 ± 9	20 ± 8	46 ± 13
Urique	167,2	225 ± 55	156 ± 69	37 ± 5	195 ± 33	316 ± 114
Citrique	192,3	680 ± 115	882 ± 263	250 ± 62	292 ± 54	363 ± 112

Tableau 6.4 – Rapports S/N des trois acides à $[\text{M}-\text{H}]^-$ dans la solution multiplexée en RN en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.

L'**acide citrique** est le mieux détecté des trois acides, probablement grâce à ses trois groupes carboxyles. Ces groupes ont tendance à se déprotoner, permettant une détection à $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{S}/\text{N} = 882$ au maximum avec la monocouche CH_3 long). En revanche, aucun pic n'est détecté à $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ et $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$, probablement parce que la molécule se fragmente plutôt que d'être plusieurs fois déprotonée. L'**acide pyruvique** qui ne contient qu'un seul groupe carboxyle est de fait moins bien détecté que l'acide citrique ($\text{S}/\text{N} = 121$ au maximum avec la monocouche CH_3 long). Par ailleurs, les deux acides sont mieux détectés avec les monocouches de silanes CH_3 court et CH_3 long. Ce résultat pourrait être lié à l'AP des silanes. En effet, les silanes NH_3^+

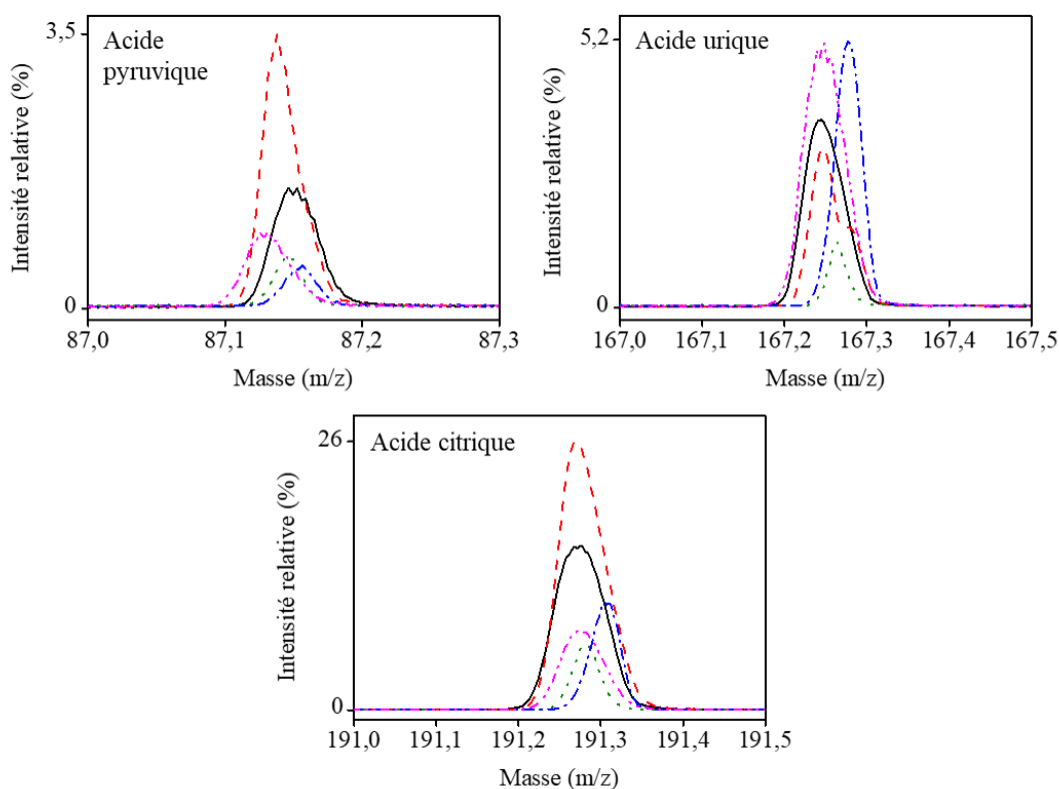


Figure 6.4 – Spectres de DIOS-MS en RN des pics à $[M+H]^+$ de l'acide pyruvique, de l'acide urique et de l'acide citrique sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH_3 court, (tirets rouges) CH_3 long, (points verts) COO^- , et (points-tirets bleus) NH_3^+ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.

(respectivement $S/N = 292$ et 20 pour l'acide citrique et l'acide pyruvique), COO^- (respectivement $S/N = 250$ et 23) et la surface de silicium non fonctionnalisée (respectivement $S/N = 363$ et 46) ont une AP plus forte que les silanes CH_3 court (respectivement $S/N = 680$ et 70) et CH_3 long (respectivement $S/N = 882$ et 121). Cette différence pourrait modifier la protonation des groupes carboxyles des acides organiques et expliquer leur meilleure détection sur les silanes CH_3 court et CH_3 long.

Le S/N de l'**acide urique** à $[M-H]^-$ est plus grand que celui de l'acide pyruvique et plus petit que celui de l'acide citrique pour toutes les surfaces. Cela pourrait s'expliquer par des AP différentes. Cependant, il n'est pas possible de valider cette hypothèse parce que ces valeurs ne sont pas connues, exceptée celle de l'acide citrique.

En tenant compte des barres d'erreur, les silanes CH_3 court et CH_3 long donnent les meilleurs résultats pour les trois acides. Pour l'acide urique, les silanes NH_3^+ et la surface de silicium non fonctionnalisée donnent également des résultats équivalents. Cela pourrait être lié à la faible affinité protonique des silanes CH_3 court et CH_3 long, qui aurait de l'importance en présence des groupes carboxyles, et dans une moindre mesure en présence des groupes $\text{O}(\text{NH})_2$. De plus, on constate systématiquement la mauvaise détection des acides avec les silanes COO^- . Cela pourrait être lié à l'AP de ce silane qui serait plus élevée que celle des autres silanes (d'après les

données au début du chapitre). Par ailleurs, il semble que cette différence ne soit pas due aux propriétés hydrophiles des métabolites car l'acide citrique et l'acide urique ont un LogP similaire et inférieur à celui de l'acide pyruvique.

Pour conclure, pour détecter les acides organiques dans les meilleures conditions, il faut travailler en mode RN et utiliser une monocouche de silanes CH₃ long pour l'**acide citrique** et l'**acide pyruvique** et une surface poreuse non fonctionnalisée pour l'**acide urique**.

6.3.3 Les autres métabolites

Nous avons regroupé l'ensemble des métabolites restants pour analyser leur comportement parce que leurs propriétés physico-chimiques sont proches : leur masse moléculaire est inférieure à 300 g/mol (sauf le glutathion à 307 g/mol), leur charge est comprise entre -1 et +1 à pH 7 et les groupements présents sur les molécules sont principalement des amines et des carboxyles, comme dans le cas des acides aminés. Tous ces métabolites sont présentés dans la Figure 1.12 pour leur forme à pH 7 et dans le Tableau 6.1 pour leurs propriétés physico-chimiques.

6.3.3.a Les métabolites qui ne sont détectés ni en RP ni en RN

Cinq métabolites ne sont jamais détectés, ni en RN, ni en RP. Ce sont la **méthionine**, le **tryptophane**, la **glycine**, l'**alanine** et la **leucine**. Leur charge est nulle à pH 7. La **méthionine** et le **tryptophane** ont un profil de fragmentation dans les solutions non-multiplexées complexe, avec une intensité faible, ainsi que des faibles signaux à $[M+H]^+$ et à $[M-H]^-$. Cette abondante fragmentation pour ces deux acides aminés ainsi que la plus faible fragmentation pour les autres acides aminés étudiés est en accord avec une étude précédente [249], et pourraient expliquer leur non détection dans la solution multiplexée. La **glycine** et l'**alanine** (énergie d'ionisation de 8,8 eV pour les deux) sont moins sujettes à la fragmentation que les deux acides aminés précédents. Elle ont cependant des AP parmi les plus basses des acides aminés étudiés (inférieures à 901 kJ/mol dans les deux cas) et des enthalpies de déprotonation parmi les plus élevées (mais elles ont une affinité protonique plus faible (AP respectivement de 886,5 et 901,6 kJ/mol contre 935,4 kJ/mol pour la méthionine et 948,9 kJ/mol pour le tryptophane). En conséquence, la glycine et l'alanine sont légèrement détectées à $[M+H]^+$ et à $[M-H]^-$ en solution non-multiplexée (sans fragmentation évidente) mais elles ne le sont plus dans la solution multiplexée. Enfin, la **leucine**, qui est proche de la glycine et de l'alanine (énergie d'ionisation de 8,5 eV et AP de 914,6 et faible fragmentation) n'est pas détectée non plus à $[M+H]^+$ ni à $[M-H]^-$ en solution multiplexée. De plus, le fragment principal de la leucine est situé à 86,0 m/z qui est aussi la masse d'un fragment des lipides. Il n'est donc pas possible de la détecter, le signal des lipides étant majoritaire devant celui des acides aminés en RP.

6.3.3.b Les métabolites détectés uniquement en RP

Sept métabolites sont exclusivement détectés en RP, ce sont : la **valine**, la **citrulline**, l'**arginine**, la **glutamine**, la **phénylalanine**, la **créatine** et la **caféine**. Les pics de détection et leurs signaux sur bruit respectifs sont présentés dans la Figure 6.5 et le Tableau 6.5. Cinq

des sept métabolites (les acides aminés) ont une AP supérieure à 910 kJ/mol. Pour les deux autres (créatine et caféine), qui ne sont pas des acides aminés, cette valeur n'est pas connue. Nos résultats pourraient suggérer qu'une telle affinité protonique favorise une détection en RP (forme $\text{COOH}/\text{NH}_3^+$). De plus, ces sept métabolites ont un S/N plus faible avec les silanes CH_3 long, COO^- , et NH_3^+ (exceptée la phénylalanine) qu'avec les silanes CH_3 court et le SiO_2 . Le faible S/N avec les silanes avec les longues chaînes alkyles pourrait venir d'un problème de capture comme pour le LysoPC ou bien d'un problème d'évacuation des ions piégés dans les pores. Notons que dans le cas des acides, les silanes CH_3 long donnent des S/N aussi élevés que les silanes CH_3 court en RN. C'est cohérent avec les résultats du chapitre précédent sur le LysoPC où l'on montre que le S/N est meilleur en RP lorsque le LysoPC est dans les pores et en RN lorsque la molécule de LysoPC reste en surface. Le faible S/N avec les silanes NH_3^+ pourrait être en lien avec l'AP de ce silane qui est probablement supérieure à celle des silanes CH_3 court et du SiO_2 , comme expliqué au début du chapitre.

	Masse	CH_3 court	CH_3 long	COO^-	NH_3^+	SiO_2
Valine	55,1	8 ± 1	4 ± 1	4 ± 1	6 ± 1	17 ± 4
Créatine	132,1	6 ± 1	5 ± 1	4 ± 1	3 ± 1	11 ± 3
Glutamine	146,9	176 ± 17	48 ± 12	26 ± 4	50 ± 4	156 ± 13
Citrulline	162,9	45 ± 4	6 ± 1	5 ± 2	10 ± 5	50 ± 26
Phénylalanine	166,0	52 ± 10	11 ± 2	9 ± 3	53 ± 9	51 ± 6
Arginine	175,1	18 ± 6	9 ± 3	8 ± 3	8 ± 1	29 ± 13
Caféine	195,0	6 ± 1	3 ± 1	2 ± 0	2 ± 1	6 ± 1

Tableau 6.5 – Rapports S/N pour le pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ de la créatine, la glutamine, la phénylalanine, l'arginine, et la caféine et le principal fragment de la valine et la citrulline dans la solution multiplexée en RP en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.

La **valine** a une affinité protonique (910,6 kJ/mol) et une énergie d'ionisation (8,7 eV) proche de celles de la glycine et de l'alanine (respectivement 886,5 kJ/mol et 901,6 kJ/mol pour l'AP et 8,8 eV et 8,8 eV pour l'énergie d'ionisation) qui ne sont pas détectées. De plus, d'après une étude précédente, et comme la glycine et l'alanine, la valine est peu fragmentée par rapport à la méthionine, au tryptophane et à la leucine. Néanmoins, sa masse est plus élevée, ce qui pourrait expliquer la différence de détection. Le pic de fragment avec la plus grande intensité est à 72,0 m/z (en accord avec l'étude récente de Zavilopulo *et al.* sur la fragmentation de valine par impact d'électrons [250]). Cependant, dans la solution multiplexée, le pic de valine à 72,0 m/z ne peut pas être décorrélié de celui du fragment des lipides également à 72,0 m/z. En conséquence, le second pic de fragment à 55,0 m/z a été pris pour l'analyse de cet acide aminé. La **citrulline**, dont l'AP est plus élevée (985,3 kJ/mol) est également détectée uniquement grâce à des fragments, principalement à 162,9 m/z, en accord avec l'étude de Yin *et al.* en MALDI-MS [251].

L'**arginine** est chargée positivement à pH 7 et a une grande affinité protonique (1051,0 kJ/mol) ce qui empêcherait une détection en RN. Cependant, l'arginine est seulement faiblement

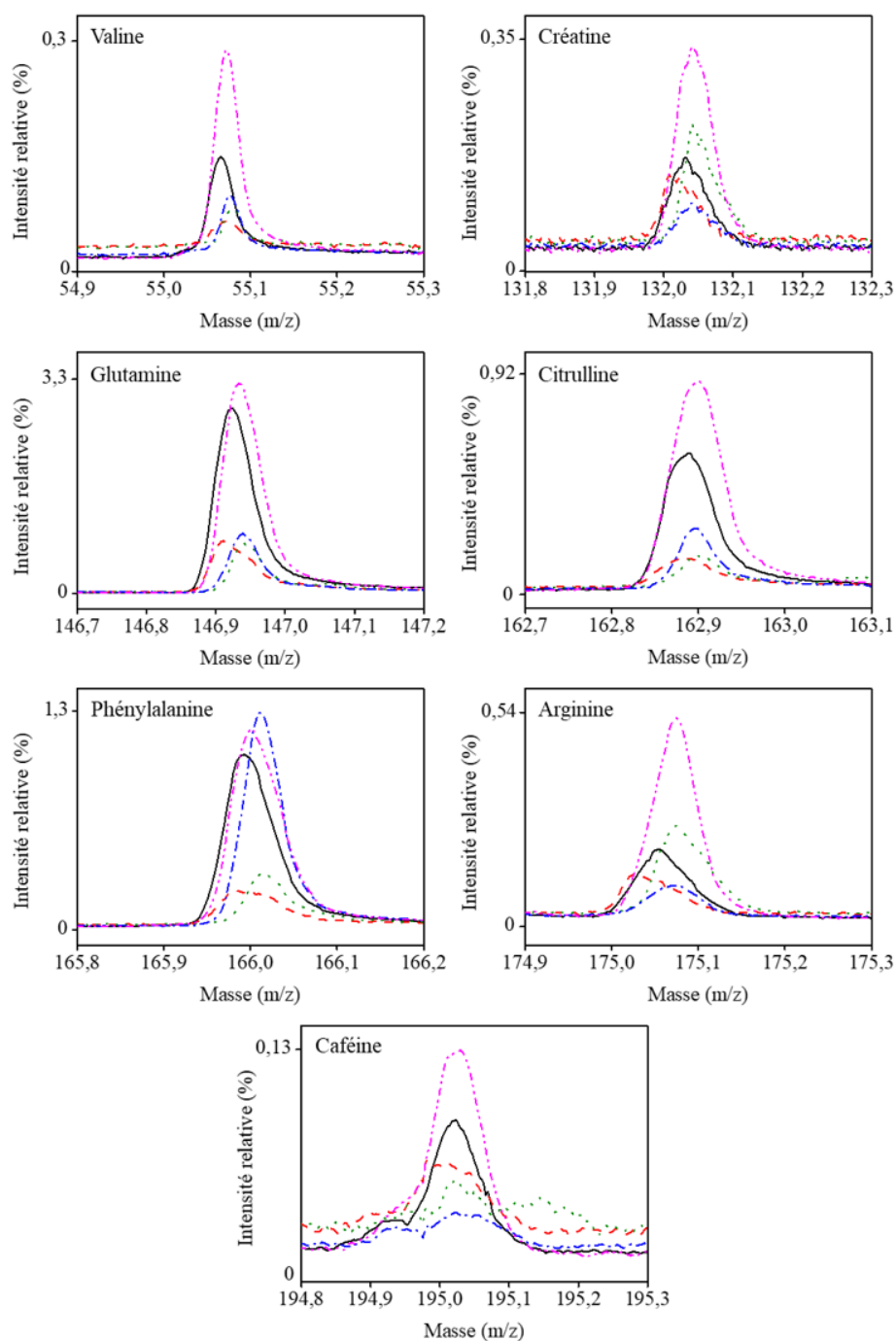


Figure 6.5 – Pic principal détecté en RP en DIOS-MS de la valine, la créatine, la glutamine, la citrulline, la phénylalanine, l’arginine et la caféine en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH₃ court, (tirets rouges) CH₃ long, (points verts) COO⁻, et (points-tirets bleus) NH₃⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. Ce pic correspond au pic [M+H]⁺ pour la créatine, la glutamine, la phénylalanine, l’arginine et la caféine et au fragment principal pour la valine et la citrulline. La normalisation TIC a été utilisée.

détectée en RP et principalement avec les silanes CH₃ court (S/N = 18) et la surface de SiO₂ (S/N = 31).

La **glutamine** et la **phénylalanine** sont aussi détectées à [M+H]⁺ (en accord avec [249]). De même que pour tous ces métabolites détectés uniquement en RP, la glutamine est mieux détectée sur les monocouches de CH₃ court (S/N = 178) et sur la surface de SiO₂ (S/N = 162). Cependant, dans le cas de la phénylalanine, le cycle aromatique pourrait provoquer une interaction cation- π avec les silanes NH₃⁺, ce qui pourrait influencer les S/N qui sont semblables pour les monocouches de CH₃ court (S/N = 51) et de NH₃⁺ (S/N = 54) et la surface de SiO₂ (S/N = 50). Notons que la glutamine et la phénylalanine sont mieux détectées que l'arginine (S/N = 29 au maximum sur la surface de SiO₂), alors que son AP (1051,0 kJ/mol) est supérieure à celles de la glutamine (937,8 kJ/mol) et de la phénylalanine (922,9 kJ/mol). Donc l'AP n'est pas déterminante à elle seule dans la détection des acides aminés. Il est probable, qu'il y ait un compromis avec, entre autres, l'enthalpie de déprotonation et l'énergie d'ionisation qui est plus faible pour la glutamine et la phénylalanine que l'arginine (respectivement 6,1 eV, 6,3 eV et 10,8 eV).

Enfin, la **créatine** et la **caféine** sont faiblement détectées à [M+H]⁺ en RP. La caféine n'est pas chargée à pH 7 et a une énergie d'ionisation faible (8,0 eV), proche de celle des métabolites qui ne sont jamais détectés, ce qui peut expliquer pourquoi le signal ne dépasse pas un rapport S/N de 6 sur la monocouche de CH₃ court et sur la surface de SiO₂. Ce signal est encore inférieur sur les autres surfaces et ne dépasse par la limite de détection de 3. Tout comme l'arginine, la créatine a un pKa supérieur à 7 (8,5), et ses S/N sont faibles. Néanmoins, son AP et son énergie d'ionisation ne sont pas connues.

6.3.3.c Les métabolites détectés uniquement en RN

Les métabolites qui ne sont détectés qu'en RN sont le **glutathion**, la **cystéine**, le **glucose** et la **taurine**. Les rapports S/N et les pics de détection sont donnés respectivement dans le Tableau 6.6 et dans la Figure 6.6.

	Masse	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	SiO ₂
Taurine	124,2	2330 ± 122	2353 ± 513	873 ± 207	1000 ± 73	1768 ± 7
Cystéine	168,2	12 ± 3	4 ± 1	6 ± 3	5 ± 1	13 ± 1
Glucose	179,2	6 ± 0	0	0	4 ± 1	8 ± 2
Glutathion	306,4	7 ± 2	8 ± 4	0	0	8 ± 2

Tableau 6.6 – Rapports S/N pour le pic [M-H]⁻ de la taurine, le glucose et le glutathion et le principal adduit de la cystéine dans la solution multiplexée en RN en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.

À pH 7, parmi les quatre métabolites, le **glutathion** est le seul qui a une charge nette négative, les autres sont globalement neutres. La faible détection du glutathion pourrait venir de sa masse élevée par rapport aux autres métabolites. En effet, nous avons vu dans le cas des lipides que les molécules à [M-H]⁻, dont les masses sont supérieures à 250 m/z ne sont

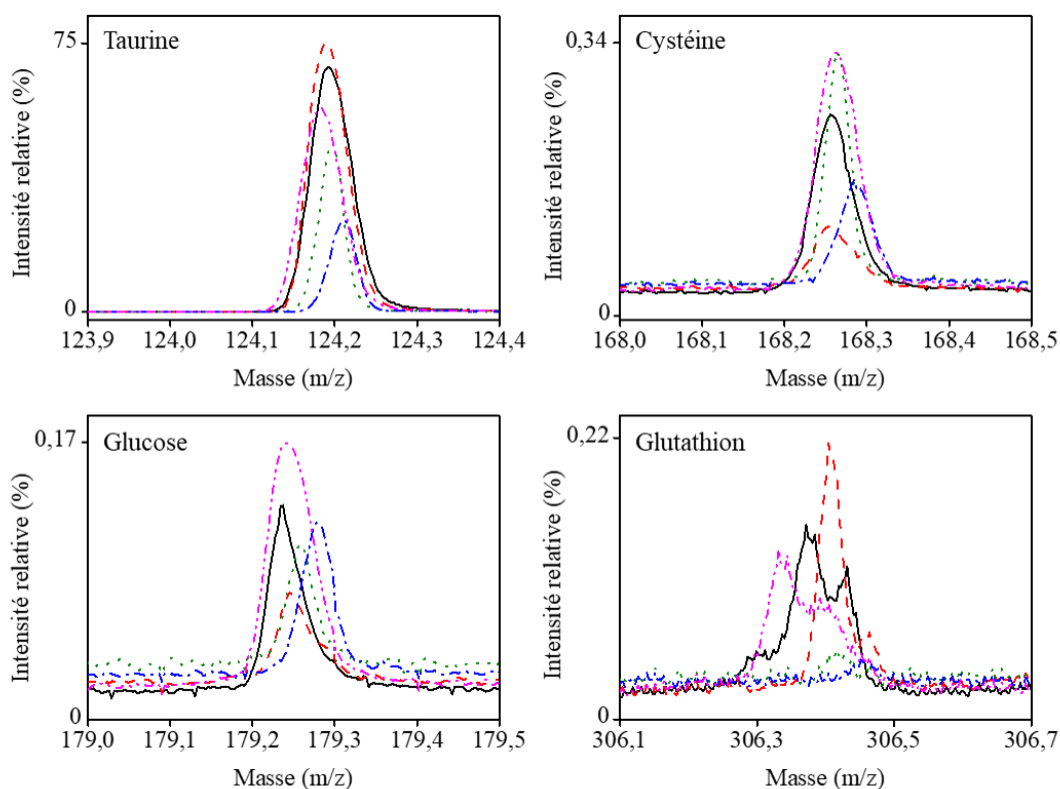


Figure 6.6 – Principal pic de détection de la taurine, la cystéine, le glucose, et le glutathion en RN en DIOS-MS en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH_3 court, (tirets rouges) CH_3 long, (points verts) COO^- , et (points-tirets bleus) NH_3^+ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.

pas détectées en RN. Le **glucose** n'est pas chargé mais possède six groupes hydroxyles qui pourraient expliquer sa détection en RN seulement. L'affinité protonique de la **cystéine** est aussi faible que celle des métabolites qui ne sont jamais détectés, ce qui explique qu'elle ne soit pas détectée non plus en RP. Sa grande énergie d'ionisation pourrait expliquer pourquoi le signal de la cystéine ne provient pas de ses fragments mais d'un adduit à 168,3 m/z (+ 47 m/z). Enfin, parmi tous les métabolites étudiés, la **taurine** est celui avec le plus grand S/N en RN. Comme pour les métabolites précédents, à notre connaissance, son affinité protonique ainsi que son énergie d'ionisation ne sont pas connues, il semblerait juste que son affinité protonique soit faible devant celle des acides aminés (au minimum 886,5 kJ/mol pour la glycine) [252].

Le S/N bas avec les silanes NH_3^+ (par rapport aux autres surfaces) pour les quatre métabolites pourrait s'expliquer par les interactions entre les métabolites et la surface qui diminuent la détection possible des ions négatifs. Le S/N est également bas avec le silane COO^- et pourrait être dû à un échange de proton entre la surface et les métabolites. Les énergies d'ionisation ne sont pas connues pour ces métabolites, il est donc difficile de valider cette hypothèse. Une affinité protonique plus forte pour le **glucose** et le **glutathion** que pour la **taurine** pourrait expliquer la détection de la taurine avec les silanes COO^- et la non détection pour le glucose et le glutathion, ainsi que les plus hauts S/N de la taurine pour toutes les surfaces par rapport aux

trois autres métabolites. On observe aussi une mauvaise détection du **glucose** et de la **cystéine** sur les silanes CH₃ long et un S/N élevé pour la **taurine** et le **glutathion**, nous ne savons pas expliquer cela. Dans l'ensemble, les silanes CH₃ court et le SiO₂ donnent les meilleurs rapports S/N pour les métabolites en RN.

6.3.3.d Le métabolite détecté en RP et en RN

Un seul métabolite (en dehors des lipides) est détecté avec les deux modes RP et RN : la **créatinine**, avec un signal faible dans les deux cas (Tableau 6.7 et Figure 6.7). En RP, la créatinine est principalement détectée sur la surface de SiO₂ non fonctionnalisée et sur la monocouche de silanes CH₃ court, comme c'est le cas pour les autres métabolites. En RN, aucune surface ne semble clairement se démarquer des autres pour la détection de la molécule. À pH 7, la créatinine est chargée positivement, ce qui pourrait expliquer le S/N plus élevée en RP qu'en RN.

Créatinine	Masse	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺	SiO ₂
RP	114,0	13 ± 1	7 ± 2	6 ± 2	6 ± 2	29 ± 3
RN	112,2	9 ± 1	7 ± 2	6 ± 3	3 ± 0	8 ± 1

Tableau 6.7 – Rapports S/N pour les pics [M+H]⁺ et [M-H]⁻ de la créatinine en RP et en RN dans la solution multiplexée en DIOS-MS. Les écarts types sont calculés à partir de 3 échantillons différents.

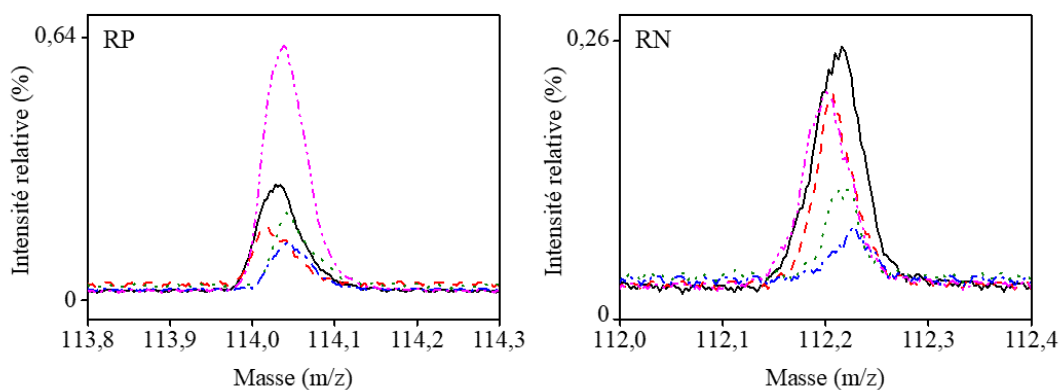


Figure 6.7 – À gauche, pic [M+H]⁺ de la créatinine en RP en DIOS-MS et à droite pic [M-H]⁻ de la créatinine en RN en DIOS-MS en solution multiplexée sur les cinq surfaces : le silicium poreux fonctionnalisé par des silanes (ligne noire) CH₃ court, (tirets rouges) CH₃ long, (points verts) COO⁻, et (points-tirets bleus) NH₃⁺ et (points-points-tirets magenta) du silicium poreux non fonctionnalisé. La normalisation TIC a été utilisée.

Pour résumer, cinq métabolites ne sont jamais détectés (**méthionine**, **tryptophane**, **glycine**, **alanine** et **leucine**). Sept métabolites sont préférentiellement détectés en RP. Parmi eux, la détection de la **phénylalanine** est meilleure avec les silanes NH₃⁺ probablement grâce aux interactions cation- π . Pour les sept autres métabolites, **valine**, **créatine**, **glutamine**, **citrulline**, **arginine**, **caféine** et **créatinine**, les silanes CH₃ court et la surface non fonctionnalisée

permettent une détection plus efficace que les silanes long grâce à une évacuation plus efficace des pores et que les silanes NH_3^+ dont l'affinité protonique n'est pas optimale. Enfin, le mode RN est préférable pour quatre métabolites et la surface offrant le signal le plus élevé est le silicium non fonctionnalisé pour la **cystéine**, le **glucose**, et le **glutathion** et les silanes CH_3 court pour la **taurine**. Les silanes CH_3 long sont aussi efficaces pour la taurine et le glutathion mais les variations entre les gouttes sont plus élevées que pour les autres surfaces.

Ces résultats ne semblent pas être corrélés aux énergies d'interaction obtenues en dynamique moléculaire. Si nous prenons l'exemple de la phénylalanine, dont la détection est bonne en DIOS-MS, nous avons vu que les surfaces les plus adaptées pour sa détection sont les silanes CH_3 court, NH_3^+ et le silicium non fonctionnalisé. Or, en dynamique moléculaire, sur de la silice poreuse, la surface offrant l'adsorption la plus efficace est la monocouche de silanes NH_3^+ (-240 ± 36 kJ/mol) et la moins efficace est la monocouche de silanes COO^- (-87 ± 26 kJ/mol). Les autres surfaces, CH_3 court, CH_3 long et silicium, donnent des énergies d'interaction équivalentes (respectivement -143 ± 54 , -147 ± 60 , et -120 ± 40 kJ/mol). En comparant les deux résultats, aucune tendance ne ressort. Il en est de même pour l'acide urique, autre métabolite bien détecté en DIOS-MS et commun avec l'étude de dynamique moléculaire. De plus, à la différence du MALDI, une molécule déposée sur la surface mais non adsorbée n'est pas nécessairement mieux détectée qu'une molécule adsorbée. En effet, la caféine qui ne s'adsorbe pas sur la surface de silicium non fonctionnalisée a un S/N 8,5 fois plus petit que la phénylalanine qui est adsorbée.

6.3.4 Perspectives : la détection des métabolites dans le plasma

Dans l'optique de faire des analyses en plasma comme pour le LysoPC, nous avons fait un test de lavage à l'eau sur la taurine seule en solution en RN, le mode pour lequel la taurine est détectée en DIOS-MS. Après juste un lavage, le signal disparaît totalement sur le SiO_2 . Néanmoins, seule la surface non fonctionnalisée a été testée, il est donc nécessaire de confirmer ce résultat avec les autres surfaces. De plus, il est probable qu'un travail soit nécessaire sur le choix du solvant pour le rinçage et sur la possibilité de modifier la tension superficielle de la solution de taurine pour éventuellement favoriser la capture dans les pores (avec l'acétonitrile par exemple).

6.4 Conclusion

Ce chapitre était consacré à l'étude DIOS-MS des 25 métabolites utilisés précédemment en MALDI-MS. La solution utilisée pour cette étude était une solution multiplexée contenant les 25 métabolites à une concentration de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cette solution a été déposée sur les quatre surfaces poreuses silanisées et le silicium poreux non fonctionnalisé. Les résultats ont montré que la détection des métabolites dépendait de leurs propriétés, en particulier de leurs groupes chimiques et de leur affinité protonique, ainsi que des éventuels échanges de protons avec la surface. Les meilleurs modes de détection et les meilleures surfaces pour chaque métabolite sont résumés dans le Tableau 6.8.

Pour les lipides, nous avons constaté qu'ils ne pouvaient être détectés que s'ils contenaient un groupe chimique de charge de même signe que le mode (RP ou RN), comme le groupe $N^+(CH_3)_3$ pour le LysoPC en RP par exemple. De plus, nous avons observé que les lipides étaient principalement détectés grâce à leurs fragments en RP et uniquement grâce aux fragments en RN et que le signal de la molécule complète était faible par rapport à celui des fragments (jusqu'à un facteur 100 pour les fragments les mieux détectés). Enfin, les lipides sont mieux détectés en RP lorsque la monocouche de silane a une chaîne alkyle courte, car les mesures en DIOS-MS sont plus efficaces lorsque les analytes se trouvent dans les pores, ce qui n'est pas possible avec les silanes longs, comme l'ont montré nos analyses de ToF-SIMS.

Les acides organiques ne sont détectés qu'en RN grâce à la perte d'un proton, ce qui suit la même logique qu'en solution avec les couples acide/base où l'acide perd également un proton. Peu de propriétés sur l'ionisation des acides dans du gaz sont connues mais le nombre de groupes chimiques déprotonables comme les groupes carboxyles semble influencer le signal de détection : l'acide citrique a un signal plus fort que l'acide pyruvique qui contient moins de groupements chimiques déprotonables.

Les métabolites du troisième groupe comprenant entre autres les acides aminés ont été analysés ensemble car ils présentent des propriétés chimiques similaires. Leur détection en RP est principalement liée à leur affinité protonique. Si l'AP est trop faible, les acides aminés ne sont pas détectés, tandis que lorsqu'elle augmente, un signal apparaît, comme c'est le cas pour la phénylalanine et la glutamine. Toutefois, une grande AP n'est pas synonyme d'un signal de détection élevé, comme le montrent les résultats pour l'arginine, et d'autres phénomènes sont importants comme probablement l'énergie d'ionisation. En général, les meilleures surfaces pour la détection des métabolites sont la surface de silicium non fonctionnalisée et les monocouches de silanes CH_3 court et NH_3^+ , comme pour les lipides.

En RN, la taurine se révèle être le métabolite le mieux détecté, grâce à des rapports S/N nettement supérieurs à ceux des autres métabolites de ce groupe. Cette excellente détection pourrait s'expliquer par la faible affinité protonique de la taurine comparée à celle des acides aminés. Les surfaces offrant les meilleurs rapports S/N sont celles qui présentent une charge faible ou nulle (SiO_2 et CH_3) par rapport aux silanes chargés. Il faut noter que les résultats obtenus en RP diffèrent de ceux obtenus en RN : l'efficacité des silanes n'est pas la même en fonction du mode de détection utilisé.

Parmi les métabolites étudiés, seule la créatinine est détectée en RP et en RN, en dehors des lipides. Cependant, le signal obtenu est très faible dans les deux cas, ce qui rend peu probable sa détection dans des milieux plus complexes.

Finalement, pour l'étude des métabolites sélectionnés, tous les silanes ont un intérêt pour au moins un métabolite excepté le silane COO^- qui est toujours celui offrant les signaux les plus faibles.

Enfin, les premiers essais de lavage de la surface après le dépôt de la taurine en solution sur une surface de SiO_2 poreux n'ont pas été concluants et il est nécessaire de poursuivre les recherches pour trouver la surface et le solvant permettant la meilleure détection de ce métabolite après lavage. Une fois que ces paramètres auront été trouvés, il sera possible de passer à l'étude

dans du plasma. Il est raisonnable de penser que pour des métabolites ayant des propriétés physico-chimiques semblables, comme les acides aminés, une fois que le protocole de lavage de la surface pour un métabolite spécifique aura été déterminé, il s'adaptera aux autres métabolites de la même catégorie, ce qui simplifiera cette étude préliminaire.

Métabolite	Détection	Masse (g/mol)	Choix 1		Choix 2	
			Mode	Surface	Mode	Surface
LysoPC	$[M+H]^+$	524,2	RP	NH_3^+	RP	CH ₃ court
Sphingomyéline	Fragments	-	RP	NH_3^+	RP	CH ₃ court
α -GPC	$[M+H]^+$	258,0	RP	CH ₃ court	RP	NH_3^+
LysoPG	Fragments	-	RN	SiO ₂	RN	CH ₃ court
Céramides	-	-	-	-	-	-
Acide citrique	$[M-H]^-$	192,3	RN	CH ₃ long	RN	CH ₃ court
Acide pyruvique	$[M-H]^-$	87,1	RN	CH ₃ long	RN	CH ₃ court
Acide urique	$[M-H]^-$	167,2	RN	SiO ₂	RN	CH ₃ court
Méthionine	-	-	-	-	-	-
Tryptophane	-	-	-	-	-	-
Glycine	-	-	-	-	-	-
Alanine	-	-	-	-	-	-
Leucine	-	-	-	-	-	-
Valine	Fragments	55,1	RP	SiO ₂	RP	CH ₃ court
Créatine	$[M+H]^+$	132,1	RP	SiO ₂	RP	CH ₃ court
Glutamine	$[M+H]^+$	146,9	RP	CH ₃ court	RP	SiO ₂
Citrulline	Fragments	162,9	RP	SiO ₂	RP	CH ₃ court
Phénylalanine	$[M+H]^+$	166,0	RP	NH_3^+	RP	CH ₃ court
Arginine	$[M+H]^+$	175,1	RP	SiO ₂	RP	CH ₃ court
Caféine	$[M+H]^+$	195,0	RP	CH ₃ court	RP	SiO ₂
Taurine	$[M-H]^-$	124,2	RN	CH ₃ long	RN	CH ₃ court
Cystéine	Adduit	168,2	RN	SiO ₂	RN	CH ₃ court
Glucose	$[M-H]^-$	179,2	RN	SiO ₂	RN	CH ₃ court
Glutathion	$[M-H]^-$	306,4	RN	SiO ₂	RN	CH ₃ long
Créatinine	$[M+H]^+$	114,0	RP	SiO ₂	RP	CH ₃ court

Tableau 6.8 – Meilleurs modes (RP ou RN) et surfaces pour la détection des 25 métabolites dans la solution multiplexée en DIOS-MS. Les lignes blanches correspondent aux métabolites qui ne sont jamais détectés.

Conclusion

Le diagnostic rapide du sepsis est un grand enjeu médical actuel et la quantification de métabolites biomarqueurs de la maladie directement dans du plasma sanguin est une solution prometteuse pour accélérer le diagnostic, et ainsi soigner plus rapidement les patients atteints de la maladie. Pour cela, la spectrométrie de masse par désorption-ionisation laser est une technique d'analyse dont la sensibilité est suffisante pour pouvoir analyser la composition d'une goutte de plasma. Cependant, les études sur la détection de métabolites dans du plasma restent très rares et nécessitent souvent de long pré-traitements des échantillons pour retirer les protéines abondantes.

L'objectif de cette thèse était de fabriquer et de caractériser les surfaces de silicium silanisées puis d'utiliser ces surfaces pour détecter les métabolites dans différents milieux pour s'approcher de la complexité du plasma sans pré-traitement. Un travail théorique parallèle de dynamique moléculaire avait également pour but d'étudier les interactions entre les métabolites et les surfaces en fonction du silane utilisé pour essayer de mettre en relation ces observations avec les résultats de spectrométrie de masse.

La fabrication des surfaces grâce à la fonctionnalisation en phase gazeuse, à partir de trois fours conçus dans le cadre du projet, et d'un quatrième four déjà présent dans l'équipe, a permis de silaniser de manière reproductible des surfaces de silicium poreux avec les quatre silanes CH_3 court, CH_3 long, COO^- , NH_3^+ . Chaque four était dédié à un silane pour éviter au maximum les contaminations entre les silanes. Nos caractérisations par angle de contact ont montré que l'hydrophobie des surfaces silanisées est équivalente à l'hydrophobie obtenue lors de la silanisation en phase liquide, également utilisée dans l'équipe. De plus, les analyses XPS permettent de conclure que les surfaces sont uniformes et la densité surfacique de silanes reproductible. Enfin, l'analyse en profondeur de ToF-SIMS a montré que la silanisation est conforme sur l'ensemble des pores. Ces protocoles pourront être utilisés également pour d'autres études dans l'équipe.

En dynamique moléculaire, trois surfaces de silice ont été modélisées : une surface plane, une en feuillets et une poreuse. Sur chacune de ces surfaces, les quatre silanes ont été greffés et les interactions entre les silanes et les métabolites ont été étudiées. Nous avons montré que

la surface de silice n'impactait pas les métabolites qui étaient adsorbés sur la surface mais la vitesse pour que cela se produise : l'état final est obtenu plus rapidement avec les surfaces en feuillets et poreuse parce que la surface totale de silice dans le système est plus importante que pour la silice plane. Les silanes CH_3 court sont les silanes qui permettent de capturer le plus de métabolites, en moyenne plus de 12 sur les 14 de l'étude, et les silanes chargés ont tendance à capturer les métabolites plus hydrophiles et de charge opposée à la charge du silane. Il est également possible qu'un métabolite soit capturé par une surface pour laquelle l'affinité chimique est mauvaise (métabolite hydrophile et chargé sur silane hydrophobe) grâce à un deuxième métabolite qui agit comme liaison entre le premier métabolite et la surface.

Notre étude de spectrométrie de masse a commencé par la technique MALDI pour l'étude des métabolites biomarqueurs du sepsis en solution sur les silanes. Lorsque ces métabolites sont mélangés, 9 parmi les 25 sont détectés en MALDI-MS avec des intensités différentes. En fonction des propriétés physico-chimiques des métabolites, la surface de silanes la plus efficace pour les détecter peut varier. Par exemple, les métabolites hydrophobes comme le LysoPC et la caféine sont mieux détectés sur le silicium poreux non fonctionnalisé alors que l'influence des silanes est moins importante pour les métabolites non chargés. En reprenant les résultats obtenus pour tous les métabolites, la surface offrant le meilleur compromis entre un bon signal et une bonne reproductibilité est le silane CH_3 court. Cependant, à des concentrations faibles, les pics de certains métabolites comme le LysoPC ne sont plus différenciables des pics de matrice ce qui rend leur étude dans un milieu plus complexe impossible en MALDI-MS.

Pour résoudre ce problème, nous avons continué les analyses de spectrométrie de masse avec la technique de DIOS-MS sans matrice. Nous avons commencé par étudier le LysoPC, le métabolite le mieux détecté en MALDI-MS dans notre panel de métabolites. Le LysoPC est détecté en RP et en RN mais à la différence du MALDI-MS, il est détecté principalement grâce à ses fragments. Toutefois, il est possible de détecter le LysoPC dans du plasma sans pré-traitement, uniquement en lavant la surface à l'eau ultrapure. Cela permet de détecter le LysoPC dans du plasma non modifié et également d'observer des différences de signal lorsque le LysoPC est artificiellement ajouté dans le plasma à plusieurs concentrations en RN et en RP.

Ces résultats nous ont amené à élargir l'étude DIOS-MS en reprenant la solution multiplexée contenant les 25 métabolites utilisés en MALDI-MS. Nous avons étudié cette solution en RP et en RN pour essayer de déterminer la meilleure surface pour détecter chaque métabolite. Parmi les 25 de la solution, 6 ne sont jamais détectés, ni en RN, ni en RP, 7 ne sont détectés qu'en RP, 8 uniquement en RN et 4 sont détectés dans les deux modes. En mode RP, les surfaces qui permettent de mieux détecter les métabolites sont le silicium poreux non fonctionnalisé et les monocouches de silane CH_3 court et NH_3^+ . En RN, les surfaces offrant les plus grandes intensités sont principalement le SiO_2 poreux et la monocouche de silanes CH_3 long.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Tout d'abord, pour la silanisation, il pourrait être intéressant de créer des monocouches de silane mixtes grâce aux fours de silanisation. Une seconde entrée a été installée sur deux des fours et permettrait de combiner les propriétés de chaque silane (un silane long et un court ou un silane non chargé et un chargé par exemple). Il a

été montré en dynamique moléculaire dans l'équipe que le mélange de couches de silanes pouvait améliorer l'adsorption des protéines sur la surface [227]. Il est possible que ce soit également le cas pour les métabolites et que le changement des propriétés optiques de la surface modifie également la détection en DIOS-MS.

Cette étude de mélange de silanes peut aussi être faite par simulation. Il est probable que la modification des couches de silane influence l'adsorption de certains métabolites. De plus, il pourrait être intéressant d'étudier le système poreux présenté dans la conclusion du Chapitre 3 à la page 120. Ce système, plus proche du pore réel permettrait d'étudier le comportement des métabolites mais aussi d'autres molécules comme des protéines dans un milieu confiné.

Enfin, en DIOS-MS, la prochaine étape est l'étude des métabolites du panel dans du plasma. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer un travail préparatoire sur le lavage des surfaces avant la mesure. Les premières mesures sur la taurine en RN ont montré que l'utilisation de l'eau sur un substrat de silicium poreux non fonctionnalisé enlevait tout le signal, il est donc nécessaire d'approfondir l'étude sur le sujet. Il serait par exemple intéressant de mélanger la taurine dans un autre solvant, comme de l'ACN, dont les propriétés de mouillabilité de la surface sont meilleures que l'eau. En diluant ensuite le plasma dans de l'ACN, on pourrait espérer détecter la taurine dans ce milieu. De plus, l'optimisation du solvant pour le lavage pourrait permettre une meilleure détection des métabolites.

Une fois que les conditions de détection des métabolites dans le plasma seront trouvées, un objectif plus lointain serait de séparer des échantillons de plasma sain d'échantillons de patients malade. Pour cela, une idée pourrait être de créer une puce composée de plusieurs zones fonctionnalisées différemment, chacune permettant de détecter au mieux certains métabolites biomarqueurs du sepsis. Nous aurions par exemple une zone composée de silicium poreux fonctionnalisée avec des silanes CH_3 court pour la détection entre autres du LysoPC. Une goutte serait ensuite déposée sur la plaque selon le protocole qui aura été déterminé avec les études précédentes puis la puce serait analysée en DIOS-MS. Nous obtiendrions alors autant de spectres que de zones présentes sur la plaque, ce qui nous permettrait de diagnostiquer l'état du patient. Pour cela, il est probable qu'il soit nécessaire d'analyser statistiquement les résultats. Nous pourrions par exemple imaginer une analyse en composante principale des spectres pour les différencier ou non d'un groupe d'échantillons de personnes saines pour déterminer si le patient est malade et lui prescrire l'antibiotique nécessaire le cas échéant.

Adsorption des métabolites sur de la silice en dynamique moléculaire

A.1 Analyse des interactions sur les surfaces silanisées

A.1.1 Capture des métabolites sur la silice plane

Les résultats obtenus en termes de nombre de capture et d'énergie d'interaction pour les surfaces de silice plane sont résumés dans le Tableau A.1 et Figure A.1. Cinq répliques ont été réalisés pour chaque silane.

A.1.1.a Silane CH₃ court

La majorité des 14 métabolites sont capturés par les silanes après 300 ns de simulation, la surface capturant le plus de métabolites étant la silice fonctionnalisée par des silanes CH₃ court. Parmi les 14 métabolites, 10 sont capturés sur tous les répliques, ce sont : la **carnitine**, l'**acide urique**, la **phénylalanine**, le **tryptophane**, le **glutathion**, la **méthionine**, la **glutamine**, le **glucose**, la **cystéine** et la **glycine**.

Les seuls métabolites qui ne sont pas capturés sur chaque réplique sont la créatine, la caféine, l'arginine et l'acide myristique. Tous ces métabolites sont toutefois adsorbés sur la surface sur au moins un réplique. Dans le cas de la **créatine** et de l'**arginine**, ce sont les deux métabolites les plus chargés de l'étude (-1 pour la créatine et 0,89 pour l'arginine). Or, les silanes CH₃ court sont des silanes non chargés et hydrophobes, ce qui peut expliquer le faible nombre de répliques où ces métabolites sont capturés.

Au contraire, la **caféine** et l'**acide myristique** sont les deux métabolites les plus hydrophobes de l'étude et pourtant, ces deux métabolites ne sont pas ceux qui sont les plus capturés. En réalité, ce résultat est dû à un artefact de modélisation : le vide qui se trouve en haut de la boîte de simulation. Lorsque la molécule d'acide myristique ou de caféine atteint cette partie

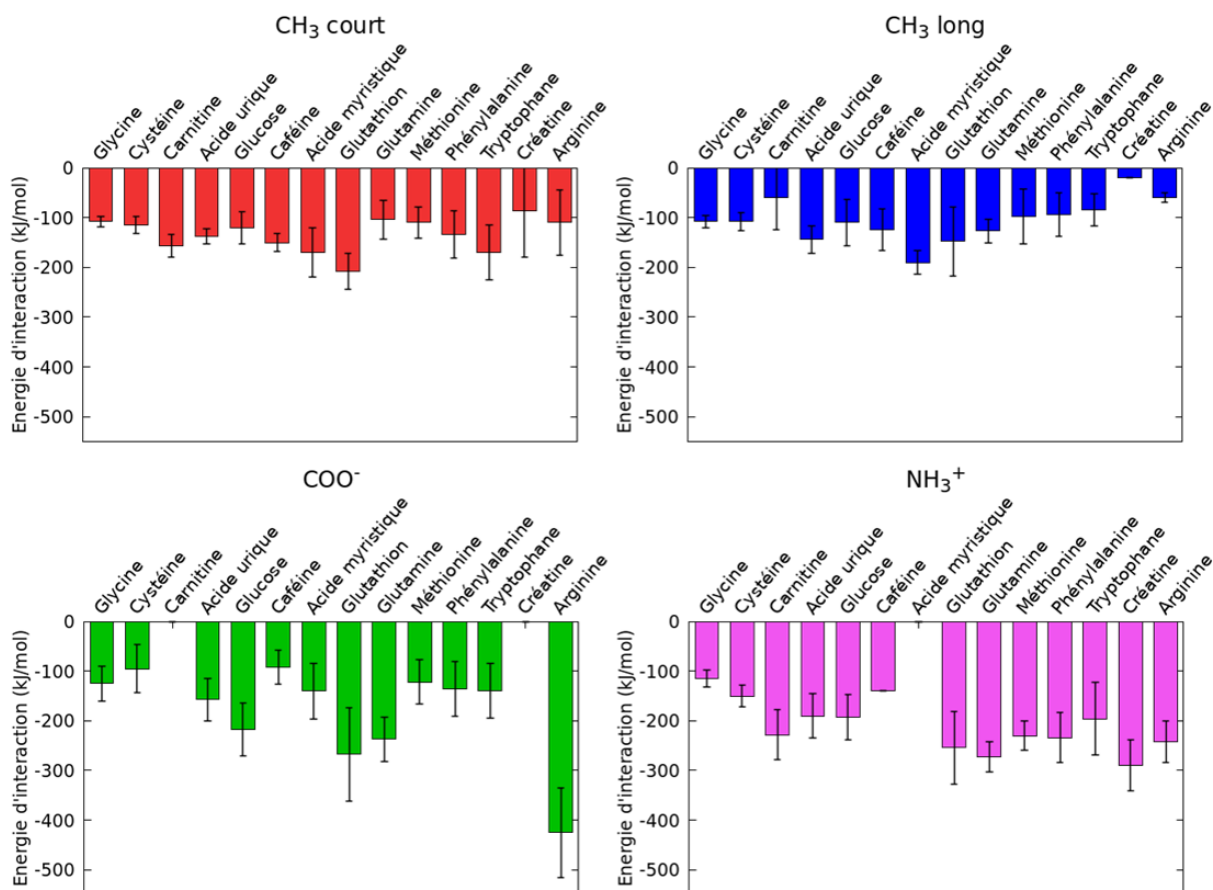


Figure A.1 – Énergie d'interaction moyenne sur de la silice plane entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de (a) CH₃ court, (b) CH₃ long, (c) COO⁻, et (d) NH₃⁺, et entre les métabolites et la silice pour (e) la silice non fonctionnalisée. Seuls les répliques pour lesquels il y a contact entre les silanes et les métabolites sont pris en compte. Les écarts types sont obtenus à partir de ces répliques.

Métabolite	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺
Glycine	5	4	3	5
Cystéine	5	5	5	3
Carnitine	5	3	0	5
Acide urique	5	5	5	5
Glucose	5	4	5	4
Caféine	4	5	5	1
Acide myristique	4	3	2	0
Glutathion	5	5	5	5
Glutamine	5	3	5	5
Méthionine	5	4	5	5
Phénylalanine	5	5	5	5
Tryptophane	5	5	4	5
Créatine	3	1	0	5
Arginine	3	2	5	5

Tableau A.1 – Nombre de captures de chaque métabolite sur cinq réplias par les quatre surfaces planes.

du système, elle reste bloquée à cet endroit parce qu'elle minimise son contact avec l'eau et se trouve donc à un équilibre.

A.1.1.b Silane CH₃ long

Pour la surface de silice fonctionnalisée par des silanes CH₃ long, il y a moins de métabolites qui sont capturés sur tous les réplias (6 sur 14), ce sont : l'**acide urique**, la **phénylalanine**, le **tryptophane**, le **glutathion**, la **caféine** et la **cystéine**. Exceptée la caféine, ces métabolites étaient également capturés avec les silanes CH₃ court. Dans le cas de la caféine, elle ne se retrouve jamais coincée en haut de la boîte, ce qui explique que le résultat soit différent du silane précédent.

Les métabolites qui ne sont pas capturés à 100 % sont la carnitine, la créatine, la méthionine, la glutamine, l'arginine, le glucose, l'acide myristique et la glycine. Les silanes CH₃ long étant plus hydrophobes que les silanes CH₃ court, l'explication donnée pour les métabolites chargés, la **créatine** et l'**arginine**, reste vraie avec ces silanes. De même pour l'**acide myristique**, pourtant hydrophobe, qui n'est pas capturé dans le cas où la molécule reste bloquée à l'interface entre l'eau et le vide.

À la différence des CH₃ court, d'autres métabolites, parmi les plus hydrophiles, ne sont pas capturés après les 300 ns de simulation. Dans certains cas, les molécules sont capturées à la fin de la simulation grâce à l'aide d'un autre métabolite. La **carnitine**, par exemple, qui a une

interaction faible avec les silanes, a tendance à se lier à l'acide urique, plus hydrophobe et donc plus facilement capturé par les silanes CH₃ long (à droite sur la Figure A.2). Cet intermédiaire permet à la carnitine d'être capturée par les silanes mais ces conditions particulières ne sont pas systématiquement réunies et la carnitine n'est pas capturée pour tous les réplicas. On retrouve aussi ce phénomène avec la **glutamine** qui est liée dans un cas à la caféine et dans un autre à l'acide urique, probablement avec des liaisons hydrogènes. Malgré son hydrophilie, la glutamine est tout de même capturée par les silanes sans l'aide d'un autre métabolite dans deux productions : la molécule peut s'orienter de façon à éloigner ses parties chargées et électronégatives des silanes.

Enfin, les autres métabolites hydrophiles (glucose, méthionine et glycine) qui ne sont pas capturés dans tous les réplicas nécessitent des conditions particulières sur les silanes pour pouvoir s'adsorber. La condition commune pour ces trois métabolites est qu'ils nécessitent une zone de silane où la densité est plus faible, un trou dans la couche de silanes par exemple (Figure A.2). Le **glucose** a besoin de ce trou : il est capturé par les chaînes des silanes en périphérie du regroupement de silanes. Cela lui permet de maximiser sa surface de contact avec l'eau et d'être capturé après les 300 ns de simulation. Il en est de même pour la **méthionine**. La molécule contient un atome de soufre à l'une de ses extrémités. Cet atome hydrophobe est l'atome permettant à la méthionine d'être capturée par les silanes alors que l'autre côté de la molécule est hydrophile et chargé. Il faut donc une orientation spécifique de la molécule pour arriver à la capturer par les silanes, cette position n'est pas atteinte dans l'une des productions. Enfin, la **glycine**, qui est le plus petit métabolite de notre étude est aussi une molécule hydrophile. Elle a tendance à interagir préférentiellement avec la base trifonctionnelle des silanes, lorsque ceux-ci sont sur les bords des trous, plutôt qu'avec la chaîne alkyle. Cette base est cependant difficilement atteignable depuis le volume d'eau et, dans une des productions, la glycine reste dans l'eau.

Cependant, certains métabolites hydrophiles sont capturés dans toutes les productions, en particulier le **glutathion**. Comme la méthionine, le glutathion contient un atome de soufre. C'est cet atome de soufre qui permet à la molécule d'être capturée par les silanes : la molécule s'oriente pour isoler son atome de soufre qui interagit avec les silanes et éloigner sa partie plus hydrophile.

A.1.1.c Silane COO⁻

Le silane COO⁻ est chargé négativement à pH 7, le pH de l'étude, ce qui ajoute des interactions électrostatiques entre les métabolites et les silanes. Cela se voit par exemple pour l'arginine, le seul métabolite chargé positivement, dont l'énergie d'interaction avec les silanes COO⁻ est de -388 kJ/mol alors qu'elle était de -110 kJ/mol avec les silanes CH₃ court par exemple. Sur les 14 métabolites, 9 sont capturés dans tous les réplicas : l'**acide urique**, la **phénylalanine**, le **glutathion**, la **caféine**, la **méthionine**, la **glutamine**, l'**arginine**, le **glucose** et la **cystéine**. Les autres, la carnitine, le tryptophane, la créatine, l'acide myristique et la glycine, ne sont pas capturés dans au moins une des cinq productions.

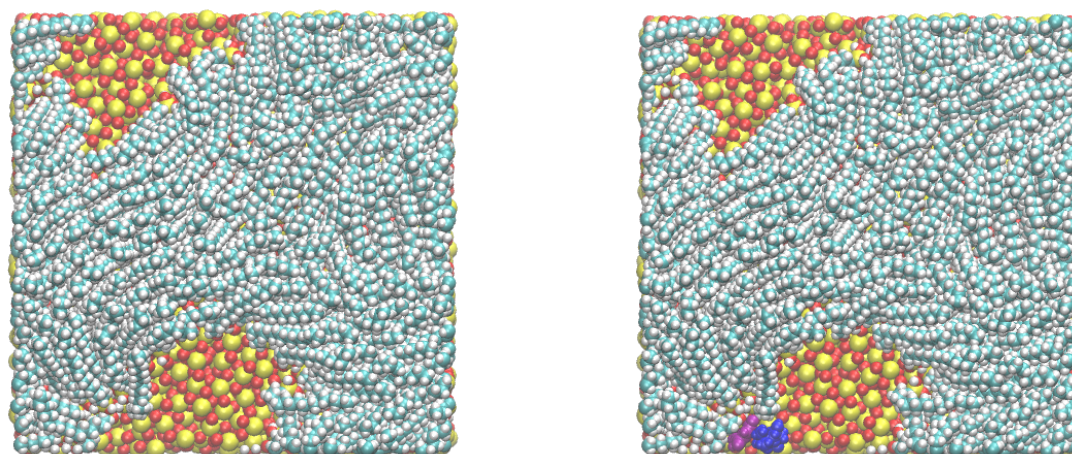


Figure A.2 – À gauche, monocouche de silanes CH_3 long sur une surface de silice et à droite interaction indirecte entre les silanes CH_3 long et la carnitine (en bleu) par l'intermédiaire de l'acide urique (en violet). Les atomes jaunes représentent le silicium, les rouges l'oxygène, les cyans le carbone, et les blancs l'hydrogène.

Deux métabolites ne sont jamais capturés par les silanes COO^- : la **carnitine** et la **créatine**. Le cas de la créatine s'explique parce que, contrairement à l'arginine, le métabolite est chargé négativement, les forces électrostatiques entre le métabolite et les silanes sont donc répulsives. La carnitine est différente car sa charge globale est nulle à pH 7. Cependant, la charge partielle positive est due à un ammonium quaternaire, la charge étant portée par l'azote centrale. Cet "emprisonnement" de la charge positive alors que la charge négative reste accessible rend la capture par les silanes COO^- chargés négativement difficile, ce qui pourrait expliquer pourquoi la molécule n'est pas capturée.

Parmi les autres métabolites qui ne sont pas capturés à 100 % par les silanes, nous retrouvons aussi le tryptophane, l'acide myristique et la glycine. Dans le cas de l'**acide myristique**, les interactions avec les silanes ne sont pas nulles mais restent faibles car la molécule est très hydrophobe. Le métabolite est capturé par les chaînes alkyles des silanes mais dans la moitié des cas, comme pour les autres silanes, l'acide myristique remonte à l'interface avec le vide. Le **tryptophane** est également un des métabolites les moins hydrophiles ($\log P = -1,1$) grâce à ses deux cycles hydrophobes. L'énergie d'interaction avec les silanes est aussi faible. Pour une bonne capture, il est nécessaire que la molécule soit capturée par la chaîne alkyle des silanes et non le groupe chargé. Dans l'une des productions, ces conditions ne sont pas réunies et la molécule reste dans l'eau.

Enfin, le cas de la **glycine**, hydrophile, avec les silanes COO^- est proche de celui avec les silanes CH_3 long. En effet, la molécule étant petite, sans partie plus hydrophobe que le reste, il est difficile pour elle d'être capturée par les silanes. Dans notre cas, lorsque la molécule est capturée, soit elle se trouve proche de la silice, au niveau de la base des silanes, soit elle est collée à un autre métabolite plus hydrophobe, lui-même capturé par les silanes. Sans ces conditions, la glycine n'est pas capturée.

A.1.1.d Silane NH_3^+

Enfin, le silane NH_3^+ est chargé +1 à pH 7 et sa chaîne carbonée est moins longue que celle du COO^- (3 carbones pour le NH_3^+ contre 11 pour le COO^-). Le caractère hydrophobe de la chaîne alkyle est donc moins important que pour les autres silanes et cela se retrouve sur la nature des métabolites capturés. 10 sont capturés sur tous les réplicas : la **carnitine**, l'**acide urique**, la **phénylalanine**, le **tryptophane**, le **glutathion**, la **créatine**, la **méthionine**, la **glutamine**, l'**arginine** et la **glycine**. Les autres, c'est-à-dire, la caféine, le glucose, l'acide myristique et la cystéine ne sont pas capturés dans au moins une des cinq productions.

Comme pour les silanes non chargés, l'**acide myristique** et la **caféine** se comportent de la même façon : ces deux molécules étant les plus hydrophobes, elle sont peu ou pas capturées par les silanes NH_3^+ . L'acide myristique est systématiquement en haut de la boîte, au niveau de l'interface entre l'eau et le vide et la caféine reste dans l'eau dans toutes les productions sauf une, pour laquelle la molécule est collée à la molécule de carnitine qui bloque les charges positives des silanes.

La **cystéine** est capturée dans 60 % du temps mais dans deux productions, elle reste dans l'eau sans s'adsorber sur la surface. Cela peut venir de son atome de soufre hydrophobe qui empêche la capture. En effet, pour chaque capture, l'atome de soufre est orienté à l'opposé des terminaisons amines des silanes, ce qui nécessite une orientation spécifique du métabolite. La méthionine et le glutathion sont aussi deux métabolites contenant un atome de soufre mais leur taille plus grande leur permet de garder l'atome de soufre plus éloigné des silanes et ainsi diminuer son effet sur l'attraction des molécules par les silanes. Cela explique pourquoi ces deux métabolites sont capturés pour tous les réplicas alors que ce n'est pas le cas de la cystéine.

Enfin, lors d'une des productions, la molécule de **glucose** n'est pas capturée par les silanes. À partir de la structure de la molécule, rien n'indique une faible affinité entre les silanes et le glucose : il est hydrophile et contient plusieurs atomes électronégatifs. Cependant, il semble que le glucose soit difficilement capturé par les silanes NH_3^+ . En effet, même lors des productions pour lesquelles le glucose est capturé, cela peut prendre jusqu'à plus de 150 ns alors qu'en moyenne, cela se fait lors des 100 premières nanosecondes de la production pour les autres métabolites. Le glucose entre dans la troisième catégorie des métabolites présentés dans la section 3.2.4.b à la page 108 : la molécule alterne entre une capture par les silanes et un détachement de la surface.

A.1.2 Capture des métabolites sur la silice en feuillets

La silice en feuillets a l'avantage par rapport à la silice plane de supprimer la zone de vide sur la partie supérieure de la boîte, où les métabolites hydrophobes pouvaient se retrouver bloqués. De plus, comme cela pouvait se voir sur la Figure 3.8, il y a au total plus de métabolites capturés après 300 ns sur certaines des surfaces de silice en feuillet par rapport aux mêmes couches de silane sur la silice plane. De plus, nous allons voir dans la suite que les quelques métabolites qui ne sont pas capturés avec la silice en feuillets sont des métabolites qui n'étaient déjà pas capturés avec les surfaces de silice plane. Les résultats de capture et d'énergies d'interaction entre les métabolites et les surfaces sont données dans le Tableau A.2 et la figure A.3. Attention,

trois répliques pour chaque silane ont été faits avec ce système pour des raisons de temps de calcul.

Métabolite	CH ₃ court	CH ₃ long	COO ⁻	NH ₃ ⁺
Glycine	3	3	3	3
Cystéine	3	3	3	3
Carnitine	3	3	0	2
Acide urique	3	3	3	3
Glucose	3	3	3	3
Caféine	3	3	3	3
Acide myristique	3	3	1	0
Glutathion	3	3	3	3
Glutamine	3	2	3	3
Méthionine	3	3	3	3
Phénylalanine	3	3	3	3
Tryptophane	3	3	3	3
Créatine	2	2	1	3
Arginine	3	3	3	2

Tableau A.2 – Nombre de captures de chaque métabolite sur trois répliques par les quatre surfaces en feuillets.

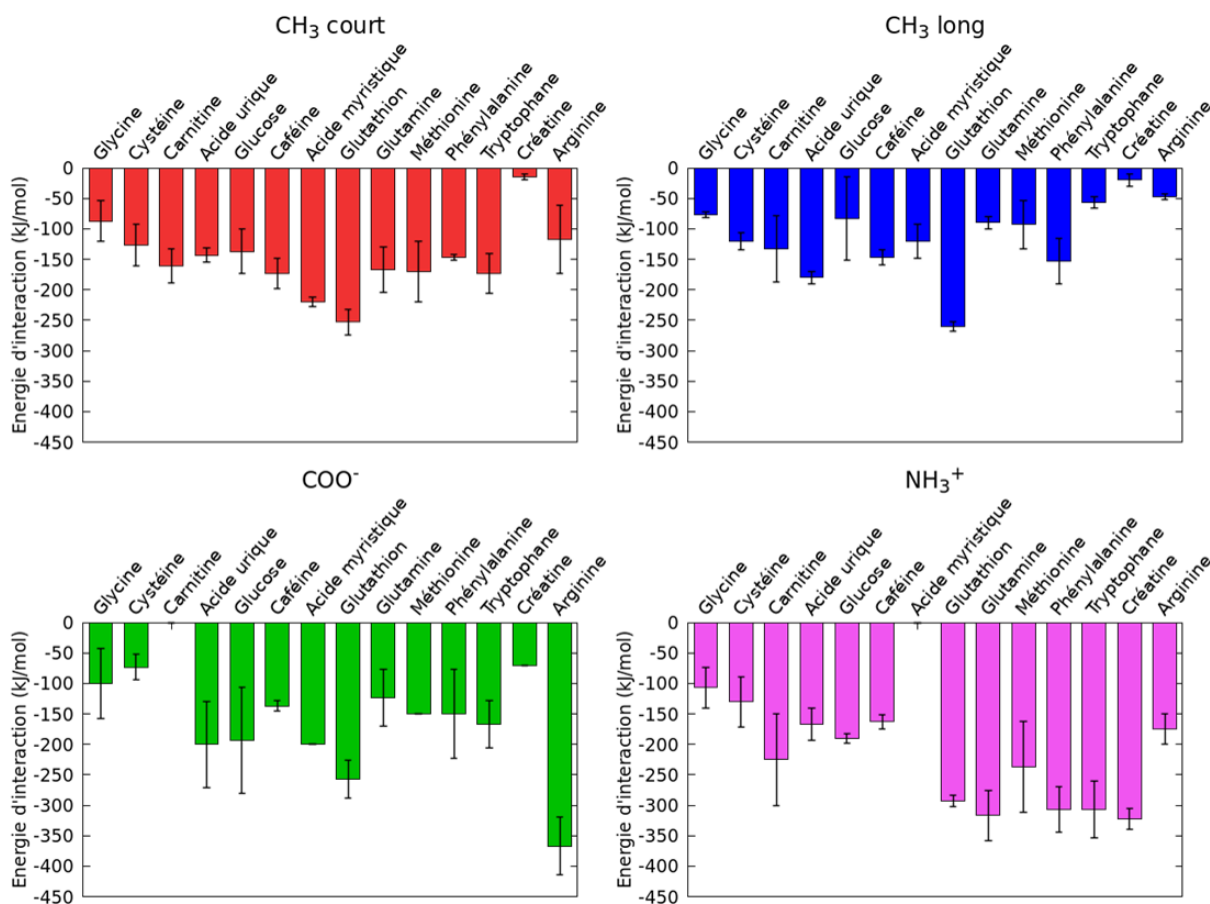


Figure A.3 – Énergie d'interaction moyenne sur de la silice en feuillets entre les métabolites et les silanes pour les surfaces de CH₃ court, CH₃ long, COO⁻, et NH₃⁺. La moyenne est faite sur les productions pour lesquelles le métabolite est capturé à la fin des 300 ns. Les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.

A.1.2.a Silane CH₃ court

Premièrement, avec la surface de silanes CH₃ court, 13 métabolites sont fixés sur la surface dans tous les réplicas. Seule la **créatine** n'est pas capturée dans une des 3 productions (comme sur la silice plane). De plus, lorsque la créatine est capturée, son énergie d'interaction avec les silanes est presque nulle et la molécule peut se décrocher de la surface après quelques nano-secondes. En comparant les énergies entre la silice plane et la silice en feuillet, nous pouvons voir que les énergies sont légèrement plus fortes dans le deuxième cas. Cette énergie étant très dépendante de la position des métabolites sur les silanes, il est possible que le fait que la capture soit plus rapide sur la silice en feuillets que sur la silice plane ait une influence sur les énergies. En effet, nous avons vu que certaines molécules pouvaient avoir plusieurs positions d'équilibre sur une surface, avec une mobilité différente (paragraphe 1.6.2.b, à la page 50). En augmentant le temps des métabolites sur la surface, on augmente les chances qu'une position d'équilibre plus stable soit atteinte, ce qui permet de maximiser l'énergie d'interaction en valeur absolue.

Parmi les autres métabolites, si nous regardons leur énergie d'interaction avec les silanes, nous pouvons voir que les deux métabolites les mieux fixés sur la surface de silane, et ainsi minimisent l'énergie d'interaction, sont le **glutathion** et l'**acide myristique**. Dans le cas de

l'acide myristique, sa longue chaîne alkyle qui se pose sur les silanes lui permet d'augmenter les interactions de van der Waals entre les silanes et la molécule. Pour le glutathion, c'est l'atome de soufre qui joue ce rôle : la molécule s'oriente pour que le soufre soit proche de la couche de silanes. De plus, son nombre d'atomes de carbone est plus grand que la moyenne des métabolites de l'étude, ce qui lui permet de plus interagir avec les silanes.

Enfin, nous pouvons remarquer que l'arginine est capturée sur tous les réplicas avec la silice en feuillets, ce qui n'était pas le cas avec la silice plane fonctionnalisée par les silanes CH_3 court. Cependant, les énergies dans les deux cas sont semblables et les variations sont grandes (-110 ± 66 kJ/mol pour la silice plane et -117 ± 56 pour la silice en feuillets). Cette différence pourrait venir du fait que l'arginine peut être liée à la glutamine en plus d'être fixée sur les silanes, ce qui peut stabiliser le métabolite sur la surface.

A.1.2.b Silane CH_3 long

Comme pour le silane CH_3 court, on retrouve avec le silane CH_3 long, une meilleure capture des métabolites sur tous les réplicas avec la silice en feuillets plutôt qu'avec la silice en plane. 12 métabolites sont capturés pour chaque production et seules la créatine et la glutamine ne le sont pas à chaque fois.

Même si la **créatine** est capturée plus souvent avec la silice en feuillets qu'avec la silice plane, son comportement est similaire. Malgré deux captures sur les trois réplicas, l'énergie d'interaction entre la créatine et les silanes est faible et sa capture ne peut se faire que lorsque les ions présents dans le milieu neutralisent les charges de la créatine. Même dans le cas où des ions entourent la molécule de créatine, le métabolite a une meilleure affinité avec la silice que les silanes et sa capture se fait en majorité par la silice, ce qui explique l'énergie d'interaction avec les silanes presque nulle dans la Figure 3.13.

Le seul autre métabolite qui n'est pas systématiquement capturé par les silanes est la **glutamine**, un métabolite qui n'était déjà pas capturé dans chaque réplica avec la silice plane fonctionnalisée par des silanes CH_3 long. Ici, dans le cas où la glutamine n'est pas capturée par les silanes, elle est capturée par la silice au niveau des mêmes trous dans la couche de silane qui étaient visibles avec la silice plane. On peut donc dire que la glutamine est capturée par la surface, même si son affinité avec la silice est plus forte qu'avec les silanes.

À la différence de la silice plane, l'**acide myristique** est toujours capturé par les silanes CH_3 long avec la silice en feuillets. Cela confirme l'hypothèse selon laquelle, la capture de l'acide myristique est uniquement due au fait que la molécule atteigne en premier l'interface entre l'eau et le vide en haut de la boîte, artefact de la simulation, ou la surface de silane en bas. Dans le cas de la silice en feuillet, il n'y a pas de vide dans la boîte, ce qui explique que l'acide myristique est capturé à 100 %. D'autres métabolites qui n'étaient pas capturés sur tous les réplicas avec la silice plane sont fixés à la surface pour chaque simulation avec la silice en feuillet. Ce sont : la **carnitine**, la **méthionine**, l'**arginine**, le **glucose** et la **glycine**. Dans la majorité des cas, la capture des métabolites cités est possible grâce à un autre métabolite qui fait le lien entre les silanes et le métabolite. Ce deuxième métabolite compense la faible énergie d'interaction des

premiers avec les silanes CH_3 long. Dans certains cas plus rares, on observe également que les étabolites interagissent plus avec la silice que les silanes, comme c'était le cas pour la glutamine.

A.1.2.c Silane COO^-

Avec les silanes COO^- , 11 métabolites sont systématiquement capturés par les silanes : l'**acide urique**, la **phénylalanine**, le **tryptophane**, le **glutathion**, la **caféine**, la **méthionine**, la **glutamine**, l'**arginine**, le **glucose**, la **cystéine** et la **glycine**. Les trois autres métabolites sont la carnitine, la créatine et l'acide myristique.

Avec la silice en feuillets, comme avec la silice plane, la **carnitine** n'est jamais capturée après les 300 ns de simulation. Le fait que son atome d'azote chargé positivement est entouré par trois carbones bloque l'interaction de cet atome avec la surface, comme dans le cas de la silice plane.

La **créatine**, métabolite chargé négativement, est capturée une fois sur trois sur la silice en feuillets et jamais sur la silice plane. Cependant, les conditions sont particulières. En effet, la créatine est capturée par des silanes sur lesquels un ion Na^+ est déposé. Cet ion permet de neutraliser la terminaison chargée des silanes et de capturer la créatine malgré sa charge négative. Ces conditions ne se sont produites que pour une des simulations et l'énergie d'interaction est l'une des plus faibles obtenues avec ces silanes.

Enfin, l'**acide myristique** est aussi un métabolite qui n'est capturé qu'une fois sur les trois productions. L'opposition entre la longue chaîne alkyle des silanes et leur terminaison chargée n'est pas favorable à sa capture dans ces conditions, malgré l'absence d'une zone de vide qui pourrait attirer la molécule.

Pour finir, le profil des énergies est le même que pour la silice plane, avec en particulier l'**arginine**, métabolite chargé positivement dont l'énergie avec la surface de silanes est la plus forte en valeur absolue.

A.1.2.d Silane NH_3^+

Pour la surface de silanes NH_3^+ , la dernière surface silanisée, les résultats sont comparables à la silice plane, à la différence que plus de métabolites sont capturés avec la silice en feuillets : 11 sur les 14 au total. Seuls l'acide myristique, l'arginine et la carnitine ne sont pas capturés dans tous les réplicas.

Comme dans le cas de la surface plane, l'**acide myristique**, n'est jamais capturé à cause de son caractère hydrophobe. Même si c'est une molécule hydrophile, l'**arginine** a une charge globale positive à pH 7, de même signe que les silanes, ce qui explique pourquoi elle n'est pas capturée dans une des productions

Le cas de la **carnitine** est différent des autres parce que le métabolite était capturé pour chaque réplica dans le cas des silanes NH_3^+ sur la silice plane. Il arrive que la carnitine se désorbe de la surface puis s'adsorbe de nouveau après quelques nanosecondes. La carnitine est donc un métabolite entrant dans la troisième catégorie de comportement définie à la page 108.

Ce phénomène n'étant que temporaire et de courte durée, il n'est pas visible systématiquement lors de l'analyse des répliques.

A.1.2.e Conclusion sur la silice en feuillets

Pour conclure, le comportement des métabolites sur la silice en feuillets est proche de celui de la silice plane mais les captures sont plus rapides, ce qui explique pourquoi certains métabolites sont capturés sur un plus grand nombre de répliques avec la silice en feuillets. De plus, cette capture plus rapide permet d'optimiser la position des métabolites sur la surface. Cela implique que, dans certains cas, l'énergie d'interaction est plus grande en valeur absolue avec la silice en feuillets. Dans l'ensemble, les métabolites qui sont capturés par chaque silane sont les mêmes quelle que soit la configuration de la surface. La silice en feuillets présente donc l'intérêt de diminuer la durée nécessaire de simulation pour arriver au même résultat que la silice plane et ainsi diminuer le temps de calcul nécessaire pour les analyses.

A.2 Résultats sur les surfaces de silice non fonctionnalisées

Silice	Plane	En feuillets	Poreuse
	/5	/3	/3
Glycine	0	0	0
Cystéine	0	0	0
Carnitine	0	1	1
Acide urique	0	1	1
Glucose	0	1	1
Caféine	0	0	0
Acide myristique	0	2	0
Glutathion	2	1	3
Glutamine	5	2	3
Méthionine	5	3	2
Phénylalanine	5	2	2
Tryptophane	4	2	3
Créatine	5	2	3
Arginine	2	3	2

Tableau A.3 – Nombre de captures de chaque métabolite sur sur la silice plane, la silice en feuillets et la silice poreuse non fonctionnalisées.

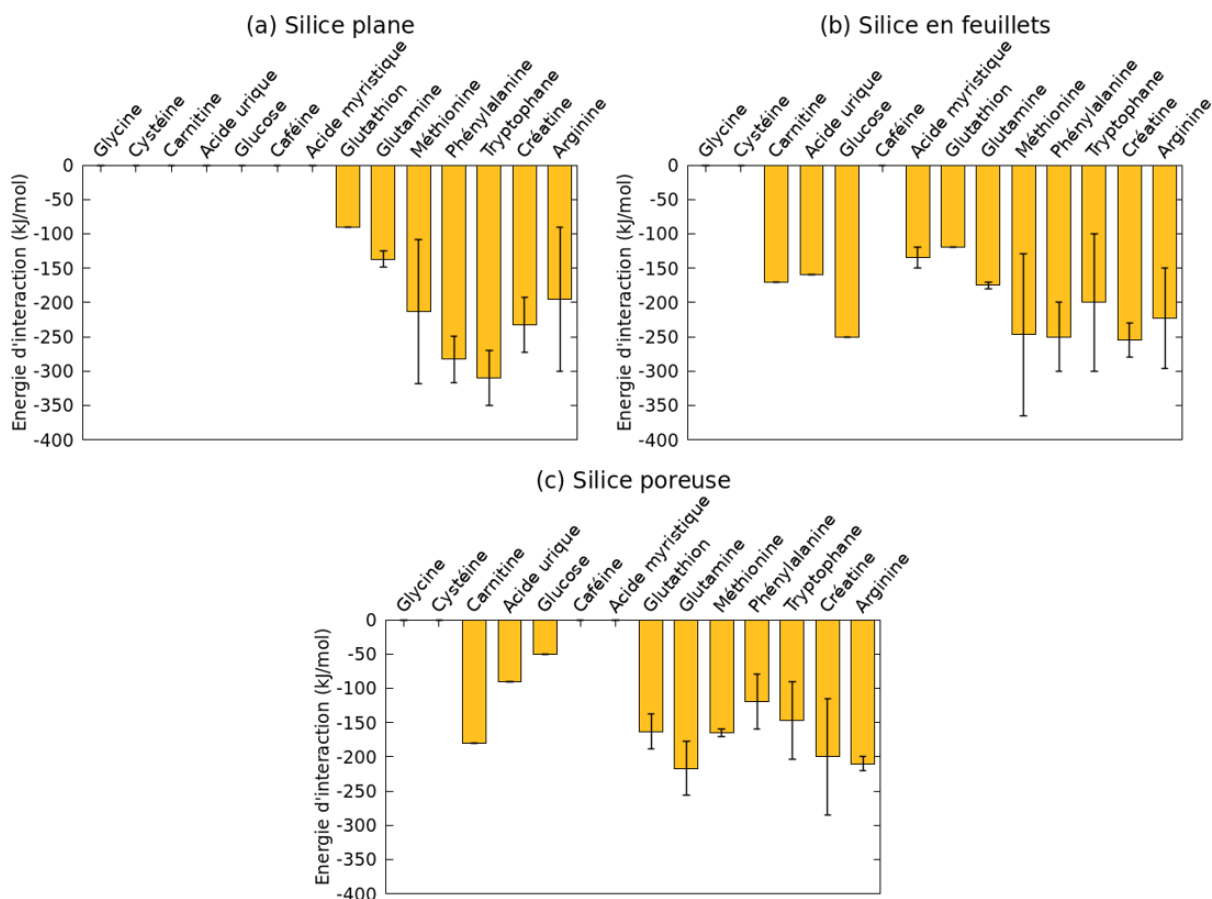


Figure A.4 – Énergie d'interaction moyenne des métabolites sur (a) de la silice plane, (b) de la silice en feuillets, et (c) de la silice poreuse non fonctionnalisées. Les moyennes sont effectuées sur les répliques pour lesquels les métabolites sont capturés et les écarts types sont obtenus à partir de ces mêmes répliques.

Informations supplémentaires de l'article : Effect of Silane Monolayers and Nanoporous Silicon Surfaces on the Matrix-Assisted-Laser-Desorption Ionization Mass Spectrometry Detection of Sepsis Metabolites in Complex Solution

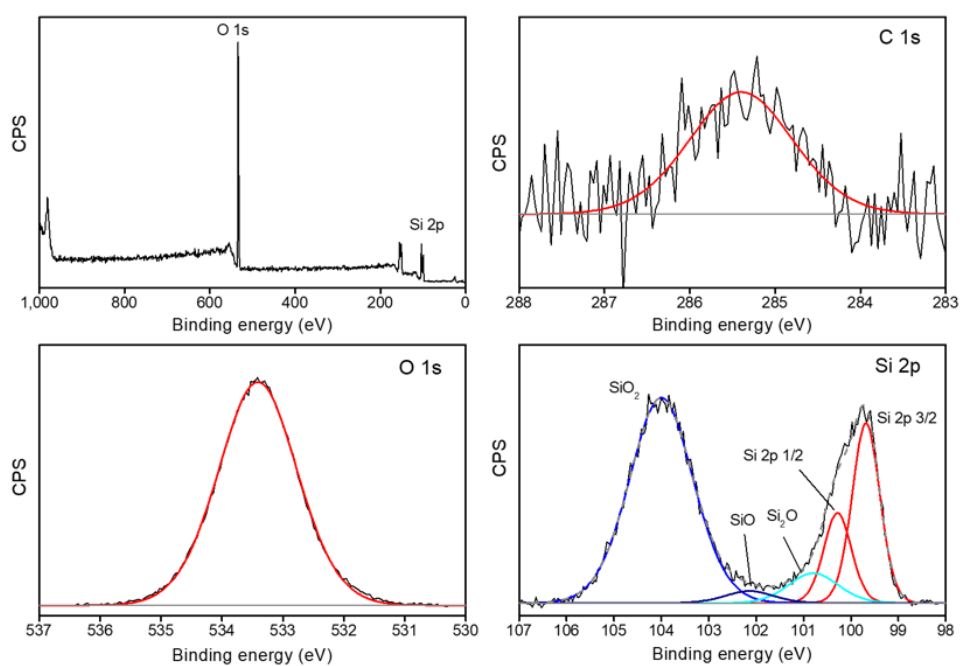


Figure B.1 – XPS spectra of the porous SiO₂ surface (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).

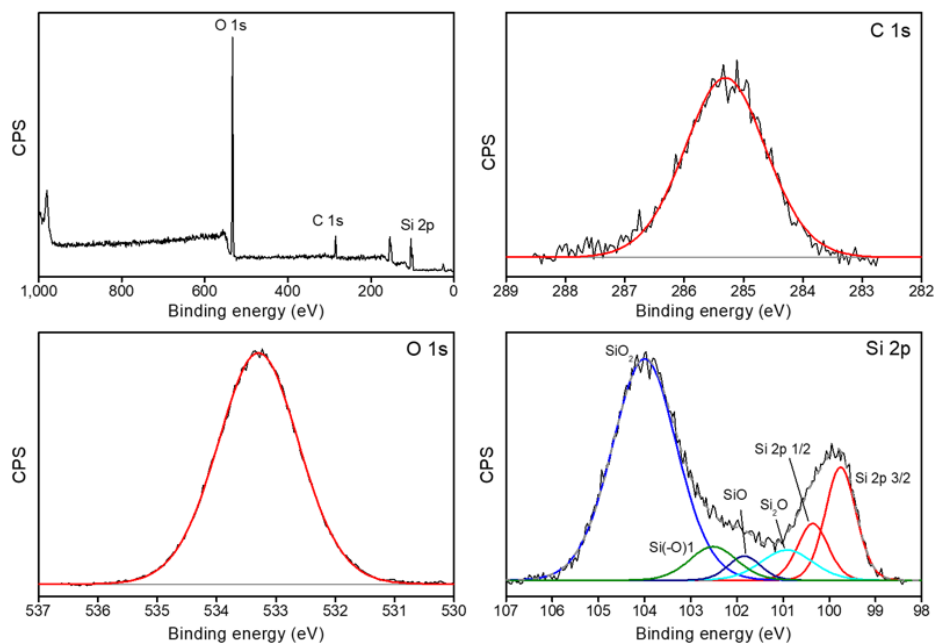


Figure B.2 – XPS spectra of the CH₃ short monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).

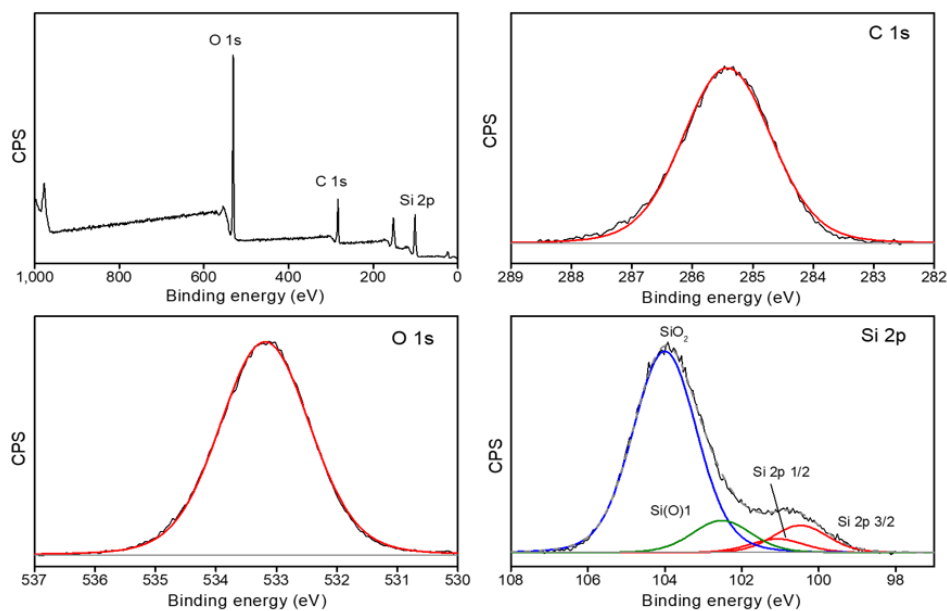


Figure B.3 – XPS spectra of the COO⁻ monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, O 1s and Si 2p core levels).

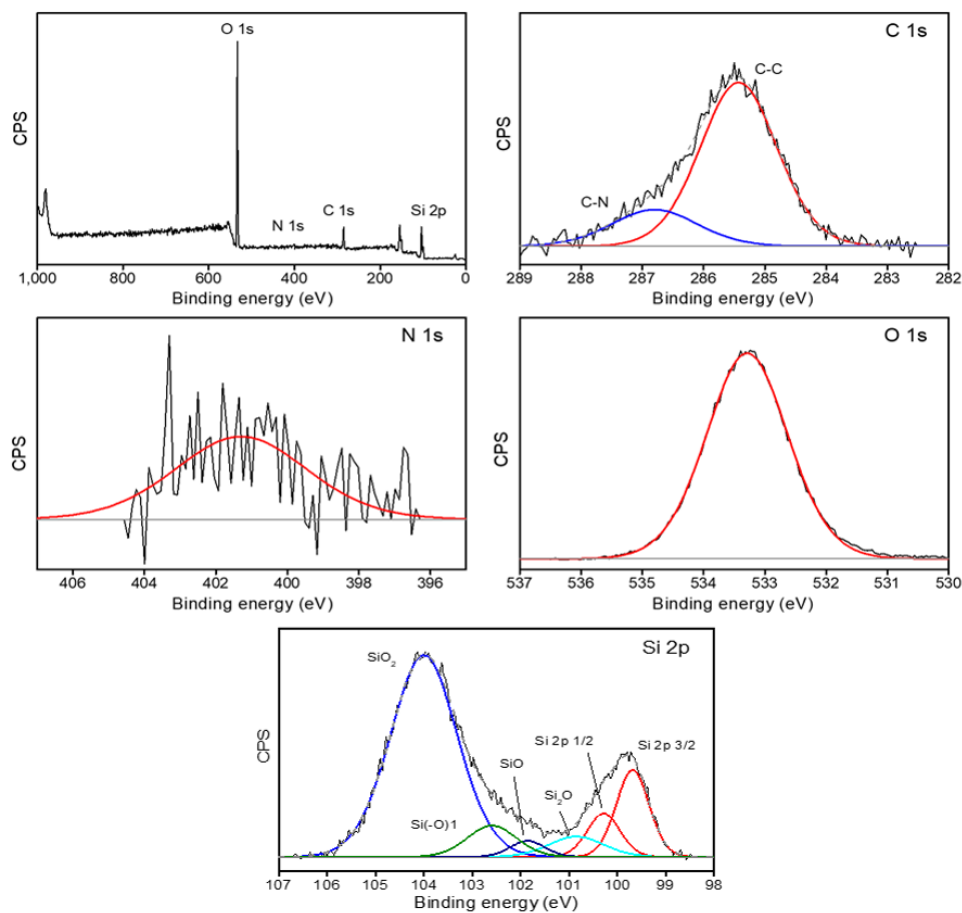


Figure B.4 – XPS spectra of the NH_3^+ monolayer on porous silicon (survey spectra, C 1s, N 1s, O 1s and Si 2p core levels).

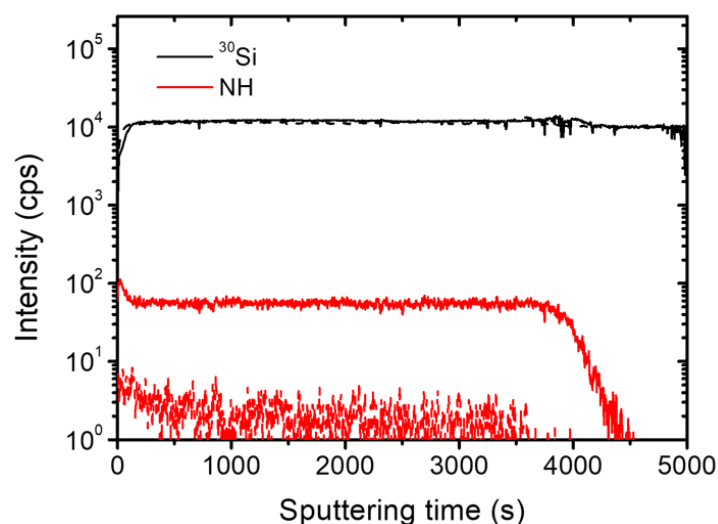


Figure B.5 – Depth profiling of silicon (black) and NH (red) ions by ToF-SIMS on (solid) porous silicon functionalized by NH_3^+ silane monolayer and on (dash) bare porous silicon. Silicon ion in Si bulk (sputtering time greater than 4300 s was used for normalization). The NH^- appears to be greater than on the NH_3^+ sample than on the bare silicon sample, confirming the presence of the silane molecule on the surface.

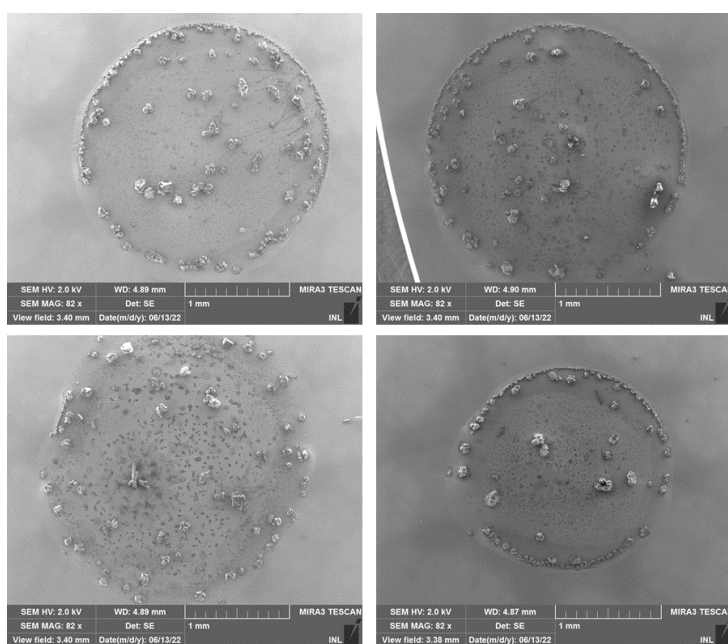


Figure B.6 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with CH_3 short silane monolayer. The 4 droplets are similar with big crystals and small 2D crystals (darker on the surface).

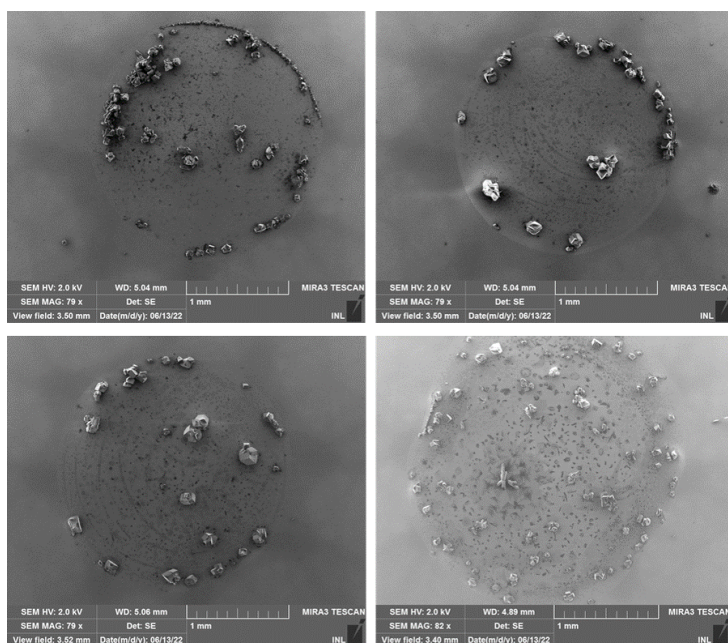


Figure B.7 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with CH_3 long silane monolayer. The 4 droplets are similar with big crystals and small 2D crystals (darker on the surface).

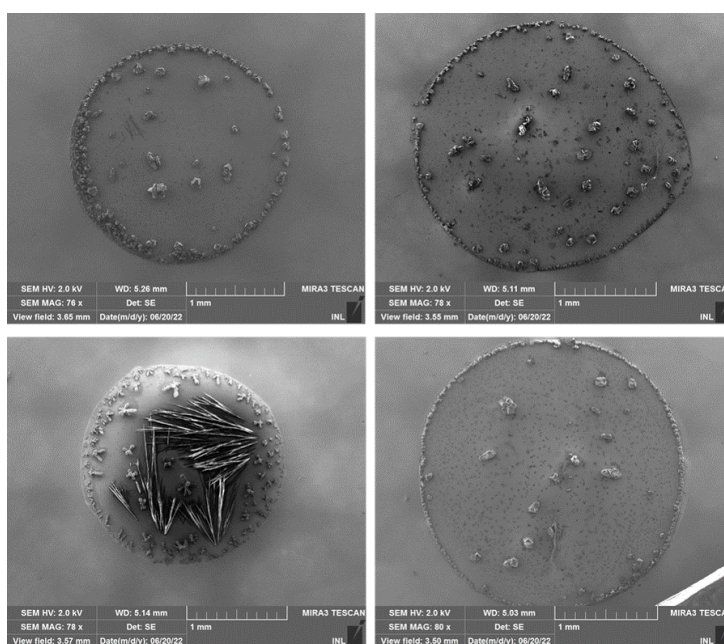


Figure B.8 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with COO^- silane monolayer. The droplets are similar except the third one with fibres on the surface which seem to have all the same length. The other droplets have big crystals and smaller 2D crystal (darker on the surface).

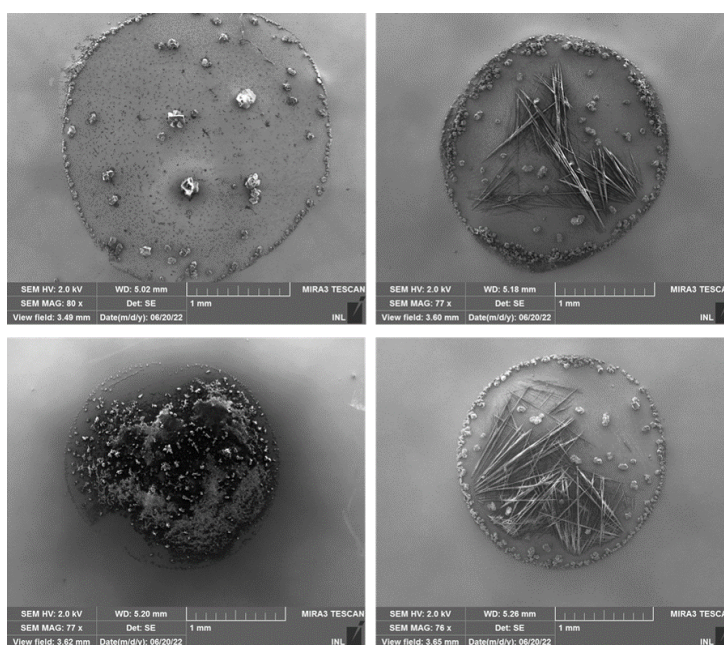


Figure B.9 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on plane silicon with NH_3^+ silane monolayer. The droplets are all different. The first one is with big crystals and smaller 2D ones (darker on the surface). The second have fibres and big crystals. The third one have medium crystals but denser on the surface. And the fourth one is similar to the second one.

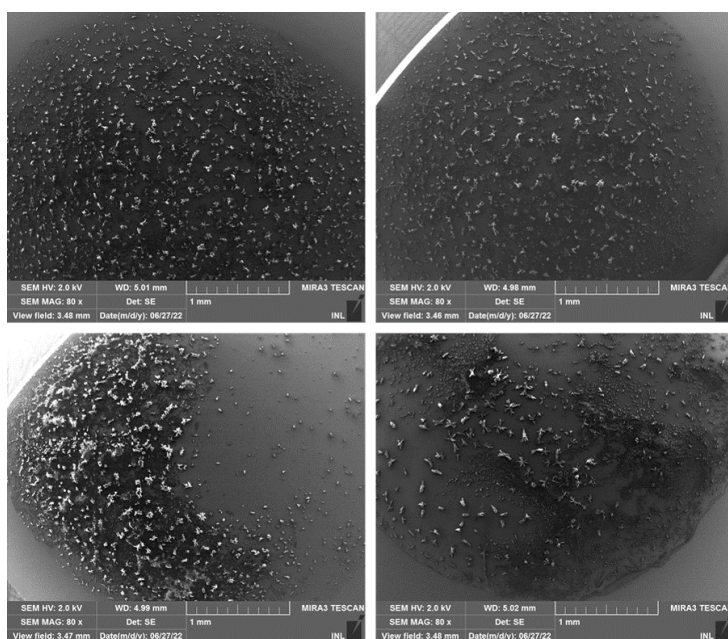


Figure B.10 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with CH_3 short silane monolayer. The droplets are similar except the third one for which the crystals are located mainly on one side of the droplet.

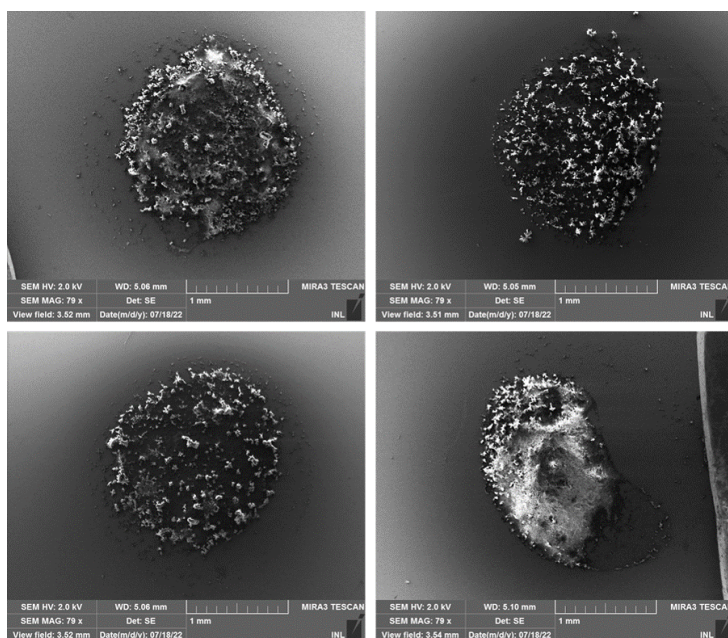


Figure B.11 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with CH_3 long silane monolayer. The droplets are similar with a surface area smaller than with CH_3 short silane monolayer, making a denser layer of crystals.

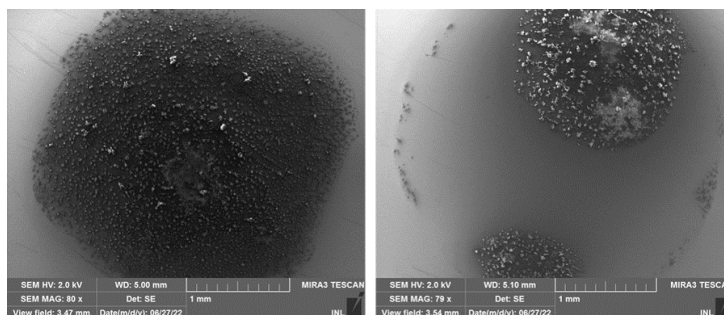


Figure B.12 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with COO^- silane monolayer. The type of crystals is similar but the shape of the droplets is different. This is due to the drying process: the second droplet didn't dry uniformly on the surface.

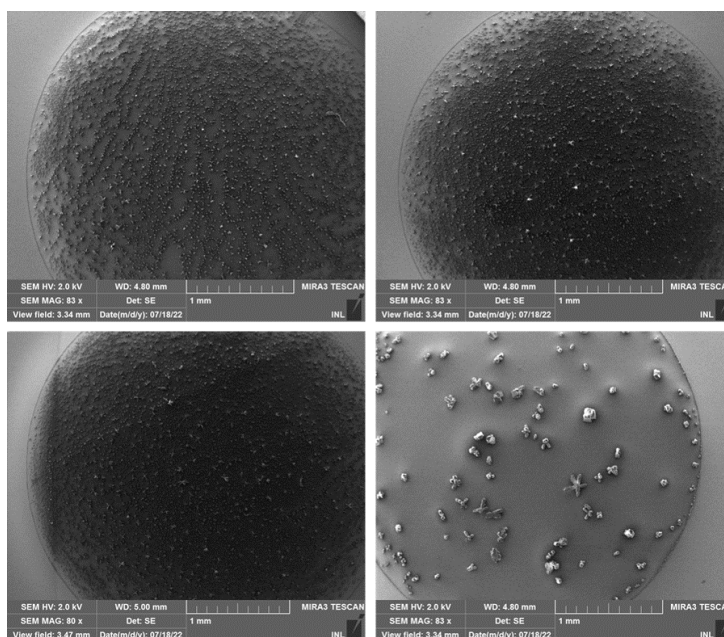


Figure B.13 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on porous silicon with NH_3^+ silane monolayer. The droplets are similar except the last which resemble to a droplet on plane silicon. NH_3^+ silane monolayer on plane silicon was already the surface with the most disparities between the droplets.

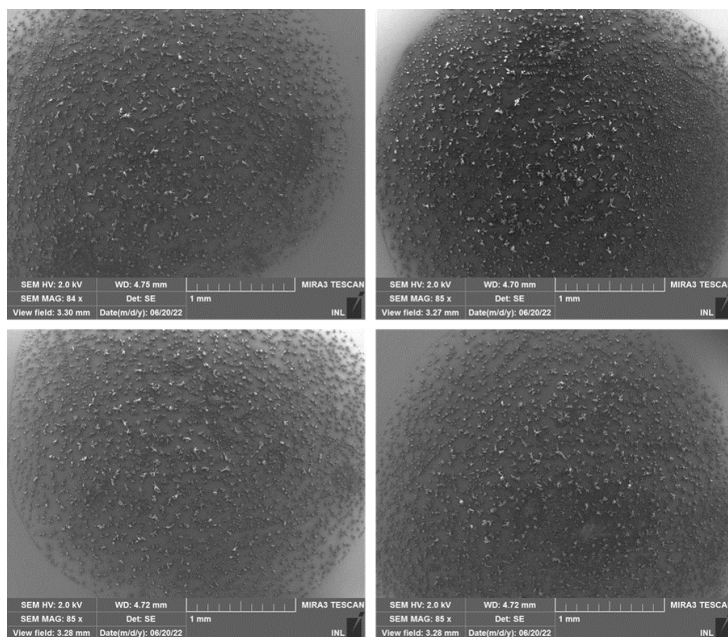


Figure B.14 – SEM photograph of CHCA matrix deposition on bare porous silicon. The droplets are highly similar.

ANNEXE C

Informations supplémentaires de l'article : Effects of Silane Monolayers on Lysophosphatidylcholine (LysoPC) Detection by Desorption Ionization on Silicon Mass Spectrometry (DIOS-MS) from Solution and Plasma

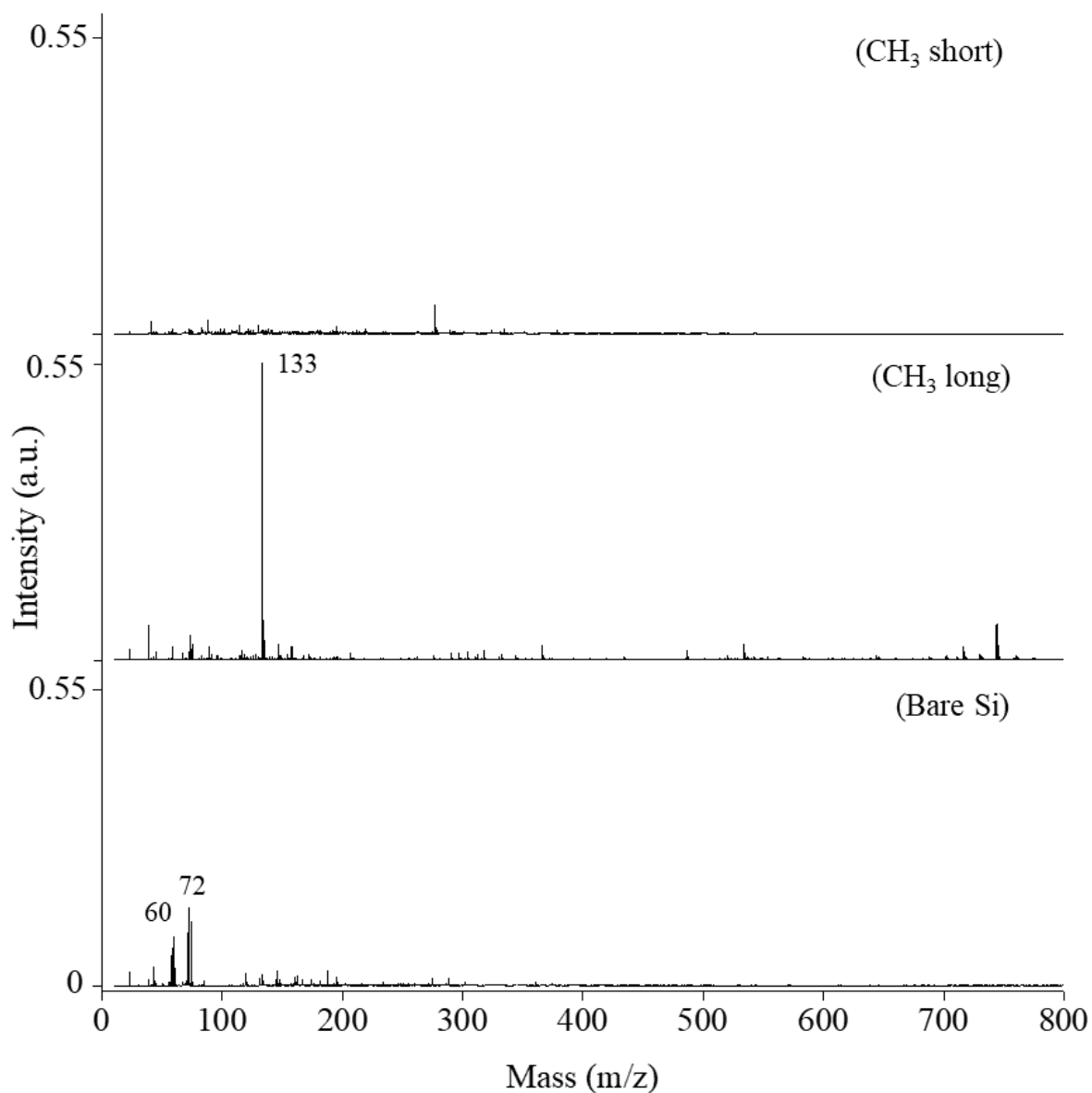


Figure C.1 – DIOS mass spectra of LysoPC (at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on the CH₃ short monolayer, for three different pore depths (300 nm, 1 μm , and 2 μm). Fragments of LysoPC are indicated (at 86.0m/z, 104.0m/z, and 184.1 m/z). Stars indicate peaks related to the surface. The 5x5 washing protocol is used. TIC normalization is used.

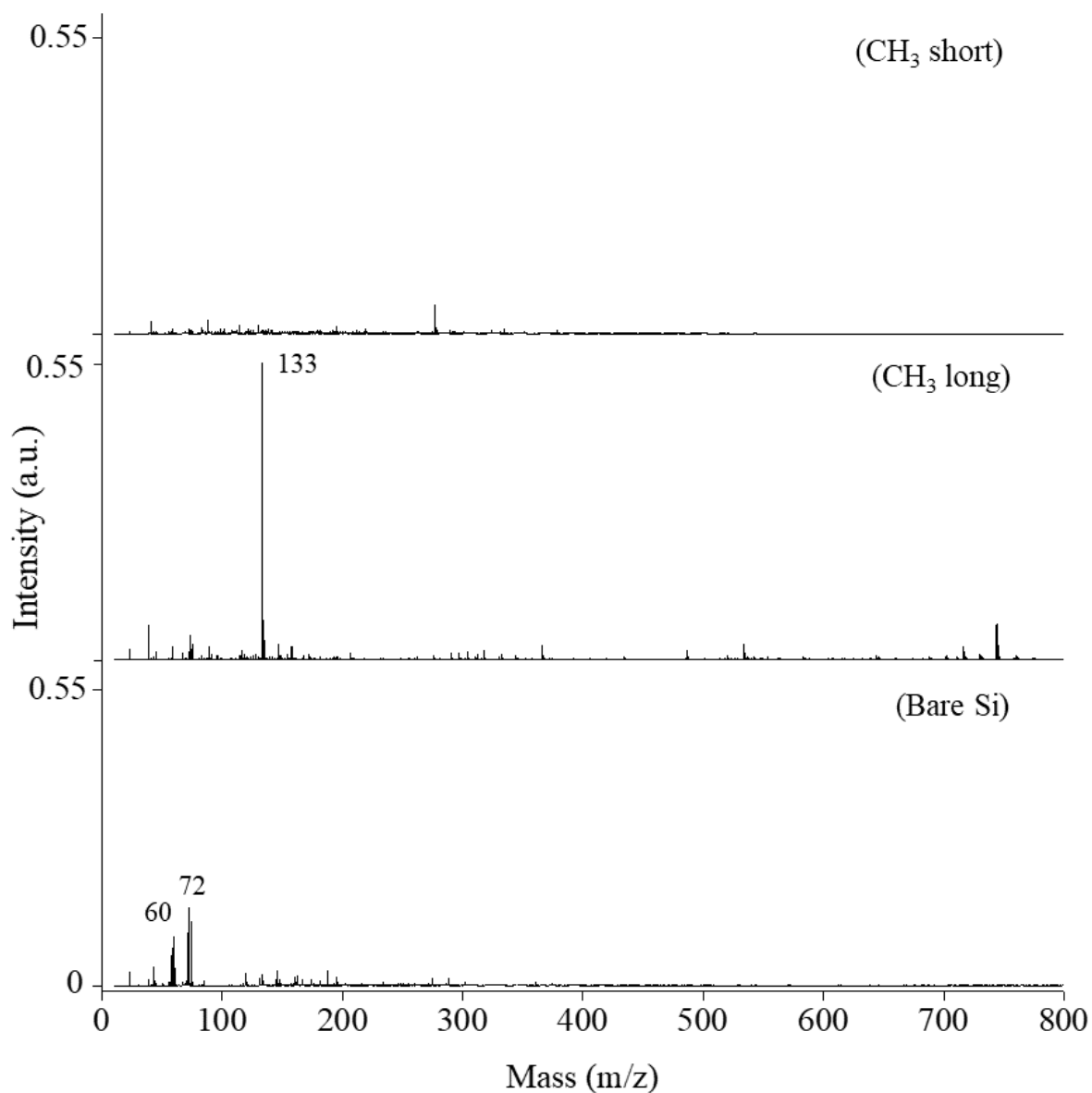


Figure C.2 – S/N ratio and standard deviation (from 3 replicate samples) of (a) the LysoPC fragment at 86.0 m/z and (b) the $[M+H]^+$ peak of LysoPC, at different concentrations, on the CH₃ short monolayer on porous silicon substrate, in RP ion mode.

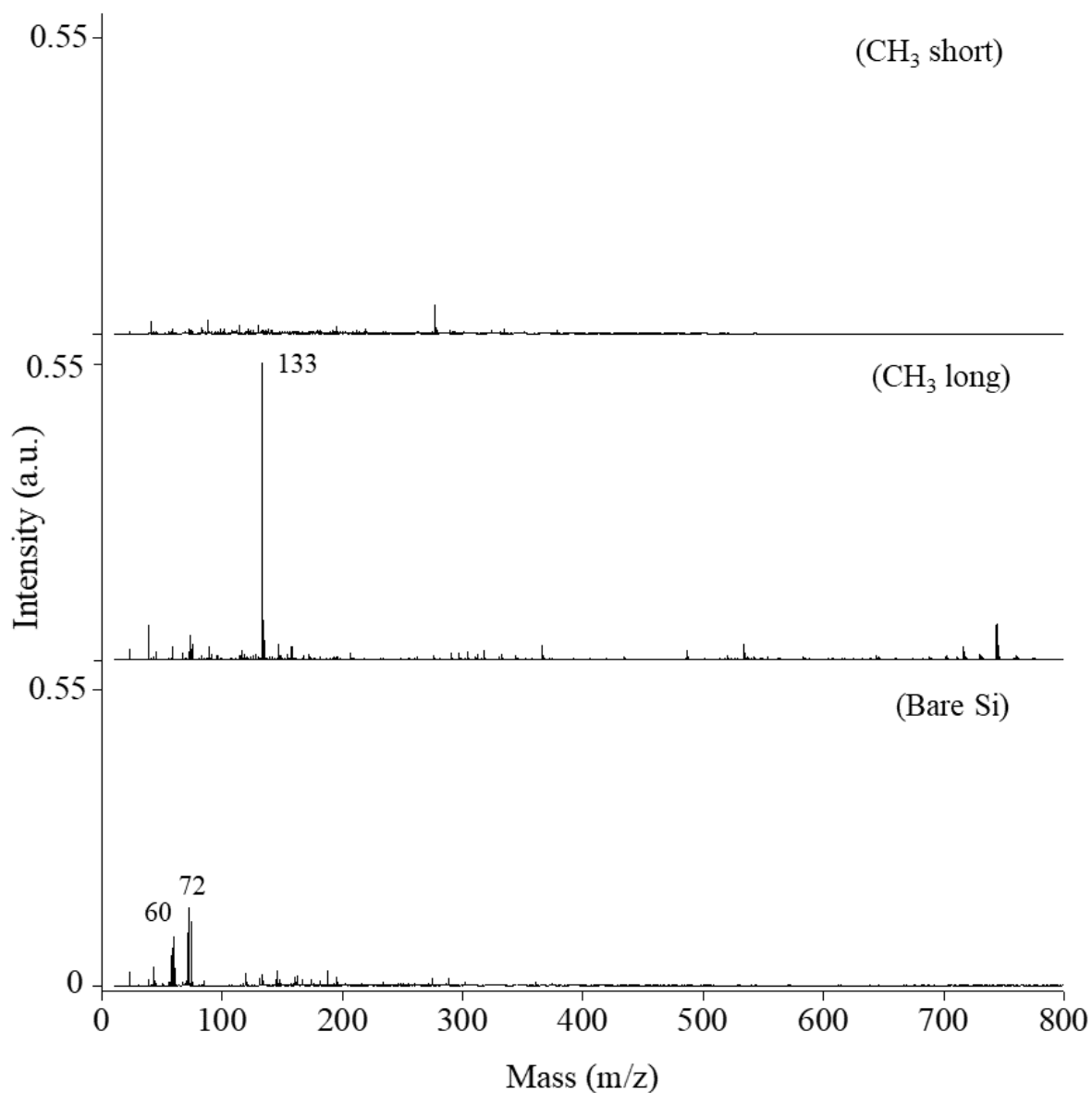


Figure C.3 – Normalized DIOS mass spectra in RP ion mode of the CH₃ short and CH₃ long monolayers on porous silicon, and the bare porous silicon surface. Total ion current normalization is used.

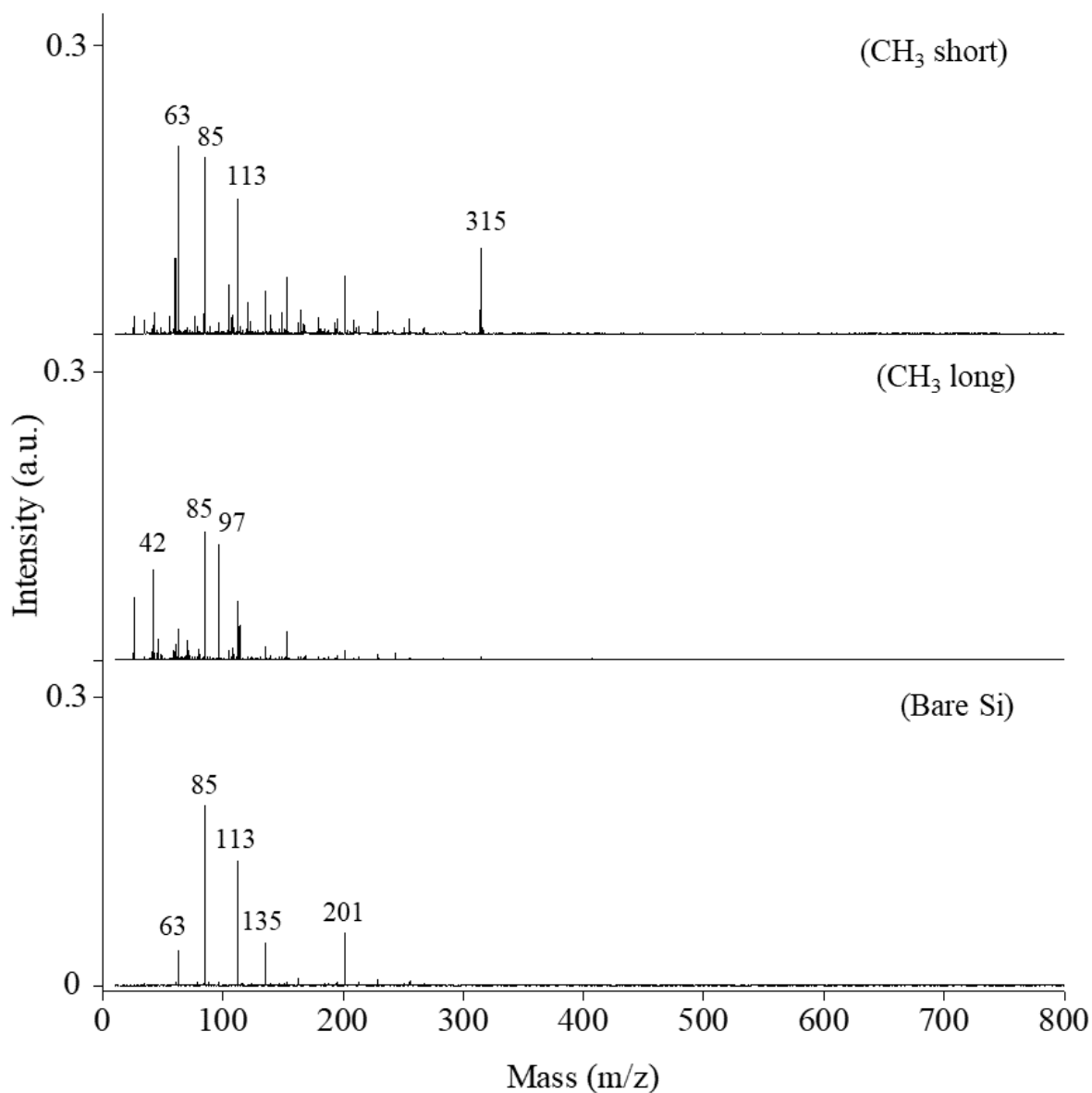


Figure C.4 – Normalized DIOS mass spectra in RN ion mode of the CH₃ short and CH₃ long monolayers on porous silicon, and the bare porous silicon surface. Total ion current normalization is used.

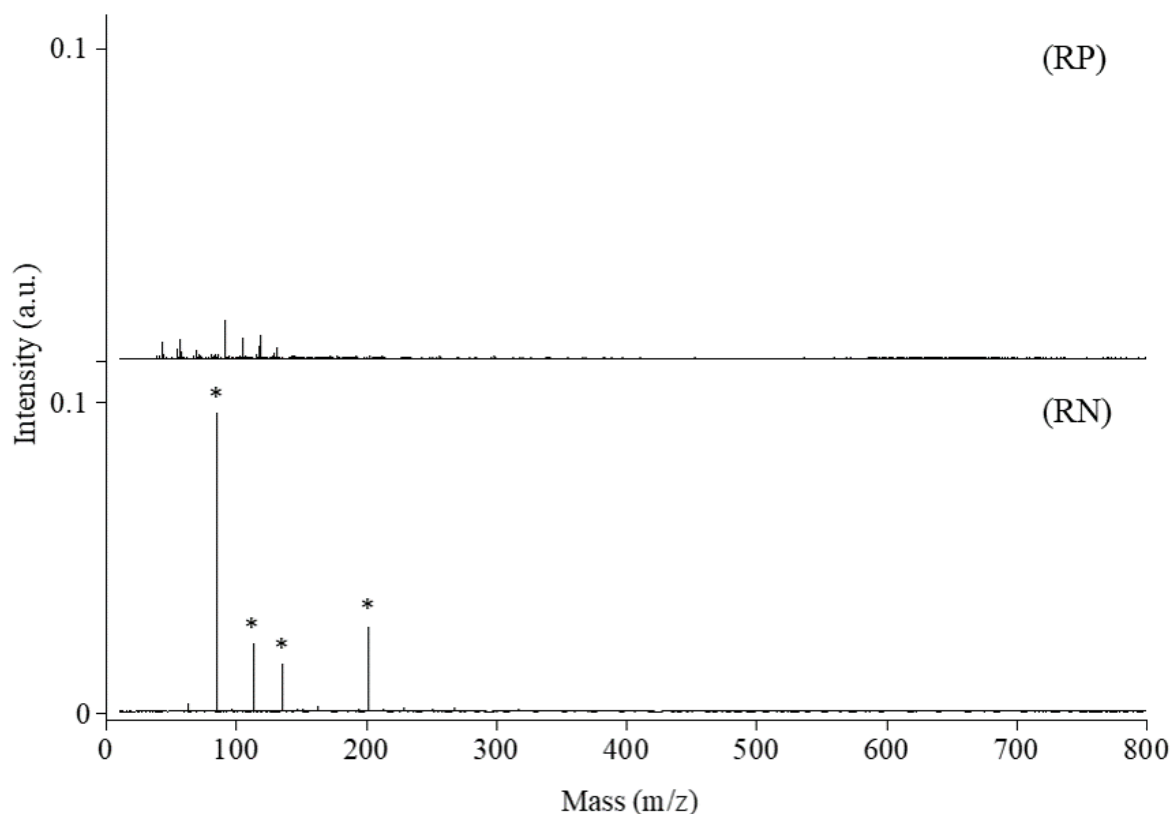


Figure C.5 – DIOS mass spectra of 10 % of a mix of chloroform/methanol (2/1 v:v) on bare porous silicon in RN and RP ion modes. Peaks corresponding to the silicon substrate are indicated by a star (*). Total ion current normalization is used.

Washing protocols on CH₃ short monolayer, in RN ion mode For all washing protocols, the intensity of the 79.0, 123.1, and 153.1 m/z fragments were increased by a several orders of magnitude compare to the sample analysed without any cleaning (Figures C.6-C.8). The intensity of the fragment at 283.6 m/z was also improved but to a lesser extent. Increasing the number of droplets (1x1, 3x1 and 10x1) did not lead to higher intensities apart for the fragment at 283.6 m/z for which a significant improvement can be observed after a 3x1 protocol (Figure C.6). Moreover, pipetting 5 droplets 2 times or 2 droplets 5 times (5x2 or 2x5 protocols) lead to similar intensities of the peaks compared to the 10x1 protocol, except for the peak at 153.1 m/z for which the 2x5 protocol leads to higher intensity (Figure C.7). Pipetting 5 times, 2, 3 or 5 droplets did not lead to clear conclusions (Figure C.8). Finally, washing 5x5 seems to be the better compromise when considering the intensity improvement of the four fragments.

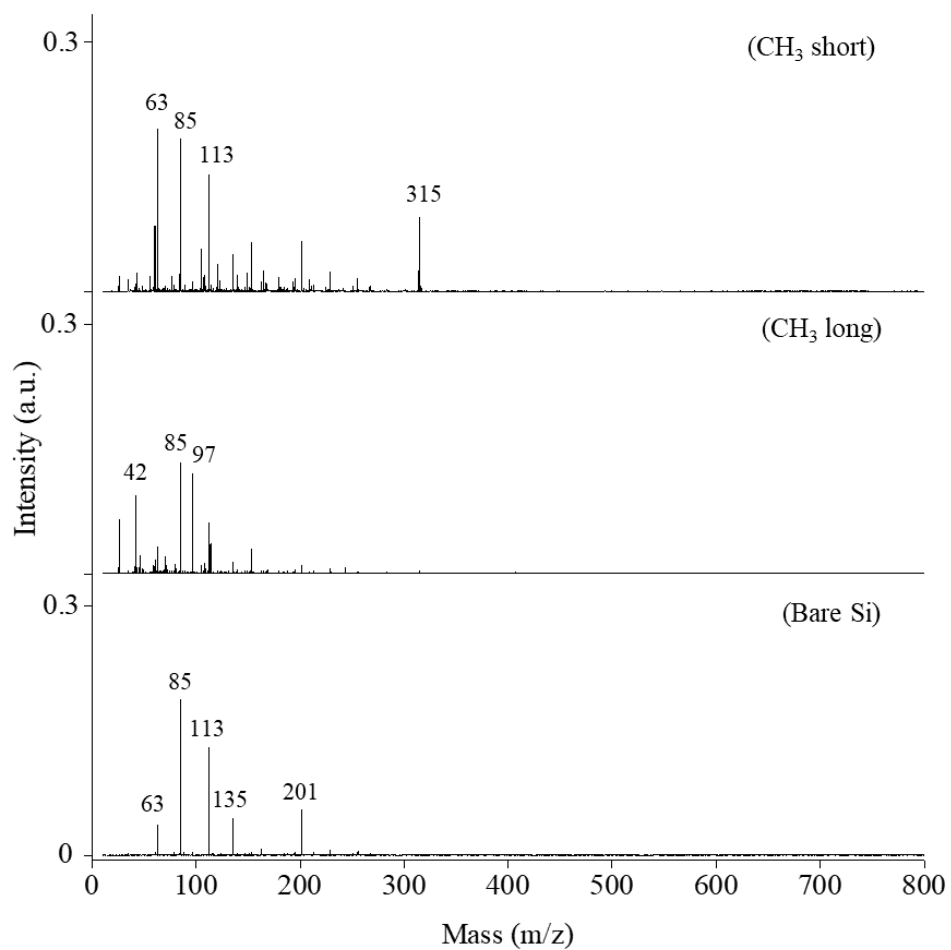


Figure C.6 – Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH₃ short monolayer, in RN ion mode, for different water washing protocols (no washing, 1x1, 3x1, 10x1).

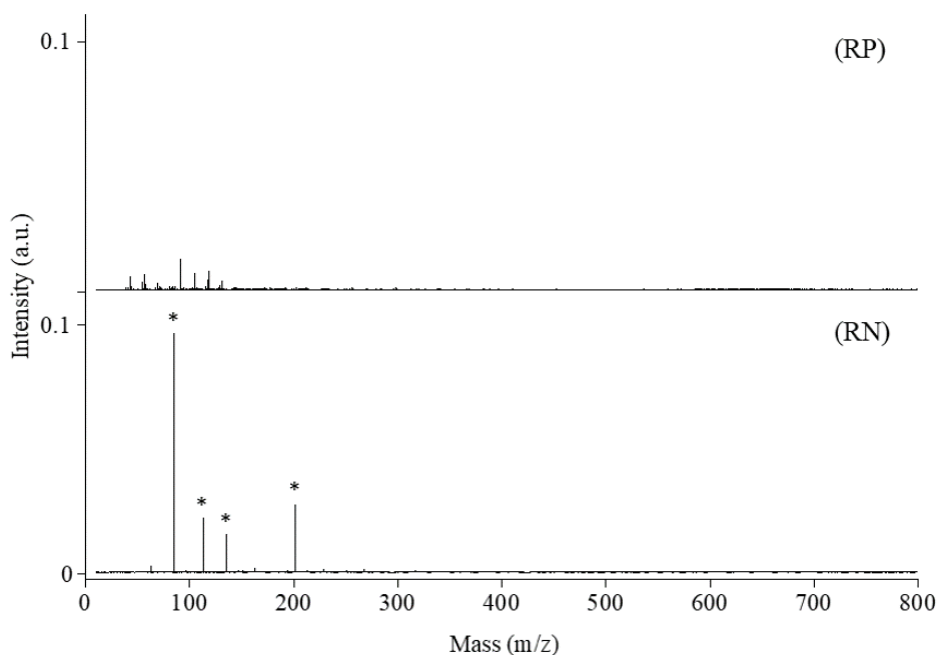


Figure C.7 – Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH₃ short monolayer, in RN ion mode, for the different water washing protocols (10x1, 5x2, 2x5).

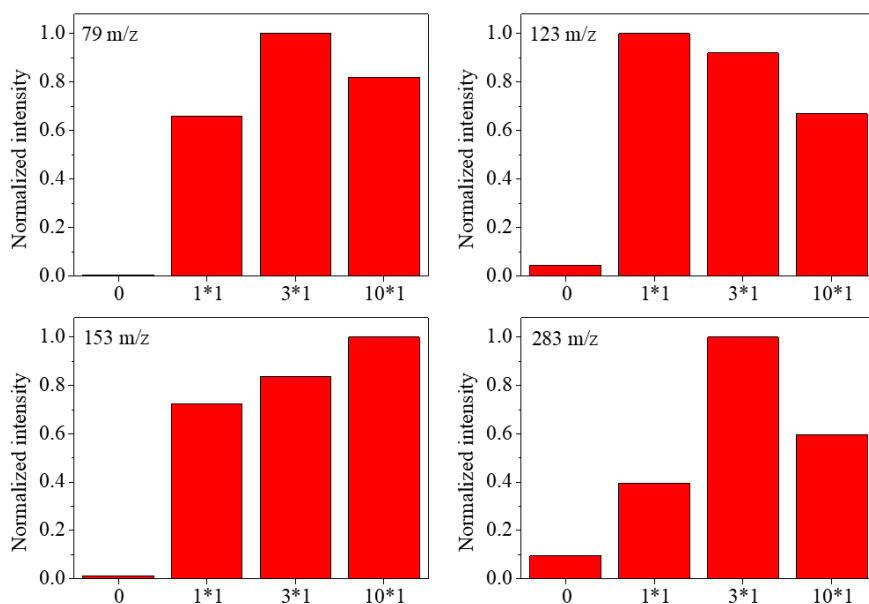


Figure C.8 – Normalized intensities of the different fragments of LysoPC, detected in the spiked plasma sample, on the CH₃ short monolayer, in RN ion mode, for the different water washing protocols (2x5, 3x5, 5x5).

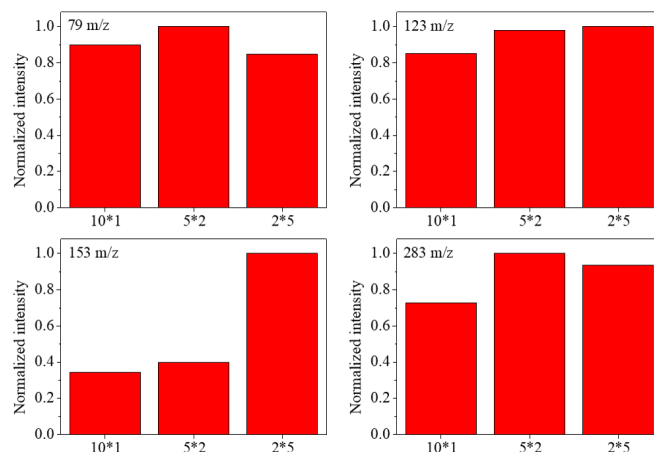


Figure C.9 – ToF-SIMS depth profiling of porous silicon functionalized by CH₃ short monolayer, after LysoPC adsorption, with (red) and without (black) water washings. The intensities of the P⁻ ions (30.9682 amu) and ³⁰Si⁻ (29.9717 amu) ions as a function of sputtering are displayed. ³⁰Si⁻ in Si bulk (time > 900 s) is used for normalization.

m/z	79.0	86.0	123.1	153.1
MALDI-MS with CHCA matrix, RP ion mode				
Bare silicon	-	18.7 (90 %)	-	-
CH₃ short	-	7.5 (46 %)	-	-
CH₃ long	-	3.6 (216 %)	-	-
DIOS-MS, RP ion mode				
CH₃ short	-	18.3 (61 %)	-	-
DIOS-MS, RN ion mode				
CH₃ short	9.1 (44 %)	-	23.9 (32 %)	20.0 (43 %)

Table C.1 – S/N values for LysoPC fragments in MALDI-MS analysis in RP ion mode on three different substrates, and in DIOS-MS analysis with the CH₃ short monolayer both in RP and in RN ion modes. Each S/N value corresponds to an average over 100 measurement spots. The spot-to-spot relative standard deviations, over 100 measurement spots, are indicated in parentheses.

- [1] Mervyn SINGER, Clifford S. DEUTSCHMAN, Christopher Warren SEYMOUR, Manu SHANKAR-HARI, Djillali ANNANE, Michael BAUER, Rinaldo BELLOMO, Gordon R. BERNARD, Jean-Daniel CHICHE, Craig M. COOPERSMITH, Richard S. HOTCHKISS, Mitchell M. LEVY, John C. MARSHALL, Greg S. MARTIN, Steven M. OPAL, Gordon D. RUBENFELD, Tom van der POLL, Jean-Louis VINCENT et Derek C. ANGUS : The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8):801, février 2016.
- [2] Fact sheet : Sepsis. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>, 2020. Consulté le 30/01/2023.
- [3] Fiche maladie : Sepsis / septicémie. <http://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/sepsis-septicemie>, octobre 2015. Consulté le 30/01/2023.
- [4] Longxiang SU, Hua LI, Aimei XIE, Dan LIU, Weiqiao RAO, Liping LAN, Xuan LI, Fang LI, Kun XIAO, Huijuan WANG, Peng YAN, Xin LI et Lixin XIE : Dynamic Changes in Amino Acid Concentration Profiles in Patients with Sepsis. *PLOS ONE*, 10(4):e0121933, avril 2015.
- [5] Jing WANG, Yizhu SUN, Shengnan TENG et Kefeng LI : Prediction of sepsis mortality using metabolite biomarkers in the blood : a meta-analysis of death-related pathways and prospective validation. *BMC Medicine*, 18(1):83, décembre 2020.
- [6] Solène LECOT, Antonin LAVIGNE, Zihua YANG, Thomas GÉHIN, Claude BOTELLA, Vincent JOUSSEAUME, Yann CHEVOLOT, Magali PHANER-GOUTORBE et Christelle YEROMONAHOS : Arrangement of Monofunctional Silane Molecules on Silica Surfaces : Influence of Alkyl Chain Length, Head-Group Charge, and Surface Coverage, from Molecular Dynamics Simulations, X-ray Photoelectron Spectroscopy, and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 124(37):20125–20134, septembre 2020.
- [7] Jing WANG, Ailian DONG, Gang LIU, Gregory J. ANDERSON, Tony Y. HU, Jian SHI, Yulin HU et Guangjun NIE : Correlation of serum hepcidin levels with disease progression in hepatitis B virus-related disease assessed by nanopore film based assay. *Scientific Reports*, 6(1):34252, octobre 2016.
- [8] Jianglan LONG, Zhirui YANG, Long WANG, Yumei HAN, Cheng PENG, Can YAN et Dan YAN : Metabolite biomarkers of type 2 diabetes mellitus and pre-diabetes : a systematic review and meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*, 20(1):174, décembre 2020.

- [9] Jane E. CARRÉ et Mervyn SINGER : Cellular energetic metabolism in sepsis : The need for a systems approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1777(7-8):763–771, juillet 2008.
- [10] Katelyn R. LUDWIG et Amanda B. HUMMON : Mass spectrometry for the discovery of biomarkers of sepsis. *Molecular BioSystems*, 13(4):648–664, 2017.
- [11] Jong-Min PARK, Joo-Yoon NOH, Moon-Ju KIM, Tae Gyeong YUN, Sang-Guk LEE, Kyung Soo CHUNG, Eun Hye LEE, Mi Hwa SHIN, Nam Su KU, Sohee YOON, Min-Jung KANG, Moo Suk PARK et Jae-Chul PYUN : MALDI-TOF Mass Spectrometry Based on Parylene-Matrix Chip for the Analysis of Lysophosphatidylcholine in Sepsis Patient Sera. *Analytical Chemistry*, 91(22):14719–14727, novembre 2019.
- [12] Tjitske S.R. van ENGELEN, Willem Joost WIERSINGA, Brendon P. SCICLUNA et Tom van der POLL : Biomarkers in Sepsis. *Critical Care Clinics*, 34(1):139–152, janvier 2018.
- [13] Jisoo LEE et Debasree BANERJEE : Metabolomics and the Microbiome as Biomarkers in Sepsis. *Critical Care Clinics*, 36(1):105–113, janvier 2020.
- [14] Herbert FREUND, Susan ATAMIAN, Jane HOLROYDE et Josef E. FISCHER : Plasma Amino Acids as Predictors of the Severity and Outcome of Sepsis. *Annals of Surgery*, 190(5):571–576, novembre 1979.
- [15] Naeem A. ALI, James M. O'BRIEN, Kathleen DUNGAN, Gary PHILLIPS, Clay B. MARSH, Stanley LEMESHOW, Alfred F. CONNORS et Jean-Charles PREISER : Glucose variability and mortality in patients with sepsis. *Critical Care Medicine*, 36(8):2316–2321, août 2008.
- [16] Sophie NEUGEBAUER, Evangelos J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Aimilia PELEKANOU, Androniki MARIOLI, Fotini BAZIACA, Iraklis TSANGARIS, Michael BAUER et Michael KIEHNTOPF : Metabolite Profiles in Sepsis : Developing Prognostic Tools Based on the Type of Infection. *Critical Care Medicine*, 44(9):1649–1662, septembre 2016.
- [17] Anna M. KAUPPI, Alicia EDIN, Ingrid ZIEGLER, Paula MÖLLING, Anders SJÖSTEDT, Åsa GYLFE, Kristoffer STRÅLIN et Anders JOHANSSON : Metabolites in Blood for Prediction of Bacteremic Sepsis in the Emergency Room. *PLOS ONE*, 11(1):e0147670, janvier 2016.
- [18] Orren WEXLER, Michael S. GOUGH, Mary Anne M. MORGAN, Cynthia M. MACK, Michael J. APOSTOLAKOS, Kathleen P. DOOLIN, Robert A. MOONEY, Erland ARNING, Teodoro BOTTIGLIERI et Anthony P. PIETROPAOLI : Methionine Metabolites in Patients With Sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*, 33(1):37–47, janvier 2018.
- [19] Yanyan ZHOU, Haiyun DONG, Yanjun ZHONG, Jia HUANG, Jianlei LV et Jinxiu LI : The Cold-Inducible RNA-Binding Protein (CIRP) Level in Peripheral Blood Predicts Sepsis Outcome. *PLOS ONE*, 10(9):e0137721, septembre 2015.
- [20] Wolfgang DROBNIK, Gerhard LIEBISCH, Franz-Xaver AUDEBERT, Dieter FRÖHLICH, Thomas GLÜCK, Peter VOGEL, Gregor ROTHE et Gerd SCHMITZ : Plasma ceramide and lysophosphatidylcholine inversely correlate with mortality in sepsis patients. *Journal of Lipid Research*, 44(4):754–761, avril 2003.
- [21] Sarah TRIMPIN, Chuping LEE, Steffen M. WEIDNER, Tarick J. EL-BABA, Corinne A. LUTOMSKI, Ellen D. INUTAN, Casey D. FOLEY, Chi-Kung NI et Charles N. MCEWEN : Unprecedented Ionization Processes in Mass Spectrometry Provide Missing Link between ESI and MALDI. *ChemPhysChem*, 19(5):581–589, mars 2018.
- [22] Thorsten W. JASKOLLA, Dimitrios G. PAPANOTIRIOU et Michael KARAS : Comparison between the Matrices α -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid and 4-Chloro- α -cyanocinnamic Acid for Trypsin, Chymotrypsin, and Pepsin Digestions by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 8(7):3588–3597, juillet 2009.
- [23] Gang SUN, Kui YANG, Zhongdan ZHAO, Shaoping GUAN, Xianlin HAN et Richard W. GROSS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry

- tric Analysis of Cellular Glycerophospholipids Enabled by Multiplexed Solvent Dependent Analyte-Matrix Interactions. *Analytical Chemistry*, 80(19):7576–7585, octobre 2008.
- [24] Lars ULMER, Jochen MATTAY, H. Gregorio TORRES-GARCIA et Heinrich LUFTMANN : Letter : The Use of 2-[(2*E*)-3-(4-*Tert*-Butylphenyl)-2-Methylprop-2-Enylidene]Malononitrile as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, 6(1):49–52, février 2000.
- [25] Tomoya KINUMI, Yukiyasu SHIMOMAE, Ryuichi ARAKAWA, Yoshiro TATSU, Yasushi SHIGERI, Noboru YUMOTO et Etsuo NIKI : Effective detection of peptides containing cysteine sulfonic acid using matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1):103–112, janvier 2006.
- [26] Shuchen HSIEH, Hsin-Yi KU, Yao-Tang KE et Hui-Fen WU : Self-assembled-monolayer-modified silicon substrate to enhance the sensitivity of peptide detection for AP-MALDI mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(12):1628–1636, décembre 2007.
- [27] I. FOURNIER, J.C. TABET et G. BOLBACH : Irradiation effects in MALDI and surface modifications. *International Journal of Mass Spectrometry*, 219(3):515–523, septembre 2002.
- [28] Bryan M. HAM, Jean T. JACOB et Richard B. COLE : MALDI-TOF MS of Phosphorylated Lipids in Biological Fluids Using Immobilized Metal Affinity Chromatography and a Solid Ionic Crystal Matrix. *Analytical Chemistry*, 77(14):4439–4447, juillet 2005.
- [29] Christopher D. CERRUTI, Farida BENABDELLAH, Olivier LAPRÉVOTE, David TOUBOUL et Alain BRUNELLE : MALDI Imaging and Structural Analysis of Rat Brain Lipid Negative Ions with 9-Aminoacridine Matrix. *Analytical Chemistry*, 84(5):2164–2171, mars 2012.
- [30] Jianing WANG, Shulan QIU, Suming CHEN, Caiqiao XIONG, Huihui LIU, Jiyun WANG, Ning ZHANG, Jian HOU, Qing HE et Zongxiu NIE : MALDI-TOF MS Imaging of Metabolites with a *N*-(1-Naphthyl)Ethylendiamine Dihydrochloride Matrix and Its Application to Colorectal Cancer Liver Metastasis. *Analytical Chemistry*, 87(1):422–430, janvier 2015.
- [31] Renato ZENOBI et Richard KNOCHENMUSS : Ion formation in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 17(5):337–366, 1998.
- [32] Michael KARAS, Doris BACHMANN et Franz HILLENKAMP : Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, 57(14):2935–2939, décembre 1985.
- [33] Franz HILLENKAMP et Jasna PETER-KATALINIC, éditeurs. *MALDI MS : a practical guide to instrumentation, methods and applications*. Wiley-Blackwell, Weinheim, 2. ed édition, 2014.
- [34] Kathrin M. ENGEL, Patricia PRABUTZKI, Jenny LEOPOLD, Ariane NIMPTSCH, Katharina LEMMNITZER, D.R. Naomi VOS, Carsten HOPF et Jürgen SCHILLER : A new update of MALDI-TOF mass spectrometry in lipid research. *Progress in Lipid Research*, 86:101145, avril 2022.
- [35] Klaus DREISEWERD : The Desorption Process in MALDI. *Chemical Reviews*, 103(2):395–426, février 2003.
- [36] Leonid V. ZHIGILEI, Prasad B. S. KODALI et Barbara J. GARRISON : A Microscopic View of Laser Ablation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(16):2845–2853, avril 1998.
- [37] H. EHRING, M. KARAS et F. HILLENKAMP : Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 27(4):472–480, avril 1992.
- [38] Thorsten W. JASKOLLA et Michael KARAS : Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation : The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(6):976–988, juin 2011.

- [39] Ralf KRÜGER, Anja PFENNINGER, Isabelle FOURNIER, Matthias GLÜCKMANN et Michael KARAS : Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes. *Analytical Chemistry*, 73(24):5812–5821, décembre 2001.
- [40] Richard KNOCHENMUSS : Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *The Analyst*, 131(9): 966, 2006.
- [41] Xiangjun CHEN, James A. CARROLL et Ronald C. BEAVIS : Near-ultraviolet-induced matrix-assisted laser desorption/ionization as a function of wavelength. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 9(9):885–891, septembre 1998.
- [42] J. SCHILLER, R. SÜSS, J. ARNHOLD, B. FUCHS, J. LESSIG, M. MÜLLER, M. PETKOVIĆ, H. SPALTEHOLZ, O. ZSCHÖRNIG et K. ARNOLD : Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research*, 43(5):449–488, septembre 2004.
- [43] Eberhard KRAUSE, Holger WENSCHUH et Peter R. JUNGBLUT : The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. *Analytical Chemistry*, 71(19):4160–4165, octobre 1999.
- [44] Rui CHEN, Wenjun XU, Caiqiao XIONG, Xiaoyu ZHOU, Shaoxiang XIONG, Zongxiu NIE, Lanqun MAO, Yi CHEN et Huan-Cheng CHANG : High-Salt-Tolerance Matrix for Facile Detection of Glucose in Rat Brain Microdialysates by MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(1):465–469, janvier 2012.
- [45] Mira MERDAS, Mélanie LAGARRIGUE, Quentin VANBELLINGEN, Thierry UMBDENSTOCK, Georges DA VIOLANTE et Charles PINEAU : On-tissue chemical derivatization reagents for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging. *Journal of Mass Spectrometry*, 56(10):e4731, 2021.
- [46] M. MANIKANDAN, Judy GOPAL, Nazim HASAN et Hui-Fen WU : A nano-patterned self assembled monolayer (SAM) rutile titania cancer chip for rapid, low cost, highly sensitive, direct cancer analysis in MALDI-MS. *Talanta*, 130:78–89, décembre 2014.
- [47] Tadesse Z. MENGISTU, Leroi DESOUZA et Sylvie MORIN : Functionalized porous silicon surfaces as MALDI-MS substrates for protein identification studies. *Chemical Communications*, (45):5659, 2005.
- [48] Chunxia MA, Lei XIE, Xiao WANG, Kang LIANG et Biao KONG : Interfacial assembly of functional mesoporous nanomatrices for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Nano Today*, 42:101365, février 2022.
- [49] Sidharam P. PUJARI, Luc SCHERES, Antonius T. M. MARCELIS et Han ZUILHOF : Covalent Surface Modification of Oxide Surfaces. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(25): 6322–6356, juin 2014.
- [50] Shujuan MA, Luwei ZHANG, Shuyue WANG, Haiyang ZHANG, Xin YOU, Junjie OU, Mingliang YE et Yinmao WEI : Preparation of epoxy-functionalized hierarchically porous hybrid monoliths via free radical polymerization and application in HILIC enrichment of glycopeptides. *Analytica Chimica Acta*, 1058:97–106, juin 2019.
- [51] Ning LI, Shuzhen DOU, Lei FENG, Qunyan ZHU et Nan LU : Eliminating sweet spot in MALDI-MS with hydrophobic ordered structure as target for quantifying biomolecules. *Talanta*, 218:121172, octobre 2020.
- [52] Shuzhen DOU, Ning LI, Xueyun WANG, Qunyan ZHU, Zhongshun WANG et Nan LU : Self-assembly of super-hydrophobic PMMA microspheres on silicon wafer as MALDI-MS chip for rapid quantification of peptides. *Sensors and Actuators B : Chemical*, 306:127573, mars 2020.

- [53] Sangwook LEE, Jong Hyun LEE, Hyuck Gi KWON, Thomas LAURELL, Ok Chan JEONG et Soyoun KIM : A Sol-gel Integrated Dual-readout Microarray Platform for Quantification and Identification of Prostate-specific Antigen. *Analytical Sciences*, 34(3):317–321, mars 2018.
- [54] Limin WANG, Ulrich S. SCHUBERT et Stephanie HOEPPENER : Surface chemical reactions on self-assembled silane based monolayers. *Chemical Society Reviews*, 50(11):6507–6540, 2021.
- [55] Bharat BHUSHAN, Kwang Joo KWAK, Samit GUPTA et Stephen C LEE : Nanoscale adhesion, friction and wear studies of biomolecules on silane polymer-coated silica and alumina-based surfaces. *Journal of The Royal Society Interface*, 6(37):719–733, août 2009.
- [56] Houjiang ZHOU, Songyun XU, Mingliang YE, Shun FENG, Chensong PAN, Xiaogang JIANG, Xin LI, Guanghui HAN, Yu FU et Hanfa ZOU : Zirconium Phosphonate-Modified Porous Silicon for Highly Specific Capture of Phosphopeptides and MALDI-TOF MS Analysis. *Journal of Proteome Research*, 5(9):2431–2437, septembre 2006.
- [57] Tanxi CAI et Fuquan YANG : Strategies for Characterization of Low-Abundant Intact or Truncated Low-Molecular-Weight Proteins From Human Plasma. In *The Enzymes*, volume 42, pages 105–123. Elsevier, 2017.
- [58] Dylan J. HARNEY, Amy T. HUTCHISON, Zhiduan SU, Luke HATCHWELL, Leonie K. HEILBRONN, Samantha HOCKING, David E. JAMES et Mark LARANCE : Small-protein Enrichment Assay Enables the Rapid, Unbiased Analysis of Over 100 Low Abundance Factors from Human Plasma. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(9):1899–1915, septembre 2019.
- [59] Jae Won CHANG, Gihoon LEE, John S. COUKOS et Raymond E. MOELLERING : Profiling Reactive Metabolites via Chemical Trapping and Targeted Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 88(13):6658–6661, juillet 2016.
- [60] Jiaojiao SUN, Guopeng YU, Yi YANG, Liang QIAO, Bin XU, Chuanfan DING, Yushan LIU et Shaoning YU : Evaluation of prostate cancer based on MALDI-TOF MS fingerprinting of nanoparticle-treated serum proteins/peptides. *Talanta*, 220:121331, décembre 2020.
- [61] Jizong YAO, Nianrong SUN et Chunhui DENG : Recent advances in mesoporous materials for sample preparation in proteomics research. *Trends in Analytical Chemistry*, 99:88–100, février 2018.
- [62] Rosa TERRACCIANO, Marco GASPARI, Flaviano TESTA, Luigi PASQUA, Piersandro TAGLIAFERRI, Mark Ming-Cheng CHENG, A. Jasper NIJDAM, Emanuel F. PETRICOIN, Lance A. LIOTTA, Giovanni CUDA, Mauro FERRARI et Salvatore VENUTA : Selective binding and enrichment for low-molecular weight biomarker molecules in human plasma after exposure to nanoporous silica particles. *PROTEOMICS*, 6(11):3243–3250, juin 2006.
- [63] Yawei XU, Zhangxiong WU, Lijuan ZHANG, Haojie LU, Pengyuan YANG, Paul A. WEBLEY et Dongyuan ZHAO : Highly Specific Enrichment of Glycopeptides Using Boronic Acid-Functionalized Mesoporous Silica. *Analytical Chemistry*, 81(1):503–508, janvier 2009.
- [64] Hemei CHEN, Shasha LIU, Huili YANG, Yu MAO, Chunhui DENG, Xiangmin ZHANG et Pengyuan YANG : Selective separation and enrichment of peptides for MS analysis using the microspheres composed of $\text{Fe}_3\text{O}_4@n\text{SiO}_2$ core and perpendicularly aligned mesoporous SiO_2 shell. *PROTEOMICS*, 10(5):930–939, mars 2010.
- [65] Yichao WANG, Xinwei HAN, Zhaoyun LI et Jiaogui XIE : Rapid detection of insulin by immune-enrichment with silicon-nanoparticle-assisted MALDI-TOF MS. *Analytical Biochemistry*, 577:14–20, juillet 2019.
- [66] Elizabeta NEMETH et Tomas GANZ : The Role of Hepcidin in Iron Metabolism. *Acta Haematologica*, 122(2-3):78–86, 2009.

- [67] Jia FAN, Shiwen NIU, Ailian DONG, Jian SHI, Hung-Jen WU, Daniel H. FINE, Yaping TIAN, Chunxi ZHOU, Xuewu LIU, Tong SUN, Gregory J. ANDERSON, Mauro FERRARI, Guangjun NIE, Ye HU et Yuliang ZHAO : Nanopore film based enrichment and quantification of low abundance hepcidin from human bodily fluids. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(5):e879–e888, juillet 2014.
- [68] Kai LIANG, Hongmei WU, Tony Y. HU et Yan LI : Mesoporous silica chip : enabled peptide profiling as an effective platform for controlling bio-sample quality and optimizing handling procedure. *Clinical Proteomics*, 13(1):34, décembre 2016.
- [69] Shilei LI, Yangyang ZHANG, Jian'an LIU, Juanjuan HAN, Ming GUAN, Hui YANG, Yu LIN, Shaoxiang XIONG et Zhenwen ZHAO : Electrospray deposition device used to precisely control the matrix crystal to improve the performance of MALDI MSI. *Scientific Reports*, 6(1):37903, novembre 2016.
- [70] Olena KUDINA, Burak ERAL et Frieder MUGELE : e-MALDI : An Electrowetting-Enhanced Drop Drying Method for MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 88(9):4669–4675, mai 2016.
- [71] V. JOUSSEAUME, J. EL SABAHY, C. YEROMONAHOS, G. CASTELLAN, A. BOUAMRANI et F. RICOUL : SiOCH thin films deposited by chemical vapor deposition : From low- κ to chemical and biochemical sensors. *Microelectronic Engineering*, 167:69–79, janvier 2017.
- [72] Akil KADERBAY, François BERGER, Ali BOUAMRANI, Marie BIDART, Graciane PETRE, Ashley BAGUANT, Ludovic GIRAUD et Sébastien SCHMERBER : Perilymph metabolomic and proteomic MALDI-ToF profiling with porous silicon chips : A proof-of-concept study. *Hearing Research*, 417:108457, avril 2022.
- [73] Xiaoqing ZHU, Lianglan WU, Divyesh C. MUNGRA, Sijing XIA et Jin ZHU : Au@SiO₂ core-shell nanoparticles for laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *The Analyst*, 137(10):2454, 2012.
- [74] Megumi SAKURAI, Taro SATO, Jiawei XU, Soichi SATO et Tatsuya FUJINO : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Compounds Containing Carboxyl Groups Using CdTe and CuO Nanoparticles. *Applied Sciences*, 8(4):492, avril 2018.
- [75] Dominic S. PETERSON : Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1):19–34, janvier 2007.
- [76] Koichi TANAKA, Hiroaki WAKI, Yutaka IDO, Satoshi AKITA, Yoshikazu YOSHIDA, Tamio YOSHIDA et T. MATSUO : Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2(8):151–153, août 1988.
- [77] Jan. SUNNER, Edward. DRATZ et Yu-Chie. CHEN : Graphite surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins from liquid solutions. *Analytical Chemistry*, 67(23):4335–4342, décembre 1995.
- [78] Rosaria Anna PICCA, Cosima Damiana CALVANO, Nicola CIOFFI et Francesco PALMISANO : Mechanisms of Nanophase-Induced Desorption in LDI-MS. A Short Review. *Nanomaterials*, 7(4):75, avril 2017.
- [79] Wendy H. MÜLLER, Alexandre VERDIN, Edwin DE PAUW, Cedric MALHERBE et Gauthier EPPE : Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging : A review. *Mass Spectrometry Reviews*, 41(3):373–420, mai 2022.
- [80] Kyuseok SONG et Quan CHENG : Desorption and ionization mechanisms and signal enhancement in surface assisted laser desorption ionization mass spectrometry (SALDI-MS). *Applied Spectroscopy Reviews*, 55(3):220–242, mars 2020.
- [81] Guanghong LUO, Yong CHEN, Gary SIUZDAK et Akos VERTES : Surface Modification and Laser Pulse Length Effects on Internal Energy Transfer in DIOS. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(51):24450–24456, décembre 2005.

- [82] Manikandan MUTHU, Sechul CHUN, Hui-Fen WU, Mark W. DUNCAN et Judy GOPAL : The ongoing evolution of laser desorption/ionization mass spectrometry : Some observations on current trends and future directions. *Journal of Mass Spectrometry*, 53(6):525–540, juin 2018.
- [83] Yilin LI, Nianrong SUN, Xufang HU, Yan LI et Chunhui DENG : Recent advances in nanoporous materials as sample preparation techniques for peptidome research. *Trends in Analytical Chemistry*, 120:115658, novembre 2019.
- [84] C. Y. SHI et C. H. DENG : Recent advances in inorganic materials for LDI-MS analysis of small molecules. *The Analyst*, 141(10):2816–2826, 2016.
- [85] Zian LIN et Zongwei CAI : Negative ion laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of small molecules by using nanostructured substrate as matrices. *Mass Spectrometry Reviews*, 37(5):681–696, septembre 2018.
- [86] Wendy H. MÜLLER, Edwin DE PAUW, Johann FAR, Cedric MALHERBE et Gauthier EPPE : Imaging lipids in biological samples with surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry : A concise review of the last decade. *Progress in Lipid Research*, 83:101114, juillet 2021.
- [87] Yasuhide NAITO, Masahiro KOTANI et Takayuki OHMURA : A novel laser desorption/ionization method using through hole porous alumina membranes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(21):1851–1858, novembre 2018.
- [88] Keiko KUWATA, Kayoko ITOU, Masahiro KOTANI, Takayuki OHMURA et Yasuhide NAITO : DIUTHAME enables matrix-free mass spectrometry imaging of frozen tissue sections. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 34(9), mai 2020.
- [89] Zuzana ŽIVCOVÁ, Eva GREGOROVÁ, Willi PABST, David S. SMITH, Aurélie MICHOT et Céline POULIER : Thermal conductivity of porous alumina ceramics prepared using starch as a pore-forming agent. *Journal of the European Ceramic Society*, 29(3):347–353, février 2009.
- [90] P. Ramana REDDY, K. M. AJITH et N. K. UDAYASHANKAR : Optical and mechanical studies on free standing amorphous anodic porous alumina formed in oxalic and sulphuric acid. *Applied Physics A*, 124(11):765, novembre 2018.
- [91] Md. Mahmudul HASAN, Fumihito ETO, Md. Al MAMUN, Shumpei SATO, Ariful ISLAM, A.S.M. WALIULLAH, Do Huu CHI, Yutaka TAKAHASHI, Tomoaki KAHYO, Yasuhide NAITO, Masahiro KOTANI, Takayuki OHMURA et Mitsutoshi SETOU : Desorption ionization using through-hole alumina membrane offers higher reproducibility than 2,5-dihydroxybenzoic acid, a widely used matrix in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry imaging analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(10), mai 2021.
- [92] Başak Kükrer KALETAŞ, Ingrid M. van der WIEL, Jonathan STAUBER, Coşkun GÜZEL, Johan M. KROS, Theo M. LUIDER et Ron M. A. HEEREN : Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS : Sample preparation issues for tissue imaging. *PROTEOMICS*, 9(10):2622–2633, mai 2009.
- [93] Nhu T. N. PHAN, Amir Saeid MOHAMMADI, Masoumeh DOWLATSHAHI POUR et Andrew G. EWING : Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging of *Drosophila* Brain Using Matrix Sublimation versus Modification with Nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 88(3):1734–1741, février 2016.
- [94] Jin WANG, Ethan YANG, Pierre CHAURAND et Vijaya RAGHAVAN : Visualizing the distribution of strawberry plant metabolites at different maturity stages by MALDI-TOF imaging mass spectrometry. *Food Chemistry*, 345:128838, mai 2021.
- [95] Pere RÀFOLS, Dídac VILALTA, Sònia TORRES, Raul CALAVIA, Bram HEIJS, Liam A. MCDONNELL, Jesús BREZMES, Esteban del CASTILLO, Oscar YANES, Noelia RAMÍREZ et

- Xavier CORREIG : Assessing the potential of sputtered gold nanolayers in mass spectrometry imaging for metabolomics applications. *PLOS ONE*, 13(12):e0208908, décembre 2018.
- [96] Nidia LAUZON, Martin DUFRESNE, Vinita CHAUHAN et Pierre CHAURAND : Development of Laser Desorption Imaging Mass Spectrometry Methods to Investigate the Molecular Composition of Latent Fingermarks. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6):878–886, juin 2015.
- [97] Gerard BAQUER, Luc SEMENTÉ, María GARCÍA-ALTARES, Young Jin LEE, Pierre CHAURAND, Xavier CORREIG et Pere RÀFOLS : rMSIcleanup : an open-source tool for matrix-related peak annotation in mass spectrometry imaging and its application to silver-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Cheminformatics*, 12(1):45, décembre 2020.
- [98] Tomoyuki OZAWA, Issey OSAKA, Satoshi HAMADA, Tatsuya MURAKAMI, Akio MIYAZATO, Hideya KAWASAKI et Ryuichi ARAKAWA : Direct Imaging Mass Spectrometry of Plant Leaves Using Surface-assisted Laser Desorption/Ionization with Sputterdeposited Platinum Film. *Analytical Sciences*, 32(5):587–591, mai 2016.
- [99] Syuhei NITTA, Hideya KAWASAKI, Takashi SUGANUMA, Yasushi SHIGERI et Ryuichi ARAKAWA : Desorption/Ionization Efficiency of Common Amino Acids in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS) with Nanostructured Platinum. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(1):238–245, janvier 2013.
- [100] Hani Nasser ABDELHAMID : Nanoparticle assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for small molecule analytes. *Microchimica Acta*, 185(3):200, mars 2018.
- [101] Hani Nasser ABDELHAMID : Nanoparticle-based surface assisted laser desorption ionization mass spectrometry : a review. *Microchimica Acta*, 186(10):682, octobre 2019.
- [102] John A. MCLEAN, Katherine A. STUMPO et David H. RUSSELL : Size-Selected (2-10 nm) Gold Nanoparticles for Matrix Assisted Laser Desorption Ionization of Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 127(15):5304–5305, avril 2005.
- [103] Minghua LU, Xueqing YANG, Yixin YANG, Peige QIN, Xiuru WU et Zongwei CAI : Nanomaterials as Assisted Matrix of Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Analysis of Small Molecules. *Nanomaterials*, 7(4):87, avril 2017.
- [104] Jianwei CHE, Tahir ÇAGIN et William A GODDARD : Thermal conductivity of carbon nanotubes. *Nanotechnology*, 11(2):65–69, juin 2000.
- [105] Bogumiła KUMANEK et Dawid JANAS : Thermal conductivity of carbon nanotube networks : a review. *Journal of Materials Science*, 54(10):7397–7427, mai 2019.
- [106] Haemin LEE, Dong-Myeong LEE, Cheol-Hun LEE, Jaegeun LEE et Kun-Hong LEE : Determining the isotropic cloud point of carbon nanotube/chlorosulfonic acid solution using UV–vis–nIR absorbance saturation behavior. *Carbon*, 173:782–791, mars 2021.
- [107] Young-Kwan KIM, Hee-Kyung NA, Sul-Jin KWACK, Soo-Ryoon RYOO, Youngmi LEE, Seunghee HONG, Sungwoo HONG, Yong JEONG et Dal-Hee MIN : Synergistic Effect of Graphene Oxide/MWCNT Films in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Small Molecules and Tissue Imaging. *ACS Nano*, 5(6):4550–4561, juin 2011.
- [108] Hani Nasser ABDELHAMID et Hui-Fen WU : A method to detect metal–drug complexes and their interactions with pathogenic bacteria via graphene nanosheet assist laser desorption/ionization mass spectrometry and biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 751:94–104, novembre 2012.
- [109] Gwangbin LEE, Sang-Eun BAE, Seong HUH et Sangwon CHA : Graphene oxide embedded sol–gel (GOSG) film as a SALDI MS substrate for robust metabolite fingerprinting. *RSC Advances*, 5(70):56455–56459, 2015.

- [110] Ryusei SAKAI, Tomonori ICHIKAWA, Hiroki KONDO, Kenji ISHIKAWA, Naohiro SHIMIZU, Takayuki OHTA, Mineo HIRAMATSU et Masaru HORI : Effects of Carbon Nanowalls (CNWs) Substrates on Soft Ionization of Low-Molecular-Weight Organic Compounds in Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (SALDI-MS). *Nanomaterials*, 11(2):262, janvier 2021.
- [111] Stefania Alexandra IAKAB, Pere RAFOLS, María GARCÍA-ALTARES, Oscar YANES et Xavier CORREIG : Silicon-Based Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry for the Analysis of Biomolecules : A Progress Report. *Advanced Functional Materials*, 29(45):1903609, novembre 2019.
- [112] Rusen YAN, Jeffrey R. SIMPSON, Simone BERTOLAZZI, Jacopo BRIVIO, Michael WATSON, Xufei WU, Andras KIS, Tengfei LUO, Angela R. HIGHT WALKER et Huili Grace XING : Thermal Conductivity of Monolayer Molybdenum Disulfide Obtained from Temperature-Dependent Raman Spectroscopy. *ACS Nano*, 8(1):986–993, janvier 2014.
- [113] Young-Kwan KIM, Li-Sheng WANG, Ryan LANDIS, Chang Soo KIM, Richard W. VACHET et Vincent M. ROTELLO : A layer-by-layer assembled MoS₂ thin film as an efficient platform for laser desorption/ionization mass spectrometry analysis of small molecules. *Nanoscale*, 9(30):10854–10860, 2017.
- [114] Juan BIAN et Susan V. OLESIK : Polyvinylpyrrolidone composite nanofibers as efficient substrates for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 448:116253, février 2020.
- [115] Jing WEI, Jillian M. BURIK et Gary SIUZDAK : Desorption–ionization mass spectrometry on porous silicon. *Nature*, 399(6733):243–246, mai 1999.
- [116] Reshma SINGH, Louis W. BEZUIDENHOUT, Abebaw JEMERE, Zhen WANG, Michael BRETT et D. Jed HARRISON : Engineering matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry using glancing angle deposition films : Matrix-free LDI using GLAD films. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(7):631–638, avril 2017.
- [117] Suguru YAMAOKA, Nikolaos-Panteleimon DIAMANTOPOULOS, Hidetaka NISHI, Ryo NAKAO, Takuro FUJII, Koji TAKEDA, Tatsuro HIRAKI, Takuma TSURUGAYA, Shigeru KANAZAWA, Hiromasa TANOBE, Takaaki KAKITSUKA, Tai TSUCHIZAWA, Fumio KOYAMA et Shinji MATSUO : Directly modulated membrane lasers with 108 GHz bandwidth on a high-thermal-conductivity silicon carbide substrate. *Nature Photonics*, 15(1):28–35, janvier 2021.
- [118] F. X. ALVAREZ, D. JOU et A. SELLITTO : Pore-size dependence of the thermal conductivity of porous silicon : A phonon hydrodynamic approach. *Applied Physics Letters*, 97(3):033103, juillet 2010.
- [119] K. DUBYK, T. NYCHPORUK, V. LYSENKO, K. TERMENTZIDIS, G. CASTANET, F. LEMOINE, D. LACROIX et M. ISAEV : Thermal properties study of silicon nanostructures by photoacoustic techniques. *Journal of Applied Physics*, 127(22):225101, juin 2020.
- [120] Qing SHEN et Taro TOYODA : Dependence of thermal conductivity of porous silicon on porosity characterized by photoacoustic technique. *Review of Scientific Instruments*, 74(1):601–603, janvier 2003.
- [121] Kasra BEHZAD, Wan MAHMOOD, W. Mahmood MAT YUNUS, Zainal TALIB, Azmi ZAKARIA et Afarin BAHRAMI : Effect of preparation parameters on physical, thermal and optical properties of n-type porous silicon. *International journal of electrochemical science*, 7:8266–8275, septembre 2012.
- [122] Abebaw B. JEMERE, Louis W. BEZUIDENHOUT, Michael J. BRETT et D. Jed HARRISON : Matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry using silicon glancing angle deposition (GLAD) films : Matrix-free LDI-MS using silicon GLAD films. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(15):2305–2311, août 2010.

- [123] Natali BUDIMIR, Jean-Claude BLAIS, Françoise FOURNIER et Jean-Claude TABEL : The use of desorption/ionization on porous silicon mass spectrometry for the detection of negative ions for fatty acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(4):680–684, février 2006.
- [124] Andrew R. KORTE, Sylwia A. STOPKA, Nicholas MORRIS, Trust RAZUNGUZZA et Akos VERTES : Large-Scale Metabolite Analysis of Standards and Human Serum by Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry from Silicon Nanopost Arrays. *Analytical Chemistry*, 88(18):8989–8996, septembre 2016.
- [125] Bennett N. WALKER, Jessica A. STOLEE, Deanna L. PICKEL, Scott T. RETTERER et Akos VERTES : Tailored Silicon Nanopost Arrays for Resonant Nanophotonic Ion Production. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(11):4835–4840, mars 2010.
- [126] Andrew R. KORTE, Nicholas J. MORRIS et Akos VERTES : High Throughput Complementary Analysis and Quantitation of Metabolites by MALDI- and Silicon Nanopost Array-Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 91(6):3951–3958, mars 2019.
- [127] S. TUOMIKOSKI, K. HUIKKO, K. GRIGORAS, P. ÖSTMAN, R. KOSTIAINEN, M. BAUMANN, J. ABIAN, T. KOTIAHO et S. FRANSILA : Preparation of porous n-type silicon sample plates for desorption/ionization on silicon mass spectrometry (DIOS-MS). *Lab Chip*, 2(4):247–253, 2002.
- [128] Ali BOUAMRANI, Ye HU, Ennio TASCIOTTI, Li LI, Ciro CHIAPPINI, Xuewu LIU et Mauro FERRARI : Mesoporous silica chips for selective enrichment and stabilization of low molecular weight proteome. *PROTEOMICS*, 10(3):496–505, février 2010.
- [129] Seo Hyeon LEE, Jae Seung KANG et Dokyoung KIM : A Mini Review : Recent Advances in Surface Modification of Porous Silicon. *Materials*, 11(12):2557, décembre 2018.
- [130] P. SEVILLA, J. GIL et C. APARICIO : Relevant Properties for Immobilizing Short Peptides on Biosurfaces. *IRBM*, 38(5):256–265, octobre 2017.
- [131] Sunia A. TRAUGER, Eden P. GO, Zhouxin SHEN, Junefredo V. APON, Bruce J. COMPTON, Edouard S. P. BOUVIER, M. G. FINN et Gary SIUZDAK : High Sensitivity and Analyte Capture with Desorption/Ionization Mass Spectrometry on Silylated Porous Silicon. *Analytical Chemistry*, 76(15):4484–4489, août 2004.
- [132] Chiara PIOTTO, Graziano GUELLA et Paolo BETTOTTI : Fluorinated surfaces : smart substrates for matrix-free laser desorption ionization : Letter to the Editor. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 31(14):1228–1230, juillet 2017.
- [133] Philipp A.E. SCHOEN, Bruno MICHEL, Alessandro CURIONI et Dimos POULIKAKOS : Hydrogen-bond enhanced thermal energy transport at functionalized, hydrophobic and hydrophilic silica–water interfaces. *Chemical Physics Letters*, 476(4-6):271–276, juillet 2009.
- [134] Hari HARIKRISHNA, William A. DUCKER et Scott T. HUXTABLE : The influence of interface bonding on thermal transport through solid–liquid interfaces. *Applied Physics Letters*, 102(25):251606, juin 2013.
- [135] Natalia SHENOGINA, Rahul GODAWAT, Pawel KEBLINSKI et Shekhar GARDE : How Wetting and Adhesion Affect Thermal Conductance of a Range of Hydrophobic to Hydrophilic Aqueous Interfaces. *Physical Review Letters*, 102(15):156101, avril 2009.
- [136] Kelsey M. STOCKER et J. Daniel GEZELTER : Simulations of Heat Conduction at Thiolate-Capped Gold Surfaces : The Role of Chain Length and Solvent Penetration. *The Journal of Physical Chemistry C*, 117(15):7605–7612, avril 2013.
- [137] Rajpreet Singh MINHAS, E. Eduardo ANTUNEZ, Taryn M. GUINAN, Thomas R. GENGENBACH, David A. RUDD et Nicolas H. VOELCKER : Fluorocarbon Plasma Gas Passivation

- Enhances Performance of Porous Silicon for Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *ACS Sensors*, 5(10):3226–3236, octobre 2020.
- [138] Michael E. KURCZY, Trent R. NORTEN, Sunia A. TRAUGER et Gary SIUZDAK : Nanostructure Imaging Mass Spectrometry : The Role of Fluorocarbons in Metabolite Analysis and Yoctomole Level Sensitivity. In Lin HE, éditeur : *Mass Spectrometry Imaging of Small Molecules*, volume 1203, pages 141–149. Humana Press, New York, NY, 2015.
- [139] T. GUINAN, M. RONCI, R. VASANI, H. KOBUS et N.H. VOELCKER : Comparison of the performance of different silicon-based SALDI substrates for illicit drug detection. *Talanta*, 132:494–502, janvier 2015.
- [140] Mathieu DUPRÉ, Christine ENJALBAL, Sonia CANTEL, Jean MARTINEZ, Nacéra MEGOUDA, Toufik HADJERSI, Rabah BOUKHERROUB et Yannick COFFINIER : Investigation of Silicon-Based Nanostructure Morphology and Chemical Termination on Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Performance. *Analytical Chemistry*, 84(24):10637–10644, décembre 2012.
- [141] C. W. TSAO, C. H. LIN, Y. C. CHENG, C. C. CHIEN, C. C. CHANG et W. Y. CHEN : Nanostructured silicon surface modifications for as a selective matrix-free laser desorption/ionization mass spectrometry. *The Analyst*, 137(11):2643, 2012.
- [142] Jing WANG, Mingsha JIE, Haifang LI, Luyao LIN, Ziyi HE, Shiqi WANG et Jin-Ming LIN : Gold nanoparticles modified porous silicon chip for SALDI-MS determination of glutathione in cells. *Talanta*, 168:222–229, juin 2017.
- [143] Han-Wei CHU, Binesh UNNIKISHNAN, Anisha ANAND, Ju-Yi MAO et Chih-Ching HUANG : Nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of drugs and metabolites. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4):1215–1228, octobre 2018.
- [144] Hong YAN, Ning XU, Wen-Yi HUANG, Huan-Mei HAN et Shou-Jun XIAO : Electroless plating of silver nanoparticles on porous silicon for laser desorption/ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 281(1-2):1–7, mars 2009.
- [145] Ya ZHOU, Chen PENG, Kenneth D. HARRIS, Rupasri MANDAL et D. Jed HARRISON : Salt Segregation and Sample Cleanup on Perfluoro-Coated Nanostructured Surfaces for Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Biofluid Samples. *Analytical Chemistry*, 89(6):3362–3369, mars 2017.
- [146] Jicheng DUAN, Hui WANG et Quan CHENG : On-Plate Desalting and SALDI-MS Analysis of Peptides with Hydrophobic Silicate Nanofilms on a Gold Substrate. *Analytical Chemistry*, 82(22):9211–9220, novembre 2010.
- [147] Arundhoti MANDAL, Monisha SINGHA, Partha Sarathi ADDY et Amit BASAK : Laser desorption ionization mass spectrometry : Recent progress in matrix-free and label-assisted techniques. *Mass Spectrometry Reviews*, 38(1):3–21, janvier 2019.
- [148] Eden P. GO, Wilasinee URITBOONTHAI, Junefredo V. APON, Sunia A. TRAUGER, Anders NORDSTROM, Grace O’MAILLE, Scott M. BRITAIN, Eric C. PETERS et Gary SIUZDAK : Selective Metabolite and Peptide Capture/Mass Detection Using Fluorous Affinity Tags. *Journal of Proteome Research*, 6(4):1492–1499, avril 2007.
- [149] Xueyun WANG, Fei TENG, Yalei WANG et Nan LU : Rapid liquid-phase microextraction of analytes from complex samples on superwetting porous silicon for onsite SALDI-MS analysis. *Talanta*, 198:63–70, juin 2019.
- [150] Chia-Wen TSAO et Zhi-Jie YANG : High Sensitivity and High Detection Specificity of Gold-Nanoparticle-Grafted Nanostructured Silicon Mass Spectrometry for Glucose Analysis. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(40):22630–22637, octobre 2015.
- [151] Taryn GUINAN, Maurizio RONCI, Hilton KOBUS et Nicolas H. VOELCKER : Rapid detection of illicit drugs in neat saliva using desorption/ionization on porous silicon. *Talanta*, 99:791–798, septembre 2012.

- [152] Hashim Z. ALHMOUD, Taryn M. GUINAN, Roey ELNATHAN, Hilton KOBUS et Nicolas H. VOELCKER : Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ordered silicon nanopillar arrays. *The Analyst*, 139(22):5999–6009, septembre 2014.
- [153] Xiaoming CHEN, Tao WANG, Leimiao LIN, Fangjie WO, Yaqin LIU, Xiao LIANG, Hui YE et Jianmin WU : Tip-Enhanced Photoinduced Electron Transfer and Ionization on Vertical Silicon Nanowires. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(17):14389–14398, mai 2018.
- [154] Xinrong JIANG, Xiaoming CHEN, Tao WANG, Yuexin LI, Aiwu PAN et Jianmin WU : Perfluorinated polymer modified vertical silicon nanowires as ultra low noise laser desorption ionization substrate for salivary metabolites profiling. *Talanta*, 225:122022, avril 2021.
- [155] Xinrong JIANG, Fengbin GAO, Xiaoming CHEN, Yanlan YU, Guoqing DING et Jianmin WU : Ultrasensitive and High Reproducible Detection of Urinary Metabolites Using the Tip-Contact Extraction Method Coupled with Negative LDI-MS. *Journal of Proteome Research*, 20(8):4022–4030, août 2021.
- [156] Ketul C. POPAT, Sadhana SHARMA, Robert W. JOHNSON et Tejal A. DESAI : AFM analysis of organic silane thin films for bioMEMS applications. *Surface and Interface Analysis*, 35(2):205–215, février 2003.
- [157] Magali PHANER-GOUTORBE, Vincent DUGAS, Yann CHEVOLOT et Eliane SOUTEYRAND : Silanization of silica and glass slides for DNA microarrays by impregnation and gas phase protocols : A comparative study. *Materials Science and Engineering : C*, 31(2):384–390, mars 2011.
- [158] Hong-Liang LI, Yingchun ZHU, Dongsheng XU, Yong WAN, Linhua XIA et Xiu-song ZHAO : Vapor-phase silanization of oxidized porous silicon for stabilizing composition and photoluminescence. *Journal of Applied Physics*, 105(11):114307, juin 2009.
- [159] Rosalba MORETTA, Luca DE STEFANO, Monica TERRACCIANO et Ilaria REA : Porous Silicon Optical Devices : Recent Advances in Biosensing Applications. *Sensors*, 21(4):1336, février 2021.
- [160] Nesrine AISSAOUI, Latifa BERGAOUI, Jessem LANDOULSI, Jean-François LAMBERT et Souhir BOUJDAY : Silane Layers on Silicon Surfaces : Mechanism of Interaction, Stability, and Influence on Protein Adsorption. *Langmuir*, 28(1):656–665, janvier 2012.
- [161] Dawn M. YANKER et Joshua A. MAURER : Direct printing of trichlorosilanes on glass for selective protein adsorption and cell growth. *Molecular BioSystems*, 4(6):502, 2008.
- [162] Mark J. STEVENS : Thoughts on the Structure of Alkylsilane Monolayers. *Langmuir*, 15(8):2773–2778, avril 1999.
- [163] Alexander A. GOLUB, Alexander I. ZUBENKO et Boris V. ZHMUD : γ -APTES Modified Silica Gels : The Structure of the Surface Layer. *Journal of Colloid and Interface Science*, 179(2):482–487, mai 1996.
- [164] Elaine T VANDENBERG, Lars BERTILSSON, Bo LIEDBERG, Kajsa UVDAL, Ragnar ER-LANDSSON, Hans ELWING et Ingemar LUNDSTRÖM : Structure of 3-aminopropyl triethoxy silane on silicon oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 147(1):103–118, novembre 1991.
- [165] Amrita R. YADAV, Rashmi SRIRAM, Jared A. CARTER et Benjamin L. MILLER : Comparative study of solution-phase and vapor-phase deposition of aminosilanes on silicon dioxide surfaces. *Materials Science and Engineering : C*, 35:283–290, février 2014.
- [166] Jiahao CHEN, Boyce CHANG, Stephanie OYOLA-REYNOSO, Zhengjia WANG et Martin THUO : Quantifying Gauche Defects and Phase Evolution in Self-Assembled Monolayers through Sessile Drops. *ACS Omega*, 2(5):2072–2084, mai 2017.
- [167] Walid-Madhat MUNIEF, Florian HEIB, Felix HEMPEL, Xiaoling LU, Miriam SCHWARTZ, Vivek PACHAURI, Rolf HEMPELMANN, Michael SCHMITT et Sven INGEBRANDT : Silane

- Deposition via Gas-Phase Evaporation and High-Resolution Surface Characterization of the Ultrathin Siloxane Coatings. *Langmuir*, 34(35):10217–10229, septembre 2018.
- [168] M. LESSEL, O. BÄUMCHEN, M. KLOS, H. HÄHL, R. FETZER, M. PAULUS, R. SEEMANN et K. JACOBS : Self-assembled silane monolayers : an efficient step-by-step recipe for high-quality, low energy surfaces. *Surface and Interface Analysis*, 47(5):557–564, mai 2015.
- [169] Feng ZHANG, Ken SAUTTER, Adam M. LARSEN, Daniel A. FINDLEY, Robert C. DAVIS, Hussein SAMHA et Matthew R. LINFORD : Chemical Vapor Deposition of Three Aminosilanes on Silicon Dioxide : Surface Characterization, Stability, Effects of Silane Concentration, and Cyanine Dye Adsorption. *Langmuir*, 26(18):14648–14654, septembre 2010.
- [170] Zhugen YANG, Yann CHEVOLOT, Thomas GÉHIN, Vincent DUGAS, Nicolas XANTHOPOULOS, Vincent LAPORTE, Thierry DELAIR, Yasemin ATAMAN-ÖNAL, Geneviève CHOQUET-KASTYLEVSKY, Eliane SOUTEYRAND et Emmanuelle LAURENCEAU : Characterization of Three Amino-Functionalized Surfaces and Evaluation of Antibody Immobilization for the Multiplex Detection of Tumor Markers Involved in Colorectal Cancer. *Langmuir*, 29(5):1498–1509, février 2013.
- [171] E. O. KIRICHENKO et E. Ya. GATAPOVA : Studying of the Contact Angle Hysteresis on Various Surfaces. *MATEC Web of Conferences*, 72:01045, 2016.
- [172] Zhugen YANG : *3D-Microstructured Protein Chip for Cancer Diagnosis*. Thèse de doctorat, Ecole Centrale de Lyon, 2012.
- [173] Fred A. STEVIE et Carrie L. DONLEY : Introduction to x-ray photoelectron spectroscopy. *Journal of Vacuum Science & Technology A*, 38(6):063204, 2020.
- [174] Rebecca A. SHIRCLIFF, Ina T. MARTIN, Joel W. PANKOW, John FENNELL, Paul STRADINS, Maria L. GHIRARDI, Scott W. COWLEY et Howard M. BRANZ : High-Resolution X-ray Photoelectron Spectroscopy of Mixed Silane Monolayers for DNA Attachment. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3(9):3285–3292, septembre 2011.
- [175] S. TANUMA, C. J. POWELL et D. R. PENN : Calculation of electron inelastic mean free paths (IMFPs) VII. Reliability of the TPP-2M IMFP predictive equation. *Surface and Interface Analysis*, 35(3):268–275, mars 2003.
- [176] J. J. BENÍTEZ, S. KOPTA, I. DÍEZ-PÉREZ, F. SANZ, D. F. OGLETREE et M. SALMERON : Molecular Packing Changes of Octadecylamine Monolayers on Mica Induced by Pressure and Humidity. *Langmuir*, 19(3):762–765, février 2003.
- [177] Brian DORVEL, Bobby REDDY JR, Ian BLOCK, Patrick MATHIAS, Susan E CLARE, Brian CUNNINGHAM, Donald E BERGSTROM et Rashid BASHIR : Vapor-phase deposition of monofunctional alkoxysilanes for sub-nanometer-level biointerfacing on silicon oxide surfaces. *Advanced Functional Materials*, 20(1):87–95, 2010.
- [178] Ghaleb A HUSSEINI, Justin PEACOCK, Amarchand SATHYAPALAN, Lloyd W ZILCH, Matthew C ASPLUND, Eric T SEVY et Matthew R LINFORD : Alkyl monolayers on silica surfaces prepared using neat, heated dimethylmonochlorosilanes with low vapor pressures. *Langmuir*, 19(12):5169–5171, 2003.
- [179] B BUSZEWSKI, L NONDEK, A JURÁŠEK et D BEREK : Preparation of silanized silica with high ligand density. the effect of silane structure. *Chromatographia*, 23:442–446, 1987.
- [180] Alexander Y. FADEEV et Thomas J. MCCARTHY : Self-Assembly Is Not the Only Reaction Possible between Alkyltrichlorosilanes and Surfaces : Monomolecular and Oligomeric Covalently Attached Layers of Dichloro- and Trichloroalkylsilanes on Silicon. *Langmuir*, 16(18):7268–7274, septembre 2000.
- [181] S. FIORILLI, P. RIVOLO, E. DESCROVI, C. RICCIARDI, L. PASQUARDINI, L. LUNELLI, L. VANZETTI, C. PEDERZOLLI, B. ONIDA et E. GARRONE : Vapor-phase self-assembled

- monolayers of aminosilane on plasma-activated silicon substrates. *Journal of Colloid and Interface Science*, 321(1):235–241, mai 2008.
- [182] Vincent DUGAS, Géraldine DEPRET, Yves CHEVALIER, Xavier NESME et Éliane SOUTEYRAND : Immobilization of single-stranded DNA fragments to solid surfaces and their repeatable specific hybridization : covalent binding or adsorption? *Sensors and Actuators B : Chemical*, 101(1):112–121, juin 2004.
- [183] Michael P. ALLEN : Introduction to molecular dynamics simulation. In *Computational soft matter : from synthetic polymers to proteins*, numéro 23, pages 1–28. NIC, Oxford, 2004.
- [184] M.A. GONZÁLEZ : Force fields and molecular dynamics simulations. *École thématique de la Société Française de la Neutronique*, 12:169–200, 2011.
- [185] Solène LECOT : *Etude de l'adsorption de protéines sur des monocouches de silanes et de leur impact sur la reconnaissance moléculaire, par simulation de dynamique moléculaire*. Thèse de doctorat, Université de Lyon, 2021.
- [186] Daniel L PARTON : *Pushing the boundaries : molecular dynamics simulations of complex biological membranes*. Thèse de doctorat, Oxford University, UK, 2011.
- [187] Tom DARDEN, Darrin YORK et Lee PEDERSEN : Particle mesh Ewald : An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics*, 98(12):10089–10092, juin 1993.
- [188] LINDAHL, ABRAHAM, HESS et VAN DER SPOEL : GROMACS 2021.6 Manual. juillet 2022.
- [189] F. VITALINI, A. S. J. S. MEY, F. NOÉ et B. G. KELLER : Dynamic properties of force fields. *The Journal of Chemical Physics*, 142(8):084101, février 2015.
- [190] Sascha HEMPEL et Gabriele SADOWSKI : Water activity coefficients in aqueous amino acid solutions by molecular dynamics simulation : 1. Force field development. *Molecular Simulation*, 38(2):132–138, février 2012.
- [191] Jiří PRŮŠA et Michal CIFRA : Dependence of amino-acid dielectric relaxation on solute-water interaction : Molecular dynamics study. *Journal of Molecular Liquids*, 303:112613, avril 2020.
- [192] Yasuhito KARINO, Maxim V. FEDOROV et Nobuyuki MATUBAYASI : End-point calculation of solvation free energy of amino-acid analogs by molecular theories of solution. *Chemical Physics Letters*, 496(4-6):351–355, août 2010.
- [193] Yingtu LI, Mingrui LIAO et Jian ZHOU : Catechol-cation adhesion on silica surfaces : molecular dynamics simulations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19(43):29222–29231, 2017.
- [194] Jie FENG, Ras B. PANDEY, Rajiv J. BERRY, Barry L. FARMER, Rajesh R. NAIK et Hendrik HEINZ : Adsorption mechanism of single amino acid and surfactant molecules to Au {111} surfaces in aqueous solution : design rules for metal-binding molecules. *Soft Matter*, 7(5):2113, 2011.
- [195] Lorenzo AGOSTA, Giuseppe ZOLLO, Caterina ARCANGELI, Francesco BUONOCORE, Fabrizio GALA et Massimo CELINO : Water driven adsorption of amino acids on the (101) anatase TiO_2 surface : an ab initio study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(3):1556–1561, 2015.
- [196] Y.H. XIE et A.K. SOH : Investigation of non-covalent association of single-walled carbon nanotube with amylose by molecular dynamics simulation. *Materials Letters*, 59(8-9):971–975, avril 2005.
- [197] Albert RIMOLA, Mariona SODUPE et Piero UGLIENGO : Affinity Scale for the Interaction of Amino Acids with Silica Surfaces. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(14):5741–5750, avril 2009.

- [198] Dominique COSTA, Claire LOMENECH, Ming MENG, Lorenzo STIEVANO et Jean-François LAMBERT : Microsolvation of glycine by silanol ligands : A DFT study. *Journal of Molecular Structure : THEOCHEM*, 806(1-3):253–259, mars 2007.
- [199] Marco NONELLA et Stefan SEEGER : Investigating Alanine–Silica Interaction by Means of First-Principles Molecular-Dynamics Simulations. *ChemPhysChem*, 9(3):414–421, février 2008.
- [200] Louise B. WRIGHT et Tiffany R. WALSH : Facet Selectivity of Binding on Quartz Surfaces : Free Energy Calculations of Amino-Acid Analogue Adsorption. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(4):2933–2945, février 2012.
- [201] Mengjun XUE, Janani SAMPATH, Rachel N. GEBHART, Havard J. HAUGEN, S. Petter LYGSTADAAS, Jim PFAENDTNER et Gary DROBNY : Studies of Dynamic Binding of Amino Acids to TiO₂ Nanoparticle Surfaces by Solution NMR and Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir*, 36(35):10341–10350, septembre 2020.
- [202] Saientan BAG, Stefan RAUWOLF, Mikhail SUYETIN, Sebastian P. SCHWAMINGER, Wolfgang WENZEL et Sonja BERENSMEIER : Buffer Influence on the Amino Acid Silica Interaction. *ChemPhysChem*, 21(20):2347–2356, octobre 2020.
- [203] Muhammad ASADUZZAMAN, Md Nasir Uddin AHMED, AKM Ferdous RAHMAN, Syed Tariq REZA, Mayisha AFIFA, BUM Wahid AHMED et Mohammad ASADUZZAMAN : Role of Glucose Variability in the Diagnosis of Septic Patients. *Bangladesh Critical Care Journal*, 10(1):10–14, avril 2022.
- [204] John C. MARSHALL : Biomarkers of sepsis. *Current Infectious Disease Reports*, 8(5):351–357, septembre 2006.
- [205] Chemicalize. <https://chemicalize.com>. Consulté le 13/02/2023.
- [206] Peter LINSTROM : NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database 69, 1997. Type : dataset.
- [207] Younes VALADBEIGI, Sahar BAYAT et Vahideh ILBEIGI : A Novel Application of Dopants in Ion Mobility Spectrometry : Suppression of Fragment Ions of Citric Acid. *Analytical Chemistry*, 92(11):7924–7931, juin 2020.
- [208] David M. CLOSE : Calculated Vertical Ionization Energies of the Common α -Amino Acids in the Gas Phase and in Solution. *The Journal of Physical Chemistry A*, 115(13):2900–2912, avril 2011.
- [209] Alice CAMBIAGHI, Bernardo Bollen PINTO, Laura BRUNELLI, Francesca FALCETTA, Federico ALETTI, Karim BENDJELID, Roberta PASTORELLI et Manuela FERRARIO : Characterization of a metabolomic profile associated with responsiveness to therapy in the acute phase of septic shock. *Scientific reports*, 7(1):9748, 2017.
- [210] Constantin LOGOFATU, Catalin Constantin NEGRILA, Rodica V GHITA, Florica UNGUREANU, Constantin COTIRLAN, CGAS MANEA et Mihai Florin LAZARESCU : Study of sio₂/si interface by surface techniques. *Crystalline Silicon-Properties and Uses*, 23:42, 2011.
- [211] Krishna MR KALLURY, Peter M MACDONALD et Michael THOMPSON : Effect of surface water and base catalysis on the silanization of silica by (aminopropyl) alkoxy silanes studied by x-ray photoelectron spectroscopy and ¹³C cross-polarization/magic angle spinning nuclear magnetic resonance. *Langmuir*, 10(2):492–499, 1994.
- [212] Rebecca A SHIRCLIFF, Paul STRADINS, Helio MOUTINHO, John FENNELL, Maria L GHIRARDI, Scott W COWLEY, Howard M BRANZ et Ina T MARTIN : Angle-resolved xps analysis and characterization of monolayer and multilayer silane films for dna coupling to silica. *Langmuir*, 29(12):4057–4067, 2013.

- [213] CA MORROW, Diane E MOORE et DA LOCKNER : The effect of mineral bond strength and adsorbed water on fault gouge frictional strength. *Geophysical research letters*, 27(6):815–818, 2000.
- [214] RC MACKENZIE : The differential thermal analysis of clays, 456 pp. *Mineral. Soc., London*, 1957.
- [215] Masahiro KITABATA, Tseden TADDESE et Susumu OKAZAKI : Molecular Dynamics Study on Wettability of Poly(vinylidene fluoride) Crystalline and Amorphous Surfaces. *Langmuir*, 34(40):12214–12223, octobre 2018.
- [216] Yida HUANG, Shaoqian DU, Jun LIU, Weiyi HUANG, Wanshan LIU, Mengji ZHANG, Ning LI, Ruimin WANG, Jiao WU, Wei CHEN, Mengyi JIANG, Tianhao ZHOU, Jing CAO, Jing YANG, Lin HUANG, An GU, Jingyang NIU, Yuan CAO, Wei-Xing ZONG, Xin WANG, Jun LIU, Kun QIAN et Hongxia WANG : Diagnosis and prognosis of breast cancer by high-performance serum metabolic fingerprints. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(12):e2122245119, mars 2022.
- [217] Anuja Shreeram KULKARNI, Lin HUANG et Kun QIAN : Material-assisted mass spectrometric analysis of low molecular weight compounds for biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry B*, 9(17):3622–3639, 2021.
- [218] Dandan LI, Jia YI, Guobin HAN et Liang QIAO : MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au*, 2(5):385–404, octobre 2022.
- [219] Jarod A. FINCHER, Andrew R. KORTE, Sridevi YADAVILLI, Nicholas J. MORRIS et Akos VERTES : Multimodal imaging of biological tissues using combined MALDI and NAPA-LDI mass spectrometry for enhanced molecular coverage. *The Analyst*, 145(21):6910–6918, 2020.
- [220] Trent R. NORTHEN, Oscar YANES, Michael T. NORTHEN, Dena MARRINUCCI, Winnie URITBOONTHAI, Junefredo APON, Stephen L. GOLLEDGE, Anders NORDSTRÖM et Gary SIUZDAK : Clathrate nanostructures for mass spectrometry. *Nature*, 449(7165):1033–1036, octobre 2007.
- [221] Matthew P. GREVING, Gary J. PATTI et Gary SIUZDAK : Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry Metabolite Analysis and Imaging. *Analytical Chemistry*, 83(1):2–7, janvier 2011.
- [222] Zhi QIAO et Franziska LISSEL : MALDI Matrices for the Analysis of Low Molecular Weight Compounds : Rational Design, Challenges and Perspectives. *Chemistry – An Asian Journal*, 16(8):868–878, avril 2021.
- [223] Tara N. MOENING, Victoria L. BROWN et Lin HE : Matrix-enhanced nanostructure initiator mass spectrometry (ME-NIMS) for small molecule detection and imaging. *Analytical Methods*, 8(46):8234–8240, 2016.
- [224] Yang TIAN, Ruizhi TANG, Luyao LIU, Yang YU, Shujuan MA, Bolin GONG et Junjie OU : Glutathione-modified ordered mesoporous silicas for enrichment of N-linked glycopeptides by hydrophilic interaction chromatography. *Talanta*, 217:121082, septembre 2020.
- [225] Adrien MOMBRUN, Mohamed-Ali BOUAMRANI, Eric BOYER et Christelle YEROMONAHOS : Device for in vivo sampling of biological species, novembre 2015.
- [226] Solène LECOT, Yann CHEVOLOT, Magali PHANER-GOUTORBE et Christelle YEROMONAHOS : Impact of Silane Monolayers on the Adsorption of Streptavidin on Silica and Its Subsequent Interactions with Biotin : Molecular Dynamics and Steered Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 124(31):6786–6796, août 2020.
- [227] Solène LECOT, Yann CHEVOLOT, Magali PHANER-GOUTORBE et Christelle YEROMONAHOS : Curious Binding Energy Increase between the Receptor-Binding Domain of the

- SARS-CoV-2 Spike Protein and Angiotensin-Converting Enzyme 2 Adsorbed on a Silane Monolayer from Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 125(39):11078–11090, octobre 2021.
- [228] Solène LECOT, Antonin LAVIGNE, Zihua YANG, Yann CHEVOLOT, Magali PHANER-GOUTORBE et Christelle YEROMONAHOS : Effects of the Chemical and Structural Properties of Silane Monolayers on the Organization of Water Molecules and Ions at Interfaces, from Molecular Dynamics Simulations. *Langmuir*, 37(18):5563–5572, mai 2021.
- [229] Rodica GHITA, Constantin LOGOFATU, Catalin-Constantin NEGRILA, Florica UNGUREANU, Costel COTIRLAN, Adrian-Stefan MANEA, Mihail-Florin LAZARESCU et Corneliu GHIC : Study of SiO₂/Si Interface by Surface Techniques. In Sukumar BASU, éditeur : *Crystalline Silicon - Properties and Uses*, pages 23–42. InTech, juillet 2011.
- [230] Kamila CHUGHTAI, Lu JIANG, Tiffany R. GREENWOOD, Kristine GLUNDE et Ron M.A. HEEREN : Mass spectrometry images acylcarnitines, phosphatidylcholines, and sphingomyelin in MDA-MB-231 breast tumor models. *Journal of Lipid Research*, 54(2):333–344, février 2013.
- [231] Antonin LAVIGNE, Benoît GILQUIN, Thomas GÉHIN, Vincent JOUSSEAUME, Marc VEILLEROT, Yann CHEVOLOT, Magali PHANER-GOUTORBE et Christelle YEROMONAHOS : Effects of silane monolayers on lysophosphatidylcholine (lysopc) detection by desorption ionization on silicon mass spectrometry (dios-ms) in solution and plasma. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 15(15):18685–18693, 2023.
- [232] Zhong GUO et Lin HE : A binary matrix for background suppression in MALDI-MS of small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(5):1939–1944, février 2007.
- [233] Gregor MCCOMBIE et Richard KNOCHENMUSS : Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect To Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences. *Analytical Chemistry*, 76(17):4990–4997, septembre 2004.
- [234] Sohta YAMAGUCHI, Takashi FUJITA, Tatsuya FUJINO et Takashi KORENAGA : Suppression of Matrix-related Ions Using Cyclodextrin in MALDI Mass Spectrometry. *Analytical Sciences*, 24(11):1497–1500, novembre 2008.
- [235] Richard KNOCHENMUSS : A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry*, 37(8):867–877, août 2002.
- [236] Richard KNOCHENMUSS : A Quantitative Model of Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Including Analyte Ion Generation. *Analytical Chemistry*, 75(10):2199–2207, mai 2003.
- [237] Hanadi IBRAHIM, Kristina JURCIC, Jasmine S-H WANG, Shawn N WHITEHEAD et Ken K-C YEUNG : 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (dph) as a novel matrix for maldi ms imaging of fatty acids, phospholipids, and sulfatides in brain tissues. *Analytical chemistry*, 89(23):12828–12836, 2017.
- [238] Frédéric FOURNELLE, Ethan YANG, Martin DUFRESNE et Pierre CHAURAND : Minimizing Visceral Fat Delocalization on Tissue Sections with Porous Aluminum Oxide Slides for Imaging Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 92(7):5158–5167, avril 2020.
- [239] Dan OUYANG, Qiong ZHENG, Huan HUANG, Zongwei CAI et Zian LIN : Covalent Organic Framework Nanofilm-Based Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for 5-Fluorouracil Analysis and Tissue Imaging. *Analytical Chemistry*, 93(47):15573–15578, novembre 2021.
- [240] Dan OUYANG, Zihua FU, Guorong LI, Chao ZHONG, Jiahao YUAN, Huan HUANG, Juan LIN, Gang XU et Zian LIN : Metal-organic framework nanofilm enhances serum metabolic profiles for diagnosis and subtype of cardiovascular disease. *Chinese Chemical Letters*, page 107992, novembre 2022.

- [241] Jie WU, Dan OUYANG, Yanting HE, Hang SU, Baichuan YANG, Jing LI, Qianqian SUN, Zian LIN et Zongwei CAI : Synergistic Effect of Metal–Organic Framework/Gallic Acid in Enhanced Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(41):38255–38264, octobre 2019.
- [242] Xiang GAO, Xin BI, Juntong WEI, Zhimin PENG, Hongxia LIU, Yuyang JIANG, Wei WEI et Zongwei CAI : N-phosphorylation labeling for analysis of twenty natural amino acids and small peptides by using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *The Analyst*, 138(9):2632, 2013.
- [243] Hui HE, Zhanchen GUO, Yanrong WEN, Shuxin XU et Zhen LIU : Recent advances in nanostructure/nanomaterial-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of low molecular mass compounds. *Analytica Chimica Acta*, 1090:1–22, décembre 2019.
- [244] Melissa PULFER et Robert C. MURPHY : Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrometry Reviews*, 22(5):332–364, septembre 2003.
- [245] Zhiyi YANG, Wenbo LI, Hao HUANG, Songlei REN, Yongfan MEN, Fang LI, Xuefeng YU et Qian LUO : Detection of serum phospholipids by microchannel-integrated black phosphorus-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Talanta*, 237:122978, janvier 2022.
- [246] T WRÓBLEWSKI, Leszek ZIEMCZONEK, K SZEREMENT et GP KARWASZ : Proton affinities of simple organic compounds. *Czechoslovak Journal of Physics*, 56:B1110–B1115, 2006.
- [247] Edward P. L. HUNTER et Sharon G. LIAS : Evaluated Gas Phase Basicities and Proton Affinities of Molecules : An Update. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 27(3):413–656, mai 1998.
- [248] John L HOLMES, Nick A van HUIZEN et Peter C BURGERS : Proton affinities and ion enthalpies. *European Journal of Mass Spectrometry*, 23(6):341–350, 2017.
- [249] Pengwei ZHANG, Wan CHAN, Irene L. ANG, Rui WEI, Melody M. T. LAM, Kate M. K. LEI et Terence C. W. POON : Revisiting Fragmentation Reactions of Protonated α -Amino Acids by High-Resolution Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry with Collision-Induced Dissociation. *Scientific Reports*, 9(1):6453, avril 2019.
- [250] A. N. ZAVILOPULO, A. I. BULHAKOVA, S. S. DEMES, E. Yu. REMETA et A. V. VASILIEV : Ionization and fragmentation of valine molecules in the gas phase by electron impact. *The European Physical Journal D*, 75(11):287, novembre 2021.
- [251] Eddy Wing Yin NG, Hugh Simon LAM, Pak Cheung NG et Terence Chuen Wai POON : Quantification of citrulline by parallel fragmentation monitoring — A novel method using graphitized carbon nanoparticles and MALDI-TOF/TOF mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 420:121–127, mai 2013.
- [252] Yukio YOKOYAMA, Tomoko TAKAHASHI et Hisakuni SATO : Rapid Screening for Inborn Errors of Metabolism Using Liquid Ionization Mass Spectrometry with Dried Blood Spots on Screening Cards. *Analytical Sciences/Supplements*, 17icas:i1535–i1537, 2002.

Résumé

Le sepsis est une infection bactérienne potentiellement mortelle et pour lequel, les chances de survie du patient diminuent de 7 % toutes les heures. Aucun outil de diagnostic spécifique et rapide n'existe à ce jour, il est donc urgent d'en développer un pour pouvoir traiter la maladie dès les premiers symptômes. Cette thèse propose le développement d'un tel outil basé sur la détection de métabolites biomarqueurs du sepsis en analysant le dépôt d'un échantillon sanguin sur un substrat de silicium poreux silanisé par spectrométrie de masse. Pour accélérer la préparation et diminuer les risques liés à l'expérimentateur, aucun traitement de l'échantillon de plasma en amont n'est nécessaire, uniquement un lavage de la surface après le dépôt pour retirer les interférences dues aux protéines présentes sur le signal.

Ce travail s'intéresse au développement de cet outil, premièrement en fonctionnalisant des échantillons de silicium poreux avec quatre silanes pour modifier les propriétés chimiques de la surface. Ce procédé est caractérisé par XPS et par ToF-SIMS. Ensuite, deux techniques de spectrométrie de masse sont développées. La première, la spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) permet une analyse sensible des métabolites en solution mais est limitée pour très faibles concentrations à cause de la présence de la matrice organique qui interfère sur le signal. La seconde, la spectrométrie de masse par désorption/ionisation sur silicium (DIOS) s'affranchit de cette matrice et permet de détecter des métabolites en solution et dans du plasma, le tout sans pré-traitement des échantillons. Ces résultats sont comparés à des simulations de dynamique moléculaire dont l'objectif est d'étudier l'adsorption de métabolites sur des surfaces de silice silanisées.

Mots clés : Sepsis, silanisation, silicium poreux, caractérisation de surfaces, fonctionnalisation de surface en phase vapeur et liquide, spectrométrie de masse, MALDI, DIOS, Dynamique Moléculaire, métabolites

Abstract

Sepsis is a bacterial infection, potentially deadly, and for which chances of survival decrease by 7 % per hour. At the moment, the diagnostic techniques are long and tedious, so it is urgent to develop one to be able to start the treatment when the first symptoms appear. This thesis propose the development of a new chip based on the detection of sepsis biomarker metabolites by analyzing a drop of plasma on porous silicon using mass spectrometry. To speed up the process and decrease the risk associated with the preparation, no sample pre-treatment is needed, only the washing of the surface before measurement to remove abundant proteins from the sample.

This work focuses on the development of this chip. Firstly, by functionalizing porous silicon samples with four different silanes to modify the chemical properties of the surface and detect specifically some metabolites. This process is characterized by XPS and ToF-SIMS. Then, two mass spectrometry techniques are investigated. The first, matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry allow a sensitive analysis of metabolites in solution but is limited for the detection at low concentrations because of the interferences of the organic matrix. The second, desorption/ionization on silicon (DIOS) mass spectrometry overcomes the use of a matrix thanks to the nanostructuring of silicon and allows the detection of metabolites in solution and in plasma without sample pre-treatment, These results are compared to Molecular Dynamics simulations of the adsorption of metabolites on silanized silica surfaces

Keywords : Sepsis, silanization, porous silicon, surface characterization, vapor and liquid phase surface functionalization, mass spectrometry, MALDI, DIOS, Molecular Dynamics, metabolites