

Zeitschrift:	Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles
Herausgeber:	Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles
Band:	125-1 (2002)
Artikel:	Vers un envol de la masse maximale mesurable des macromolécules? La spectrométrie de masse avec détecteurs cryogéniques
Autor:	Gonin, Yvan / Gerber, Daniel / Gritti, Dominique
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-89567

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 18.02.2026

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

VERS UN ENVOL DE LA MASSE MAXIMALE MESURABLE DES MACROMOLÉCULES ? LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE AVEC DÉTECTEURS CRYOGÉNIQUES

YVAN GONIN¹, DANIEL GERBER^{1,3}, DOMINIQUE GRITTI^{1*},
ALEXANDRE NETUSCHILL^{1,2}, FRÉDÉRIC ROSSEL¹⁺, DOMINIQUE SCHENKER¹,
DAMIAN TWERENBOLD^{1,3} & JEAN-LUC VUILLEUMIER¹

¹Institut de Physique, Université de Neuchâtel, Rue A.-L. Breguet 1, CH-2000 Neuchâtel,
Suisse / E-mail: yvan.gonin@unine.ch

²Institut de Microtechnique, Université de Neuchâtel, Rue Jaquet-Droz 1, CH-2000 Neu-
châtel, Suisse

³GenSpec SA, Case postale 120, CH-2017 Boudry, Suisse

Mots-clés: spectrométrie de masse, temps-de-vol, cryodétecteurs, MALDI, détecteurs ionisants, protéines, cryogénie, jonctions supraconductrices à effet tunnel

Keywords: mass spectrometry, time-of-flight, cryodetectors, MALDI, ionizing detectors, proteins, cryogenics, superconducting tunnel junctions

Résumé

L'analyse des molécules par spectrométrie de masse est une technique qui est largement employée de par le monde. Cependant, l'étude de ces molécules était handicapée par le fait que l'efficacité de détection, donc d'analyse, décroît rapidement quand la masse de ces dernières augmente. Depuis quelques années, nous avons développé un nouveau type de détecteur, le cryodétecteur, qui a une efficacité de détection de 100 %. Cet article résume les activités de l'Institut de Physique concernant ce développement.

Summary

The technique of molecule analysis by mass spectrometry is a worldwide used technique which unfortunately suffers from a loss of sensitivity with increasing molecules mass. For a few years we have been developing a new kind of detectors, namely cryodetectors, which have a 100 % detection efficiency. This paper summarizes the activities undertaken in that way in the Physics Department of the University of Neuchâtel.

Zusammenfassung

Die Analyse von Molekülen mittels Massenspektrometrie hat sich weltweit durchgesetzt. Der Anwendungsbereich dieser Methode wird jedoch beschränkt durch die Tatsache, dass die

* Adresse actuelle: Observatoire cantonal, Rue de l'Observatoire 58, CH-2000 Neuchâtel, Suisse

+ Adresse actuelle: Banque cantonale vaudoise, Place St-François 14, CH-1001 Lausanne, Suisse

Empfindlichkeit der bis anhin verwendeten Detektoren für grosse Moleküle stark abnimmt. Seit einigen Jahren arbeiten wir an einem neuen Detektortyp, den Kryodetektor, dessen Empfindlichkeit unabhängig von der Molekülmasse 100 % ist. Dieses Papier beschreibt unsere diesbezüglichen Forschungsaktivitäten.

INTRODUCTION

Les sciences de la vie occupent une place particulière dans l'esprit des hommes et ce, depuis longtemps. En effet, l'étude de la génétique a toujours revêtu une place prépondérante dans la recherche scientifique. Les dernières découvertes, notamment le décodage du génome humain, ont largement contribué au développement rapide de la discipline. La biochimie et la biologie moléculaire sont, de ce fait, des domaines qui sont actuellement en forte expansion, entraînant une hausse de l'intérêt des marchés y relatifs. En conséquence, les instruments et techniques dévolus à cette recherche subissent également un développement rapide.

Comme exemple, on peut citer la technique de l'électrophorèse pour le séquençage de l'ADN, technique où l'ADN migre dans un gel sous l'effet d'un champ électrique, les petites parties se déplaçant plus vite au travers des pores que les grandes; la chromatographie est une technique également souvent utilisée. Enfin, pour déterminer la masse d'une molécule, on a recours à un instrument appelé "spectromètre de masse". Ce dernier utilise la différence du rapport masse-surcharge des atomes ionisés pour les séparer les uns des autres. La spectrométrie de masse est donc utile pour quantifier les atomes et molécules, ainsi que pour déterminer les informations chimiques et structurales des molécules.

Les spectromètres de masse jouent donc un rôle important pour la mesure de la

masse des molécules. La technique repose sur trois étapes, à savoir la vaporisation des ions, la séparation de ces derniers en fonction de leur rapport masse-sur-charge, et enfin leur détection, qui est assurée en général par un détecteur à ions. Cependant, ce dernier rencontre une baisse significative d'efficacité pour les molécules lourdes, dites macromolécules, ayant une masse de plus d'une centaine de kDa¹. Ceci provient du fait que la capacité de détection de ce détecteur à ions décroît fortement avec la vitesse d'arrivée des molécules, donc de leur masse. Plus celle-ci est importante, donc plus leur vitesse est faible et moins le signal collecté sera grand, ce qui est assurément handicapant pour les macromolécules qui peuvent peser plusieurs centaines de kDa.

Pour pallier au problème des grandes masses, nous avons développé un nouveau type de détecteurs, déjà utilisés en physique des particules: les cryodétecteurs; il s'agit de structures métalliques hyperfines, de l'ordre de quelques centaines de nanomètres d'épaisseur, qui sont refroidies à des températures proches du zéro absolu². L'avantage principal de ces cryodétecteurs est que leur efficacité de détection ne dépend pas de la vitesse à laquelle la molécule les frappe, donc de sa masse, mais de l'énergie qui y est déposée lors de l'impact.

Cet article traite de la genèse de ces nouveaux détecteurs, depuis leur découverte jusqu'à aujourd'hui, de leur application dans le domaine de la spectrométrie de masse, de leur efficacité ainsi que des mesures de macromolécules que nous avons réalisées avec ces cryodétecteurs.

1. SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est un outil puissant permettant de mesurer la masse de molécules en analysant leur mouvement dans un champ électrique et/ou magné-

¹ kDa (kiloDalton): multiple d'unité fréquente en spectrométrie de masse: un Da (Dalton) équivaut à la masse d'un proton, soit $1.67 \cdot 10^{-27}$ kg

² Zéro absolu: 0 K correspond à -273.15°C

tique. Il existe de nombreuses sortes de spectromètres, mais ils sont tous composés des trois mêmes parties essentielles, à savoir:

1. d'une source d'ions;
2. d'un analyseur capable de séparer les ions en espace et en temps selon leur rapport masse-sur-charge;
3. d'un détecteur d'ions.

Le principe est donc toujours semblable: on vaporise et ionise les molécules, on les accélère d'une manière ou d'une autre et enfin, on détecte leur arrivée.

Le rôle d'une source d'ions est de vaporiser et de ioniser les molécules afin de les accélérer. Dans les années septante, deux techniques essentielles prédominaient, à savoir "l'impact électronique" (electron impact (EI)) et "l'ionisation chimique" (chemical ionization (CI)), mais elles étaient limitées à des masses de l'ordre de 800 Da. Par la suite, plusieurs autres techniques, en phase soit liquide, soit solide, furent mises au point, repoussant la limite de masse à environ 50 kDa. Parmi ces nouvelles techniques, on peut citer l'ionisation par "electrospray" (electrospray ionization (EI)), ou le bombardement par atomes rapides (Fast Atom Bombardment (FAB)). Il est cependant important de réaliser que la vaporisation des macromolécules n'est pas chose évidente au vu de leur masse et de leur attraction mutuelle (molécules polaires).

En 1987, un grand pas en avant fut fait quand Karas et Hillenkamp (KARAS *et al.*, 1987) annoncèrent la technique MALDI³: les molécules, mélangées à une matrice, sont désorbées à l'aide d'une pulse laser et ionisées, le rôle de ladite matrice étant d'absorber l'énergie du laser et de séparer les molécules afin d'éviter leur agrégation. Grâce à cette technique, des molécules de plus de 50 kDa purent être analysées, et ceci avec un taux de fragmenta-

tion remarquablement faible. Elle permet de travailler en mode liquide (liquid MALDI) ou solide (solid MALDI).

Les ions ainsi créés sont maintenant accélérés afin d'être analysés et ce, selon plusieurs principes. On peut citer les analyseurs quadrupôles, ceux à secteur magnétique ou à transformée de Fourier. Parmi les plus connus figurent les analyseurs dits à "temps-de-vol": les ions sont accélérés par un champ électrique à travers un tube sous vide jusqu'à ce qu'ils frappent le détecteur d'ions. Connaissant la tension d'accélération et la distance, et en mesurant le temps-de-vol nécessaire, on obtient facilement la masse du ion (figure 1).

La dernière étape consiste justement à détecter ces ions. Dans la plupart des cas, cette détection est assurée par un détecteur dit "classique", comme les Microchannel Plate (MCP), Channeltron ou autres SEM (Secondary Electron Multiplier). Le principe de fonctionnement diffère peu entre les différents types : le détecteur comprend plusieurs étages mis à différentes tensions. Quand l'ion vient frapper la première dynode, il arrache quelques électrons secondaires, qui sont ensuite accélérés par la différence de potentiel vers la deuxième dynode, arrachant d'autres électrons et ainsi de suite. On se retrouve à la fin avec une avalanche d'électrons, conduisant à un gain de 10^4 à 10^8 , donc à un signal électrique mesurable.

Une description plus complète des différents types de spectromètres et de détecteurs peut être trouvée dans la thèse de doctorat de Daniel Gerber (GERBER, 1997) ou dans l'ouvrage de Robert Cotter (COTTER, 1997).

Pour notre part, nous travaillons avec la méthode MALDI, solide et liquide, avec un spectromètre de masse en temps-de-vol (MALDI time-of-flight mass spectrometer). Le schéma de principe de ce type de spectromètre est donné à la figure 1.

³ MALDI est l'acronyme anglais de: "Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization"

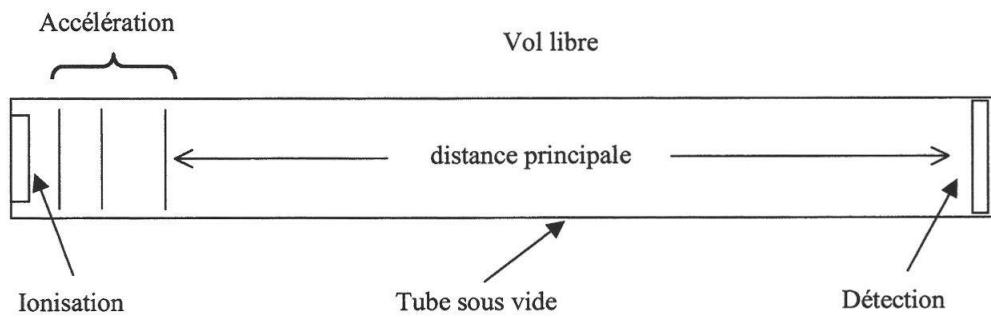


Figure 1: schéma d'un spectromètre de masse en temps-de-vol: on mesure le temps que met une molécule depuis le moment où elle est accélérée jusqu'au moment de sa détection.

Les ions, après avoir été désorbés et ionisés, vont être accélérés par le champ électrique créé par les électrodes près desquelles ils ont été formés. Ils vont donc acquérir une énergie cinétique égale au produit de leur charge par la tension appliquée aux électrodes, c'est-à-dire $E=q \cdot U = mv^2/2$. Connaissant la distance (d) depuis la source d'ions jusqu'au détecteur et en mesurant le temps-de-vol (t_{tof}) correspondant, on en déduit la masse du ion comme étant:

$$m = 2qU \frac{t_{\text{tof}}^2}{d^2}$$

L'énergie acquise par l'ion est proportionnelle à la charge q et à la tension d'accélération U . Un ion deux fois chargé aura donc une énergie deux fois supérieure à un ion avec une seule charge. En revanche, le temps-de-vol de ce ion doublement chargé sera $\sqrt{2}$ fois plus court. En étudiant le spectre de plusieurs événements, on peut déduire beaucoup d'informations sur les molécules analysées.

La figure 2 montre le spectromètre que nous utilisons. Il est couplé à un cryostat dans lequel se trouvent nos détecteurs (à gauche sur la figure).

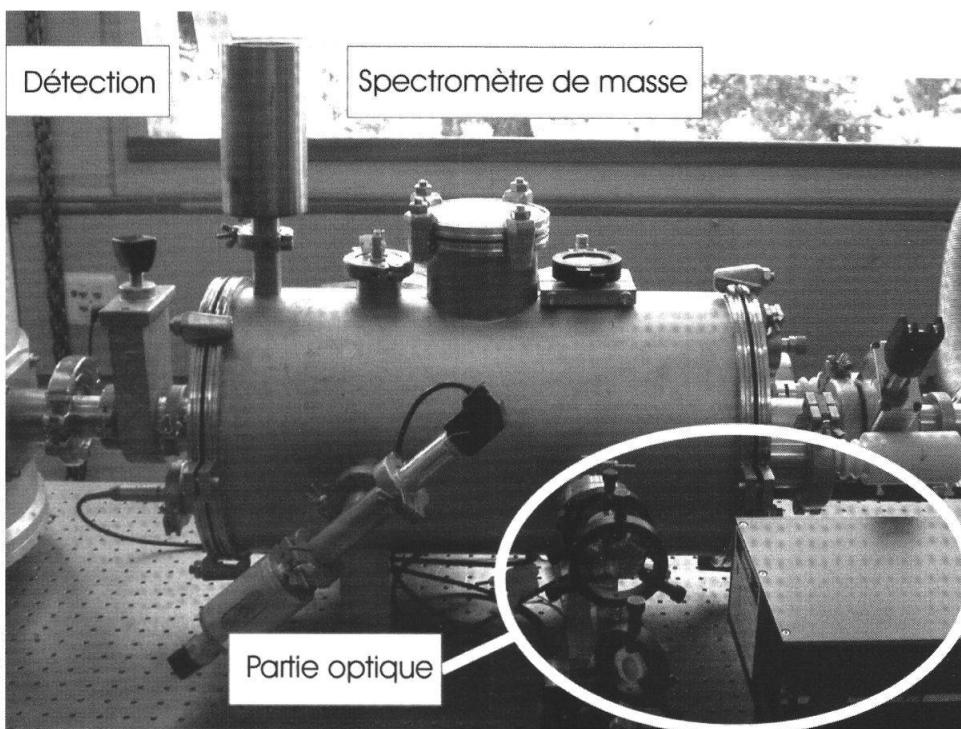


Figure 2: le spectromètre de masse à temps-de-vol MALDI que nous utilisons. A gauche se trouve la partie détection, au centre le spectromètre lui-même avec toutes les parties afférentes à son fonctionnement, à savoir le groupe de pompage et les jauge de pression, à droite la partie "load-lock" où les échantillons sont introduits et, au premier-plan, la partie optique comprenant le laser, les lentilles et les miroirs.

Ainsi que nous l'avons mentionné dans l'introduction, la nouveauté de notre travail consiste dans le développement et dans l'utilisation d'un nouveau type de détecteur pour la spectrométrie de masse, afin de pallier à l'inefficacité grandissante des détecteurs classiques pour les grandes masses moléculaires. Ces nouveaux détecteurs sont composés de jonctions supraconductrices à effet tunnel⁴, ou jonctions Josephson, aussi appelées jonctions SIS (Superconductor/Isolator/Superconductor), opérées à très basse température (~ 100 mK). Plus de détails sont donnés aux chapitres 4 et 5.4.

2. LIMITES DES DÉTECTEURS À IONS, DITS "CLASSIQUES"

La réponse des détecteurs à ions, dits "classiques", ou détecteurs ionisants, basés sur la multiplication des électrons secondaires, dépend de la vitesse de la particule qui frappe le détecteur: plus elle est grande, plus la probabilité de créer un ou plusieurs électrons secondaires est importante, donc plus le gain est élevé. La vitesse d'une molécule dans un spectromètre dépend de sa masse et de l'énergie qui lui est conférée par le champ électrique d'accélération. Ainsi, pour des tensions d'accélération fixes, plus une molécule est lourde, moins elle est rapide, donc moins bonne est l'efficacité de détection (GERVASIO *et al.*, 2000; TWERENBOLD *et al.*, 2001; GRITTI, 2001). L'équipe du Professeur Zenobi de l'ETH Zurich a obtenu un spectre de la réponse d'un tel détecteur en fonction de la masse de la molécule (figure 3): il s'agissait d'un spectre de six polyéthylèneglycols équimolaires.

3. AVANTAGES DES DÉTECTEURS DITS "CRYOGÉNIQUES"

L'utilisation de ce nouveau type de détecteur a été proposée en 1995 par D. Twerenbold pour pallier au manque de sensibilité

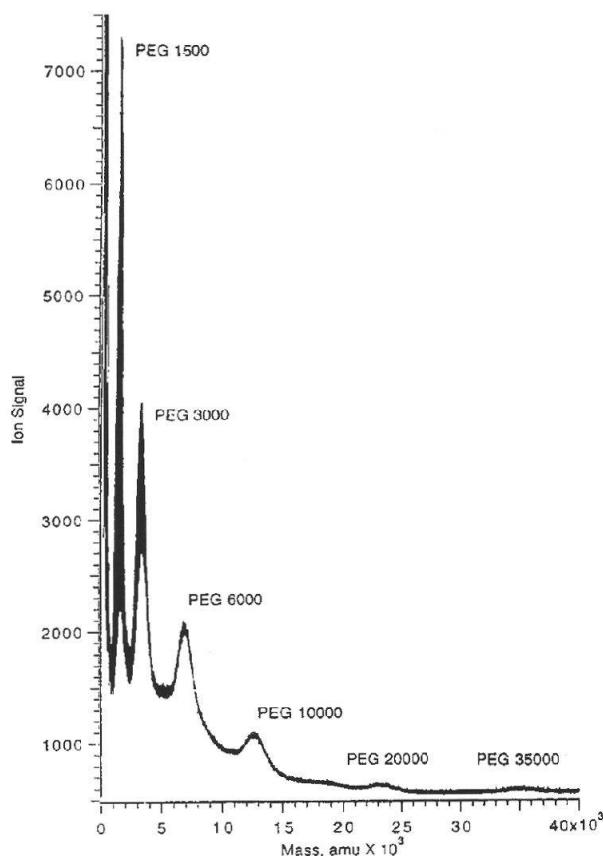


Figure 3: spectre obtenu par le groupe du Prof. Zenobi (ETH Zurich) de la réponse d'un détecteur ionisant en fonction de la masse d'une solution équimolaire de polyéthylèneglycols, de 1'500 à 35'000 Da. La tension d'accélération était de 30 kV. La perte d'efficacité pour les grandes masses est clairement visible sur cette figure [avec l'aimable autorisation du Prof. Zenobi].

des détecteurs ionisants pour les grandes masses (TWERENBOLD, 1996, a). Leur principe de fonctionnement n'est pas basé sur une cascade d'électrons mais sur un principe calorimétrique. Celui avec lequel nous travaillons est constitué de deux films très minces de matériaux supraconducteurs (aluminium, tantale, niobium, etc) séparés par une fine couche d'isolant, faisant office de barrière. La figure 4 donne une idée de ce "sandwich" de couches formant une STJ. Il existe toute une gamme de détecteurs cryogéniques qui ont tous leur spécificité, notre groupe ayant essentiellement cherché à optimiser pour notre application les détecteurs à effet tunnel.

⁴ Ces jonctions sont appelées ci-après "STJ"

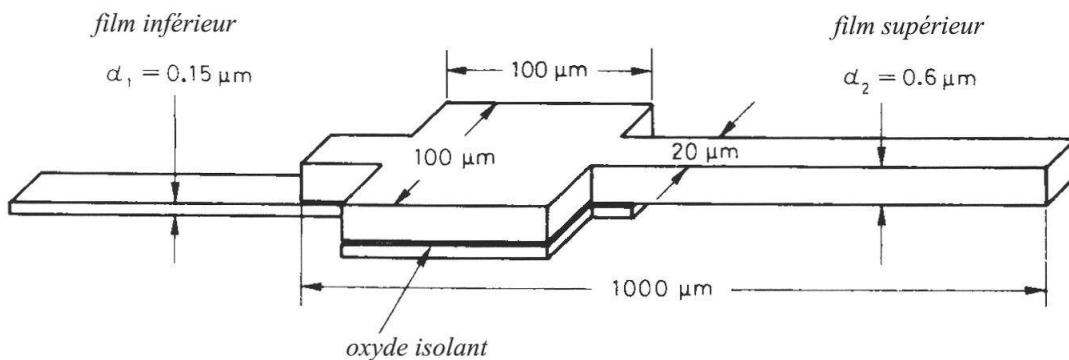


Figure 4 : schéma d'une STJ.

Lors de l'impact d'une molécule, les vibrations du réseau produites, que l'on appelle des phonons, vont casser des paires de Cooper (électrons appariés sous ces températures) et ces électrons ainsi créés, appelés quasiparticules, peuvent traverser avec une certaine probabilité, par effet tunnel, la barrière isolante. Le passage de ces quasiparticules produit un courant que l'on peut mesurer.

Les avantages de ces détecteurs sont les suivants:

- 1) l'efficacité de détection ne dépend pas de la masse de la molécule;
- 2) cette efficacité est de 100 %;
- 3) les différents états de charge de la molécule sont visibles.

La surface couverte par les jonctions étant relativement petite, on en construit plusieurs en parallèle. Pour opérer, elles doivent être refroidies bien en dessous de la température à laquelle le métal qui les constitue transite de l'état normal à celui supraconducteur: typiquement quelques centaines de millikelvins pour celles en aluminium.

Pour atteindre ces températures, on a besoin d'un cryostat, machine permettant de descendre près du zéro absolu. Ce sont des instruments que l'on peut acheter dans le commerce.

4. HISTORIQUE DES CRYODÉTECTEURS POUR LA SPECTROMÉTRIE

Les premières études de jonctions supraconductrices furent entreprises en 1960 par Ivar Giaver, alors au "General Electric Research Laboratory" à New-York. Il mesura les courbes courant-tension (I-V) de jonctions en aluminium et plomb ($\text{Al}/\text{AlO}_x/\text{Pb}$) (GIAVER, 1960) et reçut pour cela le prix Nobel en 1973. Quelques années plus tard, des jonctions en étain de type $\text{Sn}/\text{SnO}_x/\text{Sn}$ furent utilisées comme détecteurs de particules α de 5.1 MeV⁵ (WOOD & WHITE, 1969). En 1986, Twerenbold et Zehnder détectèrent, pour la première fois, des rayons X de 6 keV avec de telles jonctions (TWERENBOLD & ZEHNDER, 1987). Par la suite, ces jonctions furent beaucoup utilisées en physique des particules, ainsi qu'en astrophysique.

C'est en 1994 que D. Twerenbold, après un souper avec des biologistes américains, se rendit compte qu'il n'existe pas de spectromètres de masse optimisés pour les molécules lourdes, les machines existantes étant limitées en masse par le détecteur de type ionisant. C'est ainsi qu'est née l'idée de remplacer ce dernier par des détecteurs cryogéniques, des jonctions supraconductrices à effet tunnel en particulier (TWERENBOLD, 1996, a).

⁵ $1 \text{ MeV} = 10^3 \text{ keV} = 10^6 \text{ eV} ; 1 \text{ eV} = 1.602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$

Quelques mois plus tard, la première expérience servant à démontrer la faisabilité de cette idée fut entreprise à Neuchâtel par une collaboration internationale regroupant le groupe de Neuchâtel, un groupe du PSI⁶ et un de la George Mason University⁷. Pour la première fois, une protéine (la lysozyme, $m = 14'300$ Da) était détectée avec des jonctions de type Sn/SnO_x/Sn. La figure 5 montre le spectre obtenu (TWERENBOLD *et al.*, 1996).

L'année suivante, une deuxième expérience eut lieu. Elle regroupait cette fois-ci des gens de Neuchâtel, du NIST⁸ au Colorado et, de nouveau, un biologiste de GMU. La partie "spectrométrie de masse" était réalisée par les Neuchâtelois, alors que la partie "déttection" était assurée par les Américains. Le détecteur utilisé pour ces mesures était différent, une jonction à effet tunnel de type NIS (Normal/Isolator/Superconductor), mais le principe de

détection restait essentiellement le même. Les résultats ont été publiés en 1998 dans la revue *Nature* (HILTON *et al.*, 1998). La figure 6 montre ce qui a été obtenu, entre autre, avec ce dispositif.

Simultanément, d'autres groupes firent des expériences similaires avec des macromolécules (FRANK *et al.*, 1996; BENNER *et al.*, 1997). Pour notre part, les deux premiers résultats nous encouragèrent à persévérer dans cette voie et plusieurs améliorations furent apportées au dispositif, mais toujours avec le même type de jonctions (Sn/SnO_x/Sn), ce qui nous permit de présenter des mesures d'oligonucléotides à la conférence LTD-7 (Low Temperature Detectors) à Munich en 1997 (COOPER, 1997) (figure 7).

L'année suivante, de nouvelles jonctions furent développées, non plus en étain, métal qui résiste mal aux cycles ther-

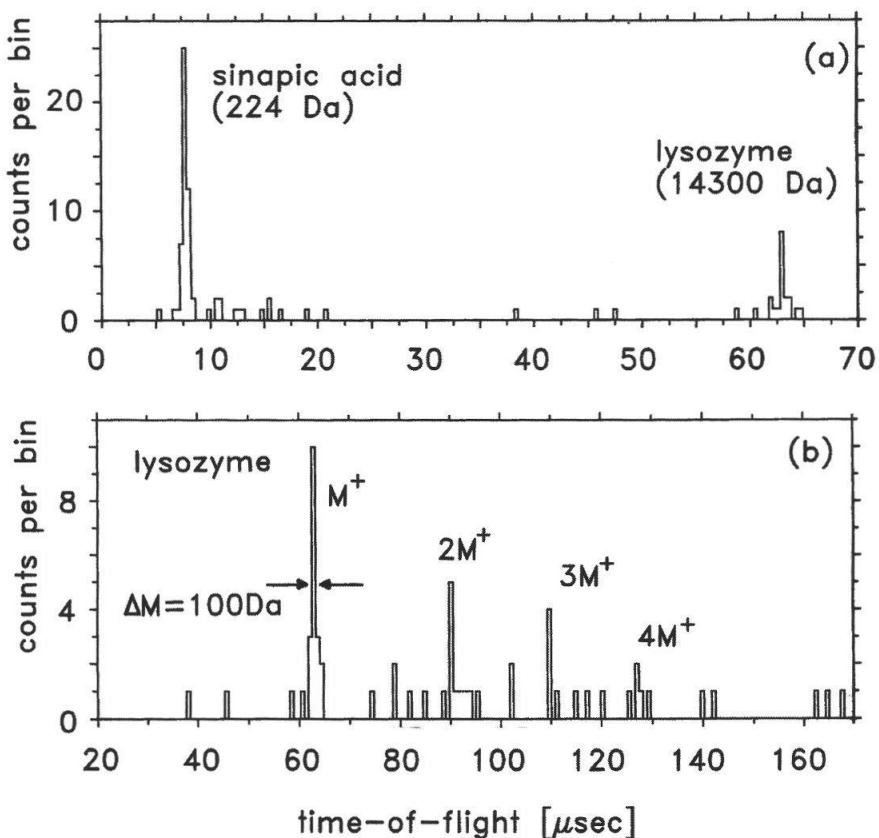


Figure 5: premier spectre de détection de protéines avec des détecteurs cryogéniques (ici de la lysozyme, $m = 14'300$ Da). La tension d'accélération était de 20 kV, la distance entre la zone d'accélération et le détecteur de 105 cm. Sur le spectre (a), on voit la matrice utilisée (acide sinapique, $m = 224$ Da) et sur le second (b), plusieurs multiplicités de masse sont détectées.

⁶ PSI: Paul Scherrer Institut, CH-5232 Villigen PSI, Switzerland

⁷ George Mason University (GMU), Fairfax, Virginia, USA

⁸ NIST: National Institute of Standards and Technology, Boulder, Colorado, USA

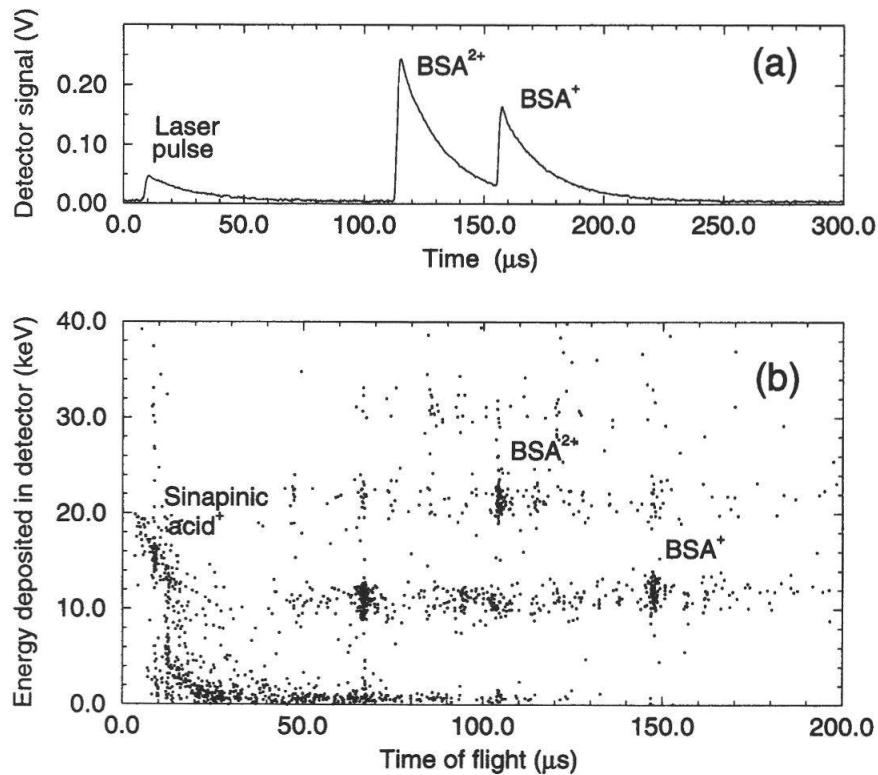


Figure 6: (a) données expérimentales obtenues avec une protéine appelée BSA (Bovine Serum Albumine, $m = 66'430$ Da). Le premier pic est dû à la réflexion de la lumière du laser sur les détecteurs. (b) Un scatter plot de l'énergie déposée dans le détecteur en fonction du temps-de-vol sous une tension d'accélération de 20 kV. Chaque point sur ce graphe représente l'impact d'un ion (ou même d'un fragment neutre créé pendant le vol vers le détecteur). Le temps-de-vol figure en abscisse et l'ordonnée représente l'énergie déposée dans le détecteur.

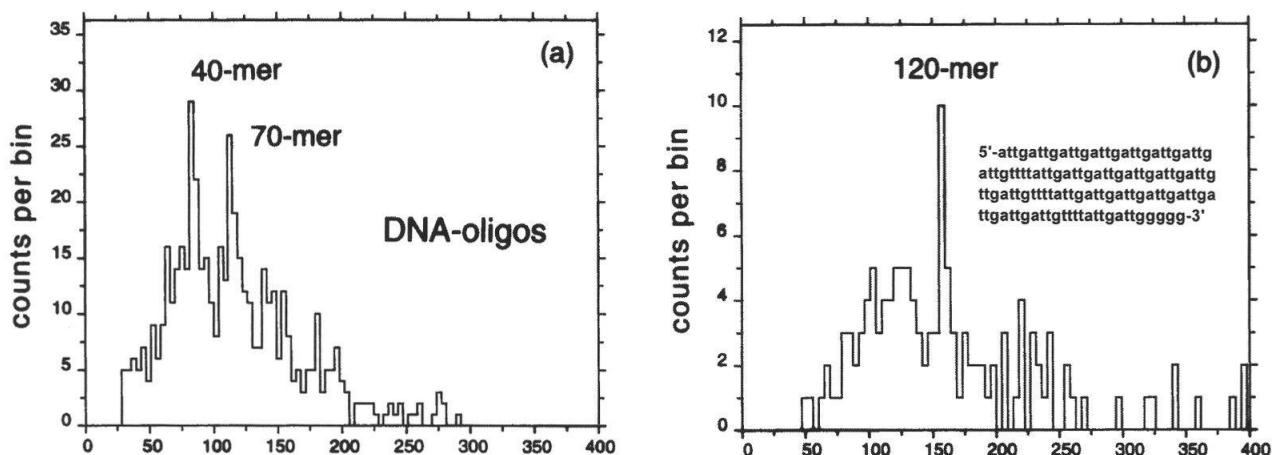


Figure 7: des oligonucléotides d'ADN ont été cette fois-ci analysés à 12 kV. Une matrice spéciale a été employée (3-hydroxypicolinic acid, HPA). Les “mers” sont les nucléotides, 40-mer ayant une masse de 12'339 Da et 70-mer 21'757 Da.

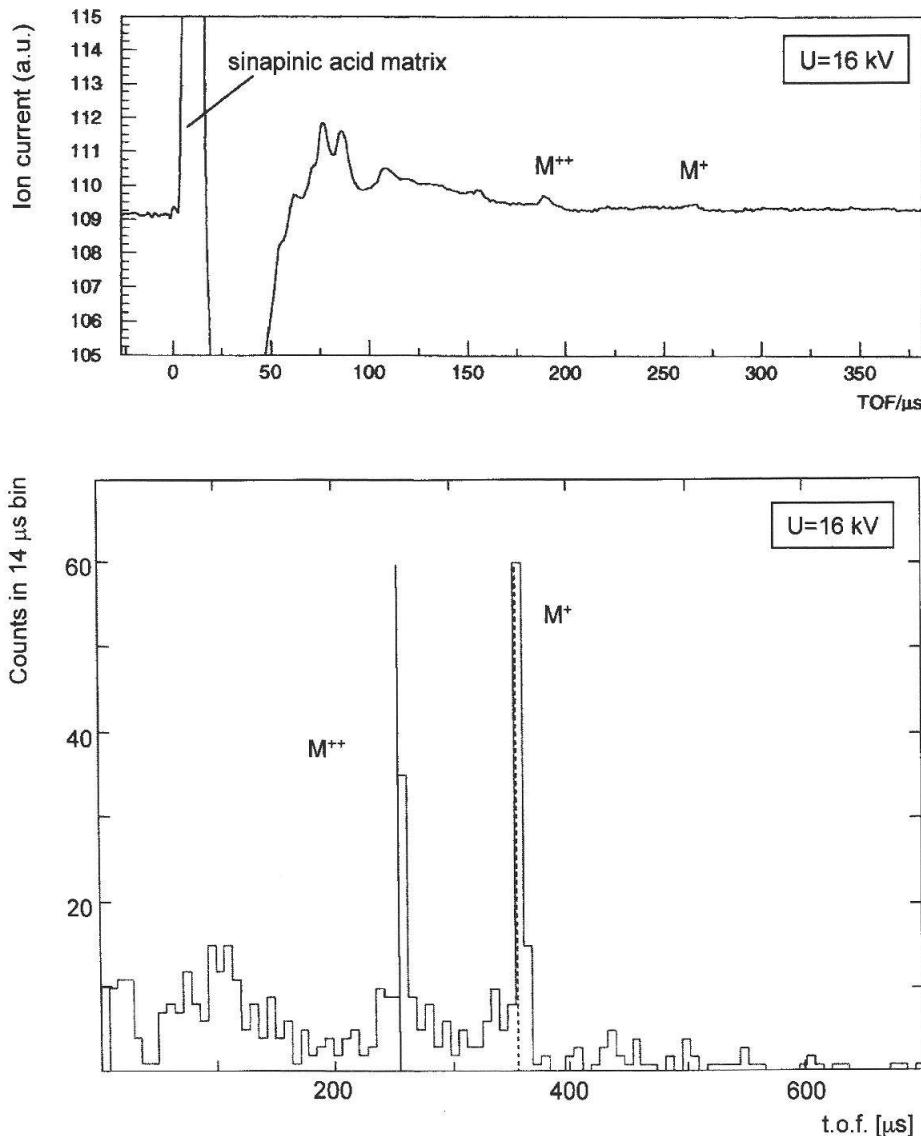


Figure 8: les jonctions originelles en étain ont été remplacées par des nouvelles en aluminium. Le spectre en haut à gauche représente la réponse d'un détecteur ionisant à l'impact de molécules d'IgG (Immunoglobuline type G, $m = 135$ kDa) accélérées avec une tension de 16 kV. On remarque que le détecteur est presque insensible à ces masses. Le spectre inférieur représente la réponse d'un détecteur cryogénique à un même impact, impact qui est détecté avec une grande sensibilité.

miques, mais en aluminium, soit de type Al/AlO_x/Al. Elles ont pour avantage d'être plus recyclables et plus résistantes. Les années 1999 et 2000 ont été consacrées à l'étude de ces jonctions et particulièrement à leur comparaison avec les détecteurs ionisants (GERVASIO *et al.*, 2000; TWERENBOLD *et al.*, 2001; GRITTI, 2001) (voir la figure 8).

La suite de l'historique, qui se conte au présent, est décrite dans le chapitre suivant. Pour une description plus complète des cryodétecteurs dans le domaine de la spectrométrie de masse, voir (FRANK *et al.*, 1999; FRANK, 2000), pour une revue des détecteurs cryogéniques en général, voir (BOOTH *et al.*, 1996 ; TWERENBOLD, 1996, b).

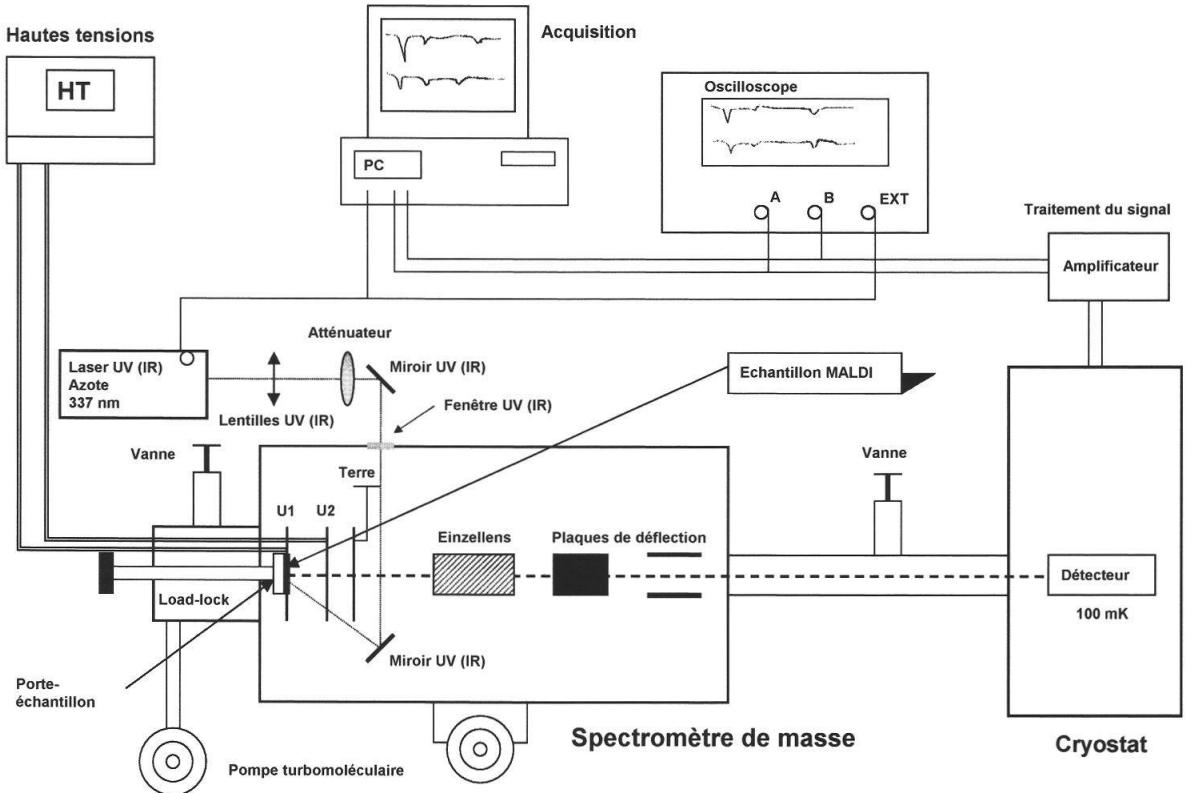


Figure 9: dispositif expérimental schématisé. Le laser ultraviolet (UV) et tous ses composants y relatifs sont représentés, mais le schéma est identique avec l'infrarouge (IR).

5. DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL

Le dispositif expérimental que nous utilisons est montré à la figure 9.

Afin de décrire ce dernier de manière la plus exhaustive possible, les différentes parties sont traitées séparément dans les sections suivantes.

5.1. Spectromètres

Nous avons fabriqué deux spectromètres identiques. Ils sont constitués d'un cylindre en acier inoxydable sur lequel viennent se fixer différents éléments. Le cylindre est maintenu à une pression de $5 \cdot 10^{-6}$ mbar grâce à une pompe turbomoléculaire. Une trappe à azote liquide refroidie à 77 K permet de descendre encore la pression d'un ordre de grandeur. Deux électrodes mises à haute tension pro-

duisent l'accélération des molécules, des plaques de déflection ainsi qu'une lentille d'*Einzel* permettant de dévier, respectivement de focaliser les macromolécules. Le faisceau laser servant à désorber la solution peut être déplacé, atténué ou dévié afin de balayer la totalité de la surface, une caméra CCD nous permettant de visualiser l'endroit de l'impact du laser. Enfin, un système de sas nous permet de changer d'échantillon sans devoir remettre le spectromètre à pression ambiante. Un de nos spectromètres est photographié en figure 2.

5.2. MALDI

Le processus de vaporisation que nous utilisons est donc le procédé MALDI, qui peut être solide ou liquide. En général, nous utilisons un laser ultraviolet⁹ pour le solide et un laser infrarouge¹⁰ pour le liquide.

⁹ Laser N₂ fournit par Laser Science, Inc.: longueur d'onde : 337 nm, durée de la pulse : 3 ns, énergie par pulse: 300 µJ, dimension du faisceau : 100 µm x 100 µm

¹⁰ Laser CO₂ de LSI : longueur d'onde: 10.6 µm ; durée de la pulse: 150 ns ; énergie par pulse: 20 mJ, dimension du faisceau: 200 µm x 200 µm

5.2.1. MALDI solide

Les molécules à analyser, qui se trouvent soit sous forme de poudre, auquel cas elles seront encore dissoutes dans une solution, soit sous forme liquide, sont mélangées à une matrice, de l'acide sinapinique dans la plupart des cas. Puis la solution est séchée naturellement sur le porte-échantillon en acier inoxydable: de magnifiques cristaux vont alors se former, comme en témoigne la figure 10, qui est une photographie au microscope de ce mélange. Puis le tout est introduit sous vide, le porte-échantillon est mis à haute tension et les mesures peuvent commencer.

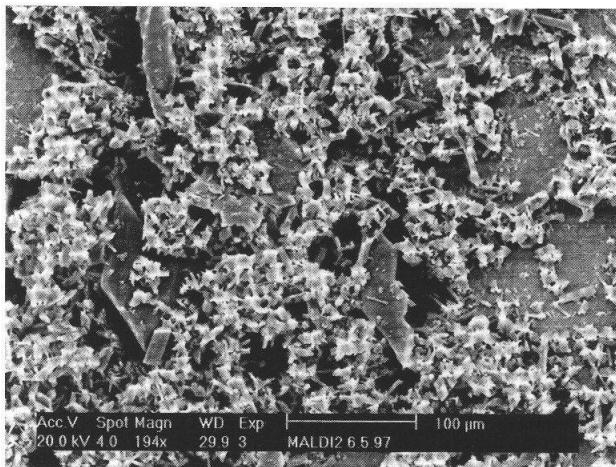


Figure 10: cristaux d'acide sinapinique dopé avec de la lysozyme après séchage sur le porte-échantillon. L'image est agrandie environ 200 x. On a préparé l'échantillon soigneusement afin d'avoir les cristaux les plus petits possible et d'améliorer le processus de vaporisation.

5.2.2. MALDI liquide

Le MALDI liquide est plus délicat, la gestion de l'élément liquide étant plus difficile. En effet, le laser étant plus puissant, la réserve de molécules est épuisée plus rapidement. Il est important de pouvoir réapprovisionner en matériel à analyser.

Pour ce faire, nous avons développé un système d'injection avec des microbus. Ces dernières, de \varnothing 4 μm , sont alimentées par deux petits tubes en Téflon reliés à une

seringue électromécanique permettant de régler le débit (TWERENBOLD *et al.*, 2002). La figure 11 montre ces buses ainsi que la goutte produite en leur extrémité. Elles ont été fabriquées à l'Institut de Microtechnique de l'Université de Neuchâtel (LUGINBUHL *et al.*, 2000).

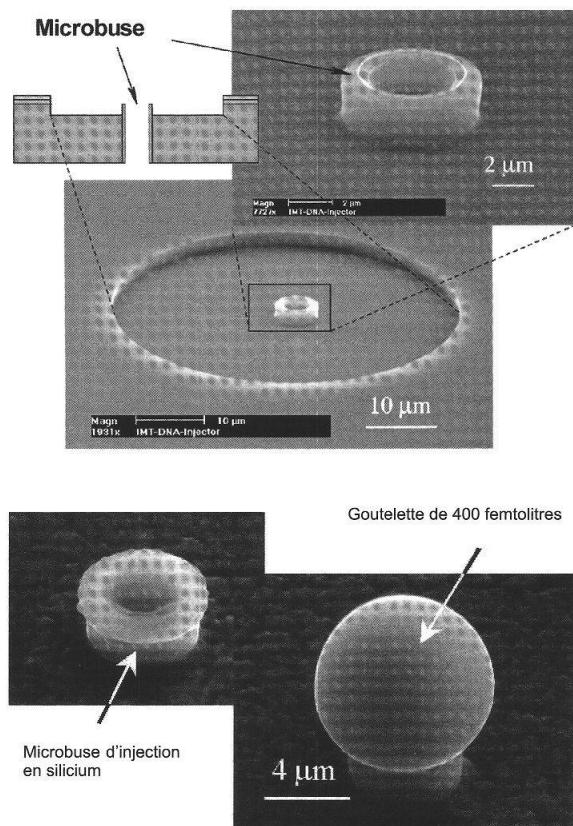


Figure 11: le système de buses nous permettant d'injecter le liquide. Ces buses de \varnothing 4 μm sont fabriquées dans une membrane de silicium. Elles permettent d'injecter des quantités minimales de l'ordre de 400 femtolitres ($400 \cdot 10^{-15}$ litre).

5.3. Cryogénie

Nous disposons de trois cryostats pour nos mesures, dont deux équipés d'un accès latéral pour le passage des macromolécules. Le premier cryostat, non-équipé dudit accès, est un cryostat $^3\text{He}/^4\text{He}$ "single shot" qui nous sert à tester les jonctions. Il a l'avantage de pouvoir être refroidi en quelques heures jusqu'à une température de base de 300 mK.

Le deuxième cryostat que nous utilisons est un cryostat à dilution fourni par Oxford Instruments, de type Kelvinox 25, d'une puissance de refroidissement de 25 μW . Il est long à mettre en œuvre, mais permet ensuite de rester autant longtemps que l'on désire à la température de base, soit environ 80 mK.

Enfin, nous disposons d'un cryostat appelé "Adiabatic Demagnetization Refrigerator (ADR)", fourni par Janis Research Instruments et qui atteint 100 mK. Le principe de refroidissement de 4.2 K jusqu'à la température de base n'est pas assuré par des cryoliquides, mais par des sels paramagnétiques que l'on démagnétise, après les avoir magnétisés. Le faible couplage thermique permet de travailler plusieurs heures avant de devoir recommencer le processus.

5.4. STJ comme détecteurs

Les jonctions que nous avons fabriquées sont des petits losanges de 100 μm de côté reliés aux contacts par des pistes de 5 μm de large. Ces seize jonctions sont constituées d'une couche d'aluminium épaisse de 200 nm, recouverte par une couche d'isolant (AlO_x) de 1 à 2 nm et d'une autre couche d'aluminium de 150 nm d'épaisseur. Elles sont fabriquées en utilisant des techniques photolithographiques et d'attaque chimique sur un substrat qui peut être de différente nature, soit en verre, saphir ou silicium, soit en cuivre (dans ce cas, une couche de polyimide de 1.5 μm d'épaisseur assurera l'isolation électrique entre le substrat et les jonctions). La figure 12 montre un schéma du réseau de jonctions que nous utilisons.

Avant de les utiliser comme détecteurs de macromolécules, il est important de pouvoir les tester en mesurant leur courbe I-V (figure 13), ainsi que de contrôler leur aptitude comme détecteurs de rayons X et ce, à l'aide d'une source de $^{55}\text{Fe}^{11}$ (figure 14). Si elles sont de bonne qualité, elles sont mises dans un des deux cryostats équipés d'un accès latéral et les mesures de macromolécules peuvent commencer.

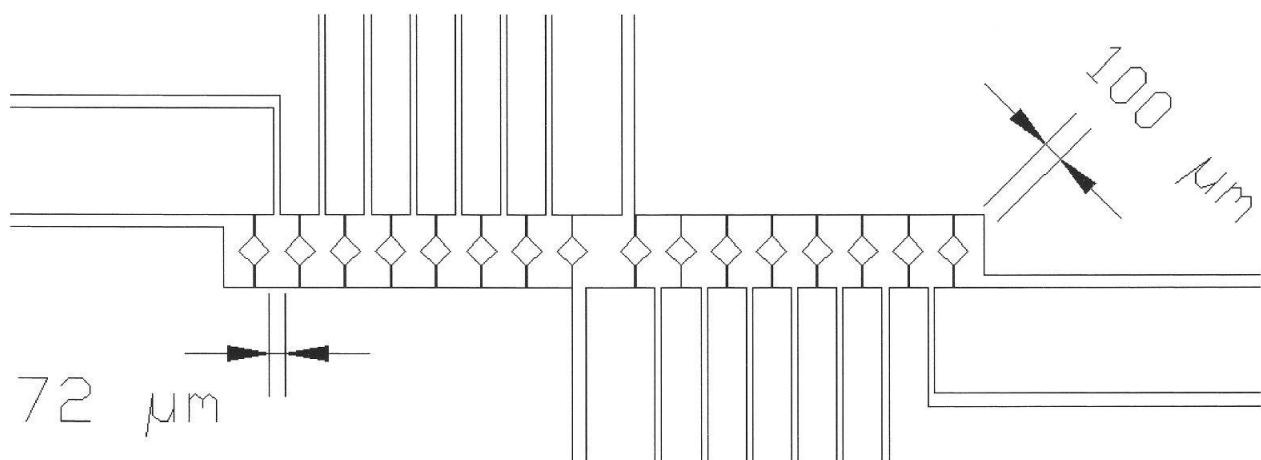


Figure 12: schéma du réseau de jonctions que nous utilisons. Il y a deux points communs, chacun reliant huit STJ.

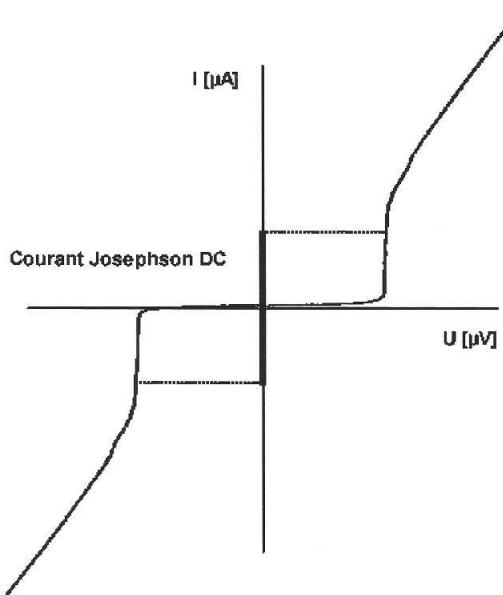


Figure 13: courbe courant-tension pour une de nos jonctions en aluminium. La forme non-ohmique est due aux effets supraconducteurs. De ces courbes peut être tirée une foule d'informations sur les jonctions afin de nous permettre de les caractériser.

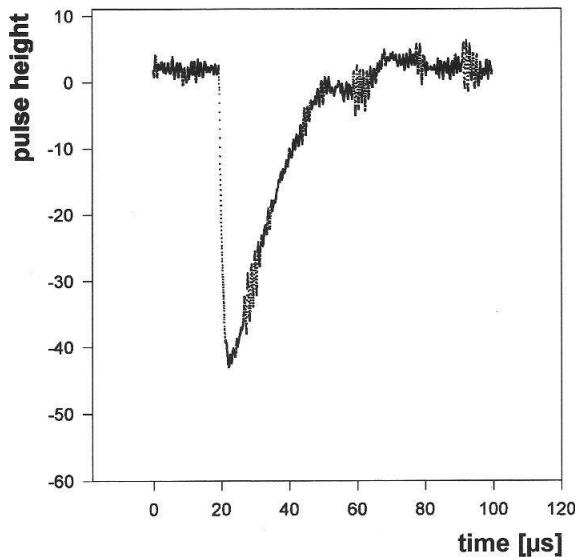


Figure 14: réponse de la jonction à la détection d'un photon X de 6 keV d'énergie. La vitesse de montée (rise time) de la pulse est très rapide (donnée par la jonction), alors que le temps de descente (fall time) est lent (déterminé par l'électronique).

5.5. Acquisition

Les signaux des jonctions sont d'abord amplifiés par un préamplificateur de charge, puis par un amplificateur opérationnel. Ensuite, ils sont digitalisés par une carte d'acquisition (Gage) reliée au PC. Cette carte est capable d'acquérir deux canaux à la fois, un canal représentant la réponse d'une STJ. Un programme nous permet ensuite de visualiser ces signaux et de les stocker, un deuxième recherche les pics produits par les macromolécules frappant le détecteur et un troisième logiciel

nous permet de visualiser le spectre qui nous intéresse.

6. QUELQUES MESURES

Les mesures les plus récentes constituent ce chapitre (figs 15-19). Elles ont été prises avec nos détecteurs cryogéniques en aluminium, sauf la figure 19, où des jonctions en tantale ont été utilisées. Elles sont essentiellement tirées de la thèse de doctorat de Dominique Gritti (GRITTI, 2001).

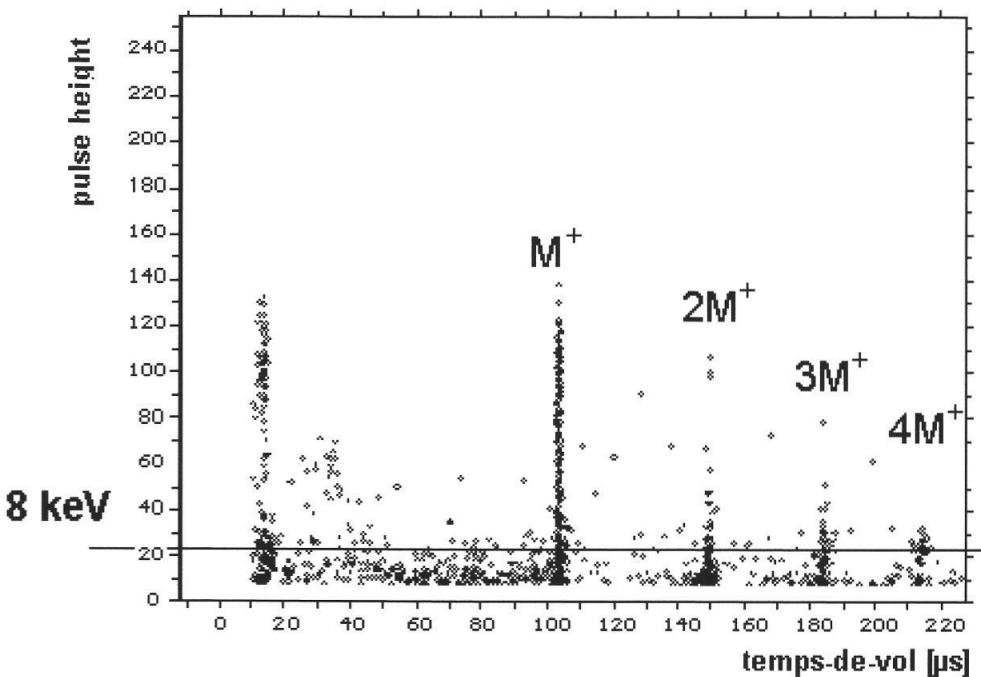


Figure 15: spectre d'insuline ($m = 5'733$ Da) pris avec une tension d'accélération de 8 kV, sans plaques de déflexion. Les multiplicités de masse sont clairement visibles jusqu'à 4.

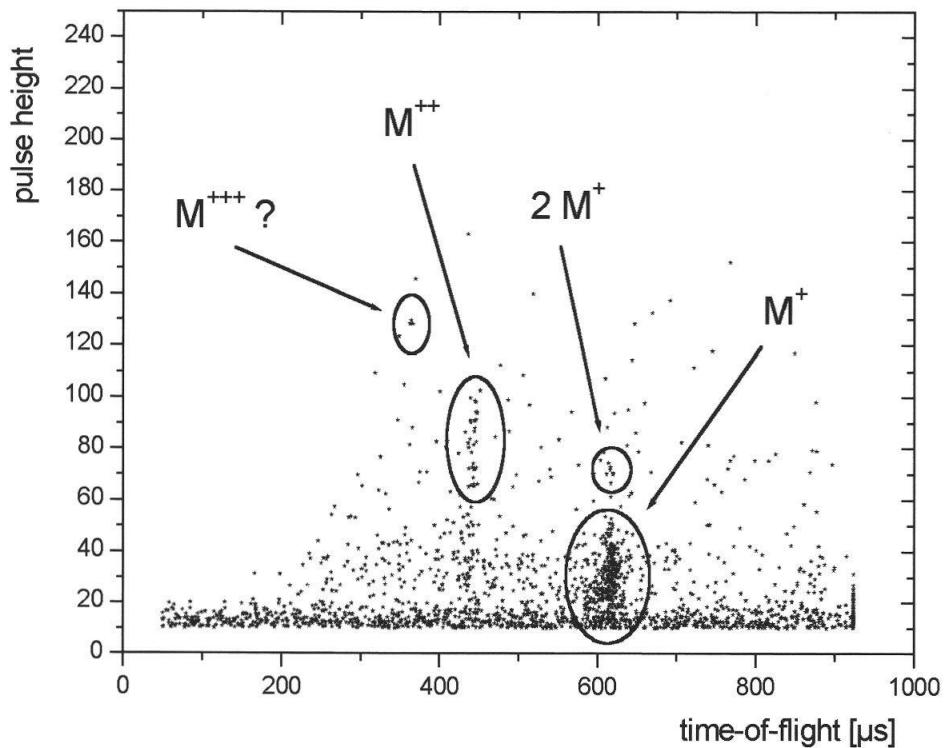


Figure 16: spectre de BSA ($m = 66.43$ kDa), obtenu avec une tension d'accélération de 3 kV. On voit sur ce graphe la séparation entre les multiplicités de charge.

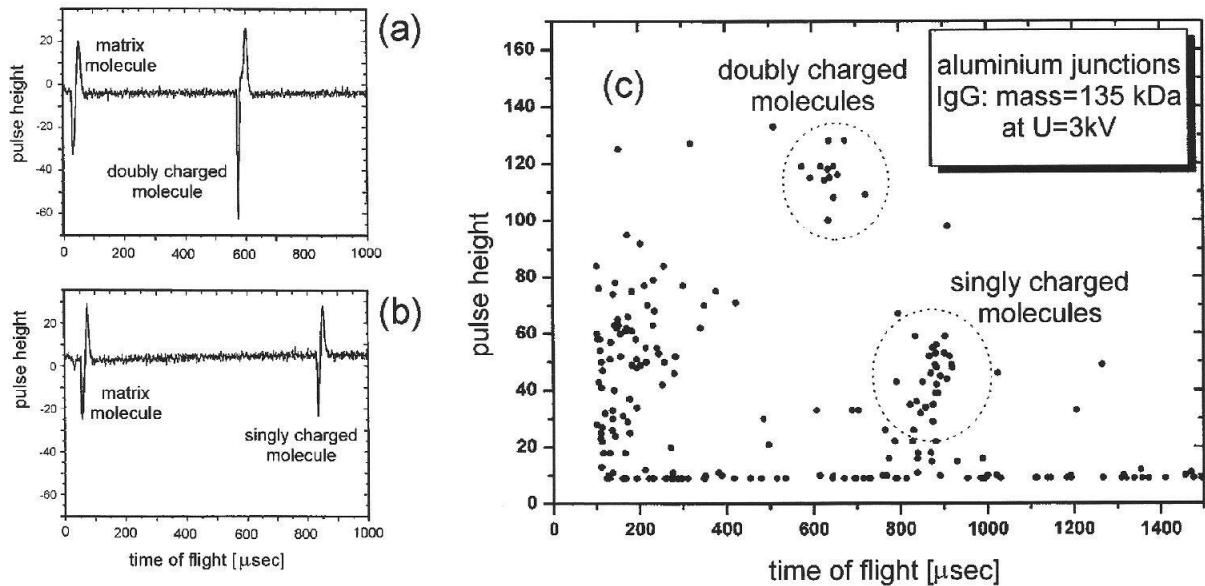


Figure 17: pulses obtenues avec nos jonctions en aluminium après l'impact de molécules d'IgG ($m=135$ kDa) avec une faible tension d'accélération (3kV): (a) molécule doublement chargée; (b) molécule simplement chargée; (c) montre le spectre du “pulse height” en fonction du temps-de-vol pour plusieurs événements où la séparation de charge est visible.

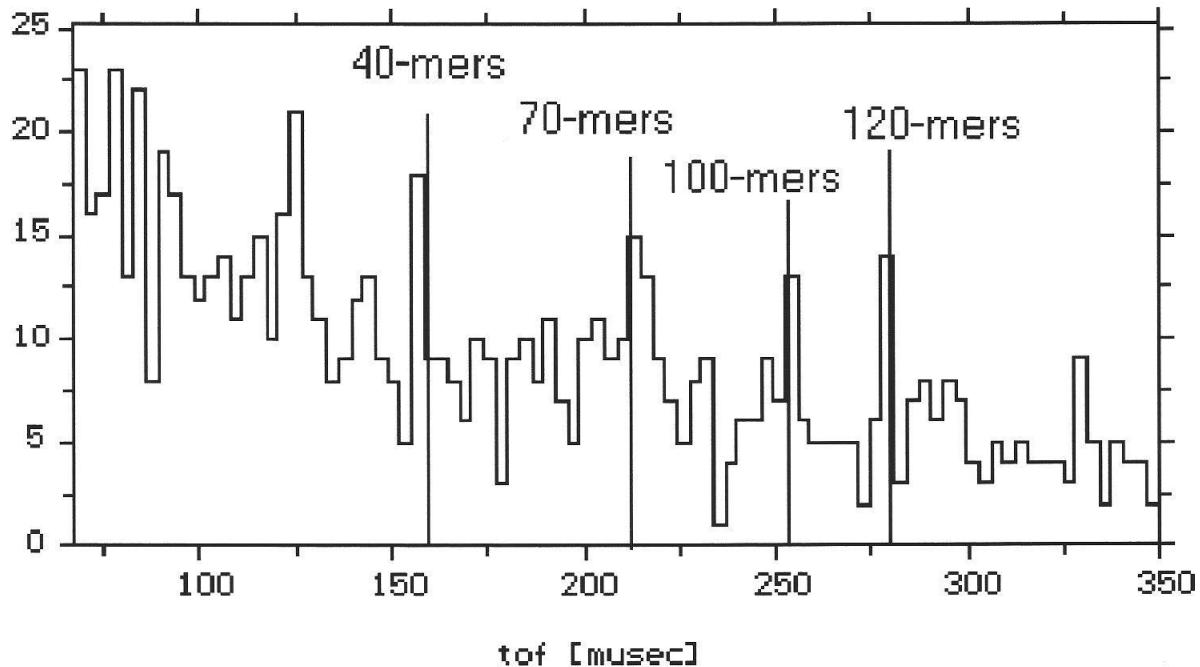


Figure 18: analyse par détecteurs cryogéniques d'oligonucléotides, avec une tension de travail de 8 kV, en solution équimolaire (8 pmol). Les lignes verticales représentent leur position théorique. La masse d'un “mer” est d'environ 300 Da.

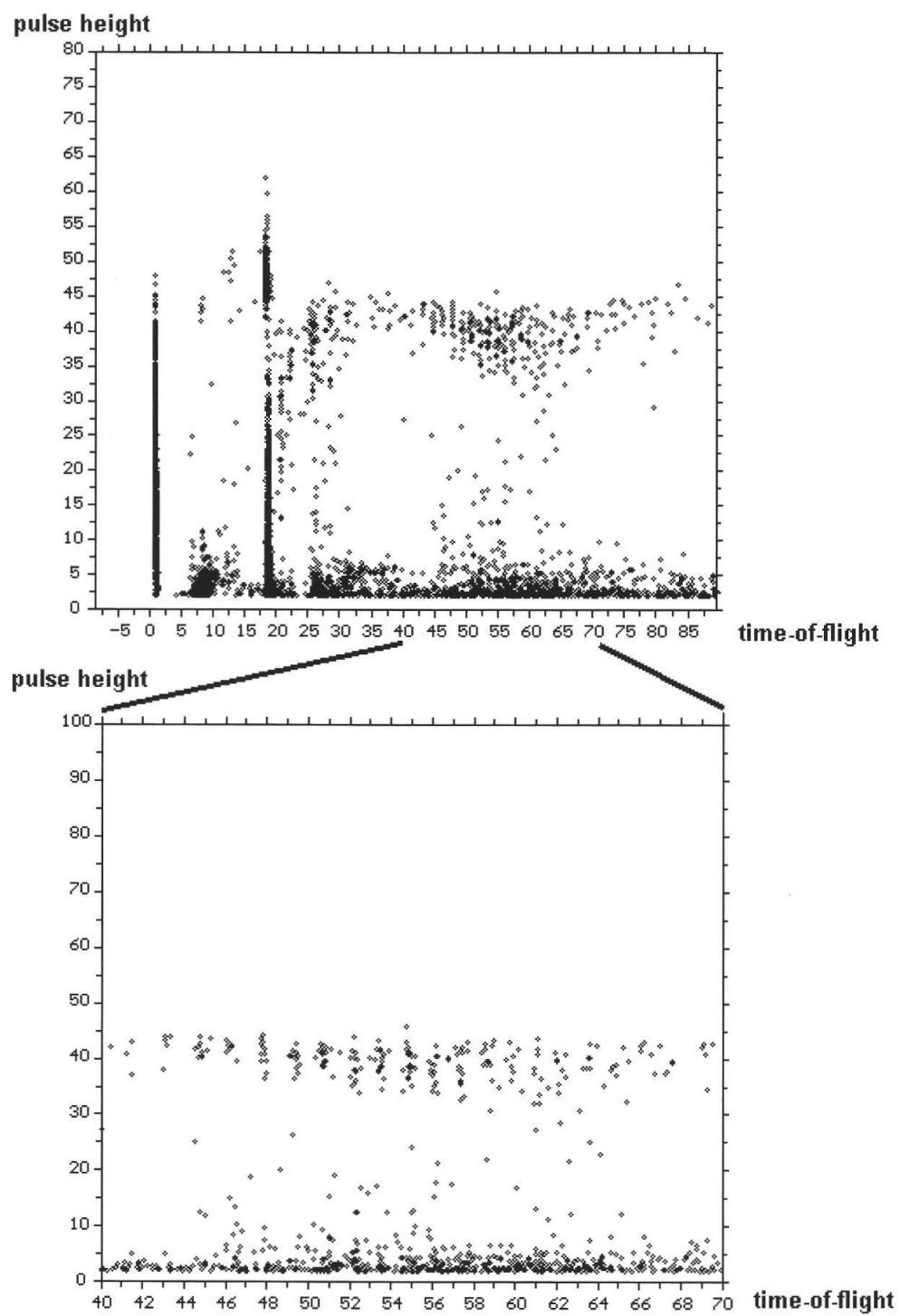


Figure 19: spectre de polystyrène 2000 ($m = 2000$ Da) obtenu, cette fois-ci, avec des jonctions en tantale. Sur le zoom inférieur, la séparation des styrènes est clairement visible. La masse d'un de ces styrènes est de 54 Da.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le mariage de la spectrométrie de masse avec les cryodétecteurs permet de prolonger la gamme des masses accessibles pour l'analyse des macromolécules. Depuis l'idée originelle de D. Twerenbold et les maintes expériences de faisabilité, beaucoup de travail a été effectué afin d'améliorer chaque partie du dispositif. Un grand nombre d'échantillons a été analysé pour différents instituts, l'introduction liquide permettant de prolonger l'offre à ce niveau.

Cependant, beaucoup d'améliorations peuvent être faites, notamment en spectrométrie: un nouveau spectromètre a été construit, permettant de mesurer jusqu'à 100 échantillons pendant le même temps de mesure, grâce à l'utilisation d'une "table x-y" nous permettant de bouger le porte-échantillon sous vide. Un système d'injection de liquide en continu par les buses est en cours de développement afin de prolonger le temps de mesure. De nouvelles STJ ont été construites sur de nouveaux substrats et sont en train d'être tes-

tées: plus nombreuses, elles sont plus reproductibles et devraient permettre une meilleure résolution. Nous travaillons aussi sur l'électronique afin de réduire le bruit de fond et d'améliorer la rapidité et la qualité d'acquisition. Enfin, le développement d'un "réflectron", spectromètre où les ions sont réfléchis avant d'être détectés, nous permettra d'obtenir un appareil à la résolution supérieure.

Nombreux peuvent être les applications et utilisateurs potentiels: tous les chercheurs travaillant avec des macromolécules, que ce soit en chimie, en biologie, dans l'industrie pharmaceutique ou dans différents instituts, peuvent trouver, dans cette technique, un moyen d'analyse efficace et rapide des macromolécules de toutes tailles.

REMERCIEMENTS

Nous remercions toutes les personnes qui ont œuvré à la réalisation de ce projet, en particulier tout le personnel technique de l'Université de Neuchâtel.

BIBLIOGRAPHIE

- BENNER, W.H., HORN, D.M., JAKLEVIC, J.M., FRANK, M., MEARS, C., LABOV, S. & BARFKNECHT, A.T. 1997. Simultaneous measurement of flight time and energy of large matrix-assisted laser desorption ionization ions with a superconducting tunnel junction detector. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8 : 1094.
- BOOTH, N.E., CABRERA, B. & FIORINI, E. 1996. Low-temperature particle detectors. *Annu. Rev. Nucl. Part. Sci.* 46 : 471.
- COOPER, S. (ed.) 1997. Proceedings of the Seventh International Workshop on Low Temperature Detectors (LTD-7). *Max Planck Institute of Physics, Munich*.
- COTTER, R.J. 1997. Time-of-flight mass spectrometry. *American Chemical Society, Washington*.
- FRANK, M. 2000. Mass spectrometry with cryogenic detectors. *Nucl. Inst. & Meth. A* 444 : 375.
- FRANK, M., LABOV, S.E., WESTMACOTT, G. & BENNER, W.H. 1999. Energy-sensitive cryogenic detectors for high-mass biomolecule mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 18 : 155.

- FRANK, M., MEARS, C.A., LABOV, S.E., BENNER, W.H., HORN, D., JAKLEVIC, J.M. & BARFKNECHT, A.T. 1996. High-efficiency detection of 66 000 Da protein molecules using a cryogenic detector in a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 : 1946.
- GERBER, D. 1997. Cryogenic detectors as high-efficiency detectors of single massive macromolecules. *Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel*.
- GERVASIO, G., GERBER, D., GRITTI, D., GONIN, Y., TWERENBOLD, D. & VUILLEUMIER, J.-L. 2000. Aluminium junctions as macromolecule detectors and comparison with ionizing detectors. *Nucl. Inst. & Meth. A* 444 : 389.
- GIAVER, I. 1960. Electron tunneling between two superconductors. *Phys. Rev. Lett.* 5 (10) : 464.
- GRITTI, D. 2001. Mass spectrometry with cryogenic detectors. *Thèse de doctorat, Université de Neuchâtel*.
- HILTON, G.C., MARTINIS, J.M., WOLLMAN, D.A., IRWIN, K.D., DULCIE, L.L., GERBER, D., GILLEMET, P.M. & TWERENBOLD, D. 1998. Impact energy measurement in time-of-flight mass spectrometry with cryogenic microcalorimeters. *Nature* 391 : 672.
- KARAS, M., BACHMANN, D., BAHR, U. & HILLENKAMP, F. 1987. Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 78 : 53.
- LUGINBUHL, PH., INDERMUHLE, P.-F., GRETILLAT, M.-A., WILLEMIN, F., DE ROOIJ, N.F., GERBER, D., GERVASIO, G., VUILLEUMIER, J.-L., TWERENBOLD, D., DUEGLIN, M., MATHYS, D. & GUGGENHEIM, R. 2000. Femtoliter injector for DNA mass spectrometry. *Sensors and Actuators B* 63 : 167.
- TWERENBOLD, D. 1996, a. Biopolymer mass spectrometer with cryogenic particle detectors. *Nucl. Inst. & Meth. A* 370 : 253.
- TWERENBOLD, D. 1996, b. Cryogenic particle detectors. *Rep. Prog. Phys.* 59 : 349.
- TWERENBOLD, D. & ZEHNDER, A. 1987. Superconducting Sn/Sn-oxide/Sn tunneling junctions as high-resolution x-ray detectors. *J. Appl. Phys.* 61 (1) : 1.
- TWERENBOLD, D., GERBER, D., GRITTI, D., GONIN, Y., NETUSCHILL, A., ROSSEL, F., SCHENKER, D. & VUILLEUMIER, J.-L. 2001. Single molecule detector for mass spectrometry with mass independent detection efficiency. *Proteomics* 1 : 66.
- TWERENBOLD, D., NETUSCHILL, A., DE ROOIJ, N., LUGINBUHL, P., GERBER, D., GRITTI, D., GONIN, Y., ROSSEL, F. & VUILLEUMIER, J.-L. 2002. Detecting single molecules launched from liquid surfaces in a time-of-flight mass spectrometer using ultraviolet and infrared lasers. *Proteomics* 2 : 436.
- TWERENBOLD, D., VUILLEUMIER, J.-L., GERBER, D., TADSEN, A., VAN DEN BRANDT, B. & GILLEMET, P.M. 1996. Detection of single macromolecules using a cryogenic particle detector coupled to a biopolymer mass spectrometer. *Appl. Phys. Lett.* 68 (24) : 3503.
- WOOD, G.H. & WHITE, B.L. 1969. Pulses induced in tunneling currents between superconductors by alpha-particle bombardment. *Appl. Phys. Lett.* 15 (8) : 237.