

École polytechnique de Louvain

Analyse de tissus d'endomètre par spectrométrie de masse des ions secondaires appliquée à la recherche biomédicale

Auteur: **Victoire STAVAU**

Promoteur: **Arnaud DELCORTE**

Lecteurs: **Patrick HENRIET, Marie-France HERENT**

Année académique 2021–2022

Master [120] : ingénieur civil biomédical

Remerciements

Je tiens à remercier Professeur Arnaud Delcorte pour son encadrement et ses précieux retours durant la durée de cette recherche. Son aide et ses conseils m'ont été précieux durant la réalisation de ce travail.

Un grand merci à l'équipe du C2 pour leur accueil, leur encadrement et la mise à disposition des différents appareils nécessaire aux recherches. Plus particulièrement, je tiens à remercier Thomas Daphnis pour son suivi continu et son soutien sans faille tout au long de cette année. Il m'a été d'une aide précieuse pour diriger mes recherches et surtout pour les nombreuses relectures de ce mémoire et pour sa patience à tout épreuve.

Je voudrais également remercier Patrick Henriet et Marie France Herent d'avoir accepté de participer à ce travail en tant que membre du jury.

Merci à Capucine Couplet pour ses relectures, corrections et aides à la rédaction.

Un tout grand merci à ma famille et mes amis qui m'ont été et soutenu durant tout mon parcours étudiant et plus particulièrement durant cette année. Je voudrais donner un remerciement tout particulier à Noémie Lapraille et Sophie Ledoux pour leurs soutiens et pour avoir réussi à me garder motivée et concentrée tout au long de ce travail, que ce soit dans les bons ou les mauvais moments. Un grand merci à mes parents, mon frère, Zoé Rabaux et Cédric Simon pour m'avoir remonté le moral quand j'en avais besoin.

Finalement, je souhaite remercier tout ceux qui de près ou de loin ont participé à cette recherche.

Résumé

À l'heure actuelle, de nombreuses recherches étudient les maladies liées aux dysfonctionnements du cycle menstruel. En effet, si les chercheurs comprennent ce cycle et ses enjeux, ce n'est pas le cas des maladies qui y sont liées. Celles-ci peuvent avoir un impact direct sur la fertilité féminine, comme l'endométriose. La compréhension complète de ces dérèglements pourraient entraîner la découverte de nouveaux traitements afin de lutter contre ces maladies.

Pour aider à faire avancer le recherche médicale, ce mémoire a pour objectifs de déterminer le taux d'hormones présent dans les tissus utérins ainsi que de déterminer sa composition lipidique. Pour cela, la bonne résolution spatiale et la spécificité du spectromètre de masse des ions secondaires à analyseur à temps de vol (ToF-SIMS) sont utilisées. L'idée est d'observer les hormones jouant un grand rôle dans le cycle utérin, la Progestérone (P_4) et l'Estradiol (E_2) lors de l'analyse des résultats. Cela permettrait alors de comparer les signaux des ions entre différents échantillons correspondant chacun à une phase de préparation de l'utérus ou à une maladie étudiée afin d'identifier un taux anormal d'hormones présent dans le tissu.

Dès lors, différentes étapes sont nécessaires. Premièrement, les hormones ont été étudiées avec pour objectif d'obtenir leur limite de détection afin de savoir si ces hormones seront détectées lors de l'analyse de tissus. Il s'est avéré que la limite de détection des deux hormones est trop élevée pour voir ces hormones au sein du tissu. La recherche s'est alors concentrée sur la détermination de la composition lipidique. Afin d'établir une liste d'identification des ions détectés, des échantillons de tissus utérins sont analysés. Finalement, pour étudier la possible augmentation du rendement ionique, différentes conditions d'analyses sont utilisées. Cela a permis de montrer les effets bénéfiques de deux matrices, l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et d'un faisceau d'ions primaires à base d'agrégats d' Ar_{3000}^+ sur ce rendement ainsi que les avantages d'un substrat conducteur pour l'imagerie 2D.

Table des matières

Remerciements	i
Résumé	iii
Liste des abréviations	vi
Liste des figures	vii
Table des figures	vii
1 Introduction	1
2 État de l’art	3
2.1 Anatomie	3
2.1.1 L’utérus	3
2.1.2 Le cycle menstruel	4
2.2 ToF-SIMS	7
2.2.1 Principe	7
2.2.2 Sources d’ions primaires	10
2.2.3 Types d’analyse	15
2.2.4 Pertinence de son utilisation pour l’imagerie biologique	19
2.2.5 Limites	20
2.3 Objectifs	25
2.4 Méthodologie	26
3 Matériels et méthodes	27
3.1 L’analyse des hormones	27
3.1.1 Produits	27
3.1.2 Substrats	28
3.1.3 Méthode	29
3.1.4 Analyses	31
3.1.5 Traitement de données	32
3.2 L’analyse des tissus utérins	33
3.2.1 Produits	33
3.2.2 Préparation des échantillons	33
3.2.3 Méthode	33
3.2.4 Analyses	35
3.2.5 Traitement de données	36

4	Résultats	38
4.1	Analyse des hormones	38
4.1.1	Ionisations des hormones	38
4.1.2	Calcul de la limite de détection	41
4.1.3	Discussion	46
4.2	Analyses des couches de l'utérus	47
4.3	Optimisation des paramètres d'analyse	52
4.3.1	Les substrats	53
4.3.2	Les faisceaux	55
4.3.3	Les traitements	56
4.3.4	Discussion	61
5	Conclusion	64
6	Perspectives	65
6.1	Analyse des hormones	65
6.2	Analyse des couches de l'utérus	66
6.3	Optimisation des paramètres d'analyse	67
7	Annexe	75
7.1	Annexe liée à la section 3.1	75
7.2	Annexes liées à la section 4.1	76
7.3	Annexes liées à la section 4.2	78

Liste des abréviations

CHCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
CL	<i>Corpus Luteum</i>
CMC	carboxyméthylcellulose
DESI	Désorption-ionisation par électronébulisation
DHB	acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DSC	Dual Source Column
E₂	Estradiol
FSH	hormone folliculo-stimulante
GCIB	faisceau d'ions à cluster de gaz
GnRH	hormone de libération des gonadotrophines
ITO	oxyde d'indium-étain
LH	hormone lutéinisante
LMIG	faisceau d'ions utilisant du métal liquide
LMIS	source d'ions utilisant du métal liquide
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MALDI	Désorption-ionisation laser assistée par matrice
ME-SIMS	spectrométrie de masse des ions secondaires assistée par une matrice
MetA-SIMS	spectrométrie de masse des ions secondaires assistée par un métal
MVA	Analyse Multivariées
OCT	optimum cutting temperature
P₄	Progestérone
PA	Acide phosphatidique
PC	Phosphatidylcholine
PCA	Analyse en composantes principales
PE	Phosphatidyléthanolamine
PGRMC1	composante 1 de la membrane de récepteur de progestérone
PI	Phosphatidylinositol
R²	coefficient de détermination
SM	Sphingomyéline
TFA	acide trifluoroacétique
ToF	temps de vol
ToF-SIMS	spectromètre de masse des ions secondaires avec analyseur à temps de vol

Table des figures

2.1	Anatomie - Appareil reproducteur féminin	3
2.2	Anatomie - utérus	3
2.3	Axe hormonal hypothalamus-ovaires	4
2.4	Cycle menstruel ovarien	5
2.5	Cycle menstruel endométrial	6
2.6	Modèle ToF-SIMS 5 de chez IONTOF	7
2.7	Parties principales du TOF-SIMS 5	7
2.8	Représentation schématique de la cascade de collision	8
2.9	Représentation schématique d'un détecteur à temps de vol	9
2.10	Schéma de dispositifs composant le détecteur	10
2.11	Modélisation des chocs lors de l'impact d'un faisceau d'ions primaires . . .	11
2.12	Modélisation d'un impact de différents faisceaux au sein d'un échantillon .	12
2.13	Schéma des instruments composant le ToF-SIMS 5	12
2.14	Composition du canon à ions métalliques liquides	13
2.15	Composition de la source d'ions à cluster de gaz	14
2.16	Chambre d'injection pour la formation de clusters	15
2.17	Source du faisceau d'ions à cluster de gaz (GCIB) pour la formation d'ions à cluster de gaz	15
2.18	Schéma des différents types d'analyse	16
2.19	Utilisation du compensateur de charge - Flood Gun	16
2.20	Principe de l'extraction retardée	17
2.21	Mode d'imagerie microsonde	17
2.22	Cycle d'un profilage en mode entrelacé	18
2.23	Cycle d'un profilage en mode non-entrelacé	18
2.24	Comparaison des techniques de MALDI et de SIMS	19
2.25	Impact des faisceaux sur la fragmentation	22
2.26	Localisation de la PGRMC1 dans les parois utérines	25
2.27	Localisation de la PGRMC1 dans l'endomètre	25
3.1	Wafers de Silicum.	28
3.2	Technique de l'enduction centrifuge	30
3.3	Porte échantillons "Backmount"	31
3.4	Structure moléculaire du CHCA.	33
3.5	Structure moléculaire du DHB.	33
3.6	Structure moléculaire du TFA.	33
3.7	Matrice Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)	34
3.8	Dispositif de sublimation	34
3.9	Traitement acide trifluoroacétique (TFA)	35

3.10	Porte échantillon de type Topmount.	35
3.11	Porte échantillon pour les transferts	36
3.12	Représentation schématique de l'installation pour un transfert	36
4.1	Structure moléculaire de l'Estradiol (E_2).	38
4.2	Structure moléculaire de la Progestérone (P_4).	38
4.3	Spectres de masse de référence pour l'Estradiol (E_2)	39
4.4	Spectres de masse de référence pour la Progestérone (P_4)	40
4.5	Spectres positifs pour différentes concentrations d'Estradiol (E_2)	41
4.6	Spectres des analyses de profils d'Estradiol	42
4.7	Profil de l'Estradiol au sein d'un échantillon	42
4.8	Spectres positifs des analyses de surface de Progestérone	43
4.9	Spectres négatifs des analyses de spectroscopie de Progestérone	43
4.10	Spectres de masse positifs des analyses de profilage pour la Progestérone (P_4)	44
4.11	Profil positif de la Progestérone au sein d'un échantillon	44
4.12	Graphique pour la limite de détection de la Progestérone (P_4)	45
4.13	Profils positifs anormaux de la Progestérone au sein d'un échantillon	45
4.14	Scores d'une Analyse en composantes principales (PCA) qui différencie les couches utérines en négatif	49
4.15	Loadings d'une Analyse en composantes principales (PCA) sur une analyse de spectroscopie	50
4.16	Images 2D de la répartition tissulaire de molécules de Phosphatidylinositol (PI)	50
4.17	Image 2D de de la répartition tissulaire d'ions reconstituant l'endomètre	51
4.18	Répartition du cholestérol	51
4.19	Répartition d'un Sphingomyéline (SM)	51
4.20	Répartition de l'Asparagine	51
4.21	Image 2D de de la répartition tissulaire de molécules reconstituant le myomètre	51
4.22	Superposition à partir de sommes de répartition	52
4.23	Comparaison entre substrats en verre et en ITO	53
4.24	Comparaison quantitative entre substrats	54
4.25	Imagerie 2D d'échantillons	55
4.26	Comparaison entre faisceaux de Bismuth et d'Argon	55
4.27	Principe de fonctionnement d'une matrice	56
4.28	Comparaison des différents traitements - P	56
4.29	Effet des matrices en positif	57
4.30	Profils positifs suite à l'application de matrices	58
4.31	Comparaison des différents traitements - N	59
4.32	Effet des matrices en négatif	60
4.33	Profils de lipides suite aux dépôts de matrices-N	61
7.1	Spectres des analyses de profils négatifs d'Estradiol	76

Chapitre 1

Introduction

La reproduction est essentielle à la perpétuation de toutes les espèces. En ce sens, la reproduction humaine a fait l'objet de nombreuses études. Nous sommes désormais capables de saisir le fonctionnement du cycle menstruel et ses enjeux. En effet, nous possédons de nombreuses connaissances sur la façon dont le corps des femmes se prépare chaque mois à accueillir un éventuel embryon. C'est l'endomètre, muqueuse interne de l'utérus, qui permet l'implantation d'un œuf fécondé ou, en cas de non-fécondation, qui est alors évacué. Ce long processus est régulé par la variation des concentrations des hormones sexuelles, la Progestérone (P_4) et l'Estradiol (E_2).

Néanmoins, le cycle menstruel ne se déroule pas toujours comme prévu. Certains dysfonctionnements peuvent entraîner des maladies, tels que des saignements utérins intempestifs ou encore l'endométriose, pouvant même aller jusqu'à l'infertilité. Si la reproduction en elle-même est bien connue des chercheurs, ce n'est pas le cas de ces maladies liées au cycle. À l'heure actuelle, la concentration hormonale est mesurée uniquement par prise de sang ou de manière très indirecte en détectant des molécules réagissant avec les hormones. Afin d'identifier les causes de ces défaillances, et ce pour trouver des traitements, il faudrait pouvoir observer les hormones qui influent directement sur le cycle au niveau du tissu. Pour répondre à cela, ce travail a pour objectif d'étudier les compositions hormonale et lipidique des différents tissus utérins. À long terme, cette étude a pour but d'identifier les facteurs et les mécanismes potentiels liés aux dysfonctionnements de l'endomètre.

Afin d'effectuer les différentes mesures utiles au bon déroulement de cette étude, nous utilisons l'analyse spectromètre de masse des ions secondaires avec analyseur à temps de vol (ToF-SIMS). Cette méthode, bien que récemment utilisée dans ce domaine, présente des résultats très prometteurs dans l'analyse de tissus biologiques. Elle permet une bonne résolution latérale des analyses et l'observation d'une large gamme de molécules. De plus, elle donne l'opportunité, lors d'une analyse unique, de récolter à la fois des informations sur les hormones, les lipides et les autres molécules composant le tissu. Néanmoins, elle n'a pas encore été utilisée sur des tissus utérins. C'est pourquoi la première étape de ce travail est d'optimiser les paramètres d'analyse afin de tirer le plus grand profit de cette technique. Cela est assuré par le changement de paramètres et l'utilisation de traitements pour améliorer le rendement des ions analysés.

Dans un premier temps, le chapitre 2 présente la théorie nécessaire à la compréhension de ce mémoire suivi des objectifs et de la méthodologie utilisée. La partie anatomie explique

l'origine et le rôle des hormones sexuelles durant le cycle menstruel. Nous nous attachons tout particulièrement à décrire leur influence sur l'endomètre. Le fonctionnement des différents types d'analyse ToF-SIMS est également présenté, en incluant les avantages et désavantages de la méthode. Ensuite, le chapitre 3 rassemble l'ensemble des informations sur les préparations d'échantillons et les analyses réalisées. Les résultats obtenus sont présentés et discutés au chapitre 4. Finalement, des perspectives ainsi qu'une conclusion clôturent ce travail.

Chapitre 2

État de l'art

2.1 Anatomie

2.1.1 L'utérus

L'utérus est un organe féminin en forme de poire. Sa fonction est de fournir un site approprié pour l'implantation d'un ovule fécondé et un environnement sûr pour le bon développement d'un embryon. Il est relié aux ovaires par les trompes de Fallope, comme illustré à la figure 2.1.

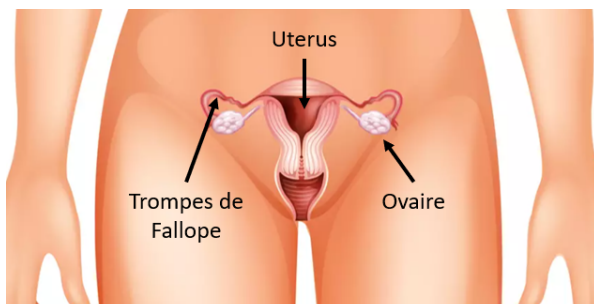


Figure 2.1 – Schéma de l'appareil reproducteur féminin [1].

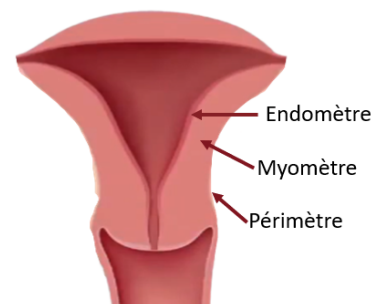


Figure 2.2 – Structure des parois utérines [2].

L'utérus est composé de trois couches de tissus, le périumètre, le myomètre et l'endomètre (Fig. 2.2). Le périumètre est la couche externe qui enveloppe l'utérus. Le myomètre est la paroi musculaire qui permet l'expulsion du fœtus lors de l'accouchement. L'endomètre est la muqueuse interne qui recouvre le myomètre et joue un rôle crucial dans la reproduction [3].

L'endomètre

L'endomètre est un tissu dynamique préparé de manière cyclique durant la vie reproductive de la femme. Il est divisé en deux parties distinctes à savoir la couche basale et la couche fonctionnelle. La couche basale est la partie de l'endomètre en contact avec le myomètre tandis que la couche fonctionnelle est la partie subissant des changements morphologiques majeurs durant la préparation de l'endomètre [4].

Cette préparation consiste en une dégradation suivie d'un épaissement et d'une modification structurelle et a pour but d'assurer l'implantation d'un œuf fécondé. Elle est

régulée par la présence d'hormones sexuelles et est rendue possible grâce à l'ensemble des changements physiologiques survenant au cours du cycle menstruel [5, 6].

2.1.2 Le cycle menstruel

Le cycle menstruel s'étend sur une période d'environ 28 jours et comprend une série d'événements physiologiques se déroulant principalement au niveau de trois organes du corps humain : le cerveau, les ovaires et l'utérus. L'ensemble des événements est expliqué ci-dessous afin de comprendre l'origine des hormones agissant sur l'endomètre.

Dans le cerveau

L'hypothalamus, une structure du système nerveux central, est chargé de faire le lien entre le système nerveux et le système endocrinien. Dans le cas du cycle menstruel, le lien se fait par la production de l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH). Cette neurohormone va alors provoquer la production de deux hormones gonadotropes, à savoir l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Une hormone gonadotrope, par définition, intervient dans le fonctionnement d'un organe génital, également appelé gonade. Ces hormones vont alors atteindre les ovaires via le sang. (Fig. 2.3) [7, 8].

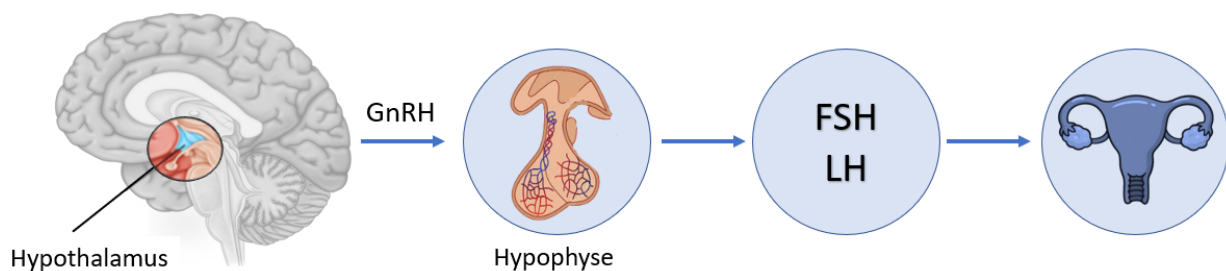


Figure 2.3 – Axe hormonal hypothalamus-ovaires. L'hypothalamus produit des hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) qui va stimuler la production de deux hormones au niveau de l'hypophyse, l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). Ces hormones atteignent les ovaires via la voix sanguine (inspirée de [8]).

Dans les ovaires

Les ovaires, gonades féminines, remplissent à la fois une fonction exocrine et une fonction endocrine. La première consiste à développer les ovocytes stockés en son sein pour mener à l'ovulation. La seconde assure quant à elle l'apport d'hormones sexuelles, à savoir l'E₂ et la P₄, essentielles au développement de l'endomètre. Afin de remplir leurs fonctions, les ovaires travaillent de manière cyclique. En effet, ce cycle, plus communément appelé cycle ovarien, est divisé en deux phases principales séparées par l'ovulation, à savoir les phases folliculaire et lutéale.

Durant la phase folliculaire, une vague d'ovocytes initialement stockés dans les ovaires se développe afin de permettre l'ovulation. Ce phénomène, appelé folliculogenèse, se déroule en plusieurs étapes illustrées à la figure 2.4. Il ne permet qu'à un seul ovocyte d'atteindre l'ovulation. Pour ce faire, les premières étapes, se déroulant indépendamment des FSH

et des LH, consistent au développement des couches cellulaires se trouvant autour de l'ovocyte, les transformant alors en follicules. Suite à ces étapes initiales, les FSH entrent en jeu et permettent la sélection de l'unique follicule qui atteindra l'ovulation. En plus de permettre cette sélection, les FSH provoquent la sécrétion d'E₂ par les cellules se développant autour de l'ovocyte depuis le début de la folliculogénèse. La concentration d'E₂, devenue élevée, inhibe la sécrétion de FSH au niveau de l'hypophyse et au contraire, favorise la sécrétion de LH (voir Figure 2.4). Afin de conclure la phase folliculaire, les LH permettent la fin du développement du follicule sélectionné et provoquent l'ovulation [9, 10].

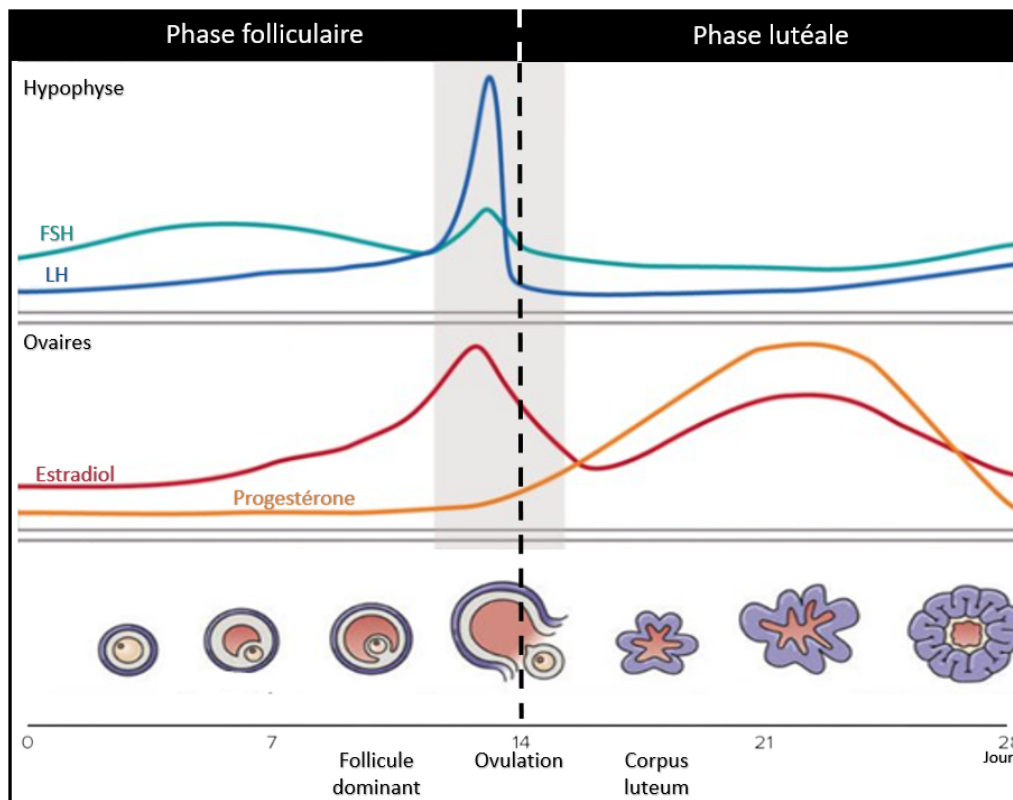


Figure 2.4 – Cycle menstruel ovarien. Ce cycle est divisé en deux phases, les phases folliculaire et lutéale, séparées par l'ovulation. Les courbes bleue et verte représentent les taux sanguins des hormones libérées par l'hypophyse alors que les courbes rouge et jaune représentent ceux de l'Estradiol (E₂) et de la Progestérone (P₄) provenant des ovaires. Ces courbes sont représentées durant un cycle menstruel de 28 jours où l'on peut voir les grandes étapes de la folliculogénèse et du développement du *Corpus Luteum* (CL) de part et d'autre de l'ovulation [11, 12].

On entre alors dans la phase lutéale, seconde phase du cycle ovarien. Lors de l'ovulation, le follicule se sépare en un ovule envoyé au niveau des trompes de Fallope et en un corps jaune également appelé *Corpus Luteum* (CL). Ce corps va subir des transformations qui sont à l'origine des changements physiologiques de cette phase. Tout d'abord, la formation du CL engendre la diminution brusque de la production d'E₂. De plus, il produit de la P₄, hormone essentielle dans le cycle endométrial comme mentionné dans la section 2.1.2. Cette hormone va également agir au niveau de l'hypothalamus en inhibant la production de GnRH. Finalement, si le CL ne reçoit pas de signal d'une éventuelle fertilisation, il se désagrège provoquant la diminution de P₄. Ces variations de concentrations sont représentées à la figure 2.4 [12].

Dans l'endomètre

Le cycle endométrial se déroule en parallèle du cycle ovarien. En effet, sous l'effet des hormones sexuelles produites dans les ovaires, les parois utérines se préparent à assurer l'implantation d'un ovule fécondé. Lorsqu'aucune fécondation n'est observée, ce cycle est séparé en trois phases importantes, à savoir les phases menstruelle, proliférative et sécrétoire (Fig.2.5) [12].

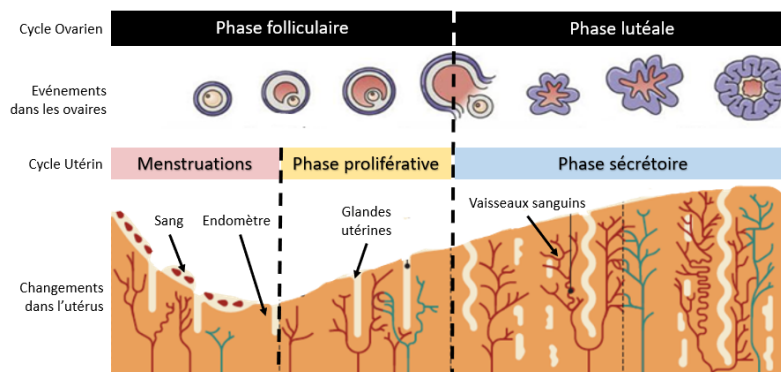


Figure 2.5 – Cycle menstruel endométrial. Ce cycle est scindé en trois phases, les phases de menstruation, proliférative et sécrétoire. Les deux premières se déroulent durant la phase folliculaire du cycle ovarien et correspondent aux menstruations suivies d'un important épaissement de l'endomètre sous l'action d'Estradiol (E_2). La dernière phase est caractérisée par le développement des capacités sécrétoires des glandes présentes dans l'endomètres sous l'action de Progestérone (P_4) [12, 13].

La phase menstruelle, première phase du cycle, dure en moyenne quatre jours et correspond aux menstruations. Cette phase est enclenchée par la diminution de sécrétion d'hormones sexuelles (P_4 et E_2) qui survient à la fin de la phase lutéale du cycle ovarien (voir section *"Dans les ovaires"*). En effet, cette diminution provoque l'inflammation de l'endomètre et la dégradation de sa vascularisation qui mènent à la désintégration de l'endomètre. Les règles correspondent à l'évacuation des résidus de cette désintégration. Finalement, il ne reste qu'une fine couche de cellules stromales correspondant au basalis pour entamer la seconde phase du cycle endométrial [12, 14].

Durant la dizaine de jours composant la phase proliférative, les cellules du basalis prolifèrent et se différencient sous l'action de l' E_2 sécrété par les ovaires. Au bout de cette prolifération, l'endomètre présente un épaissement d'environ 4,5 mm. De plus, l' E_2 permet la synthèse de facteurs de croissances et des récepteurs de P_4 . La fin de cette phase est marquée par la chute d' E_2 au moment de l'ovulation [12].

Finalement, l'endomètre entre dans la troisième phase de son cycle, la phase sécrétoire. Celle-ci est caractérisée par l'arrivée de la P_4 dans l'utérus qui se fixe aux récepteurs formés lors de la phase précédente. Sous l'action de cette hormone, non seulement la capacité sécrétoire de ses différentes glandes mais aussi sa vascularisation augmentent. On observe également un épaissement d'1 mm. En définitif, l'ensemble des cellules de l'endomètre sont prêtes à une éventuelle implantation [12].

2.2 ToF-SIMS

Le ToF-SIMS est une méthode d'analyse de surface. Cette technique a été développée dans les années 1960 grâce aux différents travaux d'Alfred Benninghoven et de son équipe. Depuis, le ToF-SIMS a connu de nombreuses améliorations qui lui ont permis d'acquérir une réelle importance dans l'analyse des matériaux semi-conducteurs pour y détecter des traces de métal, y faire du profilage à très faible profondeur, en étudier la structure chimique, etc. [15, 16]

Aujourd'hui, il montre de bons résultats dans l'analyse de tissus organiques. Néanmoins, des améliorations, comme l'optimisation des paramètres d'analyse, demeurent encore nécessaires pour éliminer les problèmes de sensibilité et pouvoir l'utiliser dans le domaine de la recherche sur tissus biologiques [17, 18, 19]. Cette partie sera développée plus en détail en fin de section.

Lors d'une analyse ToF-SIMS, l'échantillon étudié est bombardé par un faisceau ionique provenant d'un des canons présents sur l'appareil. Cela entraîne l'éjection de particules dont la partie ionisée entre dans l'analyseur temps de vol (ToF). Ce dernier permet leur arrivée successive en fonction de leur masse, les plus légères arrivant en premier sur le détecteur grâce auquel un spectre de masse est finalement obtenu. Le modèle du ToF-SIMS utilisé dans le cadre de ce mémoire ainsi que certaines de ses composantes principales sont représentés aux figures 2.6 et 2.7 respectivement.



Figure 2.6 – Modèle ToF-SIMS 5 de chez IONTOF utilisé dans le cadre de ce mémoire [20].

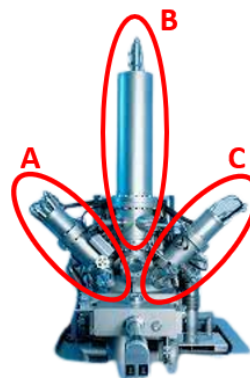


Figure 2.7 – Parties principales du TOF-SIMS 5. (A) et (C) sont des sources de faisceaux d'ions primaires (B) est l'analyseur à temps de vol (ToF) [20].

2.2.1 Principe

Lors d'une analyse, un faisceau d'ions primaires bombarde un échantillon solide. Au début de l'utilisation de cette méthode, ce faisceau doté d'une énergie allant de 1 à 25 keV était composé d'ions atomiques (He^+ , Ar^+ et Xe^+ par exemple). Lorsque ce faisceau rencontre l'échantillon, son énergie est transmise aux atomes composant l'échantillon en créant une cascade de collisions comme illustré sur la figure 2.8. Ensuite, certaines collisions retournent à la surface et provoquent la désorption des couches du matériau. La plupart des fragments de molécules émis, environ 99%, sont neutres. Cependant, une petite partie est ionisée et chargée positivement ou négativement. Ces particules sont appelées ions secondaires en

opposition aux ions primaires composant le faisceau initial. La profondeur d'origine exacte des ions secondaires dépend du faisceau primaire utilisé et donc de l'énergie du faisceau. Néanmoins, quel que soit le type de faisceau, ceux-ci proviennent des couches supérieures de l'échantillon (entre 1 et 5 nm) [21, 16, 22, 23].

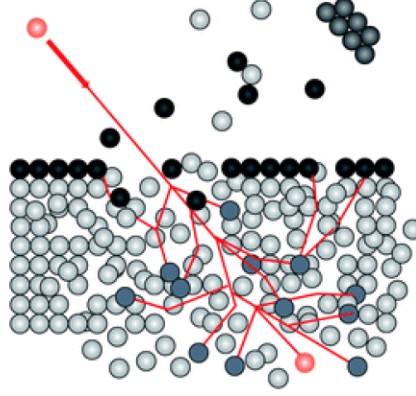


Figure 2.8 – Représentation schématique de la cascade de collisions et de la pulvérisation d'ions secondaires qui en découle suite à l'impact d'un faisceau d'ions primaires monoatomiques [21].

Lorsque la fluence d'ions primaires qui entre en contact avec l'échantillon est inférieure à $10^{13} \text{ ions/cm}^2$, l'analyse est dite "statique". Ce mode d'analyse permet d'éviter la destruction de l'échantillon. En effet, avec cette dose, moins de 1% des atomes de la couche supérieure sont affectés. La probabilité d'impacter deux fois le même atome est donc extrêmement faible [16].

Une fois que les ions secondaires sont éjectés de la surface, ils sont extraits par l'analyseur à Temps de Vol (ToF). Lors de leur éjection, les anions, en mode négatif, ou les cations, en mode positif, sont accélérés par un champ électrique respectivement positif ou négatif généré grâce à une différence de potentiel (ΔV). Il en résulte que l'énergie cinétique qui leur est fournie est la même pour tous les ions entrant dans l'analyseur. Lors de la suite de leur parcours, la vitesse des particules dépendant de $\sqrt{\frac{m}{z}}$ avec m leur masse molaire et z leur charge formelle, celles-ci sont alors séparées. De plus, la plupart des particules chargées ne portent qu'une seule charge ($z = 1$), elles sont donc différenciées en fonction de leur masse molaire. Le temps de vol, t , est ensuite calculé selon l'équation 2.1 avec D la distance parcourue, v la vitesse de l'ion et e la charge électrique d'un électron ($1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$) [21, 24].

$$t = \frac{D}{v} = D \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \quad (2.1)$$

Néanmoins, avant leur accélération dans l'analyseur, les ions sont déjà munis d'une certaine vitesse et possèdent donc une certaine énergie cinétique. Les énergies cinétiques finales de particules de même masse ne sont donc pas forcément égales. Par conséquent, pour augmenter la précision en masse, l'analyseur dispose d'un miroir ionique, appelé réflectron. Celui-ci permet de refocaliser temporellement les ions secondaires de même rapport $\frac{m}{z}$

afin qu'ils puissent arriver en même temps au niveau du détecteur. Pour cela, le miroir ionique est composé de plusieurs électrodes avec un potentiel croissant. Lorsque deux ions de même masse arrivent au niveau du réflectron, celui qui a l'énergie cinétique initiale la plus élevée pénétrera plus profondément dans le dispositif avant de faire demi-tour. Par conséquent, il réalise un trajet légèrement plus long, comme le montre la figure 2.9 [21, 24].

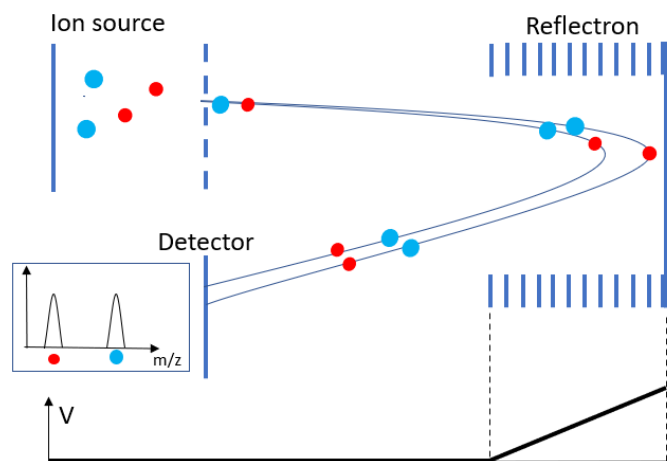


Figure 2.9 – Représentation schématique d'un détecteur à temps de vol. Les particules bleues représentent des particules de masse plus élevée que les particules rouges. Les particules ayant une énergie cinétique initiale plus élevée que des particules ayant la même masse font un plus long chemin grâce au réflectron pour arriver en même temps au niveau du détecteur (inspiré de [24]).

Finalement, les ions arrivent au niveau du détecteur. Celui-ci est composé de différents dispositifs permettant de convertir le signal de quelques ions en courant. Pour cela, chaque impact d'ion sur le détecteur génère la création d'un ou de plusieurs électrons qui sont ensuite multipliés grâce à une cascade d'impacts électroniques. À cette étape, le signal est amplifié d'un facteur 10^3 . Ensuite, le grand nombre d'électrons est traduit en photons via un scintillateur (voir figure 2.10). Ce signal lumineux ainsi obtenu atteint le dernier dispositif d'amplification de signal également illustré à la figure 2.10, le photomultiplicateur. Celui-ci a pour but de retraduire le signal lumineux en électrons tout en multipliant ce nombre d'électrons. Finalement, un convertisseur temps-numérique (TDC) est utilisé pour déterminer la durée entre deux impulsions de signal. Grâce à cet ensemble de dispositifs et à des traitements de signaux tels qu'une transformée de Fourier, un spectre de masse est obtenu [25, 26].

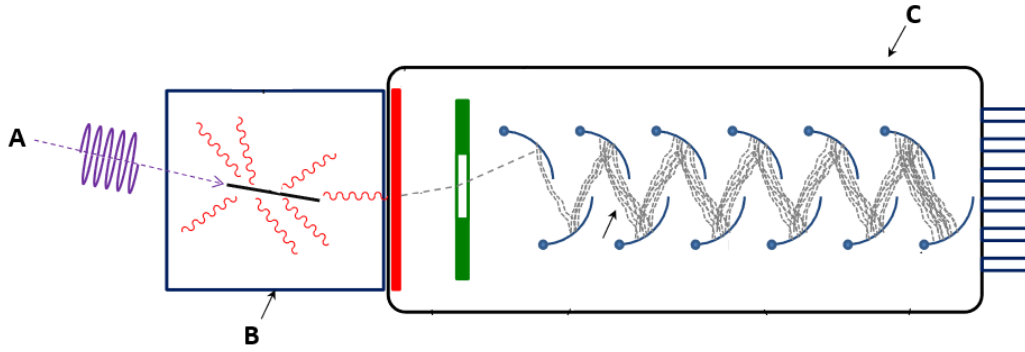


Figure 2.10 – Schéma de dispositifs composant le détecteur. (A) représente l'arrivée des nombreux électrons provenant du premier dispositif d'amplification. (B) est le scintillateur qui a pour but de transformer les électrons en photons. (C) est le photomultiplicateur qui permet la transformation du signal lumineux en électrons et l'amplification du signal [27].

Comme mentionné ci-dessus, au bout du parcours de ces ions, un spectre dans lequel chaque pic correspond à une ou des particules de même masse est obtenu. L'intensité du pic correspondant à une masse m (I_m) obtenu avec un faisceau d'ions atomiques primaires p est donnée de manière simplifiée par l'équation suivante (Eq. 2.2) :

$$I_m = I_p y_m \alpha^+ \theta_m \eta \quad (2.2)$$

où I_p est le flux de la particule primaire, y_m est le rendement de pulvérisation (le nombre de particules m pulvérisées, neutres et ioniques, par impact du faisceau primaire), α^+ est la probabilité d'ionisation en fonction de la chimie de la particule et de la matrice utilisée, σ_m est la concentration des particules m dans l'échantillon et η est le facteur de transmission du système analytique (la proportion de particules arrivant jusqu'au détecteur) [16].

Les deux paramètres les plus importants sont le rendement de pulvérisation y_m et la probabilité d'ionisation α^+ .

y_m est principalement déterminé par les propriétés du faisceau d'ions primaires, à savoir le flux primaire, la masse, la charge et l'énergie (rendement maximum entre 5 et 50 keV) des ions primaires (voir section 2.2.2) et par l'angle d'incidence du faisceau (rendement maximum avec un angle entre 60 et 80°). Un rendement maximum permet une meilleure intensité du pic et donc une meilleure détection des particules. C'est pourquoi les différentes sources d'ions primaires seront présentées à la section 2.2.2.

α^+ dépend fortement de l'état chimique de l'échantillon. En effet, il existe différents mécanismes d'ionisation qui dépendent des conditions d'analyse. *Vickerman* illustre cette dépendance de l'état chimique en comparant le rendement de pulvérisation des espèces M^+ provenant d'un matériau métallique avec celui provenant d'un matériau d'oxyde métallique correspondant. L'environnement électronique, c'est à dire la disposition des électrons autour des noyaux, des molécules étant très distinct, les espèces M^+ provenant de matériaux d'oxyde métallique sont plus facilement ionisées et donc leur signal plus intense malgré une concentration moindre [16, 24].

2.2.2 Sources d'ions primaires

Dans les débuts de l'utilisation du ToF-SIMS, le faisceau d'ions primaire était constitué d'ions monoatomiques (He^+ , Ar^+ et Xe^+). Néanmoins, cette composition du faisceau a

rapidement montré ses limites. En effet, on observait une grande destruction des échantillons. C'est pourquoi, à partir des années 1970, des nouvelles sources d'ions atomiques (Cs^+) mais surtout des sources polyatomiques ont été développées (O_2^+ , Bi_n^+). La moindre destruction et le meilleur rendement d'éjection avec les sources à métal liquide (source d'ions utilisant du métal liquide (LMIS)), en particulier avec le Bismuth (Bi_3^+ , Bi_5^+), permettent l'observation de meilleurs résultats dans l'analyse de matériaux. Depuis une dizaine d'années, afin d'améliorer de nouveau le rendement et le niveau de destruction et donc les résultats d'analyse, des agrégats (clusters) d'atomes comme l'Argon (Ar_n^+) sont utilisés comme ions primaires [24, 25, 23].

L'ensemble des progrès réalisés sur les faisceaux d'ions primaires a pour but d'améliorer le rendement et l'ionisation afin d'observer à la fois de nouveaux pics, et de déterminer de manière plus précise l'origine des particules (résolution latérale). En effet, la dépendance des propriétés d'analyse et surtout la dépendance des deux paramètres cités sont mentionnées dans la section 2.2.1. Le principal changement observé au cours du temps est la taille et la nature des ions. Cela est expliqué par le fait que, lorsque le faisceau est composé d'ions polyatomiques, on observe une fragmentation de ces ions primaires au moment de l'impact avec l'échantillon. Il en résulte un changement de mécanisme d'éjection qui n'est alors plus équivalent à une cascade de collisions mais plutôt à une onde de choc. En effet, les composants du cluster avant de frapper l'échantillon ne possèdent qu'une partie de l'énergie totale égale à

$$E_c = E_0 \left(\frac{M_c}{M_t} \right) [eV] \quad (2.3)$$

avec E_0 l'énergie du cluster, M_c la masse du constituant c , M_t la masse totale de l'ion polyatomique. La division de l'énergie entre les constituants du cluster entraîne alors la diminution de pénétration des ions dans l'échantillon, la diminution de fragmentation des particules éjectées et donc l'augmentation du rendement à haute masse des ions secondaires (voir figure 2.11) [28] .

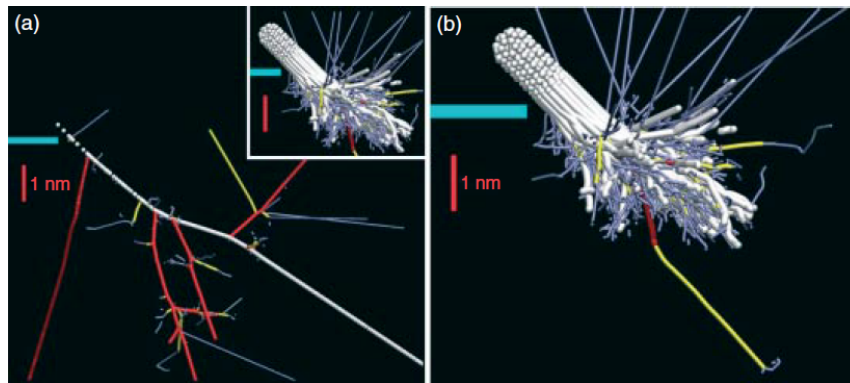


Figure 2.11 – Modélisation des chocs lors de l'impact d'un faisceau d'ions primaires (a) monoatomiques (b) sous forme de cluster [29].

La diminution de pénétration en profondeur engendre des dégâts sur une surface plus grande mais limite cette zone aux couches supérieures. Cela est illustré sur la figure 2.12 et rend possible l'analyse en profondeur d'un échantillon (voir section 2.2.3).

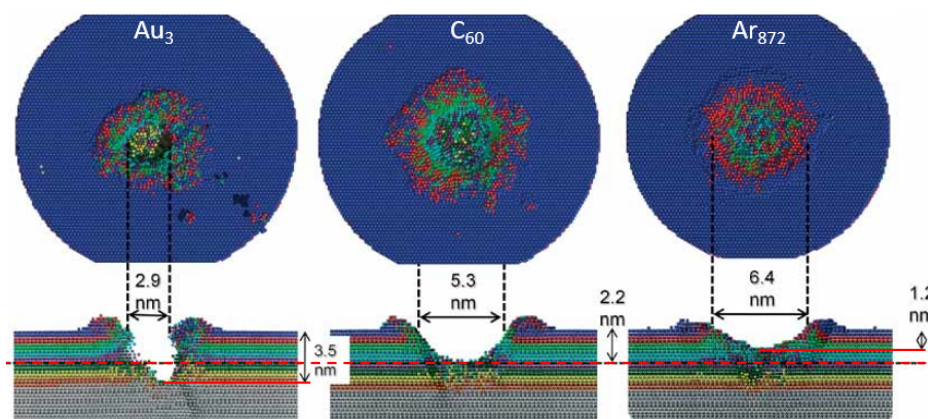
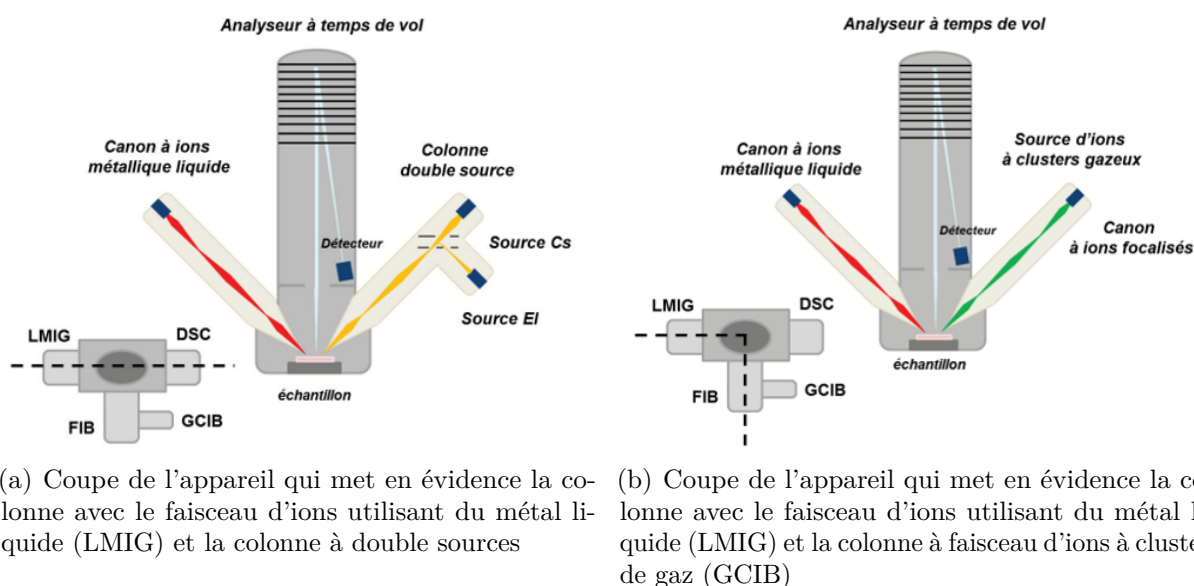


Figure 2.12 – Modélisation d'un impact de faisceaux d' Au_3^+ , de C_{60}^+ et d' Ar_{872}^+ au sein d'un échantillon d'Argent. Le cluster d'Argon forme un large cratère (voir vue du dessus) mais peu profond (voir vue du dessous). Les couleurs permettent de déterminer la profondeur d'origine des atomes [30].

Aujourd'hui, l'instrument utilisé lors de nos analyses, comme l'illustre la figure 2.13, est donc pourvu de trois canons ioniques. Ces canons sont utilisés soit individuellement soit en association afin d'analyser et/ou de pulvériser des surfaces dans les meilleures conditions possibles en fonction du type d'analyse effectué (voir section 2.2.3) [25].



(a) Coupe de l'appareil qui met en évidence la colonne avec le faisceau d'ions utilisant du métal liquide (LMIG) et la colonne à double sources

(b) Coupe de l'appareil qui met en évidence la colonne avec le faisceau d'ions utilisant du métal liquide (LMIG) et la colonne à faisceau d'ions à cluster de gaz (GCIB)

Figure 2.13 – Schéma des instruments composant le ToF-SIMS 5 selon 2 vues différentes [25].

Canon à ions utilisant du métal liquide

Le canon principal pour nos analyses, représenté en rouge sur la figure 2.13, est le canon à ions métalliques liquides (faisceau d'ions utilisant du métal liquide (LMIG)). Cette source est très souvent utilisée. Afin de fournir des faisceaux d'ions atomiques ou polyatomiques, le canon est composé de différentes parties reprises sur la figure 2.14.

La première étape consiste à chauffer, au moyen d'une alimentation haute tension, la réserve de métal, dans notre cas de Bismuth, afin de la rendre liquide. Ensuite, les ions sont éjectés

grâce à un champ électrique créé entre la source et l'électrode d'extraction. Néanmoins, à cette étape, le faisceau est composé d'agrégats de toutes tailles. C'est pourquoi différents filtres sont utilisés afin de fournir un faisceau composé d'un seul type d'ions primaires, à savoir le pré-hacheur et le hacheur. De plus, afin d'assurer une bonne résolution en masse, la durée d'impulsion du faisceau doit être courte (de l'ordre de la nanoseconde). En effet, le ToF-SIMS se basant sur la mesure du temps que prend un ion pour parcourir une distance D (voir section 2.2.1, Eq. 2.1), il est primordial de définir le temps zéro. C'est pourquoi le groupeur permet le regroupement des agrégats à l'aide de champs électrostatiques variables afin que l'ensemble soit accéléré en même temps. On parle alors de faisceau pulsé. Celui-ci frappe l'échantillon durant un court laps de temps. Néanmoins, cette courte durée engendre une réduction du courant d'ions primaires et donc une augmentation du temps d'acquisition.

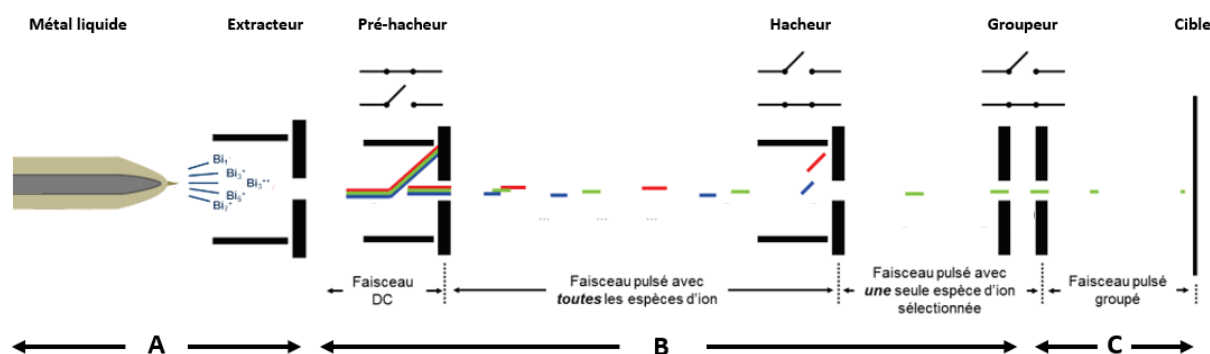


Figure 2.14 – Composition du canon à ions métalliques liquides. (A) Réserve de métal allant être chauffée afin de la rendre liquide et électrode permettant l'extraction des ions métalliques. (B) Filtres procurant la composition souhaitée au faisceau, le pré-hacheur et le hacheur. (C) Groupeur, dispositif permettant d'accélérer les ions polyatomiques en même temps pour obtenir un faisceau pulsé [25].

Cette source donne une très bonne focalisation (de l'ordre de 100 nm) et permet d'augmenter le nombre d'ions secondaires produits. Par ailleurs, le LMIG permet de fournir des faisceaux d'ions polyatomiques dont le nombre d'atomes les composant est très limité (2 à 5 atomes). Par conséquent, ces ions vont, en plus de frapper les couches supérieures de l'échantillon, endommager les couches plus profondes. C'est pourquoi, afin de limiter la destruction de l'échantillon, la dose envoyée ne doit pas excéder la limite statique. Cette limitation est surmontée par un autre type de source utilisée, à savoir les sources d'ions à agrégats d'Argon qui seront détaillées dans la section suivante [25].

Sources de la double colonne

La deuxième colonne composant le *ToF-SIMS V* est la Dual Source Column (DSC) représentée en jaune dans la figure 2.13(a). Celle-ci est composée, comme son nom l'indique, de deux sources qui peuvent être utilisées simultanément afin de co-pulvériser l'échantillon. Elle produit des ions de Césium et de Xenon. Cette colonne n'étant pas utilisée dans le cadre de ce mémoire, l'explication de son fonctionnement n'y sera pas décrite [25].

Sources d'ions à cluster de gaz

La dernière colonne est une source d'ions à clusters de gaz (faisceau d'ions à cluster de gaz (GCIB)). Cette source peut être utilisée à la fois seule en vue d'acquérir des spectres ou de transférer des molécules (voir sections 2.2.3 et 3.2.4) et en mode "dual beam" pour pulvériser l'échantillon accompagné d'une seconde source permettant l'analyse à haute résolution latérale.

La conception et la sélection des clusters nécessitent un long parcours qu'il est possible de séparer en trois étapes. Chaque action se déroule dans un lieu distinct. Le système est donc composé de trois parties illustrées par la figure 2.15, la chambre d'injection, la source du GCIB et la colonne du GCIB [25, 23].

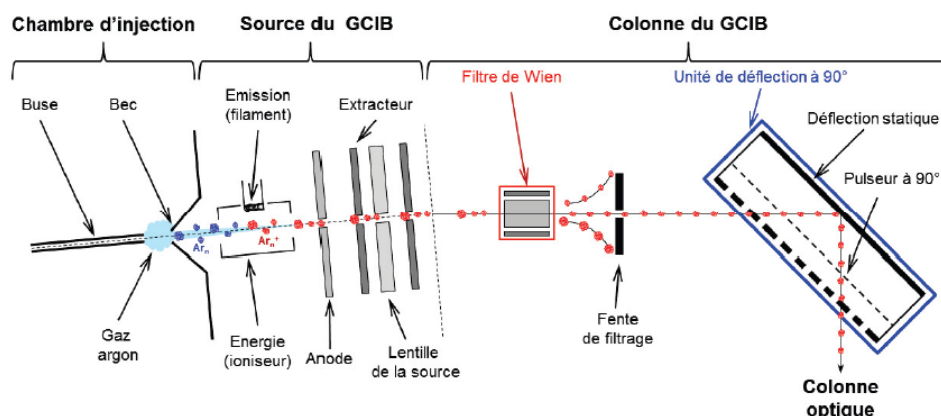


Figure 2.15 – Composition de la source d'ions à cluster de gaz. Elle est composée de 3 parties : la chambre d'injection où les clusters sont formés et déjà présélectionnés, la source du GCIB où les clusters sont ionisés et la colonne du GCIB où les ions sont filtrés en fonction de leur taille et groupés afin de créer un faisceau pulsé [25].

La chambre d'injection est le lieu où les clusters sont formés grâce à la détente du gaz initialement à haute pression (30 bar). Cette détente se déroule de manière adiabatique dans un espace sous vide (10^{-3} mbar). Le grand changement de pression provoque un refroidissement rapide des atomes d'Argon accompagné de leur condensation. Ensuite, une présélection des clusters est faite selon leur axe de déplacement. Ces étapes sont représentées à la figure 2.16 [25, 23, 31].

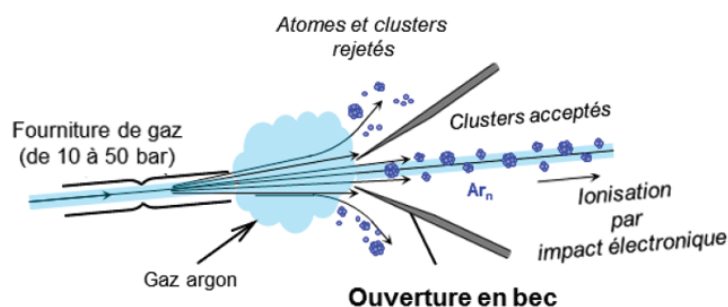


Figure 2.16 – Chambre d'injection pour la formation de clusters. Les clusters y sont formés par la détente adiabatique d'un gaz dans une chambre sous vide qui provoque le refroidissement rapide et donc la condensation des atomes de ce gaz. Ensuite, les clusters y sont présélectionnés selon leur axe de déplacement [25].

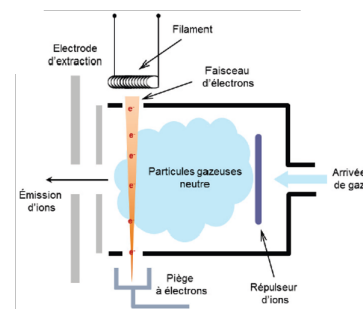


Figure 2.17 – Source du GCIB pour la formation d'ions à cluster de gaz. Les clusters y sont ionisés grâce à la technique d'impact électronique. Cette technique consiste à envoyer des électrons accélérés sur les clusters afin d'y éjecter des électrons et dès lors créer des ions [25].

Les clusters restants atteignent la partie "source du GCIB" qui génère les ions par impact électronique. Cette technique consiste à envoyer des électrons accélérés par un système filament-piège à électrons sur les clusters (voir figure 2.17). Les impacts provoquent, par conséquent, l'éjection d'électrons produisant alors des ions [25, 23].

Ensuite, les ions de clusters d'Argon entrent dans la partie "colonne du GCIB". A cette étape, le faisceau est composé de clusters de nombreuses tailles différentes. Pour ne sélectionner qu'un éventail de tailles nécessaires à l'analyse, le faisceau passe par le filtre de Wien (figure 2.15). Ce filtre permet de préserver les clusters de rapport $\frac{m}{z}$ acceptable en fonction de celui espéré grâce à un champ électrique créé avec ses deux plaques de déflexion le composant. Finalement, le faisceau passe par une unité de déflexion qui permet de regrouper les agrégats et de pulser le faisceau (voir Fig. 2.15) [25, 23, 31].

Dans le cadre de ce mémoire, des clusters d'Argon sont utilisés. Ce type de faisceau permet la diminution de la fragmentation des particules éjectées et engendre donc une meilleure visibilité pour les molécules à haute masse. La division du cluster, comme évoquée en début de section, provoque une aire de dégâts en surface plus élevée. Cependant, cette division permet également de diminuer la profondeur de pénétration et donc de limiter la destruction de l'échantillon. Ces propriétés procurent à ces faisceaux les qualités pour permettre une analyse en profondeur d'un échantillon (voir section 2.2.3 "Profilage") mais également d'obtenir des informations sur les molécules à haute masse.

2.2.3 Types d'analyse

Les sources d'ions présentes dans le *ToF-SIMS V* permettent de faire différents types de mesures et de récolter différentes données. Quatre types d'analyse sont représentés à la figure 2.18 et décrits dans cette section. Les données peuvent être enregistrées sous trois formes :

- En spectres de masse. Tous les types d'analyse permettent d'obtenir ces données.
- En profils.

- En images 2D ou 3D. Tous les types d'analyse permettent également d'obtenir ces données. Leur résolution dépend néanmoins du type d'analyse.

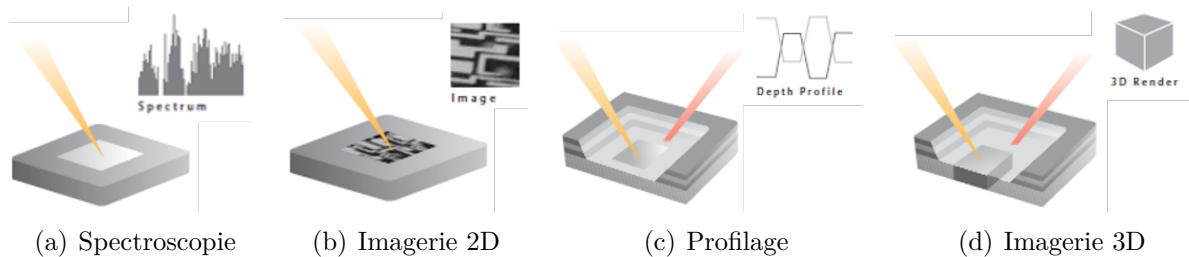


Figure 2.18 – Schéma des différents types d'analyse [20].

Lors de l'analyse d'un échantillon isolant placé sur un substrat conducteur ou d'une surface épaisse et non-homogène, des charges s'accumulent à la surface de cet échantillon. Cela perturbe l'éjection des ions secondaires et donc la qualité d'analyse. Pour contrer cela, le *Flood gun* est utilisé. Ce canon va envoyer, entre deux cycles d'analyse, des électrons avec une faible énergie sur cette surface (voir figure 2.19). Cette énergie dépend de la quantité de charges accumulées à la surface. Cependant, si ce dispositif permet de résoudre les problèmes d'effet de charge, il peut également abîmer l'échantillon selon son type (par exemple pour les polymères ou les biomolécules). Il faut donc optimiser l'énergie pour ne pas abîmer la surface [24, 23].

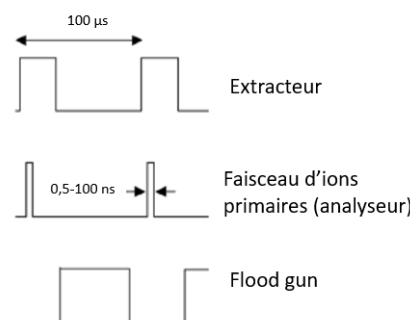


Figure 2.19 – Utilisation du compensateur de charge - Flood Gun. Il est utilisé entre une acquisition des données et un impact du faisceau d'ions primaires lors d'une analyse par spectroscopie [24].

Spectrométrie de masse

La spectrométrie est la technique la plus classique en analyse ToF-SIMS. Elle consiste à caractériser une région allant de $20 \times 20 \mu m^2$ à $500 \times 500 \mu m^2$ de l'extrême surface d'un matériau. Le faisceau d'ions primaires frappe alors l'échantillon de manière aléatoire dans la zone d'intérêt tout en respectant les conditions statiques. Ensuite, les ions secondaires sont analysés et un spectre de masse est généré (voir Fig. 2.18(a)).

Différents faisceaux d'ions primaires peuvent être utilisés afin d'obtenir des spectres. Dans le cadre de ce mémoire, le Bismuth (Bi_5^+) et l'Argon (Ar_{3000}^+) en mode d'extraction retardée sont utilisés.

Le mode d'extraction retardée permet une augmentation de la sensibilité, de la résolution et de la précision lors de la mesure de masse. Son principe est illustré à la figure 2.20. La première étape consiste à placer le support de l'échantillon à la même tension que l'extracteur. De ce fait, lorsque les ions sont éjectés, ils voyagent pendant un certain temps dans une zone sans champ. Après un certain délai, une légère différence de potentiel est observée et entraîne l'accélération des ions. Finalement, les ions subissent une accélération plus nette grâce à la présence d'une plus grande différence de potentiel [26].

Les différentes étapes d'accélération permettent de regrouper les ions secondaires ayant une énergie cinétique initiale différente. En effet, les ions ayant une vitesse initiale plus importante pénètrent plus profondément dans la zone sans champ et sont donc moins longtemps impactés par l'accélération procurée par la première différence de potentiel. Les ions moins rapides sont, par conséquent, accélérés pendant une plus grande période de temps. Cela permet le regroupement de l'ensemble des ions secondaires qui conduit finalement à une meilleure résolution en masse [24].

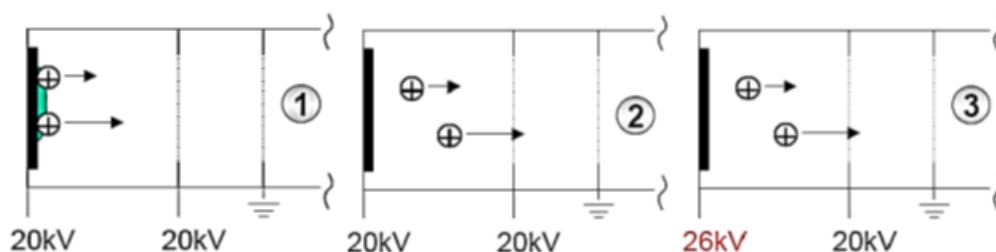


Figure 2.20 – Principe de l'extraction retardée. (1) Les ions quittent l'échantillon après qu'il ait été bombardé par le faisceau d'ions primaires et que son support ait été mis à la même tension que l'extracteur (2) aucune différence de potentielle étant observée, les ions se déplacent dans une zone sans champ (3) après un délai, les ions rentrent dans une zone avec un champ électrique et sont accélérés premièrement lentement ($\Delta V = 6V$) et deuxièmement rapidement ($\Delta V = 20V$) [26].

Imagerie 2D

Il existe deux modes de détections pour l'imagerie en ToF-SIMS, la configuration microsonde et la configuration microscope.

Le mode utilisé dans le cadre de ce mémoire est le mode microsonde. Durant celui-ci, un faisceau focalisé est utilisé afin d'acquérir un spectre de masse pour chaque pixel de l'image. Chaque spectre est enregistré par rapport à la position de du pixel analysé. Lorsque l'ensemble de la surface a été analysée, les images sont reconstruites à partir de tous les spectres de masse enregistrés (voir figure 2.21 [32]).

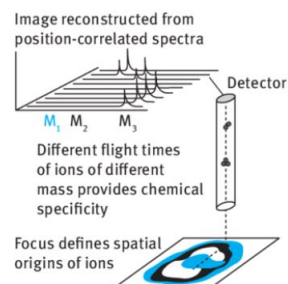


Figure 2.21 – Mode de détection pour l'imagerie par microsonde

L'imagerie 2D dite "mosaïque" consiste à acquérir séquentiellement les données de plusieurs régions afin de les regrouper pour créer une mosaïque finale d'une taille maximale de $9 \times 9 \text{ cm}^2$. Des spectres de masses sont obtenus pour chaque région qui peut être analysée pendant plusieurs cycles afin d'augmenter le signal obtenu et par ce fait améliorer la résolution. Ce type d'analyse permet d'identifier la position au sein du tissu des différentes molécules le composant.

Profilage

Le profilage analyse la composition de l'échantillon dans sa profondeur grâce à l'utilisation à la fois d'un faisceau qui analyse l'échantillon et d'un faisceau qui le pulvérise. Cela est rendu possible par la source à double faisceaux ou par l'utilisation successive d'une source qui analyse (le LMIG ou le GCIB par exemple) et d'une source qui creuse dans l'échantillon (le GCIB par exemple). Dans le cadre de ce mémoire, des faisceaux de Bismuth (LMIG) et d'Argon (GCIB) sont utilisés. En effet, l'Argon, comme décrit à la section précédente (section 2.2.2), permet de limiter la destruction en profondeur de l'échantillon malgré sa grande surface de frappe. L'analyse se fait au centre de la frappe du faisceau d'Argon pour maximiser les chances de prendre les mesures sur une surface plane.

La figure 2.22 décrit les différentes phases composant un cycle d'analyse en mode entrelacé. Un faisceau d'analyse est d'abord envoyé sur l'échantillon, les ions secondaires sont alors extraits pour être analysés. Un temps de latence (Delay) est alors observé pour éviter l'interférence entre les phases d'analyse et de pulvérisation. Finalement, le second faisceau vient pulvériser l'échantillon afin de creuser et permettre une seconde analyse dans une couche inférieure. Avant d'entamer un nouveau cycle, un temps de retard (Lead Off) est observé pour à nouveau éviter l'interférence entre les différentes phases. [25].

Toutefois, en présence d'effet de charge, le mode non-entrelacé est utilisé. Les phases composant le cycle d'analyse diffèrent légèrement car l'utilisation du compensateur de charges devient nécessaire. La figure 2.23 illustre ces changements. En effet, un nouveau temps de pause est ajouté entre deux cycles pour permettre l'utilisation du flood gun.

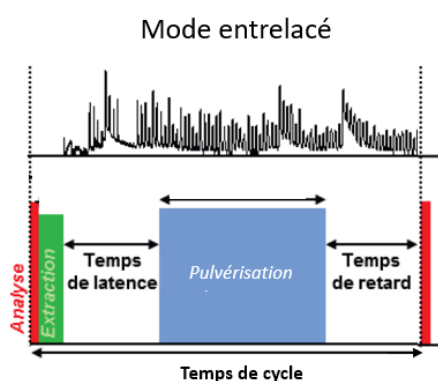


Figure 2.22 – Cycle d'un profilage en mode entrelacé. L'analyse est suivie de l'acquisition et de la pulvérisation. Les temps de latence et de retard séparent l'acquisition de la pulvérisation et la pulvérisation du prochain cycle respectivement [25].

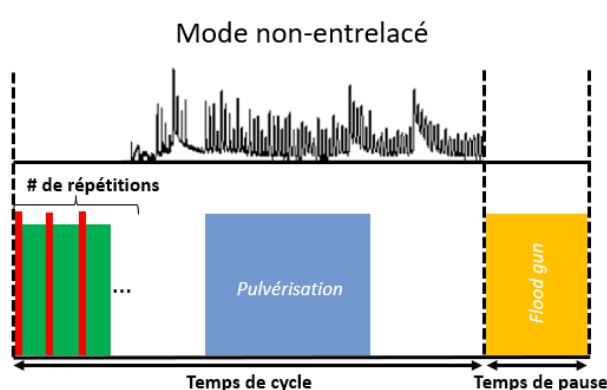


Figure 2.23 – Cycle d'un profilage en mode non-entrelacé. Les acquisitions se répètent durant un laps de temps déterminé et sont suivies de la pulvérisation. Les temps de latence et de retard sont toujours présents mais un temps de pause durant lequel le compensateur de charge est utilisé est ajouté en fin de cycle durant un laps de temps défini [25].

Imagerie 3D

L'imagerie 3D est la combinaison des analyses de profilage en profondeur et d'imagerie 2D. Ce type d'analyse n'est pas utilisé dans le cadre de ce mémoire et ne sera dès lors pas détaillé. Toutefois, il semblait important de le citer afin de montrer que l'analyse par ToF-SIMS permet de visualiser la position des composants et la composition d'un échantillon dans l'intégralité de son volume.

2.2.4 Pertinence de son utilisation pour l'imagerie biologique

À l'heure actuelle, les biologistes aimeraient avoir une connaissance plus précise des cellules et des molécules impliquées dans le métabolisme. En effet, les cellules sont différentes et pouvoir lier l'identité de la cellule à sa fonction serait souhaitable. Au vu de la taille et du peu de matière contenue dans une cellule, il est nécessaire d'avoir recours à une technologie sans marquage et avec une bonne résolution spatiale [33]. De plus, l'emplacement et l'organisation des molécules au sein des tissus est également lié à leur fonction et donc étudié à l'heure actuelle. En ce sens, l'imagerie métabolique par spectrométrie de masse fait d'énorme progrès depuis plusieurs années. Les deux techniques principales et qui ont donc de grands potentiels dans ce domaine sont la Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et le ToF-SIMS. La MALDI est une technique durant laquelle un laser apporte de l'énergie à une matrice initialement posée sur la surface d'un échantillon. Cette énergie provoque la désorption de molécules à la fois de la matrice et de l'échantillon qui, une fois en phase gazeuse, s'ionisent. Comme pour la SIMS, les ions sont ensuite analysés en fonctions de leur rapport $\frac{m}{z}$. Ces deux techniques et la Désorption-ionisation par électronébulisation (DESI) sont comparées dans le graphe présenté à la figure 2.24. La DESI est également une technique d'ionisation qui permet l'analyse de tissus biologiques.

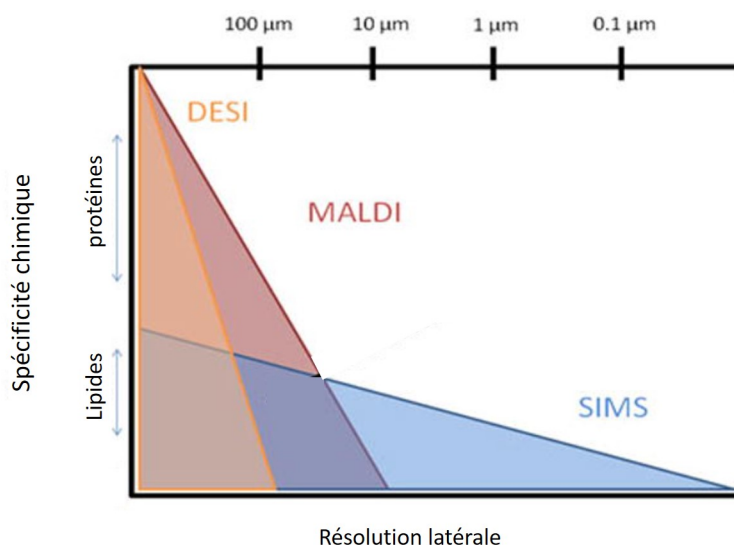


Figure 2.24 – Graphe représentant les capacités d'analyse de trois techniques, SIMS, MALDI et DESI en terme de résolution latérale et de spécificité chimique [34].

Si aujourd'hui le ToF-SIMS permet une bonne résolution spatiale, ça n'a pas toujours été le cas. De nombreuses améliorations ont eu lieu depuis la fin des années 1990. Initialement, les faisceaux d'ions ont été pensés et développés pour la spectrométrie et

la pulvérisation et non pour l'imagerie [33]. Au vu de la demande en imagerie, cette résolution a connu d'énormes progrès en peu de temps pour passer d'une centaine de micromètres au micromètre. Suite à cela, le ToF-SIMS devient réellement intéressant pour l'appliquer au domaine biologique. Grâce aux faisceaux de LMIG, des images de tissus biologiques de très haute qualité sont obtenues [35, 36]. Comparé à la MALDI, la SIMS procure une meilleure résolution latérale (50-200 nm) due à la capacité de focaliser les faisceaux d'ions primaires et une meilleure résolution en profondeur (1-5 nm) [35, 37].

Toutefois, la résolution spatiale n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour obtenir des mesures d'imagerie biologique de qualité. De bonnes spécificité et sensibilité sont également nécessaires.

La spécificité des deux techniques est très différente. En effet, le graphe de la figure 2.24 montre que la MALDI permet l'étude de grandes molécules telles que les protéines mais également de plus petites molécules comme les lipides tandis que la SIMS se limite à des ions de masse bien plus faible. En SIMS, la pulvérisation de l'échantillon par le faisceau d'ions primaires provoque la rupture de certaines molécules avant qu'elles soient potentiellement ionisées. Cet effet limite la taille des ions détectables par cette technique mais permet néanmoins d'observer certaines molécules abondantes dans les tissus telles que les lipides [38, 39, 34].

La sensibilité des techniques dépend principalement du rendement ionique. Pour la SIMS, l'équation 2.2 expliquée ci-dessus montre le lien entre le rendement des ions secondaires et la probabilité d'ionisation. Celle-ci est très faible pour les analyses de spectrométrie de masse ce qui en fait une limitation importante dans la technique. En effet, la petite probabilité d'ionisation engendre un faible rendement d'ions secondaires et donc très peu d'ions à analyser. Afin d'augmenter cette sensibilité, il est possible de prolonger l'analyse mais le risque de ne plus respecter les conditions statiques et d'engendrer trop de dommages à l'échantillon augmente [36]. D'autres techniques permettant l'augmentation du rendement en ions secondaires seront expliquées dans la section suivante.

Les tissus analysés

L'ensemble des propriétés du ToF-SIMS mais principalement sa résolution spatiale pousse à utiliser cette technique pour analyser différents tissus biologiques, notamment le cerveau [40, 41, 42, 43], l'oeil [44, 45, 46], le foie [47], le rein [48], la peau [49, 50] et l'estomac [51]. L'analyse par ToF-SIMS suscite donc beaucoup d'intérêt dans le domaine biomédical. De plus, cette technique permet d'analyser plusieurs aspects d'un échantillon. En effet, l'absence de marqueur ne limite pas à l'observation d'un seul type de molécules mais permet bien en théorie l'étude de la composition totale de l'échantillon. Grâce à ce dernier point, des résultats inattendus peuvent être obtenus.

2.2.5 Limites

Même si à l'heure actuelle le ToF-SIMS permet d'obtenir des images de haute qualité pour le secteur médical, des améliorations doivent encore être faites pour repousser ses limites et pouvoir l'utiliser dans des tests de routine dans la recherche biomédicale. Certaines de

ses limitations sont exposées ci-dessous avec certaines pistes d'amélioration.

Sensibilité

La sensibilité dépend fortement du nombre d'ions secondaires formés lors de l'analyse de la surface. Toutefois, pour des analyses par ToF-SIMS, les rendements ioniques sont très faibles ($< 10^{-3}$) et dès lors limitent la résolution spatiale [36].

Les ions secondaires peuvent être formés par éjection d'électrons, des réactions acide-base, l'addition d'ions, etc. Ces processus peuvent être influencés, bénéfiquement ou non, par la présence d'espèces chimiques dans l'échantillon. La visibilité de certains ions dépend donc de la composition du tissu. C'est ce qu'on appelle l'effet de matrice [35]. L'intensité de signal est due à l'environnement chimique et n'est donc qu'une donnée semi-quantitative.

Pour l'analyse de tissus biologiques, l'effet de matrice est très important et peut mener à la suppression de l'émission de certains ions. De ce fait, l'absence de pic ne signifie pas que l'ion correspondant à la masse est forcément absent du tissu mais possiblement que l'ionisation de cette particule n'a pas eu lieu à cause de son environnement [52, 36]. Cela rend compliquée l'analyse de tissus. Différentes études ont déjà mis en avant ces effets sur des tissus comme le cerveau par exemple.

Le défi des chercheurs est donc d'augmenter cette sensibilité. Les progrès sur les faisceaux d'ions primaires ont déjà permis d'améliorer le rendement d'ions secondaires. L'évolution du faisceau initialement composé d'atomes à une composition polyatomique a augmenté le rendement d'ions secondaires de trois ordres de grandeur et a diminué les dommages causés à la surface permettant l'analyse d'un plus grand volume et donc l'augmentation de la sensibilité. Toutefois, du chemin reste à parcourir. Pour cela différentes études sont menées pour essayer de bénéficier des effets de matrice et/ou d'augmenter l'ionisation des particules éjectées lors du bombardement de l'échantillon par le faisceau d'ions primaires. Quelques axes possibles d'amélioration sont cités et brièvement expliqués ci-dessous.

- **La post-ionisation** consiste à ioniser les particules neutres après leur éjection de l'échantillon, grâce à un laser. Lorsque le photon rencontre une particule dont l'énergie d'ionisation est inférieure à sa propre énergie, un ion est formé par éjection d'un photoélectron. Les molécules ayant une énergie d'ionisation supérieure à celle du photon ne sont donc pas ionisées sauf si elles sont frappées simultanément par plusieurs photons. Toutefois, les ions formés à partir des molécules ayant une énergie d'activation nettement inférieure à celle du photon se voient transférer l'énergie excédentaire. Cela favorise la fragmentation des ions. Il est donc nécessaire de choisir entre une grande augmentation du rendement ionique ou une faible fragmentation (augmentation de la spécificité) [36, 33].

Le procédé le plus répandu pour augmenter l'ionisation repose sur le fait d'ajouter des composants dans l'échantillon qui fournissent des voies plus accessibles d'ionisation. Il existe deux approches la SIMS assistée par un métal et la spectrométrie de masse des ions secondaires assistée par une matrice (ME-SIMS)

- **La spectrométrie de masse des ions secondaires assistée par un métal (MetA-SIMS)** consiste à recouvrir l'échantillon d'une fine couche de métal per-

mettant d'augmenter de manière significative l'ionisation [36, 53]. En effet, l'ajout d'Argent ou d'Or sur l'échantillon a déjà permis d'augmenter le rendement d'ions issus de polymères, d'acides gras, de lipides, de cholestérol, etc. en mode positif [54]. Cette augmentation de l'ionisation est additive à celle due aux faisceaux d'ions polyatomiques [54].

- **La spectrométrie de masse des ions secondaires assistée par une matrice (ME-SIMS)** consiste quand à elle à déposer une fine couche de matrice sur l'échantillon de manière similaire à la technique MALDI. Néanmoins, son fonctionnement n'est pas le même. En effet, lors d'une analyse MALDI, un laser vient donner de l'énergie à une matrice qui se met alors à chauffer et il en résulte une désorption des molécules qui réagissent finalement ensemble [52] ce qui n'est pas le cas en ME-SIMS. Dans ce cas, l'explication principale de l'augmentation du rendement est que l'environnement est favorable à l'ionisation des molécules présentes dans le tissu [52]. En effet, comme en MALDI, une diffusion des biomolécules dans la matrice est observée [55, 56] et explique l'augmentation de rendement ionique. Cette diffusion serait dépendante de la fluidité des molécules et de l'environnement chimique dans lesquels elles se trouvent initialement.

L'augmentation de l'ionisation est délicate car, due à l'effet de matrice, les méthodes fonctionnent uniquement pour certains composés et non pour tous. Cela reflète à nouveau la dépendance de l'ionisation vis-à-vis de l'environnement chimique.

La spécificité

La spécificité de la méthode utilisée dépend entre autres du taux de fragmentation engendré. Ce paramètre a déjà été amélioré de nombreuses fois en SIMS grâce à l'évolution de la composition des faisceaux d'ions primaires. La figure 2.25 montre l'effet de la composition du faisceau sur la fragmentation des molécules éjectées. Plus la fragmentation augmente, moins la spécificité est bonne et donc les informations sur la composition moléculaire diminuent car les ions à haute masse ne sont plus très nombreux.

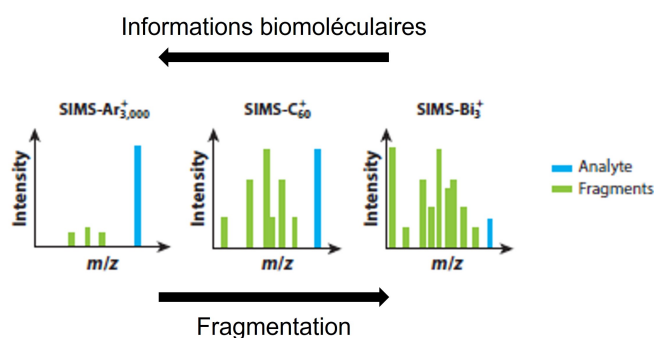


Figure 2.25 – Impact des faisceaux d'ions primaires sur la fragmentation et donc sur l'information biomoléculaire. Les graphes représentent les intensités de la molécules analysée (analyte en bleu) et de ses fragments (en vert). L'augmentation de fragmentation entraîne une diminution d'informations biomoléculaires [33].

Résolution latérale

La résolution latérale dépend de la sensibilité de l'analyse. En effet, la résolution augmente si la sensibilité augmente. Comme énoncé précédemment, l'augmentation de ce paramètre est

déjà un énorme défi en SIMS. Néanmoins, la résolution latérale ne dépend pas uniquement de celui-ci. La focalisation des faisceaux d'ions primaires jouent le premier rôle dans cette résolution [33, 37]. Le principal défi consiste à produire des sources avec une plus grande brillance qui peuvent être focalisées à moins de 1 μm . Cela doit être fait en gardant une énergie par atome inférieure à 5eV en vue de limiter la fragmentation moléculaire. L'augmentation de l'énergie rendrait la fragmentation plus importante [33].

Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est primordiale afin d'obtenir une image de haute qualité et représentative. En effet, cette préparation empêche la diffusion des molécules au sein de l'échantillon après son prélèvement. Plusieurs étapes composent cette préparation, le prélèvement, l'enrobage, le sectionnement, le montage, le séchage et finalement le stockage.

1. **Le prélèvement** : Pour commencer, les tissus biologiques doivent être prélevés. L'ensemble des échantillons de tissus utilisés dans ce mémoire proviennent d'hystérectomie humaine, ablation chirurgicale de l'utérus [57].
2. **L'enrobage** : Une fois prélevés, les échantillons subissent un processus d'enrobage. Il existe quatre enrobages classiques, l'optimum cutting temperature (OCT) qui est un mélange de polyéthylène glycol, le carboxyméthylcellulose (CMC), la gélatine et la glace. Les composants de l'OCT ont tendance à migrer dans le tissu [38]. Pour des analyses au ToF-SIMS sur des relativement grands échantillons, le CMC est donc privilégié. Ensuite, les tissus sont cryoconservés c'est-à-dire qu'ils sont refroidis très rapidement à -196 °C à l'aide d'Azote liquide (N_2) [38, 39].
3. **Le sectionnement** : Les échantillons sont ensuite coupés très finement par cryo-section à l'aide d'un microtome. Pour cela, le tissu est placé dans la chambre du microtome maintenue à une température de -20 °C et est ensuite tranché avec une lame refroidie au préalable. Les tranches obtenues ont une épaisseur de 10 à 20 μm . L'épaisseur a un impact sur l'efficacité de détection des molécules, plus la tranche est fine, moins l'effet de charge est grand et meilleure est la détection [38, 39].
4. **Le montage** : Les tranches obtenues sont ensuite montées sur des plaques en verre ou en oxyde d'indium-étain (ITO). Deux méthodes existent afin de fixer les échantillons. La première est la décongélation. Elle consiste à fixer l'échantillon en le décongelant localement grâce à la chaleur d'un doigt que l'on vient placer juste en dessous de la plaque au niveau de la tranche [38]. Cette méthode est très adaptée aux organes due à leur forte concentration en lipides. La deuxième consiste à fixer l'échantillon au moyen de ruban adhésif [38].
5. **Le séchage** : Juste avant l'analyse, les échantillons doivent être séchés. En effet, l'environnement sous-vide engendrerait la réduction de taille d'un échantillon frais et/ou des processus biologiques pourraient encore y être actifs. Les changements de températures ont également un effet néfaste sur la conservation du tissu. L'échantillon doit donc être maintenu à la température la plus basse possible. Différentes méthodes existent, le "congelé-hydraté", la lyophilisation et la décongélation.

— Le "congelé-hydraté" : Lors de l'analyse, l'échantillon est maintenue à une température cryogénique au moyen d'un porte échantillon spécial. De plus, l'échantillon est placé dans une chambre remplie d'Argon gazeux afin d'éviter la condensation au niveau de sa surface.

- La lyophilisation : Après la fixation de la tranche, l'échantillon est placé sur le porte échantillon préalablement refroidi dans une chambre dans laquelle le vide est pompé progressivement jusqu'au moment où l'échantillon atteint la température ambiante. Grâce à ce vide créé, l'eau est éliminée du tissu simultanément. Cette étape dure entre une et trois heures [38]. Durant cette étape, le formiate d'ammonium préalablement placé sur l'échantillon se sublime et permet de retirer les sels en maintenant la pression osmotique [36]. En effet, leur présence dans le tissu même à faible concentration réduit le rendement ionique des molécules [33].
- La décongélation : Les échantillons subissent un traitement ou sont directement placés sur un porte échantillon. Ils sont alors séchés à température ambiante.

La résolution en masse

Cette résolution dépend énormément du type d'analyseur utilisé. Différents types d'analyseurs existent aujourd'hui avec chacun leurs spécificités. Dans le cadre de ce mémoire, un analyseur ToF muni d'un réflectron est utilisé. Ce type d'analyseur permet d'obtenir une précision en masse inférieure à 5ppm [33]. Les meilleures résolutions en masse sont obtenues en utilisant des spectromètres de masse à transformée de Fourier, tel que l'orbitrap [33, 58]. Néanmoins, ils sont plus lents que d'autres analyseurs et prennent plus de 100 ms pour acquérir un spectre.

Afin de profiter de la vitesse du ToF et de la résolution en masse de l'orbitrap, il existe à présent un instrument couplant les deux types d'analyseurs, à savoir l'orbiSIMS [58].

2.3 Objectifs

La section 2.1 a présenté de manière très simplifiée le fonctionnement du cycle menstruel. Malgré cette simplification, il a été possible de voir l'importance de l'action de deux hormones, la P_4 et l' E_2 , au sein de l'utérus. En effet, ces deux hormones jouent un rôle clé dans la préparation des parois utérines dans le but d'accueillir un oeuf fécondé. Il est donc clair que l'homéostasie endométriale est gouvernée par la P_4 et l' E_2 et que le bon fonctionnement des voies hormonales est essentiel à la santé de l'utérus et donc à la fertilité. Lorsque qu'un dérèglement survient, des pathologies telles que l'endométriose et le cancer de l'endomètre peuvent apparaître. Pour trouver un traitement adéquat, il est donc important de déterminer le rôle exact des hormones dans ces situations. À l'heure actuelle, les taux mesurés proviennent d'une analyse sanguine ou sont obtenus par mesure indirecte. Or, il serait intéressant de faire des liens entre les taux de ces hormones présentes directement dans les tissus et la période du cycle menstruel à laquelle les mesures sont prises.

Certaines études ont déjà été faites afin d'essayer d'identifier la dose et la localisation de ces hormones dans les tissus utérins, mais toutes les méthodes sont indirectes. En effet, les études démontrent la présence de facteurs de signalisation des hormones, comme leurs récepteurs ou des facteurs de transcriptions, mais pas la présence des hormones directement.[59, 60, 61]

Parmi ces études, celle réalisée par les professeurs Patrick Henriët et Etienne Marbaix, membres de l'institut de Duve qui ont montré la présence de composante 1 de la membrane de récepteur de progestérone (PGRMC1) dans l'endomètre mérite d'être citée. Pour obtenir ce résultat, ils ont marqué cette protéine, connue pour interagir avec la progestérone étant une composante des récepteurs de cette hormone, à l'aide un tag fluorescent. Le résultat est visible aux figures 2.26 and 2.27.

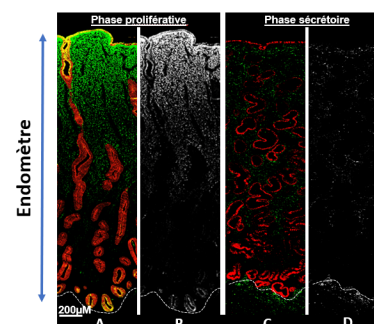
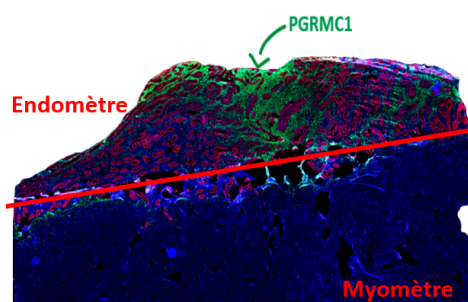


Figure 2.26 – Localisation de la PGRMC1 dans les parois utérines. La PGRMC1, en vert, est plus abondante dans l'endomètre que dans le myomètre. Ces deux couches sont séparées par la ligne rouge. [Professeurs Henriët et Marbaix]
Figure 2.27 – Localisation de la PGRMC1 dans l'endomètre. Le vert représente le marquage de la PGRMC1 (A,C), le rouge l'E-Cadherine (A,C) et le blanc la PGRMC1 seule (B et D) dans un endomètre en phase proliférative (A-B) et en phase sécrétoire (C-D) [Professeurs Henriët et Marbaix]

Malgré ses bons résultats, cette étude reste très indirecte. Il est d'ailleurs possible d'observer que la PGRMC1 est présente principalement durant la phase proliférative alors que la P_4 est principalement observée lors de la phase sécrétoire. C'est pourquoi, ce mémoire a pour but de déterminer le taux d'hormones présent dans les tissus utérins. De plus, grâce à l'analyse multiplex du ToF-SIMS, il sera possible, parallèlement à cette étude, d'étudier la composition lipidique des couches internes de l'utérus.

2.4 Méthodologie

Comme mentionné précédemment, le ToF-SIMS n'a pas encore été utilisée pour étudier des tissus utérins. Toutefois, de nombreuses applications dans le domaine médical sont observables et ont pu servir d'inspiration. C'est pourquoi, la méthodologie suivante est mise en place :

1. Étudier les hormones d'intérêt. Cela permet d'obtenir les modèles de référence de leur fragmentation et ionisation lorsqu'elles sont bombardées. Avoir un spectre de référence est important pour voir les principaux ions formés lorsque les molécules d'hormones sont bombardées.
2. Calculer la limite de détection des hormones dans un tissu animal. Cette étude permet de s'assurer qu'observer ces hormones lors de l'analyse des échantillons de tissus utérins est faisable. Pour cette étape, la méthodologie utilisée par Vorng et son équipe, qui sera détaillée dans la section suivante, sera suivie [62].
3. Étudier les tissus utérins avec différentes conditions d'analyse. Pour cela, les études d'autres tissus existantes et plus particulièrement sur celle des cerveaux de souris serviront de base. Durant cette étape, différents faisceaux d'ions primaires ainsi que différents traitements de l'échantillon sont utilisés afin d'optimiser les conditions d'analyse. Une liste des molécules présentes est également dressée.
4. Étudier les différences de composition entre les deux couches internes de l'utérus, l'endomètre et le myomètre.
5. Comparer les taux de lipides et d'hormones présents dans les différents tissus en fonction de la période du cycle menstruel. Une variabilité des taux est espérée en fonction du niveau de développement de l'endomètre.

Chapitre 3

Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les méthodes et les matériels utilisés durant ce mémoire. Il est composé de deux grandes parties correspondant aux types d'échantillons analysés, à savoir les préparations contenant les hormones et les tissus utérins.

3.1 L'analyse des hormones

3.1.1 Produits

— **La progestérone (P_4) :**

Soluble dans l'eau :

Utilisation : échantillons avec le tissu car présence d'une cage hydrophile

Synonyme : (2-Hydroxypropyl)- β -cyclodextrin

Numéro de produit : C0926

Non-soluble dans l'eau :

Utilisation : échantillons d'hormones pures

Synonyme : 4-Pregnene-3,20-dione

Numéro de produit : SIGMA-PO130

Formule : $C_{21}H_{30}O_2$

Masse molaire : 314,461 g/mol

— **L'estradiol (E_2) :**

Soluble dans l'eau :

Utilisation : échantillons avec le tissu car présence d'une cage hydrophile

Synonyme : Cyclodextrin-encapsulated 17 β -estradiol

Numéro de produit : SIGMA-E4389

Non-soluble dans l'eau :

Utilisation : échantillons d'hormones pures

Synonyme : 17 β -Estradiol

Numéro de produit : SIGMA-E8875

Formule : $C_{18}H_{24}O_2$

Masse molaire : 272,38 g/mol

— **Homogénat de tissus :**

Code CRM : ERM-BB185

Description : Homogénat de foie de bovin

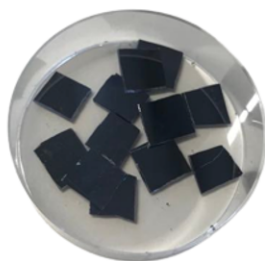
— **Formiate d'ammonium :**Formule : NH_4HCO_2

Masse molaire : 63,06 g/mol

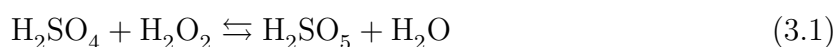
SKU : 156264-100G

3.1.2 Substrats

Afin d'utiliser le ToF-SIMS, les échantillons à analyser doivent se trouver sur un substrat. C'est pourquoi toutes les solutions préparées pour étudier les hormones sont placées sur des petites plaquettes de Silicium également appelées wafers de Silicium (voir figure 3.1). Celles-ci sont nettoyées minutieusement dans le but de minimiser la contamination de la surface à analyser. Les plaquettes préalablement coupées de sorte à créer des carrés d'environ un centimètre de côté, sont plongées dans un mélange piranha et ensuite exposées sous UV-ozone.

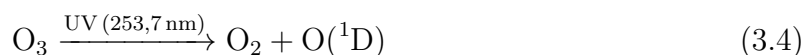
**Figure 3.1** – Wafers de Silicium.**Mélange piranha**

La première étape du nettoyage consiste à plonger les wafers dans le mélange piranha durant 15 minutes sous une hotte. Ce mélange est constitué d'acide sulfurique (H_2SO_4) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans des proportions 3 : 1 et permet de produire de l'acide de Caro (H_2SO_5), également appelé acide peroxymonosulfurique, selon la réaction 3.1. Ce puissant oxydant permet alors d'éliminer les composants carbonés en les transformant en dioxyde de carbone (CO_2). Les plaquettes sont ensuite rincées une dizaine de fois à l'eau distillée (H_2O), rincées à l'éthanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) et finalement séchées à l'aide de diazote (N_2). [63]



UV-ozone

Pour retirer les dernières traces de composants organiques se trouvant sur les wafers, nous les exposons à l'UV-ozone durant 15 minutes. La machine utilisée est une UVOCleaner Model 42 Series et est nettoyée au préalable grâce à un cycle d'1 minute. Le principe de ce nettoyage est de transformer les composés organiques résiduels en substances volatiles. Cela est rendu possible par l'action de l'ensemble des réactions 3.2 à 3.5 avec $O(^3P)$, un atome d'Oxygène ayant deux électrons non appariés de spin parallèle et $O(^1D)$, un atome d'Oxygène dont le nombre quantique s vaut zéro (singulet) et dont le pouvoir oxydant est important. En effet, les contaminants excités ou leurs radicaux formés par photolyse réagissent avec les atomes d'Oxygène pour former de nouvelles molécules gazeuses. [64, 65]



3.1.3 Méthode

Le chapitre 2.1 met en avant deux hormones sexuelles essentielles au bon déroulement du cycle menstruel, à savoir la P_4 et l' E_2 . Afin de les étudier, nous commençons par analyser des échantillons de référence contenant une très haute concentration d'hormones. Cela nous permet d'identifier les pics du spectre de masse correspondant aux différentes ionisations des molécules.

Ensuite, nous calculons leur limite de détection dans du tissu animal. Pour ce faire, nous avons suivi la méthode utilisé par *Vorng et son équipe*. Dans leur article "*Semiempirical rules to determine drug sensitivity and ionization efficiency in secondary ion mass spectrometry using a model tissue sample*", ils décrivent une méthode semi-empirique leur permettant de déterminer la limite de détection de quelques médicaments sur les 20 étudiés. La limite de détection d'une molécule dans un tissu est la concentration minimale à laquelle cette molécule est observée. Pour cela, ils commencent par produire un échantillon de référence ne contenant aucun médicament mais l'homogénat de tissu initialement préparé. Ensuite, pour chaque médicament, ils produisent des échantillons en ajoutant au tissu une dose incrémentale connue de médicament [62].

Etude de l'ionisation

Les solutions de référence ont été préparées en diluant la P_4 dans du Chloroforme ($CHCl_3$) et l' E_2 dans de l'éthanol (C_2H_5OH). Elles sont ensuite déposées sur une plaquette de

Silicium avant d'être soumise à la méthode de l'enduction centrifuge, ou *spin-coating* en anglais, durant 60 secondes à 3000 rpm. Cette méthode permet d'obtenir un échantillon avec une couche mince et homogène comme illustré à la figure 3.2.

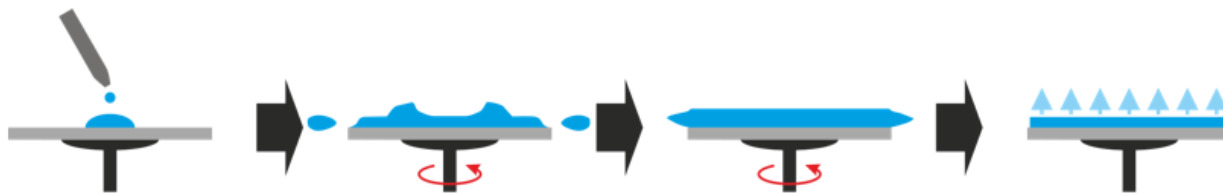


Figure 3.2 – Technique de l'enduction centrifuge. La solution est déposée sur un substrat initialement posé sur un plateau tournant. Ensuite, le plateau commence à tourner à une haute vitesse constante, ce qui permet à la solution de s'étaler de manière homogène grâce à la force centrifuge. Un vide créé au niveau du plateau permet le maintien du substrat.

Calcul de la limite de détection

Premièrement, le tissu a été préparé à partir du tissu lyophilisé qui est de l'homogénat de foie de bovin. La poudre est alors hydratée en la plaçant dans de l'eau distillée. Pour augmenter la visibilité des biomolécules, la solution est alors rincée 3 fois au formiate d'ammonium (NH_4HCO_2) 0,1M. Le tout est donc centrifugé 5 minutes à 7500 rpm. Entre chaque rinçage, le surnageant est retiré afin de minimiser la présence de sel dans le tissu. Le tissu est, à nouveau, dilué dans de l'eau distillée afin d'atteindre une concentration finale de 0,1 g/L.

Ensuite, nous préparons les solutions à base d'hormones. Pour cela, nous utilisons les poudres des molécules encapsulées (solubles dans l'eau) que nous mélangeons avec de l'eau distillée pour obtenir 3 mL de solution à une concentration de 5 g/L. Nous préparons également des solutions de progestérone à des concentrations de 20 et 40 g/L.

Une dose adéquate de solution hormonale est mélangée au tissu afin d'obtenir des concentrations incrémentales. Le tout est mélangé au vortex pour rendre la solution la plus homogène possible juste avant de déposer environ 4 μL goutte à goutte sur un wafer de Silicium. 18 échantillons à base d'hormones, repris dans les tableaux 3.1 et 3.2, sont finalement prêts à être analysés.

Table 3.1 – Ensemble des échantillons produits pour l'analyse de l'Estradiol (E_2).

Echantillons	Volume utilisé [μL]		Concentration finale d'estradiol [g/L]	Concentration finale en homogénat [g/L]
	Homogénat	E_2 5 g/L		
E_2 0,1	100	2	0,1	98,04
E_2 0,2	100	4	0,2	96,15
E_2 1,428	100	40	1,428	71,43
E_2 3,33	100	200	3,33	33,33
E_2 4	100	400	4	20

Table 3.2 – Ensemble des échantillons produits pour l'analyse de la Progestérone (P_4).

Échantillons	Volume utilisé [μL]				Concentration finale de progestérone [g/L]	Concentration finale en homogénat [g/L]
	Tissu	P_4 5g/L	P_4 20g/L	P_4 40g/L		
P_4 0,1	100	2	-	-	0,1	98,04
P_4 0,2	100	4	-	-	0,2	96,15
P_4 0,25	100	5,26	-	-	0,25	97,5
P_4 0,5	100	11,1	-	-	0,5	90,09
P_4 1	100	-	-	2,56	1	97,5
P_4 1,428	100	40	-	-	1,428	71,43
P_4 2	100	-	-	5,26	2	95
P_4 2,5	100	-	14	-	2,5	87,71
P_4 0,1	100	200	-	-	3,33	33,33
P_4 0,1	100	-	20	-	3,5	83,33
P_4 0,1	100	400	-	-	4	20
P_4 0,1	100	-	29	-	4,5	77,52
P_4 0,1	100	-	-	14,28	5	87,5

3.1.4 Analyses

Chaque wafers à analyser est monté sur un porte-échantillon de type backmount. Ce dernier, représenté à la figure 3.3, permet la fixation de 18 échantillons simultanément au moyen de petites cales métalliques placées à l'arrière. Une fois ce porte-échantillon inséré, nous mesurons les courants d'analyses au niveau de la cage de Faraday qui nous permettront de calculer la dose d'ions primaires envoyés lors de l'analyse.

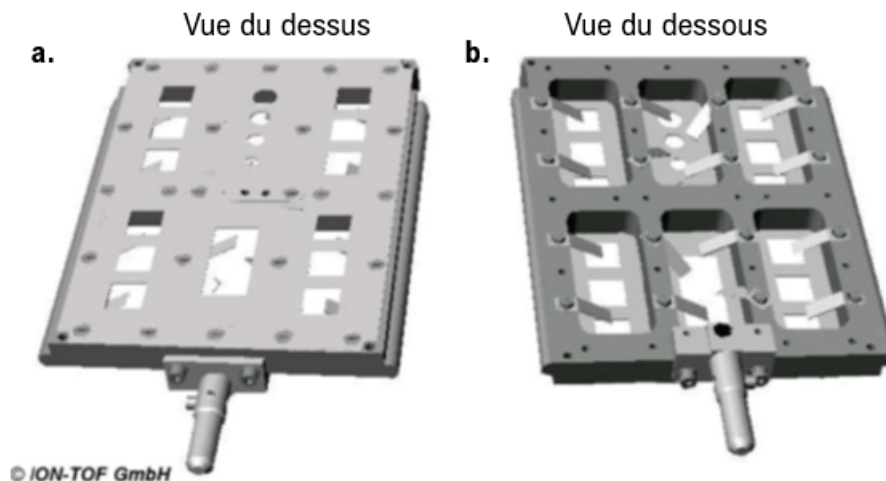


Figure 3.3 – Porte échantillons "Backmount". (a) Vue du dessus, (b) Vue du dessous, endroit où l'on place les échantillons que l'on vient fixer à l'aide de cales métalliques [25].

Différentes mesures ont été prises en fonction de la concentration en hormones de l'échantillon et des résultats obtenus précédemment. Deux types de faisceaux ont été utilisés :

- Lors d'une analyse par spectroscopie : une zone de $500\ \mu m \times 500\ \mu m$ de l'échantillon est bombardée par un faisceau de 30 keV de Bi_5^+ en mode groupé à haut courant durant 60 secondes. Le courant est d'environ 0.08 pA pour un cycle time de 100 μs

- Durant les profilages : l'échantillon est creusé sur un raster de $600\ \mu m \times 600\ \mu m$ par un faisceau d' Ar_{3000}^+ avec une énergie de 10keV et seule une surface de $200\ \mu m \times 200\ \mu m$ située au centre est analysée par un faisceau de Bi_5^+ .

La couche de tissu étant très épaisse et non-homogène, nous utilisons le faisceau d'électrons afin de compenser les effets de charges présents. Avant d'analyser les résultats obtenus, les spectres sont calibrés au moyen des pics CH^+ , $C_2H_5^+$, $C_3H_5^+$ et $C_4H_7^+$ en mode positif et grâce aux pics CH^- , C_2H^- , C_3H^- et C_4H^- en mode négatif.

L'ensemble de ces mesures et des paramètres est repris dans les tableaux se trouvant en annexe.

3.1.5 Traitement de données

Le software IONTOF SurfaceLab 7.2 est utilisé pour traiter les données récoltées lors des différentes mesures. Nous sélectionnons alors les pics d'intérêts afin d'en établir une liste. Ensuite, nous importons le compte d'ions secondaires correspondant à l'intégrale de l'aire sous chacun des pics dans un fichier Excel afin d'utiliser au mieux ces données.

Afin de comparer les différentes concentrations et d'observer la limite de détection, nous normalisons l'ensemble des résultats par les données de l'échantillon de référence de tissu auquel nous n'avons pas rajouté d'hormone et par le nombre d'ions primaires utilisés lors de la prise de mesure ou par le compte d'ions secondaires total des pics sélectionnés pour les mesures de spectroscopie ou de profil en profondeur respectivement.

3.2 L'analyse des tissus utérins

3.2.1 Produits

— **CHCA** :

Nom complet : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

Formule : $C_{10}H_7NO_3$

Masse molaire : 189.170 g/mol

— **DHB** :

Nom complet : acide 2,5-dihydroxybenzoïque

Formule : $C_7H_6O_4$

Masse molaire : 154,120 g/mol

— **TFA** :

Nom complet : acide trifluoroacétique

Formule : $C_2HF_3O_2$

Masse molaire : 114,023 g/mol

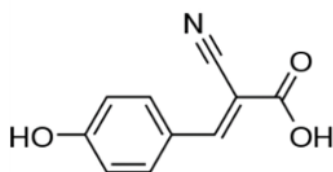


Figure 3.4 – Structure moléculaire du CHCA.

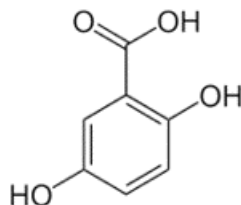


Figure 3.5 – Structure moléculaire du DHB.

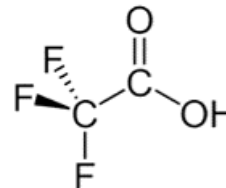


Figure 3.6 – Structure moléculaire du TFA.

3.2.2 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est un point clé dans la préparation à l'analyse parToF-SIMS. En effet, cette étape permet de préserver au maximum l'information chimique des tissus à analyser. Pour notre part, les échantillons proviennent de l'institut de Duve où ils ont été préparés comme expliquer dans la section 2.2.5.

3.2.3 Méthode

Le but principal de l'étude des tissus utérins étant de trouver les conditions optimales d'analyse, nous voulons comparer différents paramètres. C'est pourquoi nous analysons aussi bien des échantillons montés sur verre que sur ITO, avec des faisceaux d' Ar_{3000}^+ ou de Bi^+ . Nous utilisons également différents traitements afin d'améliorer le rendement d'ions secondaires lors de l'analyse. Pour cela, nous nous basons sur des traitements utilisés dans des études sur des tissus de cerveaux de souris, à savoir les matrices utilisées dans la technique MALDI et le traitement avec de l'acide trifluoroacétique (TFA) qui ont montré de bons résultats .

Matrices MALDI

Les matrices MALDI sont utilisées dans l'analyse ToF-SIMS afin d'améliorer le rendement d'ions secondaires. Elles ont déjà été de nombreuses fois utilisées à ces fins [66, 37, 67]. Afin de bénéficier de leurs avantages, nous devons en transférer une fine couche sur les échantillons à analyser. Pour cela, nous devons préalablement préparer des wafers de Silicium sur lesquels nous venons déposer la matrice choisie.

Tout d'abord, nous nettoyons les wafers de 0.3cm x 1cm au moyen du mélange piranha et du traitement UV-ozone (voir section 3.1.2) et l'appareil utilisé avec de l'éthanol. Ensuite, nous y déposons la matrice à l'aide du dispositif de sublimation au laboratoire pour optimiser le vide qui y sera formé. Pour cela, nous plaçons la matrice dans un support métallique que l'on vient insérer dans le bas du dispositif (voir figure 3.7). Nous attachons le wafers sur un bout de métal à l'aide de papier collant double face et le plaçons dans une chambre que nous mettons sous vide. Le vide est créé à l'aide de deux pompes pour atteindre une pression de 10^{-4} mbar. Une fois le vide obtenu, nous chauffons à haute température le bout métallique contenant la matrice et refroidissons le wafer en ajoutant de la glace au dessus du dispositif afin d'y condenser la matrice. Le dispositif de sublimation est représenté à la figure 3.8



Figure 3.7 – Matrice déposée dans une pièce métallique pour la sublimation.

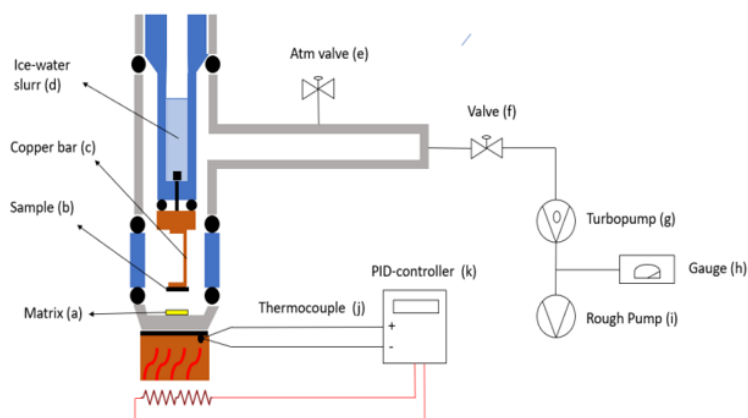


Figure 3.8 – Dispositif de sublimation. (a) matrice (b) wafers de Silicium (c) barre en cuivre (d) réservoir de glace (e) valve pour la pression (f) valve (g) turbo-pompe (h) jauge (i) pompe (j) thermocouple (k) contrôle de la température [68].

Dans le cadre de ce mémoire, deux matrices sont utilisées, à savoir l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB). Pour créer des plaquettes de Silicium avec une épaisseur de matrice optimale, nous nous sommes basés sur leur préparation pour leur utilisation dans le cadre des études de cerveaux de souris. Le CHCA et le DHB ont été respectivement chauffés pendant 2h à 180°C et pendant 50 minutes à 130°C.

Traitement TFA

Un autre traitement montrant d'excellents résultats durant les études de cerveaux de souris est le TFA. Pour l'utiliser, il suffit de placer l'échantillon de notre tissu dans un dessiccateur en présence de TFA durant environ 30 minutes (voir figure 3.9).

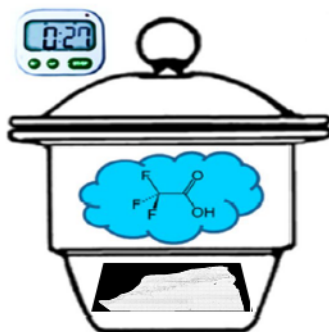


Figure 3.9 – Schéma de la préparation d'un échantillon de tissu avec un traitement à l'acide trifluoroacétique (TFA) [38].

3.2.4 Analyses

Chaque échantillon est monté sur un porte échantillons de type topmount qui permet la fixation de plus grands échantillons. Avec ce porte échantillons représenté à la figure 3.10, contrairement au backmount, nous venons coller les échantillons au dessus de celui-ci au moyen de papier collant double face. De même que pour les échantillons placés sur les wafers de Silicium, le dispositif une fois inséré, nous mesurons les courants d'analyse au niveau de la cage de Faraday. Cela nous permettra de calculer la dose d'ions primaires envoyés lors de l'analyse.



Figure 3.10 – Porte échantillon de type Topmount.

Pour pouvoir analyser les échantillons de tissus sur lesquels se trouve une matrice, une étape de plus est nécessaire : le transfert de la matrice sur l'échantillon. Dans ce cas, le porte échantillon de type topmount est muni d'un dispositif supplémentaire (voir figure 3.11) où sont placés l'échantillon à analyser et le wafers contenant la matrice préparé au préalable appelé cible. La cible est fixée au moyen d'un papier collant double face sur un plan incliné à 30° par rapport à l'horizontal.

Le transfert a lieu au moyen d'un faisceau d' Ar_{3000}^+ venant impacter la surface de la cible avec un angle de 15° par rapport à celle-ci pendant plusieurs dizaines de minutes [69]. La matrice est alors pulvérisée et envoyée sur l'échantillon se trouvant juste à côté (voir figure 3.12). L'angle de 15° est l'angle optimal pour analyser directement l'échantillon à la suite du transfert.

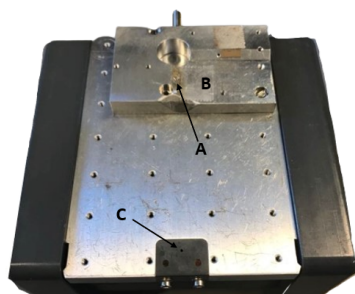


Figure 3.11 – Porte échantillon pour les transferts placé sur un porte échantillon topmount (A) endroit où placer la target (B) endroit où placer l'échantillon (C) cage de Faraday.



Figure 3.12 – Représentation schématique de l'installation pour un transfert. (A) target sur laquelle se trouve la matrice à transférer disposée sur un plan incliné à 30° (B) échantillon à analyser sur lequel est transféré la matrice (C) faisceau d'Argon venant pulvériser la matrice à un angle de 15° .

Différents types d'analyse et différents types de faisceaux ont été utilisés pour faire les mesures sur les tissus utérins. Les faisceaux utilisés sont :

- Un faisceau de Bi_5^+ avec une énergie de 30 keV. Le courant est d'environ 0.04 ou 0.08 pA pour des temps de cycle de $100\ \mu s$ ou de $200\ \mu s$ respectivement. Ce faisceau est utilisé pour la spectroscopie, l'imagerie 2D, et la partie analyse du profilage.
- Un faisceau d' Ar_{3000}^+ avec une énergie de 10 keV. Le courant est d'environ 0.035 pA pour des temps de cycle de $150\ \mu s$. Ce faisceau est utilisé pour la spectroscopie à extraction retardée.
- Un faisceau d' Ar_{3000}^+ avec une énergie de 10 keV en mode transfert. Le courant est d'environ 8 nA. Ce faisceau est utilisé pour les transferts.
- Un faisceau d' Ar_{3000}^+ avec une énergie de 10 keV en mode pulvérisation. Les temps de délai et de latence sont d'environ $60\ \mu s$ et $110\ \mu s$ respectivement pour des courants d'en moyenne 55 pA et des temps de cycle de $200\ \mu s$. Ce faisceau est utilisé pour la partie pulvérisation du profilage.

3.2.5 Traitement de données

Comme pour les échantillons précédents, le software IONTOF SurfaceLab 7.2 est utilisé pour traiter les données récoltées lors des différentes mesures. Nous sélectionnons alors les pics d'intérêts afin d'en établir une liste. Ensuite, nous importons le compte d'ions secondaires correspondant à l'intégrale de l'aire sous chacun des pics dans un fichier Excel afin d'utiliser au mieux ces données.

Afin de comparer les différents traitements, nous normalisons l'ensemble des résultats par la dose d'ions primaires utilisée lors de la prise de mesure pour les analyses faites au Bi_5^+ et par l'intensité totale pour les analyses à l' Ar_{3000}^+ . Ensuite, nous normalisons par les données de l'analyse de référence, l'analyse d'un échantillon sur verre sans traitement pour la spectroscopie, afin de visualiser rapidement s'il y a une intensification du signal.

Le volume de données étant relativement grand, nous utilisons également l'Analyse Multivariées (MVA) et plus particulièrement l'Analyse en composantes principales (PCA).

PCA - Théorie

Inventée en 1901 par Karl Pearson, développée dans les années 1930 et répandue dans les années 1970, la PCA est une technique qui permet de réduire les variables d'un ensemble de données s'il existe une corrélation entre elles [21]. Cela est rendu possible en déterminant les plus grandes directions de la variance dans cet ensemble de données [70].

Lorsqu'on répète une expérience de n manières différentes avec p variables, on obtient une matrice X de taille $n \times p$ avec l'ensemble des variables. Cette matrice est représentée à l'équation 3.6. Pour l'analyse ToF-SIMS, les manières sont les différents spectres obtenus et les variables sont les pics d'intensité sélectionnés [21, 70].

$$X = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{1,2} & \cdots & x_{1,p} \\ x_{2,1} & x_{2,2} & \cdots & x_{2,p} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ x_{n,1} & x_{n,2} & \cdots & x_{n,p} \end{pmatrix} \quad (3.6)$$

La PCA permet alors de transformer cette matrice X en une matrice T correspondant aux composantes principales. Cette seconde matrice est obtenue en multipliant la matrice de variables X par une matrice de loadings de composantes principales W (voir équation 3.7) [21].

$$T = XW \quad (3.7)$$

La matrice W est construite de telle sorte que les composantes principales de la matrice T héritent tour à tour de la variance maximale possible des données de la matrice X , c'est-à-dire que la première composante principale (CP1) représente la plus grande partie de la variation des données initiales [21].

Une fois les composantes principales obtenues, nous devons encore les interpréter. Cette interprétation est basée sur la corrélation maximale entre les différentes variables, c'est-à-dire les pics sélectionnés, et l'ensemble des composantes. La corrélation est représentée par la valeur des colonnes w_k . Ces colonnes w_k de dimension p permettent de transformer la matrice X en un vecteur t_k reprenant les scores des composantes principales (voir l'équation 3.8) [21].

$$t_k = \begin{pmatrix} x_1 \\ x_2 \\ \vdots \\ x_n \end{pmatrix} \begin{pmatrix} w_{1,k} \\ w_{2,k} \\ \vdots \\ w_{p,k} \end{pmatrix} \quad (3.8)$$

Les scores obtenus dépendent des valeurs des variables d'origine. Un score élevé d'un échantillon pour une composante principale particulière signifie que la probabilité de trouver des particules liées à la masse des pics ayant une forte corrélation est élevée.

Les scores représentent donc la relation entre les échantillons alors que les colonnes w_k de loadings représentent le poids des variables dans les différences entre ces échantillons.

Chapitre 4

Résultats

L'objectif de ce mémoire est d'identifier les conditions optimales pour étudier des tissus utérins au moyen du ToF-SIMS afin d'y estimer les concentrations hormonales et d'identifier les lipides présents dans les couches de ce tissu. Pour ce faire, deux types d'expériences ont été mis en oeuvre. Tout d'abord, les hormones de référence, à savoir la Progestérone (P_4) et l'Estradiol (E_2), sont analysées et leur limite de détection est estimée. Dans un second temps, une comparaison est faite entre les couches composant l'utérus (voir section 2.1.1). Finalement, les différentes expériences effectuées sur les échantillons de tissu utérin sont comparées afin d'identifier les meilleures conditions d'analyse.

4.1 Analyse des hormones

4.1.1 Ionisations des hormones

Afin d'être capable d'identifier les pics correspondant aux hormones d'intérêt sur des spectres plus complexes, nous étudions d'abord des échantillons de référence faits à partir de solutions d'hormones pures et concentrées.

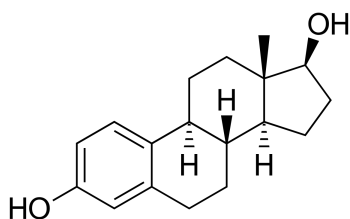


Figure 4.1 – Structure moléculaire de l'Estradiol (E_2).

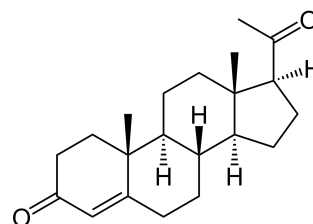


Figure 4.2 – Structure moléculaire de la Progestérone (P_4).

Estradiol (E_2)

L' E_2 , représentée à la figure 4.1, est une hormone ayant une masse molaire de 272,38 g/mol. Lorsque nous analysons un échantillon de référence, nous obtenons les spectres montrés à la figure 4.3.

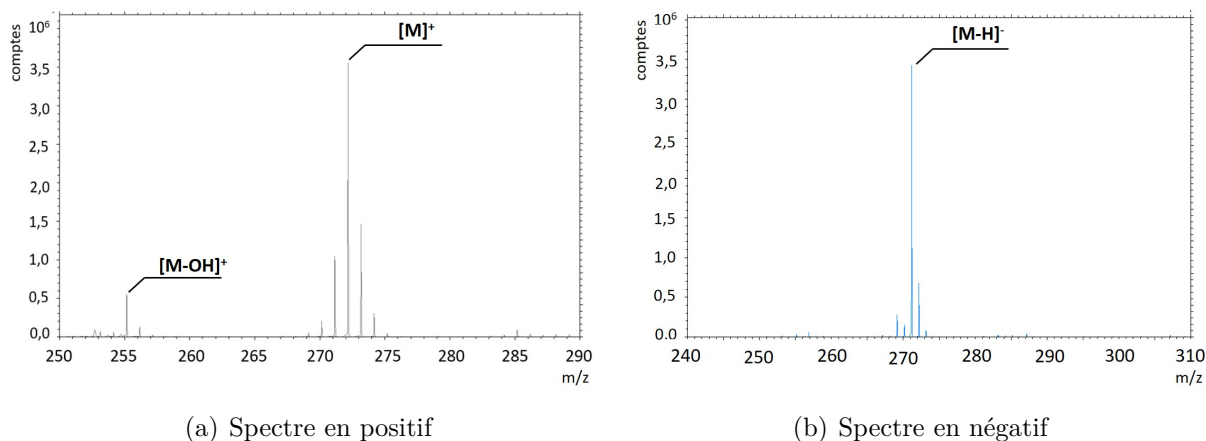


Figure 4.3 – Spectres de masse de référence pour l'Estradiol (E_2).

Les principaux pics visibles sur les spectres ci-dessus sont repris dans les tableaux 4.1 et 4.2. Ce sont les ions provenant de la molécule d' E_2 que nous espérons observer lors de l'étude des tissus utérins.

Table 4.1 – Pics de référence d'Estradiol en mode positif.

Formule	Identification	Masse
$C_{18}H_{23}O^+$	$E_2 [M-OH]^+$	255,1693
$C_{18}H_{24}O_2^+$	$E_2 [M]^+$	272,1752
$C_{18}H_{25}O_2^+$	$E_2 [M+H]^+$	273,1771

Table 4.2 – Pics de référence d'Estradiol en mode négatif.

Formule	Identification	Masse
$C_{18}H_{23}O_2^-$	$E_2 [M-H]^-$	271,1772
$C_{18}H_{24}O_2^-$	$E_2 [M]^-$	272,1754

Progestérone (P_4)

La P_4 , représentée à la figure 4.2, a une masse molaire de 314,461 g/mol. Cette hormone possédant une structure moléculaire similaire à celle de l' E_2 , nous nous attendons à observer le même modèle d'ionisation.

Les spectres de masses obtenus lors de son échantillon de référence se trouvent à la figure 4.4.

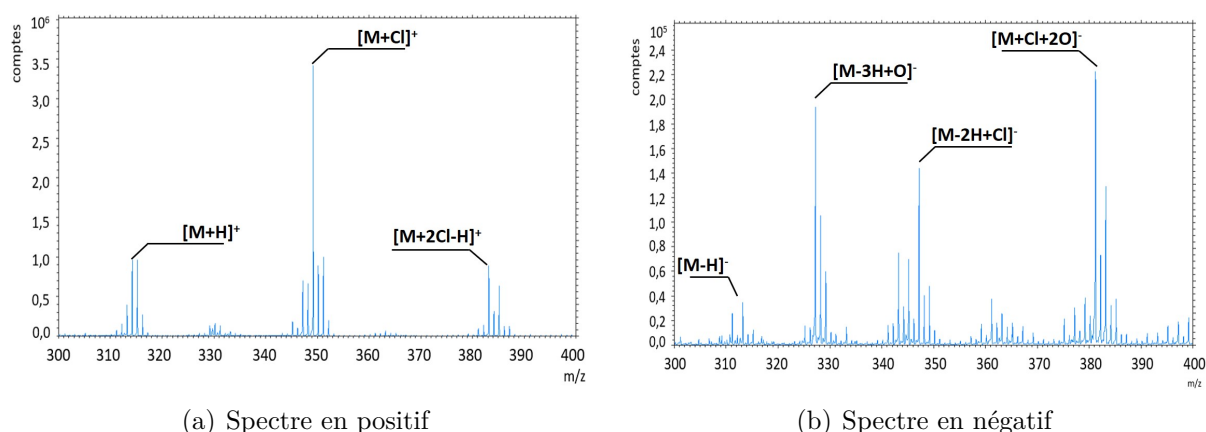


Figure 4.4 – Spectres de masse de référence pour l'Progesterone (P_4).

Les principaux pics visibles sur les spectres ci-dessus sont repris dans les tableaux 4.3 et 4.4. Nous observons que les pics les plus intenses ne sont pas ceux attendus. Ces derniers pourraient correspondre à des molécules d'hormone auxquelles s'est greffé un atome de Chlore. Ce résultat semble être confirmé par le faible écart de masse entre l'identification et le pic. Cela reste surprenant car la seule source de Chlore est le Chloroforme (CHCl_3) dans lequel est dilué la P_4 . L'hormone n'est pas censée réagir avec ce réactif. Toutefois, les pics attendus sont présents sur les spectres. Ce sont ces derniers que nous espérons observer lors des analyses des homogénats de tissus. En effet, si l'hormone a étonnement réagi avec le Chloroforme, nous ne devrions pas observer les pics les plus importants du spectre ci-dessus étant donné que nous n'avons plus dilué les hormones dans du Chloroforme mais bien dans de l'eau. Le Chlore ne sera donc plus omniprésent.

Les solutions d'hormones utilisées pour les échantillons suivants devaient être à base d'eau pour pouvoir s'incorporer à la préparation d'homogénat de tissu. Pour cela, nous utilisons les hormones solubles dans l'eau, c'est-à-dire munie d'une cage hydrophile. Les références ont néanmoins été faites non pas avec les hormones solubles dans l'eau mais avec l'hormone pure pour ne pas observer de pics liés à cette cage sur les spectres de référence.

Table 4.3 – Pics de référence de la Progesterone en mode positif.

Formule	Identification	Masse
$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2^+$	P_4 $[\text{M}]^+$	314,2194
$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2^+$	P_4 $[\text{M}+\text{H}]^+$	315,2246
$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3^+$	P_4 $[\text{M}+\text{O}]^+$	330,2119
$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_3^+$	P_4 $[\text{M}+\text{OH}]^+$	331,2215
$\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{Cl}^+$	P_4 $[\text{M}+\text{Cl}]^+$	349,1848
$\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{O}_2\text{Cl}_2^+$	P_4 $[\text{M}-\text{H}+2\text{Cl}]^+$	383,1481
$\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{O}_2\text{Cl}_2^+$	P_4 $[\text{M}+\text{H}+2\text{Cl}]^+$	385,1459

Table 4.4 – Pics de référence de la Progesterone en mode négatif.

Formule	Identification	Masse
$C_{21}H_{29}O_2^-$	$P_4 [M-H]^-$	313,1945
$C_{21}H_{30}O_2^-$	$P_4 [M]^-$	314,2029
$C_{21}H_{27}O_3^-$	$P_4 [M-3H+O]^-$	327,2104
$C_{21}H_{28}O_3^-$	$P_4 [M-2H+O]^-$	328,2195
$C_{21}H_{29}O_3^-$	$P_4 [M-H+O]^-$	329,2227
$C_{21}H_{28}O_2Cl^-$	$P_4 [M-2H+Cl]^-$	347,1896
$C_{21}H_{30}O_2Cl^-$	$P_4 [M-2H+Cl^{37}]^-$	349,1921
$C_{21}H_{30}O_4Cl^-$	$P_4 [M+Cl+2O]^-$	381,2033

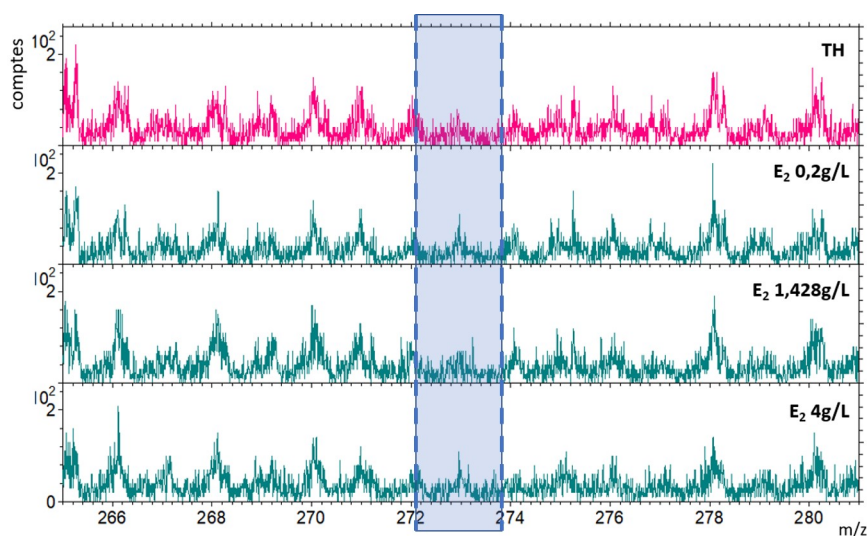
4.1.2 Calcul de la limite de détection

Afin d'estimer la limite de détection des deux hormones étudiées, nous analysons des échantillons à base d'homogénat de tissu contenant une quantité connue d'hormones. Nous avons commencé par analyser des échantillons contenant une concentration de 0,2 g/L. N'observant aucune trace d'hormones, nous avons augmenté graduellement les concentrations allant jusqu'à 5 g/L.

L'Estradiol (E_2)

Les parties d'intérêt des spectres des concentrations étudiées sont présentées à la figure 4.5 tandis que les résultats suite aux profilages des différents échantillons se trouvent à la figure 7.1. Seules ces parties sont affichées car le reste des spectres contient uniquement des pics présents dans le spectre de référence, c'est-à-dire des pics correspondants au tissu et non à la présence d' E_2 .

Pour rappel, les pics attendus pour l' E_2 doivent apparaître à des masses de 272 ou 273 g/mol. Nous observons que les résultats de spectrométrie de masse en mode positif sur des échantillons avec différents taux de concentration d' E_2 ne révèlent aucune présence significative de l'hormone même à haute concentration (voir figure 4.5). Seuls trois échantillons d' E_2 ont donc été analysés.

**Figure 4.5** – Spectre positif pour différentes concentrations d' E_2 (0,2 g/L, 1,428 g/L et 4 g/L)

Suite à cela, nous avons effectué des profilages sur les mêmes échantillons pour observer la distribution des hormones au sein de l'homogénéat de tissu. Les spectres obtenus et un exemple de profilage en mode positif sont présentés aux figures 7.1 et 4.7.

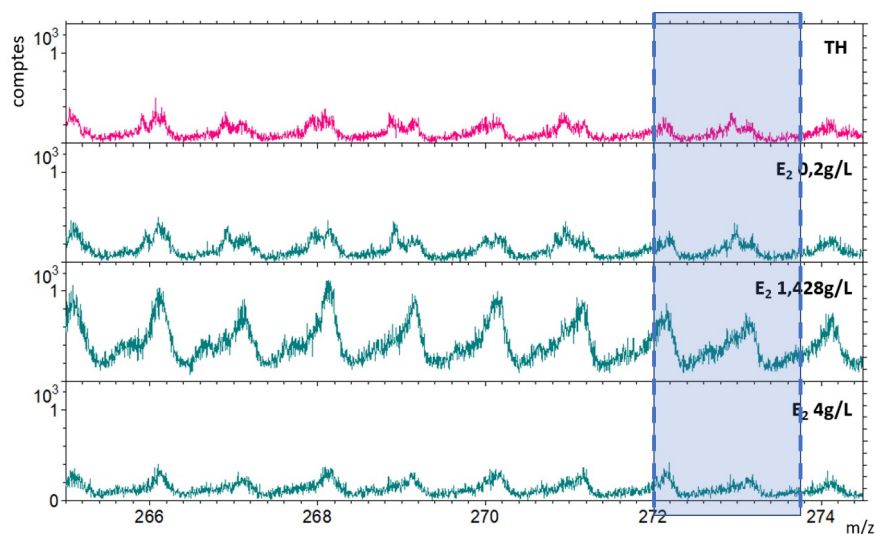


Figure 4.6 – Spectres obtenus suite à l'analyse de profilage en mode positif sur des échantillons d'homogénéat de tissu contenant différentes concentrations d'Estradiol (E_2) (0,2 g/L, 1,428 g/L et 4 g/L)

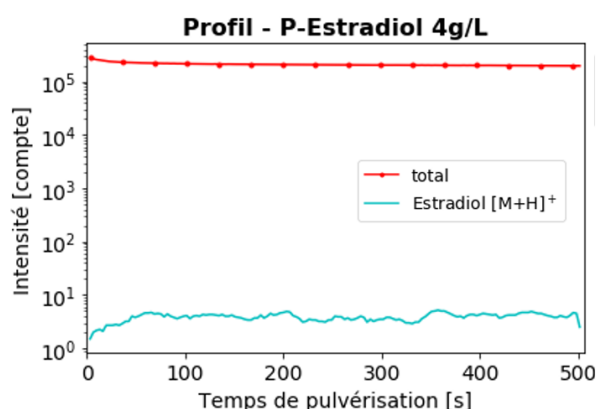


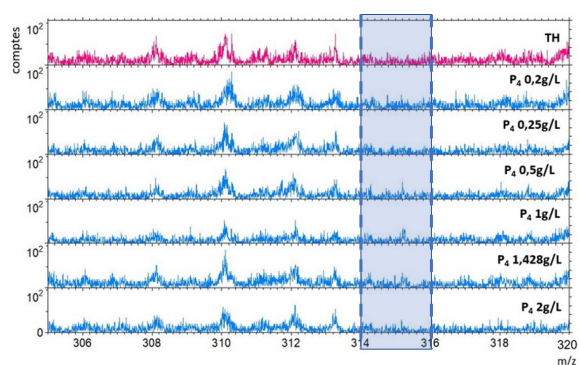
Figure 4.7 – Profil positif de l'Estradiol au sein d'un échantillon d'homogénéat de tissu contenant une concentration d'Estradiol (E_2) de 4g/L et une concentration d'homogénéat de 20g/L.

Comme pour les analyses par spectrométrie, le rapport signal/bruit est beaucoup trop faible pour détecter de l' E_2 . Le profil de la figure 4.7 représente l'intensité du signal de l'ion pseudo moléculaire d'Estradiol lors d'une analyse en profondeur. On y observe que même en creusant dans l'échantillon aucune augmentation du signal n'a lieu. Les résultats du profilage en mode négatif se trouvent en annexe. Des résultats similaires y sont observés.

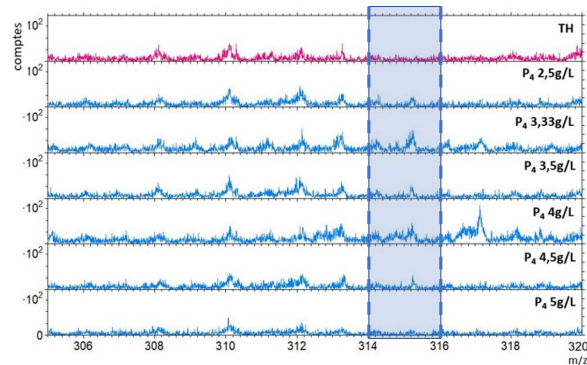
La Progestérone (P_4)

Les sections de spectres comprenant les masses 313g/mol et 315g/mol auxquelles nous attendons d'observer les ions pseudo moléculaires en négatif et en positif respectivement

sont présentés aux figures 4.8 et 4.9. Nous observons un pic à une masse de 315 g/mol dans les spectres négatifs. Toutefois, ce pic étant également présent dans le spectre de référence, nous en concluons que l'ion provient de l'homogénat de tissu. Nous n'observons aucun pic correspondant à un ion provenant de la molécule de Progestérone et ce quelque soit sa concentration dans l'homogénat de tissu.



(a) Spectres pour les échantillons ayant une concentration entre 0,2 et 2 g/L de progestérone



(b) Spectres pour les échantillons ayant une concentration entre 2,5 et 5 g/L de progestérone

Figure 4.8 – Spectres positifs des analyses de spectroscopie sur des échantillons d'homogénat de tissu contenant différentes concentrations de Progestérone.

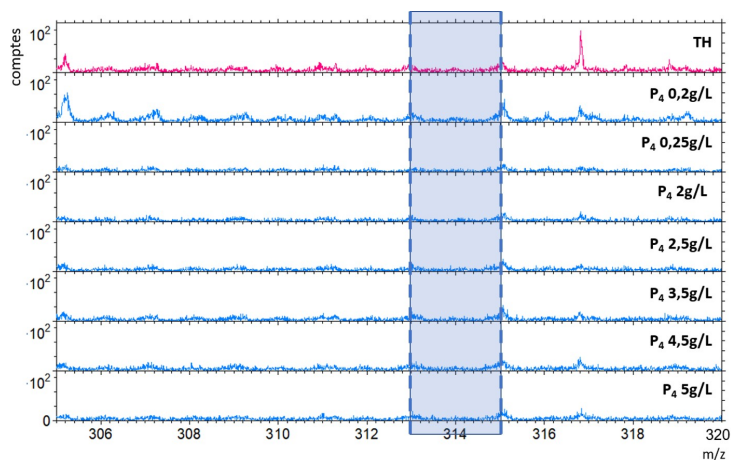
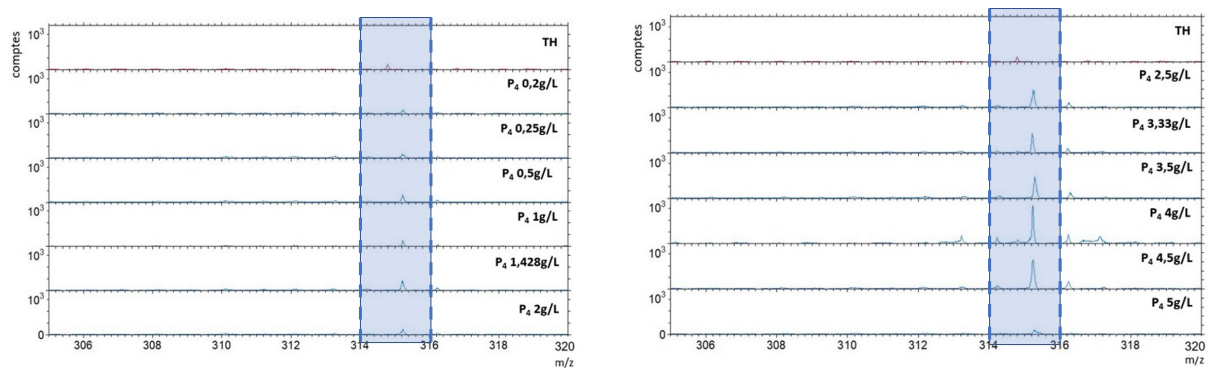


Figure 4.9 – Spectres négatifs des analyses de spectroscopie sur des échantillons d'homogénat de tissu contenant différentes concentrations de Progestérone.

Les analyses de profilage en mode positif, présentées à la figure 4.10, sont beaucoup plus instructives. En effet, nous observons un pic à la masse 315,2 g/mol correspondant à l'ion pseudo moléculaire de la progestérone. Nous observons également un pic important dans l'analyse du tissu homogénéisé de référence. Ce pic n'a pas été identifié. Cependant, il ne semble pas ressortir dans les spectres des échantillons contenant de la P_4 . Cela peut être dû à la présence de la progestérone qui offre un nouvel environnement (voir section 2.2.4).



(a) Spectres des profils pour les échantillons ayant une concentration entre 0,2 et 2 g/L de progestérone

(b) Spectres des profils pour les échantillons ayant une concentration entre 2,5 et 5 g/L de progestérone

Figure 4.10 – Spectres de masse positifs des analyses de profilage d'échantillons d'homogénat de tissu contenant différentes concentrations de Progestérone (P_4).

Un exemple de profil est illustré à la figure 4.11. Lorsque nous regardons de plus près ce profil, nous voyons que l'intensité en début d'analyse est proche de zéro et augmente avec la profondeur d'analyse jusqu'à se stabiliser. Nous pouvons en conclure que l'hormone se trouve au sein du tissu et non à la surface.

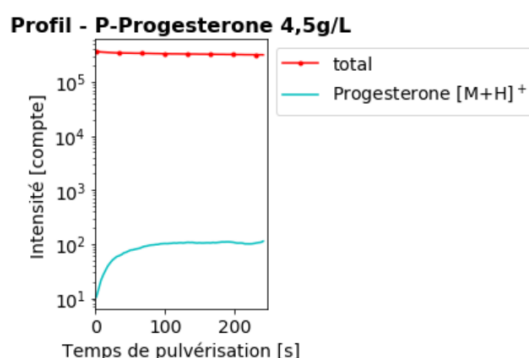
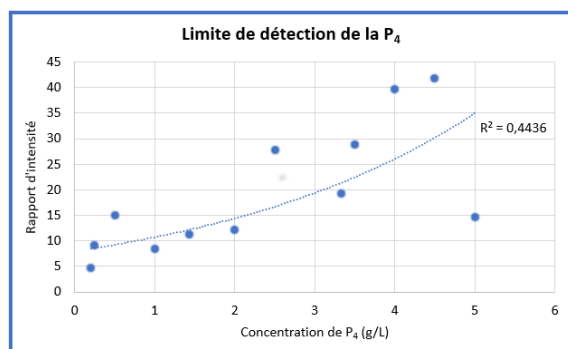
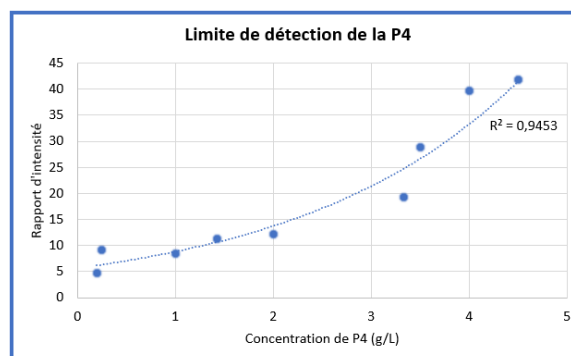


Figure 4.11 – Profil de la progestérone au sein d'un échantillon d'homogénat de tissu contenant une concentration de Progestérone (P_4) de 4,5g/L.

Suite à la détection d'ions issus de la molécule de Progestérone dans les spectres correspondants aux profilages, nous décidons de comparer les résultats liés aux différentes concentrations afin de déterminer la limite de détection de cette hormone. Pour ce faire, nous normalisons l'intensité des pics de l'ion pseudo moléculaire de chaque spectre par la dose totale d'ions secondaires analysées et par l'intensité du même pic de l'échantillon de référence. Les résultats sont ensuite placés dans un graphe présent à la figure 4.12(a).



(a) Graphe avec l'ensemble des résultats obtenus

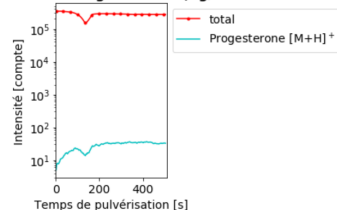
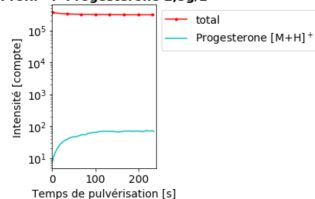
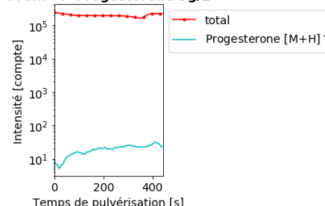


(b) Graphe après éliminations des valeurs aberrantes

Figure 4.12 – Graphe pour la limite de détection de la Progestérone (P_4).

Lorsque nous étudions le graphe obtenu, trois concentrations présentent des intensités anormales, à savoir, 0,5 g/L, 2,5 g/L et 5 g/L (voir figure 4.12(a)). En regardant de plus près les profils de ces concentrations, nous voyons qu'un problème est survenu durant l'analyse de l'échantillon avec une concentration de P_4 de 0,5 g/L (voir figure 4.13(a)). De plus, pour la concentration de 5g/L, nous n'observons pas du tout le même schéma d'augmentation de l'intensité de l'hormone en creusant dans le tissu (voir figure 4.13(c)). Enfin, pour la dernière concentration anormale, 2,5 g/L, l'intensité semble beaucoup trop importante par rapport aux autres concentrations, son profil semble se comporter comme prévu (voir figure 4.13(b)). Les trois analyses ayant été faites le même jour, une erreur a pu être commise lors de la préparation de ces échantillons.

Nous retirons donc ces concentrations pour tracer un nouveau graphe illustré à la figure 4.12(b). Le coefficient de détermination (R^2) est nettement plus grand. Celui-ci représente la qualité de la prédiction d'une régression linéaire. Nous observons que la régression se stabilise pour des concentrations de l'ordre du dixième de gramme par litre. En effet, pour ces concentrations d'hormone, le rapport signal/bruit est inférieur à 3, ce qui correspond à une incapacité à détecter l'hormone selon l'article de Vorng [62]. Ces concentrations correspondent donc à la limite de détection de la P_4 .

Profil - P-Progestérone 0,5g/L(a) Échantillon d'homogénat de tissu contenant une concentration de Progestérone (P_4) de 0,5g/L**Profil - P-Progestérone 2,5g/L**(b) Échantillon d'homogénat de tissu contenant une concentration de Progestérone (P_4) de 2,5g/L**Profil - P-Progestérone 5g/L**(c) Échantillon d'homogénat de tissu contenant une concentration de Progestérone (P_4) de 5g/L**Figure 4.13** – Profils positifs anormaux de la Progestérone au sein d'un échantillon.

Le mode négatif présente également des pics pour certaines concentrations de P_4 . Cependant les intensités détectées sont nettement plus faibles que celles en mode positif. La limite

de détection est encore plus haute que celle obtenue pour le mode positif. C'est pourquoi seuls les résultats en mode positif sont affichés et les résultats négatifs sont en annexe.

4.1.3 Discussion

L'étude de l'E₂ n'a pas eu les résultats escomptés. Nous nous sommes basés sur une seule étude [62] qui estimait la limite de détection de 20 médicaments et a montré des résultats significatifs uniquement pour 11 d'entre eux. Nous en concluons que l'E₂ a une limite de détection nettement plus haute que 4g/L. Cette valeur n'a pas été calculée car nous savions que les tissus utérins ne pouvaient contenir une telle concentration en E₂. Nous avons donc préféré nous concentrer sur la suite des analyses.

Les résultats des différentes expériences réalisées sur les échantillons contenant de la P₄ permettent de conclure que l'hormone ne se trouve pas à la surface du tissu mais qu'elle a tendance à se situer dans les couches inférieures. En effet, le fait que nous n'observons pas l'hormone lors d'analyses en surface mais bien lors d'analyses en profilage prouve sa présence au sein-même du tissu. Nous nous attendons donc au même comportement dans les tissus utérins.

Toutefois, après avoir analysé les deux hormones, nous nous attendons à n'en observer aucune au sein des tissus utérins. En effet, les concentrations sanguines étant de l'ordre de 200 ng/L pour l'E₂ et 20 µg/L pour la P₄, nous pensons que les concentrations au sein du tissu devraient être du même ordre. Les résultats obtenus sont donc peu prometteurs pour l'observation des hormones lors des analyses du tissu utérin. Nous nous attarderons donc sur la composition lipidique des tissus. Cependant, nous resterons vigilants dans le cas où une concentration nettement plus élevée qu'attendue serait présente dans les tissus.

4.2 Analyses des couches de l'utérus

Les deux couches principales qui composent les tissus utérins sont le myomètre et l'endomètre (voir section 2.1). Afin de les différencier, lorsque nous étudions ces tissus, nous prenons à la fois des mesures dans l'endomètre et à la fois dans le myomètre. Les spectres sont ensuite comparés qualitativement et par PCA.

Des analyses ont été faites dans différentes conditions qui seront présentées dans la section suivante (section 4.3). Pour toutes les conditions, excepté pour les traitements avec une matrice MALDI, six mesures par spectrométrie de masse ont été prises dans chaque mode, trois dans le myomètre et trois dans l'endomètre.

La première étape du travail a été d'établir une liste des ions présents dans les tissus. Pour cela, un travail de recherche a été effectué afin de trouver des correspondances entre les masses où un pic d'intensité importante était observé et des ions provenant de biomolécules. Deux listes ont été établies, l'une en mode positif et l'autre en mode négatif. La majorité des ions identifiés sont issus de molécules de phospholipides. Deux listes reprenant les principaux types de lipides se trouvent aux tableaux 4.5 et 4.6. Les deux listes complètes se trouvent quant à elles en annexe.

Table 4.5 – Liste d'identification de quelques pics en positif.

Formule	Identification	Masse
$C_4H_{10}N^+$	Val	72,0734
$C_5H_{15}PNO_4^+$	PC HG $[M]^+$	184,0771
$C_{27}H_{46}O^+$	Cholesterol $[M]^+$	386,3394
$C_{39}H_{81}N_2O_6PNa^+$	SM (34 :0) $[M+Na]^+$	727,5648
$C_{41}H_{83}N_2O_6PK^+$	SM (36 :1) $[M+K]^+$	769,6107
$C_{44}H_{86}NO_8P^+$	PC (36 :1) $[M]^+$	787,6153
$C_{45}H_{88}NO_8P^+$	PC (37 :1) $[M]^+$	801,5919
$C_{47}H_{90}NO_8P^+$	PC (39 :2) $[M]^+$	827,5872
$C_{46}H_{88}NO_8PNa^+$	PC (38 :2) $[M+Na]^+$	836,6343
$C_{47}H_{95}N_2O_6PNa^+$	SM (42 :1) $[M+Na]^+$	837,6583
$C_{49}H_{88}NO_8P^+$	PC (41 :5) $[M]^+$	849,588
$C_{48}H_{94}NO_8PK^+$	PC (40 :1) $[M+K]^+$	882,6075

Table 4.6 – Liste d'identification de quelques pics en négatif.

Formule	Identification	Masse
$C_4H_7N_2O_3^-$	Asparagine $[M-H]^-$	131,045885
$C_2H_7NO_4P^-$	PE HG $[M-H]^-$	140,01881
$C_5H_{11}NO_5P^-$	PE frag	196,041834
$C_9H_{16}PO_9^-$	PI-frag	299,065001
$C_{27}H_{46}O^-$	Cholesterol $[M]^-$	386,382866
$C_{39}H_{80}N_2O_6P^-$	SM (34 :0) $[M-H]^-$	703,554488
$C_{41}H_{79}NO_7P^-$	PE (36 :0) $[M-H_2O]^-$	728,564091
$C_{44}H_{82}O_8P^-$	PA (41 :2) $[M-H]^-$	769,535347
$C_{43}H_{83}NO_8P^-$	PE (38 :1) $[M-H]^-$	772,577396
$C_{46}H_{82}N_2O_6P^-$	SM (41 :6) $[M-H]^-$	789,542728
$C_{42}H_{81}NO_{10}P^-$	PS (36 :0) $[M-H]^-$	790,561853
$C_{40}H_{76}NO_{12}S^-$	Sulfatide (OH (16 :0))	794,52023
$C_{46}H_{92}N_2O_6P^-$	SM (42 :1) $[M-CH_3]^-$	799,646254
$C_{48}H_{92}NO_{11}S^-$	Sulfatide (C (24 :0))	890,625602
$C_{47}H_{88}O_{13}P^-$	PI (38 :1) $[M-H]^-$	891,612326

En positif, la majorité des ions identifiés proviennent de lipides de Phosphatidylcholine (PC) et de Sphingomyéline (SM) alors qu'en négatif nous trouvons des ions de Phosphatidyléthanolamine (PE), de Phosphatidylinositol (PI), d'Acide phosphatidique (PA), de Sphingomyéline (SM) et de sulfatide.

Une fois ces listes de pics obtenues, nous les utilisons afin de déterminer les variables de la PCA. Cette Analyse Multivariées (MVA) a été utilisée pour comparer les six mesures pour chaque condition. La matrice X comprenant l'ensemble des variables était donc composée des intensités des p pics identifiés par la liste pour les n mesures différentes (voir section 3.2.5). Dans ce cas, n vaut 6.

La différence entre les deux couches du tissu est plus marquée en mode négatif. En effet, lorsque nous observons l'ensemble des scores pour les différentes conditions, la séparation est toujours faite pour le mode négatif hormis pour l'échantillon avec un traitement TFA. Pour le mode positif, seul l'analyse d'un échantillon sans traitement placé sur de l'ITO permet la différenciation entre les deux couches. Pour un soucis de clarté, un seul résultat est présenté à la figure 4.14.

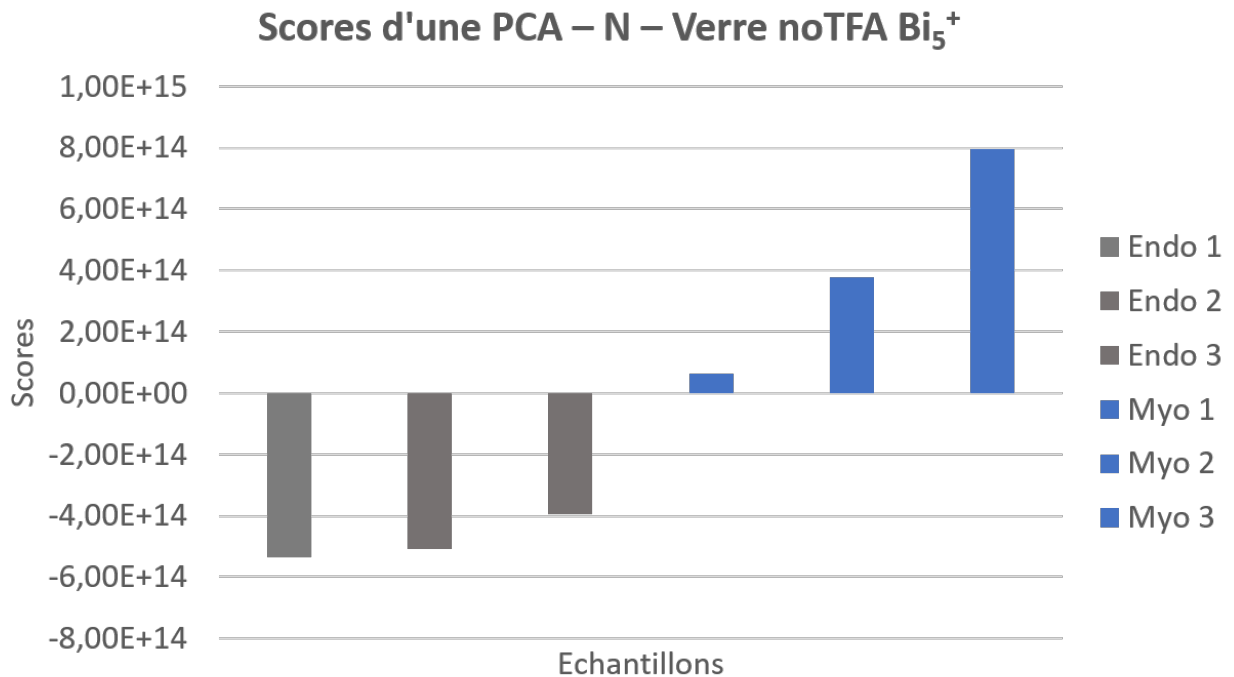


Figure 4.14 – Scores de la PCA appliquée à six mesures de spectroscopie avec un faisceau de Bi_5^+ (30 keV) prises sur un échantillon en verre en mode négatif. La PCA sépare les trois mesures prises dans l'endomètre (scores négatifs) des trois mesures prises dans le myomètre (scores positifs).

Nous observons directement que les trois mesures prises dans l'endomètre sont différenciées des trois mesures prises dans le myomètre et ce grâce au signe des scores. Nous en concluons que les compositions des deux couches sont assez différentes pour être facilement distinguées.

En plus de nous apprendre que les couches sont différenciables, la PCA nous apporte une matrice de loadings (W). Cette matrice nous renseigne sur l'importance du rôle des variables dans la différenciation des couches. Ces loadings sont également illustrés sous forme de graphe. Les pics positifs correspondent à des ions plus abondants dans le myomètre tandis que les pics négatifs correspondent à des ions principalement présents dans l'endomètre. La taille des pics correspond au rapport des proportions et dépend également de l'intensité initiale du signal de ce pic. Le graphe des loadings correspondant aux scores présentés est illustré à la figure 4.15.

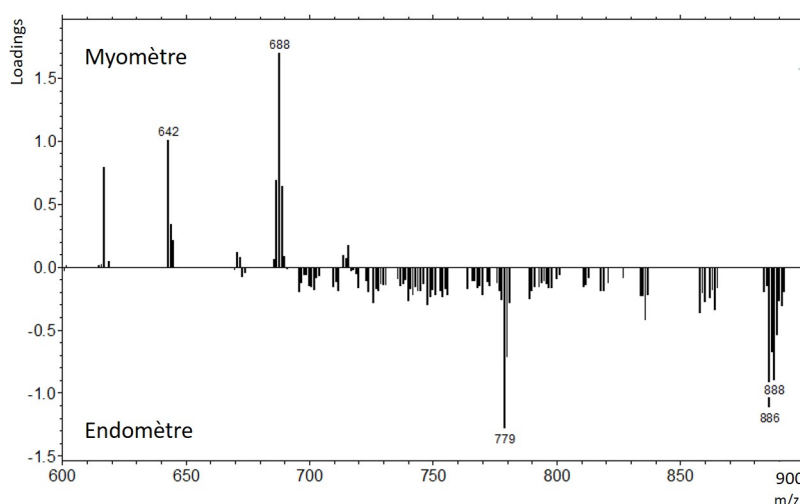
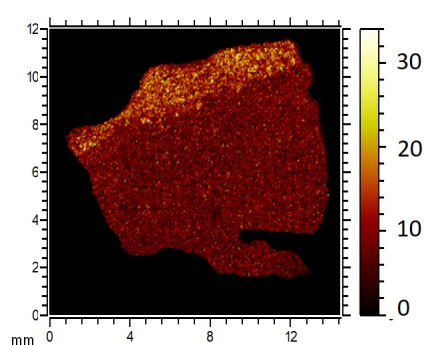


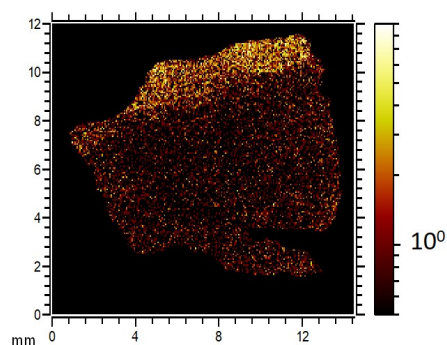
Figure 4.15 – Loadings de la PCA appliquée à six mesures de spectroscopie avec un faisceau de Bi_5^+ prises sur un échantillon en verre. L'intensité des pics représente le rôle de l'ion secondaire dans la différenciation des échantillons. Le score des mesures prises dans l'endomètre étant négatifs, les pics principalement présents dans cette couche sont représentés par des loadings négatifs tandis que les pics des particules présentes de manière plus abondantes dans le myomètre sont représentées par des loadings positifs.

Suite à cela, nous observons que certains lipides sont plus présents dans l'endomètre que dans le myomètre et inversement. Cette répartition étant plus visuelle sur les images, nous présentons les images correspondant aux principaux pics des loadings.

Nous voyons que les ions observés à haute masse sont plus présents dans l'endomètre. Il s'agit principalement de PI et de sulfatides en mode négatif. Lorsque nous regardons les images correspondant à des pics identifiés comme des ions issus de la molécule de PI et l'ion du groupe de tête (HG pour *Head Group*) d'un PI, nous voyons que ces deux ions sont beaucoup plus abondants dans l'endomètre (voir figure 4.16).



(a) PI HG identifié à une masse de 241,02 g/mol



(b) PI (38 :4) ($M - H$)⁻ identifié à une masse de 885,59 g/mol

Figure 4.16 – Images 2D de la répartition tissulaire de molécules de PI. Les molécules sont plus présentes dans l'endomètre, partie supérieure du tissu.

Les PE sont également présents en abondance dans l'endomètre. Lorsque nous additionnons les intensités de certaines molécules de PE, de sulfatides et de PI, nous reconstituons assez facilement l'endomètre (voir figure 4.17).

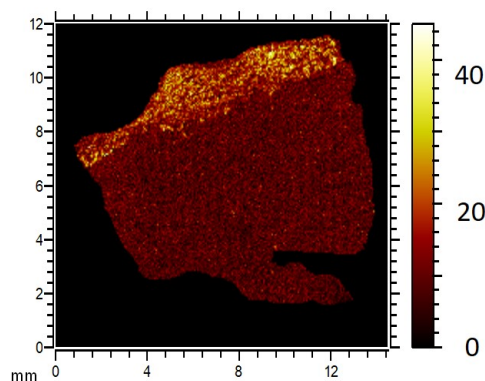


Figure 4.17 – Image 2D de de la répartition tissulaire d'ions reconstituant l'endomètre. Cette image fait la somme des répartitions de PE (39 :5) $[M - H]^-$, PE (39 :4) $[M - H]^-$, PI (36 :4) $[M - H]^-$, sulfatide (C22 :2) $[M - H]^-$, PI (36 :3) $[M - H]^-$, sulfatide (C22 :0) $[M - H]^-$ et PI(38 :5) $[M - H]^-$ identifiés à des masses de 778,56 g/mol, 780,55 g/mol, 857,53 g/mol, 858,51 g/mol, 859,52 g/mol, 862,58 g/mol et 883,57 g/mol respectivement.

D'autres ions, représentatifs de certaines molécules de SM et du cholestérol sont plus présents dans le myomètre comme illustré aux figures 4.18 et 4.19. On y retrouve également l'asparagine qui est un acide aminé.

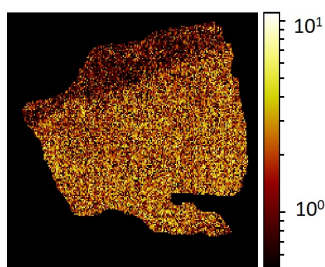


Figure 4.18 – Répartition de la molécule de cholestérol $[M - H]^-$ identifiée à une masse de 385,36 g/mol.

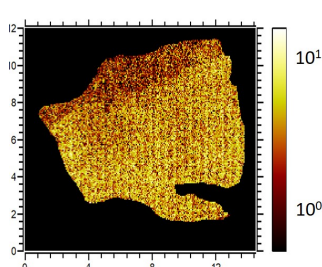


Figure 4.19 – Répartition de la molécule de SM(33 :1) $[M - H]^-$ identifiée à une masse de 687,51 g/mol.

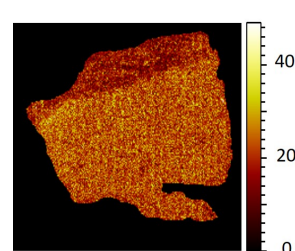


Figure 4.20 – Répartition de la molécule d'Asparagine $[M - H]^-$ identifiée à une masse de 131,04 g/mol.

De la même façon que pour l'endomètre, il est facile de reconstruire une image du myomètre en sommant différents ions provenant de molécules de SM et du cholestérol. Le résultat est visible à la figure 4.21.

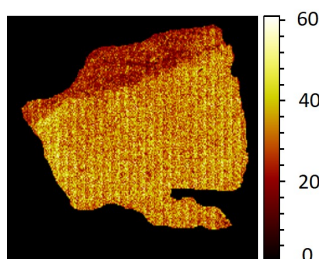


Figure 4.21 – Image 2D de de la répartition tissulaire de molécules reconstituant le myomètre. Cette image fait la somme des répartitions du Cholestérol $[M - H]^-$, d'un fragment de SM, de SM (33 :1) $[M - H]^-$ et de SM (33 :1) $[M]^-$ identifiés à des masses de 385,36 g/mol, 642,48 g/mol, 688,54 g/mol et 689,53 g/mol respectivement.

Lorsque nous superposons les résultats obtenus, nous retrouvons facilement l'ensemble du tissu. Une superposition des sommes présentées ci-dessus aux figures 4.17 et 4.21 est illustrée ci-dessous et montre l'endomètre en rouge et le myomètre en vert.

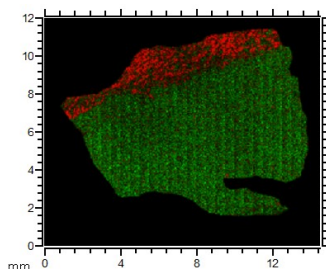


Figure 4.22 – Superposition des répartitions des sommes présentes aux figures 4.17 et 4.21. L'endomètre est représenté en rouge et le myomètre en vert.

Nous observons facilement à travers les images et grâce aux scores des PCA que l'endomètre et le myomètre ont deux compositions lipidiques différentes. En effet, les ions à haute masse ont tendance à se retrouver plus facilement dans l'endomètre alors que les ions ayant une masse inférieure à 700g/mol ont tendance à être plus abondants dans le myomètre. Néanmoins, l'ensemble des pics identifiés et donc des lipides se retrouvent aussi bien dans l'endomètre que dans le myomètre. Le ToF-SIMS est une méthode semi-quantitative et nous permet uniquement d'avoir une idée approximative de la concentration des molécules analysées.

4.3 Optimisation des paramètres d'analyse

L'un des objectifs de ce mémoire est d'optimiser les paramètres d'analyse ToF-SIMS appliquée aux tissus utérins. Pour cela, nous nous sommes basés sur les techniques utilisées dans l'analyse d'autres tissus déjà étudiés à ce jour et principalement les tissus de cerveau de souris (voir section 2.2.4).

Notre but est d'augmenter le rendement d'ions secondaires. Pour cela, il existe trois stratégies principales, l'optimisation du faisceau, la modification de la surface et la post-ionisation. Nous avons premièrement sélectionné la modification de la surface. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, analysé des échantillons montés sur deux substrats différents, l'ITO et le verre. Ensuite, nous avons également appliqué un traitement TFA aux échantillons avant de les insérer dans la machine pour permettre une augmentation du rendement de certains ions secondaires. Finalement, nous avons transféré une fine couche de matrice CHCA ou DHB sur les échantillons directement dans le ToF-SIMS juste avant de les analyser.

Deuxièmement, nous avons utilisé différents faisceaux d'ions primaires d'analyse, un composé de Bi_5^+ avec une énergie de 30 keV et un composé d' Ar_{3000}^+ avec une énergie de 10 keV (voir section 2.2.3).

L'ensemble des résultats obtenus est comparé et discuté ci-dessous. L'échantillon de référence correspond au tissu monté sur du verre n'ayant subi aucun traitement.

4.3.1 Les substrats

Comme dit précédemment, deux substrats différents ont été utilisés, le verre et l'ITO. Les résultats des analyses de spectrométrie de masse négative au Bi_5^+ sont comparés visuellement au moyen des spectres présents à la figure 4.26.

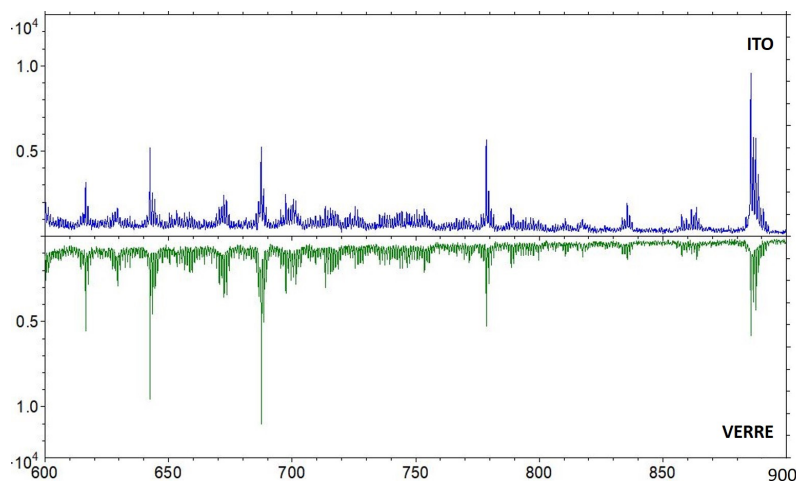
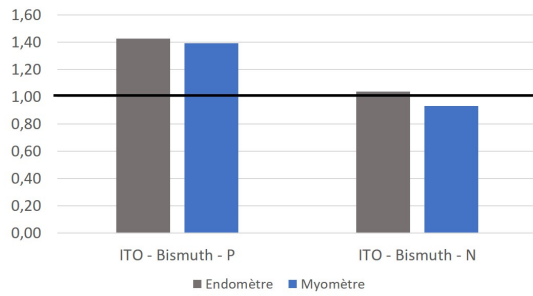


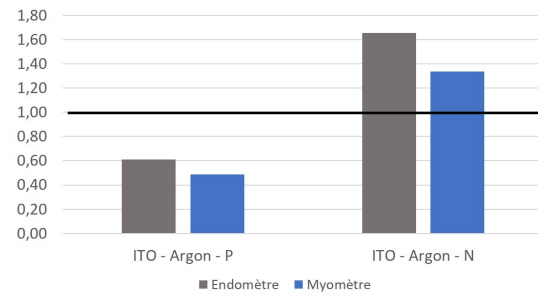
Figure 4.23 – Comparaison de spectrométrie de masse au Bi_5^+ entre des échantillons montés sur des substrats en verre et en ITO.

Le spectre représenté en bleu dans la partie supérieure de l'image correspond à la spectroscopie de masse sur ITO alors que le spectre en vert correspond à une analyse sur verre. Nous y observons quelques différences. Les expériences sur ITO semblent émettre plus d'ions à haute masse, alors que pour des masses inférieures à 700 g/mol, nous observons l'inverse. Les deux semblent donc se compenser sur l'intensité totale perçue.

Lorsque nous étudions quantitativement le rapport des intensités obtenues entre les deux substrats, nous n'obtenons pas ou très peu d'amélioration du rendement ($<1,65$). Cela signifie que dans le meilleur des cas, l'ITO a permis d'augmenter le signal d'un facteur 1,6 par rapport à celui obtenu par une analyse sur verre. L'ensemble des rapports sont présentés dans les histogrammes de la figure 4.24. Ces données ont été obtenues en normalisant les intensités des pics par la dose totale d'ions primaires pour les analyses au Bismuth et par l'intensité totale pour les analyses à l'Argon. Ensuite, les données obtenues ont été normalisées par l'analyse de référence, la mesure sur verre avec le faisceau d'ions primaires correspondant. La moyenne des données doublement normalisées se trouvent dans les histogrammes ci-dessous.



(a) Analyse au Bi_5^+ en positif (P) et en négatif (N)



(b) Analyse à l' Ar_{3000}^+ en positif (P) et en négatif (N)

Figure 4.24 – Comparaison quantitative de spectrométrie de masse entre des échantillons montés sur des substrats en verre et en ITO pour des analyses faites dans l'endomètre et le myomètre. Une colonne représente la moyenne des intensités doublement normalisées pour chaque mode d'analyse et chaque couche de tissus.

L'histogramme de la figure 4.24, nous apprend que les mesures au bismuth en mode positif sur ITO permettent un meilleur rendement en ions secondaires. En effet, la ligne noire correspond à l'analyse de référence, l'analyse sur verre, qui a donc un rapport de 1 avec elle-même. Le rapport de la moyenne des intensités obtenues avec les deux substrats étant supérieur à 1 pour l'analyse positive au Bismuth sur ITO signifie donc que le signal détecté est plus intense grâce à l'augmentation du rendement en ions secondaires total.

De la même façon, nous voyons sur l'histogramme de la figure 4.24(b) que le rendement d'ions secondaires est amélioré par l'ITO pour l'analyse à l'Argon en mode négatif. A contrario, le rendement de la même analyse en mode positif est impacté défavorablement par ce substrat.

Toutefois, en cas d'amélioration, le signal n'augmente que très peu. La modification de ce paramètre semble peu utile pour nos recherches.

Suite aux mesures de spectrométrie, nous avons comparé des échantillons en termes d'imagerie 2D. Les images obtenues représentant l'ensemble de l'échantillon sont présentées à la figure 4.25. Nous observons un effet de charge différentiel important dans l'imagerie sur verre qui est encore plus marquant sur la figure 4.25(b) représentant la répartition de l'atome K^+ au sein du tissu. Le changement de substrat pour l'ITO permet une meilleure analyse. En effet, avec ce substrat, nous ne rencontrons pas d'effet de charge différentiel. Il suffit donc de régler une seule fois la compensation de charge pour toute la durée de l'analyse.

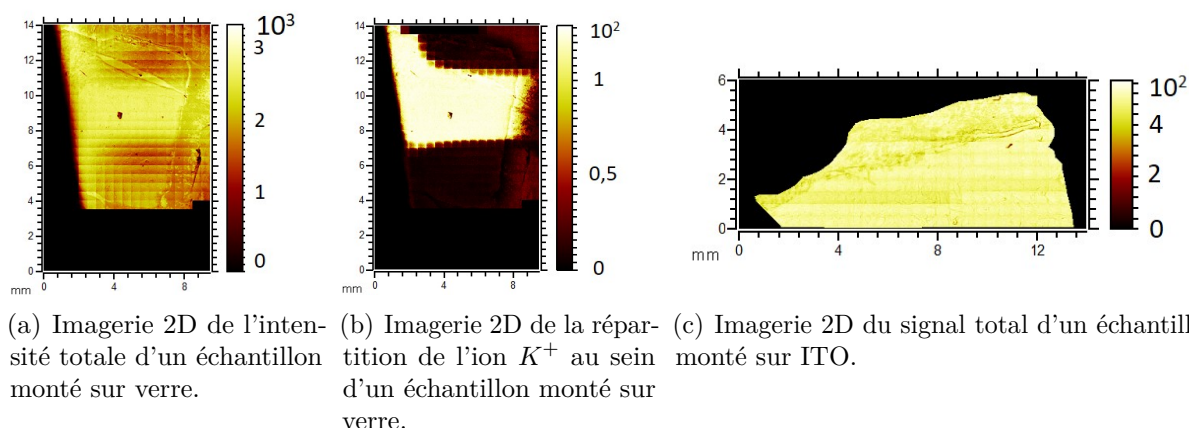


Figure 4.25 – Imagerie 2D en positif d'échantillons de tissu utérin.

4.3.2 Les faisceaux

Deux faisceaux d'analyse différents ont été utilisés, les faisceaux de Bi_5^+ et d' Ar_{3000}^+ .

Lorsqu'un échantillon est bombardé avec un faisceau d'agrégats d' Ar_{3000}^+ , la fragmentation des molécules est réputée moins importante qu'avec des agrégats de Bi_5^+ . Nous observons en effet plus d'intensité à haute masse. Cela est visible à la figure 4.26 qui compare des spectres de masse issus d'une analyse au Bismuth représenté en bleu et d'une analyse à l'Argon représenté en vert pour un même temps d'analyse et des courants de 0.041 pA et de 0.034 pA respectivement.

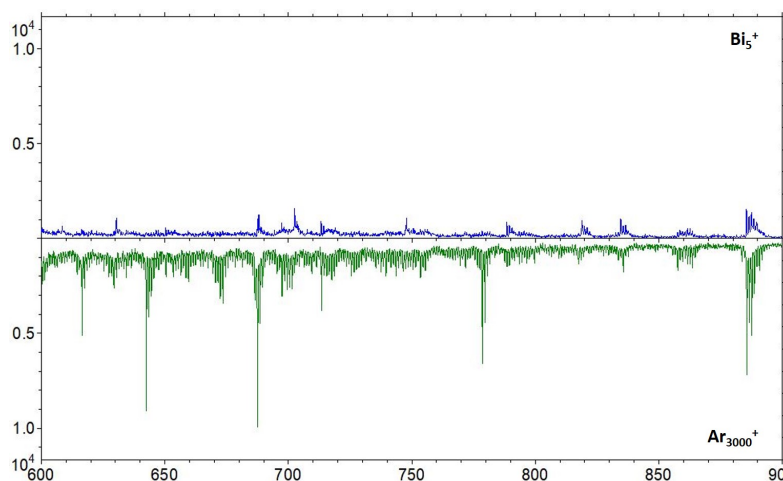


Figure 4.26 – Comparaison de spectrométrie de masse sur verre en négatif dans l'endomètre entre des analyses au Bismuth et à l'Argon. Le spectre supérieur en bleu correspond au bismuth et le spectre inférieur en vert à l'Argon.

Sur ces spectres, nous voyons l'intensité des ions détectés à haute masse est nettement plus élevée pour une analyse à l'Argon (spectre vert) que pour une analyse au Bismuth (spectre bleu). Les intensités à faible masse ne sont pas représentées car nous y portons peu d'intérêt. Ces ions proviennent de fragments de molécules.

4.3.3 Les traitements

Différents traitements de l'échantillon ont été utilisés afin d'augmenter le rendement d'ions secondaires, le traitement TFA et le dépôt de deux matrices (DHB et CHCA). L'analyse qui permet de les comparer est le profilage.

Une épaisseur optimale de matrice permet d'observer les meilleurs résultats possibles. Or, cette épaisseur n'étant pas connue, nous transférons la matrice pour en déposer une dose plus que suffisante sur l'échantillon. Lors de l'étude des résultats, nous sélectionnons la partie où les intensités sont amplifiées. Avant cette zone, la couche de matrice est trop épaisse et ne permet donc pas d'analyser l'échantillon et après, trop fine pour en tirer les avantages car il n'y a plus assez de matrice (voir figure 4.27).

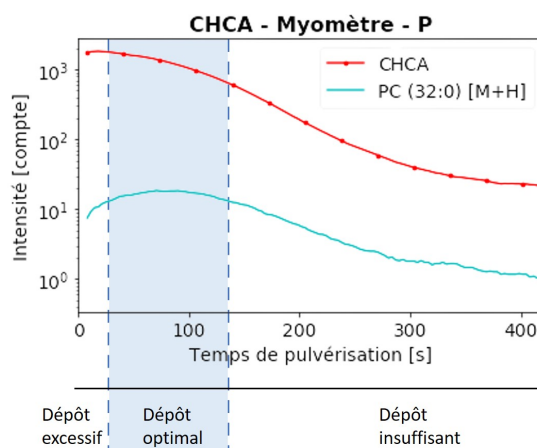


Figure 4.27 – Profil en profondeur des ions secondaires positifs émis par un échantillon de myomètre recouvert de CHCA. La zone bleue représente la partie des données sélectionnées pour l'étude de l'échantillon.

Le mode positif

Les différents traitements sont comparés et leur facteur d'amplification de signal par rapport à l'échantillon de référence sont présentés dans les histogrammes de la figure 4.28. Ces facteurs sont calculés de la même façon que précédemment.

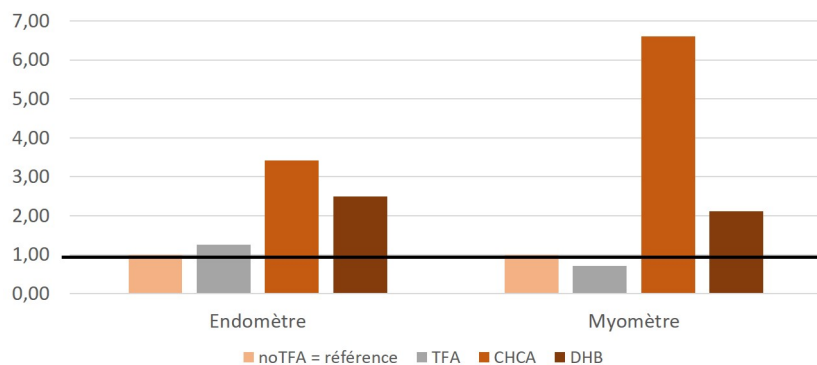
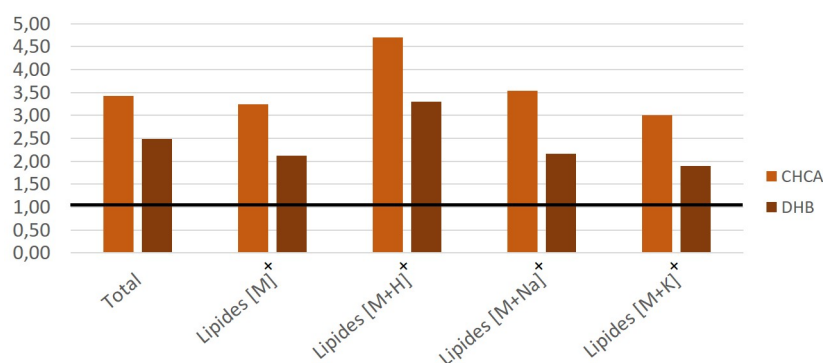


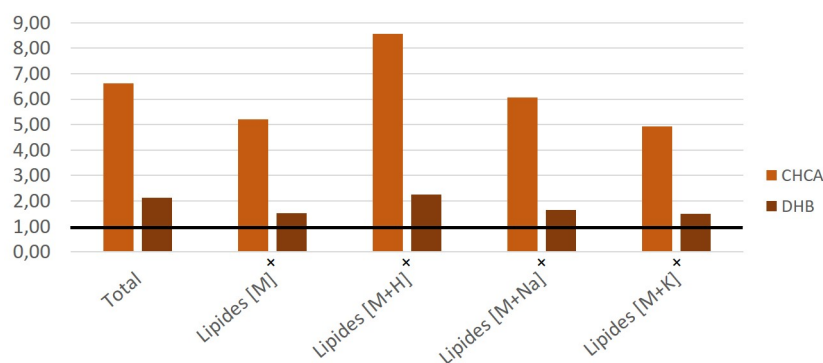
Figure 4.28 – Comparaison de l'augmentation moyenne du signal de l'ensemble des pics en fonction des différents traitements appliqués aux tissus utérins en positif.

Nous voyons que le traitement TFA représenté en gris dans l'histogramme n'est pas ou très peu efficace que ce soit dans l'endomètre ou le myomètre. En effet, l'intensité du signal est dans le même ordre de grandeur que celle obtenue par l'analyse de référence. Nous nous concentrons donc sur l'étude des dépôts de matrice.

D'une manière générale, le CHCA améliore plus le signal mesuré que le DHB. Effectivement, les colonnes correspondant au CHCA dominent l'histogramme. Nous étudions d'avantage ces résultats pour nous assurer que le DHB n'augmente pas le signal d'un type précis de molécule. Dans ce mode, nous détectons principalement des PC. Nous décidons donc de séparer ces lipides en fonction du type d'ion formé pour voir sur quels ions les matrices ont le plus d'impact. Les données obtenues se trouvent aux figures 4.29(a) et 4.29(b) pour l'endomètre et le myomètre respectivement.



(a) Endomètre



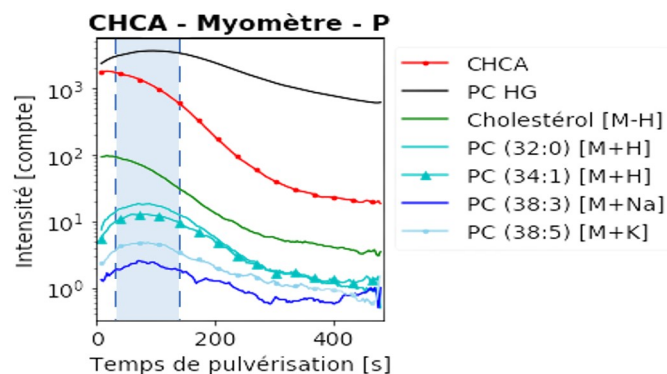
(b) Myomètre

Figure 4.29 – Effet des matrices sur l'augmentation du signal des lipides en fonctions de leur groupe ionisant en mode positif.

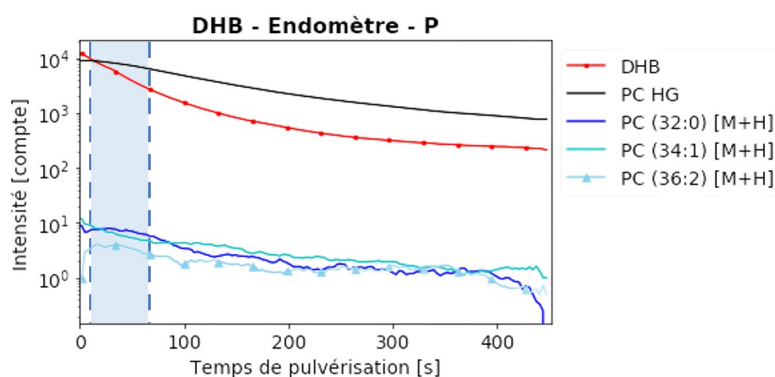
La colonne des ions pseudo moléculaires $[M - H]^+$ étant plus grande, nous en concluons que leur signal est le plus intensifié et ce par les deux matrices et dans les deux couches du tissu. Les colonnes du DHB restent, pour tous les types d'ions, inférieures aux colonnes correspondant au CHCA. Cette matrice améliore le rendement d'ions secondaires mais de manière moins significative que la matrice CHCA.

Lorsque nous traçons les profils de certains des ions, nous observons bien à la figure 4.30(a) que le CHCA augmente l'intensité du signal obtenu. En effet, les courbes des différents lipides forment une courbe en cloche dont le maximum est atteint lorsque l'épaisseur de la

matrice est optimale. Nous y voyons également que le signal est plus intensifié pour des ions pseudo moléculaires. La figure 4.30(b) quant à elle montre une légère augmentation de l'intensité du signal. Les graphes de la figure 4.30 correspondent aux couches les plus impactées par la matrice étudiée, à savoir le myomètre pour le CHCA et l'endomètre pour le DHB.



(a) Échantillon de myomètre recouvert de CHCA



(b) Échantillon d'endomètre recouvert de DHB

Figure 4.30 – Profil en profondeur des ions secondaires positifs émis par un échantillon recouvert de matrice.

Le mode négatif

De la même manière que pour le mode positif, les différents traitement ont été comparés en faisant la moyenne des données doublement normalisées. Ces rapports d'intensité du signal sont présentés à la figure 4.31.

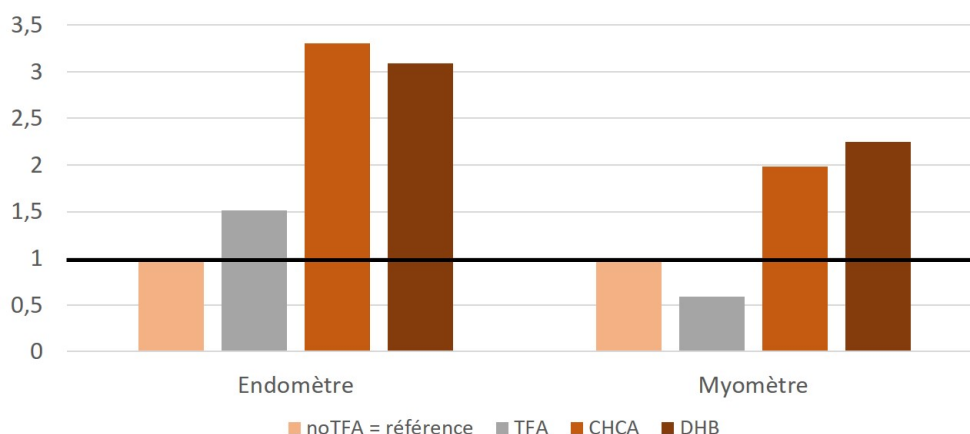
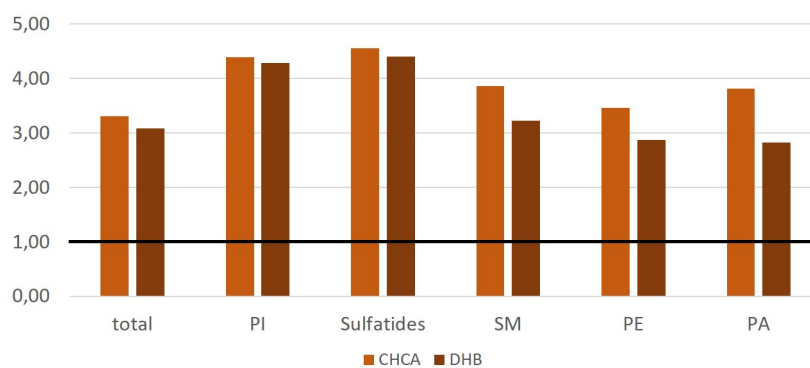


Figure 4.31 – Comparaison de l'augmentation moyenne du signal de l'ensemble des pics en fonction des différents traitements appliqués aux tissus utérins en négatif.

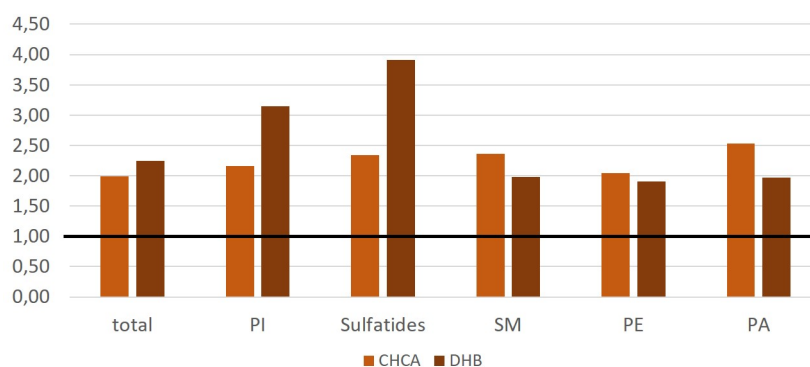
Sur cet histogramme, nous observons que la moyenne des intensités obtenues par l'analyse d'un échantillon ayant subi un traitement TFA est inférieure à celle de l'échantillon de référence pour le myomètre et de peu supérieure pour l'endomètre. Cela nous apprend que le traitement TFA, malgré nos attentes, n'améliore pas le rendement en ions secondaires. De nouveau, nous nous concentrons sur l'application de matrices.

La colonne la plus importante dans l'endomètre correspond au CHCA. Cette matrice est donc celle qui, en moyenne, augmente le plus l'intensité du signal dans cette couche de l'utérus. Pour le myomètre, nous voyons que c'est, cette fois-ci, le DHB, correspondant à la colonne la plus importante pour cette couche de tissu, qui a le plus d'impact sur le signal perçu.

Après avoir eu un aperçu global de l'effet des matrices sur les deux couches de l'utérus, nous étudions leurs effets cette fois-ci sur les différentes classes de lipides identifiées. En effet, contrairement au mode positif, une grande majorité des ions identifiés sont les ions pseudo moléculaire de la molécule correspondante. De plus, cinq classes de lipides différentes ont été identifiées contre deux en mode positif. Cela semble donc intéressant de faire une comparaison en fonction de celles-ci. Le résultat de ces analyses se trouvent aux figures 4.32(a) et 4.32(b) pour l'endomètre et le myomètre respectivement.



(a) Endomètre



(b) Myomètre

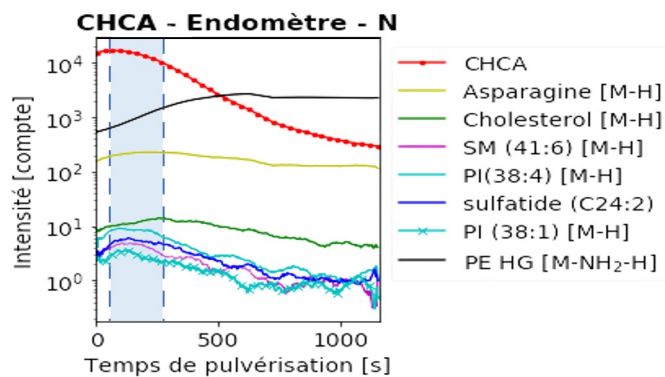
Figure 4.32 – Effet des matrices sur l'augmentation moyenne du signal de l'ensemble des lipides en fonctions de leur classe en mode négatif.

Dans les histogrammes ci-dessus, le total représente la moyenne de l'ensemble des intensités normalisées des pics identifiés c'est-à-dire la colonne présente dans le graphe de la figure 4.31. Pour les mesures prises dans l'endomètre, nous voyons que les colonnes correspondant au CHCA pour l'ensemble des lipides sont supérieures à la colonne du total. Cela signifie que cette matrice intensifie plus le signal des lipides correspondant à l'ensemble des pics identifiés à haute masse que les ions de masse plus faible. Nous observons le même comportement pour le DHB sur les PI, les Sulfatides et les SM. Les intensités des deux autres types de lipides sont, néanmoins, accrues d'un facteur 3 par rapport à la référence ce qui correspond au facteur d'amplification moyen du DHB.

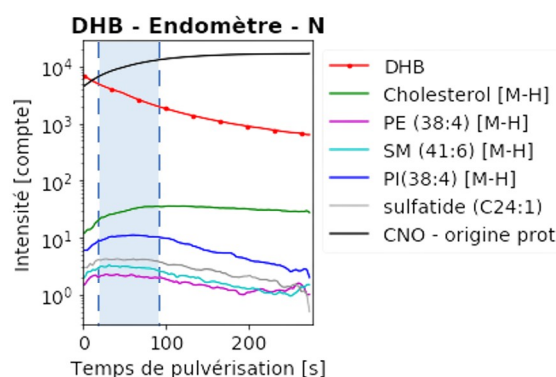
Pour le myomètre, les colonnes du DHB pour les PI et Sulfatides sont nettement plus hautes que celle du signal total. Pour les autres types de lipides, le DHB a, en moyenne, moins d'impact que sur le signal du reste des pics identifiés. Pour ces mêmes types de lipides, le CHCA est, comme pour l'endomètre, la matrice influençant le plus l'intensité du signal obtenu. Le DHB a donc une plus forte influence sur les PI et Sulfatides au niveau de l'endomètre.

Lorsque nous épluchons les données obtenues, nous observons l'augmentation de signal de certains ions due à la présence de la matrice comme annoncé par les histogrammes. Inversement, d'autres ions voient leur signal diminuer. C'est le cas pour le CNO^- qui est issu de protéines. Différents ions ont été sélectionnés afin de créer un panel représentatif des composants du tissus voyant leur signal impacté par la présence du traitement. Leurs

profils suite à l'application des matrices CHCA et DHB sont visibles aux figures 4.33(a) et 4.33(b) respectivement.



(a) Échantillon d'endomètre recouvert de CHCA



(b) Échantillon d'endomètre recouvert de DHB

Figure 4.33 – Profil en profondeur des ions secondaires positifs émis par un échantillon recouvert de matrice.

4.3.4 Discussion

Suite à l'étude des différents paramètres, nous avons pu déterminer quelles conditions choisir pour optimiser le résultat des analyses.

Dans un premier temps, nous avons remarqué que le choix du substrat influençait la qualité de l'imagerie 2D à grande échelle. En effet, lorsque nous utilisons un échantillon fixé sur du verre, un effet de charge différentiel apparaît. L'utilisation de la compensation de charge devrait être adaptée pour chaque image composant la mosaïque, ce qui n'est pas possible. Lorsque nous utilisons l'ITO, nous n'observons pas cet effet. Cela rend ce deuxième substrat, un choix idéal pour imager les échantillons analysés. Nous expliquons cela par les excellentes propriétés de conductivité de l'ITO contrairement au verre qui est un isolant.

Deuxièmement, le changement de faisceaux permet d'avoir des signaux plus intenses à haute masse grâce à l'Argon pour des temps équivalents d'analyse. Ce résultat était attendu, comme le prouvent les nombreuses études sur les agrégats d'Argon et la diminution de fragmentation suite à son impact avec l'échantillon en comparaison avec un faisceau composé d'ions polyatomiques de Bismuth [26, 36, 39, 33]. Ce sujet a été évoqué dans la section 2.2.5.

Finalement, les traitements appliqués aux échantillons avant analyse présentent des effets différents. En effet, le TFA ne montre aucun résultat bénéfique significatif qui permettrait d'augmenter le signal des ions étudiés. Au contraire, ce traitement diminue même dans certains cas le signal obtenu. Nous attendions des effets similaires à ceux observés lors d'études sur les cerveaux de souris [71], ce qui ne fut malheureusement pas le cas. En effet, dans ces travaux, une augmentation de signal des ions détectés était observée. La réaction du cholestérol, qui migre à la surface à cause du changement de température, avec le TFA, explique ce phénomène. Le mur formé par le cholestérol devient alors absent. Cela permet une augmentation du rendement ioniques des lipides situés initialement en dessous de ce mur.

Les deux matrices utilisées ont, quant à elles, permis d'amplifier le signal des différents ions étudiés.

En positif, le facteur d'amplification de signal moyen du CHCA est supérieur à celui du DHB dans les deux zones étudiées. Cela reste le cas lorsque nous analysons le type d'ions formés pour l'ensemble d'entre eux. Le CHCA permet d'atteindre des facteurs d'intensification valant 4.5 et 8 pour les ions moléculaires dans l'endomètre et le myomètre respectivement. Nous voyons donc ici une nette amélioration due à un meilleur rendement d'ions secondaires lors de l'analyse. Cette matrice est donc le meilleur choix parmi les traitements testés pour analyser les lipides dans les tissus utérins en mode positif.

Ces résultats sont comparés à une étude de tissus de cerveau recouvert de CHCA réalisée par Moshkunov et son équipe en 2021 [37]. Lorsque nous regardons la comparaison des spectres de référence et de tissu recouvert de CHCA, nous voyons que le signal total est augmenté en présence de la matrice. De plus, nous voyons qu'en mode positif, les PC sont les pics les plus importants du spectre. Ces ensembles de résultats semblent aller dans la même direction que les nôtres, à savoir une augmentation du signal total et plus particulièrement de celui des ions lipidique dans une gamme de masse similaire (720-850 g/mol). Néanmoins, le signal des ions provenant des lipides semble plus amplifié lorsque le groupe ionisant est un atome Na^+ . Ce résultat diffère un peu du nôtre. En effet, les ions dont l'augmentation de signal est la plus importante dans nos analyses se trouvent être les ions pseudo moléculaires. Cependant, les ions $[M + \text{Na}]^+$ sont très positivement impactés également.

Une autre étude a également montré l'augmentation de signal grâce au DHB déposé in situ sur de l'homogénat de tissu [72]. Lorsque nous comparons le facteur d'augmentation de signal, nous voyons que nous sommes en présence d'une augmentation du même ordre (2,5 et 2 pour les deux couches de tissu utérin contre environ 2 dans l'homogénat de tissu). Néanmoins, l'interprétation de cette comparaison est difficile étant donné le fait que l'étude est basée sur l'analyse de trois ions de plus faibles masses que celles observées dans ce mémoire.

Une autre recherche étudiant l'effet du DHB sur le rendement d'ions secondaires suite au bombardement d'un échantillon de cerveau de souris met en avant une grande diminution du signal de l'ion de cholestérol et une augmentation importante des ions $[M + \text{Na}]^+$ et $[M + \text{K}]^+$ [73]. Le profil de l'ion du cholestérol n'est pas affiché sur le profil du DHB mais lorsque nous regardons les données chiffrées, la matrice permet d'augmenter son signal de facteurs 2,6 et 3,7 dans l'endomètre et le myomètre. Cela ne correspond pas avec les résultats présents dans la littérature. Nous pouvons voir sur le profil de la figure 4.30(a) que le CHCA n'a également pas d'effet négatif sur le signal des ions de cholestérol, au

contraire cette matrice amplifie son signal. Ce résultat est également en contradiction avec les résultats obtenus par Moshkunov qui annonce un facteur 0,55 et donc une diminution de ce signal.

En mode négatif, les meilleures intensifications de signal moyen sont engendrées par la présence du DHB au niveau du myomètre et par celle du CHCA dans l'endomètre. L'utilisation du DHB en négatif semble même plus efficace qu'en positif (3 et 2,25 en négatif contre 2,5 et 2 en positif). Lorsque nous étudions l'impact des deux matrices sur les types de lipide identifié, nous observons que le DHB présente un facteur d'intensification plus élevé par rapport à sa moyenne pour deux types de lipide à savoir les PI et les Sulfatides. Ce facteur devient même équivalent à celui du CHCA au niveau de l'endomètre. Cette matrice semble agir fortement sur les lipides identifiés à plus haute masse. Pour les autres types de lipides, les facteurs d'amplification de signal des deux matrices sont plus ou moins équivalents avec une légère préférence pour le CHCA.

La comparaison avec la littérature en ME-SIMS s'avère plus difficile. En effet, les matrices sont connues pour être des donneuses de protons, les analyses sont essentiellement faites en mode positif.

Chapitre 5

Conclusion

Cette recherche a pour but de faire avancer la recherche médicale à expliquer certaines maladies liées à un dysfonctionnement du cycle utérin. En ce sens, les principaux objectifs de ce mémoire consistent à déterminer le taux d'hormones présent dans les tissus utérins et à étudier leur composition lipidique.

Dans un premier temps, afin de réaliser ces objectifs, une étude préliminaire des hormones d'intérêt, la Progestérone (P_4) et l'Estradiol (E_2), est nécessaire. Pour cela, des spectres de référence sont obtenus suite à l'analyse de solutions à forte concentration d'hormone. De plus, la limite de détection des deux hormones est calculée.

Ensuite, de nombreuses prises de mesures sont effectuées sur les tissus utérins, et ce, dans les deux couches principales composant l'organe, l'endomètre et le myomètre. Les échantillons sont analysés dans les deux modes à l'aide de différents faisceaux (Ar_{3000}^+ et le Bi_5^+), sur deux substrats distincts (le verre et l'ITO) et ce avec ou sans traitement préalable de la surface. Trois traitements ont été utilisés, le traitement TFA, le dépôt de CHCA et enfin le dépôt de DHB.

Les premières étapes ont révélé une limite de détection de la P_4 de l'ordre du dixième de gramme par litre quant à celle de l' E_2 , elle n'a pas pu être calculée. En effet, les analyses d'échantillons contenant jusqu'à 4 g/L d' E_2 n'ont pas permis d'observer cette hormone. Dans les deux, il est peu probable de les observer dans du tissu utérin car les concentrations attendues sont de l'ordre du microgramme par litre.

Les résultats des études de tissus ont montré une différence de composition entre les deux couches étudiées au point où elles ont pu être aisément séparées par la PCA en mode négatif. Ces mesures ont également permis d'identifier plusieurs classes de lipides présentes dans les tissus.

Finalement, les changements de paramètre ont montré que l'utilisation d'un substrat conducteur tel que l'ITO était recommandé pour l'imagerie par ToF-SIMS. De plus, les deux matrices ont permis d'augmenter le rendement ionique dans les deux modes. Cette augmentation correspond à des études faites sur d'autres tissus [37, 72, 73].

Chapitre 6

Perspectives

Ce chapitre a pour but de présenter des pistes d'études à explorer pour faire suite aux recherches de ce mémoire.

6.1 Analyse des hormones

Suite aux mesures et analyses des données faites au niveau des hormones durant ce mémoire, trois points me semblent intéressants à creuser.

L'analyse de la poudre de Progestérone non soluble. En effet, cette poudre a été utilisée pour obtenir son spectre de référence. Lors de l'analyse du graphe, nous avons trouvé des pics qui pourraient correspondre à des ions formés par la réaction de la Progestérone et du Chlore. Cela semble surprenant et demande plus ample étude afin de s'assurer que la poudre n'était pas contaminée.

Afin de faire ça, il faudrait placer la poudre sur un wafer de Silicum préalablement nettoyé comme expliqué dans la section 3.1. La poudre serait fixée avec du papier collant double face comme dans l'article de Nicholas et al. qui analysent des mélanges de poudres sèches [74]. Ensuite elle serait analysée au moyen du ToF-SIMS.

Le calcul de la limite de détection de l'Estradiol. Il serait en effet intéressant d'avoir une réelle idée de cette limite afin d'essayer de la diminuer avec des traitements de surface permettant l'augmentation du rendement ionique (voir point suivant).

Pour cela, il faudrait analyser des échantillons à base d'homogénat de tissu et des solutions d'hormones ayant une concentration plus élevée que celles testées durant ce mémoire ($> 4\text{g/L}$) tout en suivant la méthode de Vorng et son équipe [62].

L'optimisation du rendement ionique pour les échantillons d'hormones. Après avoir utilisé différents traitements sur les tissus utérins, nous avons vu que les matrices CHCA et DHB intensifiaient de manière générale le signal obtenu. Il serait donc intéressant d'analyser un échantillon d'hormone avec des traitements afin de voir si les matrices ont également un effet bénéfique sur la détection des hormones.

Pour commencer, nous utiliserions les traitements ayant montrés des résultats bénéfiques sur l'intensité du signal, le CHCA et le DHB. La préparation de la cible se ferait par sublimation avec les mêmes paramètres que décrit dans la section 3.2.2. Le collecteur serait alors un échantillon préparé à base d'homogénat de tissu et d'une concentration connue

d'hormones tels que ceux utilisés dans la partie du calcul de la limite de détection de ce mémoire.

Ensuite, d'autres traitements expliqués ci-dessous dans la partie optimisation pourront être utilisés.

La limite de détection pourrait être recalculée pour chaque traitement utilisé afin de voir le réel impact du traitement sur la détection des hormones.

6.2 Analyse des couches de l'utérus

Cette partie est la plus importante d'un point de vue médical et pourrait avoir de grands impacts au niveau des recherches sur les voies de guérisons de certaines maladies liées au cycle utérin. Pour l'analyse de ces tissus, énormément de travail reste à faire à long terme. Voici quelques pistes de recherches supplémentaires qui pourraient déjà avoir un impact sur la compréhension de ces maladies.

La vérification de l'identification des pics. En effet, afin d'identifier les pics durant ce mémoire, nous avons utilisé la littérature ainsi que des plateformes de bases de données sur les lipides [75, 76]. Les identifications ont été attribuées afin d'obtenir une déviation en masse inférieure à 100 ppm. Néanmoins, cela laisse une marge d'erreur. Aujourd'hui, il est possible de vérifier ces identifications au moyen de l'OrbiSIMS. Celui combine les avantages d'un analyseur ToF et d'un OrbiTrapTM pour atteindre une résolution en masse supérieure à 240 000 (contre 10 000 pour le ToFSIMS utilisé) et une déviation en masse inférieure à 2 ppm [77].

Un modèle est présent à l'université de Nottingham au Royaume-Uni. Il est possible d'aller y analyser ses échantillons.

L'identification du rôle des lipides dans le métabolisme étudié. Une fois l'identification des différents lipides confirmée, il faudrait comprendre et étudier leur rôle au sein des tissus. Cela permettrait de comprendre leur présence dans le tissu.

Pour cela, il faudrait lire la littérature à ce sujet et se référer à des experts dans le domaine [78].

L'élargissement du type d'utérus testés. Faire des analyses dans les mêmes conditions avec des échantillons provenant d'utérus différents semblent être une suite logique de ces études également. Plusieurs voies distinctes pourraient être suivies en ce sens, l'étude d'utérus à d'autres moments du cycle c'est-à-dire de leur préparation, l'étude d'utérus malades, l'étude d'utérus provenant de femmes d'âges différents ou bien encore l'étude d'utérus provenant de femmes ménopausées. Cela permettrait de comparer les signaux des lipides identifiés. Plus précisément, savoir si ils sont liés de près ou de loin à la concentration en hormones et/ou à certaines maladies.

Afin de réaliser cette étude, il faudrait analyser dans des conditions similaires des échantillons provenant de différentes hystérectomies. Les conditions complètes de la femme subissant l'intervention devront alors être connues (maladie, âge, étude du cycle préalable, etc.). Une fois les résultats des analyses obtenus, il faudra normaliser les résultats afin de les comparer.

6.3 Optimisation des paramètres d'analyse

La principale limite du ToF-SIMS est sa sensibilité (voir section 2.2.5). Afin d'obtenir des mesures de la meilleure qualité possible, nous devons tout faire pour augmenter cette sensibilité. Le paramètre influençant énormément la sensibilité et celui qui a la plus grande marge de progression est le rendement ionique. Plusieurs pistes non testées durant ce mémoire pourraient être utilisées afin de l'augmenter. En voici quelques unes.

L'utilisation d'un faisceau d' $(H_2O)_n - GCIB$. Un grand nombre d'étude a déjà prouvé l'augmentation du rendement ionique ainsi que la diminution de l'effet de matrice à l'aide de faisceau d' $(H_2O)_n - GCIB$ [79, 80, 81]. Ce serait donc intéressant d'analyser nos échantillon à l'aide de ce faisceau pour voir si nous observons le même type de résultats. La diminution d'effet de matrice pourrait également faire apparaître de nouveaux pics dans nos spectres.

L'analyse de tissus congelés. L'analyse de tissu préparé par la technique "congelé-hydraté" (voir section 2.2.5) permet de garder l'échantillon dans un état proche de celui dans lequel il a été recueilli. En effet, maintenir l'échantillon à basse température permet d'empêcher les molécules à forte mobilité de migrer vers la surface de l'échantillon et de ce fait créer un mur [82, 83].

L'utilisation d'autres matrices. En effet, deux matrices ont été utilisées durant ce mémoire mais il en existe d'autres qui ont déjà été testées sur d'autres tissus. Une matrice ayant montré une augmentation de la sensibilité pour d'autres échantillons biologique est le 1,5-diaminonaphtalène (DAN) [84]. Cette matrice serait une bonne alternative aux deux matrices précédemment testées. De plus, elles semblent montrer une augmentation de signal importante au niveau des lipides et ce dans les deux polarités.

Les mêmes techniques de sublimation et de déposition de matrice in situ seraient utilisées. Cela permettrait d'avoir un réel pouvoir de comparaison entre les différents traitements.

Bibliographie

- [1] Ingrid HABERFELD. *Utérus : anatomie, examens, maladies*. <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2535276-uterus-anatomie-examens-maladies/>.
- [2] *The uterine cycle phases and endometrial changes*. <https://study.com/academy/lesson/the-uterine-cycle-phases-and-endometrial-changes.html>.
- [3] Caroline DUPUIS. *"Expression, régulation et rôles de PGRMC2 dans l'endomètre humain et l'endométriose"*. 2021. URL : <http://hdl.handle.net/2078.1/thesis:30888>.
- [4] Patrick HENRIET, Héloïse P. GAIDE CHEVRONNAY et Etienne MARBAIX. « The endocrine and paracrine control of menstruation ». In : *Molecular and Cellular Endocrinology* 358.2 (2012). Endocrinology of the uterus and uterine-related disorders, p. 197-207. ISSN : 0303-7207. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.07.042>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303720711004552>.
- [5] « The normal menstrual cycle in women ». In : *Animal Reproduction Science* 124 (3-4 avr. 2011), p. 229-236. ISSN : 03784320. DOI : [10.1016/j.anireprosci.2010.08.030](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2010.08.030).
- [6] Héloïse P. GAIDE CHEVRONNAY et al. « Spatiotemporal Coupling of Focal Extracellular Matrix Degradation and Reconstruction in the Menstrual Human Endometrium ». In : *Endocrinology* 150.11 (nov. 2009), p. 5094-5105. ISSN : 0013-7227. DOI : [10.1210/en.2009-0750](https://doi.org/10.1210/en.2009-0750). eprint : <https://academic.oup.com/endo/article-pdf/150/11/5094/9002073/endo5094.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1210/en.2009-0750>.
- [7] Serdar E. BULUN. « Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis ». In : *Williams Textbook of Endocrinology* (2016), p. 589-663. DOI : [10.1016/b978-0-323-29738-7.00017-4](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-29738-7.00017-4).
- [8] « Physiology of the Female Reproductive System ». In : *A Textbook of Clinical Embryology*. Cambridge University Press, 2021, p. 28-55. DOI : [10.1017/9781108881760.005](https://doi.org/10.1017/9781108881760.005).
- [9] Eran GERSHON et Nava DEKEL. « Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 21 (12 juin 2020), p. 1-18. ISSN : 14220067. DOI : [10.3390/ijms21124565](https://doi.org/10.3390/ijms21124565).
- [10] Gregory F ERICKSON et Shunichi SHIMASAKI. *The physiology of folliculogenesis : the role of novel growth factors*, p. 943-9. DOI : [10.1016/s0015-0282\(01\)02859-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)02859-x).
- [11] Cindrilla CHUMDURI et Margherita TURCO. « Organoids of the female reproductive tract ». In : *Journal of Molecular Medicine* 99 (avr. 2021), p. 1-23. DOI : [10.1007/s00109-020-02028-0](https://doi.org/10.1007/s00109-020-02028-0).
- [12] MD PhD WALTER F. BORON et MD EMILE L. BOULPAEP. *Medical Physiology, 3rd Edition*. Elsevier, 2017.

- [13] Laetitia GRIMALDI. *Le cycle menstruel*. <https://pulsations.hug.ch/article/le-cycle-menstruel>. 2020.
- [14] A FERENCZY et G MUTTER. *Glob. libr. women's med. The endometrial cycle*. 2008. DOI : 10.3843/GLOWM.10293.
- [15] IONTOF. *Applications - Developing analytical solution for industry and academia*. <https://www.iontof.com/applications-tof-sims-leis-spm.html>.
- [16] John C. VICKERMAN. *ToF-SIMS - An evolving mass spectrometry of materials*. 2013.
- [17] Peter SJÖVALL, Björn JOHANSSON et Jukka LAUSMAA. « Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS ». In : *Applied Surface Science* 252.19 (juill. 2006), p. 6966-6974. DOI : 10.1016/j.apsusc.2006.02.126.
- [18] Håkan NYGREN et al. « Bioimaging TOF-SIMS : High resolution 3D imaging of single cells ». In : *Microscopy Research and Technique* 70.11 (2007), p. 969-974. DOI : <https://doi.org/10.1002/jemt.20502>. eprint : <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jemt.20502>. URL : <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jemt.20502>.
- [19] David TOUBOUL et al. « Tissue Molecular Ion Imaging by Gold Cluster Ion Bombardment ». In : *Analytical Chemistry* 76.6 (2004). PMID : 15018551, p. 1550-1559. DOI : 10.1021/ac035243z. eprint : <https://doi.org/10.1021/ac035243z>. URL : <https://doi.org/10.1021/ac035243z>.
- [20] PETRA. *IONTOF-TOF, SIMS-5-Brochure*. https://www.iontof.com/download/IONTOF_TOF-SIMS_5_Brochure.pdf. 2009.
- [21] Sebastiaan Van NUFFEL. *Three-dimensional Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging of Primary Neuronal Cell Cultures*. 2016.
- [22] Physical ELECTRONICS. *ToF-SIMS*. <https://www.phil.com/surface-analysis-techniques/tof-sims.html#:~:text=The%20average%20depth%20of%20analysis,beam%20across%20the%20sample%20surface..> 2022.
- [23] Afnan Mohammad ALNAJEEBI. *Comparison of cluster primary ion beams for quantitative biomolecular SIMS analysis*. 2017.
- [24] Tingting FU. *3D and High Sensitivity Micrometric Mass Spectrometry Imaging*. 2018. URL : <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01699065v2>.
- [25] Tanguy TERLIER. « Analyse par ToF-SIMS de matériaux organiques pour les applications en électronique organique ». Thèse de doct. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015.
- [26] Quentin VANBELLINGEN. *Imagerie de substances naturelles par spectrométrie de masse*. 2015.
- [27] *Détecteur à scintillation*. https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9tecteur_%C3%A0_scintillation.
- [28] Christine M MAHONEY et Greg GILLEN. *An introduction to cluster secondary ion mass spectrometry (Cluster sims)*. 2013.
- [29] Arnaud DELCORTE, Oscar A RESTREPO et Bartłomiej CZERWINSKI. *CLUSTER SIMS OF ORGANIC MATERIALS : THEORETICAL INSIGHTS*. 2013.

- [30] Z. POSTAWA et al. « Depth profiling by cluster projectiles as seen by computer simulations ». In : t. 43. Jan. 2011, p. 12-15. DOI : 10.1002/sia.3417.
- [31] Isao YAMADA et al. *Materials processing by gas cluster ion beams*. 2001, p. 231-295.
- [32] Liam A. McDONNELL et Ron M.A. HEEREN. « Imaging mass spectrometry ». In : *Mass Spectrometry Reviews* 26 (4 juill. 2007), p. 606-643. ISSN : 02777037. DOI : 10.1002/mas.20124.
- [33] I S GILMORE. « Metabolic imaging at the single-cell scale –recent advances and future challenges in mass spectrometry imaging ». In : *Journal of Surface Analysis* 26.2 (2019), p. 174-175. DOI : 10.1384/jsa.26.174.
- [34] MK PASSARELLI et N WINOGRAD. « Lipid imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry ToF-SIMS ». In : 1811.11 (2011), p. 976-990. DOI : 10.1016/j.bbalip.2011.05.007.
- [35] J. C. VICKERMAN et Ian S. (Ian Stuart) GILMORE. *Surface analysis : the principal techniques*. Wiley, 2009, p. 666. ISBN : 9780470017630.
- [36] JS FLETCHER et JC VICKERMAN. « Secondary ion mass spectrometry : characterizing complex samples in two and three dimensions ». In : 85.2 (2013), p. 610-639. DOI : 10.1021/ac303088m.
- [37] Konstantin MOSHKUNOV et al. « Improvement of biomolecular analysis in thin films using in situ matrix enhanced secondary ion mass spectrometry ». In : *Analyst* 146 (21 2021), p. 6506-6519. DOI : 10.1039/D1AN00727K. URL : <http://dx.doi.org/10.1039/D1AN00727K>.
- [38] Sohee YOON et Tae Geol LEE. « Biological tissue sample preparation for time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) imaging ». In : *Nano Convergence* 5 (1 déc. 2018). ISSN : 21965404. DOI : 10.1186/s40580-018-0157-y.
- [39] Manale NOUN, Rayane AKOUMEH et Imane ABBAS. « Cell and Tissue Imaging by TOF-SIMS and MALDI-TOF : An Overview for Biological and Pharmaceutical Analysis ». In : *Microscopy and Microanalysis* 28 (1 fév. 2022), p. 1-26. ISSN : 14358115. DOI : 10.1017/S1431927621013593.
- [40] Claudia BICH et al. « Argon cluster ion source evaluation on lipid standards and rat brain tissue samples ». In : *Analytical chemistry* 85.16 (août 2013), p. 7745-7752. ISSN : 0003-2700. DOI : 10.1021/ac4009513. URL : <https://doi.org/10.1021/ac4009513>.
- [41] P SJÖVALL et B LAUSMAA Jand Johansson. « Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue ». In : (août 2004), p. 4271-4278. DOI : 10.1021/ac049389p.
- [42] H NYGREN et al. « Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source ». In : (déc. 2005), p. 102-110. DOI : 10.1016/j.bbalip.2005.10.004.
- [43] Tina B. ANGERER, Amir Saeid MOHAMMADI et John S. FLETCHER. « Optimizing sample preparation for anatomical determination in the hippocampus of rodent brain by ToF-SIMS analysis ». In : *Biointerphases* 11 (2 juin 2016), 02A319. ISSN : 1934-8630. DOI : 10.1116/1.4941064.
- [44] Sarah E. GABBOTT et al. « Pigmented anatomy in carboniferous cyclostomes and the evolution of the vertebrate eye ». In : *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* 283 (1836 août 2016). ISSN : 14712954. DOI : 10.1098/rspb.2016.1151.

- [45] Jin Hyoungh KIM et al. « Label-free calcium imaging in ischemic retinal tissue by TOF-SIMS ». In : *Biophysical Journal* 94 (10 mai 2008), p. 4095-4102. ISSN : 15420086. DOI : 10.1529/biophysj.107.119800.
- [46] Jenifer MAINS, Clive G. WILSON et Andrew URQUHART. « ToF-SIMS analysis of dexamethasone distribution in the isolated perfused eye ». In : *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52 (11 oct. 2011), p. 8413-8419. ISSN : 01460404. DOI : 10.1167/iovs.11-8199.
- [47] Delphine DEBOIS et al. « In Situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging ». In : *Analytical Chemistry* 81 (8 avr. 2009), p. 2823-2831. ISSN : 00032700. DOI : 10.1021/ac900045m.
- [48] David TOUBOUL et al. « MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers ». In : *International Journal of Mass Spectrometry* 260 (2-3 fév. 2007), p. 158-165. ISSN : 13873806. DOI : 10.1016/j.ijms.2006.09.027.
- [49] Peter SJÖVALL et al. « Imaging of distribution of topically applied drug molecules in mouse skin by combination of time-of-flight secondary ion mass spectrometry and scanning electron microscopy ». In : *Analytical Chemistry* 86 (7 avr. 2014), p. 3443-3452. ISSN : 15206882. DOI : 10.1021/ac403924w.
- [50] Masayuki OKAMOTO et al. « TOF-SIMS investigation of the distribution of a cosmetic ingredient in the epidermis of the skin ». In : *Applied Surface Science* 252.19 (2006). Proceedings of the Fifteenth International Conference on Secondary Ion Mass Spectrometry, p. 6805-6808. ISSN : 0169-4332. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.02.218>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169433206003990>.
- [51] So Jeong YUN et al. « TOFSIMS-P : A web-based platform for analysis of large-scale TOF-SIMS data ». In : *Analytical Chemistry* 83 (24 déc. 2011), p. 9298-9305. ISSN : 00032700. DOI : 10.1021/ac2016932.
- [52] Emrys A. JONES et al. « Suppression and Enhancement of Secondary Ion Formation Due to the Chemical Environment in Static-Secondary Ion Mass Spectrometry ». In : *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18 (8 août 2007), p. 1559-1567. ISSN : 10440305. DOI : 10.1016/j.jasms.2007.05.014.
- [53] A. DELCORTE, N. MÉDARD et P. BERTRAND. « Organic Secondary Ion Mass Spectrometry : Sensitivity Enhancement by Gold Deposition ». In : *Analytical Chemistry* 74.19 (2002). PMID : 12380818, p. 4955-4968. DOI : 10.1021/ac020125h. eprint : <https://doi.org/10.1021/ac020125h>. URL : <https://doi.org/10.1021/ac020125h>.
- [54] Liam A. McDONNELL et al. « Higher Sensitivity Secondary Ion Mass Spectrometry of Biological Molecules for High Resolution, Chemically Specific Imaging ». In : *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17.9 (2006), p. 1195-1202. ISSN : 1044-0305. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.05.003>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104403050600479X>.
- [55] Sebastiaan VAN NUFFEL et al. « Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging ». In : *Analytical Chemistry* 90.3 (2018). PMID : 29295614, p. 1907-1914. DOI : 10.1021/acs.analchem.7b03993. eprint : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03993>. URL : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03993>.

- [56] Masoumeh DOWLATSHAHI POUR, Per MALMBERG et Andrew EWING. « An investigation on the mechanism of sublimed DHB matrix on molecular ion yields in SIMS imaging of brain tissue ». English (US). In : *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie* 408.12 (mai 2016). Publisher Copyright : © 2016 Springer-Verlag Berlin Heidelberg., p. 3071-3081. ISSN : 0016-1152. DOI : 10.1007/s00216-016-9385-3.
- [57] P HENRIET et E MARBAIX. *REMODELAGE DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE ET ENDOMETRE*. <https://www.deduveinstitute.be/fr/endometrium-and-mmps>.
- [58] Richard Alexander SCHELTEMA et al. « The Q exactive HF, a benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field orbitrap analyzer ». In : *Molecular and Cellular Proteomics* 13 (12 déc. 2014), p. 3698-3708. ISSN : 15359484. DOI : 10.1074/mcp.M114.043489.
- [59] P.G. GROOTHUIS et al. « Estrogen and the endometrium : lessons learned from gene expression profiling in rodents and human ». In : *Human Reproduction Update* 13.4 (juill. 2007), p. 405-417. ISSN : 1355-4786. DOI : 10.1093/humupd/dmm009. eprint : <https://academic.oup.com/humupd/article-pdf/13/4/405/7420907/dmm009.pdf>. URL : <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm009>.
- [60] Kun YU et al. « Estrogen Receptor Function : Impact on the Human Endometrium ». In : *Frontiers in Endocrinology* 13 (2022). ISSN : 1664-2392. DOI : 10.3389/fendo.2022.827724. URL : <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2022.827724>.
- [61] Ryan M. MARQUARDT et al. « Progesterone and estrogen signaling in the endometrium : What goes wrong in endometriosis ? » In : *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15 août 2019), p. 3822. ISSN : 14220067. DOI : 10.3390/ijms20153822.
- [62] Jean Luc VORNG et al. « Semiempirical rules to determine drug sensitivity and ionization efficiency in secondary ion mass spectrometry using a model tissue sample ». In : *Analytical Chemistry* 88 (22 nov. 2016), p. 11028-11036. ISSN : 15206882. DOI : 10.1021/acs.analchem.6b02894.
- [63] Kalani J. SEU et al. « Effect of surface treatment on diffusion and domain formation in supported lipid bilayers ». In : *Biophysical Journal* 92 (7 2007), p. 2445-2450. ISSN : 00063495. DOI : 10.1529/biophysj.106.099721.
- [64] SAMCO. *The basics of UV-Ozone cleaning of surfaces*. <https://www.samcointl.com/basics-uv-ozone-cleaning-surfaces/>.
- [65] Three Bond Technical NEWS. *Ultraviolet-Ozone Surface Treatment*. 1987.
- [66] Ioana M. TABAN et al. « Imaging of Peptides in the Rat Brain Using MALDI-FTICR Mass Spectrometry ». In : *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 18.1 (2007), p. 145-151. ISSN : 1044-0305. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2006.09.017>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044030506008361>.
- [67] Sebastiaan VAN NUFFEL et al. « Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging ». English. In : *Analytical Chemistry* 90.3 (fév. 2018), p. 1907-1914. ISSN : 0003-2700. DOI : 10.1021/acs.analchem.7b03993.
- [68] Benjamin TOMASETTI. « MALDI matrix sublimation for sensitivity enhancement in molecular SIMS ». Thèse de doct. Université Catholique de Louvain, 2020.

- [69] Vincent DELMEZ et al. « Deposition of Intact and Active Proteins in Vacuo Using Large Argon Cluster Ion Beams ». In : *Journal of Physical Chemistry Letters* 12 (2 jan. 2021), p. 952-957. ISSN : 19487185. DOI : [10.1021/acs.jpcllett.0c02510](https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02510).
- [70] DJ GRAHAM et DG CASTNER. « Multivariate analysis of ToF-SIMS data from multicomponent systems : the why, when, and how ». In : 7 (déc. 2012), p. 49. DOI : [10.1007/s13758-012-0049-3](https://doi.org/10.1007/s13758-012-0049-3).
- [71] Tina B. ANGERER et al. « Improved Molecular Imaging in Rodent Brain with Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry Using Gas Cluster Ion Beams and Reactive Vapor Exposure ». In : *Analytical Chemistry* 87.8 (2015). PMID : 25799886, p. 4305-4313. DOI : [10.1021/ac504774y](https://doi.org/10.1021/ac504774y). eprint : <https://doi.org/10.1021/ac504774y>. URL : <https://doi.org/10.1021/ac504774y>.
- [72] Matthias LORENZ et al. « Method for Molecular Layer Deposition Using Gas Cluster Ion Beam Sputtering with Example Application In Situ Matrix-Enhanced Secondary Ion Mass Spectrometry ». In : *Analytical Chemistry* 93.7 (2021). PMID : 33571411, p. 3436-3444. DOI : [10.1021/acs.analchem.0c04680](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04680). eprint : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04680>. URL : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04680>.
- [73] Masoumeh Dowlatshahi POUR, Per MALMBERG et Andrew EWING. « An investigation on the mechanism of sublimed DHB matrix on molecular ion yields in SIMS imaging of brain tissue ». In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408 (12 mai 2016), p. 3071-3081. ISSN : 16182650. DOI : [10.1007/s00216-016-9385-3](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9385-3).
- [74] Mark NICHOLAS et al. « Quantification of surface composition and surface structure of inhalation powders using TOF-SIMS ». In : *International Journal of Pharmaceutics* 587 (2020), p. 119666. ISSN : 0378-5173. DOI : <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119666>. URL : <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517320306505>.
- [75] <https://www.lipidmaps.org/>.
- [76] <https://www.ebi.ac.uk/chebi/init.do>.
- [77] Waraporn SUVANNAPRUK et al. « Single-Cell Metabolic Profiling of Macrophages Using 3D OrbiSIMS : Correlations with Phenotype ». In : *Analytical Chemistry* 94.26 (2022). PMID : 35713879, p. 9389-9398. DOI : [10.1021/acs.analchem.2c01375](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01375). eprint : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01375>. URL : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c01375>.
- [78] C. F. DRAPER et al. « Menstrual cycle rhythmicity : metabolic patterns in healthy women ». In : *Scientific Reports* 8 (1 déc. 2018). ISSN : 20452322. DOI : [10.1038/s41598-018-32647-0](https://doi.org/10.1038/s41598-018-32647-0).
- [79] Hua TIAN et al. « Multiomics Imaging Using High-Energy Water Gas Cluster Ion Beam Secondary Ion Mass Spectrometry [(H₂O)_n-GCIB-SIMS] of Frozen-Hydrated Cells and Tissue ». In : *Analytical Chemistry* 93.22 (2021). PMID : 34038090, p. 7808-7814. DOI : [10.1021/acs.analchem.0c05210](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05210). eprint : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05210>. URL : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05210>.
- [80] Kelly Dimovska NILSSON et al. « (CO₂)_n + , (H₂O)_n + , and (H₂O)_n + (CO₂) gas cluster ion beam secondary ion mass spectrometry : analysis of lipid extracts, cells, and Alzheimer's model mouse brain tissue ». In : (). DOI : [10.1007/s00216-021-03372-x](https://doi.org/10.1007/s00216-021-03372-x). URL : <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03372-x>.

-
- [81] Afnan M. ALNAJEEBI, John C. VICKERMAN et Nicholas P. LOCKYER. « The influence of polyatomic primary ion chemistry on matrix effects in secondary ion mass spectrometry analysis ». In : *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 32 (22 nov. 2018), p. 1962-1970. ISSN : 10970231. DOI : 10.1002/rcm.8265.
- [82] Hyun Kyong SHON et al. « Molecular depth profiling on rat brain tissue sections prepared using different sampling methods ». In : *Biointerphases* 13 (3 juin 2018), 03B411. ISSN : 1934-8630. DOI : 10.1116/1.5019611.
- [83] Minh Uyen Thi LE et al. « Comparison between thaw-mounting and use of conductive tape for sample preparation in ToF-SIMS imaging of lipids in *Drosophila* microRNA-14 model ». In : *Biointerphases* 13 (3 juin 2018), 03B414. ISSN : 1934-8630. DOI : 10.1116/1.5019597.
- [84] Aurélien THOMAS et al. « Sublimation of New Matrix Candidates for High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Lipids : Enhanced Information in Both Positive and Negative Polarities after 1,5-Diaminonaphthalene Deposition ». In : *Analytical Chemistry* 84.4 (2012). PMID : 22243482, p. 2048-2054. DOI : 10.1021/ac2033547. eprint : <https://doi.org/10.1021/ac2033547>. URL : <https://doi.org/10.1021/ac2033547>.

Chapitre 7

Annexe

7.1 Annexe liée à la section 3.1

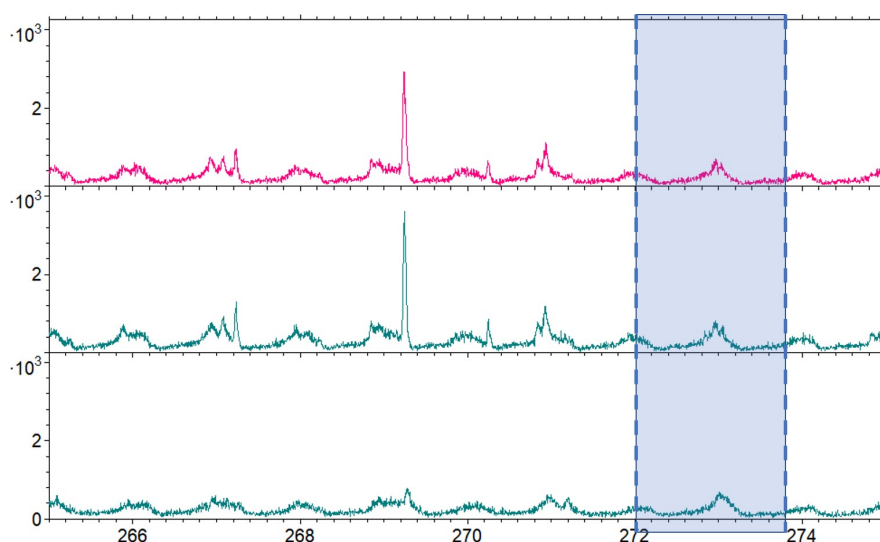
Table 7.1 – Paramètres des mesures de spectroscopie sur les échantillons à base d'hormone

Date	Echantillons	Cycle time (μs)	Courant (pA)	Dose d'ions primaires	# de mesure en -	# de mesure en +
24/09	Ref E ₂	100	0.08	3×10^7	3	3
	Ref P ₄	100	0.08	3×10^7	3	3
20/10	Ref TH	200	0.04	1.5×10^7	3	3
	E ₂ 0.2	200	0.04	1.5×10^7	3	3
	P ₄ 0.2	200	0.04	1.5×10^7	3	3
03/11	E ₂ 1.428	200	0.038	1.4×10^7	0	3
	E ₂ 4	200	0.038	1.4×10^7	0	3
	P ₄ 1.428	200	0.038	1.4×10^7	0	1
	P ₄ 3.33	200	0.038	1.4×10^7	0	3
	P ₄ 4	200	0.038	1.4×10^7	0	3
02/12	P ₄ 0.25	200	0.036	1.33×10^7	1	1
	P ₄ 0.5	200	0.036	1.33×10^7	0	1
	P ₄ 1	200	0.036	1.33×10^7	0	1
	P ₄ 2	200	0.036	1.33×10^7	1	1
	P ₄ 5	200	0.036	1.33×10^7	1	1
08/02	P ₄ 2.5	200	0.045	1.66×10^7	3	3
	P ₄ 3.5	200	0.045	1.66×10^7	3	3
	P ₄ 4.5	200	0.045	1.66×10^7	3	3

Table 7.2 – Paramètres des mesures de profilage sur les échantillons à base d'hormone

Date	Echantillons	Delay (μ s)	Lead Off (μ s)	Courant (nA)	Temps d'analyse en - (s)	Temps d'analyse en + (s)
20/10	Ref TH	50	110	0.46	593	439
	E ₂ 0.2	50	110	0.46	596	557
	P ₄ 0.2	50	110	0.46	606	698
03/11	E ₂ 1.428	32	120	0.53	0	442
	E ₂ 4	32	120	0.53	701	505
	P ₄ 1.428	32	120	0.53	0	501
	P ₄ 3.33	32	120	0.53	0	501
	P ₄ 4	32	120	0.53	0	501
02/12	P ₄ 0.25	50	120	0.6	442	475
	P ₄ 0.5	50	120	0.6	0	508
	P ₄ 1	50	120	0.6	0	429
	P ₄ 2	50	120	0.6	311	475
	P ₄ 5	50	120	0.6	639	442
08/02	P ₄ 2.5	60	110	0.45	233	239
	P ₄ 3.5	60	110	0.45	233	233
	P ₄ 4.5	60	110	0.45	233	246

7.2 Annexes liées à la section 4.1

**Figure 7.1** – Spectres obtenus suite à l'analyse de profilage en mode négatifs sur des échantillons d'homogénat de tissu contenant différentes concentrations d'Estradiol (E₂) (0,2 g/L et 4 g/L).

7.3 Annexes liées à la section 4.2

Table 7.3 – Liste des pics positifs sélectionnés pour l'ensemble des analyses

Formule	Identification	Masse
Na^+	Sodium	22,9839
K^+	Potassium	38,9593
C_4H_9^+		57,0607
$\text{C}_4\text{H}_{10}\text{N}^+$	Val	72,0734
C_6H_14^+		86,0971
$\text{C}_5\text{H}_{16}\text{N}_2^+$		104,107
C_4HF_4^+		125,0066
$\text{H}_7\text{O}_3\text{Al}_2\text{F}_2^+$		146,9842
$\text{C}_5\text{H}_{13}\text{NPO}_3^+$	PC HG[M-H ₂ O]	166,0742
$\text{C}_5\text{H}_{15}\text{PNO}_4^+$	PC HG [M]	184,0771
$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3^+$		198,0937
$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5^+$		206,0632
$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_3^+$		222,0529
$\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{P}^+$	PC frag	224,1076
$\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4^+$		246,0897
$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5^+$		254,0999
$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Cl}_2^+$		262,0731
$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2^+$		290,0669
$\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{Na}^+$		320,0849
$\text{C}_{23}\text{H}_{43}\text{O}_3^+$		367,3193
$\text{C}_{27}\text{H}_{45}^+$	Cholesterol [M-OH]	369,3491
$\text{C}_{27}\text{H}_{46}^+$		370,362
$\text{C}_{27}\text{H}_{45}\text{O}^+$	Cholesterol [M-H]	385,3668
$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}^+$	Cholesterol [M]	386,3394
$\text{C}_{27}\text{H}_{47}\text{O}^+$	Cholesterol [M+H]	387,3683
$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{NO}_4\text{H}^+$	Stearoylcarn. [M+H]	428,3845
$\text{C}_{26}\text{H}_{53}\text{SO}_2^+$		429,3942
$\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2^+$		430,3771
$\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_3^+$		478,3487
$\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_9^+$		480,3629
$\text{C}_{37}\text{H}_{47}^+$		491,3771
$\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_6^+$		492,3565
$\text{C}_{24}\text{H}_{51}\text{NO}_7\text{P}^+$	Lyso PC (P) (16 :1) [M+H]	496,371
		500,3356
$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{NO}_7\text{P}^+$		506,3776
		516,3059
$\text{C}_{33}\text{H}_{58}\text{O}_4^+$		518,3715
$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_2^+$		520,4078
$\text{C}_{27}\text{H}_{56}\text{O}_9^+$		524,4129
$\text{C}_{43}\text{H}_{70}\text{O}_4^+$		650,4635
$\text{C}_{39}\text{H}_{80}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^+$	SM (34 :1) [M+H]	703,6021
$\text{C}_{39}\text{H}_{81}\text{N}_2\text{O}_6\text{P}^+$	SM (34 :0) [M]	704,6003
$\text{C}_{38}\text{H}_{77}\text{NO}_8\text{P}^+$	PC (30 :0) [M+H]	706,5686
$\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{NO}_8\text{P}^+$	PC (31 :0) [M+H]	720,5744

Formule	Identification	Masse
$C_{39}H_{75}N_2O_6PNa^+$	SM (34 :3) [M+Na]	721,5727
$C_{39}H_{79}N_2O_6PNa^+$	SM (34 :1) [M+Na]	725,5793
$C_{39}H_{81}N_2O_6PNa^+$	SM (34 :0) [M+Na]	727,5648
$C_{40}H_{75}NO_8P^+$	PC (32 :3) [M+H]	728,5549
$C_{40}H_{81}NO_8P^+$	PC (32 :0) [M+H]	734,5821
$C_{40}H_{77}N_2O_6PNa^+$	SM (35 :3) [M+Na]	735,5862
$C_{41}H_{76}NO_8P^+$	PC (33 :3) [M]	741,5671
$C_{41}H_{77}NO_8P^+$	PC (33 :3) [M+H]	742,5571
$C_{41}H_{78}NO_8P^+$	PC (33 :2) [M]	743,5636
$C_{41}H_{79}NO_8P^+$	PC (33 :2) [M+H]	744,5532
$C_{41}H_{83}N_2O_6PNa^+$	SM (36 :1) [M+Na]	753,6168
$C_{40}H_{80}NNaO_8P^+$	PC (32 :0) [M+Na]	756,5789
$C_{42}H_{80}NO_8P^+$	PC (34 :2) [M]	757,5766
$C_{42}H_{81}NO_8P^+$	PC (34 :2) [M+H]	758,6015
$C_{42}H_{82}NO_8P^+$	PC (34 :1) [M]	759,5693
$C_{42}H_{83}NO_8P^+$	PC (34 :1) [M+H]	760,5874
$C_{42}H_{84}NO_8P^+$	PC (34 :0) [M]	761,6179
$C_{42}H_{85}NO_8P^+$	PC (34 :0) [M+H]	762,6317
$C_{41}H_{80}NO_8PNa^+$	PC (33 :1) [M+Na]	768,5566
$C_{41}H_{83}N_2O_6PK^+$	SM (36 :1) [M+K]	769,6107
$C_{41}H_{82}NO_8PNa^+$	PC (33 :0) [M+Na]	770,551
$C_{40}H_{80}NO_8PK^+$	PC (32 :0) [M+K]	772,5527
$C_{43}H_{79}N_2O_6PNa^+$	SM (38 :5) [M+Na]	773,5642
$C_{42}H_{74}NO_8PNa^+$	PC (34 :5) [M+Na]	774,5565
$C_{43}H_{81}N_2O_6PNa^+$	SM (38 :4) [M+Na]	775,55
$C_{44}H_{79}NO_8P^+$	PC (36 :5) [M+H]	780,5561
$C_{44}H_{80}NO_8P^+$	PC (36 :4) [M]	781,5976
$C_{44}H_{81}NO_8P^+$	PC (36 :4) [M+H]	782,6099
$C_{44}H_{82}NO_8P^+$	PC (36 :3) [M]	783,5851
$C_{44}H_{83}NO_8P^+$	PC (36 :3) [M+H]	784,5695
$C_{44}H_{84}NO_8P^+$	PC (36 :2) [M]	785,6104
$C_{44}H_{85}NO_8P^+$	PC (36 :2) [M+H]	786,5977
$C_{44}H_{86}NO_8P^+$	PC (36 :1) [M]	787,6153
$C_{44}H_{87}NO_8P^+$	PC (36 :1) [M+H]	788,6434
$C_{44}H_{88}NO_8P^+$	PC (36 :0) [M]	789,6302
$C_{45}H_{81}NO_8P^+$	PC (37 :5) [M+H]	794,6101
$C_{43}H_{84}NNaO_8P^+$	PC (35 :1) [M+Na]	796,574
$C_{45}H_{84}NO_8P^+$	PC (37 :3) [M]	797,6046
$C_{42}H_{82}NO_8PK^+$	PC (34 :1) [M+K]	798,5713
$C_{45}H_{86}NO_8P^+$	PC (37 :2) [M]	799,6045
$C_{42}H_{84}NO_8PK^+$	PC (34 :0) [M+K]	800,5919
$C_{45}H_{88}NO_8P^+$	PC (37 :1) [M]	801,5919
$C_{44}H_{78}NNaO_8P^+$	PC (36 :5) [M+Na]	802,4773
$C_{44}H_{80}NNaO_8P^+$	PC (36 :4) [M+Na]	804,5401
$C_{44}H_{82}NNaO_8P^+$	PC (36 :3) [M+Na]	806,5799
$C_{44}H_{84}NNaO_8P^+$	PC (36 :2) [M+Na]	808,608

Formule	Identification	Masse
$C_{46}H_{84}NO_8P^+$	PC (38 :4) [M]	809,6297
$C_{44}H_{86}NNaO_8P^+$	PC (36 :1) [M+Na]	810,6208
$C_{46}H_{86}NO_8P^+$	PC (38 :3) [M]	811,615
$C_{44}H_{88}NNaO_8P^+$	PC (36 :0) [M+Na]	812,6703
$C_{44}H_{80}NO_8PK^+$	PC (36 :4) [M+K]	820,562
$C_{44}H_{82}NO_8PK^+$	PC (36 :3) [M+K]	822,5917
$C_{44}H_{84}NO_8PK^+$	PC (36 :2) [M+K]	824,5558
$C_{47}H_{88}NO_8P^+$	PC (39 :3) [M]	825,6447
$C_{44}H_{86}NO_8PK^+$	PC (36 :1) [M+K]	826,5862
$C_{47}H_{90}NO_8P^+$	PC (39 :2) [M]	827,5872
$C_{46}H_{82}NO_8PNa^+$	PC (38 :5) [M+Na]	830,6005
$C_{46}H_{84}NO_8PNa^+$	PC (38 :4) [M+Na]	832,5936
$C_{46}H_{86}NO_8PNa^+$	PC (38 :3) [M+Na]	834,6643
$C_{46}H_{88}NO_8PNa^+$	PC (38 :2) [M+Na]	836,6343
$C_{47}H_{95}N_2O_6PNa^+$	SM (42 :1) [M+Na]	837,6583
$C_{46}H_{90}NO_8PNa^+$	PC (38 :1) [M+Na]	838,6659
$C_{46}H_{82}NO_8PK^+$	PC (38 :5) [M+K]	846,554
$C_{46}H_{84}NO_8PK^+$	PC (38 :4) [M+K]	848,578
$C_{49}H_{88}NO_8P^+$	PC (41 :5) [M]	849,588
$C_{49}H_{90}NO_8P^+$	PC (41 :4) [M]	851,6208
$C_{49}H_{92}NO_8P^+$	PC (41 :3) [M]	853,6842
$C_{46}H_{90}NO_8PK^+$	PC (38 :1) [M+K]	854,6664
$C_{48}H_{94}NO_8PK^+$	PC (40 :1) [M+K]	882,6075

Table 7.4 – Liste des pics négatifs sélectionnés pour l'ensemble des analyses

Formule	Identification	Masse
CN ⁻	CN	26,005848
CNO ⁻	CNO - origine prot	42,001827
CHO ₂ ⁻	frag	45,00043
C ₃ H ₃ O ₂ ⁻	frag	71,017481
PO ₃ ⁻	Phosphite	78,96518
H ₂ PO ₄ ⁻	Phosphate	96,976762
C ₉ H ₇ ⁻	frag	115,076242
C ₂ H ₅ NO ₃ P ⁻	PE HG [M-H ₂ O]	122,005405
C ₂ H ₅ O ₄ P ⁻	PE HG [M-NH ₂ - H]	124,014395
C ₄ H ₇ N ₂ O ₃ ⁻	Asparagine [M-H]	131,045885
C ₆ H ₃ NO ₃ ⁻		137,005516
C ₂ H ₇ NO ₄ P ⁻	PE HG [M-H]	140,01881
Al ₄ O ₃ H ₃ ⁻		158,931698
H ₃ O ₂ Al ₄ F ⁻		161,938571
C ₈ H ₆ SO ₂ ⁻		166,024262
C ₈ H ₆ O ₃ Al ⁻		177,007531
Al ₂ O ₇ H ₁₃ ⁻		179,019318
Na ₃ SO ₅ ⁻		180,90584
O ₄ F ₂ Al ₃ ⁻		182,910416
C ₅ H ₁₁ NO ₅ P ⁻	PE frag	196,041834
C ₄ H ₄ Cu ₂ F ⁻		196,88541
Al ₂ P ₂ H ₃ O ₅ ⁻		198,907065
C ₇ H ₁₄ O ₄ NS ⁻		208,071737
HO ₃ Al ₅ F ₃ ⁻		240,914653
C ₆ H ₁₀ PO ₈ ⁻	PI-HG	241,025728
Na ₃ S ₂ O ₇ ⁻		244,855014
C ₉ H ₁₆ PO ₉ ⁻	PI-frag	299,065001
C ₁₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ Al ⁻		315,064901
C ₁₄ H ₂₂ O ₈ K ⁻		357,06822
C ₂₃ H ₁₅ SO ₃ ⁻		371,081487
C ₂₇ H ₄₃ O ⁻		383,338917
C ₂₇ H ₄₅ O ⁻	Cholesterol [M-H]	385,363434
C ₂₇ H ₄₆ O ⁻	Cholesterol [M]	386,382866
C ₂₆ H ₄₈ O ₃ K ⁻		447,310488
C ₃₃ H ₃₇ O ₂ ⁻		465,146441
C ₃₁ H ₂₉ O ₅ ⁻		481,130731
C ₂₆ H ₄₆ O ₁₂ P	LPI (17 :2)	581,345443
C ₂₇ H ₅₀ O ₁₂ P	[M-H]	597,360099
C ₃₅ H ₆₈ NSO ₄ ⁻		598,472427
C ₂₇ H ₅₂ O ₁₂ P	[M-H]	599,362382
	lyso LPA (30 :2)	601,328821
Ba ₂ Na ₅ S ₅ O ₄ ⁻		614,474572
C ₃₄ H ₆₇ NO ₆ P ⁻	SM frag	616,478156
C ₃₆ H ₆₉ NO ₆ P ⁻		642,480016

Formule	Identification	Masse
$C_{37}H_{66}O_8P^-$	PA (34 :3) [M-H]	669,424494
$C_{37}H_{68}O_8P^-$	PA (34 :2) [M-H]	671,496628
$C_{37}H_{70}O_8P^-$	PA (34 :1) [M-H]	673,474039
$C_{38}H_{74}N_2O_6P^-$	SM (33 :2) [M-H]	685,530145
		686,417478
$C_{38}H_{76}N_2O_6P^-$	SM (33 :1) [M-H]	687,514054
$C_{38}H_{77}N_2O_6P^-$	SM (33 :1) [M]	688,547828
$C_{38}H_{78}N_2O_6P^-$	SM (33 :0) [M-H]	689,537721
$C_{36}H_{58}O_{11}P^-$	PI frag	697,422588
$C_{38}H_{69}NO_8P^-$	PE (33 :3) [M-H]	698,502023
$C_{39}H_{76}N_2O_6P^-$	SM (34 :2) [M-H]	699,519961
$C_{38}H_{71}NO_8P^-$	PE (33 :2) [M-H]	700,509622
$C_{39}H_{78}N_2O_6P^-$	SM (34 :1) [M-H]	701,54022
$C_{38}H_{73}NO_8P^-$	PE (33 :1) [M-H]	702,525985
$C_{39}H_{80}N_2O_6P^-$	SM (34 :0) [M-H]	703,554488
$C_{40}H_{70}O_8P^-$	PA (37 :4) [M-H]	709,444929
$C_{39}H_{69}NO_8P^-$	PE (34 :4) [M-H]	710,504745
$C_{40}H_{74}O_8P^-$	PA (37 :2) [M-H]	713,425784
$C_{39}H_{73}NO_8P^-$	PE (34 :2) [M-H]	714,428369
$C_{40}H_{76}O_8P^-$	PA (37 :1) [M-H]	715,550087
$C_{39}H_{75}NO_8P^-$	PE (34 :1) [M-H]	716,540422
$C_{41}H_{73}NO_7P^-$	PE (36 :4) [M-H ₂ O]	722,509487
$C_{41}H_{72}O_8P^-$	PA (38 :4) [M-H]	723,484835
$C_{41}H_{74}O_8P^-$	PA (38 :3) [M-H]	725,498114
$C_{41}H_{77}NO_7P^-$	PE (36 :1) [M-H ₂ O]	726,55187
$C_{41}H_{76}O_8P^-$	PA (38 :2) [M-H]	727,53621
$C_{41}H_{79}NO_7P^-$	PE (36 :0) [M-H ₂ O]	728,564091
$C_{41}H_{78}O_8P^-$	PA (38 :1) [M-H]	729,571348
$C_{42}H_{74}O_8P^-$	PA (39 :4) [M-H]	737,463209
$C_{41}H_{73}NO_8P^-$	PE (36 :4) [M-H]	738,460783
$C_{41}H_{75}NO_8P^-$	PE (36 :3) [M-H]	740,54202
$C_{42}H_{78}O_8P^-$	PA (39 :2) [M-H]	741,535224
$C_{41}H_{77}NO_8P^-$	PE (36 :2) [M-H]	742,51522
$C_{42}H_{80}O_8P^-$	PA (39 :1) [M-H]	743,544884
$C_{41}H_{79}NO_8P^-$	PE (36 :1) [M-H]	744,532364
$C_{42}H_{82}O_8P^-$	PA (39 :0) [M-H]	745,580255
$C_{43}H_{72}O_8P^-$	PA (40 :6) [M-H]	747,43512
$C_{42}H_{71}NO_8P^-$	PE (37 :6) [M-H]	748,490304
$C_{43}H_{74}O_8P^-$	PA (40 :5) [M-H]	749,499205
$C_{43}H_{77}NO_7P^-$	PE (38 :4) [M-OH]	750,548721
$C_{43}H_{79}NO_7P^-$	PE (38 :3) [M-OH]	752,557915
$C_{43}H_{78}O_8P^-$	PA (40 :3) [M-H]	753,493064
$C_{42}H_{77}NO_8P^-$	PE (37 :3) [M-H]	754,529198
$C_{44}H_{78}O_8P^-$	PA (41 :4) [M-H]	765,527946
$C_{43}H_{77}NO_8P^-$	PE (38 :4) [M-H]	766,552737

Formule	Identification	Masse
$C_{44}H_{80}O_8P^-$	PA (41 :3) [M-H]	767,547416
$C_{43}H_{79}NO_8P^-$	PE (38 :3) [M-H]	768,528737
$C_{44}H_{82}O_8P^-$	PA (41 :2) [M-H]	769,535347
$C_{44}H_{88}N_{206}P^-$	SM (40 :1) [M-CH ₃]	771,616233
$C_{43}H_{83}NO_8P^-$	PE (38 :1) [M-H]	772,577396
$C_{44}H_{75}NO_8P^-$	PE (39 :6) [M-H]	776,509975
$C_{45}H_{78}O_8P^-$	PA (42 :4) [M-H]	777,465724
$C_{44}H_{77}NO_8P^-$	PE (39 :5) [M-H]	778,561847
$C_{45}H_{84}N_{206}P^-$	SM (40 :4) [M-H]	779,543536
$C_{44}H_{79}NO_8P^-$	PE (39 :4) [M-H]	780,553177
$C_{42}H_{79}NO_{10}P^-$	PS (36 :1) [M-H]	788,558286
$C_{46}H_{82}N_{206}P^-$	SM (41 :6) [M-H]	789,542728
$C_{42}H_{81}NO_{10}P^-$	PS (36 :0) [M-H]	790,561853
$C_{40}H_{76}NO_{12}S^-$	sulfatide (OH 16 :0)	794,52023
$C_{46}H_{88}N_{206}P^-$	SM (42 :3) [M-CH ₃]	795,576775
$C_{46}H_{90}N_{206}P^-$	SM (42 :2) [M-CH ₃]	797,636332
$C_{46}H_{92}N_{206}P^-$	SM (42 :1) [M-CH ₃]	799,646254
$C_{43}H_{78}O_{13}P^-$	PI (34 :2) [M-H]	833,50102
$C_{43}H_{80}O_{13}P^-$	PI (34 :1) [M-H]	835,54533
$C_{43}H_{81}O_{13}P^-$	PI (34 :1) [M]	836,537898
$C_{45}H_{78}O_{13}P^-$	PI (36 :4) [M-H]	857,537269
$C_{46}H_{84}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 22 :2) [M-H]	858,516859
$C_{45}H_{80}O_{13}P^-$	PI (36 :3) [M-H]	859,525016
$C_{45}H_{82}O_{13}P^-$	PI (36 :2) [M-H]	861,578901
$C_{46}H_{88}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 22 :0) [M-H]	862,582392
$C_{45}H_{84}O_{13}P^-$	PI (36 :1) [M-H]	863,577831
$C_{47}H_{78}NO_{11}S^-$	sulfatide (C ₂₃)	864,550213
$C_{47}H_{80}PO_{13}^-$	PI(38 :5) [M-H]	883,575101
$C_{48}H_{86}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 24 :3)	884,548913
$C_{47}H_{82}PO_{13}^-$	PI(38 :4) [M-H]	885,590625
$C_{48}H_{88}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 24 :2)	886,59547
$C_{47}H_{84}PO_{13}^-$	PI(38 :3) [M-H]	887,602058
$C_{48}H_{90}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 24 :1)	888,596013
$C_{47}H_{86}O_{13}P^-$	PI (38 :2) [M-H]	889,619808
$C_{48}H_{92}NO_{11}S^-$	sulfatide (C 24 :0)	890,625602
$C_{47}H_{88}O_{13}P^-$	PI (38 :1) [M-H]	891,612326

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
École polytechnique de Louvain

Rue Archimède, 1 bte L6.11.01, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgique | www.uclouvain.be/epl