

École polytechnique de Louvain

Transfert de protéines par faisceaux d'ions d'argon : vers une meilleure quantification des couches déposées

Auteur: **Charline VAN HINDERDAEL**

Promoteur: **Arnaud DELCORTE**

Lecteurs: **Sophie DEMOUSTIER, Christine DUPONT**

Année académique 2021–2022

Master [120] : ingénieur civil biomédical

Remerciements

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et à la rédaction de ce travail de fin d'études en vue de l'obtention du Master en ingénieur civil biomédical, promotion 2021-2022.

Mes remerciements vont dans un premier temps à mon promoteur Monsieur Arnaud Delcorte, professeur à l'École Polytechnique de Louvain et directeur de recherche FNRS, pour sa disponibilité, sa bienveillance et son encadrement tout au long de cette année académique.

Je remercie en particulier Vincent Delmez, actuellement en fin de doctorat dans le laboratoire Bio- and Soft Matter de l'Université Catholique de Louvain. Son aide, sa patience et ses judicieux conseils ont été très précieux.

Je souhaite remercier Claude Poleunis, Pierre Eloy et Joseph Nader pour le temps qu'ils m'ont accordé à travers nos différentes rencontres et pour les enseignements reçus.

Un grand merci à François Van Hinderdael pour les corrections et les conseils de syntaxe lors de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie mes proches et ma famille pour leur soutien sans faille, leur réconfort et leurs encouragements tout au long de ce travail.

Enfin, je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes rencontrées dans le cadre de ce travail et qui ont pris le temps de m'aider, de m'écouter et de discuter du sujet. Leurs critiques constructives ont été d'une grande aide.

Abstract

La fonctionnalisation des surfaces à l'aide des protéines est un atout majeur dans de nombreuses applications. Toutefois, l'adsorption des protéines en solution aqueuse sur les surfaces présente quelques limitations telles que des changements conformationnels subis par la protéine ou le développement d'une monocouche. L'alternative présentée dans ce travail repose sur le dépôt des protéines en phase gazeuse. Elle se base sur le principe des faisceaux d'ions d'argon dirigés sur une cible de protéines. Après l'impact, les molécules émises sont récupérées sur un collecteur. Bien que le transfert des protéines de la cible au collecteur soit confirmé, la quantification des protéines déposées en phase gazeuse reste un défi. Ce travail se concentre sur la bradykinine ($\sim 1 \text{ kDa}$), le lysozyme ($\sim 14 \text{ kDa}$) et la trypsine ($\sim 24 \text{ kDa}$). Dans un premier temps, la bradykinine et le lysozyme sont transférés sur des films de polyéthylène. La quantification est facilitée car elle évite les problèmes techniques liés au silicium rencontrés durant la construction du test. Ensuite, le développement de couches sacrificielles en tréhalose et de couches fonctionnelles en polyéthylène glycol a pour but d'encourager le relargage des protéines en solution pour permettre les tests de quantification sur ces solutions. La couche de tréhalose se solubilise dans l'eau et largue de cette manière les protéines déposées à sa surface. D'un autre côté, le polyéthylène repousse les protéines en solution. Finalement, la détection de trypsine transférée sur des films de polyéthylène est un succès. Elle est suivie par un test d'activité sur des transferts supplémentaires réalisés également sur films de polyéthylène. Malgré la présence de quelques incohérences et le développement des couches sacrificielles ou fonctionnelles qui nécessite une amélioration, les résultats obtenus sont prometteurs. Chaque transfert des protéines réalisé est confirmé et des tendances sont déterminées à partir de la quantification de la matière transférée.

Table des matières

Liste des tableaux	vi
Table des figures	vii
Glossaire	xii
Introduction	1
1 Adsorption des protéines	4
1.1 Les protéines	4
1.2 L'adsorption de protéines	6
1.2.1 Adsorption de protéines en solution aqueuse : les limitations	9
2 Les outils pour déposer les protéines en phase gazeuse	12
2.1 Spectrométrie de masse	12
2.2 Soft-Landing	13
2.2.1 Source d'ionisation	15
2.3 Faisceaux d'ions	17
2.3.1 Spectrométrie de masse d'ions secondaires	17
2.3.2 Faisceaux d'ions monoatomiques	17
2.3.3 Faisceaux d'agrégats ionisés ou d'ions polyatomiques	19
2.3.4 Rendement de pulvérisation	19
2.4 Faisceau d'agrégats ionisés d'éléments gazeux	20
2.4.1 L'impact agrégat-matière	22
2.4.2 Analyse d'échantillon par GCIB	26
2.4.3 Distribution angulaire des molécules émises	27
2.4.4 Transfert de biomolécules par GCIB	30
3 Objectifs et stratégie	32
3.1 Objectifs	32
3.2 Stratégie	33
3.2.1 Choix des matériaux	33

3.2.2	Choix des protéines	37
4	Matériaux et méthodes	39
4.1	Matériaux	39
4.2	Préparation des substrats collecteurs et source de protéines	40
4.3	Outils d'analyse	41
4.3.1	Mesures avec ToF-SIMS	41
4.3.2	Spectroscopie photoélectronique à rayons X, XPS	41
4.4	Transfert des protéines	42
4.5	Les tests biochimiques	43
4.5.1	Electrophorèse sur gel	47
5	Résultats et discussion	49
5.1	Transfert de protéines sur films de polyéthylène	49
5.1.1	Transfert de bradykinine sur PE	50
5.1.2	Transfert de lysozyme sur PE	52
5.1.3	Comparaison entre la bradykinine et le lysozyme	54
5.2	Transfert de protéines sur couches fonctionnalisées	55
5.3	Transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose	56
5.3.1	Création de la couche de tréhalose	56
5.3.2	Caractérisation des couches de tréhalose avant le transfert de bradykinine	57
5.3.3	Caractérisation des couches de tréhalose après transfert de bradykinine	58
5.3.4	Caractérisation des couches de tréhalose après le relargage de la bradykinine	69
5.4	Transfert de bradykinine sur une couche de PEG	74
5.4.1	Création de la couche de PEG	74
5.4.2	Caractérisation des couches de PEG avant le transfert de bradykinine	75
5.4.3	Caractérisation des couches de PEG après le transfert de bradykinine	78
5.4.4	Caractérisation des couches de PEG après le relargage de la bradykinine	85
5.5	Comparaison entre les résultats obtenus avec les couches de tréhalose ou avec les couches de PEG	90
5.6	Quantification de bradykinine transférée sur des couches fonctionnalisées	91
5.7	Transfert de trypsine	93
6	Conclusion et perspectives	99

Bibliographie	104
A Courbes de calibration des tests BCA	112
A.1 Courbe de référence pour le lysozyme	112
A.2 Pour transferts sur films de PE	112
A.2.1 Transfert de bradykinine sur PE	113
A.2.2 Transfert de lysozyme sur PE	114
A.3 Avec différentes solutions	114
B Référence de l'ion moléculaire de la bradykinine	116
C Caractérisation de la couche de tréhalose	117
C.1 Après le transfert de bradykinine	117
C.2 Après le relargage de bradykinine et du tréhalose en solution	118
D Caractérisation de la couche de PEG	120
D.1 Pics sur les spectres d'énergies de liaison du carbone et de l'oxygène	120
D.2 Avant le transfert de bradykinine	121
D.3 Après le transfert de bradykinine	122
D.4 Après le relargage de bradykinine en solution	123
E Quantification de la bradykinine transférée	124
F Quantification de la trypsine	125

Liste des tableaux

2.1 Rendement d'ionisation positive de certains métaux et leur oxyde métallique.	26
5.1 Paramètres de la première série de transferts de la bradykinine.	50
5.2 Paramètres de la deuxième série de transferts de la bradykinine.	51
5.3 Paramètres de la première série de transferts du lysozyme.	53
5.4 Paramètres de la deuxième série de transferts du lysozyme.	54
5.5 Paramètres des transferts de bradykinine sur les couches de tréhalose.	59
5.6 Temps d'immersion de six substrats de silicium dans des solutions de PEG de concentrations différentes.	75
5.7 Rapport entre les proportions des liaisons C-O et l'or au sein d'un même échantillon.	76
5.8 Paramètres des transferts de la bradykinine sur les couches de PEG.	78
5.9 Paramètres des quatre transferts de la bradykinine sur les couches de tréhalose et de PEG.	92
5.10 Paramètres des transferts de la trypsine sur des films de PE.	93
5.11 Paramètres des conditions de transfert des différents échantillons pour lesquels le test de dosage fluorescent a été réalisé.	96
5.12 Masses de trypsine estimées par approximation polynomiale du second degré et par la racine carrée.	96
D.1 Composition du substrat de silicium couvert d'or avec les différentes couches de PEG.	121
D.2 Suite du tableau de la composition du substrat de silicium couvert d'or avec les différentes couches de PEG.	121

Table des figures

1	Prothèse de hanche Mutars®	2
1.1	Structure de la protéine de collagène.	5
1.2	Structures primaire, secondaire, tertiaire et quaternaire d'une protéine.	5
1.3	Les polyampholytes.	7
2.1	Schéma simplifié d'un spectromètre de masse.	13
2.2	Appareillage pour soft-landing.	14
2.3	Schéma d'une source d'ionisation par électrospray.	16
2.4	Principe de la spectrométrie de masse à ions secondaires.	18
2.5	Émission des particules.	18
2.6	Évolution du rendement de pulvérisation.	20
2.7	Source d'agrégats et chemin parcouru pour atteindre la cible.	21
2.8	Simulations de la dynamique moléculaire suite à l'impact d'un agrégat d'argon sur différentes surfaces.	22
2.9	Simulations de la dynamique moléculaire suite à l'impact d'un agrégat d'argon.	25
2.10	Coupe d'un cerveau de souris.	26
2.11	Expérience de <i>Lorenz et al.</i>	28
2.12	Distributions angulaires des éjectas pour des angles d'incidence de 0° et 15°.	29
2.13	Distributions angulaires des éjectas pour différents angles d'incidence.	30
2.14	Deux montages pour le transfert de biomolécules.	31
2.15	Premier montage cible-collecteur.	31
3.1	Film transparent et souple de polyéthylène.	34
3.2	Carré de 1cm ² de polyéthylène placé un tube Eppendorf.	34
3.3	Substrat de silicium recouvert d'or.	35
3.4	Structure de l'isomère naturel du tréhalose.	36
3.5	Structure de la bradykinine.	37
3.6	Structure du lysozyme.	38
3.7	Structure tridimensionnelle de la trypsine bovine.	38

4.1	Dispositif pour le transfert de protéine.	43
4.2	Kit Pierce™ de dosage BCA d'une protéine.	44
4.3	Réaction chimique lors du test BCA.	45
4.4	Allures de courbes classiques en réponse au test [BCA].	46
4.5	Kit Pierce™ de dosage fluorescent d'une protéase.	46
4.6	Digestion protéolytique d'une caséine marquée par une protéase.	47
5.1	Estimation de la masse de bradykinine transférée en fonction de la densité d'ions primaires d'argon pour la première série de transferts.	50
5.2	Estimation de la masse de bradykinine transférée en fonction de la densité d'ions primaires d'argon pour la deuxième série de transferts.	51
5.3	Estimation de la masse de lysozyme transférée en fonction de la densité d'ions primaires d'argon pour la première série de transferts.	53
5.4	Estimation de la masse de lysozyme transférée en fonction de la densité d'ions primaires d'argon pour la deuxième série de transferts.	54
5.5	Absorbance de différents sucres en réaction au test [BCA].	56
5.6	Appareil de sublimation.	57
5.7	Spectre de masse partiel illustrant un pic caractéristique du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$.	58
5.8	Spectre de masse illustrant un pic caractéristique du tréhalose, $C_{12}H_{21}O_{10}^+$.	58
5.9	Molécule de tréhalose.	59
5.10	Spectres de masse illustrant le pic du $C_6H_{11}O_5^+$ après le transfert de la bradykinine.	60
5.11	Spectres de masse illustrant le pic du $C_{12}H_{21}O_{10}^+$ après le transfert de la bradykinine.	60
5.12	Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après son transfert sur une couche de tréhalose.	61
5.13	Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 6h.	62
5.14	Premier profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h).	63
5.15	Zoom sur la première interface du premier profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h).	64
5.16	Schéma de la couche formée par le transfert de protéines sur une couche de sucre.	65
5.17	Second profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h).	66
5.18	Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 1h30).	67

5.19 Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après le relargage des protéines et du sucre en solution.	70
5.20 Spectres de masse illustrant le pic du $C_6H_{11}O_5^+$ après le relargage des protéines et du sucre en solution des.	70
5.21 Spectres de masse illustrant le pic du $C_{12}H_{21}O_{10}^+$ après le relargage des protéines et du sucre en solution.	70
5.22 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 6h, après solubilisation.	72
5.23 Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h) après solubilisation.	73
5.24 Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 1h30) après solubilisation.	73
5.25 Construction d'une couche de polymère par méthode <i>grafting-to</i> . . .	74
5.26 Spectre de masse illustrant le pic du CH_3O^+	77
5.27 Spectre de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$	78
5.28 Spectres de masse illustrant le pic du CH_3O^+ après le transfert de la bradykinine.	79
5.29 Spectres de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$ après le transfert de la bradykinine.	80
5.30 Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après son transfert sur une couche de PEG. . . .	80
5.31 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de PEG a duré 3h.	82
5.32 Premier profil dans la couche de PEG et bradykinine (transfert de 3h). .	83
5.33 Schéma de la couche formée par le transfert de protéines sur une couche de polymère.	84
5.34 Second profil dans la couche de PEG et bradykinine (transfert de 3h). .	84
5.35 Profil dans la couche de PEG et bradykinine (transfert de 1h). . . .	85
5.36 Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après le relargage des protéines en solution. . . .	86
5.37 Spectres de masse illustrant le pic du CH_3O^+ après le relargage des protéines en solution.	87
5.38 Spectres de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$ après le relargage des protéines en solution.	87
5.39 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de PEG a duré 3h, après solubilisation.	88
5.40 Profil dans la couche de PEG et bradykinine (transfert de 3h) après solubilisation.	89

5.41 Profil dans la couche de PEG et bradykinine (transfert de 1h) après solubilisation.	90
5.42 SDS-PAGE sur la trypsine transférée sur films de PE.	95
5.43 Échelle de référence de poids moléculaire Ladder.	95
5.44 Estimation de la masse de trypsine transférée en fonction de la densité d'ions primaires d'argon.	98
A.1 Courbe de calibration du lysozyme avec le kit de dosage BCA.	112
A.2 Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de PE avec le kit de dosage BCA.	113
A.3 Courbe de calibration de la bradykinine déposée sur des films de PE pour la première série de transferts avec le kit de dosage BCA.	113
A.4 Courbe de calibration de la bradykinine déposée sur des films de PE pour la deuxième série de transferts avec le kit de dosage BCA.	113
A.5 Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de PE pour la première série de transferts avec le kit de dosage BCA.	114
A.6 Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de PE pour la deuxième série de transferts avec le kit de dosage BCA.	114
A.7 Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de PEG avec le kit de dosage BCA.	114
A.8 Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de fructose avec le kit de dosage BCA.	115
A.9 Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de tréhalose avec le kit de dosage BCA.	115
B.1 Référence des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine.	116
C.1 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 1h30.	118
C.2 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 1h30, après solubilisation.	119
D.1 Spectre de l'énergie de liaison illustrant les pics du carbone et de l'oxygène.	120
D.2 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur couche de PEG a duré 1h.	122
D.3 Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur couche de PEG a duré 1h, après solubilisation.	123
E.1 Courbe de calibration de la bradykinine avec le kit de dosage BCA pour la quantification de ses transferts sur couches de tréhalose et PEG.	124

F.1	Courbe de calibration pour quantifier la quantité de trypsine transférée à l'aide du kit de dosage fluorescent d'une protéase avec approximation polynomiale.	125
F.2	Courbe de calibration pour quantifier la quantité de trypsine transférée à l'aide du kit de dosage fluorescent d'une protéase avec approximation par racine carrée.	126

Glossaire

Ar Argon.

Au Or.

BCA BiCinchoninic acid Assay.

BGG Bovine Gamma Globulin ou gammaglobuline bovine.

Bi Bismuth.

BSA Bovin Serum Albumin ou albumine de sérum bovin.

DESI Desorption ElectroSpray Ionization ou ionisation par désorption électrospray.

DM Dynamique Moléculaire.

E/n Energie par atome.

ESI ElectroSpray Ionisation ou ionisation par électrospray.

eV Electron volt.

FITC Fluorescein IsoThioCyanate ou isothiocyanate de fluorescéine.

GCIB Gaz Clusters Ions Beam ou faisceau d'agrégats ionisés d'éléments gazeux.

HSA Human Serum Albumin ou albumine de sérum humain.

m/z rapport masse-sur-charge.

MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization ou désorption/ionisation laser assistée par matrice.

PE Polyéthylène.

PEG Poly(éthylène glycol).

RNase Ribonucléase de pancréas bovin.

SAM Self Assembled Monolayer ou monocouche auto-assemblée.

SDS-PAGE Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis ou électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide.

Si Silicium.

SIMS Secondary Ions Mass Spectrometer ou Spectromètre de masse d'ions secondaires.

ToF Time-of-Flight ou à temps de vol.

XPS X-Ray Photoelectron Spectroscopy ou spectroscopie photoélectronique à rayons X.

Introduction

Contexte

Depuis son apparition sur Terre, l'Homme utilise quotidiennement les matériaux qui l'entourent. Différents types de matériaux comme le bois, la pierre ou le métal sont utilisés pour créer une multitude de choses et d'objets tels que des abris pour se protéger du climat ou des armes destinées à la chasse. Aujourd'hui, la quantité d'objets créés et utilisés chaque jour est telle qu'on ne pourrait plus les compter (gsm, couverts, vêtements, etc.).

Un domaine dans lequel l'étude des matériaux est devenue incontournable est celui de la médecine. Depuis toujours, l'Homme cherche à soigner ses maladies et à guérir ses blessures, allant même jusqu'à remplacer, si besoin, une partie de son corps par l'un ou l'autre matériau. Au début, il y avait la jambe de bois, l'œil de verre, ou le crochet pour remplacer la main. Grâce à la recherche et au progrès, la médecine, comme les autres sciences, se développe, élargit son champ de connaissances et s'aventure toujours plus loin, quand c'est nécessaire, dans le remplacement de tout ou partie d'organes ou de structures biomécaniques du corps humain par des matériaux nouveaux et complexes. Le défi est que ceux-ci doivent respecter nombre de conditions, notamment en matière de résistance et de biocompatibilité. En remontant dans le temps, des chercheurs ont découvert que déjà en Egypte antique, des tentatives d'implantations de dents en ivoire ou en bois ont été réalisées. Néanmoins, c'est seulement en 1900 que, de manière scientifiquement prouvées, les premières implantations ont réussi. Il s'agissait de l'introduction de plaques osseuses pour aider à la fixation des os lors de fractures. Ces implants sont en développement continu pour répondre aux différents besoins de la société. Pour illustrer un autre exemple, à la Figure 1, une hanche artificielle développée par Mutars[®] est représentée. 1

Depuis, les matériaux utiles à la réparation et à la régénération du corps humain sont nommés "biomatériaux". Selon le consensus accepté à la conférence de Chester en 1991, un biomatériau est *"un matériau non vivant, utilisé dans un dispositif*

médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques, qu'il participe à la constitution d'un appareillage à visée diagnostique ou à celle d'un substitut de tissu ou d'organe, ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou assistance) fonctionnelle". [1]

Utilisés dans des domaines médicaux divers (dentaire, vétérinaire, chirurgical, etc), tout type de matériau doit cependant être adapté à l'application visée et doit être capable de résister aux charges et contraintes de la partie qu'il remplace ou soutient. Les polymères, céramiques, métaux et composites sont étudiés pour répondre à ces besoins. [1] [2]



FIGURE 1 – Prothèse de hanche Mutars® développée pour le remplacement d'une hanche. [3]

La partie la plus importante de ces applications/biomatériaux est leur surface, car c'est avec celles-ci que se fait le contact avec le corps humain. L'interaction corps humain/matériau est étudiée depuis longtemps, non seulement pour comprendre et respecter les conditions de biocompatibilité, mais également pour investiguer la colonisation des surfaces par les protéines du corps qui vont s'y greffer. Ces protéines adsorbées déterminent l'adhésion cellulaire ou la réponse inflammatoire au biomatériau implanté dans le corps humain. [4] Dans le cadre de ce mémoire, des protéines seront utilisées pour fonctionnaliser des surfaces.

Question de recherche

La fonctionnalisation de surface à l'aide de protéines est importante pour l'étude des biomatériaux et fait l'objet de nombreuses recherches scientifiques. Ces couches de protéines sur les surfaces sont principalement formées par adsorption en solution aqueuse qui présente cependant des limitations. C'est la raison pour laquelle les faisceaux d'agrégats ionisés d'argon sont utilisés pour transférer des protéines sur une surface dans ce travail.

La quantification de la masse transférée qui compose ces couches n'a pas encore été résolue. Dès lors, ce mémoire vise le transfert de protéines sur différents types de substrat dans le but de faciliter la réalisation de tests biologiques de quantification.

Organisation

En vue de répondre à la question de recherche, ce mémoire s'articule en six chapitres. Le premier chapitre décrit les protéines de manière générale ainsi que les comportements qu'elles adoptent lors de l'adsorption sur une surface. L'adsorption en solution aqueuse présente plusieurs limitations qui sont également identifiées.

Ces limitations en solution aqueuse suscitent un intérêt pour trouver une méthode alternative en vue de réaliser des couches de biomolécules sur une surface. Par conséquent, le deuxième chapitre porte sur le développement de méthodes de dépôt de molécules en phase gazeuse. Le soft-landing utilisant la spectrométrie de masse est abordé. Néanmoins, il présente aussi certains inconvénients. Pour y pallier, la technologie des faisceaux d'ions est préférée. Ces faisceaux constituant la méthode de choix pour transférer des biomolécules sont présentés dans les dernières sections de ce chapitre.

Le troisième chapitre explique de manière plus précise les objectifs et la stratégie entreprise pour tenter de répondre à la problématique. L'ensemble des matériaux, des méthodes d'analyse et des tests biochimiques réalisés à travers les expérimentations et manipulations est détaillé dans le quatrième chapitre. Ensuite, une analyse et une discussion sur les multiples transferts réalisés sur différents substrats (en polymère ou métallique, fonctionnalisé ou non) sont entreprises dans le cinquième chapitre.

Pour finir, le sixième chapitre résume la problématique, les résultats trouvés ainsi que les difficultés auxquelles il a fallu faire face. Des pistes d'amélioration sont aussi proposées dans le but de résoudre les problèmes rencontrés.

Chapitre 1

Adsorption des protéines

Dans ce chapitre, une introduction générale aux protéines permet de mieux comprendre la manière dont elles s'adsorbent sur une surface. Toutefois, l'adsorption en solution aqueuse des protéines présente quelques limitations qui sont décrites dans la troisième section.

1.1 Les protéines

Dix mille ; c'est le nombre moyen de protéines différentes par cellule dans notre corps. [5] Les protéines sont en réalité la base du vivant, car elles remplissent un nombre important de fonctions au sein de la cellule et par conséquent d'un tissu. Par exemple, les enzymes assurent le rôle de catalyseurs dans certains processus, elles accélèrent les réactions. [6]

L'usage des protéines est maintenant d'application dans des domaines nombreux et variés. L'exemple du collagène (Figure 1.1) en cosmétique est à relever. Cette protéine constitue la base d'un ensemble de tissus tels que la peau, le tissu osseux ou le cartilage. Dès lors, les chercheurs ont étudié cette protéine et ont découvert sa relation avec le vieillissement de la peau et l'apparition des rides. Lorsqu'il se dégrade avec le temps et donc avec l'âge, le collagène voit son épaisseur et sa résistance diminuer, dès lors le rôle de soutien qu'il joue dans les tissus s'en trouve sensiblement affecté. Crèmes pour la peau, compléments alimentaires pour les os et cartilages... ont vu le jour pour tenter de donner une seconde jeunesse aux tissus du corps humain. [7][8]

Etudiées également dans le domaine de l'emballage alimentaire, parmi d'autres constituants (polysaccharides et lipides), les protéines sont utilisées comme matériaux pour la fabrication de polymères comestibles requis pour l'enrobage d'aliments

sans qu'il y ait de risque pour la santé des êtres vivants (humains et animaux). [9]

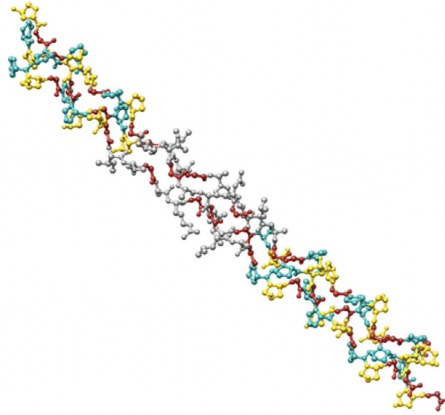


FIGURE 1.1 – Structure de la protéine de collagène. [7]

Pas plus grandes que quelques nanomètres en général, elles sont toutes différentes de par leur forme, taille, structure ainsi que par leur repliement défini par les structures secondaire et tertiaire. C'est ce repliement qui va décider de la répartition des charges positives et négatives au sein de la protéine repliée, tout comme de l'orientation et de l'exposition des groupements hydrophiles et hydrophobes qui la constituent. La disposition de ces différents groupes joue un rôle important dans l'adsorption des protéines sur une surface. [10] La structure tertiaire définit le repliement spatial final des structures secondaires prises par la molécule. Les structures secondaires sont souvent régulières et périodiques, et constituent le repliement spatial de parties de la structure primaire (la séquence d'acides aminés). [11] Les sites spécifiques qui permettent les fonctions biologiques de la protéine sont alors apparents. [12] Les différentes structures d'une protéine sont reprises à la Figure 1.2. [10]

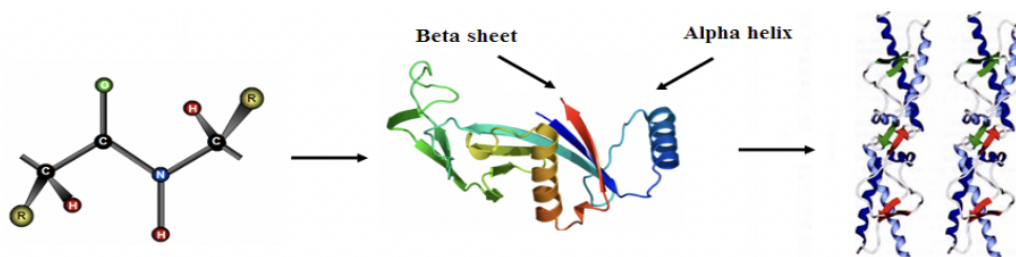


FIGURE 1.2 – De gauche à droite : Lien peptidique qui lie les acides aminés constituant la structure primaire de la protéine ; structure tertiaire qui dispose spatialement les structures secondaires (hélice alpha et feuillets beta) ; structure quaternaire qui lie plusieurs protéines dans leur structure tertiaire. [12]

Il est toutefois important de souligner que la protéine remplira ses fonctions biologiques uniquement repliée (dans sa conformation native), elle est alors dite "active". Au contraire, si pour certaines raisons elle était dépliée, elle serait dite "dénaturée" ou dans un "état dénaturé" et n'assurera plus ses rôles. Lorsqu'on manipule des protéines, il est donc important de faire attention à leur stabilité afin de les garder dans leur état actif. La protéine se dénature généralement par l'action de la température ou d'un dénaturant chimique. Pour des protéines naturellement très stable, il peut être nécessaire d'utiliser les deux manières pour arriver à la dénaturation. C'est le cas des protéines thermophiles qui ne se dénaturent pas à des températures inférieures à 100°C. [13]

1.2 L'adsorption de protéines

Dans cette section, la notion d'adsorption des protéines est développée. En effet, pour certaines applications, il est nécessaire d'immobiliser les protéines sans toutefois qu'elles ne perdent leur fonction et leur activité. Par exemple, les enzymes, mentionnées à la Section 1.1, sont utilisées dans beaucoup de domaines industriels et médicaux en raison de leur fonction catalytique. Retrouvées dans les bioréacteurs [14], elles subissent des transformations et contraintes qui réduisent leurs activité et stabilité au cours de l'adsorption sur la surface [15]. Pourtant, une immobilisation contrôlée améliorerait considérablement la capacité de réutilisation de ces catalyseurs, l'activité et la stabilité des enzymes. [16] [17] Cette section est dès lors dédiée à la compréhension des différents comportements des protéines lors de leur interaction avec une surface en vue de trouver des solutions pour conserver leurs fonctions dans de futures applications.

Le comportement des protéines vis-à-vis d'une surface a d'abord été décrit par *Irving Langmuir* et sa théorie sur l'adsorption des molécules de gaz sur les surfaces (isotherme d'adsorption de *Langmuir*). Elles étaient considérées comme des petites sphères rigides capables uniquement de s'adsorber ou de se désorber d'une surface. Cependant, cette théorie comporte plus d'une limitation étant donné que les protéines possèdent une large gamme de formes, tailles et conformations. Ces différents paramètres auront donc une influence sur leur adsorption. [10] [18]

En tant que polyélectrolytes (polymères chargés électriquement), les protéines peuvent être soumises à des forces électrostatiques au contact des surfaces (généralement chargées). Dès lors deux cas de figure s'offrent à elles. D'un côté, les charges opposées des deux composants facilitent grandement l'adsorption à la surface. Il y a alors attraction électrostatique et la protéine tend à maximiser le contact. De l'autre côté, si les charges sont de même signe, il y aura répulsion électrostatique

et la protéine n'entrera pas en contact avec la surface, sauf lorsque d'autres forces attractives surmontent cette répulsion (exemple de l'attraction hydrophobe). Pour ces deux cas de figures, la densité des protéines sera plus faible que si l'espèce n'était pas chargée. En effet, la biomolécule chargée est soumise non seulement à des répulsions électrostatiques entre ses groupes chargés qui tend la biomolécule à s'étendre, mais également à des forces de répulsion entre deux molécules chargées de même signe qui tend à les éloigner l'une de l'autre. [14]

Les protéines sont généralement des polyampholytes (voir Figure 1.3), espèces composées de charges positives et négatives. Si manipulées à leur point isoélectrique, les protéines possèdent un nombre égal de charges positives et négatives et dues à ces interactions électrostatiques intramoléculaires, la biomolécule se contracte, ce qui engendre une plus grande densité d'adsorption à la surface. [14] Au contraire, si les protéines sont manipulées dans un solvant dont le pH diffère de leur point isoélectrique, la protéine devient chargée. A pH supérieur au point isoélectrique, la protéine est chargée négativement ; à l'inverse, à pH inférieur au point isoélectrique, la protéine se charge positivement. [19]

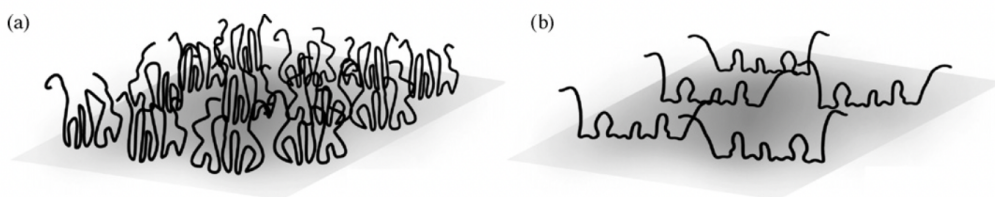


FIGURE 1.3 – Les polyampholytes. a) Au point isoélectrique du polyampholyte, la densité adsorbée est maximale due à la contraction de la molécule. b) Le pH diffère du point isoélectrique de la protéine et donc la densité d'adsorption est plus faible à cause des répulsions électrostatiques intra- et inter-moléculaires. [14]

Un autre comportement intéressant à connaître est celui des interactions entre les groupements hydrophobes/hydrophiles constituant la protéine et les surfaces hydrophobes et hydrophiles. Ce processus d'adsorption est important à comprendre, car il permet de surmonter les répulsions électrostatiques décrites précédemment. Ce mécanisme y est semblable dans un sens car certaines interactions sont favorisées. En effet, la molécule présente ses groupements hydrophiles à une surface hydrophile, de même que pour ses groupements hydrophobes qu'elle présente à une surface hydrophobe. [10] [20] En solution aqueuse, la protéine tend à protéger ses groupements apolaires en adoptant une structure globulaire. La stabilisation des hélices alpha ou des feuillets beta est assurée par les liaisons hydrogènes. Par le contact avec la surface, la protéine peut exposer ses groupements apolaires à cette

surface. Si la surface est apolaire, elle favorise le maintien des liaisons hydrogène qui forment les structures ordonnées (hélice alpha et feuillets beta). Au contraire, si la surface est polaire, la protéine peut se déplier. Les liaisons hydrogènes sont rompues et peuvent réagir avec la surface. [14]

Quand une protéine est adsorbée sur une surface, elle est généralement en configuration stable pour elle. Cependant, pour une protéine elliptique, deux orientations par rapport à la surface peuvent être considérées. En fonction du type de surface avec laquelle elle entre en contact et la disposition de ces groupements, elle peut adopter une orientation dite *side-on* ou une orientation dite *end-on*. [10] [20] Par exemple, dans le cadre d'une étude sur le lien entre la croissance de l'empreinte (nombre de contacts segment-surface) et l'énergie d'adsorption du fibrinogène, les chercheurs ont remarqué que le fibrinogène prenait des orientations *side-on* ou *end-on*. *Side-on* signifie qu'elle s'adsorbe de manière latérale tandis qu'en *end-on*, elle adopte une orientation frontale (moins de contact protéine/surface dans cette orientation, et dès lors une moins grande empreinte de la protéine sur la surface mais plus de protéines adsorbées et une plus grande épaisseur de couche de protéines). Néanmoins, au fil du temps, il a été observé que le fibrinogène tend à maximiser son empreinte sur la surface en se dénaturant sur les surfaces hydrophobes ou en se réorientant sur les surfaces hydrophiles. [20] [10]

Il est également possible d'identifier les protéines "dures" et "molles". Les protéines dures représentent des petites molécules "rigides" qui subissent de plus faibles réarrangements structuraux lors de l'adsorption à la surface. Elles possèdent une énergie de cohésion interne élevée et sont structuralement stables. Pour les molécules dites "molles", c'est l'inverse. Il s'agit de molécules plus grandes et plus aptes à subir des réarrangements structuraux pour maximiser le contact avec la surface, leur énergie de cohésion interne est faible. Elles sont dites structuralement labiles. Ces réarrangements structuraux surviennent à la suite des interactions avec des surfaces hydrophiles/hydrophobes ainsi que des interactions électrostatiques avec ces surfaces. Dans le cas de surfaces hydrophobes, protéines "dures" et "molles" s'y adsorbent. Les interactions électrostatiques attractives ou répulsives n'ont pas de poids, car l'attraction hydrophobe est plus forte que la répulsion électrostatique. La protéine "molle" a le même comportement pour une surface hydrophile. Tandis que la protéine dure ne s'adsorbe sur une surface hydrophile que si les interactions électrostatiques le permettent, c'est-à-dire si la molécule est attirée de façon électrostatique. Lors de ces adsorptions, les protéines peuvent subir de plus ou moins forts réarrangements structuraux. [10] [14] [21] [22]

Jusqu'à présent le cas d'une biomolécule unique dans une solution a été abordé, mais

qu'en est-il d'un mélange de plusieurs protéines en solution tel que celui d'un fluide corporel comme le sang ou le fluide cérébrospinal ? [12] Comment s'adsorbent-elles ? Plusieurs chercheurs se sont penchés sur ce cas. Parmi ceux-ci, Vroman et Adams ont analysé le phénomène qui se déroulait entre des protéines plasmatiques et l'ont enregistré à l'aide d'un ellipsomètre. [23] C'est ce premier chercheur qui a donné son nom au phénomène auquel les protéines sont soumises. Il s'agit d'un phénomène de compétition appelé *effet de Vroman*. L'*effet de Vroman* s'opère en trois étapes. Une première couche de protéines s'adsorbe à la surface solide. Ensuite, un complexe transitoire est formé grâce à une seconde couche de protéine. Ce complexe tourne et la première couche de protéines est ainsi orientée vers la solution. Finalement, cette première couche se désorbe et s'élimine à travers la solution laissant place à une couche de protéines secondaires sur la surface. Ce processus se réalise suite aux différentes vitesses de diffusion des biomolécules à travers la solution jusqu'à la surface à atteindre. En effet, il a été observé que les protéines de plus faible poids moléculaire étaient adsorbées dans un premier temps avant d'être remplacées par des protéines de poids moléculaire plus important. [10] [23] [24] [25]

Au cours de son étude sur le comportement des protéines aux interfaces (sur des surfaces planes), Willem Norde remarque que l'excès d'un type de protéine par rapport à la surface d'adsorption disponible mène à un certain échange homomoléculaire entre les protéines adsorbées et les protéines diluées dans la solution. Les protéines observent une adsorption transitoire sur la surface face à d'autres protéines de la même espèce. C'est comme si un effet de *Vroman* avait lieu au sein d'une espèce. De plus, il constate que les protéines "molles" conservent leurs changements structuraux dus à l'adsorption lorsqu'elles sont à nouveau libres en solution. [14]

1.2.1 Adsorption de protéines en solution aqueuse : les limitations

Malgré qu'elle soit une méthode assez simple à mettre en oeuvre, et qu'elle soit spontanée dans un grand nombre de cas, l'adsorption de protéines en solution aqueuse n'a pas que des avantages. Si elle est couramment utilisée, et qu'elle a fait ses preuves pour toute une série d'applications, elle a également montré ses limites pour une série d'autres.

Dans un premier temps, l'adsorption est généralement irréversible. Willem Norde décrit dans son papier [14] que les deux protéines principales utilisées dans son doctorat (albumine de sérum humain, [HSA], et ribonucléase de pancréas bovin, [RNase]) sont adsorbées sur la surface pendant plusieurs jours, ce qui peut être considéré

comme une adsorption irréversible mettant en doute la théorie de *Langmuir*.

De plus, la biomolécule peut subir des changements de conformation lors du processus d'adsorption à la surface. Ces changements de conformation peuvent induire alors une perte de la fonction biologique de cette molécule qui n'est ainsi plus apte à assurer son rôle. [14] [26] [27] Le changement de conformation d'une protéine est dû au changement du minimum d'énergie libre (qu'elle tente toujours de minimiser) en solution par rapport à son minimum d'énergie libre quand elle est adsorbée sur une surface. Or lors du contact à la surface, l'action est accompagnée d'un gain d'énergie libre au sein de la molécule et par conséquent, à des changements conformationnels plus ou moins importants expliqués par le concept des protéines "dures" et "molles" décrit au point 1.2 et par la capacité qu'elles ont à subir des réarrangements structuraux. Le changement conformationnel crée des interactions favorables entre la protéine et la surface qui induit des réarrangements structuraux dans la protéine. Par ailleurs, les réarrangements structuraux ont aussi pour origine le gain d'entropie lié à la perte de la structure ordonnée et à la libération de molécules d'eau et d'ions de sels. Ce gain d'entropie est considéré comme la force motrice de l'adsorption des protéines à la surface. Il n'est néanmoins pas suffisant pour atteindre le degré d'entropie de la protéine en solution. Finalement, l'entropie conformationnelle de la protéine adsorbée est inférieure à celle de la protéine dans son état natif en solution. [10] [14]

Ensuite, cette méthode offre généralement la possibilité de construire au maximum une seule monocouche, ce qui mène à une quantité adsorbée limitée. Or dans certaines applications, des multicouches de biomolécules sont nécessaires, des quantités plus élevées de protéines adsorbées permettent d'assurer une activité suffisante. [27] [28]

Dans le cas où l'on voudrait adsorber deux protéines différentes sur une même surface, la compétitivité des molécules lors de l'adsorption devient importante. Or cette dernière est un phénomène difficile à comprendre et à prédire. En effet, dans une solution qui n'est pas pure que d'une seule espèce, comment savoir que l'espèce d'intérêt sera bien celle adsorbée et qu'une autre n'aura pas une affinité supérieure avec la surface ? [27] [29] [30] [31]

Enfin, une étape de séchage supplémentaire peut être nécessaire pour faire l'intermédiaire entre la création et l'utilisation de la surface. Ce séchage induit souvent des dommages et des réorganisations spatiales des biomolécules qui peuvent perdre de leur bioactivité. [27] [29] [32]

Pour éviter une partie de ces inconvénients liés à l'adsorption spontanée, d'autres techniques de dépôt des protéines ont été développées. Parmi les plus notoires on retrouve la chimisorption covalente, le piégeage des protéines dans des broches de polymères, ou un dépôt couche par couche. [33] Cependant, deux inconvénients majeurs sont encore observés avec ces différentes techniques. Dans un premier temps, la distribution spatiale des protéines n'est pas maîtrisée. Ensuite, les étapes de séchage nécessaires avec ces techniques résultent en des performances limitées de la couche adsorbée. [27]

Chapitre 2

Les outils pour déposer les protéines en phase gazeuse

A présent que les limitations de l'adsorption en solution aqueuse sont mieux comprises (point [1.2.1](#)), une alternative pour le dépôt de biomolécules en phase gazeuse est proposée pour outrepasser ces inconvénients. Cependant, avant d'entrer dans les détails de cette technique, il est important de décrire les outils utilisés pour y parvenir.

2.1 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été développée dans le but d'identifier les espèces moléculaires qui constituent un échantillon à étudier. [\[34\]](#) [\[35\]](#) Elle caractérise la composition chimique de ce dernier grâce aux différentes masses moléculaires identifiées. [\[36\]](#) Tout d'abord, les molécules qui composent l'échantillon, qui peut être liquide ou solide en fonction du type de spectrométrie de masse utilisé, doivent être ionisées. Les molécules ionisées sont séparées en fonction de leur masse puis détectées par le détecteur. [\[34\]](#)

A l'heure actuelle, il s'agit d'une technique puissante de caractérisation. En effet, elle possède une grande précision en terme de masse, car elle est capable de détecter des éléments atomiques. En outre, elle offre une grande sélectivité par la large gamme de masse, mais également par les isotopes ou autres molécules de compositions moléculaires différentes qu'elle prend en compte et différencie dans le spectre de masse. [\[36\]](#) [\[37\]](#)

Le principe d'un spectromètre de masse est schématisé à la Figure [2.1](#).

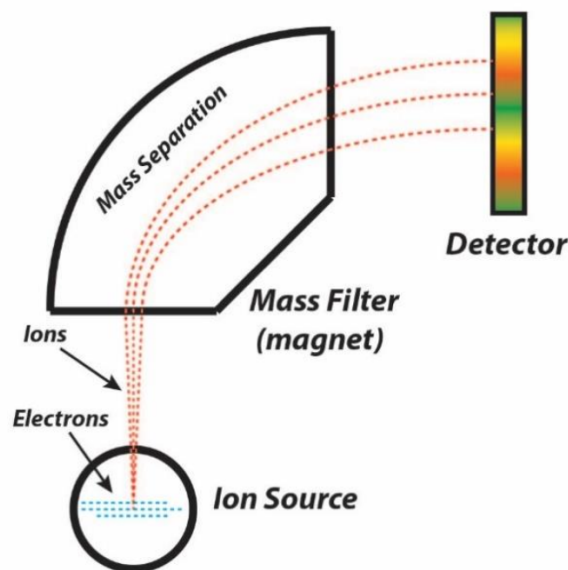


FIGURE 2.1 – Schéma simplifié d'un spectromètre de masse. [38]

2.2 Soft-Landing

La "spectrométrie de masse préparative" est une méthode qui permet de collecter des ions moléculaires provenant d'un échantillon sur un substrat choisi. Elle offre l'avantage de ne récolter qu'une seule espèce d'ion. Cette technique de dépôt moléculaire utilise un spectromètre où les filtres de masse sont réglés pour ne laisser passer que l'ion voulu jusqu'au collecteur. [36]

Le soft-landing ou atterrissage en douceur des ions est une catégorie de spectrométrie de masse préparative où les sources d'ionisation de l'échantillon sont douces. [36] Différentes sources d'ionisation douces sont citées au point 2.2.1. Elles permettent de déposer sur un collecteur des ions moléculaires provenant de l'échantillon à étudier tout en conservant leur état natif et leur activité biologique. [39] Leur charge acquise durant l'ionisation peut également subsister. [40] Ces ions sont filtrés en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z), et le dépôt se fait uniquement sous vide. [36] Un schéma du mode de fonctionnement est visible à la Figure 2.2.

Dès lors, le soft-landing peut également être classé comme une sous-catégorie de la spectrométrie de masse, car la fonction première de la spectrométrie de masse (caractérisation chimique) est déviée. [27] La fonction d'analyse est interrompue

en plaçant un collecteur avant le détecteur. En quelque sorte, la composition chimique de l'échantillon est connue avant-même la manipulation, et le transfert de l'échantillon est souhaitable sur un collecteur dans le but de créer des surfaces fonctionnelles. [27] Néanmoins, des méthodes de caractérisation supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer ou infirmer le bon transfert des molécules souhaitées.

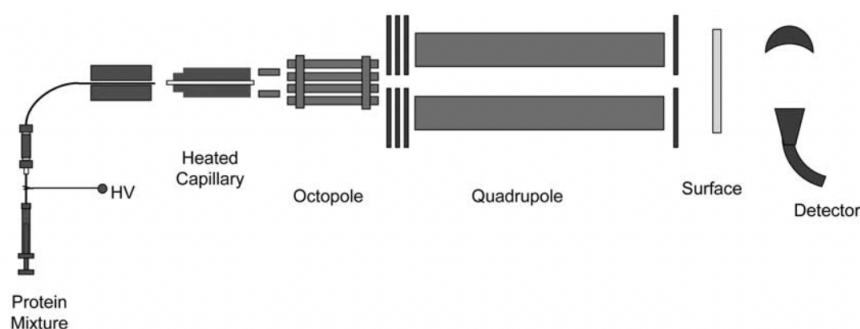


FIGURE 2.2 – Appareillage pour soft-landing. La première partie du schéma est la source d'ionisation : la solution de protéines entre sous vide et est ionisée à la sortie du capillaire. Ensuite, les ions sont dirigés vers le détecteur et soumis à des filtres de masse (octopole et quadrupole) qui composent la partie spectromètre de masse. Finalement, avant d'atterrir sur le détecteur, les ions rencontrent une surface placée juste avant celui-ci qui les réceptionne. [39]

Selon une étude réalisée pour la création de micro réseaux de protéines, des chercheurs ont utilisé la méthode de soft-landing pour déposer du lysozyme et de la trypsine. Les résultats de l'expérience ont conclu à la préservation (quasi) totale de l'activité de ces enzymes. Cela permet de déduire que la méthode est efficace. Néanmoins une question reste sans réponse. Est-ce que les protéines se déplient durant le processus pour se replier à la toute fin ou conservent-elles leur repliement tout du long ? [37]

D'autres chercheurs dans le cadre de l'étude réalisée par *Räder et al.*, ont démontré la formation de couches partielles puis complètes ordonnées ou désordonnées en utilisant une spectrométrie de masse **MALDI** à partir de phénalène. Finalement des multicouches se construisent en formant des îlots ou couche par couche. Ils ont ainsi développé l'un des premiers modèles d'épitaxie via des faisceaux d'ions. [36]

Le soft-landing offre de beaux avantages par rapport aux autres méthodes de dépôt. En effet, dans un premier temps il permet de surmonter les effets négatifs liés à l'adsorption en solution aqueuse. Ensuite, les molécules déposées peuvent être intactes, préservent leur activité, et sont pures. [29] [36] La barrière de réaction de

surface n'est plus un obstacle non plus. En donnant une énergie suffisante à la molécule transférée, elle peut s'y adsorber même si l'énergie de surface tente de la repousser dans des conditions normales. [29] Cette technique de dépôt des ions permet aussi un contrôle de différents paramètres. L'énergie de dépôt est évaluée à partir de l'énergie cinétique procurée aux ions moléculaires. [36] Enfin, il est également possible de dessiner des micro réseaux de protéines grâce à cette technique puisque les faisceaux d'ions peuvent être défléchis par des plaques électrostatiques. [29]

Cependant, un inconvénient majeur de cette méthode de dépôt de biomolécules est la faible intensité du courant d'ions engendré par le faible rendement d'ionisation des biomolécules ou dû à une limite instrumentale. [27]

2.2.1 Source d'ionisation

Il existe plusieurs sources d'ionisation qui sont utilisées pour le soft-landing : ionisation par électrospray (ESI), désorption laser assistée par matrice (MALDI), ionisation par désorption électrospray (DESI), etc. [29]

La source d'ionisation est la première partie du spectromètre de masse par laquelle passe l'échantillon avant d'être analysé. Son but est d'ioniser les particules qui composent l'échantillon et de les envoyer dans le filtre de masse.

Le développement des sources d'ionisation douces est apparu pour désorber des ions moléculaires organiques polaires en phase gazeuse sans que ceux-ci ne s'abîment. Les techniques précédemment développées traitaient l'échantillon par vaporisation. Cependant ces larges molécules subissaient beaucoup de dommages. Avec les techniques d'ionisations douces, il est possible d'ioniser de plus grosses molécules qui n'ont pas une bonne capacité de vaporisation. [41]

Diverses idées ont vu le jour. *Beuhler et al.* ont pensé une méthode qui apporterait rapidement une grande quantité d'énergie aux molécules de l'échantillon. Avec cette énergie, elles se vaporiseraient et se transformeraient en ions sans avoir le temps de subir des dégradations. Plusieurs techniques pour y parvenir ont été considérées (désorption par plasma ou encore spectrométrie de masse d'ions secondaires par exemple) mais un inconvénient majeur persistait : les ions produits n'engendraient qu'un faible courant. Une autre observation faite était la diminution importante du courant à mesure que le poids moléculaire augmentait. [41]

L'ionisation par désorption de champ additionne les effets d'une haute tension, du vide et du réchauffement pour transformer un échantillon de molécules non volatiles en ions. Cependant, trouver le bon équilibre entre les différents paramètres et

préparer correctement les échantillons rendent cette source d'ionisation compliquée à gérer. [41]

L'ionisation électrohydrodynamique a été élaborée à partir des molécules dissoutes dans un liquide non volatil. L'échantillon est envoyé à travers un fin capillaire sous haute tension et sous vide pour subir l'effet d'un champ qui extrait les ions. L'utilisation de solvant liquide de basse pression de vaporisation (pour éviter la lyophilisation) rend son utilisation moins répandue par le fait que ceux-ci ne sont généralement pas de bons solvants. [41]

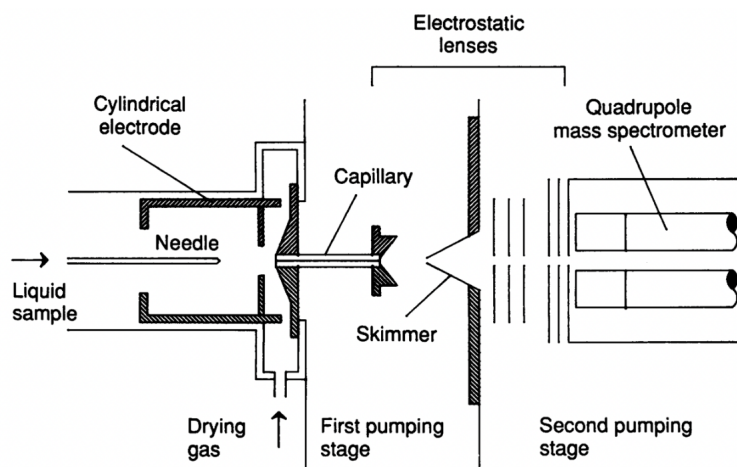


FIGURE 2.3 – Schéma d'une source d'ionisation par électrospray suivie par le filtre de masse du spectromètre de masse. [41]

Pour pallier aux différents inconvénients rencontrés avec les ionisations précédentes, l'ionisation par électrospray est préférée. Comment cela fonctionne-t-il ? Le chemin de l'échantillon à ioniser peut être suivi via la Figure 2.3. L'échantillon liquide passe, avec un débit entre 1 et 20 $\mu\text{L}/\text{min}$, à travers une aiguille sous tension de quelques kilovolts par rapport aux électrodes qui l'entourent pour maintenir un champ qui dirige le flux du gaz. A la sortie de l'aiguille, les molécules de l'échantillon sont soumises à un champ et forment alors des petites gouttelettes de liquide chargées et dirigées vers l'entrée du capillaire. Ces gouttelettes ne peuvent pas encore être considérées comme des ions moléculaires étant donné qu'elles sont remplies de solvant. L'évaporation du solvant a lieu grâce aux effets combinés d'un gaz inerte (afin d'éviter toute réaction avec les ions produits), d'une température entre 320 et 350 K ainsi que d'un débit d'environ 100 mL/s et elle continue jusqu'à ce que l'ion quasi-moléculaire soit totalement désorbé. C'est ici que la différence avec les techniques précédentes réside, la désorption se passe sous gaz ambiant plutôt que

sous vide. Ensuite, les ions passent dans deux chambres sous vide pour atterrir dans le filtre de masse où ils sont filtrés selon leur rapport masse-sur-charge, rapport m/z . Sur ce schéma, le filtre de masse est un quadrupole. [41]

2.3 Faisceaux d'ions

Pour pallier au faible rendement des sources d'ionisation douces, des scientifiques ont construit un système de faisceau d'ions accélérés vers la surface pour désorber des particules atomiques, moléculaires ou sous forme d'agrégats. [42]

2.3.1 Spectrométrie de masse d'ions secondaires

La spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) est une méthode d'analyse de surface qui tire profit de ces faisceaux d'ions. Ils peuvent être sous forme atomique ou polyatomique. Ces ions primaires bombardent la surface à analyser et des particules secondaires sont éjectées. [42] La partie analyseur associée au spectromètre de masse est généralement un analyseur quadripolaire, secteur magnétique ou analyseur à temps de vol (ToF). [43]

~~ToF-SIMS~~

~~ToF-SIMS~~ signifie "Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry". Le spectromètre de masse d'ions secondaires combiné à un analyseur à temps de vol (ToF) constitue l'outil de choix pour la SIMS moléculaire. [42] Cet outil analyse un échantillon aussi bien en deux dimensions qu'en trois dimensions. [27]

Un analyseur ToF se base sur le temps de vol de l'ion à travers une certaine distance (longueur du tube spécifiée) pour mesurer son rapport m/z sous vide. [35] Pour une analyse en deux dimensions, l'échantillon est balayé à l'aide d'un faisceau d'ions pulsé pour désorber les ions secondaires qui acquièrent une certaine énergie cinétique. Ils sont ensuite accélérés et entrent dans l'analyseur via l'extracteur où leur temps de vol mesuré permet de déterminer leur rapport m/z . Le spectre de masse est ainsi graduellement dessiné en faisant la somme des ions détectés pour chaque masse. L'appareil est illustré à la Figure 2.4. [44]

2.3.2 Faisceaux d'ions monoatomiques

Lors de l'impact entre le faisceau d'ions monoatomiques et la surface, l'énergie est transférée à l'échantillon et une cascade de collisions se propage qui résulte en l'émission de particules, voir Figure 2.5. Elles sont constituées par approximativement 95% de molécules qui proviennent des deux premières couches supérieures

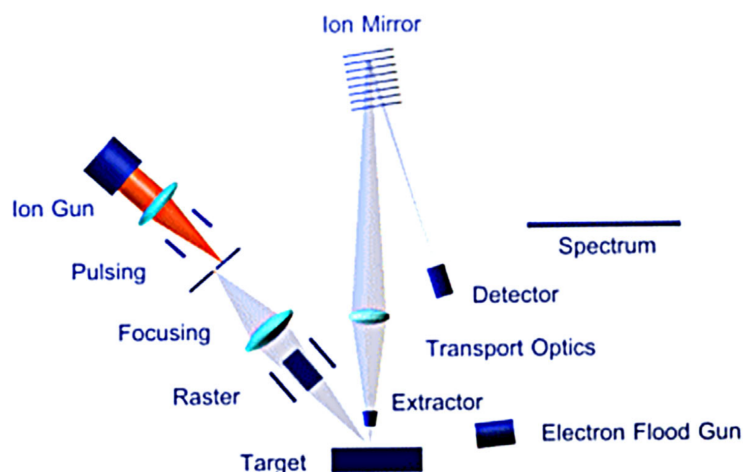


FIGURE 2.4 – Principe de la spectrométrie de masse à ions secondaires avec un analyseur à temps de vol, ToF. [44]

de la surface solide, et sont neutres ou ionisées. Seule la partie ionisée (les ions secondaires émis par les ions primaires) permet l'analyse par le spectromètre de masse (séparateur selon le rapport masse-sur-charge) et constitue le spectre de masse de l'échantillon. [42]

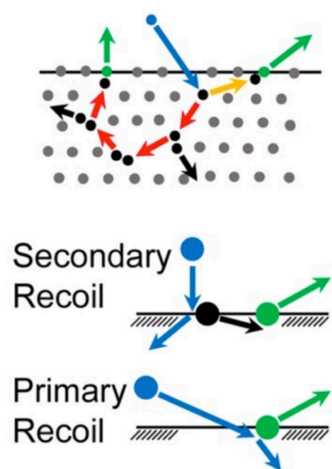


FIGURE 2.5 – Un ion monoatomique (bleu) bombarde la surface en un endroit, et une cascade de collisions est engendrée (rouge et jaune). Certaines collisions remontent à la surface, et en résulte l'émission de particules (vert) atomiques ou en petits agrégats, ionisées ou neutres. [42] L'image provient d'un article de *Lorenz et al.* [45]

Cette méthode cause des dégâts dans la surface analysée. C'est pourquoi lors de l'analyse de surface avec des faisceaux d'ions monoatomiques, le mode de la spectrométrie de masse d'ions secondaires *statique* est utilisé. Une dose d'ions primaires inférieure à $10^{13} \text{ ions/cm}^2$ permet ainsi de diminuer fortement ces dommages. En effet, moins d'1% de la surface est ainsi bombardée. [42]

L'énergie du faisceau incident se situe souvent entre 1 et 25 keV pour des énergies d'émissions de molécules secondaires très faibles d'environ 20 eV ou moins. [42]

2.3.3 Faisceaux d'agrégats ionisés ou d'ions polyatomiques

Les faisceaux d'agrégats ionisés sont créés à partir d'un matériau gazeux, liquide ou solide avant d'être ionisés et accélérés vers la surface voulue. Ils sont condensés en agrégats de milliers d'atomes par expansion adiabatique ou supersonique pour un gaz ou par électrospray pour un échantillon liquide produisant des microgouttelettes qui peuvent contenir jusqu'à des millions d'atomes. A l'impact du faisceau d'ions, des molécules et fragments sont pulvérisés de la surface. [43]

La technologie des faisceaux d'agrégats ionisés a été développée pour contrer le faible rendement des faisceaux d'ions monoatomiques. Des chercheurs se sont rendus compte que pour des énergies d'accélération égales, la quantité de matière pulvérisée de la surface augmentait considérablement après l'impact en passant des faisceaux monoatomiques aux agrégats. Dès lors, le rendement d'ions produits augmentait aussi. En outre, l'impact d'un agrégat ionisé de n atomes désorbe plus que le bombardement successif de n ions monoatomiques en ayant la même vitesse d'accélération, ce qui définit un accroissement non-linéaire de l'émission neutre ou ionique [43]. Néanmoins, l'utilisation de certains faisceaux d'agrégats d'ions métalliques nécessite toujours le mode *statique*. Par exemple, des faisceaux d'agrégats d'ions métalliques d' Au_n^+ et de Bi_n^+ avec des énergies entre 10 et 40 keV sont utilisés car ils mènent à un bon rendement d'éléments pulvérisés ainsi qu'à une excellente résolution spatiale, mais ils engendrent toujours beaucoup de dommages. [42]

2.3.4 Rendement de pulvérisation

Pour des ions monoatomiques ou des petits agrégats, le rendement de pulvérisation dépend aussi de l'énergie d'accélération du faisceau d'ions. A énergie trop faible, aucune pulvérisation de particules secondaires n'est détectée. Ce n'est qu'à partir de 20-40 eV qu'elle apparaît. Ensuite, le rendement de pulvérisation augmente à mesure que cette énergie augmente jusqu'à atteindre un maximum aux environs de 5 à 50 keV. Au-delà, l'énergie transférée à l'impact a de plus en plus difficile à

remonter jusqu'à la surface pour émettre des particules secondaires. [42] L'évolution du rendement de pulvérisation est illustré avec plusieurs exemples à la Figure 2.6.

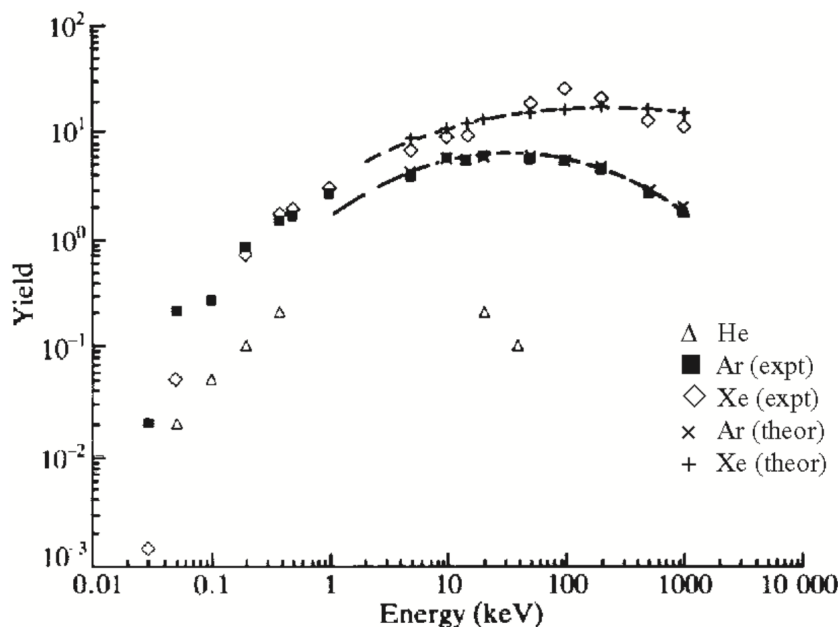


FIGURE 2.6 – Évolution du rendement de pulvérisation en fonction de l'énergie par atome et de l'élément qui constitue le faisceau d'ions. [46]

2.4 Faisceau d'agrégats ionisés d'éléments gazeux

[GCIB] signifie "Gas Clusters Ions Beam" ou en français, faisceau d'agrégats ionisés d'éléments gazeux. Il s'agit d'une catégorie de faisceaux d'agégats ionisés. Les agrégats composés de gaz rare, tels que l'argon (Ar), sont obtenus par expansion adiabatique ou supersonique étant donné qu'il s'agit d'un gaz. Ce type d'agrégats est principalement utilisé pour la désorption douce, le lissage ou la gravure des surfaces, l'implantation peu profonde, l'analyse lorsqu'il est associé à un spectromètre de masse, etc. [43]

Sattler et al. ont développé une méthode pour la réalisation d'agrégats métalliques de bismuth, antimoine et plomb. Afin d'obtenir les agrégats, la vapeur de ces métaux est envoyée dans une chambre. Sous l'effet de la pression d'un second gaz (l'hélium par exemple) présent dans la chambre, les agrégats se forment par nucléation. Le système est refroidi par de l'azote liquide. La pression dans la chambre est un paramètre important. Si elle est trop basse, la nucléation n'a pas lieu. [47]

CHAPITRE 2. LES OUTILS POUR DÉPOSER LES PROTÉINES EN PHASE GAZEUSE

Après l'obtention des agrégats, l'ionisation se fait par impact électronique. Le faisceau d'agrégats entre par une petite ouverture dans une autre chambre, et un faisceau d'électrons est dirigé perpendiculairement à celui-ci. Pour la création d'un faisceau ionisé de mercure, *Cabaud et al.* ont utilisé des énergies entre 0 et 100 eV pour les électrons et un courant électronique de $40 \mu A$. En outre, la pression dans la chambre était de $2.10^{-7} Torr$. [48] Le faisceau d'électrons provient généralement d'un filament de tungstène. [49]

Par après, les agrégats ionisés sont accélérés suite à une tension de plusieurs électronsvolts (eV) pour les extraire de la chambre d'ionisation et les faire entrer dans la quatrième chambre. Dans cette partie, les agrégats avec le nombre d'atomes voulu peuvent être choisi grâce au principe du temps de vol entre deux déflecteurs avant qu'ils ne soient dirigés sur la cible. [50] [49]

Un exemple de source d'agrégats et du chemin parcouru par le faisceau d'agrégats ionisés sont illustrés à la Figure 2.7.

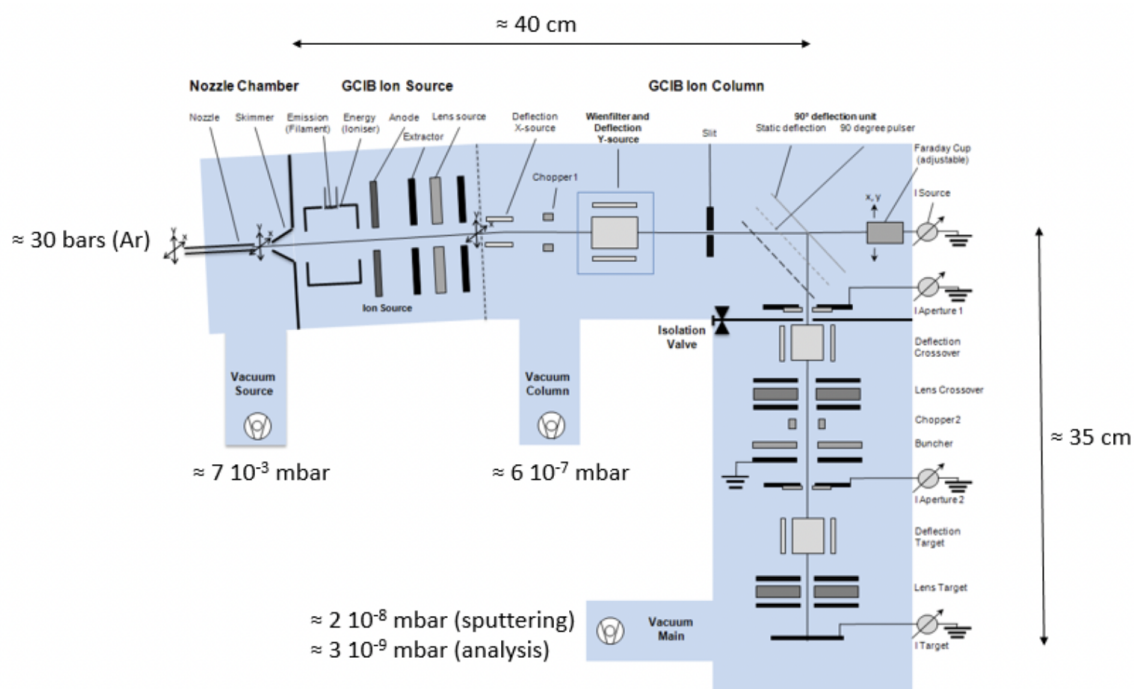


FIGURE 2.7 – Source d'agrégats et chemin parcouru pour atteindre la cible. Reçue par communication interne.

2.4.1 L'impact agrégat-matière

Un aspect montré par *Mahoney et al.* est celui de la fragmentation de l'échantillon. Pour une même énergie d'accélération de l'agrégat ionisé, la fragmentation de l'échantillon bombardé diminue avec le nombre d'atomes par agrégat (donc avec l'énergie par atome qui diminue). La quantité d'ions quasi-moléculaires augmente tandis que le rendement des fragments de molécule diminue. [43] [51] [52]

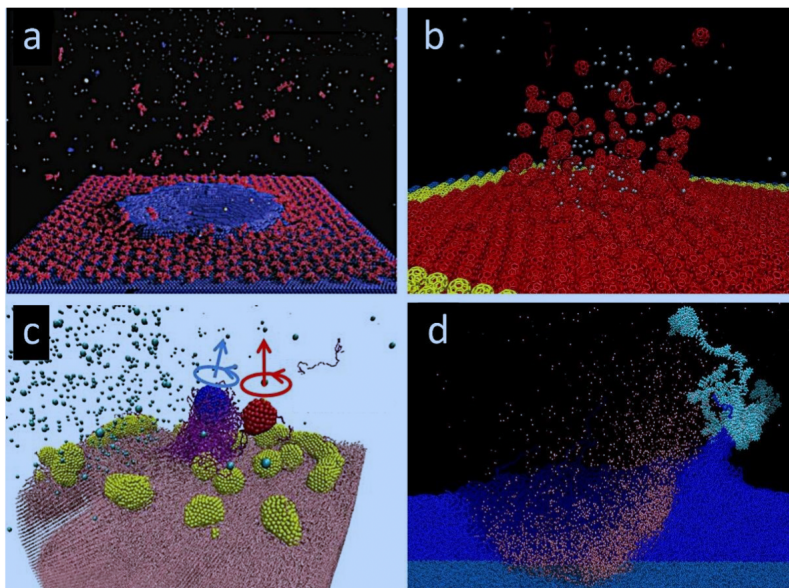


FIGURE 2.8 – Simulations de la dynamique moléculaire suite à l'impact d'un agrégat d'argon sur différentes surfaces. a) Substrat d'argent couvert par une monocouche de tétramère de polystyrène bombardé par un agrégat Ar_{9000} accéléré à 90 keV. b) Cristal de fullerite bombardé par un agrégat Ar_{250} accéléré à 15 keV. c) Substrat de polyéthylène cristallin sur lequel sont déposées des nanoparticules d'or bombardées par un agrégat Ar_{2000} accéléré à 5 keV. d) Substrat en polyéthylène amorphe sur lequel une molécule de polystyrène est adsorbée, bombardé par un agrégat Ar_{5000} accéléré à 10 keV. [43]

Pour mieux comprendre ce qu'il se passe au niveau microscopique de la surface bombardée, la dynamique moléculaire classique (DM) permet d'étudier les mécanismes de désorption des espèces d'une surface solide en tenant compte de toutes les interactions inter-atomiques. Sur la Figure 2.8, des simulations DM d'impact d'agrégats d'Ar sur différentes surfaces ont été calculées. La formation et la taille des cratères formés en surface sont généralement proportionnelles à l'énergie des agrégats et inversement proportionnelle à l'énergie de cohésion du matériau.

Pour les substrats organiques, le phénomène observé est toujours le même quel que soit l'énergie d'accélération (keV), les agrégats ionisés marquent la surface d'un cratère après l'impact, plus important à mesure que l'énergie augmente. [42] Les faibles forces qui lient les atomes, forces de van der Waals, sont à l'origine du phénomène. Il est visible à la Figure 2.8d. [43]

Un autre exemple de résultat de la DM montre que le substrat d'argent (inorganique) reste intact pour une E/n égale à $2 eV$ par atome, comparée à celle de $10 eV$ par atome utilisée lors de la simulation représentée à la Figure 2.8a, où un cratère est formé après impact. [43]

Ceci est expliqué par le fait que l'énergie de liaison des atomes à la surface est légèrement inférieure à $2,95 eV$. L'énergie du faisceau n'est donc pas suffisante pour déloger les atomes. [43]

Finalement il a été remarqué qu'à très haute E/n , la collision de l'agrégat induit des dégâts importants à la surface quel que soit son type (organique ou inorganique). [43]

Aoki et al. ont approfondi le sujet dans le cas de la pulvérisation d'une surface de silicium (Si) dont l'énergie de liaison se situe à $5 eV$, par des faisceaux d'agrégats d'Ar. Dans un premier temps, la formation des cratères a été étudiée, et des résultats similaires à ceux expliqués précédemment ont été observés. La formation du cratère ne commence qu'à partir d'un certain seuil d'énergie par atome calculé à $2-3 eV$ par atome. Ensuite, le volume du cratère augmente linéairement avec l'énergie par atome de l'agrégat à partir de $5 eV$ par atome.

En réitérant la simulation sur des surfaces organiques (oligomères de polyéthylène), aucun seuil de formation de cratère n'a été détecté, ce qui coïncide avec les résultats observés sur la surface de polyéthylène cristallin du paragraphe précédent. Le volume suit néanmoins une croissance non-linéaire jusqu'à $50 eV$ par atome et continue ensuite à évoluer linéairement avec l'énergie par atome. [43]

Toujours dans le cadre de cette simulation, la forme du cratère a été examinée. Deux formes ont pu être distinguées pour un angle d'incidence du faisceau de 45° : une forme ellipsoïdale allongée pour des grandes énergies (E) et petites nucléarités (n) et une forme ellipsoïdale aplatie pour des petites énergies et grandes nucléarités. [43] Une certaine logique peut être conclue à partir de ces formes étant donné que les projectiles à plus grande énergie par atome s'implantent plus profondément dans la surface.

D'autres simulations de la dynamique moléculaire suite à l'impact d'agrégats d'argon ont permis quelques observations. Sur les Figures 2.9a-d, l'évolution du volume du cratère, la masse pulvérisée, les ondes de pressions et la formation de nouvelles liaisons moléculaires en fonction de l'énergie par atome sont étudiées. La dynamique moléculaire confirme les résultats expérimentaux. Le volume du cratère, la

pulvérisation et la fragmentation augmentent avec l'énergie par atome des agrégats d'argon. [43]

A l'origine de la formation des cratères, les atomes du solide subissent des ondes de pression verticales et latérales. Si l'énergie d'accélération d'un agrégat est suffisamment faible, le solide est capable de supporter ces ondes de pression sans pulvérisation de matière. A l'inverse, avec l'augmentation de l'énergie par atome de l'agrégat, le solide n'a plus cette aptitude et des molécules sont pulvérisées de la surface. Sur la Figure 2.9c, les vitesses de ces ondes de pression suite à l'impact d'un agrégat d'argon dans une surface d'icosane amorphe sont représentées. Ces vitesses augmentent jusqu'à 5 km/s avant d'atteindre un maximum aux alentours de 10 à 50 eV par atome qui indique un changement de situation. [43]

Ce changement de situation est observé dans les Figures 2.9a-d. Pour chaque graphe, un régime linéaire et un régime non-linéaire sont constatés. L'énergie par atome correspondant à ce changement de régime est différente pour chaque matériau. Le changement survient à des énergies par atome plus élevées pour des substrats inorganiques qui sont plus cohésifs. En outre, un changement de composition du flux de pulvérisation s'ajoute à ce changement de régime, avec environ 50% de fragmentation pour les E/n élevées. [43]

En conclusion, l'augmentation de l'énergie par atome d'un agrégat ionisé augmente le rendement de pulvérisation, la fragmentation des molécules désorbées (moins d'ions moléculaires), et les dommages dans la surface. [43] [42] Par conséquent, un juste équilibre doit être trouvé entre ces différents paramètres pour satisfaire le besoin recherché. En particulier, pour le transfert de grandes molécules intactes, on privilégie des E/n faibles (entre 1 et 3 eV), ce qui est permis avec les agrégats d'argon ; par exemple à l' Ar_{5000} accéléré à 10 keV (2 eV /atome).

Pour les grands agrégats d'argon, les particules émises suite à la collision entre les projectiles et la surface acquièrent une énergie certaine cinétique qui dépend de l'énergie du faisceau de particules primaires, de l'angle d'incidence ainsi que du nombre d'atomes qui composent l'agrégat (nucléarité, n). Cette énergie cinétique acquise diffère également d'un matériau bombardé à l'autre pour les mêmes valeurs des paramètres cités juste avant. En effet, elle dépend aussi de l'énergie d'adhésion de la particule à la surface, du nombre de liaisons qui la retiennent, ainsi que de la capacité d'énergie interne qu'elle peut stocker sans fragmenter. Par exemple, un ion secondaire métallique a une distribution d'énergie cinétique plus large que celle d'un agrégat ionisé en raison de la fragmentation des plus énergétiques ou du stockage de l'énergie dans les vibrations des atomes et la rotation de l'agrégat. [42]

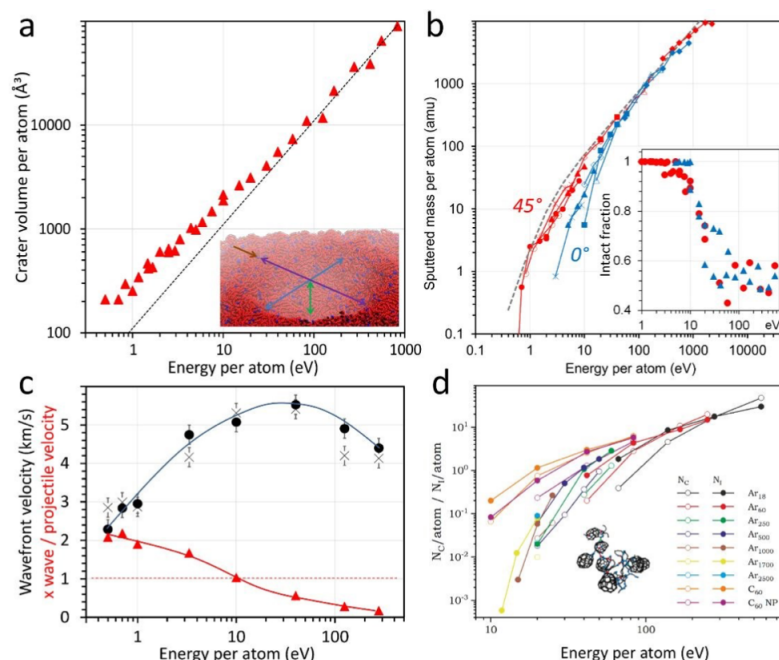


FIGURE 2.9 – Simulations de la dynamique moléculaire suite à l'impact d'un agrégat d'argon. a) Volume des cratères formés en fonction de l'énergie par atome de l'agrégat d'Ar. b) Masse pulvérisée par atome en fonction de l'énergie par atome et de l'angle d'incidence de l'agrégat d'Ar. La ligne en pointillés grise représente les résultats expérimentaux obtenus par pulvérisation d'agrégats sur une surface Irganox 1010. Dans l'encadrement, il s'agit de la fraction de molécules intactes. c) Vitesses des ondes de pression absolue (noire) et divisée par la vitesse de l'agrégat d'Ar (rouge) subies par les atomes de la surface après l'impact en fonction de l'énergie par atome de l'agrégat d'Ar. d) Évolution des nouvelles liaisons inter- et intra-moléculaires suite à l'impact en fonction de l'énergie par atome de l'agrégat d'Ar. [43]

Comme on l'a laissé entendre plus haut, en plus de l'énergie cinétique acquise, une fraction des particules secondaires émises sont ionisées et sont appelés ions secondaires. L'ionisation dépend de l'état électronique de la surface qui peut faire fortement varier le rendement d'ionisation d'un élément. Par exemple, le tableau 2.1 reprend les rendements d'ionisation de quelques métaux et de leurs oxydes. En général, l'ionisation survient suite à des échanges d'électrons, de cations ou d'anions entre la particule émise et la surface. Une molécule entière peut ainsi être ionisée par la capture d'un proton Ag^+ , Na^+ , K^+ ou H^+ . [42]

TABLE 2.1 – Rendement d’ionisation positive de certains métaux et leur oxyde métallique. [42]

Métal	Rendement d’ionisation positive du métal, Métal M^+	Rendement d’ionisation positive de l’oxyde métallique, Oxyde M^+
Al	0.007	0.7
Si	0.0084	0.58
Ti	0.0013	0.4
Fe	0.0015	0.35
Cu	0.0003	0.007

2.4.2 Analyse d’échantillon par GCIB

Le GCIB peut être utilisé dans le cadre de l’analyse de surface d’un échantillon solide. Pour se faire, il doit être lié à un spectromètre de masse. Un exemple souvent adopté est le spectromètre de masse d’ions secondaires (SIMS). Grâce à cette méthode, des molécules telles que le cytochrome C, l’Irganox 1010, des protéines et leurs des acides aminés ont été détectés. Pour l’analyse, puisque ces agrégats d’ions se basent sur le même principe expliqué au point 2.3.3, la diminution de l’ E/n des agrégats augmente le rendement des espèces de masses élevées dans le spectre de masse et donc de l’ion moléculaire également. [43]

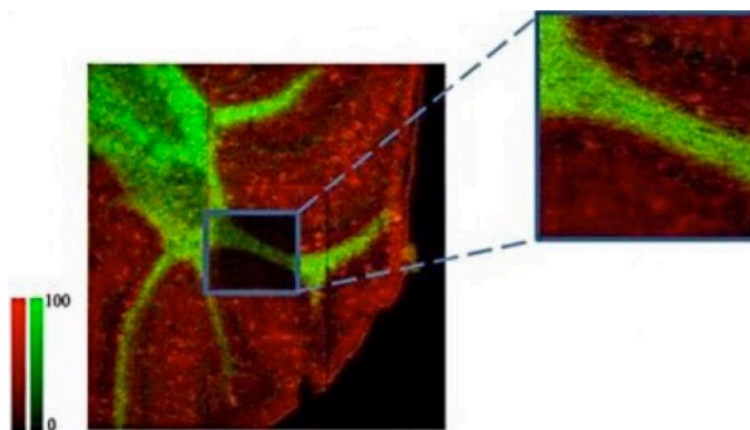


FIGURE 2.10 – Coupe d’un cerveau de souris. En rouge : phospholipide phosphatidylcholine $[M + K]^+$ avec un rapport m/z de 772,52. En vert : sphingolipide $[M + Na]^+$ avec un rapport m/z 832,66. [43]

Malgré une faible résolution de quelques micromètres, les faisceaux d’ions de gaz nobles sont apprécié pour l’analyse 2D de biomolécules dans les tissus biologiques

en raison de la désorption douce qui ne cause pas de dommage à l'échantillon. [43] Dans ce cas, l'énergie transférée à la surface pour la désorption des molécules n'est transmise que dans les couches superficielles de l'échantillon. [27] Chaque agrégat pulvérise les dégâts créés à l'impact, de sorte que l'analyse de ces tissus peut se faire sur un temps suffisamment long pour maximiser les signaux moléculaires et la sensibilité de la méthode. Dans ce cas, seule la durée de l'analyse constitue une limitation.

Par exemple, une coupe de cerveau de souris a été bombardée par un faisceau continu d' Ar_{4000}^+ avec une E/n égale à 10 eV . L'analyse a été réalisée à l'aide du J105—3D Chemical Imager et d'une dose d'ions égale à $1,05 \times 10^{12} \text{ ions/cm}^2$. La surface est divisée en pixel et le faisceau d'ions primaires balaye chacun de ces pixels séparément. De chaque pixel, les ions secondaires entrent dans l'analyseur ToF à réflectron à champ quadratique pour être sélectionnés en masse et détectés. L'analyseur mesure le temps de vol jusqu'au détecteur de chaque ion pour trouver leur rapport masse-sur-charge et graduellement construire le spectre de masse. Ensuite, une image peut être obtenue à partir des spectres de masse de chaque pixel. Cette analyse a permis de mettre en évidence deux lipides appartenant l'un à la matière grise et l'autre à la matière blanche du cerveau pour une résolution de 4 μm observable à la Figure 2.10. Seuls les rapports m/z des ions moléculaires des lipides ont été choisis pour construire l'image à partir des spectres. Les différences d'intensités pour chaque lipide sont dues aux différentes quantités d'ions moléculaires détectées lors de la mesure des spectres de masse. [43] [53] [54]

Comme indiqué plus haut, ce type de faisceau est particulièrement intéressant pour le profilage de matière organique, car il peut analyser en profondeur tout en causant un minimum de dommage moléculaire. Dans les appareils de la firme ION-TOF, il est combiné avec un faisceau de bismuth (Bi) qui analyse puis qui lui laisse la place pour creuser, et ainsi de suite, ils s'agit d'un mode "double faisceau". Cela assure une haute résolution latérale car le faisceau de Bi_n^+ est mieux focalisé, mais la quantité pulvérisée par le faisceau d'Ar est inutilisable pour l'analyse. Finalement, la résolution en profondeur est la conséquence des actions des deux faisceaux. Par exemple, pour un faisceau Ar_{1700} avec une E/n égale à 2,5 eV , une résolution en profondeur d'environ 5 nm a été rapportée. [43]

2.4.3 Distribution angulaire des molécules émises

Une expérience réalisée par *Lorentz et al.* sur des molécules Irganox 1010 pulvérisées grâce à des faisceaux d' Ar_{2000} ayant une énergie par atome de 5 eV , consistait à varier l'angle d'incidence du faisceau sur la surface pour étudier le comportement et les distributions des molécules éjectées, Figure 2.11. [45]

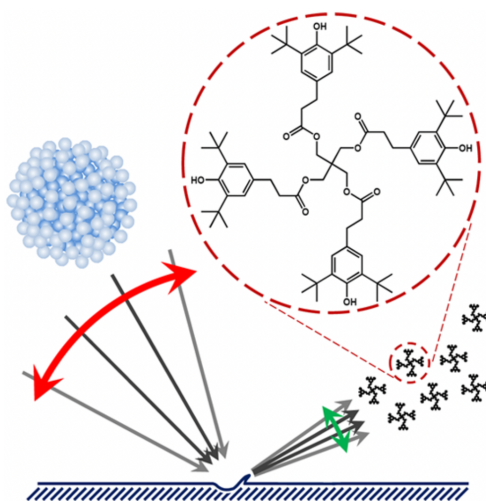


FIGURE 2.11 – Expérience de *Lorenz et al.* : variation de l'angle d'incidence pour étudier les distributions angulaires des éjectas d'Irganox 1010 pulvérisé par Ar_{2000} à E/n égale à 5 eV. [45]

Une première observation concernant les molécules éjectées est l'angle moyen d'émission par rapport à la normale de la surface qui est toujours supérieur à 45° .

Ensuite, pour un angle d'incidence égal à 0° , aucune dépendance azimutale de la distribution angulaire n'est reportée, cela veut dire que la probabilité d'éjection est la même pour tout angle azimutal, mais un maximum est observé dans l'angle polaire des particules projetées à 55° par rapport à la normale de la surface.

Lorsque l'angle d'incidence varie et est différent de 0° , il a été remarqué que les éjectas sont toujours dirigés "vers l'avant" comme cela est dessiné sur la Figure 2.11, pour des angles d'incidence supérieurs ou égal à 15° . [45]

Déjà pour une incidence de 15° , bien que la distribution des éjectas par rapport à la normal soit très similaire (avec un maximum à 55°), la distribution azimutale est bien différente de 0° étant donné qu'une grande majorité des éjectas est dirigée vers l'avant.

Ces résultats sont visibles à la Figure 2.12. Ils ne couvrent pas l'entièreté des angles en raison des dimensions du collecteur, et sont cohérents avec la DM. [45]

L'expérience répétée avec des angles d'incidence différents allant de 15° à 62° montre une tendance de direction de plus en plus précise, avec des intervalles d'angles azimutaux qui diminuent, Figure 2.13. [45]

D'autres expériences de ce genre ont conclu à un rendement de pulvérisation qui augmente régulièrement avec cet angle d'incidence, et à un maximum trouvé pour des angles d'incidence de pulvérisation autour de $45\text{-}60^\circ$. La réponse des molécules

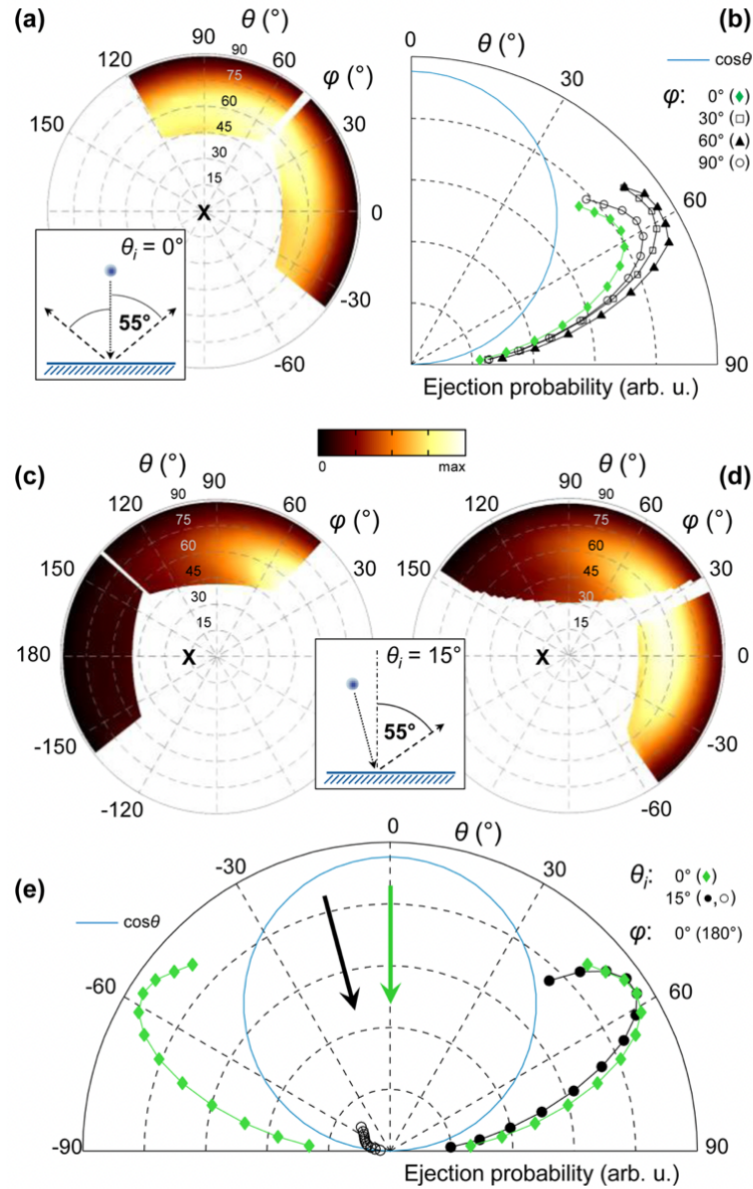


FIGURE 2.12 – θ est l'angle de pulvérisation des éjectas par rapport à la normale, ϕ est l'angle azimutal ; (a-b) Distributions angulaires des éjectas pour un angle d'incidence du faisceau égal à 0° . (b) Distribution par rapport à la normale de la surface en fonction de différents angles de réflexion pour différents angles azimutaux. (c-d) Distributions angulaires des éjectas pour un angle d'incidence du faisceau égal à 15° . La probabilité d'éjection des molécules vers l'arrière et sur les côtés est beaucoup plus faible que celle de les envoyer vers l'avant du faisceau. (e) Résumé qui compare un angle de d'incidence de frappe de 0° et 15° . Distribution par rapport à l'angle avec la normale similaire, mais distribution azimutale différente avec une grande majorité d'éjectas dirigés vers l'avant pour l'angle d'incidence de 15° . [45]

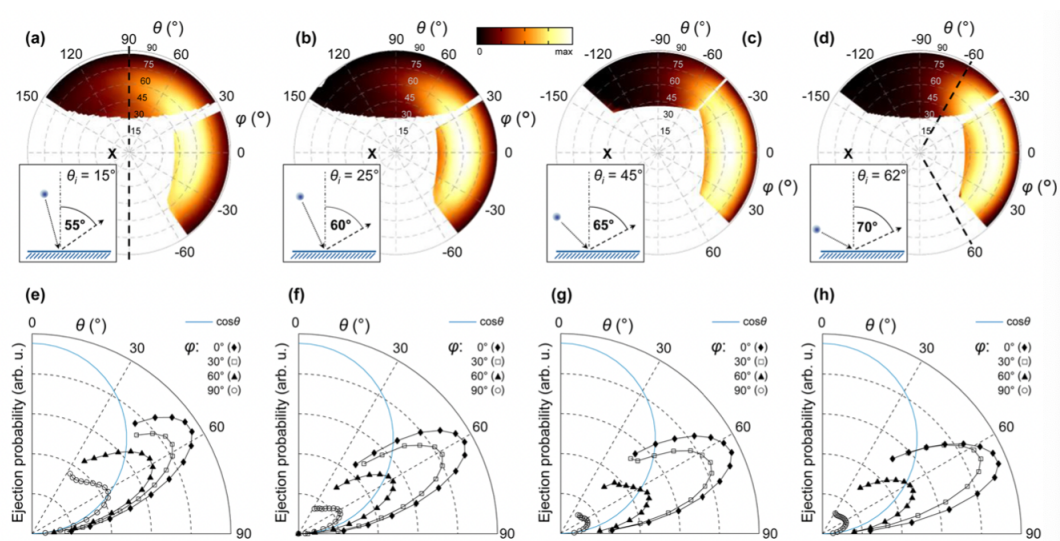


FIGURE 2.13 – θ est l'angle de pulvérisation des éjectas par rapport à la normale, ϕ est l'angle azimutal ; (a-d) Distributions angulaires des éjectas pour différents angles d'incidence du faisceau. (e-h) Distributions par rapport à la normale de la surface en fonction de différents angles de réflexion pour différents angles azimutaux.

[45]

pulvérisées est similaire à celle d'une distribution en $1/\cos(\theta)$ jusqu'au maximum.

[42]

Cette découverte de la distribution angulaire du rendement de pulvérisation dépendant de l'angle d'incidence offre des perspectives de contrôle sur le dépôt des molécules éjectées de la surface.

2.4.4 Transfert de biomolécules par GCIB

Le ToF-SIMS est l'instrument qui a permis le transfert de protéines à l'aide de faisceaux d'agrégats ionisés d'argon dans le cadre de ce mémoire. Le collecteur est placé avant l'analyseur ToF qui est coupé pendant cette manipulation. Seul le faisceau d'agrégats ionisés d'argon est utilisé et est fourni via le ToF-SIMS. Dans ce cas-ci, toutes les espèces sont récupérées par le collecteur (fragmentées et entières, ionisées et neutres).

Ce développement de technologies a permis de surmonter le faible rendement lié au soft-landing d'ions étant donné que toutes les espèces, chargées ou non, sont récupérées, mais aussi les limitations de l'adsorption en solution aqueuse ainsi que tous ses inconvénients tels que la difficulté de créer des multicouches. [27] [45] En

outre, l'une des particularités principales de cette méthode est qu'elle fonctionne en l'absence de solvant. [27]

Deux montages de la cible et du collecteur ont été construits et sont disponibles pour la réalisation des transferts de protéines. Ils sont illustrés à la Figure 2.14. Sur le premier montage, la cible forme un angle de 30° par rapport à l'horizontale et le faisceau d'ions primaires frappe la cible avec un angle d'incidence par rapport à la normale de 75° . Il est aussi illustré à la Figure 2.15. Sur le deuxième montage, le collecteur est incliné à 45° et placé au-dessus de la cible de sorte à récupérer un maximum d'espèces émises par faisceau d'ions primaires qui frappe la cible avec un angle de 45° .

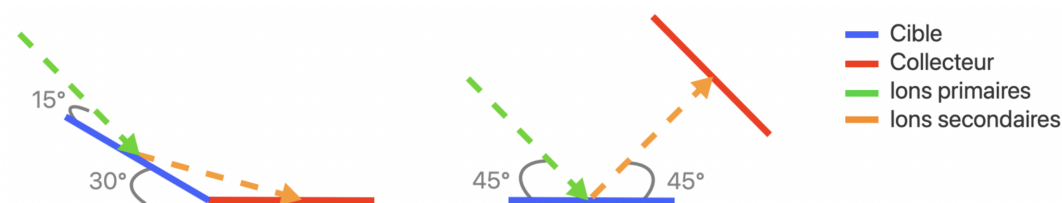


FIGURE 2.14 – Deux montages pour le transfert de biomolécules. A gauche : premier montage ; A droite : deuxième montage.

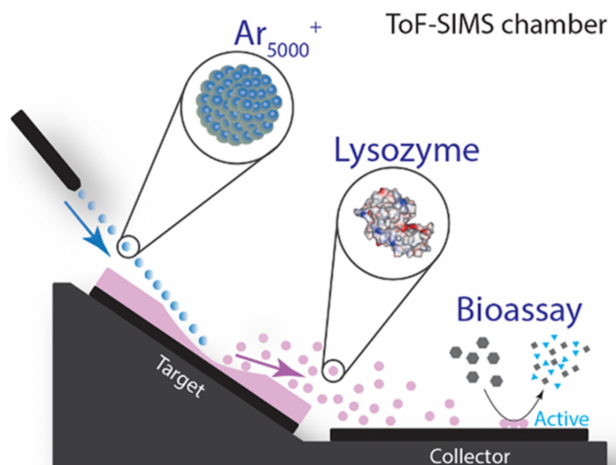


FIGURE 2.15 – Premier montage cible-collecteur. [27]

Chapitre 3

Objectifs et stratégie

Ce chapitre détaille les objectifs visé par ce mémoire. En outre, la stratégie mise en place pour y parvenir est expliquée. Elle prend en compte le choix des matériaux et des protéines étudiées pour parvenir aux objectifs.

3.1 Objectifs

L'objectif du projet dans lequel ce mémoire est incorporé est le développement d'une méthode de construction en phase gazeuse de couches minces de biomolécules pour la création de surfaces biofonctionnelles. L'outil utilisé pour le dépôt des protéines sur des surfaces est le **ToF-SIMS**, qui dans ce cas est dévié de sa fonction analytique en plaçant une cible et un collecteur sur le porte échantillon. La disposition des deux tend à récupérer les espèces pulvérisées. En réalité, c'est uniquement la source d'agrégats d'argon du **ToF-SIMS** qui est utilisée pour transférer les protéines sur un collecteur. En effet, son faisceau d'argon frappe une source de protéines (la cible) et les molécules pulvérisées après l'impact du faisceau sont récupérées sur le collecteur. Le transfert des protéines est ainsi réalisé de la cible vers le collecteur.

A ce jour, le transfert et la détection de la présence de certaines protéines transférées sur un substrat de silicium (lysozyme et bradykinine) par **ToF-SIMS** ainsi que la mesure de l'activité biologique du lysozyme transféré ont été réalisés avec succès [27]. Cependant, la mesure de l'activité d'autres protéines ainsi que l'évaluation de la quantité transférée n'ont pas encore été résolues. Une première hypothèse qui pourrait illustrer les problèmes rencontrés lors des tentatives pour arriver aux résultats est la mauvaise désorption des couches de protéines transférées lorsqu'elles sont remises en solution. Elles seraient fortement attachées à la surface de silicium. Ensuite, lors d'essais de tests biologiques, des problèmes techniques liés au substrat de silicium ont été rencontrés. Le collecteur en silicium sur lequel les protéines ont

été transférées devait être coupé en plusieurs morceaux pour le placer dans un tube Eppendorf. Après l'ajout des réactifs du test biologique, cela laisse la possibilité à ces morceaux de coller entre eux. Ceux-ci collent via la face où les protéines ont été transférées, et cela peut empêcher le bon relargage de celles-ci en solution et par conséquent empêcher le bon déroulement du test. Enfin, la détection du transfert de protéines plus grosses telles que la trypsine n'a pas non plus donné de résultat significatif.

Ce mémoire vise à dépasser les limitations rencontrées précédemment. Ses objectifs sont le transfert de protéines (lysozyme et bradykinine) sur différents substrats (silicium ou polyéthylène, fonctionnalisé ou non), et la quantification de ces protéines transférées, au moyen de différents tests chimiques. Le transfert d'une plus grande protéine (trypsine) ainsi que la mesure de son activité biologique sont aussi une finalité.

3.2 Stratégie

Dans l'intention d'atteindre les objectifs fixés dans ce mémoire, différents substrats sur lesquels sont transférés les protéines sont utilisés/créés avec chacun des propriétés différentes.

Dans un premier temps le transfert de protéines sur de simples films de polyéthylène est visé afin de confirmer leur présence ou leur activité via des tests biochimiques et d'éviter les problèmes rencontrés avec le substrat de silicium (les morceaux qui se collent). Dans un second temps, le développement de couches fonctionnelles ou sacrificielles est investigué. Les couches fonctionnelles sont réalisées avec du poly(éthylène glycol) (PEG), greffé sur des surfaces de silicium recouvertes d'or, tandis que les couches sacrificielles sont préparées en déposant du thréhalose directement sur le silicium. Sur ces substrats couverts de polymère ou sucre est transférée par ToF-SIMS une certaine quantité de protéines à déterminer. La création de ces couches a pour but le relargage des protéines transférées dans l'eau afin de les quantifier. En effet, les sucres ont tendance à se solubiliser dans l'eau tandis que les couches de PEG ont tendance à se débarrasser des protéines qui sont à leur surface.

Dans les sous-points suivants, les choix des matériaux et des protéines sont expliqués.

3.2.1 Choix des matériaux

Afin de mener à bien les différents objectifs et pallier aux différents problèmes cités au point 3.1, le substrat collecteur est varié. Trois types différents ont été employés

et/ou créés dans le but de répondre à la problématique.

Polyéthylène

Le polyéthylène (PE) est le polymère le plus basique avec une longue chaîne aliphatique composée de carbone et d'hydrogène, à la structure (3.1). Il s'agit d'un matériau isolant électrique, résistant en termes chimiques et flexible. De plus, il est peu coûteux. [55]



Le PE manipulé dans le cadre des expériences réalisées dans ce mémoire se trouve sous forme d'un fin film, visible à la Figure 3.1, découpé en petit carré de 1cm². Il s'agit d'un matériau simple d'utilisation. Pour ce travail, il évite les problèmes techniques liés au silicium car il vient se coller le long de la paroi du tube Eppendorf, et la face où les protéines sont transférées est tournée vers l'intérieur du tube. La situation est observée sur la Figure 3.2. Par conséquent, les protéines ont la possibilité d'être relâchées dans l'environnement des réactifs nécessaires pour mener à bien le test biologique. De plus, contrairement au silicium, ce matériau ne réagit pas avec les composants du test BCA, qui est l'un des tests les plus couramment utilisés pour quantifier la présence de protéines. Le fonctionnement et le protocole de ce test sont expliqués plus loin dans le chapitre. Un autre avantage est sa température de fusion qui se situe entre 108 et 132°C [55]. L'incubation lors du test BCA se fait à 56°C, le PE résiste à des changements conformationnels à cette température.



FIGURE 3.1 – Film transparent et souple de polyéthylène.

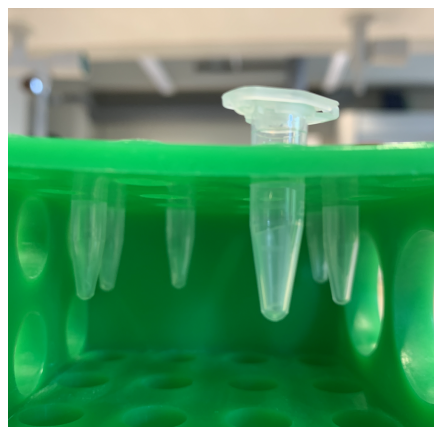


FIGURE 3.2 – Carré de 1cm² de polyéthylène placé un tube Eppendorf.

Silicium

Le silicium (Si) est le matériau qui forme jusqu'à présent la base des substrats solides employés comme collecteur pour les protéines projetées. Sur cette base de silicium pur, une couche de sucre est déposée. Du Si recouvert d'une couche d'or (Au) d'environ 100 nm est également employé comme base pour construire des couches de polymère. C'est sur ces dernières couches que les protéines sont attendues lors de leur transfert (le transfert des protéines est expliqué plus loin dans le chapitre). Les substrats recouverts d'or sont présentés à la Figure 3.3. Le silicium est également utilisé en tant que substrat cible. Les faisceaux d'argon bombarde la surface sur laquelle des protéines ont séché dans le but de les désorber et les transférer sur le collecteur.

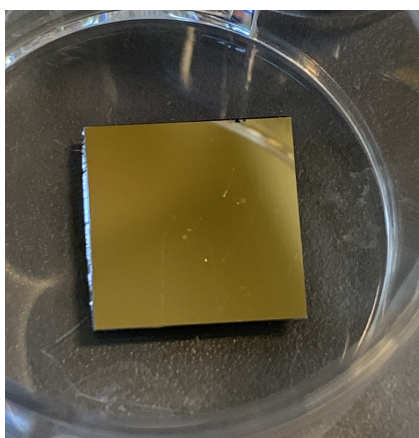


FIGURE 3.3 – Substrat de silicium recouvert d'or.

Tréhalose

Le tréhalose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, est un sucre non réducteur présent dans beaucoup d'organismes vivants (bactéries, insectes, invertébrés, certaines plantes, etc.) qui relie deux D-glucopyranose par une liaison $\alpha, \alpha - 1, 1$ glycosidique, voir Figure 3.4. Il joue principalement le rôle de réserve d'énergie et de source de carbone. Dans certains organismes, d'autres fonctions sont remplies par le tréhalose : protection des protéines et membranes cellulaires, signalisation, guide, etc. C'est un excellent stabilisateur et protecteur de protéines lorsqu'elles sont soumises à un stress. [56] [57]

Pour assurer sa fonction de couche sacrificielle, le sucre est déposé sur la surface d'un substrat en silicium sur laquelle les protéines d'intérêt sont transférées par la suite. En effet, le sucre se solubilise dans l'eau et peut alors relâcher avec lui les protéines. De ce fait, cela améliore la désorption du substrat des protéines, et les tests biologiques peuvent être réalisés de manière optimale.

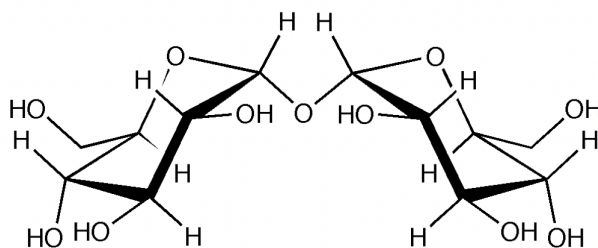
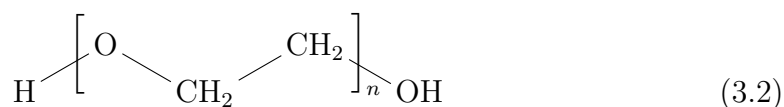


FIGURE 3.4 – Structure de l'isomère naturel du tréhalose. [56]

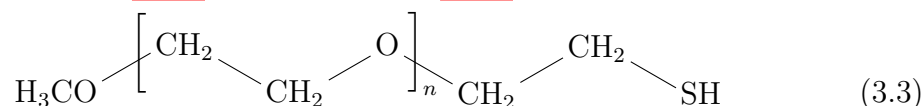
Polyéthylène glycol

Le poly(éthylène glycol) (PEG), représenté à la structure (3.2), est un polymère de structure linéaire en atomes de carbone, hydrogène et oxygène. Il est terminé d'un côté par un hydrogène et de l'autre par un groupement $-OH$.



Le choix de ce polymère réside dans le fait qu'en solution aqueuse, le PEG relâche les protéines. En effet, en présence de PEG, les protéines ont tendance à préférer l'hydratation. Une étude réalisée sur la protéine β -lactoglobuline démontre que l'exclusion stérique de la protéine envers le PEG est un paramètre majeur dans les interactions protéine-PEG et par conséquent dans l'hydratation de la protéine. De plus, cette hydratation préférentielle est présente pour des PEG présentant un poids moléculaire supérieur à 400, et augmente avec ce dernier. [58] Dans le cadre de ce mémoire, le PEG choisi a un poids moléculaire de 1200. Le mécanisme de répulsion stérique résulte de l'effet suivant. Quand l'échantillon est remis en solution aqueuse, les protéines transférées sur la couche de polymère compressent les chaînes menant à une diminution de l'entropie qu'il tend à maximiser. En outre, cette compression empêche l'hydratation du polymère qui voit son enthalpie augmenter alors qu'il veut la minimiser. Par conséquent, les polymères veulent retrouver un certain équilibre et expulsent les protéines par répulsion stérique. [59]

Dans ce cas, le PEG utilisé en tant que couche fonctionnelle sur un substrat de silicium recouvert d'or est le PEG terminé par un thiol, voir la structure (3.3). La fonction thiol réagit avec l'or de la surface générant petit à petit la couche voulue. Pour le reste de l'écrit, PEG fait référence au PEG terminé par un thiol.



3.2.2 Choix des protéines

Les protéines manipulées lors des transferts et des tests chimiques sont le lysozyme, la bradykinine et la trypsine.

Bradykinine

La bradykinine est un peptide composé de neuf acides aminés pour un poids moléculaire faible égal à 1,06021 *kDa*. Sa formule chimique est $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$. Elle exerce une influence sur les mécanismes de la vasodilatation, le relargage de médiateurs inflammatoires, la stimulation des nerfs sensitifs, mais également sur le système immunitaire ou rénal par exemple. Cette protéine est multi-fonctions. [60] Le choix de cette protéine se justifie par son bas poids moléculaire. Elle est utilisée afin de mettre au point les protocoles de quantifications, et peut aussi permettre de comparer la quantité qui pourrait être déposée par rapport au lysozyme, bien plus gros. En outre, son ion moléculaire est détecté par [ToF-SIMS], ce qui permet de vérifier in situ l'intégrité des molécules transférées.

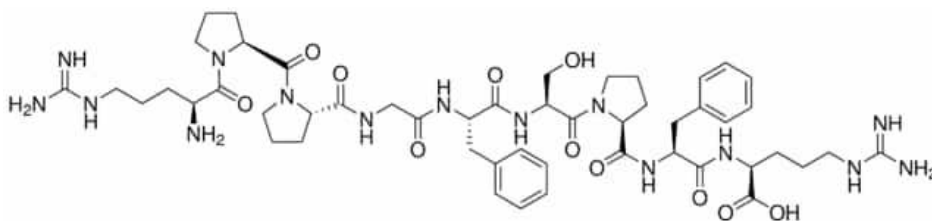


FIGURE 3.5 – Structure de la bradykinine. [61]

Lysozyme

Un autre type de protéine choisi est le lysozyme, souvent étudié pour sa fonction et sa structure dans la recherche. Découvert en 1922 par Alexander Fleming, c'est une molécule composée de quatre ponts disulfures entre les cystéines : *Cys*⁶ et *Cys*¹²⁷, *Cys*³⁰ et *Cys*¹¹⁵, *Cys*⁶⁴ et *Cys*⁸⁰, *Cys*⁷⁶ et *Cys*⁹⁴ (Figure 3.6a). Elle agit comme anti-bactérien dans plusieurs types de tissus (hépatiques, articulaires, etc.) et fluides corporels (salive, plasma, etc.) en hydrolysant la liaison $\beta - 1, 4$ -glycosidique entre deux acides aminés de la paroi cellulaire d'une bactérie (acide N-acétylmuramique et N-acétylglucosamine). [62] [63] [64] Cette protéine est peu coûteuse. En outre, son bon transfert ainsi que la conservation de sa structure tridimensionnelle et donc de son activité biologique ont été prouvés. [27] C'est la raison pour laquelle les premiers tests et transferts de ce travail ont été réalisés avec le lysozyme. Finalement, le lysozyme a un poids moléculaire de 14,3 *kDa*. [65]

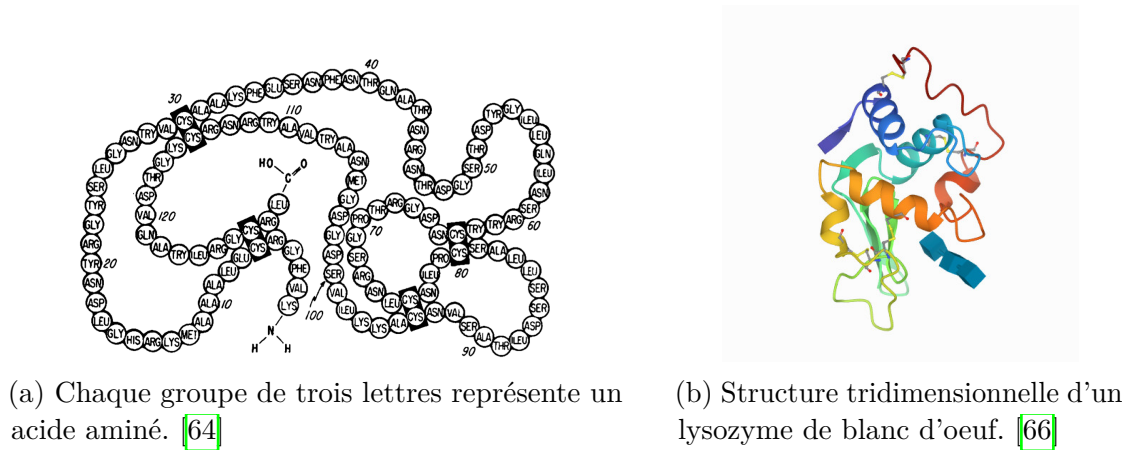


FIGURE 3.6 – Structure du lysozyme.

Trypsine

En tant qu'enzyme protéolytique (protéase) représentée à la Figure 3.7, la trypsine découpe d'autres protéines ou peptides en sectionnant la liaison du groupement carboxyle des acides aminés lysine ou arginine par hydrolyse. Elle est formée dans le pancréas sous forme inactive, le trypsinogène, et est activée dans l'intestin après clivage d'un peptide ($H_2N - Val - Asp_4 - Lys - COOH$) par l'entérokinase. Il s'agit d'une plus grosse protéine que les deux précédentes, avec un poids moléculaire de 23,746 kDa pour celle du pancréas bovin. [67] Sa formule chimique est $C_{35}H_{47}N_7O_{10}$ et s



FIGURE 3.7 – Structure tridimensionnelle de la trypsine bovine. [68]

Chapitre 4

Matériaux et méthodes

Les matériaux employés, les différentes méthodes de préparation des substrats cibles ou de collecteurs, et les protocoles de tests biochimiques sont décrits dans cette section.

4.1 Matériaux

Le D-(+)-Trehalose dihydrate ($C_{12}H_{22}O_{11}$) de *Saccharomyces cerevisiae* (poudre, pureté $\geq 99\%$, référence T9531), le sel d'acétate de bradykinine (poudre, pureté $\geq 98\%$ (HPLC), référence B3259), la trypsine de pancréas bovin (poudre lyophilisée, traitée essentiellement sans sel, ≥ 10000 BAEE unité/mg de protéine, référence T1426), et le lysozyme de blanc d'oeuf de poulet (poudre lyophilisée, protéine $\geq 90\%$, ≥ 40000 unité/mg de protéine, référence L6876-5G) proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO). Le poly(éthylène glycol) méthyl éther, terminé- Ω -thiol (référence P8698-EGOCH3SH) est obtenu par Polymer source, Inc. Les fines plaques de Si (référence WAK2PN) ont été commandées chez Neyco s.a. Tandis que les plaques prédécoupées de silicium couvert d'une fine couche d'or ont été fabriquées au laboratoire Winfab à l'Université Catholique de Louvain. Le kit PierceTM de dosage fluorescent d'une protéase (référence 23266) et le kit PierceTM de dosage BCA d'une protéine (référence 23227) sont achetés chez Thermo Fischer Scientific. Les films de polyéthylène de faible densité (LDPE Film, épaisseur de 0.05 mm, référence LS186732) ont été acquis chez Goodfellow (Cambridge, England). Pour l'électrophorèse sur gel, les gel (iD PAGE Gel, 4-20%, référence ID-PA4201-010) ont été trouvés chez Kaneka Eurogentec S.A. (Seraing, Belgique), et la coloration protéique (InstantBlue® Coomassie Protein Stain, ISB1L, référence ab119211) chez Abcam.

4.2 Préparation des substrats collecteurs et source de protéines

Film **PE** collecteur

Le film de **PE** est découpé en carrés de 1cm^2 . Ces petits carrés sont ensuite placés dans une solution d'éthanol pur dans un bécher fermé par un Parafilm et nettoyés pendant 15 minutes au sonicateur (via ultrasons). Finalement, ils sont séchés au flux d'azote, N_2 .

Silicium pur collecteur

Les fines plaques de **Si** sont découpées en carrés de 1cm^2 . Ces carrés sont immergés dans une solution piranha (trois doses d'acide sulfurique pour une dose de peroxyde d'hydrogène) pendant 5 minutes, puis rincés à l'eau pure 10 fois pour enlever tout résidu de solution piranha (elle réagit fortement avec les molécules organiques, et il ne faudrait pas que cela soit le cas avec les protéines transférées sur le collecteur). Ils sont ensuite séchés au flux d'azote, N_2 . Pour terminer la préparation, ils sont soumis à un traitement UV/ozone pendant 15 minutes. Une lampe à UV irradie la surface pour dissocier les particules (organiques entre autres) en particules volatiles (O_2 , H_2O et CO_2) qui s'enlèvent de la surface. [69]

Silicium recouvert d'or collecteur

Le **Si** recouvert d'**Au** est reçu prédécoupé en carrés de 1cm^2 . Ils sont placés dans une solution d'acétone pur dans un bécher fermé par un Parafilm et nettoyés pendant 15 minutes au sonicateur. Finalement, ils sont séchés au flux d'azote, N_2 , et la préparation se termine par un passage dans la machine UV/ozone.

Silicium pur cible (source de protéines)

Les plaques de **Si** épaisses sont découpées en petits bouts de moins d' $0,3 \times 1\text{ cm}^2$. La même méthode de nettoyage que pour les silicium purs collecteurs est appliquée. Finalement, trois fois $20\text{ }\mu\text{L}$ d'une solution de protéines de concentration égale à 20 g/L sont déposées sur la surface non polie du **Si**. Entre chaque dépôt, le **Si** recouvert de la solution de protéines est placé à l'incubateur (max 40°) afin de sécher plus rapidement.

4.3 Outils d'analyse

4.3.1 Mesures avec **ToF-SIMS**

Les mesures sont réalisées à l'aide du modèle *TOF.SIMS₅* équipé d'un analyseur de type rélectron à temps de vol, provenant de IONTOF GmbH (Münster, Allemagne). La cible est bombardée par le faisceau avec un angle de 45° , tandis que les particules désorbées entrent dans l'analyseur perpendiculaire à la surface.

Chaque échantillon est cartographié en 2D avant et après le relargage des protéines transférées en solution aqueuse. Un faisceau de Bi_5^+ accéléré à 30 **keV** balaye la surface de l'échantillon pour une densité d'ions d'environ $7.10^8 Bi_5^+/cm^2$. Ces cartographies ont pour dimensions $7 \times 7 mm^2$ pour 256 pixels, et ont duré environ 20 minutes chacune. L'analyseur enregistre les signaux moléculaires pour construire des spectres de chaque pixel et la cartographie.

Ensuite, entre deux et trois analyses en profondeur (profil 3D) ont été effectuées, chacune étant séparée de quelques millimètres d'une autre afin d'éviter toute interférence. Les profils réalisés varient en temps et en courants de pulvérisation (entre 50 *pA* et 5 *nA*) en fonction de l'objectif souhaité : atteindre la couche protéine/tréhalose ou protéine/PEG, ou atteindre le silicium. Le faisceau d'**Ar₃₀₀₀** accéléré à 10 **keV** bombarde la surface sur une aire de $600 \mu m^2$ pour désorber une couche et permettre au faisceau de Bi_5^+ (source LMIG, Liquid Metal Ion Gun) d'analyser sur une superficie de $200 \mu m^2$ avec un courant d'environ 0,07 *pA*. La différence de superficie sur lesquels les faisceaux ont un impact évite les effets de bords lors de l'analyse des espèces émises par le faisceau de Bi_5^+ . Toutes ces mesures sont faites selon le mode interlacé, dans une polarité positive, et les spectres sont calibrés grâce aux pics CH_3^+ , $C_2H_5^+$, $C_3H_5^+$ et $C_4H_7^+$.

Les données ont été acquises grâce au programme SurfaceLab 6.5 et traitées par SurfaceLab 7.2.

4.3.2 Spectroscopie photoélectronique à rayons X, **XPS**

Dans le cadre de ce mémoire, la spectroscopie photoélectronique à rayons X permet la caractérisation semi-quantitative des couches de polyéthylène glycol formées sur les substrats de silicium recouverts d'or. Cette méthode utilise l'énergie d'un photon envoyé (à 1486 **eV** dans nos mesures) sur la surface pour mesurer l'énergie cinétique des différents photo-électrons expulsés de l'échantillon et ainsi dessiner un spectre de ces énergies cinétiques. Un élément chimique qui compose l'échantillon peut se trouver sous différents états électroniques, c'est-à-dire qu'il peut être lié à lui-même

ou à d'autres éléments entraînant alors un déplacement chimique. L'énergie de liaison est différente (supérieure) de celle de l'état élémentaire (lié à lui même) lorsque l'élément est lié à un atome différent. Ces informations sont à prendre en compte pour évaluer l'état électronique de cet élément à travers l'échantillon. [70]

Une réelle analyse quantitative n'est pas possible avec ce type de spectroscopie. Néanmoins les intensités mesurées peuvent permettre de calculer les rapports atomiques. Si l'on souhaite comparer les rapports de deux éléments entre deux échantillons, ils donnent une idée sur les proportions entre les deux éléments dans un échantillon. Cependant, le rapport le plus élevé ne permet pas d'affirmer que la quantité est plus élevée dans cet échantillon. Attention tout de même que ces rapports peuvent être influencés par la contamination de surface qui est aussi prise en compte. [70]

Mesures avec XPS

Les analyses ont été réalisées avec un spectromètre photoélectronique SSX 100/206 de Surface Science Instruments (Etats-Unis) équipé d'une source de rayons-X Al microfocalisée monochromatisée (alimentée à 20 mA et 10 keV). La pression dans la chambre d'analyse était d'environ 10^{-6} Pa. L'angle entre la normale à la surface et l'axe de la lentille de l'analyseur était de 55° . La surface analysée était d'environ $1,4 \text{ mm}^2$ et l'énergie de passage était fixée à 150 eV. Un canon à eau réglé à 8 eV et une grille de Ni placée à 3 mm au-dessus de la surface de l'échantillon ont été utilisés pour la stabilisation de la charge. La séquence suivante de spectres a été enregistrée : spectre d'étude, C 1s, O 1s, N 1s, S 2p, Au 4f et C 1s à nouveau pour vérifier la stabilité de la compensation de charge dans le temps. La composante C-(C,H) du pic C1s du carbone a été fixée à 284,8 eV pour définir l'échelle d'énergie de liaison. Le traitement des données a été effectué avec le programme CasaXPS (Casa Software Ltd, Royaume-Uni). Certains spectres ont été décomposés avec la routine d'ajustement des moindres carrés fournie par le logiciel avec une fonction produit Gaussienne/Lorentzienne (85/15) et après soustraction d'une ligne de base non linéaire. Les fractions molaires ont été calculées en utilisant les surfaces des pics normalisées en fonction des paramètres d'acquisition et des facteurs de sensibilité fournis par le fabricant.

4.4 Transfert des protéines

Le transfert de protéines est réalisé à l'aide du ToF-SIMS. Il s'agit à la base d'un outil d'analyse, mais dans le cadre du projet, il est détourné de son rôle premier pour réaliser du transfert de molécules d'une cible à un substrat collecteur. En

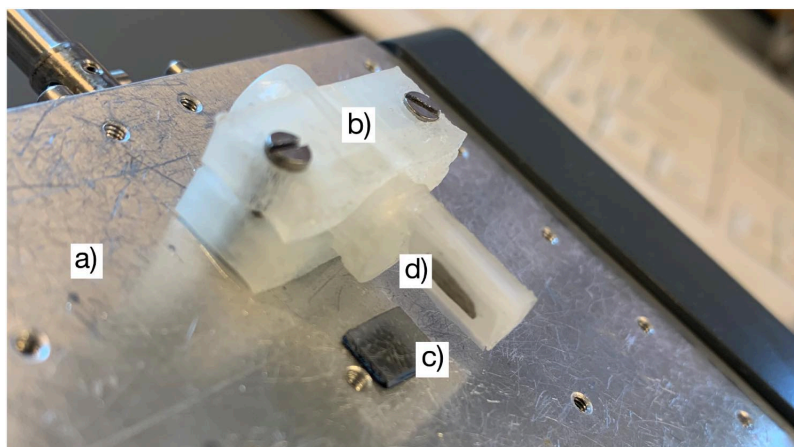


FIGURE 4.1 – a) Porte-échantillon supportant le dispositif pour le transfert de protéine. b) Dispositif imprimé en 3D sur lequel le collecteur est collé. c) Source de protéines (substrat de **Si** sur lequel des protéines ont séché) qui est la cible du faisceau. d) Collecteur collé sur le dispositif (dans ce cas, il s'agit d'un film de **PE**).

réalité, c'est uniquement son faisceau d'argon (faisceau **GCIB**) qui est utilisé pour transférer les protéines sur les substrats collecteurs.

Les dispositions de la cible et de la source de protéines sont représentées à la Figure 4.1. Tout comme pour l'analyse, le faisceau d'argon frappe la source de protéines avec un angle d'incidence par rapport à la normale de la surface égal à 45° . Le collecteur est positionné à 45° , car c'est la disposition qui permet de récupérer un maximum d'espèce pulvérisée.

Le bombardement de la source de protéines est réalisé avec des faisceaux de agrégats d' Ar_{3000}^+ et un courant de pulvérisation compris entre 6 et 9 nA pour des temps de transfert inférieurs ou égaux à 7h. Lorsque des agrégats d' Ar_{5000}^+ sont utilisés, le courant de pulvérisation est compris entre 1,2 et 1,8 nA . Les temps de transferts doivent alors être adaptés pour atteindre des doses du même ordre de grandeur, les temps de transferts sont plus longs. Dans toute manipulation, l'accélération des clusters est à 10 **keV**.

4.5 Les tests biochimiques

Dosage **BCA** d'une protéine

Le test **BCA** (kit visible à la Figure 4.2) est un test à base d'acide bicinchoninique (**BCA**) qui mesure la concentration protéique dans un échantillon. C'est ce composé

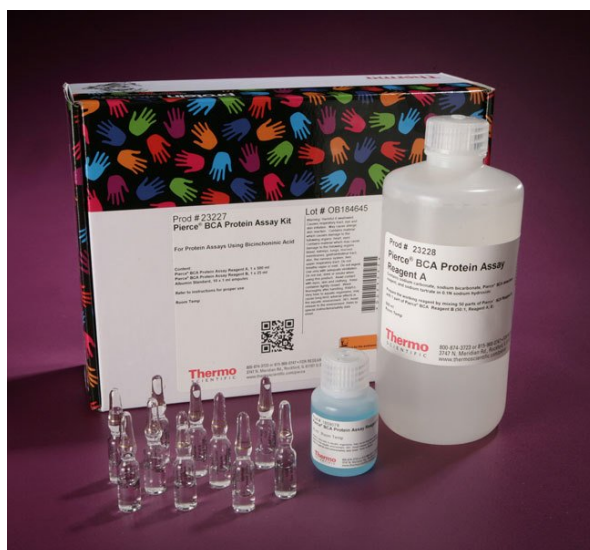


FIGURE 4.2 – Kit Pierce™ de dosage BCA d'une protéine. [71]

qui par réaction chimique avec un complexe chélaté forme la couleur mauve aperçue à l'oeil nu. [71]

Deux réactions ont lieu durant le test. La première étape est la réduction de l'ion cuivre Cu^{++} en Cu^{+} par les protéines, connue sous le nom de *réaction de Biuret* et représentée par l'équation (4.1). Attention, cette réaction doit se dérouler en milieu alcalin, sous réserve d'influencer les résultats. Les protéines ou peptides se lient à l'ion cuivrique pour former un premier complexe chélaté. Ensuite, le cuivre réduit en Cu^{+} réagit avec l'acide bicinchoninique, à hauteur de deux molécules d'acide pour un ion cuivreux. Après une incubation d'une heure à $60^{\circ}C$, un nouveau complexe chélaté hydrosoluble est formé et donne cette couleur mauve qui peut être déterminée grâce à son absorbance à 562 nm , Figure 4.3. Trois paramètres relatifs à la protéine influenceraient également la couleur du test : la structure macromoléculaire, le nombre de liaisons peptidiques, et certains acides aminés (cystéine, cystine, tryptophane et tyrosine). [71]



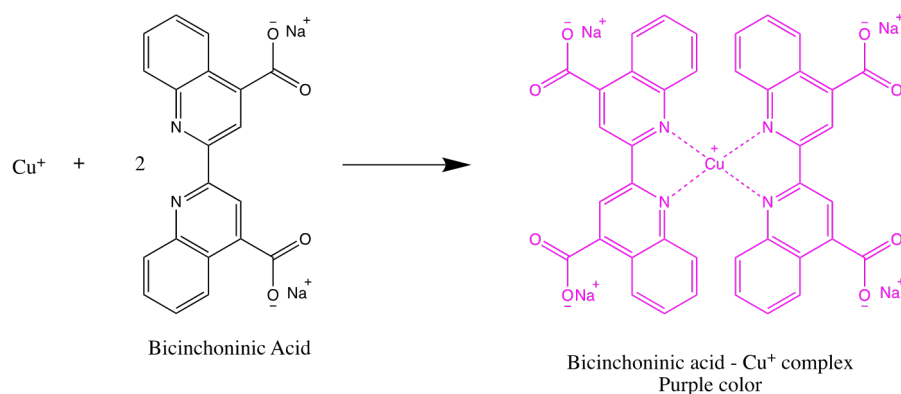


FIGURE 4.3 – Réaction chimique lors du test BCA.

La réponse à un test BCA a une tendance quasi-linéaire avec l'augmentation de la concentration en protéines allant de 20 à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. L'allure de courbes typiques sont représentées à la Figure 4.4 pour deux protéines : albumine de sérum bovin (BSA) et gammaglobuline bovine (BGG). Le test a ici été réalisé avec une incubation de 30 minutes à 37°C .

Lors de l'élaboration du test, les protéines sont séchées dans une plaque de 96 puits transparente sous 40°C dans l'incubateur jusqu'à disparition de la solution aqueuse dans laquelle elles baignaient. Ensuite, une solution des réactifs A et B en concentration 50 : 1 respectivement est préparée en quantité suffisante pour remplir chaque puits de 200 μL de solution. Lorsque le test est fait avec des films de PE, ceux-ci sont placés dans des tubes Eppendorf, et 250 μL de solution sont préparés par puits. Après incubation dans un bain à 60°C , l'absorbance d'une longueur d'onde de 562 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques multipuits. Pour les films de PE dans les tubes Eppendorf, 200 μL sont prélevés et mis dans une plaque multipuits pour permettre la mesure d'absorbance.

Dosage fluorescent d'une protéase

Ce test permet de quantifier la trypsine grâce à son activité protéolytique. Il se base sur la digestion de caséine marquée à la fluorescéine par une protéase pour mesurer son activité par fluorescence. [72] Un aperçu du kit utilisé au laboratoire est visible sur la Figure 4.5.

La caséine qui permet la détection de l'activité protéasique est marquée par du isothiocyanate de fluorescéine (FITC) présent en large excès par rapport à elle. Tant que la molécule est intacte, la fluorescence est inhibée. Lors de la digestion de la FITC-caséine en plusieurs fragments par la protéase (phénomène dessiné

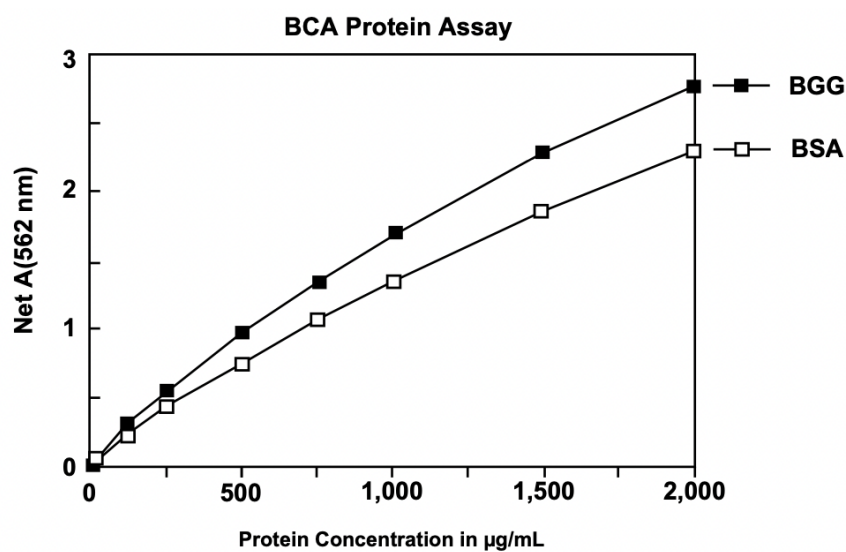


FIGURE 4.4 – Allures de courbes classiques en réponse au test **BCA**. Dans ce cas, il s'agit des courbes pour les protéines **BSA** et **BGG** avec une concentration de 20 à 2000 $\mu\text{g/mL}$. [71]



FIGURE 4.5 – Kit Pierce™ de dosage fluorescent d'une protéase. [72]

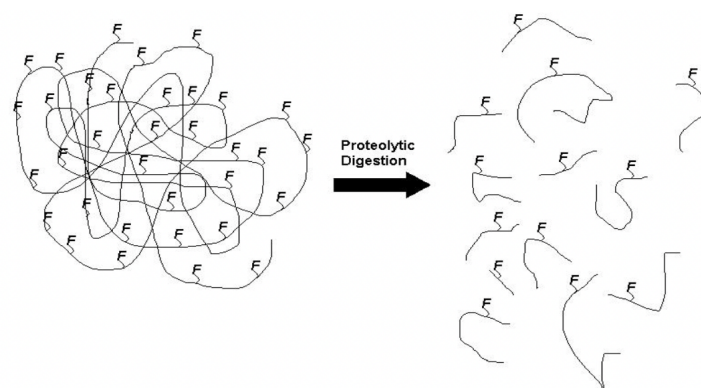


FIGURE 4.6 – Digestion protéolytique d'une caséine marquée par une protéase. [72]

sur la Figure [4.6]), l'appareil détecte l'augmentation de la fluorescence à mesure que la FITC-caséine est fragmentée. Cette mesure de l'activité de la protéase se réalise avec un fluoromètre et des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de la fluorescéine, soit 485 et 538 *nm*. [72]

Lors de l'expérience sur les protéines transférées, les films de [PE] ont été placés dans des tubes Eppendorf. Afin qu'ils soient bien couverts de la solution, 180 μL ont été insérés. D'abord, il y a l'ajout de 80 μL d'une solution tampon TBS (25 *mM* Tris, 0,15 M NaCl, et pH 7,2), et puis, 100 μL de solution réactive contenant du TBS et la caséine en concentration 500 : 1 respectivement. Une incubation de 5 minutes à température ambiante précède la mesure sur le SpectraMax. Un prélèvement de 150 μL de cette solution est mis dans les puits d'une plaque 96 puits noire pour la mesure de fluorescence pour des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de 485 et 538 *nm*.

Mesure des absorbances et fluorescences

Les mesures d'absorbances et fluorescences réalisées pour obtenir les résultats des tests qui utilisent les kits PierceTM de dosage [BCA] et fluorescences de protéines sont obtenues à partir d'un SpectraMax® iD3 provenant de Molecular Devices (San Jose, Californie, Etats-Unis). Elles sont faites en "point final" dans des plaques de 96 puits transparentes ou opaques en fonction du test.

4.5.1 Electrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel de dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide ([SDS-PAGE]) est une méthode qualitative qui permet de détecter la présence d'une protéine. Son principe repose sur la migration de la protéine sous un champ électrique, les plus

petites protéines migrant plus loin que les grosses. Connaissant le poids moléculaire de la trypsine, il est facile de savoir où attendre un trait après l'application du champ.

Préparation de la solution contenant les protéines transférées

Chaque film de **PE** est placé dans un tube Eppendorf, dans lesquels 100 μL de solution Laemmli est incorporée afin de couvrir quasi entièrement le carré. Trois inhibiteurs de protéases sont ajoutés à la solution à différentes concentrations dans le but d'empêcher les molécules de trypsine de rompre les liens peptidiques entre elles. Chaque tube Eppendorf passe au vortex pendant 15 minutes. Toutes les 5 minutes, l'appareil est mis sur pause pour repousser les films de **PE** dans le fond des tubes Eppendorf à l'aide d'une centrifugeuse (30 secondes à 10 000 rpm). Cela est aussi fait une dernière fois à la fin des 15 minutes. Ensuite, les échantillons sont placés dans un bain d'ultrasons à 56°C pendant 15 minutes. Finalement, une nouvelle centrifugation pendant 1 minute à 14 000 rpm termine le processus de préparation.

Montage de la cellule d'électrophorèse

Le gel de polyacrylamide qui contient les puits dans lesquels les solutions sont déposées est monté dans une cellule plongée dans un bain de solution tampon MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid). Dans le premier puits, 8 μL de solution Ladder (échelle de référence de poids moléculaires) sont insérés. Une référence de trypsine (2 μg) est introduite dans le deuxième puits. Dans les puits 3 à 5, 70 μL (capacité maximale d'un puits) de la solution contenant les protéines transférées sont injectés délicatement. Finalement, pour éviter que les protéines ne dérivent dans la ligne du puits 6, 20 μL de solution Laemmli y sont ajoutés.

Electrophorèse

Le lancement de l'électrophorèse se fait d'abord à tension constante, 140 V. Après environ 30 minutes, il y a un changement et il faut passer à courant constant, 50 mA. L'expérience dure environ 1h20 jusqu'à ce que la couleur bleue de la solution Laemmli soit visible tout en bas du gel, alors le processus est stoppé.

Coloration des protéines

Finalement, la cellule d'électrophorèse est démontée et le gel est placé dans une boîte et baigné dans du bleu de Coomassie, une coloration protéique à base de Coomassie. Ce colorant permet de visualiser les protéines qui ont migré à travers le gel. Le gel reste une nuit entière avant de regarder aux résultats.

Chapitre 5

Résultats et discussion

Dans cette section, les résultats obtenus à l'issue des expériences et des manipulations réalisées sur les différents transferts de protéine sont discutés.

5.1 Transfert de protéines sur films de polyéthylène

Bien que le polyéthylène soit un matériau avec beaucoup d'avantages (vus au point [3.2.1](#)) dans le cadre du test [BCA](#), il reste nécessaire de vérifier s'il interfère ou non sur le test. Pour y parvenir, une courbe de calibration, reprenant la même gamme de masse de lysozyme que celle de la courbe de calibration de référence (Figure [A.1](#) en Annexe), est construite. La courbe de référence du lysozyme est élaborée afin de comparer les résultats obtenus en ajoutant d'autres composés au test. En sachant, que la courbe de calibration de référence est construite avec une solution de lysozyme pure, aucune interférence n'est attendue pour ce test. De plus, l'allure de la courbe est similaire à celle de la Figure [4.4](#). L'absorbance est différente, mais c'est normal étant donné que les molécules comparées ne sont pas identiques.

Dans ce cas-ci, le lysozyme est déposé sur des carrés de [PE](#) à partir de solution aqueuse. Il sèche ensuite dans un incubateur à 40°C jusqu'à disparition totale de l'eau. La courbe de calibration de vérification est reprise dans la partie Annexe à la Figure [A.2](#). La tendance linéaire sur ce genre de graphe est toujours ajoutée car elle permet d'obtenir l'équation de la droite qui donne une estimation sur la quantité transférée à partir de l'absorbance mesurée. La pente de la droite suite à la régression linéaire est similaire à celle obtenue pour la référence, tout comme les valeurs d'absorbance. En conclusion, le [PE](#) n'interfère pas avec les résultats d'un test [BCA](#).

Pour la suite des transferts sur des films de polyéthylène, la bradykinine et le lysozyme sont choisis dans le but de quantifier la masse de protéines déposée.

5.1.1 Transfert de bradykinine sur PE

Une première série de transferts de bradykinine sur des films de polyéthylène est effectuée à l'aide d'agrégats d' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV. Pour chacun des transferts, la masse transférée de bradykinine est estimée à l'aide de la courbe de calibration à la Figure A.3 en Annexe. Les paramètres de transferts sont exposés au tableau 5.1.

TABLE 5.1 – Tableau reprenant les paramètres de la première série de transferts de la bradykinine sur films de polyéthylène à l'aide d' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV ainsi que la masse estimée.

	Dose totale d'ions [#ions]	Densité d'ions [ions/cm ²]	Courant [nA]	Temps de transfert	Masse estimée [μg]
1	5,43.10 ¹³	1,1.10 ¹⁶	5,8	25min	0,9323
2	7,41.10 ¹³	1,81.10 ¹⁶	3,3	1h	1,0609
3	1,69.10 ¹⁴	3,44.10 ¹⁶	5	1h30	1,6768
4	3,38.10 ¹⁴	4,86.10 ¹⁶	5,3	2h	3,0637
5	8,99.10 ¹⁴	1,83.10 ¹⁷	5	8h	8,1042

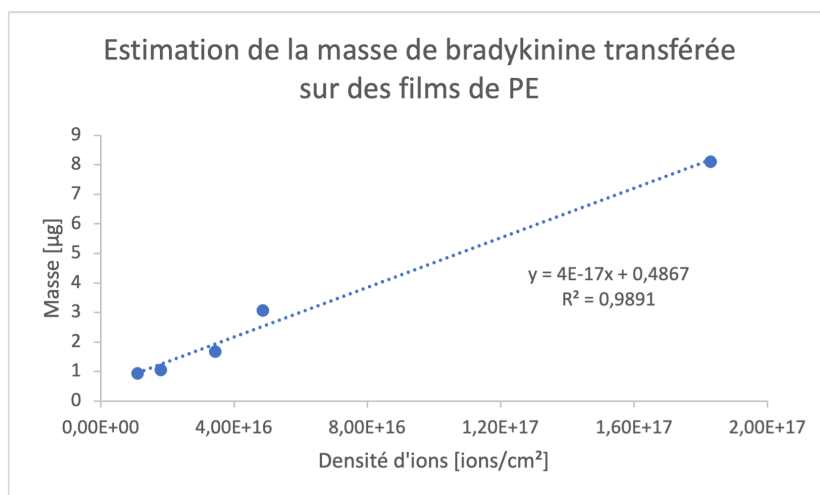


FIGURE 5.1 – Graphe de l'estimation de la masse de bradykinine transférée [μg] en fonction de la densité d'ions primaires d'argon [ions/cm²] pour la première série de transferts. La droite a pour équation : $y = 4,20249.10^{-17} x + 0,486689821$.

Un graphe reprenant la masse transférée estimée en fonction de la densité d'ions primaires est obtenu à la Figure 5.1. La valeur du coefficient de détermination indique que la régression linéaire obtenue à partir des points sur le graphe explique correctement les valeurs trouvées. Il faut néanmoins garder à l'esprit que certaines masses estimées sont hors de la gamme de masse utilisée pour la courbe de calibration. Dès lors une deuxième série de transferts est pratiquée. Dans ce cas, la courbe de calibration est construite avec une gamme de masse allant jusqu'à 10 μg , et aucun transfert supérieur à 8h n'est réalisé. Les paramètres et les masses estimées se trouvent dans le tableau 5.2, et la Figure 5.2 représente l'estimation de la masse de bradykinine transférée en fonction de la densité d'ions primaires envoyés sur la surface.

TABLE 5.2 – Tableau reprenant les paramètres de la deuxième série de transferts de la bradykinine sur films de polyéthylène à l'aide d' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV ainsi que la masse estimée.

	Dose totale d'ions [#ions]	Densité d'ions [ions/cm ²]	Courant [nA]	Temps de transfert	Masse estimée [μg]
1	1,33.10 ¹⁴	2,72.10 ¹⁶	7,9	45min	1,6456
2	3,55.10 ¹⁴	7,25.10 ¹⁶	7,9	2h	3,7177
3	7,01.10 ¹⁴	1,43.10 ¹⁷	7,8	4h	8,2311
4	1,49.10 ¹⁵	3,04.10 ¹⁷	5,3	8h	7,7936

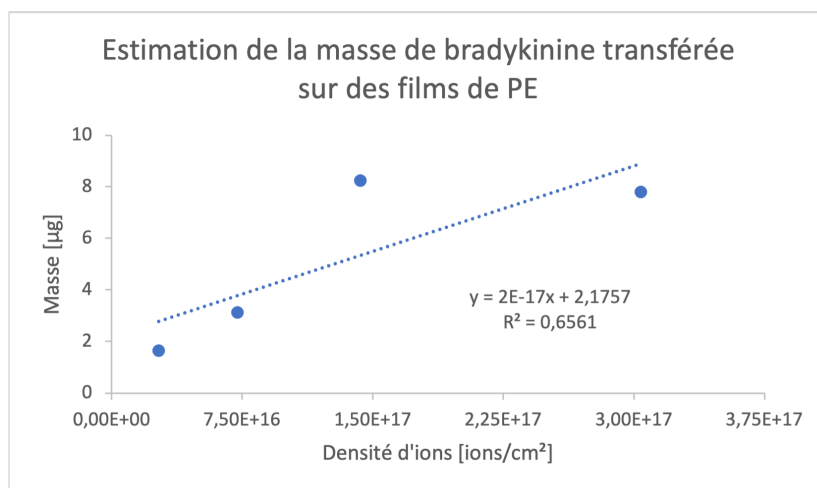


FIGURE 5.2 – Graphe de l'estimation de la masse de bradykinine transférée [μg] en fonction de la densité d'ions primaires d'argon [ions/cm²] pour la deuxième série de transferts. La droite a pour équation : $y = 2,21171.10^{-17} x + 2,175650468$.

Dans ce cas-ci, le coefficient de détermination de la régression linéaire n'est pas favorable. Ce n'est pas étonnant quand on compare les résultats des trois derniers transferts de la dernière série. Étant donné que pour des densités d'ions différentes d'un facteur 2, la masse transférée estimée a plus que doublé pour les transferts 2 et 3, on s'attend à un résultat similaire entre le transfert 3 et 4. Or, la masse estimée du transfert 4 est plus petite que celle du transfert 3. L'hypothèse qui peut expliquer ce résultat, est que la cible de protéines soit épuisée (couche complètement érodée et substrat de Si atteint) avant la fin du transfert. En outre, il est difficile de contrôler précisément l'épaisseur de la couche de protéines sur la cible, et celle-ci n'est certainement pas homogène. Il n'est pas évident non plus de savoir précisément l'endroit de frappe du faisceau d'argon sur la cible. La couche à l'endroit de frappe du transfert 4 pourrait être moins épaisse que celle à l'endroit de frappe du faisceau d'ions primaires du transfert 3. Une seconde hypothèse pourrait être la contamination du troisième échantillon. Ces hypothèses sont expliquées plus en détail dans la section 5.2, car elles permettent également de comprendre d'autres résultats obtenus dans cette section.

5.1.2 Transfert de lysozyme sur PE

Les manipulations du point précédent sont répétées avec le lysozyme. Les paramètres de transfert de chaque échantillon sont résumés dans le tableau 5.3. Le graphe à la Figure 5.3 montre la tendance de l'estimation de la masse en fonction de la densité d'ions envoyés sur la surface de la cible. Malgré un bon coefficient de détermination de la courbe de calibration (Figure A.5 en Annexe), celui de la régression linéaire à la Figure 5.3 est très mauvais. Il n'est pas possible de tirer quelconque conclusion de cette courbe. L'espoir de voir une masse estimée qui augmente avec la densité d'ions primaires envoyés à la surface de la source de protéines est balayée par les résultats exprimés au tableau 5.3. A nouveau, l'hypothèse que la couche de protéines (source) soit épuisée avant la fin du transfert en plusieurs endroits de la cible est probable.

Aucune tendance entre la densité d'ions primaires envoyés et la masse transférée ne peut donc être observée.

Une deuxième série de transferts de lysozyme sur des films de PE est réalisée afin d'obtenir de meilleurs résultats à partir desquels on pourrait tirer quelques conclusions. L'estimation de la masse transférée pour les trois derniers transferts du tableau 5.4 sont reportées dans un graphe, représenté à la Figure 5.4, en fonction de la densité d'ions primaires envoyés sur la cible. Le coefficient de détermination de la courbe de calibration (Figure A.6 en Annexe) est très bon et celui de la Figure 5.4 est excellent. Cela veut dire que pour des prochains transferts de lysozyme,

TABLE 5.3 – Tableau reprenant les paramètres de la première série de transferts du lysozyme sur films de polyéthylène à l’aide d’ Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV ainsi que la masse estimée.

	Dose totale d’ions [#ions]	Densité d’ions [ions/cm ²]	Courant [nA]	Temps de transfert	Masse estimée [μg]
1	1, 6.10 ¹⁴	3, 26.10 ¹⁶	7,1	1h	1,4689
2	2, 4.10 ¹⁴	4, 89.10 ¹⁶	6,4	1h40	1,3826
3	3, 24.10 ¹⁴	6, 6.10 ¹⁶	5,8	2h15	2,7352
4	4, 45.10 ¹⁴	9, 08.10 ¹⁶	6,6	3h	1,8576
5	5, 9.10 ¹⁴	1, 06.10 ¹⁷	6,6	3h30	2,3735

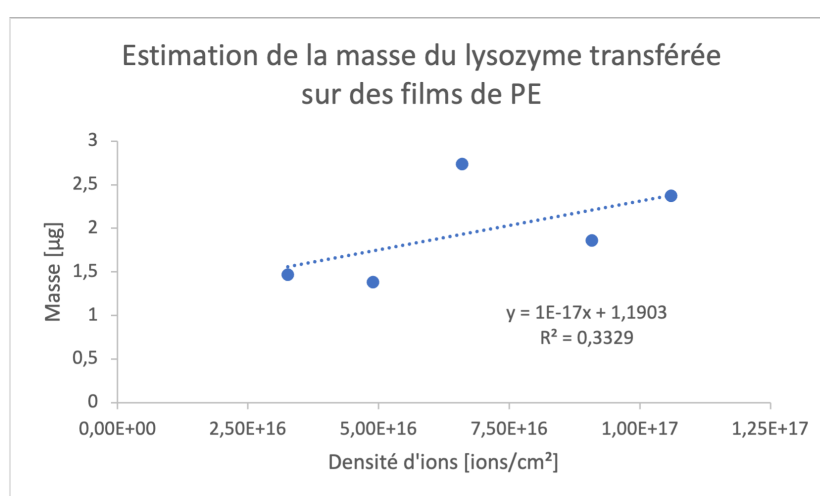


FIGURE 5.3 – Graphe de l’estimation de la masse de lysozyme transférée [μg] en fonction de la densité d’ions primaires d’argon [ions/cm²] pour la première série de transferts. La droite a pour équation : $y = 1,12311.10^{-17} x + 1,190263957$.

on pourrait s’attendre à cette même tendance de la masse estimée en fonction de la densité des ions primaires. Cependant, un certain esprit critique est à garder par rapport à ces résultats. La courbe de la Figure 5.4 n’est basée que sur trois points. Le premier transfert du tableau 5.4 n’est pas pris en compte dans le graphe à la Figure 5.4, car le transfert n’a pas été réalisé avec la même énergie par atome des agrégats d’argon. Par conséquent, le rendement de pulvérisation n’est pas le même et cela n’a pas de sens de les mettre dans le même graphique. Il serait donc intéressant de réitérer l’expérience avec plus de transferts et, pour chacun d’eux, avec une source de protéines plus épaisse afin d’éviter son épuisement avant la fin du transfert.

TABLE 5.4 – Tableau reprenant les paramètres de la deuxième série de transferts du lysozyme sur films de polyéthylène à l’aide d’agrégats d’argon accélérés à 10 keV ainsi que la masse estimée.

	Dose totale d’ions [$\#ions$]	Densité d’ions [$ions/cm^2$]	Courant [nA]	Agrégats d’argon	Temps de transfert	Masse estimée [μg]
1	$4,21 \cdot 10^{14}$	$8,58 \cdot 10^{16}$	1,56	Ar_{5000}^+	12h	0,9043
2	$1,77 \cdot 10^{14}$	$3,62 \cdot 10^{16}$	7,9	Ar_{3000}^+	1h	0,6935
3	$3,73 \cdot 10^{14}$	$7,61 \cdot 10^{16}$	8,3	Ar_{3000}^+	2h	0,9302
4	$5,33 \cdot 10^{14}$	$1,09 \cdot 10^{17}$	7,9	Ar_{3000}^+	3h	1,1136

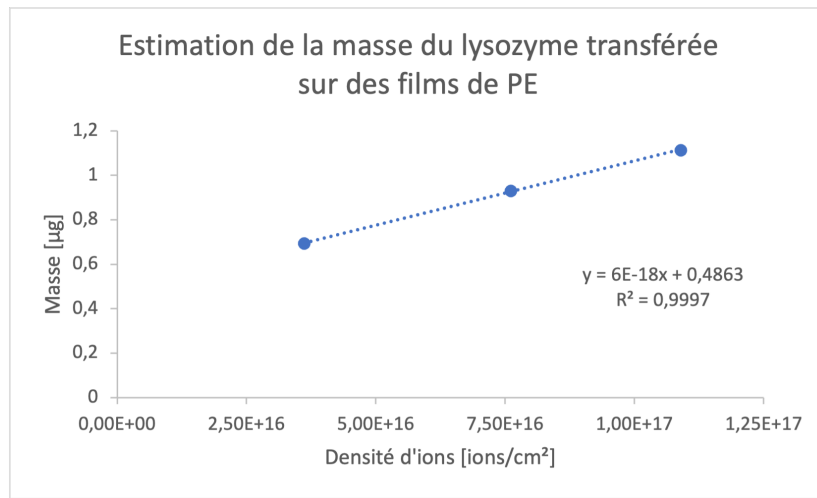


FIGURE 5.4 – Graphe de l’estimation de la masse de lysozyme transférée [μg] en fonction de la densité d’ions primaires d’argon [$ions/cm^2$] pour la deuxième série de transferts. La droite a pour équation : $y = 5,77627 \cdot 10^{-18} x + 0,486337231$.

5.1.3 Comparaison entre la bradykinine et le lysozyme

La comparaison entre les graphes de la masse transférée en fonction de la densité d’ions primaires envoyés sur la cible, fait remarquer que pour une même densité d’ions, la masse transférée de bradykinine est supérieure à celle du lysozyme. Les pentes des graphes concernant la bradykinine sont plus grandes que celles pour le lysozyme. Cette observation permet de déduire que les protéines de poids moléculaires plus petits ont une vitesse de dépôt plus grande que les protéines avec un poids moléculaire plus élevé. En outre, cette vitesse de dépôt croît linéairement avec le temps. Il devient alors facile de contrôler la masse transférée voulue en fonction du temps et du courant du faisceau. Dans le cas du lysozyme, la reproduction de

l'expérience est nécessaire pour affirmer cette théorie.

Il est à souligner que ces résultats sont obtenus grâce à la facilité de manipulation du polyéthylène, contrairement à celle du silicium qui n'a pas donné de résultat concluant pour la quantification.

5.2 Transfert de protéines sur couches fonctionnalisées

Une autre partie des objectifs est la création de surfaces fonctionnalisées. L'élaboration des couches exploitées pour le largage des protéines en solution nécessite en premier lieu de vérifier l'interférence des matériaux choisis avec le test [BCA](#). Ce test est choisi pour détecter la présence des protéines, car il est simple et fiable. Fructose, tréhalose et [PEG](#) sont ajoutés à la solution de protéines de concentration connue pour ensuite être comparée à une courbe de calibration de protéines "pure" en solution aqueuse. Les quantités de protéines de la courbe de calibration sont connues et le résultat souhaité est une courbe de calibration similaire pour tous les tests. Ces courbes sont visibles en Annexe aux Figures [A.1](#), [A.7](#), [A.8](#) et [A.9](#).

Sur les graphes, il est flagrant que le fructose a une interférence avec le test, tandis que le tréhalose et le [PEG](#) donnent des résultats très similaires au test blanc (solution aqueuse de protéines pures). Les coefficients des droites pour ces deux matériaux sont semblables. Les valeurs de la courbe avec la solution de [PEG](#) sont néanmoins légèrement inférieures, mais cela peut résulter d'imprécisions lors de la manipulation.

La courbe du fructose s'explique par le fait qu'il s'agisse d'un sucre réducteur qui a la capacité de réduire l'ion cuivrique Cu^{2+} en Cu^{+} . C'est confirmé par les résultats de *Milton et Mullen* qui démontrent que le fructose, parmi d'autres sucres, est très réactif au test [BCA](#). Son absorbance est reprise sur la Figure [5.5](#) [73](#)

Ces résultats permettent de choisir les matériaux utilisés dans les prochaines étapes : tréhalose et [PEG](#)

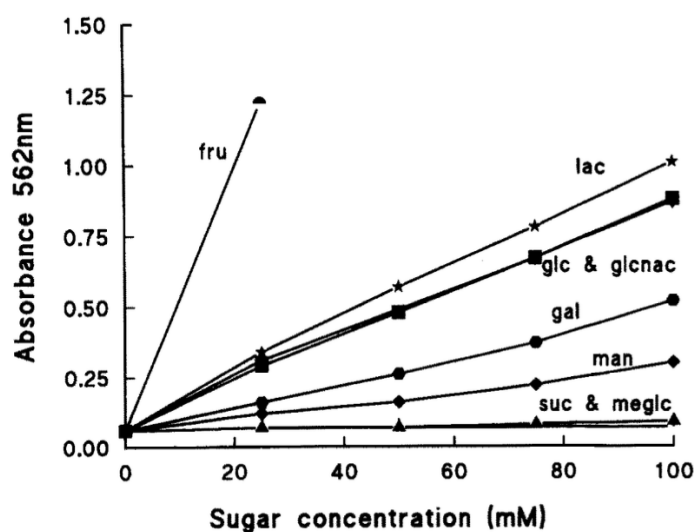


FIGURE 5.5 – Absorbance de différents sucres en réaction au test BCA : fructose (fru), lactose (lac), glucose (glc), N-acetyl-glucosamine (glnac), galactose (gal), mannose (man), sucrose (suc) et α -methyl-glucose (meglc).

5.3 Transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose

Cette section est dédiée aux transferts de bradykinine sur des couches de tréhalose. La première partie étudie le développement de la couche. Les deux autres parties se concentrent sur la caractérisation des couches avant et après le transfert de bradykinine.

5.3.1 Création de la couche de tréhalose

Pour réaliser la couche sacrificielle de tréhalose, quelques sublimations sont effectuées grâce à un appareil "fait maison" dans le laboratoire BSMA (Bio- and Soft Matter) à l'Université Catholique de Louvain. L'appareil est visible aux Figures 5.6a et 5.6b. Il est composé de deux pompes et d'une jauge pour mettre le circuit, complètement fermé à l'extérieur, sous-vide afin de permettre l'opération. Les deux pompes sont visibles à la Figure 5.6b et la jauge à la Figure 5.6a. La pompe primaire est mise en route et permet d'atteindre une pression de 10^{-2} mbar. Ensuite, la pompe turbomoléculaire (ou secondaire) est enclenchée et descend la pression jusque 10^{-4} mbar. A partir de cette pression, le sucre préalablement placé dans un creuset (Figure 5.6a) est chauffé à 180°C et sublime pendant 2h. Au-dessus, un substrat de silicium carré d' 1 cm^2 est fixé à une tige en cuivre constamment refroidie par de la glace à l'extérieur afin que le sucre en phase gazeuse se condense et se solidifie sur

le silicium. Ces paramètres de sublimation sont trouvés par essais/erreurs, et sont jugés satisfaisants, car la couche obtenue est visible à l'oeil nu.

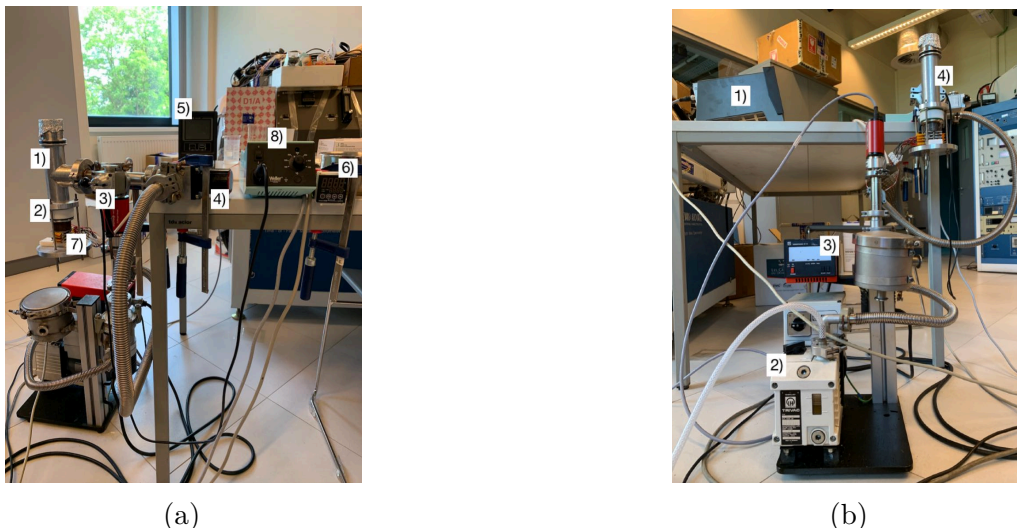


FIGURE 5.6 – Appareil de sublimation du laboratoire Bio- and Soft Matter à l'Université Catholique de Louvain. (a) : 1) Colonne dans laquelle le substrat de silicium est placé. 2) Creuset qui contient le tréhalose. 3) Vanne pour mettre le circuit à l'air. 4) Vanne pour séparer les pompes du reste du circuit. 5) Jauge. 6) Permet de sélectionner la température voulue et de commencer la sublimation. 7) Chauffe le creuset pour que le tréhalose sublime. 8) Boost du 6) pour atteindre les plus hautes températures. (b) : 1) Jauge. 2) Pompe primaire. 3) Pompe secondaire. 4) Colonne où le substrat est placé et creuset.

5.3.2 Caractérisation des couches de tréhalose avant le transfert de bradykinine

Sur les deux prochaines Figures [5.7](#) et [5.8](#), on observe des parties de spectre de masse prises sur un échantillon préparé en sublimant du tréhalose sur un substrat de [Si](#) qui sont choisies pour le représenter. Le premier pic choisi pour représenter le tréhalose correspond au fragment $C_6H_{11}O_5^+$ encadré en rouge sur la Figure [5.9](#). A gauche de ce pic, un plus petit est présent à un m/z de 163 et semble correspondre au $Si_4C_2H_{11}O^+$. Tandis que le second pic choisi à la Figure [5.8](#) est celui de la molécule de tréhalose qui a perdu un groupement $-OH$, soit $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. A droite du pic de $C_{12}H_{21}O_{10}^+$, le pic du $C_{22}H_{29}O_2^+$ est reconnu. Ces spectres de masse sont mesurés sur un essai de sublimation, et prouvent que la méthode pour créer la couche de sucre est efficace.

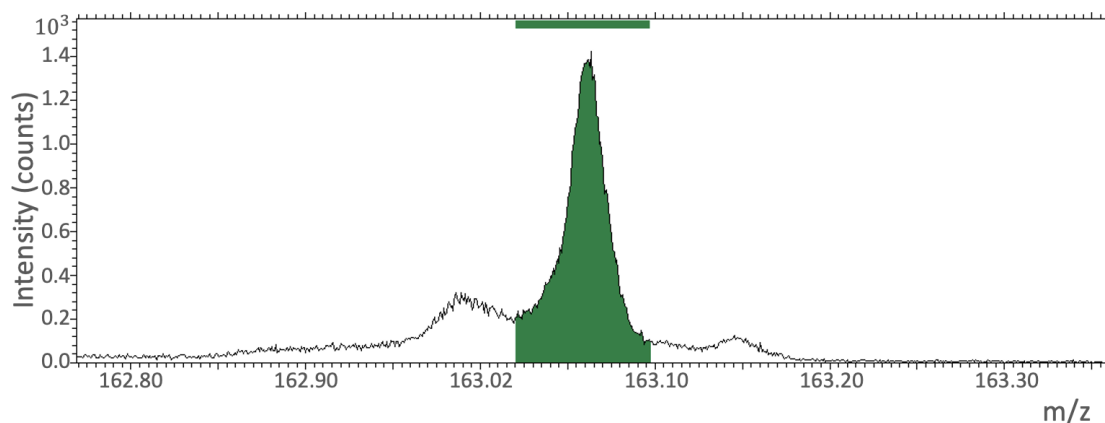


FIGURE 5.7 – Spectre de masse partiel illustrant un pic caractéristique du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$.

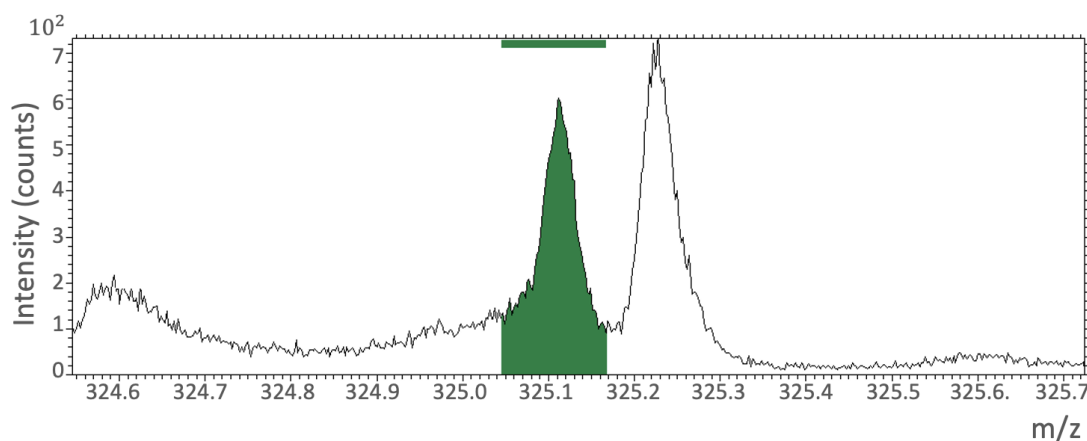


FIGURE 5.8 – Spectre de masse illustrant un pic caractéristique du tréhalose, $C_{12}H_{21}O_{10}^+$.

5.3.3 Caractérisation des couches de tréhalose après transfert de bradykinine

Deux échantillons de silicium sur lesquels une couche de tréhalose est formée sont utilisés dans le but de réaliser deux transferts de bradykinine et deux doses d'ions primaires différentes. Les transferts sont réalisés avec des agrégats d' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV. Les paramètres de transferts qui diffèrent pour les deux échantillons sont repris dans le tableau 5.5.

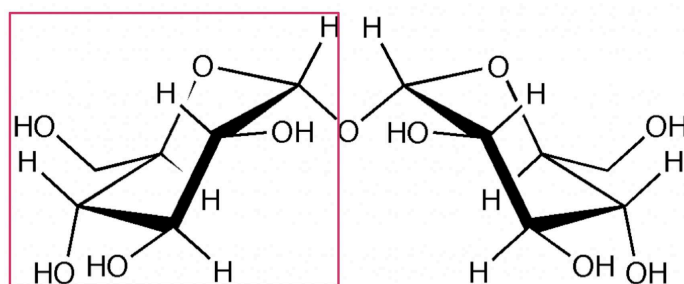


FIGURE 5.9 – Molécule de tréhalose. Encadré en rouge, il s’agit du fragment $C_{12}H_{21}O_{10}$. [56]

TABLE 5.5 – Paramètres des transferts de bradykinine sur les couches de tréhalose.

	Dose totale d’ions [#ions]	Densité d’ions d’ions [ions/cm ²]	Courant [nA]	Temps de transfert
1	$3,03 \cdot 10^{14}$	$6,18 \cdot 10^{16}$	9	1h30
2	$1,13 \cdot 10^{15}$	$2,31 \cdot 10^{17}$	8,4	6h

Différents profils sont réalisés et les spectres de masse mesurés à partir de ces profils sont montrés pour déterminer la présence de la bradykinine et du tréhalose ci-dessous. Les profils sont montrés et analysés plus loin dans la section pour déterminer la composition en profondeur de la couche formée. Pour la réalisation des profils, le courant d’analyse au Bi_5^+ est d’environ $0,07 \text{ pA}$ et le courant d’ Ar_{3000}^+ varie d’un profil à l’autre. Sur les Figures de cette section, chacune représentant une partie de spectre de masse mesurés à partir des profils, les trois premiers spectres de masse correspondent aux transferts de bradykinine d’1h30. Ils sont analysés avec des courants d’ Ar_{3000}^+ de $0,05 \text{ nA}$ pour le premier (orange), $0,5 \text{ nA}$ pour le deuxième (rouge) et 2 nA pour le troisième (bleu). Les deux derniers spectres de masse correspondent au transfert de bradykinine de 6h, et sont analysés avec, respectivement, des courants d’ Ar_{3000}^+ de 1 nA (rose) et 5 nA (vert). L’utilisation de courants plus faibles d’ Ar_{3000}^+ permet de ne pas désorber trop vite la couche de bradykinine afin d’analyser l’interface entre la protéine et le sucre.

Présence du tréhalose et de la bradykinine

Les mêmes signaux pour le tréhalose que ceux de la couche de référence du point 5.3.2, sont représentés aux Figures 5.10 et 5.11. Les signaux des deux fragments de tréhalose ont des intensités supérieures à 10^4 . Ce résultat prouve la bonne construction de la couche de tréhalose. Bien que la couche de sucre soit présente sur le substrat de silicium, les intensités ne sont pas égales sur tous les profils, ceci

étant dû à l'inhomogénéité de la couche de tréhalose formée.

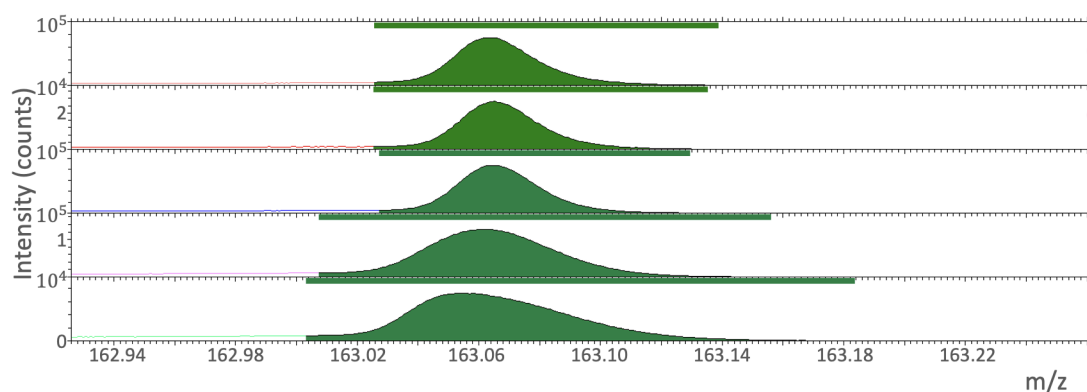


FIGURE 5.10 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_6H_{11}O_5^+$ après le transfert de la bradykinine.

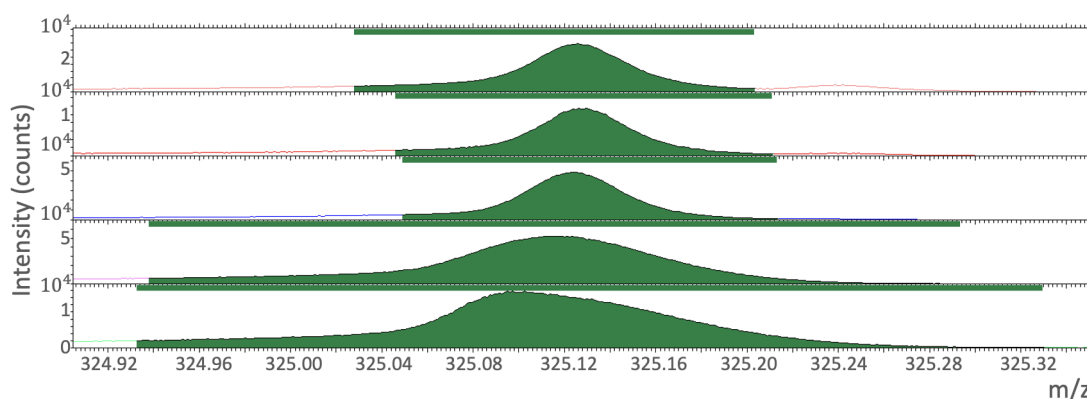


FIGURE 5.11 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_{12}H_{21}O_{10}^+$ après le transfert de la bradykinine.

A la Figure 5.12, des spectres de l'ion moléculaire de la bradykinine sont représentés (présence de plusieurs pics liée à la distribution isotopique disponible en Annexe B). Pour chaque profil, et donc pour chaque transfert, les intensités des signaux enregistrés sont supérieures à celle du signal de l'ion moléculaire de la bradykinine déposée par *spin-coating* sur une surface de référence visible en Annexe à la Figure B.1. De manière qualitative, le bon transfert de bradykinine sur les couches de tréhalose est avancé.

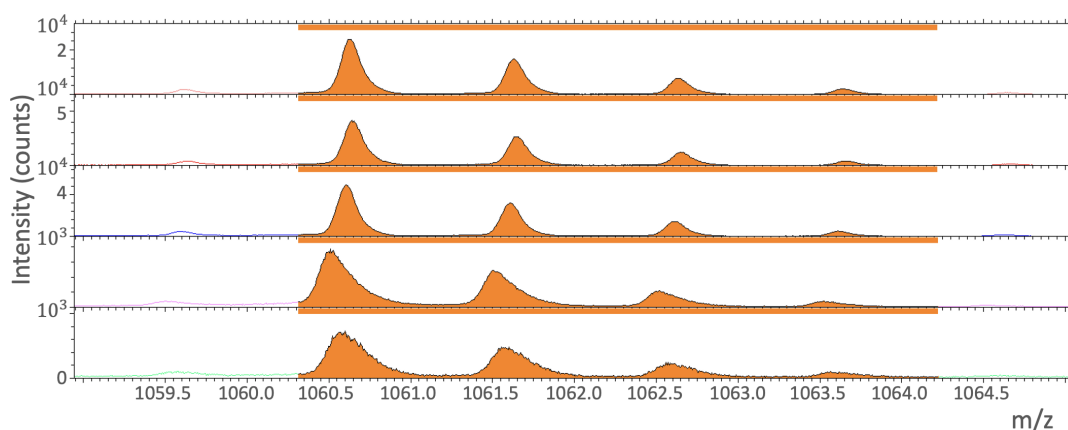


FIGURE 5.12 – Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l’ion moléculaire de la bradykinine après son transfert sur une couche de tréhalose.

Distribution des espèces moléculaires en surface de la couche

Une caractérisation de la surface de la couche de bradykinine et de tréhalose en deux dimensions est réalisée à l’aide de Bi_5^+ accélérés à 30 keV. Sur les Figures 5.13a, 5.13b, 5.13c et 5.13d, les intensités des signaux repris pour représenter chaque partie de la couche (bradykinine, tréhalose et silicium) sont aperçues. Les cartographies montrées dans cette section sont celles des couches de bradykinine et tréhalose dont le transfert a duré 6h et dont les paramètres sont repris à la ligne 2 du tableau 5.5.

La cartographie sur la Figure 5.13b confirme le transfert de la bradykinine sur le collecteur. Afin de s’assurer du transfert de molécules intactes, il faut regarder la Figure 5.13a. La détection du signal de l’ion moléculaire de la bradykinine indique que ce transfert a bien lieu. Attention, il s’agit ici de la surface de l’échantillon qui est analysée et non l’entièreté de la couche. Le signal du sucre est très faible sur toute la surface, ce qui démontre qu’il a bien été recouvert par le transfert de bradykinine. De faibles lignes d’intensités plus fortes pour le signal du sucre sont reportées sur l’image. Elles sont certainement dues à la pince qui a enlevé une fine couche de bradykinine lorsque l’échantillon a été manipulé. C’est également confirmé par les Figures 5.13a et 5.13b où les intensités des signaux sont élevées partout, avec des variations d’intensités qui indiquent que la couche n’est pas homogène, des différences d’épaisseurs semblant apparaître. Le signal du silicium est très faible et semble également indiquer qu’il n’y en a pas sur la couche.

Pour information, les cartographies de l’échantillon avec le transfert de bradykinine d’1h30 sont disponibles en Annexe aux Figures C.1a, C.1b, C.1c et C.1d. Les mêmes informations peuvent être tirées de ces images.

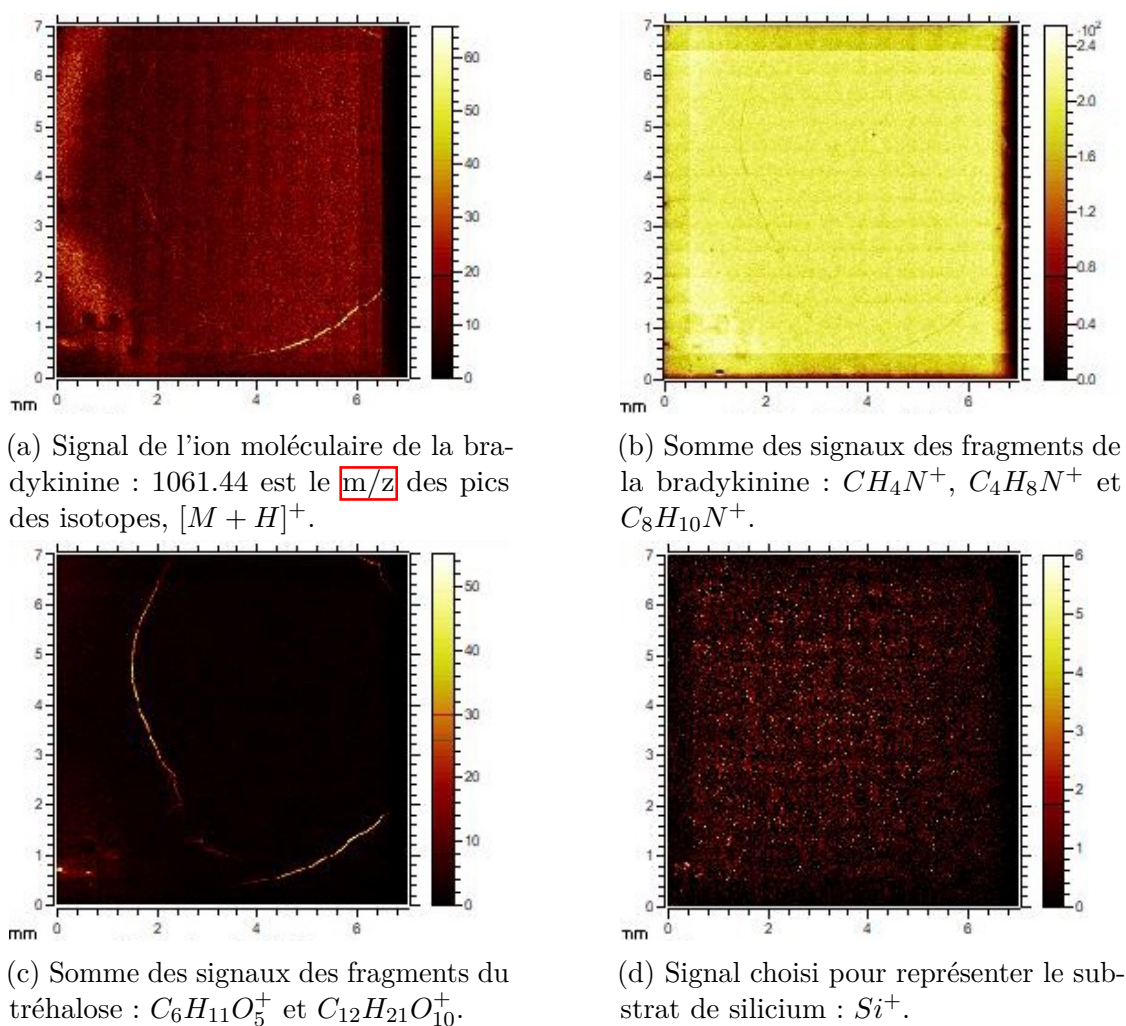


FIGURE 5.13 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 6h.

Disposition des espèces moléculaires en profondeur de la couche

Pour analyser plus spécifiquement la composition et l'organisation chimique de la couche formée sur le substrat de silicium, une analyse en profondeur est nécessaire. Le résultat montré à la Figure 5.14 représente un profil dans l'échantillon sur lequel la bradykinine a été transférée durant six heures. Dans ce cas le courant d'argon utilisé durant l'analyse est élevé. Par conséquent cela érode rapidement la couche de bradykinine déposée par le transfert.

Très vite après le début du profil, la première interface protéine/tréhalose (signaux verts et oranges) est atteinte aux alentours de $4,8 \cdot 10^{14} \text{ ions/cm}^2$, comme cela est

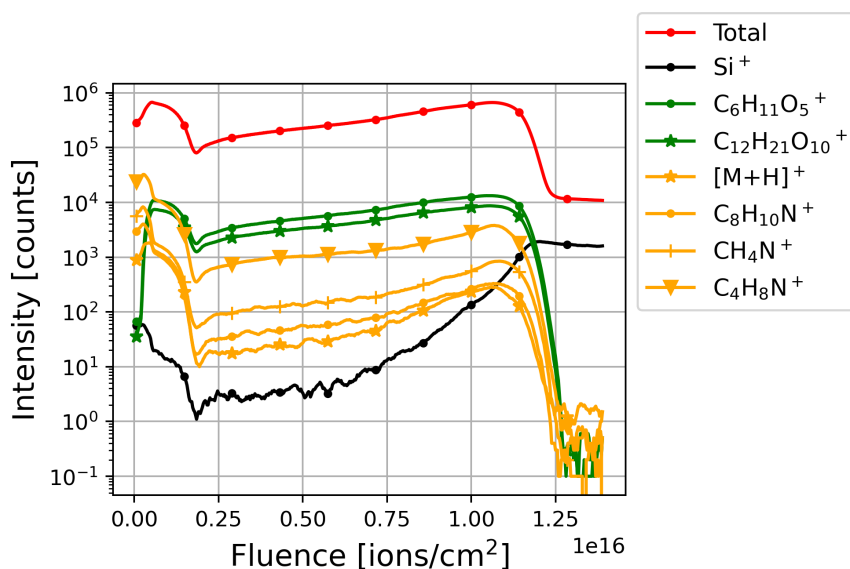


FIGURE 5.14 – Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 5 nA. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En vert : signaux des ions positifs des fragments du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine : $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

observé sur la Figure 5.15. L'intensité des signaux du tréhalose grimpe jusqu'à 10^4 tandis que l'intensité des signaux de la protéine diminue.

Ensuite, un déclin constant du signal de la bradykinine est attendu pour un signal du tréhalose constant. Or ce n'est pas le cas, deux autres effets sont observés.

Le premier effet se situe au niveau d'une densité d'ions légèrement inférieure à $2 \cdot 10^{15} \text{ ions/cm}^2$ et supérieure à $1,5 \cdot 10^{15} \text{ ions/cm}^2$. Un creux est observé dans toutes les courbes. Deux hypothèses peuvent expliquer ce phénomène.

La première pourrait être un défaut de la source d'analyse de Bi_5^+ qui fonctionnerait mal ou qui aurait une baisse de régime ou un arrêt pendant un petit temps, générant une perte d'intensité des ions secondaires émis et ne permettant pas une analyse correcte de la part de l'analyseur. La seconde est l'effet de charges, qui découle de l'accumulation de charges de même signe à la surface. Le sucre n'est pas un électrolyte et ne permet dès lors pas le passage de charge. C'est un inconvénient qui a déjà été rencontré lors de l'analyse de surfaces isolantes. Quand il s'agit d'un faisceau d'ions positifs, l'accumulation des charges positives

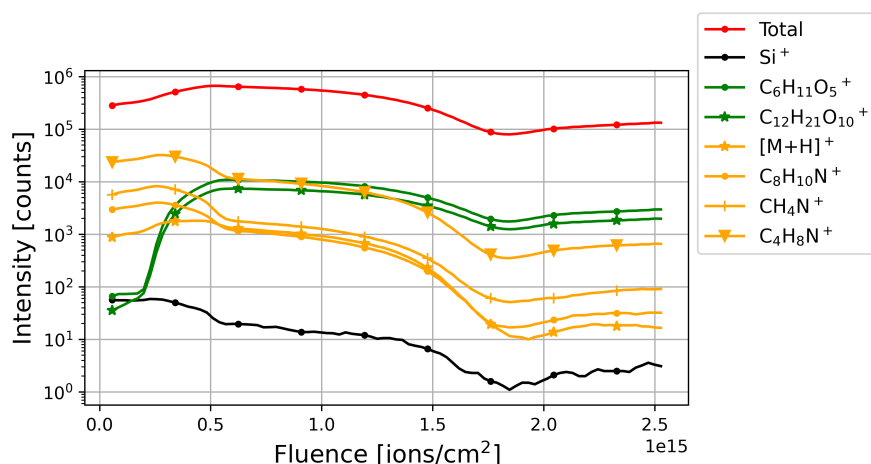


FIGURE 5.15 – Zoom sur la première interface du profil de la Figure 5.14 qui montre la première interface (protéine/sucre).

à la surface et donc le potentiel de la surface augmentent très rapidement (en quelques minutes) de plusieurs centaines de volts. Cela résulte en une énergie cinétique des ions trop élevée pour l'analyseur et donc un spectre de masse imprécis. [42]

Le deuxième effet s'observe par rapport aux signaux représentant les molécules de bradykinine. Après un premier déclin, un plateau est observé suivi d'un deuxième déclin des intensités des signaux qui commence au niveau d'une densité d'ions primaires de $1,2 \cdot 10^{15} \text{ ions/cm}^2$, légèrement avant l'effet de charge qui accentue ce déclin. Par ailleurs, le signal du CH_4N^+ ne remonte jamais au même niveau que ceux atteints par les signaux du sucre après ce deuxième déclin. Une deuxième interface est rencontrée. Ce phénomène s'observe facilement à la Figure 5.15. Finalement, ces signaux suivent la même tendance que les signaux de sucre et augmentent de manière constante. Dès lors, cela pourrait signifier que la protéine ne se dépose pas simplement sur la surface, mais se mélange également à la couche de sucre, peut-être en raison du caractère trop tendre du sucre. Les molécules pulvérisées arrivent sur la surface avec une certaine énergie cinétique qui n'est probablement pas négligeable, lorsqu'elles sont désorbées à l' Ar_{3000}^+ accéléré à 10 keV. [74] Par conséquent, elles pourraient migrer dans la surface lors de leur transfert. D'un autre côté, une réhydratation rapide du tréhalose sur le silicium à température ambiante et à pression atmosphérique est aussi observée. Afin d'y pallier, des manipulations rapides ont été faites pour réaliser le transfert de bradykinine, la caractérisation de ce transfert et le relargage des protéines en solution. Néanmoins, le temps passé à température ambiante peut favoriser un mélange entre les couches de sucre et les protéines de l'échantillon. Les intensités détectées révèlent tout de

même que la protéine est présente en moins grande quantité dans cette couche de tréhalose. La Figure 5.16 représente la situation décrite. A la surface, le dépôt de protéine a recouvert tout le collecteur et une couche uniquement composée de protéines est formée. La deuxième couche est constituée de sucre et de protéines qui ont eu l'occasion de migrer à travers la couche de tréhalose. La composition de la troisième couche n'est pas précise. Un signal pour la bradykinine a encore une intensité élevée alors que celles des trois autres signaux de la bradykinine ont considérablement diminué. L'intensité du signal du sucre est toujours la plus élevée. En outre, après l'effet de charge, les intensités des signaux du sucre et de la bradykinine remontent à des valeurs non négligeables. Cela laisse sous-entendre un gradient de la concentration de bradykinine à travers la deuxième et la troisième couche. Finalement, la quatrième couche est le substrat de silicium.



FIGURE 5.16 – Schéma de la couche formée par le transfert de bradykinine (protéine) sur tréhalose (sucre) sublimé sur silicium (substrat). Les proportions montrées sont à titre indicatif.

L'analyse du signal (noir) est à présent discutée. Pour les plus petites valeurs de densité d'ions, il semble suivre l'allure des signaux de la protéine avant de se stabiliser jusqu'à $0,75 \cdot 10^{16} \text{ ions/cm}^2$. Ce début de courbe montre qu'un léger transfert de silicium du substrat cible au collecteur (silicium avec une couche de tréhalose sublimé) a probablement lieu. En effet, il est plausible que ce transfert se fasse quand le faisceau d'argon a atteint la fin de la couche de bradykinine sur la cible, mais que le transfert n'est pas terminé. Cela risque d'arriver si l'endroit (ou en partie) de frappe a déjà été visé lors d'un précédent transfert entraînant une couche de protéines moins épaisse en cet endroit. Cela laisse moins de possibilités de pulvérisations de protéines. Cela peut aussi être dû à une couche initialement moins épaisse en cet endroit. En effet, la cible n'est pas homogène sur tout le substrat de silicium, car en séchant, la protéine a tendance à se concentrer en un endroit et à constituer différentes épaisseurs. Ensuite, bien que lors des expériences, le faisceau d'ions primaires soit correctement placé pour viser l'endroit où la couche de protéine est épaisse, des imprécisions liées aux limites de l'oeil humain peuvent influencer la visée.

Finalement, le signal du silicium remonte et la seconde interface est atteinte pour des doses d'ions comprises entre 1 et $1,25 \cdot 10^{16} \text{ ions/cm}^2$ avant d'une nouvelle fois

se stabiliser quand il ne reste plus rien à part le silicium. Juste avant sa stabilisation, les signaux du sucre et de la protéine diminuent fortement jusqu'à s'annuler. Toute la couche de protéine et de sucre est traversée, et la troisième interface est atteinte (sucre (et protéine)/silicium).

Cependant, aucun signal de silicium n'est détecté sur la cartographie qui lui est propre au point précédent. Dans les spectres, aucun pic n'est montré à la place de celui du silicium. En outre, un pic différent est aperçu dans le voisinage de celui du silicium. Dans le spectre de masse, il se situe à un m/z autour de 28. Il est possible qu'il s'agisse du CH_2N^+ , un fragment de bradykinine, et qu'il y ait une contribution de ce pic organique sur le signal du silicium lorsque son intensité est très faible. Ceci mène alors au résultat observé en début de profil bien qu'aucun silicium ne soit réellement détecté. Cette hypothèse est la plus probable.

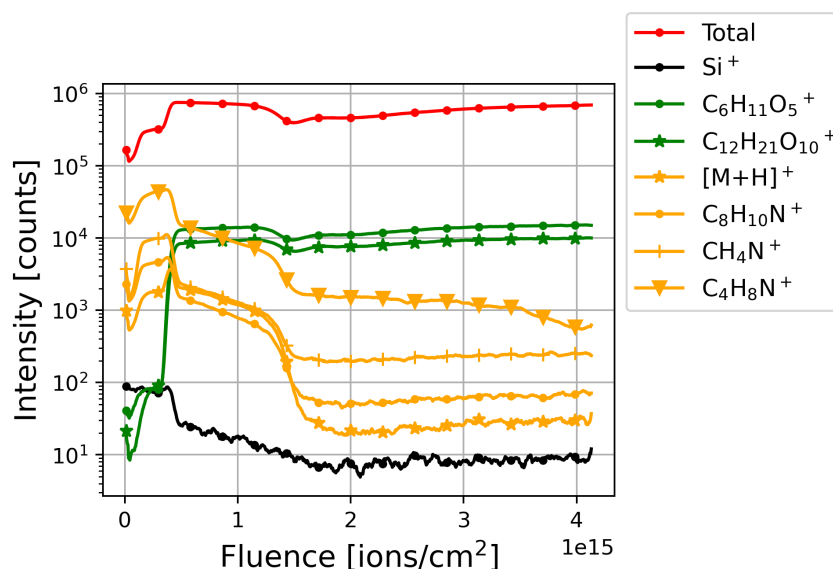


FIGURE 5.17 – Second profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 1 nA. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En vert : signaux des ions positifs des fragments du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine : $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

Afin de confirmer l'apparence générale observée dans ce profil (Figure 5.14), une autre analyse en profondeur est réalisée dans la couche de l'échantillon, disponible à la Figure 5.17. Le profil n'atteint pas le silicium, car l'analyse se concentre sur l'étude de la première interface et sur le comportement des protéines aux alentours de cette première interface. Ces deux éléments sont visibles à la Figure 5.17. D'abord, une

densité d'ions très proche à celle de l'exemple précédent est nécessaire pour atteindre la première interface, soit environ $4,8 \cdot 10^{14} \text{ ions/cm}^2$. Cette légère différence peut à nouveau se justifier par l'inhomogénéité de la couche de bradykinine. Malgré une émission dirigée (vers l'avant quand l'angle d'incidence est supérieur ou égal à 15° , point 2.4.3) des molécules émises, la disposition sur l'échantillon des molécules n'est pas contrôlée et forme un gradient. Ensuite, le deuxième déclin des intensités des signaux débute vers une densité d'ions de $1,2 \cdot 10^{15}$ avant le premier effet observé sur le profil précédent qui est présent aux alentours de $1,5 \cdot 10^{15} \text{ ions/cm}^2$ bien que moins marqué que précédemment. Le phénomène observé pour le silicium est le même que celui du profil précédent. Enfin, les intensités des signaux des deux Figures 5.14 et 5.17 sont semblables, ce qui signifie que les proportions sont semblables aussi en prenant en considération qu'il s'agit du même échantillon qui a été préparé et analysé dans les mêmes conditions.

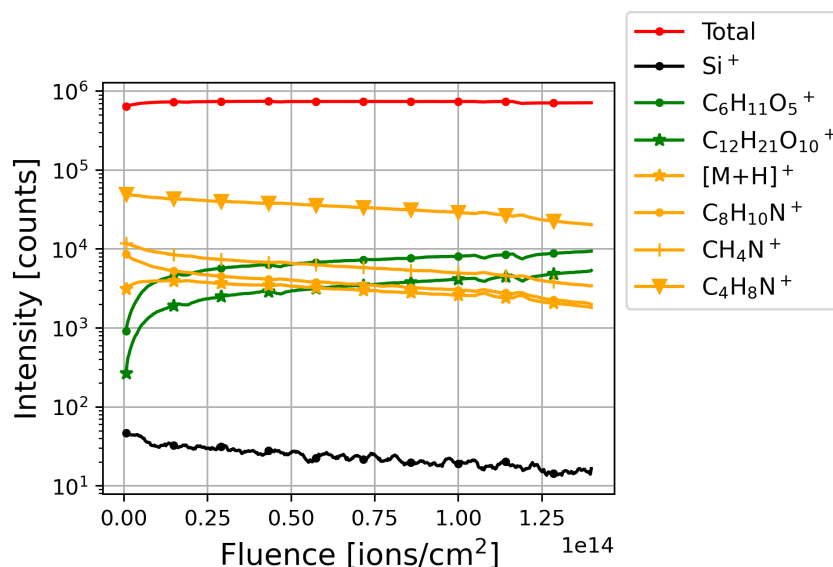


FIGURE 5.18 – Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 1h30) à l' Ar_{3000}^+ avec un courant de $0,05 \text{ nA}$. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En vert : signaux des ions positifs des fragments du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine : $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

Concernant l'échantillon dont les conditions de transfert sont reprises à la ligne 1 du tableau 5.5, une première couche de protéines moins épaisse que celle de l'échantillon précédent est prévisible. Par conséquent, un courant d' Ar_{3000}^+ initialement plus faible a permis de construire le profil suivant, illustré à la Figure 5.18. Des

densités d'ions comprises entre 2 et $5 \cdot 10^{13} \text{ ions/cm}^2$ permettent de parvenir à la première interface, soit des doses dix fois plus petites. Ce résultat est en cohérence avec celui attendu.

Le signal du silicium est également légèrement détecté dans le profil de cet échantillon, mais son intensité est moins élevée au départ. Tout comme précédemment, son signal suit l'allure de ceux de la protéine. Avec un temps de transfert aussi court, cela est étonnant d'avoir transféré du silicium. Par ailleurs, aucune incohérence n'est détectée dans l'estimation des masses transférées de bradykinine sur les films de **PE** pour ces temps de transfert et ces densités d'ions primaires. En outre, la présence du pic à un **m/z** de 28 est aussi marquée dans cet échantillon. Ceci confirme encore plus la dernière hypothèse concernant le silicium pour le premier profil.

Tous les profils ne sont pas montrés dans cette section, car les mêmes constations peuvent en être tirées.

Epaisseur de la couche

Des tentatives de mesure de l'épaisseur de la couche de tréhalose sublimé sont effectuées avec le profilomètre. Malheureusement, le sucre formant une couche trop malléable, la pointe de l'appareil y passe à travers pour atteindre directement le substrat de silicium bien plus rigide. Cela empêche de détecter un changement de hauteur dans la surface après y avoir fait une rayure à l'aide d'un cutter.

D'autres techniques (ellipsométrie, microscopie à force atomique ou réflectrométrie) existent pour réaliser la mesure d'épaisseur. Néanmoins, elles débordent du champ et des objectifs de ce mémoire et ont été abandonnées au profit des objectifs essentiels de ce mémoire.

Une approximation pour estimer l'épaisseur de la couche de tréhalose est réalisée grâce à de précédentes mesures. Suite à un profil d'une couche de polypropylène réalisé à l'aide du **ToF-SIMS** au laboratoire Bio- and Soft Matter (BSMA) à l'Université Catholique de Louvain, le cratère laissé par l' Ar_{3000}^+ accéléré à 10 keV et une densité d'ions de $10^{16} \text{ ions/cm}^2$ pour arriver jusqu'au substrat solide a pu être défini via le profilomètre. Cette couche était épaisse de $3 \mu\text{m}$. Par simple règle de trois, l'épaisseur de notre couche de tréhalose et de bradykinine transférée pendant 6h est déterminée à partir de la densité d'ions primaires nécessaire pour atteindre le silicium de cette couche. Le profil a été réalisé avec un courant d' Ar_{3000}^+ de 5 nA , et la densité d'ions primaires pour parvenir au **Si** était de $1,20 \cdot 10^{16} \text{ ions/cm}^2$, Figure 5.14. La couche de tréhalose avec un transfert de bradykinine de 6h et un courant d' Ar_{3000}^+ de transfert de $8,4 \text{ nA}$ est estimée à $3,6 \mu\text{m}$. Cette estimation est très approximative. Les deux matériaux ne réagissent très probablement pas de la

même manière à un même faisceau d'ions qui les bombarde.

5.3.4 Caractérisation des couches de tréhalose après le relargage de la bradykinine

Le but de la création de la couche de tréhalose est le relargage facile des protéines de bradykinine en solution, car le sucre se solubilise. Pour récupérer le tréhalose et la bradykinine, une goutte de 100 μL d'eau pure (H_2O) est déposée distinctement à deux reprises sur l'échantillon pendant une minute. Chaque goutte est ensuite récupérée avec la pipette, et les échantillons sont séchés au flux d'azote, N_2 . La suite de cette section a pour objectif de découvrir si les deux couches qui résultent de la manipulation décrite ci-avant ont bien disparu de la surface du silicium après prélèvement. Tandis que la solution récupérée est analysée à la Section 5.6. Une nouvelle fois, les profils dont les spectres sont montrés aux prochaines figures ont été réalisés avec un courant de Bi_5^+ accéléré à 30 keV de 0,07 pA et un courant d' Ar_{3000}^+ accéléré à 10 keV de 50 pA . Dans chacune des figures, les deux premiers spectres mesurés à partir des profils (bleu et rose) font référence au transfert de bradykinine d'1h30 et les deux derniers (rouge et vert) au transfert de bradykinine de 6h.

Absence de la bradykinine et du tréhalose

En comparant les intensités des signaux sur les spectres de masse des Figures 5.19, 5.20 et 5.21 avec les Figures 5.10, 5.11 et 5.12, il est flagrant de remarquer qu'elles ont considérablement diminué. Une différence de trois ordres de grandeurs (parfois plus) est observée. La technique utilisée pour enlever ces deux couches est donc fonctionnelle. Un léger signal de l'ion moléculaire est tout de même détecté. Il est possible que le temps de dépôt de chaque goutte laisse l'opportunité aux molécules de bradykinine de se réadsorber sur le silicium nu.

Distribution des espèces moléculaires en surface de la couche

Les mêmes cartographies en deux dimensions de la surface de l'échantillon sont refaites grâce au ToF-SIMS et à son faisceau de Bi_5^+ après la solubilisation du sucre et de la protéine dans l'eau, Figures 5.22a, 5.22b, 5.22c et 5.22d.

La première cartographie, Figure 5.22c, ne reflète pas beaucoup de couleur, ce qui signifie que très peu de signal est détecté. Dès lors, cela confirme le résultat du point précédent : les molécules entières sont bien relarguées en solution et ont quasiment disparu de la surface de silicium ; au contraire, les fragments de bradykinine sont encore présents, l'intensité de leur signal par rapport à celles des autres pics choisis

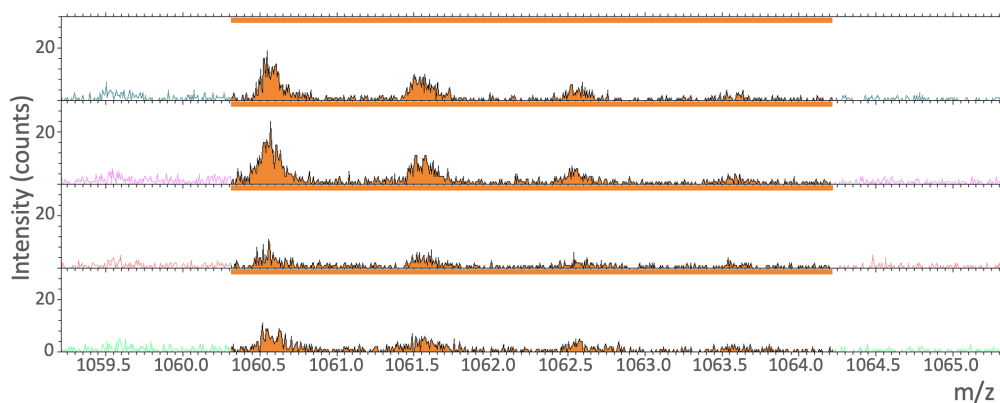


FIGURE 5.19 – Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l’ion moléculaire de la bradykinine après le relargage des protéines et du sucre en solution.

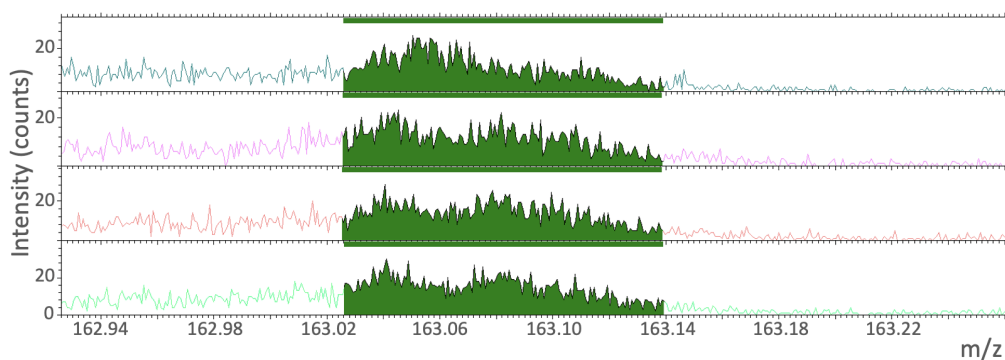


FIGURE 5.20 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_6H_{11}O_5^+$ après le relargage des protéines et du sucre en solution.

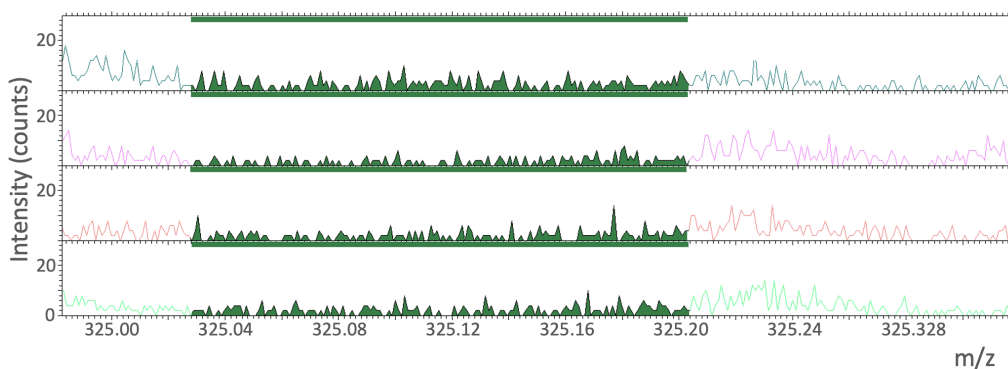


FIGURE 5.21 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_{12}H_{21}O_{10}^+$ après le relargage des protéines et du sucre en solution.

étant très haute.

Concernant le sucre, les deux signaux des pics choisis pour représenter le tréhalose sont à peine visibles, excepté dans le coin inférieur droit de la surface. Le tréhalose pourrait être presque entièrement recouvert des fragments de protéine encore présents sur l'échantillon. Avec cette seule cartographie, rien n'indique qu'il ait complètement disparu. Seuls les profils réalisés dans la prochaine section peuvent confirmer ou infirmer le résultat décrit au point précédent. L'intensité du signal légèrement plus élevée dans le coin inférieur droit est potentiellement due à une mauvaise récupération de la goutte d'eau en cet endroit, laissant du sucre présent sur la surface après le séchage. Il est somme toute logique d'apercevoir une faible intensité de signal du silicium en raison de la présence probable de fragments de protéines non correctement récupérés.

Pour l'échantillon où le transfert de bradykinine a duré 1h30, les cartographies sont disponibles en Annexe aux Figures C.2a, C.2b, C.2c et C.2d. Les mêmes remarques peuvent être faites à partir de cet échantillon.

Distribution des espèces moléculaires en profondeur de la couche

Afin de caractériser en profondeur la couche laissée après les deux gouttes d'eau sur la surface du silicium, plusieurs nouveaux profils sont construits. Seulement un profil pour chaque échantillon est présenté, car les informations données par les autres profils mènent aux mêmes déductions. Ils sont réalisés avec un courant de Bi_5^+ accéléré à 30 keV de 0,07 pA et un courant d' Ar_{3000}^+ accéléré à 10 keV de 50 pA .

Le comportement à travers le profil est le même pour les deux échantillons, Figures 5.23 et 5.24. A la surface, les intensités des signaux des fragments de protéines sont encore intenses; alors que celles du tréhalose et de l'ion moléculaire sont faibles, et voire inférieures à celle du silicium. Cela ne signifie nullement que tout a été relargué en solution, mais à nouveau, cette observation confirme le succès du relargage en grande partie de molécules entières de bradykinine et du sucre, mais ne confirme pas celui du relargage des fragments de la bradykinine.

L'interface entre les fragments restants et le silicium arrive rapidement. Une dose d'ions plus faible que celle des profils de la section précédente permet d'y parvenir. Ceci signifie que la couche restante est plus mince. Après une densité d'ions Ar_{3000}^+ comprise entre 2, $5 \cdot 10^{12}$ et 7, $5 \cdot 10^{12}$ $ions/cm^2$, le silicium est atteint. Son signal se stabilise à une intensité de 10^4 . Tandis que les intensités des signaux des fragments de bradykinine ne cessent de diminuer, celles du tréhalose et de l'ion moléculaire sont déjà presque nulles.

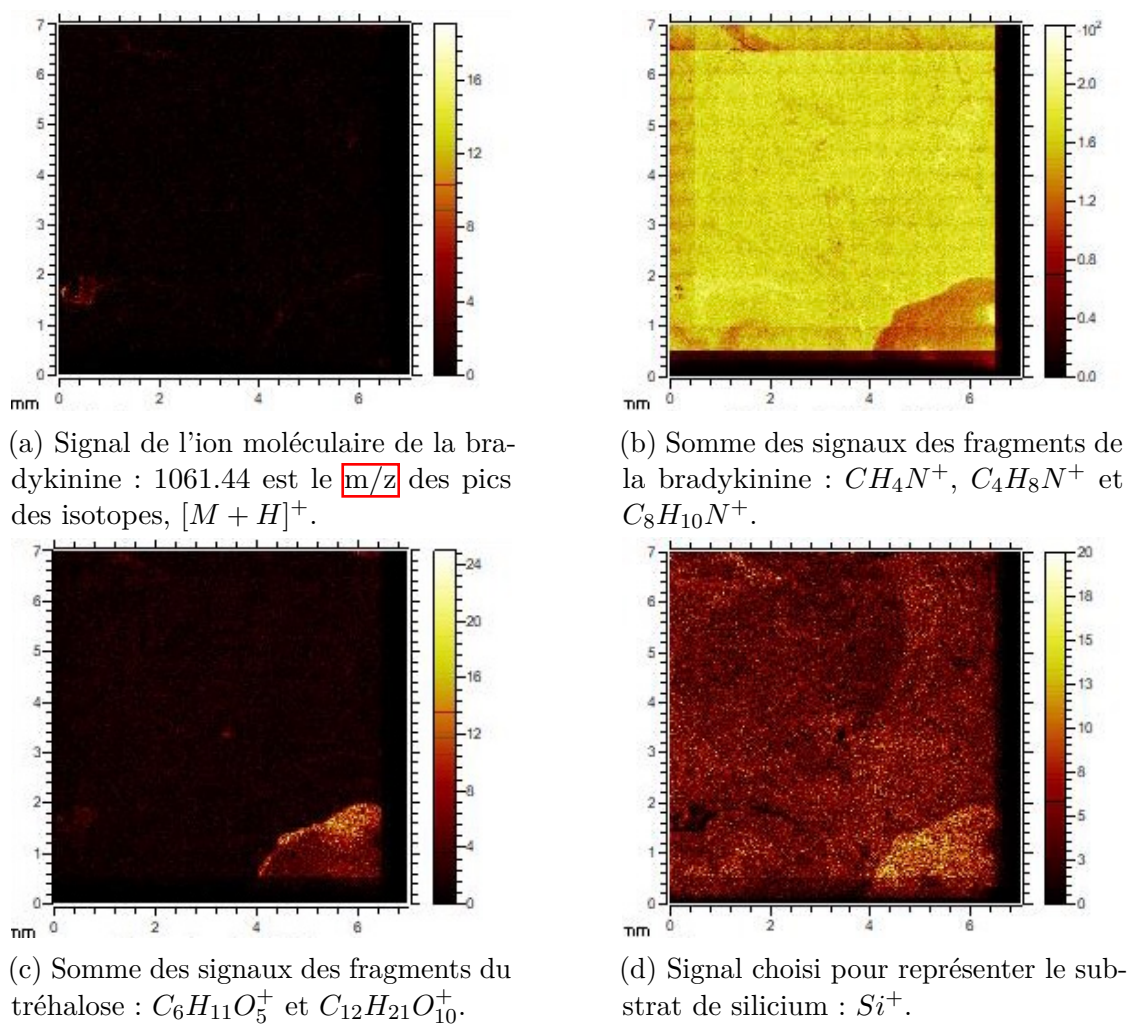


FIGURE 5.22 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 6h, après solubilisation.

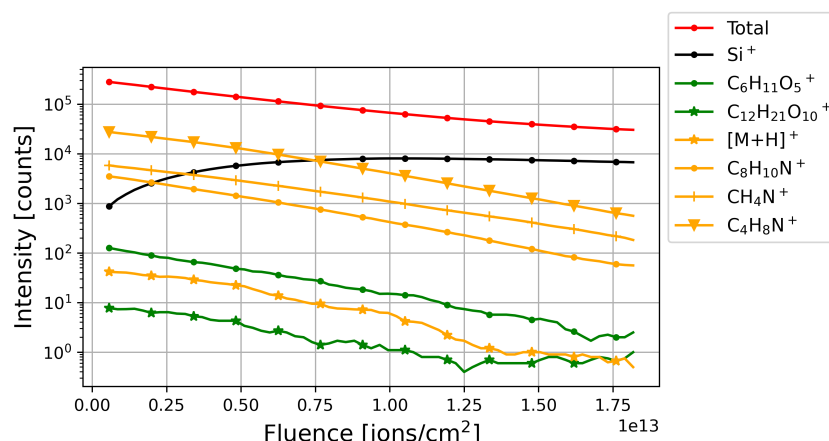


FIGURE 5.23 – Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 6h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 50 pA après solubilisation de l'échantillon. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En vert : signaux des ions positifs des fragments du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine : $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

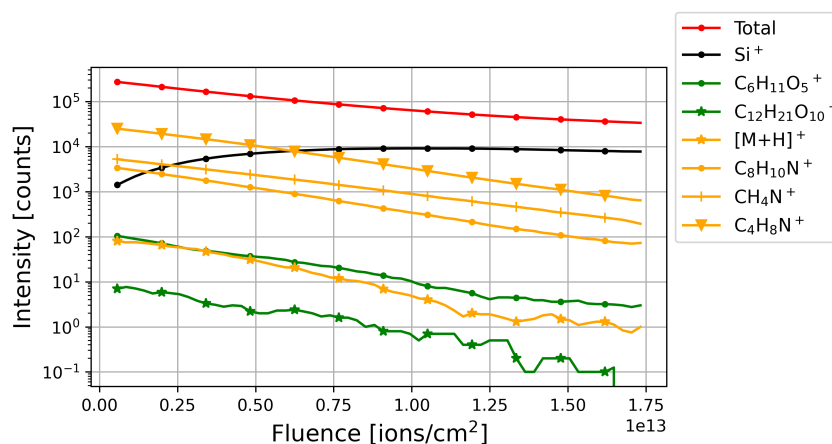


FIGURE 5.24 – Profil dans la couche de tréhalose et bradykinine (transfert de 1h30) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 50 pA après solubilisation de l'échantillon. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En vert : signaux des ions positifs des fragments du tréhalose, $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine : $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

5.4 Transfert de bradykinine sur une couche de PEG

Cette section présente la même structure que la Section 5.3, relative au transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose. Dans ce cas-ci, les résultats obtenus avec la construction d'une couche de polyéthylène glycol sont discutés.

5.4.1 Création de la couche de PEG

La couche de polyéthylène glycol terminée par un thiol $-SH$ est créée par la méthode *grafting-to*. Une réaction chimique entre le groupe fonctionnel du polymère et un groupe fonctionnel complémentaire sur la surface mène à un lien covalent entre les deux groupes. La formation simultanée de plusieurs liens engendre la couche voulue. Les couches sont généralement de faible épaisseur, car les nouvelles molécules cherchant à venir se greffer à la surface doivent préalablement traverser la couche déjà formée par les molécules précédentes. À mesure que la couche s'épaissit, les dernières molécules ont de plus en plus de difficulté à la traverser jusqu'à ne plus y parvenir, limitant de la sorte l'épaisseur de la couche. La couche créée est appelée Self-Assembled Monolayers (SAM) ou monocouche auto-assemblée de molécules avec groupement fonctionnel. À partir d'une solution aqueuse ou en phase gazeuse, le groupement de tête thiol se lie à l'or, et le groupement fonctionnel est dirigé vers l'extérieur de la surface. Le résultat attendu est reproduit à la Figure 5.25. 75 76

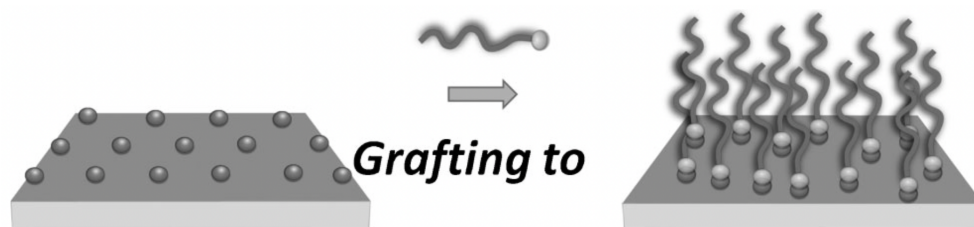


FIGURE 5.25 – Construction d'une couche de polymère par méthode *grafting-to*. 75

Les couches de PEG terminées par un thiol sont réalisées à partir de solutions aqueuses de 5, 10 et 20 g/L. Trois échantillons (un dans chacune des solutions de concentration différente) baignent dans la solution pendant 30 minutes tandis que trois autres (un dans chacune des solutions de concentration différente) baignent durant une nuit entière. Ensuite, ils sont rincés à l'eau et séchés au flux d'azote N_2 .

5.4.2 Caractérisation des couches de PEG avant le transfert de bradykinine

Avant de construire les couches de polyéthylène glycol, les résultats en termes de couche ne sont pas prévisibles. Il y a donc un intérêt à caractériser les couches grâce à la spectroscopie à rayons-X. Pour réaliser les couches, six substrats de silicium recouverts d'or sont plongés dans des bains de solution de PEG de différentes concentrations (5, 10 et 20 g/L) pendant 30 minutes ou durant toute une nuit (tableau 5.8).

TABLE 5.6 – Temps d'immersion des substrats de silicium recouverts d'or dans des solutions de PEG de concentrations différentes.

	Temps	Concentration [g/L]
1	Nuit	5
2	Nuit	10
3	Nuit	20
4	30min	5
5	30min	10
6	30min	20

Après analyse par XPS de ces six surfaces, il est possible d'établir la proportion des éléments atomiques les plus importants (O, C, S et Au) ainsi que celle de chacun de leur état chimique. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau D.1 en Annexe. Pour obtenir cette quantification, il y a lieu de se baser sur le pic du spectre XPS le plus intense et la pondération se fait grâce au facteur de sensibilité de l'élément correspondant à ce pic. Dans le calcul des pourcentages, la quantité d'hydrogène n'est pas prise en compte, car il n'est pas détectable par XPS. L'oxygène est présent entre 21 et 24 % dans les échantillons. Son pic O 1s est relativement symétrique et sa position correspond à celle de l'oxygène organique (lié à du carbone). Il est donc supposé que l'oxygène est lié à deux carbones (C-O-C), car la seule source d'oxygène provient des molécules de PEG (structure 3.3). Cependant, cela peut aussi être une liaison de type C=O. En outre, une légère asymétrie présente dans le pic indique que d'autres espèces sont présentes en légère minorité. La présence du carbone est plus élevée (entre 41 et 47 %) car il compose en plus grand nombre les chaînes de PEG. De plus, les contaminations de surface qui peuvent s'y attacher sont majoritairement organiques. Dans ce pourcentage, deux types de liaisons du carbone sont majoritaires. Le carbone lié à un oxygène est la plus importante contribution, suivie par les carbones liés uniquement à d'autres carbones ou à des hydrogènes. Le très faible pourcentage des autres liaisons autorise à les considérer comme négligeables. Le soufre de la fonction thiol constitue entre

4,5 et 6,5 %. Pour s'assurer de la construction d'une couche correcte, c'est le pourcentage de soufre lié à l'or qui importe (entre 2,3 et 3 %). Finalement, le pourcentage de l'or détecté est compris entre 22 et 32 %. L'or lié au soufre ne peut pas être distingué de l'or métallique en raison de la quantité trop importante de ce dernier. Ces pourcentages permettent de dire qu'il est encore visible entre 20 et 30 %. En conséquence, la couche formée n'est pas homogène.

TABLE 5.7 – Rapport entre les proportions des liaisons C-O et l'or au sein d'un même échantillon. Les numéros correspondent aux échantillons du tableau 5.8.

	C-O/Au
1	1,07
2	1,12
3	1,22
4	0,98
5	0,82
6	0,94

Au vu des résultats des tableaux D.1, 5.7 et D.2, on remarque qu'aucun échantillon ne ressort du lot et n'est réellement mieux construit qu'un autre. En considérant que le pourcentage de liaison C-O appartient uniquement au PEG (bien qu'il doive certainement y avoir un peu de contamination), le ratio repris dans le tableau 5.7 permet d'affirmer ce qui a été remarqué. Il semble que la concentration de la solution de PEG et le temps n'aient pas d'impact sur la composition de la couche ou très peu. Néanmoins, confirmer cette supposition avec certitude n'est pas possible, car une diversification de ces paramètres n'a pas été recherchée. De plus, il semble que la couche construite ne soit épaisse que de quelques nanomètres. Cette valeur est une estimation suite à la comparaison de couches similaires étudiées par XPS au laboratoire BSMA de l'Université catholique de Louvain. Seuls les 5 à 10 nm de la surface sont sondés par XPS. Si la couche de PEG était uniforme et épaisse de 5 nm, l'or n'aurait pas été détecté. L'objectif dans lequel s'inscrit cette partie est le relargage plus facile des protéines en solution. Dès lors, il est nul besoin de connaître avec certitude l'épaisseur de la couche ni d'avoir besoin qu'elle soit très épaisse pour continuer l'expérimentation.

La suite des expérimentations est réalisée avec des substrats de silicium plongés 30 minutes dans une concentration à 20 g/L de PEG, car la reproductibilité du temps est plus simple. En outre, bien que le ratio C-O/Au soit légèrement plus bas que celui de l'échantillon réalisé avec la concentration à 5 g/L pour le même temps, il a une proportion de soufre lié à l'or plus élevée. Cela signifie probablement que bien que la quantité totale de PEG soit moindre, la proportion de PEG correctement lié

à l'or métallique est plus grande. En conséquence, la couche serait mieux construite, avec moins de proportion de **PEG** entremêlés aux autres **PEG** attachés à la surface et sans avoir réagi avec la surface. Dans cet échantillon, la proportion de liaisons C-O est égale à 26,9 %. En considérant que les liaisons appartiennent au **PEG**, 13,45 % de l'oxygène provient du **PEG** qui constitue $13,45 + 26,9 = 40,35\%$ de la surface. Il semble que le reste de la composition de la surface soit des contaminations organiques ou de l'or encore visible. Les pics du carbone et de l'oxygène de cet échantillon sont disponibles en Annexes aux Figures **D.1a** et **D.1b**, et permettent d'illustrer les pourcentages de ces éléments le constituant.

Après la caractérisation par **XPS**, un échantillon construit avec les conditions d'immersion du paragraphe précédent est analysé par **ToF-SIMS** et deux pics sont choisis à partir du spectre de masse pour caractériser le **PEG** : CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$, affichés aux Figures **5.26** et **5.27**. Le pic du CH_3O^+ est aperçu à gauche du pic du $C_2H_5O^+$ à un m/z de 44,98. Ce pic est asymétrique car il y a aussi une contribution du CHO_2^+ . Les deux ions choisis sont petits, et sont souvent présents en surface en tant que contamination. Les intensités de ces ions sur les échantillons comparées à celles récupérées sur le spectre d'une surface d'or de référence indique qu'ils sont présents en plus grande proportion dans les échantillons sur lesquels la couche de **PEG** est formée. La création de la couche de **PEG** est confirmée.

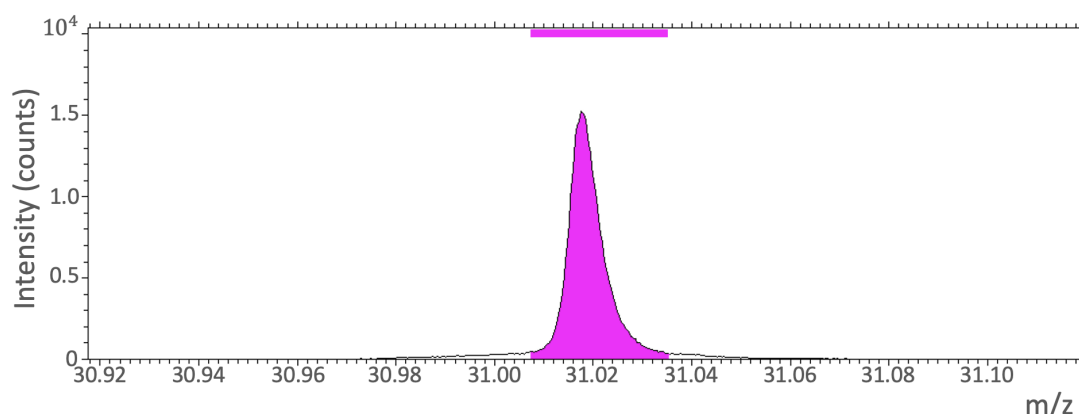
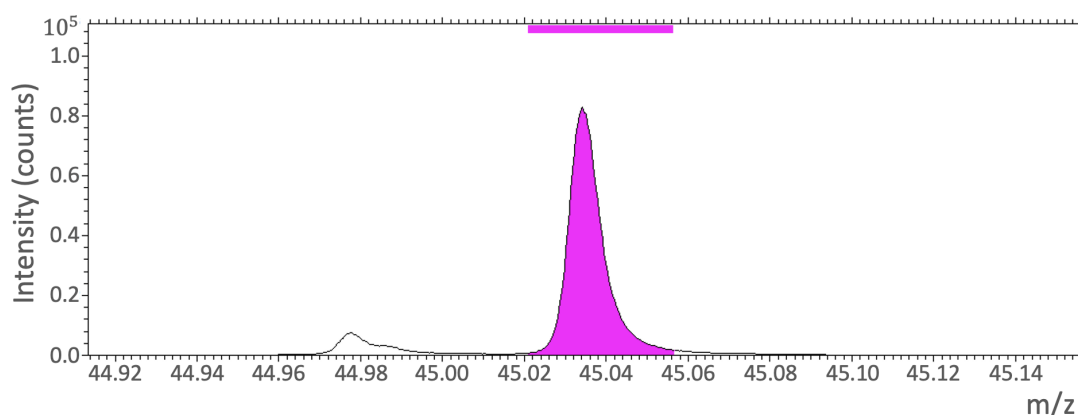


FIGURE 5.26 – Spectre de masse illustrant le pic du CH_3O^+ .


 FIGURE 5.27 – Spectre de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$.

5.4.3 Caractérisation des couches de PEG après le transfert de bradykinine

Comme avec le tréhalose, deux transferts de bradykinine sont effectués sur les couches de PEG avec des temps de transfert différents pour atteindre des doses d'ions primaires différentes dans les mêmes conditions. Pour ces transferts, c'est un faisceau d' Ar_{3000}^+ à 10 keV qui bombarde la cible. Les autres paramètres sont résumés dans le tableau 5.8. Différents profils sont réalisés sur les échantillons après le transfert de la bradykinine. Ils sont créés avec des courants de Bi_5^+ accélérés à 30 keV de 0,07 pA. Sur chacune des Figures (5.28, 5.29 et 5.30) représentant plusieurs fois la même partie de spectre de masse mesurés à partir des profils réalisés, les deux premiers spectres de masse (bleu clair et gris) représentés correspondent aux profils de l'échantillon dont le transfert de bradykinine a duré 1h. Des courants d' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV de 62,9 pA et 50 pA permettent la création des premier et deuxième profils respectivement. Les trois spectres de masse suivants (rouge, vert et bleu foncé) correspondent aux profils de l'échantillon pour lequel le transfert de bradykinine a duré 3h. Ils sont construits avec un courant d' Ar_{3000}^+ de 62,9 pA.

TABLE 5.8 – Paramètres des transferts de la bradykinine sur les couches de PEG.

	Dose totale d'ions [#ions]	Densité d'ions d'ions [ions/cm ²]	Courant [nA]	Temps de transfert
1	$1,84.10^{14}$	$3,76.10^{16}$	8,2	1h
2	$5,59.10^{14}$	$1,14.10^{17}$	8,3	3h

Présence de la bradykinine et du PEG

Les Figures 5.28 et 5.29 reprennent la même partie des spectres de masse enregistrés sur les cinq profils que celle des Figures 5.26 et 5.27. D'un côté, les intensités des signaux observées sur ces Figures prouvent une nouvelle fois la bonne construction de la couche de PEG. De l'autre côté, les différences d'intensités observées entre les pics d'un même élément de l'échantillon indiquent un certain degré d'inhomogénéité présent dans la couche.

Sur les Figures 5.28 et 5.29, deux pics en plus de ceux des fragments choisis pour illustrer le tréhalose sont visibles. A droite du CH_3O^+ , on aperçoit celui du CH_5N^+ , tandis qu'à droite du $C_2H_5O^+$, c'est celui du $CH_5N_2^+$. Ce sont certainement deux pics de fragments de la bradykinine.

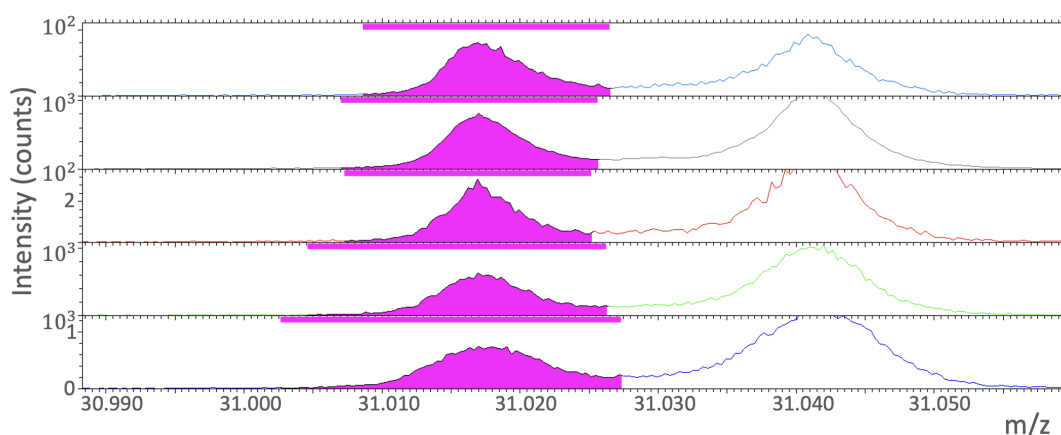


FIGURE 5.28 – Spectres de masse illustrant le pic du CH_3O^+ après le transfert de la bradykinine.

Afin de vérifier la qualité du transfert de bradykinine, le spectre du pic de l'ion moléculaire de la protéine repris sur la Figure 5.30 est comparé à celui obtenu sur une surface de référence (disponible à la Figure 5.12 en Annexe). A l'issue de cette comparaison, l'intensité du pic de l'ion moléculaire mesurée confirme le bon transfert de molécules entières de bradykinine sur la couche de PEG.

Distribution des espèces moléculaires en surface de la couche

La caractérisation de surface (en deux dimensions) de l'échantillon nécessite l'utilisation du faisceau de Bi_5^+ accélérés à 10 keV. Les mêmes signaux (celui de l'ion moléculaire, ceux de certains fragments de la protéine et celui du silicium) que ceux choisis lors de la caractérisation des échantillons avec une couche de tréhalose

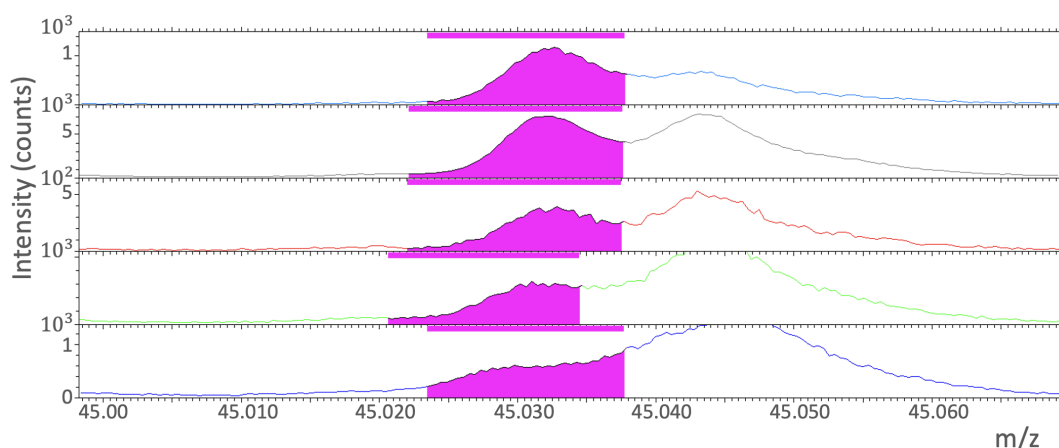


FIGURE 5.29 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$ après le transfert de la bradykinine.

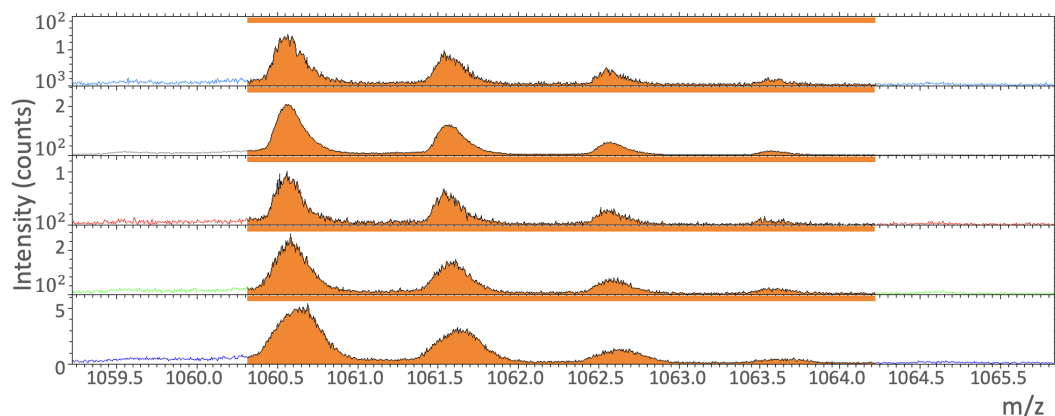


FIGURE 5.30 – Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après son transfert sur une couche de **PEG**.

sont choisis en vue de garder une certaine constance dans la présentation des résultats. Les signaux du **PEG** (Figure 5.31c) sont ceux choisis au point précédent. Finalement, deux derniers signaux sont choisis pour représenter l'or : Au^+ et Au_3^+ . Les cartographies de chaque élément constituant la couche sont disponibles aux Figures 5.31a, 5.31b, 5.31c, 5.31d et 5.31e.

En se basant sur les résultats avec la couche de tréhalose, la détection des signaux de **PEG** ou de l'or n'est pas attendue, mais la détection d'intensités plus élevées pour les signaux de la bradykinine est souhaitée. En analysant les cartographies, le même résultat est bien retrouvé. Les intensités des signaux pour l'or et le **PEG**

sont très faibles. Tandis que celles des fragments de la bradykinine sont élevées. Le transfert de la protéine est confirmé. Afin de déterminer si des molécules entières sont également transférées, il faut regarder la cartographie de l'ion moléculaire (Figure 5.31a). Bien que l'intensité du signal de l'ion moléculaire soit bien inférieure à celle de la somme des fragments de la bradykinine (Figure 5.31b), une légère quantité est détectée et en confirme le transfert. Des variations d'intensités aux Figures 5.31a et 5.31b indiquent tout de même l'inhomogénéité de la couche. L'intensité du signal du silicium est dans ce cas considérée comme nulle. La tâche noire aperçue dans le coin supérieur gauche provient certainement d'une contamination de la surface. En effet, si elle était causée par la manipulation des pinces dans la couche de bradykinine, un carré plus intense serait observé soit sur la cartographie du PEG, soit sur celle de l'or. Or, rien n'est observé sur ces cartographies, le carré reste noir. Il semble donc que sa composition soit différente des éléments retenus pour les cartographies.

Les cartographies du deuxième échantillon conduisent aux mêmes conclusions et sont disponibles en Annexe aux Figures D.2a, D.2b, D.2c, D.2d et D.2e.

Distribution des espèces moléculaires en profondeur de la couche

Dans le but de déterminer la composition de la couche en profondeur, les profils, dont les spectres sont utilisés pour s'assurer de la construction de la couche de PEG ainsi que de la présence de bradykinine entière après son transfert, sont analysés. Les conditions de construction de ces profils sont celles décrites en début de section.

A la première observation du profil de la Figure 5.32, il semble que les intensités des signaux du PEG suivent la même tendance que celles des signaux de la bradykinine, mais en étant inférieures. Cette observation signifie que la couche de bradykinine transférée est certainement plus épaisse que la couche de PEG construite, mais aussi que la couche à la surface de l'or est certainement un mélange de PEG et de bradykinine. Cependant, une légère bosse est marquée dans la courbe du $C_2H_5O^+$. Elle traduirait une légère interface entre la bradykinine et le PEG, et serait alors bien caractéristique du PEG. Au contraire, le signal du CH_3O^+ suit la tendance des signaux de bradykinine et ne montre aucune augmentation d'intensité avant de diminuer. Le comportement du signal laisse entendre que le CH_3O^+ peut provenir du lien peptidique ou d'autres résidus de protéiques. Ce n'est probablement pas le pic qui caractérise le mieux le PEG. A cette légère interface, les intensités des signaux de la bradykinine ne faiblissent pas pour autant, excepté pour l'ion moléculaire. Les molécules entières paraissent présentes en moins grandes quantités que les fragments, en cette densité d'ions primaires. Cette observation confirme l'hypothèse du mélange entre les couches de bradykinine et de PEG.

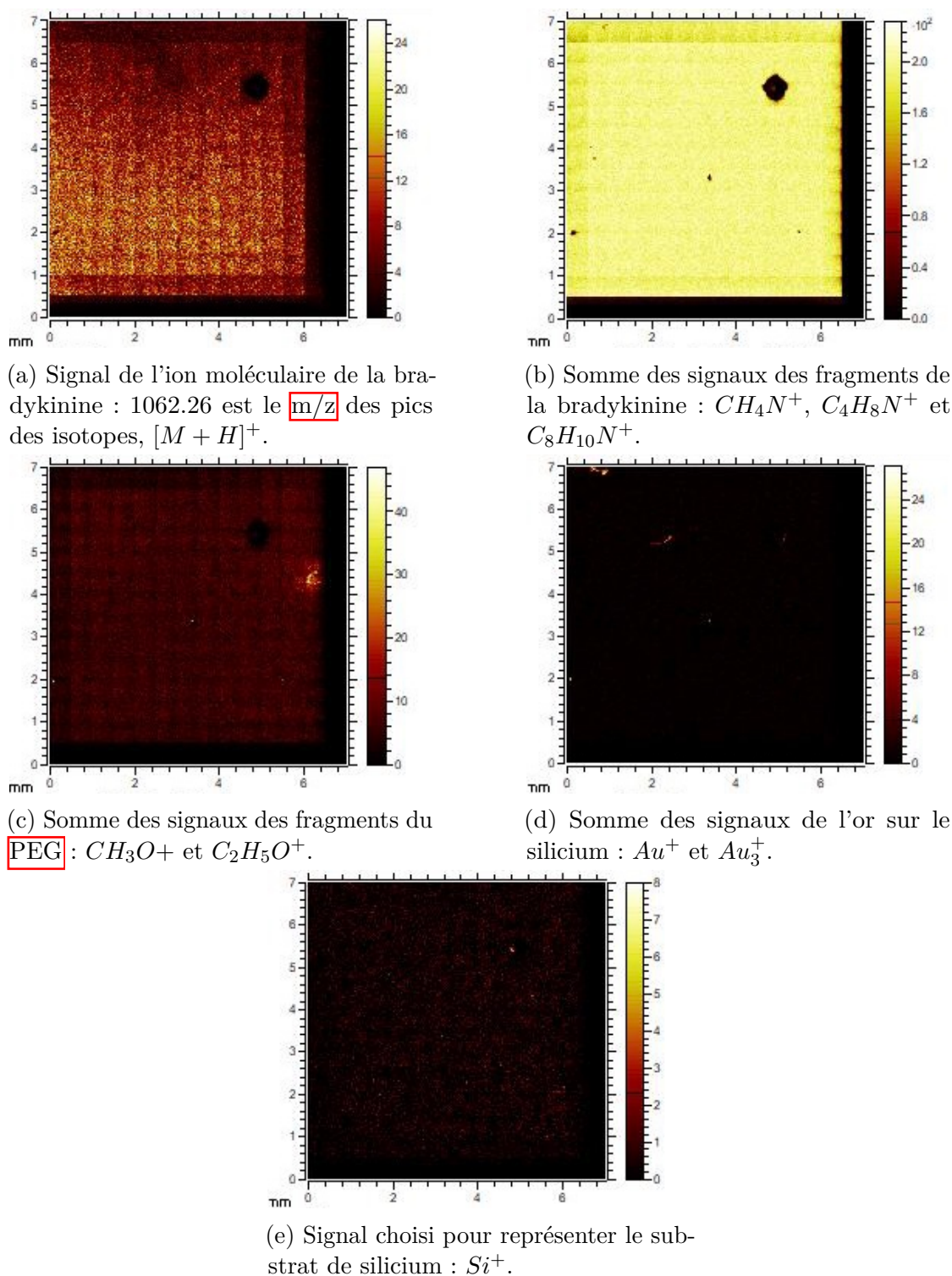


FIGURE 5.31 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de **PEG** a duré 3h.

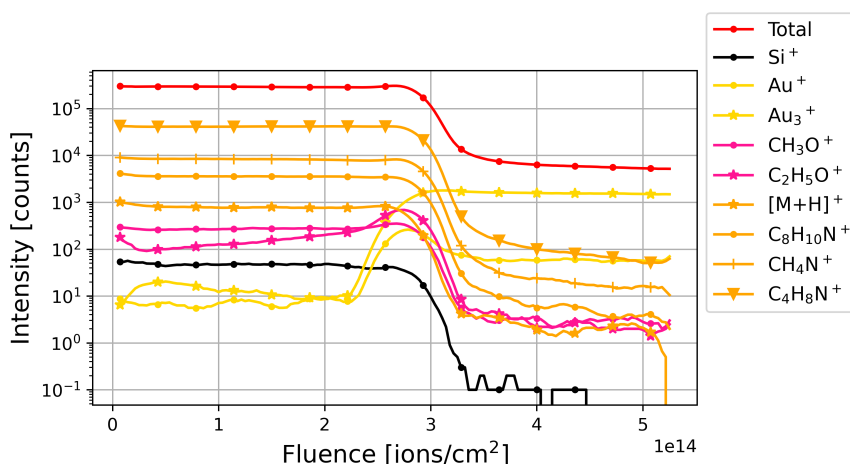


FIGURE 5.32 – Premier profil dans la couche de **PEG** et bradykinine (transfert de 3h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 62,9 pA. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En jaune : signaux des ions positifs de l'or, Au^+ et Au_3^+ . En rose : signaux des ions positifs des fragments du **PEG**, CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine, $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

La raison de ce mélange peut être liée à la couche de **PEG** trop tendre pour les molécules pulvérisées qui ont acquis une certaine énergie cinétique en raison de la pulvérisation, mais la cause est vraisemblablement la couche de **PEG** qui ne couvre pas suffisamment la surface. L'interface avec l'or est atteinte avec des densités d'ions primaires comprises entre $2,5 \cdot 10^{14}$ et $3,5 \cdot 10^{14}$ ions/cm². Au-delà de cette interface, il n'y a plus que l'or qui est détecté, les intensités des signaux qui le représentent sont stables. De même que pour les résultats observés pour les échantillons avec les couches de tréhalose, le signal du silicium est influencé par celui du CH_2N^+ . En effet, il est très étonnant de détecter le silicium sous l'or ou qu'une certaine quantité soit transférée depuis la cible avec les doses d'ions primaires des transferts. Une idée de la couche observée est dessinée sur la Figure **5.33**.



FIGURE 5.33 – Schéma de la couche formée par le transfert de bradykinine (protéine) sur couche de **PEG** (polymère) construite sur silicium recouvert d'or (substrat). Les proportions montrées sont à titre indicatif.

Dans le but de vérifier ce qui a été énoncé au paragraphe précédent, le profil de la Figure 5.34 est réalisé sur ce même échantillon et avec le même courant d' Ar_{3000} . Son analyse donne les mêmes remarques. La seule différence réside dans l'interface avec l'or qui est atteinte pour des densités d'ions primaires inférieures aux précédentes comprises entre $3,6 \cdot 10^{13}$ et $1,3 \cdot 10^{13} \text{ ions/cm}^2$. L'inhomogénéité de la couche est une nouvelle fois vérifiée. Le dépôt forme probablement un gradient sur le collecteur.

Sur la Figure 5.35, il s'agit d'un profil réalisé dans l'échantillon où le transfert de bradykinine a duré 1h. La même construction de couche que celle des profils de l'autre échantillon est retrouvée. Dans ce cas, l'interface est atteinte pour des densités d'ions entre $2,5 \cdot 10^{13}$ et $7,5 \cdot 10^{13} \text{ ions/cm}^2$.

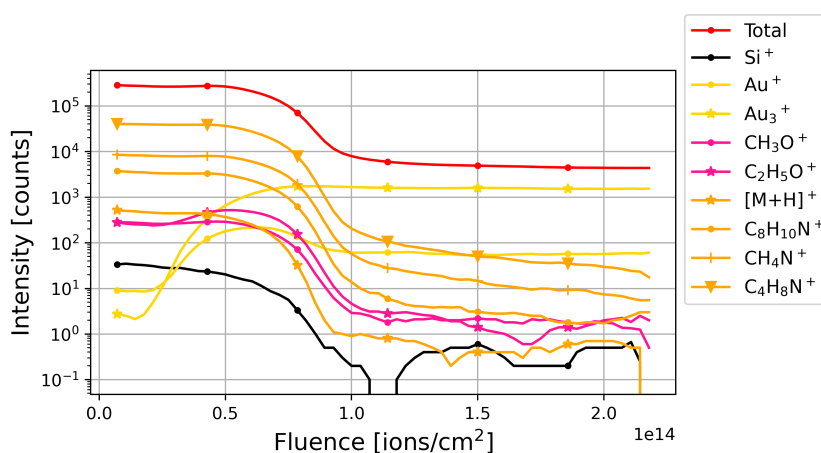


FIGURE 5.34 – Second profil dans la couche de **PEG** et bradykinine (transfert de 3h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut $62,9 \text{ pA}$. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En jaune : signaux des ions positifs de l'or, Au^+ et Au_3^+ . En rose : signaux des ions positifs des fragments du **PEG**, CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine, $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

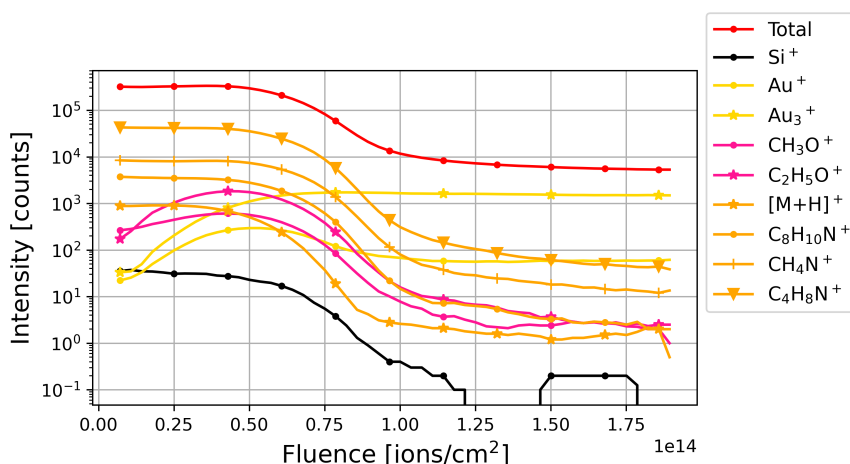


FIGURE 5.35 – Profil dans la couche de **PEG** et bradykinine (transfert de 1h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 62,9 pA. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En jaune : signaux des ions positifs de l'or, Au^+ et Au_3^+ . En rose : signaux des ions positifs des fragments du **PEG**, CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine, $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

5.4.4 Caractérisation des couches de **PEG** après le relargage de la bradykinine

Le même objectif que celui visé avec la création de la couche de tréhalose est maintenant ciblé avec la couche de **PEG** : le relargage facile des protéines en solution. Comme il est vu au point 3.2.1, le **PEG** repousse les protéines en solution aqueuse par répulsion stérique sans se détacher de la surface. Afin de récupérer la bradykinine transférée sur le collecteur, deux gouttes de 100 μL d' H_2O y sont déposées pendant une minute. Elles sont ensuite récupérées par pipette et les échantillons sont séchés au flux d'azote N_2 . La solution récupérée est analysée dans la prochaine section.

Les parties de spectres de masse montrées dans le prochain point sont tirées des spectres de masse mesurés lors des profils réalisés après cette manipulation. Les profils sont construits à partir d'un courant d'analyse de Bi_5^+ de 0,07 pA et des courants d' Ar_{3000}^+ variés. Sur ces images, les trois premiers spectres correspondent aux profils sur l'échantillon où le transfert de bradykinine a duré 1h. Les courants d' Ar_{3000}^+ valent 16,81 pA pour le premier profil (rose) et 29,98 pA pour les suivants (rouge et bleu clair). Les trois derniers spectres de masse (orange, vert et bleu foncé) sont mesurés à partir des profils sur l'échantillon où le transfert de bradykinine a

duré 3h et avec un courant d' Ar_{3000}^+ de 16,81 pA.

Absence de la bradykinine et présence du PEG

Le mode de répulsion du PEG retient à présent l'attention. A l'inverse du sucre qui se solubilise en solution aqueuse, le PEG reste attaché à la surface et repousse les protéines de la surface. Dès lors, une diminution de l'intensité des pics de l'ion moléculaire de la bradykinine est attendue, contrairement aux pics choisis pour représenter le PEG dont aucune diminution d'intensité est désirée.

L'effet attendu pour l'ion moléculaire de la bradykinine est l'effet observé sur la Figure 5.36. Les intensités observées pour la plupart ne sont que du bruit ou des intensités très basses. Cela confirme à nouveau que la méthode pour récupérer les molécules entières de bradykinine transférée est efficace. Cependant, sur un spectre, l'intensité est un peu plus élevée. Sans doute, la présence de l'ion moléculaire en cet endroit explique cette intensité plus élevée par le fait que des molécules entières sont déposées à un endroit de la surface non couvert par le PEG (relargage en solution aqueuse plus difficile), ou par le fait de leurs réadsorptions à la surface de l'or au moment du séchage.

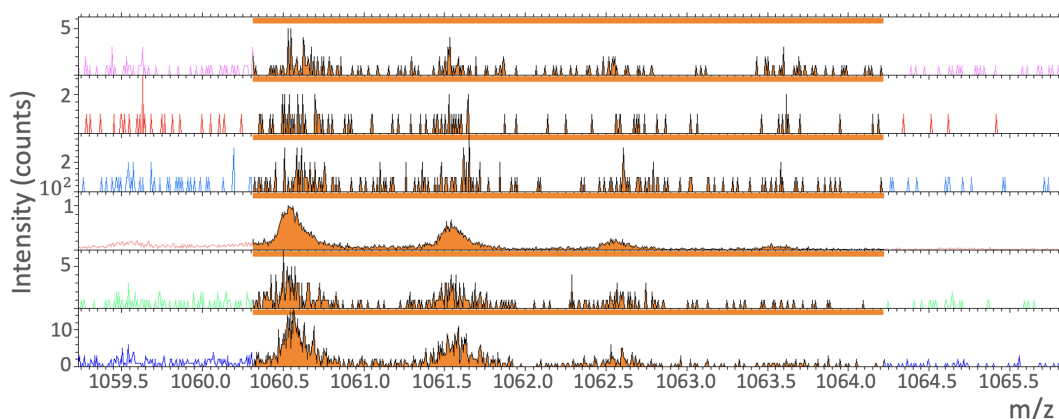


FIGURE 5.36 – Spectres de masse illustrant les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine après le relargage des protéines en solution.

Les deux Figures 5.37 et 5.38 consolident l'hypothèse du résultat attendu. Le CH_3O^+ et le $C_2H_5O^+$ sont toujours présent sur la surface. Il est possible que la quantité de PEG ait légèrement diminué en raison des molécules qui ne réagissent pas avec l'or et qui s'évacuent avec la bradykinine par la méthode des gouttes d'eau.

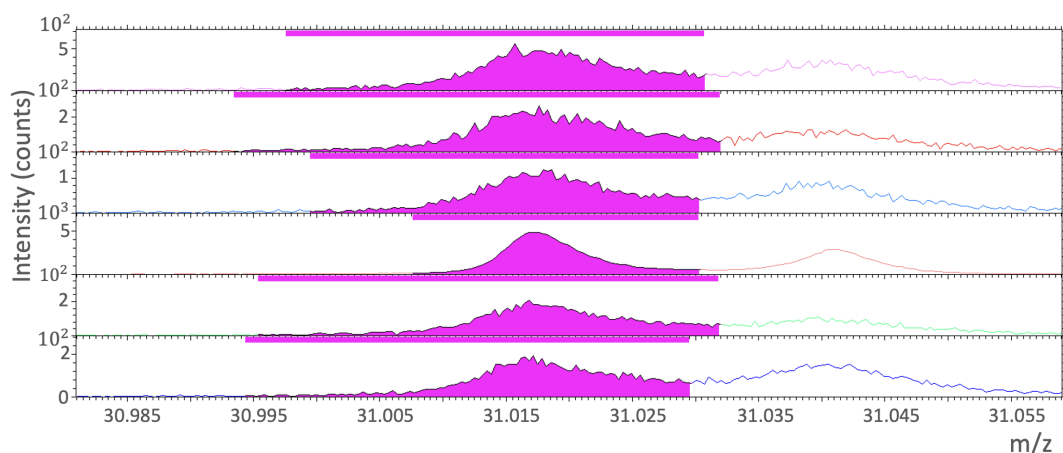


FIGURE 5.37 – Spectres de masse illustrant le pic du CH_3O^+ après le relargage des protéines en solution.

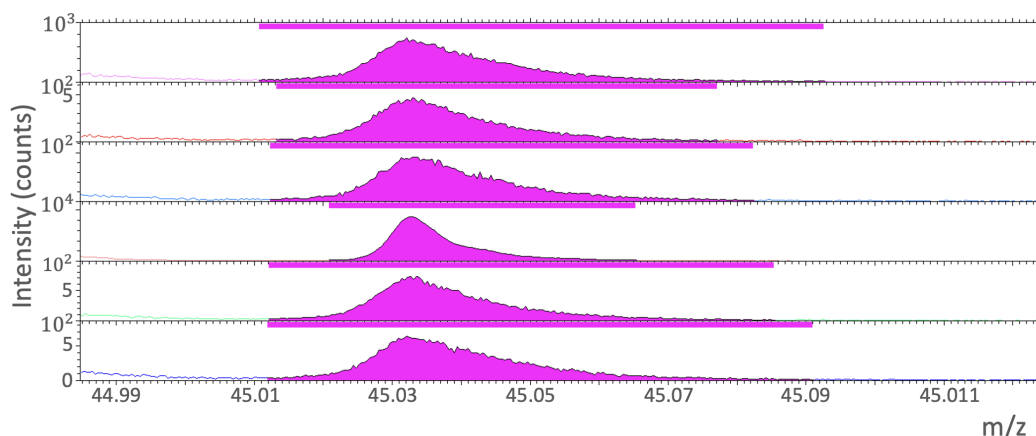


FIGURE 5.38 – Spectres de masse illustrant le pic du $C_2H_5O^+$ après le relargage des protéines en solution.

Disposition chimique en surface de la couche

Pour permettre la caractérisation chimique en surface après avoir récupéré la bradykinine, les cartographies de l'échantillon avec le transfert de bradykinine de 3h sont obtenues par le bombardement de la surface d'un faisceau d'analyse de Bi_5^+ aux Figures 5.39a, 5.39b, 5.39c et 5.39d. Malheureusement, la cartographie de l'ion moléculaire n'est pas affichée, car elle n'a pu être développée en raison d'une faute d'inattention. Le résultat pour les fragments est attendu, car c'est le même que celui observé avec la couche de tréhalose. Les fragments de la protéine semblent encore présents sur la surface. Les signaux du PEG ont également une intensité

relativement élevée qui confirme leur maintien sur la couche d'or. Les résultats pour le **PEG** de ce point-ci et du point précédent ne peuvent pas être confirmés totalement. En effet, rien n'a permis de déterminer si les signaux du CH_3O^+ et du $C_2H_5O^+$ provenaient totalement, en partie ou pas du tout du **PEG**. Les signaux de l'or ont une légère intensité qui indique tout de même sa présence à la surface due à l'inhomogénéité de la couche de **PEG**. Enfin, aucun silicium n'est détecté à la vue de la faible intensité mesurée.

Les cartographies pour l'échantillon avec le transfert de bradykinine d'1h conduisent aux mêmes observations. Elles sont montrées en Annexe aux Figures **D.3a**, **D.3b**, **D.3c** et **D.3d**.

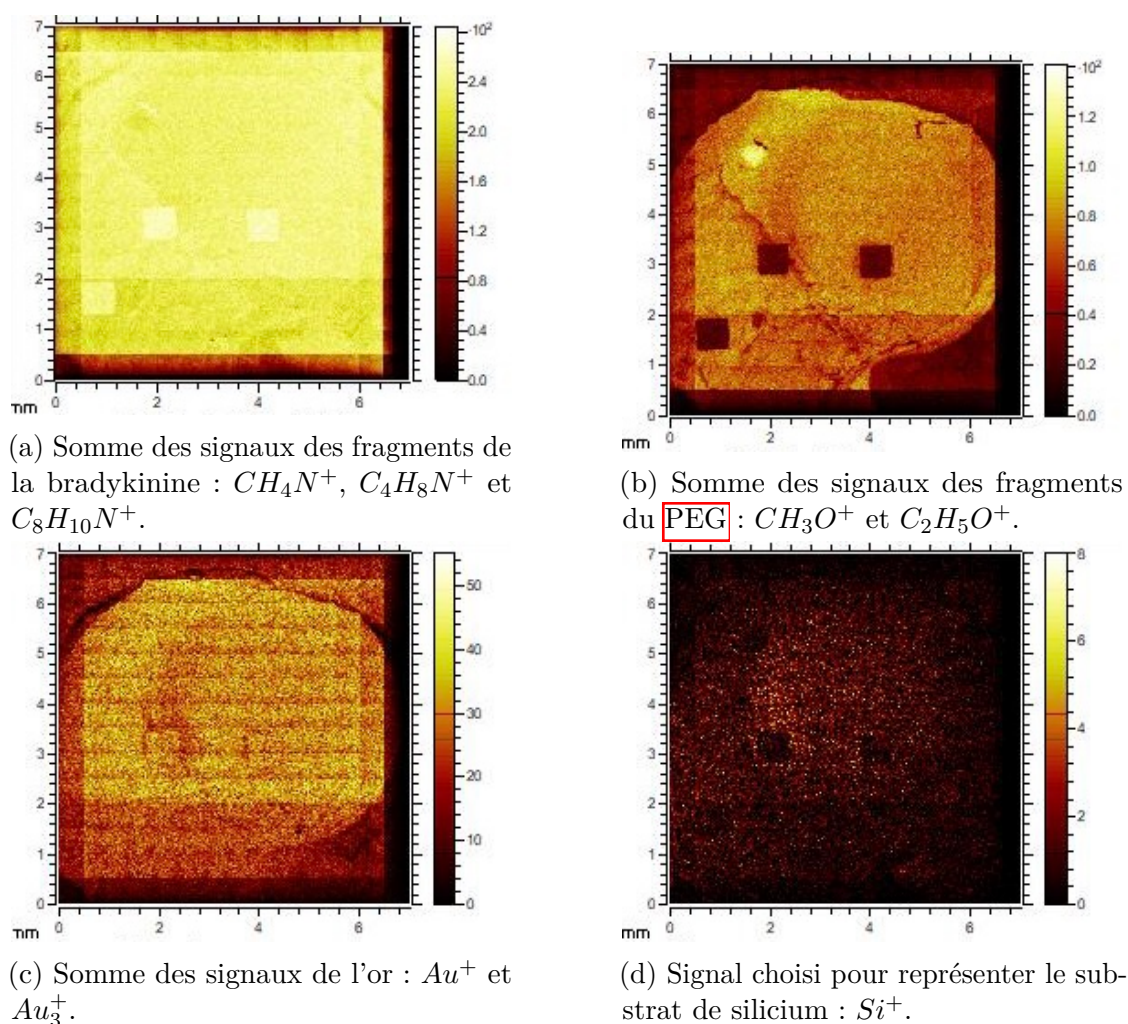


FIGURE 5.39 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de **PEG** a duré 3h, après solubilisation.

Distribution des espèces moléculaires en profondeur de la couche

Dans le but de terminer la caractérisation de la couche après le relargage de la bradykinine en solution grâce à la méthode des deux gouttes d' H_2O , les derniers profils sont pris avec un courant d'analyse de Bi_5^+ de $0,07\text{ pA}$ et un courant d' Ar_{3000}^+ qui varie.

Sur chacun des profils (Figures 5.40 et 5.41), les comportements des signaux sont les mêmes. L'interface est atteinte presque immédiatement, c'est-à-dire pour des densités d'ions primaires inférieures à $2,5 \cdot 10^{13}\text{ ions/cm}^2$. La couche restante est supposée très fine. Le signal de l'ion moléculaire de la bradykinine est devenu très faible. Cela conduit à la conclusion que les molécules intactes de bradykinine ont été désorbées. Néanmoins, les intensités des fragments sont toujours les plus élevées. La déduction à partir des cartographies est renforcée : les fragments de la bradykinine sont toujours présents à la surface. Les intensités des signaux du PEG indiquent qu'il est toujours présent à la surface, mais en plus faible proportion par rapport à l'or. L'intensité du signal CH_3O en début de profil se situe entre les deux des signaux de l'or. Ceci n'est pas observé sur les profils avant le relargage des protéines. L'hypothèse de molécules de PEG qui n'ont pas réagi avec l'or, et par conséquent, qui se sont aussi évacuées avec les deux gouttes d'eau est appuyée par le résultat obtenu sur ce profil.

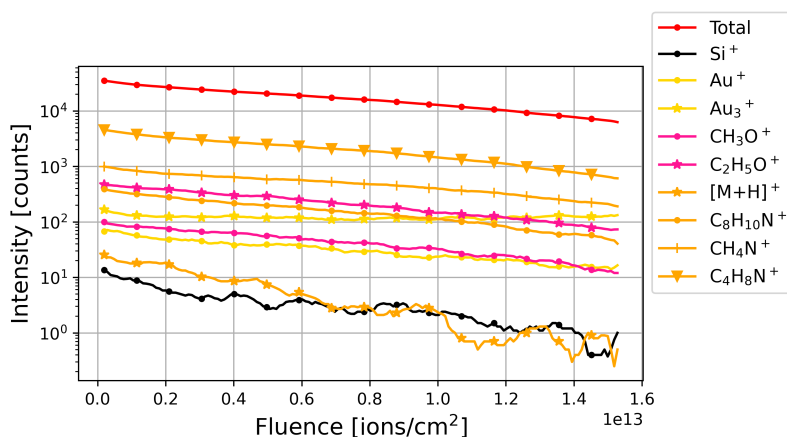


FIGURE 5.40 – Profil de la couche de PEG sans la bradykinine (transfert de 3h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut $16,81\text{ pA}$. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En jaune : signaux des ions positifs de l'or, Au^+ et Au_3^+ . En rose : signaux des ions positifs des fragments du PEG, CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine, $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

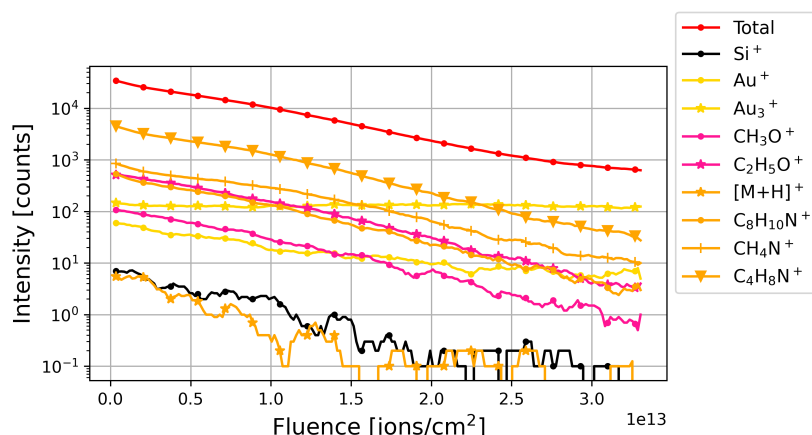


FIGURE 5.41 – Profil dans la couche de **PEG** sans la bradykinine (transfert de 1h) dont le courant d' Ar_{3000}^+ vaut 29,98 pA. En rouge : intensité totale. En noir : signal de l'ion positif du silicium, Si^+ . En jaune : signaux des ions positifs de l'or, Au^+ et Au_3^+ . En rose : signaux des ions positifs des fragments du **PEG**, CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$. En orange : signaux pour la bradykinine. Le premier est celui de l'ion moléculaire qui a gagné un hydrogène, $[M+H]^+$. Les trois autres sont ceux de fragments de la protéine, $C_8H_{10}N^+$, CH_4N^+ et $C_4H_8N^+$.

5.5 Comparaison entre les résultats obtenus avec les couches de tréhalose ou avec les couches de **PEG**

La comparaison entre les résultats obtenus avec les couches de tréhalose et ceux obtenus avec les couches de **PEG** révèle qu'ils sont assez similaires. Dans les deux cas, le transfert de la protéine se déroule correctement, et la protéine est présente sur toute la surface. Des variations d'intensité au sein de cette couche sont observées et indiquent que le transfert n'a pas formé de couche homogène sur la surface. En outre, il semble que la quantité de molécules entières soit inférieure à celles des fragments. Imaginer qu'au sein d'une même espèce de protéines, la vitesse de dépôts varie en fonction de la grosseur de la molécule comme c'est le cas observé entre deux protéines différentes (résultat obtenu avec les transferts sur **PE**), est une explication plausible. Dans ce cas-ci, l'ion moléculaire aurait une vitesse de dépôt plus faible que celles des fragments. Cette hypothèse est plausible uniquement lorsque la différence de masse entre deux fragments est grande. En effet, dans chacun des profils, les intensités de $C_4H_8N^+$ sont plus élevées que celles de CH_4N^+ , et par conséquent sa proportion dans l'échantillon pourrait l'être également. Des

tests supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Un phénomène inattendu est remarqué grâce à la réalisation des profils. La couche formée après le transfert de bradykinine montre un mélange entre la bradykinine et la couche sacrificielle ou fonctionnalisée. Pour le sucre, c'est probablement dû à l'aspect trop tendre du matériau. Tandis que pour la couche de **PEG**, aucune conclusion ne peut être tirée. En effet, étant donné que l'or est encore visible sur l'échantillon, rien ne permet d'affirmer que la molécule de protéine soit passée à travers la couche ou qu'elle se soit adsorbée sur une partie visible de l'or. Cette deuxième hypothèse explique alors le résultat observé sur un spectre de la Figure **5.36** où l'ion moléculaire est encore visible car la molécule ne s'est pas correctement désorbée avec l'eau en cet endroit. Aux autres endroits où les profils sont réalisés, cette présence de l'ion moléculaire n'est pas aussi marquée. Il semble qu'il ait bien été évacué de la surface. La cartographie de l'ion moléculaire appuie cette théorie. C'est également le cas avec la couche de tréhalose, l'ion moléculaire ayant disparu en grande majorité de la surface. Les fragments de protéines sont quant à eux toujours détectés. Une hypothèse qui pourrait expliquer ce comportement retrouvé avec les deux couches est que l'énergie cinétique acquise par les plus petites molécules leur permettrait d'atteindre le silicium et ainsi d'y rester adsorbé lors de la solubilisation de l'échantillon.

En ce qui concerne les couches de tréhalose ou de **PEG**, les résultats attendus après le relargage de la bradykinine sont aussi ceux constatés : le tréhalose n'est plus sur la surface tandis que le **PEG** y est toujours présent bien qu'en quantité inférieure par rapport à la couche initiale.

En conclusion, le développement de couches sacrificielles ou fonctionnalisées a permis de relarguer en solution des molécules entières de bradykinine. A présent que ce relargage est confirmé, une tentative de quantification des protéines relarguées en solution à partir de leurs transferts sur les couches construites est étudiée dans la prochaine section.

5.6 Quantification de bradykinine transférée sur des couches fonctionnalisées

Pour rappel, un test **BCA** agit sur les liens peptidiques des protéines. Dès lors, il estime la quantité de matière qui réagit avec le test. La matière comprend les fragments et les molécules entières de la protéine. Les paramètres des quatre transferts étudiés précédemment sont repris dans le tableau **5.9** ci-après. Dans la dernière colonne, la masse transférée est estimée à partir de l'équation de la courbe de

calibration qui se trouve en Annexe à la Figure E.1.

TABLE 5.9 – Paramètres des quatre transferts de la bradykinine à l’aide d’un faisceau d’ions Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV ainsi que la masse estimée. Les deux premières lignes concernent les transferts sur une couche de tréhalose tandis que les lignes 3 et 4 concernent les transferts sur une couche de polyéthylène glycol.

	Dose totale d’ions [$\#ions$]	Densité d’ions [$ions/cm^2$]	Courant [nA]	Temps de transfert	Masse estimée [μg]
1	$3,03.10^{14}$	$6,18.10^{16}$	9	1h30	58,8463
2	$1,13.10^{15}$	$2,31.10^{17}$	8,4	6h	58,8463
3	$1,84.10^{14}$	$3,76.10^{16}$	8,2	1h	1,3064
4	$5,59.10^{14}$	$1,14.10^{17}$	8,3	3h	9,0087

Malheureusement, on observe que pour les transferts sur les couches de tréhalose, cela ne fonctionne pas. L’absorbance mesurée est très élevée et est la même pour les deux échantillons. Ce résultat n’est pas désiré. Étant donné les densités d’ions primaires très différentes, deux masses transférées estimées sont attendues. Par ailleurs, la couleur mauve foncée observée et l’absorbance mesurée indiquent que la solution a fortement saturé. L’explication la plus probable est une contamination des échantillons. En outre, les doses de tréhalose présentes dans les solutions récupérées sont élevées. Il est possible qu’à faible dose, le tréhalose n’interagisse pas avec le test BCA, mais qu’à dose plus importante, ce soit le cas. Des tests supplémentaires sont à mettre en place pour vérifier les hypothèses.

Néanmoins, tenter de calculer cette masse transférée grâce au graphe de la masse par rapport à la densité d’ions primaires envoyés sur la source de protéine (Figure 5.1 du point 5.1.1) et grâce aux densités d’ions de ces transferts est possible. Des masses de 3,0838 et 10,1944 μg sont alors trouvées pour les transferts de 1h30 et de 6h respectivement. Attention, il s’agit d’une estimation grossière et non de la valeur réelle. La source de bradykinine n’est pas la même. Des différences d’épaisseur peuvent mener à des différences de quantités pulvérisées entre les deux expériences. La gamme de masse estimée s’arrête en-dessous de 9 μg , alors qu’ici une des deux masses estimées est supérieure à cette valeur. En outre, la couche de tréhalose devrait faciliter le relargage des protéines, une masse estimée supérieure pourrait être trouvée.

D’un autre côté, la quantification de la bradykinine transférée sur les couches de PEG semble donner des résultats cohérents. Il est intéressant de les comparer à ceux trouver via la Figure 5.1 à l’aide des densités d’ions primaires dirigées vers la source

de bradykinine lors des transferts sur les couches de **PEG**. Avec ces informations, les masses calculées sont 2,0668 et 5,2774 μg pour les transferts de 1h et de 3h respectivement. Il faut se rappeler que l'idée d'utiliser des couches de **PEG** est de relarguer les molécules de protéines plus facilement en solution par rapport à leur désorption en solution aqueuse sur substrat de silicium. En comparant les deux masses estimées pour le transfert de 3h, il semble que l'objectif soit atteint. La masse trouvée avec le relargage à partir de la couche de **PEG** est plus élevée. Concernant le transfert de bradykinine d'1h sur la couche de **PEG**, la situation inverse se produit. La masse calculée avec la couche de **PEG** est inférieure à celle calculée avec le graphe obtenu à partir des transferts sur films de **PE**. La petite différence de 0,7 μg s'explique par le fait que la disposition de la bradykinine sur le substrat de silicium (source frappée par les ions primaires) mène à ces différences de quantités transférées. Néanmoins, une masse transférée supérieure est attendue pour le relargage à partir de la couche de **PEG**.

Avant de pouvoir tirer une conclusion, il est nécessaire de reproduire cette expérience et comparer les résultats entre eux.

5.7 Transfert de trypsine

Le dernier objectif de ce mémoire est de confirmer le transfert correct de molécules de poids moléculaire plus élevé que celui du lysozyme. Pour y parvenir, la trypsine est utilisée.

Une électrophorèse sur gel (**SDS-PAGE**) est réalisée sur trois échantillons avec des temps de transfert différents et par conséquent des doses totales d'ions appliquées différentes. La protéine est transférée grâce à des agrégats d' Ar_{5000}^+ accélérés à 10 **keV** sur des carrés d'1 cm^2 de **PE**. Le faisceau d' Ar_{5000}^+ permet des conditions de pulvérisation plus douces pour la cible, car l'énergie par atome est plus faible que celle des agrégats Ar_{3000}^+ . De plus, le courant d'ions primaires est plus faible et oblige à faire des transferts plus longs pour atteindre les mêmes doses d'ions, ainsi que pour obtenir une quantité transférée suffisante pour la détecter ou la quantifier.

TABLE 5.10 – Tableau reprenant les paramètres des transferts de la trypsine sur des films de **PE**.

	Dose totale d'ions [$\#ions$]	Densité d'ions [$ions/cm^2$]	Agrégats d' Ar	Temps de transfert
Puits 3	$2,36.10^{14}$	$4,81.10^{16}$	Ar_{5000}^+	7h
Puits 4	$3,8.10^{14}$	$7,75.10^{16}$	Ar_{5000}^+	13h
Puits 5	$2,07.10^{15}$	$4,22.10^{17}$	Ar_{5000}^+	WE

Dans les deux premiers puits, une échelle de référence de poids moléculaire (Figure 5.43) et une référence pour la trypsine sont introduites. Avec les informations reprises dans le tableau 5.10, le résultat observé signifie qu'il a fallu une dose totale d'ions primaires d'environ $2,07 \cdot 10^{15}$, soit près d'un week-end entier de transfert dans ces conditions d'expérience, pour détecter de la trypsine via cette méthode. En effet, une ligne bleue dans l'alignement du cinquième puits située au même niveau que celle de la référence de trypsine est visible. Malgré un poids moléculaire inférieur à 25 kDa , en se référant à la Figure 5.43, cette ligne semble se localiser légèrement au-dessus. Cela peut être dû à une légère imprécision du test. Néanmoins la solution pure de trypsine utilisée pour la référence et cette méthode indiquent le bon transfert de la protéine.

Dans les troisième et quatrième puits du gel, le transfert est fait dans les mêmes conditions mais avec des doses totales d'ions inférieures (soit des temps de transfert inférieurs dans ces conditions). Aucune couleur bleue n'apparaît sur la même ligne et dans l'alignement de ces puits. Cela ne signifie pas qu'aucune protéine n'est transférée, mais cela peut signifier par contre que le test n'est pas assez sensible (sensibilité de 5 ng [77]) pour détecter de trop petites quantités transférées. Pour surmonter ce problème, une coloration protéique à base d'argent qui augmente la sensibilité de détection entre $0,25$ et $0,5 \text{ ng}$ pourrait être utilisée. [78] Une autre hypothèse pourrait être le temps de coloration qui n'est pas assez long pour colorer de plus petites quantités de protéine, mais cette dernière n'a pas beaucoup de poids pour justifier le résultat.

A présent que le transfert de trypsine est confirmé, un test d'activité de la trypsine permet de préciser le transfert correct de la protéine, (c'est-à-dire en conservant son activité biologique) et de donner une idée sur la quantité de molécules intactes obtenues. Le kit Pierce™ de dosage fluorescent d'une protéase permet de mesurer cette activité protéolytique. Au contraire du test BCA, dans ce test les fragments ne sont pas pris en compte. La courbe de calibration du test réalisé peut être visualisée en Annexe à la Figure F.1.

Le tableau 5.11 reprend les conditions de transfert de trypsine de chaque échantillon, à savoir que les agrégats d'argon sont tous accélérés à 10 keV . Quant au tableau 5.12, il reprend les masses transférées estimées pour chaque transfert du tableau 5.11. Il y a correspondance des numéros de lignes entre les deux tableaux.

Avec les points obtenus, on remarque qu'une approximation polynomiale du second degré permet de calculer les masses de trypsine transférée. Les valeurs trouvées grâce à l'équation de l'approximation à la Figure F.1 sont résumées à la première

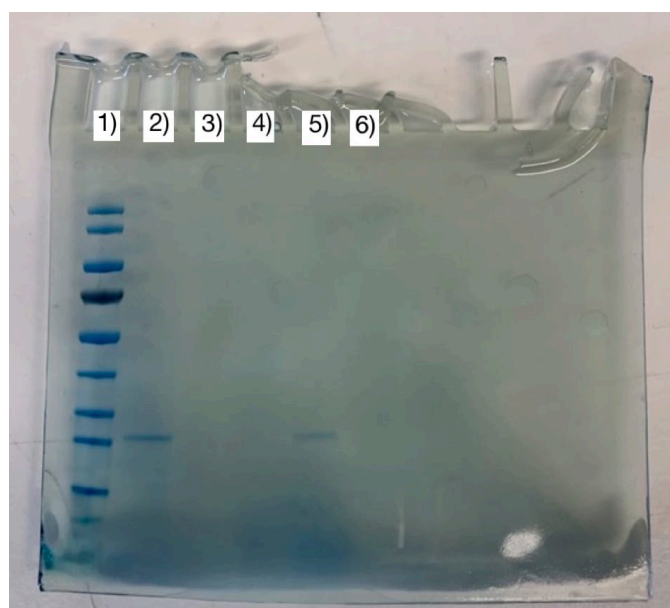


FIGURE 5.42 – **SDS-PAGE** sur la trypsine transférée sur films de **PE**. L'échelle de référence de poids moléculaire est placée dans le puits 1 et la référence de trypsine dans le puits 2. Dans les puits 3 à 5, il s'agit des échantillons de trypsine transférée dont les paramètres sont repris dans le tableau 5.10.

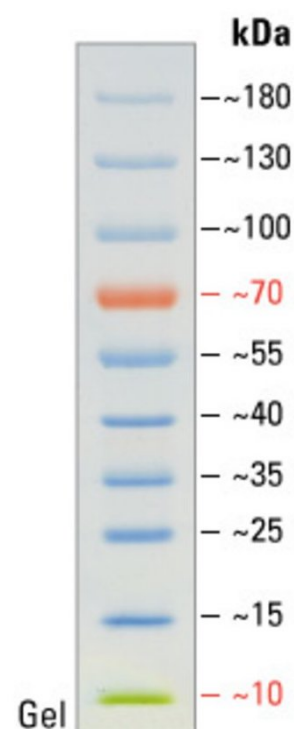


FIGURE 5.43 – Échelle de référence de poids moléculaire Ladder. 79

colonne du tableau 5.12. Cependant, deux valeurs ne peuvent pas être calculées, car elles sont hors de l'image de la fonction. Dès lors malgré un coefficient de détermination plus bas, soit 0,9195 (contre 0,9351 pour l'approximation polynomiale), une approximation par la racine carrée est réalisée. Cette approximation offre l'avantage de ne pas être limitée dans l'image de la fonction. C'est pourquoi, à l'avenir il est préférable de se baser sur les résultats obtenus par l'approximation par racine carrée.

Reproduire ces résultats est difficile. Plusieurs éléments sont à l'origine de cette non reproductibilité. Dans un premier temps, le test utilisé a une haute sensibilité. Une autre possibilité est la manipulation des échantillons avec des pinces qui a mené à enlever une quantité de trypsine sur le film de **PE** ou à une contamination de l'échantillon avec de la trypsine. Le faisceau d'ions peut aussi être mal positionné sur la cible. Par exemple, il pourrait taper sur le bord de la couche de protéines ce qui mène à des diminutions du rendement de pulvérisation, la couche de protéine étant moins épaisse sur les bords. Inversement, le faisceau d'ions peut frapper la cible au coeur de la couche qui est plus épaisse. La formation de la

TABLE 5.11 – Paramètres des conditions de transfert des différents échantillons pour lesquels le test de dosage fluorescent a été réalisé.

	Dose totale d'ions [$\#ions$]	Densité d'ions [$ions/cm^2$]	Courant [nA]	Agrégats d'Ar	Temps de transfert
1	$6,10 \cdot 10^{14}$	$1,25 \cdot 10^{17}$	1,68	Ar_{5000}^+	16h10
2	$4,8 \cdot 10^{14}$	$9,79 \cdot 10^{16}$	1,39	Ar_{5000}^+	15h23
3	$9,66 \cdot 10^{13}$	$1,97 \cdot 10^{16}$	8,6	Ar_{3000}^+	30min
4	$5,8 \cdot 10^{14}$	$1,18 \cdot 10^{17}$	8,6	Ar_{3000}^+	3h
5	$7,73 \cdot 10^{14}$	$1,58 \cdot 10^{17}$	8,6	Ar_{3000}^+	4h
6	$2,9 \cdot 10^{14}$	$5,92 \cdot 10^{16}$	8,6	Ar_{3000}^+	1h30

TABLE 5.12 – Dans ce tableau, les masses correspondantes à chaque transfert de trypsine, dont les paramètres sont repris dans le tableau 5.11, sont calculées par approximation polynomiale du second degré et par approximation par la racine carrée des données obtenues pour la courbe de calibration.

	Masse estimée par approximation polynomiale [μg]	Masse estimée par approximation par la racine carrée [μg]
1	0,083	0,0544
2	0,1152	0,08699
3	0,2601	0,2785
4	0,4707	0,542
5	-	1,15125
6	-	4,0139

source de protéines est une autre cause. En créant ces cibles, on remarque que la couche de trypsine tend à se diviser et à se décoller du substrat de silicium. Des endroits dépourvus ou amoindris en quantité de trypsine mènent aussi à des rendements de pulvérisation plus faibles. Ces différents paramètres sont autant de sources qui rendent difficile la pertinence et la reproductibilité des résultats observés.

Les masses estimées de protéines transférées pour les deux premières lignes pourraient s'expliquer par le rendement de pulvérisation et par l'énergie par atome. Bien que les doses totales d'ions et les densités d'ions soient similaires à celles d'autres échantillons, l'énergie par atome des agrégats diminue (2 eV/atome pour les Ar_{5000}^+ contre $3,33 \text{ eV/atome}$ pour les Ar_{3000}^+). Dès lors, on observe que le rendement de pulvérisation diminue aussi. On remarque également que l'augmentation de l'énergie

par atome réduit le pourcentage de molécules intactes pulvérisées. Or, c'est sur base de molécules intactes que le test de dosage fluorescent s'appuie. Étant donné que l'énergie par atome est plus élevée pour les agrégats Ar_{3000}^+ , une diminution de la masse estimée par rapport aux mêmes doses d'ions primaires à l' Ar_{5000}^+ pourrait être observée. Pour les lignes 1 et 4, la densité d'ions utilisée est similaire, mais plus de molécules intactes sont détectées avec le test pour le transfert à Ar_{3000}^+ . Ce résultat s'explique si on se réfère au cadre reprenant la fraction intacte de molécules par rapport à l'énergie par atome de la Figure 2.9b. Le pourcentage de molécules intactes calculé dans ce cadre est similaire pour ces deux énergies par atome. Le changement de situation (augmentation de la fragmentation) ne s'opère qu'à partir de 10 eV/atome. Cela veut dire que les rendements de molécules intactes pour ces deux agrégats sont similaires, mais étant donné le rendement de pulvérisation supérieur (cette affirmation est faite via la Figure 2.9b) pour l' Ar_{3000}^+ , le nombre de molécules intactes pulvérisées est supérieur pour l' Ar_{3000}^+ . Ce résultat mène à une estimation de masse plus élevée, car la fluorescence augmente avec le nombre de molécules entières. Cependant, il semble étonnant qu'un facteur 10 différencie les deux masses estimées aux lignes 1 et 4. Cette incohérence peut s'expliquer par les nombreuses hypothèses citées au paragraphe précédent.

Pour les lignes 3 à 5, une certaine logique est observée. Au plus la dose d'ions qui bombarde la surface de protéine augmente, au plus la masse estimée est élevée pour une même énergie par atome.

Au sein de chaque groupe (celui utilisant des agrégats d' Ar_{5000}^+ et celui d' Ar_{3000}^+), des incohérences sont observées. Alors que des doses totales d'ions inférieures sont utilisées pour une même énergie par atome, plus de quantité transférée est calculée (ligne 2 et 6 du tableau 5.11). Deux hypothèses peuvent expliquer le phénomène. La première hypothèse l'explique par le fait que le faisceau d'ions primaires est arrivé au bout de la couche de protéine sur le substrat de silicium à l'endroit où il la bombarde. Les raisons de l'épuisement de la source de protéine en cet endroit sont les mêmes que celles déjà citées au point 5.3.3.

La deuxième hypothèse est peut-être celle de la contamination par la trypsine elle-même. Les pinces utilisées pour détacher les films de PE sont nettoyées entre chaque manipulation. Un mauvais nettoyage ou une distraction peut être à l'origine d'un dépôt involontaire de trypsine provenant de la pince sur le film de PE. Le cas de la ligne 6 du tableau 5.11 reste tout de même surprenant. La dose totale d'ions est plus de deux fois plus petite que celle de la ligne 5 alors que la masse estimée est presque quatre fois plus grande. L'hypothèse la plus probable semble alors la contamination.

A la Figure 5.44, un graphe de la masse transférée en fonction de la densité d'ions primaires est construit uniquement pour les transferts à Ar_{3000}^+ . Le coefficient de détermination est très mauvais, aucune conclusion ne peut être tirée de la régression linéaire. Si on ne tient pas compte du transfert 6, une certaine tendance linéaire croissante entre les trois résultats se dégage. En comparant celle-ci à celle obtenue pour le lysozyme, on remarque qu'il faut des densités d'ions primaires plus élevées pour transférer autant de trypsine que de lysozyme. Rappelons cependant que le graphe de la masse du lysozyme prend toute la quantité transférée (fragments et molécules intactes) tandis que celui de la trypsine ne tient compte que de la masse des molécules intactes transférées. Dès lors, d'autres tests sont nécessaires pour tirer une quelconque conclusion entre les deux protéines.

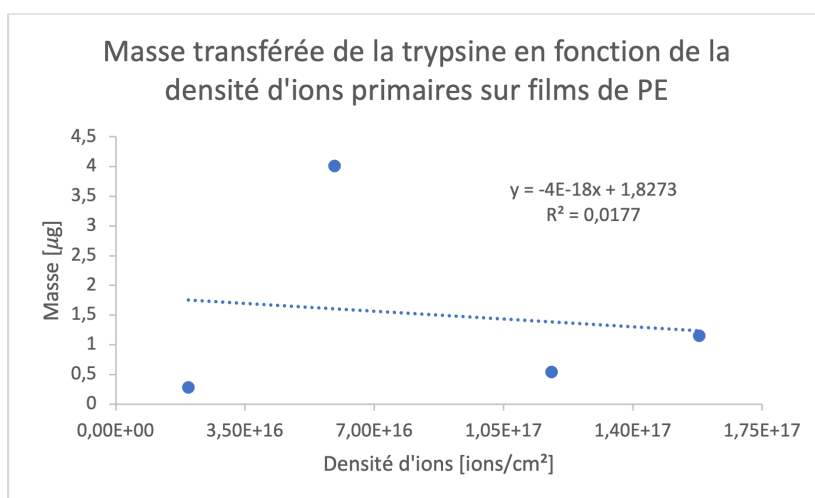


FIGURE 5.44 – Graphe de la masse de trypsine transférée [μg] en fonction de la densité d'ions primaires d'argon [$ions/cm^2$] projetés sur la cible. La droite a pour équation : $y = -3,72946 \cdot 10^{-18} x + 1,827309274$.

Malgré quelques incohérences, ces résultats sont positifs et démontrent que les faisceaux d'argon sont une méthode efficace pour le transfert de protéines de poids moléculaires semblables ou inférieurs à celui de la trypsine, soit environ $24 kDa$. De plus, en utilisant une énergie par atome appropriée, un certain pourcentage de molécules intactes est disponible après le transfert et peut être quantifié.

Chapitre 6

Conclusion et perspectives

Depuis un moment déjà, la fonctionnalisation des surfaces à l'aide de protéines est un défi majeur dans le domaine médical. Nous pouvons noter l'étude des cellules souches neurales humaines sur un motif formé par la poly(L-lysine) et le polyéthylène glycol. La protéine joue un rôle adhésif entre les cellules et la surface, tandis que le polyéthylène glycol les repousse. Ce motif formé par les protéines encourage la différenciation des cellules et leurs interactions qui sont étudiées par les chercheurs. [80] La formation de ces couches biofonctionnelles challenge les scientifiques à travers le monde entier.

En raison de limitations rencontrées avec l'adsorption aqueuse des protéines, ce mémoire s'inscrit dans un projet qui a pour finalité le dépôt de biomolécules en phase gazeuse. Un faisceau d'ions positifs (argon) transfère ces biomolécules d'une cible à un collecteur. Des résultats prometteurs ont déjà été obtenus grâce à la source d'argon d'un appareil **ToF-SIMS**. Dans ce travail, les objectifs visaient le transfert de protéines (bradykinine, lysozyme et trypsine) sur différents types de substrat (polymère ou métallique, fonctionnalisé ou non) en vue de la réalisation de tests biologiques pour permettre la quantification de la masse transférée ou la mesure de l'activité biologique.

Les manipulations et expériences pour mettre en oeuvre ces objectifs ont donné des résultats encourageants. La première partie consistait au transfert de la bradykinine et du lysozyme sur des films de polyéthylène. La quantification de la masse transférée sur ces films a permis l'élaboration d'une courbe de la masse transférée de chaque protéine en fonction de la densité d'ions primaires dirigés vers la cible. Les vitesses de dépôt de la bradykinine et du lysozyme n'étaient pas les mêmes : une masse plus importante pour les petites protéines (bradykinine) est transférée comparativement aux plus grandes protéines (lysozyme) pour une même densité d'ions primaires. En deuxième lieu, la création d'une couche sacrificielle

(en tréhalose) ou fonctionnelle (en polyéthylène glycol) sur un collecteur solide (silicium) devait permettre un relargage facile des protéines en solution dans le but de mesurer la masse transférée. Le relargage de l'ion moléculaire s'est avéré concluant contrairement à celui des fragments de protéines pulvérisés qui restaient encore présents en grande quantité. La quantification des molécules de bradykinine a bien fonctionné pour les transferts sur la couche de **PEG**, mais n'a pas pu donner de résultat pour les transferts sur couches de tréhalose. Le dernier objectif poursuivi est le transfert de plus larges protéines. La trypsine a été choisie pour tenter de l'atteindre. Une première série de transferts a permis sa détection par électrophorèse **SDS-PAGE**. En outre, un test d'activité biologique sur une deuxième série de transferts a démontré le transfert de molécules intactes et a permis leur quantification.

Bien que les résultats soient encourageants pour le futur de cette méthode de dépôt de protéines, ainsi que pour celui des méthodes utilisées dans la formation des couches et la récupération des protéines, des manipulations sont encore à faire avant d'affirmer leurs efficacités absolues.

Parmi ces résultats, certaines incohérences ont été remarquées. Au sein d'une série de transferts, des incohérences au niveau de la masse transférée estimée ont mené à l'hypothèse d'une mauvaise construction de cible (source de protéines). Utiliser des solutions de protéines à concentration plus élevée (50 g/L par exemple) et déposer plus de trois gouttes (une dizaine) pourrait améliorer possiblement la cible. En s'assurant qu'une couche suffisamment épaisse soit déposée partout, la différence d'épaisseur d'un endroit à l'autre ne serait plus un problème, car en n'importe quel endroit le silicium ne serait pas atteint.

Les couches de tréhalose formées sont également très épaisses. Dès lors, diminuer le temps de sublimation pourrait mener à des couches moins épaisses. Cependant augmenter suffisamment cette couche empêcherait peut-être certains fragments d'atteindre le silicium. Trois couches seraient formées. De la surface au substrat, il y aurait une couche de protéines en surface, suivie par une couche du mélange protéine/sucre avant d'atteindre le substrat de silicium.

D'un autre part, les couches de **PEG** ne sont ni assez denses ni ne couvrent complètement la surface. *Nagasaki* propose une méthode pour tenter de pallier à ce problème. Il a remarqué que les chaînes longues (poids moléculaire à partir de 3300) diminuaient considérablement l'adsorption de **BSA** sur une surface d'acide polylactique (PLA). Or dans le cas présent, le poids moléculaire des chaînes est de 1200, cela pourrait être un premier paramètre à améliorer. Cependant, l'augmenta-

tion de la longueur des chaînes diminuait aussi la densité de la couche et laissait passer des petites molécules qui s'adsorbaient ou réagissaient à la surface. Afin d'éviter de tels phénomènes, la construction d'une couche composée de SH-PEG sur l'or nécessiterait des SH-PEG de deux longueurs différentes. La formation d'une couche de SH-PEG de longues chaînes (5 kDa) serait améliorée par la réaction de SH-PEG (2 kDa) sur l'or entre ces premières molécules. Les molécules à longues chaînes repousseraient les protéines avec un poids moléculaires supérieurs à 10 kDa tandis que les chaînes plus courtes repousseraient l'adsorption des protéines de poids moléculaires inférieurs qui auraient réussi à passer la première barrière. [81] L'expérience avec le transfert sur les couches de PEG devrait être refaite en considérant les idées de *Nagasaki* pour améliorer la couche de PEG. Il faudrait ensuite analyser avec les profils si des molécules de protéines pénètrent dans la couche formée après avoir atteint la première interface. Si c'était le cas, des mesures pour réduire l'énergie cinétique trop importante des molécules devraient être prises en compte.

Nous pourrions également jouer avec les brosses de polymères thermo-sensibles. Il faudrait alors choisir un polymère dont la température de solubilité critique la plus haute soit supérieure à la température ambiante (condition dans lesquelles les transferts sont réalisés actuellement) et inférieure à la température de dénaturation des protéines. En-dessous de cette température, les polymères se replient sur eux et permettent le transfert de protéines sur cette couche. Au-delà, le phénomène inverse est observé, ils deviennent solubles et repoussent les protéines en solution. Il est important que cette température ne dépasse pas la température de dénaturation des protéines, car nous souhaitons récupérer des protéines encore actives. [82] D'autre part, si l'expérience est réitérée avec une protéine thermophile et une couche en brosse de polymères thermo-sensibles, la température de solubilité critique la plus haute du polymère choisi doit toujours être supérieure à la température ambiante, mais cette fois-ci peut valoir jusqu'à 100° (température de dénaturation des protéines thermophiles).

Dans le but de parvenir à la construction d'un échantillon où aucune molécule de protéine n'atteindrait le substrat de silicium, soit trois couches pures et distinctes, soit quatre couches dont l'avant-dernière n'est pas composée de protéine ; nous pourrions tenter de diminuer l'énergie cinétique des molécules pulvérisées en diminuant l'énergie par atome des agrégats d'argon envoyé sur la cible. Cela est possible en diminuant l'énergie d'accélération du faisceau ou en utilisant des agrégats plus grands tels que l' Ar_{5000}^+ (pour rappel les transferts ont été réalisés à l' Ar_{3000}^+ accélérés à 10 keV). Si la deuxième solution est choisie, alors des temps de transfert plus longs seront nécessaires pour atteindre des mêmes densités d'ions

primaires, car le courant est plus faible.

Une dernière idée pour récupérer au maximum les molécules entières est de diminuer le temps de dépôt des gouttes d'eau. Par conséquent, la réadsorption de ces molécules sur le substrat de silicium nu pourrait être évitée.

Nous avons vu dans le relargage des protéines, que la proportion de l'ion moléculaire relargué par rapport à celui restant sur la surface semblait plus grande que celle des fragments. Afin de vérifier si seul l'ion moléculaire a été relâché ou non, il serait intéressant de produire deux transferts de lysozyme sur une couche sacrificielle ou fonctionnalisée dans des conditions identiques. Sur la solution récupérée du premier transfert, un test BCA pourrait être élaboré. Tandis que sur la solution récupérée du deuxième transfert, nous pourrions faire un test d'activité enzymatique qui fonctionne uniquement avec les molécules intactes. Avec les courbes de calibration de chacun des tests, deux masses seraient estimées. Si les deux masses sont similaires, cela pourrait confirmer l'hypothèse que seuls les molécules entières sont récupérés. Si celle calculée avec le test BCA est significativement plus grande, alors nous aurions récupéré une grande quantité de fragments également. Si le résultat inverse est observé, c'est qu'une erreur dans le protocole du test a eu lieu ou que les conditions de transferts n'étaient pas les mêmes. Des répétitions de l'expérience sont incontestablement nécessaires pour vérifier la tendance des résultats, mais il faudra certainement être attentif à la reproductibilité des transferts. Étant donné que le courant du faisceau varie souvent d'un jour à l'autre, ce n'est pas à la durée du transfert qu'il faut prêter attention, mais à la densité d'ions primaires envoyés sur la cible. Ce paramètre est primordial. D'un autre côté, nous avons observé que le courant ne variait pas beaucoup entre deux transferts consécutifs. Dès lors, cela pourrait tendre vers des temps de transferts similaires, en gardant toujours à l'esprit la densité d'ions primaires envoyés sur la cible.

Ensuite, cela pourrait être intéressant d'augmenter la proportion du transfert de molécules intactes en jouant sur différentes combinaisons des paramètres de transfert.

Finalement, réaliser ces transferts sur les substrats fonctionnalisés ou augmentés d'une couche sacrificielle avec des protéines plus larges que la bradykinine serait une étape supplémentaire dans le développement de cette méthode de dépôts de protéines.

En conclusion, nous pouvons considérer la méthode de transfert de protéines à l'aide d'agrégats d'argon fiable : le transfert de protéines a été confirmé à multiples

reprises. En outre, ce travail a démontré différentes façons de quantifier la masse transférée. Néanmoins, cette méthode demande du temps, qui de surcroît, augmente à mesure que la protéine transférée est large. En effet, des énergies par atomes plus faibles sont utilisées pour transférer ces molécules, et ainsi leur induire le moins de dommages possibles. Par ailleurs, ces énergies par atome qui diminuent amènent à une densité d'ions dirigée sur la cible plus basse et de ce fait, moins d'espèces pulvérisées sont récupérées sur le collecteur. Un autre inconvénient de cette méthode de dépôt des protéines est la reproductibilité difficile des résultats. Ils dépendent d'un nombre important de facteurs tels que la couche de protéines sur la cible, le courant du faisceau d'ions primaires, les positions de la cible et du collecteur par rapport à ce faisceau ou encore les sources multiples de contamination des échantillons. Comme il est observé grâce à l'analyse des résultats des diverses expérimentations faites, l'ensemble de ces facteurs risque d'influencer très sensiblement les résultats pour un temps de transfert identique.

On n'imagine plus aujourd'hui le développement de la médecine sans avancée majeure dans la science des biomatériaux. Rendre les surfaces des matériaux fonctionnelles par adsorption et colonisation de protéines représente une étape fondamentale dans ces avancées. Le défi est difficile. Le champ d'investigation est vaste et complexe, mais tellement riche et passionnant.

Bibliographie

- [1] Elias FATTAL. *Matériaux pour la médecine de demain*. Jan. 2017. DOI : [10.1051/medsci/20173301002](https://doi.org/10.1051/medsci/20173301002).
- [2] Joon B. PARK et Roderic S. LAKES. *Biomaterials*. Boston, MA : Springer US, 1992. ISBN : 978-1-4757-2158-4. DOI : [10.1007/978-1-4757-2156-0](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2156-0). URL : <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4757-2156-0>.
- [3] Mickaël ROPARS et al. *Techniques and outcomes of hip abductor reconstruction following tumor resection in adults*. Fév. 2021. DOI : [10.1016/j.otsr.2020.102765](https://doi.org/10.1016/j.otsr.2020.102765).
- [4] Maria M. SANTORE et Christian F. WERTZ. "Protein spreading kinetics at liquid-solid interfaces via an adsorption probe method". In : *Langmuir* 21.22 (oct. 2005), p. 10172-10178. ISSN : 07437463. DOI : [10.1021/la051059s](https://doi.org/10.1021/la051059s).
- [5] Giang LAM VUONG et al. *Improved sensitivity proteomics by postharvest alkylation and radioactive labeling of proteins*. Rapp. tech.
- [6] António J.M. RIBEIRO et al. *A global analysis of function and conservation of catalytic residues in enzymes*. Jan. 2020. DOI : [10.1074/jbc.REV119.006289](https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006289).
- [7] María Isabela AVILA RODRÍGUEZ, Laura G. RODRÍGUEZ BARROSO et Mirna Lorena SÁNCHEZ. *Collagen : A review on its sources and potential cosmetic applications*. Fév. 2018. DOI : [10.1111/jocd.12450](https://doi.org/10.1111/jocd.12450).
- [8] *Colageno para todo*. Rapp. tech. 60 y mas, 2016. URL : <http://www.revista60ymas.es/InterPresent1/groups/revistas/documents/binario/ses330informe.pdf>.
- [9] Salah A.A. MOHAMED, Mohamed EL-SAKHAWY et Mohamed Abdel Monem EL-SAKHAWY. *Polysaccharides, Protein and Lipid -Based Natural Edible Films in Food Packaging : A Review*. Juin 2020. DOI : [10.1016/j.carbpol.2020.116178](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116178).
- [10] Michael RABE, Dorinel VERDES et Stefan SEEGER. *Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces*. Fév. 2011. DOI : [10.1016/j.cis.2010.12.007](https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.007).

-
- [11] Jeremy M. BERG, John L. TYMOCZKO et Lubert STRYER. *Biochemistry fifth edition*. Rapp. tech.
- [12] Fabienne PONCIN-EPAILLARD et al. "Surface Treatment of Polymeric Materials Controlling the Adhesion of Biomolecules". In : *Journal of Functional Biomaterials* 3.3 (août 2012), p. 528-543. ISSN : 2079-4983. DOI : [10.3390/jfb3030528](https://doi.org/10.3390/jfb3030528).
- [13] Louise HAMBORG et al. "Global analysis of protein stability by temperature and chemical denaturation". In : *Analytical Biochemistry* 605 (sept. 2020). ISSN : 10960309. DOI : [10.1016/j.ab.2020.113863](https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113863).
- [14] Willem NORDE. *My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond*. Jan. 2008. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2007.09.029](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.09.029).
- [15] Marie HOARAU, Somayesadat BADIEYAN et E. Neil G. MARSH. *Immobilized enzymes : Understanding enzyme-surface interactions at the molecular level*. 2017. DOI : [10.1039/c7ob01880k](https://doi.org/10.1039/c7ob01880k).
- [16] Jamshed IQBAL, Shoaib IQBAL et Christa E. MÜLLER. *Advances in immobilized enzyme microreactors in capillary electrophoresis*. Juin 2013. DOI : [10.1039/c3an00031a](https://doi.org/10.1039/c3an00031a).
- [17] Cesar MATEO et al. *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Mai 2007. DOI : [10.1016/j.enzmictec.2007.01.018](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018).
- [18] Irving LANGMUIR et Vol 54. *Vapor pressures, evaporation, condensation and adsorption*. Rapp. tech. 1932, p. 2798-2832.
- [19] Xuhua XIA. *Bioinformatics and the cell : modern computational approaches in genomics, proteomics, and transcriptomics*. Springer, mai 2007, p. 349. ISBN : 0387713360.
- [20] Christian F. WERTZ et Maria M. SANTORE. "Fibrinogen adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces : Geometrical and energetic aspects of interfacial relaxations". In : *Langmuir* 18.3 (fév. 2002), p. 706-715. ISSN : 07437463. DOI : [10.1021/la011075z](https://doi.org/10.1021/la011075z).
- [21] Willem NORDE. *Driving forces for protein adsorption at solid surfaces*. Rapp. tech. 1996, p. 5-18.
- [22] Willem NORDE et Carla E GIACOMELLI. *BSA structural changes during homomolecular exchange between the adsorbed and the dissolved states*. Rapp. tech. 2000, p. 259-268. URL : www.elsevier.com/locate/jbiotec.
- [23] L VROMAN et A L ADAMS. *Findings with the recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid solid interfaces **. Rapp. tech. 1969, p. 438-446.

- [24] Stacey L. HIRSH et al. "The Vroman effect : Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates". In : *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* 103 (mars 2013), p. 395-404. ISSN : 09277765. DOI : [10.1016/j.colsurfb.2012.10.039](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.039).
- [25] B O LASSEN et Martin MALMSTEN. *Competitive Protein Adsorption at Plasma Polymer Surfaces*. Rapp. tech. 1997, p. 9-16.
- [26] Martin LUNDQVIST, Ingmar SETHSON et Bengt Harald JONSSON. "Protein adsorption onto silica nanoparticles : Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability". In : *Langmuir* 20.24 (nov. 2004), p. 10639-10647. ISSN : 07437463. DOI : [10.1021/la0484725](https://doi.org/10.1021/la0484725).
- [27] 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).
- [28] Willem NORDE, Thomas A. HORBETT et John L. BRASH. "Proteins at interfaces III : Introductory overview". In : *ACS Symposium Series*. T. 1120. American Chemical Society, déc. 2012, p. 1-34. ISBN : 9780841227965. DOI : [10.1021/bk-2012-1120.ch001](https://doi.org/10.1021/bk-2012-1120.ch001).
- [29] Arnaud DELCORTE, Christine DUPONT et Clément LAUZIN. *Molecular tailoring with cluster ion beams*. Rapp. tech. Louvain-la-Neuve : Université Catholique de Louvain, 2018.
- [30] Cristèle J. NONCKREMAN, Paul G. ROUXHET et Christine C. DUPONT-GILLAIN. "Dual radiolabeling to study protein adsorption competition in relation with hemocompatibility". In : *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 81.4 (juin 2007), p. 791-802. ISSN : 15493296. DOI : [10.1002/jbm.a.31111](https://doi.org/10.1002/jbm.a.31111).
- [31] M. HENRY, C. DUPONT-GILLAIN et P. BERTRAND. "Characterization of insulin adsorption in the presence of albumin by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy". In : *Langmuir* 24.2 (jan. 2008), p. 458-464. ISSN : 07437463. DOI : [10.1021/la701850p](https://doi.org/10.1021/la701850p).
- [32] I. JACQUEMART et al. "Nanostructured collagen layers obtained by adsorption and drying". In : *Journal of Colloid and Interface Science* 278.1 (oct. 2004), p. 63-70. ISSN : 00219797. DOI : [10.1016/j.jcis.2004.05.040](https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.05.040).
- [33] Yuan GAO et Ilias KYRATZIS. *Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide - A critical assessment*. 2008. DOI : [10.1021/bc800051c](https://doi.org/10.1021/bc800051c).

- [34] Grant E. JOHNSON, Qichi HU et Julia LASKIN. *Soft landing of complex molecules on surfaces*. Juill. 2011. DOI : [10.1146/annurev-anchem-061010-114028](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061010-114028).
- [35] Bruno DOMON et Ruedi AEBERSOLD. *Mass spectrometry and protein analysis*. Avr. 2006. DOI : [10.1126/science.1124619](https://doi.org/10.1126/science.1124619).
- [36] Stephan RAUSCHENBACH et al. "Mass Spectrometry as a Preparative Tool for the Surface Science of Large Molecules". In : *Annual Review of Analytical Chemistry* 9 (juin 2016), p. 473-498. ISSN : 19361335. DOI : [10.1146/annurev-anchem-071015-041633](https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041633).
- [37] Zheng OUYANG et al. "Preparing protein microarrays by soft-landing of mass-selected ions". In : *Science* 301.5638 (sept. 2003), p. 1351-1354. ISSN : 00368075. DOI : [10.1126/science.1088776](https://doi.org/10.1126/science.1088776).
- [38] Erich RADAUSCHER. "Design, Fabrication, and Characterization of Carbon Nanotube Field Emission Devices for Advanced Applications Proof of Concept Coded Aperture Miniature Mass Spectrometer Using a Cycloidal Sector Mass Analyzer, a Carbon Nanotube (CNT) Field Emission Electron Ionization Source, and an Array Detector View project". In : (jan. 2015). DOI : [10.13140/RG.2.2.16376.85767](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16376.85767). URL : <https://www.researchgate.net/publication/312664731>.
- [39] Bogdan GOLOGAN et al. "Ion soft-landing into liquids : Protein identification, separation, and purification with retention of biological activity". In : *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15.12 (déc. 2004), p. 1874-1884. ISSN : 10440305. DOI : [10.1016/j.jasms.2004.09.005](https://doi.org/10.1016/j.jasms.2004.09.005).
- [40] S. A. MILLER et al. "Soft-Landing of Polyatomic Ions at Fluorinated Self-Assembled Monolayer Surfaces". In : *Science* 275 (mars 1997), p. 1447-1450.
- [41] John B FENN et al. *Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules*. Rapp. tech. URL : www.sciencemag.org.
- [42] John C. VICKERMAN et David R. BRIGGS. *ToF-SIMS : surface analysis by mass spectrometry*. 2nd Edition. 2001, p. 1-37.
- [43] Arnaud DELCORTE et al. *Large cluster ions : Soft local probes and tools for organic and bio surfaces*. Août 2020. DOI : [10.1039/d0cp02398a](https://doi.org/10.1039/d0cp02398a).
- [44] Arnaud DELCORTE et al. "Chemical Analysis of Plasma-treated Organic Surfaces and Plasma Polymers by Secondary Ion Mass Spectrometry". In : *Plasma Processes and Polymers* 12.9 (sept. 2015), p. 905-918. ISSN : 16128869. DOI : [10.1002/ppap.201500061](https://doi.org/10.1002/ppap.201500061).

- [45] Matthias LORENZ et al. "Angular distribution of molecules sputtered by gas cluster ion beams and implications for secondary neutral mass spectrometry". In : *Journal of Physical Chemistry C* 120.44 (nov. 2016), p. 25317-25327. ISSN : 19327455. DOI : [10.1021/acs.jpcc.6b06821](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b06821).
- [46] John C VICKERMAN. *ToF-SIMS - An Overview*. Rapp. tech. URL : <https://www.researchgate.net/publication/266462581>.
- [47] K SATTLER, J MUHLBACH et E RECKNAGEL. *Generation of Metal Clusters Containing from 2 to 500 Atoms*. Rapp. tech. 1980.
- [48] B CABAUD, A HOAREAU et P MELINON. *Time-of-flight spectroscopy of a supersonic beam of mercury. Intensities and appearance potentials of Hg x aggregates*. *Time-of-flight spectroscopy of a supersonic beam of mercury. Intensities and appearance potentials of Hg, aggregates*. Rapp. tech. 1980, p. 1831-1835. URL : <http://iopscience.iop.org/0022-3727/13/10/011>.
- [49] Kousuke MORITANI et al. "New design and development of size-selected gas cluster SIMS". In : *Electrical Engineering in Japan (English translation of Denki Gakkai Ronbunshi)* 176.3 (août 2011), p. 52-58. ISSN : 04247760. DOI : [10.1002/eej.21159](https://doi.org/10.1002/eej.21159).
- [50] Kousuke MORITANI et al. "Large molecular cluster formation from liquid materials and its application to ToF-SIMS". In : *Quantum Beam Science* 5.2 (juin 2021). ISSN : 2412382X. DOI : [10.3390/qubs5020010](https://doi.org/10.3390/qubs5020010).
- [51] D Shannon CORNETT, Terry D LEE et John F MAHONEY. *Matrix-free Desorption of Biomolecules Using Massive Cluster Impact*. Rapp. tech. 1994, p. 996-1000.
- [52] J F MAHONEY et al. *Massive Cluster Impact Mass Spectrometry : A New Desorption Method for the Analysis of Large Biomolecules*. Rapp. tech. 1991, p. 441-445.
- [53] Amir Saeid MOHAMMADI et al. "Intact lipid imaging of mouse brain samples : MALDI, nanoparticle-laser desorption ionization, and 40 keV argon cluster secondary ion mass spectrometry". In : *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408.24 (sept. 2016), p. 6857-6868. ISSN : 16182650. DOI : [10.1007/s00216-016-9812-5](https://doi.org/10.1007/s00216-016-9812-5).
- [54] Timothy J. BARNES, Ivan M. KEMPSON et Clive A. PRESTIDGE. *Surface analysis for compositional, chemical and structural imaging in pharmaceuticals with mass spectrometry : A ToF-SIMS perspective*. Sept. 2011. DOI : [10.1016/j.ijpharm.2011.01.043](https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.01.043).
- [55] Sara RONCA. "Polyethylene". In : *Brydson's Plastics Materials : Eighth Edition*. Elsevier Inc., 2017, p. 247-278. ISBN : 9780323358248. DOI : [10.1016/B978-0-323-35824-8.00010-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00010-4).

- [56] Alan D. ELBEIN et al. *New insights on trehalose : A multifunctional molecule*. Avr. 2003. DOI : [10.1093/glycob/cwg047](https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047).
- [57] Roberto D LINS, Cristina S PEREIRA et Philippe H HÜ. *Trehalose-Protein Interaction in Aqueous Solution*. Rapp. tech. 2004, p. 177-186.
- [58] Tsutomu ARAKAWAT et Serge N TIMASHEFF. *Mechanism of Poly(ethylene glycol) Interaction with Proteins ?* Rapp. tech. 11. 1985, p. 6709-67.
- [59] Priyadarshini SINGHA, Jason LOCKLIN et Hitesh HANDA. *A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters*. Mars 2017. DOI : [10.1016/j.actbio.2016.11.070](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.070).
- [60] M. MAURER et al. *New topics in bradykinin research*. Nov. 2011. DOI : [10.1111/j.1398-9995.2011.02686.x](https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02686.x).
- [61] MERCK SIGMA ALDRICH. *Bradykinin acetate salt*. URL : <https://www.sigmaaldrich.com/BE/en/product/sigma/b3259>.
- [62] Rajaram SWAMINATHAN et al. "Lysozyme : A model protein for amyloid research". In : *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. T. 84. Academic Press Inc., 2011, p. 63-111. DOI : [10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386483-3.00003-3).
- [63] Pierre JOLLBS et Jacqueline JOLLBS. *What's new in lysozyme research ?* Always a model system, today as yesterday*. Rapp. tech. 1984, p. 189.
- [64] Robert E CANFIELD et Anne K LIU. *The Disulfide Bonds of Egg White Lysozyme (Muramidase)*. Rapp. tech. 5. 1965.
- [65] Efstratios MYLONAS et Dimitri I. SVERGUN. "Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering". In : *Applied Crystallography* 40 (2007), p. 245-249. ISSN : 0021-8898. DOI : [10.1107/S002188980700252X](https://doi.org/10.1107/S002188980700252X).
- [66] RCSB PDB PROTEIN DATA BANK. *1HEW Refinement of an enzyme complex with inhibitor bound at partial occupancy. Hen egg-white lysozyme and tri-N-acetylchitotriose at 1.75 Angstroms resolution*. URL : <https://www.rcsb.org/structure/1HEW>.
- [67] Wirnt RICK. "Trypsin". In : *Methods of Enzymatic Analysis*. Elsevier, 1974, p. 1013-1024. DOI : [10.1016/B978-0-12-091302-2.50099-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-091302-2.50099-2). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780120913022500992>.
- [68] RCSB PDB PROTEIN DATA BANK. "2BZA Bovine pancreas beta-trypsin in complex with benzylamine". In : (). URL : <https://www.rcsb.org/structure/2BZA>.
- [69] SAMCO INC. *The Basics of UV-Ozone Cleaning of Surfaces*. URL : <https://www.samcointl.com/basics-uv-ozone-cleaning-surfaces/>.

- [70] Hidetaka KONNO. "X-ray Photoelectron Spectroscopy". In : *Materials Science and Engineering of Carbon*. Elsevier, 2016, p. 153-171. DOI : [10.1016/B978-0-12-805256-3.00008-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805256-3.00008-8). URL : <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128052563000088>.
- [71] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. URL : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23227>.
- [72] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Pierce Fluorescent Protease Assay Kit*. URL : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23266>.
- [73] J D MILTON. *The effect of reducing and non-reducing sugars on the bicinchoninic acid reaction for protein determination*. Rapp. tech. 1992, p. 141-143.
- [74] Arnaud DELCORTE et Claude POLEUNIS. "Mechanistic Insight into Gas Cluster-Induced Sputtering of Kilodalton Molecules Using Kinetic Energy Distribution Measurements". In : *Journal of Physical Chemistry C* 123.32 (août 2019), p. 19704-19714. ISSN : 19327455. DOI : [10.1021/acs.jpcc.9b05363](https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b05363).
- [75] Bogdan ZDYRKO et Igor LUZINOV. *Polymer brushes by the "grafting to" method*. Juin 2011. DOI : [10.1002/marc.201100162](https://doi.org/10.1002/marc.201100162).
- [76] J. Christopher LOVE et al. *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*. Avr. 2005. DOI : [10.1021/cr0300789](https://doi.org/10.1021/cr0300789).
- [77] ABCAM. *InstantBlue® Coomassie Protein Stain*. URL : <https://www.abcam.com/instantblue-coomassie-protein-stain-isb11-ab119211.html>.
- [78] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Protein Gel Staining Methods*. URL : <https://www.thermofisher.com/be/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/protein-gel-stains.html>.
- [79] THERMO FISHER SCIENTIFIC. *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa*. URL : <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/26617>.
- [80] A. RUIZ et al. "Stem-cell culture on patterned bio-functional surfaces". In : *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 19.12 (déc. 2008), p. 1649-1657. ISSN : 15685624. DOI : [10.1163/156856208786440514](https://doi.org/10.1163/156856208786440514).
- [81] Yukio NAGASAKI. *Construction of a densely poly(ethylene glycol)-chain-tethered surface and its performance*. Déc. 2011. DOI : [10.1038/pj.2011.93](https://doi.org/10.1038/pj.2011.93).

- [82] A. K. TEOTIA, H. SAMI et A. KUMAR. “Thermo-responsive polymers : Structure and design of smart materials”. In : *Switchable and Responsive Surfaces and Materials for Biomedical Applications*. Elsevier Inc., jan. 2015, p. 3-43. ISBN : 9780857097170. DOI : [10.1016/B978-0-85709-713-2.00001-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-85709-713-2.00001-8).

Annexe A

Courbes de calibration des tests **BCA**

Cette annexe reprend toutes les courbes de calibration réalisées pour les tests **BCA**.

A.1 Courbe de référence pour le lysozyme

Une calibration avec une gamme de masse du lysozyme allant de 0 à 1 μg est construite sur la Figure **A.1** avec le kit de dosage **BCA** afin d'y comparer d'autres résultats. Le lysozyme se trouve en solution d'eau pure.

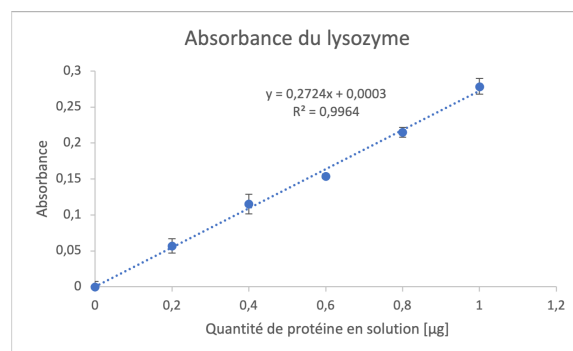


FIGURE A.1 – Courbe de calibration du lysozyme avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,272352381 x + 0,000334921$.

A.2 Pour transferts sur films de **PE**

Cette calibration est élaborée en déposant une quantité de solution de lysozyme dans de l'eau pure sur des films de **PE** pour obtenir une gamme de masse de 0 à 1

μg , Figure **A.2**. Ensuite, les échantillons sont placés dans l'incubateur à 40° pour sécher. Son but : vérifier que le **PE** n'interfère avec le test **BCA**.

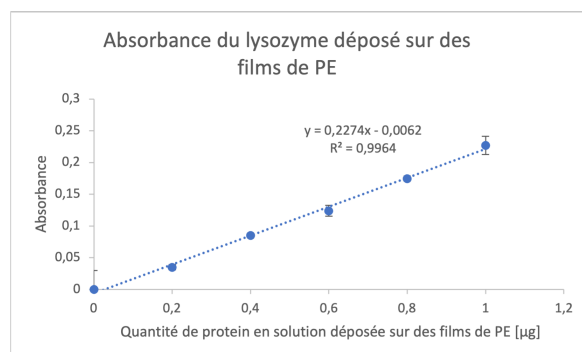


FIGURE A.2 – Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de **PE** avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,227357143 x - 0,006150794$.

A.2.1 Transfert de bradykinine sur **PE**

Ces deux graphes (Figures **A.3** et **A.4**) représentent les courbes de calibration réalisées pour la quantification de la bradykinine transférée sur les films de **PE** avec le kit de dosage **BCA**.

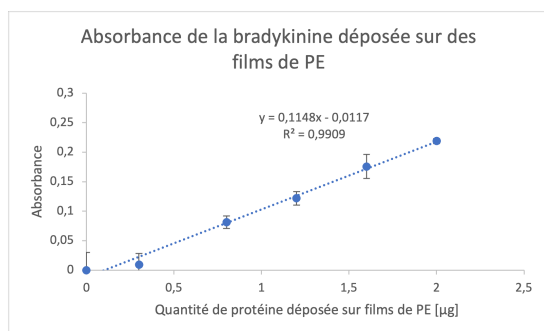


FIGURE A.3 – Courbe de calibration de la bradykinine déposée sur des films de **PE** pour la première série de transferts avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,114788845 x - 0,011742364$.

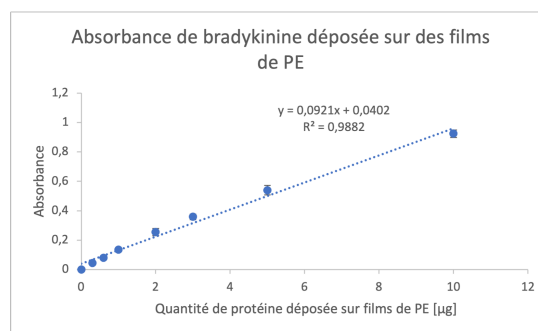


FIGURE A.4 – Courbe de calibration de la bradykinine déposée sur des films de **PE** pour la deuxième série de transferts avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,092126705 x + 0,040232311$.

A.2.2 Transfert de lysozyme sur **PE**

Sur les deux prochaines Figures **A.5** et **A.6**, les courbes de calibration pour quantifier les deux séries de transfert du lysozyme sur des films de **PE** avec le kit de dosage **BCA** sont déterminées.

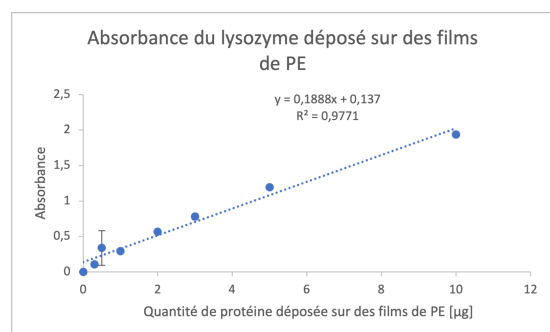


FIGURE A.5 – Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de **PE** pour la première série de transferts avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,188814526 x + 0,136984582$.

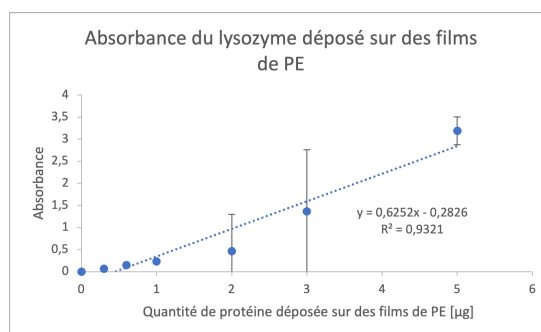


FIGURE A.6 – Courbe de calibration du lysozyme déposé sur des films de **PE** pour la deuxième série de transferts avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,625206382 x - 0,282560374$.

A.3 Avec différentes solutions

Les trois prochaines courbes (Figures **A.7**, **A.8** et **A.9**) de calibration sont construites avec le kit de dosage **BCA** dans le but de vérifier si le **PEG**, fructose ou tréhalose ont une interférence sur les mesures.

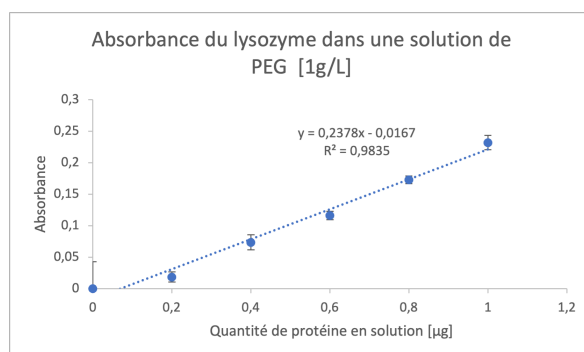


FIGURE A.7 – Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de **PEG** avec le kit de dosage **BCA**. Elle a pour équation : $y = 0,237780952 x - 0,016668254$.

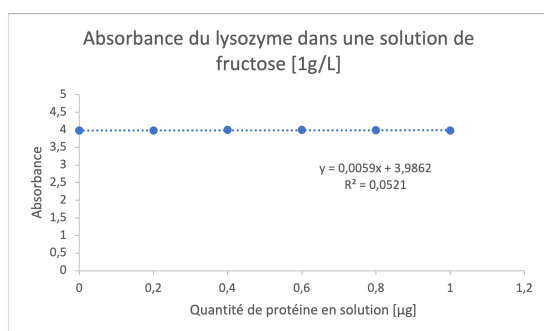


FIGURE A.8 – Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de fructose avec le kit de dosage BCA. Elle a pour équation : $y = 0,005857143 x + 3,986249206$.

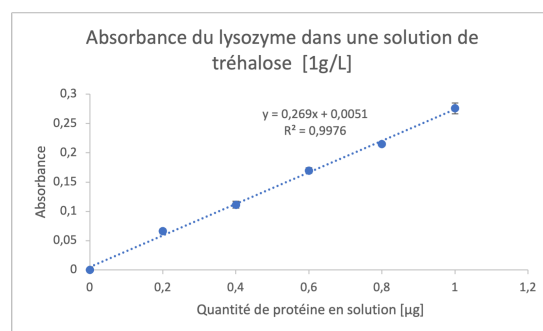


FIGURE A.9 – Courbe de calibration du lysozyme dans une solution de tréhalose avec le kit de dosage BCA. Elle a pour équation : $y = 0,269033333 x + 0,005111111$.

Annexe B

Référence de l'ion moléculaire de la bradykinine

Cette partie de spectre montre les pics des isotopes de l'ion moléculaire de la bradykinine qui a gagné un atome hydrogène à la Figure B.1. Il s'agit d'une surface de référence créée en déposant la protéine par *spin-coating* et analysée par Bi_5^+ .

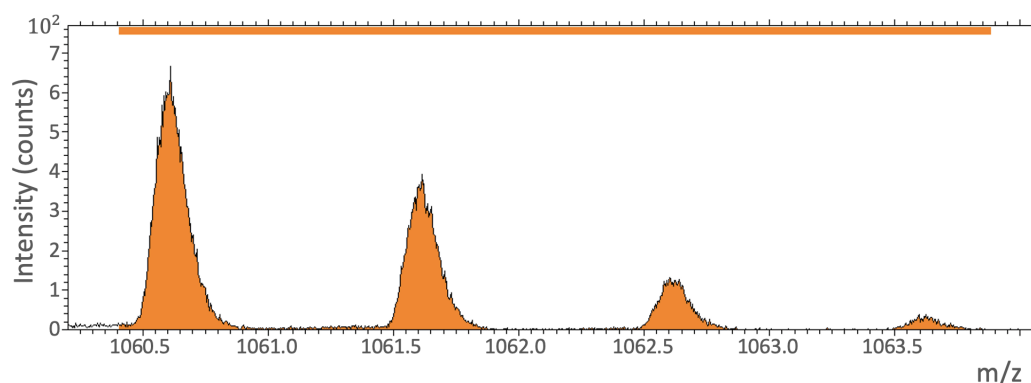


FIGURE B.1 – Référence des isotopes de l'ion moléculaire $[M+H]^+$ de la bradykinine déposée par *spin-coating* sur du silicium et analysée par Bi_5^+ .

L'abondance de chaque isotope n'est pas égale. Sur la Figure ci-dessus, chaque pic représente un isotope. Le premier correspond au $C_{50}H_{74}N_{15}O_{11}$ et est abondant à environ 54%. Le deuxième avec environ 32% d'abondance est celui du $^{13}CC_{49}H_{74}N_{15}O_{11}$. $^{13}C_2C_{48}H_{74}N_{15}O_{11}$ est présent à 11%. Finalement, le dernier représente $^{13}C_3C_{47}H_{74}N_{15}O_{11}$ avec 2, 5%.

Annexe C

Caractérisation de la couche de tréhalose

L'annexe C résume les cartographies réalisées sur l'échantillon avec une couche de tréhalose dont le transfert de bradykinine a duré 1h30, avant et après le relargage de la protéine en solution.

C.1 Après le transfert de bradykinine

Les cartographies de la Figure [C.1](#) sont faites à l'aide d'un faisceau de Bi_5^+ accéléré à 30 [keV](#) après le transfert de bradykinine d'1h sur une couche de tréhalose.

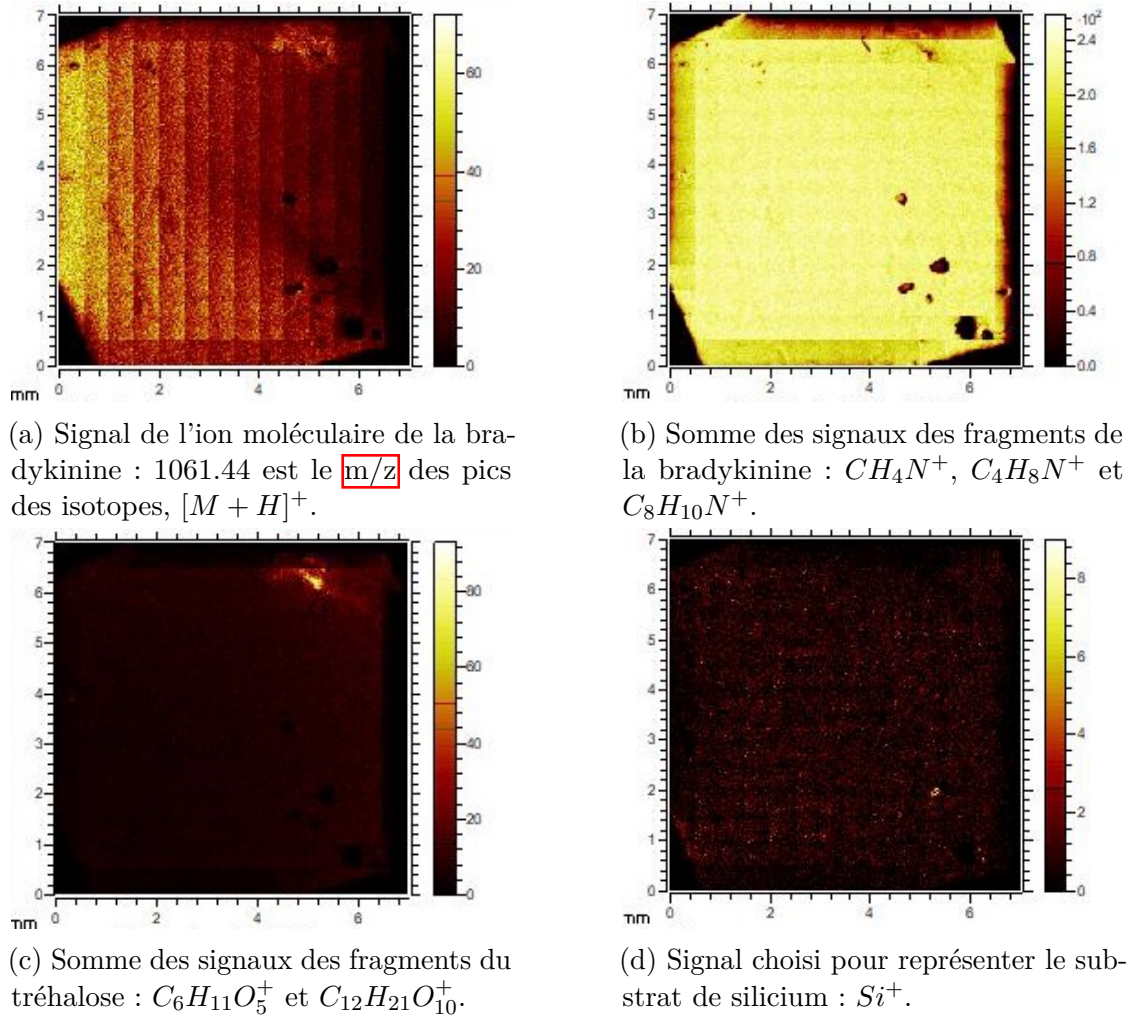
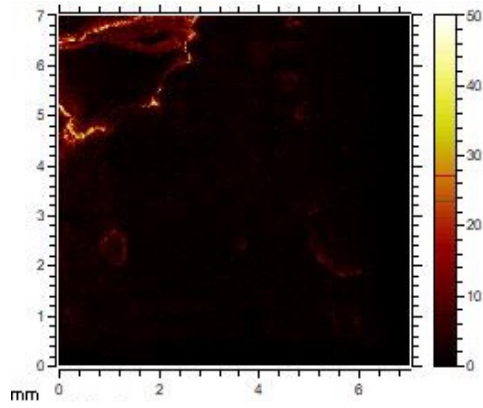


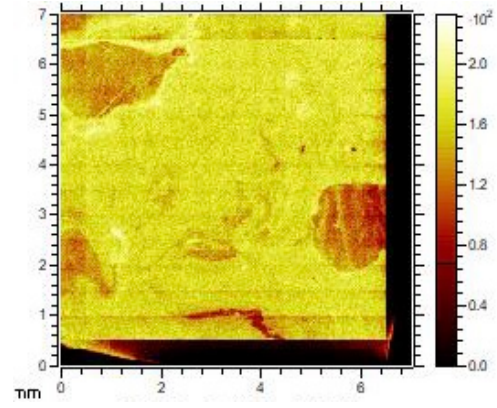
FIGURE C.1 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 1h30.

C.2 Après le relargage de bradykinine et du tréhalose en solution

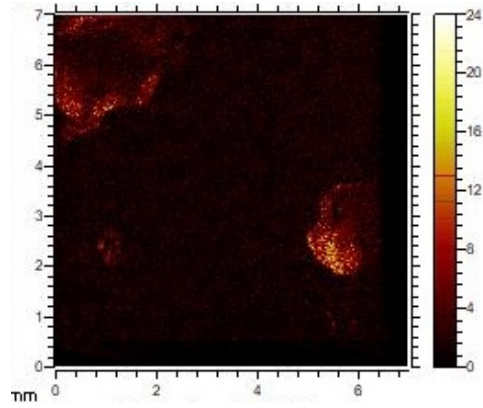
Les cartographies de la Figure C.2 sont obtenues grâce à un faisceau de Bi_5^+ accéléré à 30 keV après avoir déposé deux gouttes d' H_2O sur l'échantillon avec le transfert de bradykinine d'1h.



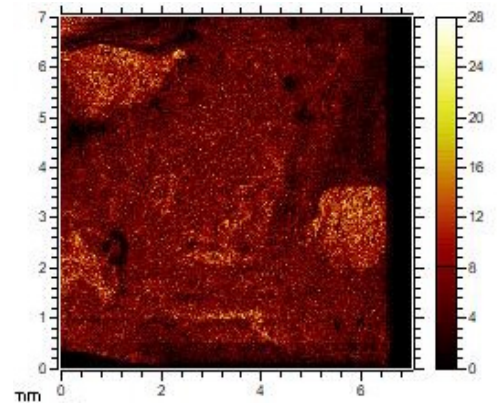
(a) Signal de l'ion moléculaire de la bradykinine : 1061.44 est le m/z des pics des isotopes, $[M + H]^+$.



(b) Somme des signaux des fragments de la bradykinine : CH_4N^+ , $C_4H_8N^+$ et $C_8H_{10}N^+$.



(c) Somme des signaux des fragments du tréhalose : $C_6H_{11}O_5^+$ et $C_{12}H_{21}O_{10}^+$.



(d) Signal choisi pour représenter le substrat de silicium : Si^+ .

FIGURE C.2 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur une couche de tréhalose a duré 1h30, après solubilisation.

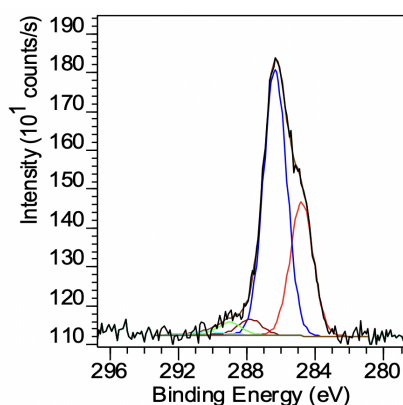
Annexe D

Caractérisation de la couche de PEG

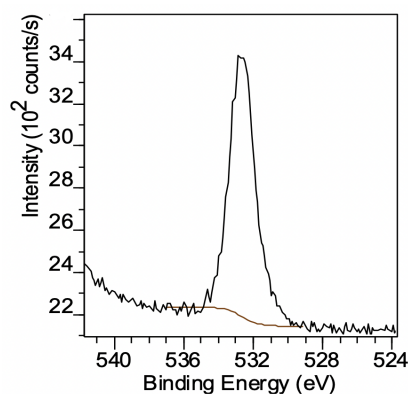
L'annexe D résume les pics des éléments obtenus par XPS, les cartographies réalisées sur l'échantillon avec une couche de PEG dont le transfert de bradykinine a duré 1h, avant et après le relargage de la protéine en solution.

D.1 Pics sur les spectres d'énergies de liaison du carbone et de l'oxygène

Les Figures D.1a et D.1b représentent les pics des spectres de l'énergie de liaison pour le carbone et l'oxygène.



(a) Pic du carbone.



(b) Pic de l'oxygène.

FIGURE D.1 – Spectre de l'énergie de liaison illustrant les pics du carbone et de l'oxygène.

Dans le pic du carbone, la courbe rouge correspond aux liaisons $C - (C, H)$, la bleue à $C - O$, la brune aux liaisons $C = O$ ou $O - C - O$, et la verte au carbone entouré de deux oxygènes, soit $O = C - O$.

D.2 Avant le transfert de bradykinine

La caractérisation de la couche de PEG avant le transfert de la bradykinine est réalisée par XPS. Le tableau D.1 reprend les pourcentages des états chimiques des éléments atomiques présents à la surface de l'échantillon.

TABLE D.1 – Composition du substrat de silicium couvert d'or avec les différentes couches de PEG du tableau 5.8. Tous les résultats sont en pourcent [%].

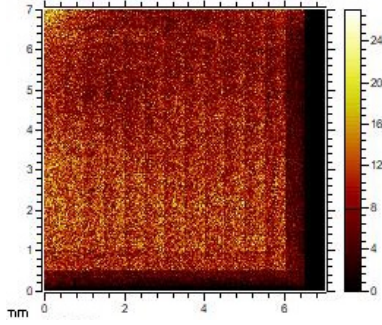
	Oxygène	Carbone				
	O 1s	C 1s				
	O tot.	O=C-O	C=O, O-C-O	C-O	C-(C,H)	C tot.
1	24	1,1	1,6	28,3	13,1	44,4
2	21,8	0,8	1,8	28,8	14,2	46,2
3	24	0,9	2	28	14,9	46,7
4	23,3	0,8	1,7	29	10,4	42,4
5	21,8	1,3	1,5	25,5	13,6	41,8
6	21,5	1,3	1,6	26,9	13,5	43,6

TABLE D.2 – Suite du tableau de la composition du substrat de silicium couvert d'or avec les différentes couches de PEG du tableau 5.8. Tous les résultats sont en pourcent [%].

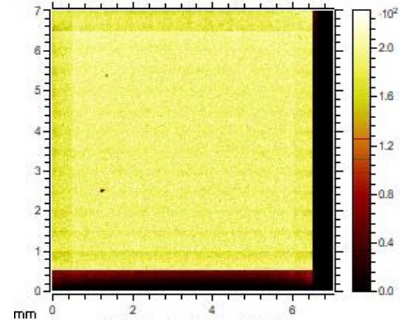
	Soufre				Or
	S 2p _{3/2}				Au 4f
	S _{ulfates}	C-SH, S-S	S-Au	S tot.	Au tot.
1	0,8	2,1	2,3	5,2	26,5
2	0,8	3,1	2,6	6,5	25,5
3	0,7	3,4	2,3	6,4	22,9
4	0,7	1,6	2,5	4,7	29,6
5	0,8	1,8	2,5	5,1	31,2
6	0,9	2,3	3	6,2	28,7

D.3 Après le transfert de bradykinine

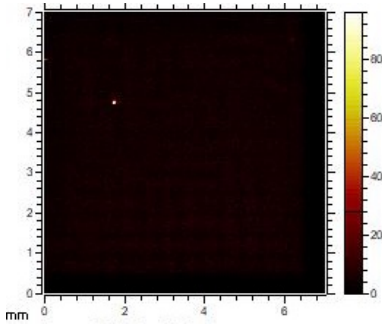
Les cartographies de la Figure D.2 de l'échantillon avec le transfert de bradykinine qui a duré 1h sont construites avec un faisceau d'analyse Bi_5^+ accéléré à 30 keV.



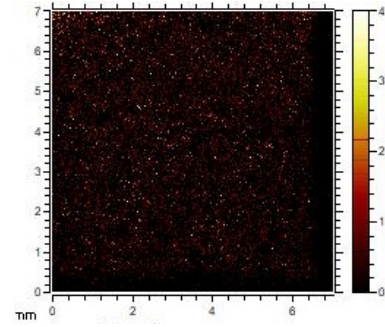
(a) Signal de l'ion moléculaire de la bradykinine : 1062.26 est le m/z des pics des isotopes, $[M + H]^+$.



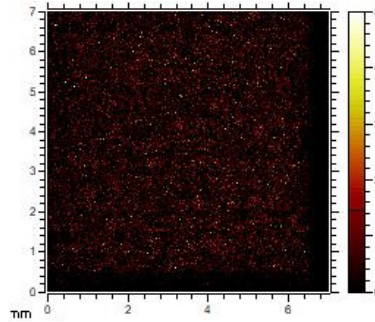
(b) Somme des signaux des fragments de la bradykinine : CH_4N^+ , $C_4H_8N^+$ et $C_8H_{10}N^+$.



(c) Somme des signaux des fragments du PEG : CH_3O^+ et $C_2H_5O^+$.



(d) Somme des signaux de l'or sur le silicium : Au^+ et Au_3^+ .



(e) Signal choisi pour représenter le substrat de silicium : Si^+ .

FIGURE D.2 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur couche de PEG a duré 1h.

D.4 Après le relargage de bradykinine en solution

Sur ces quatre images de la Figure D.3, les dernières cartographies construites à partir du faisceau de Bi_5^+ accéléré à 30 keV sont représentées. Elles sont réalisées sur l'échantillon avec couche de PEG où le transfert a duré 1h après avoir récupéré la bradykinine avec les deux gouttes d' H_2O .

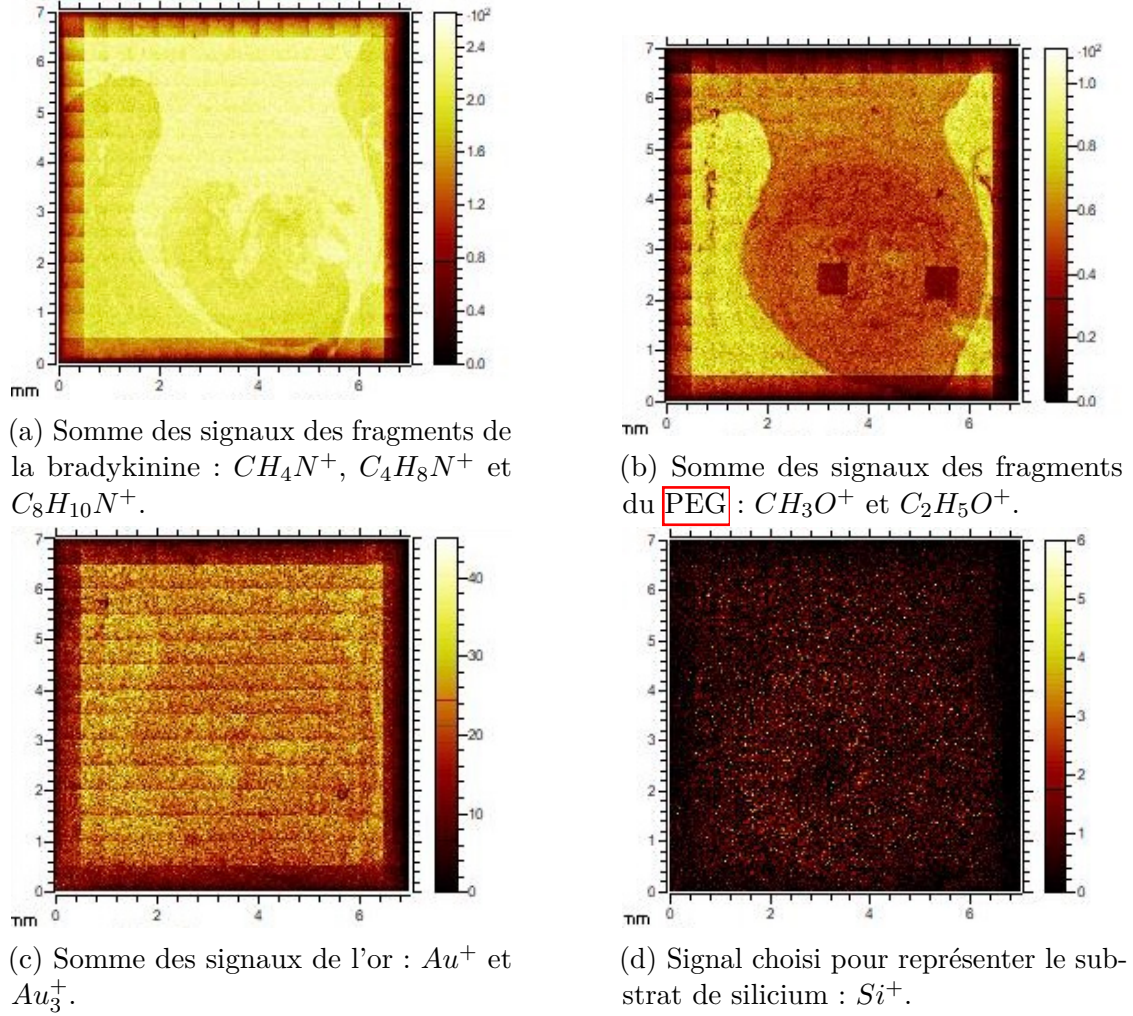


FIGURE D.3 – Cartographie de l'échantillon dont le transfert de bradykinine sur couche de PEG a duré 1h, après solubilisation.

Annexe E

Quantification de la bradykinine transférée

La courbe de calibration (Figure E.1) pour la quantification de la bradykinine transférée sur les couches de tréhalose et de PEG est réalisée avec le kit de dosage BCA pour la quantification de la bradykinine.

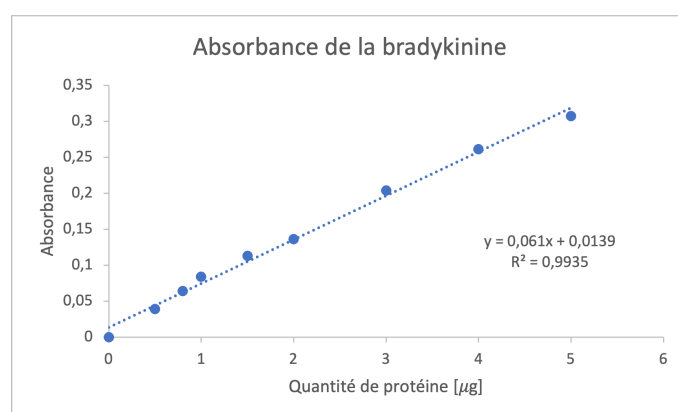


FIGURE E.1 – Courbe de calibration de la bradykinine avec le kit de dosage BCA pour la quantification de ses transferts sur couches de tréhalose et PEG. Elle a pour équation : $y = 0,060958111 x + 0,013879143$.

Annexe F

Quantification de la trypsine

La courbe de calibration pour la quantification de la trypsine transférée sur des films de PE, à la Figure F.1, est obtenue à partir d'une approximation polynomiale du second degré.

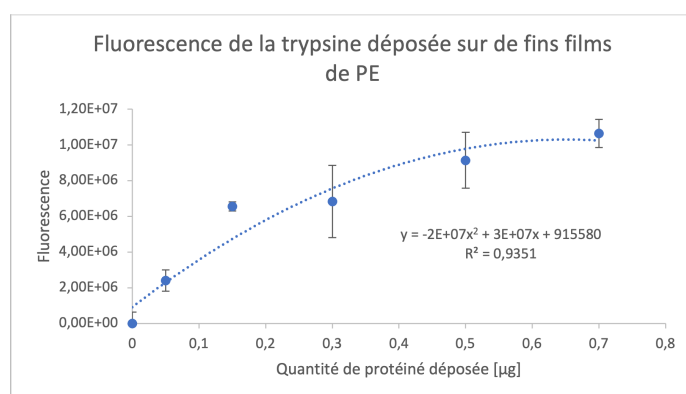


FIGURE F.1 – Courbe de calibration pour quantifier la quantité de trypsine transférée à l'aide du kit de dosage fluorescent d'une protéase avec approximation polynomiale et pour équation : $y = -22\,036\,117\,x^2 + 28\,762\,628\,x + 915\,579,61$.

La courbe de la Figure F.2 est construite en faisant la régression linéaire d'une fonction $\sqrt{x}$ qui a pour équation : $y = a\sqrt{x} + b$.

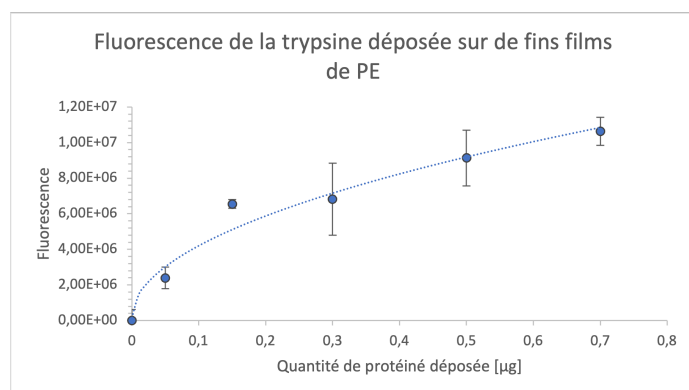


FIGURE F.2 – Courbe de calibration pour quantifier la quantité de trypsine transférée à l'aide du kit de dosage fluorescent d'une protéase avec approximation par racine carrée qui a pour équation : $y = 12758347,81\sqrt{x} + 178496,0134$. Le coefficient de détermination, R^2 vaut 0,9195.

UNIVERSITÉ CATHOLIQUE DE LOUVAIN
École polytechnique de Louvain

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