



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

# THESE

présentée

à l'Université de METZ

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ**

*Spécialité* : Chimie-Physique

par

**Pierre-Jean CALBA**

**Contribution à l'étude du mécanisme MALDI  
par l'utilisation de sondes moléculaires  
photochromiques**

**Soutenue le 23 novembre 1998**

*Président du Jury*

**Jean-François MULLER**, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de Thèse.

*Rapporteurs*

**Jean-Claude PROMÉ**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

**Alain Van DORSSELAER**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.

*Examineurs*

**Robert GUGLIELMETTI**, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille II.

**Marie-Laure VIRIOT**, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.

**Gérard JANIN**, Directeur de Recherche à l'INRA de

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 255132 6

, Chargé de Recherche CNRS à l'INRA de Nancy I.

**THESE**

présentée

à l'Université de METZ

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ***Spécialité* : Chimie-Physique

par

**Pierre-Jean CALBA**

BIBLIOTHEQUE UNIVERCITAIRE SCIENCE ET TECHNIQUES - METZ -	
N° Inv	1998/1005
Cote	S/123 98/48
Loc.	Magasin
Cat	

**Contribution à l'étude du mécanisme MALDI  
par l'utilisation de sondes moléculaires  
photochromiques**

Soutenue le 23 novembre 1998

- Président du Jury* **Jean-François MULLER**, Professeur à l'Université de Metz, Directeur de Thèse.
- Rapporteurs* **Jean-Claude PROMÉ**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.  
**Alain Van DORSSELAER**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg.
- Examineurs* **Robert GUGLIELMETTI**, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille II.  
**Marie-Laure VIRIOT**, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut National Polytechnique de Lorraine.  
**Gérard JANIN**, Directeur de Recherche à l'INRA de Nancy.  
**Jean-Pierre JOLY**, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré de Nancy I.

*A mes parents Monique et Gilbert*

*A Sylvie*

*A mes frères Laurent et Loïc*

*Ainsi qu'à Valérie et Catherine*

*Ce travail a été effectué au laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'Université de Metz.*

*Je remercie tout particulièrement le Professeur **Jean-François Muller**, sous la direction duquel ce travail a été réalisé, pour l'accueil chaleureux qu'il m'a réservé au sein de son laboratoire, la confiance et la bienveillance sans réserves, dont il a fait preuve à mon égard, et pour ses compétences et son expérience dont j'ai pu bénéficier. Qu'il veuille bien trouver ici, l'expression de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements et ma reconnaissance vont également à Monsieur **Jean-Claude Promé**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, ainsi qu'à Monsieur **Alain Van Dorsselaer**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg pour l'intérêt qu'ils ont accordé à mon travail en acceptant de le juger en tant que Rapporteurs.*

*Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Monsieur **Robert Guglielmetti**, Professeur à l'Université d'Aix-Marseille II, à Madame **Marie-Laure Viriot**, Directeur de Recherche CNRS à l'Institut National Polytechnique de Lorraine, à Monsieur **Gérard Janin**, Directeur de Recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique de Nancy, et à Monsieur **Jean-Pierre Joly**, Chargé de Recherche CNRS à l'Université Henri Poincaré de Nancy I qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Messieurs **Gabriel Krier**, Ingénieur de Recherche et **Lionel Vernex-Loset**, Ingénieur d'Etude pour leur grande disponibilité et gentillesse, et avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler.*

*Je ne peux oublier Monsieur **Adam Hachimi**, qui au cours de mon DEA, m'a fait partager sa passion pour la recherche.*

*Je tiens également à remercier Madame **Martine Flerès**, notre secrétaire, pour sa bonne humeur et son aide administrative de tous les instants.*

*Une mention toute particulière aux deux autres Mousquetaires du laboratoire, **Pierre Cassat** et **Abdel Karim El Ouachini**, avec lesquels j'ai passé de bons moments depuis le second cycle.*

*A toute l'équipe du LSMCL : **D. Muller**, **E. Millon**, **J.J. Gaumet**, **B. Maunît**, les étudiants : **Nouari**, **Frédéric**, **Benoît**, **Marc**, **Céline**, **David** et **Rachel** pour leurs conseils informatiques éclairés, ainsi que les anciens : **Eric Poitevin**, **Pascal Manuelli**, **Nadine Lobstein**, **Benoît Kubler**, **Sandrine Peter**, **Philippe Hollinger**, **Paul-Eric Larfargue**, **Christophe Masselon**, **Suzanna Martinovic**, qui ont su maintenir une excellente ambiance de travail au laboratoire.*

*Merci à Mesdames **Marie-Françoise Schmitt-Dubessy** (Docteur, Chimie Organique 3-Nancy I) et **Patricia Grandieu** (Doctorant, INRA-Nancy) avec lesquelles j'ai travaillé dans le cadre de nos thèses respectives. Je les remercie pour tous les échanges fructueux que nous avons pu avoir.*

# Sommaire

<b>Introduction Générale</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre I. Le mécanisme MALDI</b>	<b>4</b>
<b>I. La technique MALDI</b>	<b>5</b>
1.1. Son historique	5
1.2. Son principe	6
1.3. Ses principales caractéristiques	7
1.4. Perspectives	8
<b>II. Les processus de désorption/ionisation laser assistée par matrice</b>	<b>9</b>
II.1. L'étape de désorption	9
II.1.1. La formation du panache gazeux	10
II.1.2. La nature du processus	17
II.1.3. Sublimation/fragmentation	25
II.2. L'étape d'ionisation	27
II.2.1. L'ionisation laser des molécules organiques en phase gazeuse	27
II.2.1.1. L'ionisation résonante à deux ou trois photons	28
II.2.1.2. L'ionisation multi-photonique	30
II.2.2. Siège de l'ionisation MALDI	31
II.2.3. Les mécanismes d'ionisation proposés	38
II.2.3.1. La protonation	39
II.2.3.2. La cationisation	43
II.3. Les facteurs importants	44
II.3.1. L'irradiation laser	44
II.3.2. La matrice	45
II.3.3. Le mode de dépôt	47
<b>III. Conclusion</b>	<b>50</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>52</b>
<b>Chapitre II. Les spironaphtoxazines : Sondes Moléculaires Photochromiques</b>	<b>56</b>
<b>I. Le photochromisme</b>	<b>57</b>
1.1. Définition	57
1.2. Les différentes classes de photochromes	57
1.3. Les paramètres photochromiques	59
1.4. Les applications	61
<b>II. Les composés spironaphtoxaziniques</b>	<b>62</b>
II.1. Présentation	62
II.2. Propriétés photochromiques	64
II.2.1. Influence de la substitution sur les paramètres spectrocinétiques des formes colorées	66
II.2.1.1. Etudes par photolyse à éclairs	66
II.2.1.2. Etudes par RMN <sup>13</sup> C	68
II.2.1.3. Etudes théoriques par les calculs quantiques	70
II.2.2. Etude de la photodégradation	72
II.3. Synthèses	74

<i>II.4. Représentation de la forme ouverte</i>	76
II.4.1. Détermination de sa géométrie	76
II.4.2. Détermination de la répartition électronique	77
<i>II.5. Mécanisme d'ouverture/fermeture</i>	79
II.5.1. Etudes expérimentales	79
II.5.1.1. Ouverture photochimique	80
II.5.1.2. Fermeture thermique	81
II.5.2. Etudes théoriques	82
II.5.3. Schématisation du processus d'ouverture et de fermeture	84
<b>III. Conclusion</b>	<b>85</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>86</b>
<hr/>	
<b>Chapitre III. Instrumentation et Méthodologie</b>	<b>88</b>
<b>I. La spectrométrie de masse à transformée de Fourier</b>	<b>89</b>
<i>I.1. Principes théoriques</i>	89
I.1.1. La formation des ions	90
I.1.2. Le piégeage des ions	90
I.1.3. L'excitation des ions	93
I.1.4. La détection et l'acquisition des ions	94
<i>I.2. Descriptif expérimental de la microsonde laser FTMS</i>	95
I.2.1. La double cellule	93
I.2.2. Le champ magnétique	97
I.2.3. Le système de pompage	98
I.2.4. Le système d'introduction et de manipulation de l'échantillon	98
I.2.5. L'interface d'ionisation laser	99
I.2.6. Les systèmes électroniques de la microsonde	100
<i>I.3. Développements et caractéristiques de la microsonde FTMS</i>	101
I.3.1. Les développements	101
<i>I.3.1.1. Amélioration des caractéristiques spectrales : résolution et sensibilité</i>	101
a) La haute résolution en mode hétérodyne	101
b) Transfert vers la cellule analyse	102
c) Ejection sélective	103
d) Axialisation des ions par refroidissement et excitation quadrupolaire azimutale	103
<i>I.3.1.2. Détermination de structures : techniques de dissociation des ions</i>	103
<i>I.3.1.3. Etude de la réactivité en phase gazeuse : réaction ion/molécule</i>	105
I.3.2. Les caractéristiques	105
<i>I.3.2.1. Performances</i>	105
<i>I.3.2.2. Limites</i>	106
a) Limitation en masse	106
b) Autres limites	106
<b>II. Les analyses LDI/MALDI couplées à la FTMS</b>	<b>107</b>
<i>II.1. Préparation des échantillons</i>	107
II.1.1. Les sondes moléculaires	107
a) Spirooxazines	107
b) Spiropyranes	108

c ) [2H]-Chromène	108
d ) <i>Forme ouverte permanente obtenue par synthèse organique</i>	109
e ) <i>Forme ouverte permanente induite par irradiation laser UV</i>	109
II.1.2. Les matrices	110
II.1.2.1. <i>Les matrices acides</i>	110
II.1.2.2. <i>Les matrices basiques</i>	111
II.1.2.3. <i>Les matrices polymères</i>	112
II.1.3. Caractérisation des échantillons par spectrophotométrie UV-Visible	113
II.1.4. Dépôt LDI	114
II.1.5. Dépôt MALDI	115
II.2. <i>Contrôle et optimisation des paramètres laser</i>	117
II.2.1. Mesure de l'énergie	118
II.2.2. Contrôle du profil laser	119
II.2.3. Etalonnage de l'irradiance laser	120
II.3. <i>Optimisation de la séquence d'analyse FTMS</i>	121
II.3.1. Limitation du nombre d'ions dans la cellule	122
II.3.2. Limitation du temps global de l'analyse	122
<b>III. Conclusion</b>	<b>124</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>125</b>
<b>Chapitre IV. Caractérisation de spironaphtoxazines par Ablation Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse</b>	<b>127</b>
<b>I. Analyse comparative de la spironaphtoxazine non substituée par différentes techniques d'ionisation</b>	<b>128</b>
I.1. <i>Ionisation par faisceau d'électrons (EI)</i>	128
I.2. <i>Ionisation chimique (CI)</i>	129
I.3. <i>Ionisation par désorption laser directe sur support</i>	133
I.4. <i>Ionisation par désorption laser assistée par matrice</i>	137
<b>II. Caractérisation de spironaphtoxazines différemment substituées par ionisation laser couplée à la FTMS</b>	<b>140</b>
II.1. <i>Analyses LDI-FTMS à 355 nm</i>	141
II.2. <i>Analyses MALDI-FTMS à 355 nm</i>	144
<b>III. Conclusion</b>	<b>147</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>148</b>
<b>Chapitre V. Etude du mécanisme MALDI à l'aide de sondes photochromiques</b>	<b>149</b>
<b>I. Etude du transfert d'hydrogène [M+3H]<sup>+</sup> observé en MALDI</b>	<b>150</b>
I.1. <i>Son origine</i>	150
I.1.1. En présence de l'acide nicotinique	150
I.1.2. En présence de l'ester méthylé de l'acide nicotinique	151

I.1.3. En présence de l'acide nicotinique deutéré	152
I.1.4. En présence de l'acide 2,5-DHB deutéré	153
I.2. <i>Son aspect temporel</i>	154
I.2.1. Mérocyanine à forme ouverte permanente obtenue par synthèse	155
I.2.2. Composé spiro à forme ouverte permanente induite par laser	156
I.3. <i>Conclusion</i>	160
<b>II. Influence des paramètres expérimentaux en MALDI</b>	<b>160</b>
II.1. <i>La préparation de l'échantillon</i>	161
II.1.1. Les différents modes de dépôts	161
II.1.2. Le rapport des concentrations cible/matrice	162
II.2. <i>Les paramètres laser</i>	164
II.2.1. L'effet de la longueur d'onde	164
II.2.2. L'effet de l'impulsion laser	166
II.2.3. L'effet de l'irradiance	167
II.2.4. L'effet du DI <sub>3</sub>	169
II.3. <i>La matrice</i>	171
II.3.1. Matrices considérées comme "acide" à l'état excité	171
II.3.1.1. <i>La nitroaniline</i>	171
II.3.1.2. <i>Le 1,8- bis-(diméthylamino)-naphtalène</i>	174
II.3.2. Matrice polymère	175
II.4. <i>L'analyte photochromique</i>	177
II.4.1. Les spiropyranes	177
II.4.2. Les chromènes	179
II.5. <i>Conclusion</i>	181
<b>III. Proposition d'un mécanisme d'ionisation MALDI</b>	<b>182</b>
III.1. <i>Rappel des principaux mécanismes</i>	182
III.1.1. Mécanisme 1	182
III.1.2. Mécanisme 2	182
III.1.3. Mécanisme 3	183
III.2. <i>Notre proposition</i>	184
III.3. <i>Les arguments en faveur d'un tel mécanisme</i>	186
III.3.1. Existence de liaisons hydrogène	186
III.3.2. Photoexcitation de l'analyte	186
III.3.3. Transfert d'hydrogène atomique	187
<b>IV. Conclusion</b>	<b>188</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>189</b>
<b>Conclusion générale</b>	<b>190</b>
Annexes	194
Spectres d'absorption de photochromes	A
Spectres d'absorption de matrices	B
Spectres de masse EI et CI de spironaphtoxazines	C
Approche théorique du rapport isotopique	D

Spectres LDI/MALDI-FTMS d'une forme ouverte permanente	E
Premier article paru dans RCM	F
Deuxième article paru dans RCM	G
Caractérisation de complexants de catécholamines par MALDI-FTMS	H
Caractérisation de colorants du bois de Noyer par MALDI-FTMS	I

# Introduction Générale

La nécessité d'étendre les possibilités analytiques de la spectrométrie de masse aux composés biologiques de poids moléculaire de plus en plus élevé, et de façon générale aux composés solides, non volatils et/ou thermolabiles, est à l'origine de la désorption laser.

La désorption laser directe est facilitée si la molécule (M) a un caractère basique (détection préférentielle de  $[M+H]^+$ ) ou un caractère acide (détection aisée de  $[M-H]^-$ ) en ions négatifs. Dans de nombreux cas, du simple enregistrement de ces deux données il est possible de déduire, voire même d'identifier la masse d'une molécule présente dans une matrice complexe. Cependant, lorsqu'il s'agit de grosses molécules (macromolécules d'origine biologique par exemple), cette technique ne permet pas de conserver intactes les liaisons non covalentes qui maintiennent les molécules les unes aux autres. Dans la plupart des cas, une multitude d'ions fragments complique sérieusement l'interprétation du spectre de masse.

Les premiers travaux (1983-1985) effectués au laboratoire sur la désorption/ionisation résonante d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), ont permis de montrer qu'au cours d'une impulsion laser de quelques nanosecondes, il y avait réabsorption de photons par la phase gazeuse induite. Cette réabsorption intervient à l'état excité, dont la durée de vie n'excède pas la nanoseconde. Elle a pour effet d'ioniser sélectivement l'hydrocarbure. C'est ainsi que nous avons pu observer la distribution des HAP présents à la surface de particules (carbonées ou à base d'hématite) émises par une cokerie.

Cette conceptualisation de l'ionisation laser de molécules organiques en phase gazeuse, a guidé les travaux de l'équipe du Pr. Hillenkamp (réf. [1] chap. I) dans sa découverte de l'effet de matrice pour désorber des molécules cibles de haut poids moléculaire de façon quasi intacte. En absorbant une grande partie de l'énergie laser, la matrice facilite la désorption des molécules cibles tout en assurant une ionisation non destructive (contrairement à la désorption laser directe).

De par sa qualité à ioniser sélectivement les molécules sans les détruire, la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) se révèle un outil analytique indispensable à l'analyse de molécules biologiques. Il n'est de semaine sans publications montrant les capacités potentielles de cette technique révolutionnaire.

Cependant, les processus conduisant à la formation des ions sont complexes et ne sont pas encore totalement compris. En dépit de progrès substantiels dans ce domaine ces dernières années, aucune description unifiée de la nature et des caractéristiques du mécanisme MALDI n'a vu le jour. On en est réduit à une approche empirique du phénomène, qui est elle même rendue difficile par l'utilisation d'une grande variété de dispositifs expérimentaux.

**L'objectif de cette recherche est une contribution à la compréhension des processus physico-chimiques qui régissent le mécanisme MALDI par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques.**

L'idée d'utiliser des sondes moléculaires afin de mieux cerner certains aspects de ce mécanisme complexe, date des premières expériences MALDI effectuées avec le nouveau prototype de la microsonde laser ICR-FTMS mise au point au laboratoire (1989-1991). L'avantage des molécules photochromiques réside dans le fait qu'elles sont constituées de noyaux aromatiques et qu'elles peuvent changer de configuration électronique à l'échelle d'une impulsion laser.

On s'attend donc à ce qu'elles s'ionisent, en désorption laser, sous la forme d'un ion radical moléculaire  $M^+$  (caractéristique de l'ionisation des aromatiques), et en MALDI par un transfert de charges  $[M+H]^+$ , apportées par la matrice. On pourra alors étudier l'influence du changement électronique de la molécule cible au cours de l'impulsion laser sur les deux modes d'ionisation laser, et ainsi déterminer leur mécanisme d'action respectif. Ces études ont été effectuées sur une microsonde laser ICR-FTMS qui possède la particularité de combiner la haute résolution et l'optimisation aisée des paramètres laser (longueur d'onde et densité de photons notamment).

Dans le chapitre I seront présentés et discutés les processus de désorption et d'ionisation les plus couramment admis par le monde scientifique. Nous nous

intéresserons également au rôle que peuvent avoir certains facteurs expérimentaux, tels que la quantité d'énergie déposée sur l'échantillon, le choix de la matrice, ainsi que le mode de dépôt sur l'empreinte spectrale MALDI.

Le chapitre II sera consacré à la présentation des molécules photochromiques de la série des spironaphtoxazines. Après une brève définition du photochromisme, nous développerons plus longuement les caractéristiques photochromiques des spironaphtoxazines. Il s'agira au travers d'études théoriques et expérimentales, de comprendre le mécanisme d'ouverture et de fermeture de ces molécules en vue d'une utilisation en MALDI. La recherche bibliographique fera apparaître que la spectrométrie de masse est un moyen complémentaire aux techniques usuelles pour répondre aux interrogations concernant l'identification de certaines espèces lors de l'équilibre photochromique.

Au chapitre III, nous exposerons les caractéristiques de notre microsonde laser. Certains aspects techniques seront développés en vue d'une meilleure compréhension des résultats expérimentaux. Nous accorderons une importance toute particulière à la méthodologie appliquée lors de ces études, notamment à la préparation des échantillons, au contrôle des paramètres laser, et à l'optimisation de la séquence d'analyse FTMS.

Le chapitre IV présentera la spécificité de l'ionisation laser par rapport à d'autres techniques d'ionisation plus classiques. Nous verrons qu'il est possible d'identifier des structures transitoires de l'équilibre photochromique par l'étude des photofragments produits lors de l'interaction laser-matière. Nous pourrons alors constater que la technique MALDI induit spécifiquement des ions moléculaires multi-hydrogénés lors de l'ouverture des spironaphtoxazines par une irradiation laser UV.

Au cours du chapitre V, après une étude pour connaître l'origine et déterminer plus précisément quand a lieu le transfert d'hydrogène observé en MALDI, nous utiliserons les molécules photochromiques comme de véritables sondes afin d'étudier l'influence de certains facteurs expérimentaux. L'ensemble de cette étude nous permettra de proposer un mécanisme MALDI plus précis.

# Chapitre I

## Le mécanisme MALDI

Depuis sa présentation lors de la 11<sup>ème</sup> Conférence Internationale en Spectrométrie de Masse (IMSC, Bordeaux, 1988), la désorption/ionisation laser assistée par laser n'a cessé de se développer dans le monde.

En effet depuis dix ans, de nombreuses applications dans le domaine des sciences biologiques et chimiques (études des protéines, chimie supramoléculaire, ...) ont permis à la spectrométrie de masse d'élargir son champ d'investigations. Si le développement de la technique MALDI s'est fait jusqu'à maintenant de façon empirique, l'amélioration de ses performances et sa notoriété auprès des industriels, passent par une meilleure compréhension de son mécanisme d'action.

Après avoir présenté rapidement le principe de cette méthode analytique révolutionnaire, nous nous attarderons plus longuement sur les processus physico-chimiques qui caractérisent successivement l'étape de désorption et d'ionisation. Nous développerons notamment, les hypothèses les plus couramment admises à l'heure actuelle dans le monde scientifique. Des mécanismes d'ionisation seront également présentés.

Enfin, nous terminerons par l'exposé des principaux facteurs expérimentaux qui interviennent lors d'une analyse par MALDI. La maîtrise de ces paramètres peut parfois faire gagner à l'expérimentateur un de temps considérable.

## I. La technique MALDI

### I.1. Son historique

La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI<sup>1</sup>), qui permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes de haut poids moléculaire (100-500 000 Da<sup>2</sup>), trouve son origine dans les travaux de Karas et Hillenkamp [1] et de Tanaka *et al.* [2], publiés simultanément en 1988.

Afin de conserver l'intégrité de molécules polaires et thermolabiles lors de l'ionisation laser, ces auteurs ont proposé de les inclure dans une matrice absorbant fortement à la longueur d'onde du laser incident. Les principales applications de cette méthode concernent la caractérisation de polymères biologiques et synthétiques [3]. Actuellement, cette méthode est appliquée avec succès pour le séquençage de nucléotides [4], et pourrait être étendue à l'identification génétique de nombreux organismes [5].

Les techniques proposées par Karas et par Tanaka, diffèrent essentiellement par le choix de la matrice utilisée :

- ✓ Dans la méthode de Karas, l'échantillon est dilué dans un composé organique de faible masse moléculaire cristallisé, l'acide nicotinique, présentant une forte absorption à la longueur d'onde du laser incident ( $\lambda = 266$  nm).
- ✓ Dans les travaux de Tanaka, la matrice utilisée est une suspension de particules de cobalt finement divisées dans le glycérol (le diamètre des particules est de l'ordre de 300 Å). Les atomes métalliques constituent alors les centres absorbants de la longueur d'onde du laser ( $\lambda = 337$  nm).

Le couplage de ces méthodes avec la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF<sup>3</sup>), a permis à ces auteurs, de démontrer la faisabilité de l'analyse en masse de macromolécules de plus de 100 000 Da. La différence majeure entre les résultats présentés par les deux équipes, réside dans la sensibilité. En effet, la méthode de Tanaka, nécessite plusieurs nanomoles de composé, alors qu'avec celle de Karas, seules quelques picomoles suffisent. Un plus grand intérêt a donc été porté à cette dernière, plus facile à mettre en œuvre et nécessitant moins d'étapes intermédiaires.

---

<sup>1</sup> MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization

<sup>2</sup> Da : Dalton. unité de masse atomique, elle est définie comme le 1/12 de la masse d'un atome de carbone

<sup>3</sup> TOF : Time of Flight

## I.2. Son principe

En MALDI, une faible quantité de molécules du composé à analyser (molécules cibles ou analyte) est mélangée en solution avec un excès de molécules du composé servant de matrice. Quelques  $\mu\text{L}$  du mélange obtenu sont déposés sur un support métallique inerte (acier inoxydable). Après évaporation de ce faible volume, réalisé généralement à pression atmosphérique et à température ambiante, un dépôt de cristaux de matrice enrobe les molécules cibles (voir figure I.1).

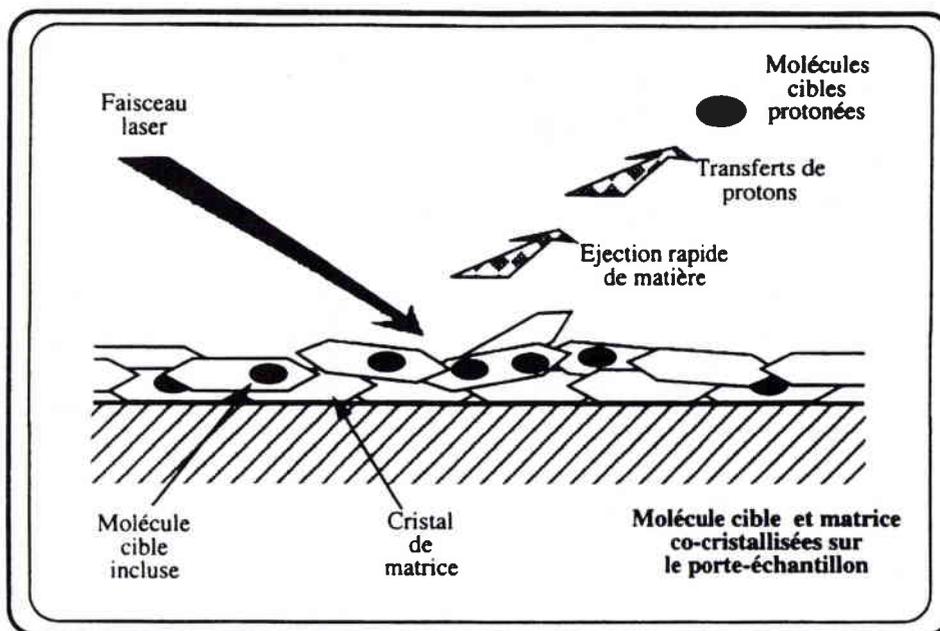


Figure I.1 : Principe de la technique MALDI, d'après [6].

Après introduction du support dans le spectromètre de masse, ce dépôt est irradié par de brèves impulsions laser (quelques ns), dont la longueur d'onde se situe dans une région correspondant à une bande d'absorption de la matrice. Lors de l'irradiation, il y a absorption sélective de l'énergie par la matrice. Cet apport d'énergie induit un processus de désorption correspondant à un changement de phase hors équilibre thermodynamique (phase condensée vers phase gazeuse). Au cours du processus de désorption qui suit l'impact laser, une très faible partie de l'énergie absorbée par la matrice est transférée aux molécules cibles ; ce qui se traduit par une co-éjection d'espèces moléculaires (M) intactes et de fragments de la matrice.

Le rendement d'ionisation est faible. Il a été estimé à  $10^{-4}$  environ (voire moins) [7]. Les ions sont majoritairement produits par des processus de protonation ( $[M+H]^+$ ), de déprotonation ( $[M-H]^-$ ), et de cationisation ( $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ , ...).

### 1.3. Ses principales caractéristiques

Les principaux atouts de cette méthode sont :

- ✓ La désorption de molécules ionisées intactes du type :  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  ou  $[M-H]^-$ .
- ✓ L'obtention uniquement pour les grosses molécules de plus de 10 000 Da, d'ions multichargés ( $M^{2+}$ ,  $M^{3+}$ ,  $M^{2-}$ ,  $M^{3-}$ , ...), ainsi que des agrégats ( $2M^+$ ,  $3M^+$ ,  $2M^-$ , ...).
- ✓ Le caractère pulsé du mode d'ionisation permet divers couplages avec la spectrométrie de masse :
  - Le temps de vol (MALDI-TOF) [8] : très grande étendue de la gamme de masse (de 100 à plus de 500 000 Daltons). Il n'y a pas de limite théorique pour les masses élevées. Ce type d'analyseur a longtemps souffert d'une mauvaise résolution en masse [9-11].
  - La résonance cyclotronique des ions (MALDI-FTMS<sup>1</sup>) [12] : détection en masse limitée, possibilité d'effectuer des expériences dites de "MS/MS"<sup>2</sup>, exactitude de la détermination de la masse (quelques ppm) et stabilité de la calibration.
  - La trappe ionique (MALDI-ITMS<sup>3</sup>) [13] : bonne résolution sur des masses inférieures à 3 000 Da, possibilité de MS<sup>n</sup>, et plus adaptée à des couplages "on line" avec des techniques séparatives (HPLC<sup>4</sup> ou CE<sup>5</sup>).
- ✓ Peu ou pas de fragments. Ceci limite l'information structurale qu'il est toutefois possible d'atteindre au travers d'études de fragmentation d'ions métastables (en MALDI-TOF) [14] ou de CID<sup>6</sup> (en MALDI-FTMS) [15].
- ✓ La sensibilité extrêmement élevée rend l'utilisation de cette technique compatible avec les exigences des biologistes : la quantité de produit à analyser sur le porte-échantillon est de l'ordre de la picomole sans purification exhaustive.
- ✓ Une détermination précise des masses moléculaires (0,1% à 0,01%) pour des masses inférieures à 30 000 Da.

<sup>1</sup> FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometer

<sup>2</sup> MS/MS : Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

<sup>3</sup> ITMS : Ion Trap Mass Spectrometer

<sup>4</sup> HPLC : High-Performance Liquid Chromatography

<sup>5</sup> CE : Capillary Electrophoresis

<sup>6</sup> CID : Collision Induced Dissociation, analyse séquentielle des ions et de leurs fragments par dissociation induite par collision

- ✓ La faible sensibilité (relative) aux contaminants (tampons, détergents, sels) en comparaison avec d'autres techniques de spectrométrie de masse, telle que l'ionisation par électrospray.
- ✓ Rapidité et simplicité.

Les principales difficultés rencontrées lors des expériences MALDI, proviennent de la faible résolution des pics en haute masse. Ceci est principalement dû à la présence de pics satellites, résultant de cationisations multiples et/ou de la présence d'adduits avec la matrice ou avec des photoproduits de la matrice. Comme nous le verrons par la suite, les ions de haute masse lors de l'étape de désorption (évaporation de la matière), acquièrent des énergies cinétiques élevées, rendant difficile leur détection et contribuant également à la faible résolution des spectres de masse.

#### *1.4. Perspectives*

MALDI et ESI<sup>1</sup> [16] sont deux méthodes qui ont émergé presque simultanément et qui connaissent des évolutions parallèles. Leurs performances sont très proches et parfois, il est possible d'observer une certaine complémentarité, notamment dans les analyses de mélanges naturels ou de polymères. Les effets discriminatifs étant différents, l'utilisation en parallèle des deux méthodes permet de mieux apprécier la nature de l'analyte. L'ESI possède clairement un avantage important, qui réside dans les couplages avec les techniques séparatives en phase liquide. Mais, des systèmes de collecte automatique en continu sur membrane ou les récents développements en ITMS, rendent désormais possible des associations de ce type avec le MALDI [17].

La puissance de la technique MALDI ouvre, dès à présent, de nombreuses possibilités de caractérisation et d'identification des macromolécules. Son évolution rapide a rendu possible l'amélioration de ses performances : précision, sensibilité et accès à plus d'informations structurales. Ses progrès et l'intérêt des résultats auxquels elle permet d'accéder, devraient définitivement asseoir la spectrométrie de masse comme un outil de première importance pour les sciences biologiques [18]. D'autre part, la recherche perpétuelle vers l'automatisation et la fabrication d'instruments moins sophistiqués et de dimensions plus réduites permettraient dans un avenir proche, d'équiper les laboratoires pharmaceutiques et industriels d'appareils MALDI [19].

---

<sup>1</sup> ESI : ElectroSpray Ionization. Le principe de l'ionisation par électrospray repose sur la création d'un brouillard électriquement chargé d'un flux continu de liquide dans une enceinte à pression atmosphérique. Un courant gazeux chaud élimine progressivement le solvant des gouttelettes, les ions issus des microgouttelettes sont attirés par un champ électrique et pénètrent dans le spectromètre de masse tandis que les neutres (molécules de solvant) sont majoritairement éliminés par des étapes successives de pompage

## ***II. Les processus de désorption/ionisation laser assistée par matrice***

En général, les molécules organiques peu ou non volatiles, qu'elles soient pures, adsorbées sur des particules ou en multicouches sur une surface, peuvent être caractérisées directement par désorption laser. Le mécanisme communément admis est le suivant [20] : au centre du point d'impact laser (faisceau pulsé UV, visible ou IR), la température atteint instantanément plusieurs milliers de degrés Kelvin, induisant la formation d'un microplasma comportant en majorité des électrons et des ions élémentaires ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $O^-$ , ... etc.). Ceux-ci se recombinent aux molécules neutres désorbées thermiquement sur le pourtour de l'impact laser par la diffusion de la chaleur. Ces réactions ion-molécule au sein du microplasma en expansion conduisent à la formation des ions moléculaires ( $M^+$ ) ou pseudo-moléculaires ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ ,  $[M-H]^-$ , ...).

Par contre, la caractérisation de molécules de haut poids moléculaire ( $M > 100\ 000$  Da) par désorption laser est très difficile. Du fait de la chaleur dégagée lors de l'impact laser (de 3 000 à 6 000 K selon l'irradiance laser appliquée [21]), ces molécules se décomposent simultanément en de nombreux fragments, rendant délicate, voire impossible leur identification par spectrométrie de masse.

L'introduction de la technique MALDI à la fin des années 80, a permis le passage de telles molécules en phase gazeuse, sans qu'elles puissent être la cible d'importantes fragmentations. Cependant, si cette technique révolutionnaire connaît à l'heure actuelle de multiples applications, notamment en biochimie et en biologie, son développement s'est essentiellement fait de façon empirique [22]. Les mécanismes qui régissent les étapes de désorption et d'ionisation laser sont encore très mal connus, ce qui peut poser de sérieux problèmes pour les développements instrumentaux et pour la mise en place d'un protocole d'analyse MALDI automatisé.

Il apparaît de plus en plus que la quantité d'énergie déposée sur l'échantillon, ainsi que les processus de redistribution de cette énergie, soient des facteurs clés dans l'explication du mécanisme MALDI [23]. Nous essayerons, tout au long de ce mémoire, de donner quelques éléments permettant une meilleure compréhension de ce mécanisme.

### ***II.1. L'étape de désorption***

La complexité et la diversité des processus engagés dans l'ablation laser, à savoir : l'excitation laser de molécules absorbantes, le transfert d'énergie de molécules excitées dans des modes internes et translationnels du solide, la

transformation d'une faible quantité de matière en un nuage gazeux supersonique, compliquent la description analytique de ce phénomène. Des modèles basés sur diverses suppositions, telles que, la sublimation thermofluctuante de molécules à la surface (vaporisation de surface) [24,25], et l'éjection brutale d'un faible volume de matière au moment de la désorption, due à une transition de phase hors équilibre thermodynamique [23,26], ou bien encore à un gradient de pression critique [27-30], sont utilisés pour expliquer les observations expérimentales. Nous n'en donnerons pour notre part qu'une vue très synthétique.

### II.1.1. La formation du panache gazeux

Lors de l'impact entre un faisceau laser et la surface d'un matériau, le laser induit la formation locale d'un microplasma ou d'un nuage gazeux (voir figure I.2) selon l'énergie mise en jeu et le diamètre de l'impact laser :

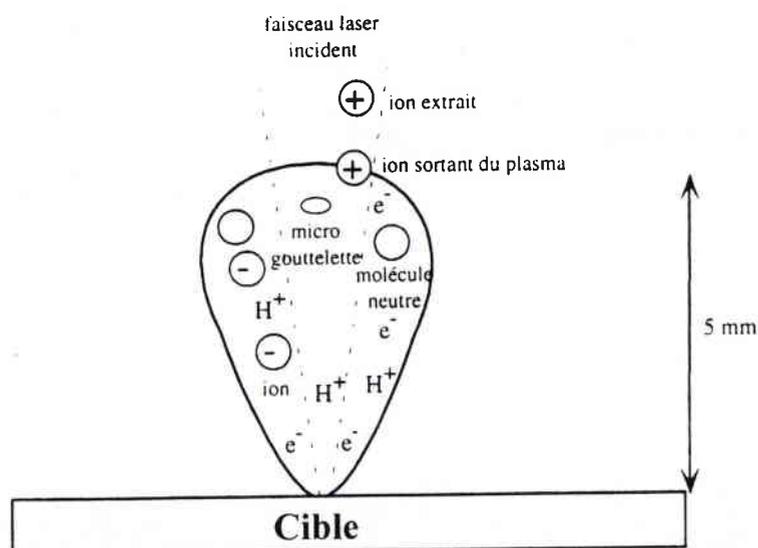


Figure I.2 : Formation d'un plasma lors de l'interaction laser-matière.

- à intensité élevée ( $I_{rr}^1 > 10^{10} \text{ W/cm}^2$ ), une véritable ablation de la matière se produit. Les ions élémentaires sont majoritaires ;
- à intensité moyenne ( $10^8 < I_{rr} < 10^{10} \text{ W/cm}^2$ ), les processus d'ablation laser sont moins accentués. Les ions élémentaires sont très souvent accompagnés de clusters ionisés (appelés agrégats ionisés ou ions de recombinaison), dont la nature dépend de la structure du solide étudié. Cette particularité est souvent mise à profit pour l'analyse des composés inorganiques ;

<sup>1</sup>  $I_{rr}$  = L'irradiance laser est un paramètre fondamental en MALDI, elle est définie comme étant la quantité d'énergie déposée par unité de surface lors d'une impulsion laser, exprimée en  $\text{W/cm}^2$

- à faible intensité ( $I_{rr} < 10^8 \text{ W/cm}^2$ ), les processus dits de désorption laser prédominent. Ils permettent en général la caractérisation des molécules organiques adsorbées en surface. Le rapport ions/neutres formés dans ces conditions serait de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$ , alors qu'il est estimé à  $10^{-2}$  ou  $10^{-3}$  dans les autres cas [21].

En réalité, ces processus sont fort complexes et très difficiles à modéliser, car entre le temps où les premiers photons de l'impulsion laser sont absorbés par la surface du matériau, et le moment où les derniers ions détectables se sont formés, un très grand nombre de phénomènes ultra-rapides se sont succédés. Les principaux d'entre eux sont schématisés dans le tableau I.1 :

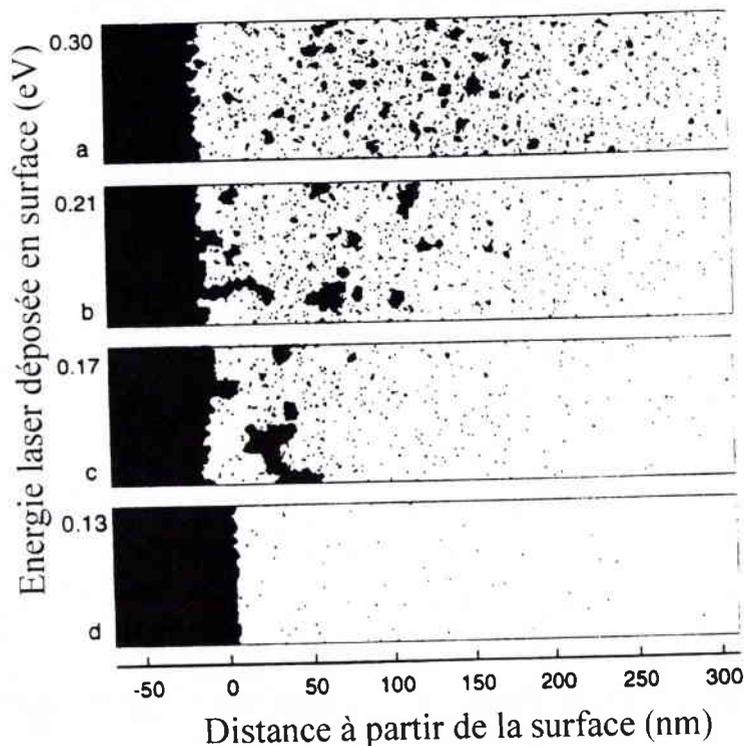
$t < 1 \text{ ps}$	Absorption non linéaire des photons	Emission de photoélectrons
$t < 0,01 \text{ ns}$	Formation d'excitons Emission thermo-ionique	Apparition de charges en surface
$t < 0,1 \text{ ns}$	Ionisation de surface	Emissions d'ions secondaires
$1 \text{ ns} < t < 5 \text{ ns}$	Formation d'une phase gazeuse	Emissions d'ions, de radicaux, d'atomes et de molécules neutres. Emission de photons
$5 \text{ ns} < t < 100 \text{ } \mu\text{s}$	Expansion du nuage gazeux ou du plasma si l'ignition est atteinte ( $T > 5 \text{ 000 K}$ )	Réactions ion/molécule Emissions d'agrégats neutres et ionisés

**Tableau I.1 :** Les principaux mécanismes mis en jeu lors de l'interaction laser-matière, tiré de [31].

Depuis les premiers modèles décrivant l'interaction laser-matière proposés par Hercules en 1982 [21] ou par Srinivasan en 1989 [32], des simulations par ordinateur permettent aujourd'hui, grâce à l'évolution de l'informatique, de modéliser de manière plus attractive les concepts généraux de l'ablation/désorption laser [33]. Cependant, pour une question de capacité mémoire, les modèles moléculaires dynamiques sont réduits en taille, notamment au niveau du temps d'interaction (de 10 à 500 ps) et du nombre d'atomes engagés dans le processus de désorption (une dizaine de milliers) [34]. Malgré tout, ces simulations offrent une assez bonne image qualitative de la réalité.

Afin de simuler l'effet collectif de l'ablation laser et de prendre en considération la relaxation vibrationnelle des molécules excitées, Zhigilei *et al.* [33,34] proposent un modèle où chaque particule est représentée par une sphère, dont le volume réagit à l'absorption d'énergie. Ainsi, ce modèle permet de représenter les vrais mouvements translationnels des molécules et donne une approximation des degrés de liberté internes des particules.

La figure I.3 représente une simulation en 2D de l'évolution de la composition du panache gazeux, libéré lors de l'interaction d'une impulsion laser de 337 nm ( $\tau = 500$  ps) avec la surface solide d'un composé organique de 100 Da [33].

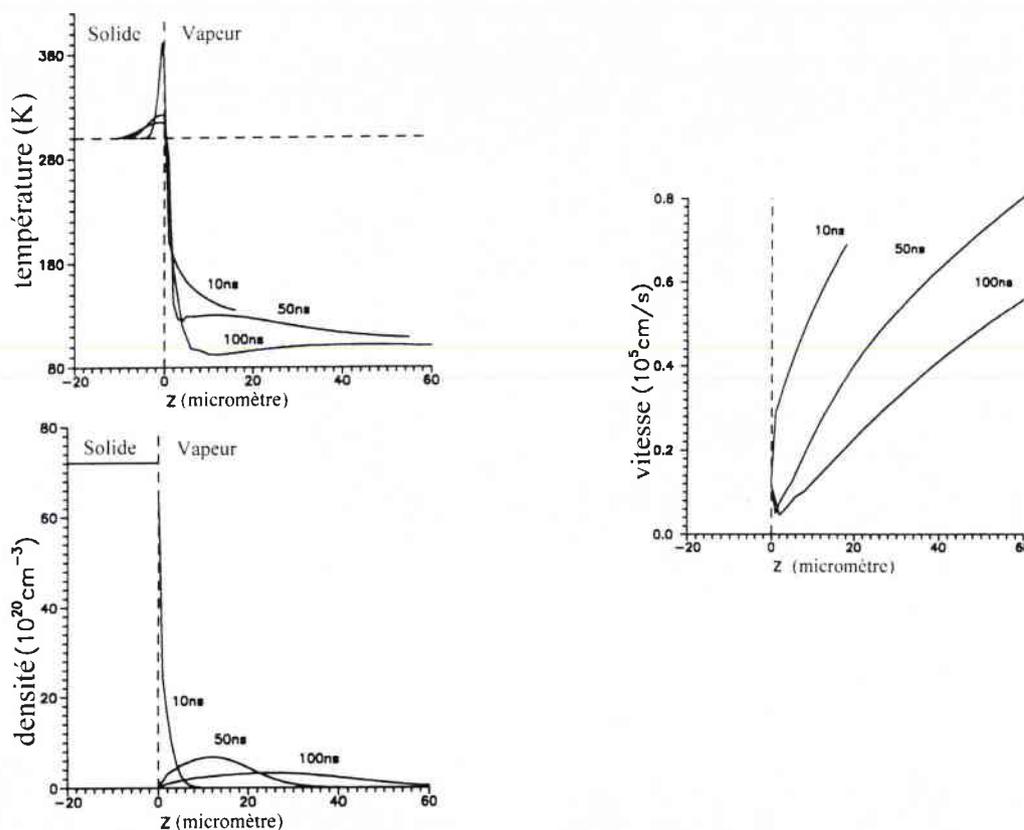


**Figure I.3 :** Influence de la quantité d'énergie laser déposée en surface d'un composé organique : (a)  $E = 0,30$  eV, (b) 0,21, (c) 0,17 et (d) 0,13.

La simulation montre un changement radical de la structure du nuage gazeux en fonction de la quantité d'énergie déposée en surface. Deux régimes différents de l'éjection de la matière peuvent être ainsi mis en évidence :

- Lorsque les molécules irradiées en surface reçoivent une quantité d'énergie équivalente à leur énergie de cohésion ( $0,31$  eV, soit  $0,31 \times 11\,605 = 3\,600$  K [35]) ou proche (Fig. I.3<sub>a-c</sub>), une quantité non négligeable de matière est expulsée sous forme d'agrégats et d'espèces isolées. On assiste alors à un phénomène d'éjection collective de la matière, appelée ablation. La profondeur ablatée est estimée dans ces conditions à 32 nm. Mais, lorsqu'on s'éloigne de la valeur d'énergie de cohésion des molécules (valeur plus faible), de gros agrégats plus inégaux en surface apparaissent (Fig. I.3<sub>b-c</sub>).
- Si on diminue encore la quantité d'énergie déposée en surface ( $0,13$  eV, soit 1 500 K), on arrive à un seuil, où seule l'extrême surface est perturbée par l'impulsion laser (Fig. I.3<sub>d</sub>). La nature collective de l'éjection de la matière ne se fait plus. Seules des particules isolées sont expulsées de la surface, c'est ce que l'on appelle la vaporisation de surface.

En 1993, des calculs théoriques [36] permirent d'estimer pour la première fois la température, la densité et la vitesse des espèces éjectées, caractérisant l'expansion du nuage gazeux MALDI. Les résultats de ces calculs sont illustrés sur la figure I.4 :



**Figure I.4 :** Evolution de la température, de la densité, et de la vitesse des espèces éjectées lors de l'interaction laser-matière, selon Vertes [36].

Lorsque le faisceau laser ( $\lambda = 266 \text{ nm}$ ,  $\tau = 10 \text{ ns}$  et  $I_{\text{rr}} = 10^7 \text{ W/cm}^2$ ) vient frapper la surface d'un dépôt cristallin MALDI, un microvolume gazeux, constitué de matrice et de molécules cibles, se forme instantanément. Cela est dû en particulier, à une température de sublimation relativement basse de la matrice, permettant une transition de phase solide-gaz ultra-rapide. Du fait que les molécules cibles se trouvent emprisonnées dans le réseau cristallin de la matrice ; lors du processus de sublimation, des molécules analytes vont suivre leurs molécules hôtes (matrice) en phase gazeuse ; on assiste alors à une co-évaporation de la matière.

Les calculs de température indiquent une élévation assez faible de la surface irradiée (110 K). Si l'on compare ces résultats à ceux estimés par Hercules pour un impact laser focalisé (3 000 à 6 000 K), on peut expliquer la présence de molécules thermolabiles intactes dans ces conditions.

L'expansion de ce nuage gazeux dans le vide est ultra-rapide, puisque 50 ns après l'impulsion laser, les espèces éjectées dont le barycentre en masse se situe à  $40 \mu\text{m}$  de la surface, ont une vitesse de 600 m/s, soit 2 000 km/h. Dans ce même intervalle de temps (50 ns), leur température est passée de 400 K à 100 K,

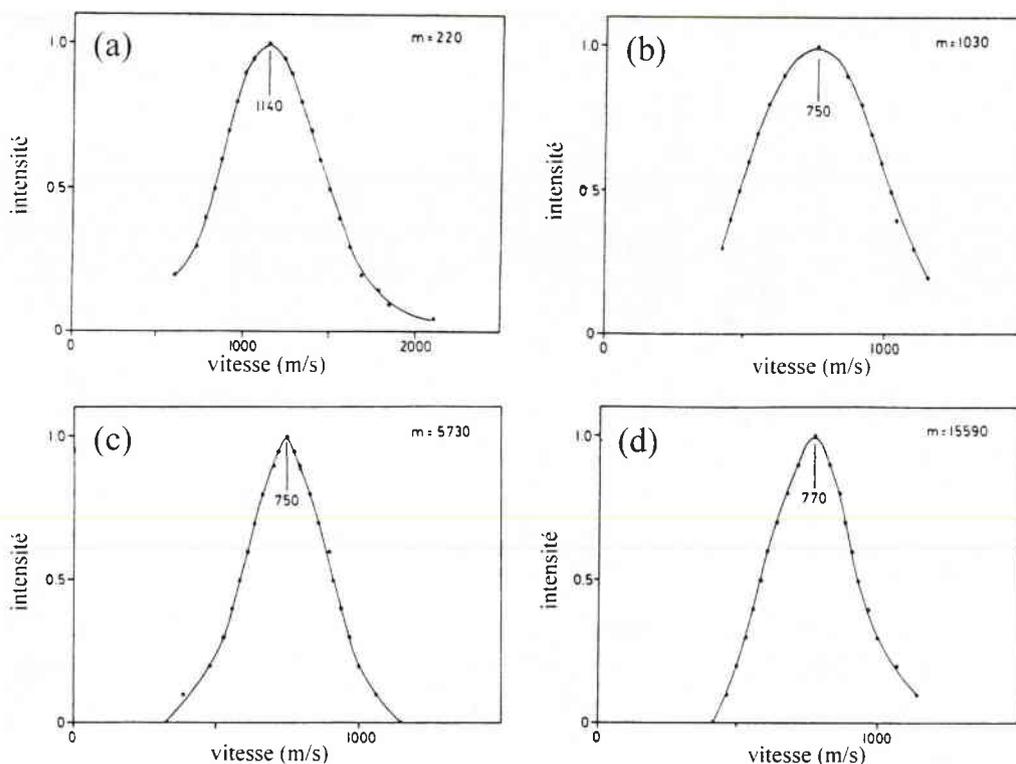
créant un véritable jet supersonique "glacial". Le refroidissement rapide du nuage gazeux en expansion, est certainement un facteur important pour la survie de grosses molécules thermolabiles, lors de la volatilisation de la matière.

A présent, nous comprenons mieux l'existence d'une valeur limite (seuil) d'irradiance laser proche de  $10^6$  W/cm<sup>2</sup>, communément observée lors de la volatilisation/ionisation d'un composé en MALDI. En particulier, il a été démontré que le rapport signal sur bruit et la résolution augmentent, lorsque la quantité d'énergie laser se rapproche de ce seuil [37]. D'après Vertes *et al.* [36], le processus d'éjection collectif de la matière (ou co-évaporation) en MALDI ne se déclencherait, que si la température de la surface irradiée par le faisceau laser, est supérieure à la température de sublimation de la matrice. Ce seuil serait donc directement lié aux propriétés physico-chimiques de la matrice. Toutefois, on peut s'interroger sur la nature de cette limite. Certains auteurs pensent que ce seuil d'énergie correspondrait davantage à une limite de l'efficacité du détecteur [33], car à ce régime d'irradiance ( $10^6$ - $5.10^6$  W/cm<sup>2</sup>), la quantité de matière volatilisée et le rendement d'ionisation sont très faibles [7,37].

Des études expérimentales réalisées sur un spectromètre de masse à temps de vol linéaire modifié, ont permis à Beavis et Chait [38] de mesurer les vitesses d'ions polypeptidiques intacts lors de l'expansion du panache gazeux (voir figure I.5).

Au moment de la volatilisation de la matière, les ions polypeptidiques adoptent une accélération translationnelle identique, indépendamment de leur masse, qui est en moyenne de 750 m/s. Les ions provenant de la matrice, quant à eux, ont une vitesse plus conséquente de 1 140 m/s. Cette étude démontre, que lors de l'expansion du nuage gazeux, les ions analytes possèdent des énergies cinétiques initiales relativement élevées, qui augmentent linéairement avec leur masse. Ainsi, un ion d'une masse moléculaire de 6 000 Da, acquiert une énergie cinétique supérieure à 10 eV lors de son expansion dans le plasma ; ce qui pose alors énormément de problèmes pour sa détection, notamment en FTMS (voir Chap. III).

De plus, il est vraisemblable que la présence d'un champ électrique servant à l'extraction des ions en TOF ou au piégeage en FTMS, participent indirectement à l'augmentation de cette énergie cinétique des ions de haut poids moléculaire. Des études théoriques et expérimentales (TOF linéaire) effectuées sur des molécules neutres d'acide férulique, ont décrit des vitesses bien inférieures à celles enregistrées pour les ions provenant de l'acide sinapinique : 250 m/s s'agissant des neutres de l'acide férulique, au lieu de 1 140 m/s pour les ions de l'acide sinapinique [36,39].



**Figure I.5 :** Vitesses mesurées expérimentalement des ions de (a) l'acide sinapinique, (b) l'angiotensine II, (c) l'insuline porcine et (d) la dismutase superoxyde bovine lors de l'expansion du panache gazeux en MALDI [ $\lambda = 355$  nm, fluence 10-20 mJ/cm<sup>2</sup>, rapport cible/matrice = 1/5 000, matrice : acide sinapinique, mode de déposition classique (mélange en solution)].

Des travaux expérimentaux datant de 1995, menés par Kaufmann *et al.* [40], révèlent l'existence de deux zones d'éjection d'ions de la matrice (voir figure I.18, p. 35) :

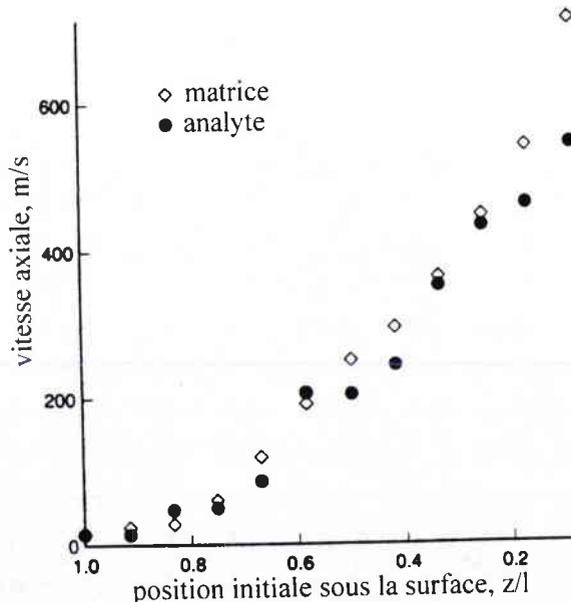
- la première est caractérisée par des vitesses avoisinant les 500 m/s ;
- la seconde enregistre des vitesses très importantes situées près de 1 500 m/s.

Comme nous le verrons par la suite, c'est dans la zone où les ions de la matrice ont des vitesses proches de celles des molécules analytes (700 m/s) qu'interviennent des réactions ion-molécule (transferts de charges).

Plus récemment, Juhasz *et al.* [41], ont démontré que la variation du délai d'extraction des ions, sur leur temps de parcours dans un temps de vol, est une fonction linéaire de la vitesse. Ils ont pu ainsi mesurer la vitesse initiale de composés biologiques en fonction de la nature de la matrice. Ils se sont aperçus, par exemple, que l'acide sinapinique et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique éjectent plus modérément les ions de l'insuline bovine que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou l'acide 3-hydroxypicolinique : 300 contre 550 m/s, respectivement. Cette différence pourrait être liée directement au rendement de la décomposition thermique de la matrice, en termes de décarboxylation ou de

déshydratation. Cette étude montre également, que la vitesse des ions provenant de la matrice, est 15 à 40 % plus élevée que celle enregistrée pour les ions de l'insuline. Cependant, si l'on compare ces résultats à ceux publiés auparavant, ils font apparaître des valeurs de vitesse plus modestes. Les paramètres expérimentaux, tels que, le type de matrice, la longueur d'onde utilisée et le mode de préparation de l'échantillon, pourraient expliquer ces valeurs disparates.

La modélisation moléculaire dynamique donne des résultats similaires (500 à 1500 m/s), mais elle a l'avantage de permettre d'accéder à une multitude de données qu'il est très difficile d'obtenir par l'expérience. Ainsi, la figure I.6 montre que les molécules de matrice et les molécules cibles évoluent à la même vitesse au moment de l'éjection de la matière. Malheureusement, du fait d'une plage de temps réduite, ces valeurs sont difficilement comparables aux valeurs expérimentales. Cependant, cette simulation met en évidence l'importance de la profondeur de la zone perturbée par les effets du laser et de la position initiale occupée par les molécules cibles dans le réseau cristallin de la matrice. En effet, les molécules de matrice et d'analyte auront des vitesses élevées si la profondeur du faisceau laser dans le réseau cristallin est grande, et si ces mêmes espèces sont en extrême surface. Inversement, si le matériau (matrice+cible) absorbe peu les photons incidents, et que les molécules cibles sont protégées par plusieurs couches de matrice, les espèces moléculaires éjectées se déplaceront à des vitesses plus faibles, accompagnées par des molécules de matrice (voir figure I.6).



**Figure I.6 :** Distribution des vitesses axiales des molécules de matrice et des molécules cibles en fonction de leur position initiale ( $z$ ) sous la surface, et de la profondeur ( $l$ ) de la pénétration laser [34].

Une autre caractéristique de ce panache gazeux est la distribution spatiale des espèces éjectées. En effet, d'après ces modèles moléculaires, l'expansion du nuage gazeux se ferait préférentiellement selon l'axe perpendiculaire à la surface de l'échantillon (vitesse axiale). Les vitesses des molécules expulsées le long de cet axe sont les plus élevées. Tandis que les vitesses rencontrées selon l'axe radial (parallèle à la surface) sont indépendantes de la position initiale des molécules, et sont nettement inférieures, voire quasi nulles, en ce qui concerne les molécules d'analyte [34].

En conclusion, la formation du nuage gazeux observé en MALDI, dépend fortement de la quantité d'énergie déposée en surface, ainsi que de la profondeur de la pénétration du faisceau laser dans le réseau de la matrice.

Plusieurs équipes ont mis en évidence l'existence d'une valeur limite (seuil) de l'irradiance laser, au-dessous de laquelle, il n'est plus possible d'observer la désorption/ionisation de composé. Cette limite se trouve dans une plage étroite, allant de  $10^6$  à  $5.10^6$  W/cm<sup>2</sup>, et semblerait être liée à la température de sublimation de la matrice. Au-dessus de cette valeur, l'intensité du signal augmente avec la puissance de 4 à 6 de l'énergie laser [42]. L'existence de cette valeur démontrerait la nature collective du processus de désorption. Un nombre minimum de molécules doit être requis pour assurer cette étape.

Des mesures de la distribution de vitesses initiales des ions issus de la matrice, et du composé étudié, ont montré que ceux-ci peuvent être distribués avec une énergie cinétique initiale élevée. Les vitesses initiales moyennes sont de l'ordre de : 700 m/s pour le composé analysé quelle que soit sa masse, et de : 500 à 1 500 m/s pour la matrice. Il semble cependant, qu'un nombre important de molécules de matrice adoptent des vitesses similaires à celles des molécules analyte [40,43]. Mais, il faut être très prudent quant au profil de la distribution de ces vitesses. Il peut en effet, soit subir des perturbations par l'existence de collisions intermoléculaires, ou bien encore par une absorption photonique secondaire de molécules neutres, majoritairement présentes dans ce nuage gazeux [44].

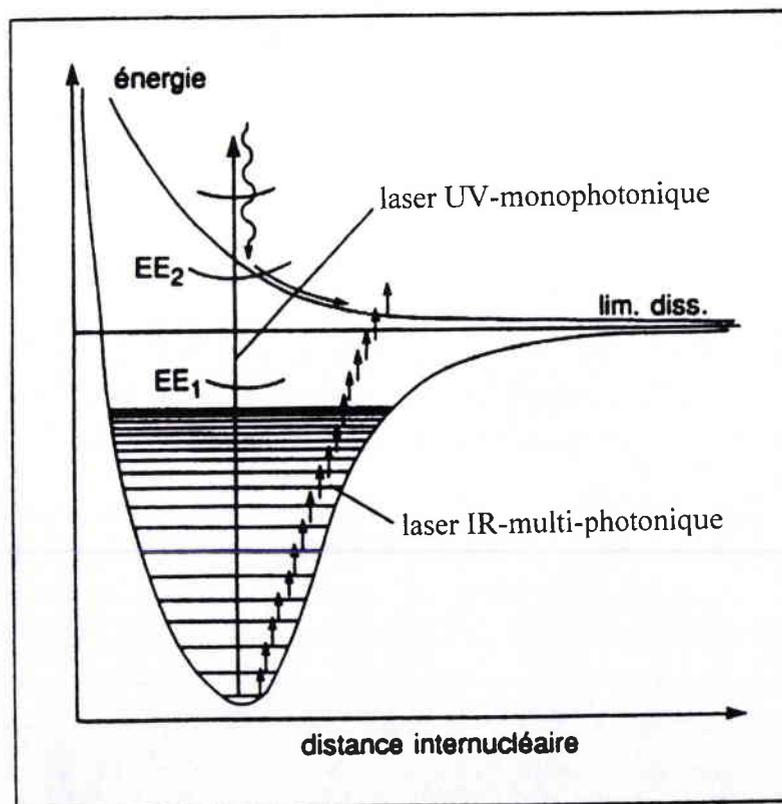
La distribution spatiale initiale des ions éjectés par MALDI est aussi une caractéristique du processus de désorption. La matière éjectée est propulsée à la normale de la surface et refroidie très rapidement (- 180 °C en 50 ns), elle est relativement asymétrique.

### II.1.2. Nature du processus

Le résultat de l'absorption de l'énergie laser consiste en l'excitation électronique et vibrationnelle du matériau.

Avec des photons ultraviolets, les électrons des plus hautes orbitales occupées sont propulsés dans des orbitales vacantes (d'énergie plus élevée) (voir figure I.7). Ils peuvent alors perdre tout ou une partie de leur énergie d'excitation par couplage avec le réseau constitué de molécules de matrice et d'analyte environnantes, suivant des schémas de désactivations radiatives ou non radiatives. L'énergie est alors transformée en énergie vibrationnelle et/ou rotationnelle, qui augmente localement la température du matériau.

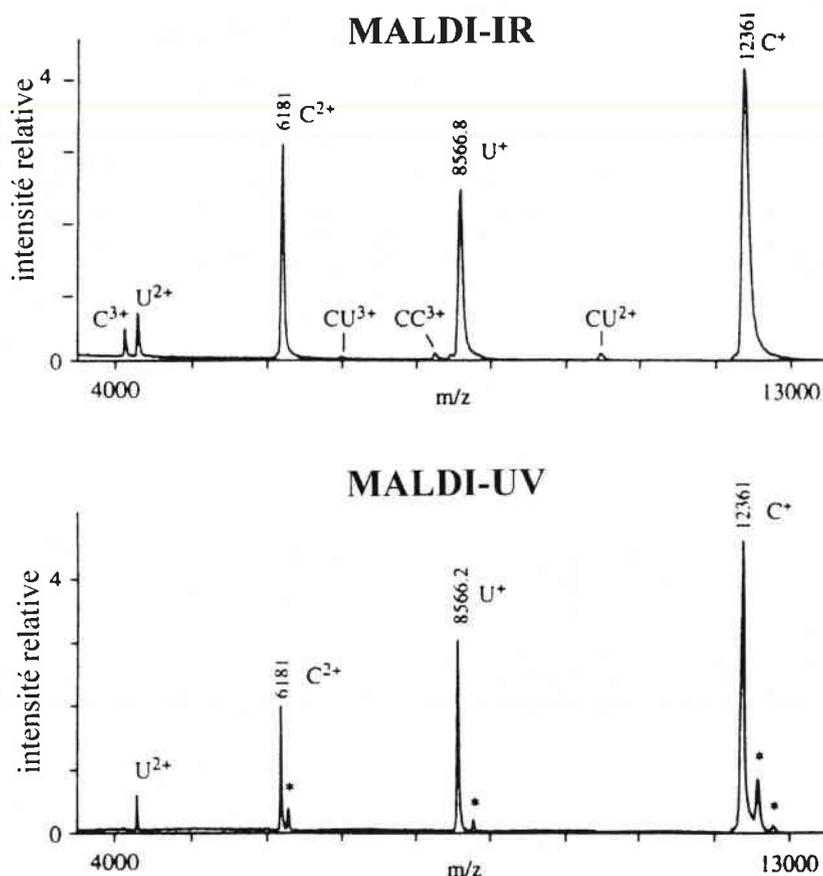
Les photons infrarouges des lasers CO<sub>2</sub> (10,6 μm) ou Nd-YAG (1,06 μm) n'excitent que des vibrations du réseau d'atomes constituant le matériau, sans susciter des transitions électroniques. La figure I.7 montre comment il faut gravir l'échelle des niveaux vibrationnels pour pouvoir casser une liaison chimique. Une telle réaction nécessite l'absorption de nombreux photons. Précisément avec un laser CO<sub>2</sub> (photons de 0,12 eV) la cassure d'une liaison C-C (3,5 eV) nécessite l'absorption d'une trentaine de photons.



**Figure I.7 :** Modèle de surface d'énergie d'une liaison covalente en fonction de la distance internucléaire. Un photon UV de 4-6 eV est suffisamment énergétique pour casser une liaison. La cassure par irradiation IR nécessite l'absorption de nombreux photons (0,12 eV pour le laser CO<sub>2</sub>). EE dénote la présence d'états électriquement excités.

La grande différence entre les excitations UV et IR provient donc de la nature du stockage de l'énergie d'excitation : électronique et thermique pour l'UV, thermique uniquement pour l'IR.

Une étude comparative des spectres MALDI de protéines [45], effectuée sous irradiation laser UV (355 nm), puis IR (2,94  $\mu\text{m}$ ) (voir figure I.8) ne montre pas de différences significatives. Toutefois, si l'on regarde plus attentivement les spectres IR, on constate alors, une absence d'adduits de photoproduits, et une photofragmentation légèrement moins importante que celle observée en UV.

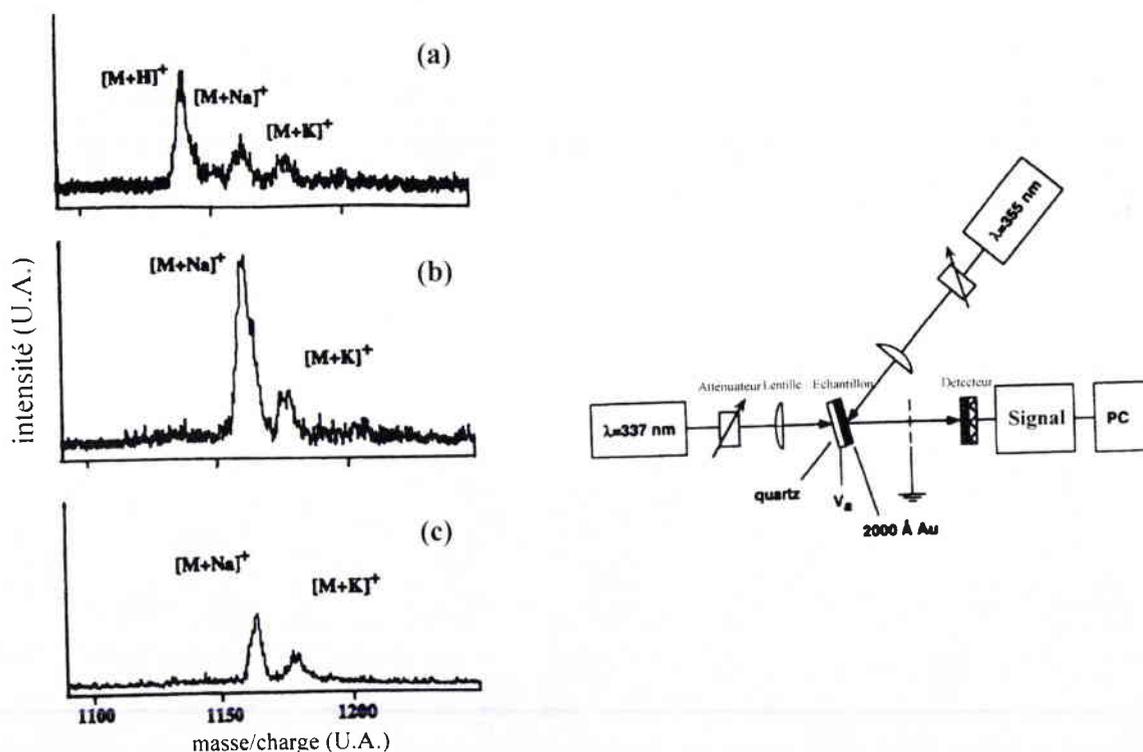


**Figure I.8 :** Spectres IR et UV-MALDI d'un mélange de cytochrome c (C) et d'ubiquitine (U) dans l'acide sinapinique. \* désigne des adduits photochimiques sur les protéines [45].

Au vu de ces résultats, il apparaît raisonnable de penser que le mécanisme de la désorption, impliquant la formation d'espèces sous forme gazeuse ou de jet supersonique, est identique dans les deux modes d'excitation. Mais, il s'avère que cette expérience ne permet pas réellement de différencier les phénomènes photothermiques (caractéristiques de l'excitation IR) des phénomènes photochimiques (plus importants lors d'une irradiation UV). D'après Van Vaecck *et al.* [20], lors d'une excitation UV à faible irradiance, l'effet thermique prédomine. Il est donc indispensable d'identifier la contribution respective des effets thermiques et photochimiques lors d'une irradiation laser UV ou IR.

Ehring *et al.* [46] ont proposé une solution simple pour déterminer la contribution respective de ces deux phénomènes lors de l'éjection d'ions biomoléculaires en MALDI. Un support constitué d'un opercule en quartz transparent aux UV, sur lequel on a dispersé une très fine couche d'or (2 000 Å), est placé de telle manière à recevoir une irradiation laser UV sur chacune de ses faces. Seule la face comportant la couche d'or est recouverte d'un dépôt MALDI classique. De ce fait, sur cette face les molécules cibles sont directement exposées à l'irradiation photonique. Tandis que sur l'autre face (irradiation en mode transmission), les molécules analytes sont protégées par la fine couche d'or, absorbant à la longueur du laser incident (355 nm). Dans ce cas, seuls les effets thermiques du laser pourraient expliquer la volatilisation de la matière.

Ce procédé expérimental révèle que, seule l'irradiation laser en mode réflexion, c'est-à-dire lorsque les molécules sont directement en contact avec les photons, induit l'apparition de la gramicidine S sous sa forme protonée (voir figure I.9).



**Figure I.9 :** Spectres de masse de la gramicidine S effectués selon deux géométries : (a) désorption en mode réflexion en présence de 2,5-DHB<sup>2</sup>, (b) désorption en mode transmission en présence de 2,5-DHB, et (c) désorption en mode réflexion sans matrice : au milieu à droite, figure le schéma expérimental [46].

Lors d'une impulsion laser UV en mode transmission, nous n'observons pas l'ion protoné de la gramicidine, mais des adduits de cations ( $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$ ), laissant ainsi présager une préformation de ce type d'ions à la surface.

<sup>2</sup> 2,5-DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque

L'expérience réalisée sans matrice (LDI)<sup>1</sup> en mode réflexion, provoque également l'apparition d'ions pseudo-moléculaires cationisés.

Ces résultats indiquent donc, que les réactions photochimiques induites par laser, telles que les réactions de transfert de charges entre des molécules de matrice excitées électroniquement et l'analyte, jouent un rôle majeur dans les processus MALDI. La protonation de la gramicidine S, uniquement observée en MALDI, ferait appel à des processus différents de ceux qui gouvernent la cationisation. Nous en débattons ultérieurement lors de la présentation de l'étape de l'ionisation.

Ces mêmes études ont été également menées uniquement sur la fine couche d'or. Les résultats montrent dans ce cas, que des ions protonés de la gramicidine S sont détectés dans les deux modes d'excitation (réflexion et transmission). Cela implique, qu'un processus mécanique, de type onde de choc peut aussi être évoqué au cours du mécanisme de la désorption. En effet, lors de l'irradiation en mode transmission, il est possible que la présence de l'opercule en quartz amortisse les effets mécaniques engendrés par le laser. Il est cependant, regrettable que ces études n'aient été menées que sous irradiation UV.

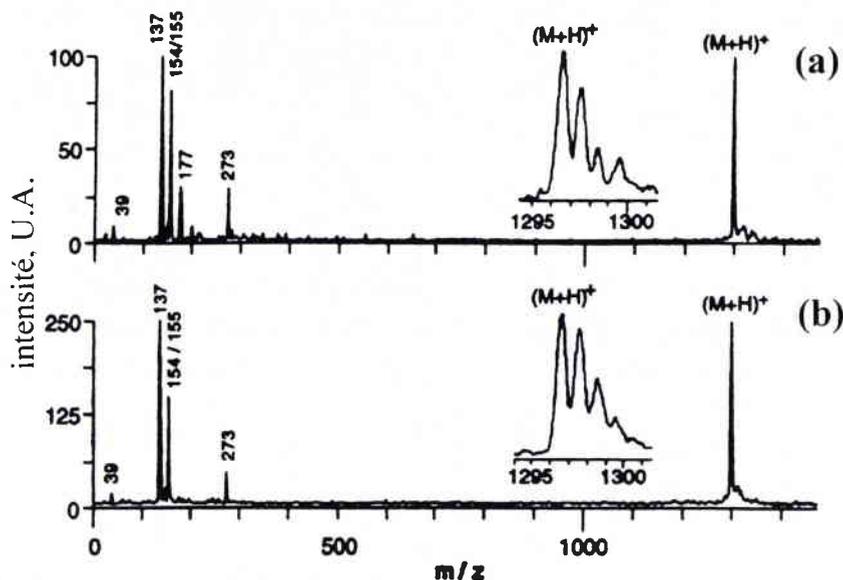
Pratiquement à la même époque, Hillenkamp *et al.* [47] démontraient que des expériences MALDI, sous irradiation en mode transmission, étaient imaginables. La première démonstration de ce genre remonte aux années 90. Vertes *et al.* [48] à cette époque, avaient mis en évidence la désorption laser assistée par matrice de petits peptides, en utilisant un LAMMA<sup>1</sup> 500 fonctionnant en mode transmission. Mais ici, l'innovation a été d'utiliser des fibres optiques aisément amovibles permettant une irradiation laser UV, soit par l'avant, ou par l'arrière du porte-échantillon.

Ainsi, les travaux d'Hillenkamp *et al.* montrent non seulement, la similitude des empreintes MALDI effectuées en mode réflexion et transmission (voir figure I.10), mais aussi que dans certaines conditions, le mode d'irradiation en transmission possède l'avantage d'induire de faibles vitesses de translation des molécules éjectées, et par conséquent, les énergies cinétiques initiales des molécules expulsées dans le vide sont relativement peu élevées. Cela revêt une importance considérable en FTMS, car le piégeage et la détection de molécules ionisées, dépendent directement de leurs énergies cinétiques de départ (voir Chap. III). Là encore, il convient de souligner que des investigations en IR n'ont pas encore été réalisées.

---

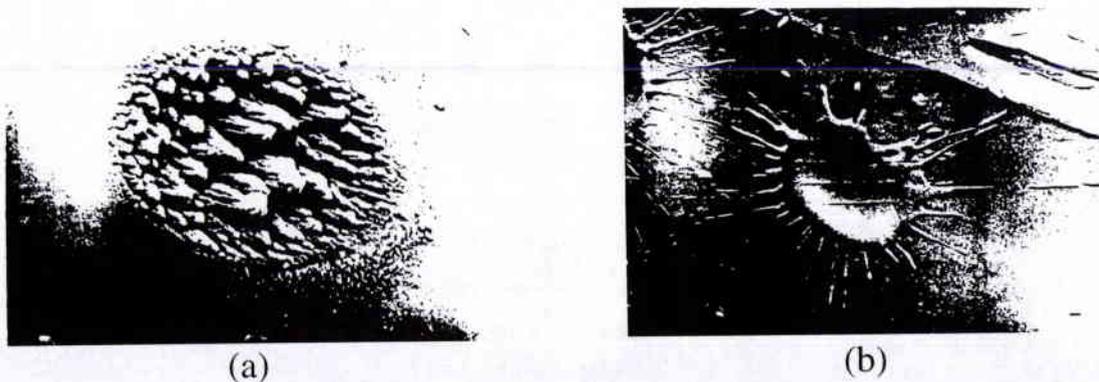
<sup>1</sup> LDI : Laser Desorption Ionization

<sup>1</sup> LAMMA : Laser Microprobe Mass Analyser



**Figure I.10 :** Spectres MALDI-TOF de l'angiotensine I à 337 nm en présence de 2,5-DHB (a) irradiation en mode transmission ( $450 \text{ J/m}^2$ ), (b) irradiation en mode réflexion ( $265 \text{ J/m}^2$ ), un seul tir laser [47].

Cependant un autre groupe, toujours de l'Université de Munich, a comparé des profils d'impacts laser UV et IR, obtenus sur des films de matrices à pression atmosphérique et sous vide [49]. A pression atmosphérique, la quantité de produit recondensé en surface est plus importante que sous vide. Sinon, les profils sont semblables quelles que soient les conditions de vide. Une plus faible absorption de la matrice 2,5-DHB aux infrarouges, comparée à celle enregistrée sous UV, induit une profondeur de pénétration du faisceau laser IR plus grande dans le solide, et par conséquent, une quantité de produit ablaté plus élevée. Si l'on compare l'aspect de la zone irradiée de la 2,5-DHB sous UV (voir figure I.11<sub>a</sub>) à celle obtenue en IR, il faut un nombre plus conséquent de tirs laser pour voir par microscopie électronique des structures coniques (10 000 tirs à une fluence de  $75 \text{ J/cm}^2$ ). Tandis qu'un seul tir laser IR, fait déjà apparaître des effets mécaniques au fond du cratère (voir figure I.11<sub>b</sub>).



**Figure I.11 :** Images de la surface de (a) 2,5-DHB sous 10 000 irradiations laser UV ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ , fluence de  $75 \text{ J/cm}^2$ ) et de (b) 2,5-DHB sous 1 seul tir laser IR ( $\lambda = 2,94 \mu\text{m}$ , fluence  $700 \text{ J/cm}^2$ ) à pression atmosphérique, échelle 1 cm :  $50 \mu\text{m}$  [49].

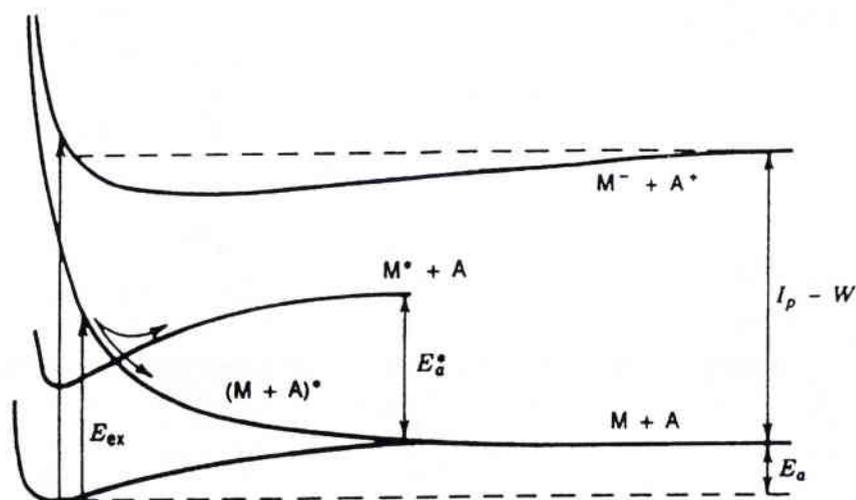
Finalement, d'après ces expériences, trois principaux modèles peuvent participer au mécanisme de désorption :

- Le modèle photothermique : l'énergie d'excitation vibrationnelle et électronique des molécules de la matrice, provenant de l'absorption de photons, se convertit rapidement en énergie thermique. Cette énergie est utilisée pour rompre la cohésion du solide et produire la sublimation. Ce mécanisme a pour origine, le modèle de désorption thermique proposé pour la désorption laser (sans matrice). Certains auteurs ont souligné les limitations de ce modèle, car il est impuissant à rendre compte de bon nombre d'expériences [50-52].
- Le modèle photomécanique : il se caractérise par une ablation brutale de différentes espèces provenant de zones voisines n'ayant pas subi directement l'impact laser. Ce phénomène se produit en un temps très court, génère une onde de choc qui parcourt le solide, et éjecte de la matière particulaire sur le pourtour du point d'impact. Ces particules n'étant plus couplées au réseau, elles ne sont pas affectées par l'augmentation de température. Il est bien connu en thermodynamique que les phases condensées ne peuvent être chauffées que jusqu'à un point où la nucléation en vapeur homogène devient dominante par rapport à la nucléation hétérogène (évaporation) et où la phase dans son ensemble est transformée soudainement en vapeur [53]. Une estimation brute de cette température est  $0,9 T_c$ , où  $T_c$  est la température critique du matériau considéré. Ce phénomène appelé "explosion de phase" ou "décomposition spinodale" a été notamment mentionné pour expliquer l'ionisation par FAB<sup>1</sup> [54]. Des simulations moléculaires dynamiques ont montré que ce processus est théoriquement possible lors de la désorption laser [55]. En IR, ce type de mécanisme semble prédominer.
- Le modèle photochimique : le rayonnement laser permet de rompre les liaisons faibles inter et intramoléculaires, ce qui conduit à la formation d'un plasma très comprimé, dont la densité est proche de la phase condensée, qui se relaxe. Cette approche consiste à considérer le fait que les photons UV peuvent exciter les complexes (adsorbant)-(molécule adsorbée) vers des états antiliants [56]. Un des mécanismes possibles de relaxation est alors le départ du composé adsorbé. Cette approche a été appliquée avec succès dans le cadre du décapage de polymères organiques par des irradiations UV [57]. D'après ce modèle, il est en effet possible d'expliquer l'ablation de polymères sans fusion ni effet thermique d'aucune sorte. Dans le volume irradié, les unités monomères sont supposées excitées

---

<sup>1</sup> FAB : Fast Atom Bombardment

instantanément vers un état antiliant et quitter le solide dans un ensemble cohérent (impulsion par impulsion). En figure I.12, le comportement du système, suite à une excitation électronique, est décrit schématiquement. Si l'état antiliant est atteint, la molécule adsorbée A subira un champ répulsif et s'éloignera de la surface M avec une énergie cinétique égale à  $(E_x - E_a)$ , où  $E_x$  et  $E_a$  sont respectivement les énergies d'excitation et d'adsorption. Si la surface d'énergie potentielle de l'état excité antiliant comporte une intersection avec la surface équipotentielle d'un état liant, des interactions croisées peuvent se produire et le départ du composé adsorbé peut être retardé (voir figure I.12).



**Figure I.12 :** Représentation schématique de la désorption induite par transition électronique lors de l'impact laser. Le composé A adsorbé sur une surface métallique M peut être excité vers un état répulsif. La relaxation vers l'état désorbé M+A peut être observée. Il peut néanmoins exister des configurations d'interactions entre des hypersurfaces du système  $M^* + A$  qui retardent ou empêchent la désorption. Des niveaux excités supérieurs ou des processus à deux photons peuvent procurer assez d'énergie pour la désorption directe d'ions ( $M^- + A^+$ ). D'après [56].

La désorption d'ions peut être observée, dans le cas de l'excitation à des niveaux électroniques d'énergie encore supérieure, généralement atteints par des processus multi-photoniques. La particularité de ce modèle, qui ne fait pas intervenir d'effet thermique, est qu'il rend compte de la conversion de l'énergie électronique en énergie cinétique pour permettre le départ des composés adsorbés. En fait, la plus grande partie de l'énergie est transformée au niveau du réseau par des interactions excitons/phonons. Des calculs de simulation en dynamique moléculaire confirment la faisabilité de ce mécanisme lors de l'interaction laser-matière [57].

### II.1.3. Sublimation/fragmentation

La libération de produits thermolabiles intacts à partir d'un solide n'est pas entièrement incompatible avec les hautes températures atteintes par le support lors de l'irradiation. En premier lieu, le profil spatial et temporel du laser engendre la création de points chauds et d'autres qui le sont moins. Mais c'est surtout le processus de chauffage extrêmement rapide qui favorise l'éjection de molécules intacts. Dire qu'un produit est thermolabile signifie que l'énergie d'activation du processus de désorption est supérieure à celle du processus de fragmentation :  $E_a(\text{dés}) > E_a(\text{frag})$ . Cependant la désorption peut être favorisée cinétiquement par rapport à la fragmentation à haute température. S'il existe une température à partir de laquelle :

$$K_{\text{dés}} e^{\frac{-E_a(\text{dés})}{RT}} > K_{\text{frag}} e^{\frac{-E_a(\text{frag})}{RT}}$$

avec  $K_{\text{dés}}$  et  $K_{\text{frag}}$ , les constantes de vitesse

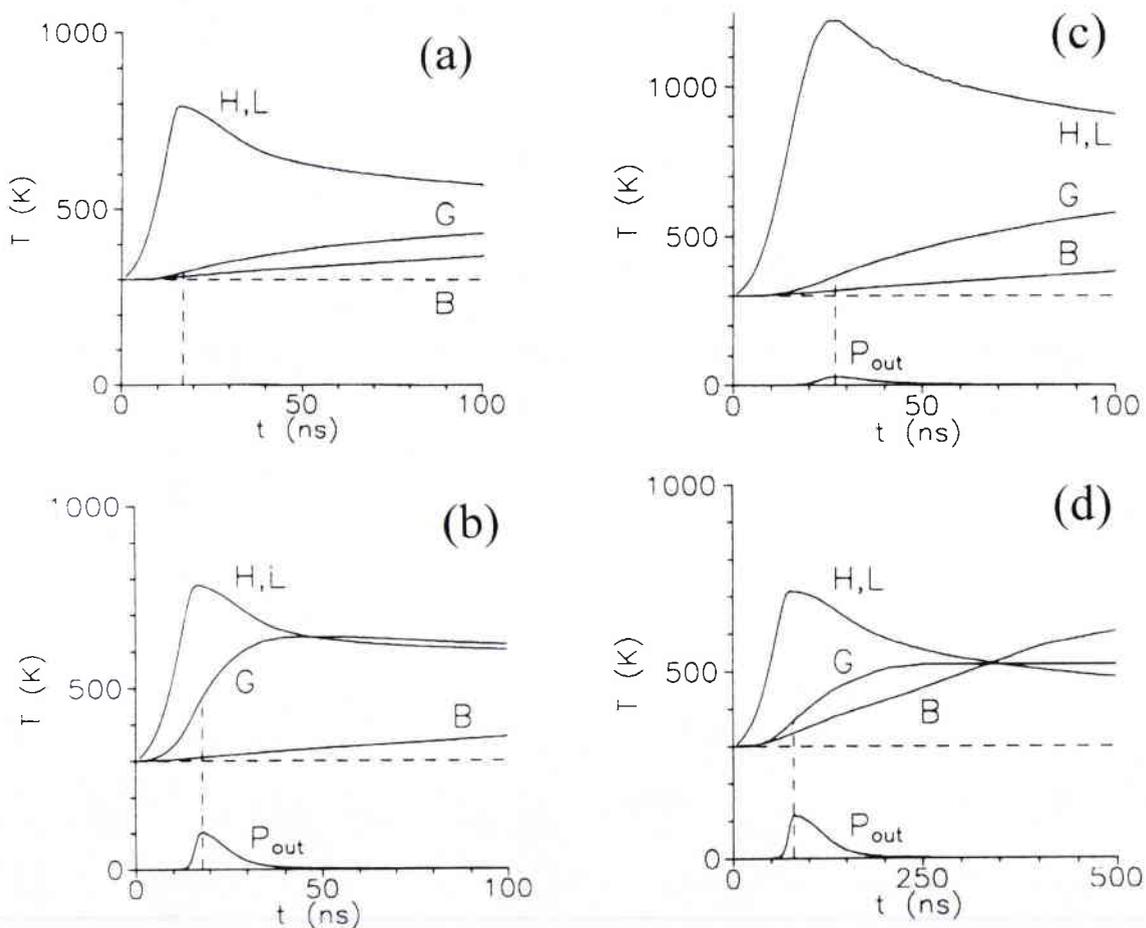
alors la désorption de molécules intacts est favorisée à condition que cette température soit atteinte suffisamment rapidement.

En réalité, des simulations dynamiques ainsi que des études théorique [25,58], montrent qu'il est possible de garder intacte des molécules cibles lors de la phase de désorption, si la vitesse de sublimation de la matrice est supérieure à celle du transfert d'énergie entre la matrice et la molécule cible. Ainsi, pour augmenter la vitesse de volatilisation, il convient d'utiliser des matrices à faible température de sublimation, et d'opérer à des impulsions laser assez courtes ( $\tau \leq$  nanoseconde) pour promouvoir la volatilisation à la place de la dégradation. Quant à la vitesse du transfert d'énergie, elle peut être réduite, en diminuant les concentrations des molécules cibles jusqu'aux limites de détection de l'appareil, et en utilisant si possible des molécules cibles, dont les différents modes de vibration interne ne correspondent pas à ceux de la matrice. Le transfert d'énergie entre la matrice et les molécules cibles se ferait par l'intermédiaire de liaisons hydrogène qui se formeraient lors de l'incorporation de l'analyte dans le réseau cristallin de la matrice [58]. Des mesures en cristallographie ont pu mettre en évidence de tels types de liaisons entre la matrice et des protéines [59]. Au regard des simulations dynamiques, ces liaisons se rompent approximativement 3 ps après l'impulsion laser [58].

Une raison possible du manque de dégradation des molécules cibles en MALDI, est la présence lors du transfert d'énergie entre la matrice et les molécules cibles, d'un "goulet d'étranglement" dû à une mauvaise correspondance des fréquences entre les vibrations à l'intérieur du réseau cristallin de la matrice (hôte) et les vibrations intramoléculaires des molécules invitées [60].

En définitif, quel que soit le mode d'excitation laser UV ou IR, la quantité d'énergie déposée en surface de l'échantillon, est concentrée dans les modes vibrationnels de la matrice en quelques ps [61]. Deux processus concomitants rentrent alors en jeu au moment de la distribution de cette énergie : (a) un transfert d'énergie de la matrice vers les molécules cibles, et (b) une désorption induite par sublimation. Ce sont les conditions expérimentales qui favoriseront l'un ou l'autre de ces deux processus.

Afin de nous rendre compte de l'existence de ces deux mécanismes, quatre situations expérimentales différentes ont été simulées (voir figure I.13).



**Figure I.13 :** Evolution de l'énergie de la matrice (H), du réseau cristallin (L), des biomolécules (G) et des biomolécules dégradées thermiquement (B). (a) dans des conditions MALDI typiques, (b) concentration en biomolécules plus élevée, (c) température de sublimation de la matrice plus élevée et (d) temps d'interaction laser plus long, d'après [60].

Les conditions expérimentales (b, c et d) présentées ci-dessus, ont pour conséquence de privilégier le transfert d'énergie de la matrice vers les molécules cibles par rapport à la désorption. Les molécules cibles subissant une élévation en température importante, se dégradent plus facilement.

En conclusion, la conservation de l'intégrité des molécules cibles sous le flux laser en MALDI, ne peut s'expliquer que si la désorption par sublimation est favorisée aux dépens du transfert d'énergie entre la matrice et l'analyte. De ce fait, le choix de certains paramètres expérimentaux, tels que : la matrice, le mode de dépôt, ainsi que la valeur de l'irradiance laser, revêt une importance capitale dans le résultat final du spectre MALDI. Nous développerons, plus amplement l'influence de ces paramètres expérimentaux en troisième partie de ce chapitre.

## ***II.2. L'étape d'ionisation***

L'origine des ions lors de l'interaction laser-matière est sujet à un débat continu au sein de la communauté scientifique. D'après les expériences réalisées en post-ionisation, il est clair que le degré d'ionisation dans le panache gazeux, formé suite à l'impact laser est très faible [62]. D'autre part, les calculs de température montrent l'impossibilité d'une ionisation purement thermique, car les températures requises conduiraient à la fragmentation des ions de composés organiques [56]. L'expérience montre qu'en MALDI, la protonation et la cationisation sont les principales sources d'ions [63]. On s'aperçoit notamment que les protéines et les peptides, s'ionisent presque exclusivement par transfert de protons ; alors que pour d'autres classes de composés, tels que les polymères synthétiques ou les hydrates de carbone, le processus d'ionisation dominant est la fixation de cations alcalins ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) ou de métaux de transition ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ) [64,65]. Au vu des résultats des études menées sur le mécanisme de la désorption laser, ces processus d'ionisation peuvent être considérés en termes de volatilisation d'ions préformés et/ou de formation d'ions en phase gazeuse.

L'étape d'ionisation, apparaît donc bien plus complexe qu'elle ne le laissait présager. C'est pourquoi, nous débuterons par un rappel des principes de l'ionisation laser des molécules organiques en phase gazeuse. Ensuite, nous tenterons de localiser le siège de l'ionisation en MALDI, tout en essayant de comprendre la formation d'ions de molécules cibles ; et enfin, nous présenterons succinctement les différents mécanismes d'ionisation avancés dans la littérature.

### ***II.2.1. L'ionisation laser des molécules organiques en phase gazeuse*** (Muller [31])

Les processus de l'ionisation laser des molécules organiques en phase gazeuse ont été très largement étudiés et ont fait l'objet de très nombreux travaux, dont l'essentiel est reporté dans la monographie éditée par Letokhov [66].

Lorsque l'intensité laser est inférieure à  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>, l'absorption des photons laser suit la loi de Beer-Lambert, et les mécanismes de l'ionisation sont gouvernés par la nature, les niveaux d'énergie et la durée de vie des états électroniques mis en jeu, et par conséquent, par les sections efficaces des transitions d'absorption ou d'émission ainsi que celles des autres processus de relaxation.

Si l'irradiance laser est supérieure à  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>, les premiers photons de l'impulsion sont absorbés par les gaz qui se transforment très rapidement en un plasma plus ou moins dense, réabsorbant les derniers photons de l'impulsion laser. Ceci induit en général une fragmentation prononcée des molécules.

### II.2.1.1. L'ionisation résonante à deux ou trois photons

Un premier laser de longueur d'onde donnée  $\lambda_1$  (dans l'exemple choisi,  $h\nu_1 = 4,66$  eV) induit la transition entre l'état fondamental de la molécule étudiée et l'un de ses états excités (par exemple  $S_1^*$ ), dont la durée de vie est relativement élevée ( $\tau = 10^{-8}$ s). A partir de ce niveau excité plusieurs processus sont en compétition (voir figure I.14) :

- La réabsorption d'un deuxième photon laser (dans l'exemple choisi,  $h\nu_2 = 4,9$  eV) permet l'ionisation de la molécule. Il est nécessaire que la somme des quanta d'énergie des deux lasers soit supérieure au potentiel d'ionisation adiabatique de la molécule, en général mesuré par spectroscopie photoélectronique UPS.

$$h\nu_1 + h\nu_2 > I_p$$

- La fluorescence (fluo) ( $S_1^* \rightarrow S_0$ ) de la molécule dont le rendement quantique peut être mesuré par des études photophysiques.
- L'interconversion spin-spin (isp) ( $S_1^* \rightarrow T_1^*$ ) qui conduit à un état triplet excité  $T_1^*$  plus stable, celui-ci pouvant éventuellement réabsorber un troisième photon dont le quantum d'énergie  $h\nu_2$  doit être plus élevé afin que l'état ionisé de la molécule puisse être atteint.

$$h\nu_1 + h\nu_2 > I_p$$

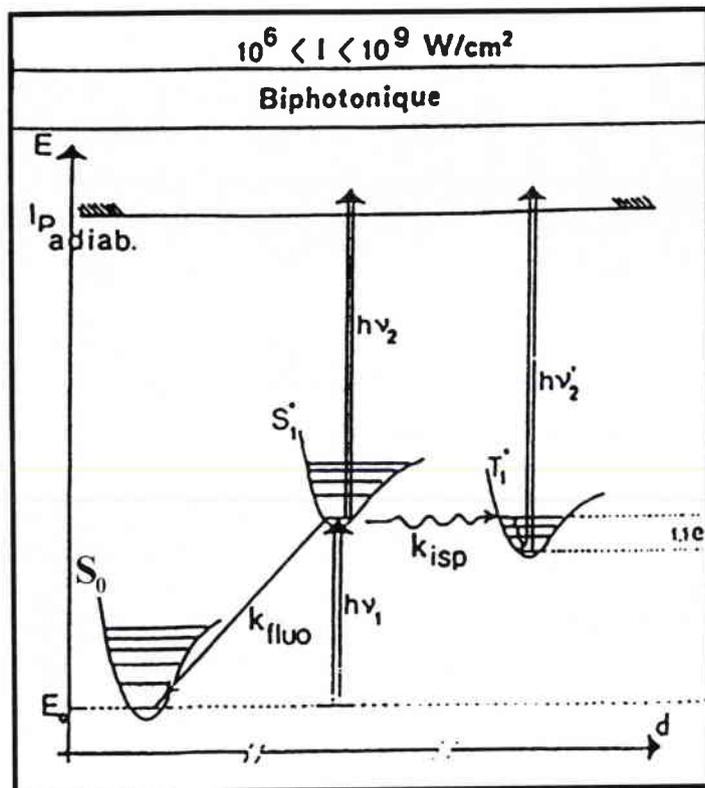


Figure I.14 : Schéma d'ionisation résonante d'une molécule M [31].

Il apparaît clairement que la durée de vie de l'état excité  $S_1^*$ , et de ce fait, la probabilité de réabsorption d'un deuxième photon, dépend en partie de la valeur des deux constantes de vitesse  $k_{\text{fluor}}$  et  $k_{\text{isp}}$ .

Ainsi, il est possible d'obtenir sélectivement le pic moléculaire  $M^+$  d'une molécule par un processus à deux photons. Dans les conditions de la figure I.14, l'ionisation ne procure pas d'excès d'énergie par rapport au complexe activé de l'état ionique vers sa dissociation unimoléculaire. De ce fait, les constantes de vitesse unimoléculaire ont des valeurs faibles, et par conséquent le taux de fragmentation est très réduit, voire inexistant. Par contre, si l'excès d'énergie photonique cumulé est trop important, celui-ci se répartit dans tous les modes de vibration de la molécule induisant alors de multiples fragmentations.

En général, deux modes d'ionisation biphotoniques (voire monophotoniques) sont accessibles à l'aide de deux lasers UV dont l'un est accordable en fréquence :

- à basse intensité, la sélectivité est maximale mais les rendements d'ionisation sont assez faibles ;
- à plus haute intensité, le rendement d'ionisation peut être égal à 100 %, mais la sélectivité est beaucoup plus faible. Ceci est dû en partie à une

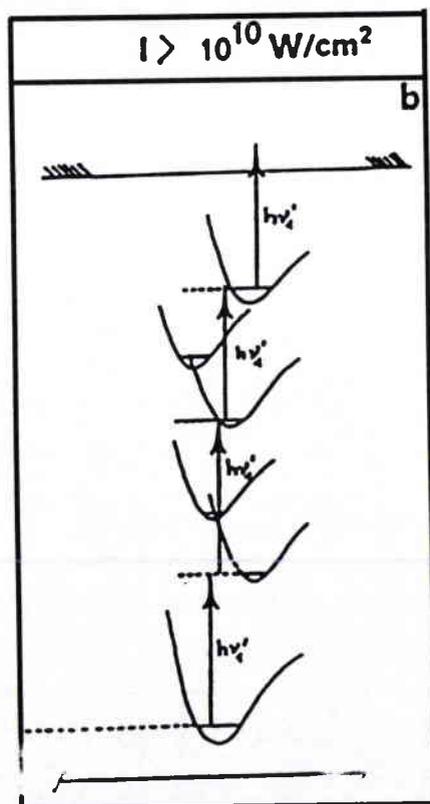
trop grande dispersion de l'énergie interne des ions (apparition de fragments).

Cependant, dans de nombreux cas, ce type de mécanisme peut être obtenu avec un seul laser, les deux photons mis en jeu ayant bien évidemment le même quantum d'énergie.

### II.2.1.2. L'ionisation multi-photonique

Dans de tels cas, la longueur d'onde du laser peut être beaucoup plus élevée ce qui correspond aux lasers IR comme le laser Nd-YAG (1 064 nm), ou le laser à gaz CO<sub>2</sub> (10,6 μm, soit une énergie  $h\nu_1 = 0,11$  eV).

Chaque photon de l'impulsion laser promeut la molécule dans une succession d'états excités virtuels de très courte durée de vie. Les sections efficaces des transitions correspondantes sont par ailleurs extrêmement faibles ( $\sigma = 10^{-34}$  cm<sup>2</sup>). Ceci explique que l'état ionique de la molécule ne pourra être atteint que si l'on dispose d'une très grande densité de photons par unité de surface, c'est-à-dire une grande intensité laser ( $I > 10^9$  W/cm<sup>2</sup>) (voir figure I.15).



**Figure I.15** : Schéma d'ionisation d'une molécule M par un processus multi-photonique via des états excités virtuels avec un laser émettant dans l'infrarouge [31].

Or, les expériences MALDI-IR sont les plus souvent menées à des irradiances laser proches de  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> [45], qui paraissent donc insuffisantes pour photoioniser les molécules de matrice (par exemple l'acide succinique). Ce qui veut dire que le processus n'implique pas nécessairement une ionisation directe de la matrice comme étape intermédiaire.

De ce fait, il est raisonnable de penser que la technique MALDI doit mettre en jeu un mécanisme complexe dont les principales étapes sont les suivantes :

- l'absorption des photons par la matrice est linéaire (loi de Beer-Lambert) puisque l'intensité est inférieure à  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> ;
- l'énergie photonique ainsi absorbée se relaxe sous forme rotation-vibrationnelle, ce qui induit la rupture des liaisons hydrogène intermoléculaires et la libération de protons ou de cations (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>) ;
- la phase gazeuse sus-jacente (effet d'écran) réabsorbe une partie des photons de l'impulsion laser.

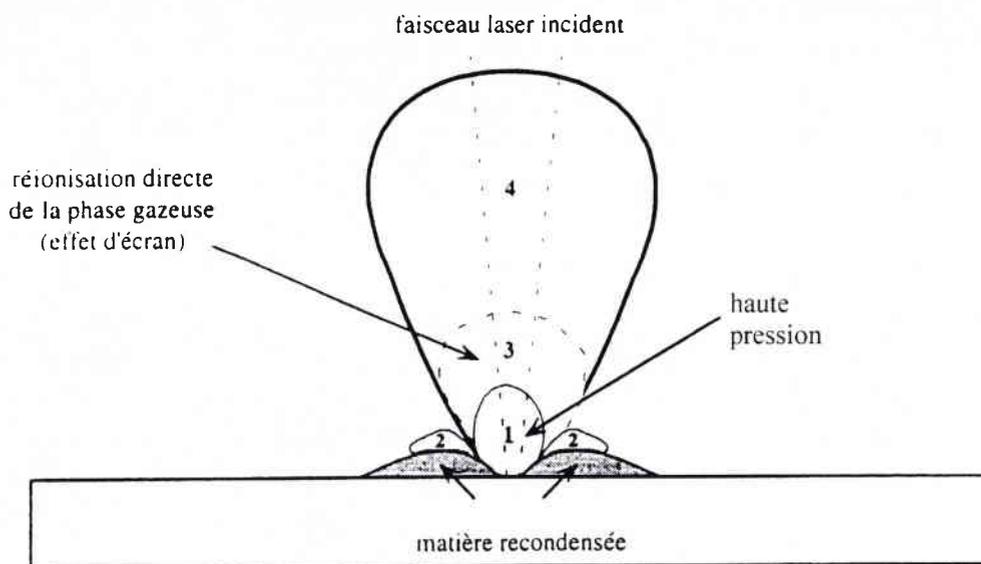
La pression initiale au niveau de l'impact étant très élevée, le taux de collision favorise les réactions ion-molécule, qui se traduisent par la formation de [M+H]<sup>+</sup> ou de [M+K]<sup>+</sup>, si le potassium est présent.

Si l'intensité du faisceau laser au point d'impact est trop faible, l'absorption par la matrice se fait toujours, mais la vitesse d'ablation ne sera pas suffisante pour une éjection efficace de la matrice afin de créer un jet supersonique. Si au contraire, l'intensité est trop élevée, la température du nuage gazeux augmente très vite et évolue vers l'ignition d'un microplasma ce qui provoque de nombreuses fragmentations et la formation d'agrégats neutres et ionisés.

### II.2.2. Siège de l'ionisation MALDI

C'est à l'heure actuelle, un sujet qui préoccupe beaucoup les scientifiques. Si l'étape de la désorption laser est à peu près bien comprise, celle de l'ionisation comporte beaucoup de zones d'ombre. Est-ce que l'ionisation de l'analyte s'effectue en phase condensée (proche de la surface) ou en phase gazeuse ? Par quel mécanisme l'analyte arrive-t-il à son état ionisé ? Afin de répondre à ces questions, il convient de présenter les différentes hypothèses avancées en littérature.

D'après Hercules *et al.* en 1982 [21], la vaporisation/ionisation d'un matériau comprend quatre types de mécanismes correspondant chacun à une zone géographique de la surface (voir figure I.16) :



**Figure I.16 :** Les différentes zones géographiques d'un plasma ou nuage gazeux induit par une irradiation laser sur un matériau.

- La zone 1 où se produit l'impact laser, est caractérisée par une ionisation directe du matériau solide, surtout à haute irradiance ( $>10^8 \text{ W/cm}^2$ ). Dans ces conditions, seuls des ions atomiques et quelques fragments moléculaires peuvent être émis (en ce qui concerne les espèces chargées).
- La zone 2, voisine de la région 1, est le siège d'une ionisation secondaire. Elle est caractérisée par un fort gradient thermique dû à l'onde de choc issue de l'impact laser. Les ions de haut poids moléculaire ainsi que les molécules neutres sont émis dans cette zone. D'autre part, un certain nombre d'ions pré-arrangés en surface seraient également éjectés dans cette zone. Nous sommes dans une zone se rapprochant d'une phase condensée.
- La zone 3, correspond à la phase gazeuse où se déroule la plupart des réactions ion-molécule responsables de la formation des ions pseudomoléculaires et des clusters (dans le cas où les molécules sont présentes en surface).
- La zone 4, représente l'espace de libération des ions dans le vide du spectromètre de masse.

En retardant le délai d'extraction d'ions produits par une impulsion laser sur un mélange 2,5-DHB/gramicidine S (conditions MALDI-TOF), Wang *et al.* [67] ont démontré que l'abondance des ions quasi-moléculaires protonés  $[M+H]^+$  de la gramicidine S, est augmentée au minimum d'un facteur deux par rapport à une extraction sans retard. En fait, sur un spectromètre de masse à temps de vol,

l'expérimentateur peut à souhait différer l'extraction des ions, produits à l'issue de la désorption, permettant ainsi d'établir un temps d'interaction entre les différentes espèces évoluant dans le panache gazeux. Il s'avère qu'au cours de cette étude, un délai d'extraction optimal de 200 à 400 ns après le tir laser, permet d'obtenir des conditions idéales pour induire des réactions ion-molécule.

Par conséquent, il est logique de penser que les ions quasi-moléculaires de la gramicidine  $[M+H]^+$ , sont produits par réactions en phase gazeuse, entre des ions de la matrice et des molécules neutres d'analyte désorbées lors de l'interaction laser-matière. Nous rappelons que le rapport entre les molécules neutres et les molécules ionisées éjectées a été estimé à  $10^4$ . Si nous considérons que les molécules neutres d'un peptide quelconque, ont une vitesse initiale de l'ordre de 500 m/s [39], la présence d'ions moléculaires protonés ayant subi un retard lors de la phase d'extraction de 300 ns, indique que les réactions ion-molécule se produisent dans une région se situant au-delà de 150  $\mu\text{m}$  de la surface irradiée. Ces résultats suggèrent que les agents protonants photoionisés de la matrice 2,5-DHB ( $mH^+$ ,  $[mH+H]^+$ ,  $[mH+2H]^+$ )<sup>1</sup>, rentrent en collision avec des molécules neutres d'analyte et initient l'ionisation de ces dernières par échange de protons, comme pour l'ionisation chimique. Il est bien connu qu'un hydrogène labile n'est pas requis pour la formation d'ion réactif en ionisation chimique. Des hydrocarbures saturés ainsi que le benzène peuvent promouvoir une protonation [68,69]. D'après Wang *et al.* [67], il semble que l'ion  $mH^+$  de la matrice soit l'ion précurseur de ces réactions ion-molécule. Selon les données avancées par Wang *et al.*, la protonation des molécules cibles s'effectuerait une centaine de nanosecondes après la fin de l'impulsion laser, correspondant à une zone se situant à une centaine de  $\mu\text{m}$  au-dessus de la surface.

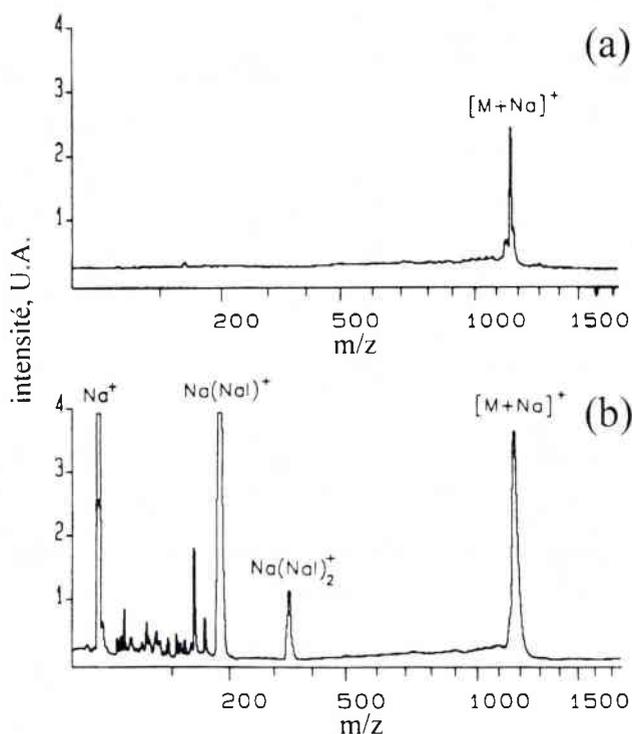
Au cours de cette expérience, cette même équipe a remarqué que la protonation de la gramicidine S avait uniquement lieu à la périphérie du porte-échantillon, contrairement à la cationisation ( $[M+Na]^+$ ) qui prévalait surtout au centre du dépôt cristallin 2,5-DHB/gramicidine. Cette tendance à s'ioniser différemment selon la zone géographique du porte-échantillon, s'explique par le fait, que la matrice ne semble pas incorporer dans son réseau cristallin des agents étrangers, tels que les cations alcalins [70]. Ils sont alors concentrés dans une zone, ici au centre du porte-échantillon, et pourront être facilement ionisés (potentiel d'ionisation bas), avant d'entrer en collision avec des molécules organiques neutres, assurant ainsi leur cationisation.

Afin de démontrer la possibilité d'une réaction cation-molécule cible en phase gazeuse, un premier laser ( $\lambda = 248 \text{ nm}$ ,  $\tau = 15 \text{ ns}$ ) va produire un nuage de

---

<sup>1</sup> Dans la littérature, il existe différentes façons de représenter la matrice. Pour notre part, nous avons choisi la symbolique  $mH$ , indiquant la présence d'un proton labile sur la matrice MALDI

cations  $\text{Na}^+$  par irradiation d'un échantillon d'iodure de sodium (NaI), puis après un délai de 100 ns, un deuxième laser ( $\lambda = 248 \text{ nm}$ ,  $\tau = 20 \text{ ns}$ ) va irradier un dépôt classique MALDI constitué d'un mélange de 2,5-DHB/gramicidine S. Un délai de 200 ns est appliqué durant la phase d'extraction des ions afin d'augmenter les probabilités de réactions entre  $\text{Na}^+$  et les molécules du peptide (voir figure I.17).



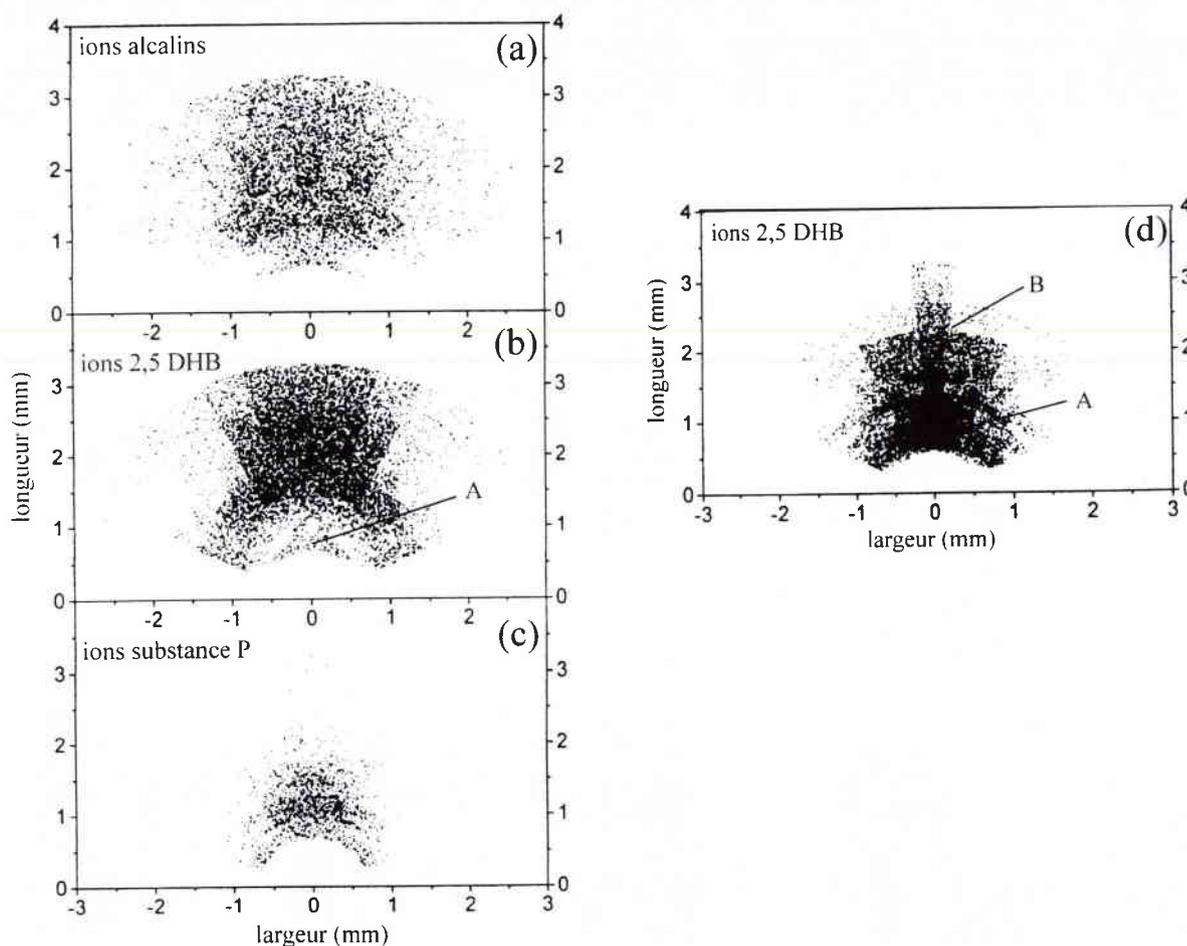
**Figure I.17 :** Spectres de masse MALDI-TOF de la gramicidine S : (a) spectre classique réalisé avec un seul faisceau laser (248 nm) sur un mélange gramicidine S/2,5-DHB (1:300), (b) spectre obtenu lorsque la désorption laser de la gramicidine S est précédée de 100 ns d'un nuage de  $\text{Na}^+$ , d'après [67].

L'augmentation de l'intensité du pic  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (figure I.17<sub>b</sub>) signifie qu'il y a bien eu réaction en phase gazeuse entre les cations libérés, lors de la première impulsion laser, et les molécules de la gramicidine désorbées, lors du deuxième tir laser. Il est à noter tout de même, que ces réactions cation-molécule provoquées artificiellement, induisent l'élargissement du pic  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  dû certainement à une trop grande dispersion des cations alcalins, au sein du nuage gazeux, avant de réagir avec les molécules peptidiques.

En 1995, Kaufmann *et al.* ont pu retranscrire sous forme d'images, la densité ionique des espèces libérées au moment de la désorption laser assistée par matrice [40].

Les figures I.18<sub>a,b,c</sub> représentent les différentes distributions spatiales des cations alcalins, des ions de la matrice 2,5-DHB déshydratée  $[\text{mH}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ , ainsi que

les ions de la substance P, libérés 1  $\mu$ s après une impulsion laser ( $\lambda = 337$  nm,  $\tau = 3$  ns) sur un dépôt cristallin, constitué de 2,5-DHB/substance P en proportion 125:1. La figure I.18<sub>d</sub> modélise quant à elle, la distribution des ions de la matrice déshydratée en l'absence de toute molécule cible (substance P).



**Figure I.18 :** Représentations de la densité des ions libérés 1  $\mu$ s après l'impulsion laser sur un dépôt cristallin de 2,5-DHB/Substance P : (a) les ions alcalins, (b) les ions de la matrice 2,5-DHB déshydratée, (c) les ions de la substance P et (d) les ions de la matrice 2,5-DHB déshydratée seule, en l'absence de molécules cibles, d'après [40].

Lorsque seule la matrice est irradiée (conditions LDI), la distribution des ions  $[mH-H_2O+H]^+$  fait apparaître deux zones bien distinctes (Fig. I.18<sub>d</sub>) :

- une zone (A) au-dessus de la surface (de 0,5 à 1 mm), où les ions sont regroupés en un paquet très compact, caractérisé par une vitesse que l'on qualifiera de lente : 500 m/s (0,5 mm/ $\mu$ s) ;
- une deuxième zone (B), plus lointaine dans l'espace (> 1,5 mm de la surface), caractérisée par un ensemble d'ions plus espacés, évoluant à des vitesses de 1 500 m/s.

A présent, si nous comparons la distribution des ions déshydratés de la 2,5-DHB à celle observée en présence de la substance P (conditions MALDI), nous constatons la disparition des ions  $[mH-H_2O+H]^+$  de la zone (A), (Fig. I.18<sub>b</sub>). L'empreinte laissée par cette disparition correspond exactement à l'empreinte de la distribution des ions de la substance P (Fig. I.18<sub>c</sub>).

L'interprétation de ces résultats suggère que l'ionisation de l'analyte se déroule en phase gazeuse, gouvernée simplement par des paramètres cinétiques et une différence d'affinité protonique. En effet, selon ce modèle, des molécules de matrice excitées évoluant à la même vitesse que des molécules peptidiques, restées dans leur état fondamental, vont pouvoir transférer des protons aux molécules cibles ou aux molécules de matrice environnantes, permettant ainsi leur ionisation.

D'après Bökelmann *et al.* [40], il n'y aurait besoin ni de collisions énergétiques, ni d'ions préformés en surface, ni d'ions désorbés directement par l'impulsion laser, pour expliquer une ionisation efficace des molécules cibles en MALDI. Ils supposent en fait, qu'il existe une densité suffisamment importante de molécules de matrice excitées, dont leur relaxation induirait un transfert protonique aux molécules environnantes (analyte et matrice) au cours de l'expansion du nuage gazeux. Pour cela, il faut tout de même un recouvrement spatial et temporel des molécules de la matrice avec celles de l'analyte. L'ionisation des molécules cibles apparaît ici, comme un processus secondaire, se développant après la phase de désorption. Quelques années auparavant, Russell *et al.* [71] étaient arrivés à la même constatation : le processus MALDI implique des réactions de transfert de protons entre des molécules de matrice (à l'état excité) et des molécules d'analyte restées dans leur état fondamental.

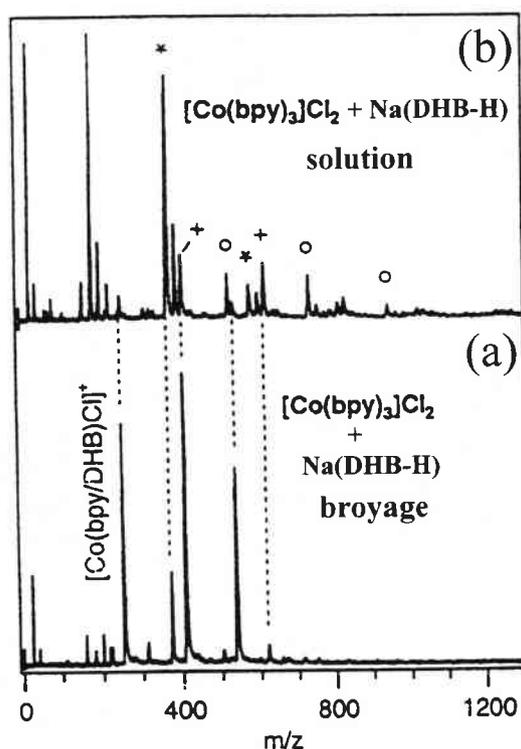
Si les travaux de Wang *et al.* [67] et ceux de Bökelmann *et al.* [40], mettent en évidence l'existence de processus d'ionisation se déroulant en phase gazeuse, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'une préionisation de la phase condensée ou de l'état solide.

C'est ainsi, que certains solides moléculaires sont constitués d'ions associés. L'acide nicotinique par exemple, se présente en phase solide comme un assemblage de dimères, dont la cohésion est maintenue par des charges partielles opposées [56]. Les molécules qui sont déjà dans leur forme ionisée en phase solide (ions préformés), sont susceptibles de donner plus facilement des ions lors de l'interaction laser-matière. L'état de surface du porte-échantillon, avec la présence parfois de défauts ou d'impuretés, est également la source de particules ionisées. Comme nous l'avons vu lors du mécanisme de la désorption laser, l'adsorption elle-même, entre des molécules de matrice et l'analyte favorise l'ionisation en procurant des ions préformés [56].

L'observation exclusive de molécules de peptides cationisées, lors de l'irradiation par l'arrière d'un dépôt, a laissé supposer à Ehring *et al.* [46] que la cationisation pouvait provenir d'un processus d'évaporation thermique d'un sel préformé en phase condensée.

Plus récemment, des travaux portant sur le mécanisme d'ionisation de polymères en présence de métaux de transition [65,72] montrent, que des réactions ion-molécule en phase gazeuse, ne peuvent à elles seules, expliquer les résultats MALDI obtenus.

Afin de démontrer l'influence d'ions préformés en surface, une expérience a été réalisée en comparant les spectres MALDI d'un mélange de solides ( $[\text{Co}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  et  $\text{Na}(\text{DHB-H})$ ) effectué dans un mortier, à ceux d'un mélange co-cristallisé, obtenu à partir de l'évaporation d'une solution aqueuse de ( $[\text{Co}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  et  $\text{Na}(\text{DHB-H})$ ) (voir figure I.19).



**Figure I.19 :** Spectre MALDI d'un (a) mélange de solides composé de  $[\text{Co}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  et de  $\text{Na}(\text{DHB-H})$  en proportion 1:20, (b) d'un mélange co-cristallisé à partir d'une solution aqueuse de  $[\text{Co}(\text{bpy})_3]\text{Cl}_2$  et de  $\text{Na}(\text{DHB-H})$  en proportion 1:20. Avec bpy : 2,2'-bipyridine, \* :  $[\text{Co}(\text{bpy}/\text{DHB})_2\text{-H}]^+$ , + :  $[\text{Co}(\text{bpy}/\text{DHB})_2\text{Cl}]^+$  et o :  $[\text{Co}(\text{bpy}/\text{DHB})_3\text{-H}]^+$ , d'après [65].

Indubitablement, des agrégats de plus haute masse sont observés dans le cas d'une solution solide (évaporation). Des mesures par spectrophotométrie infrarouge sur ce dépôt co-cristallisé, révèlent l'apparition d'une nouvelle bande comparé au spectre du mélange solide (broyage). La méthode de dépôt classique utilisée en MALDI, passant par la mise en solution des molécules de matrice et de l'analyte, permet lors de l'évaporation du solvant, un pré-arrangement d'ions en surface. Les spectres MALDI ne reflètent alors, qu'une image qualitative des

espèces présentes à l'état solide. Cependant on peut se poser la question si ce pré-arrangement ne prévaut pas seulement que pour la cationisation, car à notre connaissance aucune étude de ce genre n'a été réalisée sur un processus de protonation.

Finalement, au vu des résultats que nous avons exposés, les ions en MALDI peuvent exister en tant qu'espèces préformées à l'état solide, ou peuvent être formés par des réactions ion-molécule initiées par l'impulsion, ou encore, ce qui est le plus probable : peuvent provenir d'une combinaison des deux processus [65]. En 1997, Russell *et al.* [73] en étudiant la formation dynamique des ions de l'insuline bovine, sont parvenus eux aussi à cette conclusion. Il est cependant fort probable que les réactions ion-molécule (transferts de charges), dans une zone géographique où il y a une conjonction des vitesses d'éjection de la matrice et de l'analyte, soient les mécanismes les plus probants à l'ionisation. Mais jusqu'ici, il n'a pas été prouvé de façon certaine à quel moment exact l'ionisation intervient.

### II.2.3. Les mécanismes d'ionisation proposés

Les principaux modèles d'ionisation présentés en littérature concernent essentiellement la protonation. L'hypothèse la plus communément admise pour expliquer ce mode d'ionisation, fait intervenir des interactions et/ou des réactions par collision, entre des molécules de la matrice et des espèces moléculaires désorbées. Si dans certains cas, une préionisation à l'état solide semble établie [56,65], des réactions chimiques secondaires à la désorption, peuvent contribuer grandement à l'ionisation des molécules cibles en MALDI. Ces dernières surviendraient lors de la formation du nuage gazeux, avant son expansion adiabatique dans le vide, lorsque les molécules éjectées lors de la désorption, sont compressées dans un faible volume de gaz (phase condensée). Elles pourraient ensuite, continuer à se développer dans un plus grand volume (phase gazeuse), entretenues par des collisions intermoléculaires. Comme nous allons le voir, la matrice a un rôle fondamental dans cette étape.

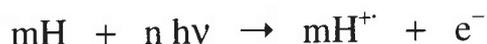
Les études relatives au processus d'ionisation par fixation de cations sont beaucoup moins nombreuses. La principale raison est que la technique MALDI a été, dans un premier temps, utilisée pour l'étude de biomolécules apparaissant essentiellement sous forme de molécules protonées ou déprotonées.

Nous allons à présent, exposer les différents modèles d'ionisation rencontrés dans la littérature. Nous désignerons les molécules de matrice par mH (notation indiquant la présence d'un atome d'hydrogène labile dans la molécule), et les molécules cibles par M. Les molécules de matrice excitées ou ionisées seront indiquées respectivement, par la symbolique suivante :  $mH^*$  et  $mH^+$ .

### II.2.3.1. La protonation

La matrice ayant absorbée les photons du faisceau laser incident, se retrouve dans des configurations électroniques différentes : l'état ionisé ou l'état excité. C'est à partir de ces deux états physiques, que des modèles d'ionisation de l'analyte ont été élaborés.

- Photoionisation de la matrice [7,67,74-78]

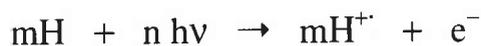


Dans une zone très dense du nuage gazeux, avant son expansion dans le vide, les molécules de matrice en quantité importante, absorbent la plupart des photons incidents par un mécanisme d'absorption multi-photonique, permettant ainsi leur passage à l'état ionisé. L'élévation de la température au moment de la formation du panache gazeux, favorise les collisions entre les ions de la matrice et les molécules désorbées. L'ionisation par protonation des molécules environnantes (M ou mH) est alors assurée par un transfert de charges (protons), entre les ions de la matrice et les molécules neutres.

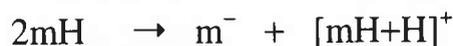
Ce modèle a été développé initialement au tout début des années 90 par l'équipe du Pr. Hillenkamp, co-inventrice de la technique MALDI. Cette proposition de mécanisme, repose sur de nombreux travaux menés en désorption laser directe (LDI). Les résultats les plus probants ont été obtenus sur le tryptophane, qui sous des conditions LDI, s'ionise presque exclusivement sous la forme  $[M+H]^+$ , alors que l'intensité de l'ion  $M^+$  est plus modeste. Cependant, lorsque l'échantillon est refroidi à 90 K, l'abondance de  $M^+$  par rapport à  $[M+H]^+$  est inversée. En même temps, si l'extraction des ions est retardée, une protonation importante du tryptophane est de nouveau observée [79]. Le mode d'ionisation du tryptophane, est à rapprocher de celui des matrices MALDI, qui très souvent sont caractérisées par la présence simultanée d'ions radicalaires  $mH^+$  et d'ions protonés  $[mH+H]^+$ . A la même époque, Speir *et al.* [80], ont mis en évidence la réaction de molécules neutres, désorbées par LDI, avec des ions piégés dans une cellule FTMS en phase gazeuse.

Ces observations semblent donc indiquer qu'en MALDI, les ions quasi-moléculaires  $[M+H]^+$ , sont le résultat de réactions en phase gazeuse entre les ions de la matrice et des molécules d'analyte neutres. Les ions radicalaires de la matrice étant les ions précurseurs de ces réactions.

Toutefois, la formation d'ions radicalaires  $mH^{\cdot}$  exige des processus d'absorption multi-photoniques de la part de la matrice. Si ces ions initient la réaction de protonation, les matrices devraient être plus efficaces à 266 nm qu'à 337 nm, car l'énergie photonique est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Or, pour l'acide indole 2 carboxylique, Ehring *et al.* [74], ont observé le résultat inverse. Ces auteurs ont alors proposé l'espèce  $[mH+H]^+$  comme responsable de l'ionisation :



Ce modèle d'ionisation se rapproche davantage à celui observé en ionisation chimique (CI). Il a la particularité, notamment d'expliquer la présence simultanée de  $mH^{\cdot}$ , de l'espèce réactive  $[mH+H]^+$ , et du produit final  $[M+H]^+$  sur le même spectre. Ce deuxième modèle est apparu comme le plus naturel et le plus communément admis. D'après Beavis *et al.* [59], l'interaction non covalente par liaison hydrogène, entre les groupements carboxyles et hydroxyles de deux molécules de matrice (acide sinapinique) dans le réseau cristallin, est favorable à la formation d'espèces protonées (et déprotonées) de la matrice :



- Photoexcitation de la matrice [40,71,81-84]



Ce mécanisme est basé sur un transfert de protons à l'état excité (ESPT<sup>1</sup>), proposé par Russell *et al.* [71]. Cette chimie acido-basique à l'état excité s'appuie sur les travaux de spectrométrie de masse laser de Chiarelli *et al.* [81,82], et ceux de Parker et Hercules [85]. Un tel mécanisme est susceptible de se produire en phase gazeuse ou en phase condensée, voire même à l'état solide.

En MALDI, la formation de complexes (matrice<sup>\*</sup>)(analyte) peuvent être produits à l'issue de l'étape de désorption ou par collision dans un nuage gazeux condensé. Selon l'affinité protonique de l'analyte, un transfert de protons de la matrice vers la molécule cible a lieu avant la dissociation du complexe en phase gazeuse.

L'intervention de molécules de matrice électroniquement excitées, repose sur le fait que des ions de type  $[M+H]^+$  sont absents du spectre MALDI, si la matrice n'est pas irradiée, mais simplement chauffée par un laser dirigé sur la face opposée au dépôt (voir figure I.9, p. 20). Dans ce dernier cas, seules des molécules cationisées par  $Na^+$  et  $K^+$  apparaissent [46]. La plus forte acidité des alcools et des amines aromatiques (composés fréquemment utilisés comme matrice) à l'état excité, par rapport à l'état fondamental, serait en faveur du rôle prépondérant des espèces électroniquement excitées dans le processus de protonation [86]. Et ceci expliquerait, notamment, la possibilité d'avoir un mécanisme d'ionisation commun sous irradiation laser UV et IR. Les espèces réactives de la matrice participant à l'ionisation de l'analyte ne sont pas dans un état ionisé [81].

Cependant, plusieurs arguments sont en défaveur de ce modèle. Ils se réfèrent au temps de vie de l'état excité de la matrice et au temps de désorption/ionisation du processus MALDI estimé à 50 ns [87]. Ainsi, comme le note Ehring *et al.* [87], la matrice 2,5-DHB induit une protonation du composé analysé, alors que la relaxation de son état excité est rapide ( $\sim 30$  ns). Au contraire, l'acide 3-hydroxypicolinique est peu efficace dans le processus de protonation, bien qu'il possède un état excité dont le temps de vie est long (dû à la présence d'un état triplet). Mais, il faut être prudent quant à ces conclusions, puisqu'elles reposent sur une mesure du temps de désorption/ionisation qui n'a jamais été confirmée.

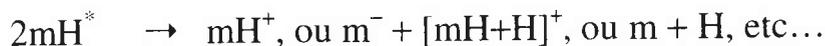
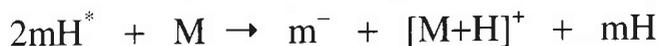
Plus récemment, Zenobi *et al.* [84] ont conforté l'hypothèse du mécanisme de la photoexcitation de la matrice. D'après elle, les molécules de matrice excitées, et non ionisées, sont les précurseurs communs de tout ion produit après la désorption (hormis ceux préformés à la surface et libérés lors de la désorption). La présence simultanée de deux molécules de matrice excitées, voisines l'une de l'autre, est requise pour l'ionisation. Celle-ci survient dans les premières

---

<sup>1</sup> ESPT : Excited-State Proton Transfer

nanosecondes de la désorption, où la densité des molécules excitées et neutres est forte :

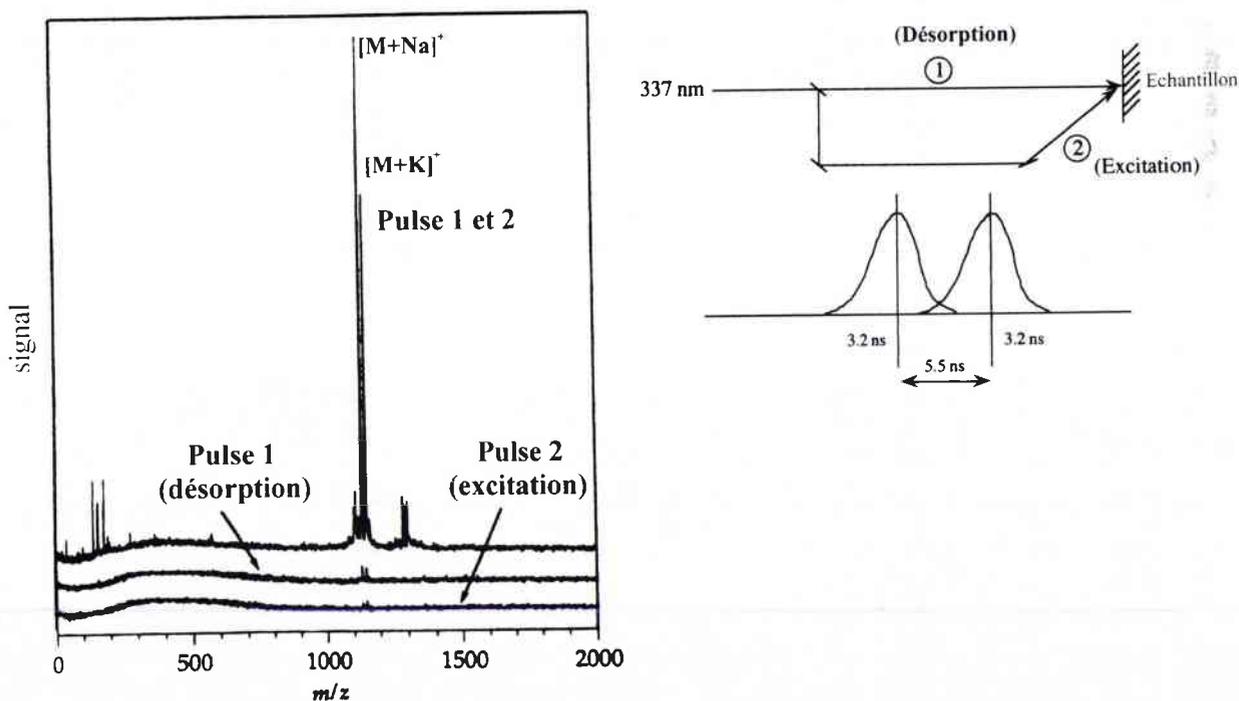
• Protonation :



• Déprotonation [88]:



Afin de démontrer l'importance du processus d'excitation en MALDI, des spectres de la valinomycine sont présentés en figure I.20, selon différentes conditions de pulses laser.



**Figure I. 20 :** Spectres de la valinomycine  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  dans différentes conditions de temps d'interaction laser-matière. Type de laser utilisé : laser azote ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) ; Matrice : 2,5-DHB dans un rapport 10:1, schéma expérimental en haut à droite, d'après [84].

Dans l'idée que les processus de désorption et d'ionisation sont séparés dans le temps, Knochenmuss *et al.* [84] ont simulé cette séparation en laissant un temps de 5,5 ns entre deux pulses laser ( $\tau = 3,3 \text{ ns}$ ). Selon ce schéma expérimental, ils

n'ont constaté aucune ionisation de l'analyte. Par contre, lorsque les pulses laser sont additionnés, le train de photons est assez long pour garder excité un grand nombre de molécules de matrice, afin qu'elles puissent échanger leurs protons avec des molécules cibles. Cette expérience démontre de manière significative, que l'étape d'ionisation est bien postérieure à la désorption. Lors d'une impulsion laser, une certaine quantité de photons servent directement au processus de désorption, tandis que les derniers arrivés, sont surtout utilisés pour exciter le plus grand nombre de molécules de matrice.

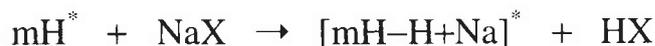
### II.2.3.2. La cationisation

Il y a peu de renseignements sur ce type d'ionisation dans la littérature. L'observation de molécules cationisées pour des composés ne pouvant pas former de sel, indique que l'espèce formée est vraisemblablement l'ion  $[M+Na]^+$ , et non le sel protoné, c'est à dire  $[(M-H+cation)+H]^+$  (cation =  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ , ...) [88].

Plusieurs indices laissent penser que la cationisation se produirait entre un cation désorbé directement à partir du dépôt cristallin et le composé à analyser (voir figure I.17, p. 34 [67]). Comme pour la protonation, différents auteurs ont proposé la participation de la matrice dans le processus de cationisation. L'espèce active serait alors la matrice excitée sous forme de sel ( $[mH-H+Na]^*$ ) [84]. Cependant, on ne peut exclure la possibilité d'une préionisation en phase condensée ou à l'état solide de l'analyte [65,72]. Ainsi, l'observation exclusive de molécules de peptides cationisées, lors de l'irradiation par l'arrière d'un dépôt, a laissé supposer à Ehring *et al.* [46], que la cationisation pouvait provenir d'un processus d'évaporation thermique d'un sel préformé en phase condensée.

Ces différentes observations, ont amené Zenobi *et al.* [84] à proposer deux mécanismes de cationisation, dont le précurseur commun est la molécule de matrice excitée :

♦ Sel non formé



♦ Sel préformé



Contrairement aux autres équipes, où l'ionisation par protonation et par attachement de cation (cationisation) est traitée indépendamment, ce modèle a l'avantage de présenter un précurseur commun aux deux modes d'ionisation.

En conclusion, il n'existe pas un mécanisme d'ionisation qui puisse satisfaire l'interprétation de l'ensemble des résultats publiés en MALDI. Dernièrement, des travaux montraient la possibilité d'intervention de fragments de la matrice ( $[mH-H_2O]^+$ ,  $[mH-CO_2]^+$ ) dans l'étape d'ionisation en désorption laser assistée par matrice [89-91]. Il semble donc, que plusieurs processus d'ionisation, se succédant les uns après les autres, contribueraient à l'image finale du spectre MALDI. De plus, il n'est pas certain que les probabilités d'ionisation soient identiques, quelle que soit la nature du composé étudié. Ceci pourrait être particulièrement préjudiciable à l'étude de mélanges, comme par exemple les polymères synthétiques.

### ***II.3. Les facteurs importants***

Les travaux publiés à ce jour ont fait ressortir l'importance de trois facteurs : les caractéristiques de l'irradiation laser, le choix de la matrice et le mode de préparation de l'échantillon.

#### ***II.3.1. L'irradiation laser***

Comme nous l'avons vu, la technique MALDI repose sur un dépôt très rapide d'énergie à la surface d'un matériau absorbant (matrice), lequel est capable d'enrober des molécules à analyser (molécules cibles), donc de les protéger d'effets néfastes d'une irradiation laser directe. Cette quantité d'énergie est l'élément clef de tout processus MALDI. En effet, la valeur de ce paramètre doit être optimale afin d'assurer une volatilisation rapide de la matière, sans pour autant induire de multiples fragmentations des molécules cibles par effet thermique. On utilise deux grandeurs pour quantifier ce paramètre, soit la fluence ( $J.cm^{-2}$ ) qui exprime la quantité d'énergie déposée par  $cm^2$ , soit l'irradiance ( $W.cm^{-2}$ ) qui représente la quantité d'énergie déposée par  $cm^2$  et par seconde. Il apparaît d'après certaines études [24,92-95], que la fluence laser est le paramètre le plus pertinent pour décrire les processus de désorption et d'ionisation laser. Cela est compréhensible dans une certaine mesure, puisque l'ensemble des lasers utilisés en MALDI, ont tous des temps d'impulsion avoisinant la nanoseconde, voire la picoseconde. Cependant, quelques travaux ont montré que lorsque la durée de l'impulsion laser est modifiée (voir figure I.20 p. 42) [65] ou bien lorsqu'elle est réduite à un temps très court ( $\sim fs$ ) [96], ces processus sont perturbés. L'irradiance a donc son importance également.

D'autres paramètres laser ont un rôle secondaire. Il s'agit notamment de : l'angle d'incidence, de l'homogénéité et de la taille du faisceau incident, et enfin du nombre de tirs laser [97-100], qui influencent directement ou indirectement, l'allure de l'empreinte spectrale (intensité et résolution des pics de masse).

La longueur d'onde a un rôle particulier, c'est elle qui fixe le quantum d'énergie des photons et intervient donc directement lors de l'excitation ou de la photoionisation des molécules organiques [101].

### II.3.2. La matrice

La matrice joue un rôle prépondérant dans le processus MALDI. Elle assure trois fonctions principales :

- ◆ elle sert "d'agent dispersant" afin de minimiser les interactions intermoléculaires de l'analyte ; la formation d'une solution solide homogène représente le cas idéal,
- ◆ elle constitue un centre de transfert d'énergie entre le rayonnement laser et le composé analysé ; elle protège ainsi les molécules du composé étudié d'une dégradation thermique (ou photochimique) lors de l'irradiation laser,
- ◆ elle favorise l'ionisation par protonation, déprotonation ou cationisation (vide infra). Comme nous l'avons discuté précédemment, les mécanismes régissant les processus d'ionisation ne sont pas encore clairement établis.

Les critères de choix d'une bonne matrice sont multiples. En effet, cette dernière doit obéir à certaines conditions :

- ✓ *La compatibilité physico-chimique.* Afin d'obtenir une solution solide homogène, le composé étudié et la matrice doivent être solubles dans les mêmes solvants. Pour certains composés, comme les polymères synthétiques, il est très difficile de trouver des solvants adéquats. Nous verrons par la suite, qu'il existe différentes stratégies de préparation de l'échantillon, qui permettent souvent de trouver une solution pour les situations les plus difficiles. Dans tous les cas, l'intégrité des molécules cibles doit être préservée. Il ne faut pas que la matrice présente une quelconque réactivité vis-à-vis du composé à étudier.
- ✓ *L'absorption photonique.* La valeur optimale de cette grandeur est difficile à déterminer car elle dépend à la fois du coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) et de la structure du film cristallisé de la

matrice. Il est donc impératif de disposer d'un spectrophotomètre en réflexion diffuse, en raison des déplacements du maximum d'absorption, constatés entre les solutions (utilisées pour faire les mesures) et l'état solide (caractéristique des échantillons MALDI) [102,103]. En pratique, les matrices efficaces ont un  $\epsilon$  supérieur à  $10^3 \text{ l.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ , ce qui limite le choix des matrices à des composés aromatiques possédant des substituants, qui ont des effets hypsochromes ou bathochromes sur le spectre d'absorption électronique. Mais, il faut garder à l'esprit qu'un fort coefficient d'absorption molaire n'implique pas forcément une matrice efficace (exemple de l'ester méthylé de l'acide nicotinique, Chap. V, p. 151).

- ✓ *La volatilité.* La matrice doit présenter une vitesse d'ablation relativement importante, afin de créer un jet supersonique permettant la co-désorption de molécules cibles. Elle doit être également stable à l'irradiation laser, car des photoproduits trop nombreux, pourraient rendre l'interprétation spectrale difficile.

D'autres paramètres importants tels que, la formation possible de liaisons hydrogène avec la molécule cible, due en particulier à la présence sur la matrice de groupements OH (ou NH), et les propriétés physico-chimiques du réseau cristallin, sont à prendre en considération.

En pratique, parmi de nombreux composés sélectionnés selon ces critères, seul un nombre très restreint donne des résultats. En outre, certaines matrices semblent être moins sensibles que d'autres à la présence de contaminants, souvent rencontrés dans les échantillons d'origine biologique (cations métalliques, détergents, ...). Il est donc souvent nécessaire d'adapter la nature de la matrice à chaque type de famille de composés étudiés. Le tableau I.2 recense les principales matrices employées en fonction du type de produit analysé et de la longueur d'onde utilisée. Cette liste est indicative et non exhaustive, de très nombreux composés pouvant être potentiellement efficaces. Les recherches dans ce domaine sont en pleine expansion.

Ainsi, il s'est avéré que, des matrices neutres (nitrocellulose) [104], ou basiques (pyrimidines, anilines) [105], sont parfois plus efficaces que leurs consœurs acides, notamment pour l'analyse d'oligonucléotides, qui se dégradent facilement en milieu acide. Dernièrement, des composés de la famille des  $\beta$ -carbolines [106], ou bien encore d'hydrocarbures aromatiques polycycliques substitués [107] se sont révélés être d'excellentes matrices pour l'analyse des polymères synthétiques.

Enfin, il semble qu'aujourd'hui des systèmes liquides de matrice, tels que Tanaka *et al.* [2] les concevaient en 1988, reviennent en force. Une matrice absorbante solide [ex : l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (4HCCA), ou le ferrocyanate de potassium ( $K_4[Fe(CN)_6]$ ), ou bien encore le graphite] est mélangée à un médiateur liquide non absorbant (ex : le glycérol). L'avantage de ce système, réside en particulier dans l'étude des composés hydrophobes, et permet surtout d'obtenir une excellente reproductibilité des résultats [108-110].

Matrice	Forme	$\lambda_{\text{laser}} \text{ utilisées}$	Principales applications
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB)	solide	266, 337/355 nm 2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines
2,5-DHB + 10% acide 5-méthoxy salicilique (DHBS)	solide	337/355 nm 2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines, essentiellement pour des masses > 20 KDa
Acide sinapinique	solide	337/355 nm 2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique	solide	337/355 nm 2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines
Acide 3-hydroxypicolinique (3-HPA)	solide	337/355 nm	Acides nucléiques, hydrates de carbone
Acide 2-(4-hydroxyphénylazo)benzoïque (HABA)	solide	266, 337/355 nm	Protéines, hydrates de carbone
Acide nicotinique	solide	266 nm 2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines
Ether 2-nitrophényl octyl	liquide	266, 337/355 nm	Polymères synthétiques
Acide succinique	solide	2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines, acides nucléiques
Glycérol	sol/liq	2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines
Eau (glace)	solide	2,79, 2,94, 10,6 $\mu\text{m}$	Protéines

**Tableau I.2 :** Recensement des matrices MALDI les plus utilisées, tiré de [3].

### II.3.3. Le mode de dépôt

La technique la plus couramment employée est la méthode de simple dépôt souvent dénommée "dried droplet". Elle s'effectue, dans un premier temps, en mélangeant une solution contenant le composé à analyser à une solution de matrice (à une concentration voisine de la saturation) ; le rapport molaire final matrice/composé étant de  $10^3$  à  $10^6$ . Dans un deuxième temps, quelques  $\mu\text{L}$  du mélange obtenu sont déposés sur un support métallique. Le séchage de ce dépôt se fait le plus souvent à la pression atmosphérique et à la température ambiante. La taille et la forme des cristaux varient avec la nature de la matrice et des solvants utilisés. Ces cristaux ont des dimensions de l'ordre de quelques dizaines à une centaine de  $\mu\text{m}$  [111].

Cette technique de préparation de l'échantillon présente les avantages d'être simple, rapide et efficace dans un grand nombre de cas. Elle nécessite cependant

que le composé étudié et la matrice aient des solubilités voisines dans les solvants utilisés, afin d'éviter la précipitation de l'un des deux constituants au moment du mélange des solutions. De plus, dans le cas de solvants à évaporation lente, le dépôt cristallin est souvent hétérogène (cristallisation en périphérie du dépôt, le centre étant faiblement recouvert), et le composé à analyser n'est pas inclus de manière uniforme dans le réseau cristallin de la matrice [112]. Si l'environnement du composé étudié n'est pas uniforme, les rendements de désorption et d'ionisation dépendront de la localisation du point d'impact du faisceau laser, ce qui entraînera une grande variation de l'intensité des signaux et de la résolution [113]. Dans le cas de mélanges de composés, un séchage lent pourra induire des phénomènes de ségrégation, rendant pratiquement impossible les études quantitatives, et notamment la caractérisation des distributions polymères. Le choix judicieux du solvant est également un facteur de réussite lors de ce type d'analyse. Pour la plupart des biopolymères, on utilise un mélange eau/TFA<sup>1</sup> 0,1 % (voire dans certains cas l'eau pure) ou eau/solvant organique (alcool ou acétonitrile, essentiellement). Pour les autres molécules (polymères synthétiques), le choix n'est pas toujours facile, il dépend de la nature chimique de la molécule cible étudiée.

Plusieurs équipes ont tenté d'améliorer cette technique en modifiant la vitesse de séchage ou le mode de dépôt du mélange matrice/composé. Weiberger *et al.* [114] montrent que le séchage sous vide conduit à une cristallisation très homogène, même lorsque des solvants peu volatils (comme par exemple l'eau) sont utilisés. Un séchage sous courant d'azote a aussi été proposé, mais une amélioration des qualités spectrales n'est observée que pour les matrices solubilisées dans des solvants présentant une faible viscosité [115]. La pulvérisation [116] ou l'électronébulisation [117] souvent utilisée en PDMS, ont également été appliquées afin de rendre le dépôt de microcristaux le plus uniforme possible.

A côté de la méthode de simple dépôt, des techniques plus sophistiquées ont été développées dans le but d'obtenir, une plus grande tolérance de la technique MALDI aux contaminants, une plus grande homogénéité du dépôt cristallin, mais aussi pour permettre la mise en place d'études systématiques et quantitatives.

Ainsi, dans le cadre particulier de l'étude de composés provenant de milieu biologique, des surfaces actives et spécifiques ont été développées. Ces surfaces permettent d'éviter les étapes de purification [118,119] et d'augmenter les potentialités analytiques de la technique MALDI par extraction sélective d'un composé du milieu biologique [120].

---

<sup>1</sup> TFA : Trifluoroacetic acid

Hurst *et al.* [121] ont proposé un mode opératoire consistant à préparer des pastilles de matrice semblables à celles employées pour la spectrométrie IR, et à déposer ensuite sur celles-ci, un faible volume de la solution contenant le composé à analyser. De leur côté, Xiang *et al.* [122], ont utilisé des films polycristallins de matrice obtenus en écrasant, directement sur le porte-échantillon, le dépôt de cristaux. La méthode de préparation de l'échantillon en deux étapes, la plus intéressante, a été décrite par Roepstorff *et al.* [113]. Elle consiste à déposer, dans un premier temps, la matrice (ici l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique) solubilisée dans un solvant très volatil (l'acétone). Après séchage, il se forme un film homogène de microcristaux. Le composé à analyser, dissous dans l'eau, est ensuite déposé sur ce premier film. La matrice étant faiblement soluble dans l'eau, le premier dépôt n'est redissous qu'en surface. Avec cette méthode, la variation de l'intensité relative des signaux est relativement faible. De plus, pour l'étude de mélanges, la corrélation entre les quantités relatives de composés présents et l'intensité relative des signaux leur correspondant, est plus grande. Roepstorff *et al.* [113] montrent que par cette technique, des protéines peuvent être analysées à l'échelle de la dizaine d'attomoles<sup>1</sup>, et qu'il est possible d'éliminer, tout du moins partiellement, les sels par rinçage du dépôt.

Récemment, Dai *et al.* [112] ont mis au point une nouvelle méthode dérivée de celles de Xiang *et al.* [122] et de Roepstorff *et al.* [113]. Un film formé de monocristaux de matrice est préparé puis, un faible volume (~ quelques  $\mu\text{L}$ ) d'une solution contenant, la matrice et la molécule cible, est déposé. La première couche de cristaux sert de germe à la cristallisation du deuxième dépôt. L'utilisation de composés possédant un groupement fluorescent, leur a permis de montrer, par microscopie confocale, que la répartition des molécules du composé à étudier, est homogène sur l'ensemble du dépôt cristallin. Cette méthode conduit à une meilleure reproductibilité des résultats.

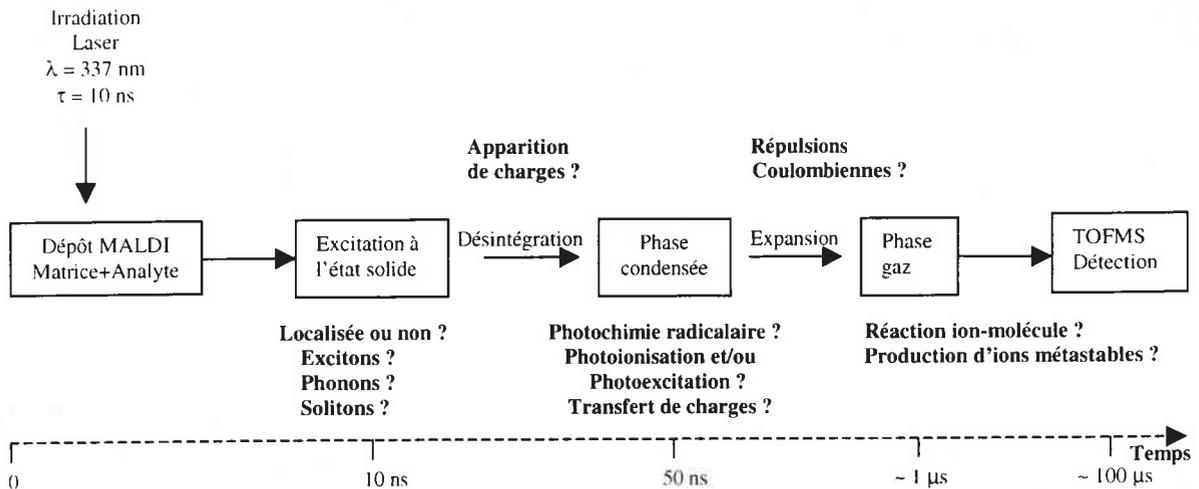
Le lecteur pourra, s'il le désire, se reporter aux publications [123,124], qui regroupent les différentes méthodes de préparation de l'échantillon existantes à l'heure actuelle en MALDI. La multiplicité des méthodes décrites ci-dessus, ne doit pas faire oublier combien il est parfois difficile pour l'expérimentateur de choisir le protocole le plus adapté pour l'analyse d'un composé particulier. Il est souvent nécessaire d'adapter et de modifier ces "recettes" en fonction des caractéristiques physico-chimiques du composé étudié, mais également selon le type d'analyseur couplé à la technique MALDI (TOF, FTMS, ITMS, ...).

---

<sup>1</sup> attomole :  $10^{-18}$  mole

### III. Conclusion

Si les mécanismes qui régissent les processus de désorption/ionisation laser sont encore mal connus actuellement, il est cependant possible de résumer les différentes hypothèses avancées dans la littérature de la manière suivante (voir figure I.21) :



**Figure I.21** : Schématisation hypothétique des différentes étapes de la désorption/ionisation laser assistée par matrice.

L'irradiation laser d'un dépôt solide, constitué de molécules de matrice et d'analyte, induit une succession de processus physico-chimiques ultra-rapides, pouvant être identifiés selon leur évolution dans le temps. Mais, il est très difficile d'arrêter une valeur précise pour chaque séquence ; l'échelle des temps (figure I.21) ne peut être donc qu'indicative. Seule la valeur finale est accessible aisément par le calcul théorique. Si nous prenons l'exemple, de l'analyse d'une protéine de 6 000 Daltons par MALDI-TOF linéaire (tension d'accélération (V) : 25 kV, longueur du tube (d) : 2 m), les ions de cette protéine arriveront sur le détecteur  $70 \mu\text{s}$ <sup>1</sup> après l'impulsion laser. Les valeurs intermédiaires n'ont pour l'instant jamais été confirmées ou infirmées.

Cependant, l'utilisation de molécules cibles photochromiques, dont la particularité est de réagir à la lumière, en présentant différentes configurations électroniques au cours d'une impulsion laser UV, peut nous renseigner sur ces valeurs temporelles intermédiaires. En effet, comme nous le verrons par la suite, des études par photolyse laser nanoseconde sur des spirooxazines, permettent d'identifier des formes transitoires. Leur ionisation respective, permettra

<sup>1</sup>  $t = 7,22 \times 10^{-5} \times \sqrt{\frac{m}{zV}} \times d$  en (s)

d'établir un ordre chronologique des événements MALDI. Nous pourrions ainsi posséder des éléments supplémentaires pour déterminer quand a lieu précisément l'ionisation des molécules cibles.

★ ★ ★

# Bibliographie

- [1] M. Karas et F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299.
- [2] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida et T. Yoshida, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 8, 151.
- [3] F. Hillenkamp, extrait de "13<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference", Budapest, **1994**, 95.
- [4] G. Talbot et M. Mann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 100.
- [5] K. Dreisewerd, R. Kinston, W.P.M. Geraerts et K.W. Li, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **1997**, 169/170, 291.
- [6] K.L. Busch, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 233.
- [7] C.D. Mowry et M.V. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 569.
- [8] D. Noble, *Anal. Chem.*, **1995**, 497A.
- [9] D.H. Russell et R.D. Edmondson, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 263.
- [10] B. Spengler, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 1019.
- [11] U. Bahr, J. Stahl-Zeng, E. Gleitsmann et M. Karas, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 1111.
- [12] J.A. Castro, C. Köster et C. Wilkins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 239.
- [13] V.M. Doroshenko et R.J. Cotter, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 822.
- [14] B. Spengler, D. Kirsch et R. Kaufmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 105.
- [15] Y. Huang, L. Pasa-Tolic, S. Guan et A.G. Marshall, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 4385.
- [16] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong et C.M. Whitehouse, *Mass Spectrom. Rev.*, **1990**, 9, 37.
- [17] M.E. McComb, R.D. Oleschuk, D.M. Manley, L. Donald, A. Chow, J.D.J. O'Neil, W. Ens, K.G. Standing et H. Perreault, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 1716.
- [18] J.C. Promé, *Cahier N° 89, dans la revue Biofutur N° 164*, février **1997**.
- [19] O.N. Jensen, P. Mortensen, O. Vorm et M. Mann, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1706.
- [20] L. Van Vaeck, W. Van Roy, R. Gijbels and F. Adams, extrait de "Laser Ionization Mass Analysis", Chemical Analysis Series, éd. par A. Vertes, R. Gijbels et F. Adams, Wiley, New York, **1993**, 177.
- [21] D.M. Hercules, R.J. Day, K. Balasanmugam, T.A. Dang et D.C.P. Li, *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 280A.
- [22] A.L. Burlingame, R.K. Boyd et S.J. Gaskell, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 599R.
- [23] A. Vertes, extrait de "Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules", éd. par K.G. Standing et W. Ens, Plenum Press, New York, **1991**, 275.
- [24] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas et F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1995**, 141, 127.
- [25] A. Vertes et R.D. Lavine, *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 171, 284.
- [26] L. Balazs, R. Gijbels et A. Vertes, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 314.
- [27] R. Braun et P. Hess, *J. Chem. Phys.*, **1993**, 99, 8330.
- [28] R.E. Johnson, extrait de "Large Ions : Their Vaporization, Detection and Structural Analysis", éd. par T. Baer, et I. Powis, John Wiley, New York, **1996**, 49.
- [29] V. Venugopalan, extrait de "Proceedings of Laser-Tissue Interaction IV", éd. par S.L. Jacques, SPIE Proceedings Series 2391, **1995**, 184.
- [30] I. Itzkan, D. Albagli, M. Dark, L.T. Perelman, C. Von Rosenberg et M.S. Feld, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **1995**, 92, 1960.
- [31] J.F. Muller, *Cours de Spectrométrie de Masse, Bases Théoriques, Applications*, ATF Chimie et Physico-Chimie des Grandes Molécules, MESR-DSPT2, **1994**.
- [32] S. Srinivasan et B. Braren, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 1303.
- [33] L.V. Zhigilei, P.B.S. Kodali et B.J. Garrison, *Chem. Phys. Lett.* 276, **1997**, 269.

- [34] L.V. Zhigilei, P.B.S. Kodali et B.J. Garrison, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 2028.
- [35] C.R. Phipps et R.W. Dreyfus, extrait de "Laser Ionization Mass Analysis", Chemical Analysis Series, éd. par A. Vertes, R. Gijbels et F. Adams, Wiley, New York, **1993**, 369.
- [36] A. Vertes, G. Irinyi et R. Gijbels, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2389.
- [37] W. Ens, Y. Mao et K.G. Standing, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 3, 117.
- [38] R.C. Beavis et B.T. Chait, *Chem. Phys. Lett.*, **1991**, 181, 479.
- [39] T. Huth-Fehre et C.H. Becker, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 378.
- [40] V. Bökelmann, B. Spengler et R. Kaufmann, *Eur. Mass Spectrom.*, **1995**, 1, 81.
- [41] P. Juhasz, M.L. Vestal et S.A. Martin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8, 209.
- [42] R.C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 653.
- [43] Y. Pan et R.J. Cotter, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 3.
- [44] S.E. Egorov, V.S. Letokhov et A.N. Shibanov, *Chem. Phys.*, **1985**, 85, 349.
- [45] S. Niu, W. Zhang et B.T. Chait, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 1.
- [46] H. Ehring, C. Costa, P.A. Demirev et B.U.R. Sundqvist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 821.
- [47] M. Schürenberg, T. Schulz, K. Dreisewerd et F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1873.
- [48] A. Vertes, L. Balasz et R. Gijbels, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1990**, 4, 263.
- [49] J. Kampmeier, K. Dreisewerd, M. Schürenberg et K. Strupat, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1997**, 169/170, 31.
- [50] J.F. Muller, *Spectra 2000*, **1987**, n°120, 15, 23.
- [51] B. Linder et U. Seydel, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 895.
- [52] B.J. Garrison et R. Srinivasan, *Appl. Phys. Lett.*, **1984**, 44, 849.
- [53] M. Von Allmen, extrait de "Laser-Ablation of Electronic Materials, Basic Mechanisms and Applications", éd. par E. Fogarassy et S. Lazarre, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, **1992**, 55.
- [54] M. Vestal, *Mass Spectrom. Rev.*, **1983**, 2, 447.
- [55] J. Shiea et J. Sunner, *Proc. 38<sup>th</sup> ASMS Conf. Mass Spectrom. Applied Top.*, Tuscon, Arizona, **1990**, 166.
- [56] A. Vertes et R. Gijbels, extrait de "Laser Ionization Mass Analysis", Chemical Analysis Series, éd. par A. Vertes, R. Gijbels et F. Adams, Wiley, New York, **1993**, 127.
- [57] B.J. Garrison et R. Srinivasan, *Appl. Phys. Lett.*, **1985**, 57, 2909.
- [58] A. Bencsura et A. Vertes, *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, 247, 142.
- [59] R. Beavis et J.N. Bridson, *J. Phys. D Appl.*, **1993**, 26, 442.
- [60] A. Vertes, R. Gijbels et R.D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1990**, 4, 6, 228.
- [61] A. Bencsura, V. Navale, M. Sadeghi et A. Vertes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 679.
- [62] I.J. Amster, D.P. Land, J.C. Hemminger et R.T. McIver, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 184.
- [63] P. Juhasz et C.E. Costello, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 343.
- [64] A. Overberg, M. Karas et F. Hillenkamp, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1991**, 5, 128.
- [65] E. Lehmann, R. Knochenmuss et R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 1483.
- [66] V.S. Letokhov, extrait de "Laser Analytical Spectrochemistry", éd. par A. Hilger, Bristol et Boston, **1986**.
- [67] B.H. Wang, K. Dreisewerd, U. Behr, M. Karas et F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1993**, 4, 393.
- [68] A.G. Harrison, extrait de "Chemical Ionization Mass Spectrometry", CRC Press, Boca Raton, **1983**.
- [69] M.S.B. Munson et F.H. Field, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 2621.

- [70] I.K. Perera, J. Perkins et S. Kantartzoglou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 180.
- [71] M.E. Gimon, L.M. Preston, T. Solouki, M.A. White et D.H. Russell, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 827.
- [72] C.K.L. Wong et T.W. Dominic Chan, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1997**, 11, 513.
- [73] G.R. Kinsel, R.D. Edmondson et D.H. Russell, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 714.
- [74] H. Ehring, M. Karas et F. Hillenkamp, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 472.
- [75] M. Karas, *Analisis*, **1992**, 20, 31s.
- [76] R.C. Beavis et B.T. Chait, extrait de "Methods and Mechanisms for Producing Ions from Large Molecules", éd. par K.G. Standing and W. Ens, Plenum Press, New York, **1991**, 227.
- [77] R.C. Beavis, T. Chaudhary et B.T. Chait, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 156.
- [78] G. Grigorean, R.I. Carey et I.J. Amster, *Eur. Mass Spectrom.*, **1996**, 2, 139.
- [79] M. Karas et F. Hillenkamp, extrait de "Ion Formation from Organic Solids, IFOSIV", éd. par A. Benninghoven, Wiley, Chichester, **1987**, 103.
- [80] J.P. Speir, G.S. Gorman et I.J. Amster, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 64.
- [81] M.P. Chiarelli et M.L. Gross, *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 3595.
- [82] M.P. Chiarelli, A.G. Sharkey et D.M. Hercules, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 307.
- [83] M. Gimon-Kinsel, L.M. Preston-Schaffter, G.R. Kinsel et D.H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2534.
- [84] R. Knochenmuss, F. Dubois, M.J. Dale et R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 871.
- [85] C.D. Parker et D.M. Hercules, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 25.
- [86] L.M. Preston-Schaffter, G.R. Kinsel et D.H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1994**, 5, 800.
- [87] H. Ehring et B.U.R. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 1303.
- [88] R. Knochenmuss, V. Karbach, U. Wiesli, K. Breuker et R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1998**, 12, 529.
- [89] R.J.J.M. Steenvoorden, K. Breuker et R. Zenobi, *Eur. Mass Spectrom.*, **1997**, 3, 339.
- [90] T. Kosaka, T. Kinoshita et M. Takayama, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 405.
- [91] J. Bai, X. Liang, Y.H. Liu, Y. Zhu et D.M. Lubman, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 839.
- [92] P.Y. Yau, T.W. Dominic Chan, P.G. Cullis, A.W. Colburn et P.J. Derrick, *Chem. Physics Lett.*, **1993**, 202, 1,2, 93.
- [93] K. Riahi, G. Bolbach, A. Brunot, F. Breton, M. Spiro et J.C. Blais, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 242.
- [94] R.C. Beavis, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 864.
- [95] K. Dreisewerd, M. Schürenberg, M. Karas et F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **1996**, 154, 171.
- [96] P. Demirev, A. Westman, C.T. Reimann, P. Hakansson, D. Barofsky, B.U.R. Sundqvist, Y.D. Cheng, W. Seibt et K. Siegbahn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 187.
- [97] A. Westman, T. Huth-Fehre, P. Demirev, J. Bielawski, N. Medina et B.U.R. Sundqvist, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 388.
- [98] R.C. Beavis et B.T. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1989**, 3, 7, 233.
- [99] A. Ingendoh, M. Karas, F. Hillenkamp et U. Giessmann, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **1994**, 131, 345.
- [100] A. Westman, P. Demirev, T. Huth-Fehre, J. Bielawski, B.U.R. Sundqvist, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **1994**, 130, 107.
- [101] M. Karas, D. Bachmann et F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2935.

- [102] D.A. Allwood, R.W. Dreyfus, I.K. Perera et P.E. Dyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1575.
- [103] T.W. Heise et E.S. Yeung, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, 299, 377.
- [104] Y.H. Liu, J. Bai, X. Liang, D.M. Lubman et P.J. Venta, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3482.
- [105] M.C. Fitzgerald, G.R. Parr et L.M. Smith, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3204.
- [106] H. Nonami, S. Fukui et R. Erra-Balsells, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 287.
- [107] X. Tang, P.A. Deifuss et A. Vertes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 1141.
- [108] J. Zhou et T.D. Lee, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1995**, 6, 1183.
- [109] P. Zöllner, G. Stübiger, E. Schmid, E. Pittenauer et G. Allmaier, *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **1997**, 169/170, 99.
- [110] M.J. Dale, R. Knochenmuss et R. Zenobi, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3321.
- [111] A. Westman, T. Huth-Fehre, P. Demirev et B.U.R. Sundqvist, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 206.
- [112] Y.Q. Dai, R.M. Whittal et L. Li, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 2494.
- [113] O. Vorm, P. Roepstorff et M. Mann, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3281.
- [114] S.R. Weinberger, *Proc. 41<sup>st</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **1993**, San Francisco, 775.
- [115] A.I. Gusev, W.R. Wilkinson, A. Proctor et D.M. Hercules, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1034.
- [116] J. Dwyer et D. Botten, *Amer. Lab.*, **1996**, 28, 51.
- [117] I.K. Perera, J. Perkins et S. Kantartzoglou, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1995**, 9, 180.
- [118] K.K. Mock, C.W. Sutton et J.S. Cottrell, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 233.
- [119] J.A. Blackledge et A.J. Alexander, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 843.
- [120] T.W. Hutchens et T. Yip, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1993**, 7, 576.
- [121] G.B. Hurst, T.J. Czartoski et M.V. Buchanan, *42<sup>nd</sup> ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, **1994**, San Francisco.
- [122] F. Xiang et R.C. Beavis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 199.
- [123] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm et P. Roepstorff, *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32, 593.
- [124] E.T.P. Sze, T.W. Dominic Chan et G. Wang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1998**, 9, 166.

# Chapitre II

## Les spironaphtoxazines : Sondes Moléculaires Photochromiques

L'analyse de composés photochromiques de la série spiro-[indoline-naphtoxazine] par MALDI a révélé simultanément au changement de couleur, que l'ouverture photochimique de tels composés, induit la formation spécifique d'ions pseudo-moléculaires triplement hydrogénés  $[M+3H]^+$  au lieu des ions  $[M+H]^+$  attendus. Alors que dans des conditions opératoires similaires, mais sans matrice (LDI), ces mêmes photochromes s'ionisent sous la forme de  $M^+$  laquelle se fragmente en plusieurs ions. De ce fait, ces composés spiraniques apparaissent comme des sondes moléculaires encore plus spécifiques que nous l'avions prévu pour l'étude du mécanisme MALDI. C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés aux propriétés physiques et chimiques des molécules photochromiques, et en particulier à la série des spironaphtoxazines.

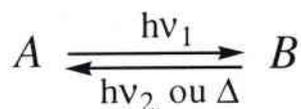
Dans un premier temps, nous reviendrons brièvement sur la définition du photochromisme. Nous verrons successivement, les réactions chimiques, les paramètres photochromiques, ainsi que les applications industrielles que ce processus implique.

La deuxième partie de ce chapitre sera entièrement consacrée à la série spiro-[indoline-naphtoxazine]. Après une rapide présentation de ces composés, nous développerons leurs propriétés photochromiques en fonction de la variation structurale introduite sur l'entité spirooxazinique. Nous aborderons ensuite, brièvement les différentes voies d'accès à ces produits, puis la meilleure façon de représenter la forme ouverte. Enfin, nous nous intéresserons plus particulièrement au mécanisme d'ouverture et de fermeture qui caractérise ces molécules.

## I. Le photochromisme

### I.1. Définition

Fischer et Hirshberg [1], en 1950, définissent le photochromisme comme une transformation réversible d'une espèce chimique simple entre deux états présentant des spectres d'absorption différents. Cette transformation est induite, au moins dans un sens, par une radiation électromagnétique.

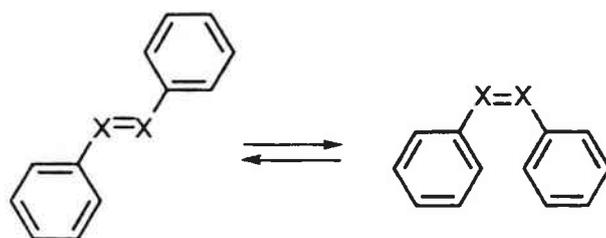


L'espèce *A* est transformée par l'action de la lumière (UV, visible ou IR) en un ou plusieurs isomère(s) *B*, dont le niveau d'énergie est généralement plus élevé. La réaction inverse est souvent un processus thermique spontané, mais peut parfois être aussi déclenchée par une irradiation lumineuse, en particulier dans le domaine du visible. Le terme photochromisme, construit selon deux racines : photo (lumière) et chrom (couleur), traduit donc tout phénomène, qui sous l'effet de la lumière, permet un changement réversible de la coloration d'un composé organique ou inorganique. La réversibilité de la réaction est un critère important. La plupart des systèmes photochromiques est basée sur des réactions unimoléculaires.

### I.2. Les différentes classes de photochromes

On peut classer les différents systèmes photochromiques en quatre catégories selon le type d'équilibre mis en jeu :

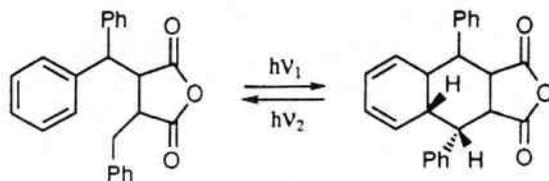
- *l'isomérisation de doubles liaisons* : stilbènes et azobenzènes [2] :



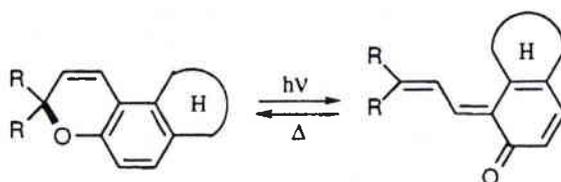
X = CH : stilbènes  
X = N : azobenzènes

- *les réactions péricycliques* : fulgides [3], chromènes [4], spiropyranes [5] et spirooxazines [6] :

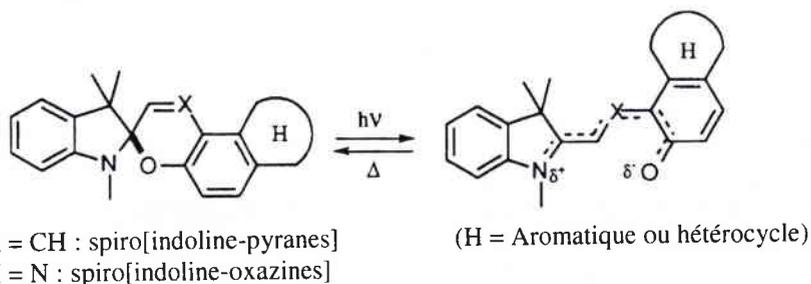
Fulgides :



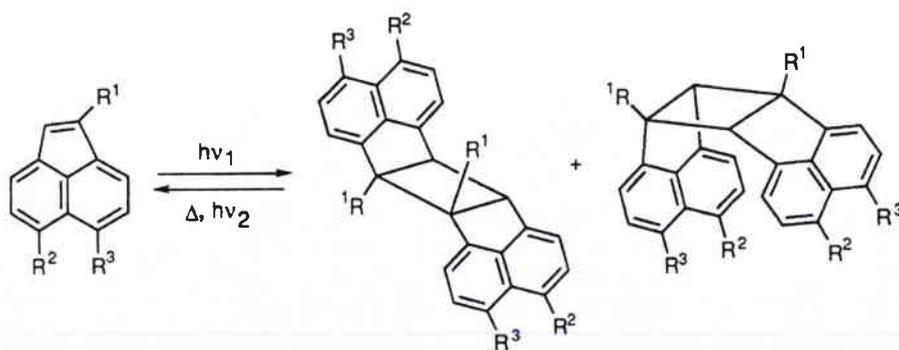
Chromènes :



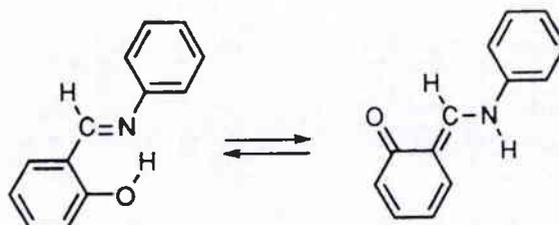
Composés spiraniques :



- les réactions de cycloaddition 2+2 ou 4+4 : acénaphthylènes [7] :



- les processus de protomérisation : anils [8] :



Parmi ces différents systèmes photochromiques, les réactions péricycliques produisent les photochromes les plus intéressants sur le plan des applications industrielles. C'est pourquoi, dans un but uniquement commercial, les spiropyranes ont été la cible de nombreuses recherches fondamentales. Ils sont restés longtemps les photochromes les plus étudiés au monde [9]. Cependant, les spirooxazines qui ont des propriétés voisines [6], les ont supplantés ces quinze dernières années, grâce notamment à une meilleure résistance à la photodégradation. La série des chromènes, découverte par Becker et Michl [4], a connu un développement plus récent, et possède également des propriétés photochromiques remarquables.

Ces différentes familles de composés photochromiques obéissent au même type de mécanisme de fonctionnement, impliquant l'ouverture des cycles pyranes ou oxazines, lorsque ces derniers sont soumis à une irradiation ultraviolette. L'ouverture de ces molécules est commandée par l'absorption d'un certain quantum d'énergie qui provoque, la rupture de la liaison carbone-oxygène, puis une délocalisation des électrons  $\pi$  sur l'ensemble de la molécule. Il y a alors production de photomérocyanine(s), forme(s) ouverte(s) colorée(s), caractérisée(s) par une bande d'absorption dans le visible. Le retour à la forme initiale (forme fermée) se fait spontanément lorsque l'irradiation est arrêtée, ou lorsque le composé est entreposé dans une chambre noire. La fermeture du cycle (décoloration) est essentiellement sous contrôle thermique, mais elle peut également être induite photochimiquement (vide infra).

La rupture de la liaison carbone-oxygène peut être aussi d'origine thermique. Le phénomène de coloration observé par chauffage est alors appelé thermochromisme [10]. Il a été observé pour les spiropyranes et les spirooxazines, mais rarement pour les chromènes [11].

Des méthodes expérimentales [12-21] telles que : la spectroscopie UV, IR, fluorescence, phosphorescence, la diffraction RX, la RMN  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$ , et des calculs théoriques [19,22,23], sont nécessaires pour quantifier et prévoir les propriétés photochromiques de ces molécules.

### ***1.3. Les paramètres photochromiques***

D'un point de vue macroscopique, le comportement photochromique de ces molécules peut être caractérisé par des paramètres déterminés dans des conditions opératoires standard (en solution) :

### ✓ La colorabilité ( $A_0$ )

La notion de colorabilité, qui traduit l'aptitude d'un photochrome à se colorer sous irradiation lumineuse, est définie par l'expression suivante, valable uniquement pour les faibles concentrations ( $\approx 10^{-5}$  M) :

$$A_0(\lambda) = \epsilon_{FC} \cdot \phi_{col} \cdot k \cdot C_{FI}$$

avec :  $A_0$  = grandeur expérimentale accessible, c'est l'absorbance maximale enregistrée après photolyse à éclairs ;

$\lambda_{max}$  = longueur d'onde d'absorption maximale de la forme colorée ;

$\epsilon_{FC}$  = absorptivité molaire de la forme colorée ;

$\phi_{col}$  = rendement quantique de coloration ;

$k$  = constante dépendant des conditions expérimentales ;

$C_{FI}$  = concentration initiale en photochrome (forme incolore).

L'absorbance mesurée pour les différents photochromes est fonction du rendement quantique de photocoloration ( $\phi_{col}$ ), ainsi que du coefficient d'absorption molaire de la forme colorée obtenue ( $\epsilon_{FC}$ ).

### ✓ La constante cinétique de décoloration ( $k_{\Delta}$ )

La décoloration des photochromes spiraniques s'effectue majoritairement par voie thermique. Une irradiation visible peut éventuellement jouer un rôle dans la réaction de décoloration, mais elle est généralement négligée. La constante cinétique de décoloration thermique  $k_{\Delta}$  (exprimée en  $s^{-1}$ ) est du premier ordre en général. Elle dépend de la température et du milieu d'étude environnant (matrice organique, polarité et viscosité du solvant). Elle caractérise le retour à la forme fermée initiale du composé photochromique.

### ✓ Les longueurs d'onde d'absorption des formes colorées ( $\lambda_{max}$ )

La formulation de composés photochromiques doit permettre l'obtention d'une couleur précise. Cette couleur peut être modulée par la variation de la structure des photochromes, induisant des différences au niveau de la distribution électronique des photomérocyanines.

### ✓ La photodégradation ( $t[A_0/2]$ )

C'est le facteur limitant au niveau des applications des composés photochromiques, l'objectif dans ce domaine étant le développement de photochromes résistant à un grand nombre de cycles de coloration-

décoloration. La photodégradation est évaluée en général par le nombre de cycles ou par le temps d'irradiation continue nécessaire pour diminuer l'absorbance initiale de moitié. Ce phénomène a suscité un nombre important d'études, non seulement sur le plan quantitatif, mais également sur la détermination de la nature des photoproduits résultants, ainsi que des mécanismes impliqués [24].

#### ***1.4. Les applications***

Les applications industrielles [25] de photochromes organiques, connaissent actuellement un net regain d'intérêts, et touchent à des domaines aussi variés que :

- ✓ La photographie non argentique et les matériaux non photocopiables [26].
- ✓ Le stockage et l'affichage d'informations optiques.
- ✓ La conception de récepteurs spécifiques aux systèmes biologiques [27].
- ✓ Les matériaux à transmission optique variable (lentilles ophtalmiques, lunettes solaires, vitrage dans le bâtiment).
- ✓ Les complexations photoinduites de cations métalliques [28].

Dans le cadre d'applications dans le domaine des matériaux à transmission optique variable (utilisation développée à grande échelle, notamment en optique ophtalmique), les composés photochromiques, incorporés à une matrice polymère, doivent répondre à un certain nombre de critères [26], en particulier :

- ♦ développer une couleur intense et neutre (gris ou brun), c'est-à-dire couvrant une large gamme du visible, pour une meilleure protection ;
- ♦ se colorer fortement ( $A_0 > 1$ ) et se décolorer rapidement ( $k_{\Delta} > 50 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) ;
- ♦ avoir une bonne résistance à la photodégradation ( $t_{A0/2} > 500 \text{ min}$ ) ;
- ♦ présenter cet ensemble de propriétés dans une large gamme de températures (de 0 °C à 50 °C).

En l'état actuel des connaissances, les industriels ont recours à l'utilisation d'un mélange de composés (les spirooxazines et les chromènes) qui présentent des absorptions complémentaires, couvrant l'ensemble du domaine du visible (voir figure II.1).

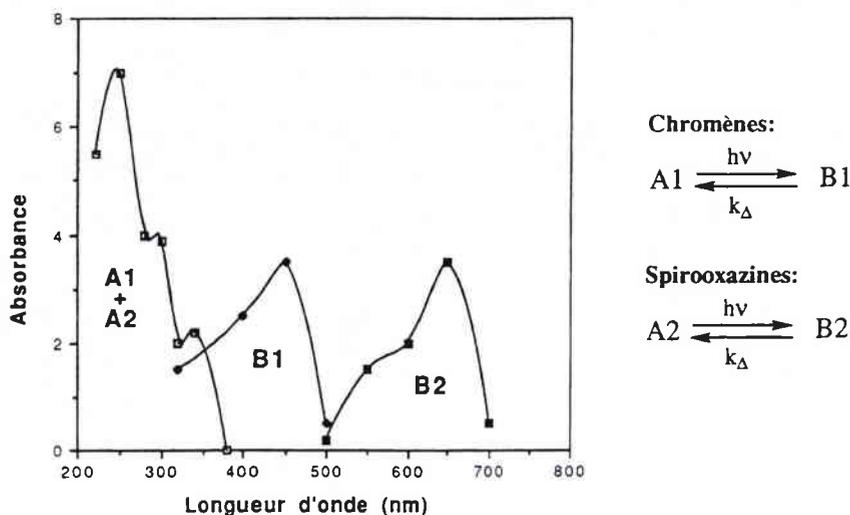


Figure II.1 : Spectres d'absorption des formes fermées et ouvertes de spirooxazines et de chromènes.

## II. Les composés spironaphtoxaziniques

### II.1. Présentation

Les spirooxazines ont été mentionnées pour la première fois par Fox [29] en 1961. Elles sont généralement constituées de deux entités hétérocycliques réunies par un atome de carbone hybridé  $sp^3$ . Le cas qui nous intéresse plus particulièrement, concerne les spiro-[indoline-naphtoxazines] (voir figure II.2), dont la partie A (spiro-indolinique), est orthogonale à la partie B (naphtoxazinique). L'absence de conjugaison entre ces deux entités, entraîne alors une absorption dans le domaine ultraviolet.

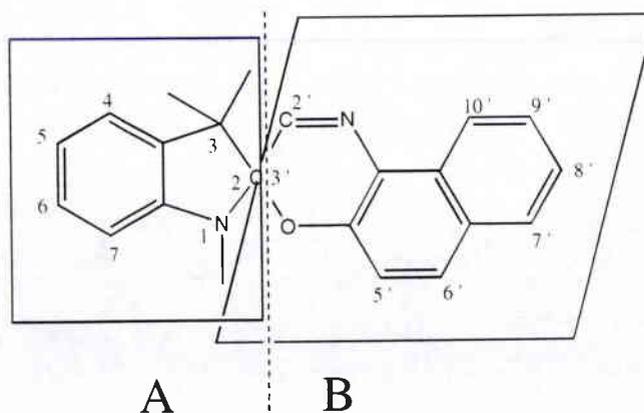
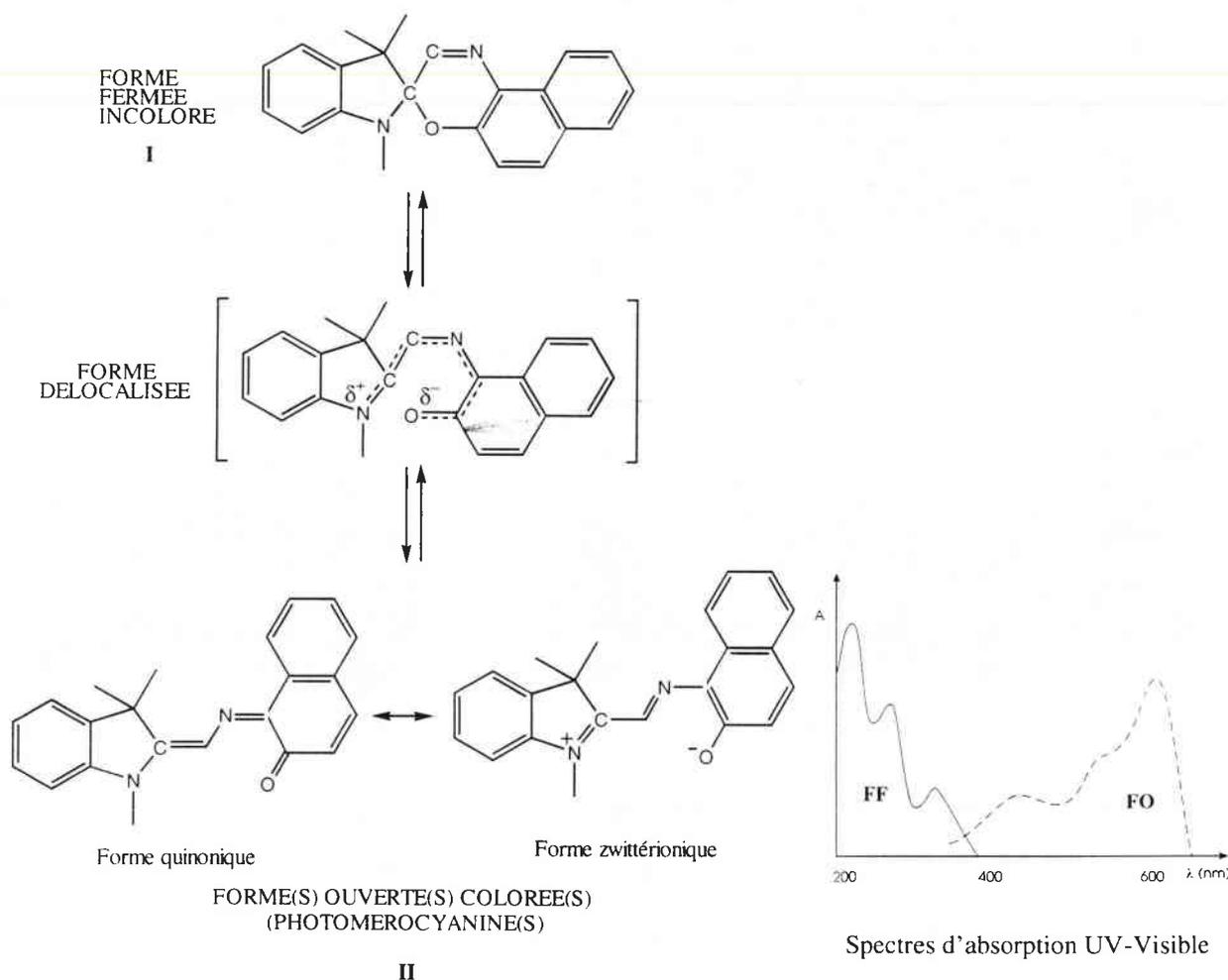


Figure II.2 : Représentation de la série spiro-[indoline-naphtoxazine].

En solution et sous irradiation ultraviolette, la forme fermée (FF) incolore (I) de la spironaphtoxazine, se trouve en équilibre avec une ou plusieurs formes ouvertes (FO) colorées (II) de plus forte conjugaison absorbant dans le visible (voir figure II.3). Cette coloration est en fait le résultat d'une isomérisation *cis-trans* ultra-rapide qui a lieu immédiatement après la rupture de la liaison C<sub>spiro</sub>-O. Comme nous le verrons par la suite, le mécanisme d'ouverture et l'isomérisation sont très complexes. La fugacité des espèces transitoires (forme délocalisée) rend difficile la compréhension globale de l'équilibre photochromique.



**Figure II.3 :** Equilibre photochromique en série spiro-[indoline-naphtoxazine].

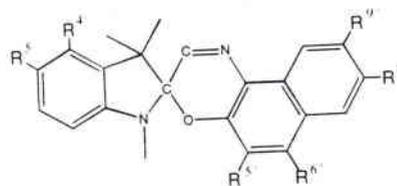
## II.2. Propriétés photochromiques

La stabilité des formes colorées, leurs caractéristiques spectroscopiques et leur résistance à la photodégradation sont représentatives des propriétés photochromiques [30,32]. Nous avons déjà exposé, dans le paragraphe I.3., les paramètres servant à les quantifier ( $k_{\Delta}$ ,  $\lambda_{\max}$  et  $A_0$ ).

L'étude de la photoactivation des formes incolores en formes colorées, implique la connaissance du spectre d'absorption des formes fermées (200-400 nm). Les bandes de faible énergie correspondent à des transitions électroniques localisées sur le cycle oxazinique. Elles sont impliquées dans la rupture de la liaison C<sub>spiro</sub>-O. Les bandes de plus grande énergie interviennent par contre fortement dans les réactions de photodégradation [33]. Le tableau II.1 présente les valeurs des longueurs d'onde d'absorption dans le domaine 280-400 nm (ainsi que le coefficient d'absorptivité molaire correspondant), de quelques spiro-[indoline-naphtoxazines] substituées.

**Tableau II.1 :** Longueurs d'onde d'absorption (280-400 nm) de quelques spironaphtoxazines (25 °C ; acétonitrile ; C = 2,5.10<sup>-5</sup> M), tiré de [34] :

	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>5'</sup>	R <sup>6'</sup>	R <sup>8'</sup>	R <sup>9'</sup>
1	H	H	H	H	H	H
2	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	H
3	H	H	H	CN	H	H
4	H	H	OH	H	H	H
5	H	H	H	H	H	OH
6	H	H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>
7	H	H	H	H	NO <sub>2</sub>	H
8	H	H	H	H	Br	H
9	NO <sub>2</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	H



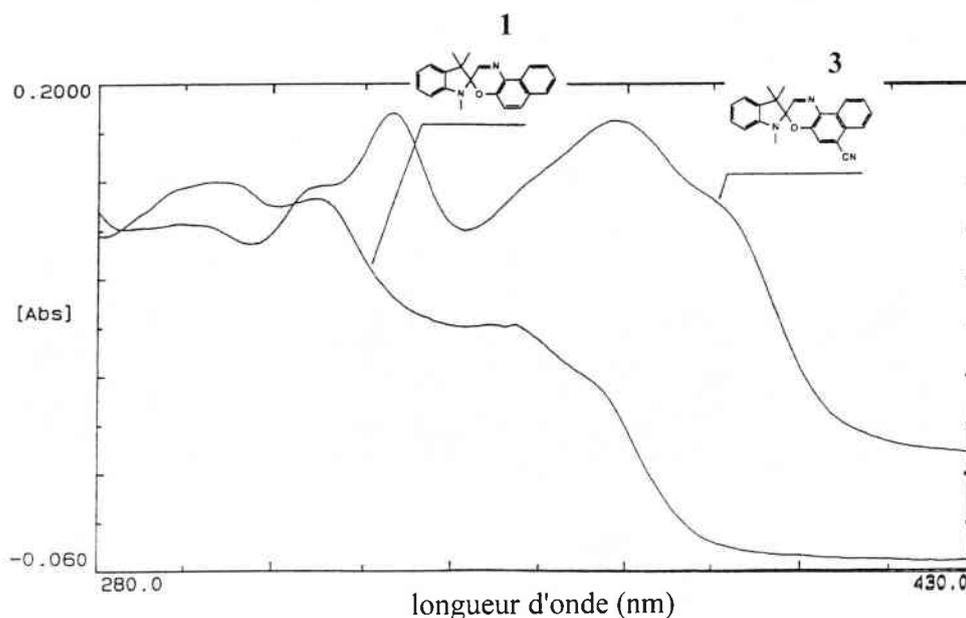
	$\lambda_{(nm)} (\epsilon)$				
1	299 (8 800)	316 (8 070)	346 (4 350)	362 (3 020)	
2	295(7 270)	(e) 298 (7 230)	326 (7 030)	352 (6 240)	(e) 365 (6 240)
3	294 (5 000)	317 (5 800)	330 (7 400)	368 (7 200)	386 (5 400)
4			336 (10 220)		
5			341 (11 640)		
6			336 (9 750)		
7	299 (12 570)	309 (12 300)		358 (5 600)	
8	292 (7 730)	(e) 301 (7 190)	317 (6 130)	353 (3 950)	369 (3 100)
9		(e) 308 (9 350)	319 (11 020)	(e) 349 (5 850)	(e) 365 (4 200)

(e) indique la présence d'un épaulement.

( $\epsilon$ ) unités : l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>.

Les valeurs exposées dans le tableau II.1 montrent la grande disparité des bandes d'absorption de faible énergie dans le domaine 280-400 nm. De manière générale, le but recherché est d'obtenir un déplacement bathochromique des bandes d'absorption afin d'optimiser le rapport photocolabilité / photodégradation, sachant que la zone d'absorption ou d'irradiation entre 200 et 330 nm est très favorable à la dégradation [33].

Par rapport à la spiro-[indoline-naphtoxazine] non substituée de référence (composé 1), on peut observer que la substitution de la partie naphtoxazinique (R'), en particulier en positions 6' et 8', se traduit par un déplacement bathochromique de la bande de plus faible énergie. La 6'-cyano-1,3,3-triméthylspiro-[indoline-naphtoxazine] (composé 3) présente le plus fort déplacement des bandes d'absorption vers le domaine du visible, accompagné d'ailleurs par une nette augmentation du coefficient d'absorptivité molaire (voir figure II.4).



**Figure II.4 :** Spectres d'absorption en solution des formes spiraniques 1 et 3.

L'introduction de substituants de part et d'autre de la molécule spirooxazinique entraîne donc des variations du spectre d'absorption électronique. On peut alors imaginer aisément, que ces variations induisent aussi un changement des propriétés photochromiques des spironaphtoxazines substituées.

### II.2.1. Influence de la substitution sur les paramètres spectrocinétiques des formes colorées

Différentes études expérimentales (en solution) ou théoriques permettent de quantifier l'évolution des propriétés photochromiques en fonction des variations structurales introduites au niveau de l'entité spirooxazinique. Parmi les études expérimentales, la photolyse à éclairs et la RMN à basse température, sont les deux techniques les plus couramment utilisées, car les plus efficaces [35,36]. L'approche théorique a démarré très tôt, avec l'avènement des méthodes quantiques [37,38]. Elle a été essentiellement consacrée à une meilleure connaissance des formes ouvertes responsables de la coloration. C'est un outil intéressant, car il n'est pas toujours commode d'étudier les formes ouvertes expérimentalement à cause de leur grande fugacité.

#### II.2.1.1. Etudes par photolyse à éclairs

L'enregistrement, après photolyse à éclairs (voir figure II.5), du spectre d'absorption de la forme ouverte (400-650 nm), ainsi que son évolution au cours du temps, donne accès à trois paramètres principaux :

- la vitesse de décoloration thermique ( $k_{\Delta}$ ), ou cinétique de fermeture du cycle oxazinique ;
- les longueur(s) d'onde maximale(s) d'absorption de la forme colorée ( $\lambda_{\max}$ ) ;
- la densité optique maximale après éclair, traduite par la notion de "colorabilité" ( $A_0$ ).

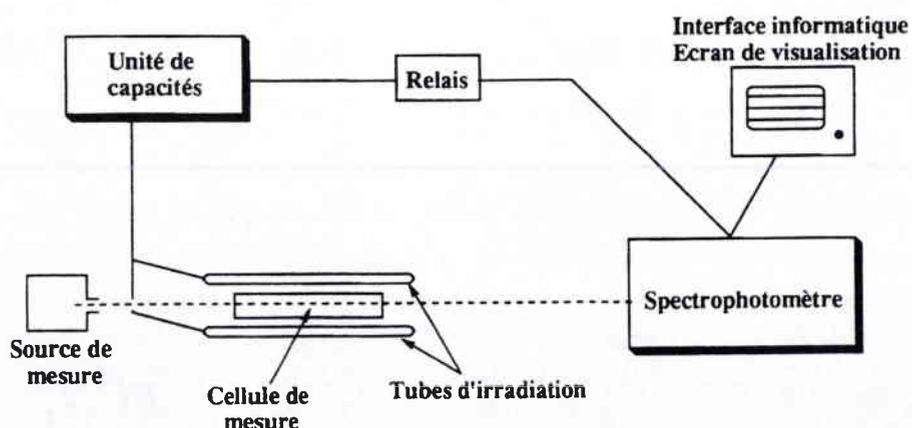
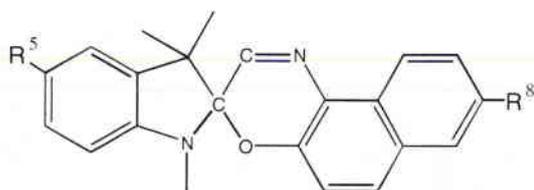


Figure II.5 : Exemple de montage utilisé lors d'une étude par photolyse à éclairs, tiré de [34].

Afin de quantifier l'influence de la substitution par des groupements électrodonneurs ou électron-attracteurs sur les paramètres spectrocinétiques des spironaphtoxazines, des composés spiraniques substitués en positions 5 et 8' ont été étudiés par photolyse à éclairs [33]. Les résultats figurent dans le tableau II.2. Il convient de souligner que ce mode d'irradiation présente pour principal avantage de simuler parfaitement nos conditions expérimentales (laser pulsé) par rapport à un mode d'irradiation en continu.

**Tableau II.2 :** Evolution des paramètres spectrocinétiques en fonction de la substitution en positions 5 et 8' du squelette spironaphtoxazinique (toluène, 25 °C, C= 2,5.10<sup>-5</sup> M), tiré de [34] :



	$K_{\Delta}$ (s <sup>-1</sup> )	$\lambda_{\max}$ (nm)	$A_0$
R <sup>5</sup> = H R <sup>8'</sup> = H	<b>0,54</b>	<b>594</b>	<b>1,08</b>
R <sup>5</sup> = NO <sub>2</sub> R <sup>8'</sup> = H	0,27	<b>555</b>	<b>6,00</b>
R <sup>5</sup> = H R <sup>8'</sup> = NO <sub>2</sub>	0,18	613	<b>9,00</b>
R <sup>5</sup> = H R <sup>8'</sup> = CN	<b>0,18</b>	602	0,91
R <sup>5</sup> = OCH <sub>3</sub> R <sup>8'</sup> = H	0,36	607	0,67
R <sup>5</sup> = H R <sup>8'</sup> = OCH <sub>3</sub>	<b>0,35</b>	595	1,07
R <sup>5</sup> = NO <sub>2</sub> R <sup>8'</sup> = CN	0,42	598	<b>7,90</b>
R <sup>5</sup> = OCH <sub>3</sub> R <sup>8'</sup> = OCH <sub>3</sub>	0,26	596	0,54
R <sup>5</sup> = OCH <sub>3</sub> R <sup>8'</sup> = CN	<b>0,18</b>	<b>617</b>	0,69

D'après les résultats exposés dans le tableau II.2, nous constatons que :

- ✓ Quelle que soit la position et la nature de la substitution sur la molécule spironaphtoxazine, les substituants induisent une diminution de la cinétique de décoloration thermique, qui se traduit donc par une certaine stabilité de la forme ouverte. Les groupements électron-accepteurs (CN) ont un effet plus marqué (0,18 s<sup>-1</sup>) que les substituants donneurs d'électrons (OCH<sub>3</sub>, 0,35 s<sup>-1</sup>).

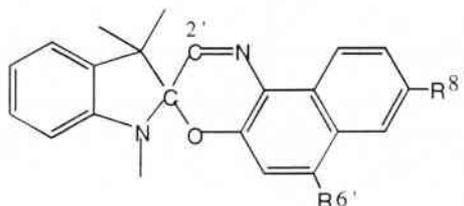
- ✓ La longueur d'onde d'absorption de la forme ouverte subit également des variations significatives. L'introduction d'un groupement  $\text{NO}_2$  sur la partie indolinique conduit à un déplacement de la bande d'absorption de - 39 nm (effet hypsochromique) par rapport au composé de référence (594 nm). Tandis que, la substitution par un groupement CN sur ce même composé nitré en position 8' (noyau naphthalénique), déplace cette fois-ci la bande d'absorption vers l'infrarouge (effet bathochromique).
- ✓ La colorabilité est principalement affectée par la substitution d'un groupement nitro, qui a pour effet d'intensifier la coloration de la forme ouverte ( $A_0 > 6$ ). Des études par photolyse laser [21] ont mis en évidence une modification du mécanisme photochimique de coloration avec intervention ici d'un état triplet, alors que pour des composés non nitrés, le passage par l'état singulet prévaut. Nous reviendrons sur ce point précis, lorsque nous aborderons le mécanisme d'ouverture de ces molécules (paragraphe II.5.)

### II.2.1.2. Etudes par RMN $^{13}\text{C}$

Expérimentalement, il a été montré que la position 6' était une position clé pour provoquer les déplacements les plus importants de la longueur d'onde d'absorption maximale de la forme colorée. Des groupements donneurs sur cette position provoquent un fort effet hypsochromique, alors que des groupements accepteurs provoquent un déplacement de la bande d'absorption de + 50 nm par rapport à la molécule non substituée [34]. Les effets électroniques des substituants dans cette position influent donc plus directement sur la délocalisation électronique de la forme ouverte, que celles étudiées précédemment.

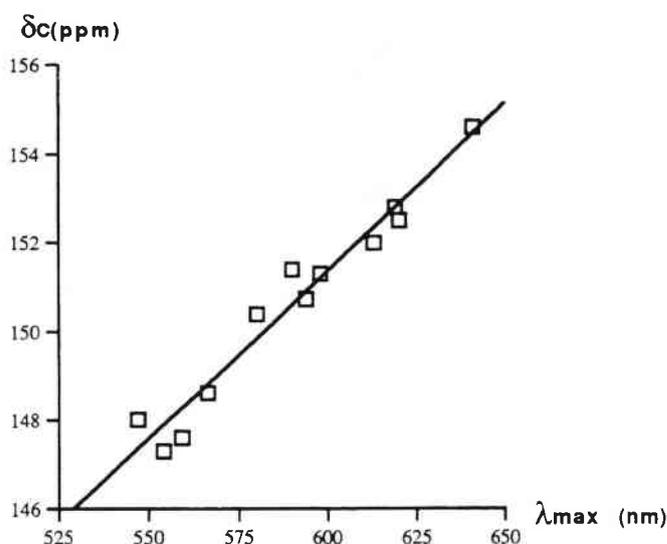
Il a été démontré qu'il est possible d'établir une corrélation entre la structure et la longueur d'onde d'absorption de la forme colorée [34]. L'analyse détaillée par spectroscopie RMN  $^{13}\text{C}$  montre que le déplacement chimique du carbone C-2' varie de manière significative en fonction de la substitution sur le noyau naphthalénique. On peut ainsi prévoir, comme le montre la figure II.6, la longueur d'absorption de la forme ouverte en fonction du déplacement chimique du carbone 2'. Le tableau II.3 rassemble les valeurs du déplacement chimique de l'atome de carbone 2', obtenus par RMN  $^{13}\text{C}$ , et les valeurs d'absorption maximale enregistrées par photolyse à éclairs, en fonction de la nature et de la position des substituants sur la spironaphtoxazine de base.

**Tableau II.3 :** Déplacements chimiques de C-2' de quelques spironaphtoxazines monosubstituées sur le cycle naphthalénique, et longueurs d'onde d'absorption maximale correspondantes, tiré de [34] :



R <sup>6'</sup>	R <sup>8'</sup>	$\delta_{2'C}$ (ppm)	$\lambda_{max}$ (nm)
OCH <sub>3</sub>	/	<b>147,3</b>	<b>554</b>
Morpholinyne	/	148,6	566
/	OCH <sub>3</sub>	150,4	580
/	/	<b>150,7</b>	<b>594</b>
/	Br	151,3	598
/	NO <sub>2</sub>	152	613
Isopropylthio	/	152,5	615
Pyrolyle	/	152,8	615
CN	/	<b>154,6</b>	<b>641</b>

Le graphique correspondant (voir figure II.6), indique un très bon coefficient de corrélation (0,99), et met en évidence qu'il est possible de prévoir la longueur d'absorption d'une forme ouverte à partir d'une analyse RMN effectuée sur une forme fermée. Ces résultats corroborent l'observation qui a été faite précédemment : la position 6' induit, selon la nature du substituant, un déplacement hypso ou bathochromique de  $\lambda_{max}$  par rapport à la spironaphtoxazine de base non substituée. Le déplacement du C-2' peut être alors relié à la distribution électronique du cycle naphtoxazinique.



**Figure II.6 :** Longueur d'onde d'absorption maximale en fonction du déplacement chimique du 2'C, tiré de [34].

Il paraît toutefois difficile de mesurer l'effet de la substitution sur la colorabilité des photochromes, car celle-ci est multifactorielle. Elle dépend en effet du rendement quantique de photocoloration et de l'absorptivité molaire de la forme colorée ; ces deux facteurs étant difficilement prévisibles. Les valeurs de colorabilité obtenues ne peuvent donc donner que des indications ponctuelles sur l'influence de la substitution. A titre d'exemple, une substitution en position 6' par un groupe méthoxy induit une colorabilité de 3,90, alors qu'elle est de 1,08 pour le composé non substitué [34].

Les variations au niveau de la cinétique de décoloration sont beaucoup moins spectaculaires. Quelle que soit la nature du substituant introduit, la stabilisation de la forme colorée ne subit pas de fortes variations [34]. Comme nous l'avons déjà remarqué, en règle générale, l'introduction d'un substituant diminue légèrement la cinétique de la décoloration. Cependant, il a été démontré que ce paramètre subissait de plus fortes variations par interactions de type stérique plutôt qu'électronique. Les spiro[azapolycycloalcane-oxazines], dont l'un de ces représentants figure dans le tableau II.5 (p. 72) ; possèdent des valeurs relativement élevées ( $k_{\Delta} = 13,8$ ) par rapport à la spirooxazine de base ( $k_{\Delta} = 0,54$ ) [33].

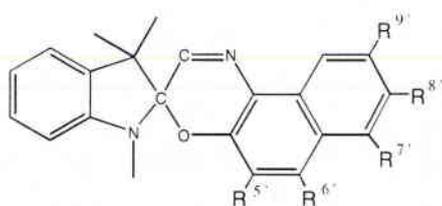
### II.2.1.3. Etudes théoriques par les calculs quantiques

Grâce à l'avènement des méthodes quantiques, il est désormais possible de prévoir, sous certaines conditions, les variations d'absorption engendrées par les substitutions sur des positions clés de la partie naphthoxazine. La méthode Pariser-Parr-Pople [39-41] (PPP) est particulièrement bien adaptée pour examiner les systèmes  $\pi$  délocalisés, et calculer leurs spectres d'absorption électronique. Cette méthode est une extension de la méthode des Orbitales Moléculaires de Hückel [42] (HMO) qui tient compte uniquement des orbitales moléculaires  $\pi$ . Un premier calcul HMO donne un premier jeu d'orbitales moléculaires. Les termes de répulsion électronique sont introduits entre les électrons  $\pi$ , et les orbitales sont calculées à nouveau ; les itérations sont poursuivies jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'amélioration sensible. C'est à partir de ce dernier jeu d'orbitales moléculaires que l'interaction de configuration permet de calculer les spectres d'absorption théoriques.

Les valeurs des longueurs d'onde d'absorption prédites d'après la méthode PPP (voir tableau II.4), et après optimisation de la paramétrisation, sont relativement proches de celles mesurées par photolyse à éclairs. Nous nous apercevons une nouvelle fois, que la position 6' occupe une place stratégique permettant d'obtenir un plus large panel de longueurs d'onde d'absorption maximale (de 561 à 615 nm). La limitation de la méthode PPP vient de ce qu'elle ne peut

traiter que des systèmes  $\pi$  plans et des substituants apportant des doublets libres au système conjugué, ce qui limite sérieusement le choix des substituants. Cependant, il existe d'autres méthodes quantiques permettant de pallier à cette limitation. Il s'agit en particulier des méthodes MNDO<sup>1</sup> [43] et AM1<sup>2</sup> [44]. Le lecteur s'il le désire, pourra trouver de plus amples explications sur le mode de fonctionnement de ces algorithmes, ainsi que des exemples d'applications dans la thèse de Garros [45].

**Tableau II.4 :** Comparaison des longueurs d'onde d'absorption expérimentales (toluène, 25 °C) et calculées (PPP) de spironaphthoxazines substituées, tiré de [45] :



R <sup>5'</sup>	R <sup>6'</sup>	R <sup>7'</sup>	R <sup>8'</sup>	R <sup>9'</sup>	$\lambda_{\text{exp}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{calc.}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{calc. opti.}}(\text{nm})$
H	H	H	H	H	<b>594</b>	507	<b>577</b>
OH	H	H	H	H	590	507	579
H	OCH <sub>3</sub>	H	H	H	<b>554</b>	492	<b>561</b>
H	CN	H	H	H	<b>641</b>	546	<b>615</b>
H	H	H	OCH <sub>3</sub>	H	595	512	583
H	H	H	Br	H	598	508	579
H	H	H	CN	H	602	520	587
H	H	H	NO <sub>2</sub>	H	613	520	587
H	H	H	H	OCH <sub>3</sub>	580	501	570

Optimisation de la paramétrisation de la méthode PPP ( $\lambda_{\text{calc. opti.}}$ ) : Le potentiel d'ionisation des électrons de valence de l'atome azote du pont azométhine passe de 15 à 18 eV. L'affinité électronique de l'azote augmente de 0,97 eV à 3,5 eV, par contre l'énergie de résonance de la liaison (C=N) est inchangée et la longueur de la liaison C=N à peine augmentée (1,38 au lieu de 1,33).

Il convient de rappeler, que les calculs théoriques sont effectués à partir d'une hypothèse concernant la géométrie de départ de la forme ouverte. Comme nous le verrons par la suite, il existe deux formes limites de la configuration électronique de la forme ouverte (quinonique et/ou zwitterionique), dont chacune possède de multiples configurations *cis/trans*. Ici, l'équipe du Pr. Guglielmetti a privilégié la forme quinonique de configuration TTC, qui d'après les calculs *ab initio* (voir paragraphe II.4) serait l'isomère le plus stable.

<sup>1</sup> MNDO : Modified Neglect of Diatomic Overlap

<sup>2</sup> AM1 : Austin Model 1

### II.2.2. Etude de la photodégradation

La mesure de la résistance s'effectue principalement dans le mode cyclique [24,46] (voir figure II.7).

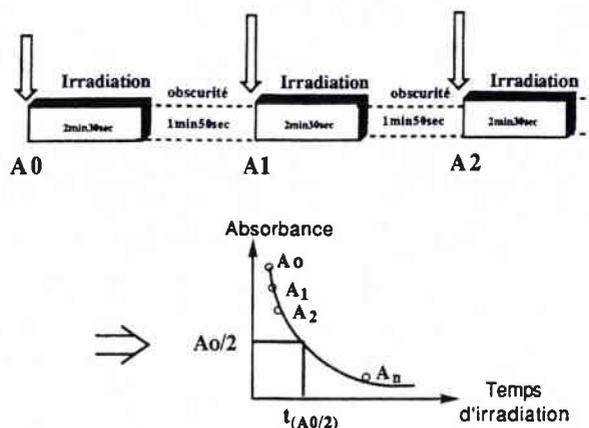


Figure II.7 : Mesure de la photodégradation en mode cyclique.

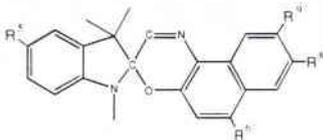
Le photochrome est alors soumis à des cycles lumière/obscurité, et l'on détermine le temps au bout duquel la colorabilité est diminuée de moitié ( $t_{A0/2}$ ). La résistance à la photodégradation est un critère important en vue d'applications du type transmission optique variable. La série des spiro-[indoline-naphtoxazines] présente en règle générale, une bonne résistance à la photodégradation, contrairement aux spiropyranes. Les temps de demi-vie obtenus au niveau de différentes séries de photochromes sont indiqués dans le tableau II.5.

Tableau II.5 : Comparaison de la résistance à la photodégradation de différentes familles de composés photochromiques, tiré de [34] :

Composé	$t_{(A0/2)}$ (min.)	Composé	$t_{(A0/2)}$ (min.)
 8-Méthoxy-6-nitro-BIPS	7	 2,2-diphényl-[2H]-chromène	456
 spiro[indoline-naphtoxazine]	515	 spiro[azapolycycloalcane-naphtoxazine]	80
 spiro[indoline-pyridobenzoxazine]	725		

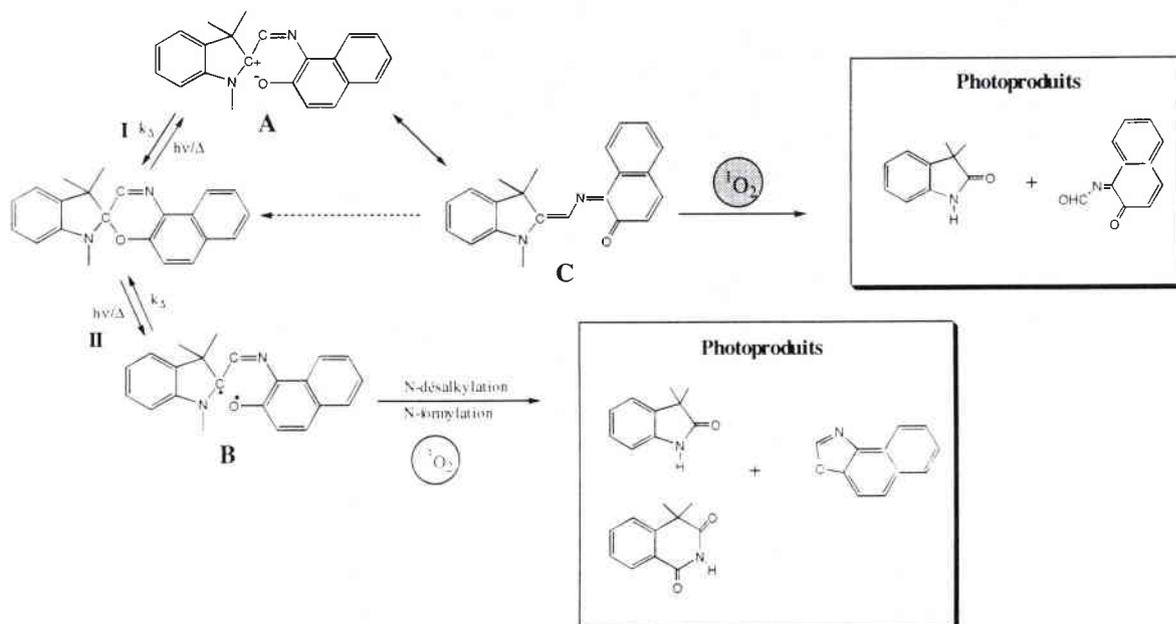
La substitution du squelette naphtoxazinique induit, comme le montrent les valeurs exposées dans le tableau II.6, de fortes variations en matière de photodégradation. De manière étonnante, le composé 8'-nitrospiro-[indoline-naphtoxazine] possède une résistance accrue vis-à-vis de la photodégradation, comparé à son homologue 5-nitrospiro-[indoline-naphtoxazine]. De même, le composé 6'-méthoxyspiro-[indoline-naphtoxazine], qui on le rappelle induit un déplacement hypsochromique de la longueur d'onde d'absorption de la forme ouverte, présente un temps de durée de demi-vie double, comparé au composé de référence. Cependant, son homologue qui induit un déplacement bathochromique de  $\lambda_{\max}$ , le composé 6'-cyanospiro-[indoline-naphtoxazine], donne un résultat plutôt décevant ( $t_{A0/2} = 282$ ). Il est donc difficile de prévoir réellement l'influence de la substitution sur le comportement à la photodégradation de la spironaphtoxazine.

**Tableau II.6 :** Comparaison de quelques valeurs de temps de demi-vie (en minute) en série spiro-[indoline-naphtoxazine], tiré de [34].



	Non substituée	R <sup>5</sup> : OCH <sub>3</sub> R <sup>9</sup> : OCH <sub>3</sub>	R <sup>6</sup> : OCH <sub>3</sub>	R <sup>8</sup> : NO <sub>2</sub>	R <sup>6</sup> : CN	R <sup>5</sup> : NO <sub>2</sub>
$t_{A0/2}$	515	337	1055	200	282	58

Selon le processus d'ouverture engagé dans la rupture de la liaison C<sub>spiro</sub>-O (hétérolytique, I, ou homolytique, II), le mécanisme de photodégradation peut être schématisé de la façon suivante (voir figure II.8) :



**Figure II.8 :** Mécanismes de photodégradation, d'après [24].

### II.3. Synthèses

Les composés avec lesquels nous avons travaillé, sont principalement des spironaphtoxazines diversement substituées, qu'il est possible de synthétiser par ces différentes voies (figure II.9) :

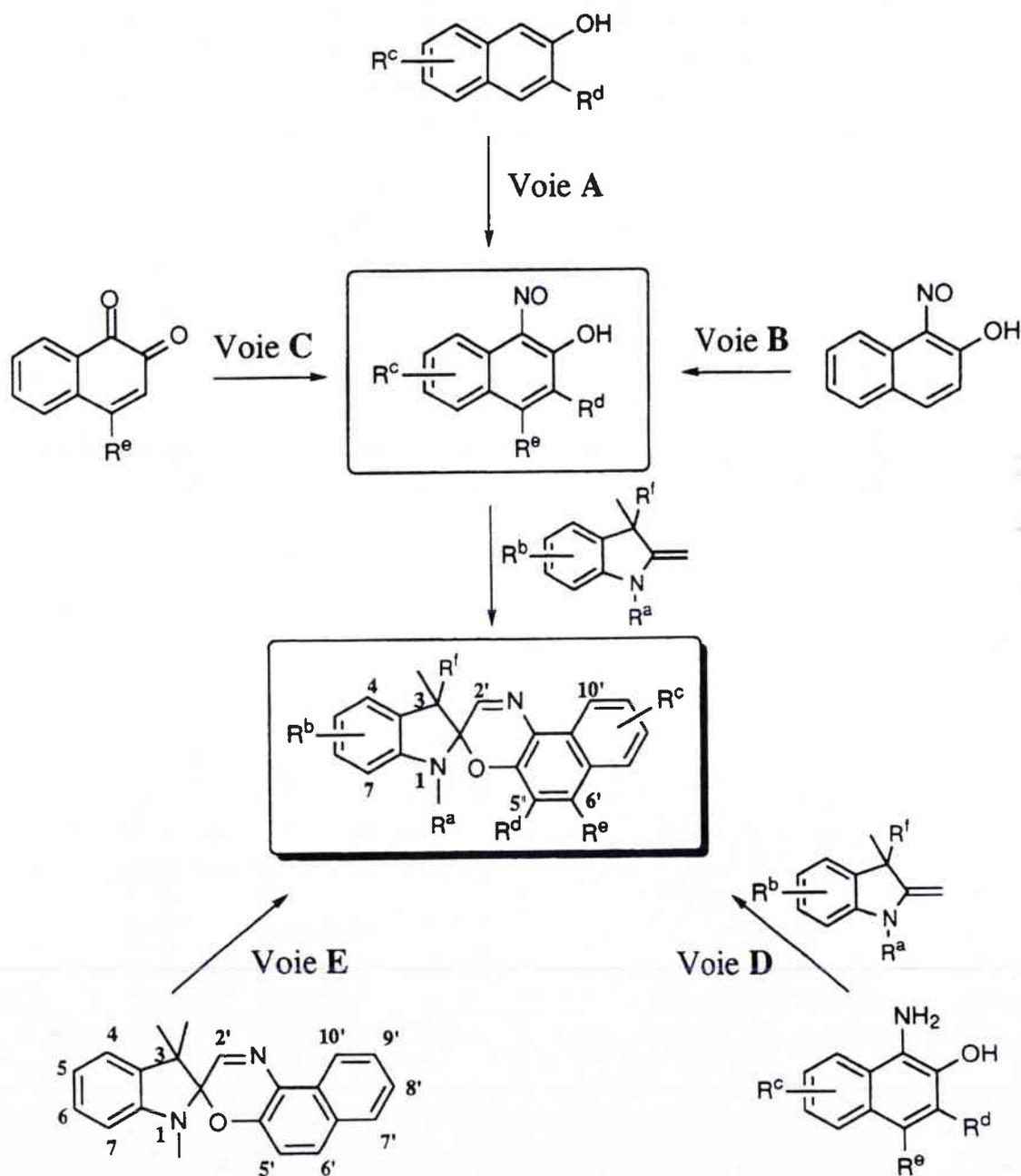


Figure II.9 : Différentes voies d'accès aux spiro-[indoline-naphtoxazines] substituées, tiré de [34].

**Voie A :**

C'est la méthode de synthèse la plus classique ; elle consiste en l'obtention préalable de naphthols qui, après nitrosation, seront condensés avec des 2-méthylèneindolines diversement substituées.

**Voie B :**

Plus originale, cette voie de synthèse permet la substitution directe de 1-nitroso-2-naphthols, et l'obtention de spironaphtoxazines substituées en position 6'.

**Voie C :**

Cette synthèse permet l'obtention de 1-nitroso-2-naphthols substitués en position 4 à partir de 1,2-naphthoquinones. Ces synthons seront ensuite condensés sur une base méthylénique selon une approche identique à la voie A.

**Voie D :**

C'est une nouvelle méthode de synthèse, qui a été développée par les équipes du Pr. Guglielmetti et celle du Pr. Minkin [47]. Elle permet un accès aisé à de nouvelles spirooxazines. Le synthon principal mis en jeu est le 1-amino-2-naphthol, qui réagit avec la 2-méthylèneindoline en présence d'oxydant (par exemple le DMSO) pour donner le motif spironaphtoxazinique.

**Voie E :**

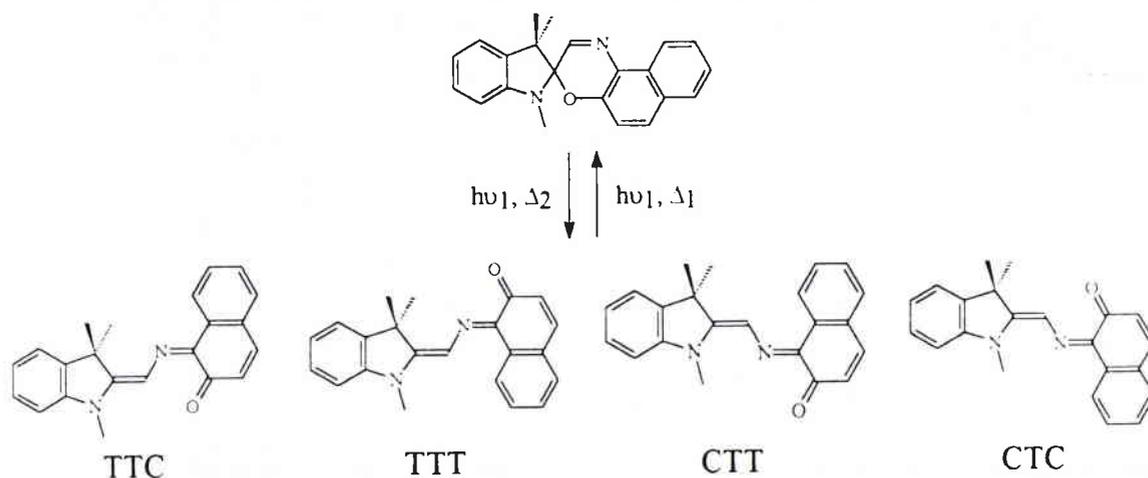
Il ne s'agit pas d'une méthode de synthèse à partir de précurseurs substitués, mais une substitution directe sur le squelette spirooxazinique préalablement synthétisé. Elle est particulièrement conseillée pour l'obtention de composés spiraniques nitrés, surtout en position 8'.

Ces différentes voies de synthèses sont complémentaires, elles permettent d'obtenir un panel de composés spirooxaziniques diversement substitués, qui, comme nous venons de le voir, induisent des comportements photochromiques différents. Toutes ces voies (A à D) présentent un précurseur commun, à savoir les 2-méthylène-indolines substitués. La thèse de Laréginie [34] explique de façon plus détaillée ces différentes voies d'accès, ainsi que les protocoles opératoires suivis.

## II.4. Représentation de la forme ouverte

### II.4.1. Détermination de sa géométrie

La formation d'une "forme ouverte" par rupture de la liaison C-O, induit l'apparition de plusieurs types de géométries. La figure II.10 regroupe les différentes possibilités de configurations transoïdes d'une photomérocyanine en série spironaphtoxazine.



**Figure II.10 :** Equilibre entre la forme fermée de la spiro-[indoline-naphtoxazine] et les formes ouvertes prédominantes (s-trans).

La RMN est une technique de choix pour appréhender la géométrie des formes ouvertes. Cherkashin *et al.* [13] ont décrit pour la première fois des spectres RMN  $^1\text{H}$  de formes colorées photoinduites en série spiro-[indoline-oxazine]. A partir de spectres avec et sans irradiation, obtenus à  $-72\text{ }^\circ\text{C}$  dans le toluène ou l'acétone deutérés, ces auteurs concluent à la prédominance de la configuration TTC parmi tous les isomères possibles. Récemment, Nakamura *et al.* [48] ont confirmé la stabilité de la forme TTC par RMN NOE  $^1\text{H}$  à  $-78\text{ }^\circ\text{C}$ .

Les calculs quantiques, *ab initio* [19,48] indiquent également que cette forme *trans* serait la plus stable, tandis que les calculs semi-empiriques [23,49] pencheraient davantage pour une conformation de type CTC. Mais de toute façon, les écarts entre les différentes conformations *trans* sont relativement faibles comme le montre le tableau II.7.

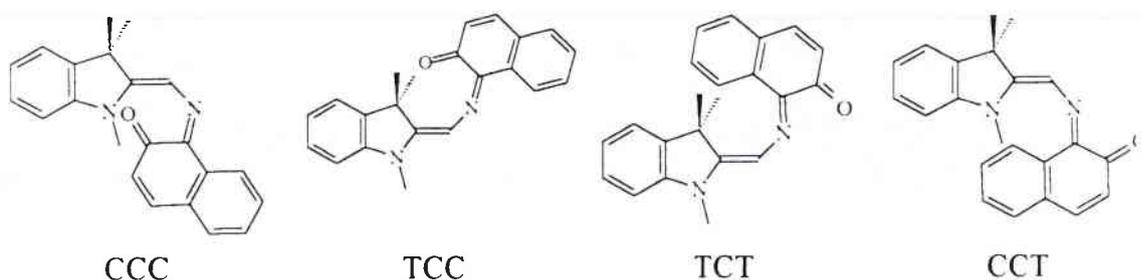
Plus récemment, une analyse en cristallographie [50] sur une forme ouverte permanente a permis de confirmer, dans ce cas particulier, la configuration TTC de la forme ouverte.

**Tableau II.7 :** Exemples d'énergies calculées (calculs semi-empiriques) pour les formes ouvertes prédominantes de la spiro-[indoline-naphtoxazine], tiré de [45] :

TTC	CTC	TTT	CTT
58,8	57,4	60,6	59,6

Energies données en kcal.mol<sup>-1</sup>

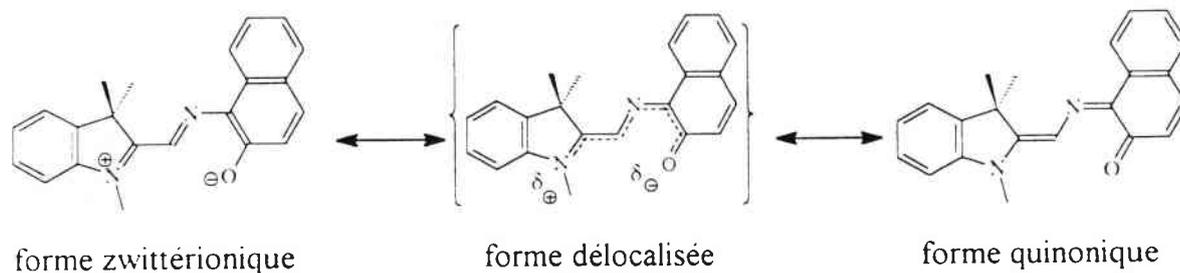
Les formes cisoides sont contraintes [49] géométriquement, donc trop énergétiques pour être prises en considération, ce qui est facilement vérifiable au regard de la figure II.11.



**Figure II.11 :** Les formes ouvertes s-cis de la spiro-[indoline-naphtoxazine].

#### II.4.2. Détermination de la répartition électronique

Pour les formes ouvertes des spirooxazines, on peut considérer deux géométries qui correspondent aux formes limites de résonance. En fonction de la distribution électronique  $\pi$ , une représentation des formes limites, zwitterionique ou quinonique est indiquée ci-après :

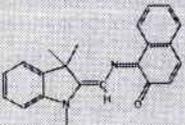
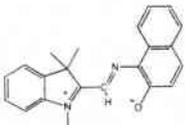


**Figure II.12 :** Les formes mésomères de la spiro-[indoline-naphtoxazine] configuration TTC.

En série spirooxazine [34,51-54], une étude de l'influence du solvant sur la cinétique de décoloration thermique montre en général une accélération de la vitesse de décoloration thermique lorsque la polarité du solvant augmente. Cette déstabilisation de la photomérocyanine en milieu polaire est en faveur d'une représentation non chargée du système électronique (forme quinonique). Des études de solvatochromie sont également en faveur d'une représentation quinonique (solvatochromisme positif) [30,50-52]. Le déplacement bathochromique de la longueur d'onde d'absorption avec la polarité du solvant indique en effet que l'état fondamental est moins polaire que l'état excité. Il est à noter que les photomérocyanines de spiropyranes fortement polaires (groupement nitro), qui peuvent être représentées sous forme zwitterionique, engendrent un fort solvatochromisme négatif [9,31]. De plus, les longueurs de liaison évaluées par rayons X [50] sur une forme ouverte permanente spirooxazinique correspondent bien à celles d'une forme quinonique.

Cependant, des calculs théoriques par la méthode MNDO-PM3<sup>1</sup> [55], permettant notamment une meilleure représentation des termes de répulsion noyau-noyau, montrent qu'une représentation zwitterionique de la forme ouverte conduit à une valeur de  $\lambda_{\max}$  plus proche (575 nm) de celle mesurée par photolyse flash (594 nm) (tableau II.8).

**Tableau II.8 :** Effet du choix de la géométrie de la forme ouverte sur le calcul de  $\lambda_{\max}$ , tiré de [45] :

$\lambda_{\text{cal.}} \text{ (nm)} \text{ (Quinonique)}$	<b>434</b>
	
$\lambda_{\text{cal.}} \text{ (nm)} \text{ (Zwitterionique)}$	<b>575</b>
	
$\lambda_{\text{exp.}} \text{ (nm)}$	<b>594</b>

Cette différence d'interprétation entre les résultats expérimentaux et théoriques montre que l'équilibre photochromique des spironaphtoxazines fait intervenir des formes intermédiaires. Les formes quinonique et zwitterionique ne sont que deux formes limites de la délocalisation électronique de la photomérocyanine.

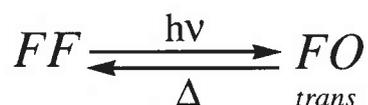
<sup>1</sup> PM3 : Nouvelle paramétrisation de la méthode MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap)

## II.5. Mécanisme d'ouverture/fermeture

Depuis les premières études en 1969 sur le photochromisme de spiropyranes par Bercovici *et al.* [56], de nombreux travaux ont eu pour objectif d'élucider le mécanisme d'ouverture photochimique de ce type de molécules. La technique la plus utilisée et la plus adaptée dans ce domaine, est la photolyse à flash laser microseconde, nanoseconde et picoseconde, permettant de caractériser des espèces transitoires [57-59]. L'approche théorique permet quant à elle, d'accéder aux propriétés intrinsèques de la molécule.

### II.5.1. Etudes expérimentales

Dans le cas de la réaction photochimique étudiée, un composé spirooxazinique, soumis à une irradiation lumineuse correspondant à une bande d'absorption de la forme fermée (FF), passe dans un état excité où il se produit une rupture de la liaison carbone-oxygène, suivie d'une isomérisation. Celle-ci conduit à un isomère ouvert (FO), qui dans sa forme la plus stable à l'état fondamental, est de configuration *trans* (voir figure II.10 ).



La forme colorée étant moins stable thermodynamiquement que la forme incolore, on assiste à un retour par simple effet thermique à l'état initial. Cette étape de fermeture nécessite une isomérisation *trans-cis* à l'état fondamental, et la formation d'une liaison entre, l'atome de carbone qui redevient spiranique, et l'atome d'oxygène. L'étude du mécanisme de l'ensemble du processus nécessite donc, d'une part l'étude du mécanisme d'ouverture photochimique (à l'état excité), et d'autre part l'étude du mécanisme de la réaction de fermeture (à l'état fondamental) (voir figure II.13).

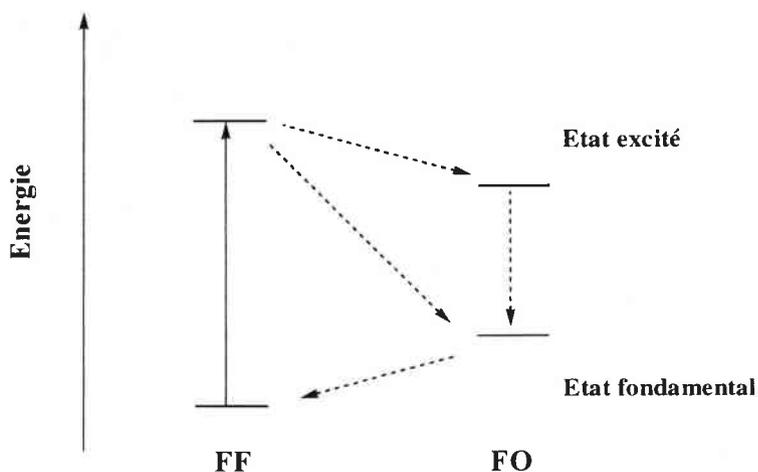
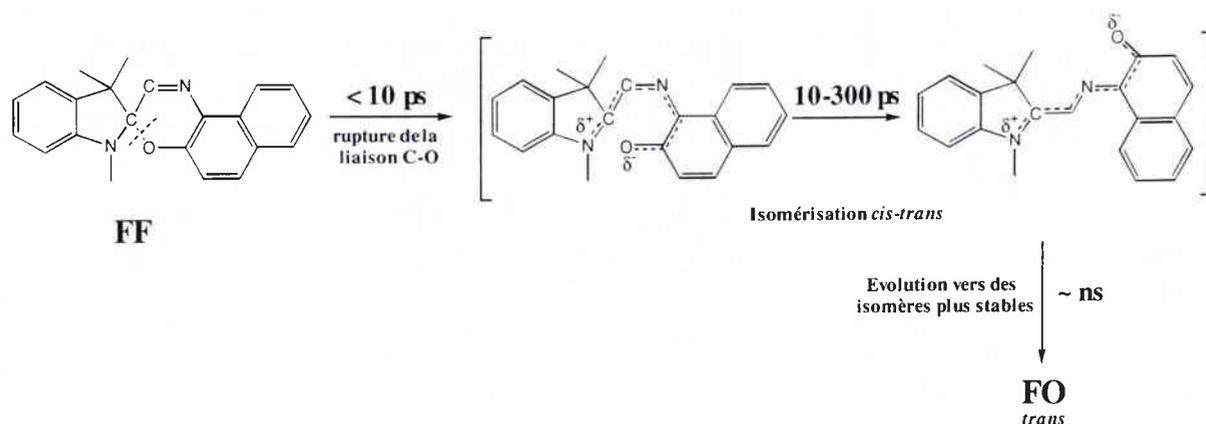


Figure II.13 : Schéma du processus global d'ouverture photochimique et de la fermeture thermique.

### II.5.1.1. Ouverture photochimique

L'ouverture des spiroyranes a fait l'objet de nombreux travaux et les conclusions qui ont pu en être retirées peuvent servir de support pour l'ensemble des composés spiraniques. L'ouverture photochimique des spironaphtoxazines peut être schématisée de la façon suivante (voir figure II.14) :



**Figure II.14** : Ouverture photochimique en série spironaphtoxazinique.

Dans la littérature, deux cas de figure sont décrits : les composés spiraniques substitués par un groupement  $\text{NO}_2$  (notamment en position 6') et les espèces non nitrées :

- Concernant les photochromes substitués par un groupement nitro [53], il a été démontré qu'un état excité triplet ( $T_1$ ) est impliqué dans le processus d'ouverture. La bande d'absorption de la forme ouverte est exaltée lorsqu'on irradie une solution de photochromes saturée en oxygène [60]. La rupture de la liaison C-O dans cet état, est très rapide, puisque des mesures expérimentales indiquent une durée d'une dizaine de picosecondes. L'isomérisation *cis-trans* qui suit, dure une centaine de picosecondes, puis évolue vers un isomère *trans* plus stable, dans un temps supérieur à plusieurs nanosecondes [61,62].
- Il a été prouvé sans ambiguïté par des expériences de photolyse laser picoseconde [62,63], que les composés spiraniques non substitués par un groupement nitro, font intervenir uniquement un état excité singulet ( $S_1$ ) et que la réaction d'isomérisation *cis-trans* est de courte durée ( $< 10$  ps). L'évolution vers une photomérocyanine plus stable, est plus rapide que celle des composés nitrés (proche de la nanoseconde, voir figure II.14) [62]. Le spectre d'absorption de la forme ouverte n'est pas affecté lorsqu'une solution de photochromes saturée en oxygène est irradiée.

### II.5.1.2. Fermeture thermique

Puisque la réaction photochimique a lieu dans un état excité (singulet ou triplet), et que le retour à l'état initial est accompagné de peu ou pas d'émission de luminescence [60], il est vraisemblable de penser que le mécanisme induisant la fermeture de la molécule s'effectue au cours d'une désactivation non radiative par un processus collisionnel et/ou vibrationnel. Généralement, les réactions thermiques ont lieu dans les états vibrationnellement excités de l'état fondamental  $S_0$ . Par ailleurs, il est à remarquer que l'on étudie généralement les formes ouvertes en travaillant à basse température (RMN à  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ ). Car à cette température, les modes de vibration de la molécule et les collisions intermoléculaires sont moins nombreux, ce qui empêche un retour rapide vers la forme fermée.

Les enthalpies d'activation de la réaction de fermeture des photomérocyanines de spirooxazines peuvent être aisément mesurées par le suivi des vitesses de décoloration thermiques de formes ouvertes produites par induction photochimiques. Chu [64] a proposé une enthalpie d'activation de fermeture de  $20\text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Mais les phénomènes mis en jeu peuvent être plus complexes car des cinétiques de décoloration (rapide et lente) ont été mises en évidence pour les spirooxazines (voir figure II.15) [34]. Si l'énergie d'activation globale de la réaction de fermeture est conditionnée par la cinétique la plus lente, l'existence de ces cinétiques lente et rapide semble montrer que plusieurs espèces colorées sont présentes en solution (et qu'elles suivent, peut être, des chemins de retour à l'état initial différents). La proportion relative entre les différents isomères de formes colorées serait la conséquence de l'établissement d'un équilibre thermique qui suit l'irradiation photochimique.

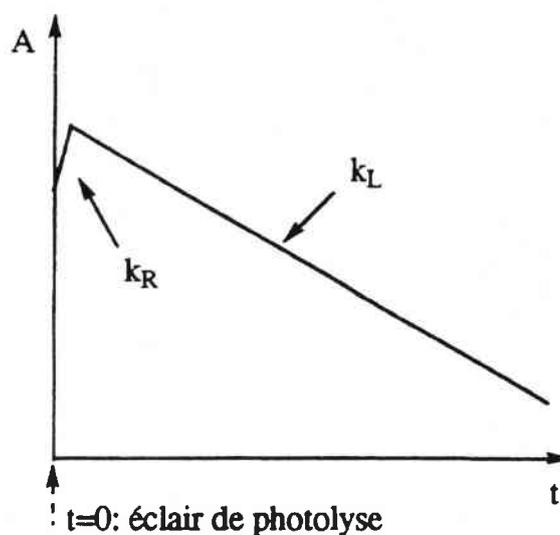


Figure II.15 : Cinétiques rapide et lente de décoloration thermique observées après photolyse flash [45].

La cinétique rapide (désignée par  $k_R$ ) apparaît juste après l'éclair d'irradiation, elle est toujours d'amplitude très faible. Elle pourrait être attribuée à l'interconversion d'isomères moins stables de formes ouvertes en isomères plus stables [34]. Cette hypothèse est confirmée par le fait que la cinétique rapide est souvent d'amplitude négative, ce qui correspond à une augmentation de l'absorbance après l'éclair. Pour exemple, la spironaphtoxazine bisubstituée en position 5 par un atome de chlore et en position 6' par un groupement CN (voir formule générale en page 62) présente une cinétique rapide d'amplitude négative de valeur  $1,0 \text{ s}^{-1}$ , et une cinétique plus lente ( $k_L = 0,32$ ) [34].

### II.5.2. Etudes théoriques [42]

Nous rappelons que les données expérimentales, obtenues par photolyse laser [17,18,20] sont en faveur de l'intervention d'un état excité au moment de l'ouverture des spirooxazines. De ce fait, l'interaction de configuration (calculée par INDO/S<sup>1</sup>) [22] choisie pour représenter la molécule à l'état excité, a été faite à partir des deux plus hautes orbitales moléculaires occupées, et des deux plus basses orbitales moléculaires vacantes. C'est par cette méthode que Garros [45] a pu représenter le bilan des réactions d'ouverture photochimique et de fermeture thermique de la spiro-[indoline-naphtoxazine] (voir figure II.16).

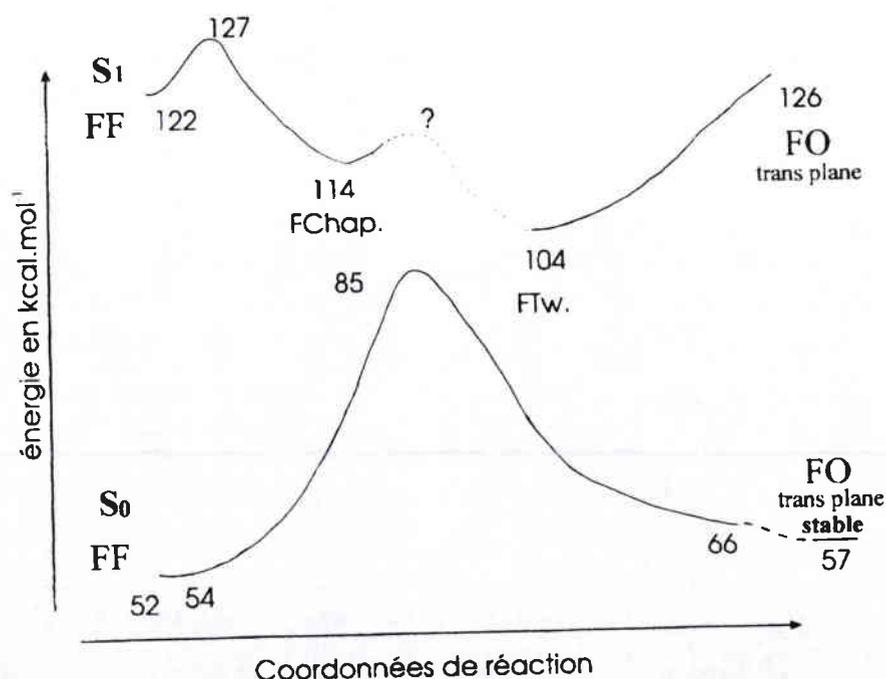
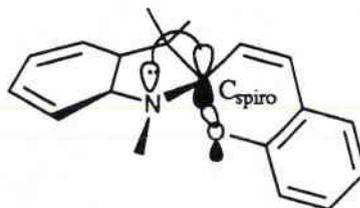


Figure II.16 : Représentation globale du processus photochromique.

<sup>1</sup> INDO/s : Intermediate Neglect of Differential Overlap / Spectroscopy [65]

Cette étude théorique montre clairement que l'ouverture de la spirooxazine (rupture de la liaison C-O) demande beaucoup moins d'énergie à l'état excité ( $5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) qu'à l'état fondamental ( $33 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Aldolshin et Atovmyan [66] suggèrent que des interactions ( $n-\sigma^*$ ) entre l'orbitale de l'atome d'azote indolinique et l'orbitale antiliante de la liaison  $C_{sp^3}-O$  (voir figure II.17) participeraient à la réaction de photocoloration, ces interactions seraient décuplées à l'état excité. Ce qui tend à montrer la participation active du doublet d'électrons de l'atome d'azote à cinq chaînons lors de la rupture de la liaison C-O.



**Figure II.17 :** Interactions orbitales pour un composé spiro-[indoline-pyrane].

A l'état excité, le chemin réactionnel du processus photochromique de la spironaphtoxazine n'a pas été totalement élucidé. Mais d'après les renseignements de la figure II.16, on constate que la rupture de la liaison C-O, provoque la formation d'un premier intermédiaire de configuration cisoïde non plan (en forme de chapeau, Fchap), qui se déploie par la suite pour donner un deuxième intermédiaire (forme Twistée) de niveau d'énergie plus faible ( $104 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Cette contorsion de la molécule dans l'espace permet le passage à la forme ouverte *trans* plane. Mais celle-ci à l'état excité n'est pas stable, elle présente une énergie considérable ( $126 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).

Le chemin réactionnel d'ouverture à l'état excité n'aboutit donc pas directement à l'isomère le plus stable, mais s'arrête au niveau du deuxième intermédiaire (FTw.), à partir duquel s'effectuerait la désactivation ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) vers l'état fondamental. Suivant le niveau énergétique en ce point de l'état fondamental et les barrières d'isomérisation existantes, l'évolution pourra se faire soit vers une (ou des) forme(s) ouverte(s) plus stable(s) ou vers la forme fermée initiale.

A l'état fondamental, les formes ouvertes *trans* planes sont bien les plus stables. La relaxation de l'énergie interne de ces molécules les conduit vers l'état de transition où la fermeture spiranique s'établit.

Il semble qu'à chaque état de transition, la répartition électronique de la molécule est fortement perturbée, possédant davantage les caractéristiques d'une forme zwitterionique [45]. L'azote indolinique prenant alors un caractère indolinium marqué.

### II.5.3. Schématisation du processus d'ouverture et de fermeture

Au regard des résultats expérimentaux et théoriques présentés précédemment, nous pouvons schématiser le processus d'ouverture et de fermeture des spironaphthoxazines de la façon suivante (voir figure II.18) :

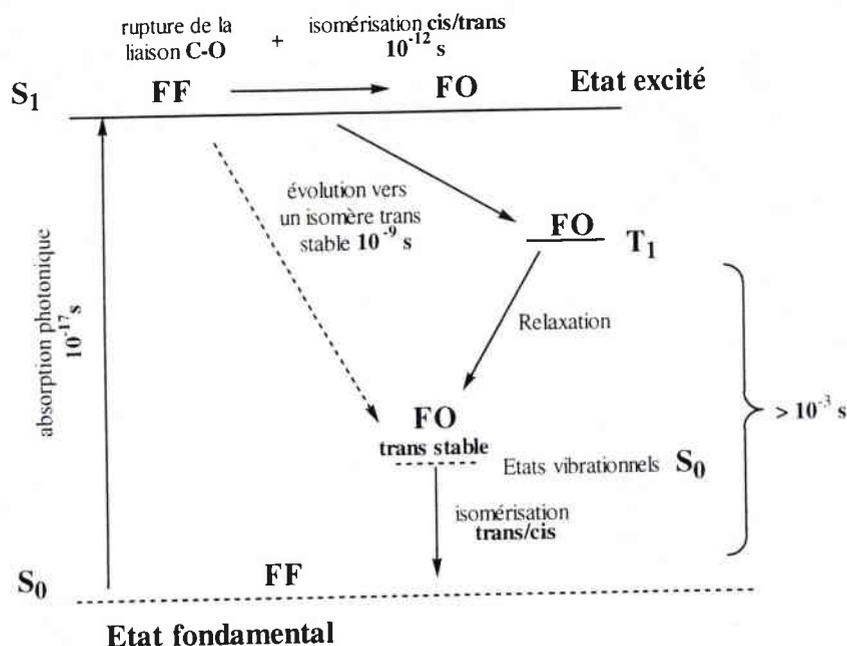


Figure II.18 : Temps d'ouverture et de fermeture du cycle oxazinique, d'après [67].

Cette schématisation succincte du mécanisme d'ouverture et de fermeture des molécules photochromiques reste à l'état d'hypothèse. Cependant, elle pourrait expliquer l'équilibre temporel qui existe entre la forme fermée de départ et la forme ouverte la plus stable. En effet, la durée de vie de l'état excité  $S_1$  ( $\tau = 10^{-9}$  s) est suffisante pour qu'une isomérisation *cis/trans* ( $\tau = 10^{-9}$ - $10^{-12}$  s) puisse avoir lieu. A partir de cet état excité  $S_1$  (le plus stable de tous les états excités singulets), la ou les photomérocyanines ont deux voies principales de relaxation pour retomber à l'état fondamental : la relaxation vibrationnelle directe  $S_1 \rightarrow S_0$  ; et la relaxation par interconversion spin-spin  $S_1 \rightarrow T_1 \rightarrow S_0$ .

Ce dernier mode de relaxation pourrait expliquer des cinétiques de fermeture de cycles assez longues. Car en effet, le passage par l'état excité  $T_1$ , dont la durée de vie varie de quelques millisecondes à plusieurs secondes, permettrait de retarder la cinétique de décoloration, contrairement à un passage directe  $S_1 \rightarrow S_0$ . Ce type de relaxation serait théoriquement possible pour des composés spiraniques substitués par un groupement nitro, dont on sait que les photomérocyanines produites passent par l'état triplet. Néanmoins, des recherches fondamentales concernant les autres types de composés photochromiques doivent être menées afin de mieux caractériser l'équilibre photochromique entre l'état fondamental et l'état excité.

### III. Conclusion

La caractérisation des formes ouvertes de composés spiraniques lors de l'équilibre photochromique, pose actuellement de sérieuses difficultés. Les méthodes quantiques ainsi que les études expérimentales sont souvent en désaccord sur le choix de la répartition géométrique de la forme ouverte : quinonique ou zwitterionique. L'identification de la photomérocyanine la plus stable lors de l'équilibre photochromique est importante car, au niveau industriel, on pourrait prévoir notamment son comportement avec une matrice polymère (additif le plus couramment utilisé) et contrôler davantage les propriétés photochromiques désirées.

Le rapide bilan des recherches menées dans ce domaine, nous a conduit aux constats suivants :

- ✓ La désorption laser couplée à la spectrométrie de masse devrait se révéler une méthode d'investigations complémentaire aux méthodes couramment utilisées (photolyse laser-spectroscopie UV/Visible, RMN) afin de connaître plus précisément la configuration électronique de la forme ouverte. En effet, en fonction de la géométrie concernée (forme quinonique et/ou zwitterionique), leur photofragmentation sous irradiance laser élevée, pourrait faire apparaître des pics fragments spécifiques, facilement identifiables grâce à la présence de chaque côté de la molécule de substituants différents.
- ✓ L'analyse directe de photochromes à l'état solide et sous une pression réduite (conditions opératoires de notre spectromètre de masse), fournira certainement des renseignements complémentaires sur l'équilibre photochromique de ces molécules, qui est habituellement étudié en solution.
- ✓ L'analyse par la technique MALDI peut être un moyen efficace pour étudier le comportement de molécules photochromiques en présence de matrice, en particulier polymère. La microsonde laser ICR/FTMS que nous avons utilisée étant parfaitement adaptée pour ce type d'étude (excellent contrôle des paramètres de l'irradiation laser).
- ✓ Enfin, les propriétés photochromiques de ces molécules, nous serviront plus spécifiquement à l'étude du mécanisme d'action de la technique MALDI. L'ouverture de ces composés étant apparemment concomitante au temps de l'ionisation supposé en MALDI.

# Bibliographie

- [1] E. Fischer et Y. Hirshberg, *J. Chem. Soc.*, **1952**, 4522.
- [2] D. Fanghänel, extrait de "*Organic Photochromes*", éd. par A.V. Eletsov, Plenum, New York, **1987**, Chap. 3.
- [3] H. Stobe, *Z. Elektrochem.*, **1908**, 14, 473.
- [4] R.S. Becker et J. Michl, *J. Am. Chem. Soc.*, **1966**, 88, 5931.
- [5] R.C. Bertelson, extrait de "*Photochromism*", éd. par G.H. Brown, J. Wiley and Sons Inc., New York, **1971**, Chap. 3.
- [6] N.Y.C. Chu, extrait de "*Photochromism, Molecules and Systems*", éd. par H. Dürr et H. Bouas-Laurent, Elsevier, Amsterdam, **1990**, Chap. 10.
- [7] G.W. Griffin et D.F. Veber, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 6417.
- [8] E. Hadjoudis, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1994**, 246, 127.
- [9] R. Guglielmetti, extrait de "*Photochromism, Molecules and Systems*", éd. par H. Dürr et H. Bouas-Laurent, Elsevier, Amsterdam, **1990**, Chap. 23.
- [10] J.H. Day, *Chem. Rev.*, **1963**, 63, 65.
- [11] A. Samat et V. Lokshin, extrait de "*Photochromism and thermochromic compounds*", éd. par R. Guglielmetti et J. Crano, Plenum Press, New York, (sous presse), Chap. 19.
- [12] V. Malatesta, P. Allegrini, C. Neri et L. Lanzini, *Magn. Reson. Chem.*, **1992**, 30, 905.
- [13] N.L. Zaichenko, A.V. Lyubinov, U.S. Marevtsev et M.I. Cherkashin, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.*, **1989**, 5, 1040.
- [14] M. Campredon, A. Samat, R. Guglielmetti et A. Alberti, *Gazz. Chim. Ital.*, **1993**, 123, 261.
- [15] R. Millini, G. Del Pietro, P. Allegrini, L. Crisci et V. Malatesta, *Acta Crystallogr. Sect. C*, **1991**, 47, 2567.
- [16] W. Clegg, N.C. Norman, T. Flood, L. Sallans, W.S. Kwak, P.L. Kwiatkowski et J.G. Lasch, *Acta Crystallogr. Sect. C*, **1991**, 17, 817.
- [17] M. Fan, Y. Ming, Y. Liang, X. Zhang, S. Jin, S. Yao et N. Lin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1994**, 1387.
- [18] N. Tamai et H. Masuhara, *Chem. Phys. Lett.*, **1992**, 191, 189.
- [19] S. Nakamura, K. Uchida, A. Murakami et M. Irie, *J. Org. Chem.*, **1993**, 58, 5543.
- [20] C. Bohne, M.G. Fan, Z.J. Li, J. Luszyk et J.C. Scaiano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1990**, 571.
- [21] A. Kellmann, F. Tfibel, A. Samat et R. Guglielmetti, *XV<sup>th</sup> IUPAC on Photochemistry*, Prague, **1994**.
- [22] H. Pommier, A. Samat, M. Rajzmann, G. Pepe et R. Guglielmetti, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1994**, 246, 241.
- [23] V. Malatesta, G. Ranglino, U. Romano et P. Allegrini, *Int. J. Quantum Chem.*, **1992**, 42, 879.
- [24] G. Baillet, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1993**.
- [25] J.C. Crano, W.S. Kwak et C.N. Welch, extrait de "*Applied Photochromic Polymer System*", éd. par C.B. Mc Ardle, Blackie, New York, **1992**, Chap.2.
- [26] R. Guglielmetti, extrait de "*Photochromism, Molecules and Systems*", éd. par H. Dürr et H. Bouas-Laurent, Elsevier, Amsterdam, **1990**, Chap. 8.
- [27] M. Inouye, K. Kim et T. Kitao, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 778.
- [28] H. Dürr, A. Thome, C. Kranz, H. Kilburg, S. Bossmann, B. Braun, K.P. Jansen et E. Blasius, *J. Phys. Org. Chem.*, **1992**, 5, 689.
- [29] R.E. Fox, *Final Report on Contact AF 41(657)-215*, Avril **1961**, AD 440226.
- [30] E. Pottier, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1990**.
- [31] A. Samat, R. Guglielmetti et G. Martin, *Org. Magn. Res.*, **1976**, 8, 62.

- [32] E. Pottier, R. Dubest, R. Guglielmetti, P. Tardieu, A. Kellmann, F. Tfibel, P. Levoir et J. Aubard, *Helv. Chim. Acta*, **1990**, 73, 303.
- [33] R. Gautron, D. Eloy, P. Escaffre, R. Guglielmetti, E. Pottier et P. Tardieu, *Bull. Soc. Chim. Belge*, **1991**, 100, 315.
- [34] P. Laréginie, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1995**.
- [35] J.J. Meyer, P. Levoir et R. Dubest, *Analyst*, **1995**, 120, 447.
- [36] G. Vermeersh, M. Campredon et al., travaux en cours.
- [37] J.L. Masse, *Comp. Rend.*, **1954**, 238, 1320.
- [38] O. Bloch-Chaudé et J.L. Masse, *Bull. Soc. Chim. France*, **1955**, 625.
- [39] J.A. Pople, *Trans. Faraday. Soc.*, **1953**, 49, 1375.
- [40] R. Pariser, *J. Chem. Phys.*, **1956**, 24, 250.
- [41] R. Pariser et R.G. Parr, *J. Chem. Phys.*, **1953**, 21, 466.
- [42] E. Hückel, *Z. Phys.*, **1931**, 70, 204.
- [43] M.J.S. Dewar et W. Thiel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 4899.
- [44] M.J.S. Dewar, E.G. Zoebisch, E.G. Healy et J.J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, 107, 3902.
- [45] G. Garros, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1997**.
- [46] P. Appriou, F. Garnier et R. Guglielmetti, *J. Photochem.*, **1978**, 8, 145.
- [47] V.I. Minkin, V.A. Paltchkov, N.E. Shelepin, N.S. Trofimova et O.A. Zoubkov, *Essilor International, Fr. Patent*, **1994**, 9400918.
- [48] S. Maeda, K. Mitsuhashi, Y.T. Osano, S. Nakamura et M. Ito, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1994**, 246, 223.
- [49] V. Malatesta, L. Longo, R. Fusco et G. Marconi, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1994**, 246, 235.
- [50] P. Laréginie, V. Lokshin, A. Samat, R. Guglielmetti et G. Pèpe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, **1996**, 107.
- [51] G. Favaro, F. Masetti, U. Mazzucato, G. Ottavi, P. Allegrini et V. Malatesta, *J. Chem. Soc. Faraday Trans 2*, **1994**, 90, 333.
- [52] P. Tardieu, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1991**.
- [53] A. Kellmann, F. Tfibel, R. Dubest, P. Levoir, J. Aubard, E. Pottier et R. Guglielmetti, *J. Photochem. Photobiol. A : Chemistry*, **1989**, 49, 63.
- [54] J.L. Pozzo, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1994**.
- [55] J.J.P. Stewart, *J. Compt. Chem.*, **1989**, 10, 221.
- [56] T. Bercovici, R. Heiligman-Rim et E. Fischer, *Mol. Photochem.*, **1969**, 1, 23.
- [57] S.A. Krysanov et M.V. Alfinov, *Chem. Phys. Lett.*, **1982**, 91, 77.
- [58] Y. Kalisky et D.J. Williams, *Chem. Phys. Lett.*, **1981**, 86, 100.
- [59] Y. Kalisky, T.E. Orlovski et D.J. Williams, *J. Phys. Chem.*, **1983**, 87, 5333.
- [60] C. Lenoble et R.S. Becker, *J. Phys. Chem.*, **1986**, 90, 62.
- [61] S. Aramaki et G.H. Atkinson, *Chem. Phys. Lett.*, **1990**, 170, 2, 3, 181.
- [62] S. Aramaki et G.H. Atkinson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 438.
- [63] N.P. Ernsting et T. Arthen-Engeland, *J. Phys. Chem.*, **1991**, 95, 5502.
- [64] N.Y.C. Chu, *Can. J. Chem.*, **1983**, 61, 300.
- [65] J.E. Ridley et M.C. Zerner, *Theor. Chim. Acta.*, **1973**, 32, 111.
- [66] S.M. Aldolshin et L.O. Atovmyan, *Izv. Akad. Nauk. SSR, Ser. Khim.*, **1985**, 9, 2009.
- [67] A. Kellmann, L. Lindqvist, F. Tfibel et R. Guglielmetti, *J. Photochem.*, **1986**, 35, 155.

# Chapitre III

## Instrumentation et Méthodologie

Le développement de l'ionisation laser en spectrométrie de masse, a pris une ampleur considérable depuis la découverte de la technique MALDI en 1988.

En particulier, la microsonde laser FTMS<sup>1</sup>, mise au point dans notre laboratoire, s'est avérée être un excellent outil analytique pour l'étude des processus physico-chimiques intervenant en MALDI.

Dans ce chapitre, nous présenterons le principe de fonctionnement d'un spectromètre FTMS, ainsi que ses principales caractéristiques.

Dans une seconde partie, nous détaillerons le mode opératoire suivi lors de l'analyse de photochromes en désorption laser avec ou sans matrice. En particulier, nous attacherons une importance à la préparation des échantillons, au contrôle des paramètres laser, et à l'optimisation de la séquence d'analyse FTMS.

---

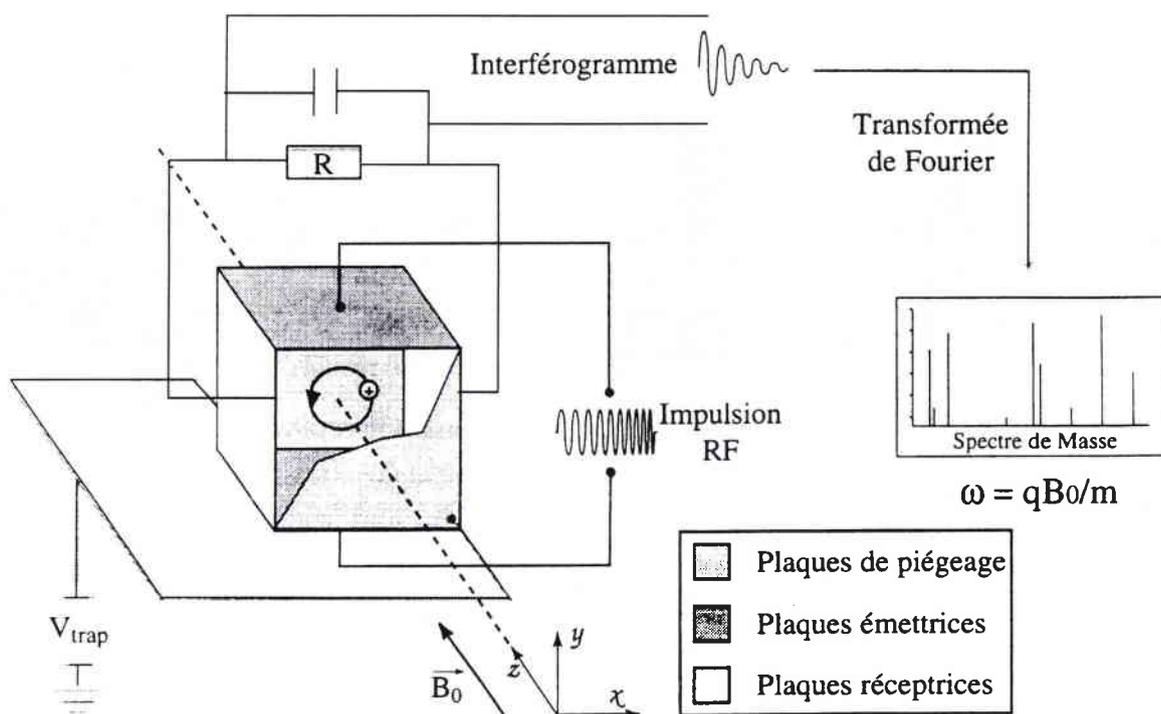
<sup>1</sup> FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometer

## I. La spectrométrie de masse à transformée de Fourier

C'est une technique d'analyse, dont le principe repose sur la détermination de la masse des ions par mesure des fréquences cyclotroniques engendrées par un champ magnétique. Ce type de spectromètre a été développé ces dernières années par Comisarow et Marshall [1,2]. Notre objectif dans cette partie, est d'exprimer en langage clair les différents phénomènes qui interviennent lors d'une analyse par FTMS, et d'exposer brièvement les caractéristiques techniques ainsi que les performances de cet instrument.

### I.1. Principes théoriques

L'organe vital de l'appareil est constitué d'une cellule cubique (voir figure III.1), placée au centre d'un champ magnétique puissant très homogène (classiquement de 3 à 14 Teslas), où règne un vide très poussé (de l'ordre de  $10^{-9}$  Torr<sup>1</sup>).



**Figure III.1 :** Schéma de principe d'un spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions et à transformée de Fourier.

<sup>1</sup> 1 Torr = 133,3 Pa = 1,33 mbar

### I.1.1. La formation des ions

L'ionisation est une étape primordiale en spectrométrie de masse. Elle détermine le nombre d'ions présents et les répartit géométriquement dans la cellule FTMS. Cette technique basée sur le piégeage des ions et non sur leur accélération, permet de coupler une source d'ionisation par laser pulsé (MALDI, LI<sup>1</sup>, LD<sup>2</sup>) [3] ou continue (EI<sup>3</sup>, CI<sup>4</sup>) [4]. Le vide poussé qui règne à l'intérieur de l'appareil, pose cependant un problème pour le couplage avec des techniques d'ionisation dites à "haute pression" (ESI). Mais ce problème a souvent été résolu en utilisant des sources d'ionisation externes avec un pompage différentiel [5]. Les ions sont donc soit formés à l'intérieur de la cellule, soit injectés depuis une source d'ionisation externe.

### I.1.2. Le piégeage des ions

Les ions générés par diverses techniques sont soumis au champ magnétique selon la direction Oz (voir figure III.1). Ils sont alors confinés dans le plan (x, y) où ils adoptent une trajectoire circulaire de fréquence (cyclotronique) proportionnelle au rapport  $m/z^5$ . Cette trajectoire résulte de l'action d'une force L (force de Lorentz), due à l'action du champ magnétique sur les ions. Elle agit perpendiculairement d'une part, à la direction du mouvement de l'ion (direction du vecteur  $v$ ), et d'autre part à la direction du champ magnétique  $B_0$  (voir figure III.2).

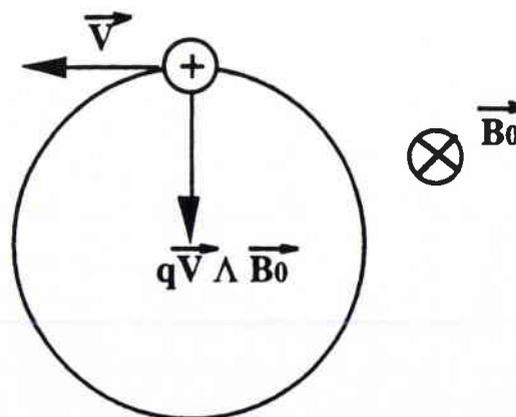


Figure III.2 : Particule chargée dans un champ magnétique.

<sup>1</sup> LI : Laser Ionization

<sup>2</sup> LD : Laser Desorption

<sup>3</sup> EI : Electron Impact

<sup>4</sup> CI : Chemical Ionization

<sup>5</sup>  $m/z$  : En spectrométrie de masse, il est d'usage de représenter le rapport masse ( $m$ ) sur charge ( $q$ ) par le rapport de deux nombres sans dimension  $m$  et  $z$  définis par  $m = m/u$  [avec  $u$  l'unité de masse atomique ( $1 \text{uma} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{kg}$ )] et  $z = q/e$  (charge de l'électron  $e = 1,6022177 \times 10^{-19} \text{C}$ )

Cette force de Lorentz a pour expression :

$$\vec{L} = q(\vec{v} \wedge \vec{B}) \quad (1)$$

$$|\vec{L}| = q \cdot v \cdot B_0$$

Avec :  $q$  = charge de l'ion (C)

$v$  = vitesse de l'ion ( $m \cdot s^{-1}$ )

$B_0$  = force du champ magnétique (T)

L'ion formé, se trouve à l'intérieur de la cellule. Sous l'effet du champ magnétique statique intense, il adopte une trajectoire circulaire qui provoque également l'apparition d'une force centrifuge  $F$  ayant pour expression :

$$\vec{F} = m\vec{\gamma} \Rightarrow |\vec{F}| = \frac{mv^2}{R} \quad (2)$$

Avec :  $m$  = masse de l'ion (kg)

$R$  = rayon de la trajectoire circulaire (m)

Le système formé par l'ion en mouvement circulaire, est en équilibre parce que la force ( $L$ ) qu'exerce le champ magnétique sur cet ion est compensée par la force centrifuge ( $F$ ) [6]. Nous avons donc l'égalité suivante :

$$|\vec{F}| = |\vec{L}|$$

d'où :

$$q \cdot v \cdot B_0 = \frac{mv^2}{R} \quad (3)$$

Ce qui nous donne la vitesse angulaire du mouvement circulaire de l'ion :

$$\omega_c = \frac{v}{R} = \frac{q \cdot B_0}{m} \quad (\text{rad} \cdot \text{s}^{-1})$$

La fréquence  $\nu_c$  du mouvement de l'ion est appelée fréquence cyclotronique naturelle ; elle a pour expression :

$$\nu_c = \frac{\omega_c}{2\pi}$$

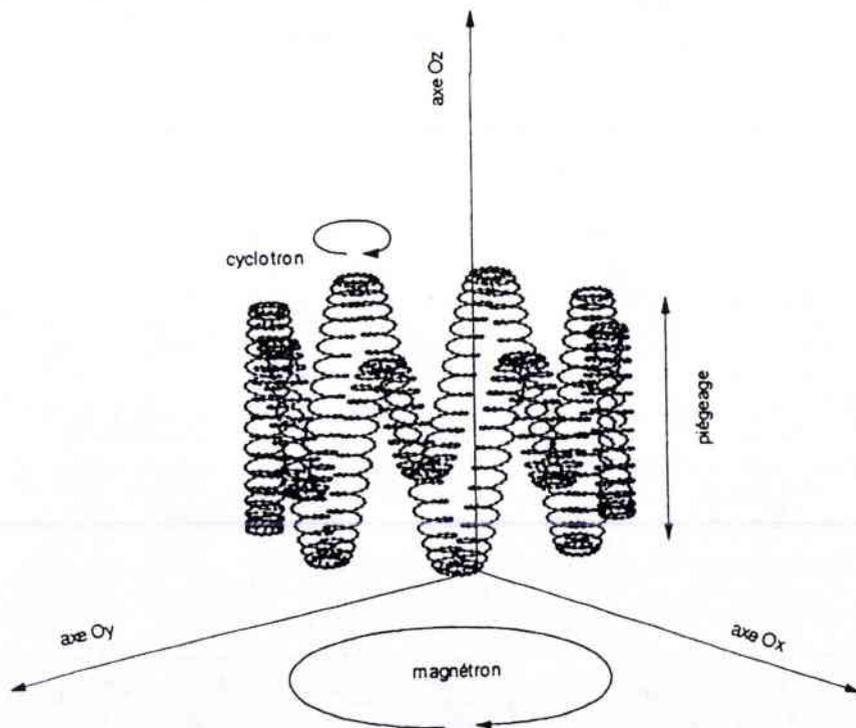
D'où :

$$\nu_c = \frac{q \cdot B_0}{2\pi \cdot m} \quad (\text{Hz}) \quad (4)$$

Ceci implique qu'un ensemble d'ions de masses différentes sera caractérisé par un ensemble de fréquences cyclotroniques. La fréquence cyclotronique d'un ion spécifique est donc inversement proportionnelle au rapport masse sur charge et directement proportionnelle au champ magnétique.

Par exemple, pour éviter la fuite des ions positifs le long des lignes de champ, il suffit alors de les confiner entre deux plaques chargées positivement (plaques de piégeage). Dans ces conditions, les ions piégés dans un puits de potentiel, adoptent un mouvement de va et vient entre les deux plaques. Les interactions des ions avec les champs magnétique et électrique colinéaires permettent de les maintenir piégés, de les manipuler, pour finalement les détecter.

La trajectoire des ions est complexe, c'est une combinaison de trois mouvements oscillatoires : le mouvement cyclotronique, les oscillations de piégeage et le mouvement magnétron (voir figure III.3). Pour plus de précisions, on pourra se référer à la thèse de Masselon [7] ou aux nombreuses revues qui traitent des aspects fondamentaux de la FTMS [8-10].



**Figure III.3 :** Combinaison des trois mouvements naturels d'un ion dans la cellule FTMS : cyclotron, magnétron et oscillations de piégeage.

### I.1.3. L'excitation des ions

Après le piégeage, les ions de même rapport  $m/z$  ont une fréquence cyclotronique donnée, mais des positions aléatoires dans la cellule et un rayon de giration ( $R$ ) trop faible pour pouvoir générer un signal sur les plaques de réception. On procède alors à l'excitation des ions par une impulsion de radiofréquence grâce aux plaques excitatrices, afin de provoquer le rassemblement des ions en un nuage d'ions cohérents.

Ce balayage en fréquence couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions : il va de quelques kHz à quelques MHz pour un champ magnétique de 3 Teslas (correspondant à une gamme de masse allant de 17 à 5 000 uma<sup>1</sup>).

Quand la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique d'un ion de masse donnée, l'ion absorbe de l'énergie. Cette énergie cinétique  $E_c$  augmente par un processus de transfert d'énergie. Elle a pour expression :

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = \frac{m \cdot \omega_c^2 \cdot R^2}{2} \quad (5)$$

Cette augmentation d'énergie cinétique se traduit donc par une augmentation du rayon de giration  $R$  de la trajectoire de l'ion.

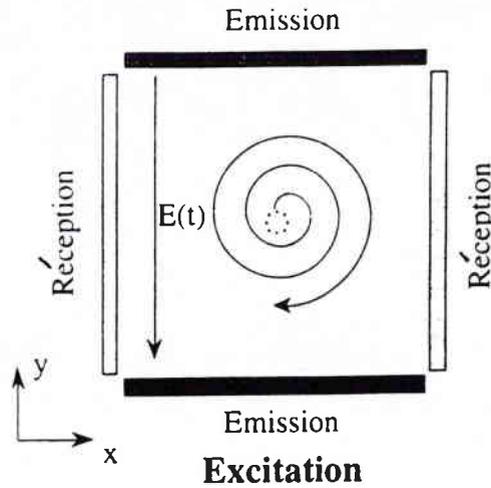
Il est possible de calculer le rayon d'équilibre dans le cas d'une particule de masse  $m$ , de charge  $q$  et d'énergie cinétique  $E_c$  dans le plan ( $x, y$ ) :

$$R = \frac{\sqrt{2m \cdot E_c}}{q \cdot B} \quad (6)$$

Après un très court temps d'interaction avec la fréquence responsable de ce phénomène, tous les ions d'une même masse sont en phase et ont la même trajectoire : leur mouvement est donc devenu cohérent (voir figure III.4) et un signal peut alors être détecté.

Ce phénomène de transfert d'énergie est appelé Résonance Cyclotronique Ionique (ICR). Il peut être utilisé pour accélérer les ions ou n'importe quelle particule chargée. Quand la résonance cyclotronique a pour but d'accélérer des particules, l'équipement utilisé est un cyclotron. Quand elle a pour but de déterminer la masse des ions, l'équipement utilisé est un spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions (ICR-FTMS) [11]

<sup>1</sup> uma : unité de masse atomique, appelée aussi **Dalton** (Da)

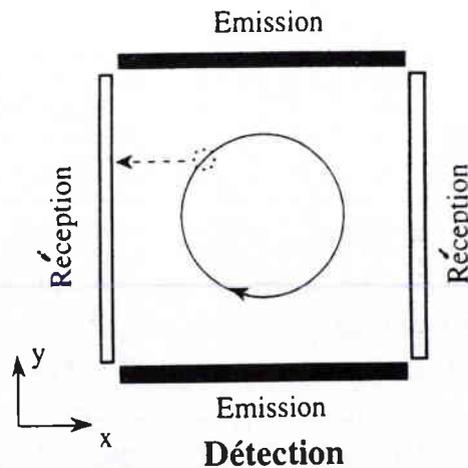


**Figure III.4 :** Schéma de principe de l'excitation des ions par FTMS. L'impulsion de radiofréquence provoque un rassemblement des ions en un paquet en cohérence de phase, décrivant une spirale d'Archimède.

#### 1.1.4. La détection et l'acquisition des ions

A l'issue de la phase d'excitation, les ions animés d'un mouvement orbital cohérent, sont confinés entre les deux plaques d'une capacité (plaques de détection) [12].

Les ions positifs, par exemple, approchant une de ces deux plaques, attirent les électrons. Continuant à se déplacer sur leur trajectoire, ils se rapprochent de la seconde plaque opposée à la première, et attirent également les électrons sur cette surface : il y a alors création d'un courant image (voir figure III.5).



**Figure III.5 :** Schéma de principe de la détection des ions par FTMS. L'impulsion de radiofréquence provoque une augmentation du rayon de giration des ions qui peuvent être détectés par la charge qu'ils induisent sur les plaques de détection.

Le mouvement de ce paquet d'ions en cohérence de phase, induit donc un courant image, dont la fréquence est égale à la fréquence cyclotronique des ions et dont l'amplitude est proportionnelle au nombre d'ions présents. Le courant image global est la superposition des influences de tous les ions excités dans la cellule. Il est collecté en tant que courant transitoire (ou interférogramme), converti en différence de potentiel et numérisé par un ordinateur.

L'interférogramme ( $F(t)$ ) est digitalisé, puis déconvolué par transformée de Fourier en ses composantes de fréquences ( $F(\omega)$ ). Chaque fréquence est ensuite associée à une masse par étalonnage. Le résultat est un spectre de masse, qui porte en ordonnée la tension du signal (abondance des ions), et en abscisse la masse des ions détectés.

## ***1.2. Descriptif expérimental de la microsonde laser FTMS***

La microsonde laser FTMS dont nous disposons au laboratoire est un prototype unique basé sur un système FTMS 2 000 commercialisé par la société Nicolet (de nos jours Thermoquest Finnigan, Madison, WI, USA). En effet, l'instrument initial, la FTMS 2 000 qui permettait de travailler en impact électronique ou en ionisation chimique, a été modifié pour recevoir une source d'ionisation laser [13-16].

Outre l'aimant cryogénique, l'électronique et l'ordinateur de traitement du signal d'origine, ce prototype comporte les éléments originaux suivants : une nouvelle platine optique, une optique de focalisation et de visualisation, une double cellule modifiée, ainsi qu'un micromanipulateur insensible au champ magnétique (voir figure III.6). Nous allons brièvement détailler ces différents éléments.

### ***1.2.1. La double cellule***

Il s'agit de deux cellules cubiques constituées de plaques en acier inoxydable amagnétique à structure à nid d'abeille (voir figure III.7). Les deux cellules partagent une plaque commune, la conductance limite, plaque pleine possédant en son milieu un orifice qui permet le passage du faisceau laser d'ionisation et des ions d'une cellule à l'autre. Cette plaque permet un pompage différentiel entre les deux cellules. Une partie de la conductance limite est constituée d'une couronne de quartz recouverte d'un treillis métallique très fin [13]. Cette couronne sert à laisser passer la lumière de l'éclairage et permet la visualisation de l'échantillon. Chaque cellule possède une plaque de piégeage perpendiculaire au champ magnétique appliqué, ainsi que deux plaques d'excitation, et deux de réception opposées. La conductance limite joue le rôle de plaque de piégeage pour les deux cellules. La plaque de piégeage de la cellule analyse est également

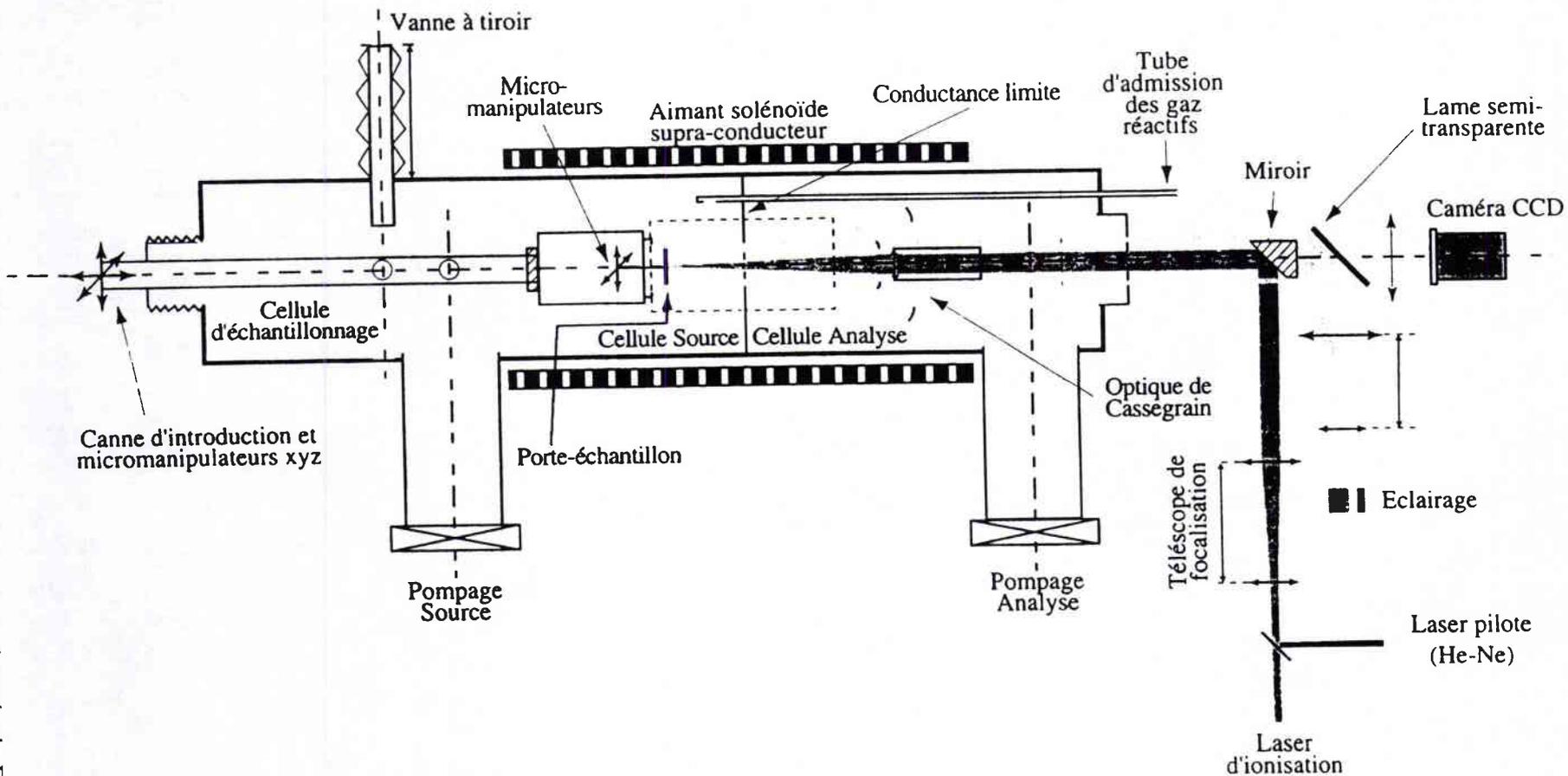


Figure III.6 : Microsonde laser spectromètre de masse à transformée de Fourier. Schéma général.

percée en son centre pour laisser passer le faisceau laser. La plaque de piégeage source est amovible et percée pour permettre d'insérer l'échantillon. Les dimensions d'une cellule sont : 5 cm x 5 cm x 5cm.

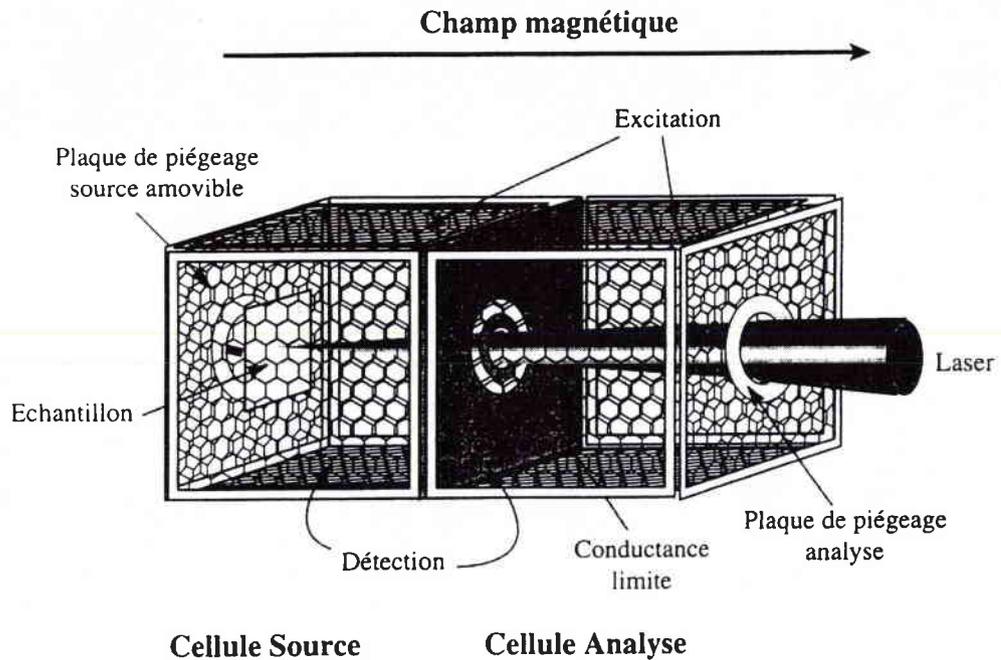


Figure III.7 : La double cellule de la microsonde laser FTMS.

### 1.2.2. Le champ magnétique

L'appareil est équipé d'un aimant supraconducteur constitué d'un bobinage en alliage niobium/titane plongé dans un bain d'hélium liquide. Une enveloppe contenant de l'azote liquide permet de maintenir un gradient de température entre l'extérieur et le dewar d'hélium liquide (4 K). La valeur du champ magnétique est fixée par les caractéristiques de l'aimant. Cependant, il est à remarquer qu'un champ intense permet une augmentation de la fréquence cyclotronique (cf. équation 4, p. 92), ce qui facilite alors la détection des ions de haute masse (caractérisés par des petites fréquences) au-dessus du bruit de fond. On gagne donc en sensibilité. Notre aimant délivre un champ très homogène de 3,04 tesla au centre de la chambre d'analyse. Les cellules "source" et "analyse" sont situées dans le tore de l'aimant et sont centrées sur l'axe du champ magnétique.

### ***1.2.3. Le système de pompage***

Les performances de la FTMS sont très dépendantes de la qualité du vide à l'intérieur de la chambre d'analyse. Le pompage est assuré aux différents étages de l'instrument.

Le vide dans la chambre d'échantillonnage est effectué par un pompage primaire à l'aide d'une pompe à palettes Alcatel à haut débit ( $35 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ) et d'un pompage secondaire par une pompe turbo-moléculaire (débit  $400 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Ce dispositif permet d'atteindre un vide de l'ordre de  $10^{-7}$  Torr en quelques minutes (15 à 20 min). La chambre d'échantillonnage est isolée du reste de l'instrument par une vanne à tiroir fabriquée par la société Méca 2000 (Vernouillet, France). La remise à l'air s'effectue en arrêtant les deux pompes (à palettes et turbo) et en envoyant un léger flux d'azote.

La chambre du spectromètre, quant à elle, est pompée différentiellement du côté source et du côté analyse au moyen de deux pompes à palettes (Alcatel 2012A, débit  $16 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ ) et de deux pompes à diffusion d'huile de débit  $650 \text{ L} \cdot \text{s}^{-1}$ . Lorsque la vanne d'isolement de la chambre d'échantillonnage est fermée, la pression dans l'instrument est typiquement de  $10^{-9}$  Torr. La vanne étant ouverte pour l'analyse, la pression augmente jusqu'à  $5 \cdot 10^{-8}$  à  $10^{-7}$  Torr en source et reste inférieure à  $2 \cdot 10^{-8}$  Torr en analyse. Ces pressions peuvent augmenter temporairement lors de l'introduction de gaz ou de composés très volatils.

### ***1.2.4. Le système d'introduction et de manipulation de l'échantillon***

Le produit à analyser est déposé sur un porte-échantillon métallique non ferromagnétique carré de 2 cm de côté et d'environ 3 mm d'épaisseur. Celui-ci est muni d'une tige qui permet sa fixation sur un support à l'aide d'une vis. Le support est situé à l'extrémité d'une canne de transfert qui coulisse de la cellule d'échantillonnage à la chambre d'analyse. La plaque de piégeage de la source est solidaire du support et est retirée en même temps que l'échantillon, placé à 3 mm à l'intérieur de la cellule.

Depuis peu, nous avons modifié le système de notre canne d'introduction, permettant ainsi un pilotage à distance de l'échantillon. Ces déplacements sont effectués par des moteurs en x, y et z, pilotés par un ordinateur. Les déplacements à l'intérieur de la cellule source ont un débattement de plus ou moins 8 mm avec un pas de  $5 \mu\text{m}$ .

### 1.2.5. L'interface d'ionisation laser

La pièce maîtresse de l'interface laser est une optique de Cassegrain inversée [13] qui permet la focalisation du laser sur la cible, l'éclairage et la visualisation de l'échantillon. Cette optique est située à l'intérieur de la chambre du spectromètre. La position des lentilles centrales est réglable de l'extérieur afin d'ajuster le point focal sur l'échantillon en fonction de la longueur d'onde utilisée (de 193 à 355 nm).

Deux lasers sont couplés à la microsonde. Il s'agit d'un laser Excimère LPX 200 commercialisé par la société Lambda Physic (Goettingen, Allemagne), et d'un laser à verre d'yttrium et d'aluminium dopé au Néodyme (Nd-YAG) Brilliant de chez Quantel (Les Ulis, France).

**Tableau III.1 :** Caractéristiques des faisceaux délivrés par les lasers couplés à la FTMS :

Longueur d'onde	Energie maximale de sortie	Energie sur échantillon	Temps d'impulsion
193 nm	200 mJ	82 $\mu$ J	23 ns
248 nm	200 mJ	140 $\mu$ J	34 ns
266 nm	63 mJ	188 $\mu$ J	4.3 ns
355 nm	63 mJ	188 $\mu$ J	4.3 ns

L'excimère permet l'accès aux longueurs d'onde 248 nm et 193 nm respectivement avec les mélanges gazeux krypton/fluor et argon/fluor.

Le Nd-YAG délivre les longueurs d'onde 355 nm et 266 nm en mode triplé et quadruplé. Il n'est malheureusement pas possible d'utiliser les première et seconde harmonique de ce laser (1 064 nm et 532 nm), car les optiques ont été conçues pour l'utilisation de longueurs d'onde dans l'ultraviolet (de 190 à 360 nm). Les caractéristiques des faisceaux délivrés par nos lasers sont résumées dans le tableau III.1

Le faisceau utilisé est amené à l'entrée d'un télescope situé à l'extérieur de la microsonde au moyen d'un jeu de prismes. Le télescope est ajustable pour permettre de faire varier le diamètre de l'impact laser sur l'échantillon, donc l'irradiance. Le tableau III.2 présente les irradiances que l'on peut atteindre aux différentes longueurs d'onde.

**Tableau III.2 :** Gammes d'irradiance accessibles à l'aide des différents lasers :

Longueur d'onde	Irradiance maximale ( $W.cm^{-2}$ )	Irradiance minimale ( $W.cm^{-2}$ )
193 nm	$2,0 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^5$
248 nm	$3,0 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^5$
266 nm	$3,0 \cdot 10^{10}$	$5,0 \cdot 10^6$
355 nm	$3,0 \cdot 10^{10}$	$7,0 \cdot 10^6$

A la sortie du télescope, le faisceau est renvoyé par un miroir à travers le hublot d'entrée vers les lentilles centrales de l'optique de Cassegrain inversée, située dans la chambre d'analyse. Il est ensuite focalisé vers l'échantillon, à travers les deux orifices qui percent la plaque de piégeage de la cellule analyse et la conductance limite.

Parallèlement au faisceau laser, la partie extérieure de l'optique de Cassegrain, transmet la lumière d'une source située à l'extérieur sur l'échantillon, et renvoie l'image vers une caméra CCD. Un téléobjectif équipe cette caméra, ce qui offre une visualisation avec un grossissement de 300 x sur le moniteur vidéo noir et blanc.

### ***1.2.6. Les systèmes électroniques de la microsonde***

L'appareil est équipé d'un ensemble de systèmes informatiques et électroniques permettant la programmation et l'exécution des séquences d'analyse.

L'électronique de contrôle de l'instrument est basée sur un ordinateur micromac 5000, qui est connecté à une série de capteurs et de vannes dans l'instrument.

La partie concernant la programmation des séquences et l'acquisition de données, est basée sur une informatique à mémoire à accès rapide et divers périphériques, dont le plus important est le contrôleur de cellule. Ce dernier génère les tensions qui sont appliquées sur les plaques de piégeage de la cellule. Le contrôleur de cellule est aussi connecté aux plaques d'excitation par l'intermédiaire d'un amplificateur de puissance et collecte le signal détecté sur les plaques réceptrices à travers un préamplificateur.

Actuellement, la société Thermoquest Finnigan FTMS (auparavant Extrel FTMS) commercialise des spectromètres de masse à transformée de Fourier. Une informatique de contrôle de l'instrument, d'acquisition et de traitement des données, basée sur un système UNIX, a été développée depuis 1993.

Le micro-ordinateur qui équipait l'appareil à l'origine était un système Nicolet 1280. Il a été changé pour un système basé sur une station de travail Sun LX, couplée à une électronique d'acquisition Odyssey (version 3.1, Extrel FTMS).

### ***1.3. Développements et caractéristiques de la microsonde FTMS***

Depuis deux décennies, cette technique a connu un essor considérable dû à ses très grandes capacités de sensibilité et de résolution, malgré son coût très élevé, comparé à d'autres types de spectromètres de masse. Il s'agit néanmoins d'une des rares techniques qui combine simultanément la haute résolution et la possibilité d'obtenir des informations structurales. Jusqu'à présent, il existe 200 appareils FTMS au monde. Cependant ce nombre représente moins de 0,5 % des spectromètres de masse. Alors que chaque année, plus de 10 % des articles en spectrométrie font référence à de nouveaux développements FTMS [17]. Nous aborderons dans cette partie, les différentes possibilités d'analyse qu'offre ce type d'analyseur, ses applications types et les inconvénients de la méthode.

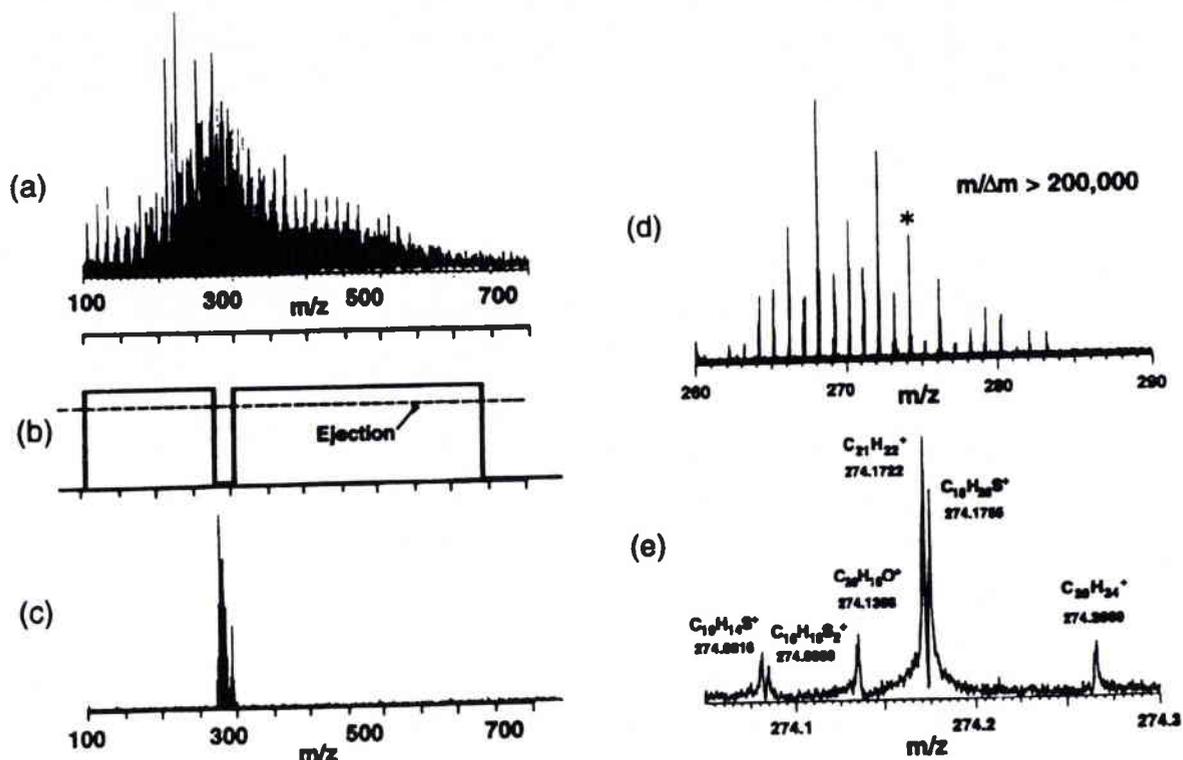
#### ***1.3.1. Les développements***

##### ***1.3.1.1. Amélioration des caractéristiques spectrales : résolution et sensibilité***

###### **a ) La haute résolution en mode hétérodyne**

Un moyen d'améliorer la résolution, consiste à enregistrer le signal sur un temps plus long que les quelques millisecondes habituelles. C'est le mode hétérodyne (voir figure III.8) pour lequel la plage de masse étudiée est réduite au minimum (quelques milliers de Hz, soit quelques unités de masses voire moins).

Après le piégeage et l'excitation des ions, on injecte grâce aux plaques excitatrices, une fréquence de référence légèrement inférieure à la fréquence que l'on souhaite détecter. On obtient sur les plaques de détection un signal qui est une combinaison de fréquences ; c'est le phénomène de battement. Après filtrage par un filtre passe-bas, le signal enregistré est une pure sinusoïde amortie de fréquence égale à la différence entre la fréquence cyclotronique de l'ion et la fréquence de référence. Ceci permet d'enregistrer le signal sur un temps beaucoup plus long (quelques secondes) et d'améliorer grandement la résolution : de 10 000 à 1 000 000 en mode hétérodyne contre 100 à 5 000 en mode direct (habituel).



**Figure III.8 :** Exemples de spectres "haute résolution", obtenus par FTICR-MS sur un distillat de pétrole brut, tiré de la référence [2] :

- a) Spectre de masse réalisé en mode direct, ionisation par impact électronique (12 eV)
- b) Séquence d'une excitation SWIFT<sup>1</sup> permettant l'isolement d'ions intéressants
- c) Spectre de masse effectué en mode direct précédé de la séquence SWIFT
- d) Spectre de masse en mode hétérodyne d'ions isolés par la technique SWIFT
- e) Agrandissement de la plage de masse  $m/z = 274$ . Séparation d'ions isobariques (différence de 0,003 unité de masse) entre l'ion  $C_{21}H_{22}^+$  et l'ion soufré  $C_{18}H_{16}S^+$ .

### b) Transfert vers la cellule analyse

L'instrument dont nous disposons comporte une double cellule. Il est possible de transférer une partie des ions formés de la cellule source vers la cellule analyse en mettant à la masse la conductance limite pendant un bref instant [18]. Seuls les ions de rayon inférieur à celui de l'orifice de la conductance limite, passeront en cellule analyse. Il est possible d'avoir alors une moins grande distribution de rayons et d'améliorer ainsi la résolution. En ce qui concerne la sensibilité, elle sera en général réduite. Au maximum, la moitié des ions présents en source passeront en analyse.

<sup>1</sup> SWIFT : Stored Waveform Inverse Fourier Transform, qui consiste à envoyer sur les plaques excitatrices un signal résultant de la transformée de Fourier inverse d'une onde prédéfinie dans le domaine des fréquences

### c ) Ejection sélective

Il est possible d'éjecter sélectivement un ou plusieurs types d'ions dont l'abondance gêne les observations afin de détecter les composants minoritaires d'un mélange [19]. Cette éjection se fait comme précédemment par excitation sélective en fréquence jusqu'à un rayon excédant les dimensions de la cellule.

### d ) Axialisation des ions par refroidissement et excitation quadripolaire azimutale

Pour que l'étape d'excitation soit efficace, il faut que les ions de même masse réagissent au champ d'excitation de la façon la plus homogène possible. Pour cela, il est nécessaire d'avoir des distributions de rayons initiaux les plus resserrées possibles, donc des énergies cinétiques minimales. Or, l'ionisation laser produit de larges distributions d'énergies cinétiques. Il est possible de diminuer ces écarts, en utilisant la relaxation par frottements. Il s'agit d'introduire un gaz de collision, qui va entraîner une relaxation des ions vers le centre de la cellule.

Cependant, de telles collisions vont également générer une diffusion du mouvement magnétron et entraîner la perte des ions. Pour pallier à cet inconvénient, on associe à l'utilisation du gaz tampon (Argon ou Hélium), l'excitation quadripolaire azimutale. C'est-à-dire que l'excitation est appliquée sur les quatre plaques (émettrices et réceptrices). Le mouvement cyclotron décroît plus rapidement que ne croît le magnétron. Lors des collisions, on a globalement un regroupement des ions excités autour de l'axe de la cellule.

Cette méthode est considérée comme la plus grande innovation, depuis ces 10 dernières années. Elle est actuellement en cours d'implantation sur notre instrument.

#### ***1.3.1.2. Détermination de structures : techniques de dissociation des ions***

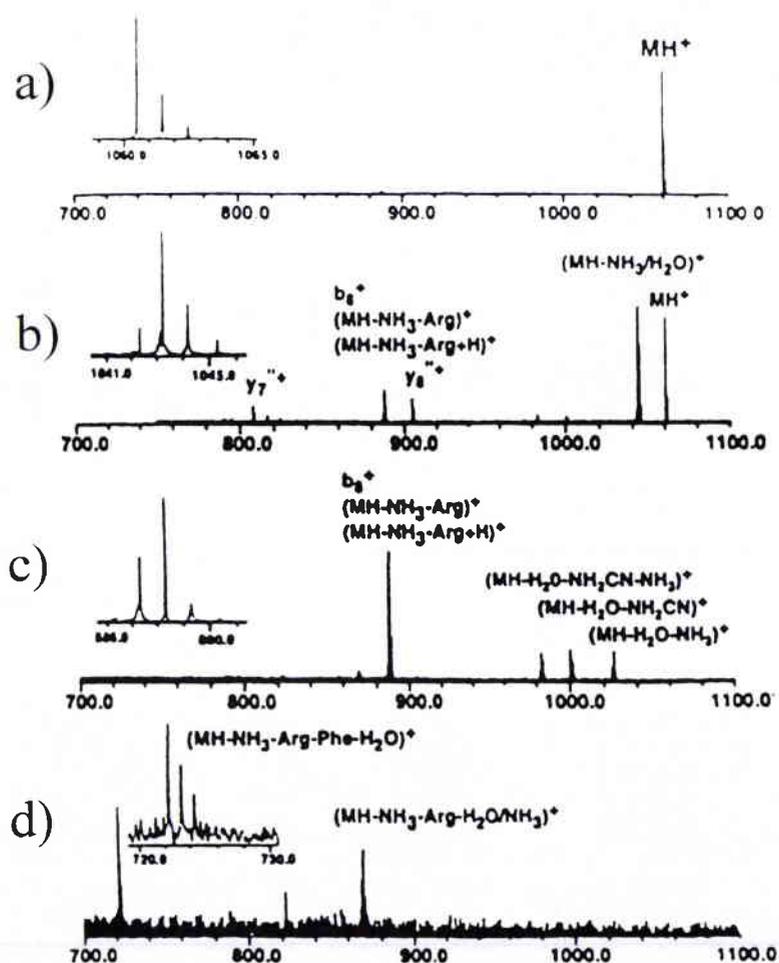
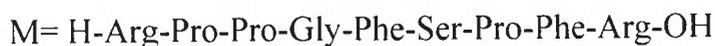
Cela consiste à sélectionner un "ion parent", puis à lui donner une énergie suffisante pour le fragmenter [20]. La sélection s'opère en excitant tous les ions, sauf l'ion intéressant jusqu'à un rayon qui excède les dimensions de la cellule. Lorsque l'éjection doit se faire à des masses proches, il vaut mieux utiliser une excitation SWIFT [21] pour obtenir une sélectivité optimale.

Après avoir sélectionné les ions parents, diverses méthodes sont envisageables pour les fragmenter [10] : parmi elles, la dissociation induite par collision (CID<sup>1</sup>)

---

<sup>1</sup> CID : Collision-Induced Dissociation

[22], la dissociation par impact sur une surface (SID<sup>2</sup>) [23], la dissociation des ions par irradiation non-résonante prolongée (SORI<sup>3</sup>) [24] ou encore la photofragmentation. Dans le cas de la CID, les ions sélectionnés doivent ensuite être accélérés en présence du gaz de collision, et leur degré de fragmentation dépendra de leur énergie cinétique. On obtient ensuite un spectre "ions fils", un de ces ions peut être à son tour sélectionné pour être le "parent" d'une génération suivante. La FTMS est une des rares techniques qui permet cette méthode dite de MS/MS (voir figure III. 9).



**Figure III.9 :** Expériences de MS<sup>4</sup> montrant la dissociation des ions de la bradykinine (tiré de la référence [10]) :

- a ) Ion bradykinine protoné [M+H]<sup>+</sup>
- b ) Dissociation de [M+H]<sup>+</sup>, perte de NH<sub>3</sub> et de H<sub>2</sub>O
- c ) Dissociation de [M-NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>, perte de l'arginine
- d ) Dissociation de [M-NH<sub>3</sub>-Arg+H]<sup>+</sup>.

<sup>2</sup> SID : Surface-Induced Dissociation

<sup>3</sup> SORI : Sustained Off-Resonance Irradiation

### ***1.3.1.3. Etude de la réactivité en phase gazeuse : réaction ion/molécule***

Pour effectuer des réactions entre les ions et des molécules neutres, il faut tout d'abord sélectionner l'ion réactif comme précédemment. Ensuite, la molécule réactive est introduite dans la cellule en phase gazeuse. Il peut s'agir soit d'un solide qui sublime dans la cellule, soit d'un gaz ou d'une vapeur introduit au moyen de vannes de fuite ou de vannes pulsées. Les réactions peuvent alors être étudiées sur des temps variant de quelques microsecondes à plusieurs dizaines de secondes. C'est ainsi que l'on peut déterminer par exemple des échelles d'affinités protoniques [25], des constantes de vitesses de réactions ou d'équilibre [12]. Les ions réactifs peuvent également être excités afin d'obtenir des énergies cinétiques permettant aux réactions de s'effectuer.

## ***1.3.2. Les caractéristiques***

### ***1.3.2.1. Performances***

- La très haute résolution ( $R > 1\,500\,000$  à la masse 1 000), permettant la séparation d'ions isobariques [26].
- Le temps d'analyse est relativement court, sauf cas particulier. La préparation de l'échantillon, sa mise en place dans la chambre d'échantillonnage et l'établissement du vide prennent entre 15 à 20 minutes. L'analyse proprement dite, suivie de l'enregistrement du spectre de masse dure une seconde.
- Détection non destructive, permettant la technique dite de "remesurement" du signal de l'ion afin d'augmenter la sensibilité de l'appareil ( $< 1$  amol) [27].
- Technique adaptée pour étudier des réactions ion/molécule [28], possibilité de faire de la  $MS^n$ .
- Analyse d'échantillon massif.
- Possibilité de couplage  $LC^1$ , HPLC ( source externe) [29].

Le champ d'applications est tellement vaste, que nous n'en citerons que quelques exemples qui nous semblent importants : analyse de mélange complexe (pétrochimie), analyse de surface (sidérurgie, bâtiment), analyse de polymères

---

<sup>1</sup> LC : Liquid Chromatography

(industrie de l'emballage), analyse de peptides et séquençage de l'ADN (biologie, génie génétique), détermination de structure macromoléculaire (chimie organique), détection et identification d'espèces biologiques à des niveaux de concentrations cellulaires (pharmacologie).

### 1.3.2.2. Limites

#### a) Limitation en masse

La cellule du spectromètre est limitée dans le plan x, y par les plaques de détection et d'excitation. Il est clair que la limite ultime de masse des ions que l'on peut piéger, est celle pour laquelle le diamètre de giration des ions atteint la distance d entre les plaques.

$$m_{\text{lim}} = \frac{q^2 \cdot B^2 \cdot \frac{d^2}{4}}{2k \cdot T}$$

avec k : constante de Boltzmann  
T : température absolue

En fait, la nécessité d'exciter les ions pour obtenir un mouvement cohérent, entraîne un rayon limite des ions détectables nettement inférieur à d/2. De ce fait, la masse limite expérimentale se situe aux alentours de 5 000 uma pour un aimant de 3,04 Tesla.

Cette limitation en masse, peut être un handicap, lors de l'analyse de biomolécules qui ont des masses moléculaires très élevées. Cependant les nouvelles générations d'appareil permettent de mesurer des masses ioniques multichargées, et d'atteindre des masses supérieures à  $10^8$  uma par couplage électrospray/FTMS [30].

#### b) Autres limites

- L'analyse demande la maîtrise de nombreux paramètres ayant une influence sur la formation et la détection des ions. Une automatisation de la séquence d'analyse n'est pas possible.
- Sensible à l'énergie cinétique des ions. Les ions qui ont une énergie cinétique élevée (hautes masses) sortiront de la cellule et ne seront pas détectés. Il existe cependant des stratégies pour contrer cet inconvénient (refroidissement des ions par collision avec un gaz tampon, couplage d'une source d'ionisation externe, ...).

- La conservation de l'aimant supraconducteur à 4 K nécessite l'utilisation de fluides cryogéniques (hélium et azote liquide) relativement onéreux.
- Les produits présentant une tension de vapeur trop faible, se vaporisent dans l'enceinte du spectromètre sous ultravide.
- Dans la majorité des cas, l'analyse est semi quantitative, car l'excitation n'est pas uniforme. Cependant, certaines études ont démontré la possibilité d'une quantification [5].

## II. Les analyses LDI/MALDI couplées à la FTMS

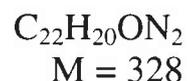
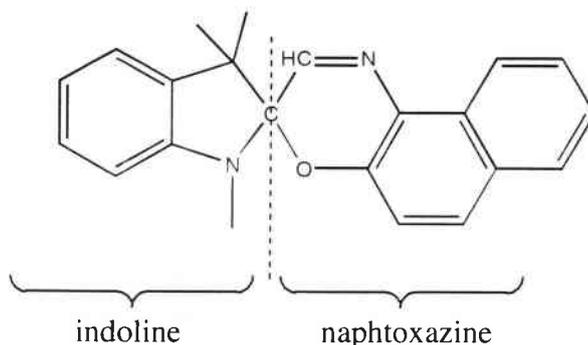
Comme nous l'avons vu précédemment, le spectromètre de masse à transformée de Fourier apparaît être un formidable outil analytique. Cependant, dans l'optique d'une étude sur des mécanismes de désorption laser, le couplage d'une source d'ionisation photonique à la FTMS, nécessite des étapes d'optimisation avant analyse. En effet, la qualité de la préparation des échantillons, le réglage de divers paramètres laser et l'élaboration d'une séquence d'analyse FTMS, pourront grandement influencer l'image spectrale finale.

### II.1. Préparation des échantillons

#### II.1.1. Les sondes moléculaires

Afin de comparer le mécanisme d'ionisation de la désorption laser assistée par matrice (MALDI) à celui de la désorption laser classique (LDI), nous avons été amenés à étudier trois grandes familles de composés photochromiques, qui se différencient par les propriétés suivantes :

a) Spirooxazines [31,32] :

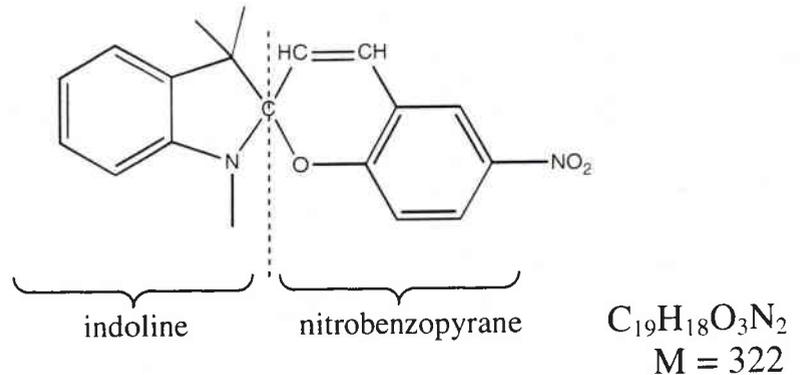


Données spectrocinétiques :

A 25°C dans le toluène [33]

 $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ -  $K_{\Delta} (\text{s}^{-1}) = 0,54$ -  $\lambda_{\text{max}} (\text{colorée}) = 594 \text{ nm}$ -  $A_0 = 1,08$ -  $t_{(A_0/2)} = 515 \text{ min}$ 

b) Spiropyranes [34,35] :

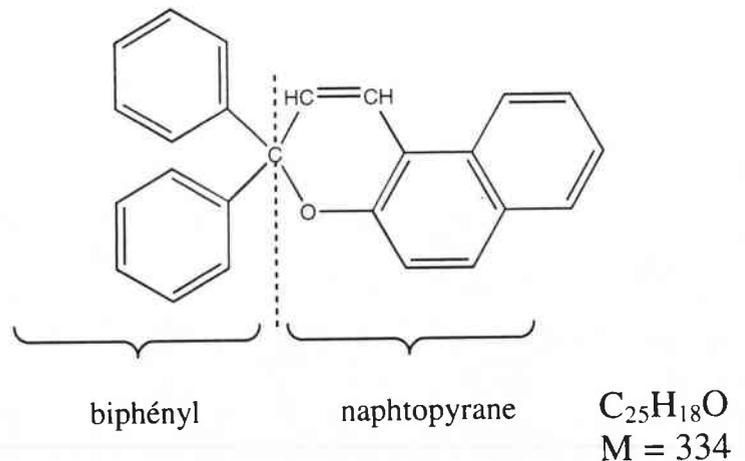


Données spectrocinétiques :

A 25°C dans le toluène [36]

 $c = 5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ -  $K_{\Delta} (\text{s}^{-1}) = 0,023$ -  $\lambda_{\text{max}} (\text{colorée}) = 598 \text{ nm}$ -  $A_0 = 4,0$ 

c) [2H]-Chromène [37,38] :



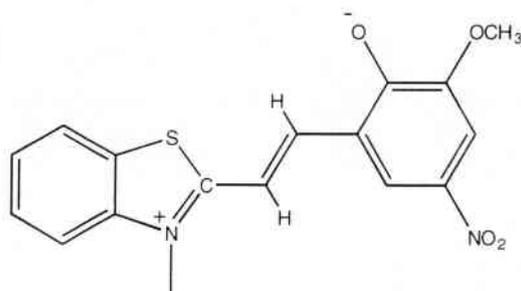
Données spectrocinétiques :

A 25°C dans le toluène [38]

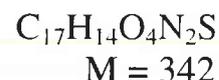
 $c = 2,5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ -  $K_{\Delta} (\text{s}^{-1}) = 0,1$ -  $\lambda_{\text{max}} (\text{colorée}) = 432 \text{ nm}$ -  $A_0 = 0,84$ -  $t_{(A_0/2)} = 460 \text{ min}$ 

Au cours de ce travail, deux autres molécules présentant un photochromisme thermiquement irréversible (forme ouverte permanente) ont été également analysées :

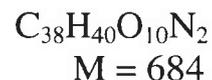
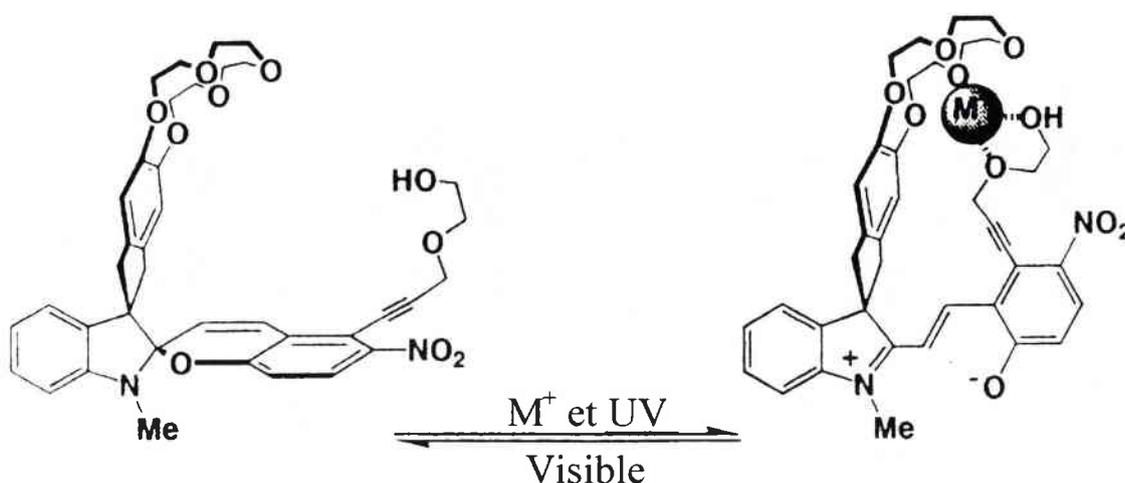
d) Forme ouverte permanente obtenue par synthèse organique [40] :



benzothiazoline



e) Forme ouverte permanente induite par irradiation laser UV d'un spirobenzopyrane particulier, auquel on a ajouté un sel alcalin ( $M^+$ ) :



Cette molécule (spirobenzopyrane + éther couronne 15C5<sup>1</sup>) synthétisée par Inoué *et al.* (Université d'Osaka, Japon) [41] possède la particularité, contrairement au spirobenzopyrane de base, de rester en conformation forme ouverte permanente, après irradiation UV et ceci uniquement en présence de sel alcalin (LiCl). Il semblerait que le cation alcalin, piégé entre l'éther couronne et le groupement oxyéthylène, change la configuration électronique de la molécule, rendant ainsi impossible le retour à la conformation initiale (forme fermée) par voie thermique. Seule une irradiation dans le visible ( $> 480 \text{ nm}$ ), permet le

<sup>1</sup> 15C5 : 15 atomes inclus dans la couronne dont 5 d'oxygène. En 1967, Pedersen a mis en évidence leur aptitude à complexer les cations alcalins [42]

retour à la forme fermée. Nous aborderons plus en détail cette particularité, qui permettra lors de la présentation des résultats, de comprendre le mécanisme du transfert protonique (et/ou d'atomes d'hydrogène), observé en MALDI (voir Chap. V).

La synthèse et la caractérisation des photochromes étudiés lors de ce travail (sauf le spirobenzopyrane + 15C5), ont été réalisées par l'équipe du Pr. Guglielmetti (Laboratoire de Chimie et Matériaux Organiques, Modélisation), à Marseille (voir chapitre II, p. 74).

Ces molécules photochromiques sont utilisées sans être purifiées, car la majeure partie de ces composés était en quantité insuffisante pour une nouvelle recristallisation avant analyse.

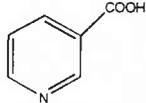
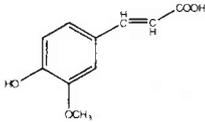
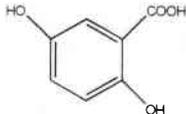
### ***II.1.2. Les matrices***

En référence au chapitre I, nous avons vu que le choix de la matrice est un critère prépondérant quant à la réussite d'une analyse MALDI. En effet, c'est elle qui participe à l'ionisation dite "douce" de l'analyte (molécule cible) et donc facilite sa détection en spectrométrie de masse.

Afin de connaître le rôle de la matrice au cours du processus d'ionisation de la méthode MALDI, nous avons testé les trois grandes familles de matrices solides.

#### ***II.1.2.1. Les matrices acides***

Depuis la parution de l'acide nicotinique dans les travaux de Karas et Hillenkamp [43], un nombre considérable d'autres matrices organiques ont été employées en MALDI, telles que les dérivés de l'acide benzoïque et cinnamique. Ces composés sont tous des acides faibles. La faculté de donner leur proton labile (présence d'une fonction acide carboxylique) permet à une molécule analyte, à caractère basique, de s'ioniser par protonation. Pour notre étude, nous avons essentiellement travaillé avec les matrices les plus représentatives de cette classe, il s'agit de l'acide nicotinique, l'acide 3-méthoxy-4-hydroxycinnamique (fêrulique) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB). La structure, la masse molaire, le solvant utilisé, ainsi que le pKa (mesuré au laboratoire) de ces composés sont répertoriés dans le tableau III.3.

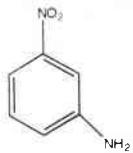
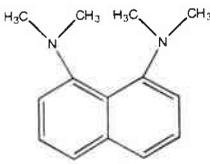
Formule	Masse Molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Solvant	pKa mesuré
 Acide nicotinique	M = 123	H <sub>2</sub> O	4,9
 Acide férulique	M = 194	MeOH	3,9
 2,5-DHB	M = 154	MeOH	3,6

**Tableau III.3 :** Matrices acides utilisées pour notre étude en MALDI.

Des deutérations ont été pratiquées sur l'acide nicotinique et l'acide 2,5-DHB. Ces expériences, nécessitant à travailler sous atmosphère d'azote, ont été réalisées au Laboratoire de Méthodologie et Synthèse Enantiospécifique de Biomolécules (Nancy I), en mélangeant en proportion stœchiométrique D<sub>2</sub>O et la matrice acide. Pour les besoins de l'interprétation des résultats, nous avons dû utiliser l'ester méthylique de l'acide nicotinique, acheté chez Aldrich.

### II.1.2.2. Les matrices basiques

Le premier spectre MALDI d'insuline bovine enregistré en FTMS a été obtenu en utilisant comme matrice la 4-nitroaniline [44]. Il semble donc que la fonction acide carboxylique ne soit pas un critère nécessaire. Il apparaît que ces composés présentent un caractère acide marqué, à l'état excité, ce qui rend ainsi possible la protonation des molécules cibles [45]. De plus le caractère basique de la matrice permet dans certains cas l'analyse de molécules cibles acides. L'analyse dans ce cas est réalisée en mode négatif, car l'ionisation se fera préférentiellement par déprotonation [46]. Les matrices basiques utilisées en MALDI sont regroupées dans le tableau III.4.

Formule	Masse Molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	Solvant	pKa mesuré
 3-nitroaniline	M = 138	MeOH	2,5 <sup>*</sup>
 4-nitroaniline	M = 138	MeOH	1 <sup>*</sup>
 1,8-bis- (diméthylamino)- naphthalène	M = 214	MeOH	12

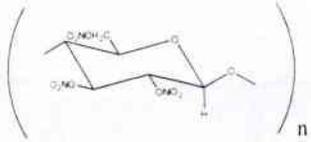
**Tableau III.4 :** Matrices basiques utilisées pour notre étude en MALDI.

<sup>\*</sup> Valeurs données dans le Handbook of Chemistry and Physics, 73<sup>rd</sup> edition, 1992-1993, 8-37.

Les matrices 3- et 4-nitroaniline possèdent des acides conjugués relativement forts.

### II.1.2.3. Les matrices polymères

Les avantages des matrices polymères résident dans le fait qu'elles sont insensibles aux polluants alcalins (possibilité de lavages avant analyse) et surtout donnent une qualité de dépôt remarquable, assurant par la même une bonne reproductibilité des résultats MALDI [47]. Nous avons réalisé toutes nos études sur la nitrocellulose [48] (voir tableau III.5).

Formule	Masse Molaire	Solvant
 Nitrocellulose	M = inconnue	MeOH

**Tableau III.5 :** Matrice polymère utilisée pour notre étude en MALDI.

Les valeurs de pKa indiquées dans les tableaux ci dessus, ont été mesurées par dosage acido-basique au laboratoire [49]. Toutes les matrices MALDI ont été commandées chez Aldrich Chimie (France) et sont utilisées sans purification préalable. Nous rappelons que l'analyseur FTMS ne permet pas d'analyser des échantillons liquides (ultravide), c'est pourquoi nous n'avons utilisé que des matrices se présentant sous forme solide.

### II.1.3. Caractérisation des échantillons par spectrophotométrie UV-Visible

En désorption laser (LD), la détermination des bandes d'absorption des différents échantillons à analyser est importante, car c'est elle qui nous permettra d'avancer une hypothèse de mécanisme d'ionisation. En MALDI, le choix de la matrice semblerait être conditionné par un coefficient d'extinction molaire élevé à la longueur d'onde du laser incident. C'est pourquoi, nous avons effectué des mesures d'absorbance sur les photochromes et les différentes matrices utilisées en MALDI. Ces mesures ont été réalisées sur un spectrophotomètre UV-Visible Lambda 14 (Perkin Elmer).

Les absorbances ont été mesurées à longueur d'onde fixe. Ces mesures ont été effectuées à 248, 266 et 355 nm, correspondant aux longueurs d'onde des lasers d'ionisation excimère KrF, Nd:YAG quadruplé et Nd:YAG triplé en fréquence. Les mesures à 193 nm n'ont pas été possibles en raison de fluctuations importantes de la lecture en dessus de 200 nm.

Les coefficients d'extinction molaire des différents échantillons sont répertoriés dans les tableaux III.6 et III.7 (voir annexes A et B).

Composé photochromique $c = 10^{-5}$ M	Coefficients d'extinction molaire ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ )			Solvant
	248 nm	266 nm	355 nm	
Spironaphtoxazine	35 000	16 000	5 000	THF
Spirobenzopyrane	33 000	33 000	8 000	THF
Chromène	63 000	25 000	6 000	THF
Spiro 15C5	3 000	4 000	1 000	CH <sub>3</sub> CN
Forme ouverte	3 000	1 000	2 000	MeOH

**Tableau III.6 :** Coefficients d'extinction molaire des molécules cibles.

Matrices MALDI		Coefficients d'extinction molaire ( $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )			solvant
		248 nm	266 nm	355 nm	
Acide nicotinique	$c = 10^{-4}$ M	2 200	3 000	0	H <sub>2</sub> O
Acide férulique	$c = 10^{-4}$ M	2 500	6 000	9 000	MeOH
Acide 2,5-DHB	$c = 10^{-4}$ M	2 100	0	2 000	MeOH
3-nitroaniline	$c = 10^{-5}$ M	24 000	19 000	2 000	MeOH
4-nitroaniline	$c = 10^{-5}$ M	14 000	10 000	24 000	MeOH
Eponge à proton	$c = 10^{-5}$ M	20 000	5 000	3 000	MeOH
Nitrocellulose	2 mg/mL	0	0	0	MeOH

**Tableau III.7 :** Coefficients d'extinction molaire des matrices MALDI utilisées.

Le coefficient d'extinction molaire de la nitrocellulose n'a pas pu être mesuré, car la masse de ce polymère n'est pas connue. Cependant, le spectre d'absorption de la nitrocellulose montre une seule bande d'absorption forte, aux alentours de 200 nm.

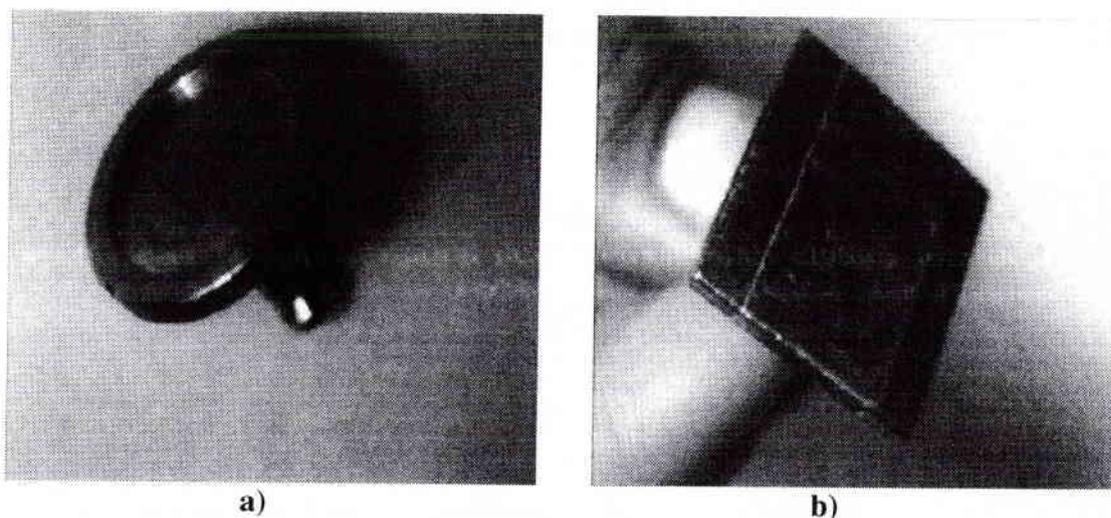
Les paramètres d'acquisition des spectres sont les suivants :

Gamme de longueur d'onde	190-400 nm
Vitesse de balayage	120 nm/mm
Intervalle d'échantillonnage	0,5 nm
Bande passante	0,5 nm
Longueur de la bande passante	3 nm

**Tableau III.8 :** Paramètres d'acquisition des spectres d'absorption UV.

#### II.1.4. Dépôt LDI

Deux types de porte-échantillons ont été utilisés lors des études par désorption ionisation laser directe sur support (sans matrice). Le premier, en aluminium (voir figure III.10.a), possède une légère cavité centrale qui permet de déposer des échantillons en solution et de sécher le dépôt. Le second, en acier inoxydable (voir figure III.10.b), est prévu pour y fixer des échantillons solides à l'aide d'un adhésif autocollant aluminé.



**Figure III.10** : Porte-échantillons LDI de la FTMS.

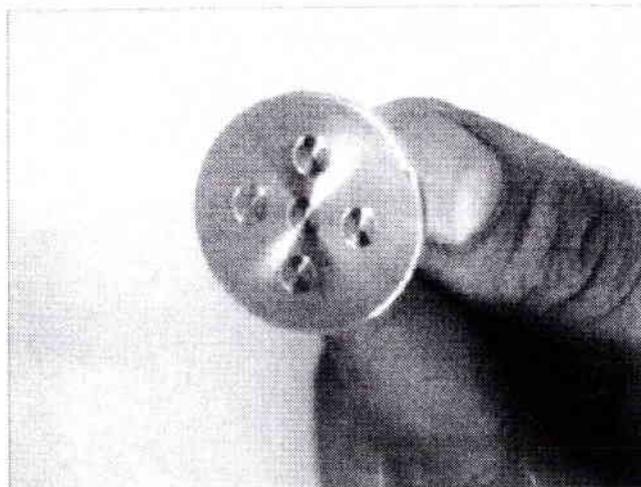
Des tests préliminaires ont montré qu'il n'y avait aucune différence spectrale entre ces deux types de dépôt. Nous avons donc choisi d'effectuer nos dépôts LDI sur le second porte-échantillon (b). En effet cette méthode comporte plusieurs avantages par rapport à la mise en solution, qui sont les suivants :

- Simplicité : une pointe de spatule de produit est déposée à la surface de la bande autocollante. Une simple pression de la spatule sur cette bande, suffit à fixer le composé.
- Rapidité : pas de protocole de nettoyage, la bande aluminée est retirée après analyse et remplacée par une autre.
- Non polluante : pas de risque de polluer l'analyte avec un solvant contenant des impuretés.

Il a été nécessaire cependant, de vérifier que la colle de la bande aluminée ne provoquait pas d'interférences ou de pics de masse parasites, pouvant être confondus avec ceux des produits analysés.

### **II.1.5. Dépôt MALDI**

Le porte-échantillon MALDI (figure III.11) quant à lui, est en inox et possède cinq cavités, dont les dimensions permettent de déposer un volume maximal de 5  $\mu$ L d'échantillon. L'énorme avantage par rapport au porte-échantillon LDI (figure III.10.a) réside dans la possibilité d'analyser, dans les mêmes conditions expérimentales, cinq dépôts qui peuvent être différents. La canne de transfert est centrée sur la cavité, se trouvant au milieu du porte-échantillon. Ainsi, en modifiant la position de la canne de transfert à l'aide de micromoteurs pilotés par ordinateur, on peut atteindre les quatre autres cavités avec une remarquable précision, grâce à la visualisation sur écran vidéo.



**Figure III.11** : Porte-échantillon MALDI de la FTMS.

En MALDI, la préparation du dépôt est une étape importante, voire même primordiale. Il existe, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, plusieurs façons de déposer les échantillons. La technique de préparation des échantillons choisie, est celle dite de "l'évaporation rapide", effectuée en deux étapes [50].

La matrice est solubilisée dans un solvant adéquat (voir tableau III.7). 2,5  $\mu\text{L}$  de solution surnageante (solution saturée en matrice) sont déposés sur le porte-échantillon MALDI. Le solvant, s'il s'agit du méthanol (très volatil), s'évapore très rapidement, permettant ainsi l'obtention d'une couche de cristaux plus ou moins homogène. Lorsque, l'eau est employée comme solvant, elle est évaporée sous vide primaire grâce à une petite enceinte reliée à une pompe à vide à membrane ( $10^{-2}$  Torr).

2.5  $\mu\text{L}$  d'une solution de photochromes à  $10^{-3}$  M dans le THF ou  $\text{CH}_3\text{CN}$  (voir tableau III.6), sont alors déposés sur les cristaux de la matrice. On constate une redissolution partielle de ces derniers, permettant après séchage à l'air ambiant, une co-cristallisation en surface entre la matrice et les molécules cibles. L'étape de la co-cristallisation, est suivie sous loupe binoculaire afin d'apprécier la qualité du dépôt. Elle doit répondre à deux critères importants : une germination rapide (facilitée par un faible volume déposé) et une homogénéité d'ensemble. La germination est d'autant plus rapide, si le porte-échantillon comporte des aspérités en surface [51].

Ce protocole d'échantillonnage a été dicté d'après des résultats préliminaires. En effet, en inversant l'ordre des dépôts ou en utilisant la méthode dite de la goutte séchée (dépôt d'un mélange matrice/analyte en solution) [43], la qualité du spectre s'en trouve modifiée. Parallèlement des essais en variant le rapport des concentrations analyte/matrice, ont montré qu'un rapport 1/100 offrait les meilleurs résultats. Malheureusement, nous ne pourrions pas quantifier ces différences, car la technique MALDI est beaucoup trop fluctuante. Dans le cas

de l'étude des photochromes, on se rend compte que la méthode de déposition en deux étapes, offre une meilleure reproductibilité des résultats.

Le nettoyage du porte-échantillon est effectué selon le protocole suivant :

1. rinçage au MeOH et essuyage à l'aide d'un chiffon en papier.
2. passage aux ultrasons pendant 15 minutes dans 100 mL d'un mélange eau, MeOH, acide acétique (1:1:1).
3. rinçage au MeOH et séchage à l'air.

Une fois que le dépôt est réalisé et visualisé sous la loupe binoculaire, l'expérimentateur peut donc contrôler et optimiser les paramètres laser pendant que le vide se fait dans la chambre d'échantillonnage.

## ***II.2. Contrôle et optimisation des paramètres laser***

Les lasers d'ionisation que nous avons couplés au spectromètre de masse à transformée de Fourier sont les suivants :

- Un laser excimère : Les lasers excimères sont des lasers pulsés à gaz, émettant dans le domaine spectral de l'UV. Le milieu laser est un mélange de gaz contenant un gaz rare, un halogène et le tampon. La plupart des lasers excimères sont pompés par une décharge électrique qui conduit à la formation d'excimères. Les excimères utilisés sont ArF et KrF, émettant respectivement à 193 et 248 nm.
- Un laser Nd:YAG : Ce laser solide utilise comme émetteur les ions trivalents de néodyme ( $\text{Nd}^{3+}$ ) présents à l'état de dopants dans un cristal de grenat d'alumine à l'yttrium (Yttrium Aluminium Garnet :  $\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ ). Le pompage d'un tel laser est habituellement effectué en soumettant le barreau cristallin à un pompage par lampe flash. L'émission dominante du laser Nd:YAG se trouve à  $\lambda_0 = 1\ 064$  nm (Infrarouge), mais il est possible de générer les : deuxième ( $\lambda = 532$  nm), troisième ( $\lambda = 355$  nm) et quatrième harmonique ( $\lambda = 266$  nm) de cette longueur d'onde fondamentale, à l'aide de cristaux doubleur ou tripleur en fréquence (KDP<sup>1</sup>). Ainsi, on peut déplacer l'émission de l'infrarouge à l'UV en fonction de la matrice utilisée.

---

<sup>1</sup> KDP : Cristal de phosphate de potassium deutéré

La longueur d'onde et le temps d'impulsion sont spécifiques au type de laser utilisé (voir tableau III.1). D'autres paramètres ont dû être contrôlés afin d'avoir une idée précise de l'irradiance déposée sur nos échantillons.

### II.2.1. Mesure de l'énergie

La mesure de l'énergie d'un faisceau laser est réalisée au moyen d'une cellule pyroélectrique, fabriquée en métal, permettant ainsi d'obtenir une forte diminution des interférences électromagnétiques.

En fait, la tête de la cellule est composée d'une céramique pyroélectrique, d'un dissipateur calorifique et d'un revêtement absorbant constitué de noir de carbone fritté.

Le principe est le suivant : la lumière arrivant sur le revêtement absorbant, est transformée en chaleur, qui traverse la céramique pour arriver jusqu'au dissipateur calorifique. La céramique produit alors une tension proportionnelle à la variation moyenne de température de la céramique.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé une cellule Gentec<sup>®</sup> (ED 200). Ce type de cellule est couplé à un oscilloscope qui indique la tension atteinte lors d'une impulsion laser ( $V_{lue}$ ). L'énergie est alors calculée par la relation :

$$E = \frac{V_{lue}}{\text{Facteur de calibration}}$$

où le facteur de calibration est une donnée du constructeur, stable dans le temps.

En fait, pour la cellule ED 200, utilisée au laboratoire, la conversion entre la différence de potentiel et l'énergie est donnée par :

$$1 \text{ mV} = 90 \mu\text{J}$$

Cette cellule, d'une grande sensibilité, ne supporte pas plus d'une centaine de mJ, au-delà de ces valeurs, elle risque d'être fortement endommagée. Des mesures de fluctuation de l'énergie laser (sur 50 tirs) ont montré des écarts de l'ordre de 10 % sur le laser Brilliant et de 5 % sur l'excimère.

En pratique, l'énergie laser sur le Brilliant peut être modulée en jouant sur le temps de déclenchement de la cellule de Pockells (responsable de la distribution gaussienne de l'énergie laser), à l'aide d'un potentiomètre. Sur le laser excimère, l'énergie est proportionnelle à la valeur de la tension appliquée sur les capacités, responsables de la décharge électrique. Cette valeur est choisie à l'aide d'un ordinateur.

Il est important également de vérifier au cours de l'analyse, si celle-ci dure plusieurs heures, la stabilité de l'énergie laser au cours du temps, car selon le type de laser, cette variation peut atteindre plus de 30 %.

### **II.2.2. Contrôle du profil laser**

La vision d'un faisceau laser apporte les deux indications suivantes :

- la forme du faisceau,
- l'homogénéité du faisceau ou la présence de points chauds.

Avant chaque analyse, il est donc nécessaire de contrôler ces deux points importants. Cela peut se faire rapidement (contrôle qualitatif) en insérant, entre l'entrée du hublot de la FTMS et le télescope, un papier photosensible qui donnera l'empreinte du faisceau laser en temps réel. Un réglage minutieux des prismes et des optiques de la platine optique externe permettra alors l'obtention de l'empreinte voulue.

Il est également possible d'effectuer des contrôles quantitatifs ; au laboratoire nous disposons pour cela d'un profilomètre (EXITECH) et d'un logiciel (Profile256™). Ce logiciel permet d'établir un bon diagnostic du profil du faisceau laser en le visualisant sur l'écran d'un ordinateur. Il est également utilisé pour représenter les profils en 3D : il permet donc d'obtenir des données sur la forme du faisceau, sur son énergie et sur son homogénéité. Le profil du laser excimère apparaît conforme à la théorie, il est très homogène et de forme "rectangulaire". L'optique sur la FTMS étant optimisée pour recevoir un faisceau lumineux de forme circulaire, un diaphragme est placé devant la platine optique. Pour le YAG Brilliant, là aussi, on est très proche de la théorie : il a une forme gaussienne, compacte, et ne présente pas de points chauds. Ces points chauds signifieraient que nous aurions une forte densité d'énergie sur une petite surface du faisceau laser. Ils peuvent induire par conséquent, des mécanismes d'interaction laser-matière, différents de ceux escomptés. Mais ce risque est minimisé, puisque tous nos faisceaux laser arrivent perpendiculaire à la surface de l'échantillon, donnant ainsi une répartition optimale de l'énergie.

En pratique, ce type de contrôle est effectué lors d'achat d'un nouveau laser ou lorsqu'après un contrôle sur papier photosensible, un problème d'homogénéité est détecté.

Pour notre étude, nous nous sommes contentés de contrôles qualitatifs. Les critères étaient les suivants : spot laser de forme circulaire, homogène (pas de points chauds) et intense avant l'entrée hublot FTMS.

### II.2.3. Etalonnage de l'irradiance laser

C'est en maîtrisant ce paramètre que l'on va se placer dans des conditions d'ionisation dites "douces" : la désorption laser.

On rappelle que l'irradiance laser (ou densité de photons) est définie de la façon suivante :

$$\mathbf{Irr} = \frac{\mathbf{E}}{\mathbf{S} \cdot \boldsymbol{\tau}} \quad (\text{W.cm}^{-2})$$

avec : E = énergie de l'impulsion laser déposée sur l'échantillon (J)  
 S = surface de l'impact laser sur échantillon (cm<sup>2</sup>)  
 τ = durée de l'impulsion laser, en seconde (s)

L'interface laser sur la FTMS est équipée d'un télescope permettant de focaliser ou d'agrandir la surface du spot laser. Ainsi, en gardant une énergie laser constante sur l'échantillon, il est possible de moduler l'irradiance laser, puisque que la durée d'impulsion est constante (donnée constructeur).

Cette façon de procéder réduit les chances d'avoir des points chauds, car lors de la défocalisation du télescope (agrandissement de la surface irradiée), nous conservons toujours le même nombre de photons.

L'étalonnage de l'irradiance est réalisé en travaillant sur un film mince de PET<sup>1</sup>. Pour chaque défocalisation du télescope, les diamètres d'impacts laser obtenus, sont mesurés sous contrôle d'un microscope optique. Un exemple d'étalonnage de l'irradiance sur la FTMS à 266 nm est donné dans le tableau III.9.

Position du télescope	Foc	-2 tours	-4 tours	-8 tours	-10 tours	-15 tours
énergie entrée hublot (mv)	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
énergie (μJ) sur échantillon transmission optique = 0,38	188	188	188	188	188	188
diamètre d'impact en μm	15	60	180	420	560	940
temps d'impulsion en ns	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3	4,3
calcul de la surface en μm <sup>2</sup>	177	2 827	25 447	138 544	246 301	693 978
calcul de l'irradiance en W/cm <sup>2</sup>	2,5.10 <sup>10</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	1,7.10 <sup>8</sup>	3,2.10 <sup>7</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	5,0.10 <sup>6</sup>

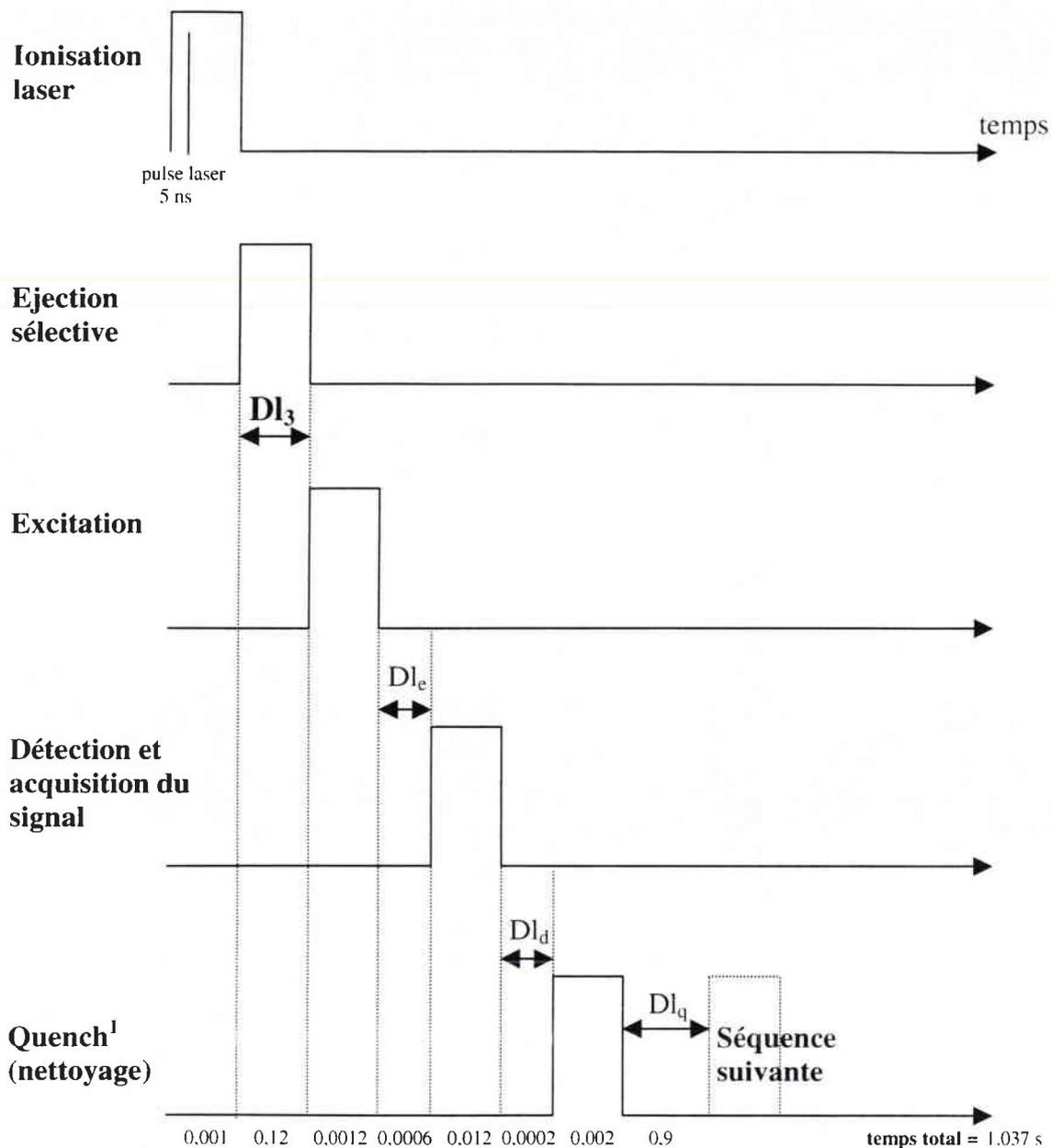
**Tableau III.9 :** Etalonnage de l'irradiance laser FTMS à 266 nm.

Après contrôle et optimisation des paramètres laser, l'expérimentateur devra, à l'aide du logiciel Odyssey, élaborer une séquence d'analyse, qui devra à son tour être optimisée.

<sup>1</sup> PET : Polyéthylène téréphtalate

### II.3. Optimisation de la séquence d'analyse FTMS

La séquence standard utilisée pour l'analyse LDI et MALDI de sondes moléculaires photochromiques est la suivante (voir figure III.12) :



**Figure III.12** : Séquence d'analyse FTMS utilisée lors des analyses par LDI et MALDI.

Nos lasers sont optimisés pour fonctionner à 1 Hz, c'est pourquoi nous ajustons toujours le  $Dl_q$ , afin que la durée de la séquence d'analyse soit égale au minimum à 1 seconde.

<sup>1</sup> Quench : Il permet en appliquant un fort potentiel (de l'ordre de 10 volts) sur les plaques de piégeage de purger la cellule de tous les ions résiduels qu'elle contient

Nous avons donc recherché quels étaient les paramètres FTMS importants pour notre étude. Une séquence optimale, doit répondre essentiellement à deux critères :

### ***II.3.1. Limitation du nombre d'ions dans la cellule***

Une accumulation trop importante d'ions dans la cellule FTMS peut être un frein à l'obtention de spectres présentant une bonne résolution et un bon rapport signal sur bruit (S/N) [52].

En effet, la présence d'un nombre important d'ions de même masse dans la cellule, peut induire des effets de charges ou des répulsions entre les ions. Ces phénomènes sont synonymes de dégradation du signal. Ce paramètre est d'autant plus sensible dans la configuration de la microsonde du laboratoire LSMCL, puisque les lignes de champ électrique dans la cellule source ne sont pas parfaitement parallèles lorsque le potentiel de piégeage des ions est appliqué (ceci est dû au fait de la présence du porte-échantillon légèrement à l'intérieur de la cellule côté source). Du fait d'une source d'ionisation interne, nous ne pouvons pas contrôler aussi facilement l'abondance des ions produits lors d'une irradiation laser, contrairement à une source externe [53]. Cependant, différents paramètres d'atténuation (potentiel de piégeage, filtre d'atténuation de l'excitation RF, filtre d'atténuation du signal en détection) permettent de limiter le nombre d'ions dans la cellule, à la fois, lors de l'excitation et lors de la détection. Nous pouvons également éjecter un ou plusieurs types d'ions. C'est ce que nous avons fait en émettant une gamme de radiofréquences appropriées correspondant à l'intervalle de masses (17-100 uma). Ceci nous a permis d'éjecter les ions de basse masse, et notamment ceux correspondant aux cations alcalins ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) provenant de la matrice ou parfois du solvant résiduel adsorbé.

### ***II.3.2. Limitation du temps global de l'analyse***

La différence fondamentale existant entre une microsonde FTMS et un appareil à temps de vol (TOF), couramment utilisé en MALDI [54], est la durée de l'analyse. En effet, si l'enregistrement complet d'un spectre de masse en TOF dure quelques centaines de microsecondes, il est de plusieurs dizaines de millisecondes en FTMS.

Or, les molécules étudiées peuvent être instables si l'augmentation de leur énergie interne, lors de l'ionisation, est trop importante. Il y a alors des fragmentations, rendant l'interprétation spectrale plus difficile. En tout état de

cause, plus le temps d'analyse est important, plus les risques de fragmentation par collision sont élevés.

La réduction de la durée globale de la séquence a été obtenue grâce à la limitation de deux paramètres :

- les écarts de temps (ou délais) qui existent entre les différents événements d'une séquence (ionisation, excitation, détection, ...),
- les gammes de masses excitées et détectées.

Tout d'abord, les différents délais (dont le principal est le temps variable  $DI_3$ ), qui se situe entre la fin de l'ionisation et le début de l'excitation des ions, est fixé à 0 s. De ce fait, le temps entre ces deux événements est réduit au temps de l'éjection des ions de basse masse. Un délai incompressible de 200  $\mu$ s environ, est appliqué entre l'excitation et la réception pour éviter d'enregistrer l'influence des plaques excitatrices sur les plaques de détection.

Enfin, toujours pour obtenir un temps total d'investigation le plus court possible, la gamme de masses excitées et détectées a été limitée (voir tableau III.10). L'enregistrement des spectres de masse se faisant sur 64 Koctets, la réduction de la plage en masse permet également une meilleure résolution spectrale.

En définitif, les paramètres de la séquence peuvent être résumés de la façon suivante :

Paramètres	Valeurs	
Configuration	Porte échantillon interne	
Ionisation laser UV	1 seul tir	
Potentiel de piégeage (V)	+ 1,5 (ion positif)	-2,0 (ion négatif)
$DI_3$ (ms)	0	
Vitesse de balayage de la RF (Hz/ $\mu$ s)	2 200	
Atténuation de la RF (dB)	0	
Ejection des ions de masse (uma)	17-100	
Gamme de masses excitées (uma)	17	2 000
Fréquences correspondantes (Hz)	2 670 202	23 290
Temps d'excitation ( $\mu$ s)	1 200	
Détection à partir de la masse (uma)	100	
Fréquence correspondante (Hz)	941 176	
Atténuation du signal (dB)	<b>LDI</b> 20	<b>MALDI</b> 5
Nombre de points (numérisation)	65 536	
Durée de la détection (ms)	12,85	

**Tableau III.10 :** Paramètres de la séquence FTMS pour l'analyse LDI et MALDI.

L'atténuation du signal en LDI est plus élevée qu'en MALDI, car l'analyse est réalisée à partir de produit pur. Une valeur faible, provoquerait des

dédoublés de pics de masse, due à une trop forte abondance d'ions dans la cellule, occasionnant ainsi des fluctuations sur les fréquences cyclotroniques par effets de charges.

### **III. Conclusion**

La spectrométrie de masse à transformée de Fourier connaît à l'heure actuelle un développement important. Ses principaux atouts : la très haute résolution en masse et la possibilité d'étudier plusieurs générations d'ions successives ( $MS^n$ ), en font un outil analytique hors pair.

Son couplage avec une source laser, datant de plus d'une dizaine d'années, rend cette technique encore plus polyvalente. De l'analyse de surface par LDI, à l'analyse de biopolymères par MALDI, elle trouve de nombreuses applications variées.

Tout au long de ce chapitre, nous avons tenté de donner le maximum d'informations au lecteur, afin de mieux cerner les problèmes susceptibles de se produire lors d'une analyse par LDI et par MALDI/FTMS.

Pour cette étude, portant sur les processus physico-chimiques intervenant en MALDI, nous avons consacré une part importante à l'explication de la préparation des échantillons, aux contrôles des différents paramètres laser, ainsi qu'à l'optimisation de la séquence d'analyse FTMS. Ces renseignements seront utiles à une meilleure compréhension des résultats.

★ ★ ★

## Bibliographie

- [1] M.B. Comisarow et A.G. Marshall, *Chem. Phys. Lett.*, **1974**, 25, 282.  
[2] M.B. Comisarow et A.G. Marshall, *J. Mass Spectrom.*, **1996**, 31, 581.  
[3] S.J. Pastor et C.L. Wilkins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **1997**, 8, 225.  
[4] F.W. McLafferty, *Acc. Chem. Res.*, **1994**, 27, 379.  
[5] H.R. Padley, S. Bashir et T.D. Wood, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 2914.  
[6] D.A. Laude, R.S. Brown, C.L. Johlman, D.A. Weil et C.L. Wilkins, *Org. Mass Spectrom.*, **1986**, 5, 107.  
[7] C. Masselon, *Thèse en Chimie-Physique*, Metz, **1997**.  
[8] C.L. Holliman, D.L. Rempel et M.L. Gross, *Mass Spectrom. Rev.*, **1994**, 13, 105.  
[9] S. Guan et A.G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1995**, 146, 261.  
[10] T. Dienes, S.J. Pastor, S. Schürch, J.R. Scott, J. Yao, S. Cui et C.L. Wilkins, *Mass Spectrom. Reviews*, **1996**, 15 ; 163.  
[11] A.G. Marshall et B.P. Grosshans, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 215A.  
[12] A.G. Marshall et F.R. Verdun, *Fourier Transform in NMR, Optical and Mass Spectrometry*, Elsevier scientific. Amsterdam **1990**.  
[13] J.F. Muller, F. Tollite, G. Krier et M. Pelletier, *Brevet n° 88-09438 Protection France, Suisse, Allemagne, Japon et Grande Bretagne*.  
[14] J.F. Muller, F. Tollite, G. Krier, M. Berveiller, A. Eberhardt et S. Dominiak, *Brevet n° 86-18244 publié le 24 juin 1988 sous le n° 608837*.  
[15] J.F. Muller, M. Pelletier, G. Krier, D. Weil et J. Campana, *J. Proceedings of the 24<sup>th</sup> Conference of the Microbeam Analysis Society-Ashville*, San Francisco press, **1989**, 311.  
[16] M. Pelletier, G. Krier, J.F. Muller, D. Weil et M. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1988**, 2, 146.  
[17] A.G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1996**, 157/158, ix.  
[18] C. Giancaspro, F.R. Verdun et J.F. Muller, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1986**, 72, 63.  
[19] T.C.L. Wang, T.L. Ricca et A.G. Marshall, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 2935.  
[20] S. Guan, A.G. Marshall et M.C. Wahl, *Anal. Chem.* **1994**, 66, 1363.  
[21] S. Guan et A.G. Marshall, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.*, **1996**, 157/158, 5.  
[22] Y. Huang, L. Pasa-Tolic, S. Guan et A.G. Marshall, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 4385.  
[23] C.F. Ijames et C.L. Wilkins, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 1295.  
[24] T. Solouki, L. Pasa-Tolic, G.S. Jackson, S. Guan et A.G. Marshall, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3718.  
[25] M. Decouzon, J.F. Gal, M. Herreros, P.C. Maria, J. Murrell et J.F.J. Todd, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 242.  
[26] J.A. Castoro, C. Kôster and C.L. Wilkins, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 784.  
[27] S. Guan et A. G. Marshall, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, 1.  
[28] B.S. Freiser, *Chemtracts-Analytical and Physical Chemistry*, **1989**, 1, 65.  
[29] A. Ingendoh, G. Baykut et T. Zhang, P. Speir et G. Kruppa, *14<sup>th</sup> IMSC*, **1997**, Finland.  
[30] R. Chen, X. Cheng, D.W. Mitchell, S.A. Hofstadler, Q. Wu, A.L. Rockwood, M.G. Sherman et R.D. Smith, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 1159.  
[31] N.Y.C. Chu, *"Photochromism": Molecules and Systems*, Ed. H. Dürr et H. Bouas-Laurent, Elsevier, Amsterdam, **1990**, Chap. 10 et 24.  
[32] P. Laréginie, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, France, **1995**.  
[33] P. Laréginie, A Samat et R. Guglielmetti, *Heterocycl. Comm.*, **1995**, 12, 119.  
[34] R.C. Bertelson, *"Photochromism"*, Ed. G.H. Brown, J. Wiley and Sons Inc., New York, **1971**, Chap. 3.

- [35] R. Guglielmetti, *"Photochromism": Molecules and Systems*, Ed. H. Dürr et H. Bouas-Laurent, Elsevier, Amsterdam, **1990**, Chap. 8.
- [36] R. Gautron, *Thèse-ès-Sciences*, Strasbourg, France, **1967**.
- [37] J.L. Pozzo, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, France, **1994**.
- [38] G. Harié, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, France, **1996**.
- [39] J.L. Pozzo, A. Samat, R. Dubest et R. Guglielmetti, *Helv. Chim. Acta* (sous presse).
- [40] E. Maler-Grenger et R. Guglielmetti, *Act. Cryst.*, **1982**, B38, 1980.
- [41] M. Inouye, K. Akamatsu et H. Nakazumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9160.
- [42] C.J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, **1967**, 89, 2495.  
D.V. Dearden, H. Zhang, I.H. Chu, P. Wang et Q. Chen, *Pure and Appl. Chem.*, **1993**, 65, 3, 423.
- [43] M. Karas et F. Hillenkamp, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2299.
- [44] T. Solouki et D.H. Russell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89, 5701.
- [45] M.E. Gimon, L.M. Preston, T. Solouki, M.A. White et D.H. Russell, *Org. Mass Spectrom.*, **1992**, 27, 827.
- [46] M.C. Fitzgerald, G.R. Parr et L.M. Smith, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 3204.
- [47] Y.H. Liu, J. Bai, X. Liang et D.M. Lubman, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 3482.
- [48] S. Zhao, K.V. Somayajula, A.G. Sharkey et D.M. Hercules, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 338, 588.
- [49] P. Cassat, *Thèse en Chimie-Physique*, Metz, **1998**.
- [50] O. Vorm, P. Roepstorff et M. Mann, *Anal. Chem.*, **1994**, 66, 3281.
- [51] P. Manuelli, *Thèse en Chimie-Physique*, Metz, **1995**.
- [52] B.J.E. Bruce, X. Cheng, R. Bakhtiar, Q. Wu, S.A. Hofstaddler, G.A. Anderson et R.D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7839.
- [53] Y. Li et R.T. McIver, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 743.
- [54] S. Borman, *Science/Technology*, **1995**, 19 juin, 23.

# Chapitre IV

## Caractérisation de spironaphtoxazines par Ablation/Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse

Dans un premier temps, afin de comprendre la spécificité de l'ionisation laser, nous avons été amené à comparer l'influence de quatre modes d'ionisation sur le comportement de la spironaphtoxazine de base (non substituée).

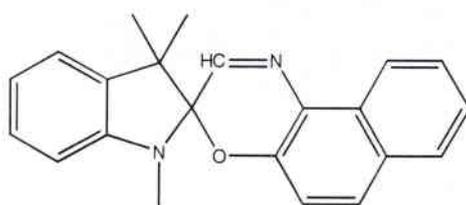
Cette étude démontrant des différences significatives entre ces différents modes d'ionisation, nous a conduit dans un second temps, à élargir nos investigations sur des spironaphtoxazines substituées, afin de mieux appréhender leur mécanisme de phototransformation sous irradiation laser, et cela en vue d'une caractérisation plus aisée par spectrométrie de masse.

Ce travail nous servira lors du chapitre V, de bases de données pour une étude plus approfondie sur la compréhension de l'étape de l'ionisation, intervenant au cours du processus MALDI.

## I. Analyse comparative de la spironaphtoxazine non substituée par différentes techniques d'ionisation

En premier lieu, nous avons comparé le comportement de la spironaphtoxazine non substituée (figure IV.1) sous différents modes d'ionisation : l'ionisation par faisceau d'électrons (EI) à 70 eV, l'ionisation chimique (CI) par CH<sub>3</sub>CN, l'ionisation par désorption laser directe (LDI) et l'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI). Il s'agira ici, de faire ressortir les spécificités de chacune, en comparant les fragments obtenus.

Les analyses par impact électronique et par ionisation chimique ont été effectuées à l'aide d'une trappe ionique (ITMS, Saturn 2 000). 1 µL d'une solution à 800 µg/mL de photochromes dans le THF, a été à chaque fois nécessaire.



Poids Moléculaire : 328

Figure IV.1 : Structure de la spironaphtoxazine non substituée.

### I.1. Ionisation par faisceau d'électrons (EI)

Le spectre de masse EI de la spironaphtoxazine non substituée est présenté sur la figure IV.2 :

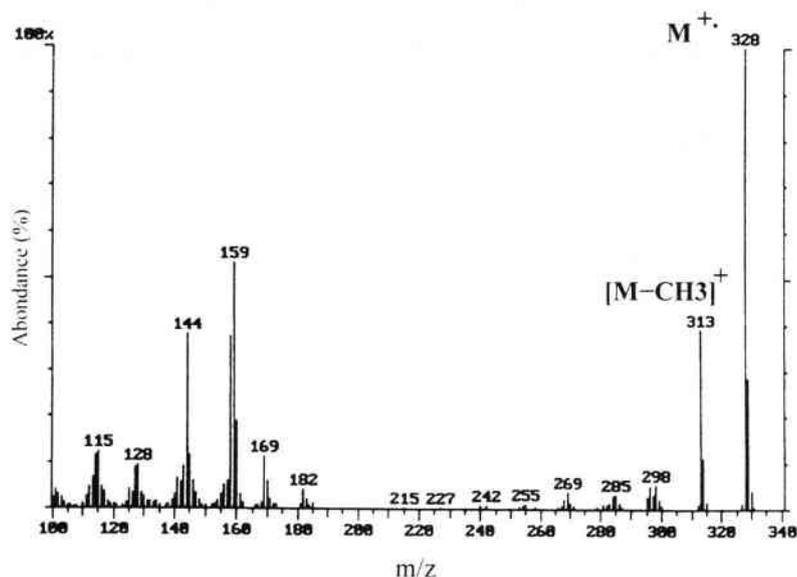


Figure IV.2 : Spectre de masse EI (70 eV)-ITMS de la spironaphtoxazine non substituée.

En raison de la présence de deux azotes sur la molécule, le pic de masse paire 328 majoritaire, représente l'ion radical moléculaire  $M^+$ . Les autres ions observés de plus basse masse, correspondent à la fragmentation de cet ion, dont les plus représentatifs sont : 313 ( $[M-CH_3]^+$ ), 169, 159 et 144.

Jusqu'à présent, on ne retrouve dans la littérature que peu de renseignements concernant l'étude de la fragmentation des spirooxazines par spectrométrie de masse [1]. La formation des ions fragments 159 et 169 (figure IV.3) indiquent toutefois, que les liaisons  $C_{\text{indoline}}-C_{\text{oxazine}}$  d'une part, et  $C_{\text{indoline}}-O_{\text{oxazine}}$  d'autre part, sont les plus facilement rompues. L'observation de ces deux pics de fragmentation en EI, nous amène à penser qu'il existerait deux sites de première ionisation (figure IV.3) : l'un se situant sur l'azote de la fonction indoline, l'autre très vraisemblablement sur l'oxygène oxazinique. L'ion 144 quant à lui, est issu de la perte d'un groupement  $CH_3$  appartenant à l'espèce 159.

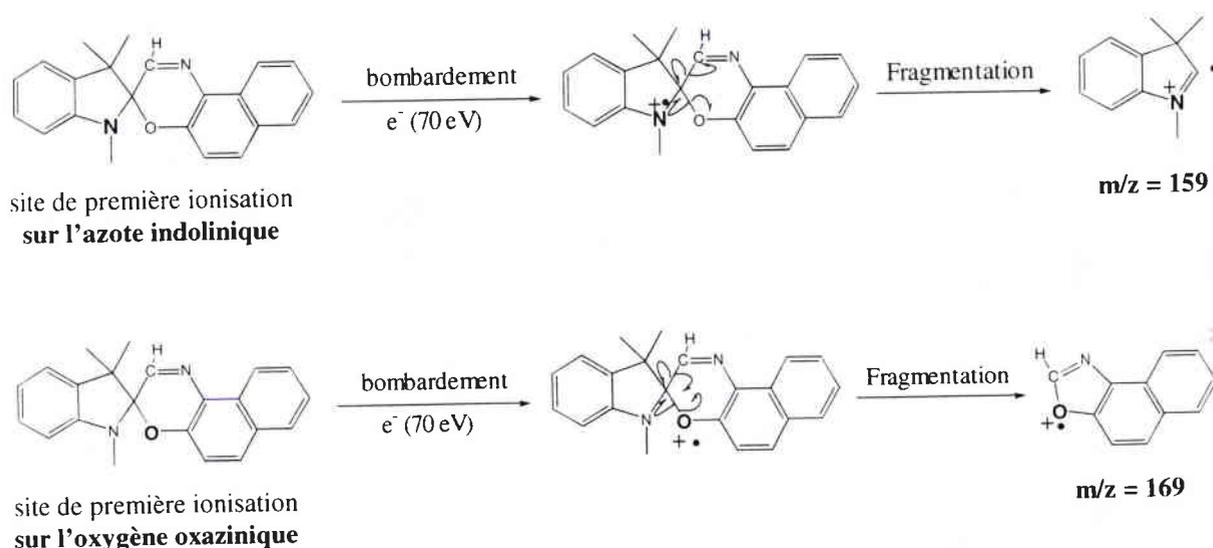
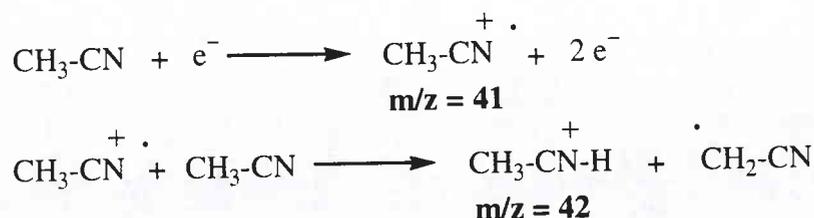


Figure IV.3 : Mécanisme de fragmentation observé en EI (70 eV).

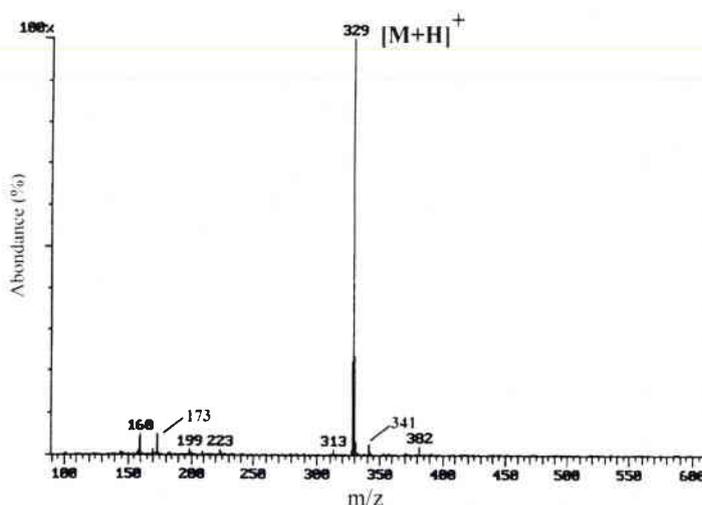
## 1.2. Ionisation chimique (CI)

Pour l'ionisation chimique, le gaz employé est l'acétonitrile<sup>1</sup>. Les ions primaires réactifs sont obtenus selon les mécanismes suivants :



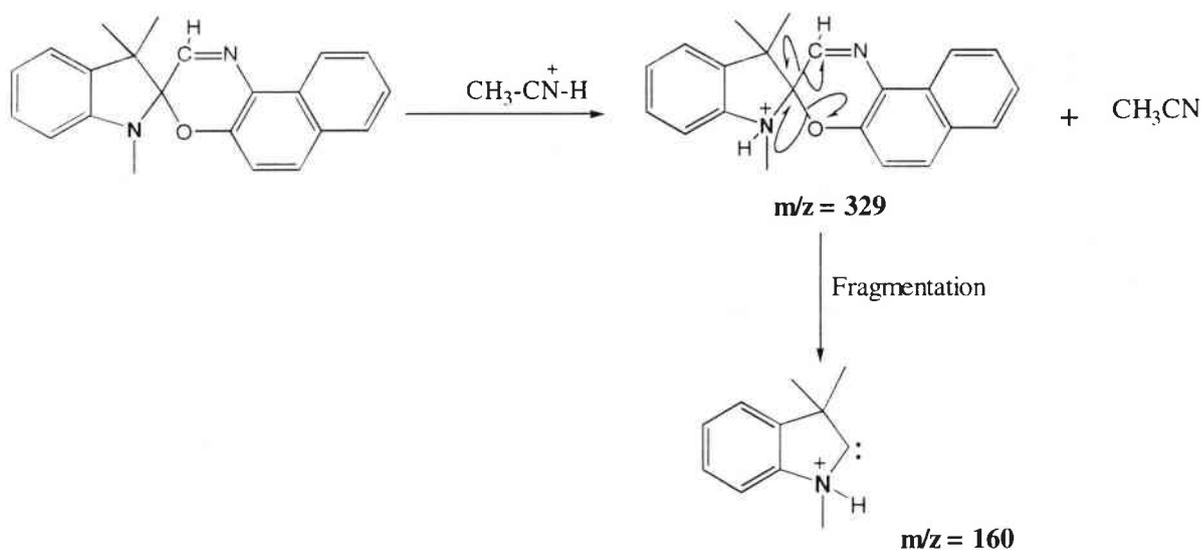
<sup>1</sup> L'avantage de cette molécule pour l'ionisation chimique est d'une part, d'être un liquide facilement vaporisable et d'autre part, d'avoir une affinité protonique semblable ( $786 \text{ kJ/mol}^{-1}$ ) à  $NH_3$  ( $858 \text{ kJ/mol}^{-1}$ ) ou à  $i-C_4H_{10}$  ( $824 \text{ kJ/mol}^{-1}$ ), gaz réactifs les plus couramment utilisés en ionisation chimique

Comme le montre la figure IV.4, le spectre de la spironaphtoxazine non substituée en ionisation chimique par  $\text{CH}_3\text{CN}$ , se caractérise par la présence du pic pseudo-moléculaire  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ( $m/z$  329) fortement majoritaire. L'ion réactif de l'acétonitrile protoné ( $[\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}]^+$ ) échange son proton avec la molécule photochromique. Ce transfert protonique s'effectue sur les deux sites de première ionisation (azote indolinique et oxygène oxazinique), puisque nous observons la présence des pics de masse ( $m/z = 160$  et  $170$ ), provenant de la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire. Cependant, cet échange protonique semble s'effectuer de manière plus importante sur l'azote indolinique, car le rapport des intensités des masses 160/170 est supérieure à 3.



**Figure IV.4 :** Spectre de masse CI ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )-ITMS de la spironaphtoxazine non substituée.

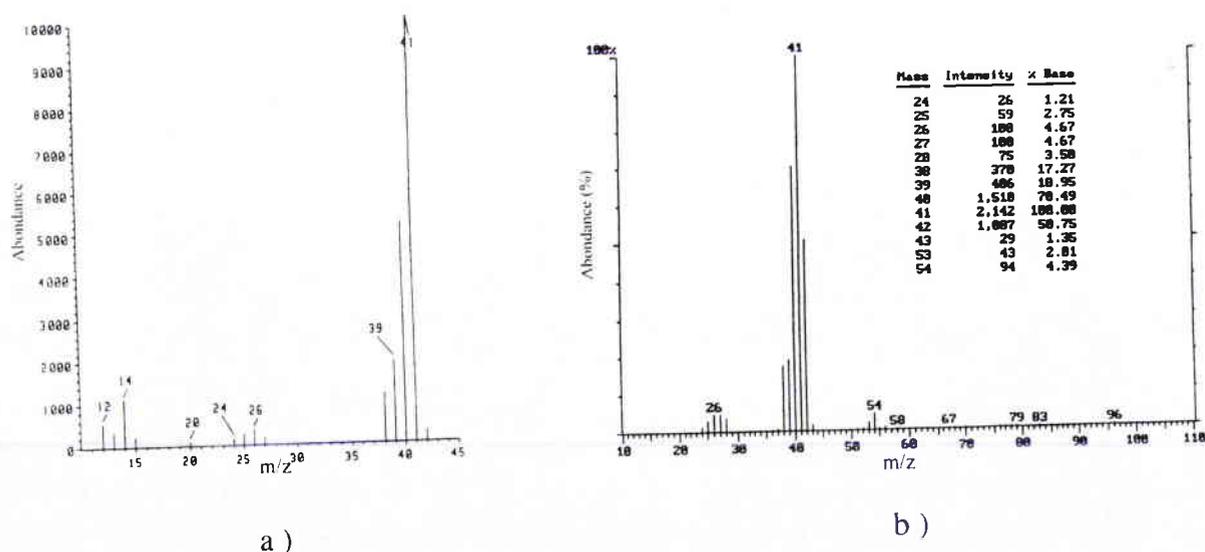
De ce fait, le comportement de la spironaphtoxazine sous ionisation chimique par l'acétonitrile peut être schématisé de la façon suivante (voir figure IV.5) :



**Figure IV.5 :** Mécanisme de fragmentation observé en CI ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ).  
Site de première ionisation sur l'azote indolinique.

La spironaphtoxazine subirait le même schéma de fragmentation qu'en impact électronique, mais du fait du transfert protonique de l'acétonitrile sur l'azote ou sur l'oxygène, nous observons un décalage d'une unité en masse sur les ions fragments observés en EI : 160 au lieu de 159 et 170 au lieu de 169. L'ionisation chimique étant une technique d'ionisation plus douce que l'impact électronique à 70 eV, induit une fragmentation de la molécule cible plus modérée. Cependant, en observant plus attentivement le spectre CI de la figure IV.4, on s'aperçoit que la molécule spiranique semble réagir avec des entités provenant de la décomposition de l'acétonitrile : des adduits à la masse  $m/z = 341$  et  $382$ , ainsi qu'un ion de plus basse masse ( $m/z = 173$ ) apparaissent sur le spectre CI. Ils étaient totalement absents du spectre de masse EI (voir figure IV.2).

Nous nous sommes alors intéressés davantage aux ions primaires de la réaction d'ionisation de l'acétonitrile (voir figure IV.6). A notre connaissance, il n'existe pas dans la littérature, de mécanisme complet expliquant l'ionisation de ce gaz réactif, ainsi que les espèces chimiques qui en résultent. La trappe ionique ne permettant pas l'observation d'ions de basse masse ( $m/z < 18$ ), nous avons complété l'analyse des produits secondaires de la réaction de l'ionisation de l'acétonitrile, à l'aide d'un spectromètre de masse GC/MS (filtre quadripolaire), dont les limites de détection en basse masse peuvent aller jusqu'à la masse du carbone ( $m/z = 12$ ).



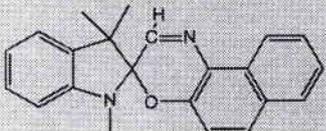
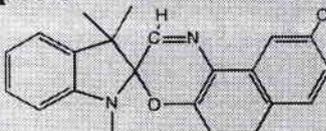
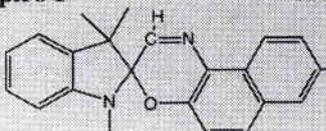
**Figure IV.6 :** Spectres de masse EI (70 eV) de l'acétonitrile :  
 a) obtenu par GC/Q-MS ( $P_{\text{source}} = 10^{-6}$  mbar) ;  
 b) obtenu par GC/IT-MS ( $P_{\text{source}} = 10^{-3}$ - $10^{-4}$  mbar).

Le produit majoritaire de l'ionisation de l'acétonitrile est l'ion moléculaire  $\text{CH}_3\text{CN}^+$  ( $m/z = 41$ ). On peut remarquer que l'ion pseudo-moléculaire  $[\text{CH}_3\text{CN}+\text{H}]^+$  est sensible à la pression, puisqu'à pression plus élevée

(conditions ITMS), l'intensité de cet ion est au-delà du rapport isotopique du  $^{13}\text{C}$ . Des ions issus de la décomposition de l'acétonitrile par perte successive d'un atome d'hydrogène, ( $m/z = 38, 39$  et  $40$ ) sont relativement nombreux. Nous notons également la présence en GC/Quad d'ions de plus basse masse ( $m/z = 12, 13, 14$  et  $15$ ), pouvant correspondre à des agrégats hydrogénés du carbone.

En tenant compte de la coexistence de telles espèces chimiques, dans le nuage gazeux réactif en ionisation chimique, nous pouvons interpréter les pics de masse apparaissant à  $m/z = 341$  et  $382$ , comme des adduits provenant très vraisemblablement de la décomposition de l'acétonitrile. L'ion  $m/z = 341$  pourrait correspondre à un adduit de CH sur la molécule spiranique, quant à l'ion à la masse  $m/z = 382$ , il correspondrait à un adduit de  $[\text{CH}_3\text{CN} + \text{CH}]$  sur cette même molécule. Concernant l'ion de plus basse masse ( $m/z = 173$ ), il serait un fragment de l'adduit  $m/z = 341$  ou  $382$ . Une expérience dite de MS/MS aurait certainement pu nous renseigner davantage sur la provenance de cet ion. Il aurait été également intéressant d'étudier la spironaphtoxazine non substituée avec l'acétonitrile deutéré ( $\text{CD}_3\text{CN}$ ), afin de confirmer la participation de l'entité chimique CH à l'ionisation de la molécule cible. L'utilisation d'un autre gaz réactif, comme par exemple le méthane, aurait été aussi une solution appropriée.

Deux autres composés spiro, dont les formules figurent dans le tableau IV.1, ont été également analysés en ionisation chimique par  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Des adduits identiques à ceux de la spironaphtoxazine non substituée ont été observés.

Composé	EI (70 eV)			CI ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )			
 Spiro O PM = 328	328	159	169	<u>329</u>	173	<u>341</u>	<u>382</u>
 Spiro I PM = 358	358	159	199	<u>359</u>	173	<u>371</u>	<u>412</u>
 Spiro IV PM = 406-408	406-408	159	247-249	<u>407-409</u>	173	<u>419-421</u>	<u>460-462</u>

**Tableau IV.1 :** Résultats complémentaires EI et CI obtenus pour deux autres composés spironaphtoxaziniques substitués. Les spectres de masse sont présentés en annexe C.

### I.3. Ionisation par désorption laser directe sur support

Nous avons représenté sur la figure IV.7, les spectres de masse LDI (266 nm) de la spironaphtoxazine non substituée, obtenus en ions positifs et négatifs, à des irradiances de  $5.10^7$  W/cm<sup>2</sup> et  $5.10^6$  W/cm<sup>2</sup>.

A irradiance modérée ( $5.10^7$  W/cm<sup>2</sup>), le spectre de masse en mode positif révèle une fragmentation intense de l'ion moléculaire M<sup>+</sup> (m/z = 328). Sa fragmentation : 313 ([M-CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>, 298, 285, 270 et 255 apparaît même plus importante que lors de l'analyse par impact électronique à 70 eV. Cela s'explique notamment par l'absorption importante de la spirooxazine à la longueur d'onde du laser incident ( $\epsilon_{266} = 16\ 000$  l.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>), et par le fait que les photons UV provoquent l'ouverture de la molécule, la rendant alors beaucoup plus fragile que la forme initialement fermée.

Il convient de signaler, qu'à forte irradiance laser ( $10^{10}$  W/cm<sup>2</sup>), aucun signal n'est observé. Le seuil d'apparition des ions spiraniques et de leurs fragments se situe aux alentours de  $5.10^8$  W/cm<sup>2</sup>. On pourrait alors penser, qu'au cours de l'interaction laser-matière, l'énergie cinétique transférée aux molécules est telle, qu'il est difficile de les détecter en FTMS (voir Chap.III, p. 93).

Lorsqu'on augmente la surface d'irradiation afin d'obtenir une irradiance laser plus faible, d'une valeur de  $5.10^6$  W/cm<sup>2</sup>, les pics de fragmentation ( $240 < m/z < 313$ ) baissent en intensité au profit de trois ions fragments de plus basse masse, m/z = 158, 160 et 182.

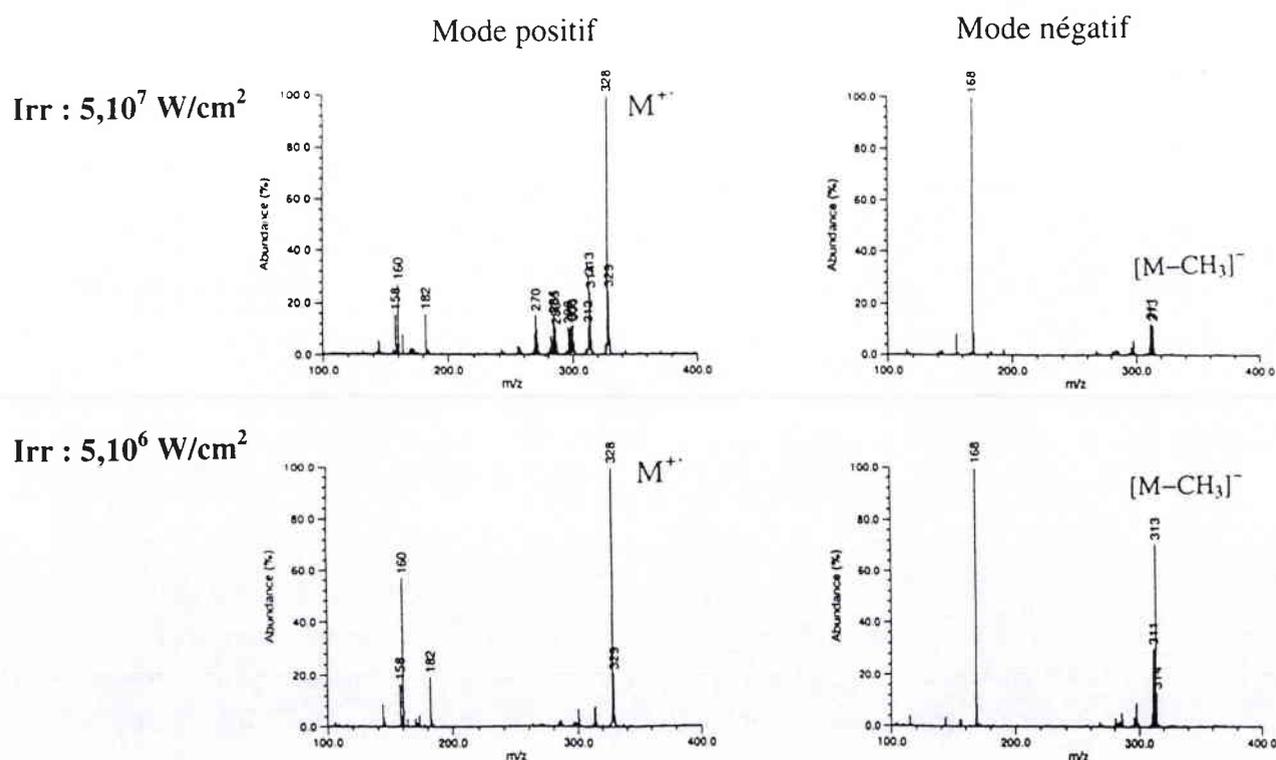
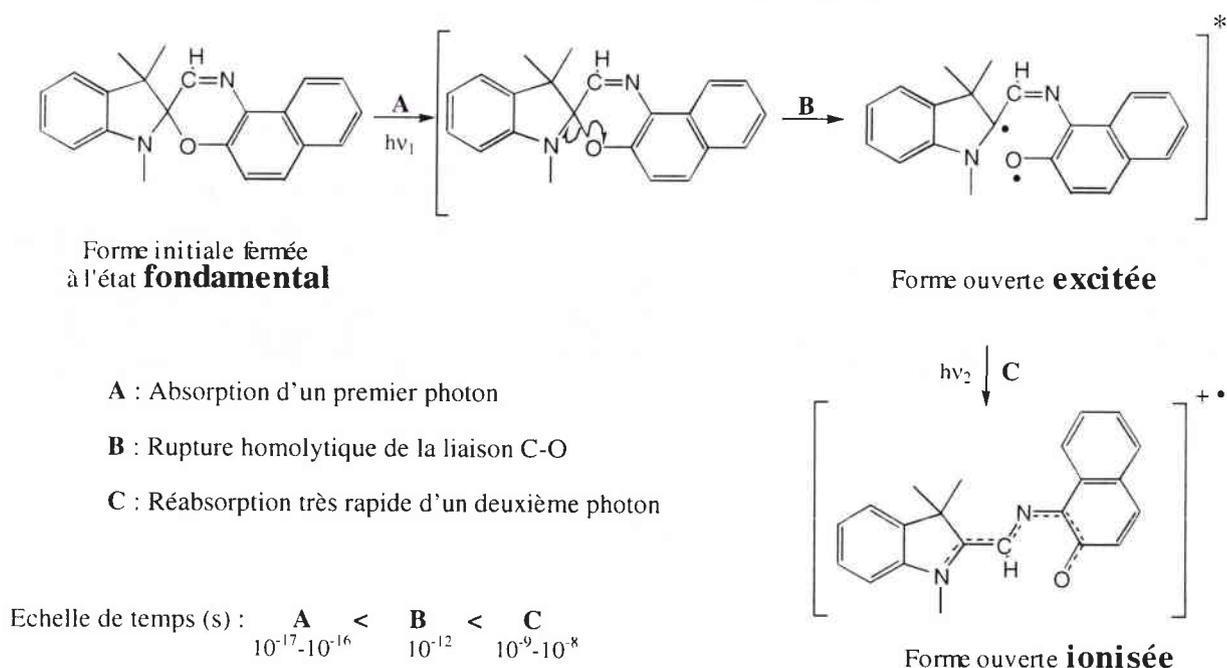


Figure IV.7: Spectres de masse LDI-FTMS à 266 nm de la spironaphtoxazine non substituée.

Les spectres en mode négatif quant à eux, démontrent l'émergence de deux types de fragmentation : l'ion  $m/z = 313$ , correspondant à la perte d'un groupement radicalaire ( $\cdot\text{CH}_3$ ) de la spirooxazine (fragment minoritaire), et l'ion négatif  $m/z = 168$  majoritaire, quelle que soit la valeur de l'irradiance laser.

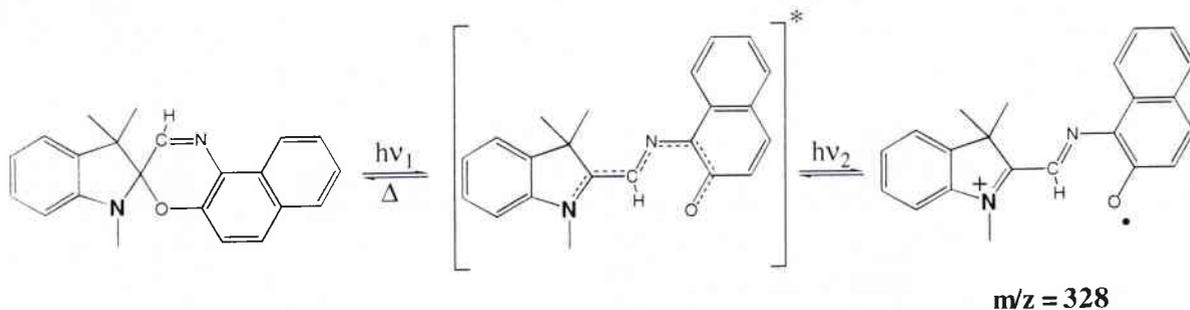
Etant donné que le potentiel d'ionisation de la majorité des composés organiques se situe aux alentours de 10 eV [2], nous pensons que l'ionisation de la spironaphtoxazine, dont on ignore le potentiel d'ionisation, s'effectue après désorption selon un processus d'absorption à 2 photons, puisque l'énergie d'un photon à 266 nm est égale à 4,66 eV. L'absorption ( $\tau = 10^{-17}$ - $10^{-16}$  s) d'un premier photon d'énergie  $h\nu_1$  par la molécule, permet son transfert vers l'état excité où la liaison C-O se rompt ( $\tau = 10^{-12}$  s) plus facilement ( $E = 5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) qu'à l'état fondamental [3]. Pendant la durée de l'impulsion laser ( $\tau = 5 \text{ ns}$ ), la réabsorption d'un deuxième photon d'énergie  $h\nu_2$  autorise le passage de la molécule ouverte (photomérocyanine) vers l'état ionisé (voir figure IV.8). Nous renvoyons le lecteur au chapitre I, paragraphe II.2.1., concernant les mécanismes de l'ionisation en phase gazeuse de molécules organiques.



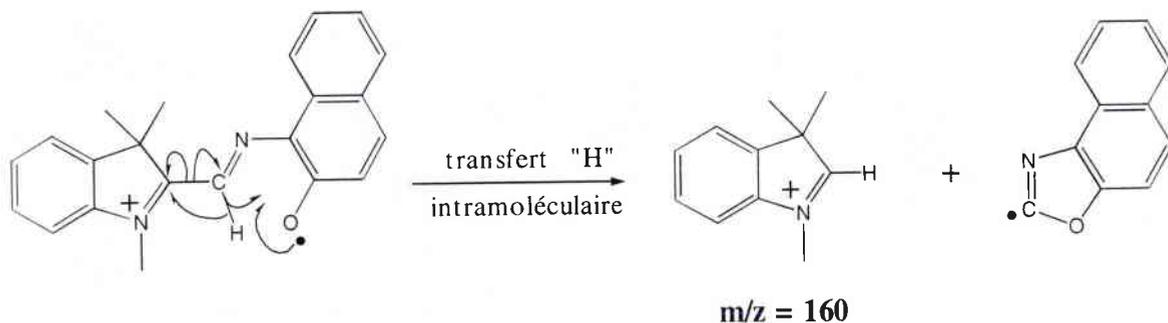
**Figure IV.8** : Schéma d'ionisation d'une molécule photochromique.

Comme nous l'avons fait pour l'impact électronique et l'ionisation chimique, nous allons à présent, proposer un mécanisme de photofragmentation de la spironaphtoxazine non substituée, en fonction de l'emplacement du site de première ionisation. Nous tenons à préciser que l'attribution des structures des ions fragments proposées a été validée par les effets des substituants décrits plus loin.

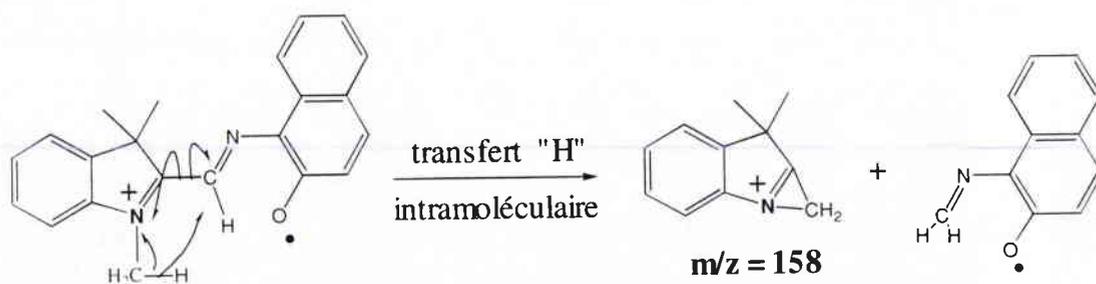
En plaçant le site de première ionisation sur l'azote indolinique (voir figure IV.9), et en tenant compte de la règle de l'azote, nous parvenons à expliquer la formation des ions positifs ( $m/z = 158$  et  $160$ ) :



a) formation de l'ion  $m/z = 160$  (le plus intense) :

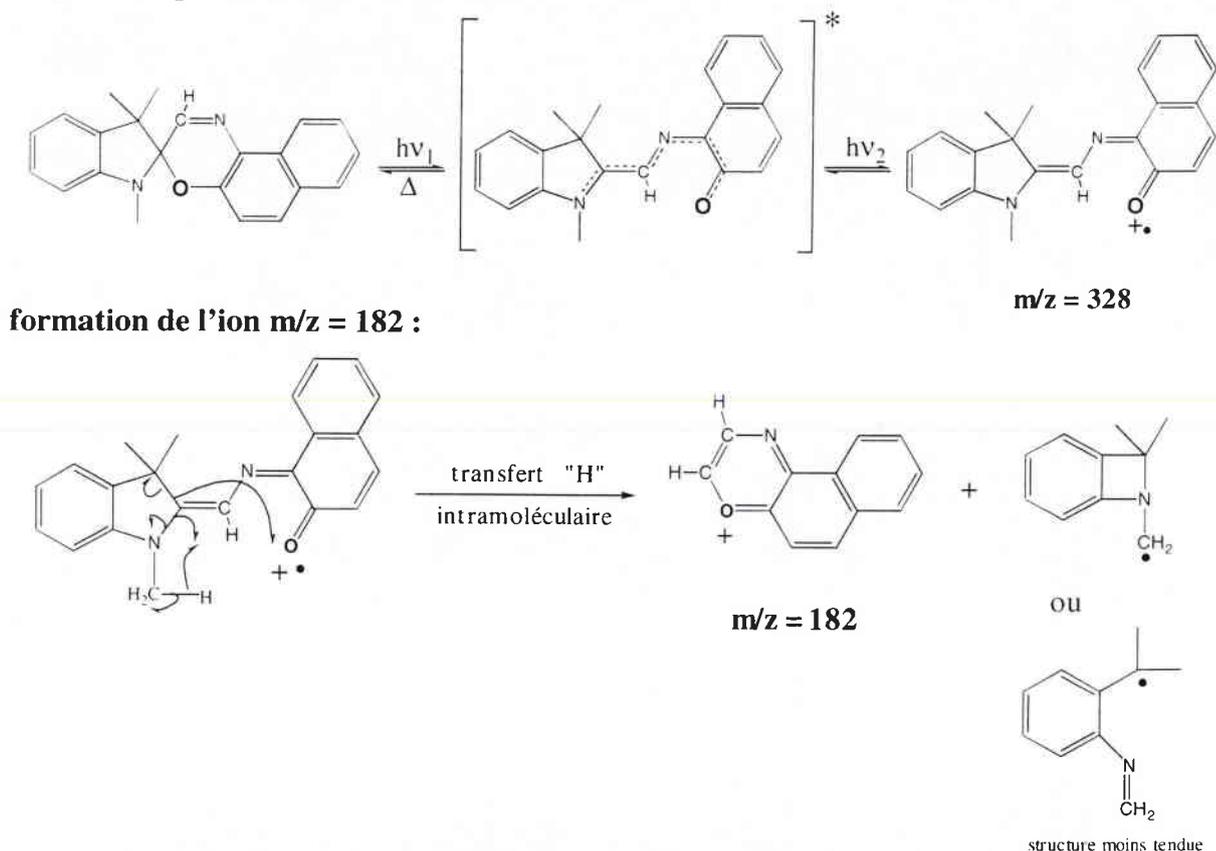


b) formation de l'ion  $m/z = 158$  (le moins intense) :



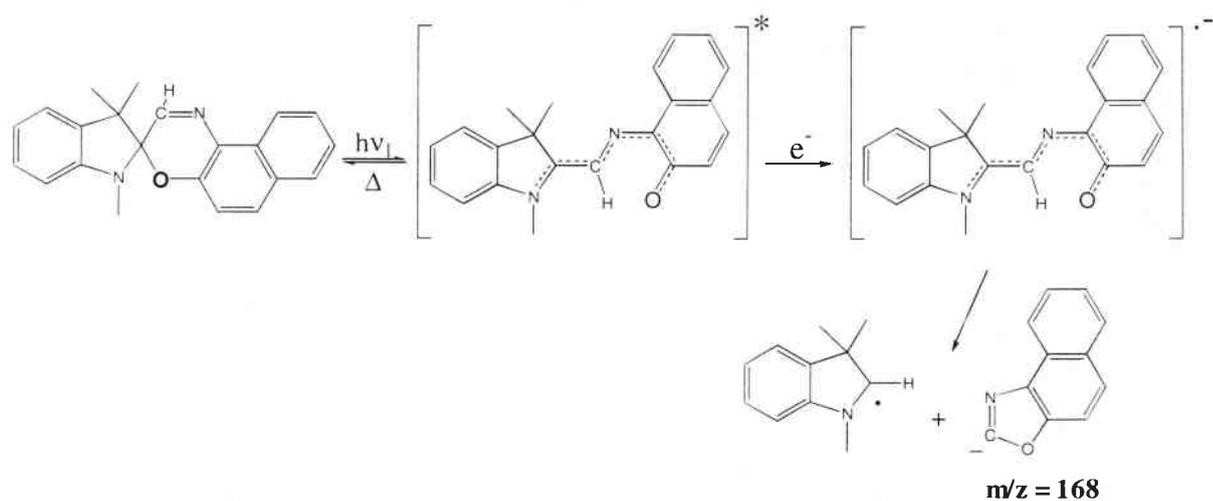
**Figure IV.9 :** Mécanisme de photofragmentation observé en LDI (mode positif). Site de première ionisation sur l'azote.

Si nous fixons le site de première ionisation sur l'oxygène oxazinique (voir figure IV.10), nous parvenons à expliquer à présent la formation des ions fragments positifs ( $m/z = 182$ ) :



**Figure IV.10 :** Mécanisme de fragmentation observé en LDI (mode **positif**).  
Site de première ionisation sur l'oxygène.

Contrairement aux ions fragments positifs, il n'y a qu'un seul type d'ions fragments majoritaires en ionisation négative ( $m/z = 168$ ). A la lumière des spectres LDI de spirooxazines diversement substituées (voir paragraphe II.1.), nous proposons le mécanisme de fragmentation suivant :



**Figure IV.11 :** Mécanisme de fragmentation observé en LDI (mode **négatif**).

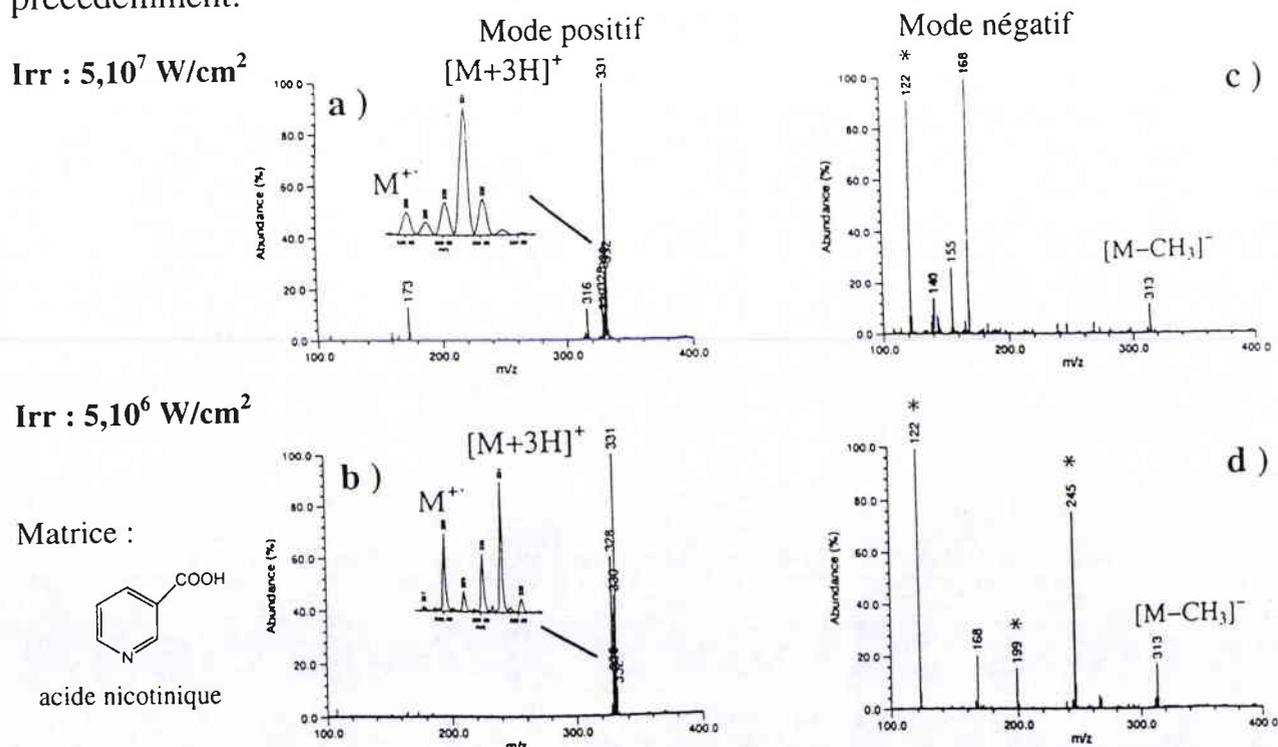
### 1.4. Ionisation par désorption laser assistée par matrice

A 266 nm, en mode positif et à une irradiance de  $5,10^7 \text{ W/cm}^2$ , la désorption laser assistée par matrice (acide nicotinique) de la spironaphtoxazine non substituée est caractérisée par l'apparition de l'ion moléculaire  $M^+$  et d'ions pseudo-moléculaires hydrogénés ( $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^+$ , et  $[M+3H]^+$ , voir figure IV.12).

Leur décomposition est très réduite, seuls deux pics fragments sont détectés à  $m/z = 316$  et  $173$ . L'ion à la masse  $m/z = 316$  est attribué à la perte du radical  $\cdot\text{CH}_3$  de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+3H]^+$  ( $m/z = 331$ ).

En diminuant l'irradiance laser à  $5,10^6 \text{ w/cm}^2$ , nous remarquons la disparition complète des pics de fragmentation  $316$  et  $173$ , démontrant ainsi la possibilité d'obtenir de façon intacte l'ion pseudo-moléculaire par la technique MALDI. Un coefficient d'absorption de la matrice plus faible ( $\epsilon = 3\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) que celui de la molécule cible ( $\epsilon = 16\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) à la longueur d'onde  $266 \text{ nm}$ , met en évidence l'importance du rapport des concentrations cible/matrice dans la protection de l'analyte vis-à-vis de la photofragmentation. Dans ce cas, la matrice est  $500$  à  $1\,000$  fois plus concentrée que l'analyte. De plus, nous montrons également que la quantité d'énergie déposée sur l'échantillon, est un paramètre important pour l'obtention d'un spectre de meilleure résolution (voir agrandissement figure IV.12).

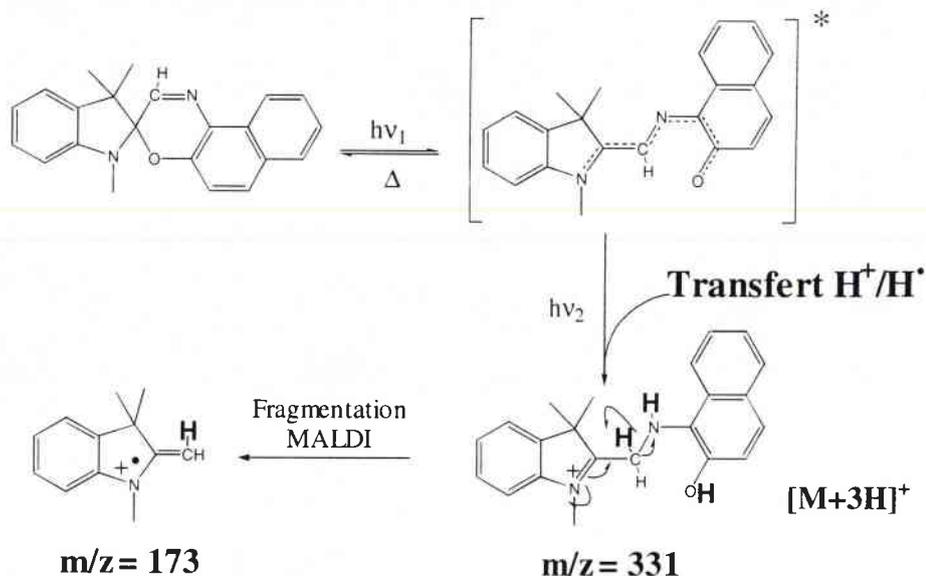
Les spectres MALDI du composé spiranique en mode négatif, n'apportent pas d'informations complémentaires par rapport aux spectres LDI présentés précédemment.



**Figure IV.12 :** Spectre MALDI-FTMS à 266 nm de la spironaphtoxazine non substituée.

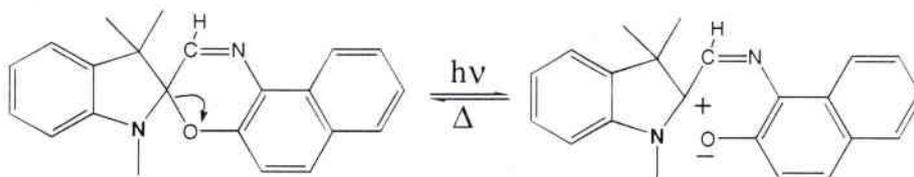
Les pics de masse  $m/z = 122$ ,  $199$  et  $245$  proviennent de la matrice ;  $122$  est l'ion déshydrogéné  $[mH^1-H]^-$ , et  $245$  l'ion dimère déshydrogéné  $[2mH-H]^-$  de l'acide nicotinique. Nous n'avons pas pu attribuer clairement une structure à l'ion  $m/z = 199$  (\* sur la figure IV. 12d).

L'unique fragment caractéristique au processus MALDI ( $m/z = 173$ ) pourrait alors être interprété de la façon suivante (figure IV.13) :



**Figure IV.13** : Mécanisme de fragmentation observé en MALDI (mode positif) de la spironaphtoxazine non substituée.

L'attribution structurale de l'ion fragment MALDI ( $m/z = 173$ ) laisse supposer une participation active d'hydrogènes atomiques dans la formation d'ions triplement hydrogénés. L'apport d'énergie, soit par l'absorption éventuelle d'un deuxième photon, soit par un mécanisme collisionnel favorise l'ionisation des molécules spiraniques. Celles-ci subiraient à la fois, une réduction de la liaison  $C=N$ , et une attaque sur leur site basique (l'oxygène) par des radicaux hydrogène. L'intervention exclusive de protons est improbable car si cela avait été le cas, nous aurions détecté des ions multi-chargés. Une ouverture hétérolytique de la molécule (figure IV.14) à l'état excité donnerait la possibilité d'un transfert protonique, mais la photofragmentation de cette structure ne correspond pas à celle observée.



**Figure IV.14** : Rupture hétérolytique de la spironaphtoxazine.

<sup>1</sup> mH : Ion moléculaire de la matrice acide nicotinique ( $M = 123$ )

L'ionisation en MALDI semble emprunter un chemin réactionnel différent de celui de la désorption laser directe. Nous consacrerons le dernier chapitre de ce manuscrit à un développement plus approfondi sur cette hypothèse de travail.

Nous rappelons que l'ion  $m/z = 173$  est détecté également en ionisation chimique, mais sa formation comme nous l'avons supposé, serait attribuée à la fragmentation d'un des deux adduits observés sur la molécule photochromique ( $m/z = 341$  et  $382$ ). En MALDI, l'ion fragment  $m/z = 173$  apparaît seul, nous n'avons jamais détecté d'adduit correspondant à la masse  $m/z = 341$  ou  $382$ , cet ion est donc bien spécifique du processus MALDI.

Le comportement de la spironaphtoxazine non substituée sous différents modes d'ionisation est résumé dans le tableau IV.2 :

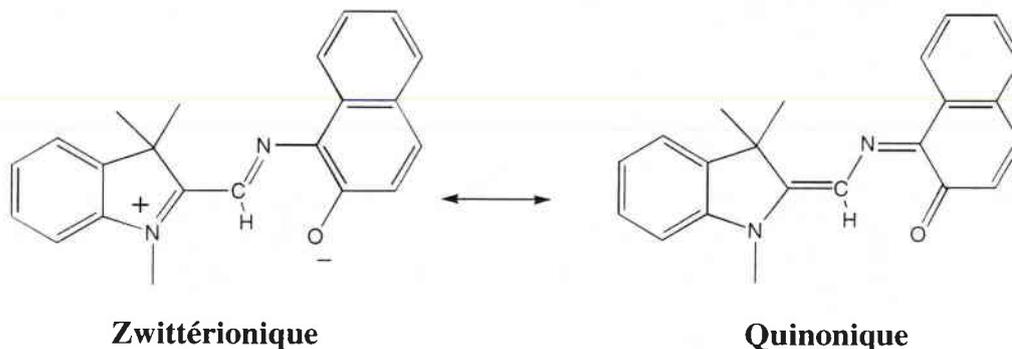
	Principaux types d'ions observés	Fragments / (adduits) caractéristiques
EI (70 eV)	$M^+$	159-169
CI ( $CH_3CN$ )	$[M+H]^+$	160-173 (341-382)
LDI ( $\lambda = 266$ nm)	en mode positif $M^+$	160-182
	en mode négatif $[M-CH_3]^-$	168
MALDI ( $\lambda = 266$ nm)	en mode positif $M^+$ , $[M+3H]^+$	160-173
	en mode négatif $[M-CH_3]^-$	168

**Tableau IV.2 :** Comportement de la spironaphtoxazine non substituée sous différents modes d'ionisation.

Dans le but d'étudier plus spécifiquement le mécanisme de phototransformation de composés de la série spiro-[indoline-naphtoxazine] sous irradiation laser avec et sans matrice, nous avons analysé des spironaphtoxazines, dont les substituants de part et d'autre de la molécule, vont nous être utiles pour confirmer les mécanismes de photofragmentation avancés précédemment. L'existence de transferts d'hydrogènes atomiques intramoléculaires (LDI) et intermoléculaires (MALDI) après l'ouverture de la molécule spiranique, caractérise l'ionisation laser par rapport à l'ionisation chimique et à l'ionisation à faisceau d'électrons. L'identification de photochromes par spectrométrie de masse devient alors plus aisée.

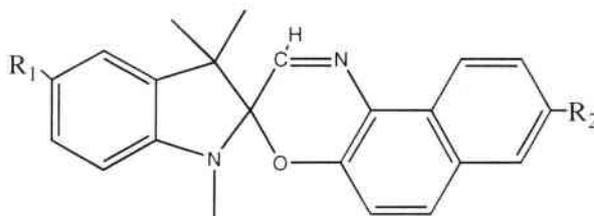
## II. Caractérisation de spironaphtoxazines différemment substituées par ionisation laser couplée à la FTMS

Nous rappelons que des études par photolyse laser ont démontré que, lorsque la spirooxazine est illuminée par un flux de photons UV, celle-ci absorbe l'énergie photonique provoquant la rupture de la liaison C-O (voir chapitre II). Elle donne ainsi naissance à deux formes limites en résonance : zwitterionique et quinonique de l'état fondamental, illustrées en figure IV.15. Ces deux formes sont en équilibre mésomères, jusqu'au retour à la forme fermée initiale.



**Figure IV.15** : Structure des formes zwitterionique et quinonique.

Nous démontrerons que l'existence de deux sites de première ionisation, l'un se trouvant sur l'azote indolinique, l'autre sur l'oxygène oxazinique, caractérise les formes limites zwitterionique et quinonique. Il s'agira alors, avec le jeu des substituants introduits au niveau de la molécule, de confirmer les mécanismes de photofragmentation de la spironaphtoxazine non substituée. D'autre part, nous avons été amenés à changer de longueur d'onde d'irradiation UV ( $\lambda = 355$  nm) pour des raisons techniques, ce qui nous a permis de vérifier la validité de ces mécanismes à une autre longueur d'onde. Pour ce travail, nous avons utilisé quatre spironaphtoxazines substituées de la façon suivante (figure IV.16) :

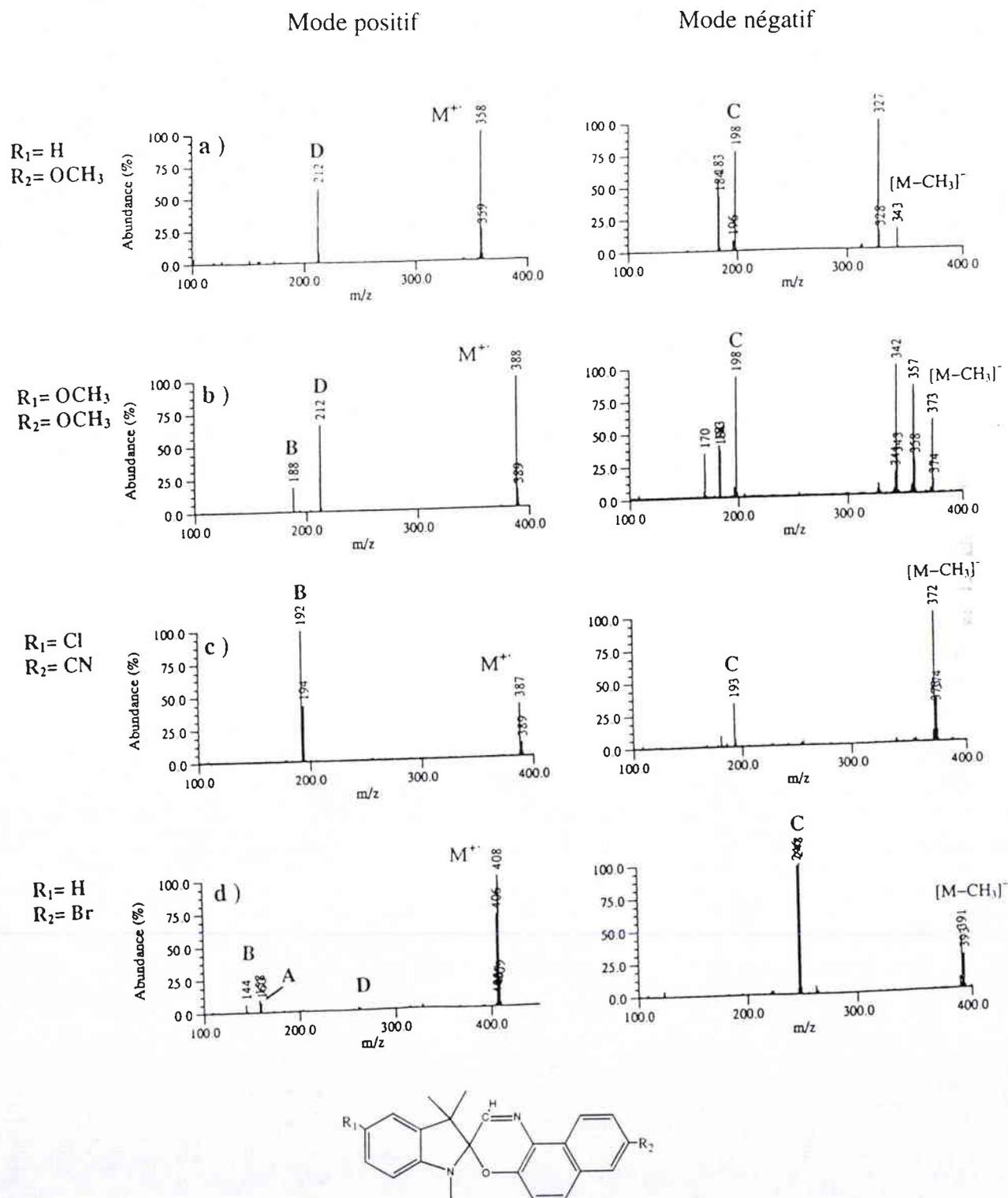


Avec :	$R_1 = H$	$R_2 = H$	Spiro 0	Masse = 328 Daltons
	$R_1 = H$	$R_2 = OCH_3$	Spiro I	Masse = 358 Daltons
	$R_1 = OCH_3$	$R_2 = OCH_3$	Spiro II	Masse = 388 Daltons
	$R_1 = Cl$	$R_2 = CN$	Spiro III	Masse = 387-389 Daltons
	$R_1 = H$	$R_2 = Br$	Spiro IV	Masse = 406-408 Daltons

**Figure IV.16** : Les différentes spironaphtoxazines substituées étudiées.

## II.1. Analyses LDI-FTMS à 355 nm

Les spectres LDI de quatre nouvelles spirooxazines diversement substituées, réalisés en mode positif et négatif à une irradiance laser de  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>, sont représentés sur la figure IV.17.



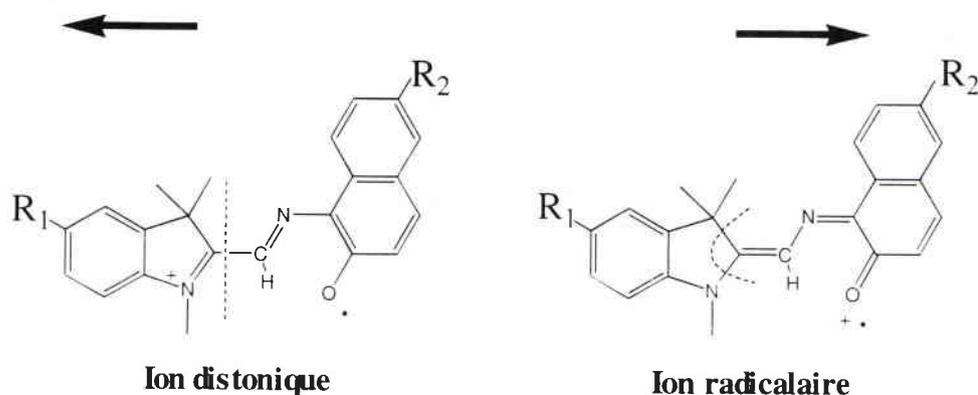
**Figure IV.17 :** Spectres LDI-FTMS à 355 nm (Irr =  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>) :  
 a) Spiro I, b) Spiro II, c) Spiro III et d) Spiro IV, voir attribution des pics page 143.

Du fait de la présence de substituants Cl et Br (Spiro III, IV), la distribution isotopique des ions moléculaires se présente sous forme de doublets d'intensités relatives 3:1 pour le chlore, et 1:1 pour le brome. Elle peut être néanmoins complétée par la distribution isotopique du carbone ( $^{13}\text{C}$ ) qui est de 1,1 % par atome de carbone.

Sur l'ensemble des spectres positifs, nous détectons l'ion moléculaire  $\text{M}^+$ . Mais, contrairement aux analyses LDI effectuées à 266 nm à faible irradiance laser, la molécule photochromique spirooxazine se décompose en un seul ou parfois deux fragments, rendant le spectre de masse plus lisible. Un plus faible coefficient d'extinction molaire de la molécule à 355 nm, en est responsable ( $\epsilon_{355} = 5\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  au lieu de  $16\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  à 266 nm).

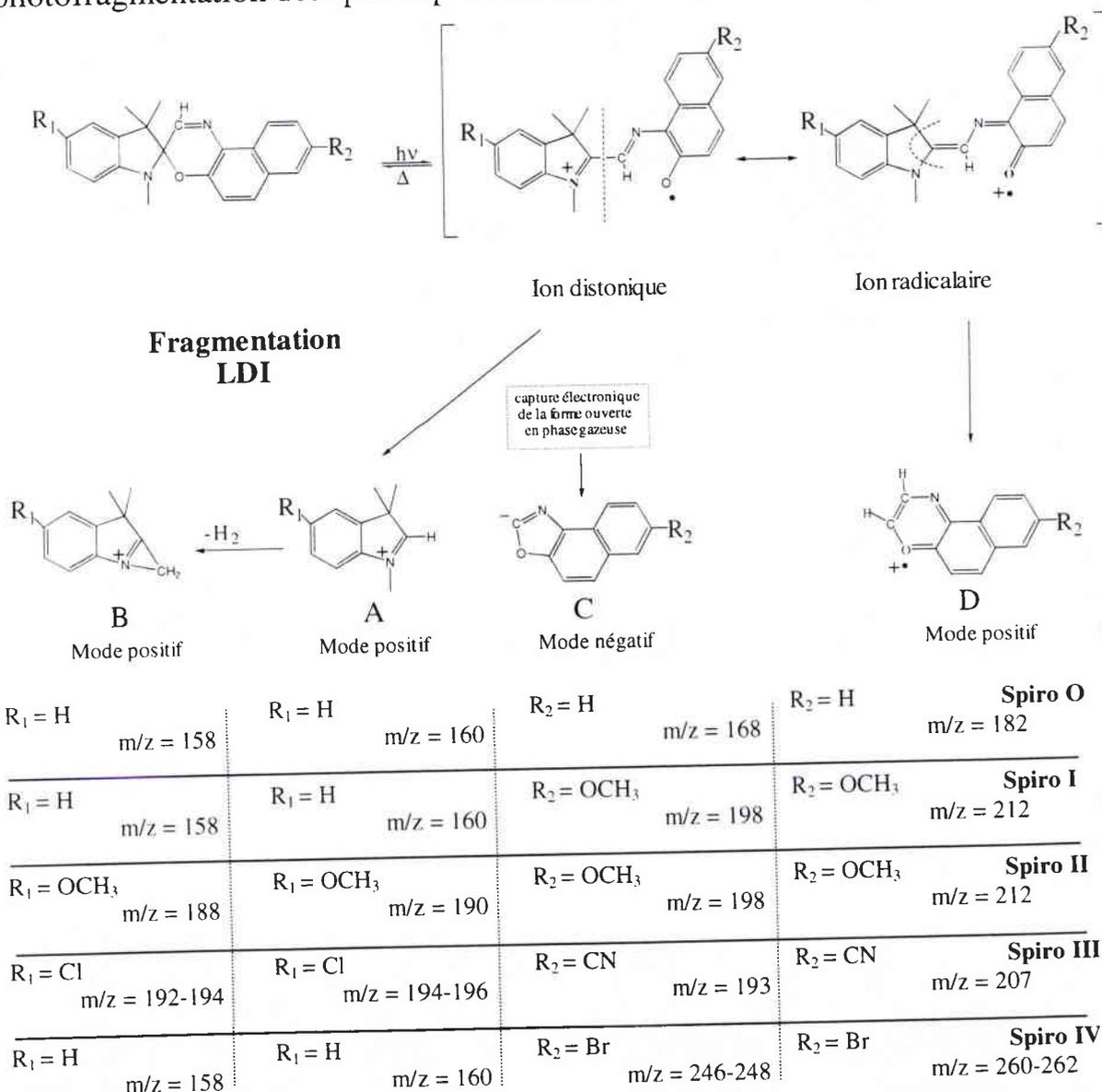
En mode négatif, nous observons une nouvelle fois le départ caractéristique du groupement  $\text{CH}_3$  sur les quatre composés étudiés, ainsi que la présence de l'ion fragment spécifique de plus basse masse ( $m/z = 168$  pour la spirooxazine non substituée, 198 [Spiro I], 198 [Spiro II], 193 [Spiro III] et 246-248 [Spiro IV]). L'effet de la substitution montre qu'il n'y a aucune ambiguïté quant à la provenance de cet ion : il correspond bien à la partie droite de la molécule substituée par  $\text{R}_2$ , où la charge négative est portée par l'oxygène.

Les composés spiro (III et IV) sont intéressants, car il mettent en évidence l'existence sur la molécule de deux sites d'ionisation. En effet, lorsque la molécule s'ouvre, l'azote indolinique et l'oxygène oxazinique possédant tout deux des doublets électroniques non appariés, sont les plus à même à perdre ou à capturer un électron pour amener la forme ouverte vers un état ionisé. La fragmentation de ces ions (ion distonique : charge portée par l'azote, et ion radicalaire : charge portée par l'oxygène) conduit à des pics fragments caractérisant la partie gauche ( $\text{R}_1$ ) ou la partie droite ( $\text{R}_2$ ) de la molécule (voir figure IV.18).



**Figure IV.18** : Ion distonique et ion radicalaire de la spironaphtoxazine.

En considérant, que la distribution des électrons  $\pi$  des ions distoniques et radicalaires, est identique à celle caractérisant les formes limites zwitterionique et quinonique, nous pouvons présenter le mécanisme général de la photofragmentation des spironaphtoxazines sous irradiation UV comme tel :



**Figure IV.19** : Mécanisme général de la photofragmentation des spirooxazines sous irradiation laser directe ( $\lambda = 355 \text{ nm}$ ).

La participation de transferts d'hydrogènes intramoléculaires (voir mécanismes de fragmentation pp. 135 et 136) au cours du processus de photofragmentation, favorise la formation d'ions fragments spécifiques, dont l'identification confirme la présence à l'état ionisé des deux types d'ions qui correspondent aux formes limites de résonance de la spironaphtoxazine : la forme zwitterionique et la forme quinonique.

L'ionisation en mode négatif met en évidence un photoproduit caractéristique des composés spiraniques, dont on retrouve la forme neutre sur le mécanisme de

photodégradation, après l'ouverture homolytique de la molécule (figure II.8, p. 73).

Afin de démontrer l'existence de tels transferts intramoléculaires, une analyse comparative en impact électronique à 70 eV et à 12 eV a été menée sur le spiro I (M = 358 Daltons).

Cette expérience a été effectuée au laboratoire sur un spectromètre de masse GC/Q-MS et a donné les résultats suivants (figure IV.20) :

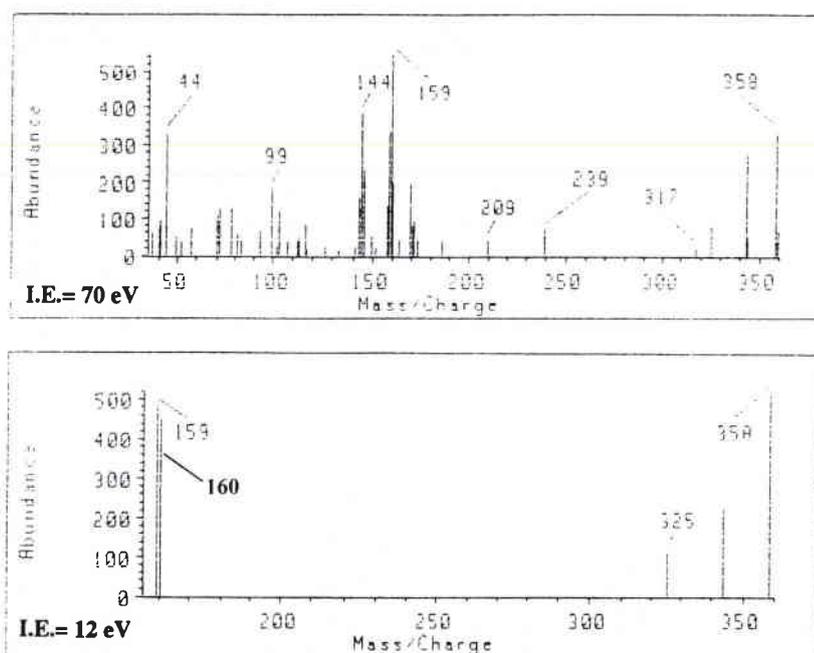


Figure IV.20 : Spectres comparatifs EI 70 /12 eV réalisés sur le spiro I.

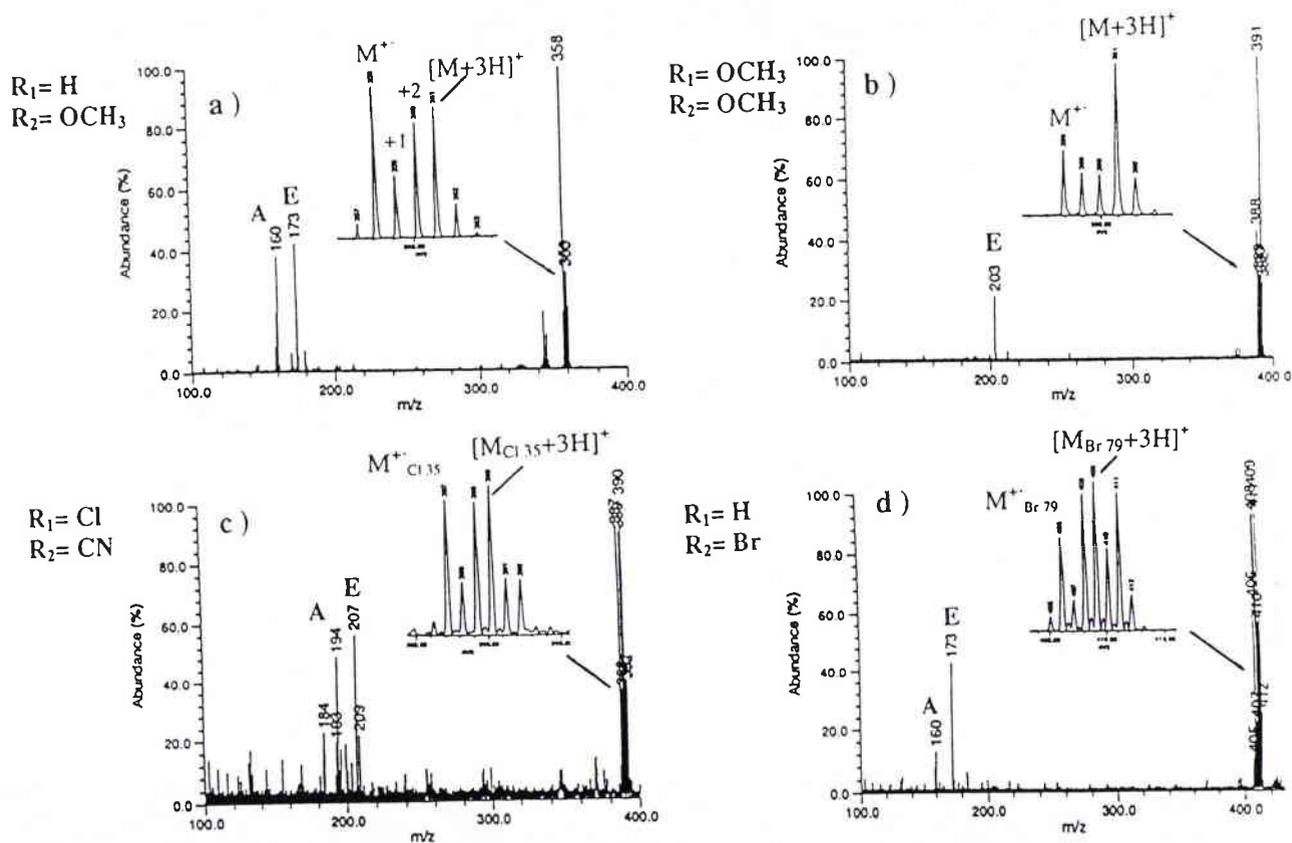
L'intensité de l'ion  $m/z = 160$ , formé à partir d'un transfert d'hydrogène intramoléculaire (voir sa formation p. 135), augmente fortement lorsque l'énergie des électrons passe de 70 à 12 eV. Le transfert d'hydrogène intramoléculaire dépend donc de l'énergie déposée. Il s'effectue plus facilement à faible énergie [4]. Nous rappelons qu'un photon à la longueur d'onde  $\lambda = 266$  nm possède une énergie de 4,66 eV, contrairement à  $\lambda = 355$  nm où l'énergie par photon est égale à 3,59 eV<sup>1</sup>.

## II.2. Analyses MALDI-FTMS à 355 nm

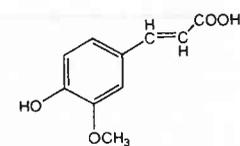
Nous avons analysé ces mêmes spirooxazines en MALDI (figure IV.21), à une irradiance laser toutefois plus élevée ( $5,10^7$  W/cm<sup>2</sup>), afin d'obtenir un certain degré de fragmentation, qui se révélera utile lors de l'interprétation des résultats. La matrice utilisée cette fois-ci, est l'acide férulique, possédant un fort

<sup>1</sup> E(eV)= 1 240/ $\lambda$ (nm)

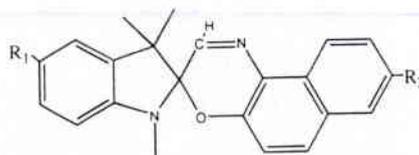
coefficient d'absorption à 355 nm ( $\epsilon = 9\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), comparé à celui de l'analyte qui est de  $5\,000 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Mais, il ne faut pas oublier que ce dernier est approximativement 500 à 1 000 fois moins concentré que la matrice (voir chapitre III, méthodologie). Nous n'avons pas présenté de spectre MALDI en mode négatif, car il n'apporte pas d'informations supplémentaires par rapport aux spectres de la figure IV.12.



Matrice :



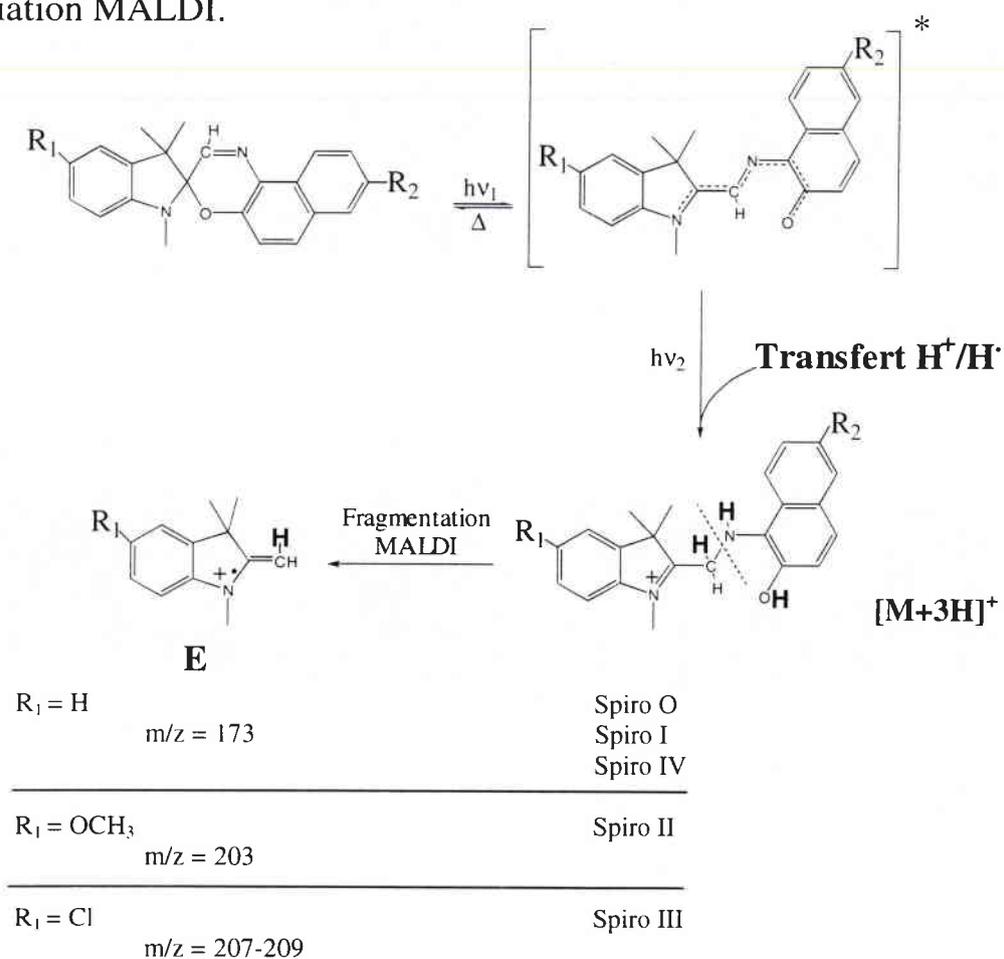
acide férulique



**Figure IV.21** : Spectres MALDI-FTMS à 355 nm,  $I_{\text{irr}} = 5.10^7 \text{ W/cm}^2$  :  
a) Spiro I, b) Spiro II, c) Spiro III et d) Spiro IV, voir attribution des pics pages 143 et 146.

Comme nous l'avons vu avec l'acide nicotinique comme matrice à 266 nm, l'ionisation de la spirooxazine en désorption laser assistée par matrice, est différente de celle obtenue en LDI. Là encore, un important transfert d'atomes d'hydrogène participe à l'ionisation de la molécule :  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^+$  et  $[M+3H]^+$ .

Nous détectons sur chacun des spectres, le fragment spécifique du processus MALDI, qui confirme donc le mécanisme de fragmentation MALDI de la spirooxazine non substituée (voir figure IV.13). Nous présentons en figure IV.22, le mécanisme général de la photofragmentation de la spirooxazine sous irradiation MALDI.



**Figure IV.22** : Mécanisme général de photofragmentation de la spironaphtoxazine observé en MALDI.

La réduction de la liaison C=N et l'attaque sur le site basique de l'oxygène par des entités hydrogénées semble se confirmer lors du processus MALDI. La photofragmentation du composé spiro III possédant un substituant Cl à gauche de la molécule, conduit à un ion E, dont les rapports isotopiques (3:1) ne laissent aucune ambiguïté quant à la nature de l'ion observé. Ces réactions chimiques sont également validées par la réactivité d'autres composés spiro, substitués différemment (voir figure IV.21).

### III. Conclusion

L'ionisation laser couplée à la spectrométrie de masse paraît être une technique d'analyse adaptée à l'étude de formes ouvertes de composés photochromiques, car les temps d'ouverture et d'ionisation de ces molécules sont très proches. En effet, l'ionisation laser d'une molécule organique se faisant généralement par l'absorption de 2 photons en phase gazeuse, oblige la molécule à passer dans un état intermédiaire (état excité) avant son ionisation. Ce passage par un état excité facilite l'ouverture de la molécule spiranique, qui lorsqu'elle réabsorbe un deuxième photon (LDI) ou lorsqu'elle réagit avec  $H^+/H^\bullet$  (MALDI), arrive à s'ioniser par la perte ou la capture d'un électron célibataire. Les ions moléculaires ou pseudo-moléculaires produits par ionisation laser, traduisent alors l'existence d'un équilibre photochromique, s'établissant à l'état excité.

- ✓ En désorption laser (LDI), l'ionisation de la spironaphthoxazine est caractérisée par l'ion radical moléculaire  $M^{\bullet+}$ . Des transferts d'hydrogènes intramoléculaires participent au mécanisme de fragmentation de la molécule. L'interprétation des ions fragments spécifiques (**A**, **B**, **C** et **D**) conduit à la coexistence d'ions distoniques et radicalaires pouvant caractériser les formes limites (zwitterionique et quinonique) de la délocalisation des électrons  $\pi$  de la forme ouverte.
- ✓ Au cours de la désorption laser assistée par matrice, l'ionisation des molécules cibles se traduit par l'apparition d'espèces triplement hydrogénées  $[M+3H]^+$  au côté de  $M^{\bullet+}$ . A des valeurs d'irradiance laser comparables à celles utilisées en LDI, la technique MALDI n'induit pas la fragmentation de la molécule cible. A des valeurs d'irradiance plus élevées, l'apparition d'un fragment spécifique **E**, confirme l'intervention d'un important transfert intermoléculaire d'atomes d'hydrogènes lors de l'ionisation des molécules cibles. Ce transfert (matrice→analyte) se ferait sur la double liaison C=N ainsi que sur l'oxygène oxazinique.

Nous allons à présent, tenter d'apporter quelques éléments d'explication qui pourront aider à la compréhension des résultats MALDI.

★ ★ ★

## Bibliographie

- [1] J.L. Derocque, P. Appriou, R. Guglielmetti et H. Dürr, *Organic Mass Spectrom.*, **1977**, 12, 10, 605.
- [2] Cours de spectrométrie de masse, première édition, ATF "Chimie et Physico-Chimie des Grandes Molécules", MESR-DSPT2, **1994**.
- [3] G. Garros, *Thèse en Sciences*, Marseille-Luminy, **1997**.
- [4] F.W. McLafferty et F. Turecek, *Interpretation of Mass Spectra*, Fourth edition, **1993**, University Science Books, Mill Valley, CA.

# Chapitre V

## Etude du mécanisme MALDI à l'aide de sondes photochromiques

L'objectif de ce chapitre est de démontrer que des molécules photochromiques de la série des spirooxazines, peuvent servir de sondes moléculaires pour l'étude du mécanisme MALDI, et plus particulièrement pour caractériser l'étape de l'ionisation.

Nous essayerons en premier lieu, d'identifier la source d'hydrogène responsable de l'apparition des espèces multi-hydrogénées, et de localiser sur une échelle de temps quand a lieu exactement ce transfert.

Dans une seconde partie, nous utiliserons les composés spiraniques comme de véritables sondes moléculaires pour déterminer précisément les paramètres expérimentaux les plus décisifs lors d'une expérience MALDI. Il s'agira entre autre de connaître l'influence : de la préparation de l'échantillon, du réglage de certains paramètres laser, de la nature chimique de la matrice, et de la modification des propriétés photochromiques de la molécule cible.

L'ensemble de ces résultats expérimentaux, ainsi que les données bibliographiques recueillies au cours des chapitres I et II, nous permettrons de proposer un mécanisme d'ionisation MALDI à la fin de ce chapitre.

## I. Etude du transfert d'hydrogène $[M+3H]^+$ observé en MALDI

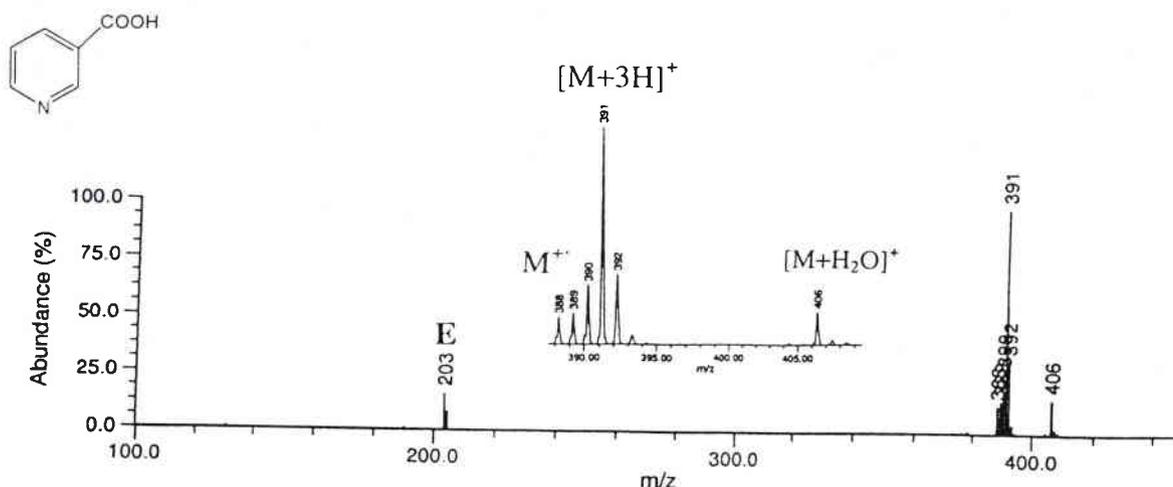
Le terme de "transfert d'hydrogène" est préféré à celui de "transfert protonique", car l'échange de trois protons induirait l'apparition d'ions multi-chargés. L'absence de ce type d'ions sur les spectres MALDI, tend plutôt à mettre en évidence l'existence de proton  $H^+$  et/ou d'atomes d'hydrogène  $H\cdot$ , libérés lors de l'impact laser par la matrice. Scott *et al.* en 1994 [1], furent les premiers à démontrer la formation d'hydrogène atomique au cours du processus MALDI par des expériences en post-ionisation. Cette espèce très réactive pourrait alors se fixer sur des sites particuliers de la molécule afin de faciliter son ionisation.

### I.1. Son origine

L'absence d'ions pseudo-moléculaires hydrogénés  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^+$  et  $[M+3H]^+$  en désorption laser directe (LDI), exclut toute participation de réactions de dismutation dans la formation d'espèces multi-hydrogénées lors du processus MALDI. La matrice possédant une fonction acide, peut en tant que telle libérer des protons  $H^+$  (acide de Brönsted), ou selon la définition de Lewis, générer des radicaux  $H\cdot$  (acide de Lewis) [2] lors de l'impact laser.

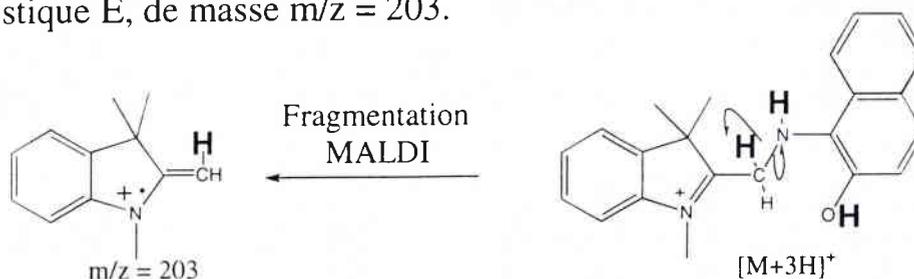
Dans le but de déterminer, si l'hydrogène de la fonction carboxylique de l'acide nicotinique (matrice MALDI utilisée à 266 nm) est la principale source de  $H^+/H\cdot$ , nous avons analysé le composé spiro II ( $m/z = 388$ , p.140) en présence de l'ester méthylique de l'acide nicotinique, puis de l'acide nicotinique deutéré. Ces expériences ont toutes été réalisées dans les mêmes conditions opératoires :  $\lambda = 266$  nm,  $Irr = 10^7$  W/cm<sup>2</sup>, et détection en mode positif.

#### I.1.1. En présence de l'acide nicotinique



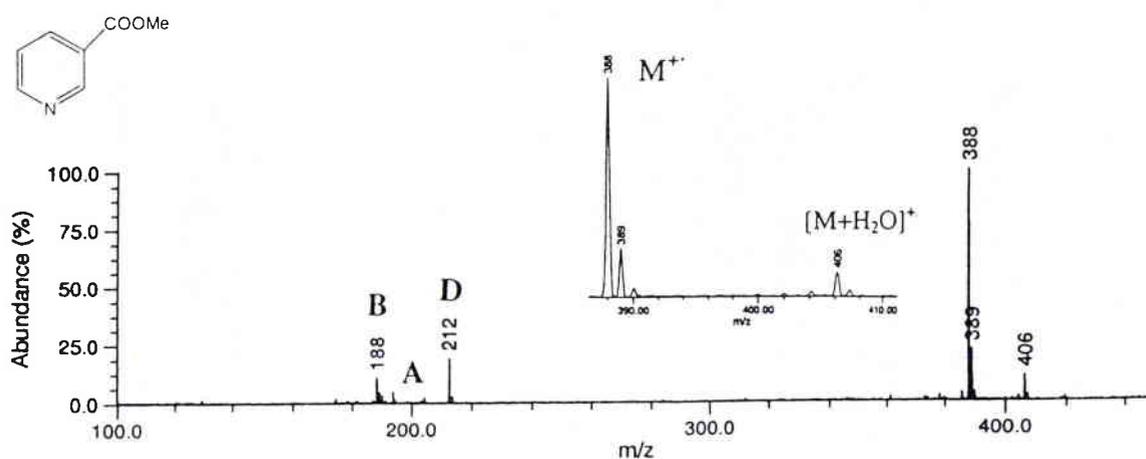
**Figure V.1** : Spectre de masse MALDI-FTMS à 266 nm du spiro II en présence de l'acide nicotinique,  $Irr = 10^7$  W/cm<sup>2</sup>.

L'allure spectrale du composé spiro II (figure V.1) est identique à celle enregistrée sous une irradiation à 355 nm (figure IV.17, p. 141) : détection de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+3H]^+$  et apparition d'un ion fragment caractéristique E, de masse  $m/z = 203$ .



Il convient cependant de noter l'apparition d'un nouveau pic de masse à  $m/z = 406$ , qui pourrait correspondre à un adduit d' $H_2O$  sur l'ion radical moléculaire  $M^+$  ( $m/z = 388$ ).

### I.1.2. En présence de l'ester méthylique de l'acide nicotinique



**Figure V.2 :** Spectre de masse MALDI-FTMS à 266 nm du spiro II en présence de l'ester méthylique de l'acide nicotinique,  $Irr = 10^7 W/cm^2$ .

Comme le montre la figure V.2, la substitution de l'hydrogène de la fonction carboxylique par un groupement méthyle, empêche le transfert d'hydrogène de s'effectuer et favorise une photofragmentation plus poussée de la molécule cible. Les liaisons hydrogène, formées entre la matrice et la molécule cible lors de l'étape de la préparation de l'échantillon [3], permettraient d'évacuer l'énergie directement absorbée par la molécule cible vers la matrice. La disparition de tels types de liaisons comme ici, entraîne la fragmentation du composé spiranique en ions fragments : A ( $m/z = 190$ ), B ( $m/z = 188$ ) et D ( $m/z = 212$ ), bien que la matrice absorbe autant les photons UV que l'acide nicotinique ( $\epsilon_{266} = 3\,000 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , voir annexes B). De plus, la présence du pic ( $m/z = 406$ ) sur le spectre de masse confirme l'existence de molécules d' $H_2O$ , libérées dans le plasma par la matrice, mais montre aussi qu'elles ne participeraient pas directement au transfert de  $H^+/H^\cdot$  vers la molécule cible.

### I.1.3. En présence de l'acide nicotinique deutéré

En remplaçant cette fois-ci, l'hydrogène de la fonction carboxylique par un deutérium, nous prouvons de façon indubitable la participation de celui-ci à l'ionisation de la molécule cible lors du processus MALDI (voir figure V.3). La deutération occasionne un décalage d'une unité de masse par rapport au spectre présenté en figure V.1, et il est probable qu'elle n'influence que très peu le spectre d'absorption de la matrice.

Nous constatons par ailleurs, que cette deutération n'est pas effective à 100 %, puisqu'un mélange d'adduits d'hydrogène et de deutérium est observé sur l'ion moléculaire, donnant ainsi l'apparition des ions :  $[M+H]^+$  : 389,  $[M+2H]^+$  et/ou  $[M+D]^+$  : 390,  $[M+3H]^+$  et/ou  $[M+H+D]^+$  : 391,  $[M+2H+D]^+$  et/ou  $[M+2D]^+$  : 392,  $[M+H+2D]^+$  : 393 et  $[M+3D]^+$  : 394.

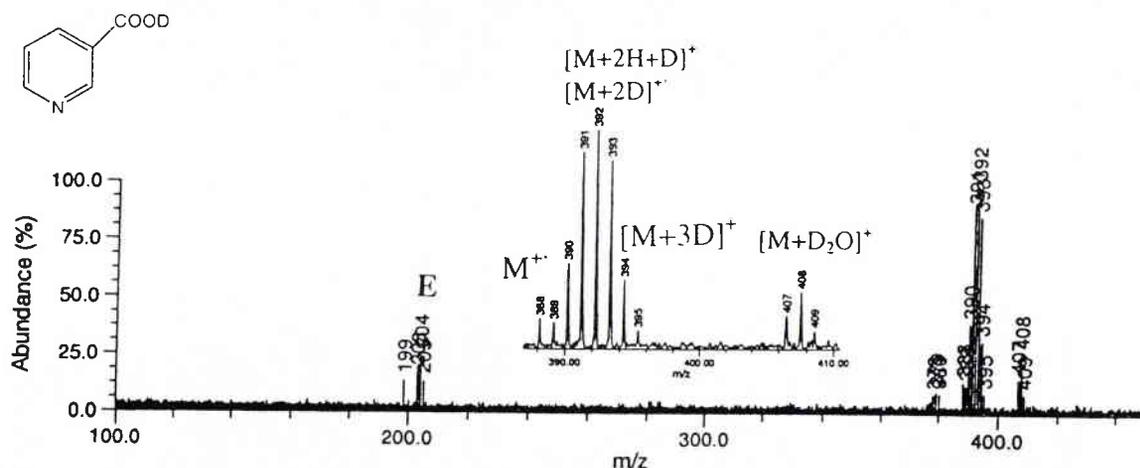
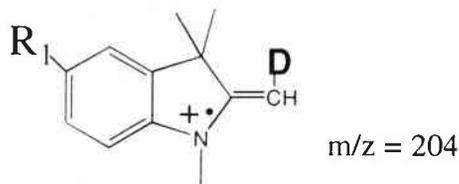


Figure V.3 : Spectre de masse MALDI-FTMS à 266 nm du spiro II en présence de l'acide nicotinique deutéré,  $I_{rr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$ .

Une approche plus théorique concernant la répartition isotopique des pics de masse est faite en annexe D. Elle montre indéniablement la participation de trois entités deutérées au cours de l'ionisation du composé spiranique.

Cette expérience confirme également que l'ion fragment E aurait bien cette structure :



La rupture de la liaison C=N après sa réduction par des entités deutérées expliquerait la formation de l'ion  $m/z = 204$ . Cependant, nous nous sommes rendus compte que l'acide nicotinique forme aussi un photofragment  $[2mH-CO_2+H/D]^+$  de même masse (voir figure V.16, p. 163). Nous avons donc décidé d'utiliser l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) deutéré comme matrice, qui a l'avantage de ne pas former un éventuel photofragment à la masse 203.

#### 1.1.4. En présence de l'acide 2,5-DHB deutéré

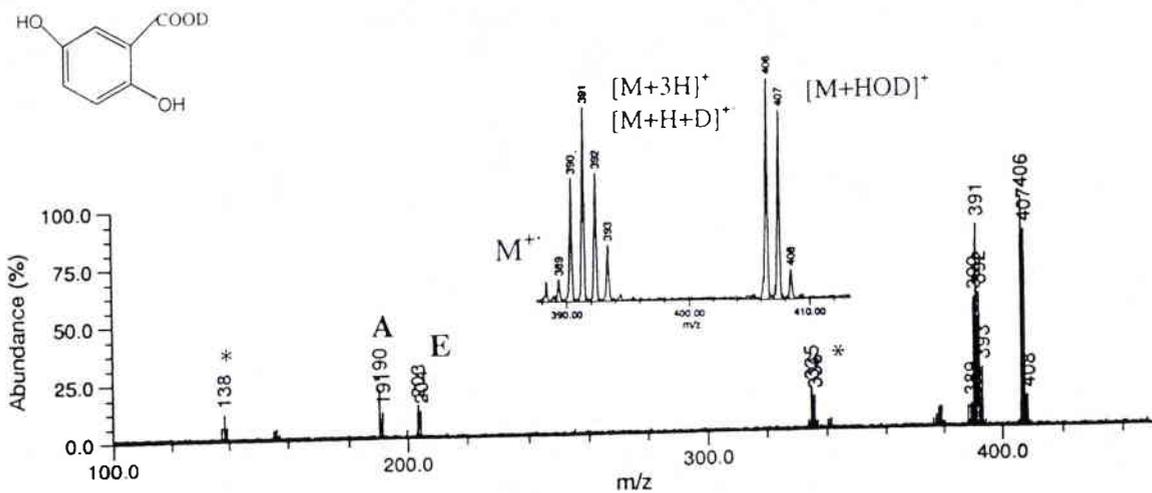


Figure V.4 : Spectre de masse MALDI-FTMS à 266 nm du spiro II en présence de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque deutéré<sup>1</sup>, Irr = 10<sup>7</sup> W/cm<sup>2</sup>.

Le spectre MALDI, en présence de l'acide 2,5-DHB deutéré, confirme le mécanisme de formation de l'ion E spécifique du processus MALDI. Cette matrice ne pouvant pas donner de fragment à  $m/z = 203$  (figure V.5), l'ion présent sur le spectre figure V.4 ne peut donc provenir que de la fragmentation de l'ion pseudo-moléculaire  $[M+3H]^+$ . Le rapport des intensités des ions 203/204 proche de 1, signifie qu'il y a eu un transfert de deutérium sur le carbone de la liaison C=N de la molécule cible (vide infra).

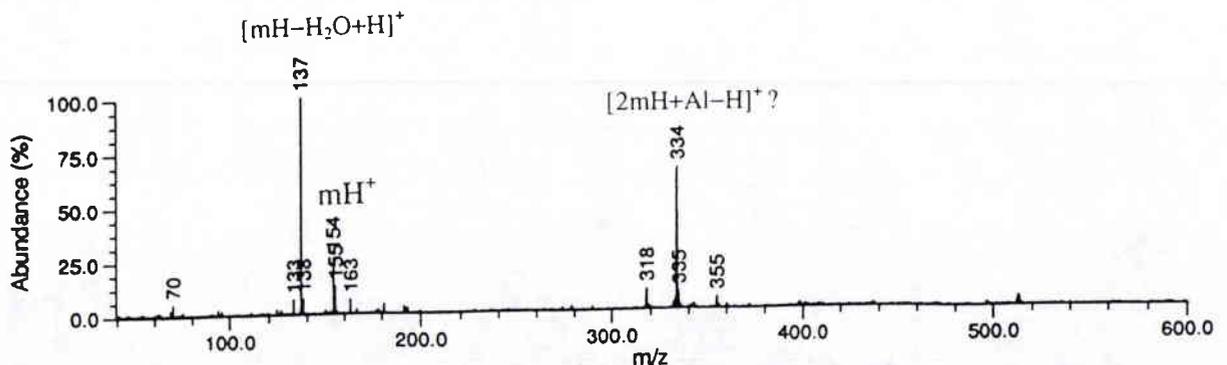
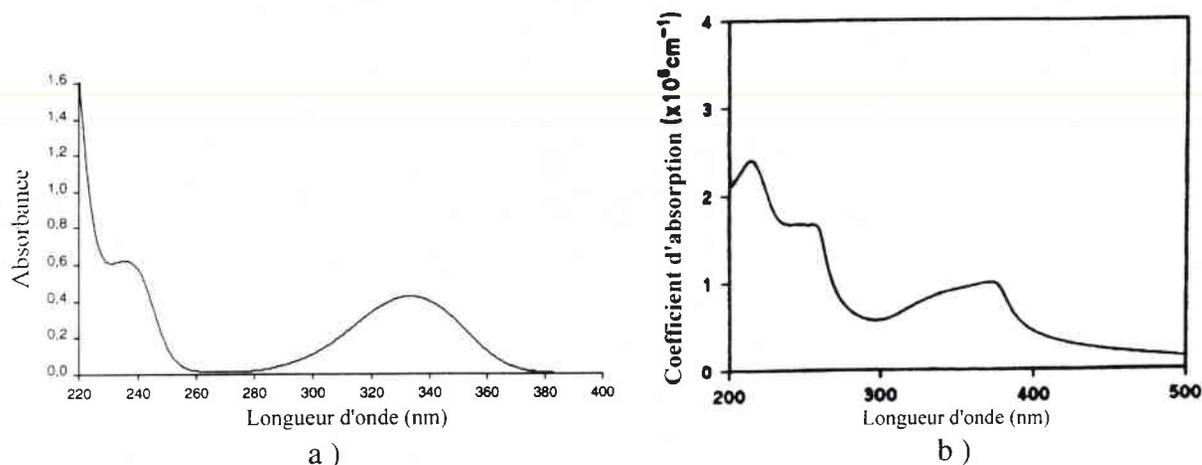


Figure V.5 : Spectre de masse LDI-FTMS à 266 nm de l'acide 2,5-DHB, Irr = 10<sup>7</sup> W/cm<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> La deutération induit un décalage de + 1 en masse sur les photoproduits (annotés par \*) de la matrice 2,5-DHB

A ce stade de la présentation des résultats MALDI, nous voudrions faire remarquer, qu'il n'est pas judicieux d'utiliser les coefficients d'absorption liquide des matrices pour l'interprétation des spectres de masse. En effet, si on se réfère aux données de spectroscopie UV liquide, la matrice 2,5-DHB n'absorbe quasiment pas à 266 nm ( $\epsilon_{266} < 1\ 000\ \text{l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ), et ne pourrait pas de ce fait, protéger l'analyte de la photofragmentation. Or, des mesures réalisées sur films minces de matrices [4], plus proches des conditions opératoires MALDI, montrent que la matrice 2,5-DHB absorbe fortement les photons à 266 nm (figure V.6), ce qui corrobore donc les résultats exposés dans la figure V.4.



**Figure V.6 :** Comparaison des spectres d'absorption UV de la 2,5-DHB :  
 a ) spectre UV effectué en solution ( $10^{-4}$  M dans MeOH),  
 b ) spectre UV réalisé sur un film, d'après réf. [4].

## 1.2. Son aspect temporel

L'interprétation des résultats expérimentaux MALDI (chapitre IV) nous amène à penser, qu'au cours d'une irradiation laser UV, la faible quantité d'énergie transmise aux molécules cibles, par la matrice via des liaisons hydrogène ou par absorption directe, induit l'ouverture des molécules photochromiques (apparition d'une coloration bleue caractéristique). Dans un second temps, l'énergie absorbée préférentiellement par la matrice conduit à la rupture des liaisons hydrogène (3 ps après l'impulsion laser, Bencsura et Vertes [5]), libérant ainsi en phase gazeuse  $\text{H}^+$  et/ou  $\text{H}$ .

Contrairement à la désorption laser directe (LDI) où les molécules photochromiques ont besoin d'une réabsorption d'un deuxième photon pour s'ioniser (ionisation en mode résonant), la technique MALDI assurerait cette fonction par un transfert d'entités hydrogénées provenant de la matrice. Afin de vérifier cette hypothèse de travail, nous allons étudier comparativement par

MALDI et LDI, deux nouvelles molécules cibles, présentant la particularité de rester en forme ouverte permanente.

### I.2.1. Mérocyanine à forme ouverte permanente obtenue par synthèse

Le composé mérocyanine de la série benzothiazoline, dont la structure est montrée figure V.7, a été obtenu par synthèse organique (voir chap. III). Il se présente sous une forme zwitterionique marquée.

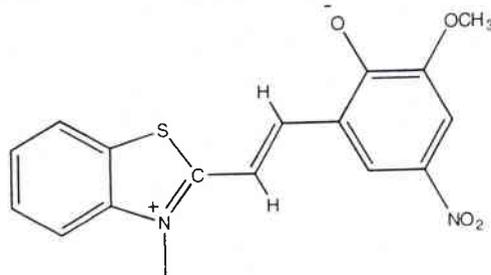


Figure V.7 : Structure de la benzothiazoline.

L'analyse comparative de cette molécule par les deux techniques d'ionisation laser (figure V.8) montre une quasi similitude des empreintes spectrales. LDI et MALDI conduisent à la formation d'ions moléculaires  $M^+$  et pseudo-moléculaires  $[M+2H]^+$ .

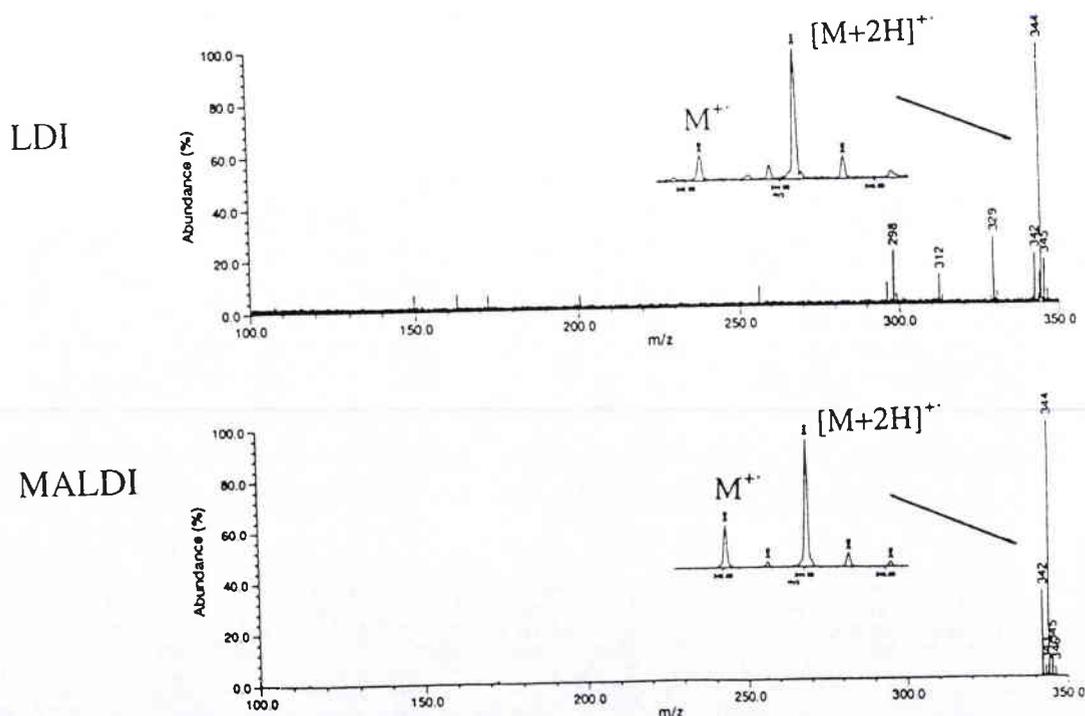
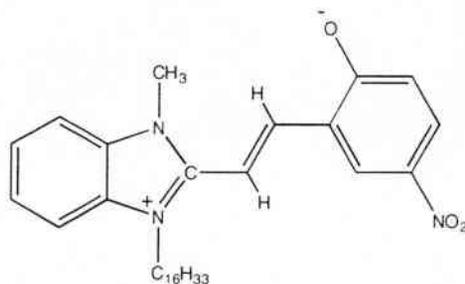


Figure V.8 : Spectres de masse LDI/MALDI à 266 nm de la benzothiazoline,  $Irr = 10^7 \text{ W/cm}^2$ .

Le spectre MALDI se démarque toutefois de celui de la désorption laser directe, par la quasi absence de pic de fragmentation, et un rapport signal sur bruit nettement supérieur. Un autre composé (figure V.9) possédant les mêmes propriétés, a confirmé ces résultats (spectres de masse exposés en annexe E).

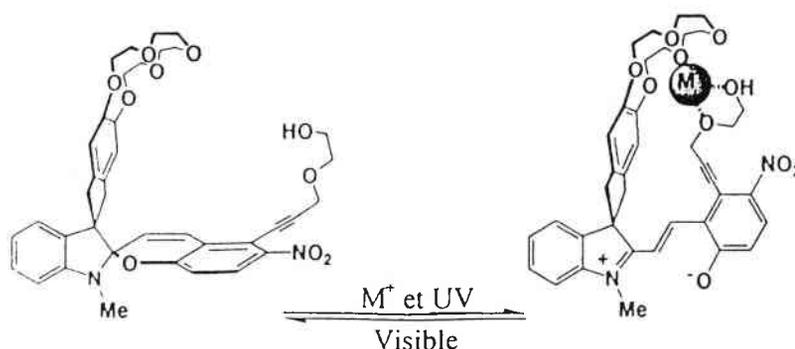


**Figure V.9 :** Autre structure possédant la particularité de rester en forme ouverte permanente.

Comme nous le montrons plus loin (paragraphe II.4.1., p. 177), la présence de la fonction alcène (C=C) semble induire lors de l'impact laser, un transfert intermoléculaire d'atomes d'hydrogène (dismutation) contrairement aux composés oxaziniques (C=N). En conséquence, la libération d'entités hydrogénées au cours des deux méthodes d'ionisation (LDI et MALDI) ne permettent pas réellement de les différencier. Cependant, la technique MALDI de par l'effet "cocon protecteur" de la matrice (acide nicotinique), garde sa spécificité : elle protège les molécules photochromiques d'une photofragmentation.

### ***1.2.2. Composé spiro à forme ouverte permanente induite par laser***

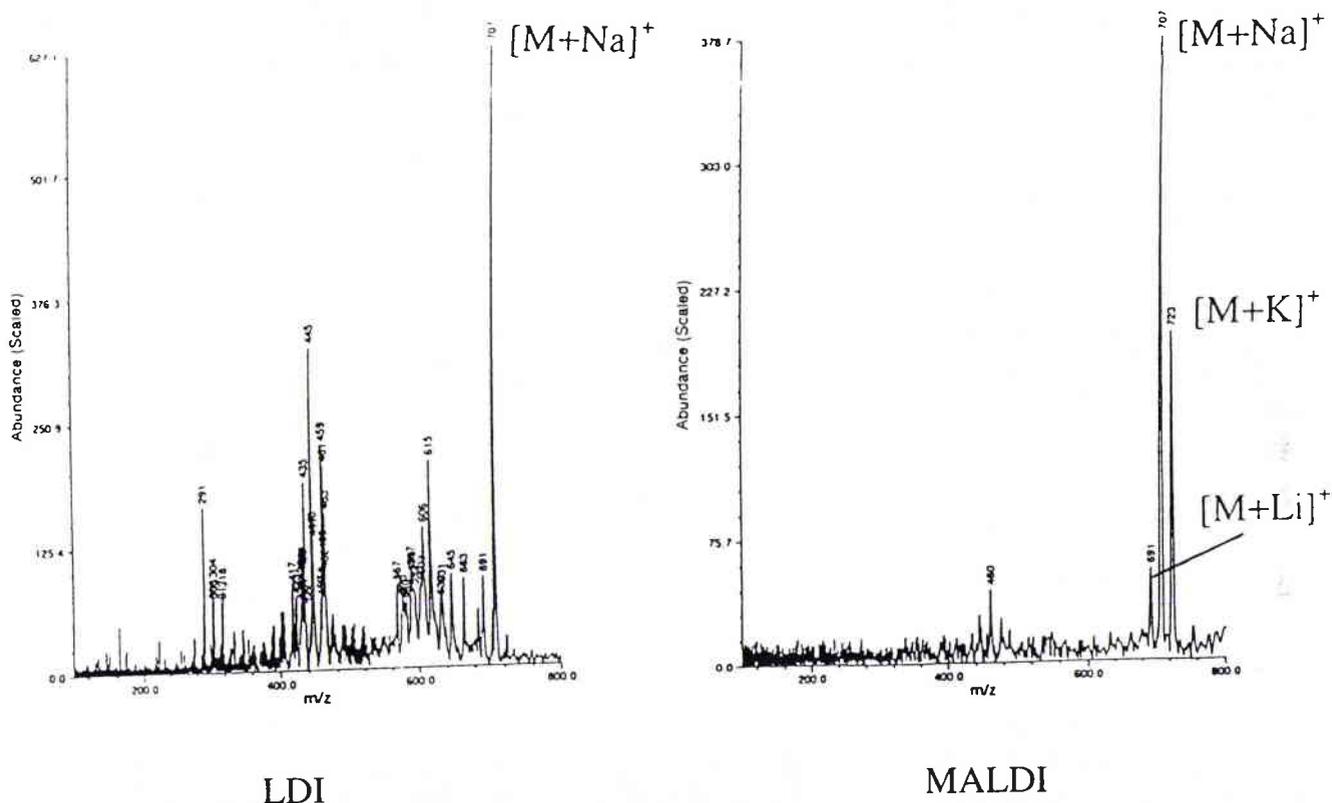
Nous rappelons, que l'ouverture permanente du composé spiro 15C5 (figure V.10) est obtenue uniquement, s'il y a conjonction de deux événements : une irradiation laser UV et la présence d'un sel alcalin qui stabilise par complexation la forme ouverte [6].



**Figure V.10 :** Structure et propriétés du composé spiro 15C5.

La possibilité de bloquer la forme ouverte de ce composé benzopyrane particulier, va nous être utile pour confirmer, si le transfert de  $H^+/H$  caractéristique du processus MALDI, a bien lieu après l'ouverture de la molécule, et non avant.

Dans un premier temps, nous allons comparer le comportement de ce benzopyrane substitué par un éther couronne 15C5, sous les modes d'ionisation MALDI et LDI, dans les mêmes conditions expérimentales que les autres composés photochromiques étudiés jusqu'alors (voir figure V.11).



**Figure V.11** : Spectres de masse LDI/MALDI à 355 nm du composé spiropyrane 15C5 sans ajout de sel alcalin et sans irradiation avant analyse,  $Irr = 10^7 \text{ W/cm}^2$ .

Le spectre LDI est caractérisé par la présence de nombreux fragments ( $291 < m/z < 663$ ). L'ionisation de ce composé, contrairement aux spirooxazines ou aux spiropyranes classiques, est assurée par cationisation de l'ion moléculaire par le sodium :  $[M+Na]^+$ .

Le spectre MALDI quant à lui, révèle une nouvelle cationisation de l'ion moléculaire par le potassium (présence de  $[M+K]^+$ , le potassium étant une impureté de la matrice acide férulique), et une quasi absence de pic de fragmentation.

L'ionisation par cationisation de ce spiropyrane original, est facilitée par la présence sur la molécule d'un éther couronne 15C5, lequel a comme c'est bien connu, une affinité particulière pour les alcalins [7].

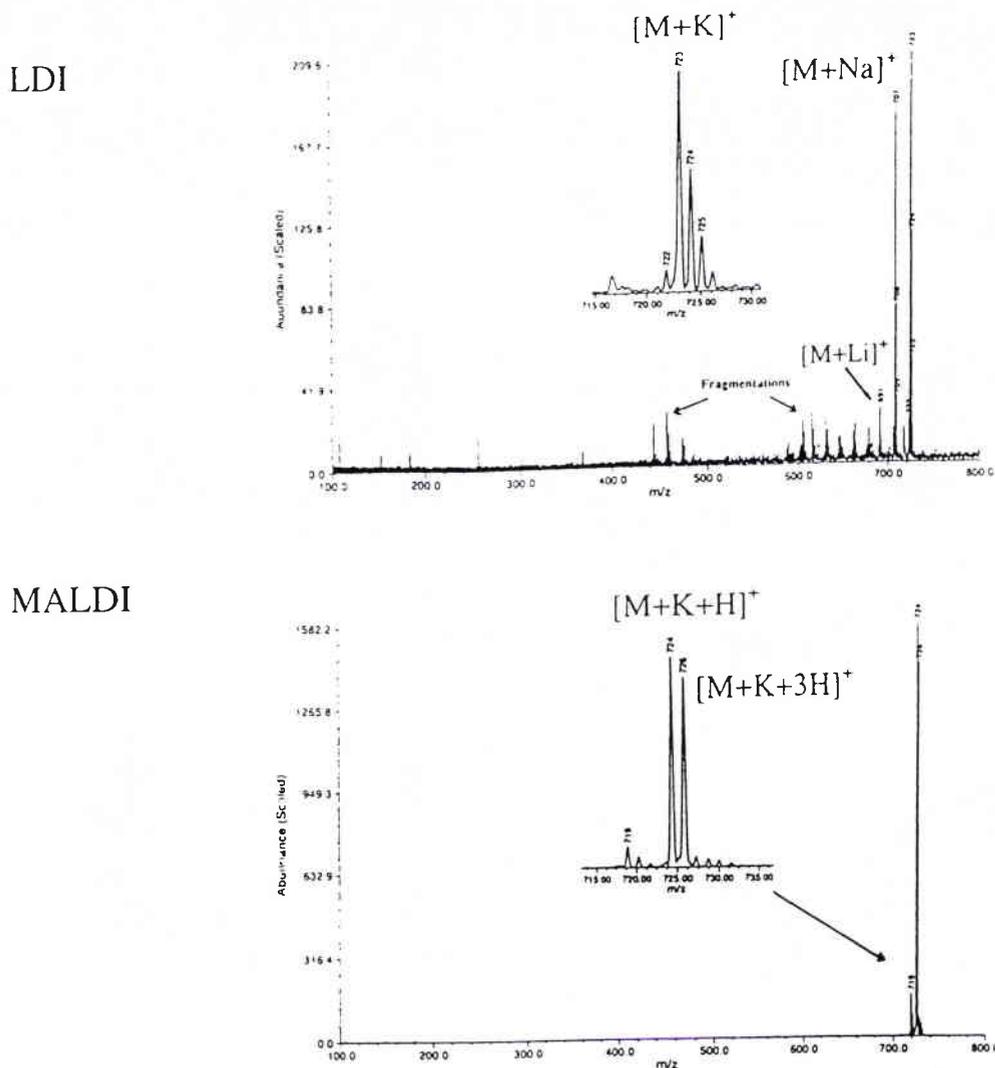
Ce benzopyrane particulier possédant un groupement nitro, devrait a priori avoir une cinétique d'ouverture bien plus longue que les composés spiraniques non nitrés. Dans le chapitre II, des recherches expérimentales par photolyse laser [8] évaluent ce temps à plusieurs centaines de picosecondes, alors qu'il est inférieur à 10 picosecondes pour les composés non nitrés. Dans ce cas, la libération de  $H^+/H^-$  par la matrice intervient bien avant l'ouverture de la molécule, et comme ces entités ont une vitesse dans le plasma ( $5\ 000\ m.s^{-1}$ , [2]) très supérieure à celle de l'analyte ( $700\ m/s^{-1}$ , voir chapitre I, p.17), l'ionisation de la molécule par transfert de  $H^+/H^-$  ne se fait pas. Les cations alcalins présents à l'état d'impureté, ont eux une vitesse comparable à l'analyte (voir chapitre I, p. 35), et peuvent de ce fait assurer l'ionisation de la molécule cible par cationisation (figure V. 11).

Nous allons à présent comparer le comportement du composé spiro 15C5, lorsqu'il se présente sous une forme ouverte permanente. Pour se faire nous avons procédé ainsi :

- 1- Une petite quantité de spirobenzopyrane (sous forme de poudre) est mélangée à un excès de  $KCl^1$  dans un mortier, et broyée pendant 10 minutes.
- 2- Pour les expériences en désorption laser directe (LDI), le mélange (spiro 15C5+KCl) est déposé sur une bande autocollante aluminée puis irradiée avant analyse pendant 1 minute avec un laser 355 nm, afin de produire la forme ouverte permanente (apparition d'une coloration bleutée). L'échantillon est ensuite introduit dans le spectromètre de masse pour analyse.
- 3- En ce qui concerne les expériences par MALDI, une solution à  $10^{-3}$  M du mélange (spiro 15C5+KCl) est préparée dans l'acétonitrile, puis est irradiée également à 355 nm pendant 1 minute. Ensuite, 2,5  $\mu L$  de la solution irradiée sont déposés à la surface d'un dépôt cristallin de l'acide férulique (solution saturée dans MeOH) avant analyse. Nous remarquons également la présence de cette coloration caractéristique de la forme ouverte.

---

<sup>1</sup> Nous n'avons pas choisi LiCl comme sel alcalin, car ses propriétés hygroscopiques empêchent la formation d'un mélange homogène à l'état solide



**Figure V.12** : Spectres de masse LDI/MALDI à 355 nm du composé spiropyrane 15C5 avec ajout de sel alcalin (KCl) et irradiation avant analyse,  $Irr = 10^7 \text{ W/cm}^2$ .

Le dopage en potassium provoque l'exaltation du pic  $[M+K]^+$  en désorption laser directe. Le potassium piégé par l'éther couronne 15C5, et retenu par la chaîne oxyéthylénique, change la configuration électronique de la molécule, rendant impossible le retour à la forme fermée de départ. Cette nouvelle disposition électronique de la molécule autorise dans les conditions MALDI, l'ionisation des molécules cibles par transfert d'hydrogène  $H^+/H'$  : ( $[M+K+H]^+$  et  $[M+K+3H]^+$ ), se différenciant ainsi du mode d'ionisation de la désorption laser directe.

La même expérience (Spiro 15C5+KCl) mais sans irradiation avant analyse, montre qu'en MALDI, il est difficile d'obtenir des ions moléculaires multi-hydrogénés. L'ionisation en désorption laser assistée par matrice intervient donc réellement après l'ouverture de la molécule cible, et très certainement à l'état excité.

### 1.3. Conclusion

L'ensemble des résultats présentés dans cette partie, permettent de donner un début de réponse quant à la localisation de l'étape de l'ionisation lors du processus MALDI. Jusque là, deux hypothèses persistaient. Elles sont résumées en figure V.13.

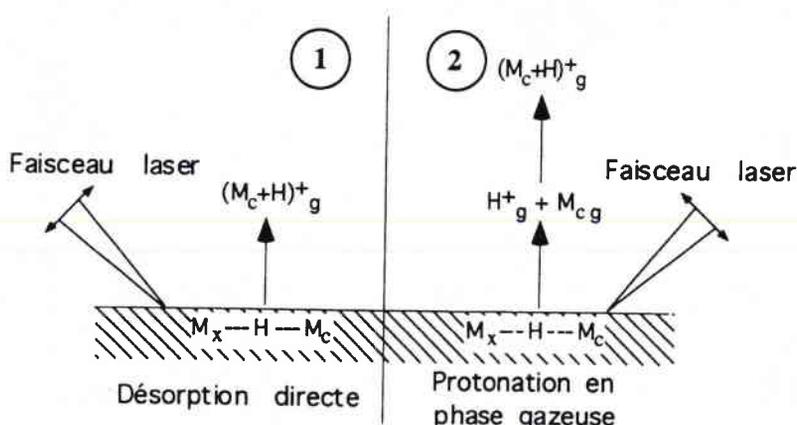


Figure V.13 : Deux des mécanismes les plus admis concernant l'ionisation MALDI.

L'hypothèse 1 suppose une ionisation par échange de proton en phase solide entre la matrice et la molécule cible. La présence de nombreuses liaisons hydrogène entre ces deux types de composés peut être en faveur de cette hypothèse.

L'hypothèse 2 consiste en une désorption de la molécule cible sous forme neutre, laquelle s'ioniserait par capture d'un proton en phase gazeuse. Les différents résultats présentés dans cette partie vont plutôt dans le sens de cette seconde hypothèse. En effet, l'étude du composé spiro 15C5 montre que l'ionisation par transfert d'hydrogène, suppose la libération simultanée de  $H^+/H$  provenant de la matrice et de molécules cibles à l'état excité (forme ouverte). Ces deux événements concomitants interviendraient quelques picosecondes après l'arrivée des premiers photons.

## II. Influence des paramètres expérimentaux en MALDI

Si la technique MALDI est une méthode d'analyse facile à mettre en œuvre, la compréhension de son mécanisme d'action est rendue difficile de par sa dépendance à de nombreux paramètres expérimentaux. En connaissant à présent, le comportement des composés spiraniques sous irradiation MALDI, nous serons plus à même à définir les paramètres expérimentaux les plus déterminants.

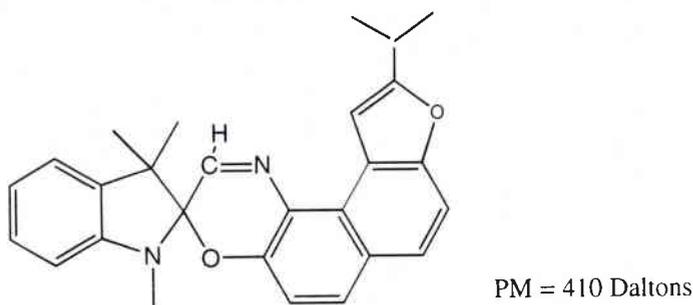
## II.1. La préparation de l'échantillon

### II.1.1. Les différents modes de dépôts

De la bibliographie (voir chapitre I) ressort deux grandes méthodes de préparation de l'échantillon :

- a ) Dépôt de l'échantillon en deux étapes :
  - matrice puis analyte (méthode A)
  - analyte puis matrice (méthode B).
- b ) Dépôt de l'échantillon en une seule étape :
  - mélange intime en solution de la matrice et de l'analyte (méthode de la goutte séchée, méthode C).

L'étude de l'influence de la préparation de l'échantillon (méthodes A, B, et C) a été menée sur le composé spirooxazinique, représenté figure V.14.



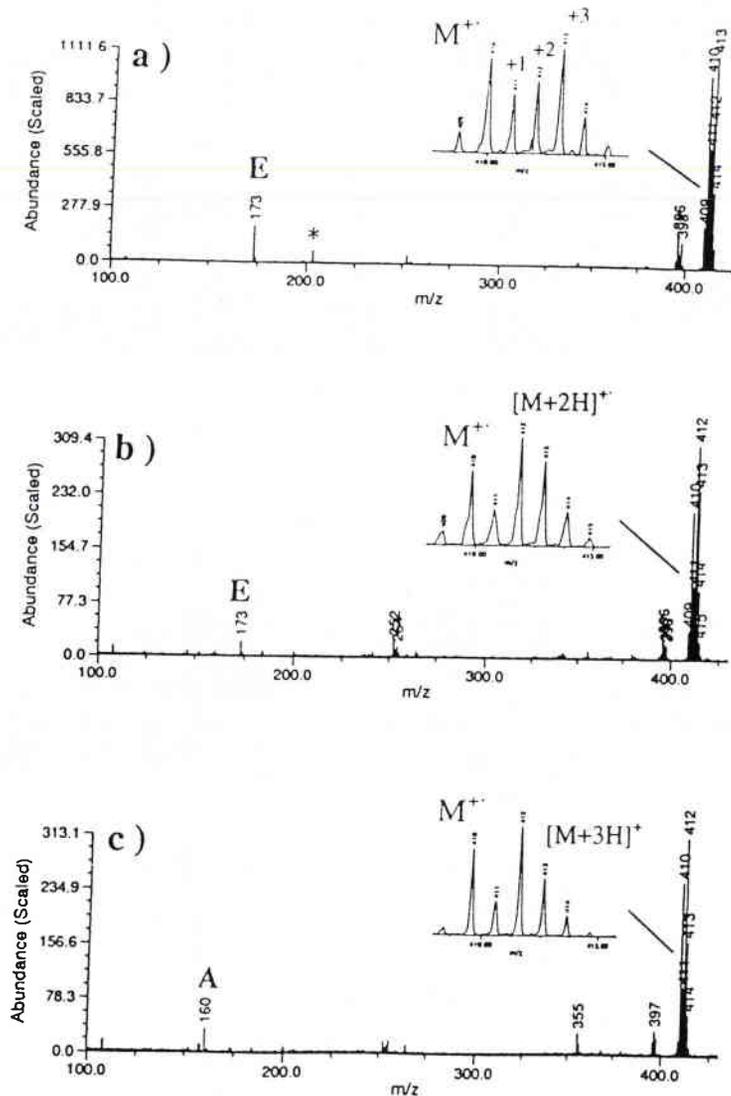
**Figure V.14** : Structure de la spirooxazine étudiée.

Les spectres MALDI présentés figure V.15, sont le résultat d'une accumulation de 50 tirs laser, effectuée sur 50 endroits différents de l'échantillon. Cette étude a été réalisée à 266 nm, sous une irradiance laser de  $5,10^7$  W/cm<sup>2</sup>, et en présence de l'acide nicotinique (saturé dans H<sub>2</sub>O). Le composé spiro est quant à lui, dissous dans le THF, afin d'obtenir une solution à  $10^{-3}$  M.

L'interprétation des résultats (figure V.15), nous amène aux observations suivantes :

- ✓ La méthode par dépôts successifs (matrice puis analyte, méthode A) permet l'obtention d'un spectre de masse plus propre, avec un rapport signal sur bruit quatre fois plus important que dans les autres cas.
- ✓ Cette même méthode de dépôt semble être plus propice à la formation de l'espèce  $[M+3H]^+$  qui n'est plus majoritaire, lorsque la méthode B ou C est appliquée.

- ✓ Des conditions différentes de germination des cristaux de la matrice expliqueraient ces variations [9]. Les méthodes B et C ne favoriseraient pas une incorporation optimale des molécules cibles dans le réseau cristallin. Elles seraient alors davantage exposées au flux photonique, expliquant ainsi la présence de pics fragments sur les spectres b et c. C'est à partir de ces résultats que nous avons basé notre méthodologie. Nous rappelons que l'ensemble des spectres MALDI présentés dans ce travail de thèse, ont été effectués à partir d'un dépôt en deux étapes (méthode A).

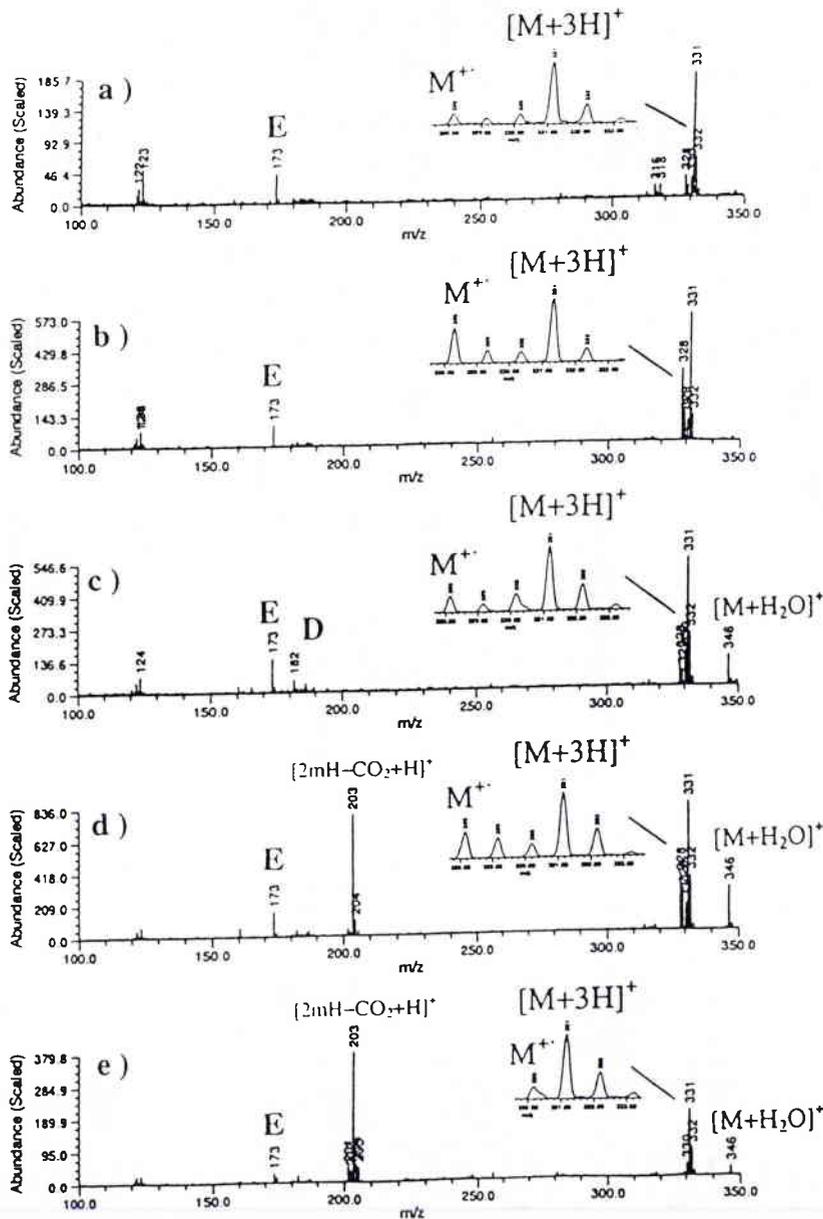


**Figure V.15 :** Influence du mode de préparation sur l'empreinte MALDI ( $\lambda = 266 \text{ nm}$ ,  $\text{Irr} = 5,10^7 \text{ W/cm}^2$ ) : a ) méthode A, b ) méthode B et c ) méthode C, \* photofragment de l'acide nicotinique (matrice) :  $[2mH-\text{CO}_2+\text{H}]^+$ .

### II.1.2. Le rapport des concentrations cible /matrice

Nous nous sommes intéressés, à faire varier le rapport des concentrations cible sur matrice, afin d'étudier l'influence de ce paramètre sur l'empreinte spectrale de la spirooxazine de base ( $M = 328 \text{ Daltons}$ ). La concentration en molécules

cibles étant fixée à  $10^{-4}$  M, nous avons eu recours à différentes concentrations de matrice, pour obtenir les rapports cible/matrice suivants : 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 et 1/1000. Comme précédemment, les spectres présentés figure V.16 représentent l'accumulation de 50 tirs laser, effectuée en se déplaçant sur la totalité de la surface de l'échantillon à analyser.



**Figure V.16 :** Influence du rapport cible/matrice. Spectres MALDI-FTMS à 248 nm, de la spirooxazine de base en présence de l'acide nicotinique et à une irradiance laser de  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> : a) cible/matrice : 1/10, b) 1/50, c) 1/100, d) 1/500 et e) 1/1000.

L'examen des spectres montre que :

- ✓ L'apparition d'espèces triplement hydrogénées  $[M+3H]^+$  n'est pas tributaire du rapport cible/matrice.

- ✓ Par contre, l'apparition de photofragments ou d'adduits, provenant de la matrice :  $m/z = 203$ ,  $[2mH-CO_2+H]^+$  et  $346$ ,  $[M+H_2O]^+$ , dépend directement du rapport cible /matrice. Ils peuvent parfois être à l'origine d'une mauvaise interprétation spectrale.
- ✓ Un rapport 1/100 apparaît dans ce cas optimal :
  - bon rapport signal sur bruit,
  - absence de pics parasites provenant de la matrice.

## II.2. Les paramètres laser

Les paramètres laser constituent à eux seuls, une source d'informations considérable, pouvant aider à la compréhension du mécanisme de l'ionisation. Ainsi, pour nous en rendre compte, nous allons déterminer successivement l'effet de la longueur d'onde, du temps de pulse, de l'irradiance laser et du  $DI_3$  (délai entre l'ionisation et l'excitation lors d'une séquence FTMS) sur l'ionisation des spirooxazines.

### II.2.1. L'effet de la longueur d'onde

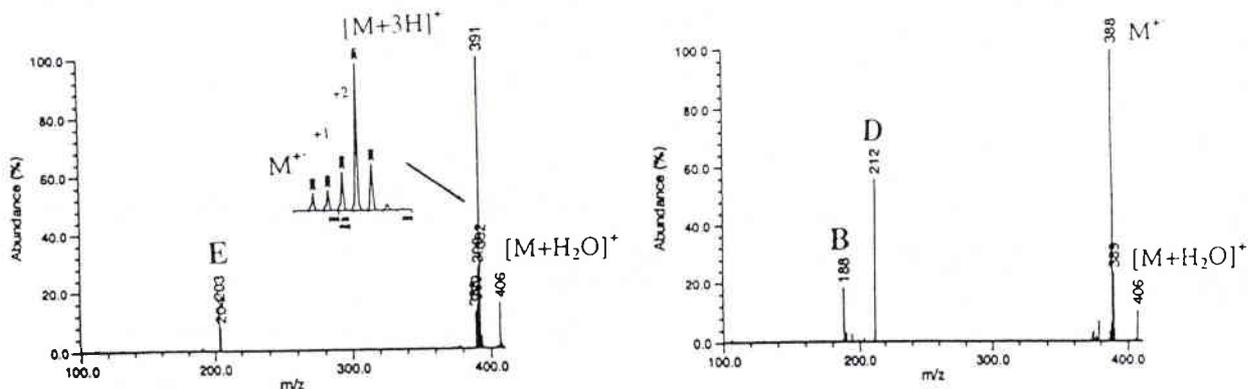
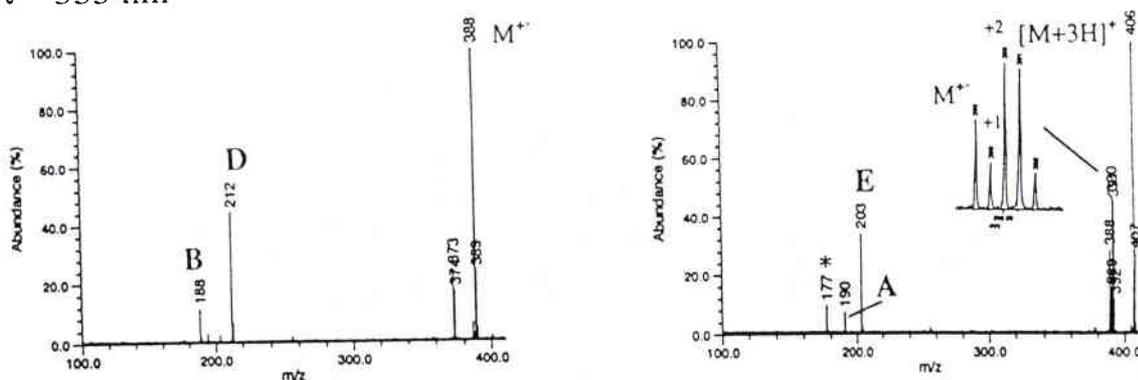
Le choix de la matrice en MALDI, est très souvent dicté par sa capacité à absorber les photons du laser incident. Nous avons alors comparé l'efficacité de deux matrices : l'acide nicotinique et l'acide férulique à deux longueurs d'onde :  $\lambda = 266$  et  $355$  nm. Le composé spirooxazinique analysé lors de cette étude, est le spiro II, dont le poids moléculaire est de 388 Daltons. L'irradiance laser est fixée pour les deux longueurs d'onde à  $5,10^7$  W/cm<sup>2</sup>.

D'après les résultats présentés figure V.17, nous constatons que :

- ✓ L'acide nicotinique à 266 nm, montre un spectre MALDI typique : apparition de  $[M+H]^+$ ,  $[M+2H]^+$ ,  $[M+3H]^+$ , et du fragment spécifique à  $m/z = 203$ .
- ✓ L'acide férulique à 355 nm, conduit également à la formation d'espèces multi-hydrogénées et du fragment spécifique E.
- ✓ Dans les autres cas, c'est-à-dire : l'acide nicotinique à 355 nm et l'acide férulique à 266 nm, nous obtenons le spectre caractéristique de la désorption laser directe, à savoir l'apparition de l'ion moléculaire  $M^+$ , et des fragments à  $m/z = 188$ ,  $212$  et  $373$ .

## Acide nicotinique

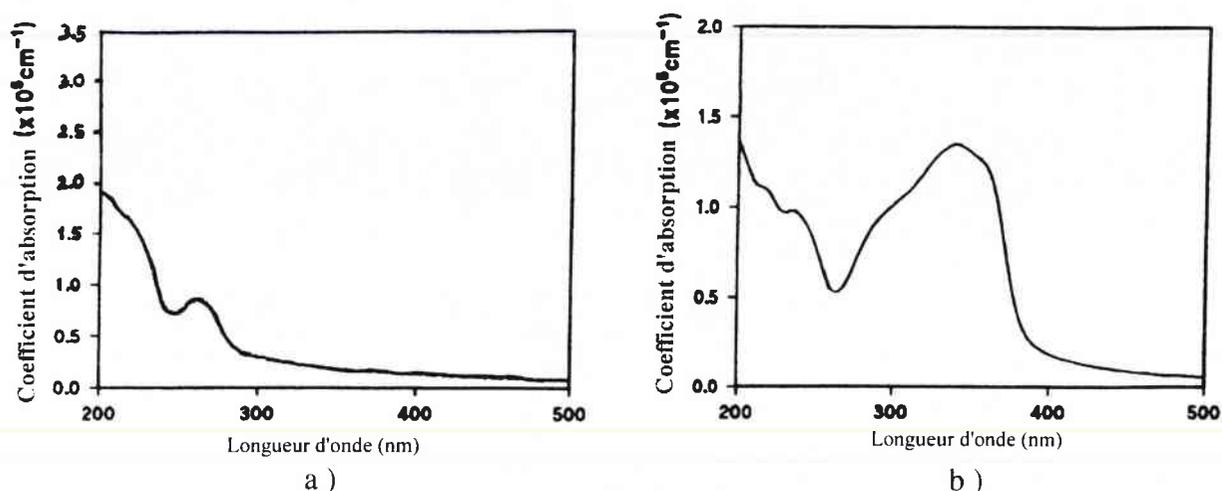
## Acide férulique

 $\lambda = 266 \text{ nm}$  $\lambda = 355 \text{ nm}$ 

**Figure V.17** : Spectres MALDI-FTMS à 266 et 355 nm du spiro II ( $M = 388$ ), effet de la longueur d'onde,  $Irr = 5,10^7 \text{ W/cm}^2$ , \* : photoproduit de l'acide férulique.

Comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe I.1.4., les spectres d'absorption UV réalisés en solution, ne traduisent pas réellement les transitions électroniques permises de la matrice à l'état solide. En effet, à l'état solide les interactions dipôle-dipôle modifient considérablement les moments de transition. C'est pourquoi, nous préférons exposer en figure V.18 les spectres d'absorption UV solide de l'acide nicotinique et de l'acide férulique. Ils traduisent mieux les transitions électroniques intrinsèques de la matrice à l'état solide.

Le rôle de "cocon protecteur ou filtre photonique" de la matrice est donc bien directement lié à la longueur d'onde du laser incident. D'après les spectres d'absorption UV de matrices enregistrés à l'état solide, il semble que l'absorption d'électrons de l'état fondamental  $S_0$  vers l'état singulet  $S_1$ , soit la plus propice à la libération d'entités hydrogénées.



**Figure V.18 :** Spectres d'absorption UV-Visible de matrices MALDI enregistrés à l'état solide : a ) acide nicotinique, b ) acide férulique, tiré de [4].

### II.2.2. L'effet de l'impulsion laser

La présence au laboratoire de deux types de laser : un Nd:Yag délivrant un faisceau lumineux de 355 nm en un temps de 5 ns, et un laser excimère à 248 nm avec un pulse de 34 ns, nous a permis de constater qu'à irradiance égale ( $10^7$  W/cm<sup>2</sup>), une durée d'impulsion laser plus longue d'un facteur 7 n'avait aucune incidence sur les spectres MALDI de la spirooxazine de base (M = 328).

Dans les deux cas, nous détectons les ions pseudo-moléculaires multi-hydrogénés caractéristiques du processus MALDI, et accompagnés du fragment E (figure V.19). Néanmoins, cette différence de temps entre les deux impulsions laser, est peut être trop faible pour que l'on puisse constater un changement notable. Il semble d'après la littérature [10] que quelle que soit la durée de l'impulsion laser, le processus MALDI est gouverné par le même mécanisme. En principe, une durée d'impulsion laser relativement longue (~ns) favorise en phase gazeuse ou en mode désorption l'absorption bi ou tri-photonique, tandis qu'une impulsion trop courte (~fs) augmente la densité de photons par unité de temps. Par conséquent, les ions acquièrent dans les deux cas, une énergie interne importante et se fragmentent. Dans ces conditions, ces temps d'impulsion laser ne sont pas optimisés pour un processus MALDI. Il serait alors intéressant d'étudier plus précisément cet aspect du mécanisme MALDI par les sondes photochromiques.

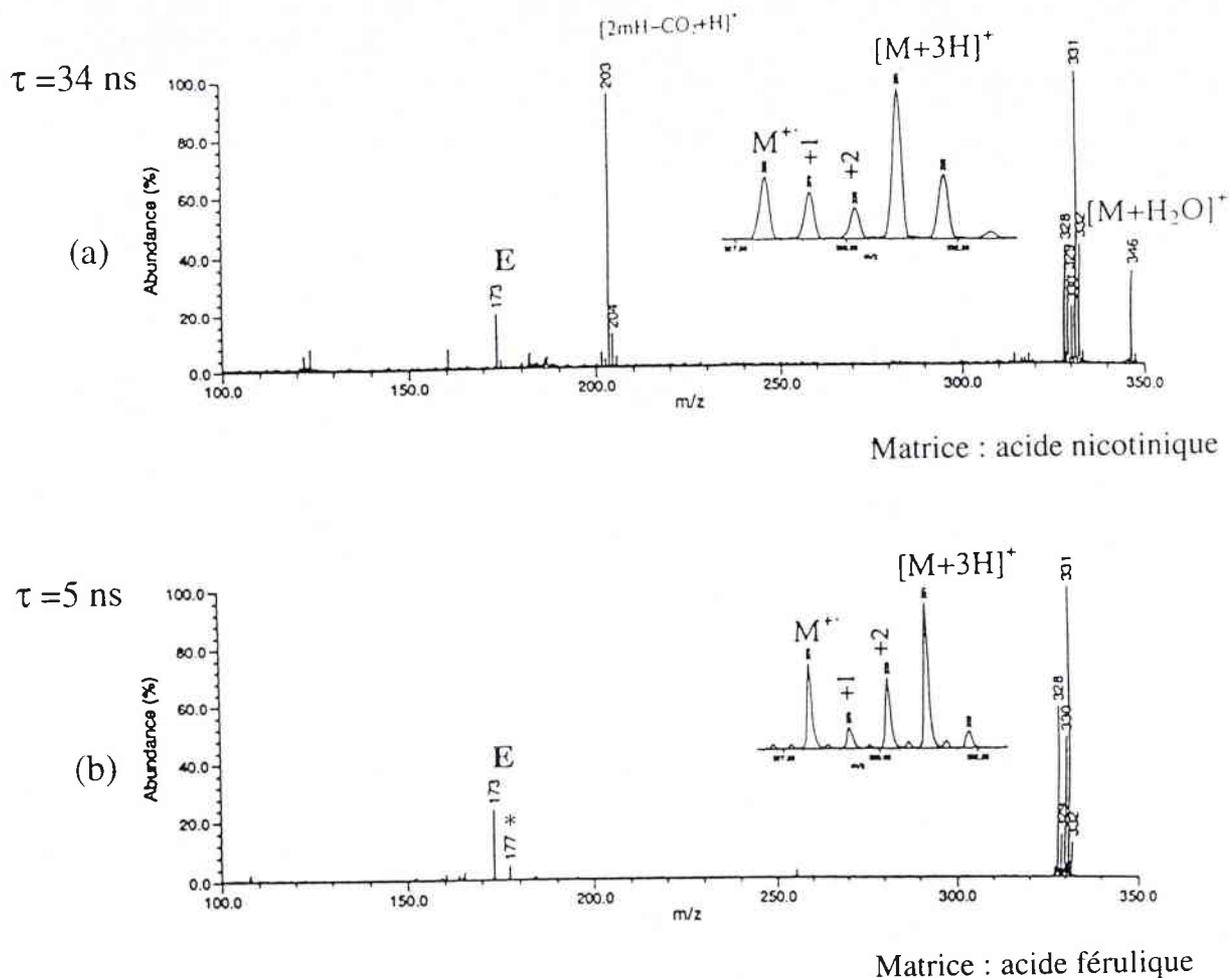
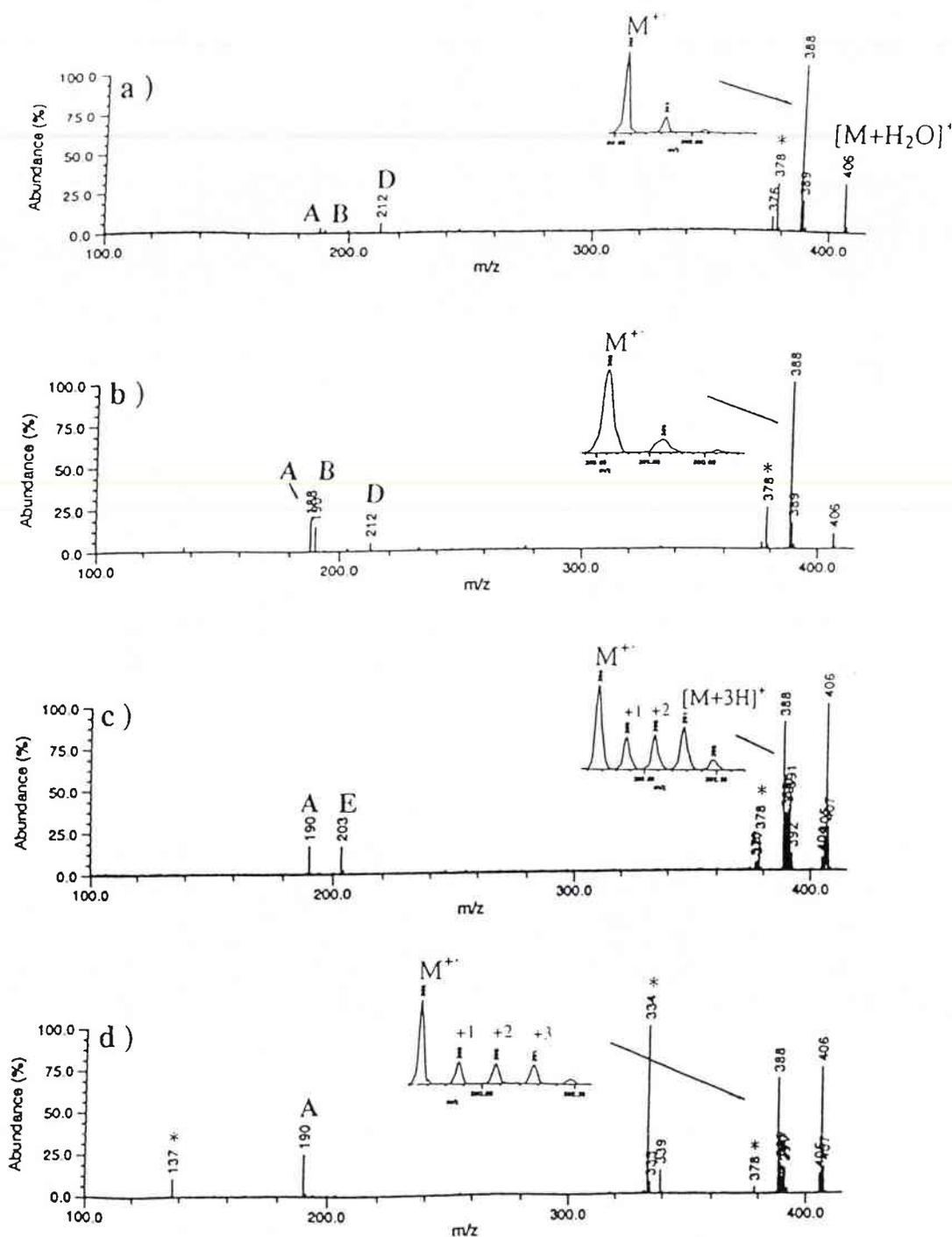


Figure V.19 : Spectres MALDI-FTMS à 248 (a) et 355 nm (b) de la spiropyrone de base effet du temps de pulse,  $Irr = 10^7$  W/cm<sup>2</sup>.

### II.2.3. L'effet de l'irradiance

L'effet de l'irradiance laser a été étudié sur le composé spiro II de masse  $m/z = 388$ , en présence de la matrice 2,5-DHB, et sous une irradiation de 266 nm (voir figure V.20). La configuration de notre interface laser, permettant de faire varier à souhait le diamètre de l'impact laser sur l'échantillon, nous a permis d'examiner l'influence de l'irradiation laser sur le mécanisme d'ionisation MALDI.

La quantité d'énergie déposée sur l'échantillon par unité de surface et au cours d'une impulsion laser, est certainement le paramètre laser le plus important en MALDI (hormis la matrice elle-même). Il existe de très nombreux exemples dans la littérature (voir chapitre I), qui font état d'une valeur seuil. En dessous de cette valeur, l'ion moléculaire n'est pas détecté, au-dessus seuls les fragments de l'ion moléculaire sont observés.



**Figure V.20** : Spectres MALDI-FTMS à 266 nm du spiro II ( $M = 388$ ) à une irradiance laser ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) : a)  $10^8$ , b)  $5 \cdot 10^7$ , c)  $10^7$  et d)  $5 \cdot 10^6$ , \* : photofragments de l'acide 2,5-DHB utilisé comme matrice.

Nous avons déjà pu nous rendre compte de l'influence de ce paramètre lors de la présentation des spectres MALDI dans le chapitre IV. L'analyse de la spironaphtoxazine non substituée en présence de l'acide nicotinique à une irradiance de  $5 \cdot 10^7 \text{ W}/\text{cm}^2$ , provoque l'apparition du photofragment E caractéristique, contrairement à une analyse réalisée à une irradiance de  $5 \cdot 10^6 \text{ W}/\text{cm}^2$ .

La figure V.20 met en évidence que l'irradiance laser peut également en certaines occasions (comme ici avec la matrice 2,5-DHB) influencer directement sur le transfert d'hydrogène.

Ces résultats nous révèlent l'existence d'une valeur seuil. Au-delà de  $10^8$  W/cm<sup>2</sup> nous observons un spectre MALDI se rapprochant davantage d'un spectre LDI classique, avec la présence de l'ion moléculaire M<sup>+</sup> et de ses fragments caractéristiques (188, 190 et 212). En dessous de cette valeur, nous remarquons l'apparition d'ions moléculaires hydrogénés typiques au MALDI. Si nous diminuons encore l'irradiance jusqu'aux limites de notre instrumentation, nous ne détectons plus de fragment MALDI (E, m/z = 203), et l'intensité des espèces hydrogénées tend à diminuer au profit des ions de la matrice (137, 334, et 378).

Néanmoins, nous tenons à préciser, que cette influence aussi marquée de l'irradiance laser, n'a été rencontrée qu'avec la matrice 2,5-DHB à la longueur d'onde 266 nm.

#### II.2.4. L'effet du $Dl_3$

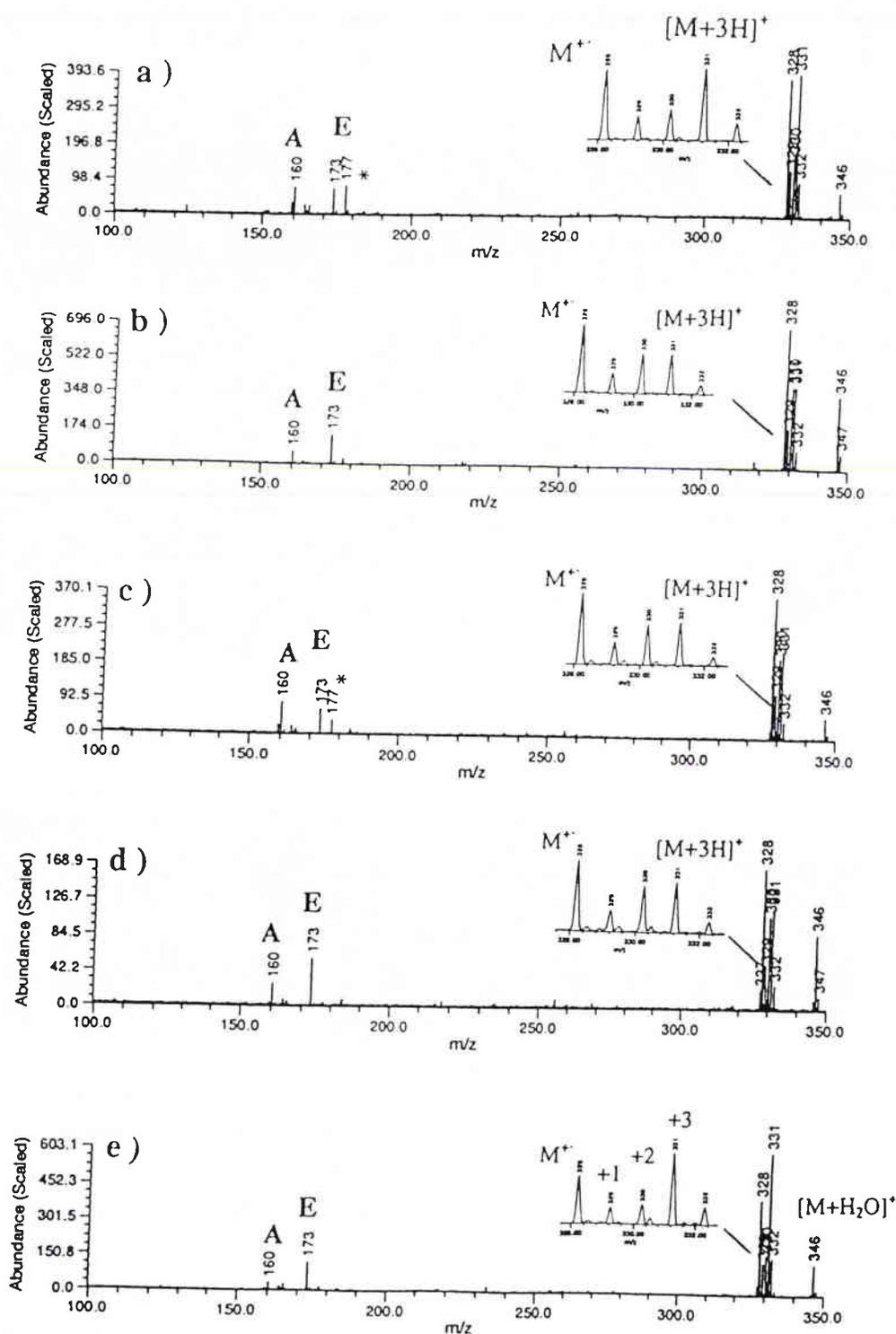
Du fait de la spécificité de notre spectromètre de masse, nous pouvons faire varier à notre gré le temps entre l'ionisation et l'excitation des ions, de 2 microsecondes à plusieurs secondes. Il était donc intéressant, de connaître l'influence de ce paramètre sur l'empreinte MALDI.

Cette étude a été réalisée à 355 nm et à une irradiance laser de  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> sur la spirooxazine de base (M = 328). La matrice utilisée à cette longueur d'onde est toujours l'acide férulique. Les spectres ont été moyennés sur 5 tirs laser.

Le résultat de ce travail présenté figure V.21 met en évidence, que la formation d'espèces hydrogénées en MALDI, ne s'intensifie pas lorsqu'on passe d'un délai de 2  $\mu$ s à 5 s. Il en va de même pour la photofragmentation.

Il serait alors particulièrement intéressant d'effectuer ces mêmes analyses par MALDI-TOF, car le temps de détection sur ce type d'appareil est bien plus court ( $\mu$ s) qu'en FTMS (ms). Nous serions sur une échelle de temps, plus proche du phénomène de l'ionisation. Nous devrions en principe obtenir les mêmes résultats qu'en FTMS.

Cette étude confirme cependant, que l'ionisation par transfert d'hydrogène ne se fait pas lors de l'expansion du nuage gazeux par un mécanisme collisionnel, mais très certainement dans la phase condensée du nuage gazeux.



**Figure V.21** : Spectres de masse MALDI-FTMS à 355 nm de la spirooxazine de base,  $Irr = 10^7 \text{ W/cm}^2$ , effet du  $Dl_3$  : a)  $Dl_3 = 2 \mu\text{s}$ , b) 0,05 s, c) 0,1 s, d) 1 s et e) 5 s, \* : photofragment de la matrice (acide férulique).

## II.3. La matrice

La matrice est l'élément clef de la réussite d'une analyse par MALDI. C'est en effet elle, qui protège la molécule cible d'une photofragmentation intensive, et participe à son ionisation par transfert de  $H^+$  et/ou  $H$ . Jusqu'à présent, nous n'avons utilisé que des matrices à caractère acide (acide nicotinique, acide férulique et 2,5-DHB). Il était donc important d'apprécier également l'efficacité des matrices basiques ou polymères, afin d'étudier l'influence de la nature chimique de la matrice en MALDI. Dans de nombreux cas (voir chapitre I), ces dernières offrent une alternative intéressante aux matrices acides conventionnelles.

### II.3.1. Matrices considérées comme "acide" à l'état excité

Nous voulions vérifier qu'une matrice réputée comme étant basique à l'état solide (nitroaniline) ou en phase aqueuse (éponge à protons) puisse également jouer le rôle de matrice (transfert d'hydrogène) en MALDI. D'après Gimon-Kinsel *et al.* [12], les propriétés physiques et chimiques des composés à l'état excité ne peuvent être comparées à l'état solide ou liquide. Nous proposons d'étudier deux isomères de la nitroaniline ainsi qu'une matrice ayant la particularité d'être une éponge à protons en solution : le 1,8-bis-(diméthylamino)-naphtalène. Il s'agira alors d'observer si les transferts d'hydrogène sont toujours aussi favorables.

#### II.3.1.1. La nitroaniline

La 3-nitroaniline ainsi que la 4-nitroaniline ont la particularité de se comporter à l'état solide comme une base. Cependant, elles forment facilement en solution leur acide conjugué. La valeur de leur  $pK_a$  en phase aqueuse est respectivement de : 2,5 et 1 (figure V.22).

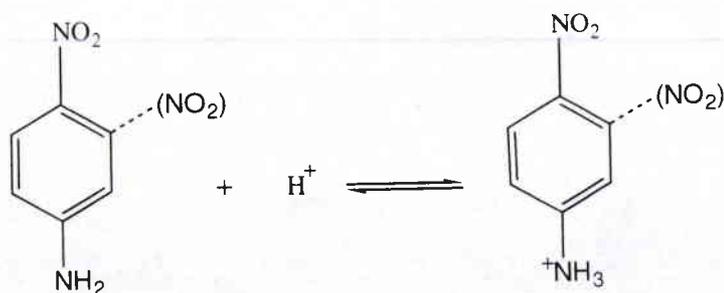
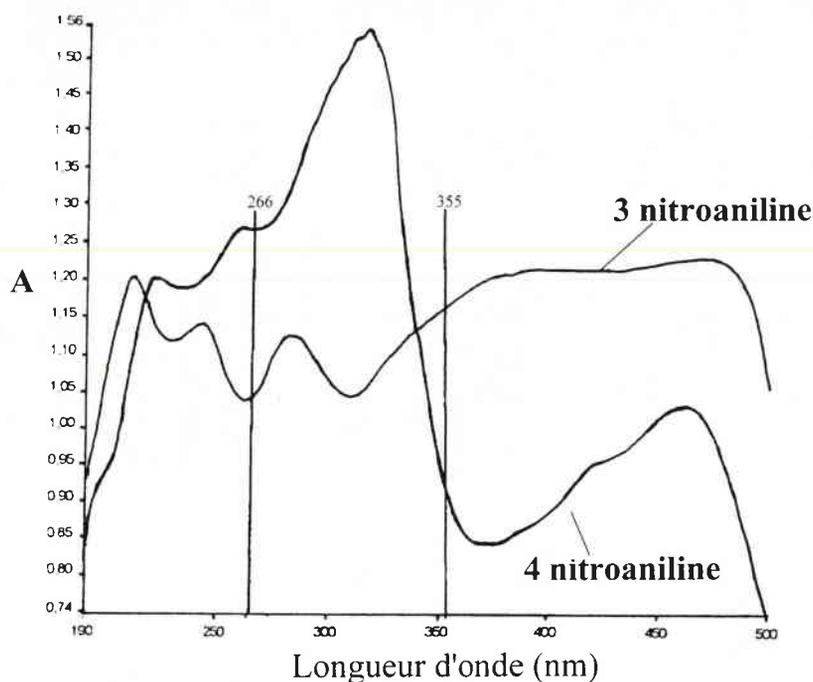


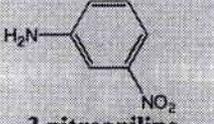
Figure V.22 : Equilibre acido-basique de la 3- et 4-nitroaniline.

Des mesures par spectroscopie d'absorption UV à l'état solide, ont permis de mettre en évidence, que l'isomérisie de position provoque une inversion de la bande d'absorption maximale (voir figure V.23). Quant aux spectres d'absorption UV effectués en solution (tableau V.1), ils indiquent une nouvelle fois des transitions électroniques d'intensité différente de celles enregistrées à l'état solide (voir annexe B).



**Figure V.23 :** Spectres d'absorption à l'état solide de la 3- et 4-nitroaniline.

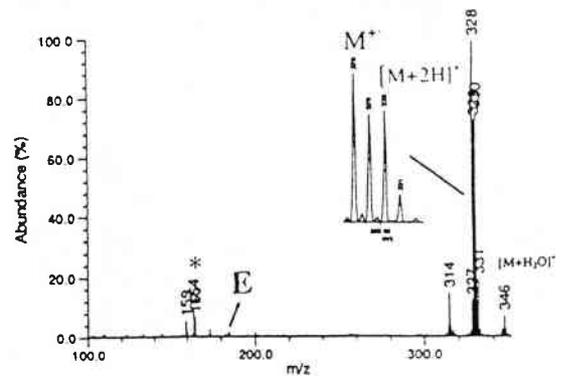
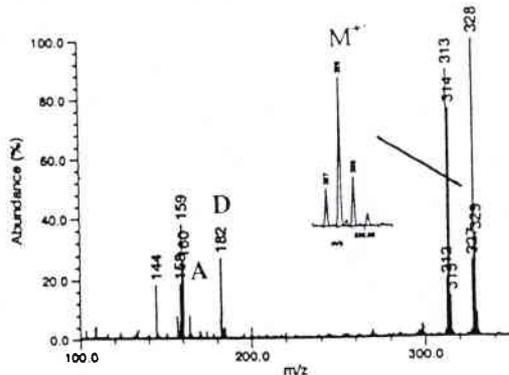
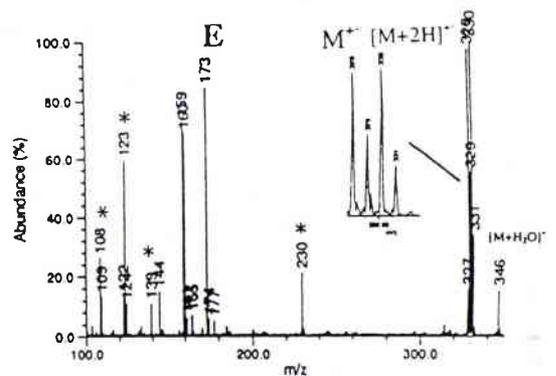
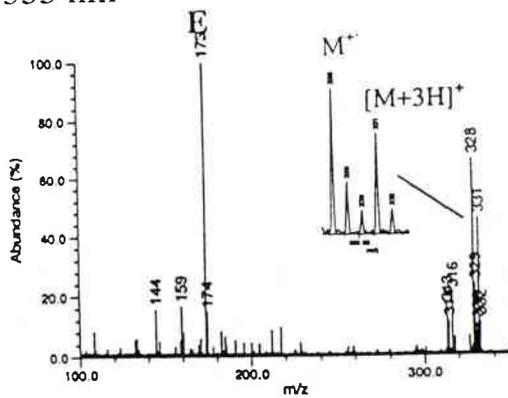
**Tableau V.1 :** Valeurs des coefficients d'extinction molaire des deux matrices basiques, exprimées en ( $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) à 266 et 355 nm.

	266 nm	355 nm
 <b>3 nitroaniline</b>	19 000	2 000
 <b>4 nitroaniline</b>	10 000	24 000

L'analyse de la spirooxazine de base ( $M = 328$  Daltons) en présence de la matrice : 3- et 4-nitroaniline, a été effectuée aux deux longueurs d'onde  $\lambda = 266$  et 355 nm. L'irradiance laser au cours de ces deux expériences a été fixée à  $10^7$   $\text{W}/\text{cm}^2$ .

## 3-nitroaniline

## 4-nitroaniline

 $\lambda = 266 \text{ nm}$  $\lambda = 355 \text{ nm}$ 

**Figure V.24** : Spectres MALDI/FTMS de la spirooxazine de base en présence de matrice basique à différentes longueurs d'onde,  $I_{\text{irr}} = 10^7 \text{ W/cm}^2$ , \* : photofragment de la matrice.

L'analyse des spectres de masse (figure V.24) a conduit aux observations suivantes :

- ✓ La fonction carboxylique n'est pas la seule à induire des transferts d'hydrogène en MALDI.
- ✓ Dans le cas présent, les espèces hydrogénées  $[M+3H]^+$  se forment préférentiellement, comme pour les matrices acides, lorsque la longueur d'onde du laser incident correspond à la transition  $S_0 \rightarrow S_1$ .
- ✓ Cette étude démontre une nouvelle fois qu'il est nécessaire de disposer de spectres d'absorption UV à l'état solide, pour réellement prévoir la capacité d'une matrice, à protéger la molécule cible d'un rayonnement photonique, et à participer à son ionisation.

- ✓ L'ion 159 apparaît pour la première fois en désorption laser. Lorsqu'il est accompagné de l'ion E, spécifique du processus MALDI, il serait attribué à une perte de carbène  $:CH_2$  (figure V.25).

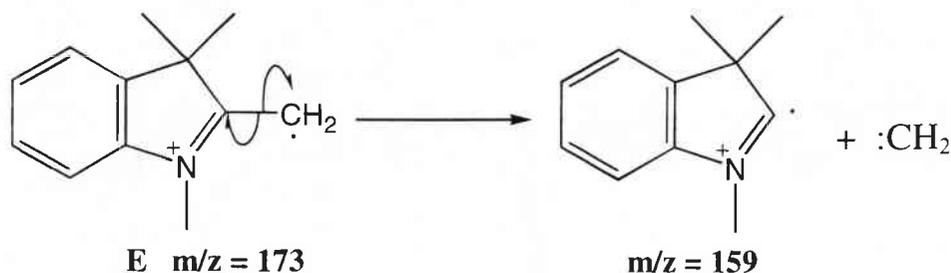


Figure V.25 : Structure de l'ion 159 issu de E.

- ✓ L'ion fragment E ( $m/z = 173$ ) très intense ne peut être en aucun cas attribué à la matrice. Il est bien caractéristique d'une fragmentation de l'ion triplement hydrogéné observé en MALDI.

### II.3.1.2. Le 1,8-bis-(diméthylamino)-naphthalène

Afin d'éliminer toute possibilité de la participation de l'hydrogène de l'acide conjugué au cours de l'ionisation de la spirooxazine de base ( $m/z = 328$ ), nous avons utilisé cette fois-ci une véritable éponge à protons, dont le pKa est égal à 12 (figure V.26).

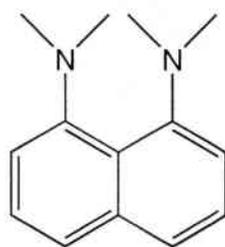
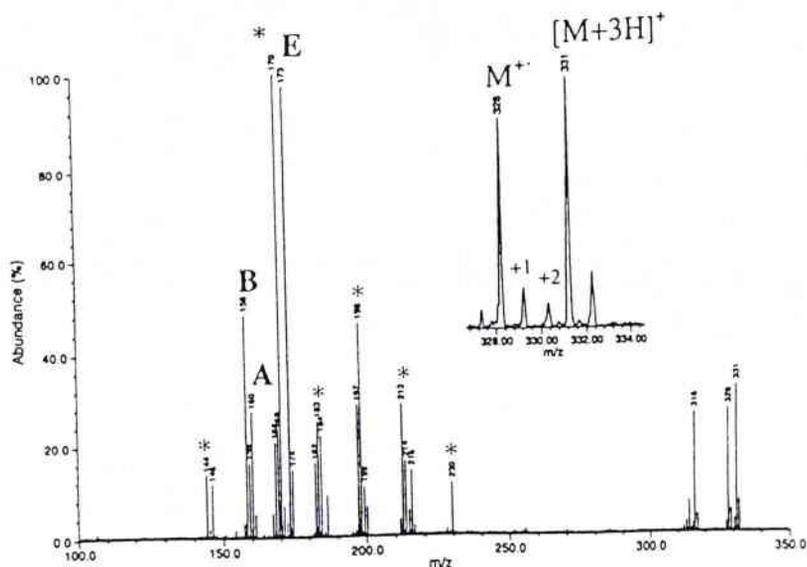


Figure V.26 : Structure de l'éponge à protons.

Le spectre MALDI ( $\lambda = 355$  nm) du composé spiranique (figure V.27) révèle la formation d'ions moléculaires triplement hydrogénés  $[M+3H]^+$  au côté de l'ion radical moléculaire  $M^+$ . Ce spectre met en évidence le caractère beaucoup plus "broyant"<sup>1</sup> de cette matrice par rapport à l'acide nicotinique ou férulique. Cela comporte un inconvénient majeur, puisque de nombreux pics fragments de basse masse appartenant à la matrice apparaissent sur le spectre de masse ( $m/z = 230, 213, 198, 183, 170, 146$ ), et peuvent dissimuler des informations capitales pour l'interprétation des résultats.

<sup>1</sup> une matrice "broyante" est une matrice qui s'ionise facilement et qui, par conséquent, donne de nombreux pics (fragments, dimères, trimères, etc.) de basse masse

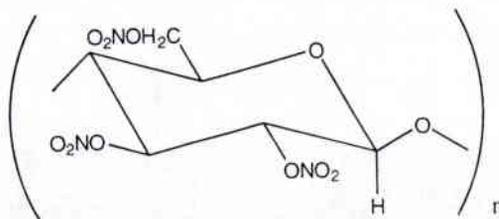


**Figure V.27** : Spectre MALDI/FTMS à 355 nm de la spirooxazine de base en présence d'une matrice basique : 1,8-bis-(diméthylamino)-naphtalène,  $Irr = 10^7 \text{ W/cm}^2$ ,  
\* : photoproduit de la matrice.

### II.3.2. Matrice polymère

La nitrocellulose, dont la formule est représentée figure V.28, a la particularité de créer un film de matrice homogène à la surface, améliorant ainsi la reproductibilité des résultats MALDI. Sa structure polymère rend cette étude plus proche des conditions d'utilisation de photochromes dans l'industrie.

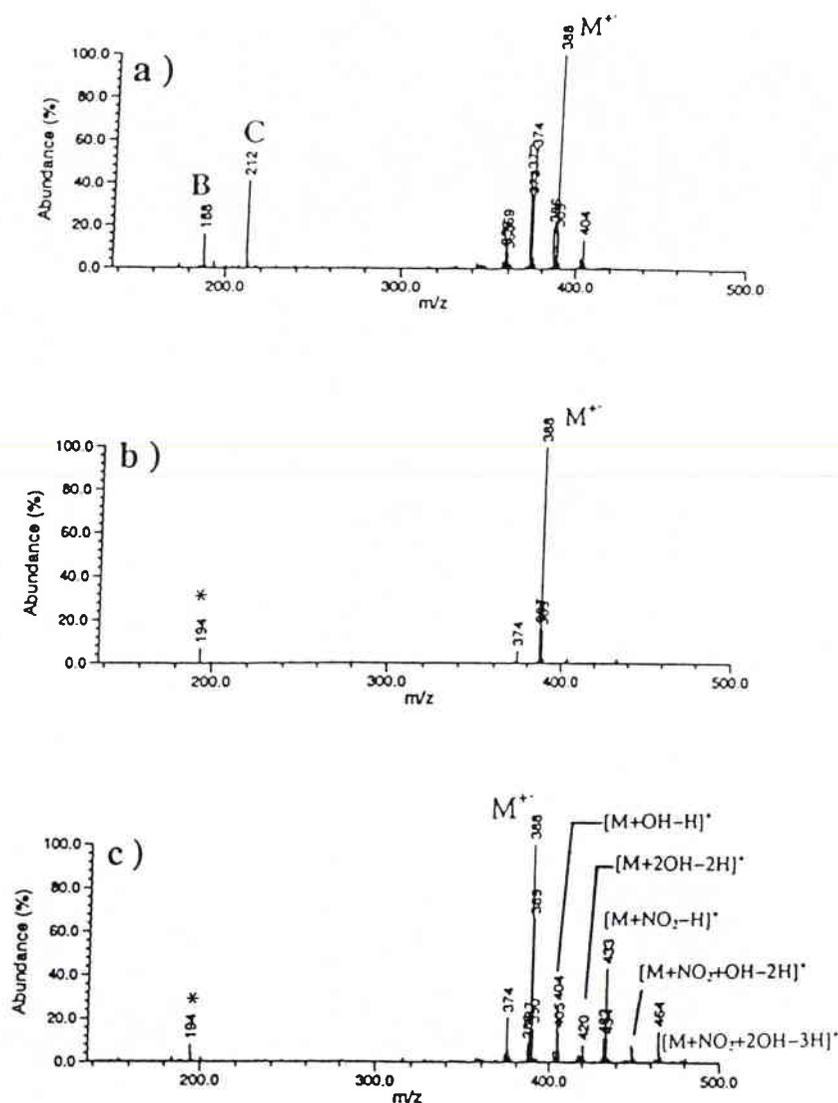
Nous avons étudié l'influence d'une telle matrice sur le comportement de la spironaphtoxazine II ( $M = 388$  Daltons) à 193 nm, car c'est à cette longueur d'onde que l'absorption de cette matrice est la plus grande (voir spectre d'absorption en annexe B).



**Figure V.28** : Structure de la nitrocellulose.

Deux types de dépôt ont été testés (voir figure V.29). Le dépôt classique en deux étapes (matrice puis cible) choisi comme méthode de dépôt standard au cours de

ce travail de thèse, et le dépôt en deux étapes mais à ordre inversé (cible puis matrice).



**Figure V.29** : Spectres MALDI/FTMS à 193 nm du spiro II ( $M = 388$  Daltons)

- a) dépôt classique,  $I_{rr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$  ;  
 b) dépôt à ordre inversé,  $I_{rr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$  ;  
 c) dépôt à ordre inversé,  $I_{rr} = 10^6 \text{ W/cm}^2$   
 \* : photofragment de la nitrocellulose.

Nous remarquons que :

- ✓ Le dépôt standard ne protège pas la spirooxazine de la photofragmentation. L'apparition de la coloration bleue à la surface du dépôt, indique la présence de formes ouvertes ionisées  $M^+$ . Leur fragmentation est caractérisée par la présence des ions 188, 190 et 212.
- ✓ C'est en inversant l'ordre des dépôts, et en augmentant la quantité de nitrocellulose déposée sur notre molécule cible, que nous arrivons à éviter

toute fragmentation de l'ion moléculaire  $M^+$ . Dans ce cas, la non modification de la coloration de départ, indique que cet ion est resté en configuration forme fermée.

- ✓ En diminuant l'irradiance laser, des adduits sont observés sur l'ion moléculaire  $M^+$ . Ils résultent de l'interaction de l'ion moléculaire avec les molécules issues de la dégradation de la nitrocellulose ( $OH_x$  et  $NO_x$ ) lors du processus d'ablation laser.
- ✓ Une vitesse d'ablation rapide du film polymère, permet certainement l'augmentation de la vitesse du panache gazeux, et améliore ainsi le refroidissement des ions moléculaires. Il est donc possible de détecter l'ion moléculaire de la spirooxazine sans excès d'énergie interne et sans qu'il y ait pour autant besoin d'un transfert de  $H^+$  et/ou  $H^-$  de la matrice vers l'analyte.

## II.4. L'analyte photochromique

Nous étudierons dans ce paragraphe d'une part, les spiroopyranes qui ont longtemps suscité de nombreuses recherches et d'autre part, les chromènes qui à l'heure actuelle avec les spirooxazines sont les plus couramment utilisés dans l'industrie. Nous proposons de comparer leur comportement respectif lors d'un processus d'ablation laser en présence ou non de matrice.

### II.4.1 Les spiroopyranes

Nous avons choisi le spiroopyrane nitré représenté en figure V.30, car au cours de l'étude menée sur le transfert d'hydrogène apparaissant en MALDI, nous avons remarqué qu'une des formes ouvertes permanentes, construite selon le même motif de base (figure V.7, p. 155), donnait des résultats surprenants. Aucune différence n'avait pu être constatée entre les spectres LDI et MALDI.

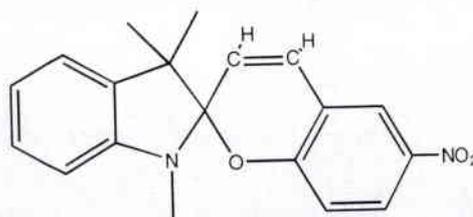


Figure V.30 : Structure du composé spiroopyrane étudié.

De ce fait, nous allons une nouvelle fois comparer le comportement de ce nouveau composé photochromique en désorption laser directe et en MALDI (voir figure V.31). Cette étude a été réalisée à 355 nm sous une irradiance laser de  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>. La matrice MALDI de référence à cette longueur d'onde étant toujours l'acide férulique.

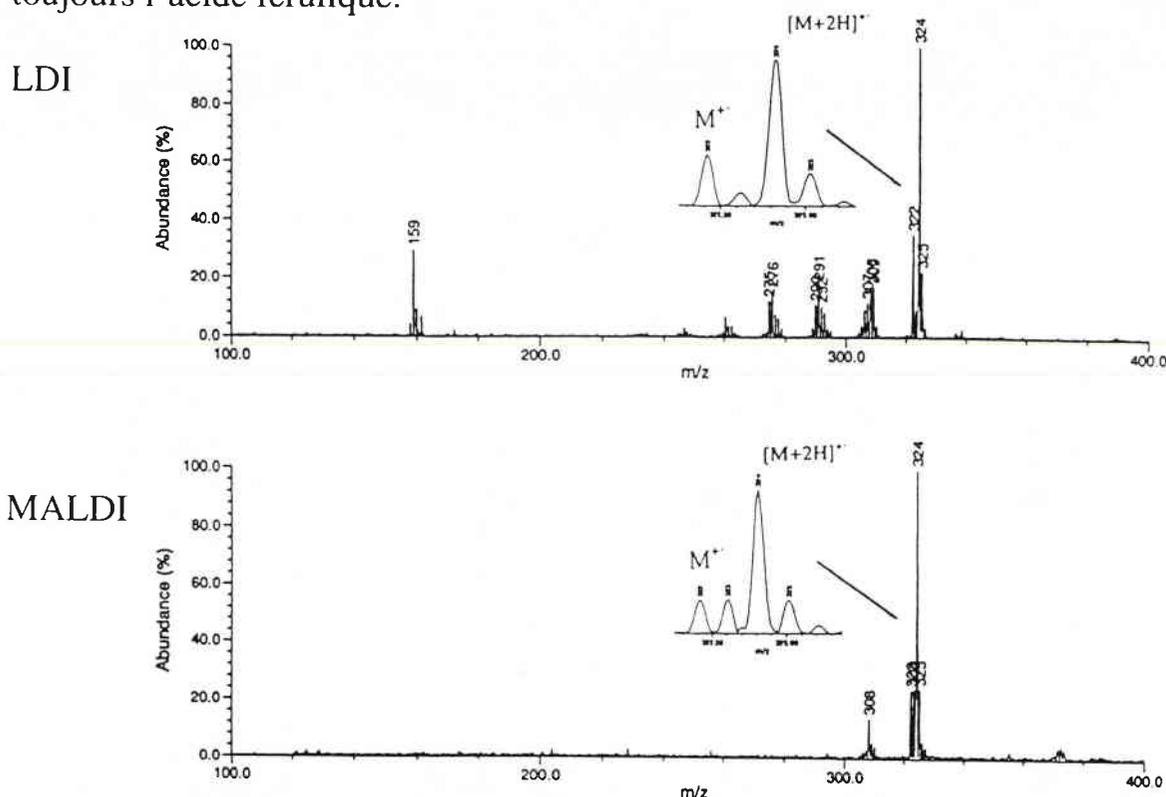


Figure V.31 : Spectres LDI/MALDI à 355nm du spiropyrane nitré, Irr =  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>.

L'examen des spectres LDI et MALDI (figure V.31) montre que :

- ✓ Quel que soit le mode d'ionisation laser, LDI ou MALDI, le spiropyrane nitré est caractérisé en spectrométrie de masse, par la présence de l'ion moléculaire M<sup>+</sup> et de l'ion moléculaire doublement hydrogéné [M+2H]<sup>+</sup>.
- ✓ Comme nous l'avons déjà fait remarquer, l'ablation laser provoque instantanément un transfert intermoléculaire d'atomes d'hydrogène de la molécule cible, et ne permet donc pas de différencier l'ionisation laser directe de la désorption laser assistée par matrice.
- ✓ L'ouverture de la molécule se faisant très certainement après la libération de H<sup>+</sup>/H<sup>-</sup> de la matrice (molécule nitrée), ne permet pas non plus de retrouver une empreinte spectrale caractéristique du processus MALDI (observée pour les spirooxazines). L'ion [M+3H]<sup>+</sup> ainsi que le fragment E n'ont jamais été détectés, même à des irradiances plus élevées. Cette expérience confirme une nouvelle fois, que E vient bien de la fragmentation de [M+3H]<sup>+</sup>.

- ✓ L'effet "cocon protecteur" de la matrice est toujours visible. Une diminution significative de la photofragmentation différencie le spectre MALDI du spectre LDI.

### II.4.2. Les chromènes

La structure du chromène dont nous avons étudié le comportement en LDI et en MALDI, est présentée en figure V.32. La même méthodologie d'analyse que précédemment, a été adoptée pour ce nouveau composé photochromique.

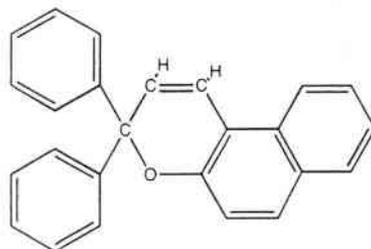


Figure V.32 : Structure du chromène étudié.

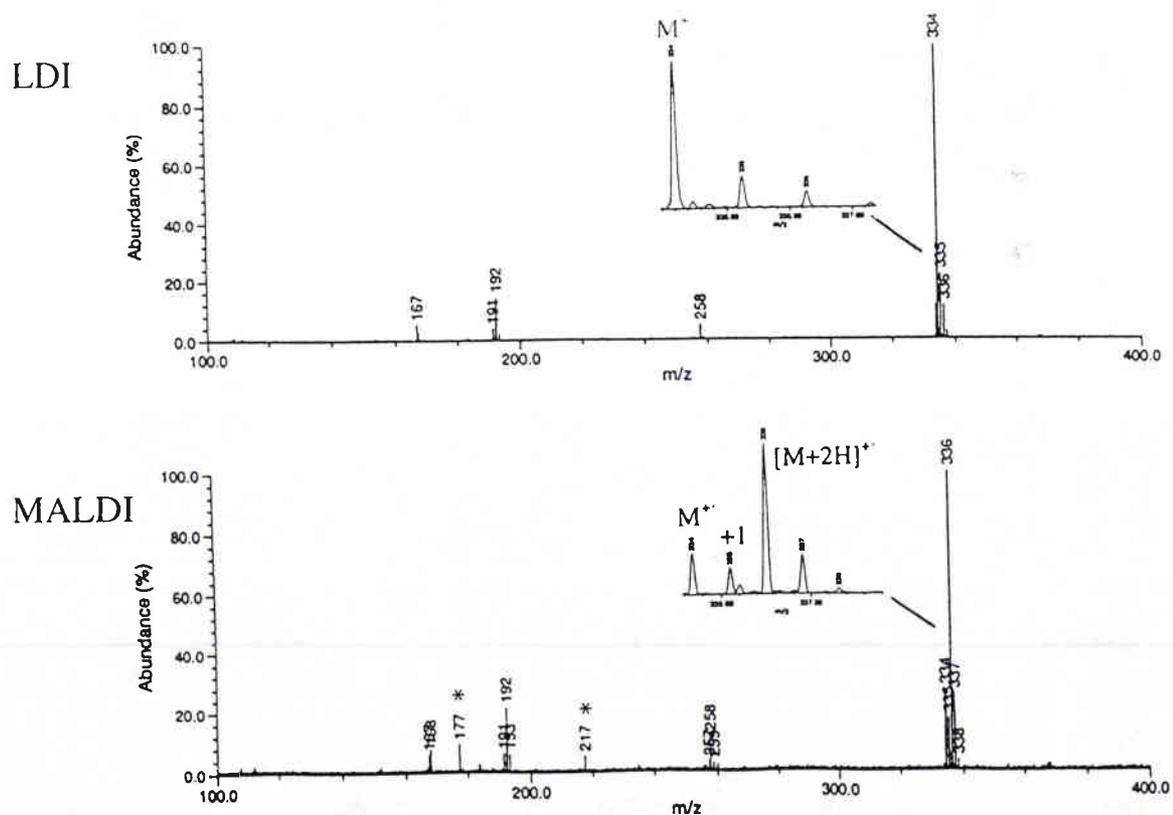
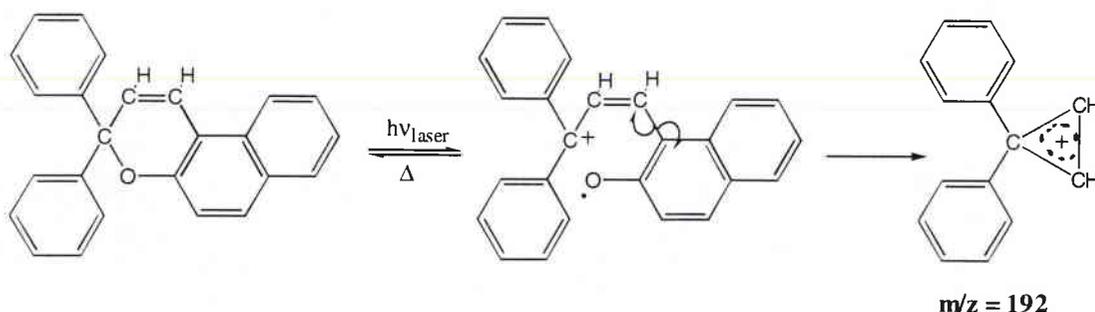


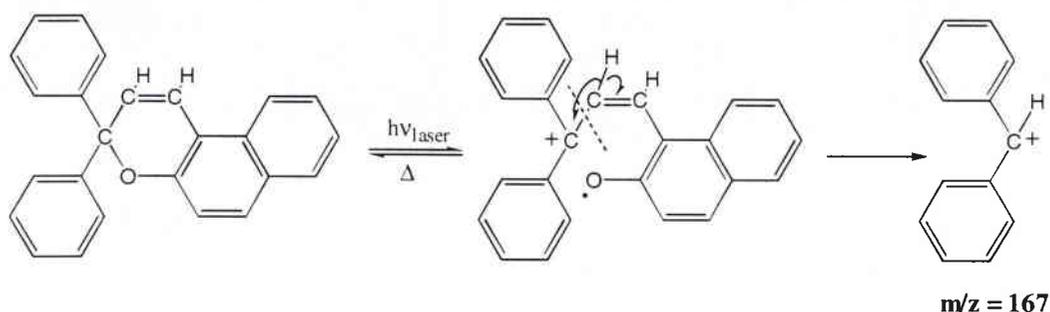
Figure V.33 : Spectres LDI/MALDI à 355 nm du chromène étudié,  $I_{rr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$   
\* : photofragment de l'acide férulique.

Les spectres illustrés en figure V.33 mettent en évidence que :

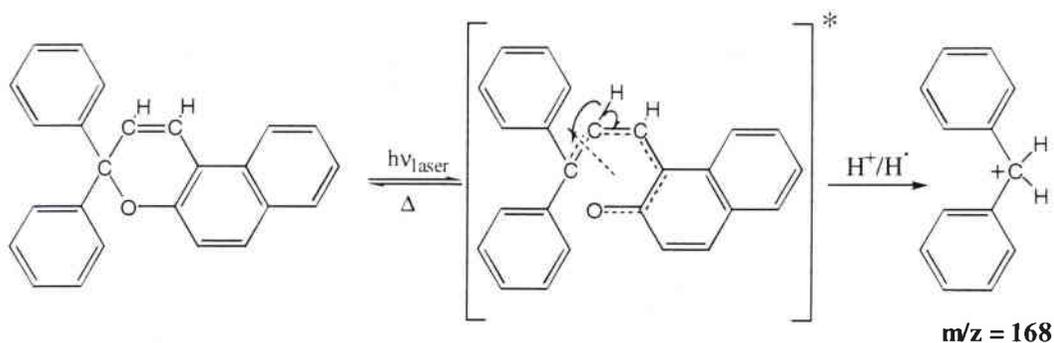
- ✓ Le chromène étudié révèle un comportement à l'ionisation laser identique à celui caractérisant les spirooxazines. Apparition de l'ion moléculaire  $M^+$  en LDI, et formation d'espèces pseudo-hydrogénées en MALDI. Cependant, dans le cas des chromènes, les ions  $[M+3H]^+$  ne sont pas observés.
- ✓ L'existence d'ions fragments à la masse  $m/z = 192$ , confirme la formation d'ions distoniques lors de l'impulsion laser. La structure proposée pour cet ion est la suivante :



- ✓ L'ion fragment  $m/z = 167$  est une fragmentation classique de l'ion moléculaire  $M^+$  dans laquelle intervient, comme pour les spirooxazines, un transfert d'hydrogène intramoléculaire :



- ✓ L'équivalent de l'ion E caractéristique de la fragmentation MALDI des spironaphtoxazines, est l'ion  $m/z = 168$  :



## II.5. Conclusion

Le mode de préparation de l'échantillon est important, car il définit le nombre de molécules de matrice qui vont participer à la protection et à l'ionisation de la molécule cible. L'étude concernant l'influence du rapport stœchiométrique analyte/matrice, montre qu'un rapport de 1/10 à 1/100 supprime les photofragments issus de la matrice. Il semble donc qu'un nombre optimal de molécules de matrice participe à l'ionisation de l'analyte.

Le contrôle rigoureux de l'irradiance laser, et le choix d'une longueur d'onde d'irradiation correspondant à une transition  $S_0 \rightarrow S_1$  de la matrice (à l'état solide), sont également essentiels à la réussite d'une analyse MALDI.

Ce travail a mis aussi en évidence que l'ionisation en désorption laser assistée par matrice n'implique pas forcément un transfert d'entités hydrogénées. En effet, la vitesse d'ablation élevée d'une matrice polymère (nitrocellulose) diminue l'accumulation d'énergie interne des ions moléculaires (par refroidissement), et permet d'atteindre par réabsorption d'un deuxième photon, le continuum de la molécule sans excès d'énergie. Les ions sont relativement stables, ils ne se fragmentent pas.

Enfin, les spirooxazines et les chromènes s'avèrent, parmi les photochromes étudiés, les plus adaptés pour l'étude du mécanisme MALDI. Contrairement aux spiropyranes, ils n'induisent pas de transfert d'hydrogènes intermoléculaire lors de l'interaction laser-matière en LDI.



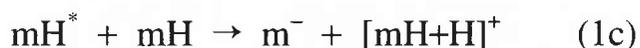
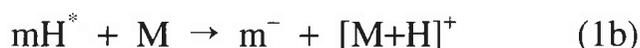
### III. Proposition d'un mécanisme d'ionisation MALDI

Ce mécanisme a pour but d'expliquer la formation d'ions pseudo-moléculaires, simplement, doublement et triplement hydrogénés, apparaissant au côté de l'ion radical moléculaire sur les spectres MALDI. La recherche bibliographique menée d'une part, sur les processus de désorption et d'ionisation de la technique MALDI (chapitre I) et d'autre part, sur le mécanisme d'ouverture et de fermeture des composés photochromiques (chapitre II), a donné les bases nécessaires pour proposer un tel mécanisme.

#### III.1. Rappel des principaux mécanismes

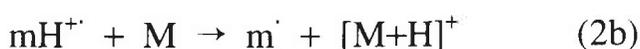
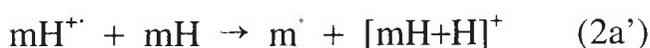
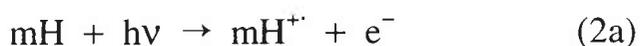
Dans un article paru en 1995, Liao et Allison [11] ont présenté pour la première fois trois mécanismes d'ionisation possibles MALDI :

##### III.1.1. Mécanisme 1 : Chimie acide-base à l'état excité



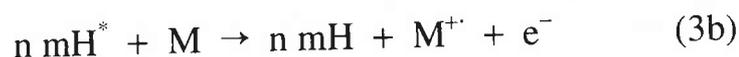
Dans ce mécanisme, les molécules de matrice excitées électroniquement  $mH^*$ , formées par la réaction (1a) agissent tel un acide, en transférant un proton aux molécules environnantes (matrice et/ou analyte). Ce processus ne peut intervenir qu'après excitation des molécules (au cours de la désorption), quand le nombre de  $mH^*$  est le plus important, c'est-à-dire en phase condensée. Ce mécanisme est gouverné par l'affinité protonique de l'analyte, et l'énergie de dissociation de la liaison ( $m^- - H^+$ ) de la matrice.

##### III.1.2. Mécanisme 2 : Photoionisation de la matrice suivie d'un transfert de $H^+$



Après photoionisation des molécules de la matrice (2a), un mécanisme semblable à l'ionisation chimique permet de transférer directement un proton vers l'analyte ou vers des molécules de matrice restées à l'état fondamental. Une molécule de matrice protonée (2b') peut également réagir avec une molécule cible M, pour donner l'ion pseudo-moléculaire  $[M+H]^+$ . Ce mécanisme a pour principal avantage de faire apparaître simultanément l'ensemble des espèces détectées sur un spectre MALDI caractéristique : l'ion radical moléculaire de la matrice, l'ion protoné de la matrice, ainsi que l'ion pseudo-moléculaire de l'analyte. L'ionisation de l'analyte par transfert protonique dépend dans ce cas, de l'affinité protonique de l'analyte, de l'énergie d'ionisation de la matrice, et de l'énergie de dissociation de la liaison ( $m-H^+$ ).

### III.1.3. Mécanisme 3 : Photoionisation de l'analyte suivie d'un transfert de H'

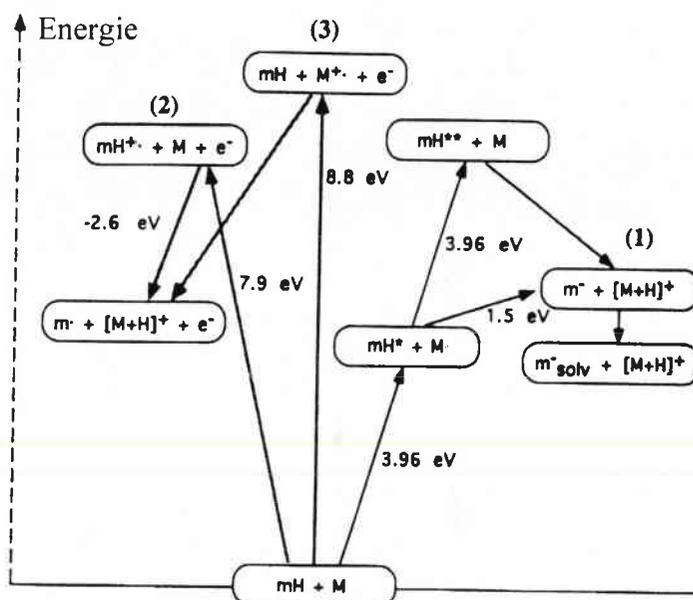


Dans ce modèle, la dissipation de l'énergie absorbée par les molécules de matrice ( $mH^*$ ) est utilisée pour ioniser l'analyte (3b). Ce dernier extrait ensuite un atome d'hydrogène de la matrice pour former l'ion  $[M+H]^+$  (3c). Ce mécanisme d'ionisation est sous l'influence directe de l'énergie d'ionisation de l'analyte, de la force de la liaison homolytique ( $m-H$ ) de la matrice, et de l'affinité de l'atome d'hydrogène vis-à-vis de l'ion radical moléculaire  $M^{+\cdot}$ .

Ce mécanisme très différent des deux premiers ne semble pas être le plus favorable d'un point de vue thermochimique. En considérant des valeurs thermochimiques de molécules modèles, telles que l'affinité protonique, l'énergie d'ionisation et l'affinité d'atome d'hydrogène de la molécule ionisée, Liao et Allison [11] ont présenté un diagramme d'énergie permettant de visualiser les différentes énergies d'activation des processus décrits dans les mécanismes 1, 2, et 3 (voir figure V.34).

Ils considèrent que dans le cas d'une analyse de l'hexaglycine par désorption laser assistée par l'acide sinapinique, le mécanisme 1 est le plus favorable. A l'état excité, l'énergie de solvatation de la matrice est faible (+ 1,5 eV)  $[mH-H]$  et permet un transfert de proton vers l'analyte. Les autres mécanismes demandent beaucoup plus d'énergie, 8,8 eV pour l'ionisation de l'hexaglycine,

7,9 eV concernant celle de la matrice. L'ionisation de ces molécules passe par un mécanisme d'absorption à deux photons.



**Figure V.34 :** Considérations thermochimiques pour la formation de peptides protonés en MALDI. M = hexaglycine, mH = acide sinapinique et la numérotation des différentes voies correspond aux mécanismes d'ionisation présentés ci-dessus. Un photon à 337 nm a une énergie de 3,96 eV, tiré de [11].

Si les mécanismes 1 et 2 sont les plus couramment évoqués dans la littérature (voir chapitre I), le mécanisme 3 est intéressant car il suppose qu'un transfert d'atomes d'hydrogène entre la matrice et l'analyte, participe activement à la formation d'ions hydrogénés  $[M+H]^+$  en MALDI. Cette intervention d'atomes d'hydrogène au sein du nuage gazeux nous a intéressé, car elle permettrait de mieux comprendre l'apparition d'ions spiraniques triplement hydrogénés.

### III.2. Notre proposition

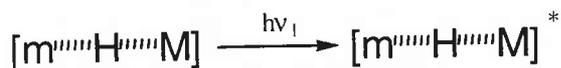
Lors de la germination des cristaux de la matrice, celle-ci piège les molécules d'analyte dans son réseau cristallin, créant ainsi de véritables complexes moléculaires de type hôte-invité ( $[m-H-M]$ ) à l'état solide. Des liaisons hydrogène assurent la cohésion de cet ensemble.

Lors de l'irradiation laser, la matrice absorbant préférentiellement les photons va redistribuer cette énergie par ses différents modes de vibration. Etant donné l'existence de liaisons hydrogène entre la matrice et l'analyte, c'est l'ensemble du complexe moléculaire qui est excité lors de l'irradiation. La relaxation du système moléculaire induit le passage à l'état gazeux d'espèces neutres, excitées, radicalaires, voire ionisées après rupture des liaisons hydrogène. De

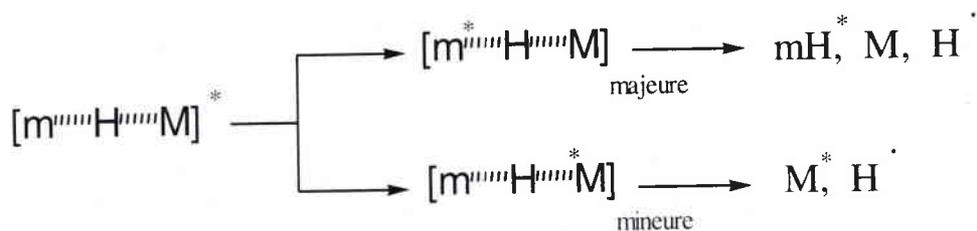
cette situation naît une multitude de réactions pouvant expliquer la formation d'ions moléculaires hydrogénés.

Nous pourrions schématiser le mécanisme MALDI de la façon suivante :

1- Photoexcitation du complexe moléculaire (matrice + analyte) :

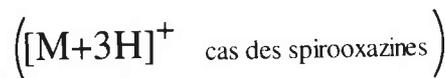
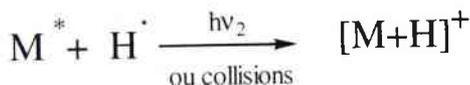


2- Relaxation :

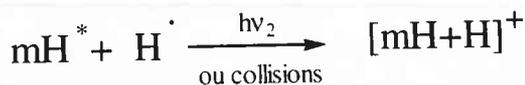


3- Réactions avec  $H^\cdot$  :

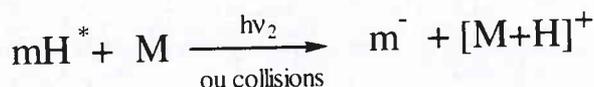
Analyte



Matrice



A cela s'ajoute la réaction 1c du mécanisme 1



**Figure V.35** : Proposition d'un mécanisme MALDI.

### III.3. Les arguments en faveur d'un tel mécanisme

Ce mécanisme est basé sur plusieurs observations expérimentales et théoriques.

#### III.3.1. Existence de liaisons hydrogène

- ✓ Des interactions non covalentes par liaisons hydrogène ont été démontrées en cristallographie [3]. Des simulations en dynamique moléculaire [5] montrent que la rupture de liaisons hydrogène intervient approximativement 3 ps après l'excitation des molécules.
- ✓ L'absence de tels types de liaisons, comme nous pouvons le supposer pour l'ester méthylé de l'acide nicotinique (figure V.2, p. 151), favorise l'ionisation résonante de la molécule cible (absorption de 2 photons), ce qui entraîne une fragmentation marquée de l'ion moléculaire  $M^+$ . Dans ce cas, les molécules d'analyte excitées n'ont pas pu transférer une partie de leur énergie à la matrice (absence de liaisons hydrogène). Ces molécules occupent alors un niveau d'énergie à l'état excité plus important. Par conséquent, la réabsorption d'un second photon  $h\nu_2$  amène la molécule bien au delà de son potentiel d'ionisation, provoquant un excès d'énergie interne de l'ion moléculaire, synonyme de fragmentations. On peut alors assimiler ces liaisons hydrogène à de véritables collecteurs d'énergie photonique, qui ventilent l'énergie vers la matrice, protégeant ainsi les ions de la molécule cible d'un excès d'énergie interne. La rupture de ces liaisons constitue la principale source d'atomes d'hydrogène ou de protons qui vont participer à l'ionisation de l'analyte. A priori, pour que ces liaisons hydrogène jouent pleinement leur rôle, il faut que les photons incidents correspondent de préférence à une transition électronique  $S_0 \rightarrow S_1$  de la matrice.

#### III.3.2. Photoexcitation de l'analyte

- ✓ L'ouverture des molécules photochromiques (voir chapitre II) se fait davantage à l'état excité, car l'énergie d'activation ( $E_a = 5 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ) est beaucoup moindre qu'à l'état fondamental ( $E_a = 33 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ).
- ✓ Au cours du processus de désorption, les molécules cibles sont entraînées avec la matrice en phase gazeuse. La dissipation de l'énergie absorbée par la matrice conduit à l'excitation des molécules cibles, c'est-à-dire à la formation de formes ouvertes délocalisées. Même si l'analyte est en concentration faible, il peut être également excité par absorption directe de photons. D'après la littérature, l'ouverture des composés spiraniques non

substitués par un groupement nitro (principaux composés que nous avons étudié) est inférieure à 10 ps.

- ✓ L'étude de l'attribution des ions fragments pour les deux méthodes d'ionisation (LDI et MALDI), montre que la molécule photochromique s'ouvre avant de s'ioniser (voir chapitre IV).
- ✓ Le mécanisme d'ionisation proposé est en accord avec l'expérience de Zenobi *et al.* (voir figure I.20, p. 42), qui démontre que le taux d'ionisation des molécules est bien meilleur s'il y a réionisation en phase gazeuse (augmentation du temps d'impulsion laser).

### III.3.3. Transfert d'hydrogène atomique

- ✓ L'étude réalisée sur le composé spiro 15C5 (pp. 157 et 159) indique clairement que la molécule photochromique doit être dans une configuration forme ouverte pour que le transfert d'atomes d'hydrogène puisse s'effectuer sur la molécule cible. En effet, ce composé possédant un groupement nitro a un temps d'ouverture supérieur d'un facteur de 10 à 100 par rapport à des composés spiraniques non nitrés. Cette discordance des temps entre l'ouverture de la molécule et la libération de H<sup>•</sup>, empêche tout transfert de se réaliser.
- ✓ Des études par post-ionisation [1] démontrent la libération d'atomes d'hydrogène lors de la formation du nuage gazeux en MALDI. Le pic de masse correspondant à l'hydrogène ( $m/z = 1$ ) est exalté lorsque l'on réionise (par un deuxième laser) le nuage gazeux 10 ns après la première impulsion laser. Dans notre cas, l'ionisation des spironaphtoxazines ne s'effectue apparemment qu'à l'état excité, nécessitant la coexistence d'hydrogène atomique. La molécule cible devant posséder en outre une affinité particulière vis-à-vis d'atomes d'hydrogène et un faible potentiel d'ionisation pour que le taux d'ionisation soit élevé.



#### IV. Conclusion

Ce travail démontre la possibilité d'étudier plus précisément le mécanisme MALDI par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques. Nous avons pu ainsi mettre en évidence la participation d'atomes d'hydrogène lors de l'étape de l'ionisation MALDI. Elle est spécifique à ce mode d'ionisation. Ces atomes d'hydrogène proviennent de la rupture des liaisons hydrogène qui se sont formées lors de la préparation de l'échantillon entre des sites privilégiés de la matrice et de la molécule cible.

Pendant l'étape de la désorption, des molécules de matrice et d'analyte se retrouvent en phase gazeuse à l'état excité, et réagissent avec l'hydrogène atomique. Ces réactions se produisent très tôt après l'absorption des premiers photons (de l'ordre de la picoseconde), et se dérouleraient sans doute dans la phase condensée.

La possibilité pour l'analyte d'évacuer une partie de l'énergie photonique absorbée, avant son passage en phase gazeuse, constitue certainement une des étapes clés du mécanisme MALDI. La libération simultanée de H<sup>·</sup> et/ou de H<sup>+</sup> en présence d'espèces moléculaires excitées favorise la formation de [M+H]<sup>+</sup>. Ce processus peut être induit suite à l'absorption d'un second photon, ou plus probablement par un mécanisme collisionnel dans la phase gazeuse condensée.

Ce passage à l'état excité explique notamment pourquoi des matrices basiques puissent aussi jouer le rôle de matrice MALDI. Selon Gimon-Kinsel *et al.* [12], les propriétés physico-chimiques de la matrice changent considérablement à l'état excité, et n'ont rien à voir par exemple avec des valeurs de pKa mesurées en solution.

★ ★ ★

## Bibliographie

- [1] C.T.J. Scott, C. Kosmidis, W.J. Jia, K.W.D. Ledingham et R.P. Singhal, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1994**, 8, 829.
- [2] M. Bernard, *Cours de Chimie Minérale*, éd. par Dunod, **1990**.
- [3] R.C. Beavis et J.N. Bridson, *J. Phys. D : Appl. Phys.*, **1993**, 26, 442.
- [4] D.A. Allwood, R.W. Dreyfus, I.K. Perera et P.E. Dyer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1996**, 10, 1575.
- [5] A. Bencsura et A. Vertes, *Chem. Phys. Lett.*, **1995**, 247, 142.
- [6] M. Inouye, K. Akamatsu et H. Nakazumi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 9160.
- [7] Q. Chen, K. Cannel, J. Nicoll et D.V. Dearden, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 6335.
- [8] C. Lenoble et R.S. Becker, *J. Phys. Chem.*, **1986**, 90, 62.
- [9] I. Fournier, R.C. Beavis, J.C. Blais, J.C. Tabet et G. Bolbach, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1997**, 169/170, 19.
- [10] P. Demirev, A. Westman, C.T. Reimann, P. Hakanson, D. Barofsky, B.U.R. Sundqvist, Y.D. Cheng, W. Seibt et K. Siegbahn, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **1992**, 6, 187.
- [11] P.C. Liao et J. Allison, *J. Mass Spectrom.*, **1995**, 30, 408.
- [12] M. Gimon-Kinsel, L.M. Preston-Schaffter, G.R. Kinsel et D.H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2534.

# Conclusion Générale

L'analyse de biomolécules par spectrométrie de masse a pris un essor considérable, en particulier avec le développement de la désorption/ionisation laser assistée par matrice. Cette méthode d'analyse est considérée comme une technique d'ionisation douce permettant le passage en phase vapeur d'ions de haut poids moléculaire.

Aujourd'hui, afin d'asseoir définitivement la technique MALDI comme un outil analytique de première importance dans les sciences biologiques, il convient de mieux appréhender le mécanisme MALDI.

En l'état actuel de la bibliographie, il est difficile de déterminer si l'ionisation des molécules cibles s'effectue par désorption directe de complexes (matrice+cible) formés à l'état solide, ou bien si elle est due à un mécanisme collisionnel secondaire à la désorption. Il semble que la phase condensée du nuage gazeux (produit lors de l'interaction laser-matière), soit une étape déterminante dans le processus MALDI, avant son expansion adiabatique dans le vide.

Afin d'étudier l'influence de cette phase condensée au moment de l'ionisation, nous avons utilisé des molécules sondes photochromiques, dont la propriété essentielle est un changement ultra-rapide de la distribution électronique des molécules, avant l'expansion du nuage gazeux. En comparant le comportement à l'ionisation de divers photochromes sous irradiation LDI et MALDI, nous avons pu comparer et mieux expliquer les mécanismes de ces processus :

**En désorption laser directe (LDI)**, l'ionisation des molécules s'effectue selon un processus d'absorption à 2 photons. L'absorption d'un premier photon en phase solide ( $\tau = 10^{-16}$ - $10^{-17}$  s), conduit les molécules vers un état excité de plus haute énergie, en général  $S_1$  ( $\tau = 10^{-8}$ - $10^{-9}$  s). La relaxation de cette énergie accumulée, provoque le passage de molécules excitées  $M^*$  dans la phase condensée. La réabsorption d'un deuxième photon lors de l'expansion du nuage gazeux amène les molécules vers leur état ionique sous la forme d'ions radicalaires  $M^+$ . L'excès d'énergie accumulée par ces ions induit une fragmentation plus ou moins forte selon son importance.

**En MALDI**, le mécanisme d'ionisation est bien plus complexe. Des liaisons hydrogène permettraient d'évacuer une grande partie de l'énergie reçue par la molécule cible vers la matrice, lorsque celles-ci forment en phase solide des complexes moléculaires [matrice+analyte]. La relaxation de l'énergie photonique de ces complexes entraîne une libération de molécules de matrice et d'analyte à l'état excité, ainsi que des atomes d'hydrogène (et/ou de proton) en phase gazeuse condensée. Une affinité particulière des molécules vis-à-vis de H et/ou de  $H^+$  permet leur ionisation sous la forme d'ions hydrogénés :  $[M+H]^+$ . Dans le cas des spirooxazines des ions multi-hydrogénés ont été détectés :  $[M+2H]^+$ , et  $[M+3H]^+$ , ne laissant aucun doute sur la participation d'atomes d'hydrogène lors de l'ionisation. Ce mécanisme suppose la coexistence temporelle de H, ainsi que de molécules d'analyte et de matrice à l'état excité ( $M^*$  et  $mH^*$ ).

Ce travail a permis de proposer un mécanisme d'ionisation MALDI, qui confirme l'une des hypothèses de Liao (Chap. V., p. 183) d'une participation d'atomes d'hydrogène dans la formation d'ions pseudo-moléculaires hydrogénés. Ce mécanisme ne peut être rapproché de celui caractérisant l'ionisation chimique (transfert protonique). Il est consécutif à la désorption d'espèces chimiques en phase gazeuse, et intervient très probablement en phase condensée ( $10^{-12}$  s) où le taux de collisions entre les molécules et les radicaux H est suffisamment élevé.

En définitif, l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques a révélé que :

- ✓ la matrice a un rôle déterminant dans la dissipation d'énergie induite par le laser ;
- ✓ la présence de liaisons hydrogène est indispensable à l'évacuation rapide de l'énergie accumulée par les molécules cibles, évitant ainsi toute fragmentation intempestive ;

- ✓ la libération d'hydrogène atomique au sein du panache gazeux MALDI, participe à l'ionisation de l'analyte ;
- ✓ les réactions photochimiques (entre  $H^{\bullet}$  et  $M^*$ ) induites avant l'expansion adiabatique du panache gazeux dans le vide, seraient bien plus importantes que des réactions ion/molécule en phase gazeuse.
- ✓ selon toute vraisemblance, le mécanisme de cationisation fonctionnerait sur le même schéma. Mais contrairement aux radicaux  $H^{\bullet}$  (5 000 m/s), la vitesse d'éjection des cations alcalins est comparable à celle des molécules cibles (700 m/s), et de ce fait, des réactions ion/molécule au cours de l'expansion du panache gazeux peuvent également participer à l'ionisation de l'analyte.

Il convient cependant, d'être prudent quant à la généralisation de ce mécanisme à l'ensemble des molécules cibles. Nous devons approfondir les recherches actuelles, en utilisant d'autres molécules sondes, notamment des composés de la série spirooxazine substitués avec un groupement nitré. Des études en MALDI-TOF avec post ionisation seraient doublement intéressantes : confirmer que les réactions ion/molécule lors de l'expansion du panache gazeux sont peu importantes au regard de l'ionisation photoinduite, et prouver la présence d'hydrogène atomique par ionisation des neutres.

Au cours de ces travaux, la microsonde laser FTMS s'est révélée être un outil analytique de première importance. Sa capacité à la haute résolution, ainsi que la possibilité de changer facilement de longueurs d'onde et de contrôler avec précision l'énergie déposée sur le porte-échantillon, ont permis de mettre en évidence l'importance de l'optimisation des paramètres laser lors du processus MALDI.

Parallèlement à l'étude du mécanisme d'ionisation MALDI, ce travail démontre également la possibilité de caractériser instantanément l'équilibre photochromique de molécules spiraniques à l'état excité. La technique MALDI couplée à la microsonde laser FTMS est intéressante, car elle permet de simuler le comportement de tels composés en présence de matrice polymère, habituellement utilisée en industrie. Nous avons pu ainsi mettre en évidence la réactivité de photochromes vis-à-vis de composés issus de la photoablation de la nitrocellulose.

L'ensemble de ce travail apporte une contribution constructive à la compréhension d'une part, des mécanismes de formation des ions sous irradiation laser assistée ou non par matrice et d'autre part, à la caractérisation

de l'équilibre photochromique de la série spiranique. Ces travaux ont donné lieu à deux publications (voir annexes F et G).

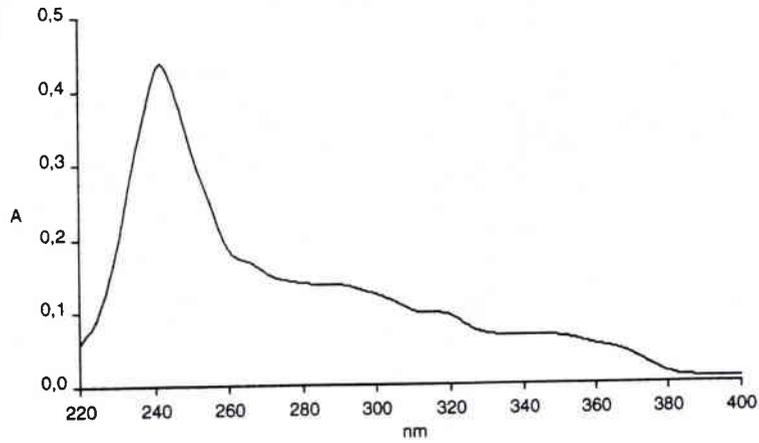
Enfin, cette étude sur le mécanisme d'action de la technique MALDI a permis de mettre en place une méthodologie d'analyse, que nous utilisons à présent comme procédure standard. C'est ainsi que nous avons pu appliquer cette technique à la caractérisation de complexants de catécholamines et à la détection de colorants naturels du bois de Noyer (voir annexes H et I).



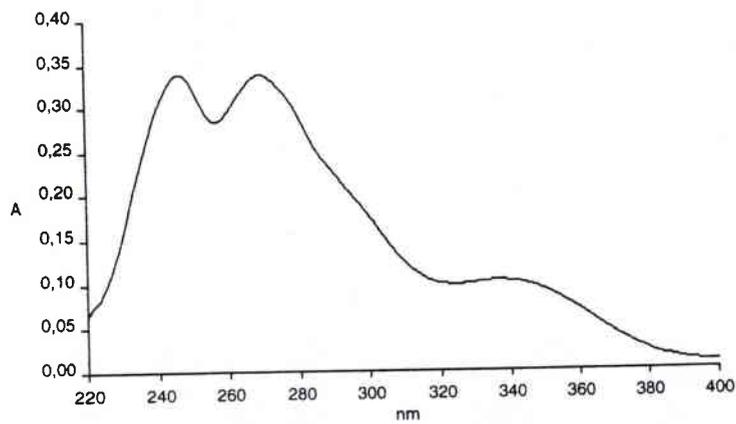
# **Annexes**

## Spectres d'absorption UV-Visible (chapitre III., II.1.3., p. 113)

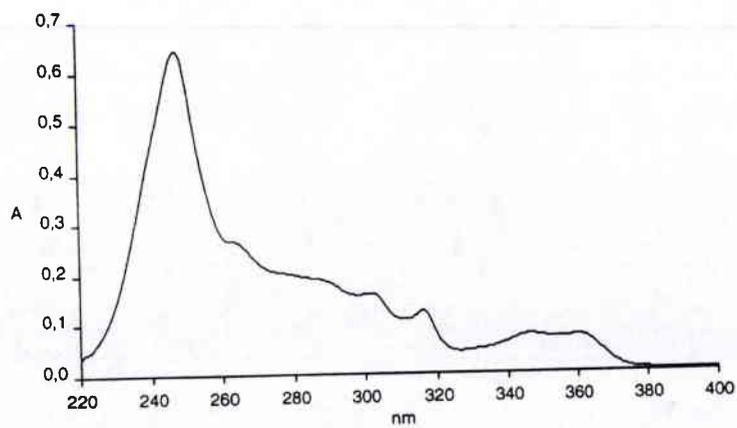
### a) Spironaphthoxazine (Spiro de référence, spiro 0)



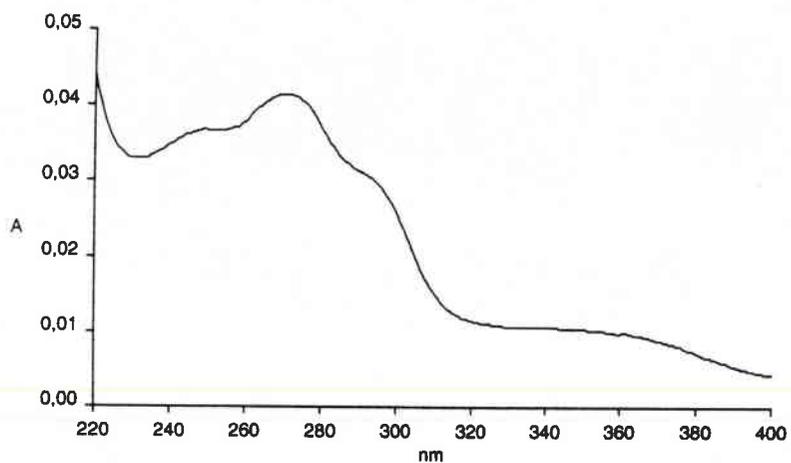
### b) Spirobenzopyrane



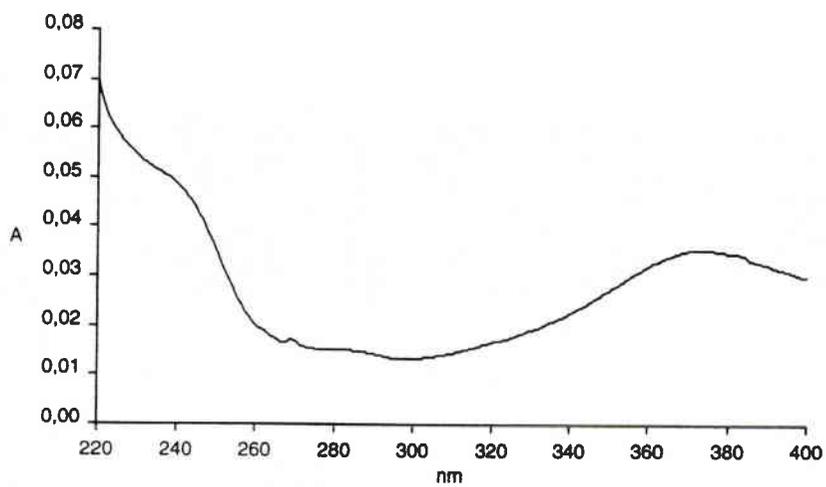
### c) Chromène



d) Spiro 15C5



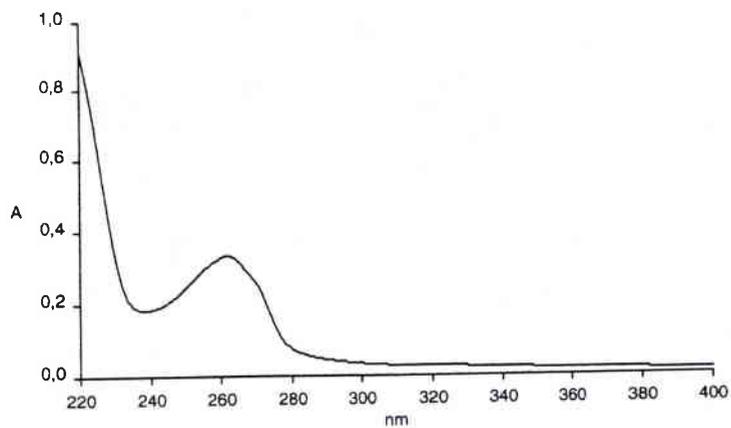
e) Forme ouverte



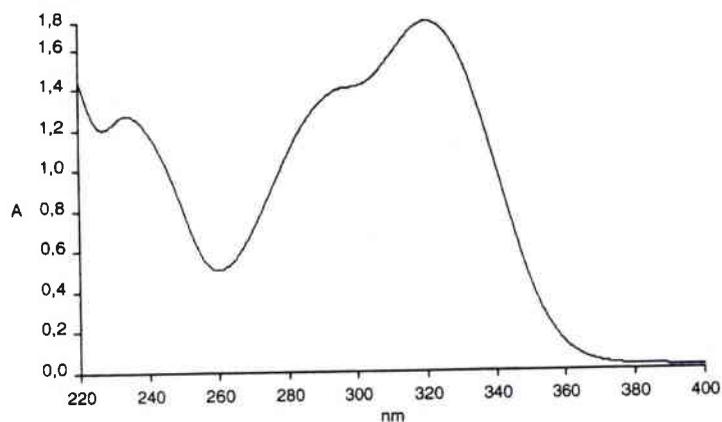
☆☆☆

## Spectres d'absorption UV-Visible (chapitre III., II.1.3., p. 114)

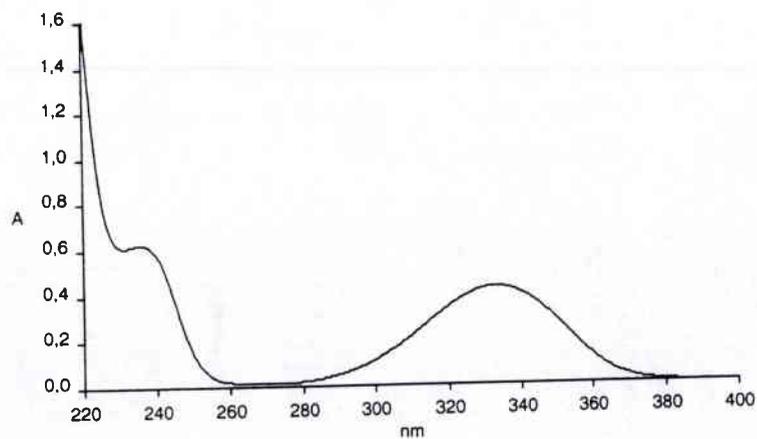
### a) Acide nicotinique



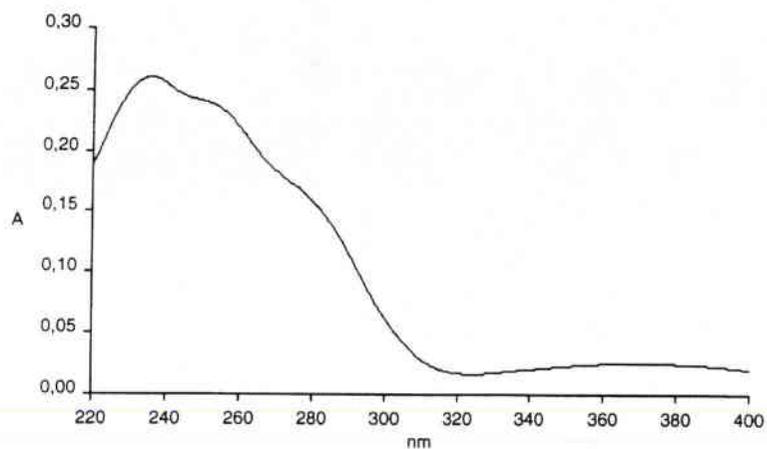
### b) Acide férulique



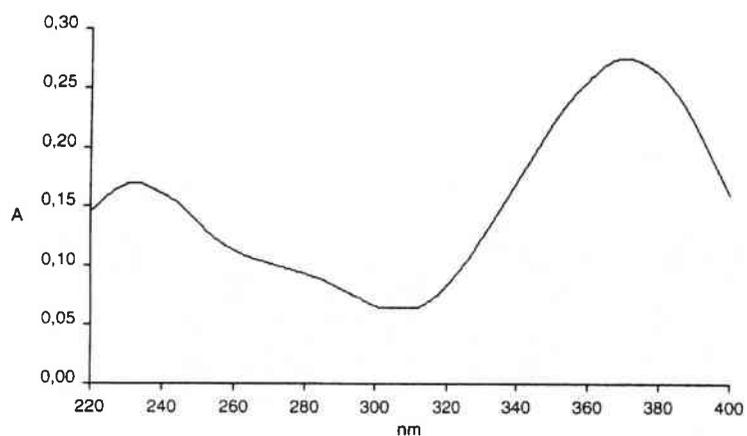
### c) Acide 2,5-DHB



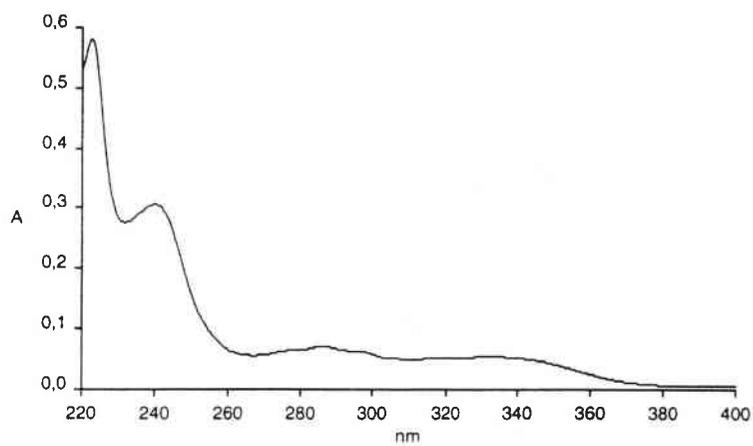
## d) 3-nitroaniline



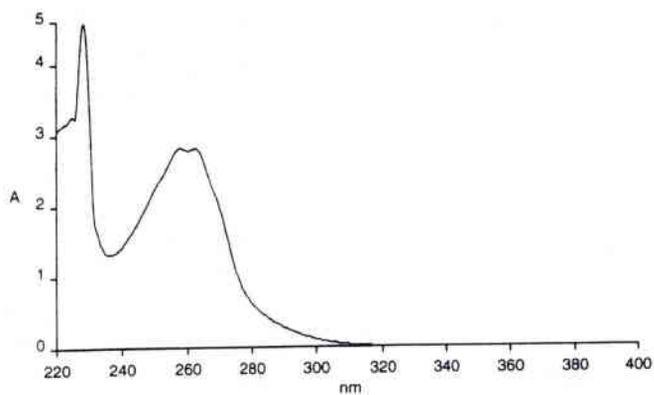
## e) 4-nitroaniline



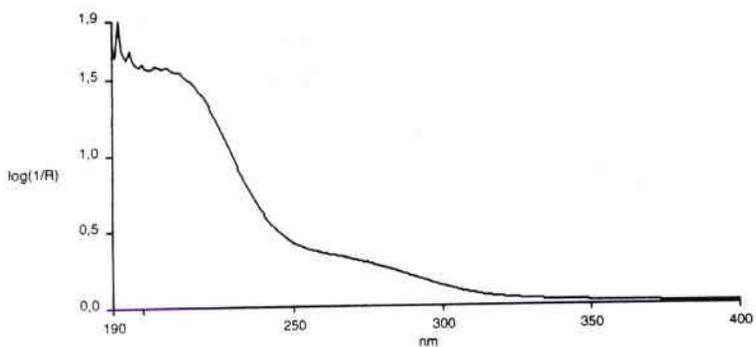
## f) Eponge à proton (1,8-bis-(diméthylamino)-naphtalène)



g) Ester méthylé de l'acide nicotinique



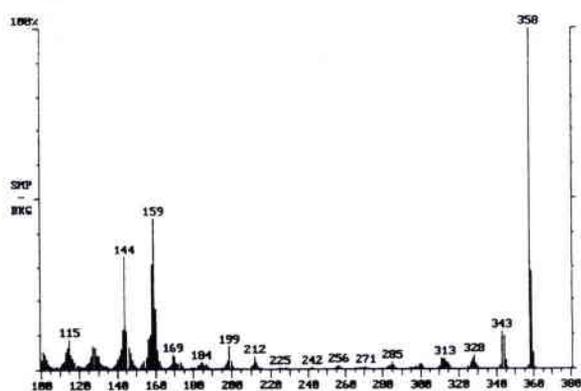
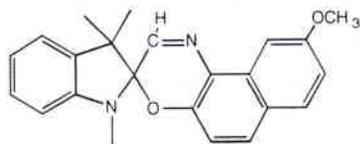
h) Nitrocellulose (spectre d'absorption UV à l'état solide)



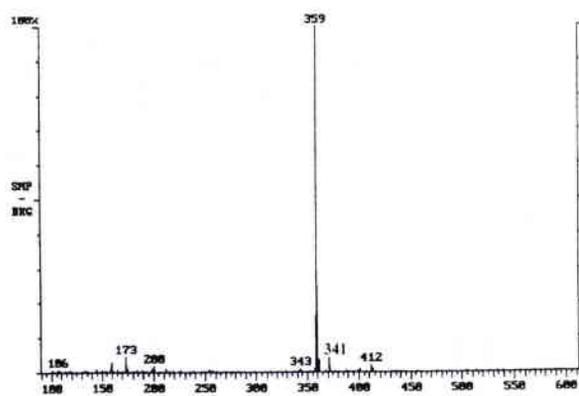
★ ★ ★

Spectres de masse EI et CI de spironaphtoxazines  
(chapitre IV., tableau IV.1, p. 132)

a) Spiro I (PM = 358)

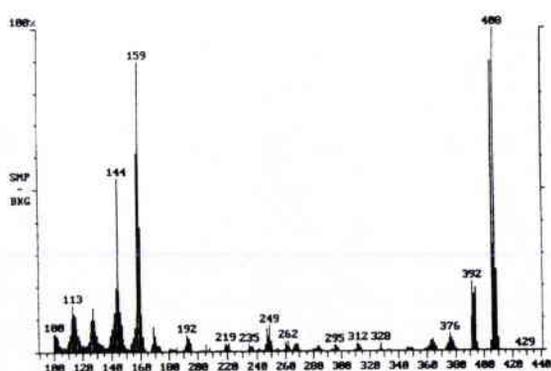
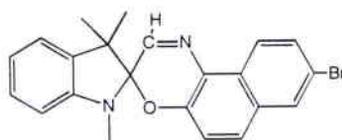


EI (70 eV)

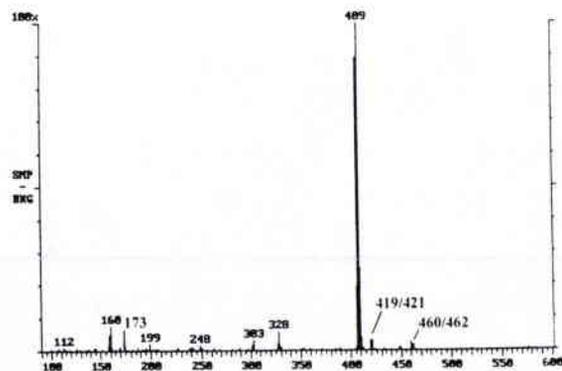


CI (CH<sub>3</sub>CN)

b) Spiro IV (PM = 406-408)

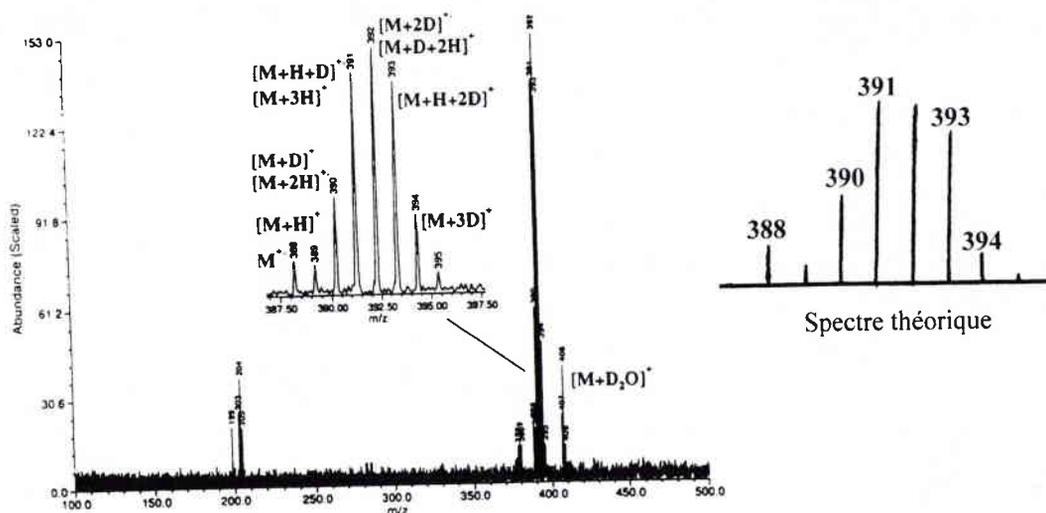


EI (70 eV)



CI (CH<sub>3</sub>CN)

## Chapitre V., I.1.3., p. 152



L'abondance naturelle de l'isotope du carbone  $^{13}\text{C}$  représentant 1,1 % de celle du  $^{12}\text{C}$ , influence l'intensité relative des pics de masse. Nous montrons ici, comment on peut s'affranchir de cette interférence, afin de montrer la contribution réelle de chaque entité deutérée ( $[\text{M}+\text{D}]^+$ ,  $[\text{M}+2\text{D}]^+$ , et  $[\text{M}+3\text{D}]^+$ ).

En partant de l'intensité absolue du pic ( $m/z = 388$ ), il faut retrancher à chaque fois la contribution respective du  $^{13}\text{C}$  sur le pic supérieur d'une unité de masse. La molécule comporte 24 atomes de carbone, la contribution du  $^{13}\text{C}$  sera donc de 26 %.

$$I_{388} = 0,45$$

$$I_{389} = 0,4 - (0,45 \times 0,26) = 0,28$$

$$I_{390} = 1,3 - (0,28 \times 0,26) = 1,2$$

$$I_{391} = 2,9 - (1,2 \times 0,26) = 2,58$$

$$I_{392} = 3,2 - (2,58 \times 0,26) = 2,5$$

$$I_{393} = 2,8 - (2,5 \times 0,26) = 2,15$$

$$I_{394} = 1,0 - (2,15 \times 0,26) = 0,44$$

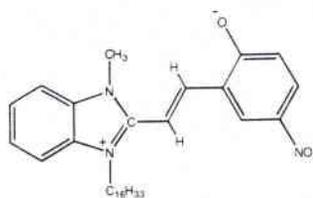
## Spectres de masse LDI/MALDI-FTMS d'une forme ouverte permanente

 $\lambda = 266 \text{ nm}$ 

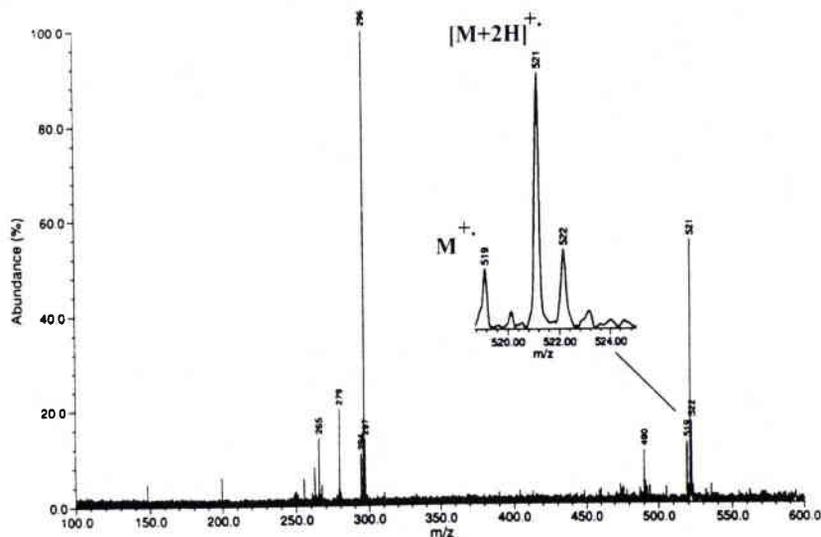
matrice : acide nicotinique

Irr =  $10^7 \text{ W/cm}^2$ 

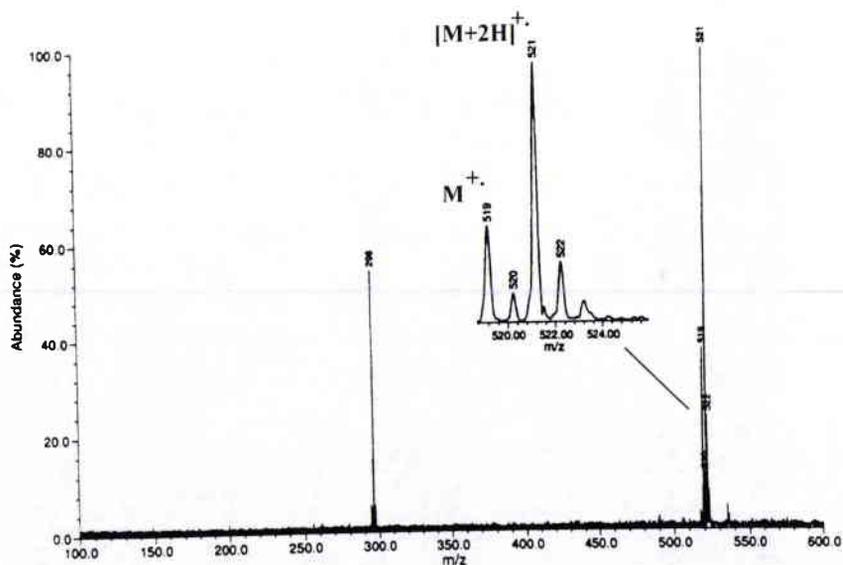
(chapitre V., I.2.1., p. 155)

 $m/z = 519$ 

LDI :



MALDI :



# Spirooxazines as a Molecular Probe for the Study of Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Processes. Part I: Study of the Interaction Effect Between the Molecular Probe and the Matrix<sup>†</sup>

P. J. Calba<sup>1</sup>, J. F. Muller<sup>1\*</sup>, A. Hachimi<sup>1‡</sup>, P. Laréginie<sup>2</sup> and R. Guglielmetti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, Technopôle Metz 2000, 57078 Metz cedex 3, France

<sup>2</sup>Laboratoire de Chimie et Matériaux Organiques, Modélisation, Faculté des Sciences de Luminy, Université d'Aix Marseille II, 13288 Marseille cedex 9, France

In a search for a better understanding of the desorption/ionization process in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), photochromic systems such as spirooxazines have been studied by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry coupled with a laser interface. These compounds become intensely blue upon exposure to ultraviolet light and return to the original color if the radiation is stopped. The blue color is due to the opening of the carbon–oxygen bond, creating a delocalized  $\pi$ -electron photomerocyanine structure which absorbs light in the 500–650 nm range. The spirooxazines appear to be an excellent probe for the study of MALDI processes because the opening of the spiro structure induces the typical formation of the triply protonated molecules  $[M + 3H]^+$  simultaneously with the color change. The source of hydrogen in the matrix has been deduced by using nicotinic acid, methyl nicotinate and deuterated nicotinic acid as matrices. The differences between the direct laser desorption (LD) (detection of molecular ion,  $M^+$ ) and the MALDI process are discussed. A detailed mechanism of spiro-compound fragmentation is proposed. © 1997 by John Wiley & Sons, Ltd.

Received 9 June 1997; Accepted 11 August 1997

Rapid. Commun. Mass Spectrom. 11, 1602–1611 (1997)

No. of Figures: 9 No. of Tables: 0 No. of Refs: 50

Since its first appearance in 1988<sup>1,2</sup> matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) has proved to be a sensitive technique for the analysis of delicate molecules owing to its capability of producing intact molecular ions in the gas phase.

Models to describe the desorption of intact molecules from an energized matrix have been developed and appear to accurately describe the desorption step.<sup>3,4</sup> However, the chemical step leading to ionization is still a matter of considerable debate and research.<sup>5–7</sup> The MALDI processes can also be studied by working with original molecules, such as photochromic indolinospironaphthoxazines, by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRMS).

Photochromism is generally a reversible phenomenon, exhibited by a compound which, when exposed to light radiation involving ultraviolet photons such as sunlight, rapidly changes color but returns to its original color if the radiation is discontinued or the compound is stored in the dark. A compound illustrating this property is called a 'photochromic' compound.<sup>8–11</sup>

Various types of photochromic compounds have been synthesized but they have no general structural similarity. The spiro compounds (Fig. 1) have been

studied more extensively<sup>10,12–15</sup> than other photochromic systems, due not only to an expanding interest in the fundamental molecular properties underlying intramolecular excited state dynamics, but also to spiro compounds having potentially important applications as functional dyes in photochromic glasses.<sup>16–20</sup>

Generally, spiro compounds are not photochromic in the solid form but show photochromism when dissolved in fluid solution or rigid media such as gels, plastic resins or films. The reversible color change can be explained by the transformation of the 'closed' spiro structure **I** into the 'open' merocyanine dye structure **II**, as illustrated in Fig. 1(a). When a spiro compound absorbs UV light, the C–O bond of the spiro system is broken and the ring is opened (very rapidly,  $\tau < 1$  ns) to form at least one or several photomerocyanines stereoisomers.<sup>21</sup> The merocyanine isomer(s) produced absorbs in the visible (500–650 nm) because of the newly formed delocalized  $\pi$  electron conjugation (see Fig. 1(b) for the absorption spectrum). The merocyanine form thermally (or photochemically) returns to the original spiro form (on the ms time scale).<sup>19–25</sup> This property is an important feature in connection with industrial applications in various fields, e.g. phototropic glasses,<sup>18,19,26</sup> non linear optics<sup>27</sup> and biological probes.<sup>28–30</sup>

Experimental methods<sup>31–40</sup> such as UV, IR, fluorescence spectroscopy, X-ray diffraction (XRD) and NMR, and theoretical calculations<sup>38,41,42</sup> are necessary to follow the photochromism of the spiro compounds. The photochromic properties and photomerocyanines produced have been extensively studied in solution.<sup>12,16,22,24,43</sup>

<sup>†</sup>Presented at the Fourth European Workshop on Fourier Transform Mass Spectrometry, Pont-à-Mousson, France, 28–30 April 1997

\*Correspondence to: J. F. Muller, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd. Arago, Technopôle Metz 2000, 57078 Metz cedex 3, France

<sup>‡</sup>Current address: Department of Chemistry, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B 2610 Wilrijk, Belgium

Our aim in this study is to use molecular probes (such as spirocompounds which give a pseudoplanar isomer after UV irradiation) in order to study proton transfer and the ionization mechanism in MALDI processes.<sup>5-7</sup> We will also compare laser desorption results from several different indolinospironaphthoxazines, using different laser power densities, with results obtained by the MALDI technique.

## EXPERIMENTAL

### Materials

The samples under study, whose structures are shown in Fig. 1, were synthesized according to known procedures,<sup>44,45</sup> and purified by recrystallization at the Laboratoire de Chimie et Matériaux Organiques, Marseille. The final products were checked by XRD and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR analysis. The matrices used in all MALDI experiments were nicotinic acid, methyl nicotinate and deuterated nicotinic acid. Nicotinic acid and its methyl ester were purchased from Aldrich Chimie (France) and used without further purification. The deuterated nicotinic acid (carboxyl hydrogen exchange only) was prepared at the Laboratoire de

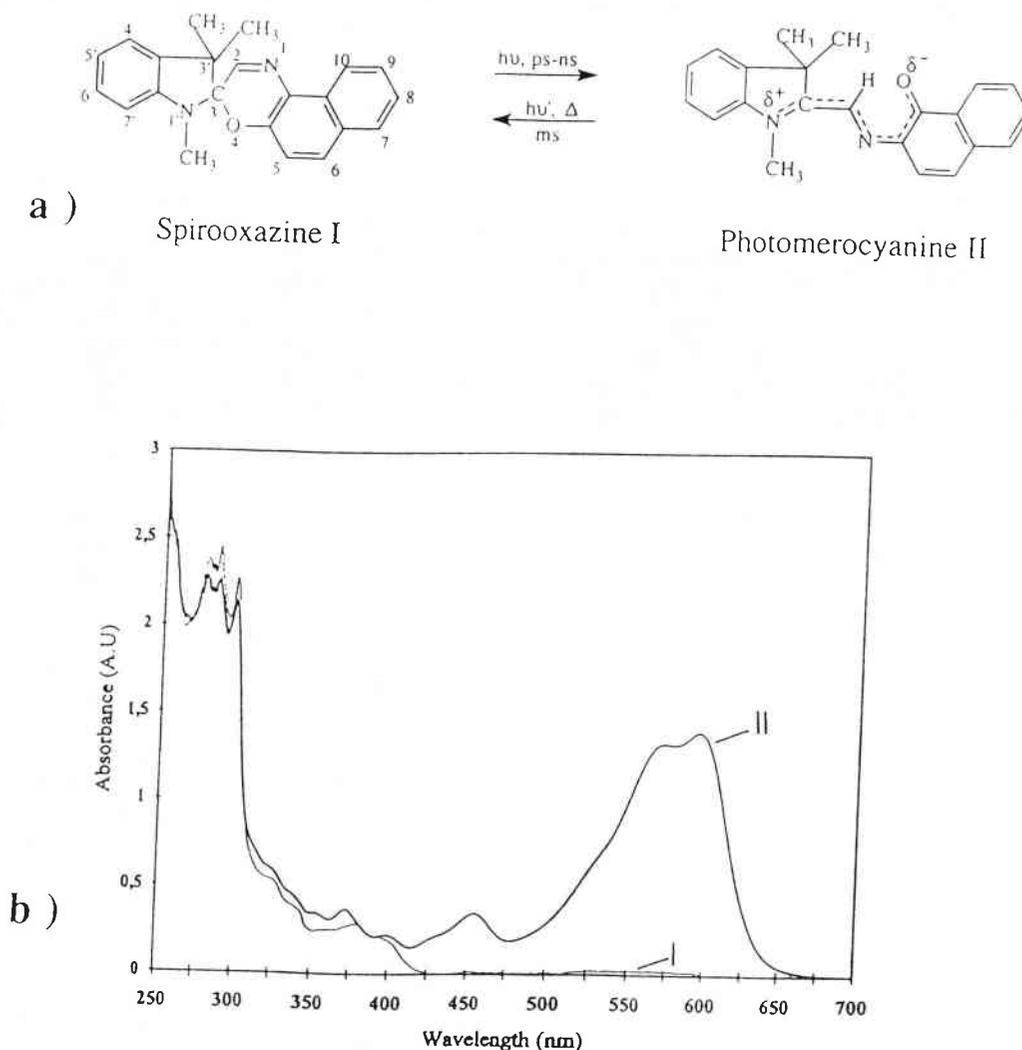
Méthodologie et Synthèse Enantiospécifique de Biomolécules, University of Nancy, France.

### Instrument

All laser experiments were performed using a laser microprobe Fourier transform mass spectrometer. This instrument is a modified, differentially pumped dual-cell Nicolet Instruments FTMS 2000 (now Finnigan MAT, Madison, WI, USA) operated at a 3.18 T magnetic field and coupled with a reflection laser interface and special sample manipulation hardware. This instrument has been described elsewhere.<sup>46,48</sup>

The laser used in the experiments was a Quantel Brilliant Nd:YAG operating at a wavelength of 266 nm with a 4.3 ns pulses of roughly 80 mJ output energy (pulse to pulse variations within  $\pm 7\%$ ). A Joule meter, Hewlett Packard 54600A (Palo Alto, CA, USA) monitored the laser energy before and after each analysis.

The laser beam was focused perpendicular to the target surface. The sample probe was positioned exterior to the source cell, approximately 2 mm from the front trap plate. The energy per pulse on the sample surface was adjusted (80 to 190  $\mu$ J) by several lenses



**Figure 1.** (a) Molecular structure and general photochromic equilibrium of indolinospironaphthoxazine (I). (b) Absorption spectra of  $10^{-4}$  M indolinospironaphthoxazine in *n*-hexane: (—) at 298 K without laser pulse (I) (---) after irradiation by 266 nm laser pulses (4 ns) for 5 min, laser irradiance  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> (II).

and an external telescope allowing the laser beam diameter to be increased from 15  $\mu\text{m}$  to several hundreds of  $\mu\text{m}$ , corresponding to a power density varying between  $10^{10}$  and  $10^6$   $\text{W}/\text{cm}^2$ .<sup>46</sup>

The viewing system, using an inverted Cassegrain optics design, allowed sample visualisation with  $\times 300$  magnification, and fine ( $x, y, z$ ) manipulations with high resolution.<sup>46,48,49</sup> Around 1  $\text{cm}^2$  sample area could be analyzed.

The experimental sequence used for this work was as follows. Ions were formed by laser-induced ionization in the source cell (residual pressure  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  Torr). The trapping potential was typically (+2 V or –4 V) to confine positive or negative ions in the source side. Ions were then excited by a frequency excitation chirp (software Odyssey 3.1) and the image current was detected, amplified, digitized, apodized (Blackman–Harris, three terms) and Fourier transformed to produce a mass spectrum.<sup>50</sup>

### Laser desorption/ionization measurements

To maintain the spiro compounds (powder) on the sample holder of the mass spectrometer, they had to be deposited and pressed on a sticky aluminium band. The adjustment of the laser beam by an external telescope allowed the power density to be varied between  $10^6$  and  $10^8$   $\text{W}/\text{cm}^2$ .<sup>46</sup> Spectra were obtained either as single shots or averages of 15 shots.

### Matrix assisted laser desorption/ionization measurements

All matrices were dissolved in  $\text{H}_2\text{O}$  (or  $\text{D}_2\text{O}$ ) at a concentration of  $10^{-1}$  M, and 50  $\mu\text{L}$  of matrix solution was applied to the probe tip of the mass spectrometer.  $\text{H}_2\text{O}$  (or  $\text{D}_2\text{O}$ ) was slowly evaporated into a vacuum ( $10^{-2}$  Torr) for 15 min to obtain very small crystals of matrix on the support. The spiro compounds were dissolved in tetrahydrofuran (THF) at a concentration of  $10^{-4}$  M, and 50  $\mu\text{L}$  of analyte solution was deposited on top of the matrix surface. A partial redissolution of matrix was observed, the solvent was evaporated very rapidly into the vacuum to form a layer of analyte and matrix co-crystallized on the sample holder surface. The power density applied was about  $10^7$   $\text{W}/\text{cm}^2$ , and spectra obtained were stored after a single laser shot.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Study of spiro compounds by laser desorption

Kellmann and colleagues<sup>22</sup> studied spiro compounds in methanol solution at 298 K using laser flash photolysis. They concluded that the photomerocyanines produced after a UV laser pulse were predominantly in quinoidal structures, in contrast with the photomerocyanines of nitro-substituted spiro compounds in which the structures were essentially zwitterionic (donor–acceptor systems).

Previous mass spectrometry investigations of spiro compounds have exclusively used electron impact ionization (70 eV). Resulting spectra were difficult to interpret owing to the many fragments obtained. Numerous fragmentation schemes have been proposed but the opening of the spiro molecule by electron impact could not really be proved.<sup>25</sup> Picosecond, time-

resolved spectrometry<sup>12,16,22,23</sup> showed that the excitation of spiro compounds by UV laser light induces formation of a highly colored open isomer, the photomerocyanine. The coupling of a laser interface ( $\lambda = 266$  and 355 nm) with an FTICR mass spectrometer is more fruitful than the use of electron impact mass spectrometry (EI-MS), as will be shown later in this paper.

The aim of this part of the study was also to observe the behavior of non nitro-substituted indolinospiraphthoxazines in the gas phase of FTICRMS. The FTICR spectrometer was coupled to an external laser source allowing the study of the photomerocyanine without effect of the solvent (in the gas phase) and to learn their intrinsic properties.

Spectra of different substituted indolinospiraphthoxazines were obtained by laser desorption mass spectrometry, as described previously. Specifically, we report here a spectrum of 9'-methoxy-1,3,3-trimethylspiro[indoline-2',3[3H]naphth [2,1-b][1,4]oxazine], denoted as MSP I, which has a molecular mass of 358.



MSP I

Figures 2 and 3 show the direct 355 nm laser desorption mass spectra of MSP I, deposited on an aluminium probe tip (this wavelength corresponds to the  $S_0 \rightarrow S_1^*$  transition of MSP I), in the positive- and negative-ion modes, respectively.

In the positive-ion mode, direct laser ionization of MSP I at high laser power density (approximately  $10^8$   $\text{W}/\text{cm}^2$ ) led to extensive fragmentation of the molecular ion  $M^+$  ( $m/z$  358). Fragment ions appeared at  $m/z$  343, 330, 315 and 301 and were very different from those observed in the EI (70 eV) spectrum. However, the ion at  $m/z$  343 can be interpreted as  $[M - \text{CH}_3]^+$  and is also present in the EI mass spectrum (see the inset to Fig. 2(a)). Comparison of the EI mass spectra at 70 and 12 eV (insets to Fig. 2(a) and (b)) showed the signal at  $m/z$  160 increased strongly upon decreasing the electron energy. This was evidence of hydrogen rearrangement. The  $m/z$  159 peak was not observed in laser desorption (Fig. 2). However, the most interesting fragment ions were at  $m/z$  212, 160 and 158, which were not observed at all or at low abundances in 70 eV EI-MS. These ions can be interpreted as characteristic fragments of the 'open' forms, as will be seen later. They were specific for laser desorption.

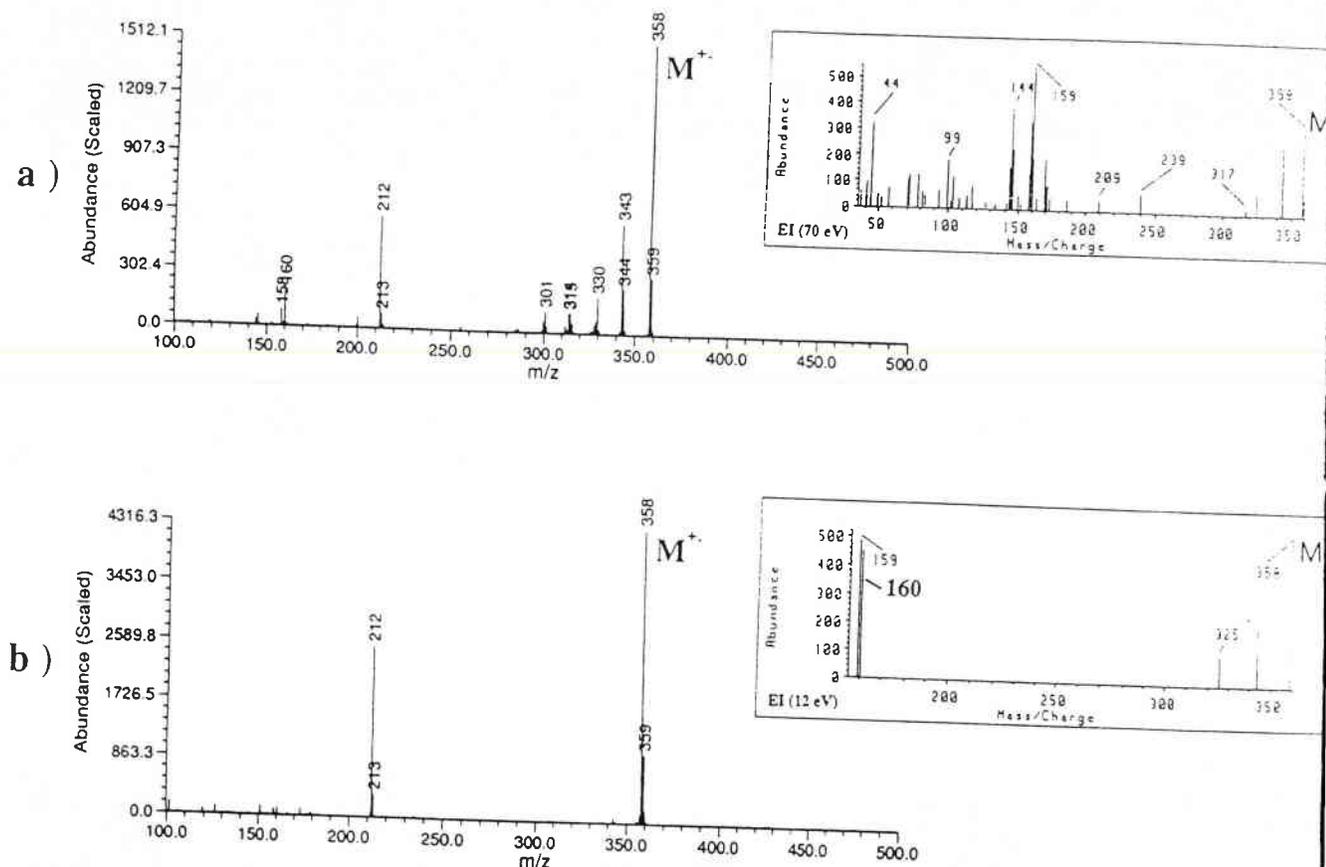
When the laser irradiance was decreased to  $10^7$   $\text{W}/\text{cm}^2$ , the main (almost exclusive) fragment ion was  $m/z$  212. The ions at  $m/z$  160, 158 had practically disappeared. The decrease of power density also permitted the desorption of spiro molecules without numerous fragments. The yields of molecular ion ( $m/z$  358) and its fragment ( $m/z$  212) were more important at  $10^7$  than at  $10^8$   $\text{W}/\text{cm}^2$  (Fig. 2(b)).

In the negative-ion mode, direct laser irradiation of

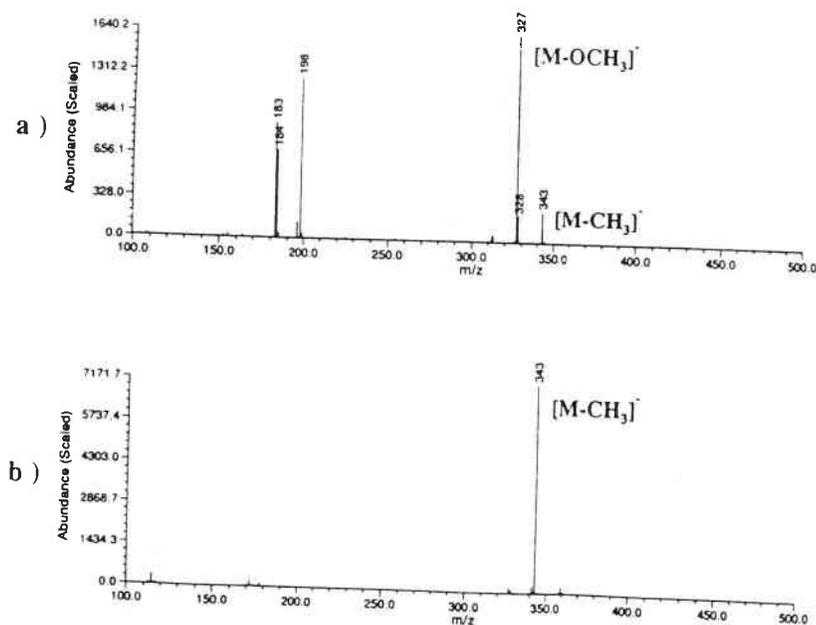
MSP I at high laser power density ( $10^8$  W/cm<sup>2</sup>) produced ions at  $m/z$  343 [ $M-CH_3$ ]<sup>-</sup> and  $m/z$  327 [ $M-OCH_3$ ]<sup>-</sup>. The molecular ion  $M^-$  was not detected at  $m/z$  358. However, an important ion was observed at  $m/z$  198, which could originate from the zwitterionic structure fragmentation, as shown below. The ion at  $m/z$

183 resulted from the loss of a  $CH_3$  group from the of  $m/z$  198 (Fig. 3(a)). At low irradiance (approximate  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>) there was only a single fragment ion at  $m/z$  343, corresponding to [ $M-CH_3$ ]<sup>-</sup> (Fig. 3(b)).

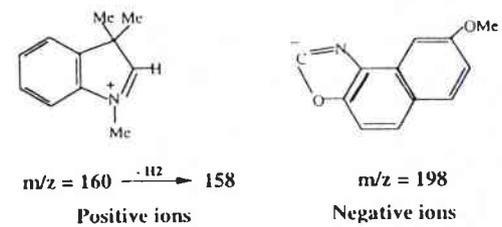
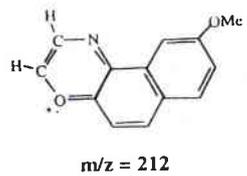
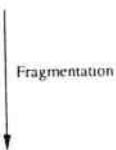
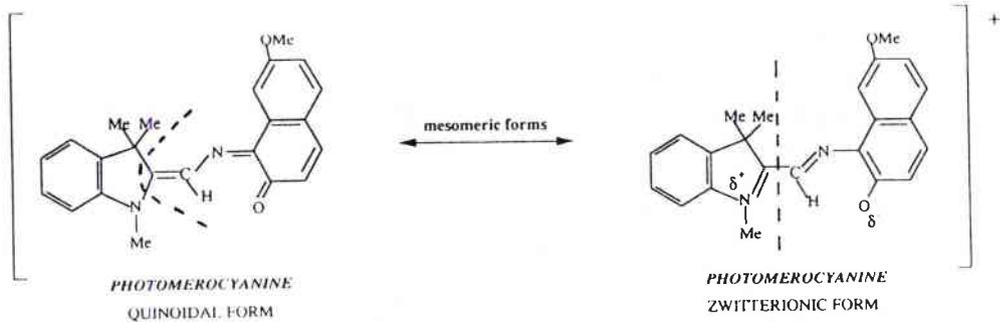
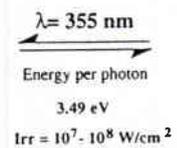
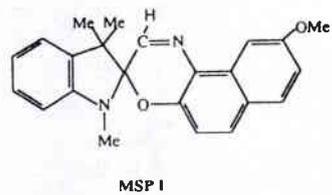
We have seen elsewhere<sup>22</sup> that quinoidal and zwitterionic electronic distributions are in mesomeric equilibrium



**Figure 2.** 355 nm LD-FTICR mass spectra of MSP I in the positive-ion mode: (a) laser irradiance  $10^8$  W/cm<sup>2</sup>. (b) laser irradiance  $10^7$  W/cm<sup>2</sup> and EI mass spectra of MSP I (a) 70 eV, (b) 12 eV in the insets.



**Figure 3.** 355 nm LD-FTICR mass spectra of MSP I in the negative-ion mode: (a) laser irradiance  $10^8$  W/cm<sup>2</sup>. (b) laser irradiance  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>.



rium which can shift according to the substituents of spirooxazines or the nature of the solvent. Generally, the predominant mesomeric form is the quinoidal one, which is the most probable in solution.<sup>22</sup>

From the mass spectra obtained in the gas phase by FTICRMS analysis (Figs 2 and 3), we have tried to determine the fragmentation processes of the photomerocyanines produced after irradiation of MSP I. The results seemed to show that two main forms could exist in the gas phase, and that their fragmentation patterns upon UV excitation were very different (Fig. 4), as described below.

For the quinoidal structure, two bond ruptures (C–N and C–C) in the indoline moiety and a proton transfer (from methyl group to oxazine carbon) are necessary for producing an ion of  $m/z$  212 (Fig. 2). For the zwitterionic structure, a bond rupture C<sub>indoline</sub>–C<sub>oxazine</sub> and a proton transfer (from oxazine carbon to indoline carbon) are necessary to break the photomerocyanine into two parts. In the excited state the zwitterionic structure is energized sufficiently to divide into an ion of  $m/z$  160 (positive-ion mode, Fig. 2(a)) and  $m/z$  198 (negative-ion mode, Fig. 3(a)) at high irradiance levels. This hypothesis of spiro fragmentation has been confirmed by working in the two ionization modes using several differently substituted spiro compounds.

To summarize, laser desorption of MSP I (at a wavelength in the absorption band of MSP I) produces (very rapidly,  $\tau < 1$  ns) photomerocyanines which, when desorbed and photoionized (a two photon process), exist in quinoidal and zwitterionic structures in the plume. The quinoidal form fragments into the characteristic positive ion  $m/z$  212, while the zwitterionic form leads to the positive ion  $m/z$  160 and to the negative ion  $m/z$  198.

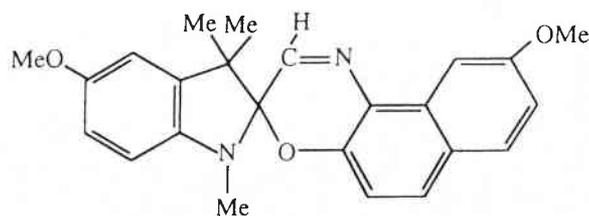
Contrary to many investigations in solution, where the solvent can react with the molecules and mask one of these two limited forms, laser desorption coupled to FTICRMS permits a demonstration that, after UV irradiation, spiro compounds are in particular, well-defined states, as described above.

### Study of spiro compounds by MALDI

Despite its wide use, the mechanism of ion production by MALDI is not yet well understood. Efforts have been made to better understand the fundamental aspects of desorption and ionization, with the goal of increasing ion yields by controlling these processes. It is generally accepted that the matrix molecules, upon absorption of the laser beam energy, rapidly sublime, forming a dense gas that undergoes supersonic expansion into the vacuum while carrying the embedded analytes into the gas phase. The velocities of the expelled analytes do not depend on their molecular masses, but are determined by the bulk gaseous expansion of the matrix molecules. Thus, desorption and ionization without significant fragmentation of protonated and/or cationized analytes can be achieved.<sup>7</sup>

In a search for a better understanding of the desorption/ionization process in MALDI, a comparative study of the behavior of 9',5 dimethoxy-1,3,3-trimethylspiro[indoline-2',3 [3H] naphth [2, 1-b] [1,4] oxazine], denoted as MSP II (molecular mass 388), was

carried out by laser desorption and by MALDI, using the same experimental conditions (wavelength, fluence, residual pressure, trapping potential, excitation chirp, etc.).



MSP II

With a 266 nm laser, typically used in MALDI, the direct laser ionization of MSP II led to little fragmentation of the molecular ion  $m/z$  388. As was seen for MSP I, the ion  $m/z$  373 was seen and interpreted as a  $\text{CH}_3$  loss from the molecular ion. Its signal intensity decreased gradually with decreasing irradiance ( $5 \times 10^6 \text{ W/cm}^2$ ). The characteristic fragments of 'open' spiro forms could still be observed at  $m/z$  212 and (poorly) at  $m/z$  190 and 188, corresponding to the fragmentation of the quinoidal and zwitterionic structures after irradiation. A good correlation was found between experimental and calculated isotopic distributions of the molecular ion ( $\text{M}^+$ ,  $m/z$  388), as observed in Fig. 5.

Laser desorption/ionization of MSP II assisted by nicotinic acid matrix showed the molecular ion  $\text{M}^+$ ,  $m/z$  388 and other ions containing the intact molecule (singly, doubly and especially triply protonated molecules),  $[\text{M} + \text{H}]^+$ ,  $[\text{M} + 2\text{H}]^+$  and  $[\text{M} + 3\text{H}]^+$ ,  $m/z$  389, 390 and 391, respectively (Fig. 6). Nicotinic acid, NA, has been used as a matrix which absorbs light strongly at 266 nm (reflection spectrum shown in Fig. 9), and appeared to protect well the molecules of MSP II. Neither fragmentation of the molecular ion  $m/z$  388 nor detection of characteristic fragments of the open forms ( $m/z$  212, 190, 188) were observed. In typical MALDI conditions (nicotinic acid,  $\lambda = 266 \text{ nm}$ ,  $I = 10^7 \text{ W/cm}^2$ , co-crystallization), ionization and desorption of the analyte without significant fragmentation occurred by an important proton transfer ( $3\text{H}^+$ ). These protons were derived from nicotinic acid. The emission of  $\text{H}_2$  from the matrix seemed to be involved in these MALDI processes, as will be seen later.

However, the ions at  $m/z$  203 and 406, which could correspond to  $[\text{2NA} - \text{CO}_2 + \text{H}]^+$  and  $[\text{M} + \text{H}_2\text{O}]^+$ , respectively, showed that the decarboxylation and the dehydration of the matrix could be involved also. However, in some spectra (not shown), the proton transfer product  $[\text{M} + 3\text{H}]^+$  was observed without the presence of  $m/z$  203 and 406. To confirm the real role of the decarboxylation and the dehydration of the matrix in MALDI processes, a complete study will be made with matrices in which the decarboxylation and/or the dehydration yields are different.

Finally, it is interesting to note that the matrix could stabilize the photomerocyanines produced by irradiation of MSP II. At the same time, the matrix could react with the analyte open form to produce the triply protonated molecules in the gas phase. It could also provide an original method to prove that the photo-

merocyanines could exist in gas phase where any solvent is present. MALDI-FTICRMS is a complementary means of investigation to LD-FTICRMS.

The source of the hydrogen in the matrix molecules which led to the formation of the triply protonated molecule has been solved by substituting the carboxylic acid hydrogen to form a methyl ester derivative. The MALDI mass spectrum obtained with the methyl ester did not show proton transfer (Fig. 7). The methyl nicotinate, which absorbs as strongly as nicotinic acid at 266 nm (Fig. 9), did not act in the same way as a matrix.

Laser desorption assisted by methyl nicotinate gave the same fingerprint as direct laser desorption (Fig. 5). The molecular ion,  $M^{+}$  ( $m/z$  388) was observed with its characteristic fragments at  $m/z$  373 [ $M-CH_3$ ] $^{+}$ ,  $m/z$

212 and  $m/z$  190, 188 due to the fragmentation of the quinoidal and zwitterionic forms, respectively. These results with methyl nicotinate seem to confirm that the presence of labile hydrogen in the matrix is a key factor in MALDI processes. The fact that the matrix absorbs strongly at the wavelength utilized is not in itself sufficient. The decarboxylation ( $m/z$  203) and the addition of water ( $m/z$  406) to the analyte from the matrix were not detected (Fig. 7).

To confirm whether the carboxylic acid hydrogen was the major proton source, deuterated nicotinic acid was investigated as a matrix. If MSP II acquired three protons from the carboxyl group, the molecular ion should be shifted to higher mass by one mass unit for each observed proton transfer.

As can be observed in Fig. 8, the source of protons

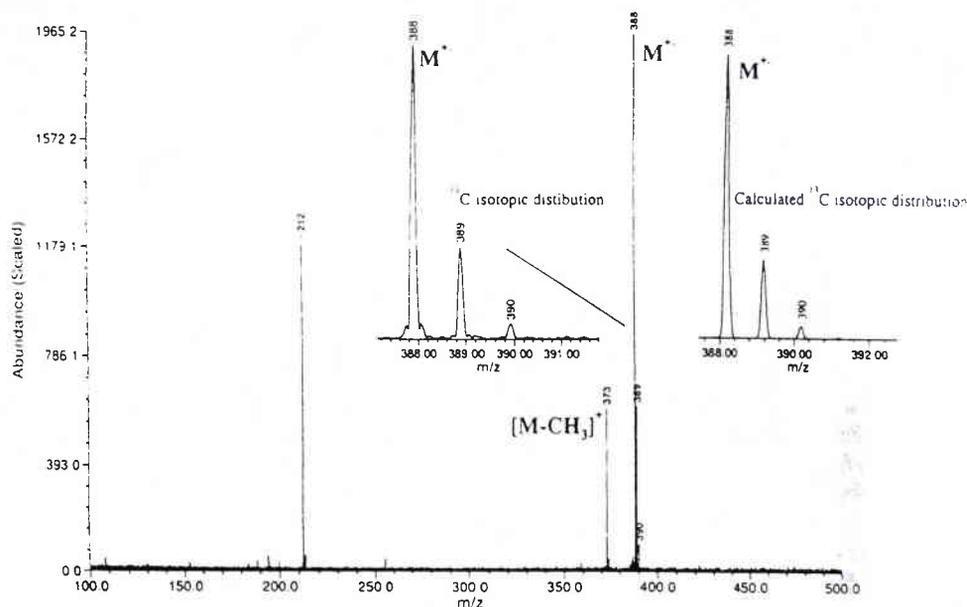


Figure 5. 266 nm LD-FTICR mass spectrum of MSP II, laser irradiance  $5 \times 10^6$  W/cm $^2$ .

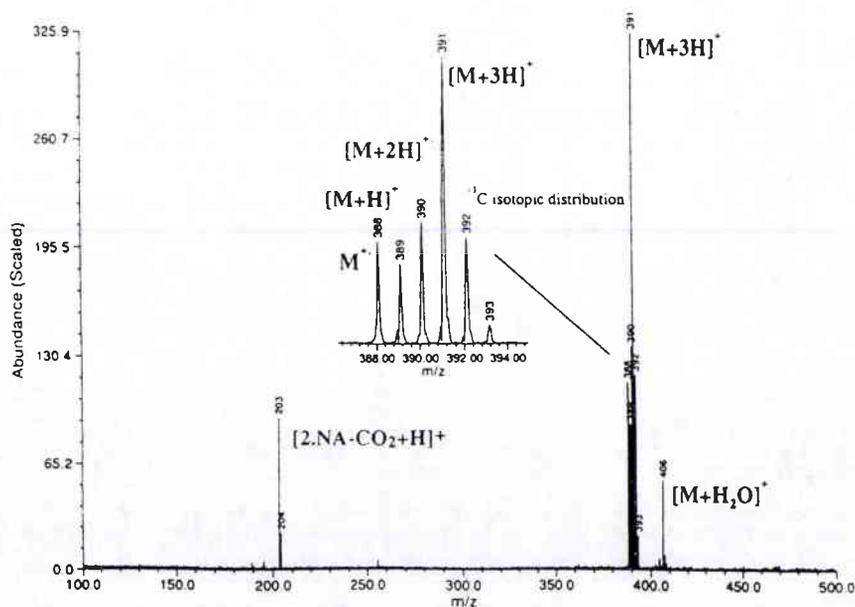


Figure 6. 266 nm MALDI-FTICR mass spectrum of MSP II, laser irradiance  $5 \times 10^6$  W/cm $^2$ ; matrix nicotinic acid.



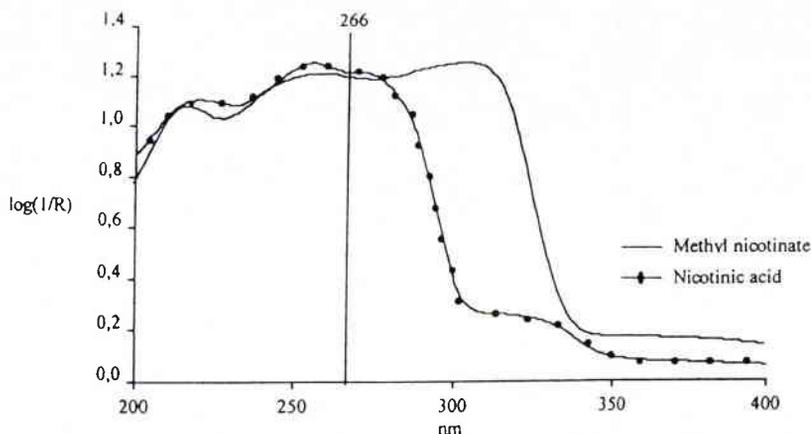


Figure 9. Reflection spectra of nicotinic acid and methyl nicotinate using an integrating sphere coupled with UV/VIS Lambda 14 Spectrometer.

spiro structure induces the typical formation of triply protonated molecules  $[M + 3H]^+$  simultaneously with the color change. Further studies using more models with different matrices and at different wavelengths (193, 248, 266 and 355 nm) will be undertaken to obtain a better understanding of the MALDI processes. Ion trap mass spectrometry (IT-MS) with MS/MS experiments will be made on the characteristic fragments of the 'open' forms ( $m/z$  160, 212).

### Acknowledgements

We would like to thank Dr G. Krier and Dr L. Vernex-Loset for their appreciated help with the FTICRMS analyses.

### REFERENCES

1. M. Karas, D. Bachman, U. Bahr and F. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **78**, 53 (1987).
2. M. Karas and F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* **60**, 2299 (1988).
3. A. Vertes, R. Gijbels and R. D. Levine, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **4**, 228 (1990).
4. K. L. Busch, *J. Mass Spectrom.* **30**, 233 (1995).
5. P. C. Liao and J. Allison, *J. Mass Spectrom.* **30**, 408 (1995).
6. R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale and R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 871 (1996).
7. G. Grigorean, R. I. Carey and I. J. Amster, *Eur. Mass Spectrom.* **2**, 139 (1996).
8. G. H. Brown, in *Photochromism*, G. H. Brown (Ed.), Chap. 1, Wiley, New York (1971).
9. R. Lingston, in *Photochromism*, G. H. Brown (Ed.), Chap. 2, Wiley, New York (1971).
10. R. C. Bertelson, in *Photochromism*, G. H. Brown (Ed.), Chap. 3, Wiley, New York (1971).
11. E. Fischer and Y. Hirshberg, *J. Chem. Soc.* 4522 (1952).
12. S. Aramaki and G. H. Atkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 438 (1992).
13. R. Guglielmetti, in *Photochromism, Molecules and Systems*, H. Dürr and H. Bouas Laurent (Eds), Chaps 8 and 23, Elsevier, Amsterdam (1990).
14. N. Y. C. Chu, in *Photochromism, Molecules and Systems*, H. Dürr and H. Bouas Laurent (Eds), Chaps 10 and 24, Elsevier, Amsterdam (1990).
15. A. Samat, R. Guglielmetti and D. De Keukeleire, *Bull. Soc. Chim. Belg.* **100**, 679 (1991).
16. N. Y. Chu, *Can. J. Chem.* **61**, 300 (1983).
17. U. W. Grümmt, M. Reichenbacher and R. Paetzold, *Tetrahedron Lett.* **22**, 3945 (1981).
18. S. Schneider, *Z. Phys. Chem.* **154**, 91 (1987).
19. P. Douzou and C. Wippler, *J. Chim. Phys. Phys.-Chim.-Bid* **60**, 1409 (1963).
20. J. C. Crano, W. S. Kwak and C. N. Welch, in *Applied Photochromic Polymer Systems*, C. B. McArdle (Ed.), Chap. 2, Blackie, New York (1992).
21. S. Scheider, A. Mindl, G. Elfinger and M. Metzger, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **91**, 1222 (1987).
22. A. Kellmann, F. Tfibel, R. Dubest, P. Levoir, J. Aubard, E. Pottier and R. Guglielmetti, *J. Photochem. Photobiol.* **A49**, 63 (1989).
23. C. Lenoble and R. S. Becker, *J. Phys. Chem.* **90**, 62 (1986).
24. A. Kellmann, L. Lindquist, F. Tfibel and R. Guglielmetti, *J. Photochem.* **35**, 155 (1986).
25. J. L. Derocque, P. Appriou, R. Guglielmetti and H. Dürr, *Org. Mass Spectrom.* **12** No 10, 605 (1977).
26. R. J. Araujo, in *Photochromism*, G. H. Brown (Ed.), Chap. 8, Wiley, New York (1971).
27. G. R. Meredith, D. J. Williams, S. N. Fishman, E. S. Goldburt and V. A. Krongauz, *J. Phys. Chem.* **87**, 1697 (1983).
28. H. Ono, T. Osada and K. Kosuge, US. Patent 3, 578, 602 (1971).
29. H. Dürr, in *Photochromism, Molecules and Systems*, H. Dürr and H. Bouas Laurent (Ed.), Chap. 1, Elsevier, Amsterdam (1990).
30. R. C. Bertelson, in *Photochromism*, G.H. Brown (Ed.), Chap. 10, Wiley, New York (1971).
31. V. Malatesta, P. Allegrini, C. Neri and L. Lanzini, *Magn. Reson. Chem.* **30**, 905 (1992).
32. N. L. Zaichenko, A. V. Lyubinov, U. S. Marevtsev and M. I. Cherkashin, *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim.* **5**, 1040 (1989).
33. M. Campredon, A. Samat, R. Guglielmetti and A. Alberti, *Gazz. Chim. Ital.* **123**, 261 (1993).
34. R. Millini, G. Del Pietro, P. Allegrini, L. Crisci and V. Malatesta, *Acta Crystallogr. Sect. C* **47**, 2567 (1991).
35. W. Clegg, N. C. Norman, T. Flood, L. Sallans, W. S. Kwak, P. L. Kwiatkowski and J. G. Lasch, *Acta Crystallogr. Sect. C* **47**, 817 (1991).
36. M. Fan, Y. Ming, Y. Liang, X. Zhang, S. Jin, S. Yao and N. Lin, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2* 1387 (1994).
37. N. Tamai and H. Masuhara, *Chem. Phys. Lett.* **191**, 189 (1992).
38. S. Nakamura, K. Uchida, A. Murakami and M. Irie, *J. Org. Chem.* **58**, 5543 (1993).
39. C. Bohne, M. G. Fan, Z. J. Li, J. Luszytk and J. C. Scaiano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 571 (1990).
40. A. Kellmann, F. Tfibel, A. Samat and R. Guglielmetti, *XV<sup>th</sup> IUPAC on Photochemistry*, Prague (1994).
41. H. Pommier, A. Samat, M. Rajzmann, G. Pepe and R. Guglielmetti, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **246**, 241 (1994).
42. V. Malatesta, G. Ranglino, U. Romano and P. Allegrini, *Int. J. Quantum Chem.* **42**, 879 (1992).
43. S. Schneider, *Physikalische Chemie Neue Folge* Bd. **154**, S. 91 (1987).
44. M. Nakamura and T. Taniguchi, *J. Synth. Orgn. Chem. Jpn.* **49**, 392 (1991).
45. P. Laréginie, Thesis, Aix-Marseille, France, January (1995).
46. J. F. Muller, M. Pelletier, G. Krier, D. Weil and J. Campana, in *Microbeam Analysis*, [ed. by San Francisco], p. 311 (1989).
47. M. Pelletier, G. Krier, J. F. Muller, D. Weil and M. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 146 (1988).

48. J. F. Muller, F. Toltite and G. Krier, M. Pelletier, French Patent 8809438
49. G. Bouvy and M. Gauneau, *Analisis* 1, 15 (1972).
50. A. G. Marshall and F. R. Verdun, *Fourier Transforms in NMR, Optical and Mass Spectrometry. A User's Handbook*, Elsevier, Amsterdam (1990).

# H-atom Transfer Following Analyte Photoionization in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Processes

P. J. Calba<sup>1</sup>, J. F. Muller<sup>1\*</sup> and M. Inouye<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, Technopôle Metz 2000, 57078 Metz cedex 3, France

<sup>2</sup>Department of Applied Materials Science, Osaka Prefecture University, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

As recently shown in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry studies (*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11, 1602, 1997), photochromic systems can be used as molecular probe for the study of matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) processes inducing the typical formation of the triply hydrogenated molecules  $[M + 2H + H]^+$  simultaneously with the color change. In this paper, a novel photochromic system blocked in its open form allows the proposal of a possible mechanism for protonated ions. The results suggest that H-atom transfer from a matrix molecule to an analyte plays an important role in the ionization step. The transferring H-atom may be derived from electronically excited states of matrix and analyte molecules via the triplet states. Among several ionization processes described in the literature, we observe that H-atom transfer following analyte photoionization is a possible ionization mechanism in MALDI. © 1998 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 15 July 1998; Revised 1 September 1998; Accepted 1 September 1998

RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY  
*Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 1727–1731 (1998)

Since its development, extensive efforts have been focused on understanding the mechanism of desorption and ionization in MALDI processes. Up to now, several different models have been proposed to explain the mechanism of desorption of large molecules in MALDI.<sup>1</sup> However, the process by which ionized analytes are produced is still not fully understood and no adequate quantitative model for the complete process exists, despite extensive studies.<sup>2–6</sup>

In MALDI, evidence exists that analyte ionization occurs both in the surface and in the expanding plume. Initiated by the laser shot, ions may form by ion–molecule reactions (a collisional mechanism) between matrix molecular ions and the analyte with the participation of radical ions,<sup>7</sup> or may exist after excited state proton transfer (ESPT) between electronically excited matrix molecules and neutral analyte molecules,<sup>8,9</sup> or most probably they may originate from a combination of both processes. Due partly to the experimental conditions and partly to the character of the analyte itself, different ionization mechanisms can be activated. Proteins and peptides ionize almost exclusively by proton transfer, for other classes of compounds such as carbohydrates and synthetic polymers the dominant ionization process is the attachment of sodium, potassium ions. Recently, Allwood *et al.*<sup>10</sup> proposed a scheme in which thermionic electron emission from excited singlet states provide the main ionization route for species in MALDI. Thus, ionization processes in MALDI appear far more complex than were first believed.

In our earlier paper,<sup>11</sup> the MALDI processes were studied by the structural change of photochromic probe incorporated in a matrix. The photochromic probes are constituted by a series of substituted spirooxazines exposed to the UV light. These compounds rapidly change color (transparent to

blue in the time scale  $< 10^{-9}$  s) and return to the original color if the irradiation is stopped. The blue color is due to the opening of the spiro moiety to opened and delocalized structure (photomerocyanine) which absorbs the light in the 500–650 nm range (Fig. 1).

The LD/MALDI results of this molecular probe were as follows: (a) laser desorption (LD) of spiro compound (at a wavelength in the absorption band of spiro, e.g. 266 nm) leads to desorption and photoionization (a 2 photons process) of the open form,  $M^{+}$  which fragments into several parts. (b) In MALDI experiments with nicotinic acid as matrix ( $\lambda_{\text{laser}} = \lambda [S_0 \rightarrow S_1^*]$  of matrix), the main ionization step of the open form is assumed by an important H-atom transfer ( $[M + H]^+$ ,  $[M + 2H]^+$  and  $[M + 3H]^+$ ) from the matrix to the probe. Contrary to LD experiments, the MALDI technique produces less fragmentations of the open form.

Spirooxazine compounds appear to be an excellent probe for the study of different MALDI processes because the opening of the spiro structure induces the typical formation of triply hydrogenated ions ( $[M + 3H]^+$  or  $[M + 3D]^+$  with deuterated matrix) simultaneously with the color change. We cannot yet determine if  $[M + 3H]^+$  is the result of 3 H-atoms adduct or a mixture of a proton ( $H^+$ ) and two H-atoms. Consequently, we prefer to use the term triply hydrogenated rather than triply protonated for the ions observed in MALDI. These compounds are also molecular probes which allow MALDI processes to be observed and clearly indicate the major role of labile hydrogen in the matrix. The rates of opening the probe ( $< 1$  ns) and closing ( $> 1$  ms) allow us to obtain an approximate time scale of proton transfer.

To obtain more evidence that excited state proton transfer in the solid state or in the gas phase may account for the ionization of analyte molecules in MALDI, a new probe has been studied. Indeed, in this study, we have worked with a novel photochromic molecular probe which can be blocked

\*Correspondence to: J. F. Muller, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, Technopôle Metz 2000, 57078 Metz cedex 3, France.

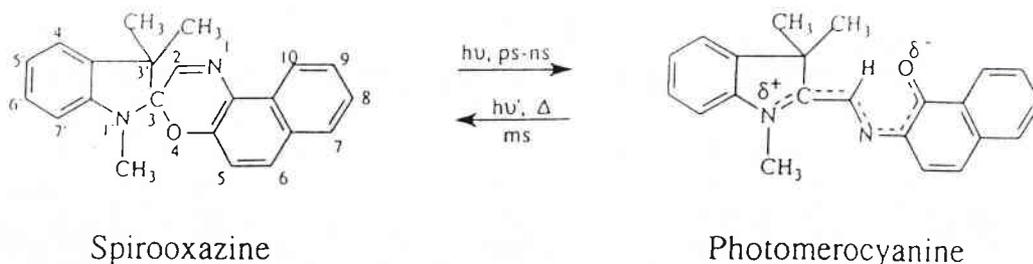


Figure 1. Molecular structure and general photochromic equilibrium of indolinospironaphthoxazine.

in its open form according to the experimental conditions. This new class of spiro compounds is crown spirobenzopyrans, designed and synthesized by Inouye's group.<sup>12</sup> Only the combination of two simultaneous 'chemical and physical inputs' (alkali metal cation and UV light) can cause irreversible photochromism unlike spirooxazine compounds (Fig. 2).

As reported in our previous publication,<sup>11</sup> comparison will be made of LD results of this new molecular probe with results obtained by the MALDI technique. Proton and/or H-atom transfer occurs before or after the opening spiro structure can be examined, i.e. if the analyte must be excited before an efficient hydrogen transfer. Finally, it will be proposed a complementary scheme of ion formation in MALDI.

## EXPERIMENTAL

The new molecular probe tested in these experiments was prepared as below.

### Crown spirobenzopyran without an adduct of alkali metal salt (denoted as CSBP)

The spiro compound has been used without further purification. For LD measurements, a small quantity of this molecule was deposited and pressed on a sticky aluminum band fixed on the sample holder of the mass spectrometer. For MALDI experiments, the crown spirobenzopyran was dissolved in  $\text{CH}_3\text{CN}$  at a concentration of  $10^{-3}$  M and 2.5  $\mu\text{L}$

of analyte solution was deposited on top of the matrix surface (saturated solution of ferulic acid in MeOH forming a matrix crystal film after air-drying). A redissolution of the matrix was observed, the solvent was evaporated very rapidly into the vacuum to form a layer of analyte and matrix co-crystallized on the sample holder surface.

### Crown spirobenzopyran with adduct of $\text{K}^+$ alkali metal salt (denoted as CSBPK)

A small quantity of crown spirobenzopyran was mixed with an excess of KCl in a mortar and crushed for ten minutes. Before LD measurements, the mixture (crown spiro + KCl) was deposited on a sticky aluminum band and irradiated for 1 minute with a 355 nm Nd:YAG laser (1Hz) for producing the permanent open form of the spiro structure. For MALDI experiments, a  $10^{-3}$  M solution (in  $\text{CH}_3\text{CN}$ ) of the mixture (crown spiro + KCl) was prepared and irradiated for 1 minute by a 355 nm Nd:YAG laser. 2.5  $\mu\text{L}$  of irradiated analyte solution was deposited on top of the crystallized matrix surface as described in Ref.<sup>11</sup>.

All experiments were performed on a Fourier transform mass spectrometer. This instrument is a modified, differentially pumped dual-cell Nicolet Instruments FTMS 2000 (now Finnigan MAT, Madison, WI, USA) operated at 3.18 T magnetic field and coupled with a reflectron laser interface.<sup>13,14</sup> The laser beam was focused perpendicular to the target surface. Ions were desorbed with a 355 nm Quantel Brilliant Nd:YAG with typical laser irradiance between  $10^6$  and  $10^7$   $\text{W}/\text{cm}^2$  in the source cell (residual

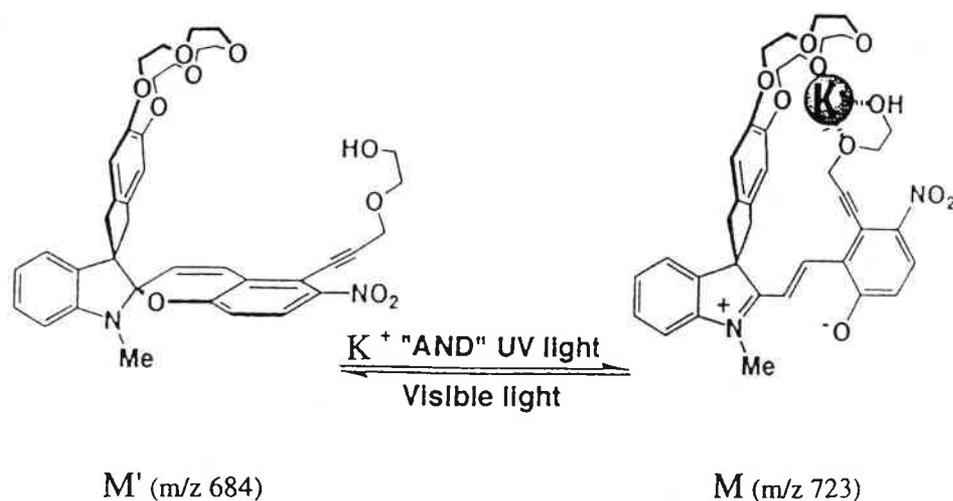


Figure 2. Thermally irreversible photochromism of crown spirobenzopyrans.

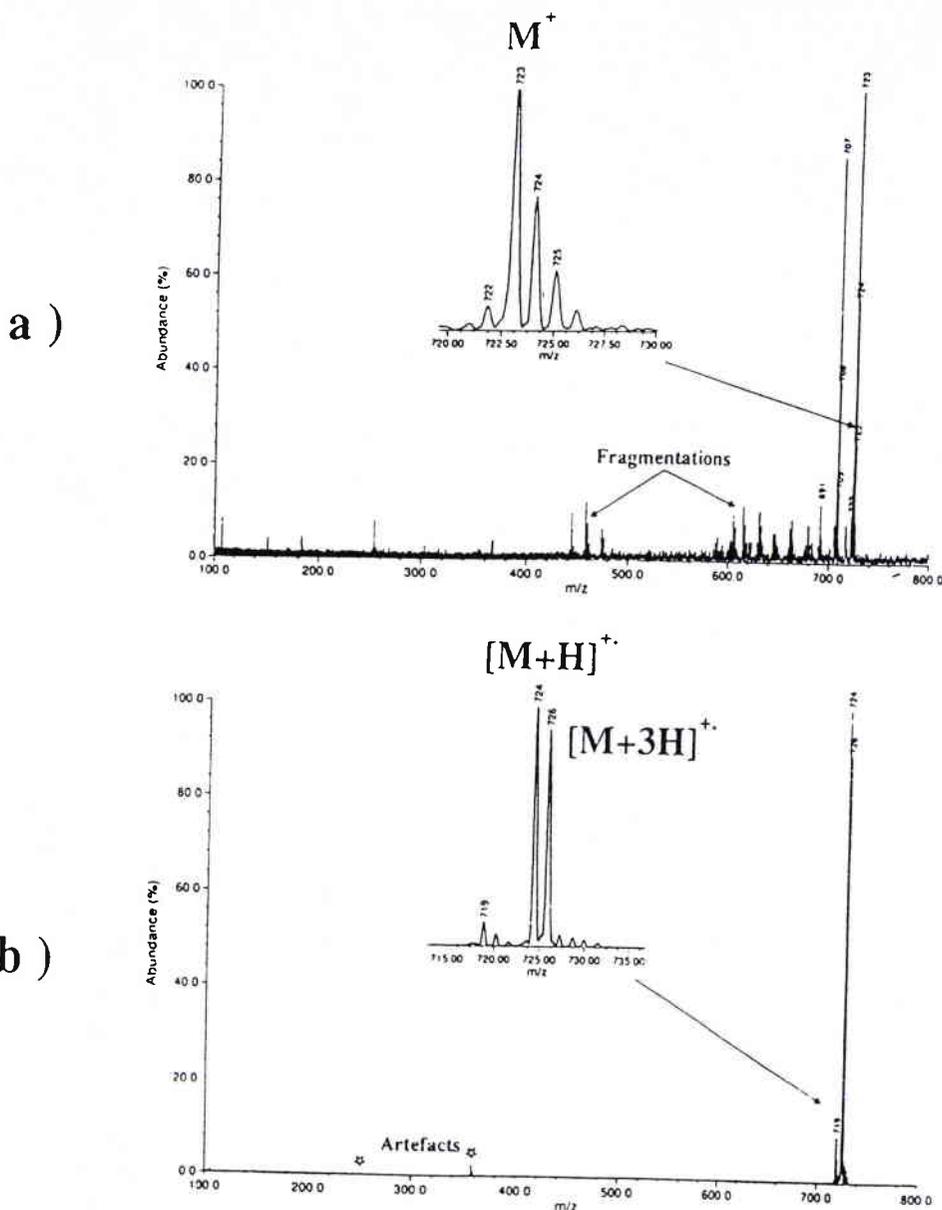


Figure 3. 355 nm FTICR mass spectra of CSBPK, positive ion mode, laser irradiance  $5 \times 10^6$  W/cm<sup>2</sup>. CSBPK = mixture of (Crown SpiroBenzoPyran + KCl) irradiated 60 times at 355 nm during 1 minute for producing the permanent open form (M): (a) UV-LDI mass spectrum (b) UV-MALDI mass spectrum.

pressure  $10^{-7}$ – $10^{-8}$  Torr). The trapping potential was typically (+1.5 V) to confine positive ions in the source side. Ions were then excited by a frequency excitation chirp (software Odyssey 3.1) and the image current was detected, amplified, digitized, apodized (Blakman–Harris, three terms) and Fourier transformed to produce a mass spectrum. Mass spectra were obtained by averaging the signals from three to five laser shots.

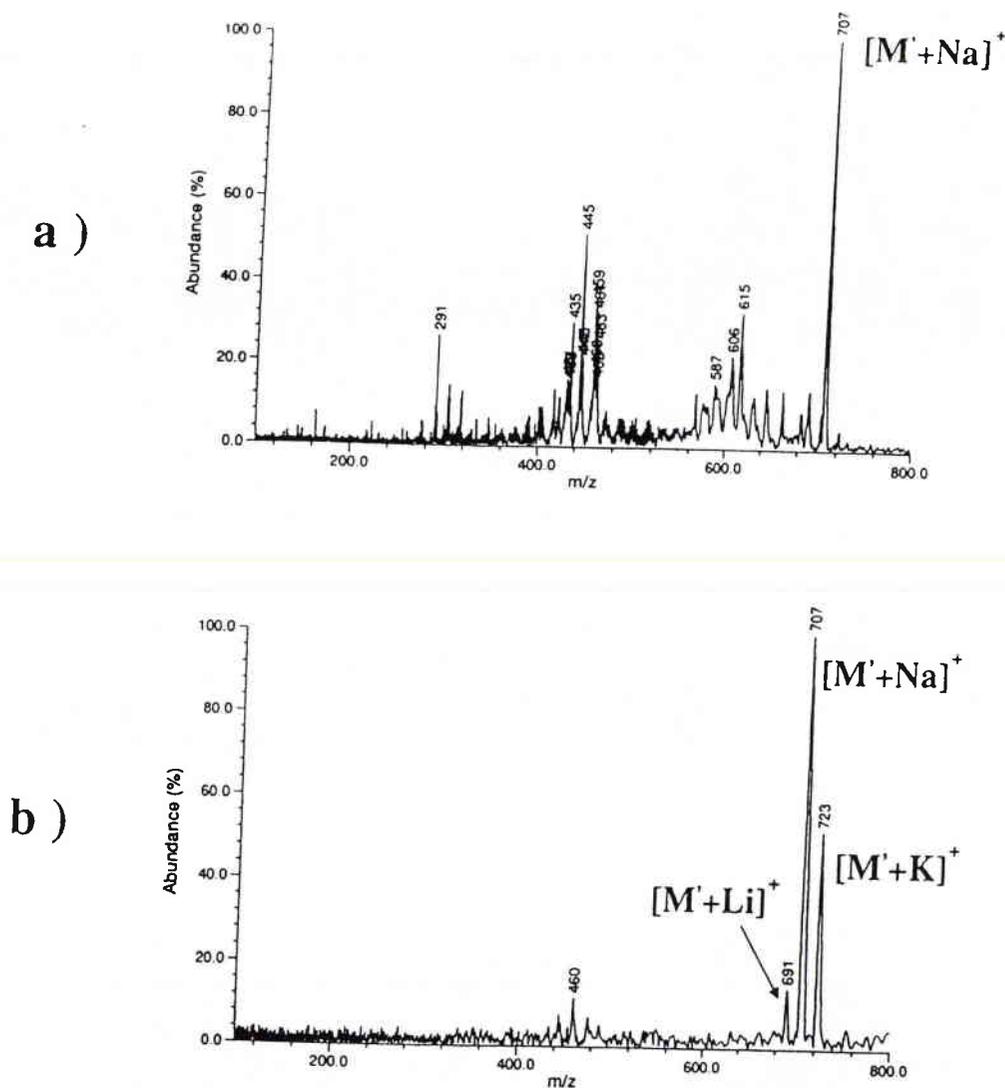
## RESULTS

A moderate selectivity of crown spirobenzopyran towards  $Li^+$  cation is shown in Ref.<sup>12</sup>. In the literature<sup>15</sup> it is well known that  $Li^+$  is small enough to fit within the 15C5 cavity contrary to other alkali cations which are too large. The combination of Li salt and UV irradiation increases the coloration of solution (absorption of the open form) which is stable and does not thermally bleach under dark conditions

at room temperature even after 30 days. However, for our study we have not used  $Li^+$  as the alkali cation but rather  $K^+$  because LiCl is too hygroscopic for mixing with crown spiro compounds in a mortar.

Figure 3 shows LD/MALDI spectra of CSBPK, the permanent open form of crown spiro structure, acquired by a 355 nm laser and with a laser irradiance of  $5 \times 10^6$  W/cm<sup>2</sup>.

There are several important differences in obtaining these spectra. First, a molecular ion,  $M^+$  (CSBP + K,  $m/z$  723) is observed in LD experiments (Fig. 3(a)) whereas singly  $[M+H]^+$  ( $m/z$  724) and triply hydrogenated molecules  $[M+3H]^+$  ( $m/z$  726) are detected by MALDI (Fig. 3(b)). The S/N ratio is strongly increased in the last technique. Second, fragmentation of the molecular ion is only observed in LD spectrum. The presence of some contaminants' peaks can be noted, which are attributed to Li and Na adducts on the crown spiro compound ( $M' = CSBP$ ),  $m/z$  691 and 707, respectively in Fig. 3(a). These alkali



**Figure 4.** 355 nm FTICR mass spectra of CSBP, molecular probe ( $M'$ ) without adduct of alkali metal salt and no 355 nm irradiation before MS analysis, positive ion mode, laser irradiance  $10^7$  W/cm<sup>2</sup>: (a) UV-LDI mass spectrum (b) UV-MALDI mass spectrum.

metal cations arise from the synthesis procedures because no purification step has been used before MS analysis. Third, MALDI spectrum of the mixture crown spirobenzopyran and KCl without UV irradiation before MS analysis (not shown) has been achieved. In this case, the yield of the triply hydrogenated molecular ion is less pronounced than in Fig. 3(b).

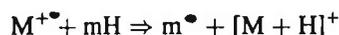
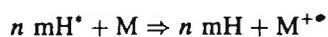
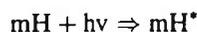
These results are comparable to the results obtained with spirooxazine as the molecular probe. In MALDI, photochromic probes specifically produce triply hydrogenated molecules. A zwitterionic form of the spiro compound in the excited state could be proposed as the intermediate for the ionization of the molecular probe. A reduction (by 2H atoms) and a protonation (by  $H^+$ ) on the pyran moiety of CSBP would occur after the opening of the spiro structure by UV irradiation. Complementary studies should be conducted to confirm this ionization step of our molecules. In this study, it has been shown that proton and/or H-atom transfer involved in ionization processes in MALDI takes place after the opening of the spiro structure, i.e. after excitation of the analyte. The presence of the matrix is necessary for the efficient ionization of the analyte without

extensive decomposition, thus the ion formation process is really assisted by the matrix.

The LD/MALDI spectra obtained from native CSBP (without alkali salt adduct,  $M'$ ) and under the same experimental conditions (355 nm,  $I_{rr} = 10^7$  W/cm<sup>2</sup>) are shown in Fig. 4. The LD spectrum (Fig. 4(a)) shows two cationized molecular peaks,  $[M'+Li]^+$  and  $[M'+Na]^+$ ,  $m/z$  691 and 707 respectively and abundant fragments of the molecular ion  $M'$  ( $400 < m/z < 600$ ) which are not detected in the MALDI spectrum (Fig. 4(b)). As seen earlier, these alkali cation adducts arise from internal pollution. In the absence of alkali salt adducts in excess, protonation of the molecular ion in MALDI is not observed, only cationized species are detected. It is clear that the closing rate of the molecule probe highly influences the hydrogen transfer between matrix and analyte. If the molecule is not doped with alkali salts, employed for producing the open structure, protonation does not occur. But as shown in Fig. 4(b) ionization in MALDI processes can be realized without hydrogen transfer. It would also appear that protonation and cationization processes are two different ionization mechanisms in MALDI. Recently, E. Lehmann *et al.*<sup>16</sup> showed

that the cationization step may originate from pre-formed species in the solid state. But the major focus of this paper is on the mechanism for production of the protonated species rather than the cationization process.

On the basis of our available experimental results, we propose that MALDI involves proton transfer reactions between electronically excited matrix molecules and analyte molecules. But contrary to Russell's results,<sup>9</sup> which suggested proton transfer reactions between an excited state of the matrix and ground state of the analyte, we think that this analyte must be in an appropriate excited or ionized state (in a zwitterionic form) for an efficient hydrogen transfer with the matrix. This hypothesis for the ionization mechanism is also consistent with mechanism 3 proposed by Liao *et al.*<sup>2</sup> as below:



The matrix molecules are designated as mH specifically indicating the presence of a H atom in the molecule and the analyte molecule as M.

This interpretation of these results is based on several papers<sup>17-19</sup> which show that the opening of the spiro structure occurs from the first-excited singlet state of the molecule (on a ps–ns time scale) and returns thermally to the ground state by different triplet pathways (where the lifetime of the molecules is longer than in the singlet state) and also to avoid fast fading rates.

Russell *et al.*<sup>20</sup> have shown that electronically excited states of a matrix can relax rapidly by radiative and nonradiative pathways (internal conversion, intersystem crossing and/or proton transfer) or strongly coupled matrix–analyte interactions (specifically hydrogen bonding).

The probability of proton and/or H-atom transfer might be increased if the lifetime of the photoactivated matrix and analyte were extended by promoting intersystem crossing of two species to the triplet manifold ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Proton and/or H-atom transfer on the nanosecond time scale requires intimate contact between matrix and analyte by hydrogen bonding. This suggestion is consistent with Beavis and Bridson's model<sup>21</sup> of inclusion of the analyte in the matrix crystal lattice, that is MALDI requires intimate contact between matrix and analyte.

In conclusion we interpret the data presented in this paper as evidence supporting the hypothesis that the UV photon energy deposited into surrounding excited matrix molecules is used to excite and/or ionize the analyte, which subsequently extracts hydrogen atoms from a matrix molecule for its ionization. Our molecular probes must be activated (in their open form) before proton and/or H-atom transfer between matrix and analyte molecules for an efficient ionization of CSPBK in MALDI. The hydrogen

transfer would occur from the triplet state of the matrix to the triplet manifold of the analyte molecules. On the basis of numerous studies it is clear that H-atom transfer following analyte photoionization can occur in MALDI. But we cannot yet determine whether the proton transfer reaction occurs in the solid state or in the gas-phase following the initial desorption process. The excited-state hydrogen transfer reaction is only possible if the lifetime of the excited states is of the same order of magnitude as the time the matrix and analytes interact in the plume. In further experiments, it would be interesting to investigate the excited states and their influence on the desorption and ionization process in more detail.

### Acknowledgements

We would like to thank G. Krier and L. Vernex-Loiset for their appreciated help with the FTICR-MS analyses.

### REFERENCES

1. H. Ehring, M. Karas and F. Hillenkamp, *Org. Mass Spectrom.* **27**, 472 (1992).
2. P. C. Liao and J. Allison, *J. Mass Spectrom.* **30**, 408 (1995).
3. E. Lehmann, R. Knochenmuss and R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1483 (1997).
4. R. Knochenmuss, F. Dubois, M. J. Dale and R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 871 (1996).
5. G. Grigorean, R. I. Carey and I. J. Amster, *Eur. Mass Spectrom.* **2**, 139 (1996).
6. M. Gimon-Kinsel, L. M. Preston-Schaffter, G. R. Kinsel and D. H. Russell, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 2534 (1997).
7. B. H. Wang, K. Dreisewerd, U. Bahr, M. Karas and F. Hillenkamp, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **4**, 393 (1993).
8. M. P. Chiarelli, A. G. Sharkey, Jr. and D. Hercules, *Anal. Chem.* **65**, 307 (1993).
9. M. E. Gimon, L. M. Preston, T. Solouki, M. A. White and D. H. Russell, *Org. Mass Spectrom.* **27**, 827 (1992).
10. D. A. Allwood, P. E. Dyer and R. W. Dreyfus, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 499 (1997).
11. P. J. Calba, J. F. Muller, A. Hachimi, P. Laréginie and R. Guglielmetti, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1602 (1997).
12. M. Inouye, K. Akamatou and H. Nakazumi, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9160 (1997).
13. J. F. Muller, F. Toltite and G. Krier, French Patent 8809438.
14. M. Pelletier, G. Krier, J. F. Muller, D. Weil and M. Johnston, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2**, 146 (1988).
15. Q. Chen, K. Cannel, J. Nicoll and D. V. Dearden, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6335 (1996).
16. E. Lehmann, R. Knochenmuss and R. Zenobi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**, 1483 (1997).
17. H. Dürr, in *Techniques of Chemistry, Photochromism*, Vol III, G.H. Brown (Ed.), Ch. 1, Kent, Ohio (1971).
18. A. Kellmann, L. Lindqvist, F. Tfibel and R. Guglielmetti, *J. Photochem.* **35**, 155 (1986).
19. S. Aramaki and G. H. Atkinson, *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 438 (1992).
20. L. M. Preston-Schaffter, G. R. Kinsel and D. H. Russell, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **5**, 800 (1994).
21. R. C. Beavis and J. N. Bridson, *J. Phys. D* **26**, 442 (1993).

# **Caractérisation de complexants de catécholamines**

**Collaboration : Groupe SUCRES, UMR CNRS 7565  
"Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires  
Complexes"**

Y. Chapleur

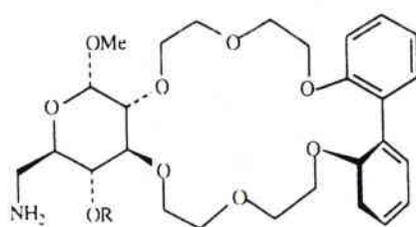
J-P. Joly

M-F. Schmitt-Dubessy

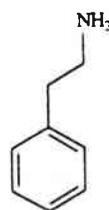
La caractérisation de complexants de catécholamines a été effectuée en collaboration avec le Dr. J-P. Joly du Laboratoire de Chimie Organique 3 (UMR CNRS 7565), de l'Université Henri Poincaré de Nancy I.

Dans le cadre de la thèse de Madame M-F. Schmitt-Dubessy (thèse soutenue le 29 Octobre 1997 à Nancy), nous avons participé à l'identification de deux types de complexants de catécholamines à visée thérapeutique dans le cadre de maladies neurologiques :

- A ) Complexe éther couronne 20C6 + PEA ( $m/z = 655$ ) :

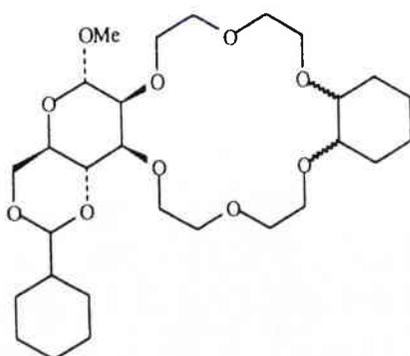


20C6  $m/z = 533$

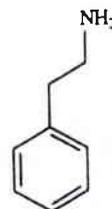


PEA  $m/z = 122$

- B ) Complexe éther couronne 18C6 + PEA ( $m/z = 666$ ) :



18C6  $m/z = 544$



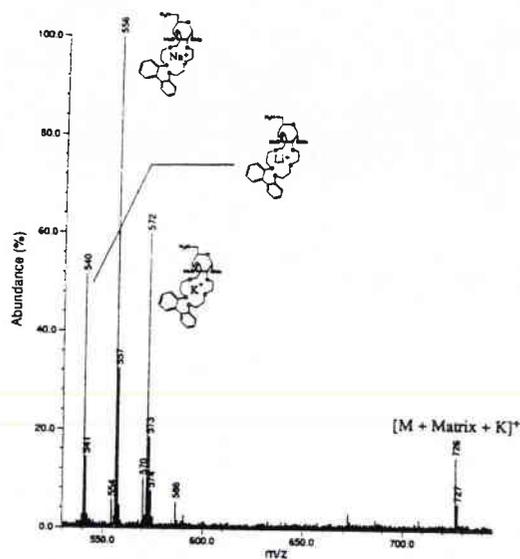
PEA  $m/z = 122$

Les analyses MALDI-FTMS ont révélé que :

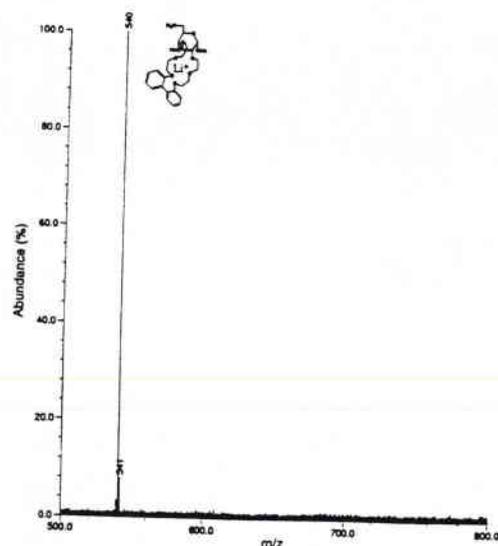
- ✓ L'éther couronne 20C6 ne complexe pas que le perchlorate de 2-phényl-éthylamine (PEA) mais a fortement tendance à complexer également le cation  $\text{Li}^+$ , apporté par  $\text{LiClO}_4$  lors de sa synthèse.
- ✓ En faisant varier l'irradiance laser, nous avons mis en évidence le pouvoir complexant de l'éther couronne 18C6. Cette expérience démontre une nouvelle fois l'importance des réglages des paramètres laser en MALDI.

- A ) Complexe 20C6 + PEA :

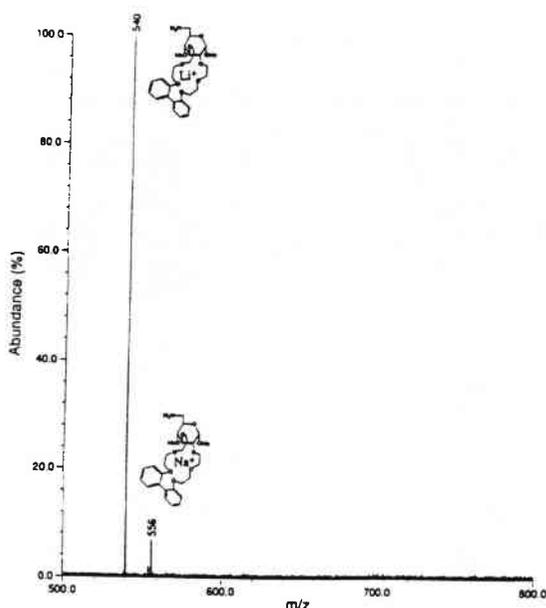
Méthodologie : voir proceeding (annexe H<sub>3</sub>).



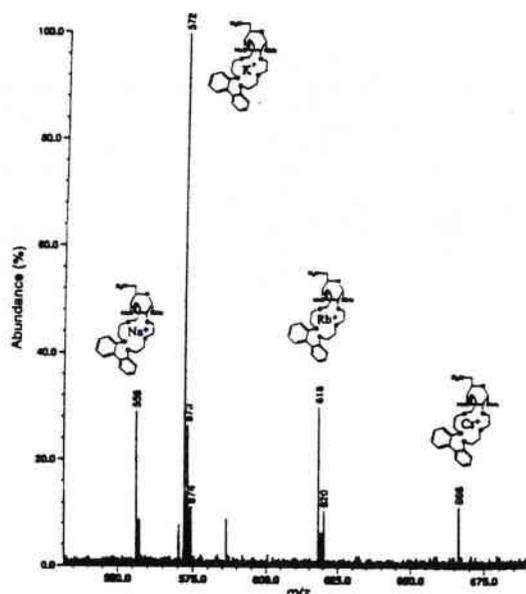
matrice 2,5 DHB



matrice  $\alpha$ -cyano-3-hydroxycinnamique  
dépôt Roepstorff (lavage de l'échantillon)



matrice  $\alpha$ -cyano-3, 20C6 + LiClO<sub>4</sub>



matrice  $\alpha$ -cyano-3, 20C6 + 1 solution  
équimolaire de 5 sels alcalins (NaCl, KCl,  
RbCl, CsCl et Li<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

☞ La technique MALDI-FTMS permet d'obtenir des renseignements sur la sélectivité des complexants des catécholamines. Ces recherches ont été présentées par affiche au 9<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Recognition and Inclusion, à l'École Supérieure de Lyon du 7 au 12 Septembre 1996. Elles ont été résumées sous la forme d'un proceeding (ISBN 0-7923-5330-7, pp. 478-481) que nous présentons ci-après.

## SYNTHESIS OF A 20-CROWN-6 FROM D-GLUCOSE AND FIRST STUDY OF ITS ALKALI METAL CATIONS AFFINITY BY MALDI-FTMS

M.-F. SCHMITT-DUBESSY and J.-P. JOLY\*

*Laboratoire de Méthodologie et Synthèse Énantiospécifique de Biomolécules associé au CNRS, Université Henri Poincaré-NANCY I, BP 239, F-54506 Vandœuvre Cedex, France.*

P.-J. CALBA, A. HACHIMI, and J.-F. MULLER

*Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université de Metz, IPC-1, Boulevard Arago, Technopôle 2000, F-57078 Metz Cedex 3, France.*

### 1. Introduction

For many years now, some of us have been involved in synthesizing various crown ethers from suitably protected hexopyranosides [1,2] or D-mannitol frameworks [3,4]. We report here the synthesis of a novel macrocycle from D-glucose incorporating a flexible biphenyl unit and a primary amine function at C-6 on the sugar moiety and some of its complexing abilities towards various guests, examined for the first time by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with Fourier Transform Mass Spectrometry (MALDI-FTMS).

### 2. Synthesis of crown ethers

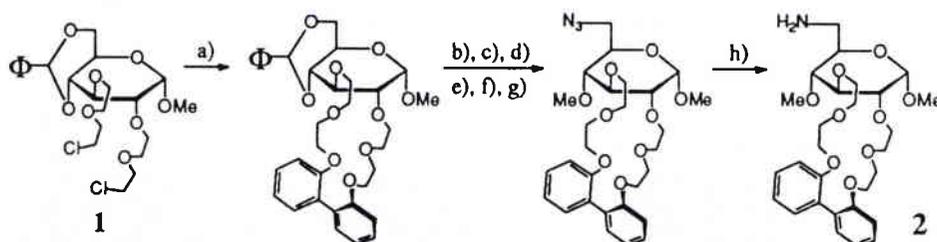


Figure 1. Synthesis of amino-crown ether 2 from half-crown 1 [1].

Reagents: a) 2,2'-biphenol,  $K_2CO_3$ ,  $nBuOH$ , 55%; b) aq.  $AcOH$ , >95%; c)  $TrCl$ , pyr., >95%; d)  $Me_2SO_4$ , aq.  $KOH$ , tol., 80%; e)  $TsOH$ ,  $MeOH$ , >95%; f)  $TsCl$ , pyr., 63%; g)  $NaN_3$ ,  $DMF$ , >95%; h)  $LiAlH_4$ ,  $THF$ , ~75%.

The 250 MHz  $^1H$ -NMR spectrum of 2 exhibited two distinct doublets at  $\delta$ -4.6 assigned to H-1 ( $J_{1,2} = 3.5$  Hz) on the anomeric carbone atom. This atropisomeric behavior, which is well recognised for small singly bridged biphenol derivatives [5,6], has never been described so far in macrocycles incorporating a non substituted 2,2'-biphenyl unit.

### 3. Extraction experiments of primary ammonium cations

Liquid-liquid extraction experiments of biogenic amines as guests (L-phenylalanine, tyramine, etc...) by crown ether **2**, as host, were performed at room temperature [2]. For instance, macrocycle **2** was able to extract 2-phenylethylamine hydrochloride, in a ~0.6 guest to host ratio, from LiClO<sub>4</sub> 1M medium into a CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>CN mixture (74:26). As a complete interpretation of the <sup>1</sup>H-NMR spectrum after complexation was not possible, we decided to study the dried isolated complex [2 + 2-phenylethylamine] by MALDI-FTMS. MALDI is a 'soft' ionization technique for introducing very delicate molecules such as macro-molecules into a mass spectrometer without fragmentation [7,8]. Our experiments were performed using a Laser-FTMS microprobe prototype equipped with a 3 T superconducting magnet [9]. For the sample desorption, a Nd-Yag laser (operating at 355 nm with a pulse of 6 ns) was used. Laser light was attenuated by a telescope to obtain an irradiance of 10<sup>6</sup> → 10<sup>7</sup> W/cm<sup>2</sup>. The use of α-cyano-3-hydroxycinnamic acid (instead of 2,5-dihydroxybenzoic acid) as matrix produced a single ion signal assigned to [M + Li]<sup>+</sup> (*m/z* 540, 100%) for the postulated 'complex' [2 + 2-phenylethylamine]:

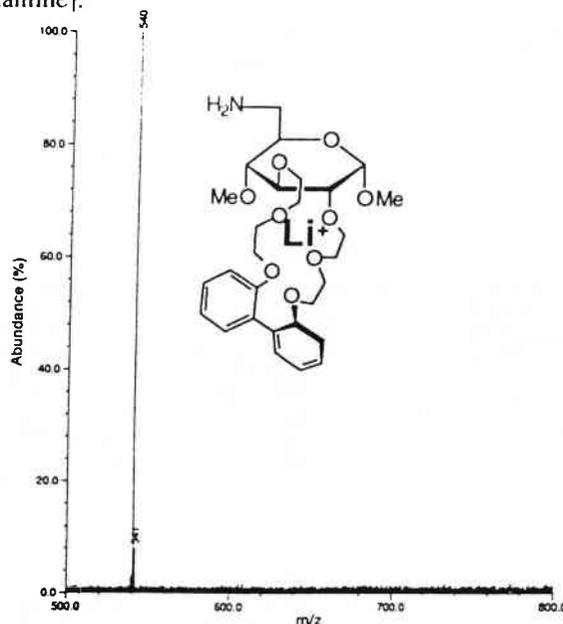


Figure 2. MALDI-FT mass spectrum of the 'complex' [2 + 2-phenylethylamine] ( $10^{-3}$  M) and matrix ( $10^{-1}$  M) in H<sub>2</sub>O/MeOH/CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA (1:1:1:1), irradiance =  $5 \cdot 10^6$  W/cm<sup>2</sup>.

None of these MALDI-FTMS data showed the presence of the complex (*m/z* 655) and of the organic cation (*m/z* 122) previously detected by <sup>1</sup>H NMR. A very close result was observed after the crown ether **2** was mixed with LiClO<sub>4</sub> (1 eq.) in CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>CN (74:26) before the MS analysis. The non detection of the complex (2 + 2-phenylethylamine) was ascribed to higher affinity of the crown ether for Li<sup>+</sup> than for 2-phenylethylamine *in the gas phase*. For that reason, we decided to study by the same method the alkali metal cations affinities of host **2** in the gas phase.

#### 4. Study of alkali metal cation selectivity by means of MALDI-FTMS

An equimolar mixture of five alkali metal cations ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) and a two-fold excess of crown ether 2 were mixed with the matrix and evaporated before the analysis to produce comparable concentrations of 1:1 complexes in the probe [10, 11]. Under these conditions, it can be postulated that the mass spectrum presented below (Fig. 3) depends to the greatest extent on the relative cation affinities in the gas phase and only to a small extent on the ionization potential of the different cations as demonstrated by the right spectrum (Fig. 4):

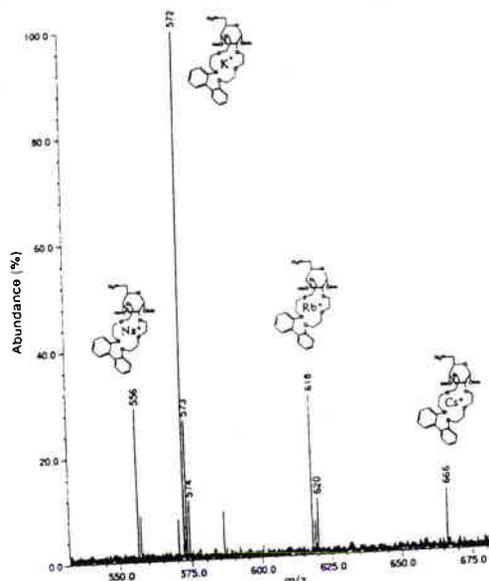


Figure 3. MALDI-FT mass spectrum of an equimolar mixture of  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  ( $10^{-4}$  M), **2** ( $10^{-3}$  M) and matrix ( $10^{-1}$  M).

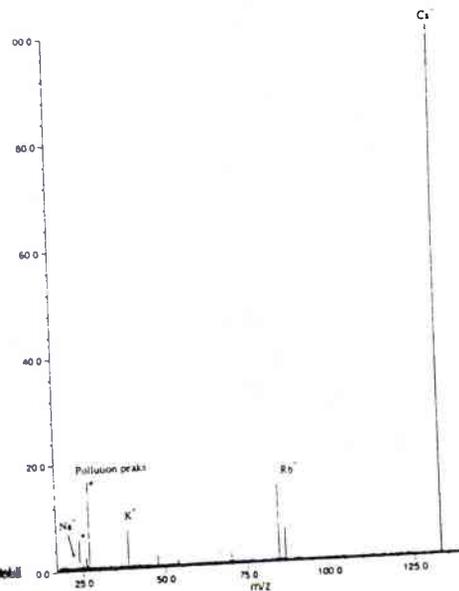


Figure 4. FT mass spectrum of an equimolar mixture of  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{RbCl}$ ,  $\text{CsCl}$ ,  $\text{Li}_3\text{PO}_4$  ( $10^{-4}$  M). Photonic energy at  $355\text{ nm} = 3.49\text{ eV}$ .

Without crown ether, the relative intensities of the peaks depend mainly on the ionization potential of the element:  $\text{Li} = 5.392$ ,  $\text{Na} = 5.139$ ,  $\text{K} = 4.341$ ,  $\text{Rb} = 4.177$ , and  $\text{Cs} = 3.894\text{ eV}$ .

#### 5. Conclusions and perspectives

The marriage of MALDI, as soft ionization method, and FTMS for obtaining high resolution of high-mass MALDI produced ions [12,13], gave us a powerful opportunity to get information on a complex (**2** + 2-phenylethylamine), which has been observed by  $^1\text{H}$  NMR. Although the cation attachment process is still not well defined, some previous results suggested that the mass spectra may reflect the order of the stability observed in solution. The phenylethylammonium-attached molecular ion could not be detected owing to the relative higher affinity of the crown ether for lithium.

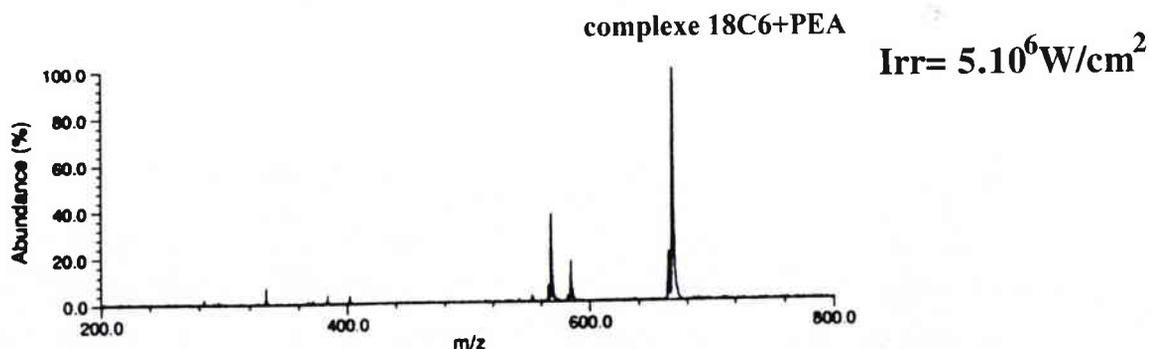
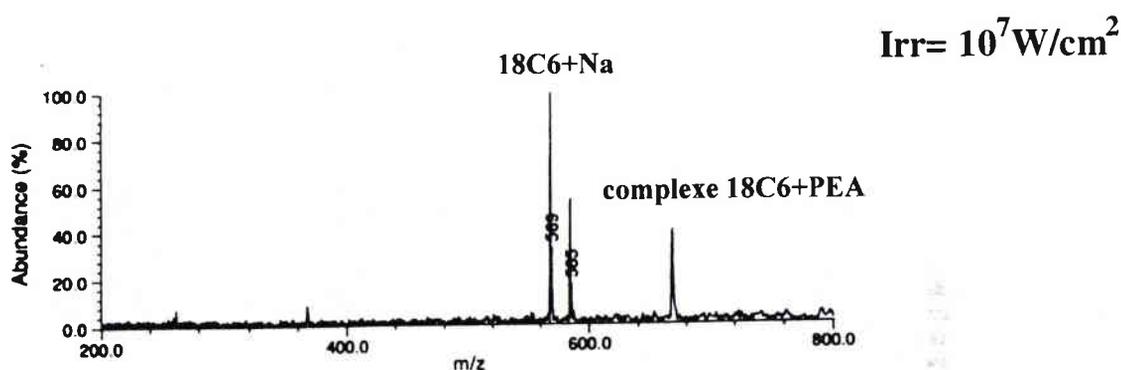
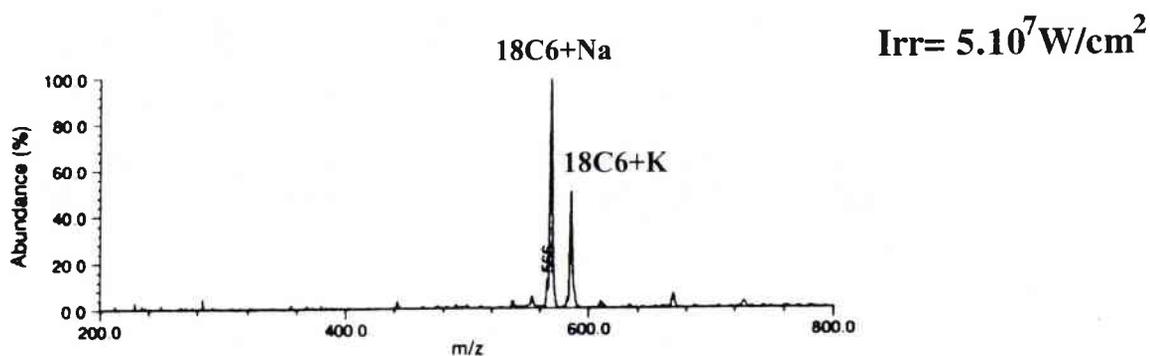
In a competition experiment with 5 alkali metals, the most intense ion signals observed were  $[2 + K]^+$  and  $[2 + Na]^+$  indicating a higher affinity for  $K^+$  and  $Na^+$ , and a lower affinity for  $Rb^+$  and  $Cs^+$  in the gas phase. Similar results have recently been claimed after the study of various 18-C-6 by electrospray-MS [14] and FAB-MS [15]. Furthermore, no protonated molecule of **2**  $[M + H]^+$  could be observed even when the amino-crown ether **2** was treated with an excess of diluted  $HClO_4$  before the analysis. Hence, the cationized molecules formed in high yield by exclusive binding of alkali metal cations seem to undergo the desorption process without significant fragmentation in the MALDI ionization process.

The possible effects of the counteranion and the matrix on the relative selectivity of host **2** and related compounds are currently under investigation.

## 6. References

1. Di Cesare, P. and Gross, B. (1979) Chiral Crown Ether Synthesis by Catalysis in a Two Phase System, *Synthesis*, 458-460.
2. Joly, J.-P., Nazhaoui, M., Dumont, B. (1994) Synthesis and complexation behavior of some crown ethers derived from D-hexopyranosides and D-mannitol towards racemic phenylglycine salts, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **131**, 369-379.
3. Joly, J.-P. and Gross, B. (1989) Synthesis and Immobilization of New Crown Ethers Derived from D-mannitol For the Resolution of Free Amino Acids, *Tetrahedron Lett.* **30**, 4231-4234.
4. Nazhaoui, M., Joly, J.-P., Jean-Claude, B. J., Del Duca, V., Aubry, A. and (in part) Boubouh, M. (1995) *trans*-Fused crown ethers from 2,5-*O*-methylene-D-mannitol: synthesis, X-ray diffraction structure and full nuclear magnetic resonance spectroscopic data of 1,6-diazido-1,6-dideoxy-2,5-*O*-methylene-3,4-*O*-naphthalene-2,3-diylbis(oxyethyleneoxyethylene)-D-mannitol and 3,4-di-*O*-acetyl-1,6-diazido-1,6-dideoxy-2,5-*O*-methylene-D-mannitol, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2919-2926.
5. Mislow, K., Hyden, S. and Schaefer, H. (1963) Stereochemistry of the 1,2,3,4-Dibenzocyclonona-1,3-diene System. A Note on the Racemization Barrier in Bridged Biphenyls, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1449-1455.
6. Kurland, R. J., Rubin, M. B. and Wise, W. B. (1964) Inversion Barrier in Singly Bridged Biphenyls, *J. Chem. Phys.* **40**, 2426-2427.
7. Rosinke, B., Strupat, K., Hillenkamp, F., Rosenbusch, J., Dencher, N., Krüger, U. and Galla, H.-J. (1995) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) of Membrane Proteins and Non-covalent Complexes, *J. of Mass Spectrom.* **30**, 1462-1468.
8. Vincenti, M. (1995) Host-Guest Chemistry in the Mass Spectrometer, *J. of Mass Spectrom.* **30**, 925-939.
9. Muller, J.-F., Pelletier, M., Krier, G., Weil, D., Campana, J. (1989) A New Generation of Microprobe: Laser Ionization and FT/ICR Mass Spectrometry, in P. E. Russel (ed.), *Proceeding of the 24th Conference of the Microbeam Analysis Society-Ashville*, San Francisco Press Inc., pp. 311-316.
10. Dietrich, B., Viout, P. and Lehn, J.-M. (1991) *Aspects de la chimie des composés macrocycliques*, InterEditions/Éditions du CNRS, Paris/Meudon.
11. Giraud, D., Scherrens, I., Lever, M.-L., Laprêvotte, O. and Das, B. C. (1996) Desorption of crown ether-alkali metal ion complexes in liquid secondary ion mass spectrometry (LSIMS), *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 901-905.
12. Castro, J. A., Köster, C. and Wilkins, C. (1992) Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization of High-mass Molecules by Fourier-transform Mass Spectrometry, *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* **6**, 239-241.
13. Sheng, L.-S., Covey, J. E., Shew, S. L., Winger, B. E. and Campana, J. E. (1994) Matrix-assisted Laser Desorption Ionization Fourier-transform Mass Spectrometry, *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* **8**, 498-500.
14. Leize, E., Jaffrezic, A. and Van Dorsselaar, A. (1996) Correlation Between Solvation Energies and Electrospray Mass Spectrometric Response Factors. Study by Electrospray Mass Spectrometry of Supramolecular Complexes in Thermodynamic Equilibrium in Solution, *J. of Mass Spectrom.* **31**, 537-544.
15. Pulpoka, B., Asfari, Z., Vicens, J. (1996) Synthesis of Unsymmetrical Calix[4]arene Cryptand Crown-6 in 1,3-Alternate Conformation, *Tetrahedron Lett.* **37**, 6315-6318.

- B ) Complexe 18C6 + PEA :



$\lambda = 355$  nm

Matrice = acide  $\alpha$ -cyano-3-hydroxycinnamique

Analyte/matrice : 1/100

☞ Cet éther-couronne 18-C-6 substitué, subirait moins de contraintes physiques au niveau de la cavité, facilitant ainsi la complexation de la PEA, H<sup>+</sup>.

# **Caractérisation de colorants naturels du bois de Noyer**

**Collaboration : Institut National de Recherche  
Agronomique de Nancy**

G. Janin

P. Grandieu-Burtin

**Institut National de Recherche  
Agronomique d'Orléans**

C. Jay-Allemand

J-P. Charpentier

Dans le cadre de la thèse de Madame P. Grandieu, nous avons collaboré avec le Dr. G. Janin de l'INRA de Nancy à un programme Européen (W-BRAINS PL96-1887) visant à valoriser le bois de Noyer.

L'un des objectifs de départ était de caractériser des colorants naturels du bois de Noyer extraits par HPLC. Pour cela nous disposions de plusieurs types de colorants (flavonoïdes) : la quercitrine, l'isoquercitrine, la myricitrine, la juglone et l'acide chloro-génique.

Une analyse comparative LDI et MALDI a permis la caractérisation par spectrométrie de masse de ces cinq composés.

La spécificité de la microsonde laser FTMS, permettant de travailler sur des échantillons solides, nous avons pu identifier un fragment caractéristique ( $m/z = 301$ ) d'un des cinq colorants, à partir d'une analyse in situ sur une coupe de bois de Noyer.

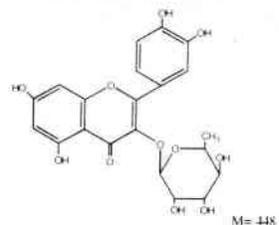
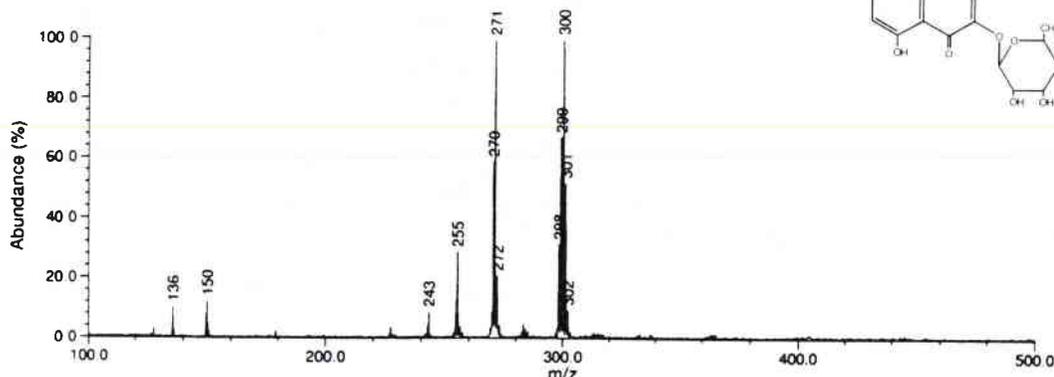
Cette analyse montre que ce colorant pourrait être attribué à l'isoquercitrine. L'intensité du pic fragment suit l'évolution de la coloration du bois de Noyer : très intense dans le bois de cœur, et faible dans la région de l'aubier.

Nous essayons actuellement de mettre au point un protocole d'analyse afin d'utiliser la cellulose du bois comme matrice naturelle pour désorber l'ion moléculaire intact de ce colorant ; ce qui nous permettra de l'identifier avec plus de certitude. Cette analyse sera effectuée à 193 nm, correspondant à une bande d'absorption forte de la cellulose.

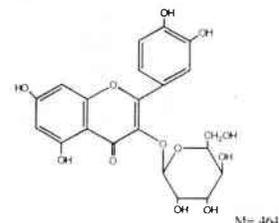
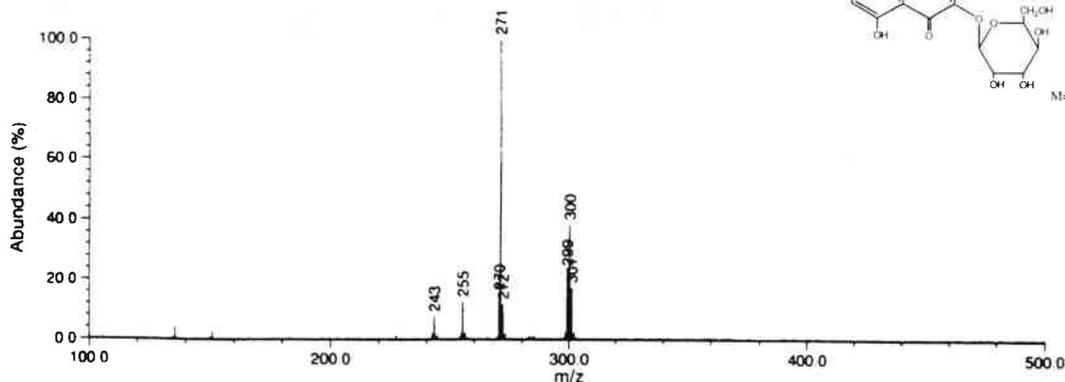
## Désorption Laser par ICR/FTMS

$\lambda = 266 \text{ nm}$       Mode négatif  
 $\text{Irr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$

Quercitrine :



Isoquercitrine :



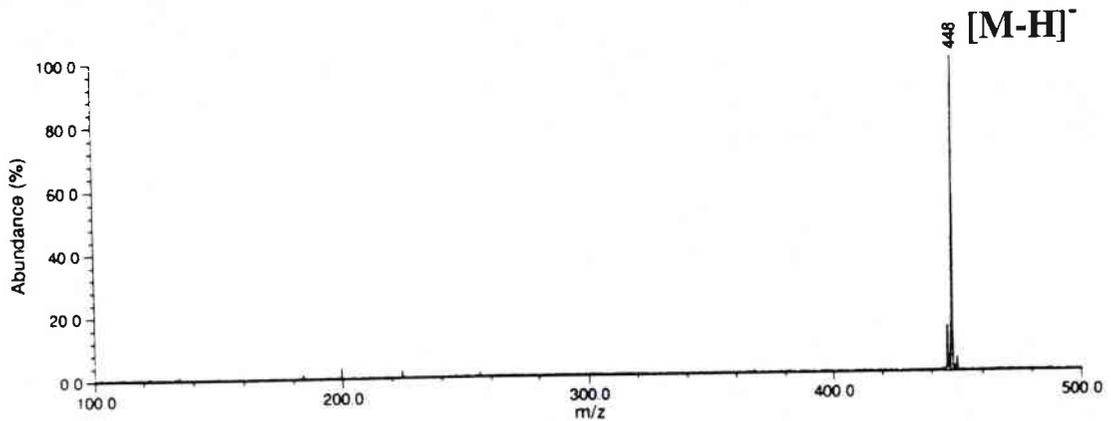
- ☞ La désorption laser permet d'obtenir des informations structurales de colorants naturels du bois de Noyer. Cependant dans ce cas précis, nous ne pouvons pas différencier formellement la quercitrine de l'isoquercitrine.

## MALDI par ICR/FTMS

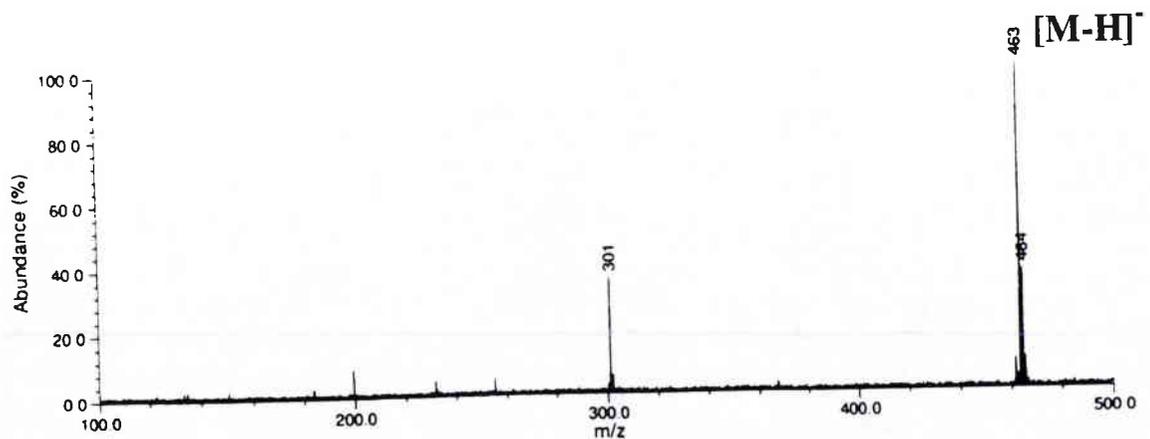
$\lambda = 266 \text{ nm}$       Mode négatif  
 $\text{Irr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$

Matrice : Acide nicotinique

Quercitrine :



Isoquercitrine :

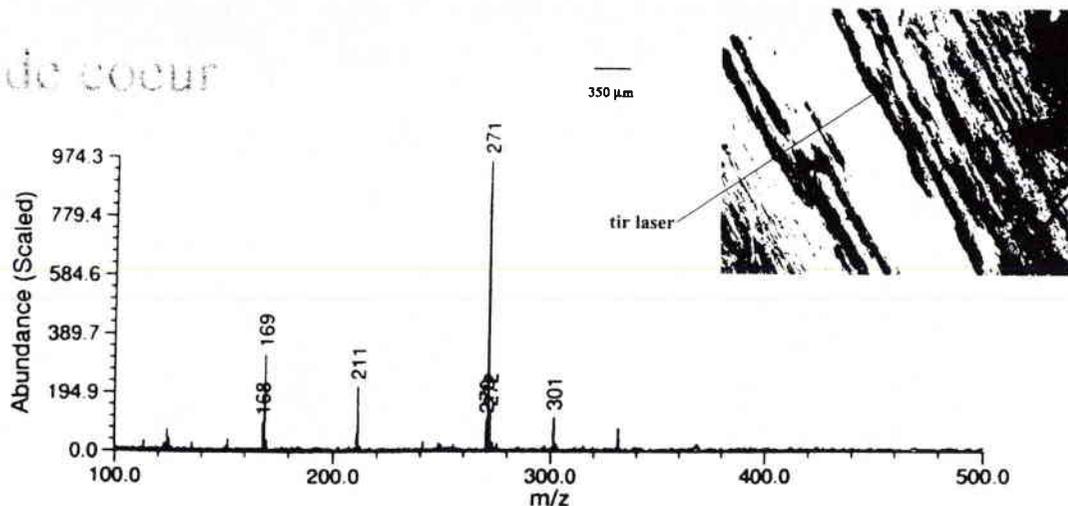


☞ La technique MALDI permet la caractérisation aisée de ces deux colorants naturels du bois de Noyer.

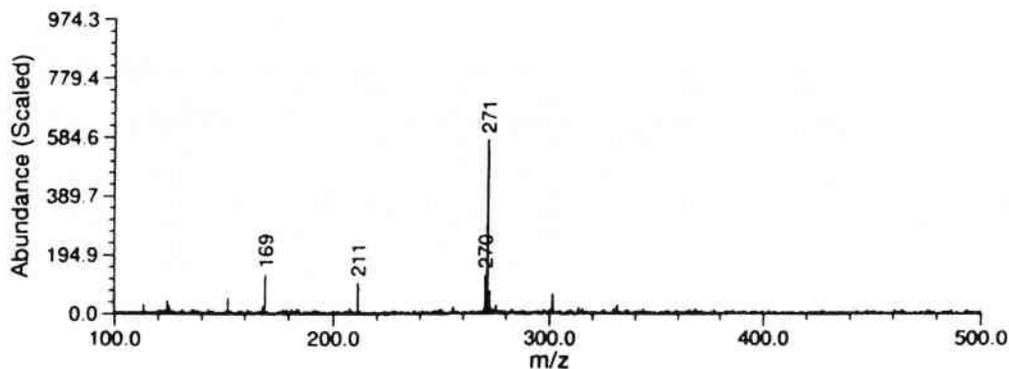
# Analyse in situ d'un bois de Noyer Par Désorption Laser ICR/FTMS

$\lambda = 266 \text{ nm}$       Mode négatif  
 $\text{Irr} = 10^9 \text{ W/cm}^2$

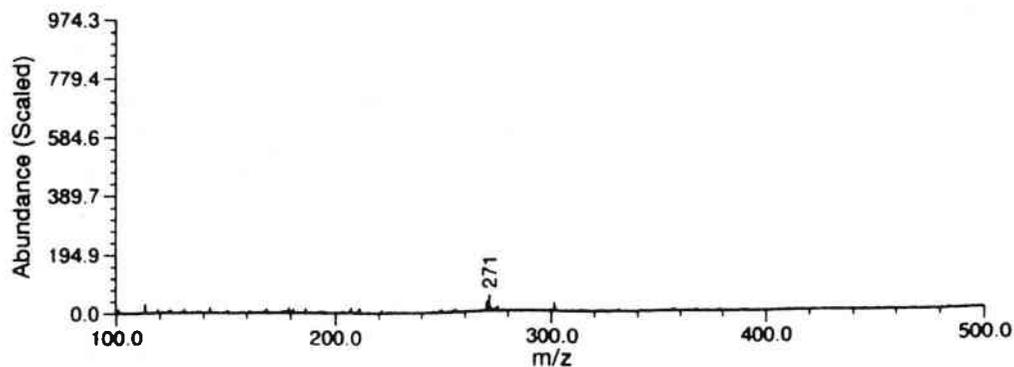
Bois de coeur



Zone intermédiaire



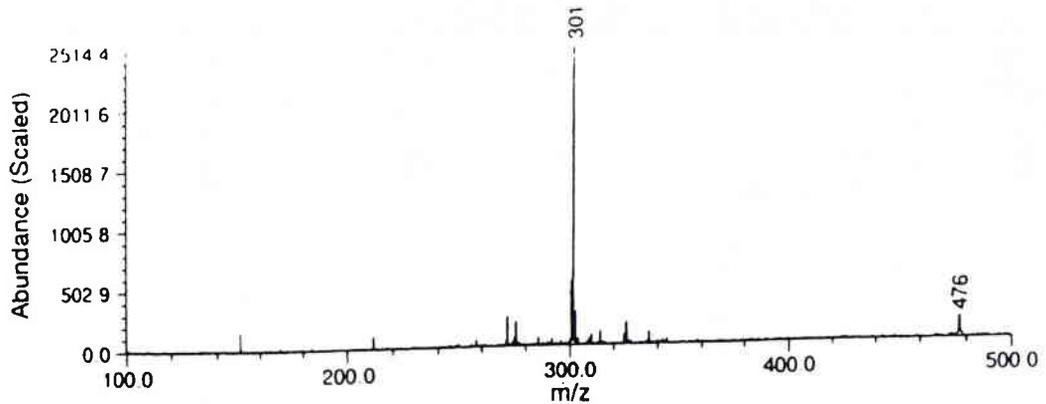
Arbrier



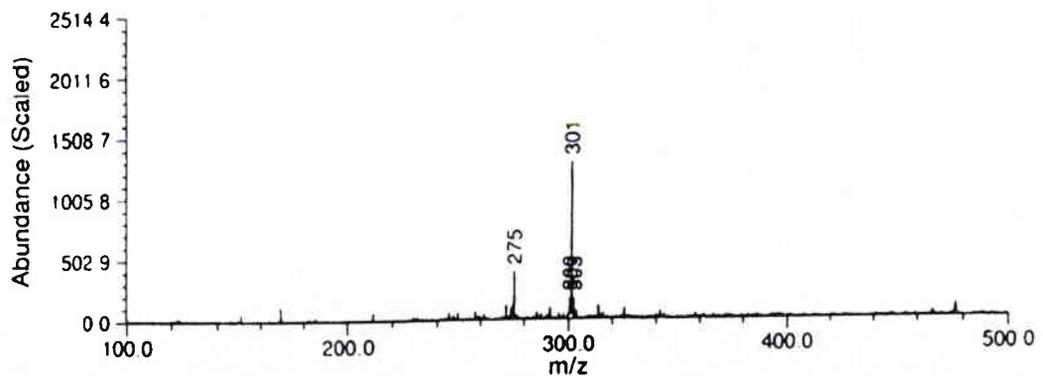
# Analyse in situ d'un bois de Noyer Par Désorption Laser ICR/FTMS

$\lambda = 266 \text{ nm}$       Mode négatif  
 $\text{Irr} = 10^7 \text{ W/cm}^2$

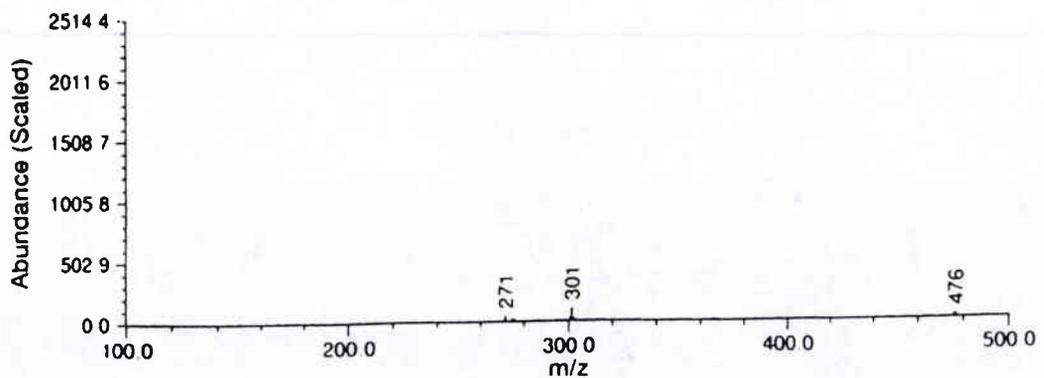
Bois de coeur



Zone intermédiaire



Aubier



## Résumé

De par sa qualité à ioniser sélectivement les molécules sans les détruire, la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) se révèle être un outil analytique indispensable à l'analyse de molécules biologiques. Il n'est de semaine sans publications montrant les capacités potentielles de cette technique révolutionnaire. Cependant, les processus conduisant à la formation des ions sont complexes et ne sont pas encore totalement compris. En dépit de progrès substantiels dans ce domaine ces dernières années, aucune description unifiée de la nature et des caractéristiques du mécanisme MALDI n'a vu le jour. On en est réduit à une approche empirique du phénomène, qui est rendue difficile par l'utilisation d'une grande variété de dispositifs expérimentaux. L'objectif de cette recherche, est une contribution à la compréhension des processus physico-chimiques qui régissent le mécanisme MALDI, par l'utilisation de sondes moléculaires photochromiques. La microsonde laser FTMS mise au point dans notre laboratoire, apparaît être l'outil analytique le plus adapté, car il permet pour chaque longueur d'onde de faire varier la densité de photons sur l'échantillon. L'analyse de composés photochromiques de la série spiro-[indoline-naphtoxazine] par MALDI a révélé simultanément au changement de couleur, que l'ouverture photochimique de tels composés, induit la formation spécifique d'ions pseudo-moléculaires triplement hydrogénés  $[M+3H]^+$ . Un tel comportement à l'ionisation indique clairement la participation d'atomes d'hydrogène lors du processus MALDI. La source d'hydrogène de la matrice acide nicotinique a été déterminée en utilisant l'ester méthylé et la matrice deutérée correspondante. Des différences entre la désorption laser directe (LDI) (détection de l'ion moléculaire,  $M^+$ ) et le processus MALDI sont discutées. L'ensemble de ces résultats expérimentaux, ainsi que les données bibliographiques recueillies dans ce mémoire, ont permis de proposer un mécanisme MALDI plus précis.

**Mots clés :** MALDI, Mécanismes d'ionisation, ICR-FTMS, Photochromisme, Transferts d'atomes d'hydrogène.

## Abstract

In a search for a better understanding of the desorption/ionization process in matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), photochromic systems such as spirooxazines have been studied by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry coupled with a laser interface. These compounds become intensely blue upon exposure to ultraviolet light and return to the original colour if the radiation is stopped. The blue colour is due to the opening of the carbon-oxygen bond, creating a delocalized  $\pi$ -electron photomerocyanine structure which absorbs light in the 500-650 nm range. The spirooxazines appear to be an excellent probe for the study of MALDI processes because the opening of the spiro structure induces the typical formation of the triply hydrogenated molecules  $[M+3H]^+$  simultaneously with the colour change. The source of hydrogen in the matrix has been deduced by using nicotinic acid, methyl nicotinate and deuterated nicotinic acid as matrices. The differences between the direct laser desorption (LDI) (detection of molecular ion,  $M^+$ ) and the MALDI process are discussed. The results suggest that H-atom transfer from matrix molecule to an analyte plays an important role in the ionization step. A more detailed MALDI mechanism is proposed from literature and experimental results.

**Keywords :** MALDI, Ionization mechanisms, ICR-FTMS, Photochromism, H-atom transfers.