

Université des Sciences et Technologies de Lille

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THESE DE L'UNIVERSITE DE LILLE 1

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Science de l'Université des Sciences et
Technologies de Lille

Par

Mr. Karim ARAFAH

**Etude lipidomique et développements en imagerie MALDI des lipides :
Application à la régénération du système nerveux central d'*Hirudo medicinalis***

Thèse co-dirigée par les Dr. Isabelle Fournier et Dominique Croix

Membres du Jury

DR. Alain BRUNELLE	Rapporteur
DR. Gérard BOLBACH	Rapporteur
Pr. Ron HEEREN	Examineur
Dr. Peter VERHAERT	Examineur
Pr. Michel SALZET	Président de Jury
Pr. Isabelle FOURNIER	Directrice de thèse
Dr. Dominique CROIX	Co-directrice de thèse

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de neuroimmunologie des Annélides (FRE-CNRS 2933) à l'Université des Sciences et Technologies de Lille.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Michel Salzet pour m'avoir accueilli dans son Unité de recherche, ainsi que pour toute sa confiance et son soutien indeflectible. Merci aussi, cher Michel, pour ta patience à toute épreuve et pour ta disponibilité durant ces trois années.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Gérard Bolbach ainsi que Monsieur le Docteur Alain Brunelle pour avoir accepté d'expertiser ce travail de thèse. Mes remerciements sont d'autant plus forts que le délai pour effectuer cette tâche était très court en raisons d'aléas indépendants de notre volonté commune. Je tiens aussi à témoigner toute ma gratitude à Monsieur le Docteur Peter Verhaert et Monsieur le Professeur Ron Heeren pour avoir accepté d'expertiser ma thèse. Votre présence à tous est un véritable honneur

Un grand merci aussi à Monsieur le Professeur Laprevotte, toute son équipe et Mademoiselle le Docteur Delphine Debois en particulier pour l'enrichissante collaboration sur l'imagerie ToF-SIMS chez *Hirudo*.

Isabelle et Dominique, mes chères directrices de thèse, je vous remercie pour le savoir que vous m'avez transmis. Isabelle, tes solides connaissances en spectrométrie de masse et ta pédagogie sans faille ont éveillé ma curiosité de cette discipline. Dominique, l'experte du monoxyde d'azote au laboratoire ; tu m'as initié à l'ampérométrie et tu m'a appris à amadouer la sonde de mesures dans ses périodes un peu rebelles...merci pour ta patience et pour la transmission de ton savoir. Je vous remercie toutes deux, pour nos échanges fructueux.

Comment faire le bilan des remerciements aux membres du laboratoire sans évoquer Annie, Christelle, Céline, Nathalie et Mathilde. Vous avez toujours été présentes quand il fallait et au moment même où je rédige ces pensées, ma chère Annie, tu m'aides toujours et encore... Je te dédie tout particulièrement une bonne partie de ce travail de thèse. Tu as toujours su te montrer présente et efficace quand mes enseignements d'ATER consumaient mon projet de thèse. Je tiens aussi à rendre un grand hommage à ton sens de l'organisation, ta disponibilité sans compter et pour ta gentillesse à bien des égards. Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire, Joel, Jonathan, Maxence, Jacopo, Françoise, Virginie, Aurélie, Christophe et Pierre-Eric

pour leur soutien continu, pour leur sympathie quotidienne et pour leur aide et disponibilité. Franck, Je t'adresse mes sincères remerciements pour ton soutien et tes encouragements. Je vous souhaite à Emmanuel et toi, de démarrer une bonne carrière.

Comment parler de ces trois années sans voir défiler les générations d'étudiants, tous plus motivés les uns que les autres. Rémi, Mohamed, Muriel, Aurore, David, Céline, Julien, Anne-lise, Thomas et Benjamin Maleck et Laurent, merci à vous tous pour tous les bons moments partagés.

Je souhaite aussi saluer Gilles Courtand pour sa disponibilité et les échanges très enrichissants qui démarraient sur l'imagerie par microscopies pour finir sur des sujets entrecoupés d'un coup de téléphone...suivi par...« ooooh zut, je n'ai pas vu l'heure, j'arrive !!!! » on se comprendra ! merci pour ton amitié et ta sympathie. Merci aussi à toi Loïc pour ta gentillesse et ta disponibilité « à la demande ».

Enfin je vous dédie ce travail maman, papa, Olfa, Sonia et Anissa et vous remercie de m'avoir soutenu jusqu'au bout. Je tiens aussi à te remercier ma Badou, pour ta compréhension, ta patience et ta gentillesse durant ces trois années de labeurs. Un grand merci à vous tous.

Résumé

Les lipides constituent un ensemble de métabolites se déclinant en plusieurs classes. Outre leur rôle structural, ils peuvent aussi agir dans différents mécanismes biologiques en tant que messagers cellulaires. Des recherches en lipidomique sur les facultés de régénération du système nerveux central (SNC) d'*Hirudo medicinalis* après une lésion ont été entreprises. Des images par spectrométrie de masse de type Tof-SIMS (Time-of-flight Secondary Ion Mass spectrometry) réalisées sur le système nerveux lésé d'*Hirudo* ont démontré au cours du temps une apparition localisée d'acides gras et de triglycérides au niveau des neurones lésés. Une approche par spectrométrie de masse MALDI Tof-Tof (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-flight) sur des extraits lipidiques de chaînes nerveuses en régénération ont démontré la présence d'une forte modulation de messagers secondaires lipidiques: le 2 arachidonyl glycerol (2AG) et l'anandamide (AEA) régulant l'activité sécrétoire du monoxyde d'azote (NO) par les cellules microgliales du SNC. A l'inverse des vertébrés, *Hirudo* est capable de réguler très finement sa libération de NO à l'endroit lésé du SNC ce qui favorise les mécanismes de réparation cellulaire après lésion.

En parallèle, une nouvelle approche de développement de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI Tof-Tof des lipides a permis pour la première fois, de valider l'utilisation de colorants histologiques lipophiles en vue de localiser et de caractériser des lipides *in situ* sur coupes de cerveaux de rat. Cette nouvelle approche par les colorants qualifiée de DALDI Tof-Tof (Dye-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-flight) a trouvé des applications directes dans le cancer de l'ovaire où une expression différentielle de lipides a été démontrée entre les régions saine et cancéreuse. Ce travail a donc permis d'une part de mettre en évidence une forte implication des lipides de type cannabinoïdes sur le recrutement des cellules microgliales ainsi qu'une régulation de la production du NO au site de la lésion, et d'autre part, l'apparition de lipides spécifiques au sein des neurones au cours des phases de régénération nerveuse du SNC d'*Hirudo*.

De plus, l'utilisation de colorants histologiques comme matrice en vue de détecter des lipides directement sur coupes de tissus permet d'associer l'application de l'imagerie MALDI des lipides à la recherche de marqueurs potentiels de nature lipidique dans le cancer de l'ovaire. Des perspectives d'interaction avec la biologie clinique et médicale pourraient être envisagées afin de compléter les diagnostics des anatomo-pathologistes par une localisation et une caractérisation des lipides impliqués dans une pathologie donnée.

Curriculum Vitae

Publications

- ✓ Franck J.*, **Arafah K***, El Ayed M., Bonnel D., Vergara D., Jacquet A., Vinatier D., Wisztorski M., Day R., Fournier I., Salzet M.. MALDI Imaging Mass Spectrometry: State of the art technology in clinical proteomics. Mol. Cell. Proteomics, 2009, 8(9):2023-33. *co-auteurs
- ✓ Franck J., **Arafah K.**, Barnes A., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I. Improving tissue preparation for MALDI-MSI. Part 1: using microspotting. Anal Chem. 2009, 81(19):8193-202.
- ✓ **Arafah K.**, Longuespee R, El Ayed M, Bonnel D., Desmons A., Buob D, Salzet M., Fournier I .Developpements of new ionic matrices for the investigation of lipids directly on tissue by MALDI Imaging Mass Spectrometry: Application in rat brain and ovarian cancer hunting of lipid biomarkers. (*en revision J. Proteome Res.*)
- ✓ **Arafah K**, Desmons A., J. Vizioli, R. Day, Fournier I., Croix D., Salzet M. Cross talk between the CB2-like receptor and the nitric oxide systems in the injured leech brain: involvement of the endocannabinoid 2AG in the microglia recruitment at the injured site (*soumission J. Neuroscience*).
- ✓ Jefferey B. Lipitz*, **Karim Arafah***, Xianchong Zhou, Isabelle Fournier,, Michel Salzet, Kenneth J. Muller. Cannabinoid control of microglia migration in the leech CNS (*soumission J. Neuroscience*, *: co-auteurs)
- ✓ Elayed M, Vergara D, Bonnel D, Tasiemski A, **Arafah K**, Franck J, Lucot J.P, Collinet P, Viniatier D, Day R, Fournier I, Salzet M. MALDI imaging on ovary cancer: Tissue Molecular classification, novel biomarkers, immune response modulation (Mol. Cell. Proteomics, soumis)

Brevets

- ✓ **Arafah K.**, Fournier I, Salzet M.
DALDI: Dye Assisted Lazer Desorption Ionisation
référence: D27762_(Etats-Unis, Europe)

Conférences

Orales

- ✓ Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM) /Société Française d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique (SFEAP) 14-17 septembre 2009 Dijon..
Dye Assisted Laser Desorption Ionization mass spectrometry: A new tool for lipid analysis in Imaging Mass Spectrometry

- ✓ XIIèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (RCJSM) 2007 à Carcan Maubuisson, France
Identification par spectrométrie de masse de lipides impliqués dans la neuro-régénération du système nerveux central de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*.

Posters

- ✓ **Karim Arafah**, El Ayed Mohamed, Annie Desmons, Wisztorski Maxence, Isabelle Fournier International Mass Spectrometry Congress 2009 ;
Introduction to DALDI Imaging Mass Spectrometry of Lipids. Application to the ovarian cancer biomarkers hunting

- ✓ **Karim Arafah**; Jeffrey Lipitz; Françoise Croq; Annie Desmons; Michel Salzet; Isabelle Fournier; Dominique Croix. Treizième Journée Scientifique du réseau LARC-Neurosciences, 2008, Caen, France
Cannabinoids and nitric oxide interactions in the Leech neuroregeneration

- ✓ **Karim Arafah**; Jeffrey Lipitz; Françoise Croq; Annie Desmons; Michel Salzet; Isabelle Fournier; Dominique Croix. Douzième Journée Scientifique du réseau LARC-Neurosciences, 2007, Lille, France
Relative quantitation of endocannabinoids in the leech by MALDI Tof-Tof mass spectrometry and nitric oxide detection during the Leech neuroregeneration

- ✓ **Karim Arafah**; Delphine Debois; Maxence Wisztorski; Alain Brunelle; Michel Salzet; Isabelle Fournier. American Society for Mass Spectrometry 2006.
Lipidomics in leech brain regeneration by cluster TOF-SIMS Imaging

Liste des abréviations

2,5 DHB: acide 2,5 dihydroxybenzoïque
2,6 DHAP: 2,6 dihydroxyacetophenone
2A4M5NP: 2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine
2AG: 2-arachydonylglycérol
6,2 ATT: 6-aza-2-thiothymine
ADN: Acide DesoxyriboNucléique
AEA: arachidonyl ethanolamide
CID: Collision induced Dissociation
DALDI : Dye-Assisted Lazer Desorption ionization
DESI: Desorption ElectroSpray Ionisation
DHA: Acide docosahexaénoïque
ESI: ElectroSpray Ionisation
FAB: Fast Atom Bombardment
FID: Flame Ionization Detector
GPC: Gaz Phase Chromatography
HPTLC: High Performance Thin Layer Chromatography
ICC: Immunocytochimie
IHC: Immunohistochimie
IMS: Imagerie par Spectrométrie de Masse
IR: Infra-rouge
ITO: Indium-Tin-Oxide
LAMMA: Laser Microprobe mass Analysis
LDI: Laser Desorption Ionisation
LMIS: Liquid Metal Ion Source
MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
Me-SIMS: Matrix-enhanced-Secondary Ion Mass Spectrometry
Meta-SIMS: Metal-Assisted Secondary Ion Mass Spectrometry
MS: Spectrométrie de masse
NO: monoxyde d'azote
NP-HPLC: Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography
OCN: Oscillating Capillary Nebilizer
PDMS: ParaDiMethylSiloxane
PSD: Post Source Decay
Rf: Rapport frontal
RMN: Résonance Magnétique Nucléaire
S1P1: Sphingosine 1 phosphate
SMALDI: Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

SNC: Système Nerveux Central

SPE: Solid Phase Extraction

SphK1: Sphingosine kinase 1

SphK2: Sphingosine kinase 2

TLC: Thin Layer Chromatography

Tof-SIMS: Time of flight- Secondary Ion Mass Spectrometry

UV: Ultra Violet

Sommaire

Chapitre 1 : Introduction	16
Chapitre 2 : Généralités	22
I. Les lipides	22
1. Les lipides : une superfamille, plusieurs classes, différents rôles biologiques	22
a. Les acides gras :	22
b. Les glycérolipides :	25
c. Les glycérophospholipides ou phospholipides:	25
d. Les glycolipides :	26
e. Les stérols :	30
f. Les prényls :	31
g. Les saccharolipides :	31
h. Les polycétides :	32
2. Les lipides présents dans le système nerveux des Invertébrés :	33
3. Principaux moyens d'étude des lipides:	36
a. Approche lipidomique classique :	37
ii. Techniques d'extraction:	37
iii. Techniques de séparation :	37
b. Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince (TLC et HPTLC) :	38
c. Analyse des lipides par chromatographie liquide (HPLC) :	39
d. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse (GPC):	40
4. Identification des lipides par fragmentation :	42
5. Imagerie des lipides par spectrométrie de masse :	42
a. L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI)	42
b. L'imagerie SIMS	45
c. Cascades de collisions, ionisation et éjection des ions secondaires :	46
d. Les sources d'ions primaires :	48
i. Les sources monoatomiques:	48
ii. Les sources polyatomiques :	48
iii. Les agrégats à constituants « légers » :	49
iv. Les agrégats à constituants « lourds » :	49
e. Applications à l'imagerie SIMS en biologie :	52
6. La source MALDI	57
a. Du LDI au MALDI	57
b. Les matrices les plus fréquemment utilisées	59
c. Principe de l'imagerie MALDI	62
7. Du développement à l'application au niveau du SNC	79
8. Conclusion :	80
II. Etude des messagers lipidiques impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue médicinale <i>Hirudo medicinalis</i>.	81

1. Historique	81
2. Etymologie et Classification	83
a. La classification	83
3. Hirudo medicinalis	85
4. Anatomie	87
a. Organisation générale d' <i>Hirudo medicinalis</i>	87
b. Le Système nerveux d' <i>Hirudo medicinalis</i>	88
i. Structure générale	88
ii. Organisation des ganglions	89
5. Les lipides de type endocannabinoïde	90
a. Les phytocannabinoïdes : origine et propriétés pharmacologiques	90
b. Le système cannabinoïde endogène des Vertébrés :	93
i. Les récepteurs aux cannabinoïdes CB1:	94
ii. Localisation des récepteurs CB1 dans le système nerveux :	98
iii. Principales fonctions biologiques des récepteurs CB1 et quelques exemples d'intérêts thérapeutiques:	98
iv. Les récepteurs aux cannabinoïdes CB2:	101
c. Les endocannabinoïdes majeurs :	103
i. L'anandamide :	103
ii. Le 2-arachidonyleglycérol :	104
6. La biosynthèse des endocannabinoïdes (Figure 12):	105
a. Synthèse de l'anandamide :	105
b. Synthèse du 2-arachidonyleglycérol :	106
c. Le catabolisme des endocannabinoïdes :	108
i. Catabolisme de l'anandamide :	108
ii. Catabolisme du 2-arachidonyleglycérol :	109
7. Le système cannabinoïde endogène des Invertébrés :	111
a. L'oursin :	111
b. La moule :	112
c. L'hydre :	112
d. La sangsue :	112
e. La Cione	113
8. Le Monoxyde d'azote : Origines et fonctions :	113
a. Historique :	113
b. Synthèse du monoxyde d'azote :	114
c. Régulation des NOS chez les mammifères :	118
d. Principales actions du NO en Biologie	118
i. Dans le système nerveux :	118
ii. Dans la Biologie de la reproduction :	119
iii. Dans le système nerveux des Vertébrés :	119
iv. Dans le système nerveux périphérique (SNP) :	120
v. Dans le système nerveux central (SNC) :	120
9. Le rôle du NO chez les Invertébrés :	124
Chapitre 3 : Résultats	128
I. Développements en imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et applications à l'analyse des lipides.	128

1. Apports de l'automatisation des micro-dépôts par impulsion piézo-électrique en imagerie MALDI :	_____	129
1. Nouvelle approche en imagerie MALDI des lipides : des matrices aux colorants lipophiles :		132
2. Conclusion et perspectives:	_____	134
II. Lipidomique & processus de régénération du système nerveux central chez la sangsue médicinale	_____	137
1. Matériels et méthodes :	_____	139
a. Préparations pour l'imagerie ToF-SIMS des lipides:	_____	139
b. Préparations des échantillons pour les analyses en MALDI ToF et ESI-Q-TOF MS/MS :	_____	140
c. Imagerie ToF-SIMS de chaînes nerveuses lésées :	_____	141
d. Fragmentation des lipides par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF/MSMS et imagerie ToF-SIMS des ions parents:	_____	143
vi. Identification des lipides à m/z 789.56 ; 412.26 et 456.15 :	_____	144
e. Conclusion	_____	150
f. Conclusion et perspectives :	_____	152
Chapitre 4 : Conclusion générale	_____	160
Chapitre 5 : Bibliographie	_____	164

Chapitre I : Introduction

Chapitre 1: Introduction

La thèse s'articule en deux parties *i.e.* l'une portant sur des développements technologiques en imagerie par spectrométrie de masse en vue de l'étude des lipides par cette technologie. Le second objectif porte quant à lui sur l'utilisation des techniques de lipidomique et d'imagerie par spectrométrie de masse en vue de l'étude d'un phénomène biologique la régénération nerveuse chez la sangsue médicinale suite à une lésion.

Axe 1

La Première partie de la thèse porte sur la mise en place de différents protocoles de conservation des lipides sur coupes histologiques de cerveau de rat afin d'améliorer la détection des lipides. En parallèle, différentes approches ont été abordées en imagerie MALDI en vue de l'étude des lipides. Tout d'abord, la synthèse d'une nouvelle matrice ionique à base d'un mélange équimolaire de 2,4,6 dihydroxyacétophénone (2,4,6 DHAP) et de 2 amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2,4,5 AMNP) a été réalisée. Ensuite, nous montrons la possibilité d'utiliser des colorants lipophiles absorbant fortement dans l'U.V. pour la détection des lipides en imagerie MALDI, ce que nous avons appelé le DALDI (Dye Assisted Laser Desorption Ionisation).

Axe 2

Dans la seconde partie de la thèse nous avons étudié le rôle des lipides et plus spécifiquement celui des endocannabinoïdes en relation avec la libération du monoxyde d'azote et la migration des cellules microgliales dans les premières phases (processus d'alerte) conduisant à la réparation/régénération du système nerveux central chez la sangsue *Hirudo sp.*

En effet, parmi les Invertébrés, les Lophotrochozoaires présentent un intérêt majeur pour les études concernant la régénération nerveuse: d'une part ils bénéficient de capacités neurorégénératives bien supérieures à celles des Ecdysozoaires (*D. melanogaster*, *C. elegans...*), et, d'autre part, ils seraient plus appropriés d'un point de vue phylogénétique. En effet, certaines molécules, comme les neurotrophines, ont été mises en évidence chez les mollusques et la sangsue médicinale *Hirudo sp.*, alors qu'elles sont absentes des génomes de *D. melanogaster* et *C. elegans*. Parmi ces Lophotrochozoaires, la sangsue *Hirudo medicinalis* possède des capacités de neurorégénération remarquables, c'est pourquoi elle constitue le modèle d'étude incontesté de notre Laboratoire. *H. medicinalis* est capable de régénérer ses neurites et ses connections synaptiques. Tant

sur le plan morphologique que fonctionnel, son SNC se régénère de manière séquentielle en l'espace de quatre semaines, suite à une lésion induite par un écrasement ou une coupure des connectifs interganglionnaires. Différentes molécules ont été caractérisées lors de la mise en place de ce processus neuroprotecteur tout comme l'implication de récepteurs aux signaux de danger de type Toll-like récepteur (TLR) [1]. Parmi ces molécules, des peptides antimicrobiens tels que la lumbricine (*Hm-lumbricin*), la neuromacine (*Hm-neuromacin*), la theromysine (*Hm-Theromysin*) ont été caractérisés chez *Hirudo* [2]. Ces peptides sont synthétisés par les neurones et les cellules microgliales rapidement accumulées sur le site de la lésion nerveuse. Ces auteurs ont démontré leurs effets bénéfiques, à la fois par leurs propriétés antibactériennes mais aussi comme facteurs neurotrophiques de la régénération nerveuse centrale de la sangsue. De manière intéressante, ces trois molécules n'ont pas été détectées chez les Ecdysozoaires *D. melanogaster* et *C. elegans*, renforçant ainsi l'intérêt du modèle Lophotrochozoaire et en particulier d' *Hirudo*, dans le souhait de percer les mystères de la régénération nerveuse. Des facteurs du complément de type C1q tout comme la cytokine Hm-EMAP II [1] participent, eux aussi, aux mécanismes précoces de neuroprotection en favorisant le chimiotactisme des cellules microgliales sur le site de lésion [3]. En effet, la nécessité de l'accumulation des cellules microgliales sur le lieu de la lésion est un pré-requis dans la mise en place des processus de repousse axonale chez la sangsue [4].

Le NO est une molécule cruciale de la phase d'alerte. Lors de la lésion de la chaîne nerveuse centrale de la sangsue, une libération modérée et de courte durée de NO est immédiatement induite au niveau du site endommagé (dès 3 à 5 minutes et s'étalant sur une durée de 20 minutes) [5, 6]. Cette production de NO, mise en évidence de façon indirecte par colorimétrie et fluorimétrie et mesurée par ampérométrie, est dans un premier temps, ponctuelle et indispensable pour initier la régénération de la chaîne nerveuse : l'application de L-NAME, inhibiteur général des NOS, bloque radicalement ce pulse de NO et la régénération. A l'inverse, un apport excédentaire de NO s'est aussi avéré délétère pour la reconstruction axonale. Le NO semble donc être une molécule signal majeure dans les mécanismes précoces qui induisent la régénération. Il semble être un facteur crucial d'induction de l'activation des cellules microgliales et de leur migration vers le site de lésion ; cette action pourrait s'effectuer en synergie avec d'autres molécules telles que l'ATP, les endocannabinoïdes, ou via des transactivations géniques des cytokines. La présence d'une NOS putative constitutive dans les neurones de *H. medicinalis* a été abordée; il pourrait s'agir d'une NOS neuronale dépendante de la calmoduline. Ces mêmes auteurs ont émis l'hypothèse de l'existence d'une NOS endothéliale chez *Hirudo*, également constitutive, présente dans les cellules macro et microgliales.

Les cellules microgliales ainsi activées voient leur morphologie se modifier : elles s'arrondissent et synthétiseraient du NO. Ainsi, bien que les NOS n'ont pu être séquencées chez *Hirudo* à ce jour, des immunoréactivités hétérologues croissantes (3 à 48 heures après la lésion) de type NOS et de type cGMP sont observées dans ces cellules qui s'agglutinent alors au niveau de la lésion. Ces

immunoréactivités suggèrent l'existence de concentrations importantes de NO, survenant donc dans un second temps. Ce NO est alors également indispensable et permettrait aux cellules microgliales de s'accumuler au site de lésion en les dirigeant puis en les stoppant sur ce site [7]. En corrélation avec ces résultats, un pré-traitement du SNC de la sangsue au bleu de méthylène avant la lésion, induit une migration désorganisée de la plupart des cellules microgliales activées, migration se poursuivant même au-delà de la lésion et conduisant en échec toute forme de régénération [8]. La compréhension de ce phénomène passe par l'action double du bleu de méthylène : chélateur du NO [9] et inhibiteur de la guanylate cyclase soluble (sGC, générée par le NO).

La surproduction de NO après lésion étant l'une des causes majeures de l'incapacité des Vertébrés à régénérer leur SNC, nous avons voulu savoir si, et par quels mécanismes, la sangsue *Hirudo* était capable de contrôler sa production de NO, à la suite d'un traumatisme de son SNC, sous un seuil compatible avec la survie cellulaire et, par voie de conséquence, propice à la régénération.

En reprenant les travaux de Stefano et al. et de Salzet et al., qui ont démontré l'existence d'un dialogue endocannabinoïdes/NO chez *Hirudo medicinalis* [10-15], notre objectif a été de démontrer en quoi le système endocannabinoïde de la sangsue pouvait contrôler la cinétique de libération du NO après lésion nerveuse et participer au recrutement des cellules microgliales en vue d'engager le processus réparateur.

Chapitre II : Généralités

I. Les lipides

1. Les lipides : une superfamille, plusieurs classes, différents rôles biologiques

Découverts par Eugène Chevreul au XIX^e siècle, les lipides constituent une classe de biomolécules aussi diversement représentée dans les règnes Eucaryote et Procaryote que les protéines, les peptides ou encore les glucides. D'un point de vue structural, les lipides se différencient des autres métabolites cellulaires par leur nature « grasseuse » et constitue la seule source de matière grasse au sein des organismes vivants. Les lipides sont des petites molécules hydrophobes ou amphipathiques principalement composées de carbone, d'oxygène et d'hydrogène et ayant une densité inférieure à celle de l'eau. Même si Eugène Chevreul, suite à sa découverte, a proposé une classification des acides gras, aucune définition ni classification unique des lipides n'a à ce jour été adoptée de façon unanime par la communauté scientifique. Ceci est vraisemblablement imputable au fait que les lipides forment un ensemble de molécules aux structures plus ou moins complexes et aux fonctions extrêmement variées dans le monde du vivant. Aussi, l'idée de créer une classification simple des lipides à l'usage des chimistes, des biologistes, des cliniciens ou encore des pharmaciens aboutit en 1976 à une nomenclature dressée par l'*IUPAC* et basée sur la comparaison des squelettes hydrocarbonés des différents lipides [16]. Par la suite, avec un perfectionnement des outils d'analyse du lipidome, des mises à jour ont régulièrement été proposées à la communauté internationale en complétant la nomenclature *IUPAC* [17]. Ainsi, la superfamille des lipides se découperait en huit groupes pouvant se décliner en classes et sous classes. Nous passerons en revue les différents groupes et leurs composantes afin de rappeler leurs structures et leurs principales activités biologiques

a. Les acides gras :

D'un point de vue biochimique, les acides gras sont initialement formés dans le cytoplasme des cellules à partir d'un précurseur, l'acétyl-coenzyme A libéré par la mitochondrie lors du cycle de KREBS ou par la voie de dégradation des acides gras et des acides aminés céto-gènes (lysine et leucine). Outre ce précurseur, la cellule nécessite différents cofacteurs et enzymes permettant entre autre la carboxylation de l'acétyl coenzyme A en malonyl coenzyme A.

Des cycles successifs additionnant tour à tour les résidus de malonyl permettent la synthèse cytosolique des acides gras jusqu'à l'acide palmitique à quatorze atomes de carbone. Les élongations supplémentaires des chaînes se font ensuite dans la mitochondrie de la cellule où l'acétyl coenzyme A constituera la « brique élémentaire » lors de l'élongation.

Les acides gras se caractérisent donc par la répétition d'un groupement méthyle $-CH_2-$. Ce motif répété forme alors une chaîne hydrocarbonée contenant classiquement un nombre pair d'atomes de carbone (4 à 36 atomes) qui confèrent l'hydrophobicité aux acides gras. Ils se déclinent en treize classes dont les principales peuvent être résumées sous les termes d'acide gras saturés et leurs dérivés insaturés, ainsi que les acides gras insaturés de type eicosanoïde dont le précurseur est l'acide arachidonique à vingt atomes de carbone, les esters ou encore les amides d'acides gras. Les premiers entrent généralement dans la composition des autres groupes de lipides ainsi que dans les systèmes membranaires des cellules et de leurs organites alors que les seconds sont les précurseurs de puissants messagers cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire tels les prostaglandines, les prostacyclines et les thromboxanes les isoprostanes et les leucotriènes (**Figure 1**).

Les esters d'acide gras entrent dans la composition des cires qui sont largement répandues dans le règne animal et végétal et les amides d'acide gras entrent dans la composition des molécules de type endocannabinoïde. D'un point de vue biologique, les acides gras saturés assurent une certaine rigidité à la membrane des organites et de la cellule alors que des rôles plus spécifiques ont été décrits sur les acides gras insaturés. Les principaux lipides insaturés se déclinent en trois séries, la série ω -3 dont fait partie l'acide docosahexaénoïque (DHA) C22 :6 représenté dans la **Figure 2**, la série ω -6 dont fait partie l'acide arachidonique C20 :4 et quelques uns de ses métabolites illustrés dans la **Figure 1**.

Salem et al.[18] ont montré que dans le système nerveux central des vertébrés, l'acide gras majoritaire, le DHA à 22 atomes de carbone et 6 double liaisons (C22 :6), était essentiel pour l'intégrité des fonctions nerveuses. Au niveau des neurones, le DHA exerce son activité neuroprotectrice en étant associé aux phospholipides alors que les astrocytes sont capables de le libérer de leurs propres membranes pour agir comme des facteurs trophiques sur les neurones [19]. En parallèle, des travaux ont également montré que les acides polyinsaturés exerçaient un rôle anti-apoptotique sur les neurones du système nerveux central [20] où l'action du DHA passerait par une stabilisation de la phosphatidylsérine dans le feuillet interne de la membrane plasmique, inhibant ainsi le déclenchement de la mort cellulaire programmée ou apoptose [6]. Autre lipide polyinsaturé largement représenté dans le cerveau, l'acide arachidonique est au centre d'un grand nombre de fonctions cérébrales [21], en effet, sa libération intracellulaire par clivage enzymatique à partir d'un phospholipide membranaire permet d'acquies ses principales fonctions biologiques. Ainsi, l'acide arachidonique et ses dérivés sont impliqués dans le contrôle de la libération des neurotransmetteurs [22], du sommeil [23] ou encore de l'appétit [24]. Ils sont également fortement impliqués dans les mécanismes d'expression des gènes du système nerveux [11, 12]. Des travaux ont également démontré qu'une altération dans le métabolisme

de l'acide arachidonique pouvait être à l'origine de maladies neurologiques telles que l'épilepsie [25] ou l'ischémie cérébrale [26] ou encore neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [15], la maladie de Parkinson [27] ou encore les démences liées à l'infection par le virus du sida [28]. L'ensemble des principales implications des deux acides gras majoritaires dans le SNC des vertébrés, l'acide arachidonique et le DHA, est résumé dans le **tableau 1**.

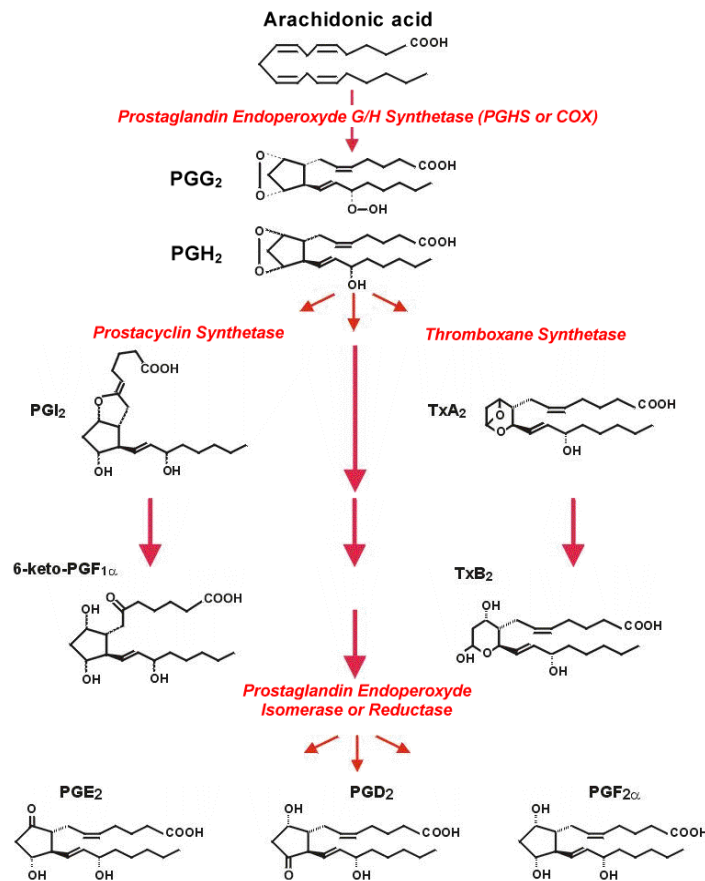


Figure 1 : Illustration de quelques dérivés pro-inflammatoires de l'acide arachidonique (d'après GREMI, Groupe de Recherche et d'Etude des Médiateurs de l'Inflammation)

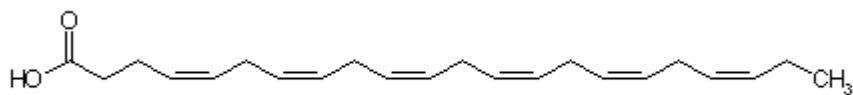


Figure 2 : L'acide gras polyinsaturé docosahexaénoïque ou DHA (22:6 D^{4,7,10,13,16,19} ou w 3, 6, 9, 12, 15, 18)

		Conditions physiologiques	Conditions pathologiques
Acides gras insaturés majoritaires du SNC Messagers cellulaires	Acide arachidonique et ses dérivés	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Contrôle du sommeil ▪ Régulation de la libération de neurotransmetteurs ▪ Contrôle végétatif de l'appétit ▪ Régulation de l'expression de gènes du SNC 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Epilepsie ▪ Ischémie cérébrale ▪ Inflammation cérébrale (production de leucotriènes, thromboxanes, prostaglandines) ▪ apparition des maladies neurodégénératives ▪ Démence liée au virus HIV
	DHA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Facteur neurotrophique ▪ Facteur anti-apoptotique ▪ Communication interneuronale ▪ Entretien de la mémoire ▪ Médiateur transductionnel 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Facteur anti-inflammatoire ▪ lipide neuroprotecteur ▪ Forme précoce de la maladie d'Alzheimer si déficience métabolique

Tableau 1 : Principales fonctions des acides gras polyinsaturés AA et DHA

b. Les glycérolipides :

Les glycérolipides sont des macromolécules lipidiques synthétisées dans la lumière du réticulum endoplasmique lisse des cellules Eucaryotes puis exportés vers tous les systèmes membranaires de la cellule. Le squelette de ce groupe de lipide est un phosphoglycérol. Les glycérolipides sont synthétisés dans la cellule par réaction d'estérification entre un, ou deux acide(s) gras saturé(s) ou insaturé(s) et un radical phosphoglycérol donnant ainsi un acide phosphatidique qui par hydrolyse libère un mono ou diglycéride respectivement. La formation du triglycéride s'opère ensuite par estérification d'un troisième acide gras sur la fonction alcool primaire du diglycéride. Les glycérolipides exercent un rôle structural dans la membrane et participent à la fluidité des membranes plasmique en fonction de leur composition en acide gras.

c. Les glycérophospholipides ou phospholipides:

La synthèse des glycérophosphoriques a une trame commune avec celle des triglycérides. Elle se fait aussi dans le réticulum endoplasmique lisse et se caractérise par l'estérification d'un alcool gras porteur d'un groupement phosphate sur le diglycéride. Dans ce groupe des phospholipides, les alcools gras sont de différentes natures (choline, éthanolamine, inositol, sérine) et forment les sous classes de phospholipides respectifs (phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol ou encore phosphatidylsérine). Le clivage entre le groupe des glycérolipides et celui des glycérophospholipides tient essentiellement à leurs rôles biologiques distincts. Les phospholipides sont les lipides les plus représentés dans les systèmes membranaires et renferment dans leurs structures des composés ayant des propriétés de messagers biologiques secondaires. Citons par exemple le phosphatidylinositol qui participe à des mécanismes de transduction de signaux cellulaires et dont le

clivage enzymatique par une protéine kinase C libère l'inositol triphosphate IP3. Citons également le rôle joué par la phosphatidylsérine comme messenger capable d'activer les mécanismes d'apoptose une fois transloquée vers la face extracellulaire de la membrane plasmique.

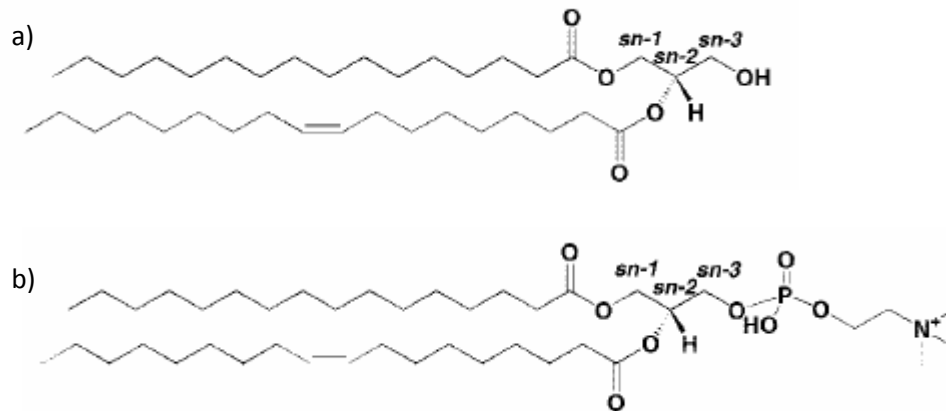


Figure 3 : Illustration du groupe des glycérolipides (a) (1-hexadecanoyl-2-(9z-octadecenoyl)-sn-glycérol) et des glycérophospholipides (b) (1-hexadecanoyl-2-(9z-octadecenoyl)-sn-glycéro-3-phosphocholine)

d. Les glycolipides :

Après les glycérophospholipides, les sphingolipides forment les seconds constituants majoritairement rencontrés dans les membranes plasmiques, ces lipides pouvant représenter jusqu'à 20% des éléments membranaires. Il s'agit d'une famille complexe de composés partageant une structure de base, la sphingosine, un aminoalcool à 18 atomes de carbone naissant dans la membrane du réticulum endoplasmique lisse des cellules eucaryotes. La sphingosine est le résultat d'une réaction de décarboxylation entre une malonyl coenzyme A et une sérine. L'amidification de la sphingosine par un acide gras C16 à C24 saturé ou mono-insaturé fournit un précurseur appelé céramide commun à toute la famille des sphingolipides. Le système nerveux central est un organe riche en céramides. Cette variété de sphingolipides exprimés dans les rafts lipidiques des membranes plasmiques est impliquée dans les mécanismes de développement neuronal en contrôlant d'une part la croissance des axones et des dendrites des neurones [29] et d'autre part, l'induction de l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'entrée en sénescence des cellules [30]. Des études ont démontré qu'une accumulation prolongée de céramides dans les lysosomes des neurones du système nerveux central peut conduire à l'apparition de maladies métaboliques neurodégénératives telles que la maladie de Gaucher ou la maladie de Fabry .

La distinction des sous classes des sphingolipides se fait selon la nature de l'élément esterificateur de la fonction alcool primaire de la sphingosine. Ainsi, comme décrit dans le **Figure 4**, la classe des sphingophospholipides comprenant entre autre les sphingosines-1-phosphates et les sphingomyélines est obtenue par phosphorylation ou par ajout d'une phosphocholine ou d'une phosphoéthanolamine au squelette sphingosine. Le cerveau est l'organe qui renferme la plus forte concentration en sphingosines, et notamment la sphingosine-1-phosphate [31]. Les voies de

biosynthèse de ce lipide implique la phosphorylation d'une sphingosine par des enzymes appelées sphingosines kinases (SphK) qui ont été clonées et caractérisées chez les mammifères [13, 17]. Ces sphingosines kinases (SphK1 et SphK2) partagent 80% d'homologie en séquences protéiques ainsi qu'un domaine diacylglycérol kinase liant l'ATP. Parmi les différences entre ces deux enzymes, l'absence de domaines transmembranaires dans la SphK1 explique en grande partie sa localisation cytosolique [32] alors que la SphK2 comporte non seulement des séquences transmembranaires mais aussi une extrémité N-terminale différente de la SphK1 permettant sa translocation dans le noyau des cellules afin de contrôler finement la synthèse d'ADN [28]. Il a été montré chez la souris que l'expression de la SphK1 est abondante dans le cœur, la rate, le poumon et le cerveau alors que la SphK2 est beaucoup plus exprimée dans le cerveau, les reins et le foie [28]. Dans le cerveau, la SphK1 est largement exprimée dans le cervelet ainsi qu'au niveau des dendrites des cellules de Purkinje et dans les neurones de l'hippocampe. La synthèse et la libération neuronale de la sphingosine-1-phosphate par la SphK1 sont physiologiquement associées à des mécanismes de libération du glutamate lors des processus de transmission synaptiques entre les neurones. En parallèle, la sphingosine-1-phosphate entretient la libération de cet acide aminé neuro-excitateur en favorisant l'entrée de calcium dans le neurone via les canaux calciques voltage-dépendant. Ce messenger lipidique entretient donc la libération de neurotransmetteur au glutamate en s'opposant aux effets inhibiteurs de la sphingosine sur les canaux calciques. Des travaux récents ont également mis en évidence une augmentation de la biosynthèse de sphingosine-1-phosphate après lésion de la moelle osseuse en réponse à l'accumulation de cellules microgliales et astrocytaires sur le site de la lésion. Cette augmentation locale de sphingosine-1-phosphate induit la migration de cellules neuronales progénitrices à l'endroit de la lésion en vue d'y amorcer une réparation.

La sphingosine-1-phosphate est un lipide qui participe fortement à la croissance et à la survie des oligodendrocytes, cellules qui myélinisent les axones dans le système nerveux central des Vertébrés. Dans les pathologies cérébrales telles que les scléroses multiples, la démyélinisation des axones s'accompagne de la destruction des oligodendrocytes. Les thérapies actuelles consistent à utiliser une approche immunomodulatoire qui vise à limiter la destruction de ces cellules par les macrophages et les lymphocytes T activés, en partie responsables de la démyélinisation des axones. Dernièrement, un analogue synthétique de la sphingosine-1-phosphate, le FTY720, a été développé et est actuellement en phase 3 des essais cliniques [33]. Une fois administrée et métabolisée *in vivo* par la SphK2 et non la SphK1, cette molécule a démontré une diminution significative des taux de rechute des patients traités. L'explication de l'efficacité de cette drogue passe par le fait que cet analogue de la sphingosine-1-phosphate entraîne une désactivation prolongée du récepteur sphingosine-1-phosphate de type 1 (S1P1), un des cinq isotypes de récepteur à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G₀/G_i liant la sphingosine-1-phosphate. Des études ont montré que la sensibilisation des lymphocytes puis leur migration depuis les tissus lymphoïdes secondaires jusqu'au lieu de l'inflammation se font

suivant un gradient de sphingosine-1-phosphate et met en jeu le récepteur S1P1 . De cette manière, le FTY720 agit comme un retardateur efficace de l'arrivée des thymocytes, des lymphocytes et autres cellules immunitaires sur les sites démyélinisés. Le FTY720, en plus de favoriser la survie des oligodendrocytes, agit sur la différenciation des cellules progénitrices oligodendritiques capables d'agir sur la remyélinisation des axones chez l'Homme.

L'estérification de la sphingosine par un sucre conduit aux cérébrosides alors qu'une estérification par une chaîne polysidique pourra donner des glycolipides neutres ou encore des gangliosides s'ils renferment en plus un ou plusieurs sucre(s) acide(s) de type acide sialique (ou N acétyl neuraminique). Cette sous classe des sphingolipides est appelée glycosphingolipide. Dans le système nerveux central, les gangliosides sont exprimés au niveau des neurones du cortex et des noyaux gris basaux du cerveau où ils participent activement à l'édification et la croissance des dendrites. L'accumulation des gangliosides monosyalilés (GM2) dans les neurones entraîne la formation ectopique de dendrites [34] ou affecte la croissance neuronale en stimulant l'apoptose [35]. Une autre conséquence du taux élevé de gangliosides GM2 concerne l'apparition de la maladie neurodégénérative de Sandhoff qui se caractérise par une inflammation cérébrale aiguë [36]. Cette neuroinflammation a pour origine l'activation des cellules immunitaires de type microgliales qui phagocytent les neurones et induisent leur apoptose. La compréhension des rôles des gangliosides dans le maintien des fonctions neuronales fait encore à l'heure actuelle l'objet de recherches intensives.

Les glycoglycérolipides forment un autre représentant du groupe des glycolipides. L'architecture des glycoglycérolipides diffère de celle des glycosphingolipides par le remplacement du squelette de base, la sphingosine, par un glycérol. Ces glycoglycérolipides sont peu présents chez les vertébrés en particulier, les mammifères chez qui, ils entrent de façon mineure dans la composition des lipides du cerveau. A l'inverse, ces glycolipides glycérolés sont plus abondants chez les plantes et les bactéries. Cependant, un lipide appartenant à ce sous groupe de glycolipides a été isolé et identifié dans l'extrémité céphalique de la blatte [37].

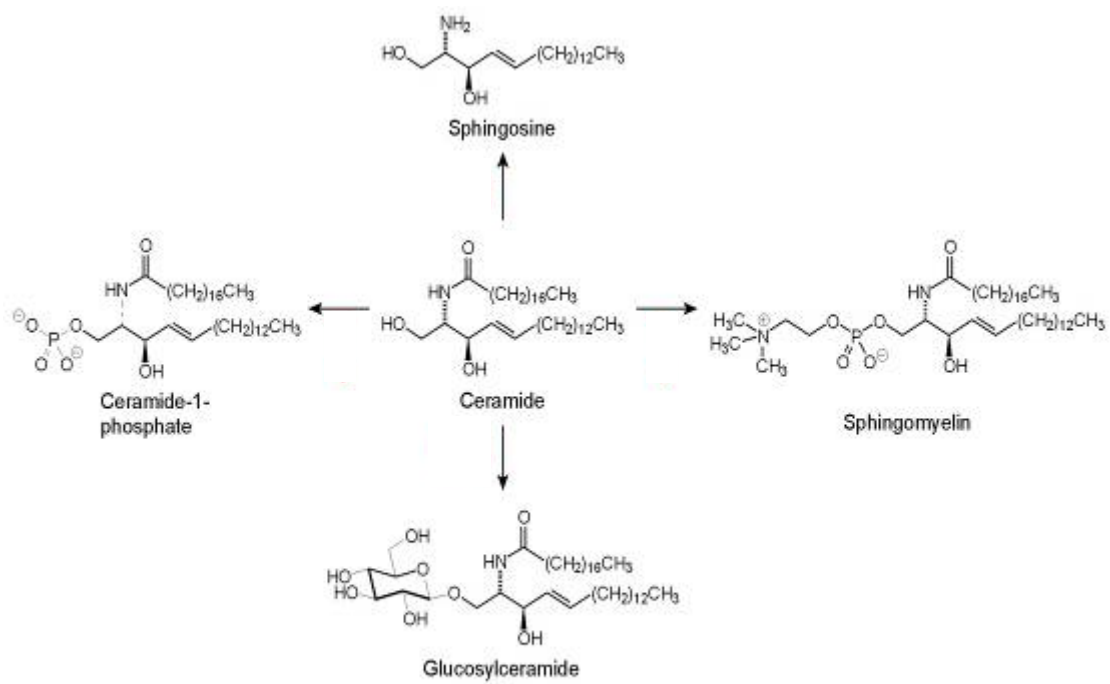


Figure 4 : les principaux membres du groupe des sphingolipides

e. Les stérols :

Egalement fabriqués par le réticulum endoplasmique lisse des cellules spécialisées, les lipides de type stérols sont subdivisés en fonction de leurs activités biologiques en stéroïdes et en dérivés du cholestérol. L'unité moléculaire commune à tout ce groupe est le noyau stéroïde constitué par trois cycles phénanthréniques et un cycle à 5 atomes de carbone formant pour l'ensemble une structure de base à 17 atomes de carbone. Des groupements méthyles supplémentaires portés par le noyau stéroïde permettent l'obtention des noyaux oestrane (18C) et androstane (19C), précurseurs des hormones de type œstrogène et androgène. L'ajout d'une chaîne aliphatique de deux à huit carbones conduit à la formation des noyaux prégnane (21C), cholane (24C) et cholestane (27C) dont provient le cholestérol (**Figure 5**).

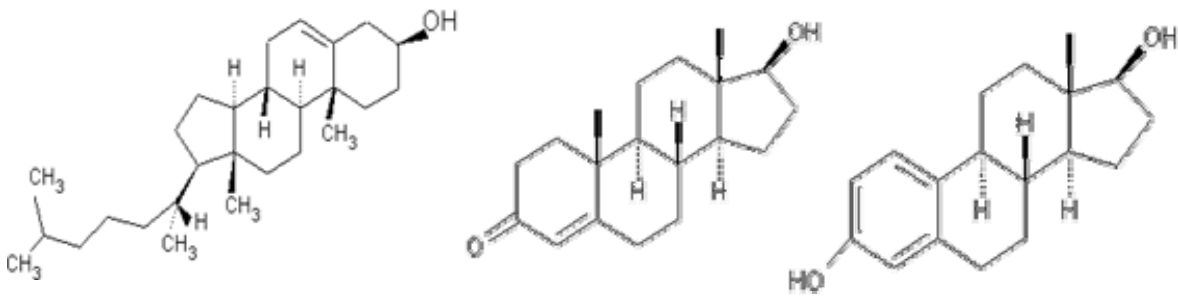


Figure 5 : Quelques représentants du groupe des stérols ; le cholestérol (a), la téstostérone (b) et l'estradiol (c)

Les Sphingolipides et les stérols sont regroupés au niveau des membranes plasmiques au sein d'unités hypermobiles appelées rafts lipidiques et qui correspondent à un foyer de concentration en lipides et en protéines s'étalant sur 10 à 200 nm de largeur sur les deux faces de la membrane plasmique [32]. Ces rafts lipidiques associés à des protéines peuvent activer les signaux apoptotiques par le biais d'une interaction étroite entre les céramides et les récepteurs fas dits de mort cellulaire [27]. Des travaux ont montré que dans les pathologies du SNC telle que la maladie d'Alzheimer, les rafts lipides riches en cholestérols et en gangliosides participent fortement dans l'accumulation des plaques β -amyloïdes à la surface des neurones [28-30]

f. Les prénols :

Ce groupe apparenté aux lipides est formé à partir de précurseurs isoprènes à cinq atomes de carbone dont la synthèse se fait majoritairement par la voie de l'acide mévalonique [38] dans le règne eucaryote et par la voie du méthylerythritol phosphate chez les procaryotes [39].

Ce groupe se décline en trois classes que sont les isoprénoïdes, les dérivés quinoniques et les polyprénols. Largement représentés dans le règne végétal, les isoprénoïdes renferment la sous-classe des terpènes, puissantes molécules odorantes des plantes. Citons également les caroténoïdes tels que la provitamine A ou le β -carotène (**Figure 6(a)**) issus de la polymérisation de 40 unités isoprènes associée à un cycle β -ionone, puissant agent anti-oxydant. Dans la sous-classe des dérivés quinoniques figurent les vitamines K et E ainsi que les cofacteurs enzymatiques mitochondriaux (ubiquinone, coenzyme Q10) ou chloroplastiques chez les plantes (plastoquinones). Citons enfin dans la classe des polyprénols, les dolichols synthétisés par les animaux et les plantes et consistant en un enchaînement de 18 à 22 groupements isoprènes (**Figure 6(b)**) alors que les polyprénols des bactéries n'en comptent que 10 à 12 en moyenne.

Leurs rôles sont cruciaux dans les membranes puisqu'ils agissent comme des transporteurs de sucres. Ils peuvent également intervenir dans leur synthèse ainsi que leur glycosylation.

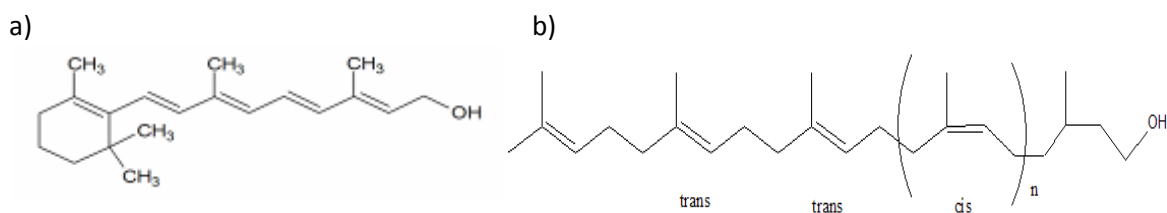


Figure 6 : Le groupe des prénols, illustration par deux membres, la pro-vitamine A (a) et le dolichol (b)

g. Les saccharolipides :

Bien qu'étant constitué de sucres et de lipides, ce groupe se distingue des sphingolipides et plus particulièrement des glycolipides par le fait que les saccharolipides résultent de l'association directe des chaînes d'acide gras avec un ou plusieurs sucre(s). Largement représentés chez les procaryotes et en particulier chez les bactéries à Gram-négatif (**Figure 7**), les saccharolipides existent à la surface de ces cellules sous plusieurs formes dont la plus répandue est l'association d'un acide gras avec une glucosamine, le tout, entrant dans la composition du lipide A du lipopolysaccharide [33] et caractérisant la pathogénicité des bactéries.

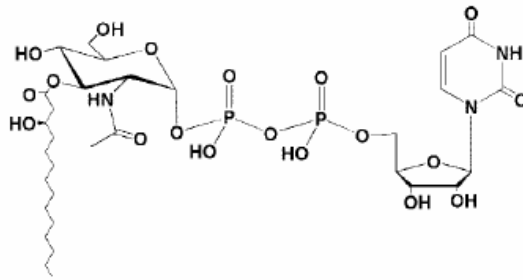


Figure 7 : Structure d'un saccharolipide bactérien : l'UDP-3-O-(3R-hydroxy-tetradecanoyl)-αD-N-acetylglucosamine

h. Les polycétides :

Les polycétides sont des métabolites secondaires produits par les procaryotes (bactéries) tout comme les eucaryotes (champignons, plantes et animaux). Les voies de biosynthèse de ces molécules partagent une forte homologie avec celles des acides gras et résultent de la condensation itérative de sous-unités acétyles ou malonyles catalysée par des enzymes spécialisées, les polycétides synthétases.

La polycétide synthétase I catalyse par exemple la formation de l'acide ascorbique (vitamine C) ou de la coumarine dans les plantes, molécules appartenant à la famille des lactones et qui renferment entre 14 et 40 atomes de carbone. Les polycétides synthétases de type II et III induisent la formation de polycétides aromatiques qui sont des toxines comme l'aflatoxine B représentée ci-dessous (**Figure 8**), des tétracyclines ou encore des molécules antibactériennes, anticancéreuses ou anti-parasitaires.

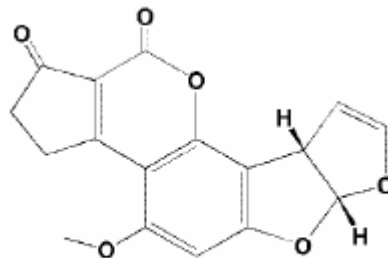


Figure 8 : l'Aflatoxine B1 appartenant au groupe des polycétides

2. Les lipides présents dans le système nerveux des Invertébrés :

Des études sur la composition en lipides chez les Invertébrés ont permis de démontrer qu'il existe diverses classes structurales avec une certaine spécificité d'expression au sein des différentes espèces biologiques. D'un point de vue général, Rabinowitz et al. ont déterminé la composition lipidique de l'annélide polychète *Eudistylia*, de la limule *Limulus*, arthropode marin, ou encore celle du mollusque gastéropode *Busycon* et du calmar *Loligo* [40]. Ces quatre Invertébrés renferment essentiellement des lipides neutres et des phospholipides. Dans les cartilages de *Limulus* et d'*Eudistylia*, les lipides neutres majoritairement retrouvés renferment des triglycérides, des acides gras méthylés et saturés (acide palmitique essentiellement) ainsi que des lipides apparentés aux esters de stérol. Les phospholipides majoritairement exprimés dans ces deux espèces sont les phosphatidylcholines, les acides phosphatidiques ainsi que les phosphatidyléthanolamines. Chez le calmar *Loligo*, les lipides neutres sont surtout composés d'acides gras libres et de lipides apparentés aux esters de stérol tandis que les phospholipides majoritaires sont les acides phosphatidiques et les phosphatidylcholines. Le gastéropode *Busycon* exprime surtout des acides gras libres ainsi que du cholestérol, des phosphatidylcholines, des phosphatidylserines, des phosphatidylethanolamines et des acides phosphatidiques. Des sphingomyélines et des lécithines ont également été découverts dans les cartilages de ces Invertébrés.

Saito et al. ont caractérisé dans les ganglions cérébraux de la seiche *Todarodes pacificus* et de la pieuvre *Octopus vulgaris* des lipides acides de type ganglioside [41] en combinant des techniques de chromatographie sur couche mince, de lyse enzymatique et de spectrométrie de masse (MS). Ces travaux ont apporté la preuve formelle que les mollusques produisent des gangliosides contenant de l'acide sialique. Ce type de lipide a également été mis en évidence chez la mouche à fruit *Drosophila melanogaster* qui exprime spécifiquement une glycosphingolipide à acide N-acétyl neuraminique durant certains stades de développement [42]. D'autres protostomiens incluant les insectes [43] et le vers de terre *Pheretima hilgendorfi* [38] renferment des glycosphingolipides neutres qui leurs sont spécifiques. Des glycosphingolipides ont été isolés et caractérisés dans les larves de la mouche *Lucilia caesar*. Ces lipides portent des enchaînements saccharidiques constitués de 5 à 7 motifs alternant des manosamines, des galactosamines, des glucosamines et du manose. Le squelette lipidique renferme des acides gras de 16 à 22 atomes de carbone ainsi qu'une structure de base définissant cette classe de lipide et portant soit une chaîne aliphatique à 14 atomes de carbone, soit une chaîne insaturée homologue de la shingénine C16:2. D'autre part, un nouveau glycosphingolipide renfermant du phosphore a été découvert chez la mouche *Calliohora vicina meigen*. Par la suite, un glycosphingolipide propre au mille-pattes et renfermant du fucose a été découvert puis caractérisé

par spectrométrie de masse chez *Parafontaria laminata armigera* [44]. D'autres lipides de type glycolipide ont été isolés et caractérisés dans la partie céphalique de la blatte *Blaberus colloseus* en utilisant un panel de techniques incluant la résonance magnétique nucléaire (RMN) et la spectrométrie de masse (MS) de type PDMS et FAB [37]. Ces lipides, dont la structure renferme des motifs osidiques associés à un squelette glycérol, appartiennent à la classe des glycolipides. Ces travaux ont présenté pour la première fois, l'existence de tels lipides chez un insecte et cette découverte fut d'autant plus surprenante que la structure précise de ces lipides nommés blabérosides était inconnue dans la famille des glycolipides d'origine animale ou végétale. Outre un rôle structural, les fonctions biologiques des lipides découverts chez ces Invertébrés restent encore à éclaircir.

Les Invertébrés produisent également des sphingolipides et plus précisément des sphingolipides acides contenant de l'acide glucuronique. Ces lipides ont été caractérisés chez deux variétés de mouche *Lucilia caesar* [45] et *Drosophila melanogaster* [46] ainsi que chez un Invertébré Urochordé, l'ananas de mer *Halocynthia roretzi* [47]. Chez ce dernier, la composition d'un sphingolipide acide nommé UGL-1 a été déterminée. Il contient d'une part des céramides à base d'acide palmitique et d'acide stéarique ou des phytosphingosines et d'autre part, des résidus sucrés tels que le galactose et le fucose liés à l'acide glucuronique. Des travaux menés sur l'oursin de mer ont permis de montrer que les Echinodermes sont capables d'exprimer des gangliosides ainsi que des glycosphingolipides acides [43, 44]. Les fonctions biologiques sont encore en cours d'étude.

Une revue récente de Kostetsky et Velansky a rassemblé l'essentiel des connaissances actuelles sur les lipides produits par les Invertébrés [48]. Les contenus en lipides des organes des mollusques, des arthropodes, des lophotrochozoaires et des bivalves ont été étudiés. Il apparaît que leurs systèmes nerveux renferment un taux élevé de phospholipides (Phosphatidylsérines, Phosphatidyl, Phosphatidylcholines, Phosphatidyléthanolamines, Phosphatidylinositol, Phosphatidylglycérol). Des dérivés de céramides n'ont pas été détectés dans le ganglion viscéral de la moule *Mytilus edulis*, ni dans les ganglions cérébraux de la pieuvre *Octopus sp.* Alors qu'un taux élevé est au contraire produit dans le cerveau des lophotrochozoaires annélides *Chaetopterus variopedatus* et *Serpula vermicularis*. Le lombric est le modèle annélide dont l'étude des lipides a été la plus complète [49]. Dans leurs travaux, Okamura et al. ont rapporté la présence de phospholipides à sérine, choline, éthanolamine et inositol dans le système nerveux du vers de terre *Lombricus terrestris*. Le système nerveux de cet annélide exprime aussi des plasmalogènes et bien qu'ayant une « myéline-like », les galactocérobrosides et les sulfatides n'ont pas été détectés, pourtant marqueurs de la myéline chez les Vertébrés. La sphingomyéline n'a pas été détectée dans le tissu cérébral du lombric alors que les sphingolipides ont été isolés et déterminés en faible quantité. Cette différence

de composition en lipides membranaires entre le système nerveux du lombric et celui des Vertébrés s'explique en partie par la différence au niveau de la myélinisation des axones. Chez le lombric comme la crevette ou la sangsue, les axones des neurones sont entourés par des cellules gliales dont le corps des cellules forment de multiples couches concentriques tout au long des axones et constitue une structure myéline-like. La sangsue médicinale qui est un annélide tout comme le lombric, produit également des lipides.

Une étude de la composition lipidique de son système nerveux central est abordée dans la suite de ce mémoire. Parmi ces lipides, les endocannabinoïdes issus de l'acide arachidonique ont été caractérisés chez la sangsue. D'autres dérivés de l'acide arachidonique ont également été isolés dans le système nerveux central d'un petit Invertébré marin, l'aplysie ou lièvre de mer (*Aplysia sp.*) [47, 48]. Dans le système nerveux central de ce gastéropode, l'acide arachidonique peut être métabolisé en acides hydroxyeicosatétraénoïques par action d'une lipoxygénase et en prostaglandines par action d'une cyclooxygénase. Ces lipides ainsi que ces deux enzymes sont exprimés dans les corps neuronaux et les synaptosomes de l'aplysie. Les auteurs ont également décrit un lien possible entre l'activation des récepteurs à histamine et la libération de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires. En effet, les dérivés de l'acide arachidonique ont été obtenus après stimulation des neurones de l'aplysie par de l'histamine. Au niveau physiologique, la production puis la diffusion de ces dérivés lipidiques contrôlent la communication inter-neuronale dans le système nerveux central de l'aplysie en favorisant l'inhibition présynaptique.

3. Principaux moyens d'étude des lipides:

Comme nous venons de le rappeler, les lipides se déclinent en multiple classes et sous-classes avec pour chacune d'elles des fonctions biologiques essentielles mais également des propriétés physico-chimiques extrêmement variées. Ces différentes fonctions biologiques reposent schématiquement sur plusieurs aspects :

- ✓ L'édification d'une réelle limite physique entre l'intérieur et l'extérieur d'une cellule (membrane) ou d'un organite cellulaire (endomembrane) constituées en majeure partie par les phospholipides.
- ✓ Un rôle non négligeable en tant que molécules énergétiques (glycérides) constituant la première source de stockage énergétique de l'organisme, la troisième à être hydrolysée après les sucres et les protéines.
- ✓ Une source considérable de messagers au carrefour de multiples voies métaboliques. Citons par exemple les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique ou l'acide docosahexaénoïque qui composent bon nombre de phospholipides et qui sont les précurseurs de métabolites (eicosanoïdes, lipoxines) ou encore les précurseurs du facteur activant les plaquettes sanguines ou l'inositol triphosphate [50]. De même, les céramides, produits de clivage des sphingolipides, jouent un rôle majeur dans la modulation de la prolifération cellulaire, dans la sénescence et l'apoptose [51] ainsi que dans l'activation de certains récepteurs membranaires (insuline, facteur de croissance) et comme marqueur cellulaire (auto-immunité, tumeur, groupes sanguins ABO).

Face à la diversité de cette famille et de leurs implications dans les processus biologiques, l'idée de créer une spécialité émergente dédiée à l'étude des lipides dans leur environnement naturel est apparue sous le terme de lipidomique. Resté dans l'ombre de la génomique et de la protéomique, la lipidomique a connu un constant essor depuis les années 2000, date de renouveau pour cette discipline sous l'impulsion de Gross et al.[52]. L'objectif a été d'améliorer l'identification des lipides à partir des techniques pré-existantes à savoir, les techniques chromatographiques (HPLC, GC, TLC) et d'analyse structurale (RMN, MS). Les progrès considérables des techniques analytiques au cours de ces 10 dernières années ont considérablement contribué au domaine de la lipidomique en facilitant l'identification des différents lipides composant les différents organismes.

a. Approche lipidomique classique :

Cette approche lipidomique se fait classiquement en plusieurs étapes commençant par une extraction totale des lipides contenus dans un tissu biologique suivi d'une éventuelle séparation en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

ii. Techniques d'extraction:

Comme dans toute stratégie analytique, l'extraction est une des étapes clef et détermine un accès plus ou moins grand aux différentes familles de lipides. Différentes méthodes d'extraction des lipides ont été développées. Ces méthodes sont principalement des méthodes d'extraction en milieu liquide-liquide (LLE) et sont connues depuis de nombreuses années. Il faut citer notamment la méthode d'extraction de Folch et al. en 1953 [53] qui repose sur l'utilisation d'un mélange chloroforme/méthanol. Cette méthode permet d'extraire les lipides en broyant directement les tissus biologiques dans ce mélange. En 1959, Bligh & Dyer [54] ont introduit une variante à la méthode de Folch en y ajoutant de l'eau. Cette méthode est recommandée pour l'extraction des lipides dans les échantillons biologiques en milieu liquide et permet une séparation entre phase aqueuse et phase organique [55]. Enfin, une troisième méthode rapportée par Radin et al. en 1981 [56] et utilisant un mélange hexane/isopropanol présente l'avantage d'être moins néfaste pour l'expérimentateur que les deux précédentes.

L'extraction de type liquide-liquide est basée sur l'utilisation d'un mélange de solvants non miscibles entre eux et conduisant à la formation de deux voire trois phases dans lesquelles les différents lipides viendront se partitionner en fonction de leur degré d'hydrophobicité et de polarité. C'est par la méthode de Folch que nous avons extrait les lipides du système nerveux central de la sangsue *Hirudo medicinalis* (cf chapitre suivant)

iii. Techniques de séparation :

Par analogie avec la protéomique classique, plusieurs méthodes séparatives ont été développées en lipidomique afin de séparer les différentes classes de lipides les unes des autres dans un mélange complexe de lipides obtenus après extraction. Kaluzny et al. ont démontré pour la première fois la faisabilité du concept en séparant de manière globale, rapide et avec un bon rendement les différentes classes lipidiques d'un mélange complexe par fractionnement en phase solide (SPE) [57]. Cette méthode consiste à utiliser une phase solide stationnaire (cartouche de silice ou de silice modifiée [58]) dans laquelle est déposé l'extrait de lipides. Après interaction des lipides avec la silice, une phase liquide mobile (solvant organique tel que le chloroforme, l'hexane, le

méthanol, l'éthanol, l'isopropanol...) permet d'éluer les lipides de manière plus ou moins sélective. Comme rapporté dans les travaux de Kaluzny et al., la SPE permet de séparer avec efficacité les glycérophospholipides, les acides gras, les glycérolipides, les cholestéris esters ou encore, les stérols et de réaliser ainsi une pré-purification suivi d'un fractionnement de la plupart des classes de lipides contenus dans des échantillons biologiques [57] tout en purifiant l'extrait des traces de contaminants non lipidiques [59]

Cependant, une des limites de la SPE concerne sa plus faible résolution de séparation des lipides comparée aux techniques chromatographiques qui elles, permettent une séparation plus fine des lipides au sein d'une classe donnée. La chromatographie est restée à l'heure actuelle la méthode de choix pour la séparation des différents lipides constituant un mélange complexe. A ce titre, les chromatographies les plus fréquemment employées sont la chromatographie sur couche mince (TLC), la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) et la chromatographie en phase gazeuse (GPC).

b. Analyse des lipides par chromatographie sur couche mince (TLC et HPTLC) :

Technique de référence pour la séparation des lipides [60], la TLC utilise une phase stationnaire constituée d'une couche de silice déposée sur un support (verre, aluminium) et d'une phase mobile composée d'un mélange de solvants ayant des polarités différentes (classiquement chloroforme, méthanol, eau, triéthylamine, isopropanol, éthanol, etc). Les lipides sont déposés sur la phase stationnaire à la base de la plaque et vont migrer de manière passive, entraînés par le mélange de solvants jusqu'à leur position d'équilibre avec la phase stationnaire. Un coefficient R_f , ratio du front de migration du lipide avec le front de migration du solvant permet de caractériser la classe à laquelle ce lipide appartient. Afin d'améliorer la résolution séparative de la technique pour certaines familles de lipides, des modifications de la silice peuvent être envisagées. , Une modification chimique de la silice avec du magnésium, de l'argent ou de l'oxalate peut ainsi être réalisée. Une telle modification de la composition de la phase stationnaire a permis par exemple d'améliorer la séparation des phospholipides [60, 61]. D'autres améliorations ont également été recherchées en ajoutant par exemple une seconde dimension de séparation. Ainsi, l'équipe de Singh et al. a développé une technique de TLC bidimensionnelle qui a permis à la technique de gagner en résolution face aux échantillons de composition lipidique complexe [61]. Enfin, dans les années 2000 a été introduite la chromatographie sur couche mince dite à haute performance (HPTLC) [62] dont le

principe de minimisation de surface de la phase stationnaire a permis une séparation plus rapide et plus efficace des lipides ainsi qu'un gain de sensibilité..

La TLC possède de nombreux désavantages en comparaison des autres techniques de chromatographie (HPLC et GPC). En particulier, lorsqu'il s'agit d'analyser les phospholipides, une perte progressive de la structure de ces lipides peut être observée [63] suite à une oxydation ou à une hydrolyse au contact prolongé avec l'air ambiant.

De plus, la TLC présente un niveau moindre de reproductibilité, de sensibilité et de résolution face à des techniques telles que l'HPLC ou la GPC.

c. Analyse des lipides par chromatographie liquide (HPLC) :

Technique de référence dans l'analyse séparative des lipides [64, 65], la technique HPLC utilise elle aussi, une phase stationnaire se présentant classiquement sous forme de particules de silice sphériques réparties à l'intérieur d'une colonne dont les caractéristiques de longueur et de diamètre interne ainsi que le diamètre et la densité des particules remplissant la colonne influencent grandement la résolution de séparation [64]. Elle se compose également d'une phase mobile (gradients de solvants de polarité différente) permettant l'élution progressives des lipides ayant interagit avec la phase stationnaire et ce dépendamment du coefficient de partage des composés entre la phase stationnaire et la phase mobile.

La phase stationnaire utilisée pour la séparation des lipides peut-être de deux types, normale ou inverse. La séparation des lipides se pratique donc soit par HPLC dite en phase normale (normal phase HPLC ou NP-HPLC) soit, par HPLC en phase inverse (reverse phase HPLC ou RP-HPLC) selon la polarité des lipides à étudier. En phase normale, la phase stationnaire est polaire et acide. Elle est constituée d'un gel de silice, où la silice est modifiée de manière à présenter des groupements silanols ou siloxanes. La rétention des composés polaire et/ou acides se fait au travers d'interactions faibles de type liaison hydrogènes. L'HPLC en phase normale est employée pour la séparation des lipides neutres ou acides. Ainsi, des études ont montré l'utilité de la technique NP-HPLC dans la séparation des triglycérides et autres lipides neutres ainsi que des phospholipides acides [67-69]. En phase inverse, la phase stationnaire est à base de silice greffée en phase inverse par de longues chaînes aliphatiques (typiquement C3, à C18) confèrent à la phase stationnaire des caractéristiques hydrophobes et apolaires. En phase inverse, les interactions faibles mises en jeu sont de type interaction hydrophobes. La RP-HPLC, quant à elle, s'emploie donc pour la séparation des lipides hydrophobes et de polarités modérée.. Appliquée aux phospholipides, une chromatographie en phase normale est dédiée à la séparation des sous classes de phospholipides alors qu'en phase

inverse, elle permet de discerner les phospholipides en fonction de leurs compositions en acide gras [70].

Bien que couramment employées, ces techniques de chromatographie demandent une mise au point permanente du traitement de l'échantillon si bien qu'il est très difficile d'établir une méthode standard pour la détection simultanée d'une large gamme de lipides en une seule expérimentation. Ceci est d'autant plus vrai que la détection est pratiquée en UV et que l'absorption dans l'UV est reliée au nombre de doubles liaisons des acides gras constituant les différentes classes de lipides. Ainsi, il peut-être parfois nécessaire de modifier chimiquement les lipides (dérivation chimique) pour pouvoir les détecter avec une bonne sensibilité, ce qui alourdit d'autant la stratégie d'étude. Ainsi, la chromatographie nécessite une optimisation permanente des protocoles expérimentaux pour chaque gamme de lipides à séparer.

d. Analyse des lipides par chromatographie en phase gazeuse (GPC):

Les premières applications de la GPC dans l'analyse des lipides datent des années 1950 et portaient sur des extraits d'acides gras [65]. Le principe de la GPC est proche de celui de la chromatographie liquide. Les composés se séparent en fonction de leur coefficient de partage entre la phase stationnaire et la phase mobile. Comme en LC, la phase stationnaire est solide. En revanche, la phase mobile est un gaz vecteur inerte (He, N₂, H₂ classiquement) et les composés sont élués par gradient de température. La phase stationnaire est soit un liquide non ou peu volatil possédant les propriétés d'un solvant vis-à-vis du composé à séparer, soit un solide adsorbant. Dans les phases stationnaires liquides sont fréquemment rencontrées des polysiloxanes de propriété apolaire ou des polyéthylènes glycols qui sont des phases plus polaires. Les phases stationnaires solides sont des matériaux adsorbant divers tels que la silice, l'alumine, les zéolites ou des polymères. Dans leurs travaux, Hoving et al. ont rapporté l'emploi d'une colonne apolaire pour l'analyse et la séparation des phospholipides [66].

Cependant, une des limites de cette technique reste la capacité à volatiliser les différents lipides. Cette limite se pose par exemple pour l'analyse des phospholipides qui ne sont pas facilement volatiles. Afin de contourner cet obstacle, Tserng et al. ont proposé d'ajouter aux acides gras des phospholipides un dérivatif améliorant considérablement la volatilité des acides gras [67]. Ainsi, dans certains cas, une dérivation chimique des lipides est nécessaire à leur analyse par GPC. En sortie de GPC, différentes détections peuvent être utilisées.

Les détecteurs sont classiquement :

Le détecteur à ionisation de flamme (FID) : Ce détecteur présente les avantages d'être très sensible, très stable et applicable à une grande famille de composés organiques tout en présentant une réponse linéaire sur une large gamme en quantification. La détection des lipides se fait après combustion au contact d'une flamme et ionisation par une électrode situées en sortie de colonne. Un des désavantages du FID est qu'il détruit l'échantillon risquant ainsi la perte des informations sur la structure moléculaire des lipides [68].

La spectrométrie de masse : dans ce cas, la détection se fait au travers de la mesure du rapport m/z du composé après ionisation de ce dernier. Des spectres sont enregistrés tout au long de l'analyse chromatographique à intervalles réguliers permettant ainsi de reconstruire un pseudo-chromatogramme sur la base du courant ionique total (TIC) détecté à un instant donné. Classiquement, les spectromètres couplés en aval des GPC présentent une source EI/CI et les analyseurs utilisés sont le plus souvent de type quadripolaire (quadripôle, pièges à ions). Les lipides sont recherchés à partir de leur temps de rétention et la mesure de leur rapport m/z . La MS présente l'avantage d'être sensible et de permettre également des études structurales afin d'obtenir une identification des composés.

Le couplage des techniques séparatives des lipides par chromatographie avec l'analyse par la spectrométrie de masse marque l'entrée de celle ci dans l'ère de la lipidomique. Dans ce sens, en 2003, Gross et al. ont décrit l'utilisation à part entière, de la spectrométrie de masse de type Electrospray (ESI) comme méthode de choix en lipidomique.

Les avantages techniques résident entre autre sur la possibilité à la fois de détecter les lipides contenus dans un extrait global et de les caractériser sur le plan moléculaire [52].

4. Identification des lipides par fragmentation :

La caractérisation des lipides n'est pas encore clairement établie pour toute les classes. Cependant, des travaux sur la fragmentation des phospholipides dans les analyseurs qTof, triple quadrupole et trappe linéaire ont abouti à la compréhension d'un schéma de fragmentation des phospholipides. Celle-ci se fait par perte successive des acides gras estérificateurs en *sn1* et *sn2* des phospholipides. L'activation du mode Collision Induced Dissociation (CID) favorise la perte des têtes polaires des phospholipides en ESI comme en MALDI [75, 76].

L'activation du mode CID clive l'acide gras estérificateur de la plupart des céramides [69] et d'autres dérivés de la sphingosine peuvent présenter un autre schéma de fragmentation [70].

5. Imagerie des lipides par spectrométrie de masse :

a. L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI)

L'imagerie par spectrométrie de masse a pour but d'associer les informations moléculaires recueillies en MS avec la localisation de ces informations à l'intérieur d'un échantillon. Il faut ainsi pouvoir disposer d'un instrument permettant d'établir une corrélation directe entre les données moléculaires collectées et leur localisation au sein de l'échantillon. Classiquement ceci est obtenu par utilisation d'une source de production d'ions permettant de produire des ions en phase gazeuse à partir d'une zone définie de l'échantillon. Dans cette optique, toutes les sources de production d'ions ne seront pas adaptées. Les sources conduisant à la production des ions au travers du bombardement de l'échantillon par un faisceau incident sont tout naturellement plus adaptées que des sources fonctionnant à partir d'un milieu liquide comme les sources d'ionisation par Electronébulisation (ESI) par exemple. Les sources de Désorption/Ionisation Laser (LDI), de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) et de Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (SIMS) sont donc particulièrement adaptées à cette utilisation avec respectivement un bombardement par un flux de photons pour le LDI et le MALDI et d'ions fortement accélérés dans le cas du SIMS. D'autres sources, variantes de l'ESI plus récemment apparues, comme le DESI [79, 80] peuvent également être utilisées pour l'analyse de zones définies sur les échantillons. Ainsi, traditionnellement, un contrôle de l'aire irradiée sur l'échantillon est réalisé, le plus souvent en contrôlant la focalisation du faisceau incident. Ainsi un contenu moléculaire particulier est associé à un pixel d'échantillon. Il est alors possible en réalisant une analyse en mode point par point (analyse en mode microprobe) d'obtenir une collection de données moléculaires à partir de l'intégralité de la

surface. L'extraction dans cette matrice de données des variations de l'intensité d'un signal particulier correspondant à un composé donné par rapport aux coordonnées de ce pixel d'analyse sur l'échantillon, puis par report de ces variations d'intensité sur une échelle de couleur permettent alors de visualiser sous la forme d'une image la localisation de ce composé dans l'échantillon. Tous types de surfaces et d'échantillons peuvent être analysés allant des surfaces organiques et inorganiques aux échantillons biologiques. Dans le cadre d'échantillons biologiques ces derniers peuvent être regardés à différentes échelles spatiales allant de la cellule, à l'organel, l'organe et même l'organisme entier. Pour les objets de faible dimension comme les cellules ou les organel, ces derniers peuvent être introduits entiers dans la source de l'instrument. En revanche, à l'échelle d'organes ceux-ci sont habituellement étudiés après réalisation de sections minces plus compatibles avec les dimensions des sources de production d'ions et permettant d'éviter également certains problèmes liés aux variations d'épaisseur de l'échantillon.

Dans sa composante la plus classique, le protocole expérimental suivi en MSI consiste tout d'abord à réaliser des sections histologiques minces (5 à 20 μ m en général) à l'aide d'un cryostat pour les tissus conservés par congélation (figure 4a,b) ou d'un microtome pour les tissus conservés après inclusion dans la paraffine ou la celloïdine (**Figure 11c,d**).

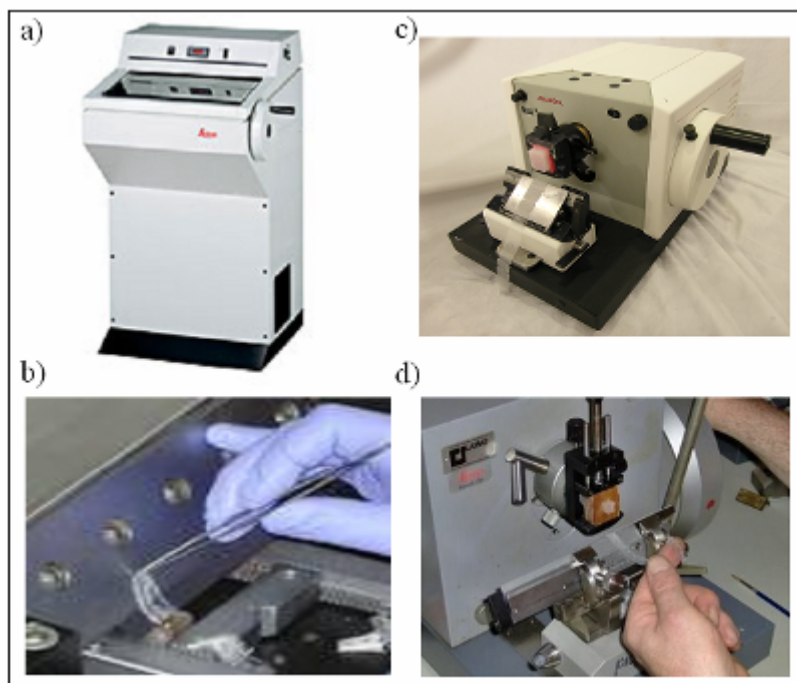


Figure 11 : Confection des coupes (b,d) à partir d'un cryomicrotome (a) ou d'un microtome(c)

Les coupes ainsi confectionnées sont ensuite déposées sur un support conducteur (lame histologique revêtue de métaux conducteurs (Indium Tin oxyde : ITO) en imagerie MALDI, plaque en inox ou en

silicium pour l'imagerie SIMS) puis déshydratées avant d'y déposer à leur surface un composé organique appelé matrice et favorisant toute acquisition en mode MALDI ou favorisant l'acquisition des bio-molécules supérieures à 1 kDa en SIMS comme il sera décrit ci-après.

Une trame commune aux différentes analyses d'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) consiste à introduire le support portant la (les) coupe(s) histologique(s) ou des cellules cultivées, dans la source du spectromètre de masse puis d'en réaliser un profil point par point du contenu en bio-molécules. Ce procédé, dont le principe global est schématisé dans la **Figure 12**, implique l'utilisation d'une combinaison de logiciels pilotant le déplacement automatisé de l'échantillon dans la source du spectromètre ainsi que le paramétrage, l'acquisition et la sauvegarde des spectres point par point. Ainsi, ces logiciels sont capables d'enregistrer les coordonnées planaires (x;y) de chaque point analysé sur la coupe afin d'en reconstruire la localisation précise sur le tissu une fois l'acquisition complètement terminée.

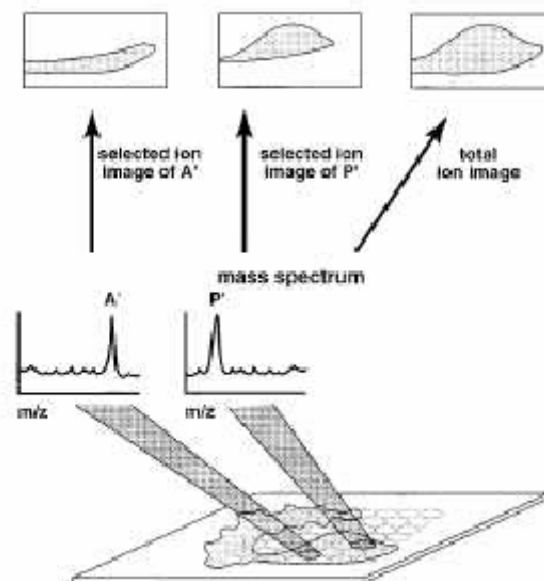


Figure 12: Représentation conceptuelle de l'Imagerie par Spectrométrie de Masse MALDI illustrant deux bio-molécules A' et P' localisées à deux endroits différents sur une coupe histologique (d'après Caprioli et al.[71])

Dans ce contexte, la technique d'imagerie idéale doit permettre de détecter, de localiser des biomolécules connues ou inconnues avec la meilleure résolution spatiale possible et de les caractériser. Le tout, en un minimum d'étapes tout en n'étant pas invasive. Même si pour l'heure, cette technique n'existe pas encore, la MSI est néanmoins capable de satisfaire bon nombre de ces critères. Bien qu'invasive, la MSI permet l'observation de cellules, de tissus voir d'organisme complet

à l'instar de l'IRM avec l'avantage sur cette dernière d'en livrer le continu moléculaire et la répartition cytologique ou histologique de manière précise.

b. L'imagerie SIMS

Hérité des premières recherches de Thomson dans les années 1900 et amélioré pour l'imagerie par Castaing et Slodzian en 1962, la Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires (Secondary Ion Mass Spectrometry ou SIMS) est une technique de spectrométrie de masse ancienne dédiée à la microanalyse chimique des composants de surfaces solides ou de fins films biologiques.

La détection des composants de surface d'un échantillon donné est basée, en SIMS, sur le bombardement de cette surface par un faisceau ions primaires de la source d'ionisation SIMS.

L'interaction entre le faisceau d'ions primaires et la surface de l'échantillon analysé provoque des cascades de collisions atomiques qui aboutissent à l'éjection de matière. Cette matière peut être constituée d'atomes ou de fragments d'atomes (clusters) représentant la composition chimique à l'endroit même de l'échantillon où les ions primaires ont conduit à l'éjection de particules secondaires sous la forme de neutres, d'électrons et d'ions positifs et négatifs. Une fois extraits, ces derniers sont accélérés dans la source SIMS avant d'être séparés selon leur rapport m/z dans un analyseur où règne un vide poussé. La **Figure 13** montre une source SIMS équipée d'un analyseur (segment tubulaire vertical) de type « temps de vol » ou TOF.



Figure 13 : Spectromètre de Masse SIMS à temps de vol : ToF-SIMS (ICSN, Gif-sur-Yvette, France)

(Avec nos remerciements à l'Equipe du Laboratoire de Spectrométrie de Masse - Institut de Chimie des Substances Naturelles – CNRS - UPR 2301 du Dr A. Brunelle, Gif-sur-Yvette, France).

c. Cascades de collisions, ionisation et éjection des ions secondaires :

Bien que les processus exacts d'ionisation impliqués en SIMS ne soient pas complètement connus, un modèle de cascade de collision a néanmoins pu être établi et admis par la Communauté Scientifique. Ce modèle schématisé dans la **Figure 14** décrit les réactions chimiques se produisant au point d'impact entre le faisceau d'ions primaires et la surface de l'échantillon à analyser. En présence d'un vide poussé dans la source SIMS ($<10^{-6}$ Torr), ce faisceau d'ions est accéléré de quelques keV à quelques MeV et percute l'échantillon à analyser. Il se produit alors au niveau du point d'impact un transfert momentané de l'énergie des ions primaires à l'échantillon sur une profondeur d'analyse comprise entre 50 et 100Å et une profondeur d'endommagement variable entre 100 et 500 Å.

C'est précisément des 50 à 100 premiers Å que proviennent les particules secondaires, fruit d'une série de cascades de collisions élastiques des ions primaires avec les atomes constituant l'échantillon. Ces ions secondaires sont alors désorbés du point d'impact et sont principalement des ions monoatomiques ou des petits agrégats de molécules, neutres ou chargés électriquement et ayant une grande énergie interne (plusieurs centaines d'eV) ainsi que des photons et des électrons.

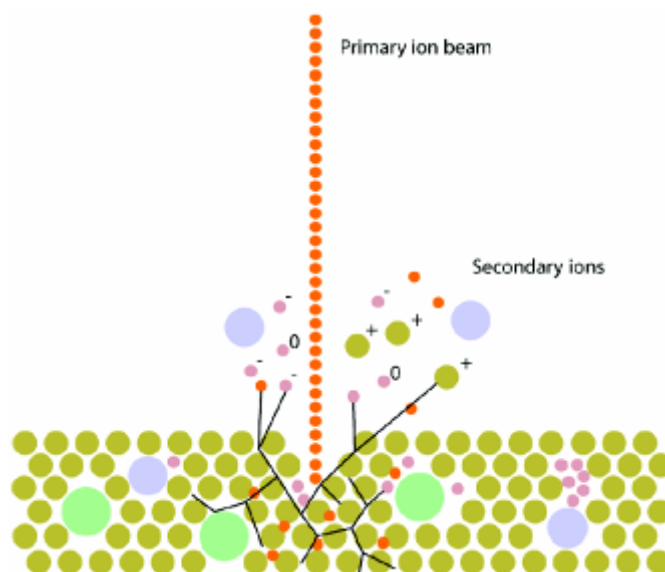


Figure 14 : Model de la cascade de collisions en SIMS.

Un faisceau d'ions primaires hautement énergétique percute un échantillon et provoque un transfert d'énergie sur une profondeur de 50 à 100Å de la zone d'impact. Les ions secondaires ainsi formés sont éjectés et accélérés dans la source

Le phénomène d'éjection de matière est étroitement lié à l'énergie des ions primaires, à leur fluence c'est à dire le nombre d'ions primaires qui atteignent l'échantillon par unité de surface lors de l'analyse et bien entendu à la nature même de ces ions primaires.

Bien que le SIMS soit considéré comme une technique destructive, l'érosion de l'échantillon peut être finement contrôlée en ajustant précisément la fluence du faisceau d'ions primaires. Il en découle alors deux régimes d'émission des ions secondaires à partir de l'échantillon, les régimes statique et dynamique :

- Le régime statique emploie un faisceau d'ions primaires à une fluence inférieure ou égale à 10^{13} ions/cm² [72]. Dans ce régime, l'endommagement de l'échantillon est pratiquement limité à la couche supérieure permettant la réalisation d'images couche par couche [83, 84]. Les particules secondaires émises peuvent être neutres (99.9%), de charges positives ou négatives (0.1%).
- Le régime dynamique utilise une fluence d'ions primaires nettement supérieure à celle du SIMS statique. Sa valeur dépasse généralement les 10^{16} ions/cm² et la pénétration de ces ions dans l'échantillon se fait de manière plus profonde par comparaison au mode statique. Les ions secondaires émis sont issus des multiples fragmentations induites dans la profondeur de l'échantillon et sont plutôt de nature monoatomique ou correspondent à de très petits agrégats moléculaires. Ce régime d'analyse est particulièrement apprécié dans l'étude des variations de composition élémentaire en relation avec la profondeur d'un matériau (depth profiling). Citons, par exemple, son utilité dans l'industrie des nanotechnologies pour l'étude des couches de structure qui constituent les circuits intégrés des semi-conducteurs.

D'une manière générale, les valeurs limites des fluences données au SIMS statique et dynamique sont relatives car il faut toujours avoir à l'esprit que l'endommagement d'un matériau est aussi fonction de sa nature et de sa résistance (matériels biologiques, microcircuits imprimés, polymères et autres composés organiques...).

d. Les sources d'ions primaires :

Les sources d'ions primaires sont l'une des composantes clés dans l'instrumentation SIMS. Elles sont soit monoatomiques (Cesium Cs^+ , Gallium Ga^+ , oxyde O^-), soit polyatomiques et ces dernières se déclinent même en sous-ensembles selon qu'elles sont faites d'entités cationiques polyatomiques de faible masse moléculaire unitaire telles que le carbone C_{60}^+ ou alors des agrégats constitués d'éléments de haute masse moléculaire unitaire tels que les agrégats d'or Au_3^+ ou de bismuth Bi_3^+ . Plus récemment, des agrégats de taille plus importante (Au_{400}^+) ont également été testés comme source d'ions primaires en SIMS

Il va de soi que la nature des différentes sources d'ions primaires influence directement la qualité et le rendement d'ions secondaires produits lors de la cascade de collision. Dans ce sens, nous passerons donc en revue les propriétés de ces sources monoatomiques et polyatomiques.

i. Les sources monoatomiques:

Elles sont représentées par une large classe d'ions utilisés historiquement en spectrométrie de masse SIMS en mode dynamique principalement. Les plus répandues sont les ions Ga^+ , In^+ , Cs^+ ou O^- dont la focalisation des faisceaux est particulièrement appréciée en mode imagerie dans le domaine de la biologie. Ceci tient au fait que ces faisceaux d'ions primaires permettent d'atteindre une résolution spatiale bien inférieure au micron (50 nm). Cependant, plusieurs défauts occultent cette qualité de résolution obtenue en imagerie moléculaire : l'efficacité de désorption et le rendement d'émission d'ions secondaires qui restent faibles ainsi que l'endommagement important de l'échantillon causé par la pénétration excessive de ces ions primaires. Des tentatives de Storm et al. ou encore Shuhmacher et al. d'utiliser des gaz rares ou du gallium comme sources primaires ont également conduit à des taux faibles d'ionisation secondaire [73, 74].

Ainsi, les ions secondaires émis n'excèdent pas 200 Da ce qui a précipité l'abandon progressif de ces sources monoatomiques d'ions primaires dans le domaine de l'imagerie en biologie où la majorité des métabolites cellulaires ont une masse nettement supérieure à 200u.

ii. Les sources polyatomiques :

Dans la volonté d'augmenter le rendement en ions secondaire après collision ainsi que la gamme de masse accessible à l'analyse SIMS notamment en imagerie biologique, des efforts concertés depuis près de vingt ans ont permis de concevoir des nouvelles sources primaires polyatomiques. Un nouveau concept se basant sur l'idée de provoquer plusieurs cascades de collisions en série à partir de l'émission d'ions polyatomiques a vu le jour.

Ainsi Andersen et al. ont démontré que le rendement de pulvérisation n'évolue pas de façon linéaire avec le nombre d'ions polyatomiques [75, 76]. D'autres équipes ont mis en évidence par la suite que l'augmentation du rendement d'ions secondaires ne répondait pas de façon linéaire au nombre d'atomes constituant la source polyatomique [89-91].

Ces travaux ont été à l'origine de l'application du SIMS à l'analyse des composés moléculaires et non plus uniquement atomiques. En outre, Bolbach et al. ont montré que 90% des ions secondaires émis en utilisant les sources polyatomiques se situaient à une profondeur d'environ 10nm [77] ce qui suppose que les ions polyatomiques déposent la majeure partie de leur énergie dans les premières couches de l'échantillon à proximité de la zone d'impact.

iii. Les agrégats à constituants « légers » :

Il s'agit des ions de type fullerènes (famille des C_{60}^+ et C_{60}^{2+}) [78] et les ions de la famille SF_5^+ et SF_6^- [94, 95]. L'impact de ces ions avec la surface de l'échantillon provoque un dépôt d'énergie conséquent sur les premières couches et de manière supérieure à ce que pourrait libérer la version monoatomique de ces ions. Ainsi, la désorption et l'ionisation des composés ainsi que l'endommagement sur l'échantillon en sont améliorés. Néanmoins, la focalisation de ce type de faisceaux d'ions n'est pas optimale (plusieurs dizaines de microns de résolution) face à ce que le SIMS peut proposer en termes de résolution spatiale en imagerie biologique.

iv. Les agrégats à constituants « lourds » :

Cette famille comporte les agrégats d'or [79] et de bismuth [80]. Une des caractéristiques de cette famille est qu'elle est constituée d'une pointe liquide, initialement utilisée pour l'émission d'ions Ga^+ ou In^+ . Cette source est aussi communément appelée Source d'ion métal liquide (LMIS) dont un schéma est détaillé dans la **Figure 15 [81]**.

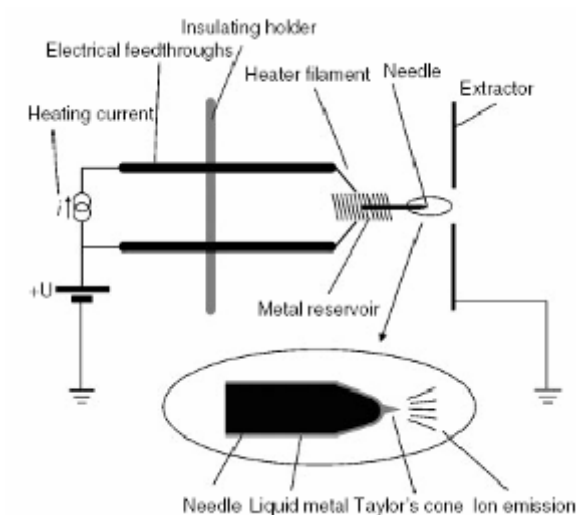


Figure 15 : Représentation schématique d'une source LMIS d'après Brunelle et al.[81]

Les métaux qui ne sont pas liquides à température ambiante sont mélangés à d'autres composés afin de former des alliages de température de fusion beaucoup plus basse (quelques centaines de degrés). C'est typiquement le cas de l'or dont la température passe de 1064°C (or pur) à 356°C pour un mélange or/germanium. Le métal ou l'alliage de métal est chauffé dans le réservoir et mouille la pointe. Une forte différence de potentielle appliquée sur un extracteur situé en sortie de pointe permet alors la formation d'un cône de Taylor qui correspond à l'émission d'ions de métaux en phase gazeuse. Néanmoins, une étape supplémentaire de sélection en masse des ions primaires souhaités est ensuite nécessaire ce processus conduisant à la formation d'agrégats variés après des ions primaires.

Les sources à pointe liquide constituent un compromis idéal de part l'excellente focalisation qu'elles permettent d'atteindre associée à un faible endommagement de l'échantillon et une efficacité accrue d'ionisation. Elles sont actuellement le moyen d'ionisation privilégié dans les études menées en imagerie SIMS. Ainsi le choix se pose entre les LMIS à l'or ou au bismuth. Dans leurs travaux, Touboul et al.[80] soulignent l'intérêt des agrégats de bismuth plutôt que or car ces sources permettent l'obtention d'une meilleure focalisation du faisceau d'ions primaires en mode imagerie (400 nm avec des ions Bi_5^{2+}), une durée optimisée d'acquisition des données et un rendement de production d'ions secondaires plus important (**Figure 16**).

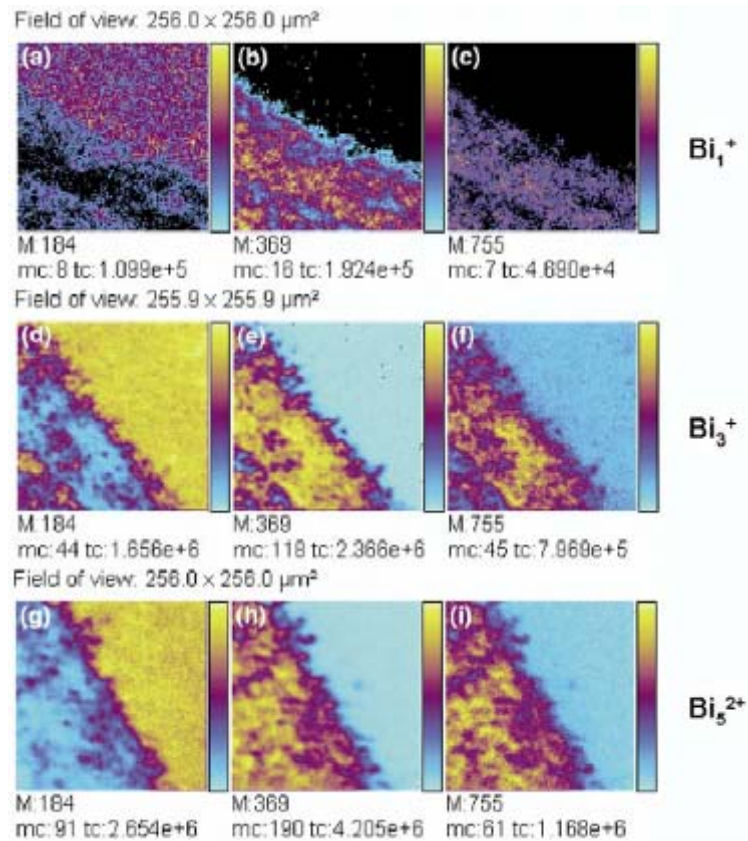


Figure 16 : Images TOF-SIMS en mode positif illustrant des lipides détectés en bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat : comparaison qualitative des signaux en fonction de l'utilisation d'ions Bismuth mono ou polyatomiques (fluence des faisceaux d'ions primaires, 10^{12} ions/cm²)

Ainsi, ces mêmes auteurs décrivent un net gain de contraste (d'un facteur 5 à 8) pour les images obtenues en utilisant les ions Bi_3^+ en comparaison avec celles acquises en utilisant les ions Bi_5^{2+} et surtout avec les ions Bi^+ . De même, les durées respectivement d'acquisition des images avec les sources Bi^+ , Bi_3^+ et Bi_5^{2+} étaient de 4, 10 et 100 minutes plaçant ainsi les ions Bi_3^+ dans un judicieux compromis entre le contraste d'image et le temps d'acquisition.

De même, le leader international Ion-TOF (Münster, Allemagne) reconnaît lui-même que la demande en source SIMS équipée d'un LMIS au bismuth est en nette croissance ces dernières années (**Figure 17**) au point que depuis 2005, leurs instruments SIMS en sont automatiquement équipés à la vente.

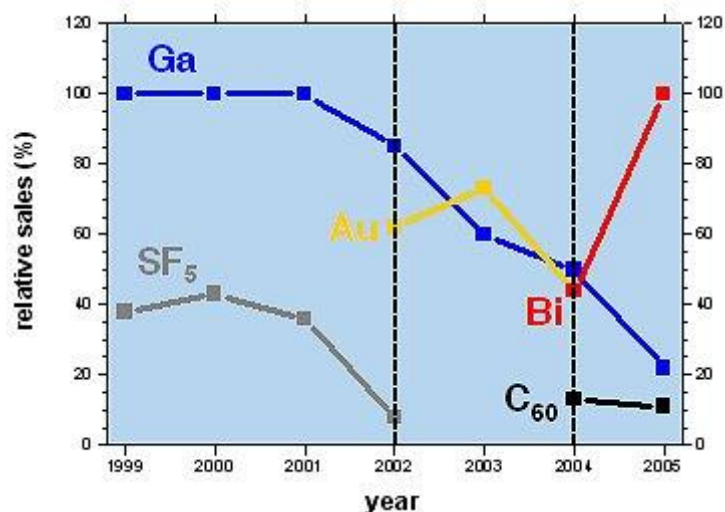


Figure 17: Evolution en dix ans des ventes des équipements SIMS en fonction des sources d'ions primaires

En parallèle, une étude menée en 2004 par Tempez et al. attribue de nombreux avantages à l'utilisation d'agrégats de type Au_{400}^+ comme source d'ions primaires en SIMS [82]. Selon cette équipe, le rendement des ions secondaires serait amélioré d'un facteur pouvant atteindre 1000 en comparaison avec une source d'ion Au^+ [83], en même temps que le rapport signal/bruit est amélioré et la fragmentation induite dans l'échantillon, diminuée par rapport aux agrégats Au_5^+ [82]. Malheureusement la mise en application de ce type de source Au_{400}^+ nécessite encore des mises au point en raison de leur instabilité relative ainsi que les difficultés à faire focaliser les ions avec une résolution compatible en imagerie.

e. Applications à l'imagerie SIMS en biologie :

Rappelons tout d'abord que l'imagerie du lipidome cellulaire ou tissulaire par approche biologique classique est à l'heure actuelle encore très limitée. En effet, les techniques d'immunohistochimie (IHC) ou d'immunocytochimie (ICC) nécessitent de disposer d'anticorps dirigés contre un lipide particulier recherché. Hormis le fait qu'une telle approche nécessite la connaissance des lipides recherchés, elle implique également de disposer d'un anticorps spécifique de chaque lipide particulier. Or, il n'existe pas d'anticorps ciblant tous les lipides de toutes les familles. La très grande majorité des anticorps disponibles « se limitent » aux lipides porteurs de motifs glucidiques tels que les gangliosides, les cérebrosides, les lipides A...ou quelques représentants des dérivés de l'acide arachidonique (prostaglandines, leucotriènes...). Ceci s'explique par la difficulté à trouver une interaction stable et spécifique entre les anticorps et certaines des structures fréquemment rencontrées chez les lipides. Alternativement, des approches par utilisation de colorants lipophiles

peuvent également être employées par utilisation de colorants réémettant à différentes longueurs d'onde pour une mesure en microscopie à fluorescence.

Cependant, là encore les colorations sont relativement peu spécifiques et l'identification d'un lipide particulier n'est pas envisageable.

Face à ces limites d'investigation du lipidome, l'Imagerie par Spectrométrie de Masse s'affiche comme une technique alternative idéale comme en témoignent les nombreux travaux réalisés en imagerie SIMS dans ce domaine. Les améliorations techniques apportées à cette source, et en particulier par l'introduction des sources d'ions primaires polyatomiques à base d'or ou de bismuth, ont considérablement améliorées le rendement d'ions secondaires ainsi que la gamme de masse accessible (1000 à 1500 Da). Ces avancées combinées à des améliorations instrumentales et en rendements de production d'ions secondaires ont conduit l'imagerie SIMS à devenir un outil important pour l'imagerie de lipides. Ces progrès sont parfaitement illustrés dans les travaux de Touboul et al. [84] et Sjövaal et al. [85] et montrent pour la première fois l'utilisation de clusters d'or pour réaliser des images de coupes de cerveau de souris. Par la suite, l'utilisation de clusters de bismuth a également permis de réaliser des images de lipides avec une très bonne résolution spatiale (**Figure 21**) [96, 102]

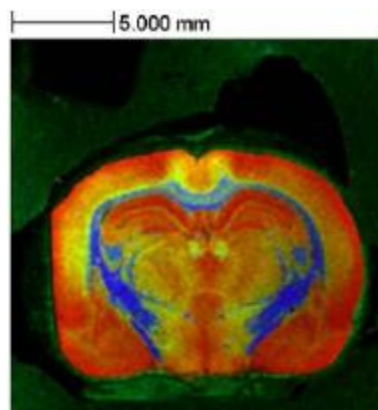


Figure 21 : Image TOF-SIMS en mode négatif d'une coupe de cerveau de rat obtenue après bombardement par des ions bismuth Bi_3^+ . Plusieurs ions acides gras sont identifiables : C16 :0 et C18 :0 (rouge), sulfatides (vert), dimère de cholestérol (bleu) d'après Touboul et al. (76)

Les multiples applications du TOF-SIMS en biologie et en particulier dans le domaine de la lipidomique ont été largement documentées dans différentes revues. [103, 104]. Parmi les différentes applications sont notamment retrouvées des applications dans le domaine médical pour l'étude de pathologies. En utilisant ces clusters, la répartition de plusieurs classes de lipides et de composés de masse inférieure à 1200 Da peut être aisément et finement réalisée. Par exemple, dans des coupes de muscles de souris atteintes de la dystrophie musculaire de Duchenne, l'analyse

d'acides gras, de triglycérides, de tocophérols, de coenzyme Q9 et de cholestérol a permis de différencier des zones de stress oxydatif, de dégénérescence ou de régénération en fonction du composé considéré [105]. D'autres applications ont été réalisées sur les cheveux ou sur la peau pour étudier ce type de molécule. Cependant, une application de cet instrument à l'imagerie des surfactines produits par une colonie bactérienne de *bacillus subtilis* (**Figure 22**) démontre la possibilité de détecter et d'imager des lipopeptides [86].

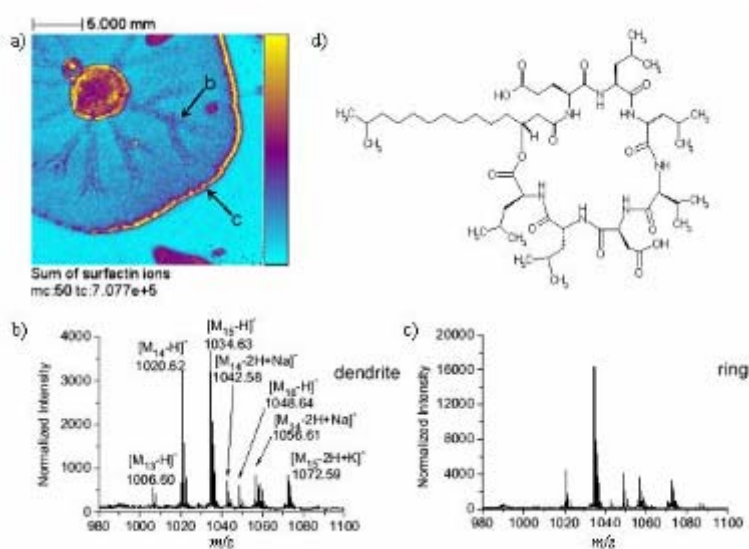


Figure 22: Image TOF-SIMS en mode négatif (a) montrant une répartition différente des surfactines au sein de colonies de *bacillus subtilis*. Les spectres de masses partiels montrent la différence d'intensité et de répartition des surfactines dans deux régions d'intérêt : les dendrites (b) et de la couronne (c) [105].

En (d), un exemple de structure d'une surfactine bactérienne d'après Debois et al. (88)

Une autre approche permettant d'augmenter à la fois la désorption des ions et la gamme de masse consiste à déposer un composé de faible poids moléculaire et absorbant très fortement dans les ultra-violets. Ce composé appelé matrice entre dans la composition du modèle d'ionisation de la source MALDI et permet de détecter des molécules de très haut poids moléculaire, jusqu'à plusieurs dizaines de kDa (*voir chapitre suivant, section MALDI*).

Dans le souci d'élargir la gamme de masse du SIMS, Wu et al. ont tenté en 1996 la combinaison des propriétés de la matrice MALDI et de la technique SIMS. Cette nouvelle approche du SIMS appelée le Matrix-Enhanced SIMS ou ME-SIMS a permis la détection de molécules en solution jusqu'à environ 10kDa [87].

En 2005, le groupe de Ron Heeren [88] a développé avec succès cette technique pour l'imagerie sur tissus, en déposant sur la coupe un composé qui cristallise, l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque, normalement utilisé comme matrice en analyse classique MALDI. De fins

cristaux de matrices sont formés de manière homogène à la surface du tissu en vaporisant par electrospray le mélange matrice/solvant. [89] (cf partie MALDI).

L'application de cette technique à un petit modèle biologique invertébré (*Lymnaea stagnalis*) a permis la mise en évidence d'un profil différent entre le SIMS et le ME-SIMS (**Figure 23**) ainsi que la détection de différents peptides directement dans le système nerveux de cet animal [90]. L' α caudorsal cell peptide (m/z 1169), le peptide d (m/z 1566), le carboxyl terminal peptide ou CTP (m/z 2590), peptides issus de la maturation de l'hormone CDCH jouant un rôle dans la conception des œufs de la Lymnée, ont ainsi pu être repérés avec une source SIMS In+. Des expériences d'imagerie ont permis d'observer la localisation du peptide d et du CTP, ainsi que d'un peptide de masse plus modeste, l'APGW amide (m/z 430) au sein du système nerveux.

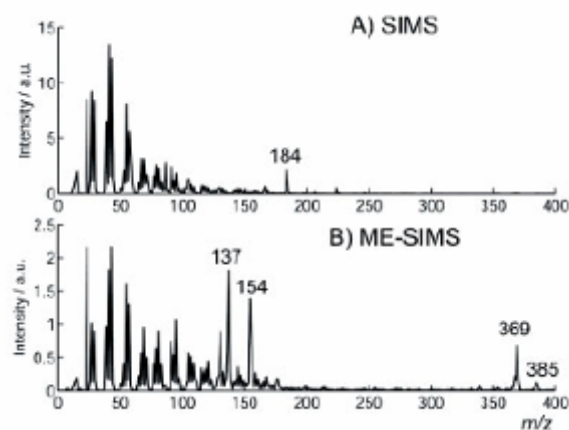


Figure 23 : spectres TOF-SIMS réalisés sur le ganglion caudal de la Lymnée avant (A) et après (B) dépôt de matrice. En (A), le spectre SIMS montre un ion à 184 correspondant à la phosphocholine provenant de lipides majoritaires représentés dans les membranes. En (B) le spectre ME-SIMS montre clairement la présence de deux ions du cholestérol non détectables sans ajout de matrice

La répartition de ce dernier observée en ME-SIMS correspond à la localisation précédemment décrite lors d'études en immunohistochimie classique chez ce même animal. La résolution spatiale du ME-SIMS avec une source In+ est de 3 μ m, ce qui représente une diminution d'un facteur 3 par rapport à l'analyse sans matrice (1 μ m environ). Cette résolution reste néanmoins suffisante pour l'étude à un niveau subcellulaire.

Si le ME-SIMS possède une gamme de masse plus étendue, les spectres obtenus avec ce type de stratégie sont malheureusement dominés par les ions issus de la matrice elle-même.

Les ions de la matrice génèrent des signaux parasites qui viennent se superposer à de nombreux signaux d'intérêt biologique issus du tissu tels que des phospholipides, compromettant la localisation d'un certain nombre de composés.

Par ailleurs, la détection de petits peptides décrite précédemment n'est pas toujours observée avec succès probablement par manque de sensibilité. Ces difficultés sont parfaitement illustrées dans d'autres travaux du même groupe concernant l'analyse d'un cerveau de rat [91]. En effet, dans cette étude les auteurs n'ont pu observer par ME-SIMS de signaux correspondant à des peptides alors que ces derniers étaient observés sans difficulté en imagerie MALDI.

Dans l'optique d'augmenter la sensibilité en augmentant les rendements d'ions, l'addition de divers éléments a également été testée ; Afin d'augmenter le nombre d'ions par formation d'ions secondaires cationisés, le dépôt de métaux comme l'or [92] ou l'argent [93] a été étudié. Cette stratégie de Metal-Assisted SIMS ou MetA-SIMS s'est révélée prometteuse et a été appliquée avec succès pour l'analyse de cellules de neuroblastomes [91], notamment pour la localisation de lipides et de cholestérol après dépôt d'une fine couche d'or. Par cette technique, l'intensité des signaux a été grandement améliorée et la gamme de masse étendue environ jusqu'à m/z 1200 ; la résolution latérale calculée s'approche de 1,5 μm , ce qui représente une amélioration d'un facteur 2 par rapport à la technique ME-SIMS. Les phénomènes expliquant cette augmentation d'intensité en présence de dépôt métallique sont encore à l'étude.

Les spectres obtenus par cette technique sont cependant riches en agrégats d'or chargés (ou du métal utilisé) ce qui complique l'interprétation des signaux. Dans le cas de l'argent, le signal majoritaire sur tissu est celui du cholestérol cationisé à l'argent, et la répartition d'autres composés est alors difficile à obtenir.

Enfin, la technique MetA-SIMS ne permet de réaliser que des analyses en mode positif [81] privant l'opérateur d'un grand nombre d'informations et de répartitions de composés biologiques, notamment des classes de lipides bien détectables en mode négatif (phosphatidylinositols, phosphatidylserines etc.) [63]

Ainsi les futurs développements en imagerie SIMS peuvent être nombreux. Les différents développements introduits assez récemment comme le ME-SIMS, le MetA-SIMS, et les sources d'ions polyatomiques peuvent avoir un effet cumulatif comme en témoigne l'utilisation de Bi_3^{2+} sur une section de tissu recouverte d'or permettant d'obtenir des signaux lipidiques environ 2 fois plus intenses que l'utilisation des agrégats seuls [94]. Cette préparation est également applicable aux composés de masse inférieure à 1200 Da, et permet alors de couvrir toute la gamme des lipides. Il est toutefois possible que des surfaces autres que l'or, puissent encore améliorer le signal.

D'autres agrégats pourront bien sûr être également étudiés plus en détail, tels que les agrégats à base de Au_{400}^+ ou ceux à base de fullerène. Les premiers résultats obtenus en imagerie sur les agrégats fullerène semblent d'ailleurs prometteurs [95] puisque les signaux lipidiques sont augmentés d'un facteur 1000 par rapport à ceux observés par utilisation d'une source classique Ga^+ .

Des images de composés tels que le cholestérol ou les sulfatides ont également été réalisées avec ce type de source.

De plus, la technique SIMS manque de méthode de caractérisation par MS/MS permettant une élucidation structurale. Toutefois, un « PSD-like » a été décrit pour l'imagerie SIMS permettant d'obtenir quelques informations sur des composés de faible masse provenant du tissu, et de réaliser une image à partir des ions fragments obtenus [96]. Les futures applications possibles dans ce domaine seraient de réaliser de la MS/MS avec une cellule de collision afin d'augmenter le nombre et l'intensité des ions fragments.

L'imagerie SIMS s'avère donc être, de par sa résolution latérale, son acquisition rapide et la gamme de masse analysable (notamment lors de l'utilisation de clusters d'ions) un outil remarquable pour l'imagerie de lipides et de composés jusqu'à une masse d'environ 1200 Da. L'analyse de peptides par cette technique est pour le moment difficile (technique ME-SIMS) et l'analyse de protéines irréalisable, nécessitant l'utilisation d'autres outils pour combler cette lacune.

6. La source MALDI

a. Du LDI au MALDI

Les premières techniques d'ionisation par désorption laser remontent aux années 1970 au travers d'appareils tels que le LAMMA, (Laser Microprobe mass Analysis) longtemps utilisé comme outil d'analyse et d'imagerie. Cette technique qui utilise un laser émettant des photons dans l'IR a permis d'obtenir des images moléculaires de composés biologiques provenant de tissus. Pour illustration, les travaux réalisés par Seydel et al. en 1988 ont validé l'application de cette technique en montrant la répartition différente de certains cations intracellulaires liés à l'effet de drogues sur des bactéries [97]. Quelques années plus tard, Good et al. ont démontré par imagerie par ionisation/désorption laser (LDI), l'accumulation d'aluminium dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer [98]. Puis Bouras de montrer en 1997 l'accumulation anormale de fer et d'aluminium dans les neurones et les réseaux neurofibrillaires de patients atteints de démence dont Alzheimer [119, 120]. Un avantage certain à cette technique est sa très bonne sensibilité lui permettant ainsi d'étudier de manière très efficace les transitions de métaux dans les tissus (cf. applications précédemment citées). Elle bénéficie aussi d'une bonne résolution spatiale qui peut approcher les 500 nm une fois le laser bien focalisé. Seulement, le laser crée de nombreuses fragmentations lors de la désorption affectant fortement la gamme de masse des ions détectables (environ 300Da).

Introduite dans la deuxième moitié des années 1980 par Hillenkamp et Karas [99] la source MALDI s'inscrit dans la continuité des sources LDI. Elle a constitué l'une des révolutions de la spectrométrie de masse avec les sources ESI, et en particulier pour les applications dans le domaine de la biologie. Cette technique venue en ligne directe des techniques de LDI est basée sur l'utilisation concomitante de l'irradiation par un faisceau laser incident d'un petit composé organique appelé matrice et dont l'une des plus importantes propriétés est de présenter une bande d'absorption à la longueur d'onde du laser. Traditionnellement, les lasers utilisés en MALDI émettent dans l'UV. Les matrices sont donc des petits composés organiques, présentant généralement un cycle aromatique et absorbant dans l'UV. Le mélange de la matrice en forte concentration avec l'analyte en faible concentration, permet d'obtenir des solutions solides homogènes formées de micro-cristaux de matrice dans le réseau cristallin desquels sont, au moins en partie, inclus les analytes. A l'inverse du SIMS, les mécanismes profonds de désorption des ions ne sont pas encore clairement connus. Cependant, un modèle admis consisterait à penser que l'irradiation par le faisceau laser provoquerait l'absorption des photons par les molécules de matrice, conduisant ensuite à l'excitation électronique de celles-ci. La relaxation de l'énergie au sein du solide induirait l'éjection de matière qui se diluerait progressivement sous vide [100]. La matière éjectée se présente sous la forme majoritairement de neutres et de quelques pourcents d'ions parmi lesquels des ions positifs et négatifs de la matrice et de l'analyte ainsi que des électrons libres. Les ions présents dans la plume sont ensuite transférés vers l'analyseur pour assurer la mesure des rapports m/z . (**Figure 24**).

Cette méthode se révèle être sensible en dépit des faibles rendements de production d'ions. Cette source se distingue par sa sensibilité et surtout par sa possibilité d'analyser des composés polaires jusqu'à des poids moléculaires très élevés (1 000 000 u.) à l'opposé des sources LDI et par extension, des sources SIMS.

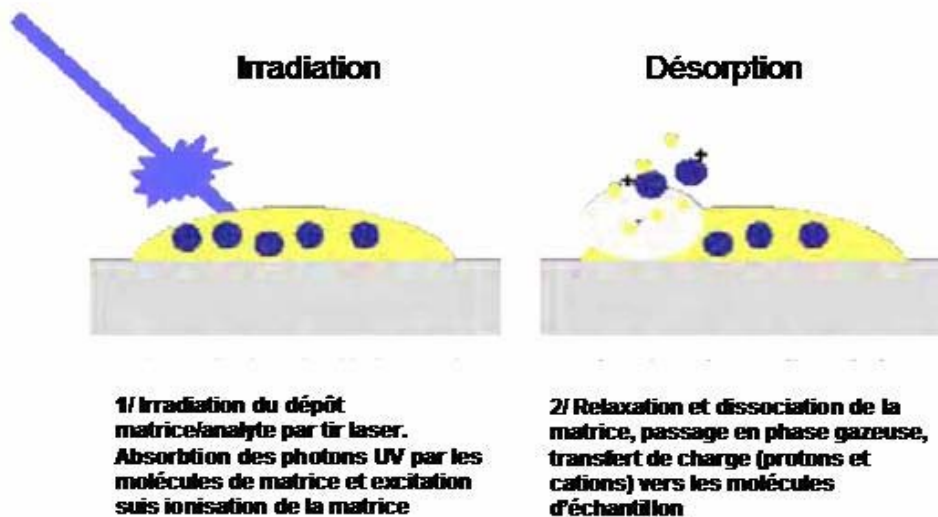


Figure 24 : Description de la désorption en MALDI, séparation dans l'analyseur à temps de vol (time-of-flight) et modes de détection (d'après Schiller et al. 2007, MALDI-Tof MS in lipidomics).

b. Les matrices les plus fréquemment utilisées

Les matrices, ces petits composés aromatiques de faible poids moléculaire, sont la pierre d'angle de cette méthode de production des ions. La propriété nécessaire mais non suffisante de la matrice est l'existence d'une bande d'absorption à la longueur d'onde du faisceau laser incident. Cependant, tous les composés présentant une bande d'absorption ne constitue pas de « bonnes matrices » i.e. ne permettent pas de générer des spectres de qualité en terme de nombre de signaux, de leur intensité, du rapport signal/bruit, des rendements de fragmentation et de la largeur des signaux. Ainsi, la matrice influe grandement l'allure des spectres générés. La faible connaissance des processus MALDI a conduit à sélectionner différentes matrices MALDI sur la base d'approche empiriques. Il peut également être démontré que les matrices présentent en général une spécificité relative vis-à-vis de certaines familles de composés, i.e. de famille de propriétés physico-chimiques. Il semble, en effet, que la capacité de co-cristallisation voir d'incorporation des analytes dans le réseau cristallin des molécules de matrice (peptides/protéines), soit également un paramètre important dans le choix de la matrice. Ainsi, 20 ans après l'introduction du MALDI différentes matrices adaptés à l'analyse de différentes familles de composés (protéines, peptides, lipides, sucres, acide nucléiques, polymères...) ont pu être sélectionnées et sont couramment utilisées dans les analyses de routine (Figure 25)

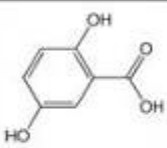
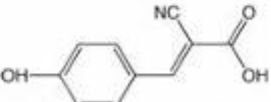
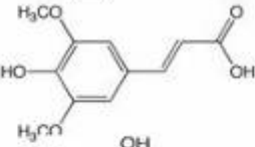
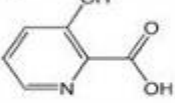
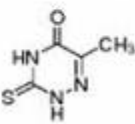
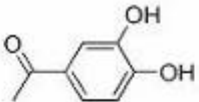
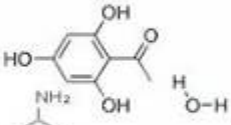

Nom usuel	Structure chimique	Domaine d'analyse
Acide 2,5 Dihydroxybenzoïque (2,5 DHB)		Protéines, peptides, oligosaccharides lipides
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		Protéines, peptides
Acide sinapinique (SA)		Protéines, polymères
Acide 3-hydroxypicolinique (HPA)		Oligonucléotides, glycoprotéines
6-aza-2-thiothymine (ATT)		Oligonucléotides, lipides
2,6 Dihydroxyacétophénone (2,6 DHAP)		Oligonucléotides, phosphopeptides, lipides
2,4,6 Trihydroxyacétophénone (2,4,6 THAP)		lipides
<i>para</i> -Nitro-aniline (PNA)		
Graphite (C _s)		

Figure 25 : principales matrices utilisées pour la détection des biomolécules

A côté de ces matrices classiques, d'autres dites ioniques ont été développées par Lemaire et al. (2006) afin d'améliorer la cristallisation et la stabilité sur coupe de tissus ou encore l'efficacité d'ionisation des peptides notamment en imagerie MALDI [101]. Ces résultats furent obtenus en mélangeant de façon équimolaire des matrices acides tels que HCCA ou SA avec des bases organiques comme la pyridine, l'aniline ou encore la 2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2A4M5NP) donnant des matrices ioniques liquides ou solides.

En suivant la même approche, des nouvelles matrices ont été créées pour l'analyse des lipides sur le modèle de la matrice ionique liquide 2,5DHB/Butylamine reconnue pour sa cristallisation homogène pour les analyses de lipides en solution [102]. Citons également une autre matrice récemment utilisée pour le profiling et l'imagerie des lipides sur cerveau ou foie de rat : la

matrice 2-mercaptobenzothiazole. Cette dernière présente de bien meilleures performances (sensibilité, homogénéité de la cristallisation...) que les matrices classiques en analyse MALDI [103]. Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'étudier les lipides en solution ou en imagerie tissulaire, l'utilisation d'une matrice reste malgré tout problématique puisque la gamme de masse des lipides correspond également à la gamme de désorption des ions matrices (150-800). De ce fait, il faut orienter le choix de la matrice vers celles qui produisent le moins possible de fragments en basse masse. Pour cela, les matrices DHB et DHAP sont beaucoup plus couramment utilisées que la matrice HCCA. Ainsi, le MALDI est particulièrement plutôt bien adapté à l'analyse des différentes familles de biomolécules et c'est avec l'analyse des protéines ainsi que le séquençage des peptides en particulier que le MALDI a fait une entrée fulgurante dans le monde des Sciences du Vivant.

Par rapport à l'Electrospray (ESI) il présente le net avantage d'être beaucoup plus tolérant aux sels et contaminants divers souvent présents dans les extraits d'échantillons biologiques même s'il est vrai que l'ESI a davantage participé au lancement de la lipidomique étant donné que cette source n'utilise pas de matrice pour désorber les ions [104]. En MALDI, les ions formés sont principalement monochargés, même si quelques ions multichargés sont observables pour des masses $M > 4000$ u.m.a, ce qui simplifie grandement l'analyse des données, par comparaison aux données provenant d'un ESI. La source MALDI est souvent associée comme en SIMS à des analyseurs Temps-de-vol (TOF) en raison de la très bonne transmission des ions désorbés, et d'où sa remarquable sensibilité.

Les analyseurs TOF basés sur la séparation dans un champ électrique puis sur la mesure du temps d'arrivée des ions au détecteur, sont très sensibles (grande transmission des ions). Ils possèdent des cycles d'analyses rapides et présentent une gamme de masse en théorie illimitée. Les instruments MALDI-TOF présentent donc de grandes performances et notamment dans le cadre d'applications pour des analyses protéomiques. Avec les progrès technologiques sont apparus ces dernières années d'autres couplages avec le MALDI et notamment avec des analyseurs présentant de hautes performances et une grande rapidité pour les études structurales (MS/MS). A titre d'exemples peuvent être cités les couplages avec des trappes ioniques (MALDI-IT), avec des instruments de Résonance d'ion Cyclotronique à transformée de Fourier (FT-ICR) ou encore les instruments hybrides quadripôles (Q) et TOF (MALDI-Q-TOF). La grande diversité des instruments disponibles avec les sources MALDI augmente très nettement les performances et le champ d'investigation de cette technologie tant au niveau des petites molécules que celui des protéines.

c. Principe de l'imagerie MALDI

Le principal but de l'ISM est d'utiliser le pouvoir analytique de la spectrométrie de masse pour créer des images moléculaires représentant la distribution de toutes les biomolécules connues ou inconnues contenues dans un échantillon. Pour les analyses par MS, l'analyte doit être transféré en phase gazeuse et ionisé, puis les ions séparés sous vide et détectés. Pour cela, la MSI diffère des autres méthodes d'imagerie considérées comme non destructrices mais ne donnant pas d'informations moléculaires. Le MALDI MSI se caractérise par le fait que la surface de l'échantillon sera scannée par un faisceau (laser ou ionique), typiquement de quelques centaines à quelques microns, en déplaçant d'une distance définie par avance l'échantillon sous le faisceau ou le faisceau par lui même. Dans cette méthode, aussi appelée imagerie point par point, un spectre de masse est enregistré et stocké pour chaque point d'analyse effectué. Des logiciels spécialement développés permettent de sélectionner le signal d'une molécule à partir du tableau de spectre de masse et de récupérer l'intensité du signal pour chaque point dans un tableau 2 dimensions (**Figure 26**). L'intensité du signal sera représentée par une échelle de couleur permettant de recréer une image de la répartition de l'analyte dans l'échantillon.

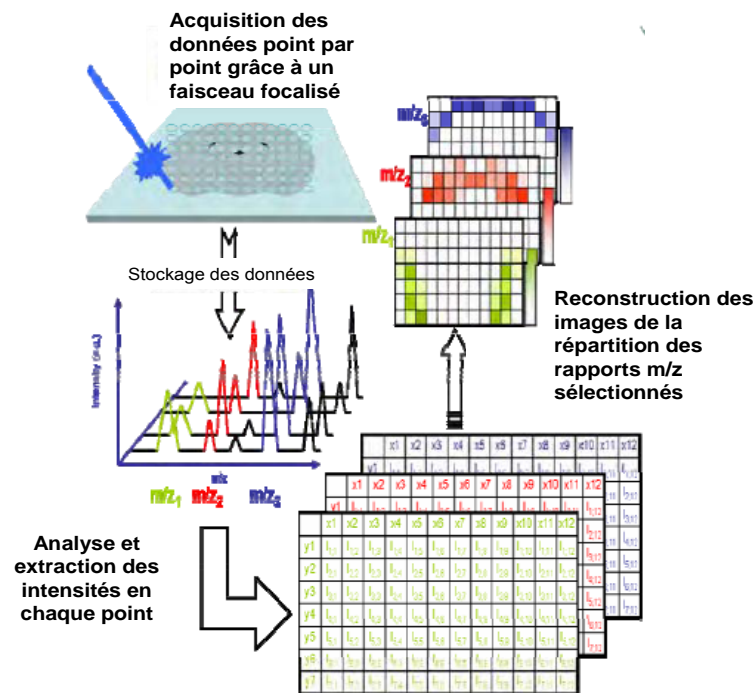


Figure 26 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI

Les premières études en analyse directe ont été réalisées sur le mollusque *Lymnaea stagnalis* [126-128], crustaceans [105], puis sur l’Aplysie [130, 131]. En 1997 Caprioli et al. ont démontré pour la première fois la possibilité de réaliser des images *ex vivo* de peptides et de protéines par MALDI-TOF sur différents organes de rat [71]. Ces résultats ont également démontré la possibilité de superposer des images tissulaires avec des informations moléculaires bien localisées malgré une résolution spatiale supérieure à la taille d’une cellule vivante (30 à 50µM en moyenne). En 2006, Cooks et al. Développent la source DESI pour l’appliquer à l’analyse directe *in vivo* sur tissus biologiques [106]. Dès lors, l’Imagerie par Spectrométrie de Masse se place comme un puissant outil prometteur pour la biologie clinique, à la frontière avec la médecine (**Figure 27**).

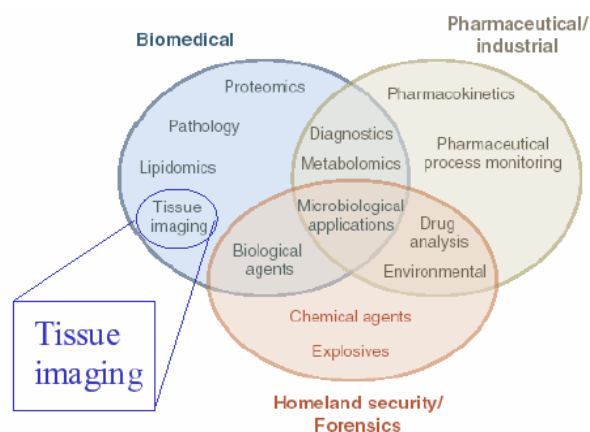


Figure 27 : Champs d’applications des techniques de Spectrométrie de Masse et introduction de l’imagerie tissulaire comme candidate dans le domaine biomédical.

Un des avantages certains de l’analyse par spectrométrie de masse MALDI sur tissus est la possibilité de détecter une large gamme de bio-molécules couvrant des gammes de bas poids moléculaire (lipides/drogues) aux protéines de plusieurs dizaines de kDa. Cette possibilité n’est, pour l’heure, pas réalisable en SIMS. A l’inverse, la résolution spatiale offerte en imagerie par le SIMS (environ 1µm) est de loin meilleure à celle du MALDI (environ 50µm en moyenne). En analyse MALDI, l’ajout d’une matrice en excès aux analytes est, comme nous l’avons vu, une étape fondamentale et incontournable de la technique. Aussi, en imagerie MALDI, la matrice est un des composants qui affecte la qualité de l’image créée en termes de résolution spectrale, de gamme de masse des ions produits dans la source ainsi que la répartition spatiale et la reproductibilité expérimentale. Tous ces paramètres influencent la qualité d’une analyse en mode Imagerie MALDI et donc reposent à la base sur la qualité de préparation de la matrice et de son mode de dépôt sur l’échantillon biologique à imager. L’efficacité de la matrice à favoriser une bonne répartition des ions après reconstruction de l’image repose sur plusieurs critères dont la bonne dissolution de la matrice dans les solvants, la taille

des cristaux obtenus et leur densité à la surface de l'échantillon. La qualité d'extraction des analytes est également liée à l'homogénéité de la co-cristallisation Matrice/biomolécules.

Classiquement, la matrice est dissoute avant dépôt à la surface de l'échantillon biologique à imager dans des solvants organiques tels que l'acétonitrile, l'éthanol, le méthanol, le xylène...éventuellement en présence d'eau acidifiée ou non. En contrepartie, le dépôt de ce mélange matrice/solvant(s)/eau peut conduire à une délocalisation des analytes avant même qu'ils ne cristallisent totalement avec la matrice à la surface de l'échantillon. Une reconstruction spatiale des analytes détectés, conformément à la répartition originale sur la coupe histologique, pourra alors être sévèrement compromise. Ces remarques sont d'autant plus vraies que les lipides sont en grande partie des molécules polaires et facilement miscibles dans les solvants polaires tels que les alcools ou complètement apolaires comme le chloroforme, l'hexane, l'éther de pétrole...C'est pour ces raisons que la préparation de l'échantillon en Imagerie MALDI nécessite une attention particulière tant au niveau du choix du (des) solvant(s) pour le mélange avec la matrice qu'au niveau de la manière dont le dépôt sera fait sur la coupe. Comme rappelé dans le paragraphe 1.2.2.a de ce manuscrit, après confection des coupes histologiques, seule une étape de dessiccation de la coupe peut s'avérer nécessaire avant l'analyse en SIMS. Globalement, la préparation de l'échantillon avec cette source nous rappelle celle de la microscopie électronique. En MALDI tout comme en ME-SIMS, le dépôt de matrice est une étape cruciale dans le bon déroulement de l'expérimentation par imagerie. En effet, afin de minimiser les risques de délocalisation inhérents à l'addition de cette matrice sur les sections de coupe, plusieurs outils ont été développés en parallèle de l'essor de l'Imagerie MALDI tout particulièrement. Ces modes de dépôt du mélange matrice/solvant(s) peuvent se faire de trois manières possibles :

- Le dépôt par micro-pipette, le plus simple et le moins coûteux mais aussi celui qui engendre le plus de délocalisation.
- Le dépôt par spots, appelé « spotting »
- Le dépôt par spray ou « spraying »

La technique de spotting se présente sous forme d'un appareil contenant un réservoir dans lequel est déposé le mélange matrice/solvant(s). Par un système de micro-impulsions électriques, des micro-gouttes de ce mélange sont déposées en lignes parallèles selon une aire du tissu préalablement délimitée par l'expérimentateur. Les deux leaders dans ce domaine sont Shimadzu (Japon) avec le Chemical Inkjet Printer Chip 1000, et le spotter développé par la firme Labcyte (Etats-

Unis). D'un point de vue conceptuel, les deux technologies ont pour but de déposer de manière automatisée sur une plaque MALDI portant l'échantillon biologique, un volume précis de matrice, le tout sous contrôle de l'expérimentateur.

Le phénomène d'éjection de matrice selon le Chip 1000 repose sur la vibration d'une tête piézo-électrique à un optimum de fréquence. Cette tête est surmontée d'un réservoir où est déposée la solution de matrice. En dessous de la tête, à quelques dizaines de millimètres se trouve la plaque d'imagerie MALDI portant la lame conductrice ITO sur laquelle est adhérente la coupe histologique ou les cellules dissociées à analyser. De cette manière, l'utilisateur peut décider de la superficie à spotter, du volume final de matrice à déposer, tout comme, du laps de temps entre chaque passage du dépôt en faveur du séchage de la matrice fraîchement déposée. Le spotter Labcyte fonctionne d'une toute autre manière mais les objectifs restent similaires au Chip 1000. Le fond d'un réservoir contenant la solution de matrice est soumis à une onde électroacoustique (de type onde sonore). Cette onde est alors transmise à la solution de matrice et percute la surface en projetant hors du réservoir une gouttelette de matrice sur la surface de l'échantillon biologique. Avec cette méthode, le volume de matrice déposée peut être encore plus finement contrôlé qu'avec les Chip 1000 puisqu'il est possible de descendre à 1pL le volume déposé par chaque gouttelette contre l'ordre du nL avec le Chip 1000.

Cependant, spotter la matrice réduit les zones analysables de l'échantillon aux seuls dépôts. De plus, une des limites atteinte avec un spotter est le risque de dépôt non homogène de la matrice et le diamètre du spot, qui peut atteindre plusieurs dizaines de microns, peut également être le lieu d'une délocalisation des analytes [133, 134]. De ce fait, une partie des informations peut être perdue si l'on travaille avec un laser dont la résolution spatiale est supérieure à celle du spot [135, 136].

L'autre mode dépôt de la matrice, par spray, présente l'avantage de recouvrir complètement l'échantillon biologique de manière uniforme d'où son utilisation répandue en Imagerie MALDI [107]. La technique de dépôt par spray présente néanmoins des limites, comme le manque de reproductibilité concernant les dépôts manuels non automatisés (spray pneumatique) ou encore, les limites de volume, de concentrations en matrice et même le fait de ne pas être compatible avec certains solvants dans le cas des sprayer à impulsion électrique (electrospray) de type ImagePrep (Bruker Daltonics). Le risque de délocalisation peut également être suspecté, indépendamment de la technique mais bien du solvant utilisé. En alternative, il existe un autre type de sprayer qui se présente davantage sous la forme d'un nébuliseur, l'OCN (Oscillating Capillary Nebilizer) (**Figure 28**) dont l'utilisation en Imagerie MALDI permet d'avoir un dépôt de matrice uniforme tout en assurant une bonne sensibilité et reproductibilité [138, 139].

Le système OCN permet de nébuliser la solution de matrice sous forme de gouttelettes de petite taille au travers d'un capillaire supportant toute gamme de polarité dans les solvants [108]. Un contrôle fin des paramètres de l'OCN à la sortie du capillaire, permet de favoriser l'interaction entre la matrice et l'analyte afin de réduire la dispersion de celui-ci dans le solvant de la matrice, limitant ainsi fortement le risque de délocalisation à la surface de l'échantillon [108].

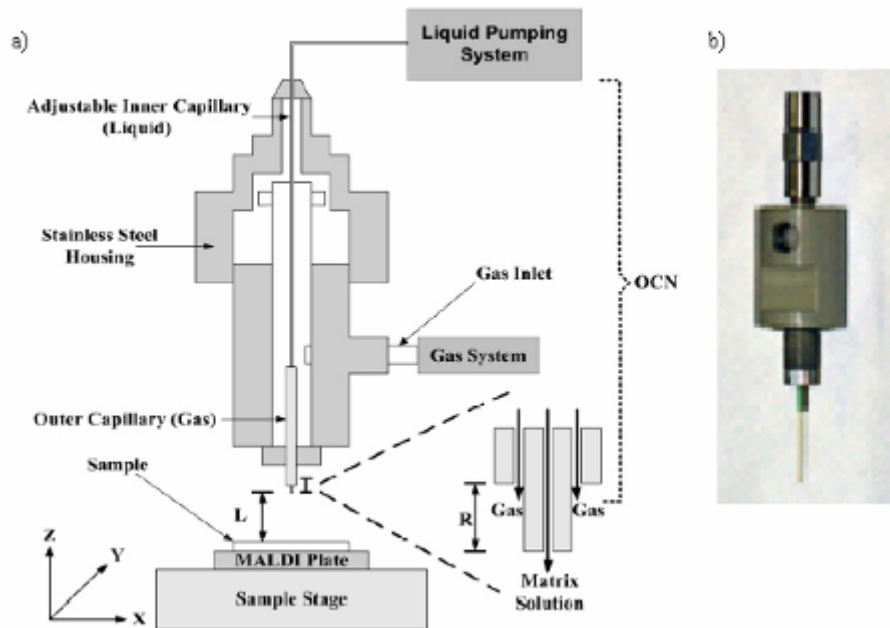


Figure 28 : Représentation schématique du dispositif de nébulisation de la matrice par la technologie OCN

$L= 10\text{cm}$, $R=1\text{mm}$ (a) d'après Chen et al. [141] et tel qu'il apparaît dans la réalité (b).

Le capillaire se compose de deux lames de silices fusionnées et co-axiales, capable de friction entre elles en présence d'un flux de diazote passant entre le capillaire interne contenant la solution de matrice et le capillaire externe conduisant le flux de gaz.

La haute fréquence d'oscillation induit la nébulisation de la matrice à l'extrémité du capillaire interne et un fin spray uniforme de matrice se crée. Le déplacement automatisé de la plaque portant l'échantillon selon les axes x et y permet au sprayer OCN de recouvrir entièrement la surface de l'échantillon. Les débits peuvent varier du $\mu\text{L}/\text{min}$. (microflux) au mL/min . (macroflux). Toutefois, Chen et al. [141] montrent que la distance échantillon/sprayer OCN ainsi que la pression d'azote et le débit sont des critères importants dans l'obtention d'un bon rapport signal/bruit et un minimum de délocalisation des lipides sur coupe histologique. Après plusieurs essais, cette équipe a établi les paramètres suivants comme étant optimum : débit de spray : $60\mu\text{L}/\text{min}$., pression d'azote 55psi, distance à l'échantillon 10cm, mouvement des axes x et y, 5mm/min.

Un autre sprayer également connu pour être utilisé en imagerie MALDI est un sprayer pneumatique servant à pulvériser des solutions révélatrices en chromatographie sur couche mince des lipides. Il s'agit du sprayer TLC/HP-TLC, représenté **Figure 29**.



Figure 29 : Le sprayer pneumatique TLC/HP-TLC utilisé en Imagerie MALDI pour pulvériser la solution de matrice à surface d'un échantillon biologique

Ce spray étant manuel, la reproductibilité et la qualité des dépôts ne sont pas optimisées comme peuvent l'être les autres techniques (spotting et spray OCN).

Afin de comparer les méthodes de déposition par spray entre eux, Chen et al. ont montré qu'en utilisant le sprayer manuel TLC/HP-TLC, se produisait une délocalisation des lipides sur coupe de cerveau de rat (**Figure 30**) alors que ce phénomène n'a pas été visible avec l'OCN.

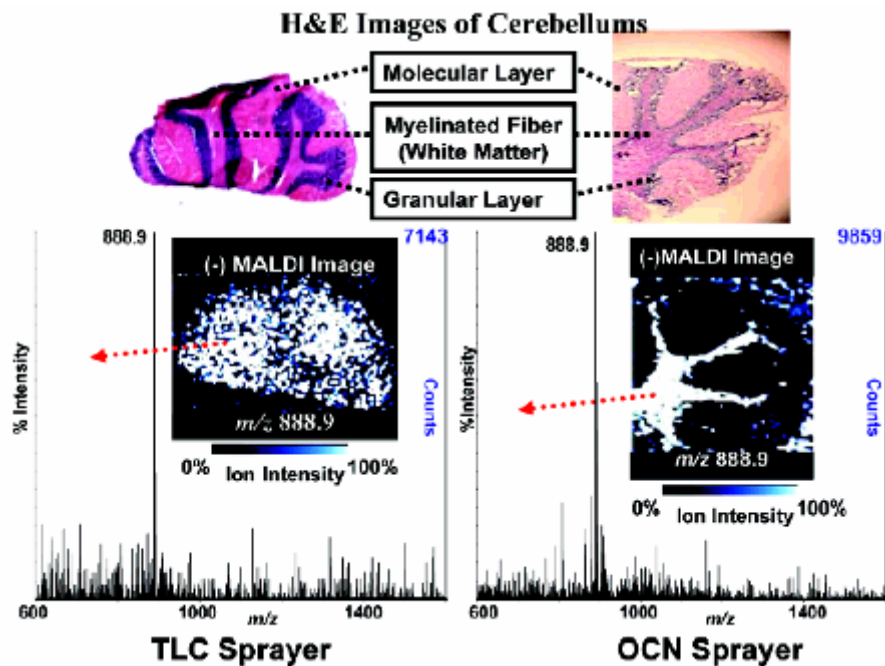


Figure 30 : Images MALDI en mode négatif montrant la répartition d'un sulfatide sur des coupes de cerveaux de souris après dépôt d'une solution de matrice DHB (ACN/eau 50 :50 v :v, 0.1% TFA) avec des sprayers TLC et OCN (d'après Chen et al. [141]).

Ces travaux démontrent bien la délocalisation spécifique des lipides dans la coupe « sprayée » selon l'approche TLC en comparaison avec la technique OCN où l'on voit clairement la régionalisation du sulfatide dans la substance blanche du cervelet uniquement.

Sachant à juste titre que la nature du solvant et la quantité déposée sur la coupe sont susceptibles d'entraîner une délocalisation des lipides en imagerie MALDI, l'Equipe de Caprioli a récemment mené avec succès le dépôt de matrice DHB dépourvue de tout solvant. De cette manière, des phospholipides ont été mis en évidence sur des coupes sagittales de cerveaux de souris avec une meilleure précision de localisation que dans le cas d'un « sprayage » de la matrice DHB sur la coupe avec un sprayer TLC (**Figure 31**)

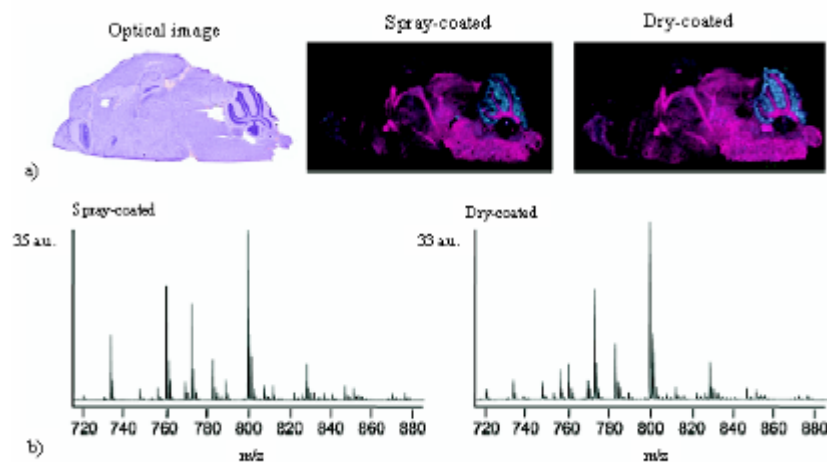


Figure 31: Images MALDI d'un lipide (Phosphatidylcholine 36 :1) obtenues sur coupes sagittales de cerveau de souris (a) montrant la coloration H&E (image optique) et les images après dépôt de matrice DHB 40mg/mL (éthanol/eau 50 :50 ; v :v) sprayée (Spray-coated) ou DHB déposée sans solvant (dry-coated). Les spectres correspondants montrent une différence d'intensité de signal entre les deux modes de dépôt (b) (d'après Caprioli et al.[109]).

En 2008 l'Equipe de M. Setou introduit une nouvelle méthode d'étude du lipidome et du peptidome au travers de l'utilisation de nanoparticules de fer fonctionnalisées avec des groupes amino, hydroxy et silicates (**Figure 32**). Les billes de nanoparticules ont un diamètre de 3.7 ± 0.1 nm. Appliquée à l'Imagerie MALDI des lipides, cette technique de nano-PALDI (nanoparticle Assisted Laser Desorption/Ionisation) a permis la réalisation d'images de lipides (**Figure 33**) avec un meilleur niveau de sensibilité de signal que la DHB et de peptides avec une résolution de $15 \mu\text{m}$ sur cerveau de rat (**Figure 34**)

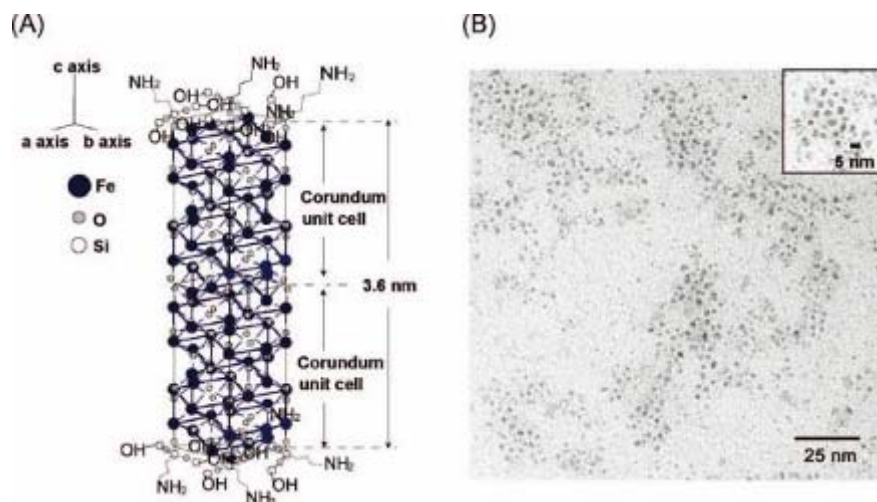


Figure 32 : Nanoparticule fonctionnelle en représentation schématique (A) et par microscopie électronique en transmission (B)

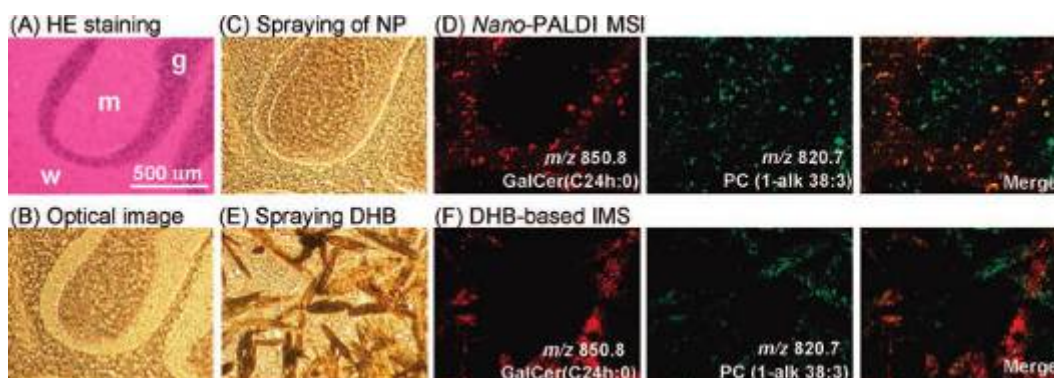


Figure 33 : Images de coupes de cervelet de rat après coloration H&E (A), avant dépôt de matrice DHB (B), avec dépôt de nanoparticules (C) et dépôt de DHB (E). Les répartitions ioniques de deux lipides Galactosylcéramide (m/z 850.8) et Phosphatidylcholine (m/z 820.7) sont observables par nano-PALDI IMS (D) et MALDI IMS (F). Ces résultats montrent une localisation plus fine et mieux répartie de ces deux lipides par nano-PALDI IMS. M : couche moléculaire, g : couche granulaire, w : substance blanche.

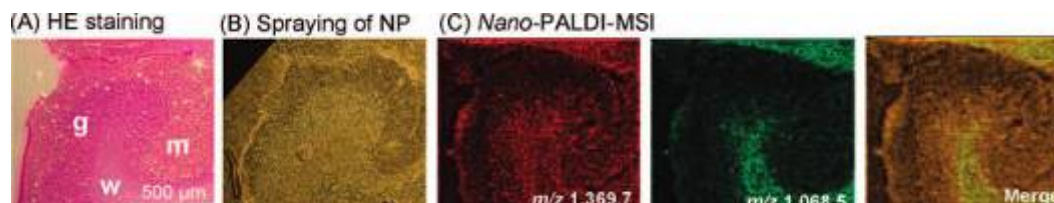


Figure 34: Images coupes de cervelet de rat après coloration H&E (A), après dépôt de nanoparticules fonctionnelles (B) et par nano-PALDI MSI (C). L'ion m/z 1369.7 est présent dans les couches granulaires (g) et moléculaire (m). L'ion m/z 1068.5 est localisé uniquement dans la substance blanche (w)

La possibilité de travailler sur des échantillons solides, déposés sur un support en MALDI et le fait que l'analyse soit restreinte à l'aire de l'impact du faisceau laser incident avec la surface à analyser rendent cette méthode compatible avec l'introduction et l'analyse directe d'échantillons bruts et entre autres d'échantillons biologiques, tels que des cellules, des morceaux d'organes ou des coupes de tissus. Dans le cas de l'analyse directe de tissus, la méthodologie repose en grande partie sur la préparation de l'échantillon.

De manière la plus simple après dissection de l'organe ou du tissu d'intérêt, des coupes à congélation peuvent être réalisées sur un cryostat. L'épaisseur des coupes varie entre 5 et 20 μm . Les coupes sont transférées sur la plaque métallique tenant lieu de porte échantillon de l'instrument. Dans le cas de petits organites (suffisamment petits pour ne pas altérer les conditions d'analyse dans l'instrument), comme des ganglions nerveux, l'organite est directement transféré après dissection sur le porte échantillon, la procédure est identique dans le cas de l'étude de cellules.

Idéalement, le porte échantillon pourra être remplacé par un support de verre recouvert d'un matériau conducteur transparent permettant des observations microscopiques sans altérer les conditions d'analyse dans le spectromètre (perturbation des champs électriques). Par la suite, l'étape critique est liée au choix de la matrice et à son dépôt.

Pour l'analyse directe des tissus des spots discrets de matrice pourront être réalisés soit à la micropipette soit selon un processus plus sophistiqué permettant le dépôt de microquantités dans différentes régions du tissu. Dans l'optique de réaliser une analyse de l'ensemble du tissu, ce dernier devra être entièrement recouvert soit par dépôt classique à la micropipette soit par utilisation de techniques de vaporisation (spray) permettant le recouvrement du tissu par la matrice en minimisant la quantité de solvant déposé. Les critères de choix de la matrice sont également importants afin d'optimiser l'analyse des composés en terme du nombre de composés détectés, de la résolution des pics, de l'intensité du signal, de rapport signal/bruit et de la gamme de masse accessible, pour une famille particulière de composés

La nécessité d'ajouter une matrice pour l'analyse soulève un certain nombre de questions quant à la délocalisation possible des composés au sein du tissu pendant l'étape de cristallisation de la matrice. Pour cette raison, l'utilisation de technique alternative est souhaitable. Dans le cas de l'analyse d'un organite ou de cellules d'un même type cellulaire dans leur intégralité, le dépôt de la matrice est moins crucial puisque seule l'analyse des composés présente un intérêt et que la localisation des composés à ces niveaux n'est pas nécessairement recherchée. Dans ce cas, le facteur limitant reste la quantité de solution de matrice déposée afin d'éviter une dilution trop importante des composés à analyser. Après dépôt de la matrice, le porte échantillon sera introduit dans le

spectromètre et des analyses pourront être réalisées en différents points de l'échantillon. Dans le cas de cellules ou organites, le signal est en général moyenné (moyenne des spectres résultants de plusieurs tirs lasers) en se déplaçant sur l'ensemble de l'échantillon.

Dans le cas de tissus, les spectres sont en général moyennés sur l'ensemble du dépôt discret réalisé ou en dans le cas de tissus entièrement recouverts de matrice dans une zone particulière du tissu (e.g. noyau supra-optique pour une coupe de cerveau de rat). Les spectres sont alors enregistrés et les données analysées de manière classique. Sur coupes des tissus, il est alors possible de comparer les ions observés entre deux régions distinctes du tissu (soit la comparaison des différentes molécules observables).

La réalisation d'images en MALDI (Imagerie MALDI) comme pour les autres méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse (Imaging Mass Spectrometry IMS) passe par le développement d'outils d'acquisition automatisés ainsi que d'outils puissants de traitement des données et de reconstruction d'images. Les images sont préférentiellement réalisées à partir de coupes de tissus constituant une surface macroscopiquement plane et évitant ainsi au maximum les pertes de résolution liées à la forme de l'échantillon. L'image pourra être réalisée à partir du balayage de l'échantillon dans son entier. Le porte échantillon sera déplacé de manière régulière avec un pas défini sous le faisceau du laser. En chaque point, une moyenne de spectres sera enregistrée dans des conditions d'acquisitions définies par l'utilisateur sans déplacement de l'échantillon. Ainsi, l'échantillon sera déplacé de manière régulière de manière à ce que l'ensemble de la surface soit balayé et en chaque point de balayage, une analyse effectuée. Si un point de référence est fixé sur le porte échantillon, alors les spectres peuvent être enregistrés avec comme donnée supplémentaire, les coordonnées d'enregistrement par rapport au point de référence. L'ensemble des données enregistrées se présente sous la forme d'une matrice avec pour chaque coordonnée d'enregistrement un spectre qui contient sur une colonne les différents m/z et dans une seconde colonne les intensités correspondantes. Par la suite, pour un ion particulier (i.e. un m/z donné) correspondant à un composé particulier, la mesure de l'intensité de cet ion (ou l'intégrale de l'aire du pic) permettra au travers de logiciels de reconstruction d'images d'obtenir la répartition de cet ion (et donc du composé correspondant) en prenant en compte l'intensité du pic avec les coordonnées d'enregistrement et en affectant à chaque point un pixel de couleur et/ou d'intensité de couleur définie.

Deux parties importantes se distinguent dans la réalisation d'images, l'acquisition des données et leur traitement avec leurs propres limites qui affecteront la qualité des images. Du point de vue de l'acquisition, un des facteur limitant reste le temps d'analyse. Le temps d'analyse est tributaire de la fréquence de répétition des tirs laser de la rapidité de déplacement du support pendant l'analyse et du temps d'acquisition de l'électronique. Pour les lasers, l'utilisation de lasers pouvant atteindre de grandes fréquences de répétition est particulièrement souhaitable. Par exemple, à quelques Hz l'acquisition peut durer plus d'une journée alors qu'à 100 Hz le temps d'acquisition sera réduit à quelques heures, sachant qu'une durée d'analyse importante peut conduire à une dégradation de l'échantillon (évaporation de la matrice progressive sous vide par exemple) et une diminution de la qualité des analyses au cours du temps. Pour la vitesse de déplacement de l'échantillon, il existe sur le marché des systèmes (e.g. systèmes piézoélectriques) permettant des déplacements très rapides avec une grande précision.

De la même façon les progrès dans le domaine de l'électronique permettent d'améliorer sans cesse la capacité des instruments. Pour la qualité des images, l'un des paramètres important est la reproductibilité du déplacement. L'aire analysée en chaque point est elle aussi primordiale. L'amélioration de la résolution spatiale passe par la diminution de l'aire analysée permettant ainsi d'augmenter le nombre de points balayés, sachant qu'en toute logique le pas minimum de déplacement sera égal au diamètre du faisceau laser. Différentes méthodes peuvent être envisagées pour réduire l'aire analysée et entres autre des systèmes de focalisation du faisceau. Contrairement au SIMS, le MALDI ne permet pas d'atteindre une résolution spatiale subcellulaire, et ce, par la plus grande difficulté à focaliser le faisceau incident (laser) ou par les pertes de rendement de production des ions pour des faisceaux très focalisés. En plus de ces facteurs vont s'additionner les paramètres classiques pour une analyse MALDI à savoir le choix de la matrice, du solvant et les paramètres d'acquisitions choisis. Comme dans le cas de l'analyse directe de tissus, le dépôt de la matrice sera une étape cruciale pour la qualité des images puisque sous certaines conditions, une délocalisation des composés dans le tissu peut se produire consécutivement au dépôt de la solution de matrice et influencer la qualité des images par perte d'informations sur la localisation.

Du point de vue de la reconstruction de l'image, un grand nombre de paramètres vont affectés le rendu de l'image. Différents paramètres sont à considérer.

Par exemple les traitements des spectres doivent-ils être effectués ou non avant extraction des données (lissage, retrait de bruit, filtrage du bruit,...) et dans quelle mesure ces traitements affecteront la qualité des images.

La question de savoir si l'intensité ou l'aire d'un pic décrit le mieux la réalité peut aussi se poser. De la même manière, sachant que plusieurs ions distincts peuvent correspondre à un même composé (MH^+ , MNa , MK^+ , MK^{2+} , MH , $[M+m]^{2+}$, ...) cela soulève la question de savoir si l'image de chaque ion doit être reconstruite distinctement ou si l'intensité des différents ions correspondant à ce même composé doivent être prise en compte simultanément. Des critères de sélection peuvent être aussi ajoutés : utiliser un seuil d'intensité minimum au-dessous duquel le signal sera considéré comme nul ou un seuil d'intensité maximum au-delà duquel il sera estimé que les valeurs du signal sont automatiquement attribuées à 100%. L'utilisation d'échelles multi chromatiques peut également jouer sur le rendu visuel de l'image ainsi que la superposition avec des images de microscopie classique. Un travail de recherche important reste à faire sur les développements de logiciels adaptés à ce type d'imagerie.

L'avantage de l'imagerie réside dans le nombre de composés analysables en une seule étape d'acquisition même si cette dernière reste assez longue, en une seule acquisition sur un tissu (par exemple pour l'étude des protéines), plusieurs centaines d'ions pourront être observés. Sur cette base (en supprimant les informations redondantes, *i.e.* différents ions d'un même composé) de nombreuses images moléculaires pourront être reconstruites pour un même tissu. De plus l'imagerie MALDI tout comme les autres techniques de spectrométrie de masse ne nécessite aucune connaissance préalable et aucune caractérisation avant l'analyse.

L'imagerie par spectrométrie de masse a fait l'objet depuis de nombreuses années de recherches assidues. La Désorption Laser et le SIMS ont connu depuis longtemps de nombreux développements dans ce sens. Le MALDI a mis plus de temps pour s'orienter vers cette voie, probablement par l'inadaptation des premiers instruments (automatisation difficile), le nombre de champs d'investigations offerts par cette technologie dans de nombreux domaines (analyses de biomolécules diverses, polymère synthétiques, composés inorganiques, etc.) ainsi que par la difficulté de compréhension des mécanismes de désorption/ionisation et donc la difficulté à contrôler la quantité de matière éjectée et les rendements d'ions.

Par contre, la grande qualité du MALDI pour l'analyse de biomolécules a conduit rapidement à l'analyse directe de cellules ou d'organes de petites tailles. Plusieurs études ont ainsi été réalisées sur

différents organes issus de différents organismes (vertébrés, invertébrés), sur des cellules (neurones par exemple), puis, progressivement, l'analyse directe a été réalisée sur une seule cellule. Dans ce cadre, les premiers travaux MALDI sur tissus datent de 1994 avec les travaux de Van Veelen et al. [110]. Par la suite, il faut citer différentes études sur des nerfs, sur des cellules neuroendocrines d'invertébrés (escargot, limnée) [127, 128], de vertébrés (Xénope et rat) et sur des neurones uniques (neurones géants chez la limnée, l'aplysie et l'écrevisse) [143, 144]. Plus récemment des études ont été menées sur des vésicules à noyau dense à partir de l'aplysie [145]. Sur ces cellules ont en particulier été étudiées les peptides bioactifs et la maturation de certaines hormones pour conduire à la libération de ces peptides. Certains de ces travaux permettent de remonter à la voie de maturation des hormones comme dans le cas de l'hormone procHH pour l'écrevisse [105] ou de l'hormone ELH pour l'aplysie. L'analyse se fait classiquement par transfert de la cellule, des cellules ou du tissu sur le support métallique.

Différents paramètres peuvent influencer sur la pertinence de l'analyse, comme le milieu physiologique très riche en sels pouvant rendre ces analyses difficiles. Des études réalisées par le groupe de Sweedler [146] montrent l'influence du milieu qui peut être substitué au milieu physiologique sur la qualité des analyses, et par exemple l'utilité de certaines fixations ou de stabilisateurs comme le glycérol. Dans d'autres études sur cellules uniques la puissance de la méthode est démontrée au travers de la caractérisation *in situ* de certains peptides en utilisant les capacités d'élucidation structurale de la spectrométrie de masse soit par des études en mode PSD sur instrument de type MALDI-TOF [111] soit par des études en mode MS/MS CID sur des analyseurs magnétiques.

Dans le cas de l'imagerie, les premiers et la majorité des travaux restent l'initiative du groupe de R. Caprioli depuis 1997. Depuis les premières études, l'imagerie a constamment progressé et notamment au travers du développement de programmes informatiques spécifiques permettant l'acquisition automatique et la réalisation d'images [112]. Dans les premières études réalisées par ce groupe, il faut également souligner des essais pour réaliser des images topographiques et non pas moléculaires des échantillons, et qui s'approcheraient de la microscopie topographique. Dans ces expériences, la topographie de l'échantillon (dans ce cas une fourmis [113] peut-être obtenue en se basant sur les différences d'arrivées en temps d'ions provenant d'une surface non plane *i.e.* différentes épaisseurs de l'échantillon. Les ions suivis sont en particulier les ions de la matrice déposée à la surface de l'échantillon. Dès les débuts de l'imagerie MALDI un certain nombre de difficultés se sont révélées. En particulier le choix de la matrice, son mode de cristallisation et le

mode de dépôt sont des variables capitales en termes de reproductibilité des analyses sur l'ensemble de l'échantillon ou de délocalisation des composés au sein des tissus. Sur les trois matrices particulièrement adaptées à l'analyse des protéines (l'acide α -cyano 4-hydroxycinnamique HCCA, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque 2,5-DHB et l'acide sinapinique) en conditions classiques toutes ne se révèlent pas adaptées à l'imagerie. Le 2,5-DHB cristallise de manière non homogène sous forme de longs cristaux épais et de taille relativement importante. La cristallisation se produit à partir du bord du dépôt et peu de cristaux sont présents au centre du dépôt. Ainsi, le 2,5-DHB se révèle inadapté par sa grande hétérogénéité de cristallisation à l'obtention d'images. Finalement, seules les matrices HCCA et acide sinapinique présentent un intérêt dans ce cadre d'études, HCCA permettant l'analyse préférentiellement des composés de $m/z < 5000$ et l'acide sinapinique présentant des performances plus intéressantes dans la gamme des $m/z > 4000$. Pour améliorer le dépôt de matrice, sont rapidement proposées des méthodes par nébulisation pneumatique ou electrospray.

Une deuxième stratégie d'analyse émerge également dans ces travaux. La première stratégie étant la stratégie simple de l'analyse directe des coupes de tissus après dépôt de la matrice. La deuxième stratégie proposée repose sur l'utilisation de support présentant des propriétés (hydrophobe par exemple) permettant de bloquer par interactions hydrophobes, électrostatiques ou forces de Van der Waals les composés sur les membranes [114]. En appliquant le bloc de tissu sur la membrane, il est alors possible de réaliser un transfert (une empreinte) des composés types peptides/protéines en conservant leur localisation sur la membrane (membrane présentant des fonctions actives C18). Dans ce cas, la matrice est ajoutée sur la membrane et l'image ou l'analyse est réalisée à partir de cette membrane. Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir effectuer des étapes de rinçage permettant de retirer les sels et contaminants ainsi que l'hémoglobine excédentaire. La limite de cette stratégie réside dans le choix du type de membrane utilisé dont le critère majeur est de posséder une affinité plus spécifique pour certains composés et sur les rendements de transferts sur cette membrane. A l'inverse, la rétention des composés à la surface de la membrane permet d'éviter en partie les délocalisations liées aux dépôts de matrice. Les membranes sont non conductrices et peuvent altérer l'analyse, celles-ci sont donc rapidement remplacées par des membranes de Polyéthylène conductrices permettant un transfert également efficace des peptides et protéines et assurant de meilleures conditions d'analyse. Dans ces études sont également comparées les performances de l'analyse directe des tissus et de l'analyse indirecte des tissus par empreinte sur membrane [114].

Les études réalisées sur différents organes de souris démontrent l'efficacité de la méthode avec des profils protéiques obtenus différents suivant les régions analysées et ce avec une bonne reproductibilité pour les stratégies testées. Ces deux stratégies restent prédominantes pour la réalisation d'analyses directes de tissus et d'images. Comme le montrent les études, l'utilisation des membranes permet également d'effectuer des digestions enzymatiques (trypsine plus particulièrement) sur la membrane pour identifier les composés d'un intérêt plus particulier par interrogations de banques de données. Pour les peptides, la caractérisation peut être réalisée directement sur coupe en étudiant les spectres d'ions fragments obtenus en mode PSD [115].

Parmi les développements envisagés pour l'imagerie MALDI, la possibilité d'obtenir conjointement des informations morphologiques et moléculaires. Pour cela il faut développer l'étude de la compatibilité des colorations histologiques usuelles avec l'analyse MALDI. Les travaux ont été menés par l'équipe de Caprioli sur différents colorants et notamment sur des colorants se fixant sur les oligonucléotides [152]. Les colorants usuels étant généralement des molécules absorbant dans l'UV, les auteurs proposent également d'étudier la répartition de certains oligonucléotides (ADN, noyaux, acides nucléiques,...) au travers de l'étude de la répartition du colorant, liés de manière non covalente à leur cible en désorption laser pure (LDI). Les images obtenues montrent que l'étude de la répartition de l'ion pseudo-moléculaire correspondant au colorant permet de suivre la répartition de certaines classes de composés. Les études montrent en revanche que les colorants des protéines ne peuvent être suivis en LDI et ne donnent donc pas d'informations [152].

Dans la même optique des études plus récentes de ce même groupe propose une intégration des études histologiques à l'imagerie MALDI [116]. Dans leurs travaux, Chaurand et al. ont intégré principalement des colorants marquant les ADN et n'interférant pas avec les protéines montrent que pour certaines colorations les structures sont bien observées tout en conservant des profils moléculaires après analyse MALDI similaires à ceux obtenus pour des tissus non colorées. Les études montrent également que des images peuvent être obtenues à partir de coupes colorées permettant de recueillir des informations histologiques et moléculaires sur une même coupe de tissu.

La dernière stratégie proposée pour l'analyse de cellules repose sur la microdissection par un laser de cellules d'un même type cellulaire. Cette technique relève moins de l'imagerie réelle mais permet également des analyses protéomiques poussées [117]. Dans cette stratégie les cellules sont directement transférées sur le support métallique après microdissection permettant un gain de temps considérable par rapport aux études classiques après microdissection qui passent par la

séparation sur gels (électrophorèse 2D) puis excision de spots, digestion sur chacun d'entre eux puis analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode d'analyse directe des cellules microdisséquées offre également l'avantage de nécessiter un nombre de cellules plus faible donc un gain de temps et d'échantillon. Les études mettent en évidence que les profils sont très similaires à ceux obtenus pour les cellules dans les coupes de tissus, validant ainsi la méthodologie. Plus récemment, le concept de transfert sur membrane est creusé par Stoeckli et collaborateurs [118]. Ce concept repose sur la réalisation d'une digestion enzymatique à partir d'empreintes de tissus sur membrane suivant l'idée du scanner moléculaire [156] permettant des études en mode MS/MS sur les fragments peptidiques issus de la digestion locale d'une protéines. Il est alors possible de réaliser les images sur la base de certains ions fragments permettant de lever l'ambiguïté dans certains cas de chevauchement d'ions provenant de composés distincts.

Parmi les paramètres limitant la résolution des images les facteurs instrumentaux sont particulièrement importants, nous avons vu que dans ce contexte la taille du faisceau laser incident était un facteur prépondérant. Certains groupes s'intéressent plus particulièrement aux développements instrumentaux. A ce titre, le groupe de B. Spengler a développé un concept instrumental particulier le SMALDI (Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) instrument étant en quelque sorte un hybride entre la technologie utilisée en LAMMA et le MALDI classique (40). Sur cet instrument, le laser peut-être focalisé jusqu'à $1\mu\text{m}$ permettant une nette augmentation de la résolution spatiale jusqu'à un niveau subcellulaire. Tout comme en SIMS des images d'une grande résolution spatiale sont obtenues par études de coupes de végétaux en regardant la répartition des ions Na^+ et K^+ . Des images sont également obtenues à partir de peptides déposés en pico dépôts sur une surface.

Parmi les développements instrumentaux de l'imagerie MALDI, un autre concept d'imagerie est proposé par le groupe de R.M. Heeren. Dans ce cas, le concept proposé s'approche de techniques de microscopie moléculaires par spectrométrie de masse, le stigmatic-MALDI. Pour compenser les problèmes liés à la focalisation du faisceau laser incident et les temps d'analyse longs en imagerie MALDI classique, le laser est défocalisé permettant l'analyse de grandes quantités d'ions et l'image est réalisée par utilisation d'un détecteur de position [119]. Le point d'impact de l'ion sur le détecteur est conservé comme une donnée spatiale liée à la position de départ de l'ion qui sera conservée tout au long de son trajet. Ces instruments présentent une configuration particulière avec des systèmes de guidance des ions bien particuliers et des détecteurs de position de haute performance permettant de relier la position d'arrivée à la position de départ pour reconstruire

l'image de la répartition d'un ion donné dans son contexte d'origine. Les tests effectués sur des grilles recouvertes de différents composés démontrent la fonctionnalité de l'instrument et la résolution qui peut être alors obtenue avec une vitesse d'acquisition remarquable. Cette technologie présente également un avenir très prometteur pour l'imagerie MALDI. Des études ont également été menées par ce groupe sur cette instrumentation mais avec une source IR-MALDI démontrant également la potentialité d'utiliser des lasers émettant dans l'IR plutôt que dans l'UV pour l'imagerie et notamment en terme de matrices utilisables [120].

Dans les développements plus particuliers de l'imagerie MALDI sont également d'un intérêt tout particulier les développements réalisés par A. Woods et collaborateurs. Dans ces études les auteurs proposent une méthode qui permettrait l'analyse directe de tissus sans addition d'une solution de matrice [159, 160]. La technique proposée ou MILDI (Matrix Implanted Laser Desorption Ionization) consiste à implanter des ions d'Au dans les tissus par irradiation du tissu par un faisceau d'ions primaires avec source Au. La matrice implantée par cette voie ne peut entraîner de délocalisation des composés. Cette technique permet d'obtenir des ions pour des protéines à partir de tissus. Cependant, à l'heure actuelle les rendements d'ions restent assez faibles ainsi que le nombre de composés analysables.

En parallèle à ces développements méthodologiques, différentes applications de l'analyse directe des tissus et de l'imagerie MALDI ont été réalisées, démontrant l'intérêt de cette technologie pour les études biologiques et en particulier pour l'application à différentes pathologies. Diverses études dans le cas de l'analyse de tissus pathologiques par comparaison à des tissus sains ont été menées et montrent l'utilité de la méthode dans la recherche de biomarqueurs de ces pathologies. Dans le cas des lipides l'analyse et l'imagerie de coupes de cerveaux de souris modèles de la maladie de Sandhoff ont mis en évidence une expression intense et co-localisée de gangliosides GM2 et d'asialogangliosides GM2 au niveau de la couche granulaire du cervelet [141]. A l'inverse, ces mêmes travaux ont démontré que les sulfatides présentaient une distribution quasi-homogène dans la substance blanche du cervelet. Ces différents patterns de lipides exprimés dans les cerveaux de souris simulant la maladie de Sandhoff et les souris saines, ont été confirmés par analyses en electrospray sur des extraits lipidiques de ces mêmes tissus. Ces résultats établissent comme biomarqueurs potentiels de cette maladie, les gangliosides de types GM2 et s'inscrivent dans la continuité des observations faites par Wada et al. [36].

Des applications du MALDI MSI ont aussi permis de mettre en évidence les protéines représentées de façon différentielle entre des tissus sains et pathologiques. Citons par exemple l'analyse de la répartition des peptides β -amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie

d'Alzheimer [65], l'étude des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson [66], ou encore l'application conjointe de méthodes de clustering à l'étude de modèles souris présentant des tumeurs du cerveau [68] et de tumeurs primaires du cerveau [121].

7. Du développement à l'application au niveau du SNC

En parallèle à ces développements méthodologiques, différentes applications de l'analyse directe des tissus et de l'imagerie MALDI ont été réalisées, démontrant l'intérêt de cette technologie pour les études biologiques et en particulier pour l'application à différentes pathologies. Diverses études dans le cas de l'analyse de tissus pathologiques par comparaison à des tissus sains ont été menées et montrent l'utilité de la méthode dans la recherche de biomarqueurs de ces pathologies. Dans le cas des lipides l'analyse et l'imagerie de coupes de cerveaux de souris modèles de la maladie de Sandhoff ont mis en évidence une expression intense et co-localisée de gangliosides GM2 et d'asialogangliosides GM2 au niveau de la couche granulaire du cervelet [141]. A l'inverse, ces mêmes travaux ont démontré que les sulfatides présentaient une distribution quasi-homogène dans la substance blanche du cervelet. Ces différents patterns de lipides exprimés dans les cerveaux de souris simulant la maladie de Sandhoff et les souris saines, ont été confirmés par analyses en electrospray sur des extraits lipidiques de ces mêmes tissus. Ces résultats établissent comme biomarqueurs potentiels de cette maladie, les gangliosides de types GM2 et s'inscrivent dans la continuité des observations faites par Wada et al. [21].

Des applications du MALDI MSI ont aussi permis de mettre en évidence les protéines représentées de façon différentielle entre des tissus sains et pathologiques. Citons par exemple l'analyse de la répartition des peptides β -amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie d'Alzheimer [50], l'étude des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson [51], ou encore l'application conjointe de méthodes de clustering à l'étude de modèles souris présentant des tumeurs du cerveau [53] et de tumeurs primaires du cerveau [106].

8. Conclusion :

L'imagerie MALDI est une méthodologie en plein essor dont les applications déjà acquises montrent la pertinence dans les domaines de la pharmacologie, de la médecine et de la protéomique clinique. Le développement de ce type de technologie est à rapprocher de celui de la Résonance Magnétique Nucléaire qui conduisit aux techniques d'imageries dites IRM dont l'implantation en milieu médical est importante et utilisées pour le diagnostic de certaines pathologies. Bien que déjà très performante, cette technologie encore jeune va connaître de nombreux développements grâce au travail des équipes de recherche.

Si aujourd'hui l'imagerie MALDI est plutôt dédiée à l'analyse des peptides/protéines et aux petits composés à vocation pharmacologique, son champ d'application va s'ouvrir vers d'autres familles de composés présents dans le domaine du vivant comme les lipides et les sucres.

II. Etude des messagers lipidiques impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*.

1. Historique

La sangsue médicinale est utilisée depuis la plus haute Antiquité à des fins thérapeutiques. Les plus anciennes traces de son utilisation remontent au moins aux années 1600-1300 avant J.C. En effet, dans un tombeau de Thèbes (Egypte) de la XVIII^{ème} dynastie, une fresque murale représentant une pose de sangsue a été découverte. L'usage des sangsues a également été décrit par des écrivains grecs et latins de l'Antiquité (Plaute, Cicéron, Horace) sous le nom de *bdella*, *sanguisuga* ou *hirudo*. En Grèce, Nicandre de Colophon (185-138 avant J.C.) et à Rome, Thémison de Laodicée (123-43 avant J.C.) semblent avoir été les premiers à préconiser l'emploi des sangsues en thérapeutique. Pline l'Ancien (23 à 79 après J.C.) conseillait déjà leur usage dans le traitement des phlébites et des hémorroïdes. Au cours de l'histoire, la sangsue a connu en France des périodes de forte utilisation, en particulier au XIX^{ème} siècle par François-joseph BROUSSAIS, mais également des phases d'abandon voire de dénigrement.

A la fin du Moyen Age, les médecins traitaient de nombreuses maladies par des applications de sangsues. Mais dans le même temps, l'ensemble des facultés de médecine en Europe ignorait son usage. Le naturaliste Guillaume Rondelet présente, vraisemblablement en 1554, une des premières descriptions des différentes espèces de sangsues dans une « Histoire des Poissons ». En 1735, Linne effectue la classification d'*Hirudo medicinalis* et d'*Hirudo sanguisuga* dans son ouvrage « Le système de la nature ». En 1809, Vitet, auteur du Traité de la sangsue déclara : « les avantages de la sangsue sur l'homme sont si grands qu'il importe à tout médecin de les connaître ». La sangsue est de nouveau perçue comme un outil thérapeutique unique. L'influence de Broussais (1772-1838), chirurgien de l'armée napoléonienne, a été décisive pour la sangsue et pour son commerce. La France devint à son époque la plus grande consommatrice de sangsues. Selon la devise de Broussais : « Toute maladie étant une hyperstimulation, une inflammation le plus souvent de l'estomac, il faut la combattre par des mesures anti-inflammatoires, c'est-à-dire, l'application de sangsues de préférence sur l'abdomen et par une diète stricte ». La quantité d'annélides utilisée entre les années 1830 et 1840, aurait été d'environ 60 millions par an !

Dans le même temps, l'utilisation abusive des sangsues, provoquant des convalescences interminables, des hémorragies et des infections cutanées, conduisit au discrédit de la doctrine de Broussais et par conséquent des sangsues elles-mêmes. Après les années 1850, l'élevage de la sangsue a été abandonné par le plus grand nombre ; la production dépassant largement la demande

et la concurrence des pays tels que la Hongrie et la Turquie, les prix s'effondrèrent considérablement. Après la grande épidémie de choléra de 1832 et l'avènement de l'asepsie avec Pasteur, les médecins ont rejeté l'usage de la sangsue considérée alors comme vecteur de germes. La sangsue entama son déclin et l'abandon de l'hirudiniculture.

L'assèchement des marais et l'utilisation des pesticides et herbicides eurent raison de la survie des sangsues très sensibles à la qualité de l'eau. En 1938, elles ont disparu du Codex français et par conséquent des officines en France mais également dans les pays voisins. En effet, les nouveaux concepts émergents de la médecine entachèrent leur réputation tant auprès des thérapeutes qu'auprès des patients et cet animal fut éliminé quasi-totalement de la thérapeutique avec l'apparition des nouvelles molécules de l'industrie pharmaceutique.

Cependant, dans le même temps, la sangsue retrouvait les faveurs de la médecine, et plus précisément celles de la chirurgie. En effet, elle a été introduite dans les services de chirurgie plastique et traumatologique des hôpitaux et cliniques. Ainsi, la sangsue est de nouveau au cœur de l'actualité et effectue un retour remarqué dans les cabinets de médecine générale pour le traitement de différentes affections : phlébites, arthrose, intoxications sanguines....

L'industrie pharmaceutique et les laboratoires scientifiques se penchent depuis quelques années sur les formidables pouvoirs de ces sangsues. Compte tenu de ses qualités en médecine générale, de son rôle inégalable en chirurgie, des propriétés de sa salive et des capacités de son système nerveux, la sangsue est un animal bien précieux au milieu des techniques de pointe de la médecine moderne.

2. Etymologie et Classification

a. La classification

D'un point de vue phylogénique, les Annélides sont des Eumétazoaires caractérisés par une symétrie bilatérale d'où le qualificatif de Bilatéraliens. Lors de leur développement embryonnaire, le blastopore de la gastrula est à l'origine de la bouche et de l'anus. La bouche est donc formée primitivement. Le système nerveux central des Annélides est organisé autour d'un ganglion céphalique et d'une chaîne nerveuse ventrale (Protostomien).

L'embranchement des Annélides auquel appartient la sangsue médicinale est composé de trois classes : Les Myzostomidés, les Polychètes et les Clitellates. La classe des Myzostomidés regroupe environ trois cents espèces marines de parasites internes et externes de l'embranchement des échinodermes (contenant l'oursin de mer). Les Polychètes sont des animaux métamérisés et chaque métamère ou segment qui compose leur corps porte une paire de parapodes (expansions latérales) munis de branchies et de soies chitineuses **Figure 1**. Le prostomium des polychètes et qui correspond à la région la plus antérieure de la tête, à hauteur de la cavité buccale est pourvu d'antennes, de palpes et parfois même de tentacules **Figure 2**. La classe des Clitellates rassemble des espèces hermaphrodites ne portant ni antennes, ni parapodes, caractérisées par la présence d'un clitellum qui peut se définir comme une structure épidermique glandulaire qui s'étend généralement sur plusieurs métamères de la région antérieure du vers. Ce clitellum secrète un cocon muqueux servant à accueillir les œufs et leur fournir des éléments nutritionnels essentiels aux embryons et protecteur contre la déshydratation. Le clitellum est donc une spécificité d'adaptation des Clitellates au milieu terrestre. La classe des Clitellates se divise en deux sous-classes : les Oligochètes (par exemple le lombric) et les Achètes ou Hirudinées (représentés par les sangsues)

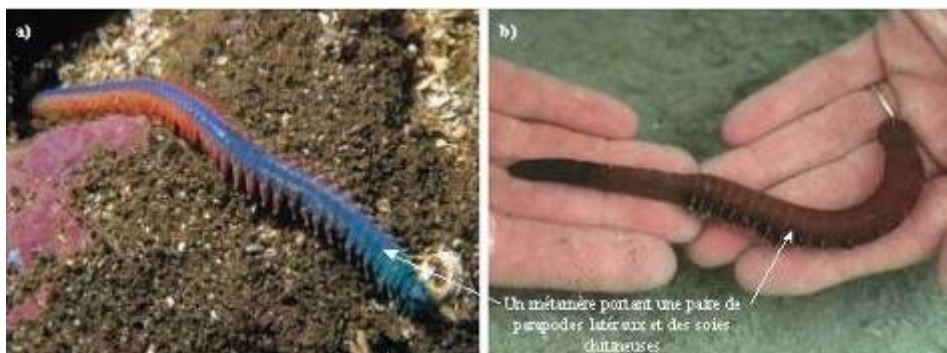


Figure 1 : Deux représentants de la sous-classe des Polychètes, la néréis (a) et l'arénicole des pêcheurs (b) caractérisés par une métamérisation de leur corps, chaque métamère portant une paire de parapodes munis de branchies et de soies.

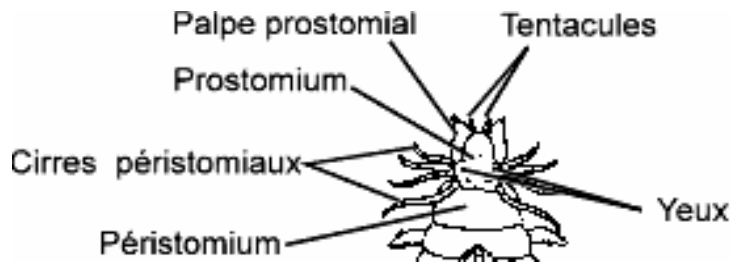


Figure 2 : Représentation schématique de l'extrémité céphalique d'un Annélide Polychète.

Les Oligochètes sont dépourvus de parapodes, de rares soies voire absentes. Ils sont terrestres ou dulçaquicoles (Tubifex, Lombrics, etc.).

Les membres de la sous-classe des Hirudinées sont des animaux majoritairement d'eau douce ou terrestres. Ils se différencient des Polychètes par l'absence de soies et de parapodes. L'existence d'une ventouse buccale et d'une ventouse postérieure aux deux extrémités du corps assure leur locomotion hors de l'eau. Les Hirudinées présentent également une segmentation interne délimitée par le système nerveux. La présence d'un nombre constant de segments (ou métamères) est un signe d'évolution important par rapport aux Oligochètes dont fait partie par exemple le lombric (ou ver de terre). Cette caractéristique permet en effet un haut degré de spécialisation des différentes régions du corps et ces segments constituent des vestiges du développement embryonnaire qui disparaissent chez l'adulte. La position et l'espacement des organes sensoriels des Annélides constituent la preuve de cette segmentation embryonnaire. Toutefois, l'annélation externe visible sur le corps des sangsues ne correspond pas à la segmentation interne, il est néanmoins possible de séparer les anneaux en groupes correspondant aux somites fondamentaux.

La subdivision des Hirudinées est basée sur les caractéristiques du tube digestif (Sawyer, 1986). En effet, le tube digestif débute soit par une trompe (ordre des Rhynchobdelles), soit par un pharynx porteurs de mâchoires dentées (Gnathobdelles) ou non (Pharyngobdelles). Les ordres des Rhynchobdelles représenté par exemple par *Theromyzon tessulatum* et des Pharyngobdelles (par exemple la sangsue *Erpobdella octoculata*) sont également regroupés sous le terme d'Arhynchobdelle. Enfin, l'ordre des Acanthobdelles renferme également des sangsues partageant des caractères communs avec les Oligochètes : la présence de soies et de cavités cœlomiques plus reconnaissables que chez les autres sangsues.

Le cœlome est réduit à des lacunes remplies par un abondant tissu conjonctif qui ne laisse libre que les cavités des organes génitaux. Les gonades de ces animaux hermaphrodites sont individualisées et chacun des deux ovaires ainsi que les nombreux testicules est compris dans une portion de cœlome. Chez les Arhynchobdelles, le système cœlomique se transforme en vaisseaux et

la lymphe acquiert physiologiquement le rôle de sang. Par contre, les Rhynchobdelles possèdent un système circulatoire clos, à paroi contractile. Il y a également présence d'un clitellum comparable à celui des Oligochètes et sécrétant un cocon qui contient les œufs. Le développement ne comporte pas de forme larvaire libre ; il est dit direct.

L'évolution de ces animaux a conduit au cours du temps à l'apparition de sangsues hématophages qui ont conquis à la fois les océans, les lacs, les étangs, les fleuves et le monde terrestre.

3. *Hirudo medicinalis*

Parmi les 650 espèces de sangsues existantes, *Hirudo medicinalis* (**Figure 3**) est l'un des représentant les mieux étudiés des annélides et l'espèce la plus utilisée en thérapeutique. Le mot « sangsue » est d'origine latine. *Hirudo* proviendrait de *hoero* qui signifie j'adhère, et *sanguisuga*, de *sanguis* le sang et de *suga* je suce. Le terme de *Bdella* provient du grec et a laissé son nom à l'ordre des Gnathobdellés. En anglais, le sens primitif de leech est médecin. En l'an 900, *laece* signifiait « médecin » ou « sangsue » témoignant vraisemblablement de la preuve de son utilisation en médecine.

Elle appartient à :

- L'Embranchement des Annélides
- La Classe des Achètes ou Hirudinées (ni parapodes, ni soies)
- L'Ordre des Gnathobdellés (présence de mâchoires mais pas de trompe)
- La Famille des Hirudinées
- Genre *Hirudo*



Figure 3: Photographie d'une sangsue *Hirudo medicinalis* à l'état adulte

La sangsue médicinale est un annélide aquatique d'eau douce affectionnant plutôt les mares et les étangs, à fond vaseux, riches en matière organique. La sangsue médicinale est une espèce réputée strictement hématophage se nourrissant du sang des mammifères, reptiles, poissons et amphibiens (Sawyer, 1981). Elle se fixe sur l'animal, incise la peau avec ses mâchoires et aspire le sang tout en injectant dans la plaie des anticoagulants dont l'Hirudine [122]. Le sang subit ensuite des changements très lents, notamment par la lyse progressive des érythrocytes faisant intervenir 2 mécanismes successifs, l'hémolyse et la protéolyse. La digestion du repas de sang est rendue possible dans le tube digestif par la bactérie *Aeromonas hydrophila* dans le tube [163]. Après son repas, la sangsue est gonflée et se déplace avec peine, elle peut absorber entre 3 et 10 fois son poids en sang. Ses repas de sang sont espacés, en effet les sangsues supportent aisément un jeûne de 6 à 8 mois.

Dans le milieu naturel, les sangsues sont alertées de la présence d'une proie potentielle par les vibrations de l'eau. L'autre stimulus important pour les sangsues est la température de la proie potentielle. Une source de chaleur placée dans l'eau du bassin, comme un ballon d'eau chaude, attire les sangsues à sa surface. Elles repèrent ainsi vraisemblablement plus facilement les vertébrés à sang chaud.

Dans les bassins naturels, elle se déplace dans son milieu soit par la nage, à l'aide de mouvements ondulatoires, soit par déplacement sur le substrat, à l'aide des ventouses. Sur terre, elle progresse en fixant la ventouse postérieure puis en allongeant le corps pour fixer la ventouse antérieure. Détachant ensuite le disque arrière et se contractant sur leur point d'appui, elle rapproche toute la partie postérieure du corps vers la ventouse antérieure et ré applique la ventouse arrière.

Possédant des organes de reproduction mâle et femelle, la sangsue est hermaphrodite (Malecha, 1981). Cependant, l'autofécondation n'est pas possible et la copulation n'est pas obligatoirement réciproque. Elle s'effectue tête-bêche. Le pénis est introduit dans le vagin où le sperme est déposé. A l'approche de la ponte, la sangsue présente un renflement dans la partie antérieure du corps accompagné d'une coloration de la zone, d'une teinte allant du vert au jaune voire orange. La reproduction débute au printemps et se termine à la fin de l'automne. La ponte se produit en général 1 mois après la fécondation et a lieu à l'extérieur de l'eau; la sangsue libère un cocon, capsule ovoïde d'une consistance variable, et dans lequel les œufs fécondés sont déposés. La taille du cocon, 2 à 3 cm de longueur sur 1 à 1,5 cm de largeur, est fonction de la taille de la sangsue pondreuse. Le cocon est rempli d'un liquide nutritif permettant l'alimentation des jeunes sangsues avant leur sortie dans le milieu extérieur. Au bout d'un minimum de 3 semaines, les jeunes perforent une extrémité du cocon et gagnent l'eau le plus rapidement possible. Le développement de la larve

se fait par division spirale. Celle-ci est de type trochophore. Les jeunes individus peuvent s'alimenter initialement de larves d'insectes, de petits mollusques.

4. Anatomie

a. Organisation générale d'*Hirudo medicinalis*

(d'après Sawyer, 1981)

La sangsue *Hirudo medicinalis* est un ver annelé aplati dorso-ventralement. Chacune des extrémités de son corps est pourvue d'une ventouse. La ventouse antérieure ou buccale, la plus petite, entoure la bouche et sert à la succion et à la fixation. La ventouse postérieure, plus grande, sert uniquement à la fixation (**Figure 4**)

L'appareil digestif comporte 4 parties : la bouche s'ouvrant au fond de la ventouse antérieure est munie de 3 mâchoires, formant un Y renversé et portant de très nombreuses dents assurant l'incision ; le pharynx, doté de muscles puissants, permettant la succion et la déglutition du sang ; l'estomac assurant le stockage du sang en quantité très importante ; l'intestin moyen constituant la zone digestive active et l'intestin postérieur court se terminant par l'anus. Comme pour tous les annélides, la sangsue possède un système circulatoire clos.

L'appareil excréteur est composé de 17 paires de néphridies s'ouvrant au niveau du tégument par des néphridiopores. L'appareil reproducteur est constitué d'un appareil mâle, formé par 9 paires de testicules, des spermiductes et d'un pénis permettant la libération des spermatozoïdes et d'un appareil femelle, comprenant 2 ovaires, des oviductes, un utérus et un vagin. Au niveau du tégument ventral de la sangsue, un pore mâle (entre le 24ème et le 25ème anneau) et un pore femelle (entre le 29ème et 30ème) sont visibles. L'appareil respiratoire n'est pas différencié. La respiration s'effectue directement à travers l'épiderme. L'appareil circulatoire est constitué de vaisseaux et sinus indépendants.

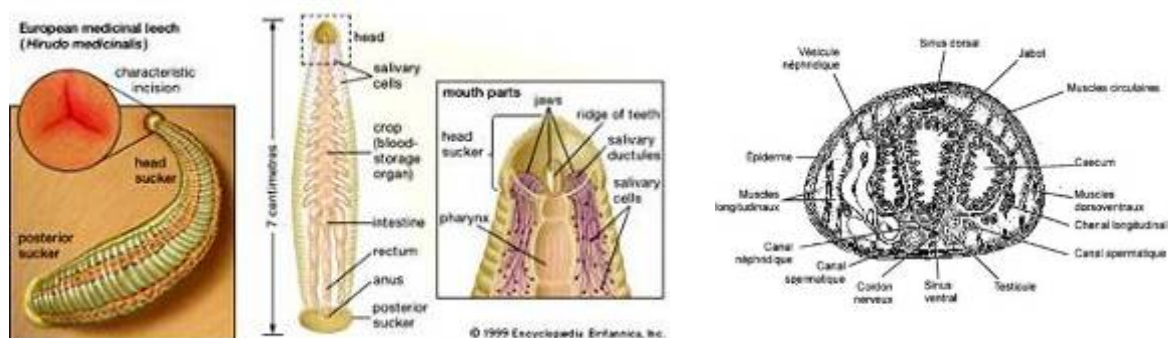


Figure 4 : Représentation schématique du système digestif (à gauche) et coupe transversale de la sangsue *Hirudo medicinalis* (à droite)

b. Le Système nerveux d'*Hirudo medicinalis*

Le système nerveux de la sangsue *Hirudo medicinalis* est relativement simple, expérimentalement accessible, et a été intensivement étudié : plusieurs des ~400 neurones centraux dans chaque ganglion segmentaire ont été caractérisés physiologiquement et des rôles comportementaux leurs ont été assignés. Les récentes avancées dans l'application des techniques génétiques, biochimiques et moléculaires, y compris l'interférence d'ARN et l'expression ectopique de gènes, ont ouvert la porte à des études détaillées des processus biologiques fondamentaux de la sangsue, tels que la neurogènes, la neurorégénération et la réponse [123]. De plus, des bases de données génomiques et transcriptomiques de sangsue sont disponibles. Il est maintenant également possible d'explorer les programmes génétiques qui sont à la base du développement embryonnaire du système nerveux. Ainsi, il est possible de déterminer quels aspects de ces programmes sont employés dans la réparation et la restauration afin de rétablir la fonction normale du système nerveux central suite à un trauma physique ou [124].

i. Structure générale

C'est au début du XIX^{ème} siècle que les premières études ont porté sur le système nerveux de la sangsue médicinale, permettant ainsi à la sangsue d'être l'un des premiers modèles en neurobiologie. Depuis, de nombreuses études menées au niveau de son système nerveux ont abouti à une connaissance très précise de sa structure, schématisée sur la figure ci-après (**Figure 5**)

Le système nerveux central d'*Hirudo medicinalis* est segmenté. Il est composé d'un nombre fixe de 32 neuromères bilatéraux. Les 4 neuromères antérieurs sont fusionnés et forment le ganglion péri-œsophagien. L'anneau péri-œsophagien d'origine non-segmentaire ainsi que le ganglion secondaire-œsophagien composent le ganglion principal. Celui-ci est formé de deux masses qui vont innover la partie antérieure de l'animal. Les ganglions supra-œsophagiens ont un rôle limité excepté dans la neurosécrétion [125] tandis que les ganglions sous-œsophagiens jouent un rôle sensoriel important par l'innervation de la ventouse antérieure et des trois mâchoires [167, 168]. Les 7 neuromères postérieurs forment le ganglion de queue, innervant principalement la ventouse postérieure de la sangsue. Les neuromères bilatéraux simples des segments de mi-corps sont composés quant à eux de ganglions individuels.

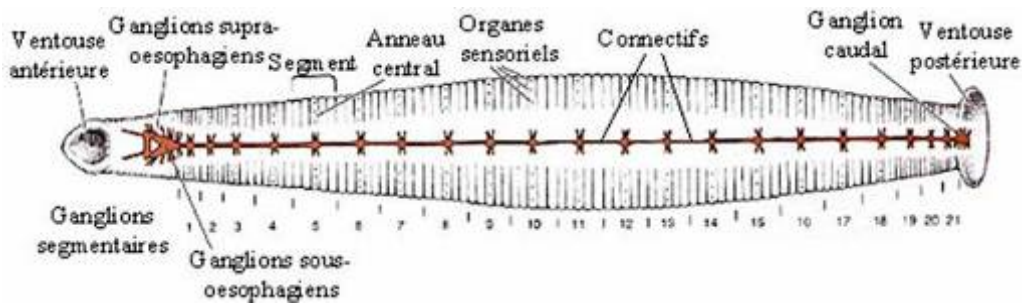


Figure 5 : Anatomie de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale (en orange). (D'après Kuffler, S. W. and Nicholls, J. G., 1976)

La Figure 4 montre la surface ventrale d'un ganglion segmentaire, qui fait d'environ 0,6 mm de diamètre. Enfin, la chaîne nerveuse, par sa simplicité structurale, représente un tissu très accessible aux expérimentations *in vivo* et *in vitro*.

ii. Organisation des ganglions

L'architecture neuronale des ganglions segmentaires est très bien caractérisée et extrêmement conservée d'un ganglion à l'autre (**Figure 6**). Les ganglions contiennent environ 400 corps cellulaires, excepté les ganglions 5 et 6 associés aux systèmes reproducteurs qui en contiennent environ 700 (Macagno, 1980). Le ganglion est divisé en 6 paquets de cellules (follicules), séparés par des septas, contenant les neurones sensoriels et moteurs ainsi que des interneurones. Chaque follicule est enveloppé par une cellule gliale (cellule gliale des paquets). Deux autres cellules gliales sont présentes dans le neuropile (cellules gliales géantes ou neuropile glia). La plupart des raccords synaptiques sont formés dans un neuropile central. Une cellule gliale supplémentaire est associée à chaque connectif (cellules gliales des connectifs). De nombreuses cellules microgliales sont disséminées au sein du neuropile et du neuvrilème. En plus des connectifs inter-ganglionnaires, partent de chaque côté des ganglions deux nerfs segmentaires en communication avec le système nerveux périphérique de l'animal.

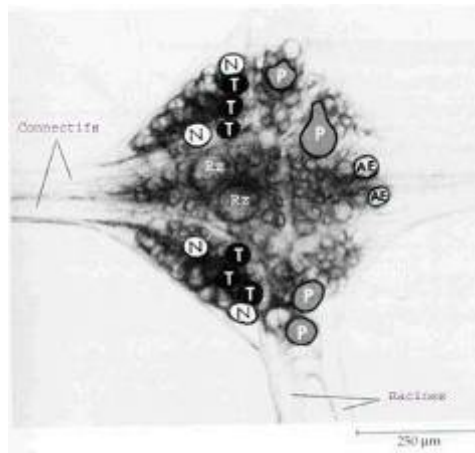


Figure 6 : Photographie d'un ganglion de la sangsue *Hirudo medicinalis*. Les différents neurones assurant les perceptions sensorielles sont représentés par leur lettre respective (N, T et P cells). Au centre sont visibles les cellules de Retzius (Rz).

L'organisation de la sangsue présente un certain nombre d'avantages pour l'analyse neurobiologique. D'une manière primordiale, plusieurs de ces neurones sont organisés dans un modèle réitéré dans chacun des ganglions segmentaires, et un certain nombre de neurones sont individuellement identifiables. Une cartographie détaillée de ces neurones ainsi que l'étude du rôle de certains d'entre eux ont été réalisées. Ainsi, les neurones possédant des corps cellulaires de plus grande taille sont associés aux activités sensorielles. Ce sont les neurones nommés T-cells (toucher), P-cells (pression) et les N-cells (nociception). D'autres neurones sont quant à eux associés à des fonctions telles que la nage, la circulation sanguine ou encore l'activité sexuelle de l'animal. Chacune de ces cellules identifiées est située dans le même endroit dans chaque ganglion segmentaire. En raison de cette organisation modulaire, le système nerveux de sangsue est considérablement plus favorable à l'analyse que celui des vertébrés, beaucoup plus complexes. Les neurones de sangsue sont relativement grands (μm 10-60).

5. Les lipides de type endocannabinoïde

a. Les phytocannabinoïdes : origine et propriétés pharmacologiques

Les endocannabinoïdes renferment une grande famille de composés de nature lipidique. Ces substances, utilisées depuis des millénaires dans les médecines chinoise et égyptienne étaient préconisées pour traiter la douleur, les spasmes, les nausées, l'insomnie ou encore le manque d'appétit. Comme nous pourrions le voir en détail dans la suite de ce manuscrit, ces molécules peuvent être secrétées dans différents tissus d'un bon nombre d'organismes vivants. Ces médiateurs

lipidiques endogènes furent apparentés à la famille des cannabinoïdes plus en raison de la similitude de leurs effets pharmacologiques que structurale.

La découverte des propriétés narcotiques du cannabis a passionné l'Europe du XIX^e siècle. En effet, c'est en 1810 qu'un pharmacien français, M. Rouyer, découvrit les propriétés psychotropes du chanvre que les Egyptiens cultivaient pour son pouvoir enivrant et euphorisant. C'est à la même époque que les médecines chinoise puis indienne utilisèrent le chanvre pour soulager les constipations, les rhumatismes ou encore la malaria. Le chanvre est une plante de la famille des cannabinaées. L'espèce, présente de manière endémique en Europe, était utilisée pour ses fibres textiles et ses graines nourrissaient les oiseaux. Le chanvre chinois, indien ou encore égyptien provient d'espèces différentes de la variante européenne, l'espèce *Cannabis sativa*. En 1848, le médecin anglais Robert Christinson remarqua, qu'outre des propriétés psychotropes puissantes, le cannabis produisait également des effets pharmacologiques par ses propriétés analgésiques, antispasmodiques ou encore par sa capacité à soulager les troubles du sommeil. Néanmoins, il remarqua qu'un usage chronique du cannabis était capable de déclencher des symptômes secondaires comme l'hypotension artérielle, l'amnésie, les hallucinations et l'incoordination des mouvements. De tels symptômes furent également relevés par le médecin français Joseph Moreau [126].

Le composé actif du cannabis, le Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC), fut isolé en 1964 par Raphaël Mechoulam [127]. Le Δ^9 -THC est une molécule lipophile à la différence des constituants actifs des autres plantes psychotropes comme la cocaïne extraite de la feuille de coca, *Erythroxylon coca*, et la morphine issue de l'opium, *Papaver somniferum*.

En 1940, Lord Todd et Roger Adams isolèrent de manière indépendante, le cannabinoïde et le cannabidiol [128] comme étant les principes actifs majoritaires de la plante *Cannabis sativa*. Un autre composant mineur de la plante a été par la suite isolé comme étant l'acide cannabinoïque aux vertus psychotropes plus faibles. Tous ces dérivés naturels du cannabis font donc partie de la famille des phytocannabinoïdes (**Figure 7**) et se présentent comme des composés bis-voire tricycliques caractérisés par une chaîne n-pentile en position C3 du cycle benzénique. Ils dérivent du géranylpyrophosphate et de l'olivétol qui sont des métabolites végétaux .



Figure 7 : Structures chimiques des trois principaux phytocannabinoïdes

Les propriétés pharmacologiques du Δ^9 -THC et son utilisation en médecine ont été examinées par différents auteurs [172-174]. Ce phytocannabinoïde possède un potentiel thérapeutique en tant qu'antiémétique à l'image des autres composés du cannabis. L'une de ses premières utilisations dans les traitements anti-nauséeux et antiémétiques causés par la chimiothérapie ou en réponse à des traitements cytotoxiques remonte au début des années 1980 [129]. Grâce à ce pouvoir antiémétique, le Δ^9 -THC permet de limiter la perte de poids en stimulant l'appétit chez les patients séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine et/ou atteints d'anorexie [130]. Dans ce domaine, le Δ^9 -THC a reçu l'accord de l'« American Food and Drug Administration » pour son utilisation à visée thérapeutique dans le milieu hospitalier américain. Outre leurs effets antiémétiques, les phytocannabinoïdes présentent des potentialités anticonvulsives, davantage attribuables au cannabidiol, en particulier dans le traitement de l'épilepsie [131]. Dans le traitement de l'asthme, le Δ^9 -THC exerce un effet broncho-dilatateur (Hollister et al 1986). Utilisé en complément d'un traitement avec des broncho-dilatateurs classiques, le Δ^9 -THC présente l'avantage de réduire les effets secondaires comme la tachycardie. Dans le cas du glaucome, une réduction de la pression oculaire a été attribuée aux effets du Δ^9 -THC ; malheureusement, les effets secondaires apparaissant à l'arrêt du traitement ont affaibli sa potentialité thérapeutique (augmentation brutale de la pression oculaire, conjonctivite, ulcération rétinienne etc..) [132]. Des tests comportementaux chez la souris ont montré que le Δ^9 -THC était également capable de diminuer la température corporelle.

Le Δ^9 -THC est un agent très actif sur le système nerveux central. Des études ont montré qu'il pouvait réguler le système endocrinien en ciblant l'hippocampe. Ainsi, une administration de Δ^9 -THC stimule la sécrétion d'hormone adénocorticotrope (ACTH), d'adrénaline et de corticostérone et inhibe la sécrétion de prolactine, de gonadotrophines, d'hormone de croissance ou encore d'hormone thyroïdienne (TSH). Les cannabinoïdes sont également capables de freiner la libération d'acétylcholine [133] et de glutamate [134], et celle de noradrénaline par les cellules de l'hippocampe [135] ou de contrôler la sécrétion de celle-ci dans le système nerveux autonome [136]. Un premier intérêt thérapeutique majeur du Δ^9 -THC réside dans son puissant effet analgésique,

certes moindre que certains alcaloïdes comme la morphine, mais dont l'accoutumance se révèle moins sévère. Ainsi, l'administration médicalisée du Δ^9 -THC permet d'atténuer les douleurs liées aux maladies neurologiques comme la maladie de Hutchinson, de Parkinson ou encore le syndrome de Gilles de la Tourette [137]. Le second intérêt du Δ^9 -THC justifiant son emploi dans le cadre médical repose sur ses propriétés anti-inflammatoires remarquables. En effet, ce phytocannabinoïde module fortement les fonctions immunitaires des cellules qu'il cible, supprimant alors la production d'interféron, ou diminuant celle du Facteur Nécrosant des Tumeurs (TNF α) et augmentant la sécrétion d'interleukine 1. Les cannabinoïdes, de manière générale, sont responsables de l'augmentation des infections virales et de la diminution de la réponse inflammatoire chez l'Homme [138].

Cependant, s'agissant du système cognitif, les premières études sur les effets secondaires du Δ^9 -THC ont souligné de sévères contre-indications en tant que substance thérapeutique : perte de mémoire, confusion, altération de la perception cognitive, tachycardie...sont des effets possibles et incontrôlables de l'administration répétée de Δ^9 -THC [139]. A plus court terme, les effets psychotropes du Δ^9 -THC entraînent une euphorie, des hallucinations, de l'anxiété, la dépersonnalisation voire même la dépression. Ce large panel d'effets secondaires variables limite l'emploi généralisé de cet agent comme anti-inflammatoire et analgésique central. De plus, même si un phénomène d'accoutumance peut apparaître assez rapidement et réduire les effets indésirables, les atouts thérapeutiques peuvent en être alors également dévalués.

Les systèmes nerveux et immunitaires ne sont pas les seules cibles des cannabinoïdes. De manière plus visible, le système locomoteur, certes sous commandement neurologique, présente lui aussi des signes caractéristiques. Des études menées chez la souris ont montré que les cannabinoïdes peuvent diminuer l'activité spontanée (hypomobilité), augmenter l'anti-nociception et induire une catalepsie (suspension complète du mouvement musculaire volontaire, état locomoteur anormalement figé)).

Enfin, en tant que molécules exogènes, le catabolisme et l'élimination corporelle des phytocannabinoïdes est assez longue. Ainsi, la détoxification hépatique peut s'étendre jusqu'à trente jours, prolongeant les effets indésirables sur l'organisme. Un sevrage trop rapide peut également engendrer des problèmes d'anxiété et d'augmentation de la pression oculaire.

b. Le système cannabinoïde endogène des Vertébrés :

Au vu des nombreuses propriétés pharmacologiques du Δ^9 -THC, la Communauté Scientifique s'est longtemps interrogée sur la présence de récepteurs spécifiques aux cannabinoïdes comme

première approche explicative des effets biologiques. A ce jour, deux types de récepteurs aux cannabinoïdes ont été mis en évidence : un récepteur aux cannabinoïdes central (CB1) et un récepteur aux cannabinoïdes périphériques (CB2). De nombreuses données ont montré que les phytocannabinoïdes constituaient, une fois administrés à un organisme, des agonistes exogènes capables de déclencher des réponses biologiques. Ces observations ont suggéré l'existence de molécules endogènes de structures plus ou moins proches et se liant également à ces mêmes récepteurs. Ainsi, deux ligands endogènes ou endocannabinoïdes ont été découverts : le N-arachidonyl ethanolamide (ou anandamide, AEA) [186] et le 2-arachidonyl glycerol (2AG) [140]. Ces deux ligands, leurs voies métaboliques d'anabolisme et de catabolisme ainsi que le système de transport et de transduction constituent le système endocannabinoïde.

i. Les récepteurs aux cannabinoïdes CB1:

L'hypothèse selon laquelle les cannabinoïdes agiraient via des récepteurs spécifiques et non par perturbation de la membrane plasmique a été confirmée dès le début des années 1980 par le groupe d'Howlett qui démontra que les cannabinoïdes étaient capables d'inhiber la synthèse d'AMP cyclique dans des neuroblastomes N18TG2 [141]. Le développement d'analogues synthétiques des cannabinoïdes a permis de renforcer cette découverte en montrant que ces molécules inhibaient également l'adénylate cyclase responsable de la production d'AMPc mais aussi qu'ils se liaient à des sites membranaires spécifiques. De plus, les distributions membranaire et cellulaire de ces sites de liaison coïncidaient avec les propriétés pharmacologiques des cannabinoïdes [186, 188, 189]. L'utilisation de la toxine pertussique suggéra l'implication des protéines Gi, couplées à des récepteurs membranaires. La preuve incontestable de l'existence d'un récepteur aux cannabinoïdes fut finalement apportée par le clonage moléculaire de la séquence codant un récepteur adéquat localisé dans le cerveau de rat [142].

Ainsi, le récepteur CB1 de rat a été cloné de manière fortuite par Matsuda et al. en criblant une banque d'ADN complémentaire (ADNc) de cortex cérébral de rat à l'aide d'une sonde dirigée contre le second domaine transmembranaire du récepteur de la substance P bovine. La localisation de ce récepteur orphelin correspondait à la localisation des sites de liaison du Δ^9 -THC. Le clonage de cet ADN de 1422 paires de base (pb) a confirmé que seuls les cannabinoïdes étaient capables de se lier à ce récepteur [142]. Le clonage des récepteurs CB1 humain, de souris et de chat (Genbank : U94342) a ensuite été réalisé. La taille des ADNc est respectivement de 1755, 1654, 1419 paires de bases. En termes de similitude, la séquence nucléotidique de souris partage 91% d'homologie avec celle du rat contre 96% avec la séquence humaine. Chez le poisson *Fugu rubripes*, deux variantes du récepteur CB1 (CB1A, 1986pb et CB1B, 1907pb) ont été identifiées et partagent une large expression dans le

cerveau . Plus tard, des études ont montré, en pharmacologie ou grâce à des lignées de souris invalidées génétiquement pour le gène du récepteur CB1 [143], qu'il existait au moins un autre récepteur CB chez la souris. Deux récepteurs CB1, CB1A et CB1B, ont également été identifiés chez l'Homme dans la décennie 1990 [144]. Les récepteurs de type 1A résulteraient d'un épissage alternatif et des preuves de l'existence *in vivo* de ces récepteurs tronqués du côté extracellulaire ont été apportées par les travaux de Xiao et al. [145].

La localisation chromosomique du récepteur CB1 se situe sur le chromosome 6 dans la région 6q14-q15 chez l'Homme, sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 9 chez le bovin . Chez l'Homme, la séquence codante du récepteur CB1 est contenue dans un seul exon. D'un point de vue structural, les récepteurs CB1 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires (7 hélices α , 3 boucles extracellulaires et 3 intracellulaires), couplés à des protéines G présentant de nombreux sites de glycosylation [146] (Figure 8).

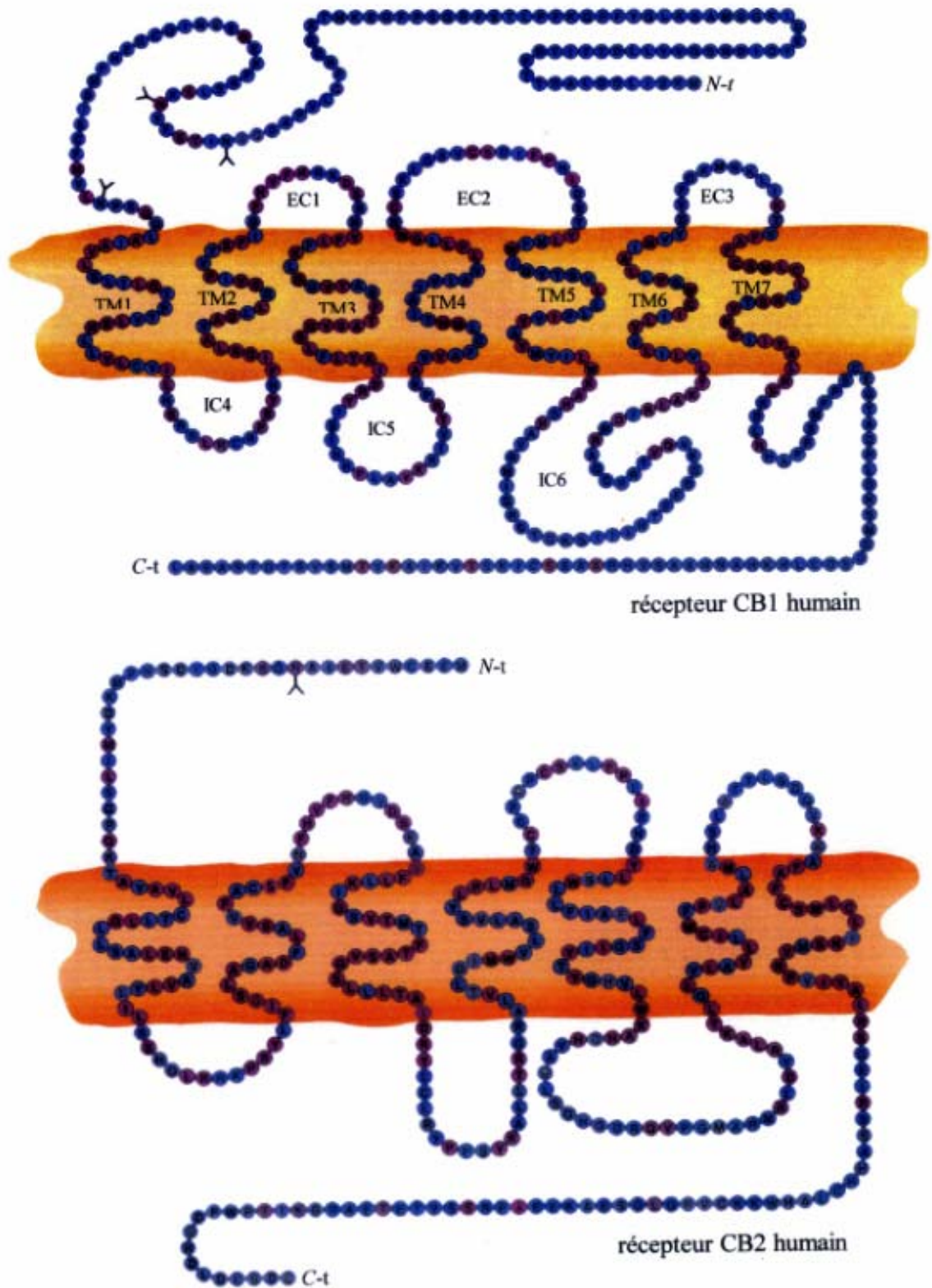


Figure 8 : Représentation schématique des récepteurs aux cannabinoïdes CB1 & CB2 humains

Le récepteur CB1 humain est composé de 472 acides aminés (AA). Sa taille diffère de celles des récepteurs CB1 de rat et de souris (473 AA) par la présence d'un AA supplémentaire en position N-terminale (Figure 5). Ce récepteur CB1 humain partage respectivement 97.3%, 99%, 96%, 72.2%, 59%, 90% et 90% d'homologie avec les récepteurs CB1 de rat, de souris, de chat, de type A et type B du poisson, d'oiseau et d'amphibien (Figure 4). Cette forte homologie reflète une très grande conservation des récepteurs CB1 au cours de l'évolution.

Les récepteurs CB1 sont capables de reconnaître trois types de ligands : les cannabinoïdes, les aminoalkylindoles et les eicosanoïdes. Des modulateurs allostériques tels que des cations monovalents, principalement Na^+ , K^+ et Li^+ , sont susceptibles de moduler la liaison du ligand au récepteur CB1. Le domaine extracellulaire 2 et les domaines transmembranaires 4 et 5 contiennent des résidus aminés indispensables à cette liaison. Les récepteurs adoptent plusieurs conformations différentes pour chacun des trois types de ligands. Ce changement de conformation permet d'activer des protéines G de type $G_{i/o}$. Les 2^o et 7^o domaines transmembranaires semblent indispensables au changement de conformation du récepteur et la partie C-terminale constitue l'extrémité qui est davantage impliquée dans l'interaction du récepteur CB1 avec les protéines G. Une fois lié/activé par son ligand, le récepteur CB1 est capable d'interagir avec les protéines G afin d'enclencher diverses phénomènes biologiques, ainsi :

- L'une des premières voies transductionnelles caractérisée a été l'inhibition de l'adénylate cyclase, enzyme membranaire chargée de produire de l'AMPc à partir d'Adénosine triphosphate. L'AMPc est un messenger secondaire capable d'activer des enzymes intracellulaires telles que la protéine kinase A, chargée de réguler des réponses biologiques par activation de récepteurs, d'enzymes ou de sites transcriptionnels dans la cellule [141]
- L'inhibition des canaux calciques de types N et Q qui diminuent à leur tour le taux de Ca^{2+} intracellulaire et la stimulation des canaux potassiques [147]. L'inhibition des canaux calciques de type N conduit à la diminution de la libération cérébrale des neurotransmetteurs au niveau des jonctions chimiques inter-neuronales.

La présence de sites de phosphorylation sur la partie C-terminale autorise l'activation de protéines kinases telles que les MAP kinases permettant ainsi au récepteur CB1 de contrôler plusieurs voies biologiques.

ii. Localisation des récepteurs CB1 dans le système nerveux :

Les premières études qui ont fait état de la présence des récepteurs CB1 ont été réalisées au niveau du cerveau [186, 188]. Des études d'autoradiographie à l'aide de ligands radioactifs et d'hybridation *in situ* à l'aide des sondes moléculaires ont confirmé la localisation cérébrale de ces récepteurs. En effet, des sites de liaisons spécifiques ont été détectés, chez le rat, au niveau du cortex, du cervelet, du striatum et aussi de l'hippocampe (région qui est le siège de la mémoire et du contrôle des humeurs et des comportements). La couche moléculaire du cervelet, certaines régions de l'hippocampe ainsi que les noyaux de la base du cerveau (noyau caudé-putamen latéral, *globus pallidus*, noyau entopédonculaire et partie réticulée de la substance noire) contiennent les densités les plus élevées en récepteur CB1. Dans le système nerveux, ce récepteur est essentiellement localisé dans le *globus pallidus* (au niveau présynaptique), le noyau entopédonculaire et la substance noire non réticulée alors que sa densité est plus modérée dans le cortex et encore plus éparse dans l'hypothalamus, l'amygdale, le tronc cérébral et la moëlle épinière. La présence d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) dans ces mêmes régions a également été démontrée par l'équipe de Matsuda [148]. Le tronc cérébral, la medulla et le thalamus sont des régions où les récepteurs CB1 sont présents en faible quantité et les couches internes du bulbe olfactif présentent également un marquage modéré de ces récepteurs.

La présence des récepteurs CB1 ne se limite pas aux neurones du système nerveux central. Ces récepteurs sont aussi présents dans les neurones périphériques comme ceux innervant les muscles lisses de la paroi intestinale. Des ARNm codant pour ces récepteurs ont également été identifiés dans les testicules de rat et dans les spermatozoïdes humains [197]. L'épithélium vasculaire contient aussi des récepteurs CB1. Et des quantités plus faibles en transcrits ont été mises en évidence dans la rate, les amygdales et les leucocytes humains [144].

iii. Principales fonctions biologiques des récepteurs CB1 et quelques exemples d'intérêts thérapeutiques:

Les premières tentatives d'élucidations des effets biologiques induits par les phytocannabinoïdes ont concerné l'activation du récepteur CB1 dans les différentes aires cérébrales. Ainsi, le fait de voir majoritairement exprimé ce récepteur au niveau de la couche moléculaire du cervelet est en accord avec la perturbation des fonctions motrices lorsque cette aire est stimulée par du Δ^9 -THC. De la même manière, des études portant sur les effets biologiques secondaires de ce cannabinoïde ont montré qu'il pouvait causer une hypothermie après activation des récepteurs CB1 dans l'amygdale. Quant aux effets anti-nociceptifs des cannabinoïdes, ils seraient dus à la présence de récepteurs CB1 au niveau des terminaisons axonales des neurones de la moëlle épinière.

La présence de faibles quantités, voire l'absence totale de récepteurs CB1 dans certaines parties du cerveau comme le tronc cérébral, la medulla et le thalamus, se traduit par une absence d'effets secondaires lors d'un usage abusif du cannabis . Les travaux de Croci et al. ont montré que l'activation des CB1 par les cannabinoïdes au niveau des rameaux innervant les muscles lisses intestinaux était responsable de l'effet anti-émétique [198]. L'étude des effets biologiques secondaires des phytocannabinoïdes a initié et encouragé les recherches sur la compréhension des rôles biologiques joués par le récepteur CB1 sous l'action des agonistes endogènes tels que l'AEA ou le 2-AG. Dans ce sens, des travaux *in vitro* sur des astrocytes de rat ont permis de comprendre que l'activation des récepteurs CB1 dans ces cellules stimule la voie ERK-PKB tout comme celle aboutissant à l'activation d'une multitude de facteurs de transcription. L'activation de l'ensemble de ces voies de transduction conduit à une modulation dans l'expression des gènes influençant l'état de différenciation des astrocytes ainsi que leur survie. En accord avec le rôle de soutien et de nutrition pour les neurones, il a été démontré que les astrocytes hydrolysaient les glucides via l'activation des CB1 à la jonction des artères cérébrales et des neurones [149]. Les travaux de Costa et Coleoni ont également appuyé cette observation en montrant que le Δ^9 -THC augmente le métabolisme énergétique dans le cerveau du rat [150]. . Des travaux d'Eljaschewitsch (**Figure 9**) portant sur les cellules microgliales ont montré que l'activation des récepteurs aux cannabinoïdes par l'AEA pouvait moduler des voies de transduction aboutissant à l'induction des MAP kinases 1 (MAPK-1) et de bloquer ainsi l'expression de gènes pro-inflammatoires induite par une infection par des bactéries à GRAM – [151].

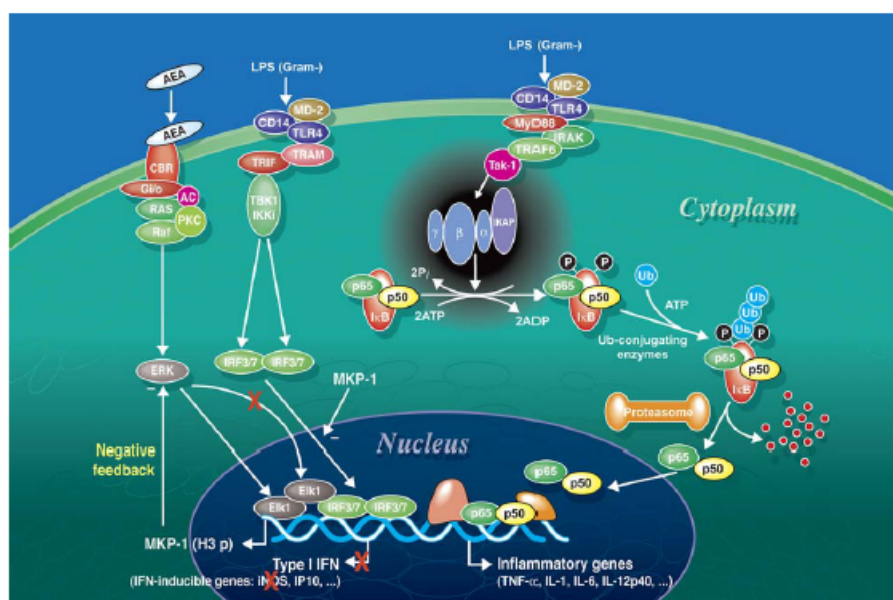


Figure 9 : Illustration de l'interaction anti-inflammatoire hypothétique mise en jeu entre la voie des récepteurs aux cannabinoïdes et l'inhibition de la voie de transduction engagée par la liaison du Lipopolysaccharide (LPS) au Toll-like receptor 4 (TLR4) (d'après Rivest et al. 2006[151])

Les phyto et endocannabinoïdes se sont révélés très efficaces (parfois même plus que les opiacés) dans des modèles animaux de douleurs aiguës, inflammatoires, neuropathiques et d'hyperalgie. Un pouvoir anti-nociceptif des cannabinoïdes chez l'Homme, via l'activation des CB1, a également été démontré peu de temps après la découverte des implications biologiques du système endocannabinoïde. Depuis longtemps utilisés dans le traitement des glaucomes, les cannabinoïdes causent une vasodilatation et une réduction de la pression oculaire en rapport avec la présence d'un système endocannabinoïde dans l'œil, découvert en 2002. Par ailleurs, les propriétés antiémétiques et oréxigéniques bien connues des cannabinoïdes expliquent les résultats encourageants qui ont été obtenus dans le traitement des effets secondaires particulièrement dévastateurs des chimiothérapies anticancéreuses et les pertes de poids accompagnant une infection par le VIH. Le ciblage des récepteurs CB1 impliqués, entre autres, dans le contrôle de fonctions neurologiques, constitue un moyen efficace pour diminuer les symptômes d'hyperactivité dopaminergique liés à de nombreuses maladies neurodégénératives. De ce fait, la stimulation des récepteurs CB1 présenterait un intérêt thérapeutique dans le traitement des tics accompagnant le syndrome de Gilles de la Tourette, dans la maladie de Parkinson et dans certaines autres formes de tremblements. Notons enfin des résultats significatifs obtenus dans le traitement des tremblements et spasmes liés à la sclérose en plaques ainsi que dans un modèle animal auto-immun mimant cette maladie. Sachant que les accidents cérébraux, qu'ils soient de nature traumatique ou ischémique, ne possèdent pas de traitement appropriés et ciblés, une stratégie neuroprotectrice qui consisterait à contrer le principal effet secondaire inhérent à la survenue d'une telle pathologie cérébrale, à savoir le déclenchement de l'excitotoxicité glutamatergique, pourrait être proposée. La capacité des phyto et endocannabinoïdes à réduire la libération de glutamate (acide aminé excitateur) jouerait un rôle important dans le puissant pouvoir neuroprotecteur mis en évidence chez différents modèles animaux.

Enfin, le traitement des gliomes par les cannabinoïdes constitue l'une des potentialités thérapeutiques les plus prometteuses d'autant plus que les gliomes sont des maladies au pronostic très réservé. En effet, les cannabinoïdes participent au contrôle du devenir cellulaire, tant dans la croissance que dans la mort, via l'induction de la synthèse de céramides. Des concentrations élevées et soutenues en céramides induisent une apoptose cellulaire alors que des concentrations élevées mais brèves favorisent au contraire la régulation des fonctions métaboliques. Or, dans plusieurs types de gliomes, l'activation des récepteurs CB conduit à des concentrations chroniquement élevées de céramides et donc à l'apoptose des cellules tumorales. Cet effet, spécifique aux gliomes, n'entraîne pas d'apoptose marquée des cellules saines car une activation des récepteurs CB

astrocytaires ou neuronaux, même lorsqu'elle est soutenue et induisant des élévations aiguës (mais non chroniques) de céramides n'ont qu'un très faible effet délétère.

iv. Les récepteurs aux cannabinoïdes CB2:

Découvert au début des années 90 par l'équipe de Munro et al., le récepteur CB2 a été cloné pour la première fois chez l'Homme à partir d'une banque d'ADNc de promyélocytes. La taille de ce récepteur a été estimée à 1790 pb. Ce fut seulement quelques années plus tard que ce récepteur fut cloné chez la souris et chez le rat. Leurs ADNc respectifs ont une taille de 1753 et 1099 pb. Le gène du récepteur CB2 est localisé sur le chromosome 4 chez la souris et sur le chromosome 1, plus précisément dans la région 1p36 chez l'Homme.

Tout comme les CB1, les CB2 sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires domaines extrêmement conservés entre les récepteurs CB2 mais aussi entre les récepteurs CB1 et CB2. A titre d'exemple, il existe une homologie de 35 à 82% entre les domaines transmembranaires des récepteurs CB1 et CB2 humains (**Figure 10**). Les tailles des récepteurs CB2 humain et de rat font 360 AA et diffèrent du CB2 murin (347 AA) par l'addition de 13 AA en position C-terminale intracellulaire (Figure 8). La comparaison des séquences des récepteurs CB2, après alignement de type *Blastp*, permet de déduire une homologie en séquence protéique avoisinant les 80% entre les CB2 humain et murin ainsi qu'entre les CB2 humain et de rat.

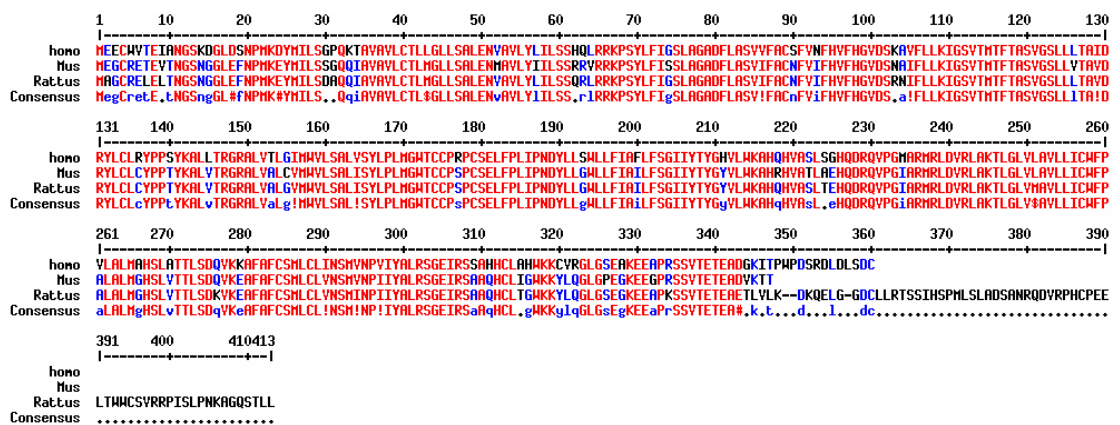


FIGURE 10 : Alignements *blastp* entre les séquences protéiques des récepteurs CB2 humain, murin et de rat (d'après le programme d'alignements multiples *multAlin*)

Contrairement aux récepteurs CB1, les mécanismes d'actions intracellulaires déclenchées par les récepteurs CB2 restent, à ce jour, encore mal connus et sujets à débat. Cependant, ces récepteurs sont également couplés à des protéines G inhibitrices (Gi) dont l'activation conduit à l'inhibition de la synthèse d'AMPc. Il a également été démontré que ces récepteurs CB2 activent les MAP kinases

ainsi que certains facteurs de transcription. L'inhibition de la transcription des gènes codant la nitric oxide synthase inductible (iNOS) ayant pour conséquence l'inhibition du monoxyde d'azote (NO) a permis de découvrir l'un des tous premiers rôles attribués au récepteur CB2.

Ce récepteur a une répartition tissulaire beaucoup plus restreinte que le CB1, en accord avec des fonctions biologiques particulières. Il fut découvert et cloné dans des promyélocytes humains HL-60. Le taux de transcrits codant le CB2 est très abondant dans les cellules différenciées en macrophages et en granulocytes. Les ARNm codant ce récepteur sont également fortement exprimés dans les organes à fonction immunitaire tels que la rate ou les amygdales. Le taux d'expression des récepteurs CB2 à la surface des leucocytes humains serait 10 à 100 fois supérieur à celui des CB1. Aussi, les cellules qui contiennent le taux le plus élevé en ARNm codant pour CB2 sont, par ordre décroissant, les lymphocytes B, les cellules Natural Killer (NK), les monocytes, les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes T8 et enfin les lymphocytes T4. La forte expression des récepteurs CB2 au niveau des cellules du système immunitaire explique les effets immunomodulateurs des cannabinoïdes sur ce système. Ils sont en général responsables de l'augmentation des infections virales et de la diminution de la réponse inflammatoire. Klein et al ont démontré que les cannabinoïdes réduisent la prolifération des lymphocytes T8 et des lymphocytes B, la synthèse des immunoglobulines G ainsi que l'activité de phagocytose des macrophages.

Dans le système nerveux des Vertébrés, l'activation des récepteurs CB2 par les cannabinoïdes module les fonctions immunitaires des cellules gliales et microgliales, en particulier dans le système nerveux central où ces dernières sont des cellules immunitaires innées. Les cellules microgliales forment la première ligne de défense dans les systèmes nerveux central et périphérique, dès lors qu'une lésion nerveuse apparaît. Dans pareils cas, les cellules microgliales passent par plusieurs étapes d'activation qui consistent en une augmentation de l'expression de marqueurs microgliaux de surface et cytosoliques, suivie d'une production accrue de facteurs pro-inflammatoires (cytokines et chimiokines, NO, prostaglandines...), de même qu'un changement morphologique des cellules, une activation de leurs propriétés phagocytaires ainsi que leur migration et leur prolifération cellulaires [152].

Les travaux de Ashton et ceux de Nunez ont apporté la preuve de l'expression des récepteurs CB2 dans la glie humaine ainsi que dans celle du rat, et ce, dans des conditions physiologiques [153]. Les équipes de Sheng et de Ramirez ont, quant à elles, démontré l'existence d'une surexpression des CB2 à la surface de la glie en conséquence d'une inflammation cérébrale. L'activation *in vitro* des CB2 réduit à la fois la production de TNF α et celle du NO et présente ainsi des effets neuroprotecteurs contre l'action délétère des cellules microgliales activées. Une des voies de régulation possible conduisant à l'inhibition des processus pro-inflammatoires dans le cerveau par l'activation des

récepteurs CB2 a récemment été décrite : l'augmentation des phosphatase MKP-3, suite à l'activation des CB2, entraînerait la déphosphorylation des kinases ERK, ce qui induirait une inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires .

c. Les endocannabinoïdes majeurs :

i. L'anandamide :

La découverte des récepteurs CB1 a suggéré la présence de composés endogènes présents dans le cerveau et capables d'activer ces récepteurs. De plus, le fait que ces récepteurs soient capables de reconnaître le Δ^9 -THC (substance lipophile) a suggéré que les composés endogènes en question devaient avoir des propriétés chimiques similaires. En se basant sur cette hypothèse, Devane *et al.* ont étudié la capacité des composés lipophiles de cerveaux de porc à se lier aux récepteurs CB1. En 1992, ils isolèrent pour la première fois, par de nombreuses étapes de chromatographie, un composé lipidique capable de déplacer la liaison d'un agoniste radioactif (le HU-243 tritié) des récepteurs CB1, tout en ayant des effets cannabimimétiques très proches du Δ^9 -THC . La structure de la molécule fut ensuite déterminée à l'aide de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-El MS), de la résonance magnétique nucléaire (RMN), puis confirmée par synthèse chimique. Ce premier endocannabinoïde s'est avéré être de nature lipidique et complètement différente du Δ^9 -THC puisqu'il s'agit d'un éicosanoïde, famille de molécules dérivées de l'acide arachidonique (acide gras à 20 atomes de carbone et 4 insaturations), tout comme les médiateurs locaux, prostaglandines, leucotriènes et thromboxanes (Cf chapitre 1). Sur le plan structural, la présence d'une tête polaire (ethanolamine) liée à une queue lipophile (acide arachidonique) a orienté le classement de cet endocannabinoïde dans la famille des N-acetyl-ethanolamides (NAEs). Le nom d'anandamide fut donné à cette nouvelle molécule, du sanscrit « ananda » désignant la « félicité », probablement en lien avec les propriétés récréatives de cette molécule, bien que sa dénomination chimique soit le cis-5,8,11,14-eicosatetraenoyl-N-(2-hydroxy-éthyle)-amine ou plus simplement, l'arachidonoyl-éthanolamine (AEA) (Figure 11).

L'affinité de l'AEA est de 420 ± 120 nM pour les récepteurs CB1 et de 1760 ± 360 nM pour les CB2 . Deux autres composés possédant des structures et des affinités pour les CB1 proches de l'anandamide ont été identifiés peu après. Il s'agit du 7, 10, 13,16-docosatetraenoyléthanolamide et de l'homo- γ -linolényléthanolamine que l'on peut aussi regrouper sous le nom d'anandamide mais présents à des concentrations plus faibles.

Des quantifications de l'anandamide ont été réalisées dans les cerveaux ovin et humain. L'équipe de Di Marzo a également ciblé la production d'anandamide dans le cerveau au niveau des neurones et des astrocytes. La même équipe a établi la distribution cérébrale prédominante de l'AEA dans l'hippocampe, le striatum, le thalamus et le cervelet. D'autres organes renferment également de l'AEA : Il a été ainsi montré que l'utérus de souris était capable d'augmenter son taux d'anandamide lorsqu'il était réceptif à l'implantation embryonnaire par une signalisation cellulaire mettant en jeu l'AEA et les récepteurs CB1. En outre, Whang et al. ont démontré qu'une concentration faible en AEA induisait l'activation du blastocyste en stimulant la voie des MAP kinases. A l'opposé, une forte concentration en AEA inhibe cette étape nécessaire à l'implantation de l'embryon par blocage, via CB1, des signaux calciques. Les reins, les testicules, la peau ou encore le sang, renferment aussi de l'anandamide à des teneurs variables.

ii. Le 2-arachidonyleglycérol :

La découverte des récepteurs aux cannabinoïdes de type 2 a conduit certaines équipes à se demander si ce récepteur possédait également un ligand endogène spécifique. Trois années après la découverte de l'anandamide, un second endocannabinoïde fut isolé par deux équipes différentes, l'une dans l'intestin de chien, l'autre dans le cerveau de rat. De la même manière que pour l'anandamide, la nature chimique du 2-arachidonyleglycérol (2-AG, **Figure 11**) a été élucidée par spectrométrie de masse. Ce composé appartient à la famille des monoacylglycérol, tout comme les deux autres analogues isolés par Mechoulam et al. à partir de la fraction active aux tests de fixation aux récepteurs cannabinoïdes : le 2-palmitoylglycérol et le 2-linoléoylglycérol (Figure 11).

L'affinité du 2-AG est de 472 ± 55 nM pour le récepteur CB1 et de 1400 ± 172 nM pour le récepteur CB2. La quantité de 2-AG est très largement supérieure à celle de l'anandamide dans le cerveau de rat (environ plus de 200 fois). Tout comme l'anandamide, le 2-arachidonyleglycérol est majoritairement représenté dans le tronc cérébral, l'hippocampe et le striatum. Dans les autres tissus où ces deux endocannabinoïdes sont présents, le taux de 2-AG a toujours été trouvé supérieur à celui de l'anandamide. Le 2-AG a été retrouvé dans l'intestin, dans le pancréas et dans la rate de chien . Il est également présent dans les neuroblastes de souris et peut être produit par les macrophages .

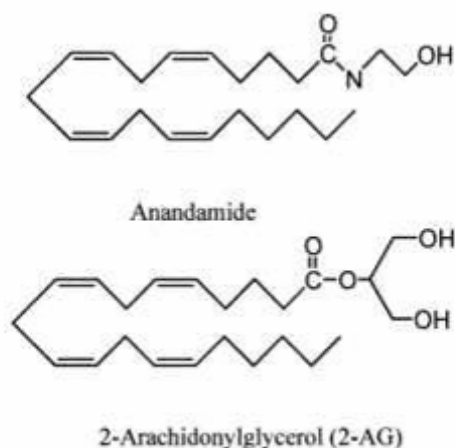


Figure 11 : La molécule d'anandamide ou arachidonoyl-ethanolamide (AEA) et 2-AG

6. La biosynthèse des endocannabinoïdes (Figure 12):

a. Synthèse de l'anandamide :

La première étude portant sur les voies de biosynthèse de l'AEA s'appuyait sur le fait que l'acide arachidonique et l'éthanolamine était capable de se condenser grâce à une anandamide synthase détectée dans des fractions membranaires de cerveau de mammifère et de testicules de rat. Cette enzyme présentait une activité maximale à pH basique (8.5-10) et ne nécessitait pas la présence d'ATP ni de cofacteur tel que le coenzyme A. De plus, une co-élution de cette anandamide synthase avec une anandamide amidohydrolase a été observée, ces deux enzymes partageant les mêmes caractéristiques de sensibilité au pH, à la température et aux inhibiteurs. Ces études suggéraient que l'anandamide synthase était en réalité une anandamide amidohydrolase appelée FAAH (Fatty Acid AmidoHydrolase) et que celle-ci était seulement capable de condenser l'acide arachidonique et l'éthanolamine *in vitro* [154]. Une autre voie de biosynthèse (**Figure 12**) fut proposée sur la base des travaux de Shimd. L'AEA serait libérée par hydrolyse d'un précurseur, le N-arachidonoyl-phosphatidyléthanolamide (NarPE), par action d'une phospholipase D spécifique. Le NarPE dériverait des phospholipides membranaires grâce à l'intervention d'une acyle transférase. Cette voie de biosynthèse à partir du remodelage des phospholipides membranaires s'avère être la voie majoritaire de synthèse de l'AEA par les cellules qui en produisent.

L'acyle transférase ou trans-acylase est l'enzyme qui catalyse le transfert d'un acide arachidonique en position sn-1 du 1,2-sn-di-arachidonoyl-phosphatidylcholine sur une phosphatidyléthanolamine pour donner le NarPE. Cette enzyme, calcium-dépendante, possède une

activité maximale à pH 7 et son contrôle se fait par l'AMPc et les activateurs de l'adénylate cyclase tels que l'ATP [155, 156]. Le NarPE est ensuite hydrolysée par une N-acyl-phosphatidyl-éthanolamine phospholipase D pour libérer l'AEA. La formation de cette molécule est extemporanée et se réalise lors d'une stimulation par des agents dépolarisants comme l'ionomycine (favorisant l'entrée du calcium dans les cellules par activation des canaux calciques) et le glutamate [156]. Dans le cas du neurone, sa dépolarisation entraîne l'entrée de calcium dans la cellule et l'activation des enzymes calcium-dépendantes. Cependant, Katayama et al. ont construit et purifié une FAAH recombinante qui catalyse *in vitro*, à la fois l'hydrolyse de l'anandamide mais aussi, en moindre mesure, la réaction de synthèse inverse qui permet la réassociation des produits de dégradation. L'équilibre entre la dégradation et la synthèse inverse a été obtenu en présence d'un excès d'enzyme [157].

La biosynthèse d'anandamide s'accompagne aussi de la synthèse de nombreuses autres N-acyls-éthanolamines (NAEs) mais dépourvues d'activité cannabimimétique telles que le N-stéaroyléthanolamide, le N-palmythoyléthanolamide, le N-oleoyléthanolamide et le N-linololéoyléthanolamide ou encore le N-docosahexaenoyléthanolamide. Ces différentes NAEs, en quantité supérieure comparée à l'AEA, sont également des substrats de la FAAH et du transporteur des cannabinoïdes, ce qui permettrait de prolonger les effets de l'anandamide *in vivo*, en entrant en compétition avec celle-ci vis-à-vis de la FAAH et du transporteur.

b. Synthèse du 2-arachidonoylglycérol :

La synthèse du 2-AG (**Figure 12**) montre des points communs avec la voie de biosynthèse de l'AEA [158]. En effet, lors de la première phase de la biosynthèse de l'AEA, le sn-1-lyso-2-arachidonoylphosphatidylcholine produit constitue l'un des précurseurs du 2-AG. Celui-ci libère le 2-AG après hydrolyse par une lysophospholipase C [159]. Lors de la seconde phase de la biosynthèse de l'AEA, la N-acyl-phosphatidyl-éthanolamine phospholipase D libère l'AEA mais également un acide phosphatidique. Celui-ci peut également provenir de la synthèse *de novo* ou du remodelage des phospholipides membranaires [128]. Ce lipide est ensuite modifié par un acide phosphatidique hydrolase pour donner un sn-2-arachidonoyl-glycerol, second précurseur du 2-AG. Ce diacylglycérol peut aussi bien être produit à partir des phosphoinositides après action d'une phosphoinositide phospholipase C spécifique. Ce second précurseur libère alors le 2-AG grâce au travail d'une sn-1-arachidonate diacylglycérol lipase (Stella et al. 1997).

La biosynthèse du 2-AG, dépendante du calcium, est aussi sensible à l'ionomycine et aux lipopolysaccharides bactériens [160]. Accompagnant la biosynthèse du 2-AG, d'autres monoacylglycérols sans activité cannabimimétique ont été retrouvés; il s'agit du mono-

palmytoylglycérol et du mono-oléoylglycérol. Contrairement à l'AEA, le 2-AG est le composé majoritaire de sa famille.

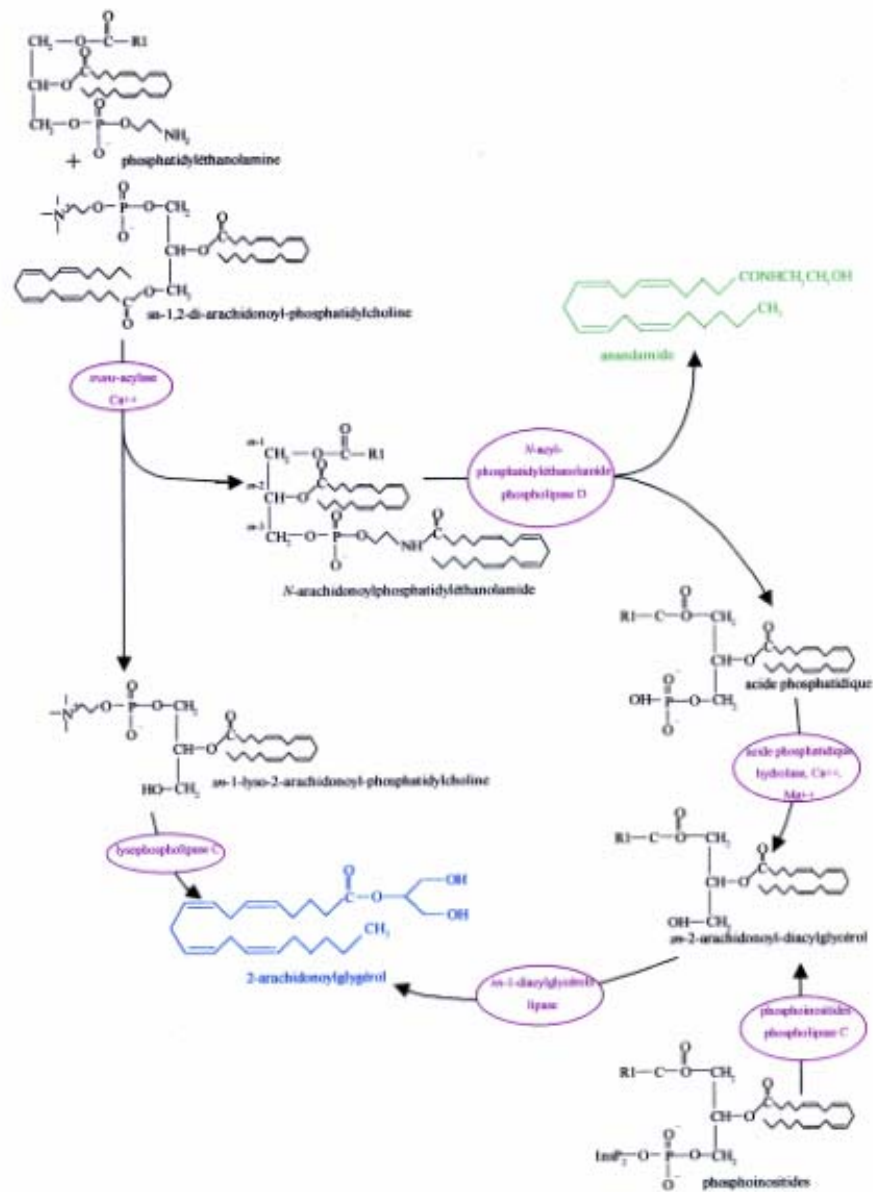


Figure 12 : voie biosynthèse de l'AEA et du 2-AG (d'après Di Marzo et al. 1999[158])

Les endocannabinoïdes sont, comme nous l'avons vu, des molécules de nature lipidique capables de moduler des processus biologiques complexes par le biais de leurs récepteurs aux cannabinoïdes et ce, dans différents tissus. Ils sont également décrits et admis comme des neurotransmetteurs locaux [154], synthétisés dans la fente synaptique après qu'un stimulus ait induit la dépolarisation de la membrane plasmique. Une fois qu'ils ont conduit l'influx nerveux, ces endocannabinoïdes sont réabsorbés par les neurones avant d'être dégradés. A l'état basal, les taux d'AEA et de 2-AG sont comparables à ceux des neurotransmetteurs classiques. Toutefois, il existe des

différences avec les neurotransmetteurs classiques dans le sens où les endocannabinoïdes ne sont pas stockés dans l'élément pré-synaptique, mais exportés hors de la cellule par diffusion facilitée grâce à un transporteur membranaire assurant aussi leur re-capture avant leur destruction. Une autre différence majeure avec les neurotransmetteurs classiques est que la biosynthèse des endocannabinoïdes s'accompagne d'autres molécules apparentées mais sans effet.

c. Le catabolisme des endocannabinoïdes :

i. Catabolisme de l'anandamide :

Une multitude de travaux portant sur les mécanismes d'hydrolyse de l'AEA ont été menés sur une grande variété de tissus et de cellules [161, 162]. Il a ainsi été établi que les produits de dégradation de l'AEA sont composés d'acide arachidonique et d'éthanolamine (**Figure 13**). Cette voie catabolique est aussi reconnue comme axe majeur pour l'élimination de l'AEA dans les tissus de mammifères. L'activité enzymatique catalysant l'hydrolyse des N-acyléthanolamines en acides gras et en éthanolamines a été étudiée par Schmid et al. [163]. Peu de temps après la découverte de l'AEA, l'enzyme responsable de son hydrolyse fut révélée par les travaux de Deutsch et Chin en 1993 [164] à partir de modèles cellulaires de neuroblastomes murins N18TG2, de cellules gliales de rat C6 et de cellules de carcinome de poumon humain H358. Cette enzyme est inhibée par un traitement au phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), inhibiteur à sérine estérase. Ces mêmes auteurs l'ont appelée: anandamide amidase ou amidohydrolase. Cette enzyme fut ensuite partiellement purifiée des travaux ont porté sur la compréhension de ses fonctions biologiques dans le système nerveux central [161, 165, 166]. Plus tard, Cravatt et al. ont cloné une enzyme responsable de l'hydrolyse d'un autre lipide produit dans le cerveau, l'oléamide, qui favorise le sommeil [167]. Il s'est avéré que cette enzyme était également capable de cliver l'AEA et d'autres N-acétyléthanolamines. Ces auteurs ont alors appelé cette enzyme « Fatty Acid Amide Hydrolase ou FAAH ». A l'heure actuelle, toutes les équipes s'accordent à penser que la N-acétyléthanolamines hydrolase, l'anandamide amidase/anandamide amidohydrolase et la FAAH forment une seule et même enzyme. Cette FAAH, rencontrée dans le foie, le cerveau et les testicules de mammifères est une protéine de 579 acides aminés pour un poids moléculaire avoisinant les 63 kDa ; aucune trace de son existence n'a été décelée dans les muscles et le cœur de rat. Son pH optimum d'activité est basique (8.5-10). Enfin, une autre voie métabolique de catabolisme de l'AEA passe pas l'oxygénation enzymatique. Des enzymes comme le cytochrome P450 ou encore les lipoxygénases sont capables de métaboliser l'AEA pour donner des dérivés lipidiques. L'AEA est également un substrat possible de la cyclooxygénase-2 donnant la prostaglandine E2 [168].

ii. Catabolisme du 2-arachidonylglycérol :

Le mécanisme par lequel le 2-AG est métabolisé passe par l'action d'une enzyme, la monoacylglycérol lipase qui est aussi capable de cliver d'autres monoacylglycérols (**Figure 13**). Konrad et al. ont démontré que le 2-AG était catabolisé dans des homogénats porcins et Goparaju et al. ont confirmé l'existence d'une élimination du 2-AG dans le cerveau de porc par la mise en évidence d'une monoacylglycérol lipase en activité. Une telle activité fut décrite dans des macrophages et l'enzyme partiellement caractérisée. Des études approfondies menées par Horrocks et al. ont permis d'élucider les propriétés de la monoacylglycérol lipase dans le cerveau. D'autre part, Di Marzo et al. ainsi que Goparaju et al. ont apporté la preuve que la FAAH est également capable de métaboliser le 2-AG, en présence de monoacylglycérol lipase et sous certaines conditions. Citons également la voie de reconversion du 2-AG en acide 2-arachidonyl lysophosphatidique (**Figure 12**) par action d'une kinase intracellulaire. Cette voie est probablement importante pour recycler le 2-AG sous forme de phospholipides membranaires, comme le phosphatidyl inositol. Enfin, une voie métabolique supplémentaire ciblant le 2-AG consiste en une oxygénation enzymatique par action de la cyclooxygénase-2 ou de la 12-lipoxygénase, catalysant alors la formation de prostaglandines glycéryl ester et de dérivés de l'acide 12(S)-hydroperoxyeicosatetraénoïque glycéryl ester. Les fonctions distinctes du 2-AG, physiologiques ou au contraire pathologiques, soulèvent encore des interrogations à l'heure actuelle.

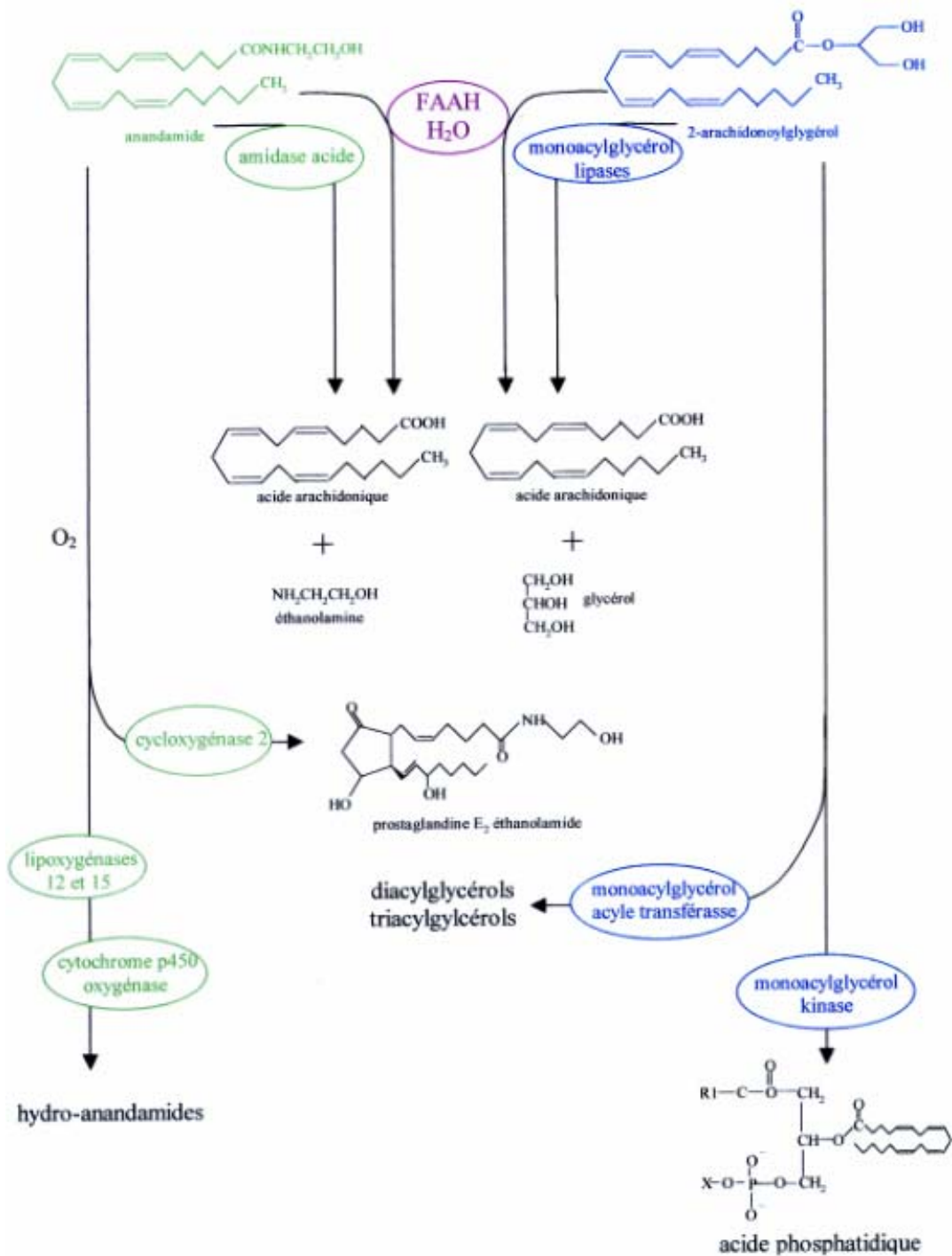


Figure 13 : Voies de dégradation de l'anandamide et du 2-AG chez les Vertébrés

7. Le système cannabinoïde endogène des Invertébrés :

Dans le règne des Invertébrés, chez l'aplysie (*Aplysia californica*), mollusque gastéropode marin, le Δ^9 -THC provoque une diminution de l'excitabilité des cellules nerveuses du ganglion pariéto-viscéral isolé et maintenu en solution saline [169]. Plusieurs travaux ont également fait état de la présence de nombreuses composantes du système endocannabinoïde voire même, dans certains cas, la mise en évidence d'un système complet chez des Invertébrés comme l'oursin, la moule, l'hydre ou encore la sangsue [11].

a. L'oursin :

Des travaux réalisés par l'équipe de Schuel et al. ont démontré que les cannabinoïdes de type Δ^9 -THC, cannabinoïde et cannabidiol diminuent de manière réversible la fertilité des spermatozoïdes des oursins *Strongylocentrotus purpuratus* [170]. En effet, ces cannabinoïdes activent la phospholipase A2 et l'ouverture des canaux calciques, potassiques et sodiques [171] ; ceci modifie la composition lipidique de la membrane plasmique et perturbe la réaction acrosomiale provoquée par la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde avec l'acrosome. Puis ces deux équipes ont mis en évidence des sites de liaisons aux analogues des récepteurs CB1 et à l'AEA sur les membranes des spermatozoïdes de l'oursin, suggérant ainsi la présence de récepteurs aux cannabinoïdes spécifiques chez cet invertébré [172] ([173]). Par la suite, une étude de Bisogno et al. portant sur les ovaires d'oursin *Paracentrotus lividus* a révélé que seuls les ovaires matures de cet animal étaient capables de synthétiser de l'AEA ainsi que deux autres endocannabinoïdes minoritaires, [174] également capables d'inhiber la reproduction des oursins . Une activité amidohydrolase pour l'AEA a aussi été décelée dans les ovaires matures. La distribution subcellulaire de cette enzyme, de même que sa dépendance au pH et aux inhibiteurs sont comparables à ceux de la FAAH.

L'oursin possède donc un système cannabinoïde qui serait impliqué dans la régulation de la reproduction. Ceci peut être rapproché du rôle qu'exerce ce système chez les vertébrés ; en effet, il a été démontré chez la souris que le taux d'AEA présent dans l'utérus contrôle étroitement l'implantation de l'embryon.

b. La moule :

L'AEA ainsi que le N-palmitoyléthanolamide et le N-stéaroyléthanolamide ont été mis en évidence chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, mollusque bivalve [175]. Chez la moule, le taux d'AEA *post-mortem* augmente et présente une similitude avec les observations de Kempe et al. concernant le taux croissant *post-mortem* de cet endocannabinoïde mesuré dans le cerveau de rat [176]. Des sites de liaisons spécifiques à l'AEA ont été mis en évidence dans les ganglions nerveux de l'espèce *Mytilus edulis*. Ces sites ont de plus été associés à la présence d'une activité de synthèse de monoxyde d'azote. Des propriétés enzymatiques très proches de celles de la FAAH et hydrolysant l'AEA existe également chez la moule (Sepe et al. 1998).

c. L'hydre :

Chez l'espèce *Hydra vulgaris*, cnidaire hydrozoaire, un système cannabinoïde complet a été décrit [177]. L'hydre renferme de l'AEA et son précurseur, ainsi que du 2-AG et des N-acyléthanolamines. Des sites de liaisons spécifiques à un antagoniste du récepteur CB1, le SR141716A, ont été détectés avec succès, appuyant ainsi l'hypothèse de la présence d'un récepteur CB1. Une activité amidohydrolase relevant de fractions membranaires renferme des propriétés biochimiques relativement proches de la FAAH ; comme cette dernière, elle est active à pH optimum situé entre 9 et 10 et possède une sensibilité importante aux inhibiteurs de la FAAH.

Ce système serait impliqué dans le contrôle de la nourriture [178]. En effet, l'AEA et l'acide arachidonique inhibent, de manière dose dépendante, la prise de nourriture induite par le glutathion en accélérant la fermeture de la bouche, action contrée par le GABA dont l'action est inverse [179]. L'équipe de De Petrocellis a émis l'hypothèse que les endocannabinoïdes seraient produits après activation des chémorécepteurs au glutathion, chez l'hydre, dans le but de produire un rétro-contrôle négatif sur la prise de nourriture. En effet, l'activation des récepteurs au glutathion par les endocannabinoïdes induit la production de l'acide aminé inhibiteur, le GABA ainsi que la synthèse d'acide arachidonique via l'activité amidohydrolase. Enfin, chez *Hydra polyps*, la présence d'AEA, du 2-AG ainsi que d'une enzyme FAAH a également été soulignée [177].

d. La sangsue :

Les premières études portant sur le système endocannabinoïde chez la sangsue *Hirudo medicinalis* remontent aux travaux de Stefano réalisés en collaboration avec notre laboratoire. La présence des sites de liaisons à l'AEA fut mise en évidence dans les ganglions de la chaîne nerveuse [180] et l'activation par l'AEA, de ces sites imputables à des récepteurs, a conduit à la libération de monoxyde d'azote (NO). Matias et al. ont découvert un système endocannabinoïde chez la sangsue

médicinale, qui impliquerait les deux principaux endocannabinoïdes l'AEA et la 2AG, un récepteur CB1 partiellement séquencé chez cet invertébré et enfin, l'existence d'une amidase de type FAAH (non sélective aux endocannabinoïdes). L'utilisation de l'antagoniste du récepteur CB1, le SR141716A, ainsi que du L-NAME (N-omega-nitro-L-arginine methyl ester), inhibiteur de NO synthase diminuent la production de NO induite par l'AEA [180]. De plus, un agoniste cannabinoïde synthétique : le CP-55940, est aussi capable d'induire la production de NO. Ces résultats suggèrent donc la présence de récepteurs de type CB1 chez cette espèce. Le clonage d'une séquence de 400 pb présentant respectivement une homologie de 49.3 % et 47.2 % avec les variantes des récepteurs CB1 humain et de rat est un indice supplémentaire de l'existence de tels récepteurs chez *Hirudo* [13]. L'existence d'une amidohydrolase a également été suggérée dans les ganglions de la chaîne nerveuse de cet invertébré, car en effet, un inhibiteur spécifique de la FAAH de mammifère (le MAPF) est capable d'augmenter le taux de NO normalement induit par l'AEA [14].

e. La cione

La présence de récepteurs de type CB1 et CB2 ont été mis en évidence chez les vertébrés (poissons, amphibiens, oiseaux et mammifères) [12]. Chez l'urochordé *Ciona intestinalis*, l'équipe de Elphick et al. [181]. Par des études *in silico* ont montré la présence d'un récepteur de 423 acides aminés intermédiaire entre le CB1 et le CB2 humain et nommé CiCBR. L'analyse phylogénétique montre que CiCBR semble être l'ancêtre de CB1R qui aurait donné par duplication le CB2R chez les vertébrés. CiCBR est absent chez les ecdysozoaires tels que *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans*. Le gène codant CiCBR s'exprime dans le ganglion cérébral, le pharynx branchial, le cœur et les testicules de la cione. Le 2AG est cinq fois plus abondant que l'anandamide dans l'estomac et le tractus gastrique (0.063-5.423 pmol/mg de lipides extraits). L'analyse du génome a aussi conduit à mettre en évidence l'existence d'une FAAH similaire à celles retrouvées chez les mammifères [182].

8. Le Monoxyde d'azote : Origines et fonctions :

a. Historique :

Le monoxyde d'azote a été identifié pour la première fois par Joseph Priestly en 1772, comme un gaz étant simplement composé de l'association covalente entre un atome d'azote et d'oxygène (NO). La considération de cette molécule fut pendant très longtemps limitée à un simple polluant atmosphérique. Dans les années 1980, des chercheurs ont étudié les mécanismes de

vasoconstriction et vasodilatation des vaisseaux sanguins contrôlant la pression artérielle. Des drogues favorisant la vasodilatation des vaisseaux sanguins telles que la nitroglycérine étaient alors prescrites afin de traiter les maladies cardiaques, (angine de poitrine), mais le mécanisme d'action était inconnu. En 1977 Ferid Murad découvrit que la nitroglycérine libérait du NO qui induisait une cascade de relaxation des cellules musculaires lisses.

En 1980 Robert Furchgott a étudié l'effet de l'acétylcholine sur la vasodilatation et en identifia la cible cellulaire : les cellules endothéliales de la paroi des vaisseaux. En plus de ces cellules endothéliales, les fonctions de contraction et de relâchement vasculaire étaient aussi mises en relation avec la présence de fibres musculaires lisses tout autour des cellules endothéliales. Dans leurs travaux, Furchgott et al. ont montré que sans ces cellules, les fibres musculaires étaient incapables de causer la vasodilatation. Ils en déduirent qu'un facteur spécifique, produit par les cellules endothéliales, était capable de moduler la contraction et la dilatation des vaisseaux sanguins. Ce facteur, appelé Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF), a été l'objet d'importants travaux afin de le caractériser. Les différentes pièces du puzzle ont été assemblées en 1986 lorsque Louis Ignarro identifia l'EDRF et lui trouva des propriétés communes avec le NO. Il a été montré, pour la première fois, qu'un gaz pouvait jouer un rôle important dans la régulation des fonctions biologiques humaines. En 1998, Furchgott, Murad et Ignarro ont été récompensés par un Prix Nobel intitulé « le monoxyde d'azote comme agent de signalisation dans le système cardiovasculaire ». Depuis, d'autres fonctions du NO ont été découvertes chez les mammifères, les insectes et autres invertébrés et aussi chez les plantes. En parallèle, d'autres gaz ayant un effet physiologique d'importance moindre chez les mammifères, par rapport à celle du NO, ont été identifiés tels le monoxyde de carbone et le sulfure d'hydrogène

b. Synthèse du monoxyde d'azote :

La formation du NO est catalysée par une enzyme appelée NO synthase (NOS). Des isoformes variables de cette enzyme ont été purifiées et clonées à partir de différents tissus de mammifères. Elles ont toutes été caractérisées comme des homodimères [183-185] pour lesquelles chaque sous-unité peut varier de 125kDa pour l'isoforme exprimée dans les macrophages, à 160kDa pour celle exprimée dans le cerveau.

Toutes les isoenzymes NOS sont des molécules très complexes en raison de leur structure qui renferme plusieurs fonctionnalités :

- Un site catalytique chargé de produire du NO à partir d'un substrat, principalement l'arginine.
- Des sites d'interactions avec de nombreux co-facteurs enzymatiques nécessaires aux

réactions d'oxydation du substrat pour produire le NO

- La dépendance ou non du calcium, et/ou de la calmoduline pour le processus de synthèse du NO
- L'expression constitutive ou au contraire inductible des isoenzymes
- La possibilité ou non de s'ancrer à la membrane plasmique des cellules

Bredt et Snyder ont décrit cinq isoformes de NOS exprimées de manière caractéristique : dans le cerveau (isoforme bNOS pour brain NOS ou nNOS pour neuronal NOS ou encore NOS I, constitutive), l'endothélium (isoforme eNOS pour endothelial NOS ou encore NOS III, constitutive), les cellules immunitaires phagocytaires de type macrophagique (isoforme macNOS ou iNOS pour inductible NOS ou NOS II, forme uniquement induite), le foie (isoforme hepNOS pour hépatic NOS) et aussi une isoforme ubiquitaire membranaire : le cytochrome P450 reductase ou CPR (**Figure 15**) [186].

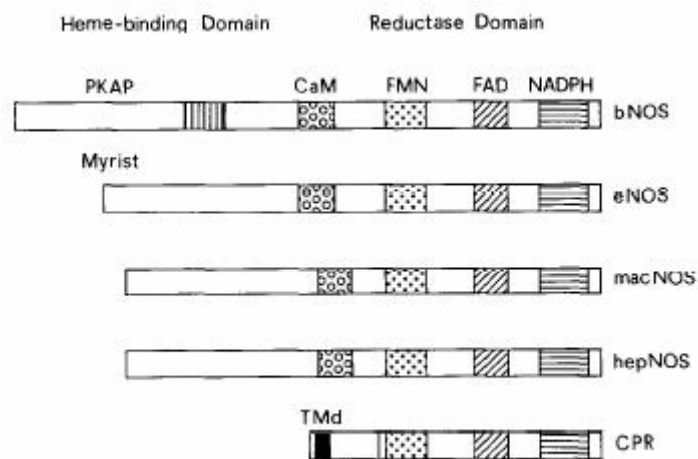


Figure 15 : Représentation schématique des sites de liaison aux cofacteurs des enzymes NOS, et du cytochrome P450 reductase (CPR). Les sites de liaison des cofacteurs enzymatiques NADPH, FAD, FMN et calmoduline (CaM) sont représentés dans les régions C-terminales tandis que les sites de phosphorylation (PKAP) par la protéine kinase A, et de myristoylation (Myrist) sont portés par les parties N-terminales, TMd= domaine transmembranaire. (d'après Bredt and Snyder, 1994[186]).

Toutes les sous-unités de chaque isoforme de la NOS possèdent un domaine réductase dans la partie C-terminale de l'enzyme. Ce domaine réductase est composé des différents sites de liaison des co-facteurs enzymatiques NicotinAmideDinucléotide Phosphate Hydrogénase (NADPH), flavine Adénine Dinucléotide (FAD) et Flavine MonoNucléotide (FMN). Le domaine N-terminale contient le domaine de liaison à l'hème, site catalytique de l'enzyme.

Un site de liaison à la calmoduline, situé à l'union des domaines réductase et oxygénase (site de l'hème), est exprimé dans les isoformes cytosoliques de la NOS (nNOS, eNOS, iNOS, hepNOS) et non dans la forme membranaire CPR [186]. Ces mêmes auteurs ont rapporté une homologie de 36% entre le domaine réductase de l'isoforme CPR et des autres isoformes NOS. Les principales différences structurales se situent davantage au niveau des domaines oxydases N-terminaux.

Les NOS ont pour fonction d'oxyder le groupe guanidine de la L-arginine, oxydation qui s'effectue selon deux étapes séparées qui aboutissent à la formation de deux produits : le NO et la citrulline [187-189] (**Figure 16**).

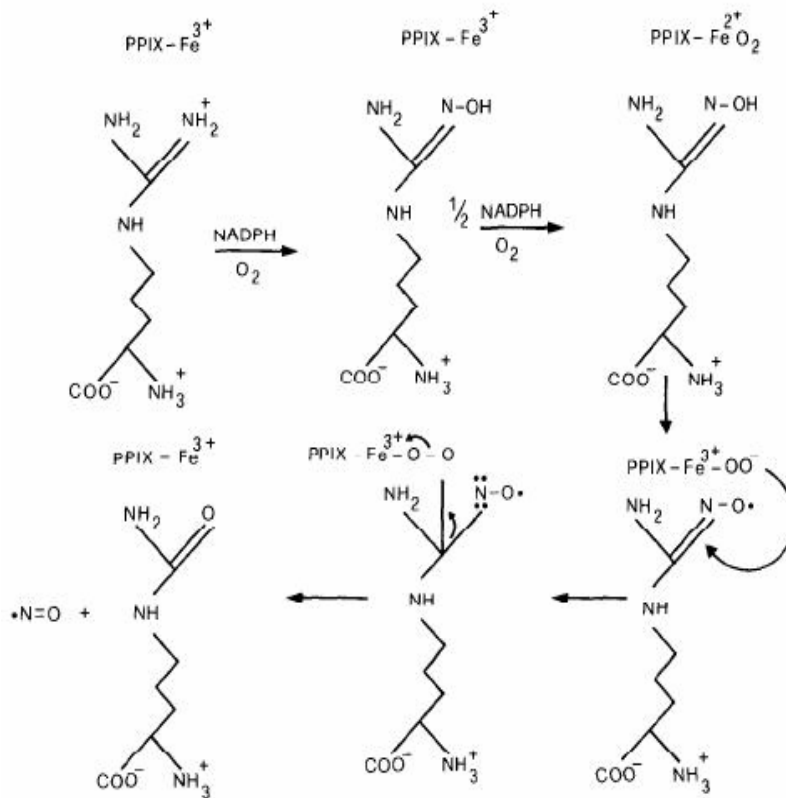


Figure 16 : Mécanisme réactionnel décrivant la formation du NO et de Lcitrulline à partir de la L-arginine ; PPIX= protoporphyrine (d'après Marletta et al. 1993[190])

Les mécanismes complets de synthèse du NO ne sont pas encore clairement élucidés. Il a été néanmoins démontré que, dans la première étape nécessitant une molécule de dioxygène et une de NADPH, la L-hydroxyarginine est formée et constitue un intermédiaire réactionnel étroitement associé à la NOS [187, 191]. La seconde étape de la réaction dans laquelle la L-hydroxyarginine est oxydée pour former du NO et de la L-citrulline est encore en cours d'élucidation. Cependant, il est admis que la L-hydroxyarginine et le NADPH peuvent chacun fournir un électron afin de favoriser la seconde oxydation et l'hème pourrait être directement impliqué dans l'activation de l'oxygène. Une seconde théorie se base sur l'idée que l'hème de la NOS attaquerait le carbone guanido de la L-

hydroxyarginine pour former un intermédiaire qui libèrerait du NO et de la L-citrulline après décomposition [190] (**Figure 16**).

Bien que les isoformes de la NOS présentent une importante variabilité dans leurs séquences d'acides aminés, chacune des isoformes décrites précédemment est bien conservée chez les mammifères. L'isoforme cérébrale nNOS de rat partage, par exemple, 94% et 98% d'identité en acides aminés avec les séquences humaine et murine, respectivement.

La NOS endothéliale (eNOS) partage quant à elle, 60% d'identité avec la nNOS de rat et l'existence, chez l'eNOS, d'une séquence consensus N-terminale présentant une modification post-traductionnelle (myristoylation) permet la liaison à la membrane . La NOS macrophagique de rat présente, après clonage, des homologies de séquence égales à 50% et 51% avec les isoformes nNOS et eNOS respectivement [192]. L'iNOS macrophagique lie fortement la calmoduline et son fonctionnement est indépendant du calcium alors que ce dernier est nécessaire pour les isoformes cérébrale nNOS et endothéliale eNOS . La macNOS est NOS inductible en raison du fait que son expression dans les cellules phagocytaires est induite par des motifs antigéniques tels que les lipopolysaccharides bactériens ou par des cytokines interférons (IFN- γ), des interleukines (IL-1 α , IL-1 β), le TNF- αGeller et al. ont cloné et fait exprimer une isoforme hépatique inductible de la NOS chez l'Homme. Cette équipe a démontré que l'induction de hepNOS était possible par des traitements combinés de LPS, de TNF, d'IL-1 et d'IFN- γ [193].

Parmi les nombreuses fonctions physiologiques exercées par le NO dans les tissus de mammifères (relaxation des vaisseaux sanguins, inhibition de l'agrégation et de l'adhésion des plaquettes, plasticité synaptique des neurones, différenciation et régénération neuronales, activités bactéricides...), trois mécanismes principaux ont été identifiés [186]:

- Activation de la guanylate cyclase
- Production de radicaux
- Adp-ribosylation

Le NO produit dans une cellule peut diffuser dans toutes les directions. Il peut interagir avec des cibles intracellulaires (enzymes, protéines, régulateur de gènes) ; cependant, de nombreuses découvertes expérimentales ont suggéré que ses actions principales s'effectuent à la périphérie des cellules qui le produisent. En effet la nature lipophile de ce gaz lui permet, en grande partie, de diffuser à travers les membranes pour agir de manière paracrine sur les cellules voisines et les mécanismes de diffusion du NO à distance des sites de production mettraient en jeu des transporteurs de type hémoprotéine [194].

D'un point de vue réactionnel, le NO active la guanylate cyclase par liaison avec l'atome de fer de l'hème, ce qui change la conformation de l'enzyme qui s'active. Cette enzyme catalyse alors la formation intracellulaire de guanine monophosphate cyclase (GMPc) dans les cellules cibles. Au niveau du système nerveux central des mammifères, le NO est responsable de la production de GMPc dans les cellules de Purkinje du cervelet : la GMPc ainsi produite est capable d'activer une sérine/thréonine kinase cytosolique dont l'expression cérébrale a été spécifiquement établie dans ces. Dans les cellules phagocytaires activées, différents dérivés de type radical libre sont produits et sécrétés: anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène et NO. Bien que le NO puisse s'avérer délétère pour les protéines et l'ADN, sa combinaison avec les radicaux superoxydes O₂⁻ génère des péronitrites qui se décomposent en radicaux hydroxyde et nitrite, beaucoup plus réactifs et toxiques que le NO. Des effets neurotoxiques ont été attribués à ces radicaux libres [195]. Etant donné que le NO n'a pas de sites de liaison pour des récepteurs spécifiques et qu'il peut interagir tout en modifiant l'activité de nombreuses macromolécules, la liaison entre l'activité toxique du NO et les voies de signalisation n'apparaît pas clairement définie.

c. Régulation des NOS chez les mammifères :

Comme dit précédemment, un des principaux activateurs des NOS est le taux de calcium intracellulaire ciblant spécifiquement des NOS constitutives (eNOS et nNOS) est le taux de calcium intracellulaire. En outre, il existe cinq sites régulateurs de phosphorylation sur l'eNOS, cibles de kinases telles que la kinase Akt et de phosphatases. La nNOS possède également des sites de phosphorylation activatrice et inhibitrice pour l'enzyme. Concernant l'iNOS, les régulations post-traductionnelles sont encore méconnues. Il semblerait néanmoins qu'elle soit régulée par une phosphorylation sur un résidu de tyrosine médiée par la kinase Src. Cependant, le niveau de régulation le plus décrit concerne la régulation transcriptionnelle du gène codant l'iNOS.

d. Principales actions du NO en Biologie

Depuis la découverte de son rôle dans le contrôle de la vasodilatation, le NO s'est vu attribuer bien d'autres fonctions :

i. Dans le système nerveux :

Le NO est produit à taux élevé par les cellules immunitaires de type macrophage, en réponse à une infection bactérienne, virale ou parasitaire. Dans ce sens, le NO constitue l'une des premières lignes de défense contre les pathogènes en agissant comme un radical libre, attaquant et désorganisant les membranes cellulaires des pathogènes cibles. Un taux non contrôlé de NO, libéré

par un système immunitaire trop actif, peut également être à l'origine de maladies telles que l'arthrite et les maladies auto-immunes.

ii. Dans la Biologie de la reproduction :

Le NO est impliqué dans plusieurs aspects du mécanisme de la reproduction. Il a été montré, chez le rat, que les cellules endothéliales des capillaires fenestrés portes-hypophysaires génèrent (via la eNOS) du NO, qui est libéré spontanément dans l'éminence médiane, à proximité des terminaisons nerveuses des neurones à gonadolibérine (GnRH) et induit la libération de cette neurohormone. Chez la femelle, la production pulsatile de NO, qui est, de surcroît, sous le contrôle cyclique des stéroïdes gonadiques, est un acteur majeur de la libération préovulatoire massive de GnRH (induisant, à son tour, le pic de sécrétion d'hormone lutéinisante (LH) par l'hypophyse et donc l'ovulation) [196].

Le NO joue également un rôle précoce dans les premières phases de l'implantation embryonnaire dans l'utérus et sa fonction de relaxation vasculaire est particulièrement importante pour réguler la pression vasculaire maternelle. Durant la gestation, le NO, facteur angiogène, peut favoriser la formation de vaisseaux sanguins. Le NO exerce aussi une activité importante dans le maintien des cellules trophoblastiques qui forment le placenta embryonnaire

iii. Dans le système nerveux des Vertébrés :

Le monoxyde d'azote est une molécule cruciale capable de moduler la plasticité neuronale. De par sa qualité de gaz radical libre diffusible au travers des membranes plasmiques, il joue au niveau du système nerveux, une fonction importante de neurotransmetteur dans des mécanismes de signalisation inter et intra-cellulaires . Les formes constitutives, nNOS et eNOS sont représentées dans les neurones du système nerveux et la forme induite iNOS est exprimée dans les cellules immunitaires de type astrocytaire et microglial après déclenchement d'un processus inflammatoire ou pathologique. Dans le système nerveux, il existe une dualité des effets biologiques engendrés par le NO en fonction de la concentration produite. En effet, si un niveau relativement élevé de monoxyde d'azote peut s'avérer bénéfique, une concentration trop élevée (>1 μM), rapidement atteinte lors d'états inflammatoires/pathologiques est délétère pour la viabilité des cellules et/ou leurs fonctionnements biologiques. Bien qu'ayant une demi-vie très courte (quelques secondes), le NO peut rapidement entraîner la formation de peroxy-nitrite dans les neurones et provoquer la nitration des résidus de tyrosine des protéines ou encore la formation d'ions superoxydes qui peuvent attaquer, désorganiser et déstructurer les protéines.

iv. Dans le système nerveux périphérique (SNP) :

D'un point de vue pathologique, une lésion du SNP s'accompagne d'une dégénérescence progressive du nerf distal qualifiée de dégénérescence Wallérienne. Durant celle-ci, se met en place, au niveau de l'extrémité proximale, un micro-environnement favorable à la repousse neuritique. Localement, les cellules de Schwann qui enveloppent les fibres nerveuses répondent à la destruction neuronale en régulant fortement la transcription des gènes codant la myéline ainsi qu'en se différenciant avant de proliférer. Ces cellules s'organisent en réseau tubulaire (Bandes de Büngner) au niveau du nerf lésé et se mettent à exprimer des molécules de surface qui aideront à guider la régénération des fibres nerveuses. Le système immunitaire se met également en alerte lors de ce processus et des cellules immunitaires telles que les macrophages phagocytent les débris de myéline tout en sécrétant des cytokines, des neurotrophines et autres molécules d'adhésion cellulaires neuronales. Parmi ces molécules exerçant un rôle critique, le NO joue un rôle fondamental et précoce pendant la dégénérescence Wallérienne. Cependant, si son taux n'est pas suffisamment contrôlé au niveau du site inflammatoire (libération locale excessive), le processus de repousse neuritique avorte et les axones ainsi que les cônes de croissance dégèrent. McDonald et al. soulignent aussi, dans leur travaux sur une lésion de nerf sciatique de rat, les effets délétères du NO libéré à long terme par la NOS inductible [197]. Ces auteurs ont constaté un arrêt de la régénération nerveuse périphérique en présence d'une stimulation prolongée de l'iNOS. Par ailleurs, ce résultat a pu être partiellement inversé en traitant le nerf avec un inhibiteur de la NOS : le L-NAME (N- Ω -nitro-L-arginine-méthyl-ester).

v. Dans le système nerveux central (SNC) :

Des trois enzymes NOS, l'isoforme NOS neuronale est l'enzyme majoritaire du SNC. La nNOS constitue la source prédominante de NO dans les neurones. Par des expériences d'immunohistochimie révélées en microscopie électronique, la nNOS s'est vue exprimée dans différents compartiments cellulaires des neurones : l'appareil de Golgi, le reticulum endoplasmique, les dendrites, et les terminaisons axonales où cet enzyme co-localise avec les récepteurs ionotropiques N-méthyl D-aspartate (NMDA) au glutamate. La NOS neuronale est exprimée dans les neurones matures et immatures. La régulation du taux de NO libéré dans les neurones mais diffusant aussi dans le SNC est excessivement importante pour le maintien des fonctions physiologiques et une dérégulation de ce taux peut engendrer des pathologies cérébrales variées tels que la dépression chronique ou encore les maladies de Parkinson, Alzheimer...

Au niveau du SNC des Vertébrés, les fortes concentrations de NO d'abord libérées lors de la lésion nerveuse puis relayées par la mise en place des processus inflammatoires provoquent des effets délétères sur la survie des cellules (apoptose, nécrose...). Dans un contexte pathologique affectant le SNC (lésions traumatiques, ischémie cérébrale, maladies neurodégénératives), la surproduction de NO par les neurones lésés (via l'augmentation de synthèse de nNOS), par les cellules gliales (astrocytes, microgliales) et par les macrophages (via la synthèse abondante de NOS inductible iNOS) conduit à un ensemble de réactions létales pour les neurones. En effet, le NO provoque la libération, par les neurones, d'acides aminés excitateurs tel le glutamate, qui, en se fixant sur son récepteur type NMDA va induire une entrée massive de Ca²⁺ dans la cellule et la libération des réserves calciques du réticulum endoplasmique. Le système va s'auto-amplifier par l'activation d'enzymes dépendantes du Ca²⁺, telle la nNOS et l'augmentation de la concentration cytosolique de Ca²⁺ provoque alors la perméabilisation des membranes mitochondriales. Il en résulte une inhibition de la respiration mitochondriale accompagnée de la libération de cytochrome c suivie par l'activation en cascade des caspases. A l'échelle cellulaire, l'augmentation intracytoplasmique d'ions Na⁺, Ca²⁺ et d'ATP achève la mise en place des mécanismes apoptotiques des neurones.

Cette vision délétère de l'excès du NO produit par une nNOS activée au moment du traumatisme cérébral a été confirmée par les travaux de Linares et al. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que les NOS constitutives et en particulier la nNOS pouvaient entretenir la production d'un taux élevé en NO au détriment de la survie des oligodendrocytes. La mort des oligodendrocytes affecte directement la re-myélinisation des axones [198]. Cette hypothèse s'est vue confirmée en utilisant un modèle murin invalidé pour le gène de la NOS neuronale : dans ce cas les oligodendrocytes peuvent non seulement se maintenir mais de plus exercer leur rôle de myélinisation des axones dans le cas d'une sclérose multiple. En outre, l'invalidation du gène codant la NOS inductible n'a eu qu'un effet mineur sur la dé-myélinisation/remyélinisation des axones ceci suggère bien que la libération excessive et rapide de NO par la nNOS constitutive est néfaste pour le SNC des Vertébrés.

En parallèle, le NO, qui est produit également de façon massive par la iNOS synthétisée par les cellules gliales et les macrophages sous l'effet des cytokines pro-inflammatoires, est, de plus, un facteur important de stress oxydatif. Comme nous l'avons précédemment décrit, le NO libéré à moyen et long terme interagit avec les ions superoxydes pour former des peroxy-nitrites, puissants agents d'oxydation et de nitrosation qui vont induire la fragmentation des ADN, oxyder les lipides

membranaires, inhiber la respiration mitochondriale... provoquant ainsi la mort des neurones par nécrose ou apoptose.

De la même manière qu'une surproduction de NO est susceptible d'accompagner une hyper-excitabilité neuronale via la production excessive de glutamate, d'autres maladies métaboliques, ischémiques, ou encore neurodégénératives sont aussi imputables à un excès de NO. Dans la maladie d'Alzheimer, la mort neuronale progressive accompagnant la perte de la plasticité du tissu cérébral sont l'une des causes de démence typique de la maladie. Le rapprochement entre une anomalie dans l'expression des gènes de la NO synthase participant à la fois à la plasticité neuronale et à la survie cellulaire et l'apparition de la maladie d'Alzheimer a été de plus en plus suspectée. Des travaux réalisés sur des souris déficientes en NO synthase a permis de souligner le rôle crucial de la dérégulation de l'expression du gène de l'eNOS dans les neurones et l'apparition de la maladie d'Alzheimer. Des marquages anormaux et diffus ont été observés au niveau des neurites dans les cerveaux murins affectés par cette maladie.

Des études *in vitro* ont aussi démontré que l'apport cellulaire en NO pouvait entraîner la perte des cônes de croissances des neurones et des études *in vivo* ont démontré qu'un fort taux de NO produit localement lors d'un traumatisme nerveux inhibait tout processus de régénération. Ces effets délétères du NO ont pu être corrigés soit par des traitements visant à inhiber les NO synthases ; soit en augmentant le taux de superoxyde dismutase, enzyme cytosolique responsable de la neutralisation des radicaux libres présents dans la cellule, y compris le NO, ou encore en employant des piègeurs de radicaux libres (Osgawa et al. 1994) ou une extinction génique de la NO synthase de type I ou nNOS .

Cependant, il est évident que le NO joue un rôle important dans le maintien des fonctions neuronales. Par exemple, ce médiateur cellulaire est indispensable pour la neuroplasticité synaptique et la potentialisation à long terme à l'origine des mécanismes tels que l'apprentissage et la mémoire au sein de l'hippocampe. Des études ont montré qu'une exposition au NO de certains neurones favorisait la croissance de neurites et entretenait l'intégrité structurale des synapses. Contrairement au dogme de longue date affirmant qu'aucun neurone ne peut être remplacé après la naissance chez les mammifères, les facultés de neurogenèse du système nerveux adulte ont récemment été démontrées , notamment au travers de la neurogenèse de l'hippocampe. Les deux zones où se produisent la production et l'intégration des neurones néoformés ont été caractérisées : il s'agit des zones subventriculaire et subgranulaire du dentate gyrus de l'hippocampe. Le processus de

neurogenèse se compose classiquement de trois étapes principales qui sont la prolifération/migration des précurseurs neuronaux suivie par le mécanisme de différenciation/intégration des cellules et se termine par la survie. De manière intéressante, il a été démontré que la zone subventriculaire était entourée par des neurones exprimant la nNOS et des neurones progéniteurs exprimant cette même enzyme ont été découverts dans le dentate gyrus.

Ces découvertes suggèrent que l'isoforme nNOS pourrait jouer un rôle dans la neurogenèse. Mais ce rôle est controversé : dans les études de Matarredona et al., le NO s'avère être un inhibiteur physiologique de la neurogenèse et dans celle de Zhu et al. le NO exerce un effet inhibiteur sur la neurogenèse du dentate gyrus en bloquant la phosphorylation d'une protéine liant l'AMPc. Une étude précédente avait également souligné l'effet antiprolifératif du NO sur le dentate gyrus dans le cas d'une ischémie cérébrale chez le rat alors que dans d'autres expérimentations, l'administration de donneurs de NO a au contraire stimulé la neurogenèse. Ces conclusions opposées sur les effets réels du NO sur la neurogenèse pourraient provenir de la disparité des protocoles expérimentaux mis en œuvre. Ainsi, des injections intraveineuses ou dans l'hippocampe de donneurs de NO peut induire des taux difficilement contrôlables de NO, nuisibles au cerveau et au processus de neurogenèse s'ils sont élevés.

Néanmoins le NO, à faible concentration, a des effets neuroprotecteurs. En effet, il est capable d'induire un changement de conformation des canaux calciques membranaires par transnitrosation et oxydation des thiols libres, réduisant ainsi l'activité des récepteurs NMDA. La voie GMPc-NO dépendante peut prévenir l'apoptose du neurone et l'accumulation de GMPc pourrait inhiber à la fois la libération de cytochrome c dans le cytoplasme et l'activation des caspases pro-apoptotiques. La nitrosation de résidus cystéyls peut également inhiber le récepteur au glutamate de type NMDA des neurones et ainsi inhiber son excitotoxicité [199].

Les concentrations physiologiques de NO et d'oxygène ainsi que les régulations qui permettent de les contrôler sont des éléments fondamentaux. Il existe probablement une notion de seuil critique, en deçà duquel la régénération nerveuse serait possible, mais qui, une fois franchie, conduirait directement ou indirectement vers l'apoptose et la nécrose cellulaire puis tissulaire. Face aux effets multiples du NO en étroite relation avec la concentration libérée lors d'une lésion cérébrale, les Vertébrés semblent avoir perdu la capacité de réguler les NOS, le NO et ses métabolites en dessous de ce seuil critique.

9. Le rôle du NO chez les Invertébrés :

Des études menées sur le système nerveux des arthropodes ont rapporté l'existence de NOS ou d'activité NADPH diaphorase dans dix espèces d'araignées [200] ainsi que chez la sauterelle *Schistocerca gregaria* [201]. Cette équipe a révélé, pour la première fois, la présence d'une NOS ainsi qu'une voie de transduction impliquant une GMPc liant le NO, dans le système nerveux d'Invertébré.

Chez les Invertébrés supérieurs, possédant un système organisé, des neurones présentant une activité NADPH diaphorase positive ont été mis en évidence chez différents groupes : coelentérés, turbellariés, urochordés, nématodes, mais aussi annélides, arthropodes et mollusques. [202]. Une attention particulière a été portée sur les mollusques, chez qui un signal intense de NO a été observé dans les ganglions buccaux. Une activité NOS, découverte chez le mollusque gastéropode *Lymnaea stagnalis* a été démontrée au travers de la présence de citrulline et de l'inhibition du NO par le L-NAME. D'autres travaux ont montré, par immunohistochimie, que le SNC de la Lymnée contenait des neurones produisant du NO. De plus, l'application d'un donneur de NO (la S-nitrosocystéine) provoque une augmentation des mouvements, alors que le L-NAME, induit l'effet inverse. Chez la pieuvre *Octopus vulgaris*, des injections intramusculaires d'inhibiteurs de NOS ont eu, pour effet, de bloquer complètement le processus d'apprentissage tactile.

Par ailleurs, des travaux réalisés sur des hémocytes du gastéropode *Viviparus ater* ont mis en évidence une activité NOS, par immunohistochimie à l'aide d'un anticorps anti-NOS de rat et par mesures de l'activité NADPH diaphorase. Une augmentation, tant de l'immunoréactivité anti-NOS que de l'activité diaphorase est observée après stimulation de l'animal avec des bactéries à GRAM négatif *E. Coli*, [203] suggérant que l'enzyme de type NOS présente dans les hémocytes serait inductible. En parallèle, une NOS a partiellement été caractérisée sur le plan biochimique dans les hémocytes de ce même escargot. Ainsi, le traitement des hémocytes avec de la L-arginine et du NADPH en présence de tritium a permis de mettre en évidence la formation de citrulline tritiée ainsi que d'ions nitrites et nitrates. A l'inverse, un traitement avec du L-NAME en doses croissantes a significativement réduit la concentration de citrulline tritiée (inhibition quasi-totale observée avec 1mM de L-NAME). Ces résultats ont suggéré la présence d'une NO synthase dans les hémocytes d'escargot.

Chapitre III : Résultats

I. Développements en imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF/TOF et applications à l'analyse des lipides.

La préparation des échantillons avant toute analyse est une étape cruciale en biologie et l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI s'appuie en grande partie sur deux critères fondamentaux: la recherche d'une conservation des biomolécules au sein du tissu et le choix d'une matrice dédiée à la famille d'analytes recherchés. Pour cela, la spectrométrie de masse MALDI utilise classiquement des matrices dissoutes dans des solvants organiques qui peuvent solubiliser les lipides, les protéines, les peptides, les sucres et les acides nucléiques. La grande diversité des lipides ainsi que leurs natures chimiques variables rendent ces biomolécules miscibles avec la majorité des solvants organiques tels que les alcools, les éthers, les solvants halogénés.... Cette miscibilité concomitante est susceptible de provoquer une délocalisation des lipides à la surface des coupes histologiques, notamment, lors du dépôt d'une matrice. Ce phénomène est davantage compromettant lorsqu'il s'agit d'étudier la répartition des lipides sur une coupe histologique en imagerie MALDI. Dans ce contexte, leur délocalisation tissulaire peut non seulement en modifier la répartition réelle mais aussi fausser les interprétations sous jacentes.

A l'heure actuelle, différentes approches sont développées pour limiter ce phénomène de délocalisation des lipides au sein des tissus. Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit, des dépôts de matrice sans solvant ou au contraire, en solution par spray ou par microdépôts permettent de contrôler le volume de matrice déposée à la surface des sections de tissus à analyser. Avec cette approche, les délocalisations sur coupes histologiques sont limitées aux spots de matrice solvatée.

Une autre approche consisterait à fixer les biomolécules dans les tissus afin d'y conserver leur localisation *in situ* et ainsi, de pouvoir réaliser des traitements par des solvants ou des dépôts de matrice en solution tout en limitant la délocalisation. Cependant, s'agissant des peptides et des protéines, leur fixation par des agents tels que le paraformaldehyde rend leur caractérisation plus délicate par spectrométrie de masse en raison de la formation de ponts méthylènes entre les fonctions amines libres des acides aminés. Une alternative à ce mode de fixation est de traiter les coupes par des solvants organiques (éthanol, méthanol...) qui fixeraient les protéines et peptides par déshydratation des tissus. Malheureusement, cette approche ne permet pas la conservation des lipides car ces solvants sont utilisés pour les extraire, entraînant en parallèle leur délocalisation.

Le choix de la matrice constitue également un critère important lors de la phase préparatoire de l'échantillon. Un certain nombre d'entre elles sont particulièrement utilisées pour l'imagerie MALDI des lipides sachant que la matrice idéale serait celle dont la cristallisation est la plus homogène et la plus fine possible à la surface de la coupe, une stabilité dans le vide de la source MALDI ou encore, une résistance aux tirs du laser.

Nous présentons ici des améliorations ciblant d'un côté le micro-dépôt de matrices sur ces coupes histologiques afin de limiter la délocalisation des analytes (lipides, peptides et protéines) à la goutte déposée. D'un autre côté, nous présentons le développement d'une matrice ionique dérivée de la 2,6 DHAP, instable sous vide, ainsi qu'une nouvelle approche de détection des lipides par des fluorochromes lipophiles absorbant dans les UV.

1. Apports de l'automatisation des micro-dépôts par impulsion piézo-électrique en imagerie MALDI :

Les matrices les plus utilisées pour l'analyse des lipides en modes positif et négatif sont la 2,5 DHB (2,5-DHB (2,5-dihydroxybenzoic acid) , la 6,2 ATT ((6-aza 2-thithymine) et la 2,6 DHAP (DHAP (2,6-dihydroxyacetophenone)) (Stoeckli et al. 2002 ; Jackson et al. 2005 ; Seeley et al. 2008). Une fois ionisée par le laser dans la source MALDI, ces matrices produisent un nombre limité d'ions dans les bas rapports m/z (<800) ce qui les rend plus compatibles avec l'analyse des lipides étant donné le recouvrement spectral limité de ces ions matrices sur les signaux de lipides. Cependant, la 2,5 DHB et la 2,6 DHAP présentent deux défauts majeurs qui limitent leur emploi notamment dans le cas de l'imagerie MALDI. En effet, la 2,5 DHB solvatée est une matrice stable sous vide et dont la cristallisation en bordure du dépôt se fait typiquement sous forme d'aiguille. Ainsi la répartition de la 2,5 DHB à la surface de l'échantillon n'est pas homogène ce qui restreint la co-cristallisation des lipides aux seules aiguilles de matrice. D'un autre côté, la 2,6 DHAP cristallise de façon plus homogène que la 2,5 DHB mais son utilisation est limitée par sa grande instabilité dans le vide poussée de la source MALDI. Des travaux ont démontré que cette matrice se sublimait dans la source en moins d'une demi-heure, délai maximal au delà duquel aucun signal ne pourrait être détecté. En ce qui concerne la 6,2 ATT, l'analyse des lipides sur des coupes de cerveaux de rat s'est résumée aux phospholipides et aux sphingomyélines (Wang et al. 2007).

Au vu de l'importance du choix des matrices, des solvants dans lesquelles elles sont solubilisées et du mode de dépôt, nous avons cherché à tester et optimiser les paramètres de dépôts automatisés de solutions par microspotting. Plus précisément, des optimisations ont été apportées

dans la manière de déposer les solutions, dans le gain de temps de préparation de l'échantillon en définissant les zones de dépôts sur tissu. Nous avons ensuite évalué la reproductibilité des dépôts d'une matrice ionique (HCCA/ANI) dédiée à l'analyse des peptides et celle d'une nouvelle matrice ionique (SA/ANI) pour l'analyse des protéines sur des coupes de cerveaux de rat. En parallèle à ces études, une comparaison des signaux de lipides détectés sur ce même organe avec la 2,6 DHAP et ceux détectés avec la 6,2 ATT a été réalisée au cours du temps. Nous avons également cherché à estimer la reproductibilité des dépôts de matrice par cette méthode de microdépôts ainsi que l'homogénéité des cristaux formés.

Ces travaux sont présentés dans l'article : Franck J, Arafah K, Barnes A, Wisztorski M, Salzet M, Fournier I. Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: using microspotting. Anal Chem. 2009 81(19):8193-202.

Dans ces conditions, nos travaux démontrent qu'il est possible de déposer avec précision différentes matrices sur une coupe de tissu en vue de détecter des lipides mais aussi des peptides et des protéines. Dans de pareil cas, la résolution de l'image des ions détectés est directement liée à l'espacement des spots de matrice. Les micro-dépôts de matrice sur coupe nous ont permis de montrer que s'agissant des protéines, la matrice ionique SA/ANI présente une cristallisation sur coupe bien plus homogène que la matrice SA seule. Outre l'homogénéité des dépôts, cette étude met aussi en évidence les performances analytiques de cette matrice ionique (amélioration de la gamme dynamique des protéines détectées sur tissu, gain d'intensité des signaux) en comparaison avec la matrice SA.

Les micro-dépôts de matrice HCCA ont cependant permis de soulever certaines limites inhérentes à ce mode de déposition. Il apparaît nécessaire d'ajuster la concentration de HCCA afin d'empêcher la cristallisation de la matrice à l'extrémité de la tête piézoélectrique ; les conséquences peuvent aller jusqu'au bouchage de cette pièce. Les avantages apportés par la matrice ionique SA/ANI sont en premier lieu, l'absence de cristallisation en surface de la tête piezo et en second lieu, une nette homogénéité des dépôts à la surface de la coupe, associée à un gain d'intensité des peptides détectés. Ces avantages ont permis à la fois d'isoler, de fragmenter et d'imager les ions sélectionnés. Concernant l'analyse des lipides sur coupe, la matrice 6,2 ATT a montré une parfaite stabilité dans la source MALDI en opposition avec la matrice 2,6 DHAP dont la sublimation affecte sérieusement la détection des lipides après 1h sous vide. La méthode de micro-dépôts des matrices a mis en évidence une meilleure homogénéité pour la 2,6 DHAP comparée à la 6,2 ATT et à la 2,5 DHB (figure 1).

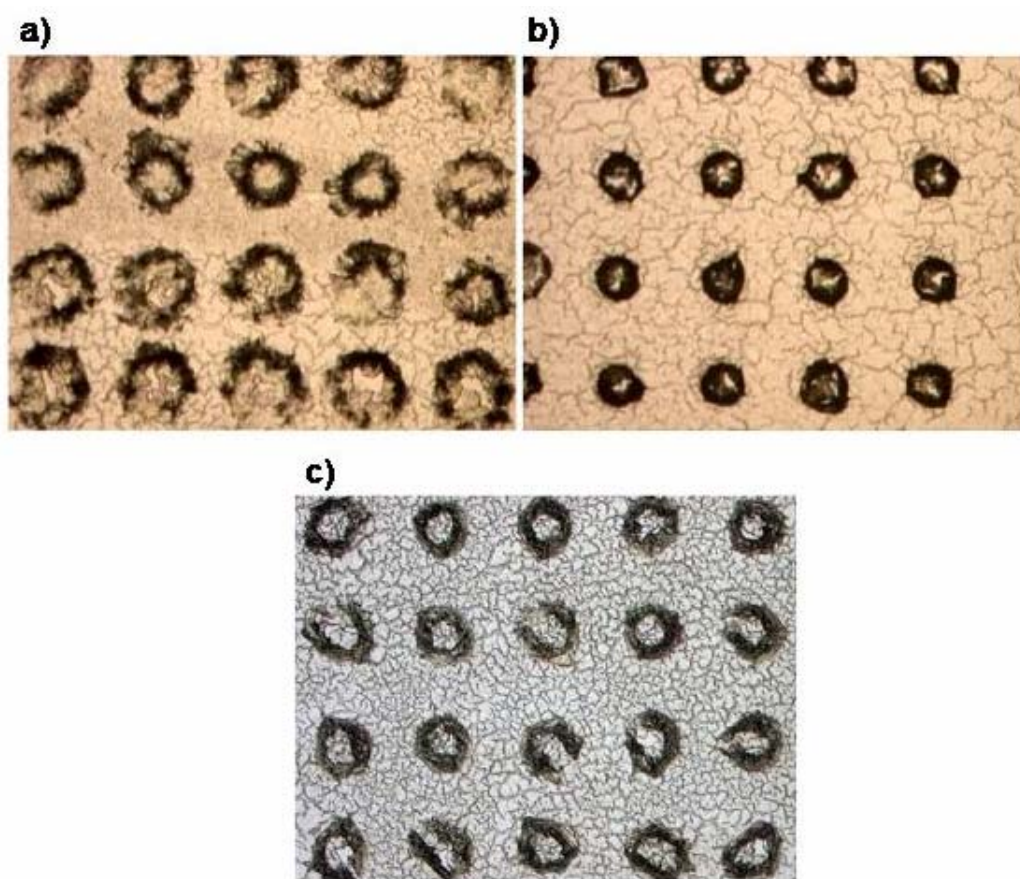


Figure 1 : Photographies en microscopie photonique illustrant les cristallisations de microdépôts de matrices ATT (a), DHAP (b) et DHB (c) (20mg/mL dans un mélange etOH-TFA 0,1% (7 :3, v :v) sur une coupe de cerveau de rat

Pour conclure, la technique de micro-déposition par impulsion piézoélectrique permet de répondre à plusieurs exigences nécessaires à l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Tout d'abord, il est possible de réaliser des images moléculaire de biomolécules (lipides, peptides et protéines) en limitant la délocalisation de ces composés aux spots de matrice tout au plus, ce qui rend cette méthode de dépôt compatible avec la résolution du MALDI. Ensuite, les solutions de matrices ou de réactifs peuvent être déposées de façon reproductible et relativement aisée. Enfin, cette technique de déposition présente un avantage indéniable dans le fait de pouvoir contrôler le volume de solutions déposées ainsi que le nombre de cycle à effectuer, tout comme la possibilité de définir des régions différentes sur une même coupe histologique et d'y déposer des solutions afin de mener des études comparatives de plusieurs matrices sur la qualité de détection des biomolécules recherchées par exemple. Par cette approche il est ainsi possible de prétraiter une coupe avec des solvants, des réactifs ou des enzymes telles que la trypsine, avant de réaliser un dépôt de matrice.

Les principales limites techniques du système piézoélectrique concernent le risque d'obturation de ce dispositif pendant les cycles de déposition de matrice ainsi que la résolution spatiale de l'image sur la coupe histologique, limitée à une cinquantaine de microns (distance entre les centres des spots consécutifs).

A l'heure actuelle, l'amélioration de l'imagerie par spectrométrie de masse passe par la recherche et le développement de processus, de méthodes voire d'instruments permettant la standardisation des méthodes poussant les analyses vers le haut débit. Les domaines biomédical et pharmacologique s'orientent de plus en plus vers cet objectif avec en prime, l'assurance d'une reproductibilité des procédés d'analyse. Cependant en imagerie MALDI comme pour toute méthode analytique, une étape fondamentale et même cruciale consiste à préparer l'échantillon de manière à préserver le plus possible les composés recherchés dans l'échantillon biologique tout en améliorant les moyens physico-chimiques de les détecter ensuite. Pour résumer, nous pouvons dire qu'en amont de l'étape instrumentale se trouve l'étape de préparation de l'échantillon. Nous nous sommes naturellement intéressés aux moyens de conserver les lipides présents dans les tissus biologiques sans perdre de vue la nécessité d'améliorer les performances des matrices préexistantes voire d'innover dans l'élaboration de nouvelles approches analytiques pour l'imagerie MALDI des lipides.

1. Nouvelle approche en imagerie MALDI des lipides : des matrices aux colorants lipophiles :

Des améliorations dans l'imagerie MALDI des lipides ont été apportées certes en évitant le plus possible leur délocalisation dans les tissus au moyens de dépôts automatisés des mélanges matrices/solvants. Nous avons vu qu'il existe le système de micro-dépôts, la nébulisation ou encore les « sprayers » de type OCN (cf. chapitre 1). Des nouvelles matrices stables sous vide poussé et présentant peu de fragments dans les bas rapports m/z ont été développées ces dernières années. De manière non exhaustive, citons par exemple, le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) utilisé pour la première fois dans le « profiling » des lipides sur du cerveau de rat et en imagerie, sur des coupes de foie (Astigarraga et al. 2008). Cette étude en « profiling » et en imagerie des lipides mettent en avant l'excellente stabilité de cette matrice sous vide comparée à la matrice para-nitro aniline (PNA) dont la sublimation sous vide s'effectue après 1h30 dans la source MALDI. La matrice MBT présente aussi une qualité d'analyse au moins équivalente à celle de la DHB mais avec l'avantage d'être homogène. Au vu des qualités analytiques de la DHB, une matrice ionique (DHBB) résultant du mélange cet acide avec une base, la butylamine, a été synthétisée dans le but d'homogénéiser la

cristallisation de cette matrice DHB tout en permettant la détection des lipides tels que les gangliosides, les oligosaccharides, les peptides voire même les protéines. S'agissant des gangliosides, la matrice ionique DHBB réduit la fragmentation de cette classe de lipides en source. Cette même matrice a été utilisée pour détecter des polysaccharides pouvant atteindre les 100kDa (Schnöll-Bitai et al. 2008). Cependant, la DHBB n'a encore jamais été testée en imagerie.

Dans la même optique d'améliorer les performances de la DHB, nous avons focalisé nos efforts sur la 2,6 DHAP dans le but d'en faire une matrice ionique stable dans la source MALDI. En la combinant avec la 2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2A4M5NP), nous démontrons que la DHAP résiste à la sublimation pendant plus d'une nuit dans la source.

Dans la même optique, mais en ayant l'idée de s'affranchir de la matrice pour un temps et de pouvoir détecter d'abord les lipides puis les peptides et ensuite les protéines, nous avons eu l'idée de colorer les lipides puis d'en imager la répartition ionique sur tissus a été développée en se basant sur les propriétés exclusivement lipophiles de certains colorants topographiques tels le Bleu de Nile A (NBA), le noir Soudan (SBB), le rouge à huile O (ORO) ou encore le rouge Soudan (SR). Les structures chimiques cycliques de ces composés, décrite dans les travaux ci-après montrent des cycles aromatiques (groupement azo) absorbant dans les longueurs d'ondes UV à UV lointain. Des travaux ont montré par exemple qu'il est possible de détecter et même doser par HPLC l'huile pour moteur diesel après ajout de rouge Soudan (Angelika Gratzfeld-Huesgen, *Analysis of Sudan Red in Diesel Oil using HPLC*, Agilent technologies). Une étude en spectrométrie de masse basée sur un instrument hybride LC-IT MS a révélé la possibilité d'ioniser et de détecter ce même colorant (Mölder et al. 2007). La source MALDI n'est pas en reste puisqu'il est possible d'ioniser et de détecter les colorants de la famille des coumarines tant en UV-MALDI (Perera et al. 1994 ; 1996) qu'en MALDI-QqQ MS irradiant dans le visible (Hu et al. 2008). Après s'être assuré qu'il est possible d'ioniser et de détecter différents lipides préalablement colorés sur des coupes histologiques, nous nous sommes dans un premier temps attardés sur les étapes de préparation de coupes de cerveau de rat et de cancer d'ovaire en s'inspirant des protocoles d'insolubilisation des lipides utilisés dans les laboratoires d'anatomie pathologique (fixateur topographique des coupes histologiques au Baker, post-chromisation au bichromate de potassium). Une seconde approche utilisant du tetroxyde d'osmium (OsO_4), fixateur des lipides, a également été évaluée pour la conservation des lipides avant l'étape de coloration.

Ces résultats sont présentés dans l'article (en révision) : Karim ARAFAH, Mohamed El Ayed, David BUOB, Annie DESMONS, Michel SALZET, Isabelle FOURNIER. NEW DEVELOPMENTS in MALDI

MASS spectrometry IMAGING for lipids: DYE-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION Mass spectrometry (DALDI), J. Proteome Res.

Face au manque d'outil permettant d'analyser les lipides *in situ*, sur des coupes histologiques, l'imagerie par spectrométrie de masse s'est placée comme technique de choix dans l'analyse du lipidome cellulaire mais aussi tissulaire. Nos nouveaux développements apportent des nouveaux outils d'analyses pour les pathologistes et notamment dans le cas de diagnostic sur des biopsies en extemporanée en permettant de corréler l'image photonique obtenues après colorations topographiques des structures cellulaires et l'image moléculaire obtenus par MSI.

2. Conclusion et perspectives:

La micro-déposition de matrice 2,5 DHAP sur des coupes de cerveau de rat a permis de confirmer sa sublimation dans le vide du MALDI et par la même, son incompatibilité avec l'imagerie MALDI, bien que l'image de la coupe de cerveau ait été réalisée dès son introduction dans la source. A l'inverse, aucune sublimation n'a été constatée avec la matrice ionique 2,6 DHAP/2A4M5NP. Cette conclusion quant à la sublimation de la 2,6 DHAP comparée à son mélange équimolaire avec la 2A4M5NP se traduit par l'irrégularité des signaux ioniques obtenus avec la 2,6 DHAP. L'absence d'ions pourtant détectés avec la matrice ionique montre la sublimation progressive de la matrice 2,6 DHAP. Cette déduction est facilement vérifiable en comparant les signaux d'ions matrice DHAP (m/z 302,07) et DHAP/2A4M5NP (m/z 301,86). En témoignent également les spectres enregistrés sur la même coupe, après plus d'une nuit (12h) passée dans la source. Il est évident que la sublimation de la matrice 2,6 DHAP ne permet plus de favoriser l'ionisation des lipides sur la coupe tandis qu'un spectre présentant une bonne intensité d'ionisation des lipides peut encore être obtenu dans les mêmes conditions. En outre, la matrice ionique a permis d'ioniser davantage de lipides en comparaison avec la matrice 2,6 DHAP seule. Ceci pourrait être dû à l'action de la base 2A4M5NP sachant que la pyridine est utilisée pour extraire lipides comme les cébrosides ou les phospholipides (Barka et Anderson 1965). En effet, une comparaison des ions détectés par ces deux matrices montre en effet la possibilité de détecter des phospholipides et sulfatides non retrouvés dans les analyses avec la 2,6 DHAP. Cette étude comparative des deux matrices a pu être réalisée grâce à l'application d'un « process » commun à l'ensemble des micro-dépôts réalisés. Nous nous sommes ainsi assurés de la reproductibilité des dépôts, nécessaire pour l'obtention d'une détection la plus fidèle possible des lipides dans chaque spot analysé pour chacune des matrices. Le contrôle des volumes égaux de matrices déposées nous garantit aussi de l'absence d'une différence

d'épaisseur de matrices sur la coupe, pouvant être causée par un manque de reproductibilité dû à l'expérimentateur. Une telle différence influencerait indéniablement sur l'épaisseur de matrice sujette à l'action du vide et pourrait par conséquent, fausser les interprétations. Concernant la détection des lipides sur coupes de cerveau de rat colorées au NBA, au SBB ou encore à l'ORO, il est possible de réaliser un couplage off-line entre la coloration des lipides par ces fluorochromes lipophiles puis de faire une analyse MALDI de ces biomolécules sans aucune étape supplémentaire. La reconstruction des images acquises avec les colorants NBA et SBB montre une bonne intensité spectrale doublée d'un bon rapport signal/bruit.

Il a été possible d'analyser en modes réflecteurs positif et négatifs avec le NBA. La coloration des lames de cerveau par simple immersion dans la solution aqueuse de colorant NBA n'a pas montré de délocalisation des lipides à la surface de la coupe en tenant compte de la résolution du MALDI. A l'inverse, l'analyse des lipides après coloration au SBB des coupes de cerveau n'est possible qu'en mode négatif étant donné que ce colorant s'ionise intensément en mode positif. La nécessité de dissoudre ce colorant dans un alcool ou dans un mélange alcool/eau s'accompagne de la délocalisation des lipides sur la coupe après immersion dans cette solution. Une conservation des lipides sur la coupe a pu être obtenue en ajoutant une étape de fixation à l' OsO_4 avant immersion dans la solution colorante de NSB. Le spectre de l'image montre une conservation des lipides de rapport $m/z < 500$, absents dans la condition non fixée à l' OsO_4 .

Afin d'appuyer l'utilité de l'imagerie MALDI des lipides assistée par des colorants, une étude concrète sur un carcinome ovarien coloré à l'ORO démontre qu'il est possible d'appliquer l'approche DALDI à un autre organe que le cerveau. De plus, l'imagerie DALDI a mis en évidence des marqueurs différentiellement exprimés entre les régions bénigne et maligne du carcinome. Ces mêmes ions attribuables à une sphinganine, un phospholipide et deux acides gras ont aussi été retrouvés par une approche statistique basée sur la comparaison des profils spectraux enregistrés en chaque point analysé de la coupe par le MALDI TOF-TOF.

Les perspectives actuelles sont :

- ✓ La poursuite des expériences de coloration de coupes sériées de cerveau de rat avec les différents fluorochromes NBA, SBB, ORO et SR pour déterminer une éventuelle affinité de chacun des colorants avec des familles de lipides.
- ✓ Caractérisation des lipides détectés avec les colorants en mode MS/MS et réalisation des ions des ions issus de la fragmentation MS/MS.
- ✓ Ces développements seront également poursuivis en ce qui concerne la détection sur la

même coupe des lipides puis des peptides après dépôts de matrices suivis de la détection de protéines de haute récemment réalisée au laboratoire.

- ✓ Sur la même idée sera également recherchée, la détection des oligosaccharides seuls ou associées soit aux protéines ou aux lipides afin d'avoir une vision globales des biomolécules présentes au sein d'une pathologie et comprendre l'association lipides-protéines, lipides-sucres dans le développement de la pathologie, en fait, de réaliser de la lipoproteomique et de la glycolipidomique.

L'analyseur à temps de vol (TOF) est un instrument très sensible, cependant, il n'est pas suffisamment résolutif pour séparer les ions possédant un rapport m/z très proches. Ces ions vont traverser le TOF avec la même vitesse et seront donc détectés en même temps. Cette limite de séparation est davantage marquée pour les composés de faible poids moléculaires dont font partie les lipides. C'est pour cela qu'il serait intéressant de comparer l'imagerie DALDI après séparation dans un TOF versus une séparation dans une cellule à mobilité d'ion. Nous aurions aussi une attribution plus précise des ions lipides comme marqueurs potentiels dans une pathologie telle que l'ovaire.

Il est également nécessaire de comprendre la physico-chimie de l'interaction lipides/colorants pour établir un mécanisme réactionnel possible expliquant la désorption des lipides.

Improving Tissue Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging. Part 1: Using Microspotting

Julien Franck,[†] Karim Arafah,[†] Alan Barnes,[‡] Maxence Wisztorski,[†] Michel Salzet,[†] and Isabelle Fournier^{*†}

Université de Lille1, CNRS, Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, MALDI Imaging, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, and Shimadzu Corporation, Wharfedale, Trafford Wharf Road, Manchester, U.K.

Nowadays, matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (MALDI MSI) is a powerful technique to obtain the distribution of endogenous and exogenous molecules within tissue sections. It can, thus, be used to study the evolution of molecules across different physiological stages in order to find out markers or get knowledge on signaling pathways. In order to provide valuable information, we must carefully control the sample preparation to avoid any delocalization of molecules of interest inside the tissue during this step. Currently, two strategies can be used to deposit chemicals, such as the MALDI matrix, onto the tissue both involving generation of microdroplets that will be dropped off onto the surface. First strategy involves microspraying of solutions. Here, we have been interested in the development of a microspotting strategy, where nanodroplets of solvent are ejected by a piezoelectric device to generate microspots at the tissue level. Such systems allow one to precisely control sample preparation by creating an array of spots. In terms of matrix crystallization, a microspotting MALDI matrix is hardly compatible with the results by classical (pipetting) methods. We have thus synthesized and studied new solid ionic matrixes in order to obtain high analytical performance using such a deposition system. These developments have enabled optimization of the preparation time because of the high stability of the printing that is generated in these conditions. We have also studied microspotting for performing on-tissue digestion in order to go for identification of proteins or to work from formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) tissue samples. We have shown that microspotting is an interesting approach for on tissue digestion. Peptides, proteins, and lipids were studied under this specific preparation strategy to improve imaging performances for this class of molecules.

Since its introduction in 1997 by the group of R. M. Caprioli et al.,¹ tissue profiling and imaging by matrix-assisted laser

desorption ionization (MALDI) mass spectrometry has allowed the analysis of hundreds of biomolecules while maintaining tissue integrity and molecular localization.^{2–4} The detection and mapping of several classes of biomolecules like proteins,^{5–9} peptides,^{10–14} and lipids^{15–22} were then possible. In MALDI mass spectrometry imaging (MALDI MSI), the matrix is uniformly deposited on a fresh frozen tissue section and a pulsed laser irradiates the surface leading to desorption and ionization of compounds contained in discrete locations (profiling) or on a whole tissue section by rastering the pulsed laser (imaging).

- (2) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 676–681.
- (3) Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5263–5270.
- (4) Rubakhin, S. S.; Greenough, W. T.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5374–5380.
- (5) Seeley, E. H.; Caprioli, R. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**.
- (6) Chaurand, P.; Rahman, M. A.; Hunt, T.; Mobley, J. A.; Gu, G.; Latham, J. C.; Caprioli, R. M.; Kasper, S. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 411–423.
- (7) Lemaire, R.; Menguellet, S. A.; Stauber, J.; Marchaudon, V.; Lucot, J. P.; Collinet, P.; Farine, M. O.; Vinatier, D.; Day, R.; Ducoroy, P.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 4127–4134.
- (8) Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Reska, M.; Jakse, G.; Knuechel, R.; Wellmann, A. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, *20*, 155–159.
- (9) Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Dias, E. C.; Andersson, M.; Arteaga, C. L.; Sanders, M. E.; Caprioli, R. M. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, *5*, 1975–1983.
- (10) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9–14.
- (11) Brand, G. D.; Krause, F. C.; Silva, L. P.; Leite, J. R.; Melo, J. A.; Prates, M. V.; Pesquero, J. B.; Santos, E. L.; Nakaie, C. R.; Costa-Neto, C. M.; Bloch, C., Jr. *Peptides* **2006**, *27*, 2137–2146.
- (12) DeKeyser, S. S.; Kutz-Naber, K. K.; Schmidt, J. J.; Barrett-Wilt, G. A.; Li, L. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1782–1791.
- (13) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A.; Gardiner, J.; Seebach, D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1921–1924.
- (14) Rubakhin, S. S.; Churchill, J. D.; Greenough, W. T.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7267–7272.
- (15) Shimma, S.; Sugiura, Y.; Hayasaka, T.; Hoshikawa, Y.; Noda, T.; Setou, M. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *855*, 98–103.
- (16) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 17–26.
- (17) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4523–4527.
- (18) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 133–138.
- (19) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 2052–2056.
- (20) Jones, J. J.; Borgmann, S.; Wilkins, C. L.; O'Brien, R. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3062–3071.
- (21) Woods, A. S.; Jackson, S. N. *AAPS J.* **2006**, *8*, E391–395.
- (22) Puolitaival, S. M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 882–886.

* Corresponding author. E-mail: isabelle.fournier@univ-lille1.fr.

[†] Université de Lille1, CNRS.

[‡] Shimadzu Corporation.

(1) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751–4760.

Many developments have been undertaken to improve MALDI MSI. Selection of the matrix and of the matrix deposition mode is a crucial step for MALDI imaging. In fact, most of the matrixes are specific to a mass range or family of compounds which can be exhibited more in tissue samples than in classical MALDI experiments due to the complex mixture of compounds in tissue. In addition, matrix choice is important from the viewpoint of solvent used and the crystal formation. Solvents used must allow good solubilization of the matrix and an efficient extraction of compounds in the tissue. Moreover, matrix layer quality greatly influences the resulting spectra reproducibility quality and will determine MALDI-MSI sensitivity, spectral resolution, and spatial resolution of molecular images. It is therefore, crucial to control uniformity of deposition using the smallest volume as possible to avoid analyte delocalization as well as crystal size and homogeneity of distribution across the spot for higher spatial resolution and spot-to-spot reproducibility. The easiest approach for depositing the matrix is manually with a micropipet. This allows a fast preparation of the tissue with a good extraction and cocrystallization of compounds. This preparation, however, suffers from poor reproducibility and delocalization of molecules within the tissues, and this approach is generally only used for profiling experiments. Another matrix application method is by spray coating, providing a homogeneous deposition of the matrix over the tissue section. This can be obtained manually with a pneumatic sprayer^{23,24} or by a robotic device.^{25–27} The homogeneous deposition of small droplets provides the formation of matrix crystals smaller than the laser beam diameter allowing the acquisition of images with a high spatial resolution. However, manual spray is generally not very reproducible. In this way, Electrospray deposition of matrix is much more reproducible and really provides highly homogeneous polycrystalline matrix layers with extremely small crystals and should provide the lowest delocalization and the highest spatial resolution. This type of matrix deposition, however, results in drastically reduced solvent (and matrix) volume that can be far too low to provide good extraction and incorporation of analytes into matrix crystals. Thus, this method provides almost perfect layers of matrix crystals but very poor quality MS spectra in terms of signal intensity and the number of detected ions, notably peptides and proteins. Compromised systems have been found between minimizing analyte delocalization and providing smallest matrix crystals with a homogeneous distribution while keeping enough solvent to preserve analytical performances. A new automatic system, the ImagePrep by Bruker Daltonics, was recently developed that creates matrix aerosol by vibrational vaporization under controlled condition. This system monitors the different steps of matrix deposition, extraction, and drying and allows control of the matrix layer thickness. Other techniques, like matrix sublimation,²⁸ were used to uniformly cover a tissue section for imaging. Such methods can only be used for analysis

of molecules with low molecular weight (typically lipids) as these do not require embedding (cocrystallization) in the matrix crystal lattice for the desorption/ionization process to occur.

Alternative methods to spraying methods can be used for matrix deposition. One of the alternatives is to apply micro- or even nanovolumes of matrix solutions to create microspots at the tissue section level. In microspotting methods, the tissue will be covered with an array of matrix microspots. In this case, analyte delocalization cannot exceed the size of the spot. The main advantages of this method are the high reproducibility of matrix deposition and the high quality of spectra that can be recorded owing to solvent volume allowing for analyte extraction and incorporation in matrix crystals. In microspotting methods, the spot diameter is generally $\sim 150\ \mu\text{m}$. Microspotting allows for creating an ordered array of spots but also deposition on specific locations. Various strategies have been developed to supply small amounts of matrixes. Microspotting can be obtained using acoustic deposition²⁹ and inkjet printing^{30–32} or using a modified nano LC–MALDI spotter.³³ Here, we have used an automated piezoelectric chemical inkjet printer (CHIP-1000, Shimadzu) to generate picoliter droplets. With the use of this automated spotting device, small droplets of solution are ejected by piezoelectric heads directly onto the tissue section to generate a raster of spots of about $150\text{--}200\ \mu\text{m}$ spot diameter. Interestingly, such a system allows various tissue treatments to be successively applied on the same spots such as on tissue digestion followed by matrix deposition. The different strategies developed by combining microspotting using CHIP-1000 and MALDI are presented in Figure S-1 in the Supporting Information. In these experiments, we describe complete strategies for MALDI MSI of lipids, peptides, and proteins imaging and identification using the CHIP-1000 systems. We present the methodological developments and improvements made in order to provide robust and reproducible high-quality imaging of analytes on such a system. Many developments were required to reach a real and usable tool, including the search and synthesis of new MALDI matrixes that were compatible with such a microdeposition system.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 6-aza-2-thiothymine (ATT), trifluoroacetic acid (TFA), ethanol (EtOH), acetonitrile (ACN), chloroform, aniline (ANI), and water CHROMASOLV PLUS for HPLC (H_2O) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Sequencing grade modified trypsin, porcine enzyme was from Promega (Charbonnières-les-Bains, France).

Tissue Preparation. Thin $10\ \mu\text{m}$ tissue sections were obtained from frozen rat brain using a cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) and applied onto ITO-coated

(23) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 1081–1092.

(24) Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 699–708.

(25) Sugiura, Y.; Shimma, S.; Setou, M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 8227–8235.

(26) Chen, Y.; Allegood, J.; Liu, Y.; Wang, E.; Cachon-Gonzalez, B.; Cox, T. M.; Merrill, A. H., Jr.; Sullards, M. C. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 2780–2788.

(27) Jardin-Mathe, O.; Bonnel, D.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M. *J. Proteomics* **2008**, *71*, 332–345.

(28) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 1646–1652.

(29) Aerni, H. R.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 827–834.

(30) Baluya, D. L.; Garrett, T. J.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 6862–6867.

(31) Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 254–262.

(32) Patel, S. A.; Barnes, A.; Loftus, N.; Martin, R.; Sloan, P.; Thakker, N.; Goodacre, R. *Analyst* **2009**, *134*, 301–307.

(33) Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1295–1305.

(34) Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7145–7153.

conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). It has been shown that MS spectra quality depends generally from the chemical washing step. Lemaire and co-workers introduced the use of chloroform³⁴ to mainly remove phospholipids which can interfere in the spectra and create poor crystallization when analyzing peptides or proteins. Caprioli et al. showed the use of alcohol to fix the tissue and remove salts and lipids.³⁵ Thus, for peptides/proteins analysis, tissue sections were submitted to a washing step using cold EtOH 95% during 15 s followed by a washing step using chloroform during 1 min in order to remove abundant lipids. For lipids analysis, no washing procedure was used.

On Tissue Digestion. Automatic trypsin deposition was performed using a high accurate position chemical inkjet printer CHIP-1000 (Shimadzu, Kyoto, Japan). A volume of 20 nL of solution containing 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of trypsin in 20 mM NH_4HCO_3 buffer was applied on each spot spaced by 250 μm center to center. Five droplets of 100 pL were deposited at each spot per cycle, and then 40 iterations were necessary to obtain the total volume. The tissue section was then incubated for 2 h in a humid atmosphere at 37 °C.

Mass Spectrometry Imaging of Proteins. A volume of 10 nL of solution containing 20 mg/mL of sinapinic acid (SA) in ACN/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v) were deposited using the CHIP-1000. The spots were spaced by 250 μm center to center, and five droplets of 100 pL were deposited at each spot per cycle, and then 20 iterations were necessary to obtain the final volume. A solid ionic matrix SA/aniline was prepared just prior to use according to a rapid conversion procedure. Briefly, 8.1 μL (1 equivalent) of ANI was added to a solution containing 20 mg/mL (1 equivalent) of SA in ACN/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). The solution was then agitated for several minutes before use. For rapid conversion, the matrix solution must be used within 1 day of preparation. Alternatively, stable matrix powder can be synthesized by a long conversion method. In such a case, 1 equivalent of ANI is added to 1 equivalent of SA dissolved in methanol (MeOH, 2.5 mg/mL). The solution is then stirred for 1 h, and the solvent was evaporated in a rotary evaporator for 45 min. The matrix powder is then placed in a desiccator for 30 min to eliminate residual solvent and stored at -20 °C. Just prior to the experiment, the matrix solution is prepared by dissolving 20 mg/mL of SA/ANI in a solution of ACN/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). This solid ionic matrix was deposited using the CHIP-1000 according to the same parameters as for SA. Molecular images were acquired using an UltraFlex II MALDI-time-of-flight (TOF)/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam laser having a repetition rate up to 200 Hz and controlled by FlexControl 3.0 (Build 158) software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Images were performed in the positive linear mode, and MALDI MS spectra were acquired in the 2500–35 000 m/z range. A total of 500 laser shots were averaged at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were saved and reconstructed using FlexImaging 2.1 (Build 15) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Mass Spectrometry Imaging of Peptides. A solution containing 10 mg/mL of HCCA in ACN/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v) was used as the matrix for peptides analysis. The total volume of

matrix was set to 20 nL and was deposited directly on tissue or on tryptic spots using the CHIP-1000. Solid ionic matrix HCCA/aniline (HCCA/ANI) was used as the matrix and was prepared following the procedure established previously³⁶ and similarly to SA/ANI. Briefly 14.4 μL of ANI (1.5 equivalent) was added to a solution containing 20 mg/mL of HCCA (1 equivalent) in ACN/aqueous TFA 0.1%. The matrix can also be synthesized using the complete conversion protocol as described for SA/ANI but using 1.5 base equivalent for 1 acid equivalent. The total volume of this solid ionic matrix was set to 10 nL and was deposited directly on tissue or on tryptic spots using the CHIP-1000. The images were performed in positive reflector mode, and MALDI MS spectra were acquired in the 600–5000 m/z range. A total of 500 laser shots were averaged at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were saved and reconstructed using FlexImaging 2.1.

Mass Spectrometry Imaging of Lipids. A solution containing 15 mg/mL of ATT in EtOH/H₂O (1:1, v/v) was used as the matrix for lipids analysis. The total volume of this matrix was set to 20 nL and was deposited directly on the tissue using the CHIP-1000. The images were performed in positive and negative reflector modes, and MALDI-MS spectra were acquired in the 300–3000 m/z range. A total of 500 laser shots were averaged and acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were saved and reconstructed using FlexImaging 2.1.

MS/MS Identification of Digested Tissues. MS/MS experiments on digested tissue were performed using the UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument equipped with a LIFT III cell. For MS/MS experiments, parameters were set as follows: laser repetition rate was 100 Hz, ion source voltages were, respectively, 8 and 7.3 kV on the MALDI sample plate and the first electrode; the LIFT cell was pulsed from ground for electrodes 1 and 2 to 19 kV and in the last step, electrode 3 was decreased to 3.2 kV; the reflector end voltage was set to 29.5 kV and midgrid to 13.85 kV. For each MS/MS spectrum 5000 total shots were averaged including 1000 for parent ions and 4000 for fragments. The laser fluence was increased over the experiments for generating lower m/z fragments.

Data Analysis. Protein identification in databanks were performed using Biotoools 3.0 (Build 1.88) software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected to Mascot 2.2.0.3 search engine and interrogating the Swiss-Prot Protein Knowledgebase Release 56.1 of September 2, 2008 (397 539 sequence entries, comprising 143 289 088 amino acids abstracted from 172 934 references) with oxidation as the variable modification and no fixed modification. Taxonomy was specified to be *Rattus norvegicus*. Trypsin was selected as the enzyme, and two missed cleavages were selected. The mass tolerance was set at 0.5 and 1 Da, respectively, for the MS and MS/MS.

RESULTS

Mass Spectrometry Imaging of Proteins. Analysis of proteins by MALDI-TOF is generally performed using SA as a matrix. SA has also proven to be useful for MALDI-MSI of proteins. Thus, imaging of proteins directly from tissue using the CHIP-1000 was first performed using a solution of SA at 10 mg/mL. A total of 40

(35) Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 1069–1077.

(36) Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 809–819.

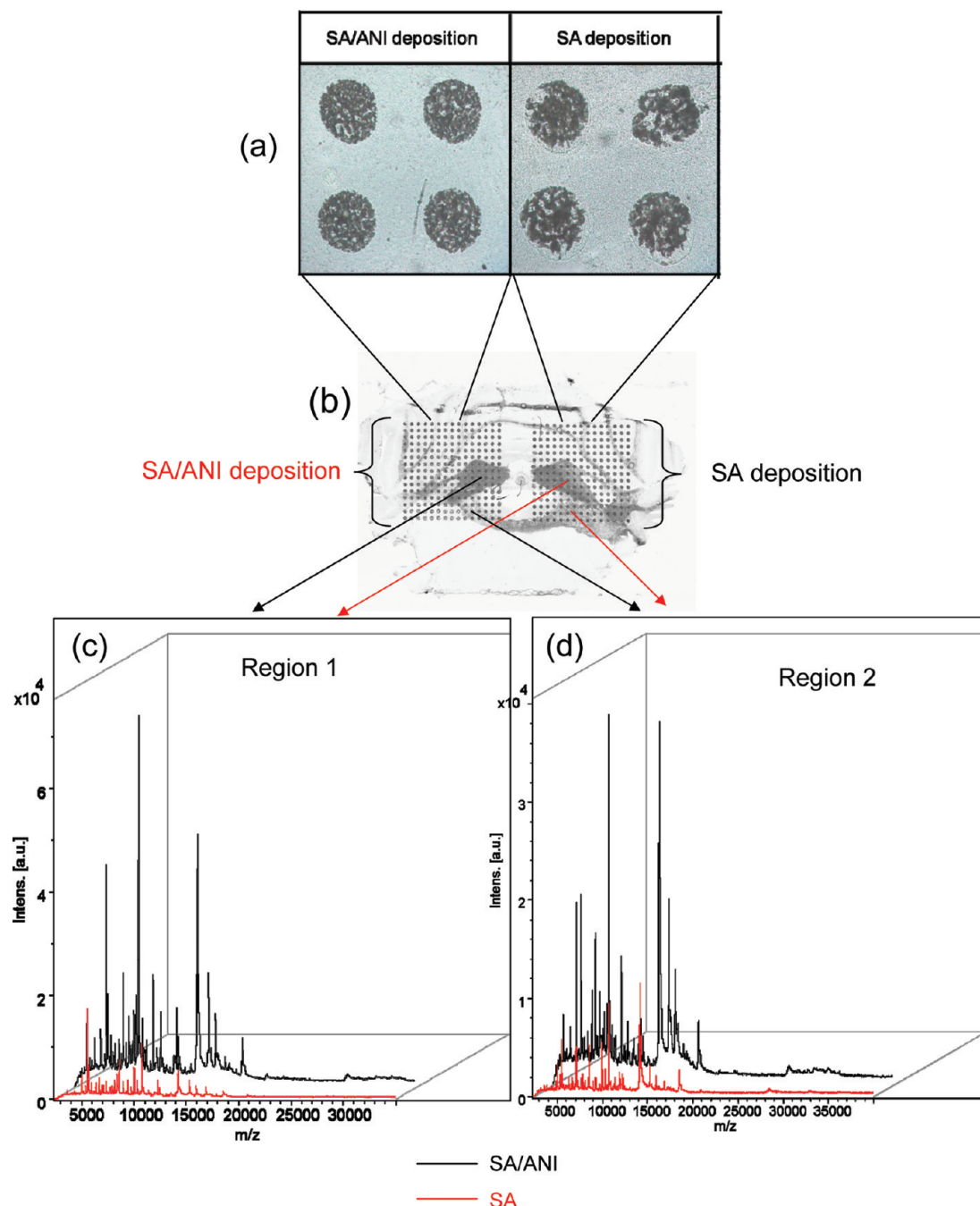


Figure 1. (a) Crystallization comparison between deposition of 10 nL of SA and deposition of 10 nL of SA/ANI, and (b–d) MS spectra recorded on two symmetric regions after deposition of 10 nL of SA/ANI and 10 nL of SA.

iterations were necessary to obtain a homogeneous crystallization on the tissue and a good signal in the MALDI-TOF spectrum. With dependence on the size of the tissue section, this number of iterations is time-consuming (approximately 2 h/cm²). For this reason, the matrix concentration was increased up to 20 mg/mL, allowing for decreasing, thus, the number of iterations to 20 while keeping the same signal quality in the MALDI spectrum. The printing at this concentration was stable, and the spots were completely covered by a thin layer of SA. However, the MALDI-TOF/MS spectra were generally low in intensity and with a high background noise. Lemaire and co-workers³⁶ have shown that the use of solid ionic matrixes was providing a good alternative to “classical matrixes” for MALDI imaging. The use of solid ionic matrixes has been demonstrated

to give better sensitivity, resolution, intensity, as well as better resistance to laser irradiation and lower matrix crystal sublimation under high vacuum conditions. Previously published work has shown solid ionic matrixes are better suited for peptide analysis from tissue sections.^{36,37} In this work, a new solid ionic matrix SA/ANI was synthesized and tested as matrix to establish its efficiency to analyze proteins in tissues using the CHIP-1000 for matrix deposition and was compared to classical SA. Comparison of SA/ANI and SA was made from different levels including deposition, crystallization, and spectral aspects. Concerning matrix crystallization, the SA/ANI solid ionic matrix shows a more homogeneous crystallization than classical SA (Figure 1a). For SA, most of the spots present an external noncrystallized ring and a rather heterogeneous crystallization. For SA/ANI, spots are

Table 1. Intensity and Signal/Noise Values for Peptides and Proteins Detected by Microspotting

<i>m/z</i>	intensity		S/N	
	SA/ANI	SA	SA/ANI	SA
3 175.750	954.50	242.00	2.8	1.2
3 387.949	1 023.50	nd	3.0	nd
3 549.578	498.00	nd	1.4	nd
3 681.870	1 128.00	nd	3.3	nd
3 837.879	1 311.25	nd	3.8	nd
4 332.224	379.50	nd	1.1	nd
4 976.567	3 387.00	598.50	9.5	4.5
5 499.559	5 352.00	1 088.50	14.7	8.2
6 736.988	4 541.00	666.00	12.0	5.0
7 080.038	12 665.00	1 865.50	33.5	14.0
8 589.494	13 574.50	2 570.50	35.5	19.6
9 969.582	7 974.00	2 438.50	20.8	18.8
14 181.465	30 010.00	5 212.00	89.1	45.9
15 264.720	4 538.00	1 989.00	14.2	18.4
18 491.561	3 633.00	768.00	13.6	7.9
28 405.901	751.50	237.00	4.6	3.2

wholly covered by a thin homogeneous layer of matrix crystals. Moreover the spot diameter obtained from ionic matrixes is generally smaller. Because of the higher reproducibility and smaller spot diameter with SA/ANI, the distance between spots can be decreased. This enabled increasing the number of spots of the raster in the printed area and consequently to increase spatial resolution of images. In terms of the ease of deposition, both matrixes were similar in term of the stability of printing. Concerning MALDI MS, a comparison between SA and SA/ANI under microspotting conditions was performed on the same tissue section taking advantage of the brain symmetry to avoid artifact signal variations due to intersection composition variations or sample handling (Figure 1b). To carefully compare in detail the two matrixes, 5000 shots were accumulated in different regions of the tissue. As shown Figure 1c,d, spectral analysis clearly reveals that SA/ANI enables the detection of more signals over a broader *m/z* range. In particular, many peptides were observed in the low *m/z* range of the SA/ANI MS spectra when these signals were not observed for SA. Thus, SA/ANI provides spectra with a higher dynamic mass range. Ion signal intensities were also compared, and the intensities of several peaks over the *m/z* range are given in Table 1 for both matrixes. For the same laser energy just above the threshold for ion production, Table 1 shows that signal intensity and S/N is higher for the ionic matrix. This was confirmed for all the experiments. Up to a 5-fold increase in intensity was observed for certain peaks, and the signal intensity was always higher for SA/ANI. The averaged S/N ratio was 2-fold higher with SA/ANI. In conclusion, for equivalent printing stability, SA/ANI presents better crystallization and analytical performance than SA. SA/ANI spectra showed a higher number of peaks, of superior intensity, with a higher S/N ratio. SA/ANI was demonstrated to be more efficient for tissue analysis than SA and is a matrix to retain for MALDI MSI of proteins since it is also well suited with microspotting conditions. Figure 2 shows MALDI MSI experiments using SA/ANI after whole laser rastering of a rat brain tissue section under microspotting conditions.

Over the whole tissue section (Figure 2a,b), very intense signals were observed with very specific spectrum profiles according to the acquisition position on the tissue. MALDI images of three different ions have been shown (Figure 2c). These compounds show the apparent different distribution in the rat brain section. Absolutely no delocalization of analytes was observed in the surrounding area outside of the tissue sample. MALDI matrixes better suited for proteins and peptides, in addition to performing well for imaging, accelerate the potential for biomarker discovery and tissue classification in disease samples.^{38–40} In clinical applications, proteins that reveal a biologically relevant localization are of great interest. Consequently identification of proteins of interest is the next step after detection. The most direct strategy would be to fragment proteins to directly deduce their primary structure. Although, currently direct protein fragmentation is not possible for MALDI from complex mixtures because of compatibility with ion activation methods (low charge states) or parent ion selection (e.g., in-source decay (ISD)). Although, currently available methods allowing the generation of sufficient structural information from the direct fragmentation of proteins by various ion activation methods are either not available for MALDI (not enough charge states for ion transfer in some parts of the instrument) or with not enough efficiency (e.g., electron capture dissociation (ECD)) because of the low charge states or efficiency but do not allow parent ion selection, requiring a purified sample (e.g., ISD on MALDI-TOF systems). Currently the most reliable method of protein identification from tissue samples is by enzymatic digestion followed by MS/MS of selected ions. Enzymatic digestion at the tissue level requires careful control of hydrolyzed peptide delocalization. Microspotting provides an excellent tool for controlling localization and volumes of enzymes in contact with the tissue sample. A “bottom-up” strategy involving an in situ enzymatic digestion has previously been shown using the chemical printer; however in these experiments, optimization of peptide detection conditions and trypsin digestion has been shown.

Mass Spectrometry Imaging of Peptides. Peptide analysis in MALDI MS is generally performed using either 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) or HCCA as matrix. 2,5-DHB characteristically crystallizes in the shape of needles that grow from the outer rim of the deposited solution. In addition, a fine polycrystalline film forms in the inner part with salts species accumulating in this region. Because of this heterogeneous crystals distribution, 2,5-DHB is not best suited for MALDI MSI although this can be dependent on the method of deposition used. 2,5-DHB is compatible with spraying devices but has been shown to create heterogeneous crystallization when microspotted despite reduced crystal size and reduced heterogeneity than for classical MALDI sample preparation. 2,5-DHB is also known for presenting hot spots. This phenomenon can be overcome in classical MALDI by carefully and manually moving the sample under laser irradiation toward the needle part of the crystals. Because of the spatial resolution required in MALDI MSI, this is not possible to a large extent.

(37) Djidja, M. C.; Francese, S.; Loadman, P. M.; Sutton, C. W.; Scriven, P.; Claude, E.; Snel, M. F.; Franck, J.; Salzet, M.; Clench, M. R. *Proteomics* **2009**, *9*, 2750–2763.

(38) Yao, I.; Sugiura, Y.; Matsumoto, M.; Setou, M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3692–3701.

(39) Walch, A.; Rauser, S.; Deininger, S. O.; Hofler, H. *Histochem. Cell. Biol.* **2008**, *130*, 421–434.

(40) Deininger, S. O.; Ebert, M. P.; Futterer, A.; Gerhard, M.; Rocken, C. J. *Proteome Res.* **2008**, *7*, 5230–5236.

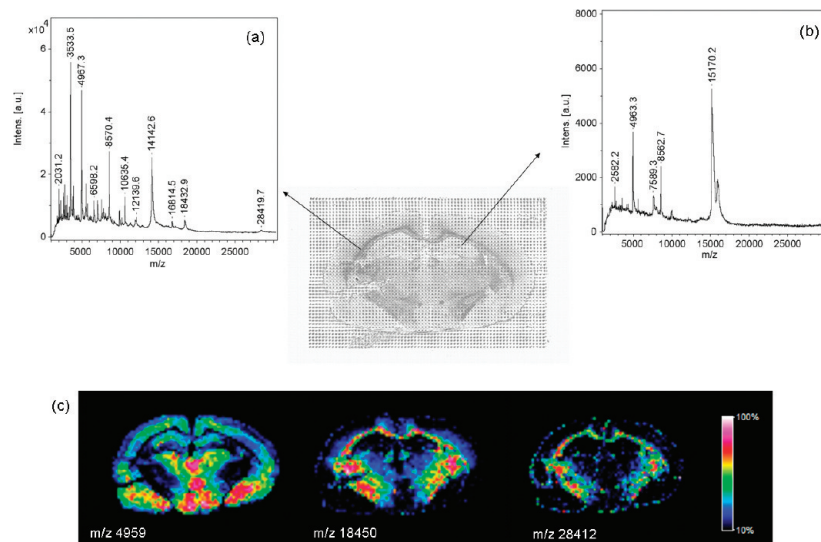


Figure 2. (a, b) MALDI MS spectra recorded in two different locations of a rat brain tissue section after automated microspotting of matrix solution (SA/ANI) and (c) reconstructed molecular images for m/z 4959.3, m/z 18450.7, and m/z 28412.

For this reason, HCCA, which presents an homogeneous crystallization, was preferred to 2,5-DHB in these experiments. HCCA was used for microspotting by chemical printing. Pictures of rat brain tissue sections after the microspotting of HCCA are shown (Figure S-2a in the Supporting Information). The solution containing 10 mg/mL of HCCA was very difficult to spot. The printing was unstable after only 10 min of spotting leading to many satellite droplets, and the piezoelectric head was totally clogged after 30 min. To increase printing stability with HCCA, a cleaning procedure was required every 5 min. Alternatively the matrix solution concentration was decreased to 5 mg/mL, although for 5 mg/mL the number of iterations had to be increased therefore increasing the preparation time. Tissue microspotted with 5 mg/mL HCCA solution were analyzed but weak, and limited peptide signals were detected in addition to MS spectra showing high background noise. To overcome this drawback, solid ionic matrixes, HCCA/ANI or HCCA/DANI,³⁶ were tested under microspotting conditions. These matrixes have previously shown good sensitivity and a good intensity for peptide analysis from tissue sections. In addition, solid ionic matrixes benefit from high solubility and low surface tension, aiding the microspotting process. HCCA is difficult to solubilize at a concentration of 20 mg/mL in a mixture containing 60% ACN and 40% aqueous TFA 0.1%. An organic base, such as aniline, when added to the above solution, an acid–base reaction occurs and the complex is solubilized. We discovered that the higher solubility of the ionic matrix improved printing performance. In addition, we observed that crystallization time was longer with the ionic matrix, thus avoiding a rapid clogging of the piezoelectric head and possibly giving more time for better peptide extraction from tissues. A solution of HCCA/ANI containing 20 mg/mL of HCCA was then tested. Figure S-2b in the Supporting Information shows the pictures of a rat brain tissue section after HCCA/ANI microspotting. Comparison of HCAA and HCCA/ANI printing show that a well-defined raster of spots is obtained for HCCA/ANI, which was not possible for HCCA. It must also be noticed that for HCCA/ANI, the printing was stable over hours without requiring any cleaning procedure. Because of the benefits described above, solid

ionic matrixes were chosen for imaging mass spectrometry of both endogenous peptides and peptides generated after enzymatic digestion. The classical proteomics approach to protein characterization involves extraction, fractionation of proteins, separation by RP-HPLC or by SDS PAGE, followed by an enzymatic digestion, and MS/MS analysis. Some groups have recently demonstrated the possibility to make protein identification after in situ enzymatic digestion followed by MS/MS directly on frozen³¹ or FFPE tissues.^{33,37,41,42} Identified proteins can then be cross-validated using classical immunohistochemistry or by a technique developed in our lab called TAG-MASS⁴³ allowing specific detection of proteins by MALDI-MSI (specific MALDI-MSI). Direct identification of proteins was performed by on-tissue microspotted enzymatic digestion. Advantages of chemical printer were great reproducibility for spotting different solutions at the same spot. In the case of enzymatic digestion, CHIP-1000 allowed, microdeposition of trypsin followed by incubation and a microspotting of HCCA/ANI matrix. Different concentrations of trypsin were tested from 20 $\mu\text{g/mL}$ up to 100 $\mu\text{g/mL}$. No major differences in terms of the number of peptides detected after digestion were observed with varying trypsin concentration. The most apparent difference discovered was the presence of trypsin autolysis peaks which were most intense at 100 $\mu\text{g/mL}$ trypsin concentration. However, even for the lowest concentration, autolysis peaks from trypsin at m/z 842.5, m/z 1045.5, m/z 2211.1, and m/z 2283.2 were still detected providing good internal calibration signals. The volume of solution required for printing was also taken into account. Generally, below 200 μL of solution loaded in the instrument led to droplets that were unstable and spotting became difficult. The amount of trypsin deposited was set to 40 nL per spot. Above this value, no difference was observed in terms of number of detected peptides even after 2 h incubation at 37 °C.

(41) Stauber, J.; Lemaire, R.; Franck, J.; Bonnel, D.; Croix, D.; Day, R.; Wisztorski, M.; Fournier, I.; Salzet, M. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 969–978.

(42) Groseclose, M. R.; Massion, P. P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3715–3724.

(43) Lemaire, R.; Stauber, J.; Wisztorski, M.; Van Camp, C.; Desmons, A.; Deschamps, M.; Proess, G.; Rudloff, I.; Woods, A. S.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 2057–2067.

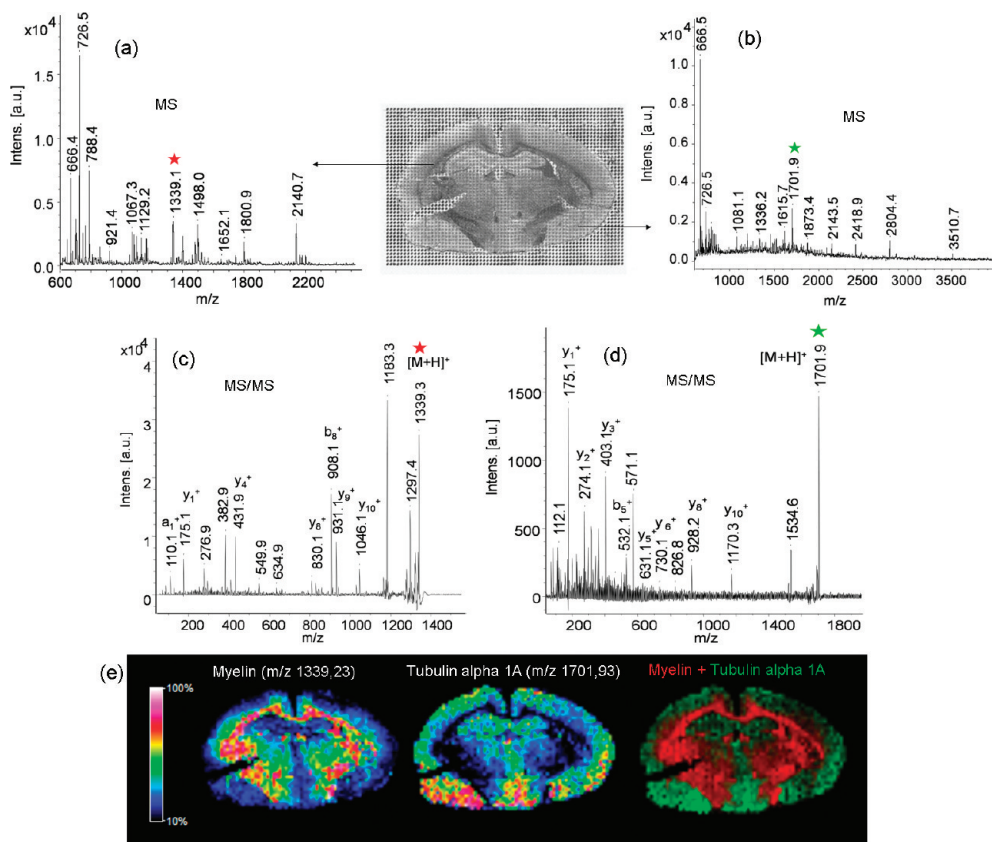


Figure 3. MALDI MSI of a rat brain tissue section after on-tissue tryptic digestion followed by matrix deposition (HCCA/ANI) using an automated microspotting device. (a, b) MS spectra recorded at two different locations of the tissue section and (c, d) corresponding MS/MS spectra of ions at m/z 1339.8 and m/z 1701.9. (e) Reconstructed molecular images for m/z 1339.8, m/z 1701.9, and overlaid image of both ions.

After in situ enzymatic digestion and image reconstruction, the peptides generated from the digest can be selected to perform MS/MS experiments for direct identification of proteins. Figure 3 shows the images of tryptic peptides indirectly giving the localization of the corresponding proteins identified directly from the rat brain tissue section after enzymatic digestion and MS/MS experiments. In this example, two different proteins localized in different regions of the tissue were selected and directly submitted to MS/MS allowing one to correlate localization and identification of myelin and tubulin α 1A. These two proteins show a very specific localization and opposite distribution in the rat brain. Myelin is exclusively localized in the corpus callosum while tubulin α 1A is present in the rest of the tissue. This experiment also shows that microspotting of the enzyme followed by matrix deposition limited the delocalization of the species to the maximum value of the spot size. Taking into account the spot size as reference, the spatial resolution commonly obtain for microspotting is about 200 μm . Emphasis must also be given to the possibility to automatically move the laser over the spot during acquisition, which increases the sensitivity and S/N ratio. This is to be considered for MS/MS in order to improve fragmentation spectra quality for protein identification. This is also an opening to consider reconstructing digestion peptides images based on MS/MS spectra (specific fragments of peptides) and increasing image selectivity by avoiding isobaric ions overlapping effects that could be expected from the digestion of highly complex middles such as tissues. Taking advantage of the MS/MS discrimination

power is the solution to image isobaric peptides belonging to different proteins presenting different distributions within the tissue.

Improving Deposition by Geometry Modification. In order to improve the printing reproducibility and quality of reagent deposition, we also studied the geometric parameters of the microspotter. We often observed that, due to the distance between the piezoelectric head and the sample, the deposition was sometimes not accurately reproducible possibly due to differences in solution viscosity. To overcome this drawback, we reduced and optimized the distance between the piezoelectric head and the sample by modifying the target holder used for printing. For this, an adapter for Prespotted AnchorChip targets from Bruker Daltonics was modified. A metal slide from approximately 1 mm of thickness is added directly on the target, and the slide containing the tissue section is then added on top of the metal slide using an adhesive tape as shown in Figure S-3 in the Supporting Information. By reduction of the distance, depositions were more accurate and reproducible allowing a better matrix deposition on the tryptic spots after an incubation step. This modification needed great care in order to avoid contact between the piezoelectric head and the slide. We also noticed that satellite spots (occasionally ejected by the piezoelectric heads) were observed less frequently due to the reduced distance for the satellite droplet to deviate from the principal spot. The accuracy of the deposit is thus greatly improved, and by combining this modification with the use of solid ionic matrixes such as SA/ANI

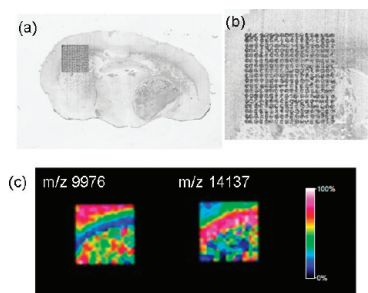


Figure 4. (a) Optical image of spots obtained after SA/ANI deposition using the CHIP-1000 with a spatial resolution of $150\ \mu\text{m}$. (b) Zoom of the region containing spots of SA/ANI. (c) Reconstructed molecular images for m/z 9 976 and m/z 14 137.

which present a highly stable printing, it is thus possible to decrease the spot size in order to improve the spatial resolution of images. By deposition of three droplets of SA/ANI by spot, a spatial resolution of $150\ \mu\text{m}$ can be easily achieved (Figure 4a,b). A decrease in the spatial resolution is obtained without any alteration of the sensitivity (identical number of proteins detected with the same intensity). In Figure 4c is reported the reconstructed molecular images for two proteins, respectively, at m/z 9 976 and m/z 14 137. These proteins have a close but not similar localization. This can be observed here using the highest resolution than with the classical microspotting conditions.

Improving Deposition Time. Microspotting has several advantages including multireagent deposition in specific locations and good control of analyte delocalization; however, the printing process is time-consuming. This is especially true when several reagents are successively spotted on a tissue section or for large samples. Previous MALDI imaging publications using microspotting devices have required an entire square or rectangular region to be printed (Figure S-4a, left panel in the Supporting Information). Printing areas that include regions outside the tissue can waste time and reagent. To remove these unnecessary regions, the simplest solution was to divide the printing area into several smaller areas of 4×4 spots. In this approach, spots were only on the tissue section and were following the shape of the tissue section (Figure S-4a, right panel in the Supporting Information). In all regions, reagents are spotted using the option “single pass iterative”. With this option, a single pass is performed on the first small area before moving to the next. The benefit of performing printing by this method is that print positions have time for solvent to evaporate before the next printing round occurs, and through a number of iterations a sufficient quantity of solution is deposited. Optimization of printing time was also gained by increasing the frequency of the piezoelectric head from 240 (standard) to 960 Hz. This modification was only possible for extremely stable solutions such as solid ionic matrixes. Through the combined approach to printing optimization, over 1 h of printing time was saved for printing on a typical rat brain tissue section. Figure S-4b in the Supporting Information shows the images reconstructed after acquisition on rat brain tissue sections spotted with SA/ANI at high frequency and removing the unnecessary regions. The deposition was perfectly stable during the 20 passes with a high frequency, and the spots were well-defined and followed exactly the shape of the tissue section. The spectra quality and thus that of the resulting images (here, proteins) were not affected by these modifications.

Mass Spectrometry Imaging of Lipids. Since the emergence of the new field of lipidomics in early 2000,⁴⁴ “soft-ionization” mass spectrometer sources have become the optimal approach for lipid analysis of crude extracts. Direct profiling of lipids in tissue using a MALDI ion source was successfully reported⁴⁵ as well as MALDI MSI of a lipid distribution in brain tissue.^{46,47} Despite the matrix clusters that occur in the low m/z ratio, a wide range of matrixes for lipidomic purpose have been compared for their crystallization, their acidic or neutral properties, and for their stability inside the MALDI source.⁴⁸ Because of its low background ions in the low mass range, stability under vacuum conditions, and quite large applicability to a broad range of lipid classes, the acidic organic matrix 2,5-DHB has become a well established matrix for lipid analysis in a biological mixture.⁴⁹ As previously described, 2,5-DHB is reputed for heterogeneity of crystallization and hot spots. Even when sprayed on a tissue, 2,5-DHB has been reported to be nonhomogeneous.⁵⁰ Despite this, depositing 2,5-DHB by a chemical printer achieved more homogeneous results than spraying. A. S. Woods et al. reported that the hydrophobic matrix 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP) and 6-aza 2-thiathymine (ATT) matrix^{17–19} gave better results for the direct analysis of lipids directly from tissue sections.⁵¹

Lipids are largely highly soluble in matrix solutions and can easily and quickly diffuse from tissues. Free solvent deposition of the matrix is a good alternative to minimize delocalization and generate a very thin and homogeneous crystallization polycrystalline layer,^{22,28} although fewer lipid species are generally observed using such approaches. Microspotting however is again a good compromise between analytical performances and analyte delocalization. Microspotting was optimized for lipids imaging. Printing was successfully assessed for spotting ATT and DHAP matrix (Figure 5). The two matrixes ATT and DHAP were deposited onto a same rat brain slice. Half-left and half-right sides of the brain were, respectively, spotted with ATT and DHAP. An optical scanning of the slice was realized to observe matrix crystallization (Figure 5a) immediately after spotting of the matrixes. Tissues were also scanned after 1 h inside the MALDI source of the instrument under vacuum conditions (Figure 5b). As observed from these pictures, the microspots of DHAP matrix were sublimated under the MALDI source vacuum on the top and outside of the rat brain slice, whereas ATT matrix microspots were still present. So as to assess the behavior of these matrixes under high vacuum, spectra were recorded for each matrix in the rat brain just after microspotting and after 1 h under vacuum conditions. A comparison between lipids detected either with ATT or DHAP matrix was assessed in the rat brain (Figure 5c) in the positive reflector mode. Both matrix detected similar lipids in the studied m/z 700–900 and gave rise to high intensity signals of

- (44) Han, X.; Gross, R. W. *J. Lipid Res.* **2003**, *44*, 1071–1079.
 (45) Rujoi, M.; Estrada, R.; Yappert, M. C. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1657–1663.
 (46) Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M. *J. Lipid Res.* **2008**.
 (47) Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* Supplement, S317–322.
 (48) Schiller, B. F. a. *J. Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2009**, *111*, 83–98.
 (49) Petkovic, M.; Schiller, J.; Muller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Arnhold, J. *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 202–216.
 (50) Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castano, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodriguez-Puertas, R.; Fernandez, J. A. *Anal. Chem.* **2008**.
 (51) Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**, *18*, 567–577.

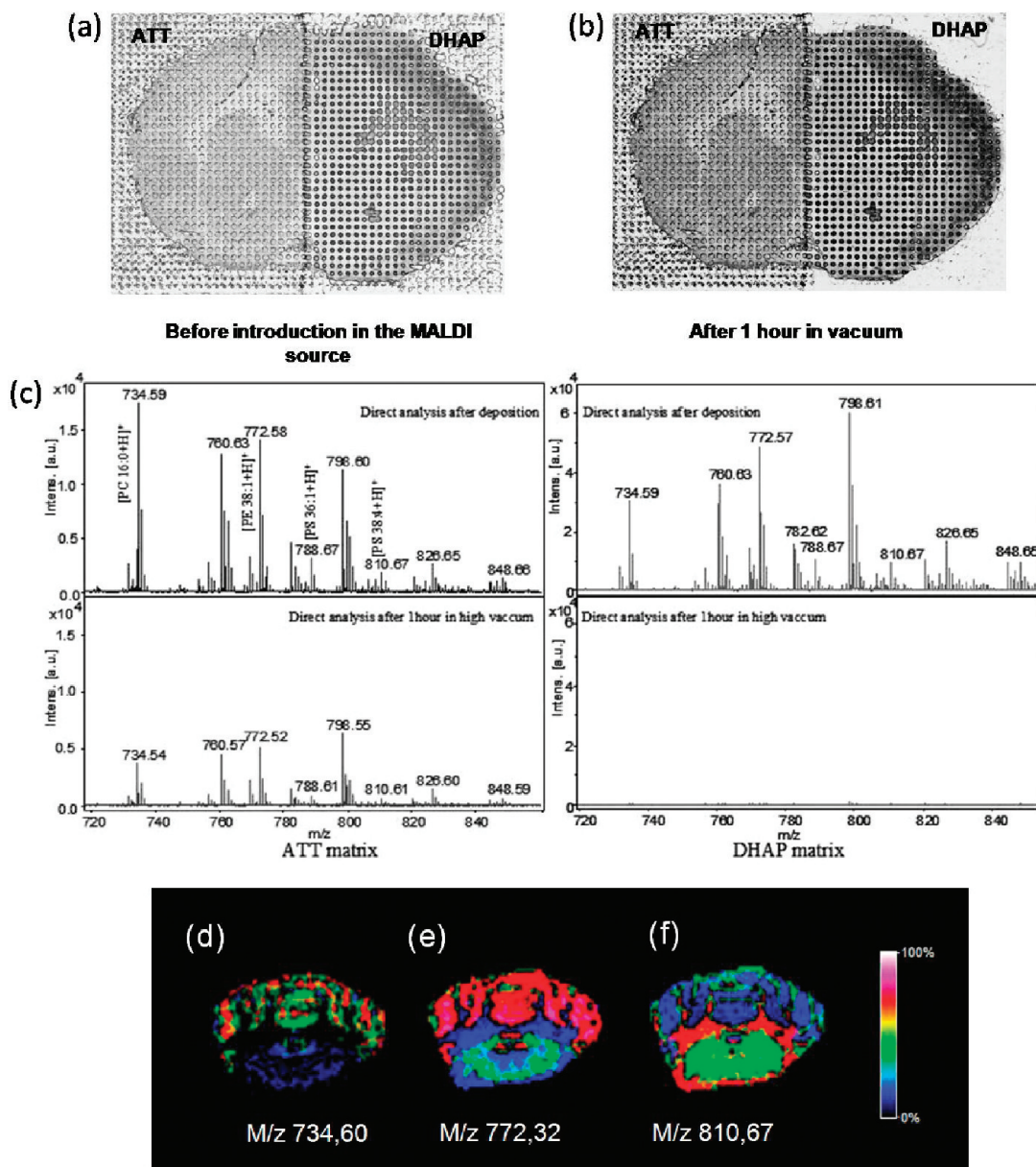


Figure 5. (a, b) ATT and DHAP matrix deposition onto a rat brain slice with the CHIP-1000 printer and vacuum-related effect on matrix sublimation. (c) Time-course vacuum effect on direct tissue analysis of lipids in white matter. Rat brain imaging of PC 16:0 (d), PE 38:1 (e), and PS 38:4 (f).

detected lipids when recorded immediately after introduction of the sample in the MALDI source. On the other hand, DHAP in high vacuum conditions for 1 h lead to a dramatic decrease in the intensity of the previous detected lipids whereas for ATT equivalent signal intensity is observed (Figure 5c). This highlights a previous observation made by A. S Woods et al.⁵² regarding the sublimation of the DHAP matrix under high vacuum conditions. This sublimation is accentuated by the weak amount of DHAP matrix deposited onto the slice using the microspotting device. The stability of ATT matrix under high vacuum has taken advantage over DHAP for lipid imaging using a microspotting device.

With the knowledge that glycerophospholipids are extracted with a polar solvent such as ethanol, hand deposition of the matrix

has been correlated with an important delocalization of this latter class of lipids.²¹ As a consequence to these observations, the DHAP and ATT matrixes were used for microspotting. Because of its stability under vacuum conditions, only ATT was used for imaging sequences. The printer was set to generate 250 μm diameter spots of the ATT matrix. Spectra were then recorded in the positive reflector mode, and normalized images are presented (Figure 5d–f). MALDI images of $[M + H]^+$ ions of glycerophospholipids showed that phosphatidylcholine PC 16:0 (Figure 5d) and phosphatidylethanolamine PE 38:1 (Figure 5e) were observed mainly in gray matter, whereas phosphatidylglycerol PS 38:4 (Figure 5f) was located in white matter.

CONCLUSIONS

Sample preparation is a crucial step in the MALDI MSI workflow. The matrix choice and its crystallization is an important

(52) Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 2822–2829.

parameter for MALDI MSI quality in terms of analytical performances but must be combined with an appropriate deposition method to avoid analyte delocalization. Minimization of analyte delocalization is tightly linked to the volume of solvent used. Minimization of solution volumes was the key to avoiding delocalization, but analytical performance (at least for peptides/proteins) was inversely related to larger volumes for ensuring their extraction and embedding in matrix crystals lattice. One of the deposition methods fulfilling both criteria was microspotting of solutions allowing the deposition of a small amount of solution at specific spots of defined diameter ensuring a delocalization at maximum of the size of the spot. Automatic microspotting allowed various reagents to be deposited on the tissue in a controlled manner. Identification strategies from tissue still currently require enzymatic digestion to generate peptides for MS/MS analysis. Moreover, N-terminal chemical derivatization of peptides can also be necessary for confident identification of proteins. Automatic microspotting ensured controlled experimental conditions which would be crucial when comparing sample replicates and extending to larger studies. We have shown in this article that reproducible, faster, and homogeneous deposition of reagents can be obtained for piezoelectric microspotting. After geometry modifications of the target, the printing realized higher reproducibility allowing a better deposition of different reagents at the same position. This was very useful in the case of in situ protein identification where trypsin was first deposited and then incubated before matrix deposition. Solid ionic matrixes for proteins and peptides, including new matrixes, were shown to be much more efficient and compatible with the printing. Solid ionic matrixes presented higher analytical performances in terms of sensitivity, number of detected compounds, signal intensity, S/N, stability under vacuum conditions but are also more suited with microspotting conditions with higher stability, reproducibility, and crystallization. Because of their lower crystallization speed and low vapor pressure, a better extraction of analytes from the tissue is hypothesized while no crystallization is observed on the piezoelectric head giving a stable

printing during several hours. It was demonstrated that the deposition time could be improved by increasing the printing frequency with ionic matrixes and creating a region of interest following the shape of the tissue section. Enzymatic digestion was also optimized for printing conditions in order to provide efficient digestion while avoiding peptide delocalization. Better digestion yields are obtained by incubation after enzyme microspotting. Geometry optimization allowed one to more precisely add the matrix solution onto the enzyme spots. Combination of in situ enzymatic digestion with ionic matrixes allowed retrieving very rich peptide profiles with enough peak intensity for MS/MS experiments to be performed and to obtain high-quality spectra for protein identification.

By combination of the improvements concerning the printing, the chemical printer affords the possibility to detect lipids, peptides, and proteins in a high-throughput manner providing images with good spatial resolution and spectra of sufficient quality to perform statistical analysis.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to I.F.), and Institut du Cancer (INCA to I.F.). Also supported by Conseil Régional Nord-Pas de Calais (grant to K.A.).

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review June 29, 2009. Accepted August 10, 2009.

AC901328P

SUPPORTING INFORMATION

IMPROVING TISSUE PREPARATION FOR MALDI-MSI.

PART 1: USING MICROSPOTTING

Julien FRANCK¹, Karim ARAFAH¹, Alan BARNES², Maxence WISZTORSKI¹, Michel SALZET¹, Isabelle FOURNIER^{1@}

¹Université de Lille1, CNRS-FRE 2933, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, IFR 147, Bâtiment SN3, 1^{er} étage, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, <http://www.maldi-imaging.com>

²Shimadzu Corporation, Wharfside, Trafford Wharf Road, Manchester, UK

@Corresponding author: isabelle.fournier@univ-lille1.fr

Figure S-1: Schematic workflow of MALDI MSI using the CHIP-1000. **(a)** Tissue section is transferred onto conductive slide followed by a washing step. **(b)** Matrix deposition for direct analysis of peptides, proteins or lipids. **(c)** in situ enzymatic digestion followed by matrix deposition for protein identification

Figure S-2: Pictures of the piezo head after **(a)** HCCA (10mg/mL) deposition during 30 minutes and **(b)** HCCA/ANI (10mg/mL) deposition after 30 minutes printing

Figure S-3: Target geometry optimization to improve reproducibility of reagents deposition. Picture of a standard target from Bruker **(a)** and the optimized target **(b)**

Figure S-4: Time deposition improvement. **(a)** Region of interest divided in smaller area allowing non-tissue areas not to be printed. **(b)** Reconstructed molecular images for m/z 6732 and m/z 14179 after deposition of SA/ANI

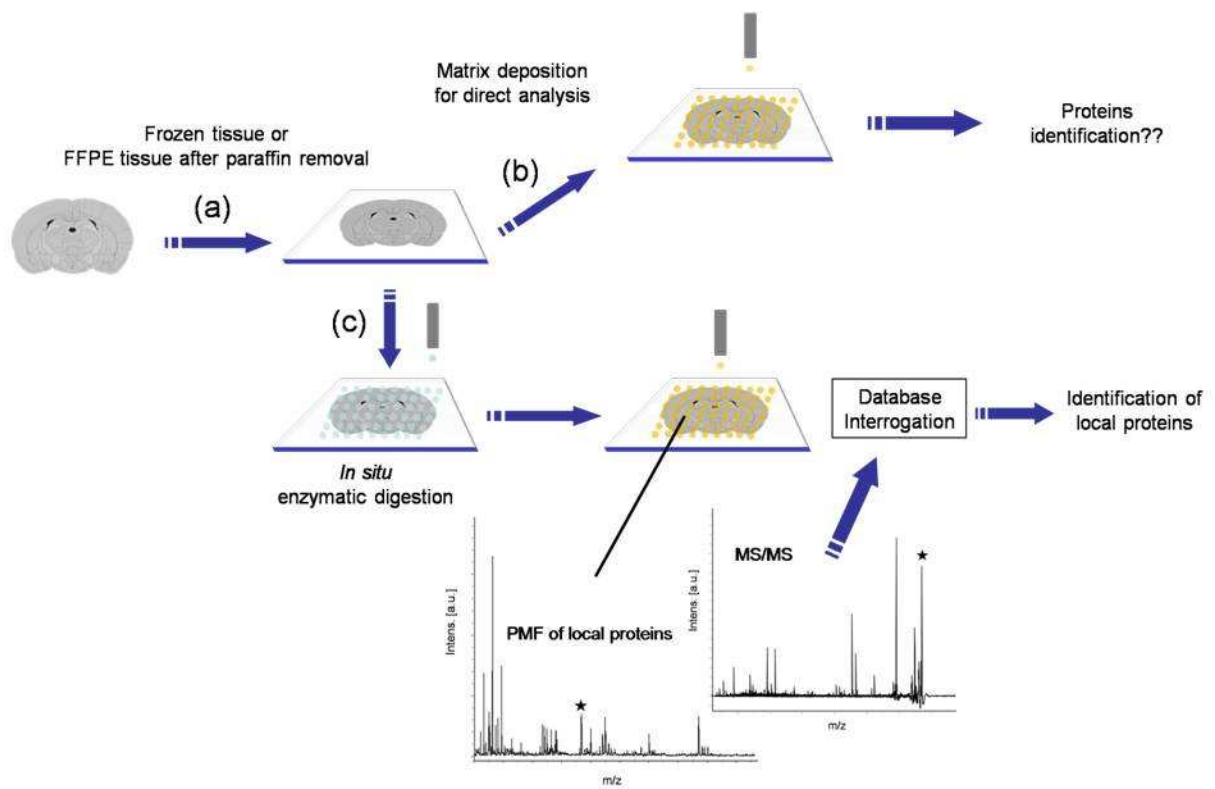


Figure S-1

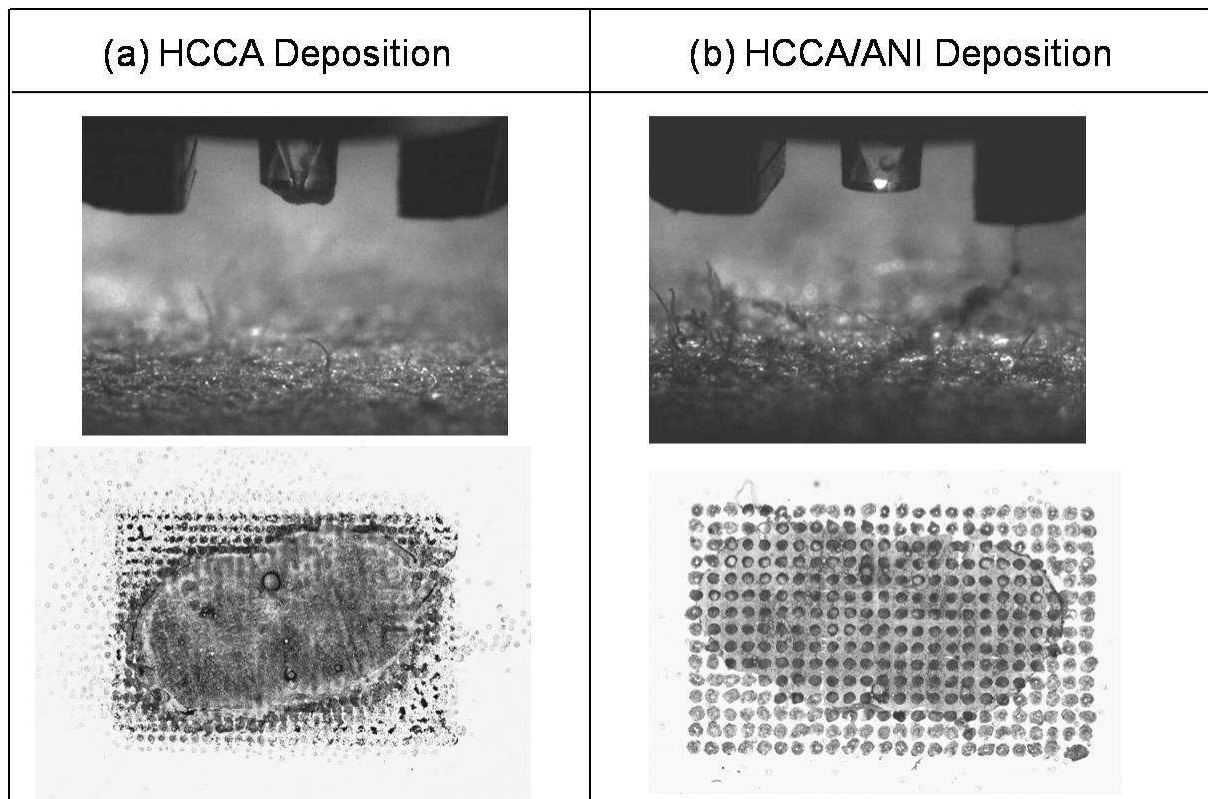


Figure S-2

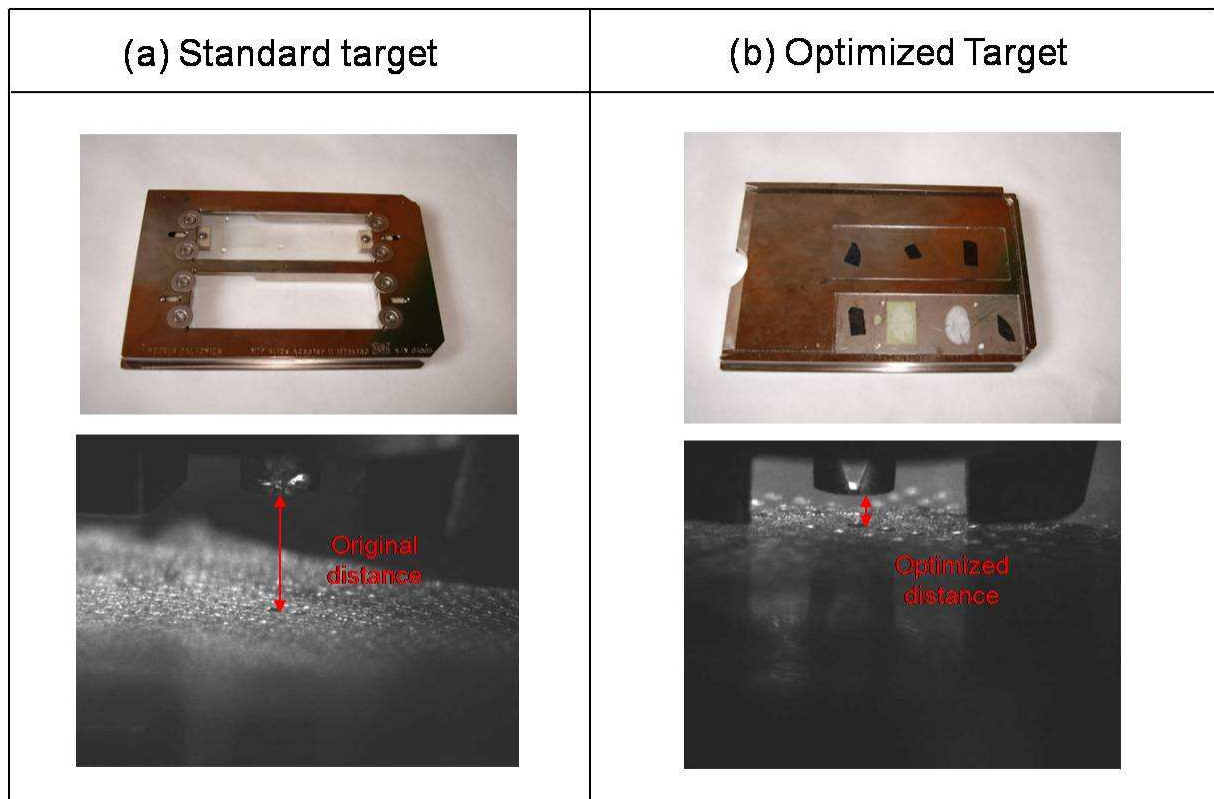


Figure S-3

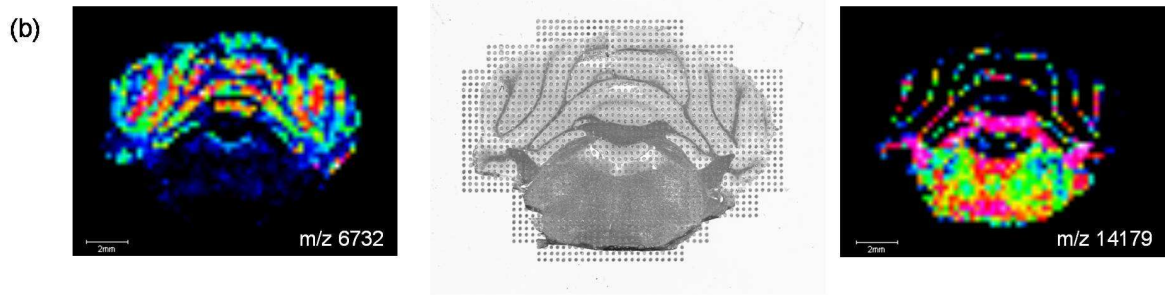
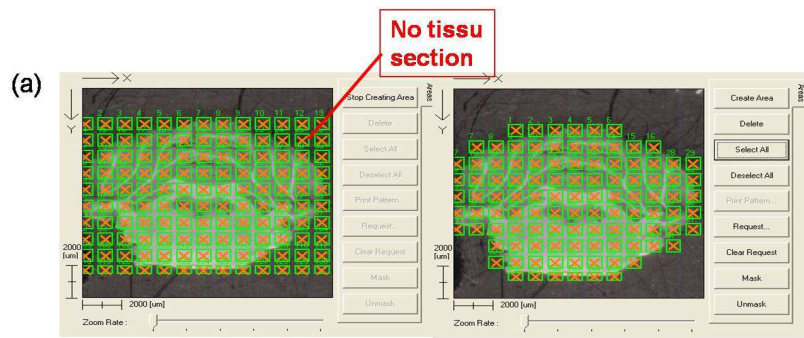


Figure S-4

**NEW DEVELOPMENTS FOR LIPIDS MALDI MASS
SPECTROMETRY IMAGING: DYE ASSISTED LASER
DESORPTION IONSATION MASS SPECTROMETRY (DALDI)**

Journal:	<i>Journal of Proteome Research</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Technical Note
Date Submitted by the Author:	
Complete List of Authors:	Arafah, Karim; University of Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933 El Ayed, Mohamed; University of Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS-FRE 2933, IFR 147 Buob, David; Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, CHRU de Lille Desmons, Annie; University of Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933 salzet, michel; University of Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933 Fournier, Isabelle; University of Lille 1, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933



**NEW DEVELOPMENTS FOR LIPIDS MALDI MASS SPECTROMETRY IMAGING:
DYE ASSISTED LASER DESORPTION IONISATION MASS SPECTROMETRY
(DALDI)**

**Karim ARAFAH¹, Mohamed El Ayed¹, David BUOB², Annie DESMONS¹, Michel
SALZET¹, Isabelle FOURNIER^{1@}**

1: Université de Lille1, CNRS, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie
des Annélides, FRE 2933, IFR 147, Bâtiment SN3, 1^{er} étage, F-59655 Villeneuve d'Ascq
Cedex, France, <http://www.maldi-imaging.com>

2: Centre de Biologie Pathologie. Service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques,
Parc Eurasanté, C.H.R.U. Lille, 59100, Lille.

ABSTRACT

Lipids are one major component of cells and present varied role in the organisms. In a general manner, they play a key role in the structural composition of membranes but some like sphingoglycolipid are also mediators in different biological processes like protein transport, cellular growth regulation, cellular morphogenesis, neuronal plasticity, immune response regulation. Considering the development of the MALDI Mass Spectrometry Imaging (MSI) technology, this class of biomolecules has recently investigated by several groups. Here we present new development for these substances. We present a method for in tissue lipid fixation with either chrome or osmium tetroxide as well as a novel ionic matrix (2,6 dihydroxyacetophenone with 2-amino-4-methyl-5-nitropyridine : DHAP/2A4M5NP). DHAP/2A4M5NP is very stable under vacuum, extracting lipids from tissue, greatly facilitating MS/MS structural studies in positive and negative modes and easy to spot or spray with robot. These novel developments have been tested on rat brain. Beside these researches, we have a novel technology for investigating these molecules by using specific dyes that have the faculty to absorb at the laser UV wavelength and that facilitate to reach specific class of lipids in positive and negative modes. The other advantage of this development that these colorant staining is clearly compatible with pathologist processes and keep the histological structure of the sample. This new method, named DALDI for Dye Assisted Laser Desorption Ionisation, opens the door to clinical investigation using exactly the pathologist procedures with the addition of a post-chromization step as a fixative for the lipids when alcohol is used as vehicle for the dissolution of the dyes. These novel developments have been tested on human ovary cancer biopsies in order to demonstrate its use as an express procedure specifically for extemporary diagnosis.

Keywords: MALDI MS Imaging, DALDI, Lipids, Brain, Ovary Cancer

@Corresponding author: isabelle.fournier@univ-lille1.fr

INTRODUCTION

Lipidic diseases come from dysfunction of the lipidic metabolism, characterized by accumulation of lipids of different types, especially cerebrosides, gangliosides or sphingomyelin in different organs. Accumulation of each particular type of lipids is the consequence of one of the specific enzyme (catalyser organics) default that normally metabolizes it in the cell. In the Gaucher disease, for example, the abnormal amount of cerebrosides accumulated in liver, spleen, bone marrow and lymphatic ganglia. The deficient enzyme is the glucocerebrosidase. Excess of lipids stocked in the cells of Gaucher, stretched, typical of the disease, disrupts the functioning of the normal cell provoking two syndromes i.e. the acute cerebral form is most prevalent in infant, who is normal at birth but present rapidly a hypotonic development failure and severe neurologic symptoms, leading to the death, generally occurring the first year of the life; the chronicle form appears later. The characteristics are an increase of the spleen volume, anaemia and a coetaneous pigmentation with brown plaques. The coronaries diseases like the Fabry disease is in this case an intra-cellular accumulation of sphingolipids, particularly, globotriacylceramide and galactosylceramide, reflecting the preponderant role of lipids.

In this optic, Fujiwaki *et al.* (1-3) have demonstrated the ratios of ceramide/monohesoxylceramide, ceramide/sphingomyéline and glucosylceramide/sphingomyeline in these two diseases as showing real difference. Similarly, Takeromi *et al.* (4) have demonstrated the utility of MALDI source for glycosphingolipids analyses in human brain. All these studies have been performed using the same technical preparation of extraction, centrifugation, and sodium carbonate treatment following lipids separation (5, 6) with sometime saponification treatment for sulfatides quantification (7). Recently, direct analyses of the biological tissue by mass spectrometry has been developed (8-10) and after proteins/peptides focused (11, 12), lipids are intensively now investigated. Ishida *et al.* then Rujoi *et al.* have used such a technology for the localisation of phospholipids and/or sphingomyelins in zooplankton, bacteria(13-15) or in calf eyes (16-18), eliminating the protocol previously described. In the same optic, imaging of phospholipids and cholesterol after direct analysis was firstly realized in SIMS-TOF in mice allowing getting a map of these molecules in a slice (19). In MALDI, the first map of lipids from

mouse or rat brain and liver by MALDI-MSI was performed very recently (20-24). In fact, the major problem with lipids is the sample preparation and the matrix. Lipids are moving a lot in tissue preparation and are dissolved in solvent used for matrix preparation. Thus, the delocalization of lipids strongly occurs. Murphy team(22) used sublimation of the a 2,5-dihydroxybenzoic acid without solvent that can dissolve the lipid in the tissue. Whereas, Burnum *et al.* have used 2,5- dihydroxyacetophenone with aniline (25) or solvent-free matrix deposition(26).

In these report, we present an ionic matrix fully suitable for MALDI-MSI studies of lipids, 2,6 dihydroxyacetophenone with 2-amino-4-methyl-5-nitropyridine (DHAP/2A4M5NP) allowing lipids extraction with a better stability under vacuum and easy to deposit using automatic robot like CHIP 1000 (Shimadzu) or spay with Imageprep (Bruker Daltonics). Besides, this specific ionic matrix, we investigate the possibility of use specific colorant agents sharing the property to absorb at UV-laser wavelength in order to desorb especially the lipids from tissue sections. After lipids fixation with chrome (27, 28) or with osmium tetroxide(29-32), coumarin dyes can directly be used without matrix. Taking into account this ability for some dyes, we tried to find some specific colorants that can be used with MALDI and specific to lipids. We stained tissue sections with either Sudan-Black B or Nile Blue A or Oil Red O, and performed molecular images without any automatic-micro-spotting device without any delocalization. This new method named DALDI open the door to clinical investigation using exactly the pathologist procedures without any other tissue treatment. This is an express procedure specifically for extemporary diagnosis.

EXPERIMENTAL PROCEDURE

Materials

2,6 dihydroxyacetophenone (2,6-DHAP), ethanol (EtOH), 2-amino-4-methyl-5-nitropyridine (2A4M5NP), water Chromasolv Plus for HPLC (H₂O), Nile Blue A, Oil red O, Black Sudan B, all certified by the Biological Stain Commission were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). 4% aqueous solution osmium tetroxyde OsO₄⁻ was purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, England). 330mm diameter filters were from Fisherbrand (Elancourt, France).

Preparation of staining solutions

Nile Blue A was diluted in water (30 mg/ml). Oil red O and Sudan black B staining solutions were diluted in a 60% ethanol solution (30mg/mL). After stirring, all staining solutions were filtered.

Rat brain cryosections and lipids fixation

Thin 10 μm tissue sections were obtained from frozen rat brain using a cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) and applied onto ITO-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Rat brain slices were then dried in a dessicator for 10 minutes and subsequently fixed in the tetroxyde osmium solution prior staining with Sudan Black B for 15 minutes. Rat brain slices stained with Nile Blue A were fixed overnight in Baker's fixative solution and post-chromized for 2hours prior lipid staining.

Baker's fixative solution: 10 ml concentrated formalin, 10% concentration of CaCl_2 and 90 mL of distilled water.

Fixation protocol of rat brain lipids with osmium tetroxyde

A 1% osmium tetroxyde was prepared in water from the 4% mother stock solution. 50 μL of the 1% running solution were deposited onto the rat brain slice and let for the fixation of lipids during 20 minutes under light cover.

Protocol for global fixation of rat brain with Baker's fixative solution

A Baker's solution was prepared mixing 10mL of a 10% CaCl_2 solution to 10mL of concentrated formalin in 90mL of HPLC grade water. Slices were dipped overnight in the baker's solution for global tissue fixation and then, washed 3 times in HPLC grade water (3 bathes 5 minutes each). Slices were then dipped in a 50mL of a 5% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ solution (m/v) and 7.5mL of formalin 4% all diluted in distilled water (HPLC grade). After 3 washes in HPLC grade water (3 bathes 5 minutes each), slices were dried for 15 minutes.

Sample Preparation

Rat brain cryosections

Thin 10 μm tissue sections were obtained from frozen rat brain using a cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) and applied onto ITO-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Rat brain slices were then dehydrated in a dessicator for 10 minutes before deposition of the ionic matrix using Chip-1000 chemical inkjet printer (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Ovarian cancer cryosections and fixation

Ovarian cancer biopsies were obtained, with informed consent and institutional review board approval (CCPPRBM Lille: CP 05/83), from patients undergoing any ovarian tumor resection at Hospital Jeanne de Flandre. Patient information was collected, including gender, age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of original pathologic diagnosis. Samples were collected at the time of surgery, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis.

Thin 12 μm were prepared from fresh ovarian cancer tissues using a cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) and applied onto ITO-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The slices were first fixed in a Baker's fixative solution overnight and then postchromized for 2 hours for non solubilized hetephasic lipids (see protocol above). After drying into a dessicator for 15 minutes, slices were dipped into the Nile Blue A or the Oil Red O staining solution for 30 minutes or 15 minutes respectively. Histopathologic diagnoses were made by an anatomopathologist, blinded to the original clinical diagnosis, from subsequent H&E-stained sections.

Matrices preparation

Preparation 2,6 dihydroxyacetophenone (2,6 DHAP) matrix

2,6 DHAP matrix was used at 15mg/mL in EtOH/H₂O (1:1; v/v). The solution was stirred until total dissolution of the matrix.

Preparation of the [2,6 DHAP/2A4M5NP] ionic matrix:

1 mole equivalent of 2,4,5 AMNP was added to 1 mole equivalent of 2,6 DHAP matrix prepared in EtOH/H₂O (1:1; v/v). Briefly, 15,1mg of the 2,4,5 AMNP ($M = 153,14 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) was first dissolved in EtOH/H₂O (1:1; v/v). The preparation was then stirred 15 minutes and placed overnight at 60°C until complete dissolution. After cooling at room temperature, 15 mg of the 2,6 DHAP matrix ($M = 152,15 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) were added to the solution and stirred briefly until dissolution of 2,6 DHAP. The ionic matrix can be used just after synthesis or kept several days at 60°C for further uses.

Matrix deposition

20 nL of 2,6 DHAP in EtOH/H₂O (1:1; v/v) were deposited using the CHIP-1000. The spots were spaced by 250 μm center to center and 5 droplets of 100 pL were deposited at each spot per cycle, then 40 iterations were necessary to obtain the final volume. The solid ionic matrix DHAP/2A4M5NP was prepared and deposited using CHIP-1000 using the same parameters as for 2,6 DHAP. 2,6 DHAP was deposited onto the half-left part of the brain section and DHAP/2A4M5NP onto the half-right part.

Mass Spectrometry Imaging of lipids

Molecular images were acquired using an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a Smartbeam laser having a repetition rate up to 200 Hz and controlled by FlexControl 3.0 (Build 158) software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Images were performed in negative reflector mode and MALDI MS spectra were acquired in the 200-1500 m/z range. A total of 500 spectra were acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were saved and reconstructed using FlexImaging 2.1 (Build 15) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

Statistical data analysis. Symbolic discriminant analysis (SDA) was used to analyze the lipid profiles. SDA allows determining discriminatory signals and builds functions using these signals that distinguish sample populations based on their classification. Peak lists from MALDI spectra obtained with *Flex analysis 2.4* and *Flex control 2.5* input into the analysis program were clustered according to similarity, using a presence/absence criterion. Statistical analyses were carried out using the ClinProTools 2.2 Software. For the statistical analyses, the mass spectra were internally recalibrated on common peaks (also known as spectral

alignment) and normalized on the total ion count. An average spectrum created from all single spectra was used for a peak picking and to define integration ranges. These integration ranges were used to obtain the intensities or areas on the single spectra. The signal intensities were used for all calculations. For the principal component analysis and the hierarchical clustering, the individual peak intensities were standardized across the data set (12). The PCA was carried out using Pareto scaling, which uses the square root of the standard deviation as a scaling factor to reduce the dominance of large-scale intensity changes in the matrix and other high-abundance ions, as these may mask variation in lower abundance ions during PCA. The overall outcome of PCA is greatly affected by the masking of the underlying relevant information by ions relating to matrix coating and other endogenous molecules. A plot of principal component 1 (PC1) versus principal component 2 (PC2) was chosen since these components resulted in the highest overall degree of separation of the spectra within the PCA scores plots. Under unsupervised PCA each spectrum is classed as an individual so the principal components are selected which account for the greatest separation of each of the individual spectra. At the top of each of the scores and loadings plots. The principal components that have been plotted are shown, with the percentage variance, or the percentage of the variance accounted for from each of the principal components.

RESULTS

Ionic matrix for lipids

Lipids are largely and highly soluble in matrix solutions and can easily and quickly diffuse within tissues. Free solvent matrix deposition is a good alternative to minimize delocalization of lipids and generate very thin and homogenous crystallization polycrystalline layers of matrix(26, 33), although, fewer lipid species are generally observed using such approaches. Micro-spotting however is again a good compromise between analytical performances and analyte delocalization. In these cases, we have developed a novel ionic matrix which is easy to micro-spot with an automatic robot. This matrix is a combination of 2,6 dihydroxyacetophenone (2-6 DHAP) with 2-amino 4-methyl 5-nitropyridine (2A4M5NP) (**Figure 1A**). 2A4M5NP was previously used for reaction with HCCA, and HCCA/2A4M5NP has shown to present increased performances for tissue analysis (34). Half-left and half-right sides of the brain were respectively micro-spotted with 2,6 DHAP and 2,6 DHAP/2A4M5NP. Immediately after spotting of matrices, an optical scanning of the tissue

section was performed to observe matrix crystallization of the 2,6 DHAP matrix (**Figure 1A**) and the ionic matrix 2,6 DHAP/2A4M5NP (**Figure 1B**). This same tissue slices were then scanned after 12H under high vacuum inside the MALDI source of the instrument (**Figure 1B**) after having recorded molecular images of lipids(**Figure 1D-E**) with respectively 2,6 DHAP matrix and 2,6 DHAP/2A4M5NP ionic matrix.. As observed from the pictures, 2,6 DHAP micro-spots have partially disappeared especially from the top and outside of the tissue section. This is due to matrix sublimation under vacuum conditions. In fact, 2,6 DHAP is known to present interesting properties for lipids analysis(35) from tissue sections but also to be very unstable under vacuum(35). By comparison, 2,6 DHAP/2A4M5NP matrix micro-spots were still present. Ionic matrices have proved to be extremely stable under vacuum conditions (34) as exemplified here. Average mass spectra recorded after 12H under vacuum conditions show very low level of detection for lipids with 2,6 DHAP matrix whereas high intense signals are observed with DHAP/2A4M5NP ionic matrix (**Figure 1C**). This is confirmed by the molecular images recorded with both matrices as shown (**Figure 1D to E**) for m/z 302 and m/z 408 ions. MALDI images obtained using 2,6 DHAP/2A4M5NP show a good correlation between the molecular images and the rat brain tissue structures whereas localization is rather unclear with 2,6 DHAP (**Figure 1D-E**). These observations are confirmed on the other molecular images reconstructed from lipid signals ranging from m/z 300 to 1000 (**Figure 2A**). As an ionic matrix with 2A4M5NP, 2,6 DHAP is much more stable under vacuum conditions since ionic matrices do present a much higher sublimation temperature and the number lipid species detected with this matrix is higher than with 2,6 DHAP (**Table 1**). Few images obtained from ions only observed with the ionic matrix 2,6 DHAP/2A4M5NP are presented **Figure 2B**. For all ions, a good correlation with the structures of the brain is observed using the ionic matrix. The ionic matrix combines both the analytical performances of 2,6 DHAP with stability under vacuum. It is also much more compatible with micro-spotting mode of matrix deposition. In fact, ionic matrices because of lower vapor pressure and slower crystallization have shown to be much better suited for micro-spotting devices. Thus, 2,6 DHAP/2A4M5NP is a new ionic matrix for lipids analysis with very interesting properties with respect to MALDI-MSI applications.

Lipids fixation and Dye Assisted Laser Desorption /Ionization (DALDI) lipids MALDI-MSI

As mentioned above, one of the major problems with lipids are their plasticity, high diffusion and high solubility. This makes difficult to ensure that lipids are not diffusing during tissue preparation. This is also a difficulty for matrix solution application. In order to solve these problems, we have studied specific tissue fixation for lipids before any other tissue treatment. For this purpose, we have used either osmium tetroxide or chrome fixation based on electronic microscopy protocols(27-32). Fixation of lipids shall avoid their delocalization within the tissue sections during manipulations prior to MS analysis. Because matrix addition is one of the difficulties of lipids imaging and because lipids are rather volatile compounds easy to desorb under laser irradiation, we looked for using staining molecules as MALDI matrix. Though, it should be possible to fixe lipids using Baker's solution and stained tissue sections for histology analysis and then reuse the same sections for MALDI-MSI without any further treatment of the tissue section. Such a technology is called "Dye Assisted Laser Desorption Ionization (DALDI). Fixed tissue sections were thus immerged in specific colorant solutions which are fluorescent hydrophobic probe. We used Nile blue A (**Figure 3B**) which is specific of phenoxazone basic dye and specific of neutral and acidic lipids as phospholipids like phosphatidylcholine as well. Acidic dyes like the Oil red O (**Figure 3C**), a diazo dye specific for cholesteryl esters and neutral fats as triacylglycerols or the black Sudan (**Figure 3A**), also a diazo dye that stains triglycerides and lipoproteins were assessed for imaging lipids with the MALDI technology. Nile blue A, Oil Red O and Sudan Black B present UV absorptions λ equal to 340 nm, 359 nm and 415 nm, which all are in the same λ than the MALDI UV laser absorption wavelength range.

Based on such properties, rat brain sections were treated with Baker and post-chromization and stained with colorant dyes. For Sudan Black section a step is added by a treatment with osmium tetroxide before coloration in order to ensure that no delocalization can occurs due to the presence of ethanol as vehicle for the dissolution of the dye.

As presented in **Figure 4**, mass spectra and molecular images comparison between osmium tetroxide fixed and stained with Sudan black (**Figure 4B & 3D**) or not (**Figure 4A & 3C**), shown better lipids detection and structure preservation in fixed tissue. Comparison of molecular images for identical ions in both cases shows a very good localization in specific regions without any osmium tetroxide-fixed tissue (**Figure 4D**). Triglycerides, sulfatides, diglycerides, sphingomyeline and fatty acids are much better detected with Sudan Black B

with fixation whereas phospholipids are better detected with Sudan Black without fixation (**Table 2**). In contrary, phospholipids are better detected with Sudan Black without fixation (**Table 2**) but the spatial localization of these compounds is completely lost (**Figure 4C**), washed by the ethanol/water vehicle once the slide deeped into the staining solution. In the case of Nile Blue A, after fixation with the Baker fixative solution and post-chromization of lipids for their insolubilization, negative and positive modes can be used (**Figure 5**). In positive mode, diglycerides, sphingomyelin, phospholipids, triglycerides and sulfatides are localized with respect to the rat brain anatomy (**Figure 5C, Table 3**). The last dye, Oil red O allows the detection of all these lipids but also gangliosides (Not shown). These data reflect real complementary methods for lipids localization due to the possibility to get access to negative and positive modes. Molecular images reinforce this assumption (**Figures 5B, 5D**). Experiments were also performed using Oil Red O staining in combination with fixation process (data not shown). Similar observations can be drawn from these experiments. Better correlation between tissue structures is again obtained for fixed samples. However, with Oil Red O, different classes of lipids are better analyzed like PE 42:11, PE 44:11, ST-OH 40: 0, ST-OH 42:1, ST-44:1. . These experiments highlight the interest of performing lipids fixation to avoid diffusion of such species inside tissue section. This also shows that classical dyes for lipids can advantageously replace classical MALDI matrices for lipids analysis. Thus, it is possible to prepare a tissue section for histological studies of lipids contains within tissue sections and thus, thereof, such sections for MALDI-MSI. This provides an interesting alternative avoiding difficulties due to matrix application. Moreover, a good quality of spectra at least equal to what is obtained with 2,6 DHAP is recorded using these dyes as matrices.

Application to pathology: Ovary cancer

In order to investigate, these developments on pathology, we tested Nile Blue A and Oil Red O on serous ovarian carcinoma after osmium fixation (**Figure 6, Table 4**). Principal component analyses were performed on the biopsies allowing to define two regions have been detected (**Figure 7**). As observed from **Table 4**, more lipid species are detected with the Nile blue A than with the Oil Red O for ovarian cancer biopsies. However, considering PCA analyses, some specific ions (421.84, 422.85, 407.35) have been detected in the tumor region with Oil red O (**Figure 8**). These ions may correspond to the hexacosadienoic acid C22:6 (407.35), the phosphatidic acid PA 17:1 (421.23) and the sphinganine CerP2:0 (422.26). With Nile Blue A, the results are successful as well. Some specific ions have been detected in the

tumor region after PCA analyses (**data not shown**) like the 255.63 (palmitic acid), the 303.29 (arachidonic acid), the 283.63 (hexadecoid acid), the 282.25 (C18:0) or the 369.14 which is unknown (**Table 4**). These data are in line with previous studies having shown that fatty acid compositions of ceramide and sphingomyelin isolated from tissues are significantly different: the predominant acids are oleic (18:1) in ceramide and palmitic (16:0) in sphingomyelin, which contains much more other saturated acids. These differences are characteristic of both normal and tumor tissues. Sphingoid base compositions of ceramide and sphingomyelin in normal tissue are identical: the major component is sphingenine (over 96%), while ceramides from tumors contain, in addition to sphingenine, a significant amount of sphinganine. In sphingomyelins from tumours, sphinganine content is significantly lower than in ceramides and depends on the type of tumour (36, 37). Considering our data, applying Oil red O and Nile blue A as coloring agents to study ovarian carcinoma not only succeed in detecting lipids from this tissue by MALDI MSI but put also forward the capability of DALDI MSI to highlight potential biomarkers like sphingenine in combination with PCA analyses.

DISCUSSION

DALDI is a novel technology to investigate lipidomic in context of clinical studies. Profiling and molecular images can be easily obtained without any delocalization especially after osmium or chrome fixation while avoiding difficulties due to matrix application by using classical dyes as MALDI matrix for lipids analysis. This implies that tissues as prepared for lipids histological studies can be directly used to retrieve molecular information without any further treatment of samples. This is a method that could be implemented in hospital for pathologists all the more since no sprayer or spotter is needed here. The big difficulty is performing a good diagnosis in extemporary biopsy. This can be conducted with histochemical colorant dyes used by the pathologist. The difference occurs at the level of the analysis. Pathologist based it on the tissue coloration and DALDI does now provide molecular diagnostic in a same slide just putting the slide in a MALDI instrument without any other treatment including matrix recall for histochemical staining. This can be named, DALDI clinical diagnosis: DCD. The Ovarian cancer example has shown the feasibility of such concept and maintained that after fixation and staining with the specific dyes assessed here i.e. Nile Blue A and Oil red O are very selective and allows to detect very specific lipid markers in the tumor region. These data will give a real new input for pathologists in order to give a clear and very quick diagnostic. Moreover, these lipid-related dyes give us interesting

insights regarding the possibility to detect preferentially some groups of lipids over others taking into account the chemical properties of basic dye as Nile Blue A or acidic as Sudan Black B or Oil Red O in addition with the working solvent. In comparison, the widely used matrices giving poor drawbacks in low m/z for the investigation of lipids in mass spectrometry are acidic. As seen in this report, the Nile Blue A dissolved in water is more lipophilic with neutral and acidic lipids taking affinity with phospholipids and sulfatides in negative mode whereas much more lipids are detected in positive mode according to the basic property of this dye (Table 3). In this latter mode of detection, the Nile Blue A covers fatty acids, glycerides, sphingo and phospholipids. The use of this dye takes advantage in its better partition into hydrophobic tails of lipids instead of water when the slices are deeped into this staining solution. As a consequence of the water vehicle, a minimized délocalization can easily be corrected just by fixation of the biological sample slice in Baker's fixative following by a post-chromization step.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Éducation Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF).

REFERENCES

1. Fujiwaki, T., Tasaka, M., and Yamaguchi, S. (2008) Quantitative evaluation of sphingomyelin and glucosylceramide using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with sphingosylphosphorylcholine as an internal standard. Practical application to tissues from patients with Niemann-Pick disease types A and C, and Gaucher disease. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 870, Page.
2. Fujiwaki, T., Yamaguchi, S., Tasaka, M., Sakura, N., and Taketomi, T. (2002) Application of delayed extraction-matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for analysis of sphingolipids in pericardial fluid, peritoneal fluid and serum from Gaucher disease patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 776, Page.
3. Fujiwaki, T., Yamaguchi, S., Tasaka, M., Takayanagi, M., Isobe, M., and Taketomi, T. (2004) Evaluation of sphingolipids in vitreous bodies from a patient with Gaucher disease, using delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 806, Page.
4. Taketomi, T., Hara, A., Uemura, K., and Sugiyama, E. (1996) Rapid method of preparation of lysoglycosphingolipids and their confirmation by delayed extraction matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Biochem* 120, Page.

5. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, Page.
6. Lebaron, F. N., and Folch, J. (1959) The effect of pH and salt concentration on aqueous extraction of brain proteins and lipoproteins. *J Neurochem* 4, Page.
7. Calvert, G. D., Blight, L., Illman, R. J., Topping, D. L., and Potter, J. D. (1981) A trial of the effects of soya-bean flour and soya-bean saponins on plasma lipids, faecal bile acids and neutral sterols in hypercholesterolaemic men. *Br J Nutr* 45, Page.
8. Caprioli, R. M., Farmer, T. B., and Gile, J. (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 69, Page.
9. Fournier, I., Day, R., and Salzet, M. (2003) Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett* 24, Page.
10. Jimenez, C. R., Li, K. W., Dreisewerd, K., Spijker, S., Kingston, R., Bateman, R. H., Burlingame, A. L., Smit, A. B., van Minnen, J., and Geraerts, W. P. (1998) Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of single neurons reveals differential peptide patterns in a small neuronal network. *Biochemistry* 37, Page.
11. Caprioli, R. M. (2005) Deciphering protein molecular signatures in cancer tissues to aid in diagnosis, prognosis, and therapy. *Cancer Res* 65, Page.
12. Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., Bonnel, D., Vergara, D., Jacquet, A., Vinatier, D., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., and Salzet, M. (2009) MALDI IMAGING: State of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, Page.
13. Ishida, Y., Kitagawa, K., Nakayama, A., and Ohtani, H. (2005) On-probe sample pretreatment for direct analysis of lipids in gram-positive bacterial cells by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 71, Page.
14. Ishida, Y., Madonna, A. J., Rees, J. C., Meetani, M. A., and Voorhees, K. J. (2002) Rapid analysis of intact phospholipids from whole bacterial cells by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry combined with on-probe sample pretreatment. *Rapid Commun Mass Spectrom* 16, Page.
15. Ishida, Y., Nakanishi, O., Hirao, S., Tsuge, S., Urabe, J., Sekino, T., Nakanishi, M., Kimoto, T., and Ohtani, H. (2003) Direct analysis of lipids in single zooplankton individuals by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Chem* 75, Page.
16. Rujoi, M., Estrada, R., and Yappert, M. C. (2004) In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue. *Anal Chem* 76, Page.
17. Rujoi, M., Jin, J., Borchman, D., Tang, D., and Yappert, M. C. (2003) Isolation and lipid characterization of cholesterol-enriched fractions in cortical and nuclear human lens fibers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, Page.
18. Yappert, M. C., Rujoi, M., Borchman, D., Vorobyov, I., and Estrada, R. (2003) Glycero- versus sphingo-phospholipids: correlations with human and non-human mammalian lens growth. *Exp Eye Res* 76, Page.
19. Touboul, D., Halgand, F., Brunelle, A., Kersting, R., Tallarek, E., Hagenhoff, B., and Laprevote, O. (2004) Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal Chem* 76, Page.
20. Astigarraga, E., Barreda-Gomez, G., Lombardero, L., Fresnedo, O., Castano, F., Giralt, M. T., Ochoa, B., Rodriguez-Puertas, R., and Fernandez, J. A. (2008) Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Anal Chem* 80, Page.
21. Mikawa, S., Suzuki, M., Fujimoto, C., and Sato, K. (2009) Imaging of phosphatidylcholines in the adult rat brain using MALDI-TOF MS. *Neurosci Lett* 451, Page.
22. Murphy, R. C., Hankin, J. A., and Barkley, R. M. (2009) Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J Lipid Res* 50 Suppl, Page.

23. Sugiura, Y., Konishi, Y., Zaima, N., Kajihara, S., Nakanishi, H., Taguchi, R., and Setou, M. (2009) Visualization of the cell-selective distribution of PUFA-containing phosphatidylcholines in mouse brain by imaging mass spectrometry. *J Lipid Res*, Page.
24. Sugiura, Y., Shimma, S., Konishi, Y., Yamada, M. K., and Setou, M. (2008) Imaging mass spectrometry technology and application on ganglioside study; visualization of age-dependent accumulation of C20-ganglioside molecular species in the mouse hippocampus. *PLoS One* 3, Page.
25. Burnum, K. E., Cornett, D. S., Puolitaival, S. M., Milne, S. B., Myers, D. S., Tranguch, S., Brown, H. A., Dey, S. K., and Caprioli, R. M. (2009) Spatial and temporal alterations of phospholipids determined by mass spectrometry during mouse embryo implantation. *J Lipid Res*, Page.
26. Puolitaival, S. M., Burnum, K. E., Cornett, D. S., and Caprioli, R. M. (2008) Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom* 19, Page.
27. Purbach, B., Hills, B. A., and Wroblewski, B. M. (2002) Surface-active phospholipid in total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*, Page.
28. Kotelnikov, V. M., and Litinskaya, L. L. (1981) Comparative studies of Feulgen hydrolysis for DNA. I. Influence of different fixatives and polyethylene glycols. *Histochemistry* 71, Page.
29. Collin, R., Griffith, W. P., Phillips, F. L., and Skapski, A. C. (1974) Staining and fixation of unsaturated membrane lipids by osmium tetroxide. Crystal structure of a model osmium(VI) di-ester. *Biochim Biophys Acta* 354, Page.
30. Collin, R., Griffith, W. P., Phillips, F. L., and Skapski, A. C. (1973) Staining and fixation of unsaturated membrane lipids by osmium tetroxide: crystal structure of a model osmium(VI) intermediate. *Biochim Biophys Acta* 320, Page.
31. Litman, R. B., and Barnett, R. J. (1972) The mechanism of the fixation of tissue components by osmium tetroxide via hydrogen bonding. *J Ultrastruct Res* 38, Page.
32. Riemersma, J. C. (1968) Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy. A possible reaction mechanism. *Biochim Biophys Acta* 152, Page.
33. Hankin, J. A., Barkley, R. M., and Murphy, R. C. (2007) Sublimation as a Method of Matrix Application for Mass Spectrometric Imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, Page.
34. Lemaire, R., Tabet, J. C., Ducoroy, P., Hendra, J. B., Salzet, M., and Fournier, I. (2006) Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 78, Page.
35. Jackson, S. N., Ugarov, M., Post, J. D., Egan, T., Langlais, D., Schultz, J. A., and Woods, A. S. (2008) A study of phospholipids by ion mobility TOFMS. *J Am Soc Mass Spectrom* 19, Page.
36. Rylova, S. N., Somova, O. G., and Dyatlovitskaya, E. V. (1998) Comparative investigation of sphingoid bases and fatty acids in ceramides and sphingomyelins from human ovarian malignant tumors and normal ovary. *Biochemistry (Mosc)* 63, Page.
37. Dyatlovitskaya, E. V., Andreasyan, G. O., Malykh Ya, N., Rylova, S. N., and Somova, O. G. (1997) Ganglioside shedding and changes in ceramide biosynthesis in human ovarian tumors. *Biochemistry (Mosc)* 62, Page.

Table & Figure Captions

Tables

Table 1: Comparison of lipid species detected after on tissue application of 2,6 DHAP vs. 2,6 DHAP/2A4M5NP (in red).

Table 2: Comparison of lipid species detected after on tissue application of Black Sudan coloration with or without previous lipid fixation with osmium tetroxide

Table 3: Comparison of lipid species detected after on tissue application Nile blue A in positive and negative modes

Table 4: Comparison of lipid species detected after on tissue application with either Oil red O or Nile Blue A. This study was performed on human ovarian cancer biopsy.

Figures

Figure 1: (A-B) rat brain tissue sections pictures after microspotting matrix application with DHAP and DHA/2A4M5NP matrix taken just after the end of matrix application (A) and after 12H under high vacuum conditions in the MALDI source of the instrument (B). (C) Comparison of MALDI mass spectra recorded from the tissue sections 12H under high vacuum conditions for DHAP and DHA/2A4M5NP matrices. (D-E) Molecular images reconstructed for ions at m/z 302 (D) and 409 (E) from rat brain tissue sections with DHAP and DHA/2A4M5NP matrix.

Figure 2: (A) comparison of molecular images reconstructed from various ions observed with both DHAP and DHA/2A4M5NP matrix from rat brain tissue sections and (B) molecular images from the same acquisition of ions only detected with DHA/2A4M5NP matrix. (C) Developed formula of DHAP and DHA/2A4M5NP matrix

Figure 3: Developed chemical formula of studied dyes (A) Sudan Black, (B) Nile Blue A and (C) Oil Red O.

Figure 4: Comparison of tissue profiling and imaging from rat brain tissue sections after osmium tetroxide fixation followed by Sudan Black staining. **(A-B)** MALDI mass spectra recorded from the tissue in positive mode for Sudan Black staining after **(B)** or not **(A)** osmium tetroxide fixation. **(C-D)** molecular images reconstructed for various ions after tissue imaging in the positive mode for Sudan Black staining after **(D)** or not **(C)** osmium tetroxide fixation.

Figure 5: Comparison of tissue profiling and imaging from rat brain tissue sections after chrome fixation followed by Nile Blue A staining. **(A-B)** Comparison of MALDI mass spectra recorded from the tissue in positive **(B)** versus negative **(A)** mode. **(C-D)** molecular images reconstructed for various ions after tissue imaging for Sudan Black staining after chrome fixation in the positive mode **(D)** versus negative mode **(C)**.

Figure 6: MALDI mass spectra and molecular images obtained for the analysis of serous ovarian cancer biopsy sections after fixation and staining with different dyes. **(A-B)** Comparison of MALDI mass spectra recorded from the tissue sections in the positive mode for Nile Blue A **(A)** versus Oil Red O **(B)** staining. **(C-D)** molecular images reconstructed for various ions after tissue imaging in the positive mode for Nile Blue A **(C)** versus Oil Red O **(D)**.

Figure 7: PCA analysis for serous ovarian cancer biopsy sections after tissue fixation and Oil Red O staining.

Figure 8: Reconstructed molecular images of some of the ions found to be differentially expressed in specific regions of the ovarian serous cancer tissue section after PCA analysis.

DHAP experimental mass (u.)	DHAP Intensity (a.u.)	DHAP-2A4M5NP experimental mass (u.)	Intensity (a.u.)	Calculated mass (u.)	Identified species	Other identification	Calculated mass (u.)
n.o.		263.17	975.24	263.16	C16:4(OH)		
n.o.		272.45	4371.35				
n.o.		287.55	2253.06	287.23	C16:0(H ₂ O)		
302.07	117.4	301.96	9823.91				
328.99	1140.29	n.o.		329.26	MG 16:0		
341.86	116.59	n.o.		341.31	MG 18:1		
404.11	123.51	n.o.					
408.99	9.06	409.14	1803	409.23	PA 16:0		
n.o.		423.68	3505.68				
n.o.		317.95	2727.46				
n.o.		451.1	10848.78	451.28	PA 19:0		
531.51	1304.41	n.o.		531.4	DAG 30:4		
n.o.		602.39	1836.12	602.39	PE 26:2		
680.44	228.88	n.o.		680.43	PE 32:5		
n.o.		790.62	1140.48	790.56	PS 36:0	PE(18:0/22:6)	790.54
n.o.		835.24	901.05	835.53	PI 34:1	PG 41:6	835.55
n.o.		863	269.66	862.61	ST 40:1		
n.o.		879.06	819.16	878.06	ST-OH 40:1	PIP 32:5	879.40
n.o.		886.01	1704.21	886.62	ST 42:3		
890.05	137.22	890.23	1444.68	890.6	ST 42:1		
907.1	195.78	907.59	2948.15	907.63	ST-H ₂ O 42:1		

n.o. not observed

Table 1

Experimental mass (u.)	Experimental intensity (a.u.)	Identified species	Calculated mass (u.)	Precision (u.) $\Delta M(\text{exp-theo})$	Other identification	Calculated mass (u.)
Black Sudan. Negative Mode. Without Fixative						
249.20	509.80	C16:3	249.19	0.01		
255.65	175.58	C16:0	255.23	0.42		
282.85	124.09					
309.54	92.13	C20:1	309.28	0.26		
335.95	101.25	C22:2	335.3	0.65		
443.41	1354.61					
456.65	1094.44					
880.33	357.85	PS(22/5:22/6)	880.51	-0.18		
882.85	402.36	PC(O-18:0/26:2)	882.73	0.12	PC(O-18:1/26:1)	882.73
890.76	4224.96	ST 42:1	890.63	0.13		
904.55	109.09	ST-OH 42:2	904.62	-0.07	PS 45:6	904.60
906.72	1556.30	ST-OH 42:1	906.62	0.10	PS 45:5	906.62
1130.14	33.58	GL 72:6	1130.01	0.13		
Black Sudan. Negative Mode. With OsO4 fixative						
246.74	604.77					
255.24	136.65	C16:0	255.23	0.01		
265.54	247.25	C16:3(OH)	265.18	0.36	C16:2(Ep) C16:2(Ke)	
283.37	524.4	C18:0	283.26	0.11		
309.56	122.34	C20:1	309.28	0.28		
443.1	1138.72					
456.83	3194.84					
463.13	602.41	SM 0:0	463.33	-0.2		
466		sphinganine SM0:0	465.34	0.66		
695.07	290.88	GL 42:6	695.56	-0.49		
880.49	1648.57	PS(22/5:22/6)	880.51	-0.02		
883.68	350.10	PG 44:3	883.64	0.04	PI(38:5) PA(49:1)	883.53 883.71
900.63	213.14	ST-OH 42:2	900.60	0.03		
906.69	4423.35	ST-OH 42:1	906.62	0.07	PS 45:5	906.62
921.72	207.69	PA 52:3	921.73	-0.01	PC 46:4	921.71
1020.03	256.33	PI 47:0	1019.75	0.28	PI(44:4)	149.61
1050.91	315.44	PI(24:4/26:2)	1049.71	1.2		

Tableau 2

experimental mass (u.)	Intensity (a.u.)	Calculated mass (u.)	Identification [M-H] ⁺ species	Precision (u.) ΔM(exp-theo)	Other identification	Calculated mass (u.)
Nile Blue A, Negative mode						
197.49	3902.22					
288.51	368.11					
506.31	41.16	506.36	PC(O-18:1/0:0)	-0.05		
524.2	44.53	524.27	PE 22:6	-0.07	PE(18:0)	524.29
631.28	59.41					
720.42	48.13	720.46	PE 35:6	-0.04	PC(32:6)	740.46
739.46	55.23	739.58	GL 44:5	-0.12	GL(45:5)	739.62
782.59	38.76	782.65	CerP(d18:1/24:0)	-0.06		
811.58	78.54	811.67	SM 24:1	-0.09	PA(44:2)	811.62
882.47	102.15	882.52	PS 44:10	-0.05		
892.7	124.26	892.63	ST 42:0	0.07		
907.1	254.58		ST-OH?			
923.34	121.53	923.47	PIP 35:4	-0.13		
1039.91	67.22	1040	GL 66:2	-0.09		
Nile Blue A, Positive mode						
184.16	9232.86	184	Pcho	0.16		
274.12	2686.91					
281.24	2627.66	281.24	C18:2	0		
291.07	n.d.		C14 species			
303.16	2509.41	303.25	MG(14:0)	-0.09		
332.36	782.84					
405.21	19561.98	405.29	MG 22:5	-0.08		
422.22	790.54	422.26	CerP 2:0	-0.04		
441.32	362.78	441.39	DG 24:1	-0.07		
459.26	11859.23	459.25	PA 20:4	0.01		
474.29	1813.26	474.26	PE 18:4	0.03		
502.3	411.57	502.29	PE 18:4	0.01		
583.38	671.51	583.39	PG 23:0	-0.01	PG 22:0	583.36
613.32	3002.18	613.38	PA 30:4	-0.06		
618.45	4292.47	618.48	Sphinganine CerP 16:0	-0.03		
634.5	3627.95	634.48	PC 26:1/PE 29:1	0.02	sphinganine Cer20:0 (K)	634.55
722.56	2428.58	722.54	Sphingosine CerP 24:4	0.02	PS 32:0	722.53
740.43	452.38	740.45	PS 33:5	-0.02		
760.42	534.19	760.41		0.01	PS 33:6 (Na)	760.41
789.36	656.52	789.39	PIP 26:2	-0.03		
861.48	213.14	861.49	PIP(O-18:O-13)	-0.01		
879.67	1313.8	879.68	PA 49:4	-0.01		
915.47	1072.62	915.49	PIP 34:2	-0.02		
1072.17	295.05	1072.06	GL 68:0	0.11		

Table 3

experimental mass (u.)	Intensity (a.u.)	Calculated mass (u.)	Identification [M-H] ⁺ species	Precision (u.) ΔM(exp-theo)	Other identification	Calculated mass (u.)
Ovarian Cancer Oil Red O						
183.93	1251.67					
200.01	4630.16	200.1	C10:1(H ₂ O)	-0.09		
284.06	3601.5					
285.12	2085.36	285.13	C14:3	-0.01		
300.14	979.61	300.29	Sphinganine Cer0:0	-0.15		
305.22	102.43	305.24	eicosatrienoic acid C20:3	-0.02		
407.35	316.87	407.35	hexacosadienoic acid C22:6	0		
421.23	1665.04	421.23	phosphatidic acid PA 17:1	0		
422.23	950.02	422.26	sphinganine CerP2:0	-0.03	PE(14:1/0:0)	
452.24	332.77	452.26	PE 16:0	-0.02		
536.38	64.74	536.37	PC 19:0	0.01		
552.32	14	552.33	PS 20:0	-0.01	PE 22:0	
553.37	73.64	553.36	phosphoglyceride PG 21:0	0.01	C30:5	
604.4	176.43	604.39	PE 26:1	0.01		
620.48	40.23	620.46	PE(O-16:0/12:0)	0.02	PE(O-18:0/10:0). PC(25:0/0:0)	
785.66	35.54	785.65	sphingomyelin 22:0	0.01	PA(O-18:1/25:0). GL 47:3	
886.64	14.83	886.63	PC 44:7	0.01		
Ovarian Cancer, Nile Blue A						
163	7626.05	163.07	C10:4	-0.07		
196.1	2648.07					
200.15	2001.34					
255.63	68.22	255.23	C16:0	0.4		
282.27	154.24		C18:0			
283.63	109.29		DiCH3C16:0			
285.12	471.76	285.15	C18:6(Ep)	-0.03	C18:6(Ke)	
291.1	791.68	291.19	C18:4(OH)	-0.09	C18:3(OH)-cyclo	
297.43	345.03	297.25	C18:1(OH)	0.18		
300.45	756.37	300.29	Sphinganine Cer0:0	0.16		
303.29	152.44	303.24	C20:4	0.05		
326.31	494.43					
369.14	342.95					
384.95	429.95					
405.9	578.21					
459.12	200.28	459.25	PA 20:3	-0.13		
474.1	175.31	474.26	PE 18:3	-0.16		
579.37	35.15	579.49	TG 33:1	-0.12		
600.51	109.71	600.33	PS 24:4	0.18	SphingosineCer18:0(Cl-) Sphinganine Cer18:1(Cl-)	600.51
614.5	128.67	614.46	sphingosineHexCer10:0	0.04		
721.73	127.61	721.7	TG 44:0	0.03	DAG 33:0	721.54
740.75	449.28	740.45	PC 33:4	0.3		
881.18	110.47		TG?			
896.1	31.25		TG?			
935.26	34.51	935.46	PIP 36:5	-0.2		
978.46	31.96	979.53	PIP 39:4	-1.07		

Table 4

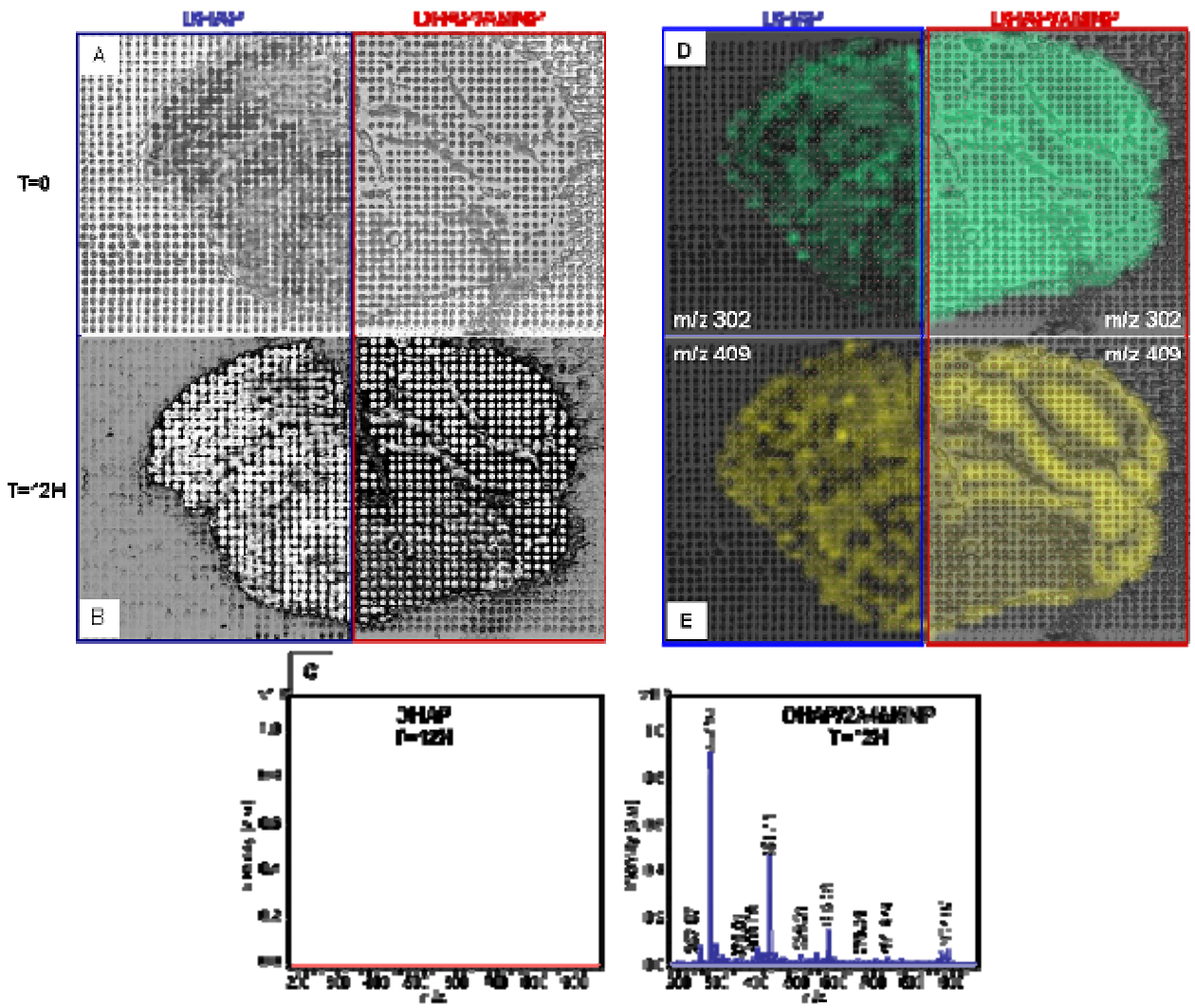


Figure 1

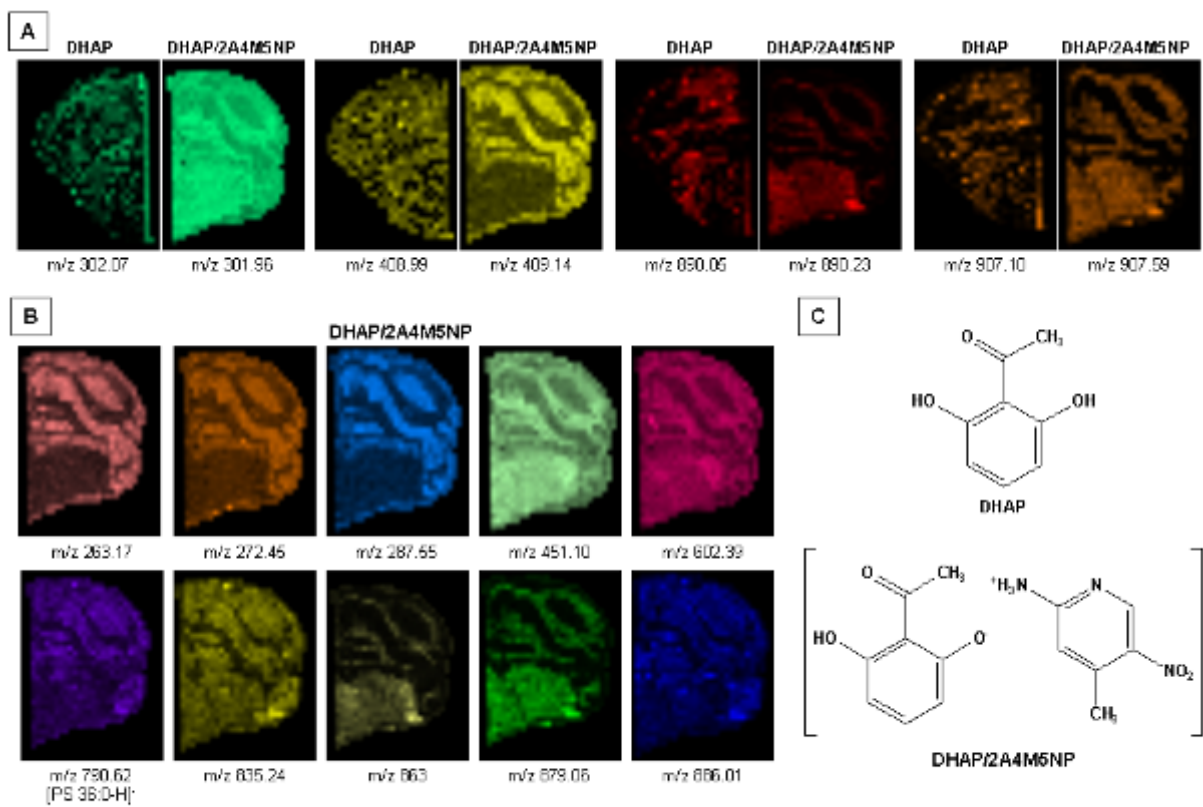


Figure 2

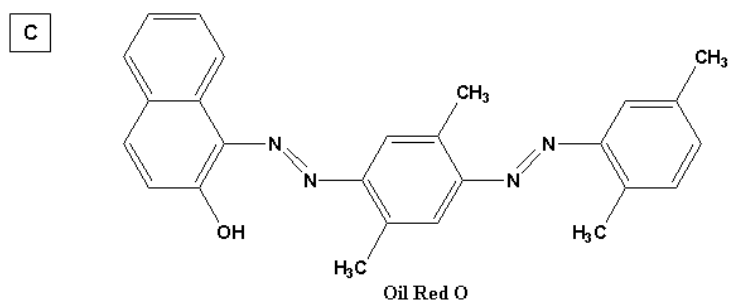
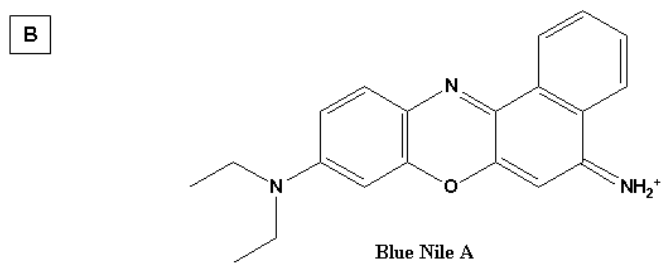
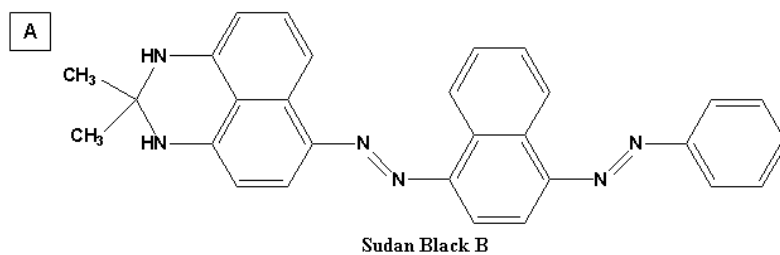


Figure 3

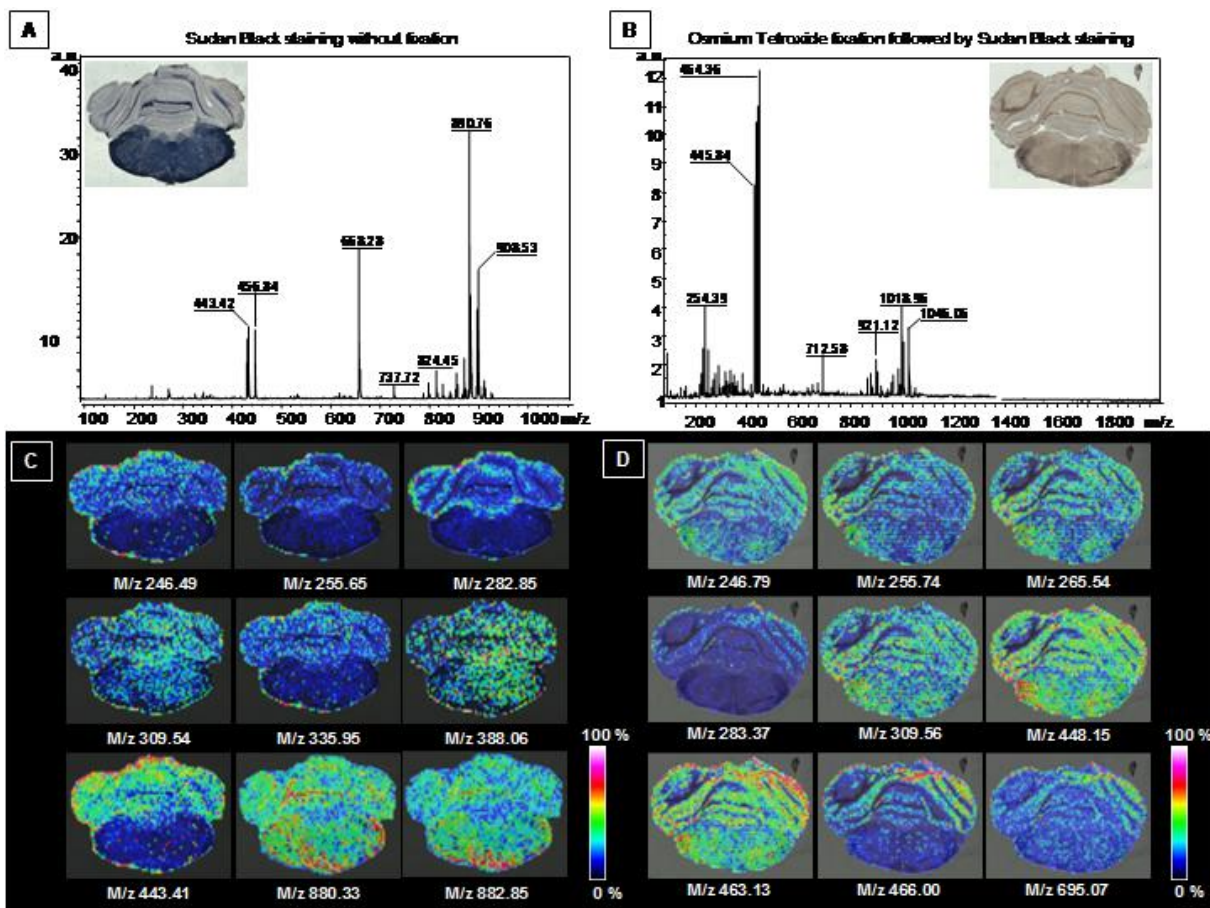


Figure 4

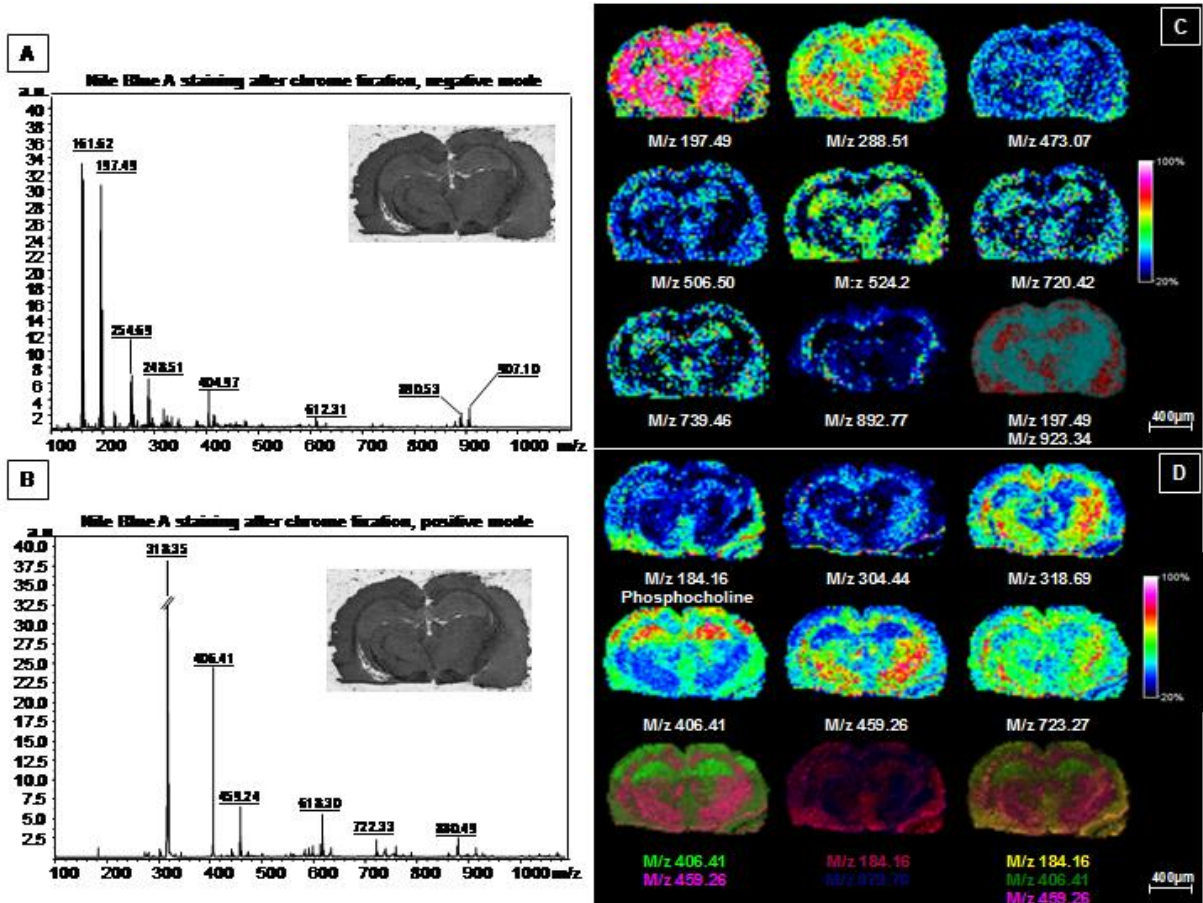


Figure 5

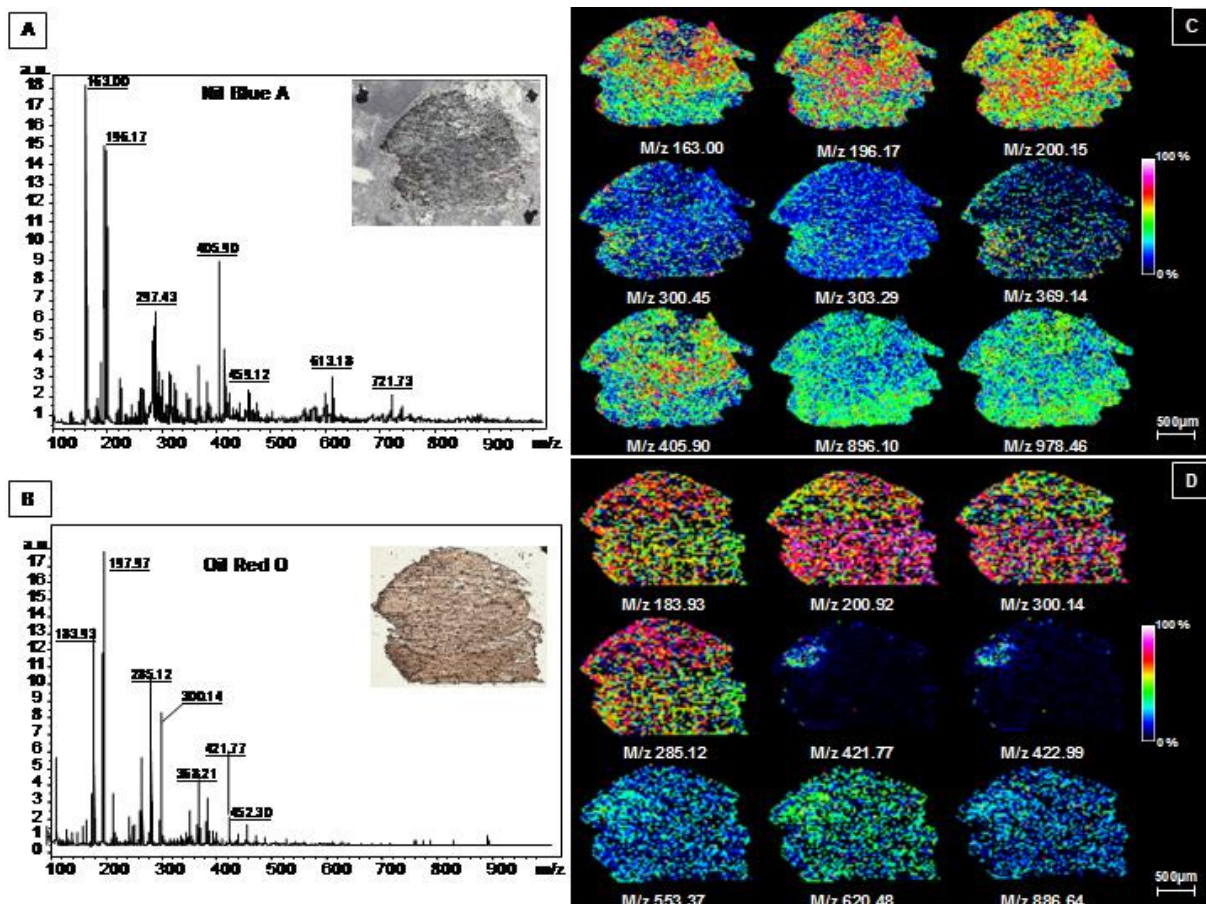


Figure 6

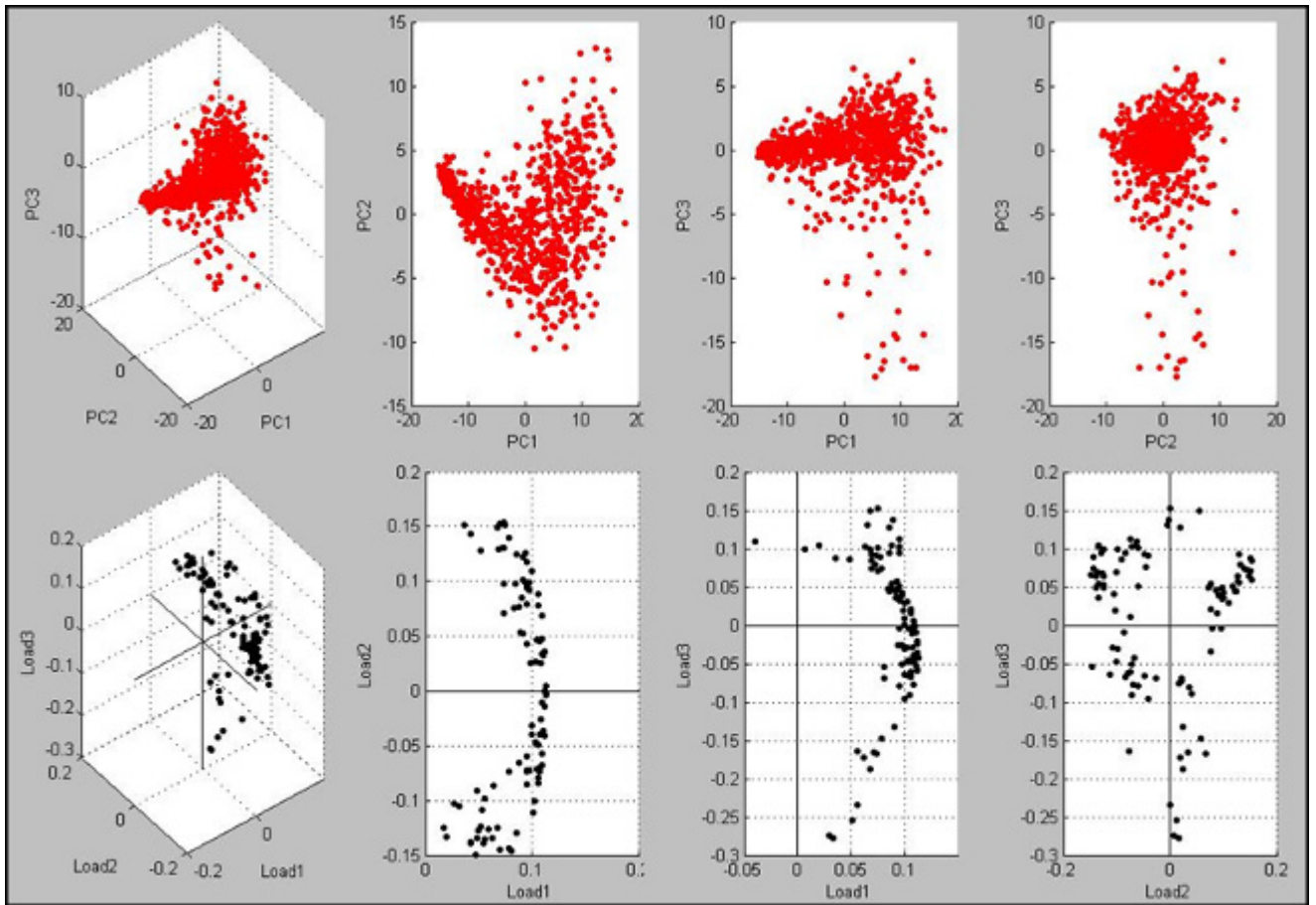


Figure 7

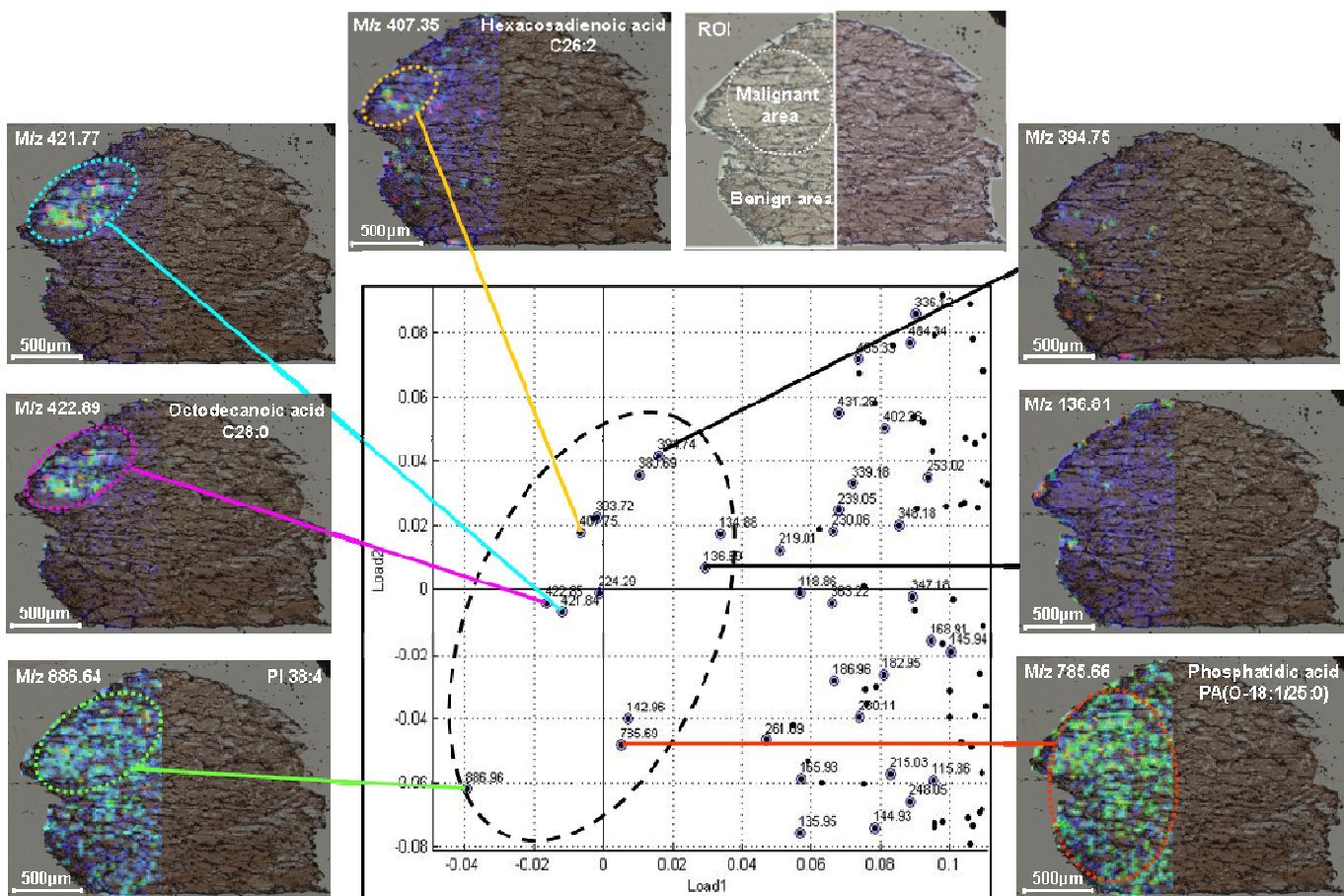


Figure 8

II. Lipidomique & processus de régénération du système nerveux central chez la sangsue médicinale

Dans le chapitre suivant nous allons développer cette analyse des lipides dans le cadre de la compréhension d'un processus biologique : la régénération nerveuse chez la sangsue médicinale. Une telle approche en utilisant la lipidomique et l'association des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse (SIMS et MALDI) est complètement nouvelle. Cette analyse repose sur la recherche dans la banque d'EST (Expressed Sequencing Tag) du système nerveux de ce modèle des enzymes impliquées dans la biosynthèse de ces lipides. Le **Tableau 1** montre bien la présence d'enzymes de la famille des phospholipases (A2, D et C) et lipooxygénases chez ce modèle la sangsue médicinale qui sont impliqués chez les vertébrés dans les phénomènes de régénération nerveuse au cours d'ischémie.

Numéro di Contig	Proteine	Homologie	E Value
EN-133k-group2267.Contig1	Phospholipase D3 (EC 3.1.4.4) (PLD 3) (Choline phosphatase 3)	<i>Bos taurus</i>	Ee ⁻¹⁰⁰
EN-133k-group1648.Contig4	Phospholipase A2, group IVB (Cytosolic)	<i>Xenopus tropicalis</i>	1.3 e ⁻⁷⁴
EN-133k-group574.Contig2	calcium-independent phospholipase A2, iPLA2)	<i>Mus musculus</i>	1.4 e ⁻⁵⁹
EN-133k-group179.N_gs_28394	Lysophospholipase	<i>Argas monolakensis</i>	6.2e ⁻⁵⁹
EN-133k-group11049.Contig1	Phospholipase C	<i>Aplysia californica</i>	9.7e ⁻⁵¹
EN-133k-group12326.N_gs_44143	Phospholipase d	<i>Aedes aegypti</i>	2.5e ⁻⁴⁸
EN-133k-group501.Contig1	Arachidonate 15-lipoxygenase type II	<i>Mus musculus</i>	9e ⁻⁴⁷

Tableau 1 : Identification de quelques phospholipases exprimées chez Hirudo et partageant des homologies avec les Vertébrés

Comme nous l'avons décrit dans le premier chapitre de ce manuscrit, la Spectrométrie de masse est un outil dont l'utilisation s'est considérablement diversifiée au cours des dernières décennies. Des améliorations technologiques croissantes l'ont propulsées dans l'ère de l'imagerie moléculaire tant à l'échelle microscopique que macroscopique. A l'heure actuelle, l'une des applications majeures de la spectrométrie de masse en biologie inclue le domaine biomédical. Des

pathologies incluant les maladies neurologiques, les ischémies ou les hypoxies cérébrales du système nerveux central des Vertébrés s'accompagnent d'une absence de régénération centrale. Des travaux réalisés sur des troubles cérébraux causés par un anévrisme ou encore sur la régénération périphérique du nerf sciatique de rat ont mis en évidence l'implication de certaines classes de lipides dans les processus de régénération. L'ensemble des lipides qui constituent les cellules animales se décline grossièrement en lipides à expression constitutive des membranes (phospholipides, glycérides essentiellement), les lipides à fonction énergétique (triglycérides), les lipides à l'origine d'hormones (dérivés du cholestérol, vitamine D) ou des vitamines à effet anti-oxydant. Un autre ensemble de lipides pouvant également agir de manière autocrine ou paracrine sont les lipides à expression induite. Ils peuvent agir comme messagers secondaires dans le système nerveux central et leur production se fait en réponse à des stimuli physiologiques et/ou pathologiques. Ces molécules ont par ailleurs une durée de vie généralement courte car ils sont ensuite métabolisés. Les seconds messagers lipidiques qui nous intéressent particulièrement dans les travaux d'étude de la régénération nerveuse chez *hirudo sp.* sont ceux dont l'expression au sein des neurones varie au cours des processus de réparation/régénération.

En rappel du premier chapitre de ce manuscrit, chez les Vertébrés, diverses études ont relevées les effets neuroprotecteurs des acides gras polyinsaturés des séries linoléique ($\omega 3$), linoléique ($\omega 6$), oléique ($\omega 9$) dont la libération peut se faire par action de phospholipases sur des phospholipides membranaires. Le lipide majoritaire de la série $\omega 3$ dans le système nerveux central est l'acide docosahexaénoïque encore appelé acide cervonique. Cet acide gras est la cible de lipoxygénases cérébrales qui produisent des puissantes molécules anti-inflammatoires : les neuroprotectines et les résolvines. Dans la série $\omega 6$, l'acide arachidonique est produit par toutes les cellules sous l'action de phospholipases [133]. Il est le précurseur de nombreux dérivés neuroprotecteurs tels que les endocannabonoïdes, synthétisés dans le cerveau et ayant des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires [94]. Le lipide majeur de la série $\omega 9$ est l'acide oléique (C18 :1). Celui-ci protège également le système nerveux en limitant l'inflammation suite à sa stimulation excessive (exitotoxicité) [94]. Les sulfatides et les gangliosides constituent une autre classe de lipides préservant le système nerveux central. Des études ont démontré qu'une diminution de leur taux cérébral est directement associée à l'apparition de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [134].

Chez la sangsue, les seuls travaux faisant état de la présence de lipides et de leurs implications dans la régénération nerveuse concernent les endocannabinoïdes et la découverte du système

endocannabinoïde (cf. chapitre 2). Compte tenu de leurs propriétés anti-inflammatoires et neuroprotectrices dans un modèle animal où la régénération axonale s'opère, nous avons cherché à élargir à tout le lipidome de la sangsue, la possibilité de détecter d'autres classes de lipides associés au processus de régénération. Pour cela, une approche combinant plusieurs spectromètres de masse a été réalisée :

- L'imagerie par analyse directe en TOF-SIMS (mode négatif) sur des chaînes nerveuses : Cette technique nous a permis d'avoir un aperçu global du contenu en lipides et d'imager la répartition cellulaire dans trois chaînes nerveuses en suivant une étude cinétique de la régénération (témoin au temps T0 et les temps T6h et T24h après lésions des chaînes).
- Etudes des lipides issus des chaînes nerveuses par ESI-Q-TOF/MSMS et MALDITOF/MS.

1. Matériels et méthodes :

a. Préparations pour l'imagerie Tof-SIMS des lipides:

L'imagerie du profil d'expression des lipides après lésion du SNC d'*Hirudo* a été menée par Tof-SIMS selon la cinétique suivante : T0, T6h et T24h post-lésion. Concrètement, des sangsues ont été anesthésiées dans une solution d'éthanol 10% et leurs chaînes nerveuses lésées *in vivo* au niveau du connectif situé entre les ganglions 7 et 8. Cette opération a été réalisée au moyen d'instruments appropriés (scalpel et pachef stérilisés) capables de réaliser une fine incision ventrale afin d'atteindre la chaîne nerveuse. Après sacrifices des animaux aux différents temps, les chaînes nerveuses étaient isolées avec leur sinus ventral et incluses dans un tissu d'enrobage OCT (Optimal Cutting Temperature polymere). Après découpes de 12 μ m des blocs de chaînes nerveuses grâce à un cryostat, les coupes étaient recueillies dans des lames en inox adaptées à l'imagerie Tof-SIMS. En collaboration avec le Dr. Alain Brunelle (ICSN, Gif sur Yvette), des images globales des ganglions les plus proches du site de lésion ont été réalisées en mode négatif en utilisant une source d'agrégat de bismuth Bi³⁺ à une fluence de 1,5x10¹¹ ions.cm⁻². La résolution des images est de 256x256 pixels et couvrent une surface de 500x500 μ m².

b. Préparations des échantillons pour les analyses en MALDI Tof et ESI-Q-TOF MS/MS :

L'étude par spectrométrie de masse des variations du lipidome dans le SNC d'*Hirudo* a également été menée selon deux aspects : la réalisation de lésions faites *in vivo*, dans le SNC des sangsues et selon un critère cinétique. Comme pour le cas de l'imagerie SIMS, des sangsues ont été anesthésiées et lésées *in vivo*. Dans toutes les séries d'expérience, les sections étaient systématiquement réalisées dans le connectif reliant les ganglions 7 et 8. Les sangsues ainsi lésées étaient ensuite sacrifiées à des temps variables plus ou moins éloignés du temps initial de lésion. Nous avons choisi de réaliser une cinétique suivante : T0, T1h30, T3h, T6h, T18h, T24h, T48h et T168h (soit 7 jours) après lésion. Les analyses étaient réalisées sur des lots de cinq sangsues par condition.

Après dissections des sangsues, les chaînes nerveuses étaient totalement isolées du sinus ventral, rincées dans une solution de Ringer puis congelées dans l'azote liquide. Les lipides étaient ensuite extraits d'après la méthode de Folch avec quelques modifications. Les chaînes nerveuses reprises dans 1mL d'un mélange chloroforme/méthanol (2 :1) étaient soumises à un broyage mécanique, dans la glace, ponctué par des cycles courts de chocs thermiques (azote liquide/37°C). Après sonication dans l'eau glacée (3 cycles de 20 secondes), les homogénats de chaînes nerveuses étaient placés sous agitation pendant 2h à 4°C suivie d'une étape de centrifugation (5000rpm pendant 30min. à 4°C). Après addition d'une solution de NaCl (200µL à 0,09% m : v) aux homogénats puis mélange (vortex) et centrifugation (10000rpm, 10min. 4°C), deux phases étaient clairement visibles :

- Une phase supérieure correspondant à la phase méthanolique et contenant les lipides polaires (classiquement les phospholipides, les glycolipides...)
- Une phase inférieure ou phase chloroformique renfermant les lipides les plus hydrophobes (classiquement, les acides gras, les glycérides...)

A l'interface de ces deux phases se forme un amas de débris tissulaires. Chacune des phases a été récoltée séparément et soumise à une étape de lavage par un nouveau mélange chloroforme/méthanol. Les nouvelles phases chloroformiques et méthanoliques sont additionnées respectivement aux solutions précédentes puis centrifugées sous vide pendant une nuit. Après évaporation totale du chloroforme, 500µL d'un mélange de chloroforme/méthanol (2 :1) étaient ajoutés.

Une étude comparative en mode réflecteur positif est alors menée sur les lipides de la phase chloroformique, par MALDI-Tof Voyager-DE STR (*Applied Biosystem*) et ESI-Q-Tof MS/MS (QStar, *Sciex*) offrant en plus la possibilité de sélectionner et de caractériser des ions lipides. Concernant les

analyses en MALDI-Tof MS, 1 μ L de la solution de matrice DHB (50 μ g/mL méthanol/eau ; 1:1 v:v) a été déposé sur une cible MALDI puis mélangé à 1 μ L de solution d'extrait de lipides.

c. Imagerie Tof-SIMS de chaînes nerveuses lésées :

L'imagerie TOF-SIMS a permis de détecter un grand nombre de lipides. Des comparaisons ont été réalisées sur des images de la répartition de lipides au sein du ganglion de la chaîne nerveuse, positionné avant la zone de lésion (**Figure 1**). Des images ont été obtenues pour ce ganglion après différents temps de régénération (T0, T6h, T24h) La **Figure 2** présente la répartition de certains lipides dont la localisation varie au cours de la régénération. Ces lipides sont l'acide oléique, l'acide stéarique et un lipide à caractériser, autant d'acteurs moléculaires connus pour leurs effets neuroprotecteurs du système nerveux central des vertébrés [133].

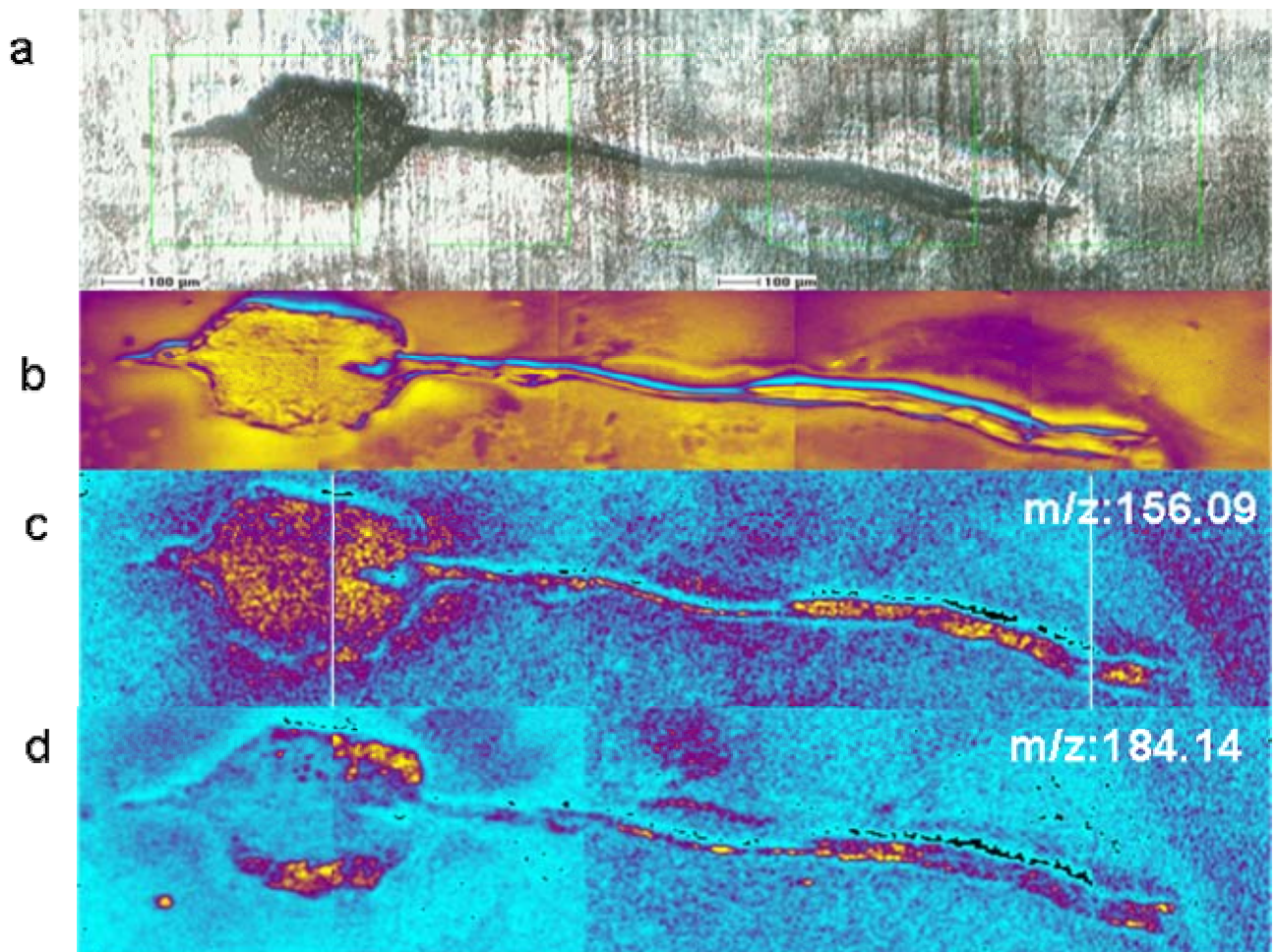
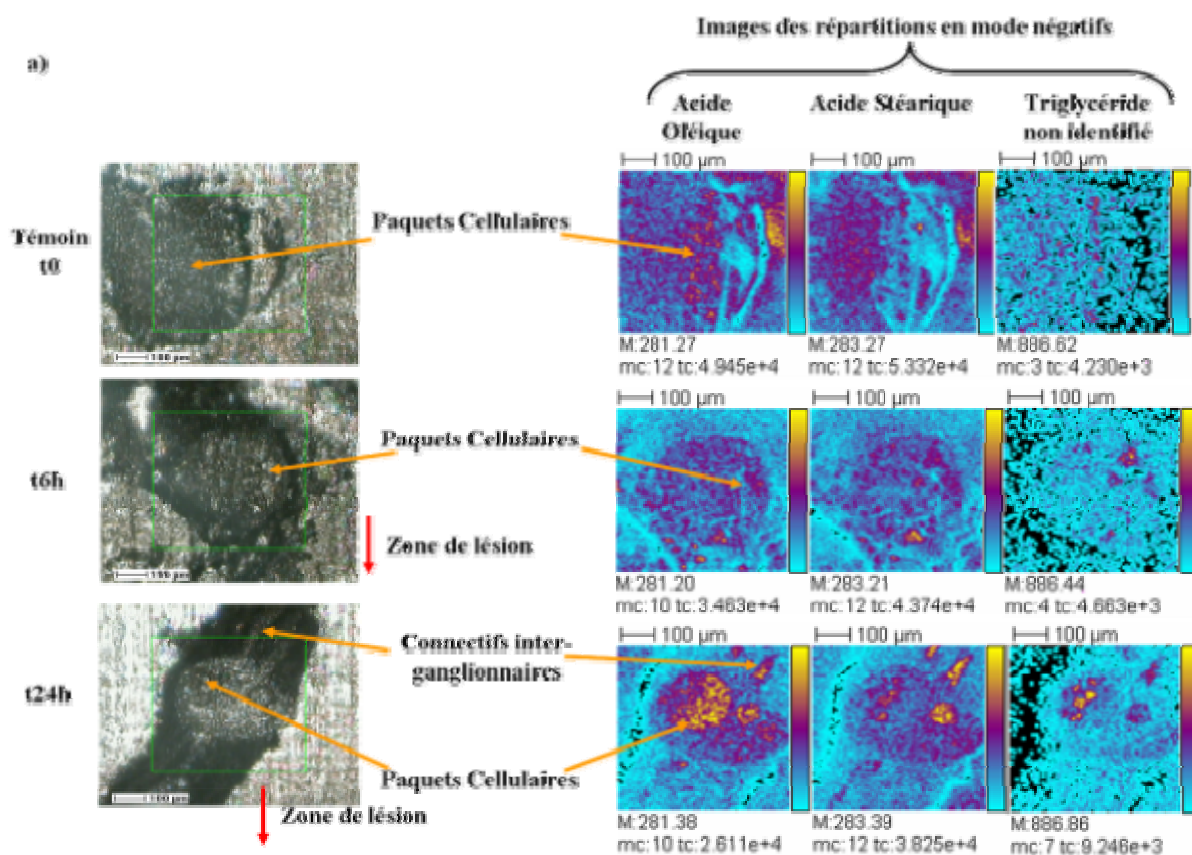


Figure 1 : a) image photomicrographique d'une chaîne nerveuse de sangsue avec un ganglion, b) image moléculaire de l'ensemble des ions au niveau de cette chaîne nerveuse et du ganglion, c et d) représente la répartition des deux lipides de masse m :z 156.09 et 184.14

A l'état basal, l'acide oléique et l'acide stéarique ne présentent pas la même localisation. Six heures après la lésion (T6h), ces acides gras sont faiblement détectés au sein des paquets cellulaires. Après 24h de régénération (T24h), l'acide stéarique est essentiellement présent dans les neurones et les connectifs inter-ganglionnaires, alors que l'acide oléique s'accumule dans les paquets cellulaires et peu dans les connectifs. Le lipide à m/z 886.86 est légèrement présent dans le ganglion témoin. Il apparaît après 6h de régénération au niveau de certaines cellules proches du connectif qui relie le ganglion au ganglion antérieur à la zone de coupure. Il se localise exclusivement dans les cellules du paquet après 24h de régénération.



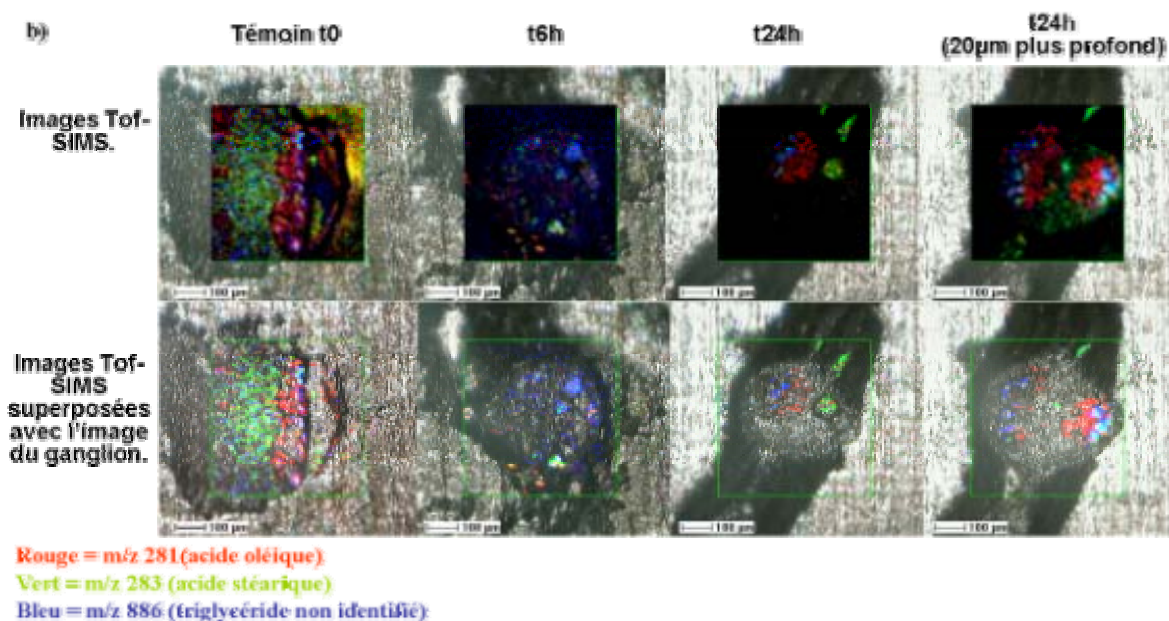


Figure 2 : Imagerie ToF-SIMS en mode négatif de certains lipides exprimés par *Hirudo sp.* Après lésion du SNC. (a) répartition de l'acide oléique (m/z 281.38), l'acide stéarique (m/z 283.39) et d'un lipide à m/z 886.86 (b) Superposition de la localisation composite de ces trois lipides avec la caméra du ToF-SIMS.

d. Fragmentation des lipides par spectrométrie de masse ESI-Q-TOF/MSMS et imagerie ToF-SIMS des ions parents:

Le TOF-SIMS, tel que, ne permet d'obtenir que des informations sur la masse moléculaire des composés analysés. Depuis peu une méthode « PSD-like » a été mise au point et donne la possibilité d'obtenir quelques informations structurales [141]. Cette technique reste pour l'heure difficile à mettre en place. Pour obtenir plus d'informations et identifier les lipides observés, il convient de revenir à des techniques d'analyses classiques de lipidomique.

Les premières expériences ont été réalisées sur des chaînes nerveuses entourées de leur sinus ventral. Le sinus ventral de la sangsue est un tissu parenchymateux susceptible de contenir des cellules et des molécules jouant un rôle dans les mécanismes de régénération.

Après extraction suivant le protocole de Folch [142], le passage en ESI-Q-TOF/MSMS a permis d'obtenir des données structurales de certains lipides contenus dans les chaînes avec leur sinus. La répartition de ces lipides a également été réalisée par imagerie TOF-SIMS. La **Figure 3** illustre les résultats obtenus pour trois d'entre eux.

Les lipides de rapport m/z 789.56, 412.96 et 456.15 illustrent quelques uns des lipides qui ont offert la meilleure sensibilité de détection après analyse par ESI-Q-TOF MS. Les ions fils obtenus par MS/MS pour chacun de ces lipides ont été annotés en fonction des différentes attributions des ions

parents 789.56, 412.96 et 456.15, fournies par la banque de données des lipides *Lipid MS Predictor* (LMP) (LIPID MAPS). A partir de ces données, leurs localisations par imagerie TOF-SIMS ont été reconstruites

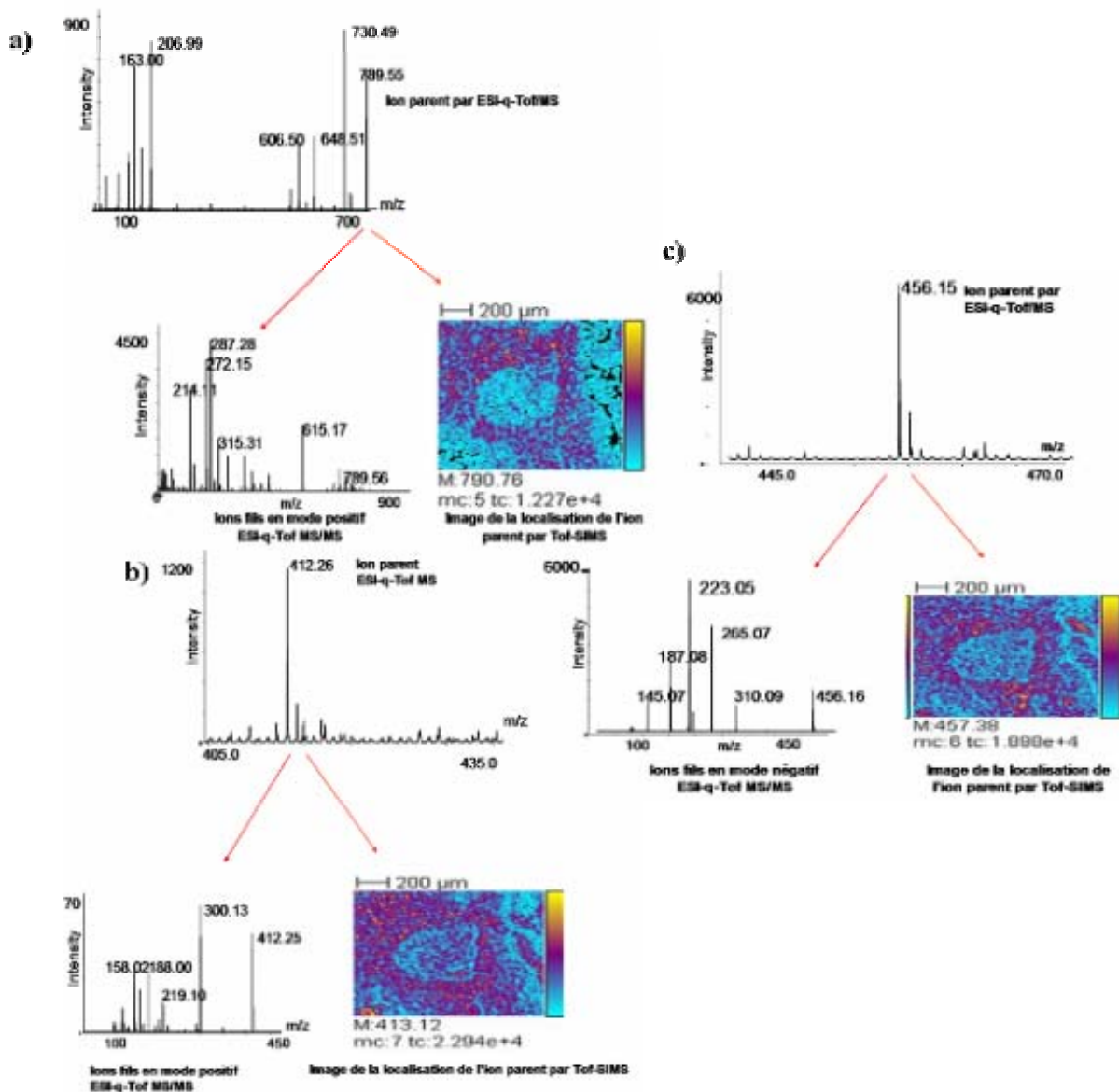


Figure 3 : Répartition en imagerie ToF-SIMS de trois lipides caractérisés par ESI-Q-TOF/MSMS (mode positif).

vi. Identification des lipides à m/z 789.56 ; 412.26 et 456.15 :

✓ **Ion m/z 789.56**

Le spectre MS obtenu en ESI-Q-TOF nous a permis de déterminer la classe à laquelle appartient ce lipide. D'après les possibilités d'annotation fournies par la banque de données LMP, il s'agirait d'un adduit sodium de la glycérophosphatidylcholine de type PC 36 :5. En effet, l'ion à m/z 730.49 correspond à l'ion $[PC+Na-(N^+(CH_3)_3)]^+$. La fragmentation en source du groupement phosphocholine libère un composé de rapport m/z équivalent à 59 et attribuable au groupement $-N^+(CH_3)_3$. De la même manière, un clivage de l'adduit sodium de la phosphocholine par rapport au reste du squelette

diacyl-glycérade libère l'ion à m/z 606.50 identifiable comme étant l'ion $[\text{PC-Na-PCho}]^+$. Le spectre de l'ion parent de la PC+Na 36 :5 présente également un ion à m/z 206.99 qui correspond au massif isotopique de l'adduit sodium de la phosphocholine $[\text{PCho+Na}]^+$ (**Figure 3a**).

Afin de déterminer la nature des acides gras estérificateurs en sn1 et sn2, nous avons cherché à identifier les ions fils de la PC+Na 36 :5. Le spectre de fragmentation de cette phosphocholine libère, entre autre, trois massifs isotopiques ions fils à m/z 315.31 ; 287.28 et 272.15. Ces ions correspondent à différents fragments contenant l'acide eicosapentaénoïque C20 :5 comme décrit dans la **Figure 4**. La caractérisation précise de cette phosphatidylcholine a ainsi été possible sachant que l'acide gras estérificateur en sn3 est la phosphocholine et l'acide gras C20 :5 en sn2. D'après LMP, l'acide gras en sn1 est un dérivé de l'acide palmitique C16 :0 est le glycérophospholipide m/z 789.25 est l'ion $[\text{PC (O-16 :0/20 :5)+Na}]^+$

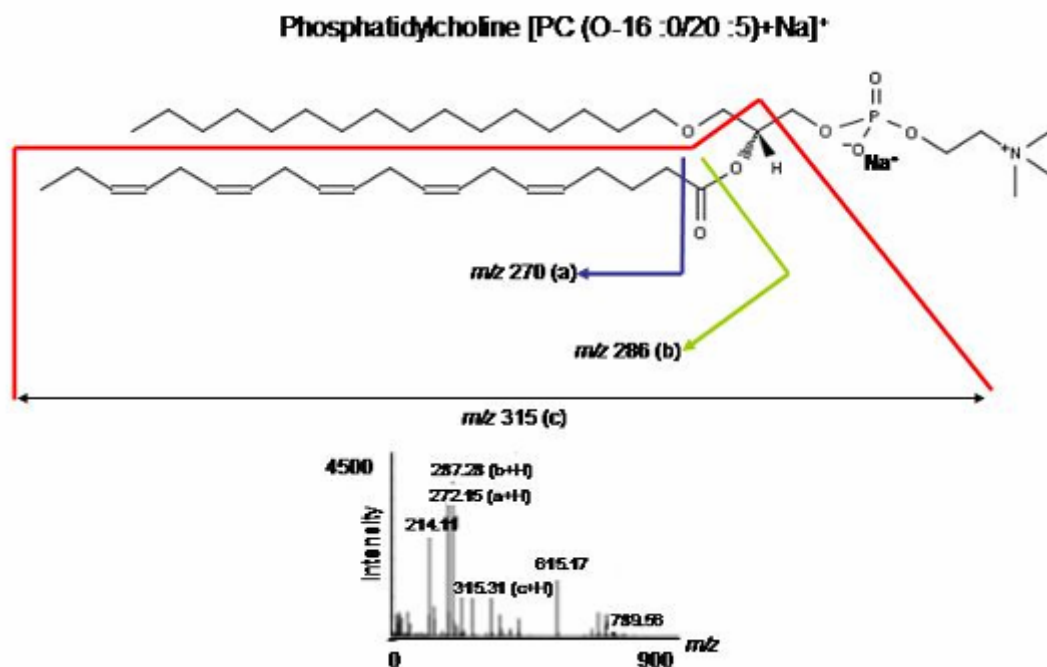


Figure 4 : Caractérisation de l'ion m/z 789.56, phosphatidylcholine $[\text{PC (O-16 :0/20 :5)+Na}]^+$

✓ Ion m/z 412.26

La fragmentation de cet ion conduit, entre autre, à la formation des ions m/z 300.13 et 158.02 (**Figure 5**). LMP attribue l'ion m/z 412.26 à un acide glycérophospholipide protonné (acide phosphatidique PA) estérifié par un acide palmitique C16:0 et noté $[\text{PA(16:0/0:0)+H}]^+$. Une fragmentation entre les carbones sn2 et sn3 libère un fragment protonné renfermant l'acyl gras C16:0 (m/z 300.13) et un autre fragment contenant un phosphatide (m/z 111). Le clivage de l'acyl gras C16 :0

du reste de la molécule conduit à l'ion protonné m/z 158.02 qui renferme le phosphatide et le squelette glycérol du phospholipide.

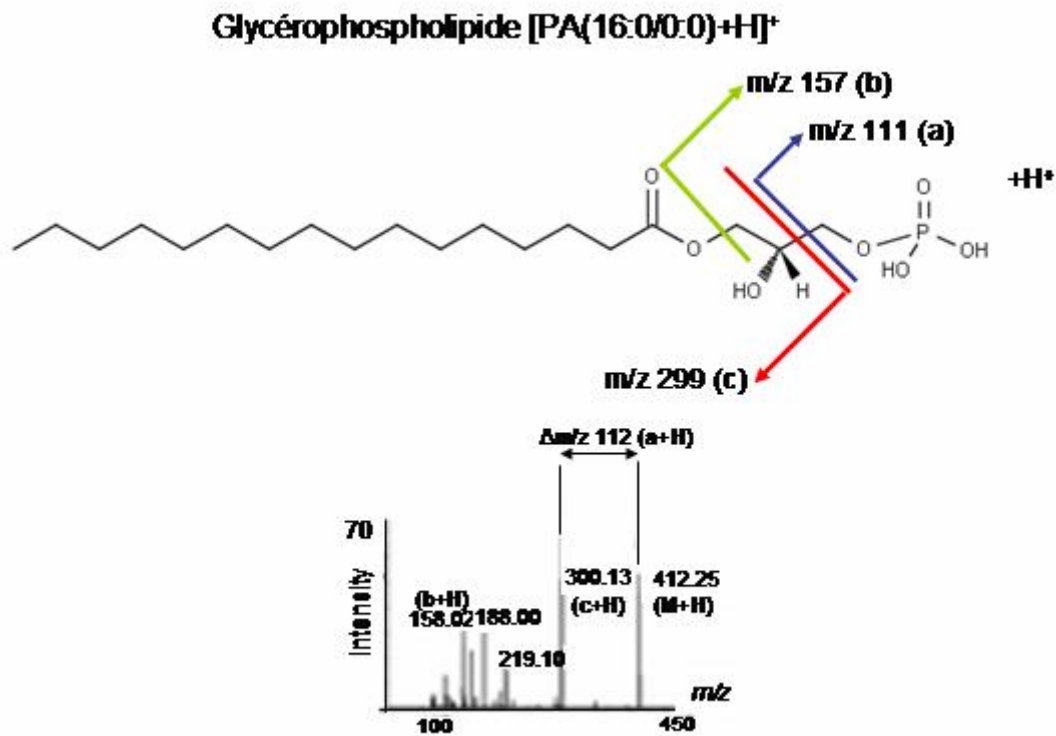


Figure 5: Caractérisation de l'ion m/z 412.26, acide phosphatidique [PA(16:0/0:0)+H]⁺

✓ Ion m/z 456.15

D'après *LMP*, plusieurs combinaisons possibles peuvent conduire au massif isotopique de l'ion parent m/z 456.15 noté M. Il pourrait s'agir soit d'une sphinganine Cer(d18 :0/10 :0) protonnée, soit d'un triglycéride protonné. Un des fragments attendus après fragmentation d'un dérivé de la céramide dont fait partie la sphinganine, est l'ion céramide (Raith et Neubert 1998 ; Hsu et Turk 2002). L'absence du fragment correspondant à la base céramide d18:0 dans le spectre MS2 (figure 2c) ne semble pas indiquer une sphinganine.

Un des triglycérides proposés par *LMP* est l'ion $[M(C11:0/0:0/13:0)+H]^+$, dont la fragmentation libère entre autre les ions m/z 145.07 ; 187.06 ; 310.09. L'ion m/z 187.06 correspondrait à la libération de l'acide gras C11:0 protonné ($[C11:0+H]^+$) du reste du triglycéride. L'ion à 145.07 correspondrait à la forme décarboxylée du même acide gras ($[C11:0-CO_2+H]^+$). L'ion du massif isotopique m/z 310.09 correspondrait à la perte de l'acide gras decarboxylé par l'ion parent M soit, $[M-145.06+H]^+$.

Grâce à l'imagerie Tof-SIMS, nous avons pu montrer que les trois lipides détectés et caractérisés par ESI-Q-TOF/MSMS et qui présentant un forte intensité d'ionisation sont en réalité des ions lipides localisés dans le sinus qui enveloppe le système nerveux central d'*hirudo*. Ainsi, la présence abondante de lipides dans ce sinus nerveux pourrait entraîner une dilution du signal des lipides contenus dans les ganglions. Afin de ne pas « masquer » les lipides qui sont exprimés au sein des ganglions et des connectifs au cours des processus de réparation/régénération nerveuse, les études suivantes ont été réalisées sur des chaînes débarrassées du sinus.

Etude différentielle par spectrométrie de masse des profils de lipides impliqués dans la régénération

Les lipides contenus dans la fraction méthanolique ont été analysés en MALDI-TOF/MS ainsi qu'en ESI-Q-TOF MS (**Tableau 2**). Les lipides dont la présence variait au cours du temps ont été répertoriés et présentés sous forme d'un tableau. La couleur bleue indique la présence des lipides tandis que la couleur rouge désigne leur absence.

De nombreux lipides ont été détectés sur les deux types d'instrument. Toutefois, par soucis de clarté, ne sont présentés que les lipides dont les signaux apparaissent ou disparaissent au cours de la régénération. Compte tenu des différences dans les processus de formation des ions entre l'ESI et le MALDI, certains lipides sont observés plus spécifiquement dans un cas ou dans l'autre, certains des lipides étant observés pour les deux sources. Les lipides communs aux deux analyses sont surlignés en jaune dans le tableau. Globalement, les variations sur les lipides communs au MALDI et à l'ESI sont concordantes. Néanmoins dans quelques fractions, les composés ne sont pas observés en MALDI, les pics liés à la matrice pouvant entraîner des suppressions de signal.

Cette étude *in vivo* semble montrer qu'il existe quatre profils:

- Une gamme de lipides présents en début de régénération nerveuse: il s'agit principalement des lipides de masse inférieure ou égale à 600 u.m.a. disparaissant environ 1H30 à 3h après la lésion.
- Une gamme de lipides présents en phase tardive de régénération: il s'agit des lipides de très haute masse (>1000 u.m.a) et dont la présence débute 6h après la lésion.
- Une gamme qui présente une distribution éparpillée dans le temps et en masses (606, 725, 782, 958 u.m.a).

Les lipides de masses 616 et 625 u.m.a. ont été détectés uniquement aux temps 6h et 3h de régénération.

a)

m/z	T0	T30min	T1h30	T3h	T6h	T18h	T48h	T7jrs
172,55	Blue	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red
182,88	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red
236,54	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
253,53	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
397,56	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
557,21	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
563,80	Blue	Red	Blue	Red	Red	Red	Red	Red
617,24	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red

b)

m/z	T0	T30min	T1h30	T3h	T6h	T18h	T48h	T7jrs
173,09	Blue	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red
183,02	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
236,11	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
254,89	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
606,40	Blue	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue
616,28	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
625,51	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red
664,64	Blue	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Blue
725,65	Blue	Red	Red	Blue	Red	Red	Red	Red
782,54	Blue	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
824,81	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Blue	Blue
958,50	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
1016,40	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red
1132,40	Red	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red
1308,30	Red	Red	Red	Red	Blue	Red	Red	Red

Tableau 2 : Comparaison en fonction du temps de régénération des ions présents (bleu) ou absents (rouge) des spectres de masse obtenus par a) MALDI-TOF et b) ESI-Q-TOF.

Cette étude *in vivo* semble montrer qu'il existe quatre profils:

- Une gamme de lipides présents en début de régénération nerveuse: il s'agit principalement des lipides à m/z inférieure ou égal à 600. disparaissant environ 1H30 à 3h après la lésion. Une annotation possible de ces lipides par *LMP* nous indique qu'il s'agirait d'acides gras en C10 et C14 (**Tableau 3**).
- Une gamme de lipides présents en phase tardive de régénération: il s'agit des lipides de très haute masse ($m/z >1000$) et dont la présence débute 6h après la lésion. Ces lipides correspondraient à des phospholipides, en particulier, phosphatidylsérine (PS) et phosphatidylinositol bis-phosphate (PIP2) et un ganglioside GM3 (**Tableau 3**).
- Une gamme qui présente une distribution éparpillée dans le temps et en masses (606, 725, 782, 958). Il pourrait s'agir de phospholipides et de triglycérides
- Les lipides à m/z 616 et 625 ont été détectés uniquement aux temps 6h et 3h de régénération. Les meilleurs scores d'identification de ces ions avec la banque *LMP* sont respectivement obtenus avec une phosphatidylsérine et un triglycéride (**Tableau 3**).

a)	m/z	Ions $[M+X]^+$ n.d	m/z théoriques	$\Delta m/z$	Autres annotations possibles $[M+H]^+$
	172.55				
	182.88	C10:3(OH)	183,1	0.22	C10:2(OH)-cyclo; C10:1(Ke)-cyclo; C10:2(Ep), C10:1(Ep)-cyclo; C10:2(Ke)
	236.54	C14:5 (NH ₄ ⁺)	236.16	0.38	C12:1 (K ⁺)
	253.53	C16:2 (H ⁺)	253.21	0.32	
	397.56	C26:0 (H ⁺)	397.40	0.16	C24:5 (K ⁺) (397.25); GL 18:0 (K ⁺) (397.27); PA(O-16:0/0:0) (H ⁺) (397.27)
	557.21	PI 15:1 (H ⁺)	557.27	0.06	Sphinganine Cer16:0 (K ⁺) (557.57); PG 22:6 (H ⁺) (557.28); PI(O-16:1/0:0) (H ⁺) (557.30)
	563.80	GL 33:3 (H ⁺)	563,5	0.30	GL 31:0 (Na ⁺) (563.50)
	617.24	PI 18:3 (Na ⁺)	617.27	0.03	PG 24:1 (Na ⁺) (617.38); PA 30:2 (H ⁺) (617.41)
b)	m/z	Ions $[M+X]^+$	m/z théoriques	$\Delta m/z$	Autres annotations possibles $[M+H]^+$
	173.09	C10:0 (H ⁺)	173,15	0.06	
	183.02	C10:3(OH)	183,1	0.08	C10:2(OH)-cyclo; C10:1(Ke)-cyclo; C10:2(Ep), C10:1(Ep)-cyclo; C10:2(Ke)
	236.11	C14:5 (NH ₄ ⁺)	236.16	0.05	C12:1 (K ⁺)
	254.89	C14:6 (K ⁺)	255.08	0.19	C14:6(OH)Na ⁺ (255.09)
	606.40	PE 26:1 (H ⁺)	606.41	0.01	Sphinganine Cer18:0 (K ⁺) (606.52); PC 24:1 (H ⁺) (606.45)
	616.28	PS 22:2 (K ⁺)	616.30	0.02	PE 25:0 (Na ⁺) (616.39)
	625.51	GL 38:7 (H ⁺)	625.52	0.01	PG 26:0 (H ⁺) (625.44); GL 37:7 (H ⁺) (625.44); PA 30:2 (Na ⁺) (625.42)
	664.64	Cer24:4 (Na ⁺)	664.56	0.08	PE 31:0 (H ⁺) (664.52); PC 28:0 (H ⁺) (664.52)
	725.65	GL 44:6 (H ⁺)	725.60	0.05	GL 43:6 (H ⁺) (725.57); PA 36:1 (Na ⁺) (725.51)
	782.54	PS 35:2 (Na ⁺)	782.53	0.01	PE 39:4 (H ⁺) (782.57); PE 37:1 (Na ⁺) (782.56); PC 34:1 (Na ⁺) (782.56)
	824.81	PE 41:1 (Na ⁺)	824.65	0.16	PC 40:4 (H ⁺) (824.65)
	958.50	PS 47:5 (H ⁺)	958.65	0.15	
	1016.40	PS 50:5 (K ⁺)	1016.67	0.27	
	1132.40	PIP(48:0) (NH ₄ ⁺)	1132.77	0.37	
	1308.30	GM3	1307.86	0.44	

Tableau 2 : Annotations d'après *LMP*, des ions détectés par a) MALDI-TOF et b) ESI-Q-TOF au cours des processus de réparation/régénération du SNC d'*Hirudo*.

e. Conclusion

L'imagerie TOF-SIMS nous a permis non seulement d'imager des lipides avec une grande précision mais surtout, de montrer qu'une lésion nerveuse dans le SNC d'*Hirudo* s'accompagne d'une expression différentielle des lipides. L'accroissement du signal des acides stéarique et oléique ainsi que du phosphatidyl inositol dans les ganglions de chaînes nerveuses lésées démontre une dynamique du lipidome du SNC d'*Hirudo* au cours du temps. Ces résultats sont d'autant plus intéressants que l'acide oléique et l'acide stéarique ont des effets neuroprotecteurs. Le phosphatidyl inositol est connue pour ses rôles en tant que relais intracellulaire de diverses voies transductionnelles. L'étude et la caractérisation en ESI-Q-TOF/MSMS des lipides contenus dans les chaînes nerveuses enveloppés de leurs sinus veineux ont révélées la présence d'ions majoritaires. La localisation précise de ces ions majoritaires dans le sinus a été possible grâce au Tof-SIMS. De ce fait, les instruments ESI-Q-TOF et Tof-SIMS apparaissent idéalement complémentaires dans le fait de pouvoir caractériser les lipides détectés et associer leurs localisations précises.

Sachant que le sinus est riche en lipides, nous avons orienté notre stratégie d'étude des variations du lipidome du SNC d'*Hirudo* au cours de la réparation/régénération en se débarrassant du sinus. De cette manière, nous avons cherché à minimiser le risque de détecter à partir d'extraits lipidiques de SNC lésé, des ions majoritaires du sinus, qui pourraient masquer les lipides du SNC lors de la réparation/régénération. Ainsi, des cinétiques d'analyse sur des extraits lipidiques de chaînes nerveuses lésées ont permis de mettre en évidence par MALDI-TOF et ESI-Q-TOF des marqueurs potentiels des différentes étapes biologiques favorisant la reconstruction nerveuse chez *Hirudo*. Le(s) rôle(s) joué(s) par des lipides en réponse à une lésion du SNC d'*Hirudo* passera(en)t par l'existence de « fenêtres d'activités » de ces lipides pendant les processus précoces de réparation nerveuse. Ainsi, des acides gras C10 et C14 seraient spécifiquement exprimés dans un délai maximal de trois heures suivant les lésions nerveuses. Les phospholipides PS et PIP2, et le ganglioside GM3 s'exprimeraient six heures après lésions, à un stade un peu plus tardif dans le processus de réparation des chaînes nerveuses lésées. Des études réalisées sur différentes lignées cellulaires du tissu nerveux ont établi la distribution des gangliosides GM1, GM2, GD1 et GT1 à la surface des lignées de type neuronal. Bien que la distribution et le(s) rôle(s) biologique(s) au ganglioside GM3 sont encore peu connu(s), des travaux ont démontré que ce lipide est plutôt exprimé dans les gliomes (Wilfried Dimpfel, 1981). D'autres travaux ont démontré qu'il pouvait soit favoriser le phénomène d'excitotoxicité induite par le glutamate, lui conférant des propriétés neurotoxiques indirectes (Hosung et al. 2006), soit au contraire, le GM3 activerait la production de myéline en stimulant la différenciation des oligodendrocytes du SNC de mammifères (Yim et al. 1994). La

présence éventuelle d'un ganglioside GM3 dans le SNC d'*Hirudo* dès 6 heures après lésion pourrait s'inscrire dans les processus de réparation axonale.

Les marqueurs lipidiques annotés par LMP et variant au cours du temps après lésion du SNC d'*Hirudo*, pourront être isolés et utilisés dans le cadre d'études *in vitro* afin d'évaluer leurs effets sur les processus de régénération de la chaîne nerveuse d'*Hirudo medicinalis*. L'activité de ces molécules pourra par la suite être testée sur des modèles cellulaires et animaux afin de déterminer le potentiel thérapeutique de ceux-ci dans le cadre des maladies neurodégénératives, ou d'ischémie.

Dans le système nerveux central, le tissu microglial constitue l'une des toutes premières lignes de défense en cas de lésion cérébrale, d'infection ou d'inflammation. Pour assurer leur rôle de défense, les cellules microgliales passent par différents états d'activation nécessaire pour engager les réponses immunitaires. De toute évidence les cellules microgliales d'abord quiescentes puis activées, vont migrer en direction du foyer d'inflammation. A cet endroit, des signaux tels que les cytokines, le monoxyde d'azote (NO), des interleukines, des acides aminés excitateurs...créent localement un environnement délétère pour les neurones. Un tel phénomène peut conduire à la mort neuronale, caractéristique des maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaque visant le SNC des Vertébrés. Il n'existe pour l'heure, aucun traitement curatif à ces deux maladies.

Les cellules microgliales activées en réponse à une inflammation consécutive à une lésion, une infection ou une hypoxie provoquent généralement un emballement de la réponse immunitaire néfaste pour la survie neuronale. Contrairement au Vertébrés, notre modèle d'étude, *Hirudo*, a acquis et conservé au cours de l'évolution sa capacité à réparer son SNC. Cette réparation sous entend un contrôle de l'inflammation dans le SNC lésé dans le but de protéger les neurones et de reconstruire progressivement les trames axonales. Ce processus neuroprotecteur aboutit au recouvrement total des facultés sensorielles du SNC d'*Hirudo*.

Libéré très rapidement suite à une lésion cellulaire en général, et compte tenu de ses propriétés à la fois neurotoxique à forte concentration et neuroprotectrice à faible teneur (cf chapitre 2), le NO retient depuis sa découverte, l'attention de la communauté scientifique toutes disciplines confondues. Des études ont montré que le SNC de la sangsue produit un premier pic de NO en réponse à une blessure. De manière intéressante, ce pic de NO d'une durée d'environ 20 minutes semble être un maillon capital dans l'enchaînement des processus réparateurs post-traumatiques du SNC d'*Hirudo*. L'absence de régénération a été démontrée lorsque ce premier pic sécrétoire de NO était inhibé chez la sangsue. En parallèle, cette sécrétion immédiate de NO après lésion du SNC revient temporairement à sa teneur basale passé le délai des 20 minutes. Nous nous

sommes donc intéressés à comprendre comment la sangsue parvient à réguler sa teneur en NO par opposition aux Vertébrés chez qui, une sécrétion élevée est observée dès lors qu'un traumatisme cérébral survient. Nous avons vu au travers de ce manuscrit que les lipides comptent parmi les médiateurs cellulaires capables d'engager des processus neuroprotecteurs. Les propriétés immunomodulatrices et neuroprotectrices des endocannabinoïdes ont également été décrites précédemment (chapitre 2) en même temps qu'ils activent des récepteurs aux cannabinoïdes spécifiques capables de produire localement du NO. Ce NO agit entre autre comme une molécule chémoattractante. Elle est capable de provoquer le recrutement des cellules microgliales dans le SNC des Vertébrés et des Invertébrés (cf chapitre 2). L'accumulation des cellules microgliales au site de lésion est une condition nécessaire pour initier la régénération chez *Hirudo* (production de laminine, guidance axonale...), tandis qu'elle constitue un facteur délétère au sein du SNC lésé des Vertébrés.

Nous avons donc focalisé notre travail de recherche sur la compréhension des voies possibles permettant aux cannabinoïdes de contrôler les cellules microgliales accumulées au site de lésion. En second lieu, nous avons recherché un modèle pouvant expliquer comment *Hirudo* parvient à maintenir un taux de NO remarquablement faible, compatible avec la survie neuronale, pendant tout le temps nécessaire à la régénération nerveuse.

f. Conclusion et perspectives :

La stimulation des chaînes nerveuses lésées avec les cannabinoïdes anandamide (AEA) et 2-arachidonylglycérol (2AG), agonistes des récepteurs aux cannabinoïdes CBr-like chez *Hirudo* nous démontrent que ces lipides influencent fortement la migration des cellules microgliales. L'AEA et le 2AG à 10 μ M semblent freiner le recrutement des cellules microgliales alors qu'un traitement du SNC lésé avec une concentration en 2AG à 30 μ M, favorise la migration. Il y aurait donc un effet dose dépendant de cette molécule, vérifié à la fois lors des tests *ex vivo* et *in vitro* de recrutements des cellules microgliales de sangsue. Cette différence de recrutement des cellules microgliales entre les deux cannabinoïdes semble liée à leur variation de concentration au cours du temps, dans le cas d'une lésion du SNC d'*Hirudo*. Des quantifications relatives par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF ont permis de montrer que les 4 premières heures suivant la lésion du SNC s'accompagnent d'une augmentation de la concentration en 2AG alors que celle de l'AEA chute. En parallèle à ces observations, nous avons démontré que le 2AG est capable de provoquer la libération de NO à la demande. Nous pensons donc que dans les premières heures après lésion de la chaîne nerveuse, le SNC d'*Hirudo* augmente sa libération en 2AG libérant ainsi un taux contrôlé de NO chargé de recruter les cellules vers le site de lésion. La diminution simultanée de la concentration en AEA constituerait

un moyen pour *Hirudo*, de limiter les effets neurotoxiques pouvant s'activer par un récepteur de type vanilloïde-like dont l'existence putative à la surface des neurones pourrait conduire ces cellules à l'apoptose.

Cette hypothèse, qui constitue une nouvelle voie d'investigation, semble être confirmée par nos études *in vitro* à l'aide d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs vanilloïdes et cannabinoïdes i.e. l'anandamide, l'arvanil, la capsaïcine et la capsazépine.

Nous avons utilisés des concentrations molaires en neuromédiateurs comprises entre $10^{-5}M$ et $10^{-7}M$ diluées dans le milieu de culture L15 et ceci pendant 7 jours de culture. La présence ou l'absence de prolongements cellulaires ainsi que la présence ou l'absence de cellules microgliales au niveau du site de lésion ont permis d'évaluer l'action des drogues utilisées.

Au niveau du connectif inter-ganglionnaire du « témoin » apparaissait un bouquet de cellules microgliales, signe d'un début de régénération nerveuse. A l'inverse, les chaînes traitées à l'anandamide, observées aux mêmes délais, n'ont en comparaison avec la condition « témoin », présenté aucune régénération (Figure 1).

En présence d'anandamide, les chaînes sont devenues très brunes comparées au « témoin » et les cellules semblaient se regrouper au centre des ganglions.

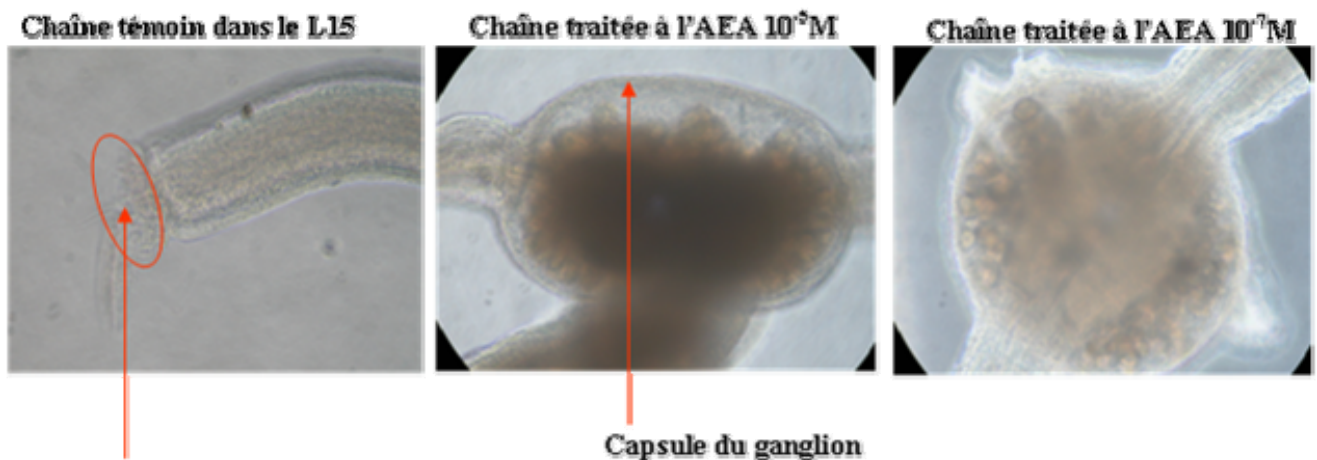


Figure 1 : Chaînes traitées à l'anandamide et condition « témoin ». Photos prises au cinquième jour de culture (grossissement x20)

Il est à noter qu'à la concentration de 10^{-7} M, un résultat similaire est observé 48H plus tard; il semble donc qu'il existe un effet dose dépendant de l'anandamide. Du fait de l'aspect brun des chaînes suite aux traitements, la viabilité des cellules a été vérifiée par une coloration au rouge neutre après cinq jours de culture (Figure 2). L'ensemble de la chaîne a incorporé et conservé le rouge neutre dans ses différentes structures, ce qui témoigne de sa viabilité.



Figure 2 : Chaîne nerveuse colorée au rouge neutre

Par analogie, les chaînes ont été traitées à l'arvanil, aux mêmes concentrations et les cultures ont été menées dans les mêmes conditions. Moins de 48H après la mise en culture des chaînes nerveuses, un début de régénération était déjà visible au niveau des sites de lésion (**Figure 3**). Nous avons également observé un effet dose dépendante de l'arvanil.

Il semblerait que l'arvanil stimule la régénération nerveuse chez *Hirudo* à l'image du rôle neuroprotecteur que cette drogue exerce chez les vertébrés.

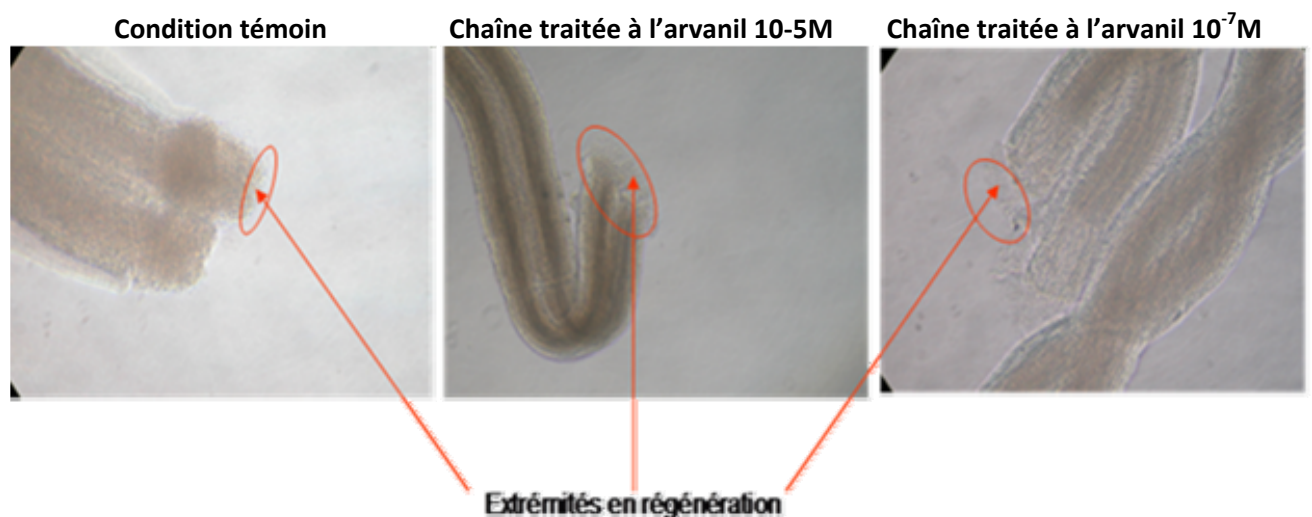


Figure 3 : Chaînes traitées à l'arvanil et condition « témoin ». Photos prises au septième jour de culture (grossissement x20)

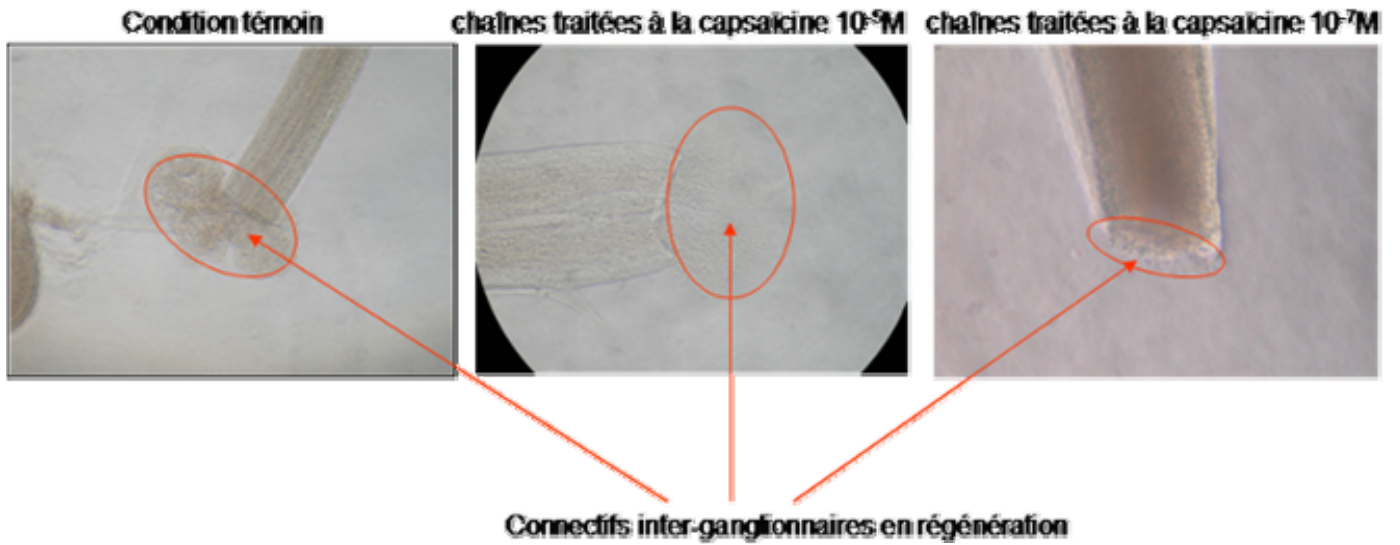


Figure 4 : Chaînes traitées à la capsaïcine et condition « témoin ». Photos prises au quatrième jour de culture (grossissement x20)

Par contre, les chaînes traitées à la capsazépine étaient caractérisées par un brunissement et un flétrissement progressif de l'ensemble des chaînes. En comparaison avec les résultats obtenus après traitements à l'anandamide, la capsazépine a provoqué une dégradation progressive des chaînes après quatre jours de traitements. De plus, aucun effet dose dépendante n'avait été observé (Figure 5).

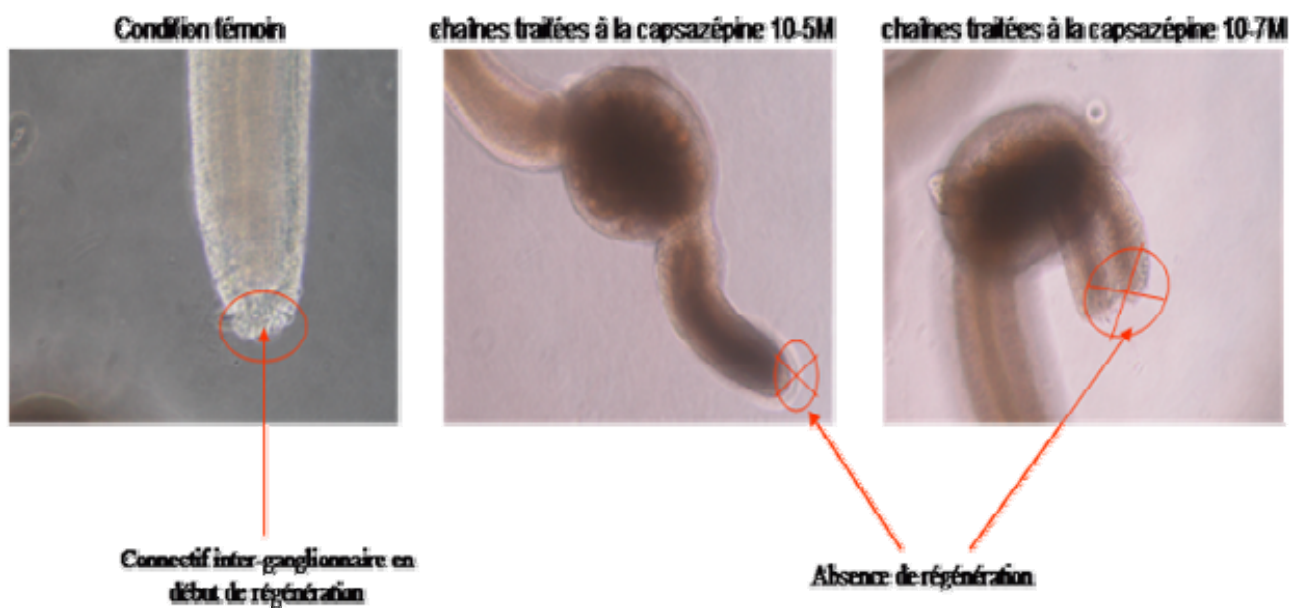


Figure 5 : Chaînes traitées à la capsazépine et condition « témoin ». Photos prises au quatrième jour de culture (grossissement x20)

Ces résultats en culture organotypique confirment que les chaînes en condition témoin conservent leur faculté à régénérer. En effet, des prolongements cellulaires sont observables au niveau du site de lésion et ceci est lié à la migration des cellules microgliales vers le site de coupure. L'inhibition de la libération de NO ainsi que l'inhibition de l'accumulation des cellules microgliales, que nous avons montrées chez *Hirudo* après un traitement des chaînes lésées avec un bloqueur des récepteurs de type CB2-like, appuie fortement l'idée que le système endocannabinoïde et les voies de production du NO sont couplés. Ce système fonctionnerait en synergie afin de contrôler dans l'espace et dans le temps, à la fois l'accumulation des cellules microgliales sur le site lésé du SNC et la concentration de NO libéré dans l'environnement de la lésion.

Si le système endocannabinoïde d'*Hirudo* semble être un moyen possible pour cet Invertébré de réguler durablement son taux de NO après une lésion, les voies de métabolisme des endocannabinoïdes seraient à l'image des Vertébrés, sous influence de l'adénosine triphosphate (ATP) et des récepteurs purinergiques à sept domaines transmembranaires entre autre.

De plus, il semble qu'une exposition trop longue à ces cannabinoïdes comme l'anandamide provoque un phénomène de cicatrisation des chaînes (absence de régénération et de nécrose des chaînes). Cette cicatrisation serait due à un blocage de l'activité pro-inflammatoire des cellules microgliales, ce qui est en accord avec les travaux antérieurs du laboratoire montrant le potentiel anti-inflammatoire de l'anandamide chez la sangsue.

L'arvanil semble stimuler la régénération nerveuse. Son pouvoir régénératif n'a pas été décrit chez les invertébrés. Toutefois, ses effets neuro-protecteurs ont été démontrés dans le modèle murin ainsi que chez le rat (Brooks et al., 2002). L'arvanil active le récepteur CB1 et désensibilise le récepteur vaniloïde VR1, tous deux présents à la surface des neurones. La résultante de ces deux interactions est l'inhibition des mécanismes intra-cellulaires à l'origine de la neuro-dégénération.

La capsaïcine semble, elle aussi activer la régénération des chaînes nerveuse en culture. Tout comme l'arvanil, la capsaïcine désensibilise le récepteur VR1 et bloque le processus inflammatoire après une lésion cérébrale (Brooks et al., 2002). Par contre, aucune régénération nerveuse n'est observée en présence de capsazépine. Les chaînes présentent une morphologie très proche de celle obtenue après traitement à l'anandamide, mais au bout d'un temps plus long (48H pour l'anandamide contre 84H environ pour la capsazépine.). Chez le rat, cette molécule agit en temps qu'antagoniste de VR1, ce qui rend cette drogue active dans le cadre de la neuroprotection impliquant la capsazépine. Ces résultats suggèrent l'existence d'une balance entre récepteurs de types CB-R et vanilloïdes.

Les perspectives sont donc de cloner ces récepteurs d'autant plus que des récepteurs de type CB2R et CB1R sont présents dans le génome de la sangsue *Helobdella robusta*. Leech CB2R et leech CB1R présentent 22% et 41.4% d'homologie avec ceux présents chez la souris.

De cette manière, nous pourrions réaliser des études cinétiques de chaînes lésées associant l'activation des cellules microgliales, l'augmentation de la transcription des gènes codant ces récepteurs et la production de leurs ligands produits au cours des processus de la régénération. Ces études nous permettront de disséquer finement ces processus et par la suite d'envisager grâce à l'emploi d'agonistes et d'antagonistes, leurs modulations en vue d'une translation vers les modèles vertébrés, dans le cas de pathologies neurodégénératives ou d'ischémie.

Cannabinoid control of microglia migration to lesions in the leech CNS

Jeffrey B. Lipitz^{1,*}, Karim Arafah^{2,*}, Xianchong Zhou¹, Isabelle Fournier², Michel Salzet²,
and Kenneth J. Muller^{1,3,#}

¹Department of Physiology and Biophysics, University of Miami School of Medicine, 1600 NW 10 Ave, Miami, FL 33136 USA

²University of Lille1, IFR 147, CNR-FRE 2933, Laboratoire de 8 Neuroimmunologie des Annélides, Villeneuve d'Ascq, France

³Neuroscience Program, University of Miami School of Medicine, 1600 NW 10 Ave, Miami, FL 33136 USA

*Co-authors, with first draft and experiments except for MALDI by JBL, and MALDI experiments and related writing by KA.

Corresponding author's address: RMSB 5089, Department of Physiology and Biophysics, University of Miami School of Medicine, 1600 NW 10 Ave, Miami, FL 33136. kmuller@miami.edu

Abbreviated title: Cannabinoid control of microglia

1 Table and 7 Figures

3 Supplemental figures

Number of pages:

Number of words for Abstract (233), Introduction (476), and Discussion (2044)

Keywords: anandamide, 2-arachadonoyl glycerol, MALDI, extracellular ATP, BzATP, nerve injury

Acknowledgements: Supported in part by an NIH grant to KJM, a University of Miami fellowship to JBL, and . We thank Oscar Cabrera for technical assistance.

ABSTRACT

In both vertebrates and invertebrates, including leeches, microglia are rapidly activated by central nervous system (CNS) damage and migrate to the site of damage. Adenosine triphosphate (ATP), nitric oxide (NO) and endocannabinoids have been implicated in controlling microglial activation and migration, but the effects of these molecules on migration have been controversial. We report that application of endocannabinoids to leech nerve cords at concentrations as low as 10^{-7} M for arachidonylethanolamide (anandamide, or AEA) reduced the number of migrating microglia that accumulated, but not when cords were pretreated with 10 μ M of the CB2 cannabinoid receptor (CB2R) antagonist SR144528. The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol (2-AG) blocked accumulation at 10^{-5} M. Immunoblots confirmed the expression of CB1-like and CB2-like receptors and immunohistochemistry showed that they were concentrated at lesions, where microglia accumulated. MALDI-ToF mass spectrometry showed both AEA and 2-AG were present and 2-AG peaked in the first hour in response to nerve cord damage and to application of 100 μ M ATP, whereas AEA levels rapidly fell. In separate experiments, BzATP (100 μ M) also reduced microglia accumulation, an effect blocked by pretreatment of nerve cords with SR144528 and with the P2X receptor antagonist Brilliant Blue, whereas the G-protein coupled P2Y receptor agonists uridine triphosphate (UTP) and methylthio-ATP (MeSATP) at 100 μ M did not reduce accumulation. These results suggest that P2X7-like receptor

activation elicits production and release of a CB2R agonist that influences microglia movement.

INTRODUCTION

Microglia are distributed throughout the uninjured CNS of vertebrates and invertebrates (Morgese et al., 1983; Ashwell et al., 1989; Perry and Gordon, 1997) and begin moving immediately toward lesions and during various neurological diseases (Duke et al., 2004; Vilhardt, 2005; Kreutzberg, 1996). Their role in repair is controversial because they may release cytotoxins (Qin et al., 2006) or, on the contrary, be neuroprotective and promote axon sprouting (Ngu et al., 2007). While movement of mammalian and invertebrate microglia is reported *in vivo* and *in situ* (Duan et al., 2003; Davalos et al., 2005), most studies have been conducted *in vitro* (Morioka et al., 1991; Ogata et al., 2003; Watanabe et al., 1999), where cells activated during isolation may change and blood cells may be present (Kann et al., 1998; Moller et al., 2000). Because the leech nerve cord lies within a blood vessel, leech microglia can remain undisturbed and separate from blood cells *in situ*, as *in vivo* (McGlade-McCulloh et al., 1989). Extracellular ATP that is presumably released by cord injury initiates movement of microglia while nitric oxide (NO), which is generated following the injury, directs movement of microglia. (Chen et al., 2000; Duan et al., 2003; Shafer et al., 1998; Honda et al., 2001; Davalos et al., 2005; Boucsein et al., 2003; Duan et al., 2009). However, it is unclear how the two signals coordinate their influence over microglia migration and whether there are additional signals.

The cannabinoid system may be important in the response of microglia to injury, since many of the same signals and insults that activate microglia also cause major changes to the endocannabinoid system (Panikashvili et al., 2001;

Berrendero et al., 2001; Cabranes et al., 2006; Maresz et al., 2005; Witting et al., 2004b). Application of ATP to cultured murine microglia causes the synthesis and release of endocannabinoids (Walter and Stella, 2003). The binding of ATP and its analogs to the P2X7R in microglia and astrocytes produces 2-AG (Walter et al., 2003; Witting et al., 2004a). The reported effects of cannabinoids on microglia migration are contradictory, ranging from increased cell movement *in vitro* (Franklin et al., 2003; Walter et al., 2003) to activation and reduced movement *in vitro* and *in vivo* (Sacerdote et al., 2000; Ramirez et al., 2005).

The aim of the present study was to determine whether, in an invertebrate in which accumulation of microglia at lesions appears to promote axon sprouting, cannabinoids and their receptors are involved in regulating microglia activation, migration and accumulation. To investigate this hypothesis, pharmacological agents were used to affect either cannabinoid production or signaling. Their effects were determined by measurement of endocannabinoids, by time-lapse microscopy of living microglia in leech nerve cords and by counting microglia that accumulated at lesions. It was hypothesized that cannabinoids and possibly their metabolites act directly on microglia and on the neuroglia to influence migration and ATP release.

METHODS

Preparations and solutions

Leeches are favorable for studies of microglia migration because of several properties of the leech nerve cord, which is situated entirely within a blood vessel along the animal's ventral midline. The cord can be studied free of blood macrophages by removing it to a saline bath; placed in culture medium, the neurons in the cord will regenerate their usual connections (Nicholls, 1987). The neuronal somata are situated in ganglia separated by paired bundles of axons called connectives that are several millimeters long. A single giant glial cell with its nucleus located midway between ganglia ensheathes all the axons of each connective; the glial cell and axons together are wrapped by a perineurium forming a capsule containing cells that do not move. The resident microglia are scattered among the axons within the glial sheath, they stain with silver carbonate and nuclear stains, and they are present at a density of about 1 cell/ μm of connective length (Morgese et al., 1983). The only cells that move in the connectives are microglia, and they can be tracked by staining their nuclei with vital fluorescent dyes (McGlade-McCulloh et al., 1989).

Adult leeches (*Hirudo sp.*) (Siddall et al., 2007), 3-4 g, were purchased from commercial suppliers (Leeches USA, Westbury, NY, or for MALDI measurements (see below), Ricarimpex, Audenge, France (which supplies Leeches USA)) and maintained in artificial pond water (Forty Fathoms, 0.5 g/L H₂O; Marine Enterprises, Towson, MD) at 22°C. For accumulation experiments and for time-lapse video microscopy experiments, isolated connectives were

dissected in physiological saline (Kuffler and Potter, 1964) and pinned in a 35 mm petri dish containing 1 ml transparent silicone rubber (Sylgard 184; Dow Corning, Midland, MI). When periods of incubation were required, as during overnight incubation after staining nuclei with Hoechst 33258 dye, connectives were placed in Leibowitz-15 culture medium supplemented with 2% fetal bovine serum, 0.6% glucose, and gentamicin (5 μ g/ml) (Ready and Nicholls, 1979), referred to here as L-15. Pharmacological reagents were dissolved to their final concentrations in physiological saline. Anandamide (AEA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was dissolved in ethanol and maintained as a stock 20 mM solution. CB1 and CB2 receptor blockers SR141716A and SR144528, obtained as a gift from the National Institute of Mental Health's Chemical Synthesis and Drug Supply Program, were dissolved in DMSO and physiological saline as stock solutions at 15 mM and 20 mM, respectively. Purinergic agonists (ATP, BzATP, UTP, and MeSATP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were maintained as stock 10 mM solution.

Measurement of microglia accumulation at lesions

The effects of drugs on the accumulation of microglia at crushes were assessed by dissecting connectives, crushing them with a pair of fine forceps (Dumont #5, ground to produce parallel edges separated by ~0.4 mm), and incubating the living tissue at 15 °C for 4 hours in saline alone or in a specified drug. The tissue was fixed 30 min in PBS with 4% paraformaldehyde, pH 7.2, washed in saline, and mounted on a microscope slide under a coverslip in glycerol with Hoechst 33258 dye (10 μ g/ml), a fluorescent nuclear marker. To

count the number microglia accumulating at crushes, images were collected using a Leica DM RXA2 fluorescence microscope with a 20X objective, NA 0.7. A fluorescein filter set was used to identify crushes, since this filter set did not disclose the location of Hoechst-stained nuclei. Stacks of 10 optical sections were photographed at 2 μm intervals in the middle of the connectives with a UV filter set suitable for the Hoechst dye. These stacks were collapsed and projected using a maximum intensity algorithm by the program Metamorph (Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA); cells were counted in a double-blind manner over a square region with sides of 100 μm at each edge of the crush for a volume of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ each. The results were analyzed statistically by an ANOVA, followed by a Fisher post-hoc analysis to determine significance.

Low-Light Video Microscopy

To determine the effects of cannabinoid agonists on microglial cell migration in acutely crushed connectives, living cell nuclei were stained with fluorescent nuclear dye and tracked using low-light video microscopy. Specifically, nerve cords from adult leeches were dissected and mounted as described above, and stained 30 min with Hoechst 33258 fluorescent dye [0.001% (wt./vol.) in physiological saline]. Rinsed nerve cords were kept overnight in L-15 culture medium at 15 °C to optimize staining and decrease background. Although a few microglia accumulated at the cut ends by the next day, microglia throughout the connectives were not moving and were otherwise uniformly distributed.

Stained connectives were treated with the cannabinoid receptor agonist AEA and crushed with the same forceps used to study accumulation of microglia. A 12 V, 100 W tungsten-halogen lamp operated at 8 to 10 V on a Zeiss WL epifluorescence microscope with an 0.2 filter set and heat filter illuminated the preparation through a 40X water immersion objective (NA = 0.75), focusing midway between the top and bottom surfaces of the preparation. A 30% neutral density filter and a computer controlled shutter were placed in the path of the excitation beam to minimize illumination of the tissue and avoid damage. A 300 μm length of connectives adjacent to the lesion was photographed at 2.5-minute intervals for 2 hours (a time in which a maximal rate of accumulation was observed) with a sensitive CCD camera, model XC-77 (Hamamatsu, Hamamatsu City, Japan), and contrast enhanced with an image processor (Argus-10). Images were digitized and a group of 256 frames averaged prior to saving with Image1/AT or Metamorph imaging software (Universal Imaging Corporation Media, PA). Time-lapse videos were analyzed using Metamorph double blind by naïve students, who were instructed to draw one line at the edge of the crush and a second line parallel to the first, 100 μm away from the crush. Only cell nuclei that crossed both lines were counted as having moved in one direction or the other. Statistical significance was determined using a repeated measures ANOVA and a Fisher *post-hoc* test.

Immunoblotting:

Chains of 10 ganglia were dissected, each connective was crushed twice between ganglia and fixed after 4 hours, the time used to allow microglia to

accumulate at the lesions; for an initial time point. Other connectives were fixed immediately after crushing. For the detection of CB1-like receptors and CB2-like receptors in the leech CNS, the connectives were crushed and homogenized in cell extraction buffer (100 mmol HEPES, pH 7.5, 1% Triton X-100, 10 M dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 g/mL leupeptin, 1 g/mL pepstatin A, 1 mmol/L EDTA) at 0 hr and 4 hr. Proteins were quantified with Coomassie blue dye assay. Equal amounts of protein were resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels by electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Applied Biosystems, Foster City, CA), and placed in blocking buffer (0.1% Tween 20, 0.4% I-block in PBS; Applied Biosystems) for 1 hr. The membranes were incubated with anti-CB1R or anti-CB2R (Affinity Bioreagents, Golden, CO) antibody (fusion proteins containing the first 99 and 33 amino acid residues of human CB1 and CB2, respectively, in 100 μ l of affinity purified IgG (1 mg/ml) in PBS containing 50% glycerol, 1 mg/ml BSA, 0.05% sodium azide), washed in blocking buffer, and then treated with an anti-rabbit IgG horse-radish peroxidase linked secondary antibody (Cell Signaling Technology). Membranes were then washed in I-Block for 20 min and PBS for 20 min. The signal was generated by enhanced chemiluminescence using a Phototope-HRP Detection Kit (Cell Signaling Technology) and developed on Blue Ultra Autoreduced Film (ISC Bioexpress, Kaysville, UT). To control for protein loading, the immunoblots were stripped with Restore® Western blotting stripping buffer (Pierce, Rockford, IL) and were re probed with anti-tubulin antibodies (BD Biosciences PharMingen, San Diego,

CA). The band densities were analyzed using repeated measures ANOVA followed by a Fisher *post-hoc* test.

Immunohistochemistry

To examine the distribution of CB1-like receptors and CB2-like receptors and microglia, crushed cords were immunolabeled with anti-CB1R or anti-CB2R antibodies (Affinity Bioreagents Inc., Golden, CO, USA), stained with secondary antibodies and the microglia nuclei then stained with Hoechst 33258 dye. In brief, tissues were dissected from the leech and crushed either 4 hr or 0 hr before fixation in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed and incubated in 10% sucrose for 30 min and in 25% sucrose overnight for cryoprotection before embedding in Tissue-Tek (Ted Pella, Inc, Redding, CA). Tissues were sectioned on a cryostat (Leica SM 2000R Microtome, Leica Microsystems, Bannockburn, IL) at a thickness of 10 μ m. Tissue sections were blocked by treatment with the appropriate preimmune serum [5% normal goat serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.4% Triton X-100 in 0.1M PBS] for 1 hr and then incubated with one of the primary antibodies—the rabbit anti-CB1R (first 99 amino acid residues from human CB1R) or anti-CB2R (first 33 amino acid residues from human CB2R) antibody. The anti-CB1R antibody was applied to tissue sections at a concentration of 1:1500 by volume, while the anti-CB2R antibody was applied to the tissue at a concentration of 1:2000 by volume. Primary antibody binding was detected with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (1:2000; Invitrogen Life Technologies; Carlsbad, CA). Controls lacking the primary antibody were run in parallel. Sections were cover-slipped with 85% glycerol containing 15% aqueous

Hoechst 33258 dye (10 µg/ml) and viewed with a Leica DM RXA2 fluorescence microscope with a 20X objective, NA 0.7, and a Hoechst 33258-selective filter set or a Texas Red-selective filter set. Photographs were also made using a 10X objective, NA 0.3.

Mass Spectrometry - Sample preparation and total lipid extraction:

The approach used to measure levels of endocannabinoids was a form of mass spectrometry called matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time of flight (ToF) spectrometry. Mass spectrometry is well known to be suitable for endocannabinoid detection and quantitation (Williams et al., 2007; Hardison et al., 2006; Bisogno et al., 2009). Lithium salt combined with a matrix solution is known to be effective for determination of nonpolar long-chain lipids, hydrocarbons and polymers by MALDI (Stubiger et al., 2008). Under these conditions, the lithium chloride dissolved in the matrix solution (DHB in acetone) ionizes lipids to form lithiated lipid adducts, and the resulting positive ions, detected in the reflector mode to give higher resolution, are then analyzed. MALDI can also be used for lipid quantitation (Mims and Hercules, 2004; Sugiyama et al., 1999). This approach was then used, as described below.

Isolated nerve cords from 24 leeches, comprising 4 sets, were dissected in physiological saline. Each animal of the set (n=6) contributed six nerve cord sections (three ganglia and three connectives), which were used for measurements of cannabinoids following injury. A second set of animals (n=6) was used for measurements of cannabinoid production following treatment of the cords with 100 µM ATP.

The Folch method (chloroform/methanol (3:1; v/v)) was performed for *Hirudo* CNS total lipid extraction. Internally deuterated anandamide, AEA 4 µg/mL (Cayman Chemical, 390050) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) 4 µg/mL (Cayman Chemical, 362160) were added to each sample before lipid extraction.

The chloroformic phase containing endogenous and deuterated endocannabinoids (AEA & 2-AG) was harvested and submitted to a relative quantification using MALDI-TofF Mass spectrometry (Ultraflex II, Bruker Daltonics Bremen). A 6 mg sample of 2.5 DHB (149357) matrix was mixed with 3 mg of lithium chloride (L-9650; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) salt in 100% acetone lithiated matrix (chromasolV 34850; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and lipid extracts (1:1 v:v) were mixed and dropped onto a 384 stainless steel sample plate (Bruker Daltonics) for mass spectrometric analysis. Each droplet represented a specific time point in the time-course experiments.

Linearity of the mass spectrometry measurements was determined with endocannabinoid standards by measuring the ratio of their accumulated (8000 laser smartbeam shots) area spectra over the corresponding internal deuterated standard one. The measurements obtained for accumulated spectra showed linear responses within the referenced range (Supplementary Fig. 1). Relative quantitation of 2-AG and AEA was performed by stable isotope dilution (2-AGd₈ and AEA d₈). The calibration curves for these endocannabinoids allowed the determination of the relative amounts in the crushed leech connectives and in ATP 100µM. Samples of the records obtained at various times after treatment are shown in Supplementary Fig. 2. The presence of 2-AG and AEA was

determined by observing that their respective ions of M/z 385.29 and 354.29 were isolated and fragmented according the positive LIFT mode of the MALDI ToF mass spectrometer and compared to their corresponding standards, as shown in Supplementary Fig. 3.

A one-way ANOVA was used for statistical analysis of the measurements of 2-AG, for which the data passed both the normality and equal variance tests, while a Mann-Whitney U test was used for the AEA data. The Holm-Sidak method for multiple comparisons versus control group was used to determine significant at the 0.01 level, indicated by asterisks.

RESULTS

Effects of AEA on migration of microglia to lesions

To determine whether cannabinoids alter microglial migration to lesions, the number of microglia that accumulated at the lesion in 4 hours was measured in cords that were crushed in the presence of AEA or 2-AG at a range of concentrations and compared to controls without AEA or 2-AG (Fig. 1A and 1B). In addition, microglia were counted in the same volume more than a millimeter from the crush site, shown previously to be unaffected by the crush in 4 hours (Duan et al., 2005), which is represented as distal (DIS), or baseline, counts. There was a concentration-dependent effect of AEA in reducing microglia accumulation compared to controls over a range of 10^{-4} M to 10^{-7} M. 2-AG reduced microglia accumulation at 10^{-5} M. Agents that interfere with action of nitric oxide (NO) reduce accumulation of microglia at lesions by causing their movement to no longer be directed, although the motion of the cells is undiminished (Duan et al., 2003). Therefore, it was important to determine whether the AEA was arresting movement.

Time-lapse video microscopy was used to distinguish whether microglia were arrested or misdirected away from crush sites upon cannabinoid application. Table 1 shows the number of microglia moving toward or away from a crush in 10^{-5} M AEA and in the control. One microglial cell moved away from the crush in the presence of AEA, while there was a 75% reduction of the total number of microglia moving compared to control preparations. This indicates that microglia are slowed or arrested in response to AEA.

To determine if the effect of AEA on microglia was reversible, connectives exposed to AEA for 4 hours were washed, crushed in physiological saline and then microglia allowed to accumulate (Wash). As a negative control in which microglia were able to accumulate, connectives were kept in physiological saline for 4 hours, washed for 20 min with saline, then crushed and microglia allowed to accumulate for 4 hours (Fig. 1C). For the positive control (AEA), connectives were also kept in saline for 4 hours, washed, crushed in AEA at 10^{-4} M and microglia allowed to accumulate. The effects of AEA applied for 4 hours were reversible and not lethal to microglia, since in the “Wash” condition microglia accumulation was not statistically different than the negative control.

AEA action through CB1- and CB2-like cannabinoid receptors

To determine if cannabinoid receptors were stimulated by AEA, the connectives were preincubated with an antagonist for the CB1 receptor, SR141716A, or for the CB2 receptor, SR144528, at 10^{-5} M. Standard accumulation procedures and analysis were used to determine AEA receptor targets. Our results showed that 10^{-5} M AEA in the presence of SR144528 did not reduce accumulation of microglia at lesions (Fig. 2). In contrast, SR141716A did not fully reverse the effect of AEA on microglia accumulation. The vehicles DMSO and ethanol at the maximum concentrations applied with reagents did not alter the response of microglia to nerve cord damage. This result suggests that AEA arrested migrating microglia, in part, through the CB2-like receptor.

Cannabinoid-like receptors are present in the leech

While there is evidence for the cannabinoid system in the CNS of *Hirudo*, and CB1 receptors have been microsequenced (Stefano et al., 1997), CB2 receptors have not been reported. A Western blot was used to detect them in the leech CNS (Fig. 3). Commercial antisera against the first 99 amino acid residues on the extracellular N-terminus of the human CB1 receptor and against the first 33 amino acid residues on the extracellular N-terminus of the human CB2 receptor were used to identify CB1-like and CB2-like proteins, respectively. Rat hippocampus and rat spleen were used as positive controls to confirm molecular weights of CB1 and CB2 receptors, respectively, as these rat tissues are known sources of the receptor proteins. The CB1- and CB2-like receptors were detected at molecular weights of 53 kD and 46 kD, respectively, in both leech and rat tissue, and the intensity of the bands did not change from 0 to 4 hours after nerve cord injury.

Immunohistochemistry was used to determine if the receptors were associated with microglia, which take time to accumulate, or simply with lesions (Fig. 4). Connectives that were fixed immediately after dissection and crushing and others that were fixed after 4 hours when microglia had accumulated were cryosectioned and exposed to anti-CB1R or anti-CB2R antisera prior to staining with fluorescent secondary antibody and Hoechst 33258 dye to observe the distributions of presumed cannabinoid receptors and microglia nuclei. As controls, some sections were treated with only secondary antibody. In controls, there was no change of immuno-fluorescence at crush sites with or without

microglia (Fig. 4C). CB2R immunoreactivity predominated in the regions that contained microglia nuclei in tissue that had been fixed 4 hours after crushing (Fig. 4A). This result suggests that CB2-like receptors were expressed on microglia at higher levels than on other cells. In contrast, CB1R immunoreactivity was highest at crush sites independently of whether microglia had accumulated (Fig. 4B). Furthermore, CB1R immunoreactivity was identified on 1 of the 2 connectives or both, consistent with the expression of the CB1 receptor in the large glial cell or in the axons. This result does not rule out the possibility that the CB1 receptor is located directly on microglia, but it does suggest that the CB1 receptor is expressed on cells other than microglia. It also indicates that the CB1 receptor protein expression levels are higher on the large glial cells or axons, or both, than on microglia. Additionally, the CB1-stained sections served as controls to confirm that increases in immunoreactivity could not be accounted for by bleed through from the Hoechst-stained tissue, since CB1 immunoreactivity was not associated with microglia nuclei. Separate measurements of rhodamine fluorescence intensity directly on the nuclei and in nearby regions confirmed that there was no contamination of the rhodamine signal by Hoechst 33258.

Measurements of endocannabinoids following injury and treatment with 100 μ M ATP

Because the results in this study show that endocannabinoids inhibit microglia, it is of interest to know whether endocannabinoids are present in nerve cords and whether their levels change after treatments that have been shown to affect microglia movement and migration. Since ATP and BzATP increase

production of 2-AG in cultured murine microglia ATP (Witting et al., 2004a), ATP and a crush, which presumably releases ATP, might also increase production of cannabinoids in the leech.

As shown in Fig. 5A, 2-AG levels rose about 14-fold from baseline levels 30 min after treatment with 100 μ M ATP, and returned to baseline levels 60 min after treatment. Similarly, 2-AG levels rose to a maximum about 30 min after injury, and returned to baseline levels 4 hours after injury (Fig. 5B). In contrast, AEA levels dropped after treatment with ATP, beginning to recover by 10 min after treatment. AEA levels also rapidly (within 5 min) dropped after injury to the nerve cord, but did not fully return to baseline levels within 4 hours of injury.

Effects of ATP and its analogs on microglia accumulation

Since ATP, perhaps including analogs such as BzATP, increased production of 2AG, and cannabinoids reduced accumulation of microglia at lesions, ATP and BzATP may also alter microglia accumulation. Alternatively, the drop in AEA in response to 100 μ M ATP and the stimulation of microglial movement by exogenous ATP might suggest otherwise (Duan et al., 2009). As shown in Fig. 6, ATP, BzATP, MeSATP and UTP were each applied at a concentration of 100 μ M to connectives for 4 hours beginning immediately after injury. The P2X7R agonist BzATP reduced microglia accumulation to the level observed with no crush, i.e. the distal level (DIS). BzATP and UTP may both bind to P2Y2 receptors (Wildman et al., 2003), but since ATP and UTP had no effect on microglia accumulation, the action of BzATP might be via P2X7

receptors rather than P2Y2 receptors . Furthermore, the non-selective P2Y agonist MeSATP had no effect on microglia accumulation.

BzATP and Endocannabinoid signaling

Since BzATP reduced accumulation of microglia at crushes in the experiments of the previous section, it was of interest to know whether BzATP reduced microglia accumulation through cannabinoid signaling. To test this hypothesis, drugs that interfere with purinergic and cannabinoid signalling were applied to connectives to determine if microglia accumulation at lesions was affected (Fig. 7). Specifically, connectives were incubated with the CB2R antagonist SR144528 (10 μ M) or with the P2X7R antagonist Brilliant Blue (BB, 10 μ M) for 30 min, crushed, and microglia allowed to accumulate for 4 hours before fixation. In some preparations containing SR1445128, BzATP (100 μ M) was added to connectives at the time of crushing, while in other preparations containing BB, AEA (10 μ M) was added at the time of crushing. The CB2 antagonist blocked the effect of BzATP on microglia accumulation, restoring accumulation to control levels. This indicated that BzATP was ineffective unless cannabinoid signalling through the CB2 receptor occurred. BB by itself had no effect on accumulation, and BB had no effect on the ability of AEA to reduce accumulation of microglia, consistent with specific actions of the drugs, although BB did block the ability of BzATP to interfere with accumulation. This indicates that cannabinoid signaling is a downstream event of BzATP binding. However, the apparent recovery of the microglia response in BzATP-BB was incomplete, since the difference between the BzATP and BzATP-BB conditions was not

statistically significant. As in previous experiments, AEA and SR144528 were dissolved in ethanol and DMSO, respectively, so those connectives were exposed to final vehicle concentrations of 1:2000. The vehicles had no effect on microglia accumulation. AEA and BzATP were positive controls for this experiment. Both reagents reduced microglia accumulation, as in previous experiments. BB and SR144528 by themselves had no effect on microglia accumulation in the first 4 hours after injury.

DISCUSSION

Cannabinoids suppress microglia migration

The endogenous cannabinoid system is established as important in the regulation of neuron signaling, and may also help to regulate signaling in immune cells and tissues. The CB1R has been identified on large populations of neurons, astrocytes and macrophages in vertebrates (Sinha et al., 1998; Liu et al., 2003b; Blazquez et al., 1999) and invertebrates (Matias et al., 2001). Although the CB2R has been identified on immune cells and in tissues in vertebrates (Benito et al., 2003; Carlisle et al., 2002; Van Sickle et al., 2005), CB2 receptors have not been reported in invertebrates. The present study has demonstrated that in the leech, exogenous cannabinoids decreased the accumulation of microglia at lesions, a result of reduced movement in AEA and, in preliminary experiments (not shown), in 2-AG. The action was at least in part mediated through a CB2-like receptor, since it was reversed by a CB2-R inhibitor, and a CB2-like receptor colocalized with microglial cells by immunohistochemistry. Furthermore, the ATP analog BzATP affected microglia at least in part through endocannabinoid signaling involving the CB2-like receptor.

There are conflicting reports on how endocannabinoids influence the migration of macrophages, including microglia, in mammals. There is indirect evidence that cannabinoid stimulation will stop macrophages from reaching sites of injury (Sacerdote et al., 2005; Sacerdote et al., 2000) and evidence that cannabinoids suppress accumulation of microglia (Ramirez et al., 2005). In contrast, most *in vitro* studies show that cannabinoids activate microglia and

initiate their chemotactic migration (Franklin et al., 2003). Experiments in the present study showed that leech microglia were influenced by cannabinoids in a concentration dependent manner. Both AEA and 2-AG reduced accumulation of microglia at crush sites, and low-light video microscopy showed AEA suppressed migration and did not instead misdirect moving microglia, as reported for treatments that interfere with NO signalling (Duan et al., 2003; Duan et al., 2009). The chemotactic response of leech microglia to nerve injury is part of a signalling cascade in which nitric oxide synthase activated by the lesion generates NO (Shafer et al., 1998) that activates soluble guanylate cyclase (Duan et al., 2003; Duan et al., 2005; Duan et al., 2009). The suppression of microglia movement by cannabinoids was consistent with a separate influence of higher concentration of NO, which slows or arrests microglia. Thus, the NO donor SPNO slows migration of microglia to a crush and slows or arrests their movement in collagen gels (Chen et al., 2000).

Cellular and phylogenic distribution of CB1 and CB2-like receptors

There is good evidence for a conserved endocannabinoid system in vertebrates (De Petrocellis et al., 2004) and invertebrates (Matias et al., 2001; Salzet and Stefano, 2002), despite an unsupported claim that CB1 receptors do not exist in the leech (Elphick, 1998). The partially microsequenced CB1 receptor reported for leech has highly conserved regions in the putative transmembrane domains 1 and 2 (Matias et al., 2001; Salzet and Stefano, 2002). This receptor also exhibits high affinity binding of AEA as shown by the inability of other cannabinoid signaling molecules to displace [³H]AEA (Stefano et al., 1997).

However, to establish that CB1 and CB2 receptors exist and are expressed in the leech, it will be necessary to sequence the receptor cDNA.

Several major components of the endocannabinoid system have been reported in the leech, including the CB1 receptor, endogenous cannabinoid ligands and the fatty acid amide hydrolase that degrades AEA (Matias et al., 2001). Furthermore, the experiments reported here confirmed the existence of a CB1-like receptor in leech nerve cord based on pharmacology and immunology, with a molecular weight comparable to that of the rat CB1 receptor (Twitchell et al., 1997). Moreover, immunoblot results indicated the presence of a CB2-like receptor with a mass similar to the CB2 receptor in vertebrates (Jorda et al., 2004).

CB1- and CB2-like receptors were associated with leech microglia corresponding in many respects to vertebrate CB1 and CB2 receptors reportedly on microglia (Walter et al., 2003). Activation of cultured mouse microglia causes a redistribution of these receptors, leading to high density CB2 receptor expression at the leading edge of the lamellipodia, which is an indication that cannabinoid signaling may be involved with microglia migration (Walter et al., 2003). In invertebrates, in addition to the present work on the leech, there is evidence for a CB1-like receptor on microglia and immunocytes in mollusks (Stefano et al., 1996). It is important to note that the result showing the distribution of CB1 receptor immunoreactivity does suggest that the CB1 receptor may influence microglia indirectly or may have a role independently of influencing microglia migration. Although the immunostain presented here does not indicate

that there is a redistribution of CB receptors after injury, it does support the hypothesis that endocannabinoid signaling has been conserved as an important regulator of microglia function.

Synthesis of cannabinoids after injury

Despite evidence for a cannabinoid system in the CNS of the leech including the presence of AEA, 2AG and *N*-arachidonylphosphatidylethanolamine, the precursor of AEA (Matias et al., 2001), it was unknown whether endocannabinoid levels change after nerve cord damage in the leech. The present results showed that both injury and ATP, which is released after injury, caused a rise in 2-AG, but caused a decline in AEA. In vertebrates, disrupted synthesis of 2-AG and of AEA are documented in cases of traumatic brain injury (Panikashvili et al., 2001), experimental autoimmune encephalomyelitis (Cabranes et al., 2005), and multiple sclerosis (Shohami and Mechoulam, 2006), each where there is neuroinflammation (Witting et al., 2004b; Witting et al., 2004a). Cultured mouse macrophages themselves synthesize AEA in response to agents associated with nerve insults (Liu et al., 2003a).

Interactions of purinergic and cannabinoid signaling pathways

There is evidence for the existence of P2X and P2Y-like receptors in the leech, since antagonists of P2Y receptors such as Reactive Blue 2 prevent activation of leech microglia altogether and the response to 100 μ M ATP, whereas the P2X7R agonist BzATP suppresses microglia accumulation (Duan, 2004; Duan et al., 2009). The P2X7R agonist BzATP at 100 μ M reduced the accumulation of microglia at crush sites, while 100 μ M UTP, MeSATP or ATP did

not affect accumulation, consistent with activation by BzATP of a P2X7-like receptor^[JBL2]. ATP activates rat and mouse microglia in tissue culture and *in vivo* (Davalos et al., 2005; Inoue, 2002), evidently acting through a P2Y12 receptor (Haynes et al., 2006). Application of 100 μ m ATP, ADP, or UTP but not BzATP independently of nerve damage results in the non-directed movement of microglia, consistent with the hypothesis that P2Y receptors are important for activation of microglia. Although ATP induces microglia to move, microglia at crush sites do not migrate away from the crush, consistent with the presence of a signal at the lesion that may coordinate microglia accumulation there. In the leech, NO may play such a role (Shafer et al., 1998; Chen et al., 2000; Duan et al., 2003).

Injury to the vertebrate CNS causes ATP to be released, both locally from damaged cells spilling their contents and through specific but diffuse release by glial cells propagating calcium waves (James and Butt, 2001; Paemeleire and Leybaert, 2000). There is good evidence for similar release in the leech (Bao et al., 2007). Although extracellular ATPases degrade released ATP, release may persist and ATP may remain elevated. ATP activates vertebrate P2X7Rs and thus causes the synthesis of 2-AG (Witting et al., 2004a). ATP that is detected by more sensitive receptors at a distance from the crush may also trigger synthesis of AEA and 2-AG (Walter and Stella, 2003; Walter et al., 2003). In addition, P2X7R- and CB2R-immunoreactive human microglia are increased in multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis (Yiangou et al., 2006), further supporting a possible link between purinergic and cannabinoid signaling.

Application of ATP and its analogs to leech nerve cords caused a drop in AEA and a rise in 2-AG, perhaps because of a rise in its synthesis. Consistent with this, ATP treatment of cultured mouse microglia, astrocytes and neurons increases 2-AG synthesis (Walter et al., 2003; Walter and Stella, 2003). Furthermore, there is a proposed pathway in vertebrates whereby P2X7R stimulation leads to the synthesis of 2-AG (Witting et al., 2004a). However, even 100 μ M ATP, which might not significantly activate P2X7Rs, increases production of 2-AG nine-fold in mammalian astrocytes (Walter and Stella, 2003), so activating other purinergic receptors may also trigger endocannabinoid synthesis. Moreover, the synthesis of N-acylphosphatidylethanolamine (NAPE), the precursor of AEA, is contingent on a transient rise in intracellular calcium, characteristic of P2Y activation (Liu et al., 2006). Interestingly, under basal conditions, cultured mouse microglia produce twenty-fold higher levels of endocannabinoids than do neurons (Walter et al., 2003). The cultured microglia contain high levels of AEA under basal conditions, which does not appear to change after 10 min of treatment with 1 mM ATP or up to 5 min treatment with 5 μ M ionomycin (Walter et al., 2003). On the other hand, the same study shows that 2-AG is present at lower concentrations in microglia under basal conditions and is rapidly synthesized following treatment with the same stimuli. In our study, AEA was present in nerve cords at high levels under basal conditions, while 2-AG was present at much lower concentrations; the two findings are consistent with the cultured mouse microglia and neuron study. Our result that 2-AG rose following treatment with ATP or nerve injury was also consistent with that for the

cultured mouse microglial cells. Like ionomycin, nerve injury should elevate calcium in damaged cells. In contrast to the cultured mammalian cell study, in which AEA levels are unchanged following ATP and ionomycin treatment, we found that AEA levels rapidly decreased. Although the basis of the difference is not known, it appears that AEA is unlikely to influence microglial migration immediately after injury.

AEA causes nitric oxide levels to rise in invertebrate immunocytes, microglial and human monocytes (Magazine et al., 1996). In leeches (Shafer et al., 1998) and in mollusks (Stefano et al., 2004b; Stefano et al., 2004a) high nitric oxide levels inhibit microglial chemotaxis. In addition, in human granulocytes and in molluscan ganglia and immunocytes, nitric oxide is present under basal conditions (Stefano et al., 2002). Perhaps under basal conditions, AEA is in part present to maintain basal NO levels and maintain microglia in a relatively quiescent state. However, following injury, tonal AEA content is decreased to facilitate microglial recruitment. Since 2-AG and AEA may activate some of the same receptors (CB1 and CB2), the influence of AEA will decrease whether AEA is unchanged or reduced. Since our measurements were global, regional or local differences would not have been detected. It is conceivable, for example, that AEA drops generally in the tissue, thus facilitating microglia movement, but that at the lesion 2-AG increases and possibly also AEA, arresting microglia migration, most likely by increasing NO to levels that inhibit movement.

The interaction of BzATP and the endocannabinoids

In the present work, the P2X7R agonist BzATP suppressed the accumulation of microglia, apparently through the production of endocannabinoids that mediate their effect through a CB2-like receptor. An alternative explanation is that the action of BzATP through a P2X7-like receptor requires the coactivation of the CB2-like receptor by endocannabinoids that are constitutively present, but this seems unlikely with evidence that ATP increase 2-AG synthesis with a delay like that for slowing of microglia in BzATP. In any case, presumably ATP itself in high concentrations might similarly slow microglial migration, although that has not been clearly determined in the leech or elsewhere.

Why are cannabinoids produced and released in response to ATP? It is possible that endocannabinoids produced prior to injury are present in order to stabilize microglia. Microglia are activated by ATP, presumably at concentrations that may be used to signal between cells independently of injury ($>100 \mu\text{M}$) (Duan, 2004). However, if microglia activation were unchecked, the cells could not respond optimally to a true threat. The problem is solved by a negative feedback system that controls for the unnecessary activation of the immune response, but does not block sustained signals, such as ATP. Since AEA is reduced after the first few minutes following injury or treatment with ATP, its effect on microglia migration may be decreased until later after levels of 2-AG and possibly other cannabinoids rise. This implies that some cannabinoids may need to be degraded to allow microglia to respond to injury. On the other hand,

cannabinoids like 2-AG present 30 min after injury may be involved in regulating microglia accumulation at sites of injury. In other words, cannabinoids may play a crucial role in the negative regulation of microglial migration, while ATP rapidly initiates their migration.

Table

	Anandamide/AEA	Ringer
Microglia Moving <i>Toward the Lesion</i>	4.50 ± 0.32*	16.75 ± 1.48
Microglia Moving <i>Away From the Lesion</i>	0.50 ± 0.14	0 ± 0

Table 1: Effect of AEA on migration of microglia in response to a nerve crush. Microglia nuclei were stained with Hoechst 33258 dye and observed for 2 hours following an acute crush of the nerve cord (n = 4). Values are the number of microglia crossing 2 lines separated by 100 µm. One line was placed at the edge of the crush and the second was parallel to the first and placed 100 µm away from the crush. Values are averages ± S.E.M. Asterisk indicates significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test (P<0.05).

Figures

Figure 1. Effects of cannabinoids on microglia accumulations at lesions. **A.** Effect of AEA at the concentrations indicated, with the response of microglia measured as accumulation at a crush site (n = 5). The highest concentration of AEA contained 0.5% ethanol, which was therefore used as a control. Distal counts (DIS, diamond) were made at least 1 mm from the crush. **B:** Dose-response curve of 2-AG at the concentrations indicated, with response of microglia measured as accumulation at a crush site (n = 3). The highest concentration of 2-AG contained 0.5% ethanol, which was therefore used as a control as “vehicle.” Distal counts (DIS, diamond) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $100 \times 100 \times 18 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisk indicates significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$). **C.** Reversibility of the effect of AEA on microglia accumulation. Connectives were treated with AEA (100 μM) or Ringer’s for 4 hrs, washed for 20 minutes with Ringer’s, and then crushed in Ringer’s to assess microglia accumulation 4 hrs later (n = 3). In the positive control (AEA), AEA was applied at the time of crush. For panels A-C, distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush and 2 counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significant difference from vehicles, as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

Figure 2. Effect of CB1R and CB2R antagonists on AEA block of microglia accumulation. Accumulation was measured 4 hours after crushing (n = 6). The concentrations of reagents were 10 μ M AEA, 10 μ M SR141716A (CB1R antagonist), and 10 μ M SR144528 (CB2R antagonist). The vehicles in this experiment were ethanol (1:2000) and DMSO (1:2000). Antagonists were applied 30 minutes prior to crushing the connectives. All other drugs were applied at the time of crushing. Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

Figure 3: Immunoblots to measure expression of CB1 and CB2-like receptors in the leech CNS before and after injury. Ten connectives and ganglia were removed for each condition from 3 animals each. In the “0 hour” condition connectives were immediately frozen and in the “4 hour” condition connectives were crushed and frozen 4 hours later. Rat hippocampus and spleen tissues, which contained CB1 and CB2 receptors, respectively, were immunoblotted with the anti-CB receptor antibodies to confirm the molecular weights of the bands to which the antibodies were binding. Values are averages \pm S.E.M.

Figure 4 Immunostains of CB-like receptors and accumulated microglia at lesions. In each pair of panels, top panel is the immunostain, with Alexa Fluor

594 goat anti-rabbit IgG as secondary antibody, and bottom panel shows microglia nuclei stained with Hoechst 33258 dye, fixed 4 hours after injury. In each panel the region of the crush was between the 2 vertical bars. **A:** Immunostain of CB2-like receptors and microglia nuclei, using an antibody for human CB2 receptors. **B:** Immunostain of CB1-like receptors and microglia nuclei using an antibody for CB1 receptors. **C:** Controls labeled with secondary antibody without primary antiserum. In each case, Images are representative of sections of nerve cord from 3 animals. Images taken with a 10X objective, NA = 0.3. Scale bar = 100 μm .

Figure 5. MALDI ToF measurement of cannabinoids in injured nerve cords or in cords treated with ATP. **A.** Levels of 2-AG after the nerve cord was bathed in 100 μM ATP (closed circles, $n = 5$). **B.** Levels of 2-AG after the nerve cord was crushed (closed circles, $n = 6$). In a separate set of 6 animals the levels before crushing and 30 minutes after crushing were also measured (open triangles). **C.** Levels of AEA after the nerve cord was bathed in 100 μM ATP (closed circles, $n = 5$). In a separate set of 5 animals the levels before adding ATP and 30 minutes afterward were also measured (open triangles). **D.** Levels of AEA after the nerve cord was crushed (closed circles, $n = 6$). Asterisks indicate levels significantly different from the first time point, nominally at 0 minutes, at $p < 0.01$, as described in Methods.

Figure 6. Effects of purinergic agonists BzATP, ATP, UTP and MeSATP on microglia accumulation at lesions. All agonists were applied to connectives at 100 μM immediately following injury, and fixed 4 hours later ($n = 4$). Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush and indicate the number of microglia present without crushing. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are mean \pm S.E.M. Asterisk indicates significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

Figure 7. Drugs that promote microglia accumulation at lesions in presence of BzATP. Reagents were applied 30 min before crushing the connectives, which

were fixed 4 hours after injury (n = 6). BzATP was applied at 100 μM , while Brilliant Blue (BB), AEA and SR144528 were each applied at 10 μM . AEA contained 0.05% ethanol, which was used as a control (Vehicle). Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

Supplementary Figure 1. Calibration curves for endocannabinoids (see Methods). **a.** 2-AG, for crushed nerve cords. **b.** 2-AG, for ATP-treated nerve cords. **c.** AEA in crushed or ATP treated nerve cords.

Supplementary Figure 2. Time course of 2-AG (a) and AEA (b) measured in the leech CNS by MALDI ToF mass spectrometry.

Supplementary Figure 3. Characterization of the endocannabinoids ions related to 2AG (a) & AEA (b) produced in the leech nerve cord.

Reference List

- Ashwell KWS, Hollander H, Streit W, Stone J (1989) The Appearance and Distribution of Microglia in the Developing Retina of the Rat. *Vis Neurosci* 2: 437-448.
- Bao L, Samuels S, Locovei S, Macagno ER, Muller KJ, Dahl G (2007) Innexins form two types of channels. *FEBS Lett* 581: 5703-5708.
- Benito C, Nunez E, Tolon RM, Carrier EJ, Rabano A, Hillard CJ, Romero J (2003) Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci* 23: 11136-11141.
- Berrendero F, Sanchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, Garcia-Merino A, Fernandez-Ruiz J (2001) Changes in cannabinoid CB1 receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* 41: 195-202.
- Bisogno T, Piscitelli F, Di Marzo V (2009) Lipidomic methodologies applicable to the study of endocannabinoids and related compounds: Endocannabinoidomics. *Eur J Lipid Sci Technol* 111: 53-63.
- Blazquez C, Sanchez C, Daza A, Galve-Roperh I, Guzman M (1999) The stimulation of ketogenesis by cannabinoids in cultured astrocytes defines carnitine palmitoyltransferase I as a new ceramide-activated enzyme. *J Neurochem* 72: 1759-1768.
- Boucsein C, Zacharias R, Farber K, Pavlovic S, Hanisch UK, Kettenmann H (2003) Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* 17: 2267-2276.
- Cabranes A, Pryce G, Baker D, Fernandez-Ruiz J (2006) Changes in CB1 receptors in motor-related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. *Brain Res* 1107: 199-205.
- Cabranes A, Venderova K, de Lago E, Fezza F, Sanchez A, Mestre L, Valenti M, Garcia-Merino A, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz J (2005) Decreased endocannabinoid levels in the brain and beneficial effects of agents activating cannabinoid and/or vanilloid receptors in a rat model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 20: 207-217.

- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *International Immunopharmacology* 2: 69-82.
- Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ (2000) Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *J Neurosci* 20: 1036-1043.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8: 752-758.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141: 765-774.
- Duan Y (2004) Control of Microglial Cell Migration. Coral Gables: Thesis, University of Miami.
- Duan Y, Haugabook SJ, Sahley CL, Muller KJ (2003) Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. *J Neurobiol* 57: 183-192.
- Duan Y, Panoff J, Burrell BD, Sahley CL, Muller KJ (2005) Repair and regeneration of functional synaptic connections: Cellular and molecular interactions in the leech. *Cell Mol Neurobiol* 25: 441-450.
- Duan Y, Sahley CL, Muller KJ (2009) ATP and NO dually control migration of microglia to nerve lesions. *Dev Neurobiol* 69: 60-72.
- Duke DC, Moran LB, Turkheimer FE, Banati R, Graeber MB (2004) Microglia in culture: What genes do they express? *Dev Neurosci* 26: 30-37.
- Elphick MR (1998) An invertebrate G-protein coupled receptor is a chimeric cannabinoid/melanocortin receptor. *Brain Res* 780: 170-173.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 23: 7767-7775.
- Hardison S, Weintraub ST, Giuffrida A (2006) Quantification of endocannabinoids in rat biological samples by GC/MS: technical and theoretical considerations. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 81: 106-112.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D (2006) The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9: 1512-1519.

- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21: 1975-1982.
- Inoue K (2002) Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40: 156-163.
- James G, Butt AM (2001) P2X and P2Y purinoreceptors mediate ATP-evoked calcium signalling in optic nerve glia in situ. *Cell Calcium* 30: 251-259.
- Jorda MA, Rayman N, Tas M, Verbakel SE, Battista N, van Lom K, Lowenberg B, Maccarrone M, Delwel R (2004) The peripheral cannabinoid receptor Cb2, frequently expressed on AML blasts, either induces a neutrophilic differentiation block or confers abnormal migration properties in a ligand-dependent manner. *Blood* 104: 526-534.
- Kann O, Moller T, Verkhratsky A, Kettenmann H (1998) Activation of microglia affects expression of purinoreceptors. *Eur J Neurosci* 10: 337.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19: 312-318.
- Kuffler SW, Potter DD (1964) Glia in the leech central nervous system: physiological properties and neuron-glia relationship. *J Neurophysiol* 27: 290-320.
- Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G (2003a) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappa B independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 278: 45034-45039.
- Liu J, Wang L, Harvey-White J, Osei-Hyiaman D, Razdan R, Gong Q, Chan AC, Zhou ZF, Huang BX, Kim HY, Kunos G (2006) A biosynthetic pathway for anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13345-13350.
- Liu P, Bilkey DK, Darlington CL, Smith PF (2003b) Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat hippocampus and entorhinal, perirhinal, postrhinal and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Brain Res* 979: 235-239.
- Magazine HI, Liu Y, Bilfinger TV, Fricchione GL, Stefano GB (1996) Morphine-induced conformational changes in human monocytes, granulocytes, and endothelial cells and in invertebrate immunocytes and microglia are mediated by nitric oxide. *J Immunol* 156: 4845-4850.

- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005) Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95: 437-445.
- Matias I, Bisogno T, Melck D, Vandenbulcke F, Verger-Bocquet M, De Petrocellis L, Sergheraert C, Breton C, Di Marzo V, Salzet M (2001) Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain Res Mol Brain Res* 87: 145-159.
- McGlade-McCulloh E, Morrissey AM, Norona F, Muller KJ (1989) Individual microglia move rapidly and directly to nerve lesions in the leech central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1093-1097.
- Mims D, Hercules D (2004) Quantification of bile acids directly from plasma by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem* 378: 1322-1326.
- Moller T, Kann O, Verkhatsky A, Kettenmann H (2000) Activation of mouse microglial cells affects P2 receptor signaling. *Brain Res* 853: 49-59.
- Morgese VJ, Elliott EJ, Muller KJ (1983) Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. *Brain Res* 272: 166-170.
- Morioka T, Kalehua AN, Streit WJ (1991) The microglial reaction in the rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 11: 966-973.
- Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ (2007) Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. *J Comp Neurol* 503: 101-109.
- Nicholls JG (1987) *The Search for Connections: Study of Regeneration in the Nervous System of the Leech*. Magnes Lecture Series: Volume II. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.
- Ogata T, Chuai M, Morino T, Yamamoto H, Nakamura Y, Schubert P (2003) Adenosine triphosphate inhibits cytokine release from lipopolysaccharide-activated microglia via P2y receptors. *Brain Res* 981: 174-183.
- Paemeleire K, Leybaert L (2000) ATP-dependent astrocyte-endothelial calcium signaling following mechanical damage to a single astrocyte in astrocyte-endothelial co-cultures. *J Neurotrauma* 17: 345-358.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413: 527-531.

- Perry VH, Gordon S (1997) Microglia and macrophages. In: Immunology of the nervous system (Keane RW, Hickey WF, eds), pp 155-172. New York: Oxford University Press.
- Qin B, Cartier L, Dubois-Dauphin M, Li B, Serrander L, Krause KH (2006) A key role for the microglial NADPH oxidase in APP-dependent killing of neurons. *Neurobiol Aging* 27: 1577-1587.
- Ramirez BG, Blazquez C, del Pulgar TG, Guzman N, de Ceballos MAL (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: Neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25: 1904-1913.
- Ready DF, Nicholls J (1979) Identified neurones isolated from leech CNS make selective connections in culture. *Nature* 281: 67-69.
- Sacerdote P, Martucci C, Vaccani A, Bariselli F, Panerai AE, Colombo A, Parolaro D, Massi P (2005) The nonpsychoactive component of marijuana cannabidiol modulates chemotaxis and IL-10 and IL-12 production of murine macrophages both in vivo and in vitro. *J Neuroimmunol* 159: 97-105.
- Sacerdote P, Massi P, Panerai AE, Parolaro D (2000) In vivo and in vitro treatment with the synthetic cannabinoid CP55,940 decreases the in vitro migration of macrophages in the rat: involvement of both CB1 and CB2 receptors. *J Neuroimmunol* 109: 155-163.
- Salzet M, Stefano GB (2002) The endocannabinoid system in invertebrates. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 353-361.
- Shafer OT, Chen A, Kumar SM, Muller KJ, Sahley CL (1998) Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc R Soc Lond B* 265: 2171-2175.
- Shohami E, Mechoulam R (2006) Multiple sclerosis may disrupt endocannabinoid brain protection mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 6087-6088.
- Siddall ME, Trontelj P, Utevsky SY, Nkamany M, Macdonald KS (2007) Diverse molecular data demonstrate that commercially available medicinal leeches are not *Hirudo medicinalis*. *Proc Biol Sci* 274: 1481-1487.
- Sinha D, Bonner TI, Bhat NR, Matsuda LA (1998) Expression of the CB1 cannabinoid receptor in macrophage-like cells from brain tissue: immunochemical characterization by fusion protein antibodies. *J Neuroimmunol* 82: 13-21.

- Stefano GB, Kim E, Liu Y, Zhu W, Casares F, Mantione K, Jones DA, Cadet P (2004a) Nitric oxide modulates microglial activation. *Med Sci Monit* 10: BR17-BR22.
- Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS (1996) Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem* 271: 19238-19242.
- Stefano GB, Mantione K, Jones D, Zhu W, Casares F, Cadet P (2004b) Immunocytes modulate ganglionic nitric oxide release which later affects their activity level. *Neuro Endocrinol Lett* 25: 57-61.
- Stefano GB, Salzet B, Salzet M (1997) Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor: Coupling to nitric oxide release. *Brain Res* 753: 219-224.
- Stefano GB, Salzet M, Magazine HI (2002) Cyclic nitric oxide release by human granulocytes, and invertebrate ganglia and immunocytes: nano-technological enhancement of amperometric nitric oxide determination. *Med Sci Monit* 8: BR199-BR204.
- Stubiger G, Pittenauer E, Allmaier G (2008) MALDI seamless postsorce decay fragment ion analysis of sodiated and lithiated phospholipids. *Anal Chem* 80: 1664-1678.
- Sugiyama E, Hara A, Uemura K (1999) A quantitative analysis of serum sulfatide by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry with delayed ion extraction. *Anal Biochem* 274: 90-97.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78: 43-50.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di M, V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310: 329-332.
- Vilhardt F (2005) Microglia: phagocyte and glia cell. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37: 17-21.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie YH, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23: 1398-1405.

- Walter L, Stella N (2003) ATP increases endogenous cannabinoid production in astrocytes. *Glia* 57.
- Watanabe T, Yamamoto T, Abe Y, Saito N, Kumagai T, Kayama H (1999) Differential activation of microglia after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 16: 255-265.
- Wildman SS, Unwin RJ, King BF (2003) Extended pharmacological profiles of rat P2Y(2) and rat P2Y(4) receptors and their sensitivity to extracellular H⁺ and Zn²⁺ ions. *Br J Pharmacol* 140: 1177-1186.
- Williams J, Wood J, Pandarinathan L, Karanian DA, Bahr BA, Vouros P, Makriyannis A (2007) Quantitative method for the profiling of the endocannabinoid metabolome by LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS. *Anal Chem* 79: 5582-5593.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N (2004a) P2X(7) receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3214-3219.
- Witting A, Weydt P, Hong S, Kliot M, Moller T, Stella N (2004b) Endocannabinoids accumulate in spinal cord of SOD1(G93A) transgenic mice. *J Neurochem* 89: 1555-1557.
- Yiangou Y, Facer P, Durrenberger P, Chessell IP, Naylor A, Bountra C, Banati RR, Anand P (2006) COX-2, CB2 and P2X7-immunoreactivities are increased in activated microglial cells/macrophages of multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis spinal cord. *BMC Neurol* 6: 12.

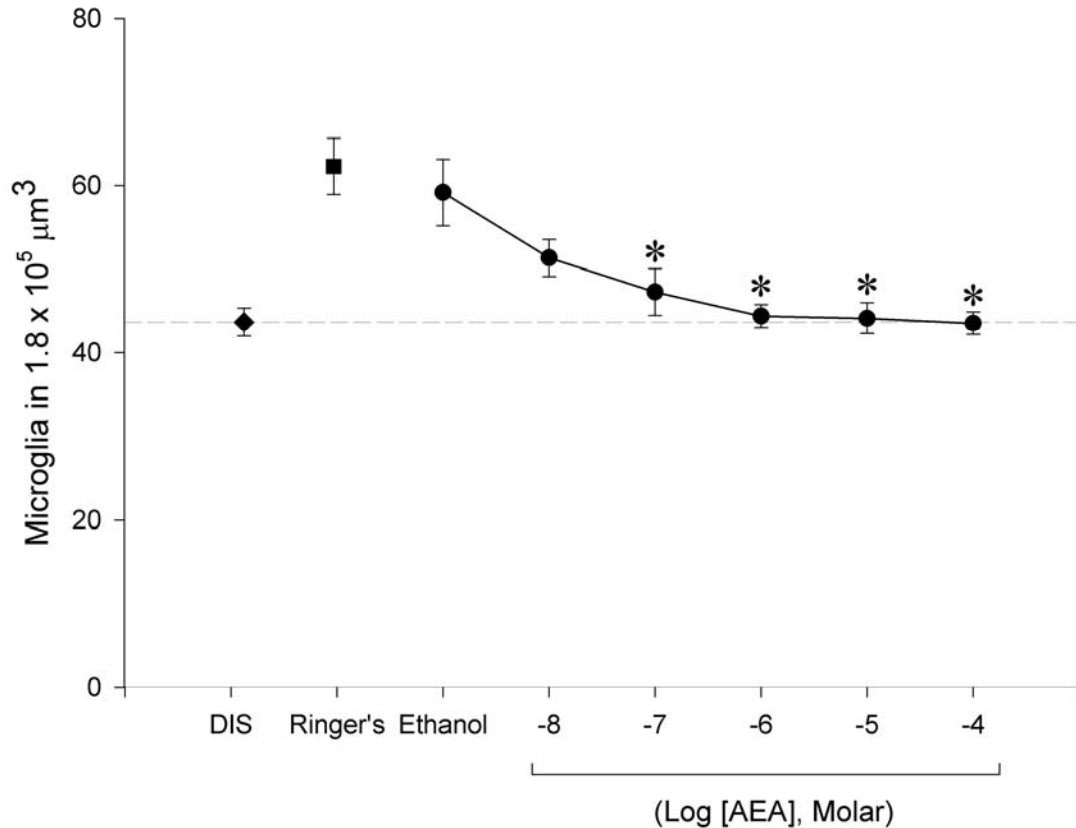


Figure 1 A: Effect of AEA on microglia accumulation at lesions. Dose-response curve of AEA at the concentrations indicated and the response of microglia measured as accumulation at a crush site ($n = 5$). The highest concentration of AEA contained 0.5% ethanol, which was therefore used as a control. Distal counts (DIS, diamond) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

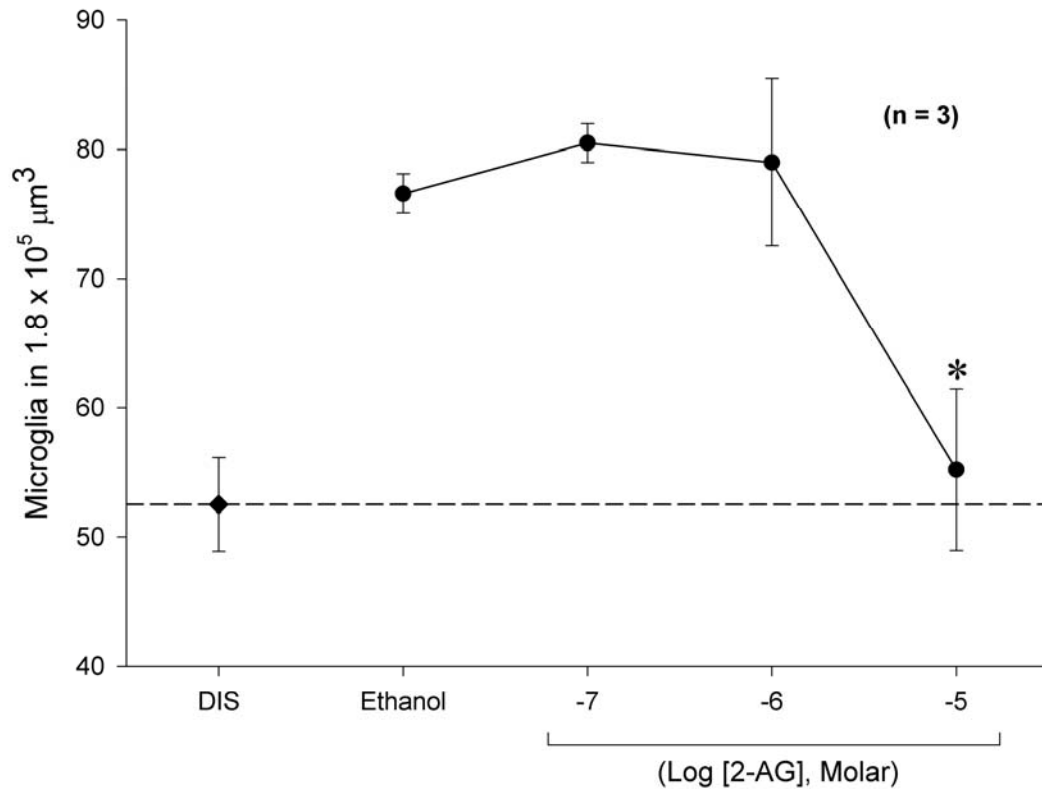


Figure 1B: Effect of 2-AG on microglia accumulation at lesions. Dose-response curve of 2-AG at the concentrations indicated and the response of microglia measured as accumulation at a crush site ($n = 3$). The highest concentration of 2-AG contained 0.5% ethanol, which was therefore used as a control as “vehicle.” Distal counts (DIS, diamond) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisk indicates significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$)

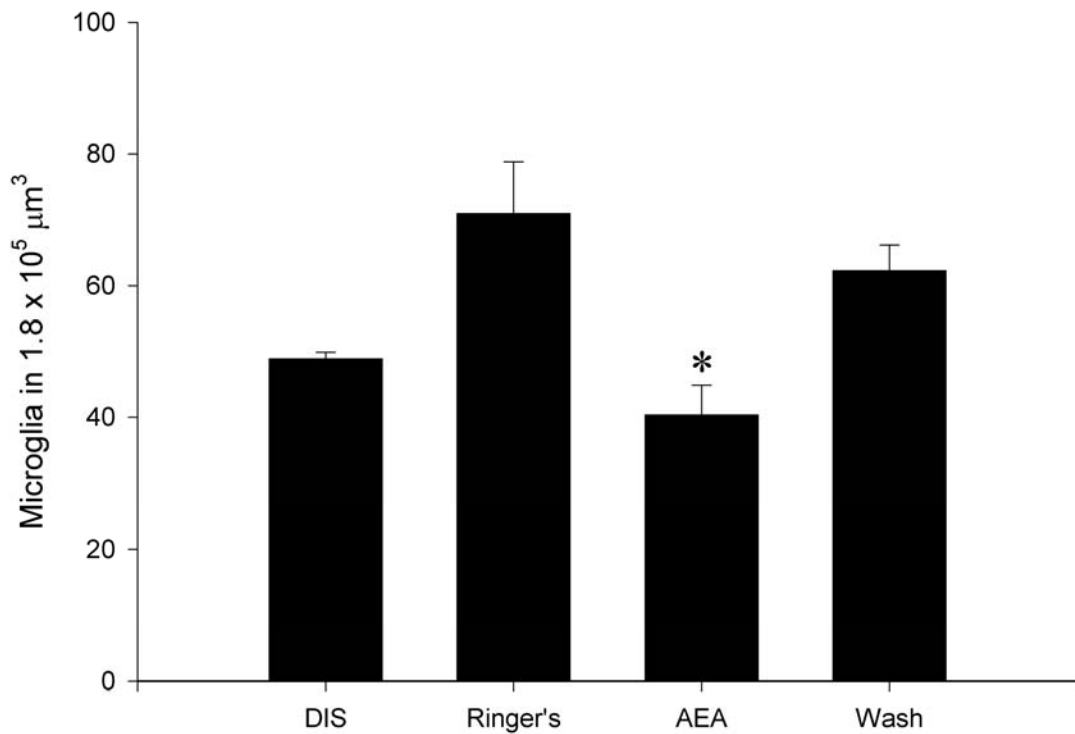


Figure 1C: Reversibility of the effect of AEA on microglia accumulation. Connectives were treated with AEA (100 μM) or Ringer's for 4 hrs, washed for 20 minutes with Ringer's, and then crushed in Ringer's to assess microglia accumulation 4 hrs later ($n = 3$). In the positive control (AEA), AEA was applied at the time of crush. Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisk indicates that AEA is significantly different from Ringer's and Wash as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

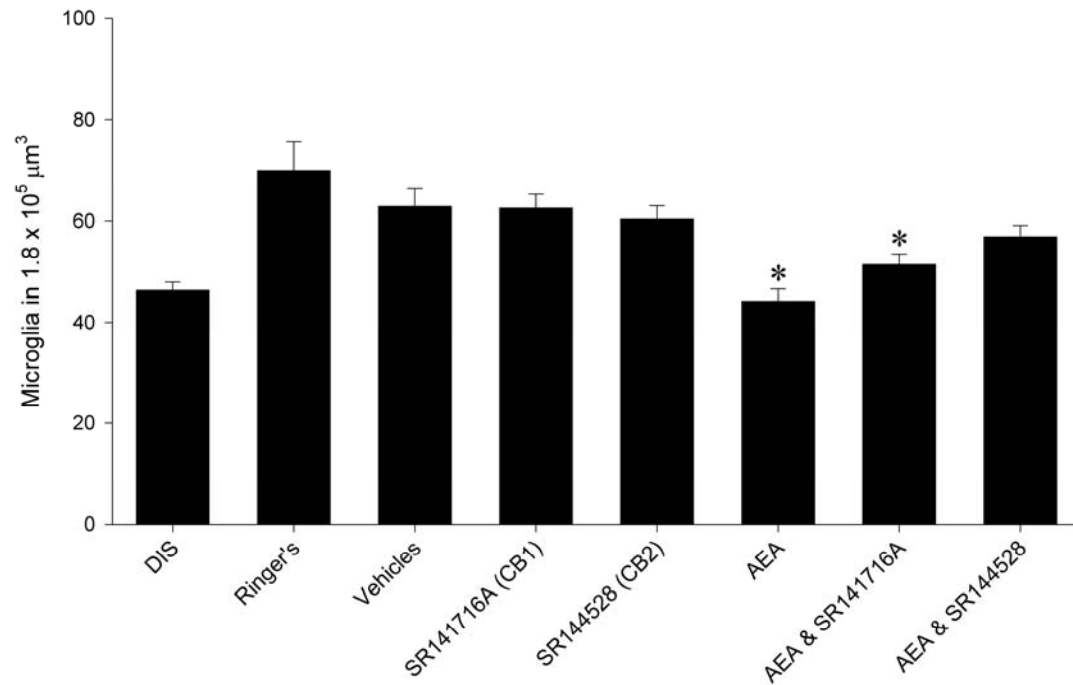


Figure 2: Effect of CB1R and CB2R antagonists on AEA block of microglia accumulation. Accumulation was measured 4 hours after crushing ($n = 6$). The concentrations used were $10 \mu\text{M}$ AEA, $10 \mu\text{M}$ SR144528, and $10 \mu\text{M}$ SR141716A. The vehicles in this experiment were ethanol (1:2000) and DMSO (1:2000). Antagonists were applied 30 minutes prior to crushing the connectives. All other drugs were applied at the time of crushing. Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

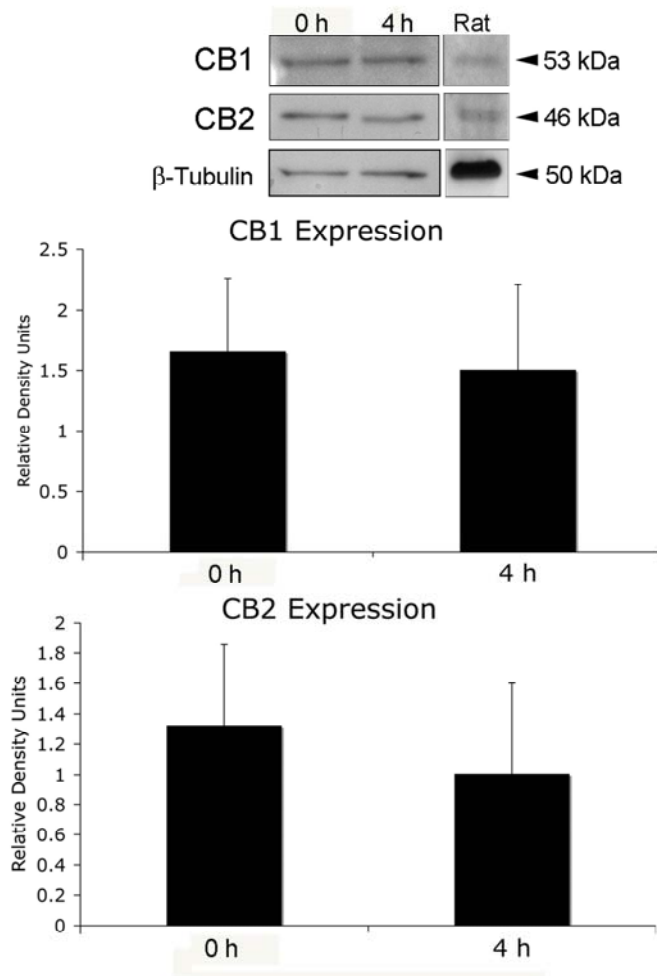


Figure 3: Immunoblots to measure expression of CB1 and CB2-like receptors in the leech CNS before and after injury. Ten connectives and ganglia were removed for each condition from 3 animals each. In the “0 hour” condition connectives were immediately frozen and in the “4 hour” condition connectives were crushed and frozen 4 hours later. Rat hippocampus and spleen tissues, which contained CB1 and CB2 receptors, respectively, were immunoblotted with the anti-CB receptor antibodies to confirm the molecular weights of the bands to which the antibodies were binding. Values are averages \pm S.E.M.

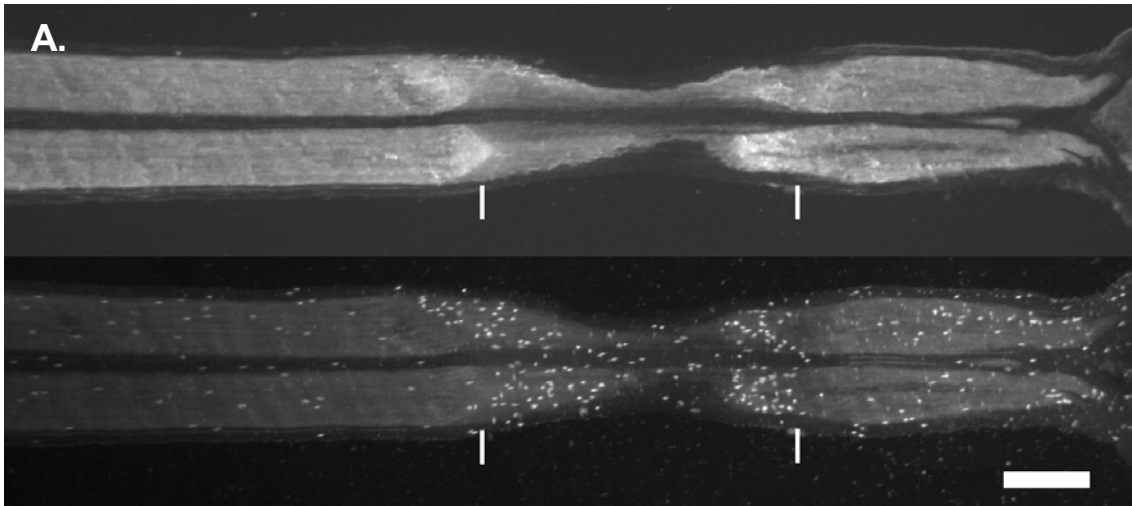


Figure 4A: Immunostain of CB2-like receptors and microglia nuclei, 4 hours after a crush injury ($n = 3$). Images are representative of sections of nerve cord from 3 animals. Top panel shows fluorescent labeling of CB2-like receptors in the leech using an antibody for human CB2 receptors. Bottom panel shows microglia nuclei stained with Hoechst 33258 dye. Images taken with a 10X objective, NA = 0.3. In each panel the region of the crush was between the 2 vertical bars. Scale bar = 100 μm .

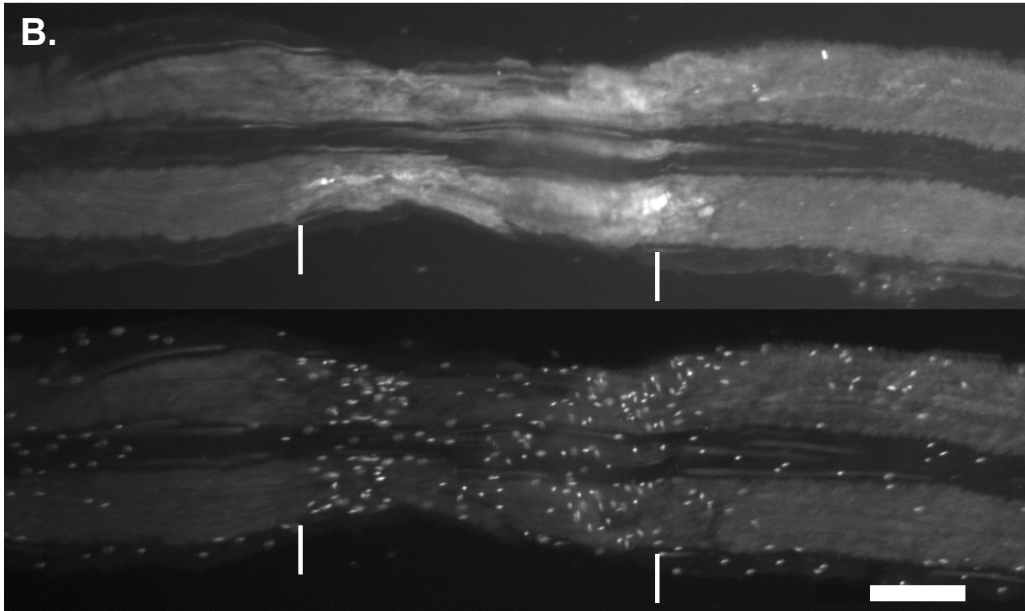


Figure 4B: Immunostain of CB1-like receptors and microglia nuclei, 4 hours after a crush injury. Images are representative of sections of nerve cord from 3 animals. Top panel shows fluorescent labeling of CB1-like receptors in the leech using an antibody for human CB1 receptors. Bottom panel shows microglia nuclei stained with Hoechst 33258 dye. Images taken with a 10X objective, NA = 0.3. In each panel the region of the crush is between the 2 vertical bars. Scale bar = 100 μ m. _

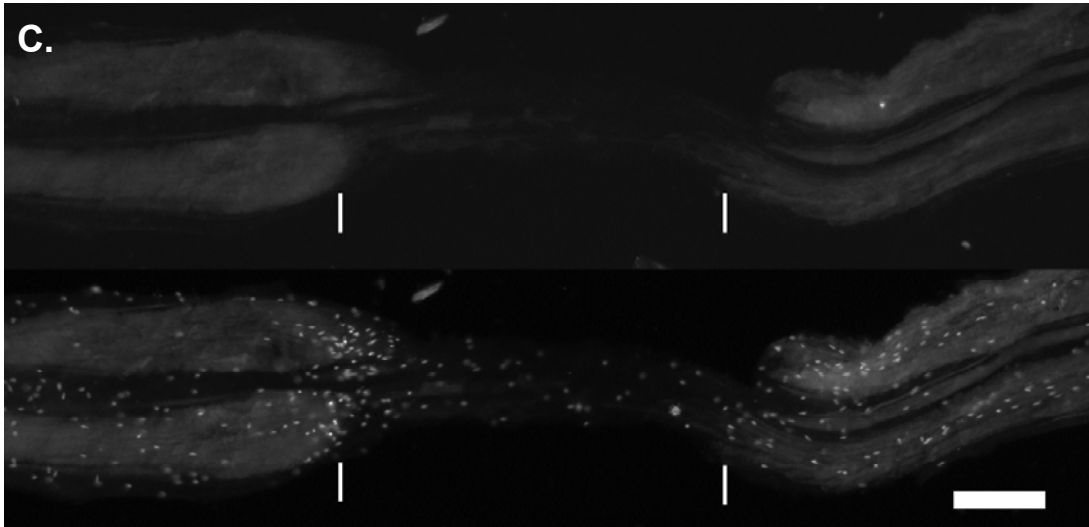


Figure 4C: Control, showing immunostain with secondary antibody alone and accumulation of microglia nuclei at the crush, fixed 4 hours after injury. Images are representative of sections of nerve cord from 3 animals. Top panel shows fluorescent labeling with Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG without any primary antibody. Bottom panel shows microglia nuclei stained with Hoechst 33258 dye. Images taken with a 10X objective, NA = 0.3. In each panel the region of the crush is between the 2 vertical bars. Scale bar = 100 μ m.

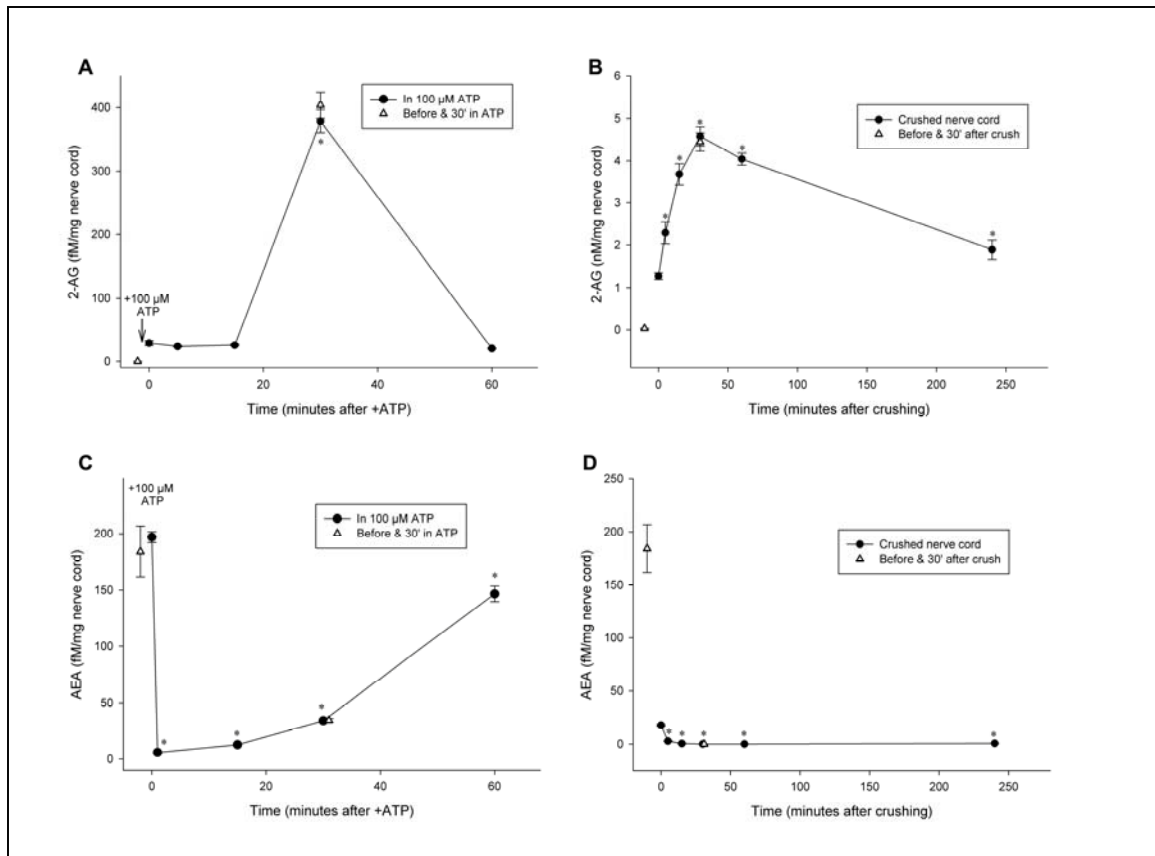


Figure 5. MALDI ToF measurement of cannabinoids in injured nerve cords or in cords treated with ATP. **A.** Levels of 2-AG after the nerve cord was bathed in 100 μ M ATP (closed circles, $n = 5$). **B.** Levels of 2-AG after the nerve cord was crushed (closed circles, $n = 6$). In a separate set of 6 animals the levels before crushing and 30 minutes after crushing were also measured (open triangles). **C.** Levels of AEA after the nerve cord was bathed in 100 μ M ATP (closed circles, $n = 5$). In a separate set of 5 animals the levels before adding ATP and 30 minutes afterward were also measured (open triangles). **D.** Levels of AEA after the nerve cord was crushed (closed circles, $n = 6$). Asterisks indicate levels significantly different from the first time point, nominally at 0 minutes, at $p < 0.01$, as described in Methods.

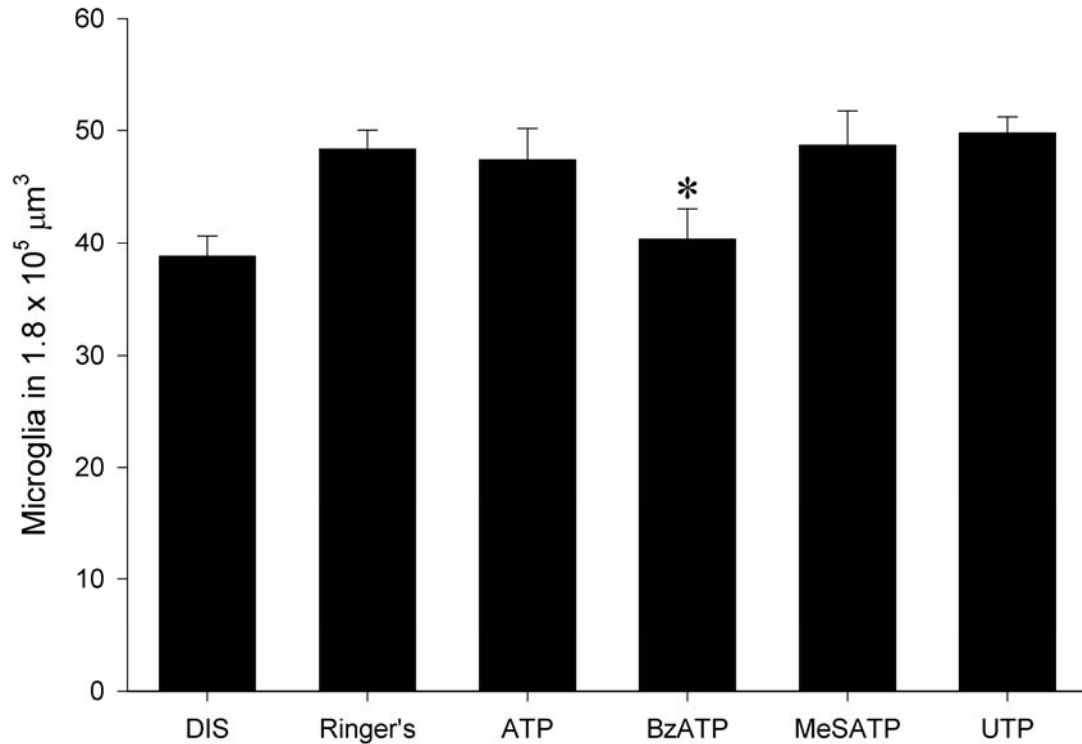


Figure 6: Effects of purinergic agonists BzATP, ATP, UTP and MeSATP on microglia accumulation at lesions. All agonists were applied to connectives at 100 μM immediately following injury, and fixed 4 hours later (n = 4).. Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush and indicate the number of microglia present without crushing. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are mean \pm S.E.M. Asterisk indicates significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

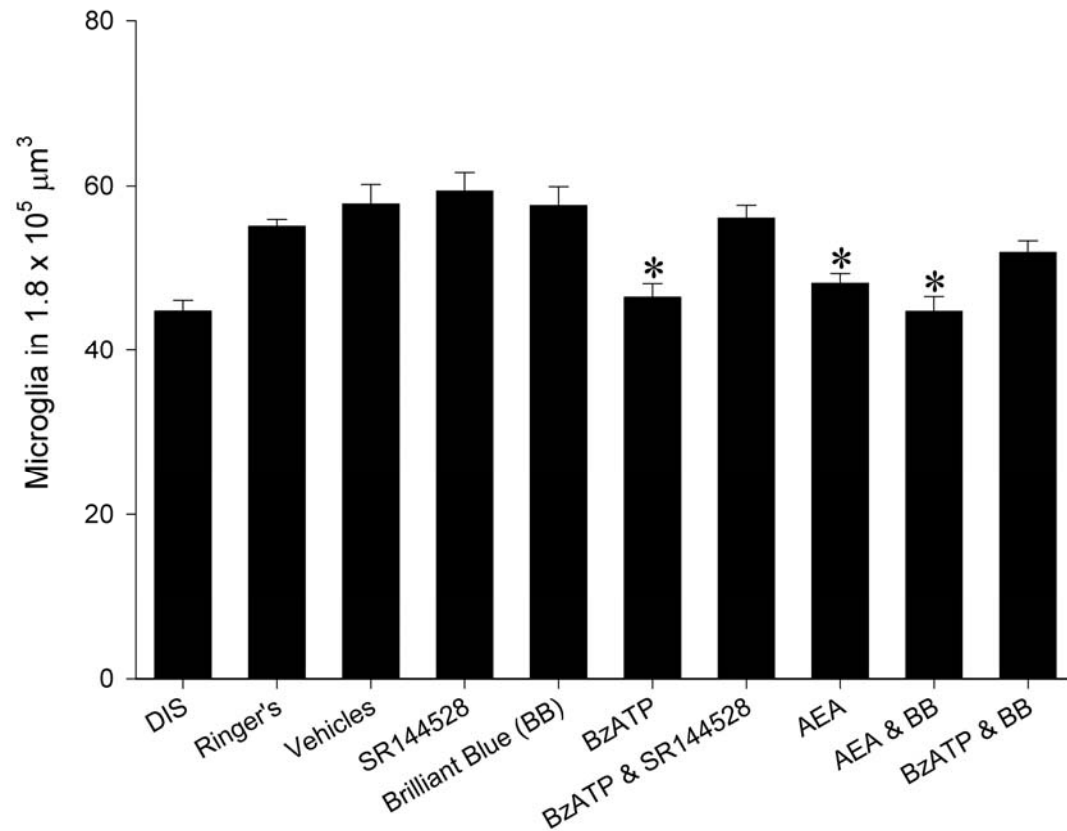
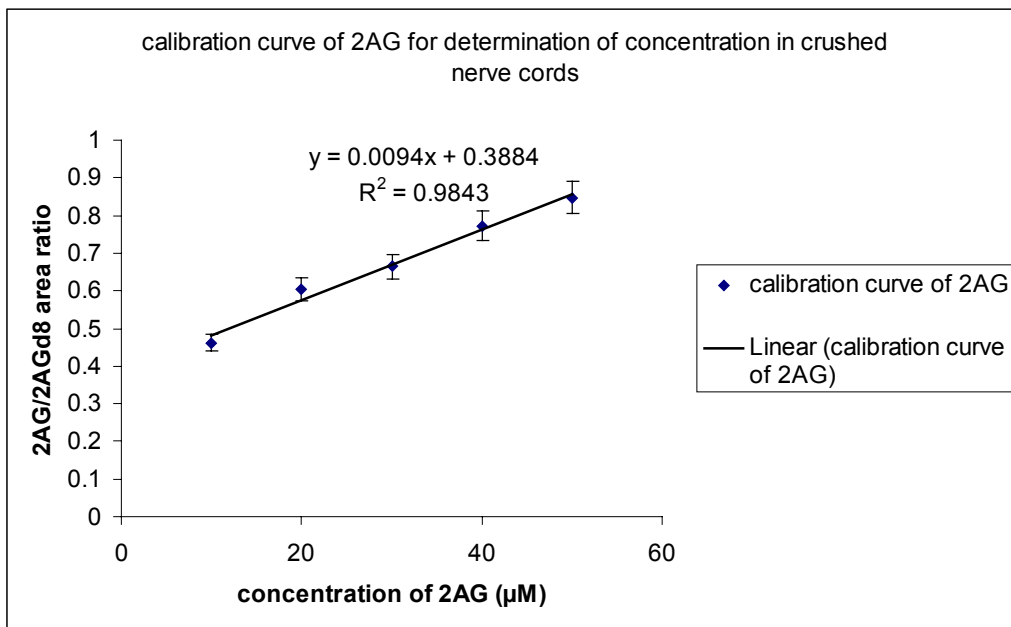


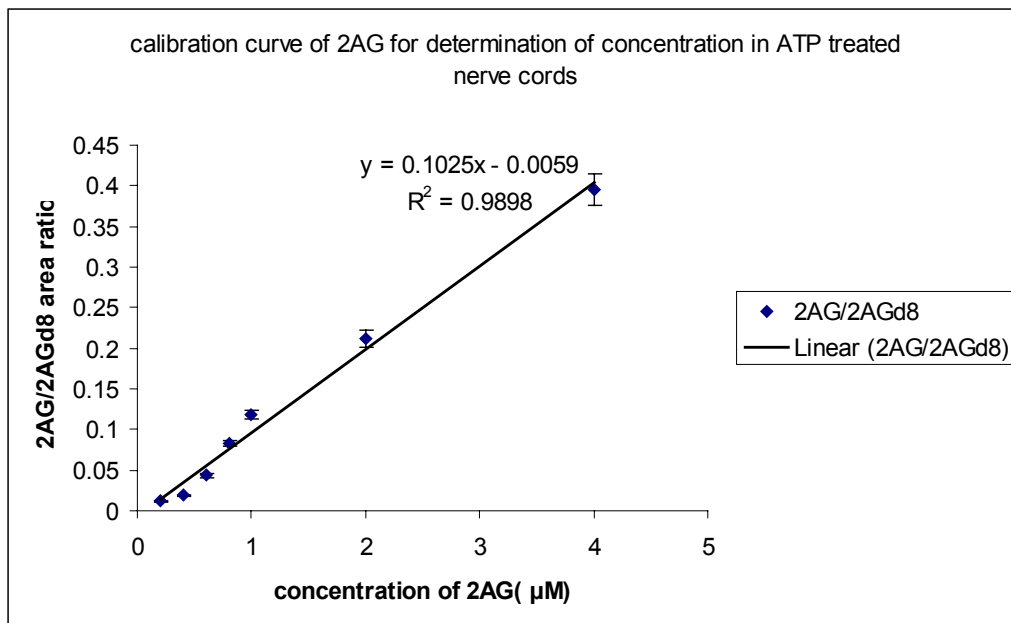
Figure 7: Drugs that promote microglia accumulation at lesions in presence of BzATP. Reagents were applied 30 min before crushing the connectives, which were fixed 4 hours after injury ($n = 6$). BzATP was applied at $100 \mu\text{M}$, while Brilliant Blue (BB), AEA and SR144528 were each applied at $10 \mu\text{M}$. AEA contained 0.05% ethanol, which was used as a control (Vehicle). Distal counts (DIS) were made at least 1 mm from the crush. Two counts per crush were made in volumes of $1.8 \cdot 10^5 \mu\text{m}^3$ that were located on both sides of the crush. Values are averages \pm S.E.M. Asterisks indicate significance as determined by a repeated measures ANOVA and Fisher *post-hoc* test ($P < 0.05$).

Supplementary Figure 1, a & b of a-c.

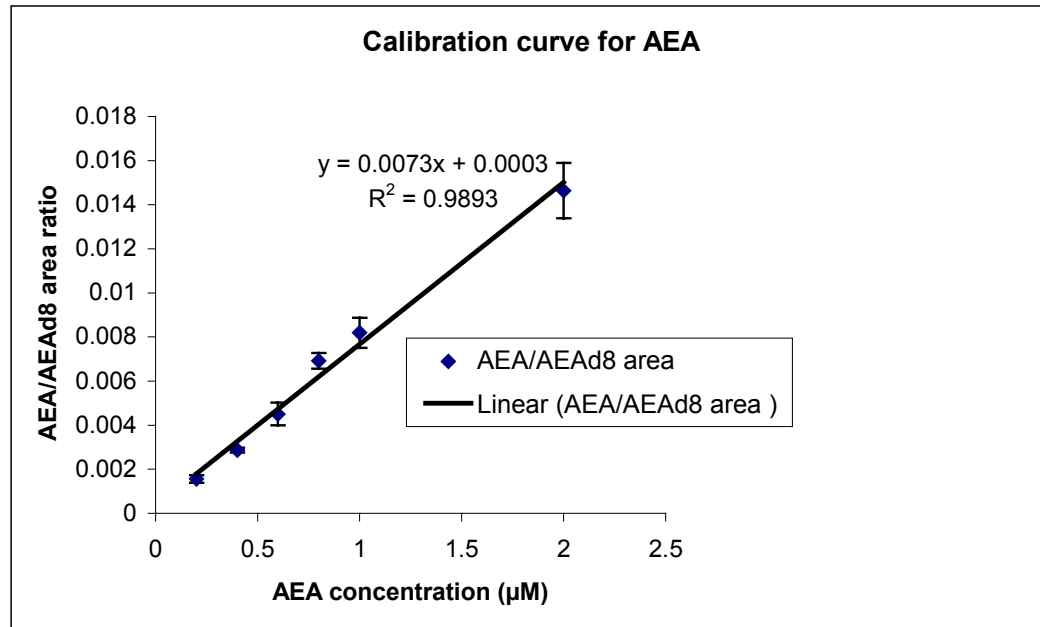
a.



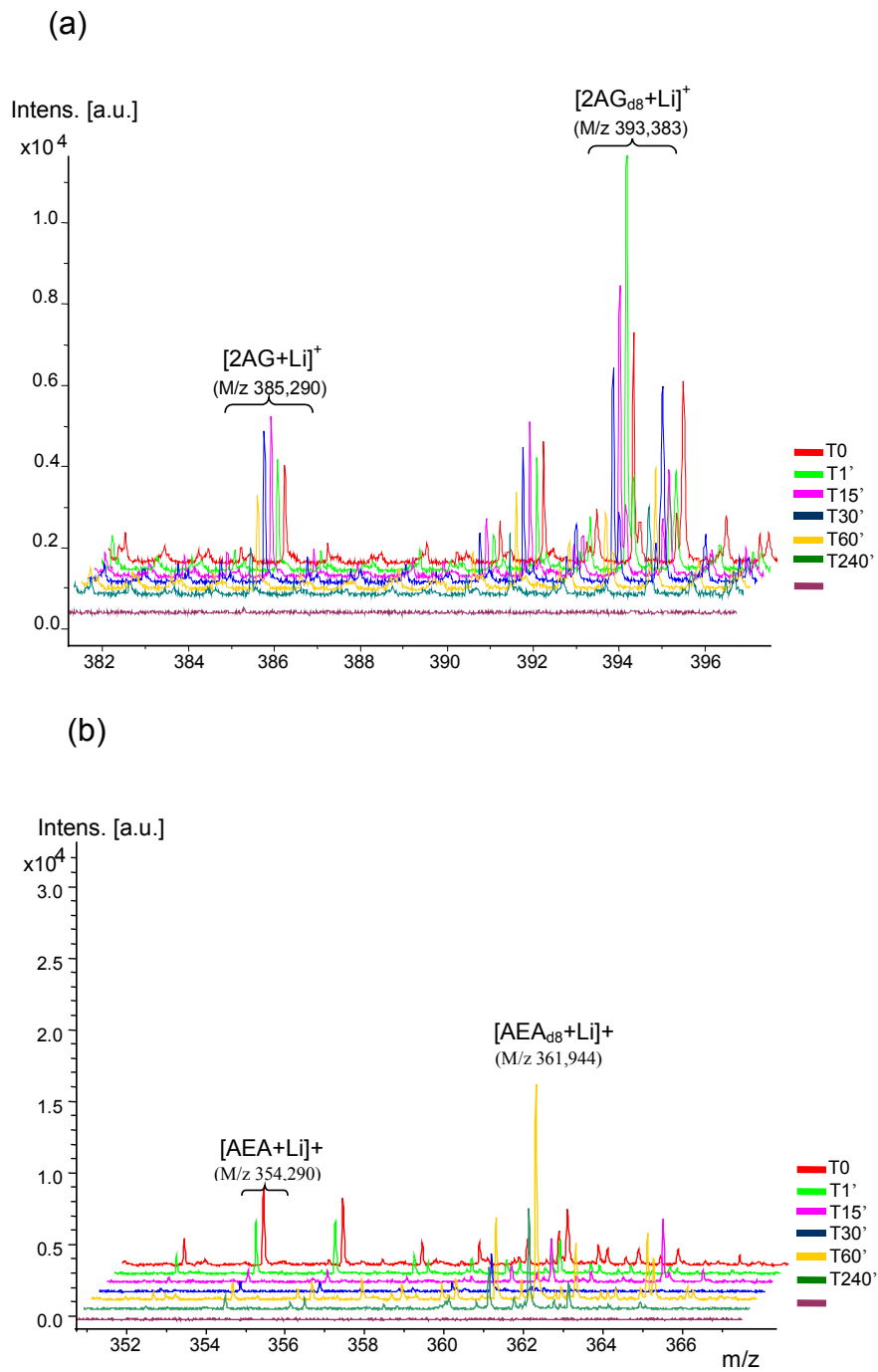
b.



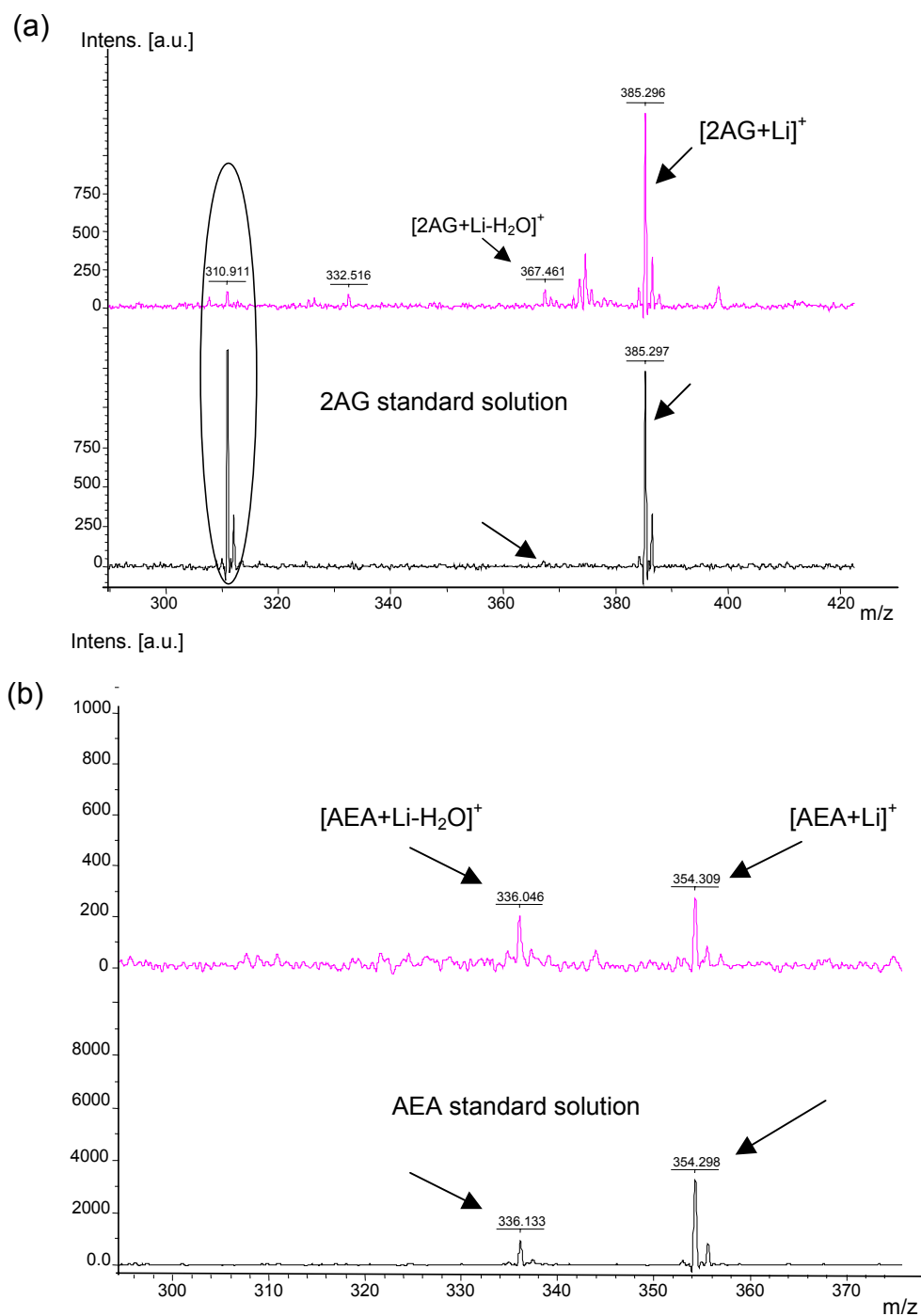
c.



Supplementary Figure 1 Calibration curves for endocannabinoids. **a.** 2-AG, for crushed nerve cords. **b.** 2-AG, for ATP-treated nerve cords. **c.** AEA in crushed or ATP treated nerve cords.



Supplementary Figure 2. Time course of 2-AG (a) and AEA (b) measured in the leech CNS by MALDI ToF mass spectrometry.



Supplementary Figure 3. Characterization of the endocannabinoids ions related to 2AG (a) & AEA (b) produced in the leech nerve cord.

Part 2

Cross-talk between the CB2-like receptor and nitric oxide systems in the injured leech brain: involvement of the endocannabinoid 2AG in microglia recruitment at the injured site.

Karim ARAFAH¹, Annie DESMONS¹, Jacopo VIZIOLI¹, Robert DAY², Isabelle FOURNIER¹,
Dominique CROIX^{1*}, Michel SALZET^{1*}

¹ Université de Lille1, CNRS, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des
Annélides, Villeneuve d'Ascq F-59655, France, <http://www.maldi-imaging.com>

² Université de Sherbrooke et Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de médecine et des
sciences de la santé, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

Abstract

The medicinal leech is notable for its capacity to regenerate its central nervous system following trauma. Nitric oxide (NO) is among the molecules that participate in this physiological process. NO acts as a neurotransmitter and a powerful chemokine in the inflammation mechanism in the brain. Indeed, the controlled long-term release of NO when a lesion occurs in the leech brain is a critical step in the initiation of neuroprotection. By contrast, brain trauma in vertebrates is classically accompanied by elevated NO levels that have irreversible deleterious effects on the brain. In this context, we used an electrochemical NO-selective electrode to measure NO levels in leech brains that had been damaged for several hours. We found that the NO time-course profile in the injured leech brain is partially under the control of endocannabinoids, namely, anandamide (AEA) and 2-arachidonylglycerol (2AG), which affect the NO time-course through their modulation of cannabinoid-like receptors. These data are the first report of the complementary chemoattraction activities of these endocannabinoids on isolated leech microglial cells and in the leech brain. Furthermore, our data suggest the presence of a putative cannabinoid receptor 2 in both isolated microglia and in the leech brain. Finally, we present here the role played by 2AG in the control of NO production during trauma in the leech brain. This control over NO production is accompanied by the controlled chemoattraction of microglia directed from the periphery to the lesion site of the brain for neuronal repair purposes.

Keywords: Leech, cannabinoid, regeneration, anandamide, 2AG, microglial cells, nitric oxide

@Co-Corresponding author: dominique.croix@univ-lille1.fr and michel.salzet@univ-lille1.fr

Introduction:

In pathological conditions such as trauma, ischemia, hypoxia and neurodegenerative diseases, the vertebrate central nervous system (CNS) dramatically increases the pro-inflammatory response and nitric oxide (NO) production. This overproduction of NO first involves the altered neurons and then the immune-related cells in the brain, mainly the resident immune microglial cells. In this latter case, NO overproduction becomes a hallmark of their activated state. As a consequence of this biological process, the intracellular calcium concentration and the formation of reactive oxygen species increase, as does the activation of neuronal apoptosis. In a parallel response, the endocannabinoid pathways have been shown to be highly activated (Panikashvili et al., 2001; Eljaschewitsch et al., 2006). Indeed, the depolarization of the plasma membrane increases the intracellular calcium concentration, and this rapidly activates lipid precursors of the most evoked endocannabinoids: anandamide (N-arachidonyl ethanolamide (AEA) and 2-arachidonyl glycerol (2-AG).

As described elsewhere (Devane et al., 1992), anandamide (arachidonyl ethanolamine, AEA) is a full agonist for the seven transmembrane cannabinoid receptor 1 (CB1r) expressed in neurons, astrocytes, glial and microglial cells. AEA-mediated activation of CB1r has been correlated with neuroprotection via the MKP-1 pathway (Eljaschewitsch et al., 2006). However, the biological effects of anandamide on the vertebrate brain still remain controversial since it can exhibit deleterious effects when it binds to rat neurons via microglial transient receptor vanilloid 1 (TRPV1) (Maccarrone et al., 2000). The most closely related abundant endocannabinoid in the CNS of vertebrates, 2-arachidonyl glycerol (2-AG) (Sugiura et al., 1995), is released when brain damage occurs (Walter et al., 2003). It was found to bind CB1r and the seven transmembrane cannabinoid receptor 2 isoform (CB2r) with high affinity (Sugiura and Waku, 2000). CB2R is specifically expressed in the vertebrate brain on the surface of immune cells (Felder CC, 1998) such as microglial cells (Carlisle et al., 2002; Carrier et al., 2004). Maestroni (2004) reported the CB2r-mediated chemoattraction of dendritic cells by 2-AG *in vivo*, and an antioxidant effect of this lipid has been reported to be neuroprotective (McCarron et al., 2003).

Regarding vertebrates, a current hypothesis is that the endocannabinoids AEA and 2-AG mediate neuroprotection by combining a chemoattractant effect for microglial cells (Franklin A, 2003) and control of the immune response (Eljaschewitsch et al., 2006). In microglial cells, CB1 receptors are always weakly expressed, whereas the expression of CB2 receptors is modulated according the cell's state of immune activation. Thus, reports indicate that CB2r is not expressed on the surface of resting mammalian microglial cells but is highly expressed when cells are responsive and primed. Subsequently, CB2r decreases in activated cells (Cabral et al., 2008). In their studies, Cabral et al. mentioned a time-dependent CB2r-activated state of mammalian microglia that takes part in the regulation of the microglial immune response. Despite the beneficial effect of cannabinoids on microglia, the central nervous system of vertebrates is not able to regenerate.

However, some lophotrochozoans such as the medicinal leech *Hirudo medicinalis* have been demonstrated to have the ability to regenerate the CNS following injury (Baylor and Nicholls, 1971; Jansen JK, 1972). Due to this ability, the medicinal leech has become a model in neuroscience. During the first repair step, microglial cell accumulation has been reported (Morgese et al., 1983; von Bernhardt and Muller, 1995) as previously described in mammals. Real-time amperometric measurements have shown that experimental lesions performed in the medicinal leech CNS cause the quick release of low amounts of NO during the first ~20 min (Shafer et al., 1998; Kumar et al., 2001). This NO production at the lesion site is required for the initiation step of the leech brain regeneration process since treatment with the NO inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) has been reported to inhibit the first peak of NO release and brain regeneration as well (Chen et al., 2000). Nevertheless, a high concentration of NO in the leech brain produced by an NO donor like spermine inhibits the regeneration process (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001). Moreover, by targeting NO synthase and cGMP in microglial cells, Duan et al. showed that these activated cells accumulate at the lesion site in a time-dependent manner (Duan et al., 2003), suggesting that a higher amount of NO is produced hours after the lesion. Recent leech studies have suggested that microglia accumulation at the lesion site is essential for the usual sprouting of injured axons (Ngu et al., 2007).

Previous work performed in our laboratory demonstrated for the first time an operational endocannabinoid system in the medicinal leech (Matias et al., 2001), and a CB1-like receptor was partially characterized (Stefano et al., 1997). These results highlighted a link between cannabinoid receptor activation and NO production (Stefano et al., 1998).

In our present study, we show that 2-AG is fully involved in microglial cell recruitment in a dose-dependent manner using *in vitro* chemotaxis assays and *in situ* staining of microglia at the lesion site. In addition to this chemoattractant effect on microglia, 2AG controls the kinetics of NO production in the injured leech nerve cord. Moreover, we demonstrate that blocking the cannabinoid receptor *in situ* with drugs completely modulates the response of microglia in terms of accumulation and NO production at the lesion site.

Materials and Methods

Materials

For all NO determinations, freshly dissected leech connectives surrounded by two ganglia were stripped and pinned into a 35-mm dish containing sylgard polymer in the bottom and the connectives between ganglia were injured using a pair of fine forceps. 2-AG was purchased from Sigma-Aldrich (n°A8973, >98% HPLC purity in acetonitrile solution) and AEA was obtained from Calbiochem (n°172100, >97% HPLC purity) and prepared in ethanol (Sigma-Aldrich ChromasolV >99.8% HPLC purity). The selective cannabinoid receptor 1 antagonist AM251 was purchased from Cayman Chemicals (n°71670) and the selective cannabinoid receptor 2 antagonist AM630 was from Tocris (n°1120). Both antagonists were diluted in acetonitrile solution (n° 34998 ChromasolV plus >99.9% purity, Sigma-Aldrich). The cannabinoid receptor 2 antibody and its blocking peptide were purchased from Tocris.

Chemicals and leech dissections:

All adult medicinal leeches sp. were purchased from Ricarimpex (Eysines, France). Upon arrival, leeches were kept and starved in artificial pond water until dissection. After isolation of their entire CNS according to the procedure of Nicholls et al. (Nicholls and Baylor, 1968), all ganglia and non-injured inter-ganglia connectives were bathed at room temperature in sterile saline Ringer's solution (115 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 4 mM KCl, 10 mM Tris maleate pH 7.4) for 7 h prior to performing all the experiments.

Real-time NO measurements:

Technical description:

An electrochemical NO-selective electrode encased in a protective stainless steel sleeve covered with a gas-permeable NO-selective Nafion membrane (World Precision International, Apollo 4000, (Xian et al., 2000) was used to oxidize the NO at the working electrode into an amperometric signal monitored by a computer. With this approach, neither the nitrite and nitrate ions nor interfering species such as dopamine, ascorbate and L-arginine can react with the electrochemical sleeve.

Biological preparation and NO records:

Connectives were first pinned and bathed in a 35-mm dish. After crushing the connective with fine forceps, the Nafion extremity of the sleeve was put a few millimeters above the crushed site of the leech connective. Surrounding the lesion site, the NO release from the crushed site went through the NO-selective membrane and was immediately oxidized by the electrochemical cell thereby yielding real-time NO measurements with very high sensitivity (limit of detection <1 nM) and accuracy.

Regarding the stimulation experiments with AEA (10 μ M) and 2-AG (30 μ M), drugs were carefully deposited onto the crushed site of the connective and NO release was simultaneously monitored and recorded. Due to their hydrophobic properties, the antagonists of the mammalian cannabinoid receptors 1 and 2 (AM251 and the AM630, respectively (30 μ M)) were directly injected into the lesion site of the connective using a syringe equipped with a 1 μ m diameter extremity glass needle prior to NO recording. Real-time measurements of NO release from the injured connectives were performed with an Apollo 4000 and recorded with the Apollo software. A method for calculating the NO level released from the biological sample was obtained from the manufacturer's recommendations and it was calculated using the following relation: $0.54 \times A$ where A represents the value in the y axis defining the intensity scale of NO measured during the time-course.

Chemotaxis tests and staining experiments:

Hirudo medicinalis microglia preparation:

Microglia cell isolation

To assess the *in vitro* effect of synthetic cannabinoids on leech microglial cell chemotaxis, the entire CNSs from six different leeches were dissected in a 35-mm Petri dish under a laminar flow hood and each ganglion was carefully decapsulated using a fine pair of forceps and an optical microscope. As a result, neurons, microglial cells and other nerve cells were mechanically resuspended by gentle scraping. After filtration of the cell suspension into a 7 μ m diameter nylon mesh, microglial cells were harvested and thus separated from the others according to their size. A centrifugation step (1000 \times g for 10 min.) at room temperature gave a cell pellet which was resuspended in 300 μ L of L15 complete medium.

Microglia chemotaxis assay:

The effects of synthetic AEA and 2-AG on microglial cell recruitment were determined using the *in vitro* double-P assay (Kohidai, 1995) for chemotaxis purposes with minor modifications. After filling 35-mm Petri dishes with 1 mL of a 0.5% agar supplemented with 1% gelatin solution and drying at room temperature for 20 min, two wells (6 mm in diameter) were dug in the polymerized mixture of agar-gelatin. From each of the wells emerged a parallel individual trench. One well was filled with 50 μ L of the purified microglial cells and the other one with synthetic cannabinoids in a range of concentrations (both AEA and 2-AG 10 μ M, 30 μ M) or negative controls (culture medium, vehicle ethanol 1:1000, vehicle acetonitrile 1:1000 v:v). Next, a channel was made using a coverslip as a way to link the two parallel trenches from the wells, thus starting cell migration from the initial well to the second one. Prior to running all the chemotaxis assays, the number of microglial cells contained in the initial well was estimated by using a hemocytometer under a light Zeiss Axioskop microscope (40x magnification), and a final cell

count was carried out in the arrival well after 1 h of migration. Chemotaxis experiments were carried out in triplicate and their results are expressed as the mean of the microglial cell number \pm S.D. A one-way repeated analysis of variance (ANOVA; $p < 0.01$) was performed for all the results and the significance of differences was assessed with the Holm-Sidak test $\alpha = 0.01$ (SigmaStat 3.11)

Microglial cell staining at the lesion site:

Leech cell nuclei were stained in the connectives for 20 min at room temperature with a 1:5,000 Hoechst 33258 dye solution (Invitrogen) diluted in Ringer's solution. Particular attention was focused on the microglial cells present at the lesion site of the injured connectives. *In vivo* microglia accumulation at the lesion site consecutive to treatments with cannabinoid receptor agonists (AEA, 2AG) or antagonists (AM251, AM630) was then directly assessed using a FITC filter on a Leica microscope.

Immunocytochemistry:

An immunocytochemical assay for CB2 receptor-like investigation in the leech was performed on isolated microglial cells and leech neurons (as described above). An antibody targeting the extracellular loop of the CB2 rat receptor was chosen for the experiments. Leech neurons and microglial cell pools from three different animals were freshly isolated according to their size by filtering (see above). Pellets of each pool of cells were suspended in 600 μ L 4% paraformaldehyde (PAF) diluted in Ringer's solution. The cells were fixed for 20 min at 4°C and then cytospun onto a glass slide at 2,000 rpm for 10 min. Fixed cells were incubated in 3% normal goat serum (NGS) and 1% ovalbumin in phosphate-buffered saline (PBS) for 20 min. After washing the slides three times in PBS containing 1% ovalbumin, the preparations were incubated overnight with the CB2 receptor antibody (1:1,000) in PBS supplemented with 1% NGS and 1% ovalbumin.

The same kind of preparations were employed for the negative controls using either a preincubation step with the CB2r antibody and its blocking peptide 1:1,000 or without CB2r antibody. Once done, PBS 1% ovalbumin was used to wash each preparation three times prior to a final wash in 1X PBS. Then, the preparation was incubated for 1 h at 37°C with an anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen) conjugated to Alexa Fluor 488 at a dilution of 1:50. After mounting the preparations in Dako reagent, the samples were observed under a Leica microscope using a FITC UV filter.

Results

Synthetic agonists and selective antagonists of mammalian CB receptors induced *in situ* variation in microglia chemotaxis after axotomy of the leech CNS.

A classical hallmark occurring after leech CNS injury is the accumulation of microglial cells at the lesion site (Morgese et al., 1983). A typical accumulation of leech microglia cells was observed at the injured leech nerve cord 6 h after axotomy. Other studies have reported that 2AG is fully involved in chemotaxis of mammalian microglia (Franklin A, 2003). Similarly, its precursor AEA has been shown to mediate insect hemocyte migration (Merchant et al., 2008). Furthermore, NO has also been characterized as playing a key role in the regeneration of the CNS in both the leech and the embryonic insect (Chen et al., 2000; Kumar et al., 2001; Stern and Bicker, 2008).

In order to better understand the implication of the cannabinoid receptors-like on NO-mediated microglia recruitment in leech, we treated injured nerve cords with NO-Synthase inhibitor (L-NAME) and with different CB receptors agonists (AEA and 2AG) and antagonists (AM251 and AM 630) (**Figure 1**). Basal microglial cell accumulation at the lesion site (**Figure 1a**) was impaired using the specific NO synthase inhibitor L-NAME (**Figure 1b**). This result confirms the involvement of NO in microglial cell recruitment, as previously described (Chen et al., 2000).

AEA and 2AG, specific ligands of cannabinoid receptors 1 and 2, respectively, were added simultaneously to the crush and microglial cells were assessed for chemotaxis during lesion of the leech CNS. The AEA (10 μ M) blocked the microglial cell migration to the lesion site (**Figure 1c**). An opposite effect was obtained using 2AG that, at the same concentration, highly increased the accumulation of these cells at the axotomized nerve cord (**Figure 1d**) in comparison with the control condition (**Figure 1a**).

In the same experimental conditions, the treatment with the CB1-like receptor antagonist AM-251 (30 μ M) did not inhibit the microglial recruitment (**Figure 1e**). In contrast, the addition the of CB2-like receptor antagonist AM-630 blocked the chemotaxis process (**Figure 1f**).

Cannabinoid-induced microglia chemotaxis

Microglial cells were harvested from the CNSs of freshly dissected leeches. The previous observations of the modulation of cannabinoid-related chemotaxis of microglial cells were investigated directly in isolated microglia. AEA and 2AG significantly attracted the microglial cells in a dose-dependent manner compared to the negative control (basal medium L-15) (**Figure 2**). Interestingly, different effects of 2AG and AEA upon microglial cell chemotaxis were observed when using a 30 μ M concentration (**Figure 2**). At 30 μ M, 2AG recruited more cells than it did at 10 μ M, while AEA recruited fewer (**Figure 2**). Although these two lipid-derived compounds have

similar structures derived from arachidonic acid, the chemotaxis results suggest that AEA and 2AG modulate microglial attraction differently depending on the dose and the regulatory context (**Figure 2**).

In situ immunohistochemistry and isolated microglial cell immunostaining:

A rat anti-CB2 receptor antibody was used for a heterologous approach to targeting the CB2-like receptor in the medicinal leech. This antibody previously used in western blotting was shown to recognize a protein assumed to be a CB2-like receptor in a crude extract of proteins from the leech brain (Lipitz). By using this antibody directly in the fresh leech nerve cord, specific immunostaining was observed in the decapsulated ganglia where some cells were scattered from the heap.

These clearly immunostained cells might be attributable to the putative CB2-like receptor of microglia (**Figure 3b**). This staining was not evident in the negative control where only the FITC secondary antibody was used (**Figure 3a**).

In order to confirm the microglial immunostaining, a similar rat polyclonal anti-CB2 receptor antibody was used (primary antibody). As controls, freshly isolated leech microglia were incubated either with a preincubated solution containing the primary antibody and its specific blocking peptide (1:500) or without primary antibody (**Figure 4**). In each set of experiments, images of 5x and 20x magnification were recorded with both FITC (**Figures 4a, 4c, 4e**) and Hoechst (**Figures 4b, 4d, 4f**) filters of a Leica instrument. In the control condition without the CB2r primary antibody (**Figure 4a & 4b**), no microglial staining was observed (**Figure 4a**) even though microglial cells were indeed discernible by the nuclear Hoechst 33258 dye (**Figure 4b**). In contrast with this control condition, the CB2r primary antibody successfully immunostained the isolated microglial cells (**Figure 4c**) in accordance with the Hoechst 33258 staining (**Figure 4d**).

A second negative control using the primary antibody saturated with its specific blocking peptide prior to performing the immunostaining experiment revealed only non-specific binding in the slide (**Figure 4e**), whereas Hoechst 33258 allowed staining of microglial cells on the same slice (**Figure 4f**). These latter results are in accordance with those obtained with the *in situ* immunohistochemistry experiments (**Figure 3b**) and further substantiate the existence of a putative CB2-like receptor in the leech microglia. These data are in line with the presence of a CB2-like receptor in the genome of the annelid *Capitella* sharing a maximum score of 312 and an e-value of 1.2×10^{-28} with the CB2-like receptor of *Danio rerio* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/searchGM?db=Capca1#RESULTS>).

Real-time measurements of nitric oxide released by injured leech nerve cords.

As described above, stimulated injured leech nerve cords were seen to modulate microglial cell chemotaxis in response to 2AG and selective CB receptor antagonists. These

results (which were observed 6 h after simultaneous injury and treatment (**Figure 5**)) are consistent with a report that the NO-like synthase in the leech *Hirudo medicinalis* (Duan et al., 2003) may be triggered by one of the putative CB-like receptor pathways in leech microglia.

Indeed, previous studies of the leech *Hirudo medicinalis* have demonstrated cross-talk between the CB1-like receptor and NO pathways (Stefano et al., 1998). Furthermore, NO is known to be a powerful chemoattractant signal for activated microglia (Chen et al., 2000). We present here for the first time real-time measurements of nitric oxide levels recorded at the injury site of *Hirudo* connectives for 20 h (**Figure 1**). Freshly dissected connectives were either cut or cut and stimulated with different drugs such as 2AG, AM630 (30 μ M) or both, and a 1:1,000 acetonitrile vehicle control solution was injected 1 h after the crush of the nerve cords (**Figures 5 & 6**). As a basal determination of the NO released from uncrushed and untreated connectives, the amperometric apparatus for NO measurements began its recording 2 h prior to the experiments.

Using the amperometric apparatus, we were able to detect and monitor nitric oxide release from injured nerve connectives of the leech *Hirudo sp.* In this context, the average starting time of NO pulses relative to the basal level (before the crush of the connectives) was found to be equal to 215.33 min (\pm 15.33) and the corresponding amount of NO released was 29.7 nM (\pm 6.33). Knowing the fluctuation of the NO level in the control condition (*i.e.*, from 23.37 to 36.03 nM), we assigned the threshold concentration 40 nM as the starting time-point for NO release after the crush of the connective. We wanted to make sure of being just over the upper limit of the first significant peak of NO in the crushed nerve cord of the leech in the control condition. We monitored the starting time point of NO release between the connectives treated with either agonists or antagonists to their putative receptor. As shown in **Figure 5**, the stimulation of crushed connectives with 30 μ M 2AG (**Figures 5d & 5e; 6c**) significantly enhanced the NO waves compared to the control condition (**Figures 5f & 6a**). This result suggests that 2AG-induced activation of the CB-like receptor in the leech activates the NO waves earlier than the control condition, as shown by the average times of the NO pulses. By contrast, blocking the CB2-like receptor in the crushed connectives with the specific inhibitor AM630 (30 μ M) caused a significant delay of the NO pulses (**Figures 5a & 5b, 6d**) compared to the control condition (**Figures 5f & 6a**) and the 2AG-treated crushed connectives (**Figures 5d & 5e; 6c**). To exclude any possible effect of the acetonitrile vehicle used to dissolve the 2AG and the AM630 solutions, we injected a 1:1,000 solution of ACN into the crushed connectives (**Figures 5c & 6b**). Significant differences were obtained between the ACN-treated condition and both the 2AG-treated condition (**Figure 5c vs. Figures 5d & 5e**) and the AM630-treated condition (**Figure 5c vs. Figures 5a & 5b**), but no significant difference was found with the control condition, thereby suggesting that ACN did not interfere with the timing of NO release after crushing the nerve cord.

Taken together, these results underscore the fact that the stimulation of crushed connectives with either an agonist or antagonist for the CB2-like receptor significantly modulates the starting time point of NO release in crushed connectives of *Hirudo sp.*

Figure 6 depicts the variation in NO concentration over the course of the experiment. As shown here, the crushed nerve cord (control condition, **Figure 6a**) reached the threshold NO level (40 nM) at 4 h 30 min after the crush, and this increased progressively to reach concentrations consistently above 200 nM after 20 h of recording. A similar result was observed in the condition with ACN treatment (**Figure 6b**). Stimulating (**Figure 6c**) the crushed connective with 2AG (30 μ M) 1 h after the time of the lesion yielded a 40 nM concentration by 1 h 25 min after the crush, *i.e.*, significantly earlier than in the control and ACN-treated conditions. Stimulation of injured connectives with 2AG reduced the amount of NO released after 20 h, as the amount of NO stayed under 100 nM. In contrast, blocking the CB2-like receptor with AM630 1 h after the crush (**Figure 6d**) significantly delayed arrival at the 40 nM NO threshold (about 8 h post-crush) and strongly reduced the NO level at 20 h, as the highest concentration detected was equal to 42.22 nM. These results suggest both strong and fine regulation of the kinetics of NO secretion by 2AG and the antagonist AM630 in injured connectives of the leech brain. This cross-talk pathway between the endocannabinoid and NO systems may be attributable to the regulation of the CB2-like receptor carried by immune cells of the leech CNS.

As a consequence of these observations, all the dynamic measurements of NO produced at the lesion site might be attributed to the movement of the microglia. 2AG has been shown to stimulate *ex vivo* microglial cell migration toward the lesion site (**Figure 1d**) and the Kohidai chemotaxis test confirmed the chemotactic effect of 2AG *in vitro* (**Figure 2**). Moreover, the specific real-time measurements of NO at the lesion site of the connective demonstrate the possibility that 2AG cross-activates the NO pathway in the recruited microglia. In accordance with the *ex vivo* results (**Figure 1f**) where treatment of connectives with the specific CB2 receptor antagonist AM-630 inhibited microglial cell chemotaxis towards the lesion site 6 h post-crush, a delayed response in NO production was also recorded (**Figures 5a & 5b, 6d**).

Discussion

The regeneration of the leech CNS is characterized by at least two major events, which are the accumulation of activated microglia and the nerve repair process at the lesion site (Chen et al., 2000). As a means of recruiting microglia to the site of injury, chemotactic factors are quickly produced and released by the damaged brain of the leech, including nitric oxide (Chen et al., 2000; Yahyavi-Firouz-Abadi et al., 2007), the recently discovered *HmC1q* chemotactic factor (Tahtouh et al., 2009) and antimicrobial peptides with neurotrophic activities (Schikorski et al., 2008). Moreover, the first release of NO produced immediately after the nerve damage has been described as a crucial signal in microglial cell chemotaxis during leech nerve repair since neither microglial accumulation nor nerve cord regeneration succeed without NO production (Chen et al., 2000).

In addition, a report on the medicinal leech by Stefano et al. (Stefano et al., 1997) describes for the first time a functional cannabinoid system coupled with NO production. As in

mammalian systems, the roles of the cannabinoid receptor and NO pathways in activated microglia have remained controversial. In this study, we demonstrate the immediate production of NO when a lesion in the leech nerve cord occurs, and we show that the rate of production decreases over time during brain trauma. Between 3 h 30 min and 4 h after the lesion, a delay was systematically observed, during which the damaged nerve cord enhances NO production detected at the lesion site. Our report also highlights dual effects of agonists and antagonists of cannabinoid-like receptor activation in terms of the time-course of NO production and microglial recruitment to the leech lesion site. Moreover, the neuroprotective effects of non-psychotic cannabinoids have been reported in several different experimental contexts including *in vitro* (Nagayama et al., 1999; Mechoulam, 2002) and *in vivo* studies (Pryce et al., 2003; Veldhuis et al., 2003). As a link with the beneficial effects of controlled NO production by the injured leech nerve cord, we looked for cross-talk between the NO and endocannabinoid systems when a lesion occurs in the leech brain.

Controversial effects have been widely ascribed to the well-studied endocannabinoid AEA, ranging from inhibition of the neuroinflammation process to neurotoxic effects (Kim et al., 2007). We found that AEA blocked microglial cell accumulation before their arrival to the lesion site in a concentration dependent-manner, and this effect of AEA on microglial cell recruitment was also demonstrated *in vitro*. Moreover, stimulation with a concentration of AEA determined elsewhere by MALDI TOF/TOF mass spectrometry (Lipitz et al., unpublished data) enhanced the release of NO at the lesion site of the harmed connective. This NO release may be related to the AEA-activated CB1-like receptor carried by neurons of the leech present in the injury site. This same report suggested that this pathway leads to a microglia stop signal.

In a complementary mode of action, the second most described endocannabinoid 2AG has been shown to enhance and drive the chemotaxis of microglial cells in a dose-dependent manner. Moreover, a better result in chemotaxis was obtained using a concentration of 2AG detected 30 min after injury of the leech nerve cords (Lipitz et al., unpublished data). This result is reinforced by Cabral et al. who suggested that 2AG could act through the autocrine/paracrine system to chemoattract microglial cells after brain insult (Cabral et al., 2008). Our report offers insights regarding the complementary effects of AEA and 2AG in terms of modulation of the chemotaxis of microglia when the leech nerve cord has been injured. We also determined in previous works (Lipitz) that the AEA level declines and (in contrast) the 2AG climbs during the first 4 h following a lesion of the leech CNS. Knowing that these two endocannabinoids are able to chemoattract microglia in a dose-dependent manner in combination with the stimulation of NO release, we investigated the role of the leech CB-like receptors in the control of NO release and chemotaxis towards the lesion site.

On one hand, blocking the CB1-like receptor in the leech with a specific antagonist of the mammalian CB1 receptor (AM-251) failed to block the accumulation of microglial cells at a distance from the lesion site. This latter result underscores the role of the CB1-like receptor in

microglial chemotaxis. On the other hand, blocking the CB2-like receptor in the leech with the specific antagonist AM-630 completely abolished the recruitment of microglial cells at the lesion site, and co-stimulation of a crush with 2AG and AM-630 failed to reverse the accumulation of microglia as compared to the 2AG treatment alone (unpublished data). This latter result suggests that the CB2-like receptor in the leech is triggered by 2AG in order to promote chemotaxis and direct recruitment of microglial cells to the site of injury. In parallel, the treatment of injured connectives with a physiological concentration of 2AG released upon CNS injury in the leech provoked a specific response in NO production at the lesion site just after the stimulation. This observation is consistent with the binding and thus activation of the CB-like receptor subsequently inducing the release of NO. Blockade of the CB2-like receptor by AM-630 revealed an inhibition of NO secretion and the time-course of NO production was significantly delayed in comparison with the control condition. In this way, we demonstrated that at least part of the NO produced by the injured leech was related to the 2AG-activated CB2-like receptor, as was described in experiments using Guinea pig mast cells (Vannacci et al., 2004).

Even if 2AG and AEA are both able to produce NO during a lesion of the leech brain, only 2AG seems to play a major role in the chemotaxis of microglia, and its capacity to do so is closely related to a putative functional CB2-like receptor expressed by activated microglia. Previous pharmacological studies have named the CB2 receptor as playing a crucial role in the early inflammatory process, thereby implicating microglia in this process as well. The CB2 receptor is expressed very early in the different activation steps of microglia, thus describing a “window” of functional relevance for the expression of the CB2 receptor in the plasma membrane of brain immune cells including microglial cells (Cabral et al., 2008). In his model, Cabral delayed the timing of the initiation of microglial cell activation, which changes their morphology from resting to responsive and allows them to acquire CB2 receptors in correlation with chemotaxis and phagocytosis. The next steps of activation, named “primed” and “responsive,” were discarded from the initial step of CB2 receptor expression. As a diffusible molecule, NO has been demonstrated to take part in the migration of microglia and their accumulation at lesions of the leech CNS (Chen et al., 2000) in a dose-dependent manner. The mechanisms by which the resting microglia become responsive are not fully understood. However, we hypothesize that the NO immediately released by the damaged neurons (the first peak of secreted NO detected in the injured leech brain with the amperometric apparatus) might stimulate the resting microglial cells present at the lesion site and allow them to be responsive for CB2-like receptor expression.

Concurrently, the cannabinoid system becomes activated at the lesion site and produces the two major endocannabinoids (AEA and 2AG) from membrane precursors in an apposite concentration time-course of (Lipitz et al., unpublished data), consistent with our previous work where the 2AG concentration was found to progressively increase in opposition with the AEA concentration after the lesion. It has been hypothesized that when the diffusible lipid 2AG increases, the microglia become responsive and start to accumulate at the lesion site via changes

in cell morphology related to the activation of the CB2-like receptor expressed in the lamellipodia of responsive microglia (Walter et al., 2003). This hypothesis is reinforced by our *ex vivo* results regarding the stimulation of crushed connectives with 2AG (30 μ M) 1 h after the lesion. In comparison with the connectives simultaneously crushed and treated with 30 μ M 2AG, the same stimulation 1 h after the crush stimulated NO production more rapidly. This observation suggests that microglial cells are more responsive to 2AG 1 h after the lesion than at the instant of the lesion, at which time microglia might be resting. During the responsive step, the leech microglia might express functional CB2 receptors at the cell surface, and when these receptors are activated by the endocannabinoid 2AG, NO might be produced and participate in cell recruitment as a chemical gradient from the lesion site towards the periphery. On the other hand, the AEA released at the lesion site decreased in concentration after the lesion, and it can activate NO release by targeting the CB1-like receptor and inhibiting the accumulation of microglia at the lesion site. This pathway has been described as leading to a microglia stop signal (Salzet, 2000). The dual activity of these two endocannabinoids working in apparent opposition might be a means of controlling microglial cell recruitment to the lesion site. However, both molecules control the long-term release of NO, as shown in our time-course measurements of NO after stimulation of injured connectives with cannabinoids. This can be explained by the immunosuppressive response of microglial cells described both in vertebrate (Ehrhart et al., 2005) and invertebrate models (Salzet, 2000)

A better understanding of methods of regulation by the endocannabinoid system is currently a very attractive field of investigation since reports have implicated dysregulation of this system in many brain disorders (Sinor et al., 2000; Maresz et al., 2007). Using both *in vivo* and *in vitro* studies, Katarzina et al. and Sinor et al. demonstrated the specific role played by cannabinoids in the inhibition of immunological activities of microglial cells accumulated at the site of a brain injury. Indeed, Zhang et al. reported that both blockade of CB1rs and activation of CB2rs in the brain enhanced neuroprotective effects after brain ischemia in mice (Zhang et al., 2008). Alzheimer's disease, in which activated microglia accumulate around amyloid senile plaques and are known to express CB2 receptors, is also characterized by a dramatic decrease in the expression of the CB1 receptor in neurons mainly in areas bearing plaques. The authors pointed out the vulnerability of these neurons to the toxic species generated by activated microglia (e.g., NO and cytokines) (Ramirez et al., 2005).

When considering the balance of CB1 and CB2 receptors in brain disorders, the regulation of the endocannabinoids AEA and 2AG must be considered as well. Indeed, AEA can play a dual role since it has been shown that AEA protects neurons via activation of the MKP-1-related CB1 receptor pathway in microglial cells during inflammation of the vertebrate CNS (Eljaschewitsch et al., 2006). Also, trauma in the rat brain significantly elevated the level of AEA production but not that of 2AG (Hansen et al., 2001), whereas only a small amount of AEA is produced in the healthy rat brain (Kempe et al., 1996). As shown elsewhere (Tognetto et al., 2001), a high concentration

of AEA after an injury in the vertebrate CNS can also activate another type of receptor named transient vanilloid receptor 1 (TRPV1) by which AEA can interact with and enhance proinflammatory and nociceptive effects. In a mouse model of closed head injury, the 2AG level increased and administration of exogenous 2AG led to significant reductions in brain edema and hippocampal cell death and better clinical recovery compared to the control condition (Panikashvili et al., 2006).

As an interesting comparison, trauma in the leech brain strongly decreases the level of AEA and in parallel increases the level of 2AG as an alternative means of regulation when compared to the levels in an injured mammalian brain. Moreover, the accumulation of microglia at the lesion site following injury of the leech CNS is strongly suggested to be modulated by cross-talk between the CB2-like receptor borne by responsive microglial cells and NO pathways.

As a consequence of the imbalance in the regulation of these endocannabinoids in the injured brain of the leech, the level of NO is also finely regulated during the lesion since stimulation of harmed leech nerve cord with the endocannabinoids inhibits the long-term production of NO by microglia and probably damaged neurons. In contrast to the leech, trauma in the rat CNS stimulates NO synthase many hours after injury (personal data performed with the same Apollo 4000 amperometric apparatus) thereby increasing NO the micromolar range. *Hirudo sp.* maintains NO concentration in the nanomolar range (well under 200 nM in the control condition), and up to 50% less when an agonist and antagonist of the CB2-like receptor are added concurrently with damage to the leech brain.

Conclusion

Taking into account all the data, we suggest that in the leech, after injury, endocannabinoids are released at different levels compared to those in the mammalian brain. Taken together, our results show that in the leech, concurrent with NO production and microglia recruitment, a fine imbalance occurs in the endocannabinoid system. All of these events may promote neuronal survival by regulating immune functions, such as NO production in the microglia.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Génoscope (to MS) and the Conseil régional Nord-Pas-de Calais (to KA) and the Canadian Institutes of Health Research (to RD). RD is member of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-LeBel

References

- Baylor DA, Nicholls JG (1971) Patterns of regeneration between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Nature* 232:268-270.
- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F (2008) CB2 receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* 153:240-251.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2:69-82.
- Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007.
- Chen A, Kumar SM, Sahley CL, Muller KJ (2000) Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *J Neurosci* 20:1036-1043.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Duan Y, Haugabook SJ, Sahley CL, Muller KJ (2003) Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. *J Neurobiol* 57:183-192.
- Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005) Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2:29.
- Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 49:67-79.
- Felder CC GM (1998) Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:179-200.
- Franklin A SN (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol* 474:195-198.
- Hansen HH, Schmid PC, Bittigau P, Lastres-Becker I, Berrendero F, Manzanares J, Ikonomidou C, Schmid HH, Fernandez-Ruiz JJ, Hansen HS (2001) Anandamide, but not 2-arachidonoylglycerol, accumulates during in vivo neurodegeneration. *J Neurochem* 78:1415-1427.
- Jansen JK NJ (1972) Regeneration and changes in synaptic connections between individual nerve cells in the central nervous system of the leech. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:636-639.
- Kempe K, Hsu FF, Bohrer A, Turk J (1996) Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue. *J Biol Chem* 271:17287-17295.
- Kim SR, Chung YC, Chung ES, Park KW, Won SY, Bok E, Park ES, Jin BK (2007) Roles of transient receptor potential vanilloid subtype 1 and cannabinoid type 1 receptors in the brain: neuroprotection versus neurotoxicity. *Mol Neurobiol* 35:245-254.
- Kohidai L (1995) Method for determination of chemoattraction in *Tetrahymena pyriformis*. *Curr Microbiol* 30:251-253.
- Kumar SM, Porterfield DM, Muller KJ, Smith PJ, Sahley CL (2001) Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. *J Neurosci* 21:215-220.
- Maccarrone M, Lorenzon T, Bari M, Melino G, Finazzi-Agro A (2000) Anandamide induces apoptosis in human cells via vanilloid receptors. Evidence for a protective role of cannabinoid receptors. *J Biol Chem* 275:31938-31945.
- Maestroni GJ (2004) The endogenous cannabinoid 2-arachidonoyl glycerol as in vivo chemoattractant for dendritic cells and adjuvant for Th1 response to a soluble protein. *FASEB J* 18:1914-1916.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN (2007) Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via

- the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* 13:492-497.
- Matias I, Bisogno T, Melck D, Vandenbulcke F, Verger-Bocquet M, De Petrocellis L, Sergheraert C, Breton C, Di Marzo V, Salzet M (2001) Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain Res Mol Brain Res* 87:145-159.
- McCarron RM, Shohami E, Panikashvili D, Chen Y, Golech S, Strasser A, Mechoulam R, Spatz M (2003) Antioxidant properties of the vasoactive endocannabinoid, 2-arachidonoyl glycerol (2-AG). *Acta Neurochir Suppl* 86:271-275.
- Mechoulam R (2002) Discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:93-99.
- Merchant D, Ertl RL, Rennard SI, Stanley DW, Miller JS (2008) Eicosanoids mediate insect hemocyte migration. *J Insect Physiol* 54:215-221.
- Morgese VJ, Elliott EJ, Muller KJ (1983) Microglial movement to sites of nerve lesion in the leech CNS. *Brain Res* 272:166-170.
- Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *J Neurosci* 19:2987-2995.
- Ngu EM, Sahley CL, Muller KJ (2007) Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. *J Comp Neurol* 503:101-109.
- Nicholls JG, Baylor DA (1968) Specific modalities and receptive fields of sensory neurons in CNS of the leech. *J Neurophysiol* 31:740-756.
- Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413:527-531.
- Panikashvili D, Shein NA, Mechoulam R, Trembovler V, Kohen R, Alexandrovich A, Shohami E (2006) The endocannabinoid 2-AG protects the blood-brain barrier after closed head injury and inhibits mRNA expression of proinflammatory cytokines. *Neurobiol Dis* 22:257-264.
- Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, Cuzner ML, Baker D (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 126:2191-2202.
- Ramirez BG, Blazquez C, Gomez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904-1913.
- Salzet M (2000) Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res Brain Res Rev* 34:69-79.
- Schikorski D, Cuvillier-Hot V, Leippe M, Boidin-Wichlacz C, Slomianny C, Macagno E, Salzet M, Tasiemski A (2008) Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J Immunol* 181:1083-1095.
- Shafer OT, Chen A, Kumar SM, Muller KJ, Sahley CL (1998) Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc Biol Sci* 265:2171-2175.
- Sinor AD, Irvin SM, Greenberg DA (2000) Endocannabinoids protect cerebral cortical neurons from in vitro ischemia in rats. *Neurosci Lett* 278:157-160.
- Stefano GB, Salzet B, Salzet M (1997) Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor: coupling to nitric oxide release. *Brain Res* 753:219-224.
- Stefano GB, Rialas CM, Deutsch DG, Salzet M (1998) Anandamide amidase inhibition enhances anandamide-stimulated nitric oxide release in invertebrate neural tissues. *Brain Res* 793:341-345.
- Stern M, Bicker G (2008) Nitric oxide regulates axonal regeneration in an insect embryonic CNS. *Dev Neurobiol* 68:295-308.
- Sugiura T, Waku K (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108:89-106.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.

- Tahtouh M, Croq F, Vizioli J, Sautiere PE, Van Camp C, Salzet M, Daha MR, Pestel J, Lefebvre C (2009) Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Mol Immunol* 46:523-531.
- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, Matera M, Geppetti P, Bianchi A (2001) Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* 21:1104-1109.
- Vannacci A, Giannini L, Passani MB, Di Felice A, Pierpaoli S, Zagli G, Fantappie O, Mazzanti R, Masini E, Mannaioni PF (2004) The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol decreases the immunological activation of Guinea pig mast cells: involvement of nitric oxide and eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 311:256-264.
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, van Zadelhoff G, Maccarrone M, Fezza F, Veldink GA, Vliegthart JF, Bar PR, Nicolay K, Di Marzo V (2003) Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J Neurosci* 23:4127-4133.
- von Bernhardi R, Muller KJ (1995) Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches. *J Neurobiol* 27:353-366.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23:1398-1405.
- Xian Y, Zhang W, Xue J, Ying X, Jin L, Jin J (2000) Measurement of nitric oxide released in the rat heart with an amperometric microsensor. *Analyst* 125:1435-1439.
- Yahyavi-Firouz-Abadi N, Tahsili-Fahadan P, Ostad SN (2007) Effect of mu and kappa opioids on injury-induced microglial accumulation in leech CNS: involvement of the nitric oxide pathway. *Neuroscience* 144:1075-1086.
- Zhang M, Martin BR, Adler MW, Razdan RK, Ganea D, Tuma RF (2008) Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Neuroscience* 152:753-760.

Figure captions

Figure 1. Dual cannabinoid-related effect and CB-like receptors selective antagonist activity on microglia accumulation in injured connectives. Each connective was cut off and assessed for the accumulation of microglia towards the lesion site by Hoechst 33258 fluorescent nuclear staining. The accumulation of microglial cells 6 h after axotomy was revealed in the control condition (a). A 6-h treatment with the NO synthase inhibitor L-NAME (30 μ M) simultaneous with axotomy blocked the accumulation of microglial cells (b). Treatment with 30 μ M AEA simultaneous to axotomy (c) blocked cell migration to the injury site, whereas the addition of 30 μ M 2AG strongly increased the recruitment of microglia (d). The treatment with the CB1-like receptor antagonist AM-251 did not block cell recruitment (e). In contrast, the addition of specific CB2 receptor antagonist AM-630 inhibited the accumulation of the cells at the lesion site (f). The red circled area shows accumulated microglia, and the red arrows point out the lack of microglial cell accumulation at or close to the lesion site.

Figure 2. The dose-dependent chemotactic effects of cannabinoids on microglia isolated from total leech brain confirmed that AEA and 2AG are sufficient to promote microglial cell recruitment *in vitro* in a significant manner compared to the controls (basal medium L-15 and L-15 supplemented with 1:1,000 diluted vehicle). In a dose-dependent manner, 2AG was more efficient at attracting the cells than AEA, indicating a difference in microglia accumulation between these two cannabinoids that was in accordance with the *in situ* observations (**Figures 1a & 1c**). The results are expressed as the percent of microglial cells that migrate compared to the L-15 control condition. In each set of experiments, cell counts were performed in triplicate at the beginning of the chemotaxis test and at its end. The asterisks denote that the indicated samples were significantly different from each other (one-way repeated ANOVA $p < 0.01$, Holm-Sidak test $\alpha = 0.01$; SigmaStat 3.11).

Figure 3: CB2-like receptor immunostaining using a rat anti-CB2 receptor antibody. The immunohistochemistry of a fresh dissected leech nerve cord showed localized microglial staining (**b**; arrows) in area surrounding neurons (arrowheads). No staining was found in microglia in the control condition in which the primary anti-CB2 receptor antibody was used (**a**).

Figure 4: Immunocytochemistry investigation of CB2-like receptor in microglia isolated from *Hirudo* CNS. A rabbit anti-rat CB2R polyclonal antibody, coupled to secondary FITC anti-rabbit Ab, positively stained microglial cells (fig. A). Negative controls were performed following the same protocol either adding a pre-incubation step mixing the antibody with its selective blocking peptide

(fig. C) or using the secondary antibody alone (fig. E). To establish the position of the microglial cells, some of them indicated by arrows, samples were counterstained with the nuclear dye Hoechst 33258 (fig. B, D, F). Scale bars = 10 μ m.

Figure 5: The CB receptor agonist 2AG and the selective antagonist AM630 modulate NO release in the injured leech CNS independently from the initial time-point of stimulation (simultaneously with crush or 1 h post-crush). Significant differences have been established in the timing of NO release at the lesion site between control (**f**) and treated connectives (**a,b,d,e**). Stimulation of the nerve cord with 30 μ M 2AG induced significant NO production at the injury site (**d,e**) in comparison with the control condition (**f**). Treatment with AM630 (30 μ M) (**a,b**), which is known to have a high affinity for the CB2 receptor, significantly delayed NO release in the injured nerve cord compared to the control. Moreover, no significant NO release related to the ACN treatment was evident in comparison with the control. All statistics were performed with SigmaStat 3.11 using a one-way repeated-measures ANOVA test $p < 0.01$ with the post-hoc Holm-Sidak test $\alpha = 0.05$. Significant differences are denoted by asterisks. All the treatment conditions presented significant differences when compared with the control condition (**a,b,c,d,e vs. f**). The AM630 conditions did not share significant differences with each other (**a vs. b**) but were different from all other conditions. Finally, the **c**, **d** and **e** conditions were significantly different from each other.

Figure 6: Real-time NO recording illustrations showing the NO profile from crushed connective (control condition, **a**) and crushed connective treated with either acetonitrile (**b**), 30 μ M 2AG (**c**) or 30 μ M AM630 (**d**). The figures depict the variation in NO concentration (in nM) over the course of the experiment (20 h). These results show that the kinetics of NO production in the control condition and the ACN-treated condition are similar, suggesting that stimulation of the crushed connectives with ACN only weakly influences the kinetics and concentration of NO. In contrast, 2AG and AM630 strongly modulate the NO profile in its kinetics as well as its concentration. While 2AG speeds up the process allowing the connective to produce NO waves, AM630 down-regulates this process in comparison with the control and the connective treated with ACN.

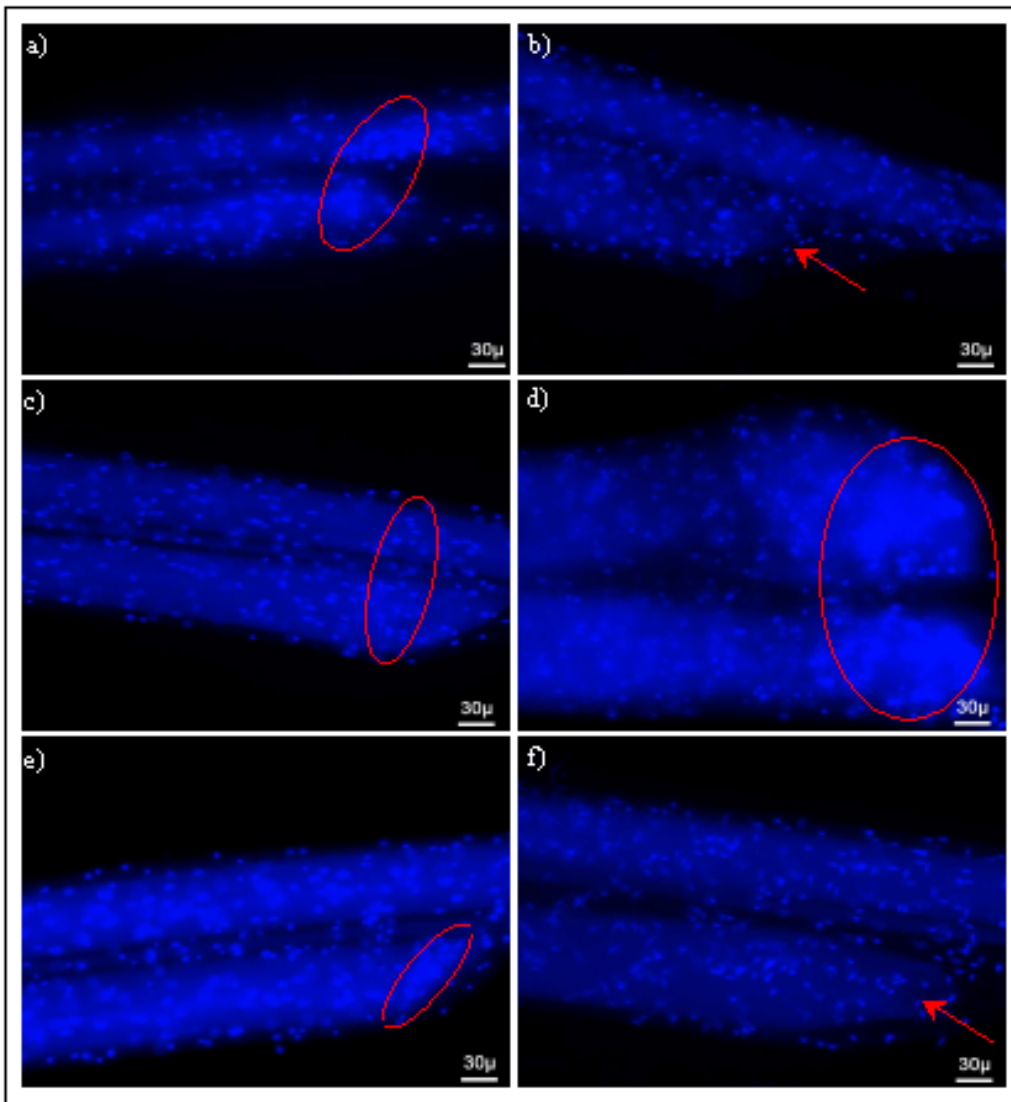


Figure 1

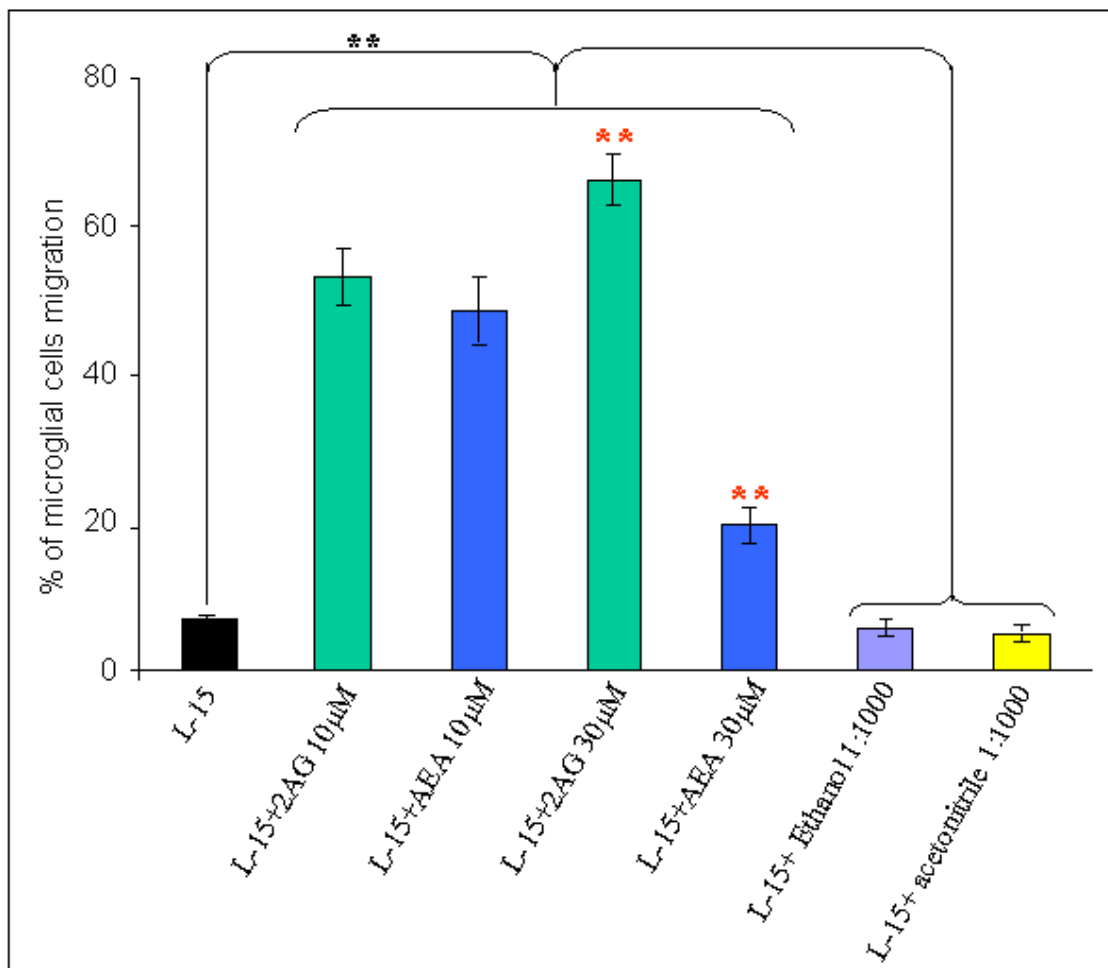


Figure 2

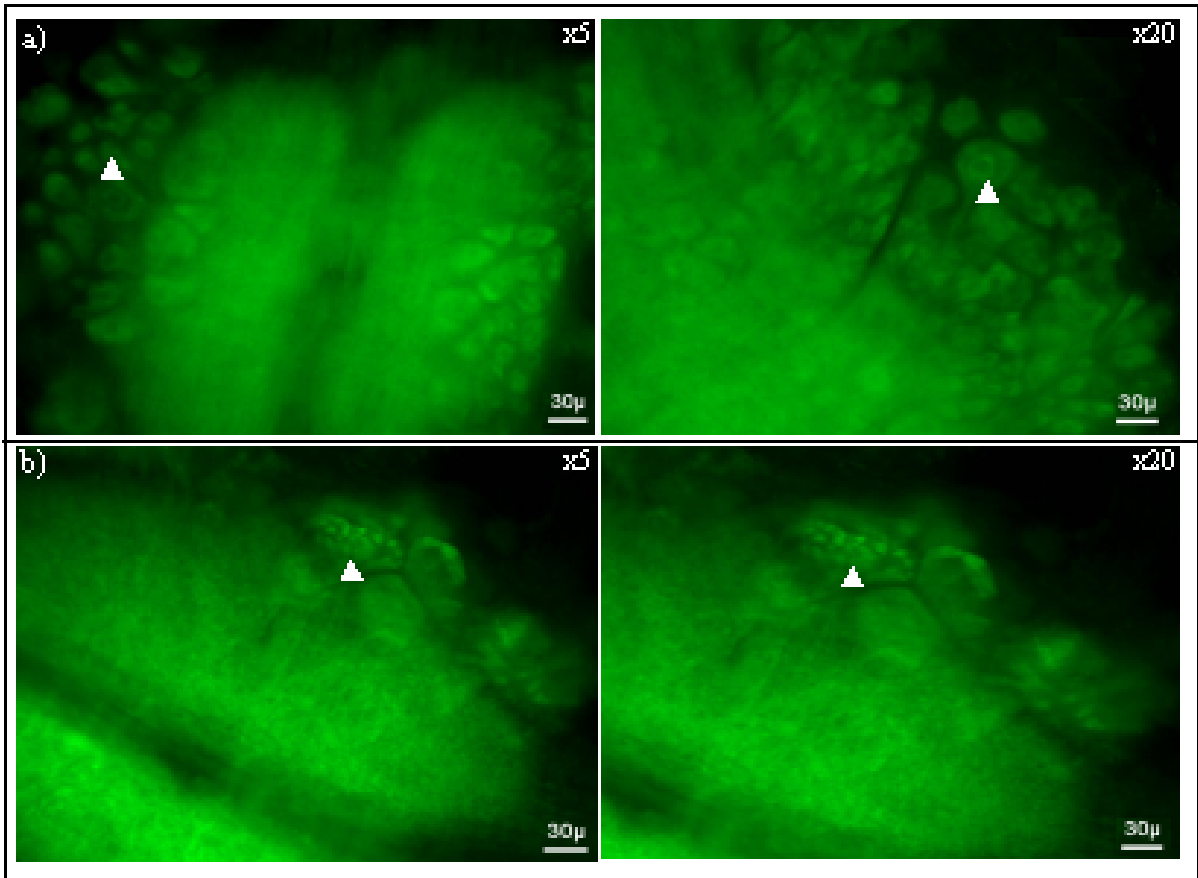


Figure 3

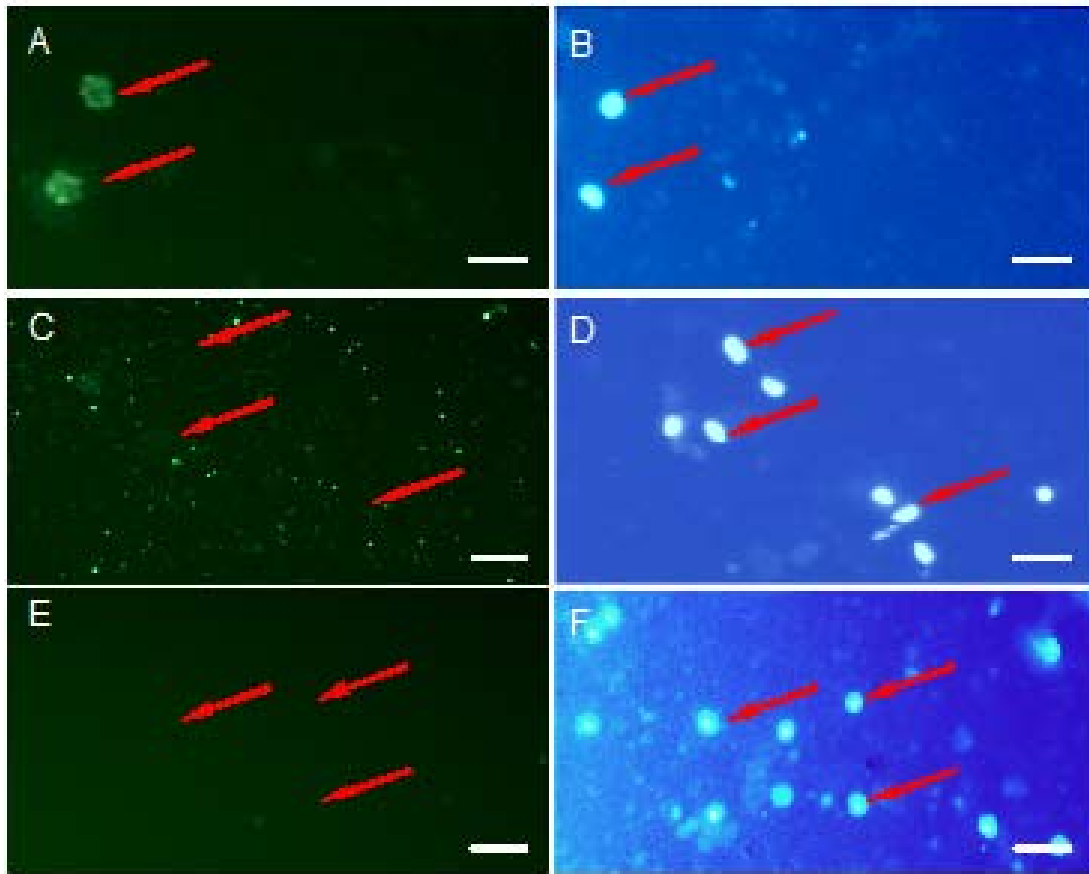


Figure 4

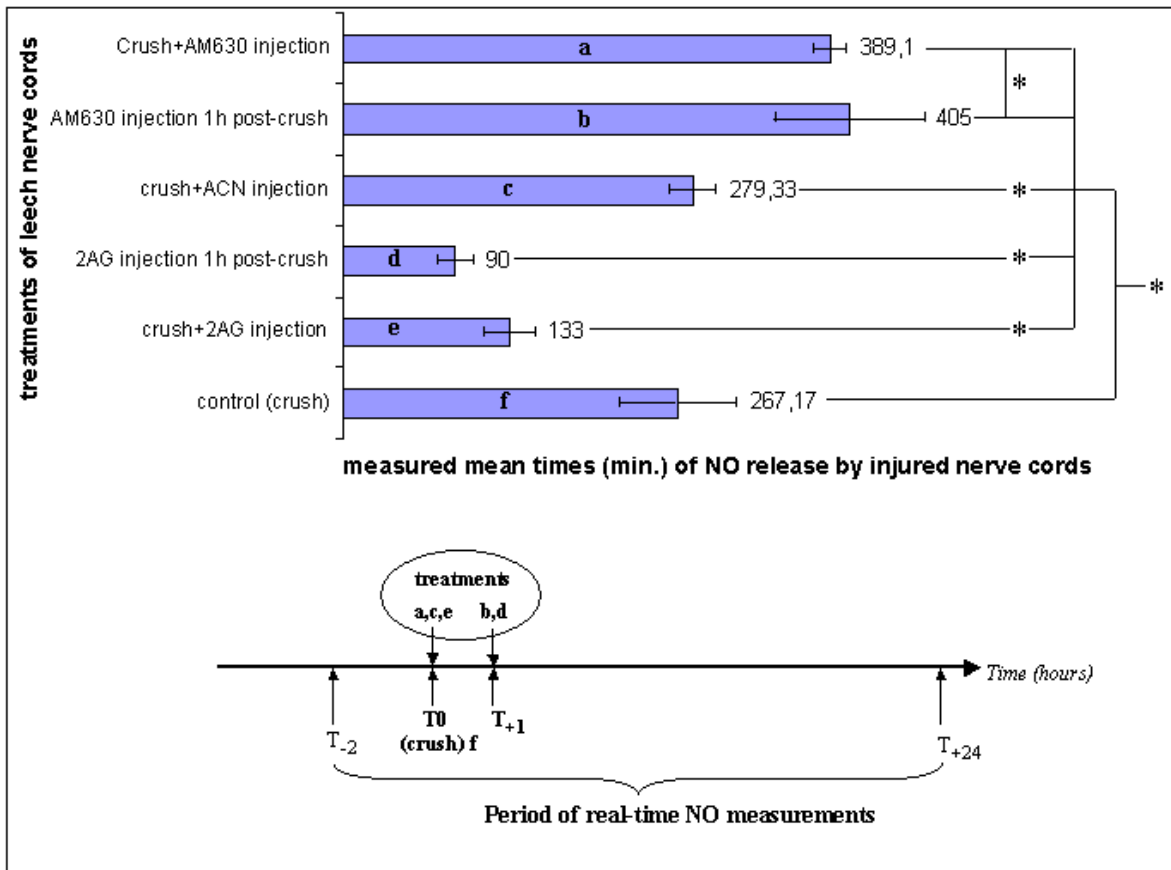


Figure 5

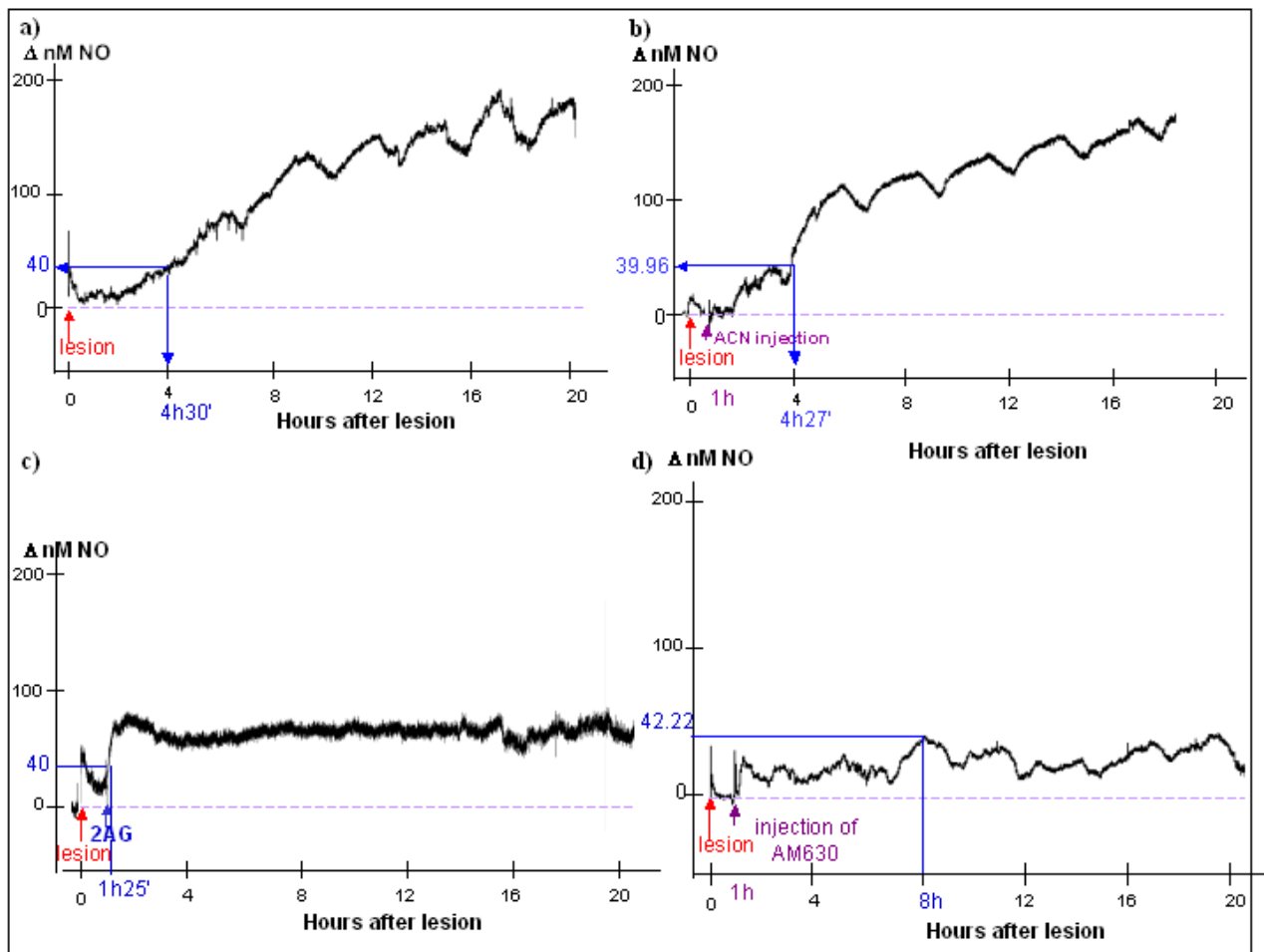


Figure 6

Chapitre IV : Conclusion

Chapitre 4: Conclusion générale

Au cours de cette thèse, nous avons pu mettre en place des procédures méthodologiques pour l'analyse des lipides par spectrométrie de masse et en imagerie moléculaire.

L'approche par les coumarines permet une première analyse des coupes par fluorescence afin de déterminer la globalité des lipides présents au sein du tissu à un temps donné (**Figure 1**) suivit d'une analyse par DALDI afin d'y associer une image moléculaire de ces lipides et par la suite une caractérisation moléculaire par MS/MS.

Ceci montre qu'une approche multi modale est donc importante et doit être développée dans un cadre d'analyse de pathologies ou comme ici dans une thématique plus fondamentale, la régénération nerveuse chez la sangsue.

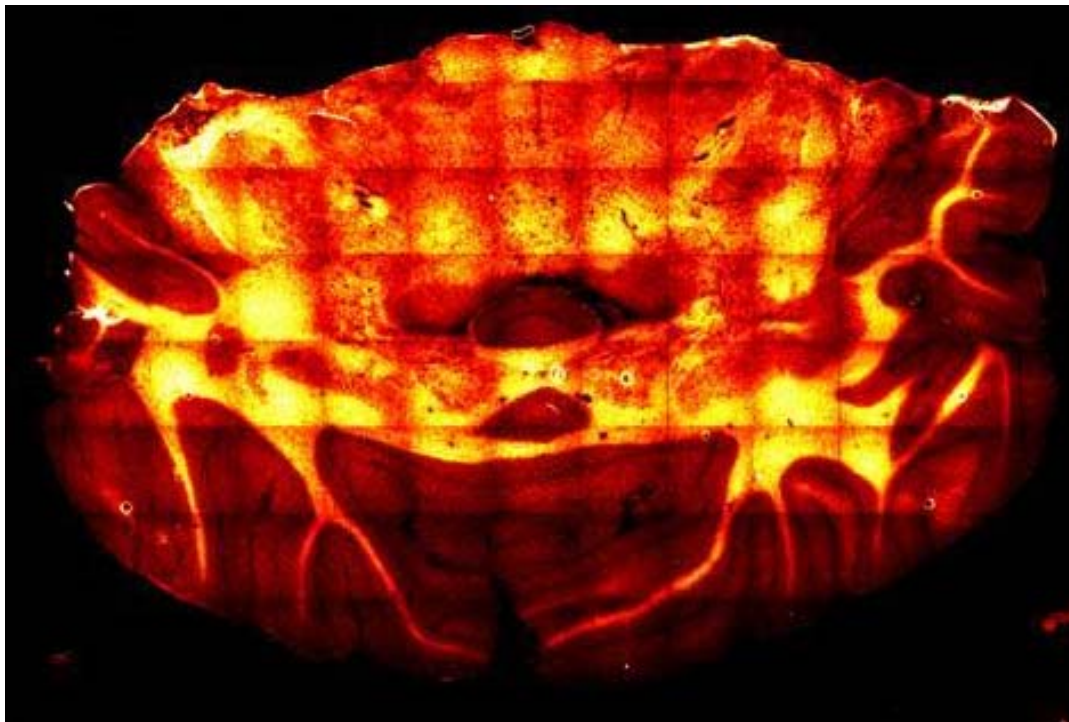


Figure 1 : Image par Fluorescence d'une coupe de cerveau rat fixée au Baker (PAF-CaCl₂) après coloration au Nile Blue A.

La mise en évidence que l'utilisation de techniques classiques de coloration par des agents fluorescents ouvre des perspectives intéressantes pour l'avenir dans le cadre de la recherche de l'association pour un phénomène biologique de plusieurs type de biomolécules i.e. lipides, glucides,

peptides, protéines. L'imagerie par spectrométrie de masse présente le gros avantage de permettre l'analyse simultanée sur une même coupe de ces différents composés dépendamment du traitement du tissu réalisé. La glycomique sur coupes tout comme la lipoprotéomique ou la glycolipidomique seront demain les nouveaux champs d'investigation en imagerie par spectrométrie de masse.

Cependant l'imagerie MALDI doit encore s'améliorer en ce qui concerne le traitement des tissus pour atteindre du deep-protéome. C'est à l'heure actuelle un verrou technologique fondamental à dépasser pour permettre l'accès aux composés minoritaires du point de vue de leur caractérisation et leur quantification au sein du tissu.

En ce qui concerne, le volet sur la régénération nerveuse, nos travaux montrent le rôle clé des lipides dans ce phénomène biologique. On ne peut plus considérer uniquement les gènes, le transcriptome, le protéome pour la régulation d'une fonction biologique. Le lipidome est tout aussi important tant dans sa dynamique que dans la rapidité de mobilisation. IL est désormais fondamental d'étudier l'association de ces lipides avec les autres biomolécules pour mieux comprendre la biologie qu'elle soit normale ou pathologique. Les lipides Raft en sont un exemple tout comme les cannabinoïdes dans notre étude.

Le modèle sangsue offre la possibilité d'étudier en détail ces lipides en vue de la compréhension d'un mécanisme important car perdu au cours de l'évolution *i.e.* la régénération nerveuse.

Chapitre V : Bibliographie

Chapitre 5: Bibliographie

1. Schikorski, D., et al., Deciphering the immune function and regulation by a TLR of the cytokine EMAPII in the lesioned central nervous system using a leech model. *J Immunol*, 2009. 183(11): p. 7119-28.
2. Schikorski, D., et al., Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J Immunol*, 2008. 181(2): p. 1083-95.
3. Tahtouh, M., et al., Evidence for a novel chemotactic C1q domain-containing factor in the leech nerve cord. *Mol Immunol*, 2009. 46(4): p. 523-31.
4. Ngu, E.M., C.L. Sahley, and K.J. Muller, Reduced axon sprouting after treatment that diminishes microglia accumulation at lesions in the leech CNS. *J Comp Neurol*, 2007. 503(1): p. 101-9.
5. Shafer, O.T., et al., Injury-induced expression of endothelial nitric oxide synthase by glial and microglial cells in the leech central nervous system within minutes after injury. *Proc Biol Sci*, 1998. 265(1411): p. 2171-5.
6. Kumar, S.M., et al., Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor. *J Neurosci*, 2001. 21(1): p. 215-20.
7. Chen, A., et al., Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS. *J Neurosci*, 2000. 20(3): p. 1036-43.
8. Duan, Y., et al., Methylene blue blocks cGMP production and disrupts directed migration of microglia to nerve lesions in the leech CNS. *J Neurobiol*, 2003. 57(2): p. 183-92.
9. Gibbs, S.M. and J.W. Truman, Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron*, 1998. 20(1): p. 83-93.
10. Matias, I., et al., Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. 87(2): p. 145-59.
11. Salzet, M. and G.B. Stefano, The endocannabinoid system in invertebrates. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002. 66(2-3): p. 353-61.
12. Salzet, M., et al., Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response. *Eur J Biochem*, 2000. 267(16): p. 4917-27.

13. Stefano, G.B., B. Salzet, and M. Salzet, Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor: coupling to nitric oxide release. *Brain Res*, 1997. 753(2): p. 219-24.
14. Stefano, G.B., et al., Anandamide amidase inhibition enhances anandamide-stimulated nitric oxide release in invertebrate neural tissues. *Brain Res*, 1998. 793(1-2): p. 341-5.
15. Abbas, A., et al., Cold plasma functionalized TeraHertz BioMEMS for enzyme reaction analysis. *Biosens Bioelectron*, 2009. 25(1): p. 154-60.
16. The Nomenclature of Lipids, IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. *Biochem. J*, 1978. 171(): p. 21-35.
17. Fahy, E., et al., A comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res*, 2005. 46(5): p. 839-61.
18. Salem, N., Jr., et al., Mechanisms of action of docosahexaenoic acid in the nervous system. *Lipids*, 2001. 36(9): p. 945-59.
19. Kim HY, E.L., Garcia M, Zhang H, The release of polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenation in the brain. *Adv Exp Med Biol*. <javascript:AL_get(this, 'jour', 'Adv Exp Med Biol. ');>, 1999. 447: p. 75-85.
20. Kim, H.Y., M. Akbar, and K.Y. Kim, Inhibition of neuronal apoptosis by polyunsaturated fatty acids. *J Mol Neurosci*, 2001. 16(2-3): p. 223-7; discussion 279-84.
21. Bosetti, F., Arachidonic acid metabolism in brain physiology and pathology: lessons from genetically altered mouse models. *J Neurochem*, 2007. 102(3): p. 577-86.
22. Ojeda, S.R., et al., The role of arachidonic acid and its metabolites in the release of neuropeptides. *Ann N Y Acad Sci*, 1989. 559: p. 192-207.
23. Hayaishi, O. and H. Matsumura, Prostaglandins and sleep. *Adv Neuroimmunol*, 1995. 5(2): p. 211-6.
24. Baile, C.A., et al., Prostaglandins and food intake of rats: a component of energy balance regulation? *Physiol Behav*, 1973. 10(6): p. 1077-85.
25. McCown, T.J., D.J. Knapp, and F.T. Crews, Inferior collicular seizure generalization produces site-selective cortical induction of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Brain Res*, 1997. 767(2): p. 370-4.
26. Phillis, J.W. and M.H. O'Regan, The role of phospholipases, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cerebral ischemic/traumatic injuries. *Crit Rev Neurobiol*, 2003. 15(1): p. 61-90.

27. Teismann P, T.K., Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, Vila M, Jackson-Lewis V, Przedborski S. , Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 2003. 100: p. 5473-5478.
28. Griffin, D.E., S.L. Wesselingh, and J.C. McArthur, Elevated central nervous system prostaglandins in human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*, 1994. 35(5): p. 592-7.
29. Boldin, S. and A.H. Futerman, Glucosylceramide synthesis is required for basic fibroblast growth factor and laminin to stimulate axonal growth. *J Neurochem*, 1997. 68(2): p. 882-5.
30. Hannun, Y.A. and L.M. Obeid, Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(2): p. 139-50.
31. Edsall, L.C. and S. Spiegel, Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate. *Anal Biochem*, 1999. 272(1): p. 80-6.
32. Pike, L.J., Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res*, 2006. 47(7): p. 1597-8.
33. Brinkmann, V., FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol*, 2009. 158(5): p. 1173-82.
34. Walkley, S.U., M. Zervas, and S. Wiseman, Gangliosides as modulators of dendritogenesis in normal and storage disease-affected pyramidal neurons. *Cereb Cortex*, 2000. 10(10): p. 1028-37.
35. Schwarz A, R.E., Hirschberg K, Futerman AH., A regulatory role for sphingolipids in neuronal growth. Inhibition of sphingolipid synthesis and degradation have opposite effects on axonal branching. *J Biol Chem.*, 1995. 270(18): p. 10990-8.
36. Wada, R., C.J. Tiffit, and R.L. Proia, Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(20): p. 10954-9.
37. Stoskopf, M.K., et al., Characterization of novel glycolipids from the giant cockroach (*Blaberus colosseus*). *J Biol Chem*, 1989. 264(9): p. 4964-71.
38. Kuzuyama, T. and H. Seto, Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep*, 2003. 20(2): p. 171-83.
39. Rodriguez-Concepcion, M., The MEP pathway: a new target for the development of herbicides, antibiotics and antimalarial drugs. *Curr Pharm Des*, 2004. 10(19): p. 2391-400.

40. JOSEPH L. RABINOWITZ , C.J.T., ROBERT LIPSON, and PHILIP PERSON LIPID COMPONENTS AND IN VITRO MINERALIZATION OF SOME INVERTEBRATE CARTILAGES *Biol Bull*, 1976. 150: p. 69-79.
41. Saito, M., H. Kitamura, and K. Sugiyama, Occurrence and tissue distribution of c-series gangliosides in the common squid *Todarodes pacificus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2002. 131(3): p. 433-41.
42. Roth, J., et al., Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 1992. 256(5057): p. 673-5.
43. Dennis, R.D., et al., Glycosphingolipids in insects. Chemical structures of ceramide tetra-, penta-, hexa-, and heptasaccharides from *Calliphora vicina* pupae (Insecta: Diptera). *J Biol Chem*, 1985. 260(9): p. 5370-5.
44. Sugita, M., et al., A novel fucosylated glycosphingolipid from the millipede, *Parafontaria laminata armigera*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. 1215(1-2): p. 163-9.
45. Sugita, M., et al., Characterization of two glucuronic acid-containing glycosphingolipids in larvae of the green-bottle fly, *Lucilia caesar*. *J Biol Chem*, 1989. 264(25): p. 15028-33.
46. Seppo, A., et al., Zwitterionic and acidic glycosphingolipids of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Eur J Biochem*, 2000. 267(12): p. 3549-58.
47. Ito, M., et al., Isolation and characterization of a novel uronic acid-containing acidic glycosphingolipid from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *J Lipid Res*, 2007. 48(1): p. 96-103.
48. Odintsova, N.A., et al., The fatty acid profile changes in marine invertebrate larval cells during cryopreservation. *Cryobiology*, 2009.
49. Okamura, N., et al., Lipid composition of the nervous system of earthworms (*Lumbricus terrestris*). *J Neurochem*, 1985. 45(6): p. 1875-9.
50. Zemski Berry, K.A. and R.C. Murphy, Electrospray ionization tandem mass spectrometry of glycerophosphoethanolamine plasmalogen phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2004. 15(10): p. 1499-508.
51. Camera, E., et al., Separation and characterisation of sphingoceramides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J Sep Sci*, 2004. 27(12): p. 971-6.
52. Han, X. and R.W. Gross, Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res*, 2003. 44(6): p. 1071-9.

53. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957. 226(1): p. 497-509.
54. Bligh, E.G. and W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 1959. 37(8): p. 911-7.
55. Schiller J, S.R., Arnhold J, Fuchs B, Lessig J, Müller M, Petković M, Spalteholz H, Zschörnig O, Arnold K., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog Lipid Res.* , 2004. 43(5): p. 449-88.
56. Radin, N.S., Extraction of tissue lipids with a solvent of low toxicity. *Methods Enzymol*, 1981. 72: p. 5-7.
57. Kaluzny, M.A., et al., Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J Lipid Res*, 1985. 26(1): p. 135-40.
58. Ruiz-Gutierrez, V. and M.C. Perez-Camino, Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds. *J Chromatogr A*, 2000. 885(1-2): p. 321-41.
59. Kyrklund, T., Two procedures to remove polar contaminants from a crude brain lipid extract by using prepacked reversed-phase columns. *Lipids*, 1987. 22(4): p. 274-7.
60. Touchstone, J.C., Thin-layer chromatographic procedures for lipid separation. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. 671(1-2): p. 169-95.
61. Singh, A.K. and Y. Jiang, Quantitative chromatographic analysis of inositol phospholipids and related compounds. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. 671(1-2): p. 255-80.
62. Sherma, Planar Chromatography in Clinical Chemistry. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 2000: p. 1583–1603.
63. Pulfer, M. and R.C. Murphy, Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass Spectrom Rev*, 2003. 22(5): p. 332-64.
64. Breton, L., et al., A new rapid method for phospholipid separation by high-performance liquid chromatography with light-scattering detection. *J Chromatogr*, 1989. 497: p. 243-9.
65. Bondia-Pons, I., A.I. Castellote, and M.C. Lopez-Sabater, Comparison of conventional and fast gas chromatography in human plasma fatty acid determination. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004. 809(2): p. 339-44.
66. Hoving, E.B., Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *J Chromatogr B Biomed Appl*, 1995. 671(1-2): p. 341-62.
67. Tserng, K.Y. and R. Griffin, Quantitation and molecular species determination of diacylglycerols, phosphatidylcholines, ceramides, and sphingomyelins with gas chromatography. *Anal Biochem*, 2003. 323(1): p. 84-93.

68. Lima, High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 2002. 465: p. 81-91.
69. Fillet, M., et al., Separation, identification and quantitation of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2002. 949(1-2): p. 225-33.
70. Gu, M., et al., Ceramide profiling of complex lipid mixtures by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal Biochem*, 1997. 244(2): p. 347-56.
71. Caprioli, R.M., T.B. Farmer, and J. Gile, Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem*, 1997. 69(23): p. 4751-60.
72. Van Vaeck L, A.A., Renaat Gijbels R, Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation. *Mass Spec Rev* 1999. 18: p. 1-81.
73. Storm HA., S.J., Joint US/Japan seminar on SIMS technique. *ARL probe news*, 1976.
74. Schuhmacher M, M.H., Comparative useful yield measurements under oxygen, cesium and gallium bombardment. 1992.
75. Andersen HH, B.H., Non linear effects in heavy-ion sputtering. *J. Appl. Phys.*, 1974. 45: p. 953.
76. HL, A.H.a.B., Heavy-ion sputtering yields of gold: further evidence of nonlinear effects. *J. Appl. Phys.*, 1975. 46(6): p. 2416.
77. Bolbach G, V.A., Galera R, Brunot A and Blais JC, Organic film thickness effect in secondary ion mass spectrometry and plasma desorption mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom Ion Processes*, 1992. 112 (1): p. 93.
78. Weibel, D., et al., A C60 primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics. *Anal Chem*, 2003. 75(7): p. 1754-64.
79. Benguerba M, B., A, Della-Negra, S, Depauw, J, Joret, H, Le Beyec, Y, Blain, M G, Schweikert, E A, Assayag, G B, Sudraud, P, Impact of Slow Gold Clusters on Various Solids: Nonlinear Effects in Secondary Ion Emission. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B* 1991. B62.(1): p. 8-22.
80. Touboul, D., et al., Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. 16(10): p. 1608-18.

81. Brunelle, A., D. Touboul, and O. Laprevote, Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *J Mass Spectrom*, 2005. 40(8): p. 985-99.
82. Tempez, A., et al., Orthogonal time-of-flight secondary ion mass spectrometric analysis of peptides using large gold clusters as primary ions. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004. 18(4): p. 371-6.
83. Novikov, A., et al., The Au(n) cluster probe in secondary ion mass spectrometry: influence of the projectile size and energy on the desorption/ionization rate from biomolecular solids. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. 19(13): p. 1851-7.
84. Touboul, D., et al., Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal Chem*, 2004. 76(6): p. 1550-9.
85. Sjovall, P., J. Lausmaa, and B. Johansson, Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Anal Chem*, 2004. 76(15): p. 4271-8.
86. Debois, D., et al., In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics*, 2008. 8(18): p. 3682-91.
87. Wu, K.J. and R.W. Odom, Characterizing synthetic polymers by MALDI MS. *Anal Chem*, 1998. 70(13): p. 456A-461A.
88. McDonnell, L.A., et al., Subcellular imaging mass spectrometry of brain tissue. *J Mass Spectrom*, 2005. 40(2): p. 160-8.
89. Schwartz, S.A., M.L. Reyzer, and R.M. Caprioli, Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom*, 2003. 38(7): p. 699-708.
90. Altelaar, A.F., et al., Direct molecular imaging of *Lymnaea stagnalis* nervous tissue at subcellular spatial resolution by mass spectrometry. *Anal Chem*, 2005. 77(3): p. 735-41.
91. Altelaar, A.F., et al., Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 2006. 78(3): p. 734-42.
92. Delcorte, A., N. Medard, and P. Bertrand, Organic secondary ion mass spectrometry: sensitivity enhancement by gold deposition. *Anal Chem*, 2002. 74(19): p. 4955-68.
93. Nygren, H., B.R. Johansson, and P. Malmberg, Bioimaging TOF-SIMS of tissues by gold ion bombardment of a silver-coated thin section. *Microsc Res Tech*, 2004. 65(6): p. 282-6.
94. McDonnell, L.A., et al., Higher sensitivity secondary ion mass spectrometry of biological molecules for high resolution, chemically specific imaging. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2006. 17(9): p. 1195-202.

95. Ostrowski, S.G., et al., Secondary ion MS imaging of lipids in picoliter vials with a buckminsterfullerene ion source. *Anal Chem*, 2005. 77(19): p. 6190-6.
96. Touboul, D., A. Brunelle, and O. Laprevote, Structural analysis of secondary ions by post-source decay in time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006. 20(4): p. 703-9.
97. Seydel, U. and B. Lindner, Monitoring of bacterial drug response by mass spectrometry of single cells. *Biomed Environ Mass Spectrom*, 1988. 16(1-12): p. 457-9.
98. Good, P.F., et al., Selective accumulation of aluminum and iron in the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease: a laser microprobe (LAMMA) study. *Ann Neurol*, 1992. 31(3): p. 286-92.
99. Karas, M. and F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988. 60(20): p. 2299-301.
100. Hillenkamp, F., et al., Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*, 1991. 63(24): p. 1193A-1203A.
101. Lemaire, R., et al., Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem*, 2006. 78(3): p. 809-19.
102. Mank, M., B. Stahl, and G. Boehm, 2,5-Dihydroxybenzoic acid butylamine and other ionic liquid matrixes for enhanced MALDI-MS analysis of biomolecules. *Anal Chem*, 2004. 76(10): p. 2938-50.
103. Astigarraga, E., et al., Profiling and imaging of lipids on brain and liver tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using 2-mercaptobenzothiazole as a matrix. *Anal Chem*, 2008. 80(23): p. 9105-14.
104. Han, X. and R.W. Gross, Shotgun lipidomics: electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples. *Mass Spectrom Rev*, 2005. 24(3): p. 367-412.
105. Redeker, V., et al., Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells. *Anal Chem*, 1998. 70(9): p. 1805-11.
106. Cooks, R.G., et al., Detection Technologies. Ambient mass spectrometry. *Science*, 2006. 311(5767): p. 1566-70.
107. Cha, S. and E.S. Yeung, Colloidal graphite-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and MSⁿ of small molecules. 1. Imaging of cerebroside directly from rat brain tissue. *Anal Chem*, 2007. 79(6): p. 2373-85.

108. Reyderman, L. and S. Stavchansky, Novel methods of microparticulate production: application to drug delivery. *Pharm Dev Technol*, 1996. 1(3): p. 223-9.
109. Puolitaival, S.M., et al., Solvent-free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2008. 19(6): p. 882-6.
110. Li, K.W., et al., Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of *Lymnaea*: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994. 25(3-4): p. 355-8.
111. Li, L., et al., In situ sequencing of peptides from biological tissues and single cells using MALDI-PSD/CID analysis. *Anal Chem*, 1999. 71(24): p. 5451-8.
112. Stoeckli, M., T.B. Farmer, and R.M. Caprioli, Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999. 10(1): p. 67-71.
113. Guillot S., S.M., Chaurand P., Caprioli R.M, Proceeding of the 49th American Society for Mass Spectrometry and Allied Topics Conference,, 2001.
114. Chaurand, P., M. Stoeckli, and R.M. Caprioli, Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem*, 1999. 71(23): p. 5263-70.
115. Jespersen, S., et al., Direct sequencing of neuropeptides in biological tissue by MALDI-PSD mass spectrometry. *Anal Chem*, 1999. 71(3): p. 660-6.
116. Chaurand, P., et al., Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem*, 2004. 76(4): p. 1145-55.
117. Xu, B.J., et al., Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002. 13(11): p. 1292-7.
118. Rohner, T.C., D. Staab, and M. Stoeckli, MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev*, 2005. 126(1): p. 177-85.
119. Luxembourg, S.L., et al., High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface. *Anal Chem*, 2004. 76(18): p. 5339-44.
120. Luxembourg, S.L., et al., Infrared mass spectrometric imaging below the diffraction limit. *J Proteome Res*, 2005. 4(3): p. 671-3.
121. Fenn, J.B., et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989. 246(4926): p. 64-71.
122. Salzet, M., Leech thrombin inhibitors. *Curr Pharm Des*, 2002. 8(7): p. 493-503.

123. Salzet, Invertebrate Neuropeptides and Hormones: Basic Knowledge and Recent Advances Molecular aspect of Annelid neuroendocrine system, 2006.
124. Salzet M, M.E., Annelids in Modern Biology-Regeneration, and immune responses of the leech Nervous system. Wiley-Blackwell, 2009: p. 156-184.
125. Orchard, I. and R.A. Webb, The projections of neurosecretory cells in the brain of the North-American medicinal leech, *Macrobdella decora*, using intracellular injection of horseradish peroxidase. *J Neurobiol*, 1980. 11(3): p. 229-42.
126. Leweke, F.M., et al., Elevated endogenous cannabinoids in schizophrenia. *Neuroreport*, 1999. 10(8): p. 1665-9.
127. Gaoni, Y. and R. Mechoulam, The isolation and structure of delta-1-tetrahydrocannabinol and other neutral cannabinoids from hashish. *J Am Chem Soc*, 1971. 93(1): p. 217-24.
128. Mechoulam, R., E. Fride, and V. Di Marzo, Endocannabinoids. *Eur J Pharmacol*, 1998. 359(1): p. 1-18.
129. Cocchetto, D.M., L.F. Cook, and A.E. Cato, A critical review of the safety and antiemetic efficacy of delta-9-tetrahydrocannabinol. *Drug Intell Clin Pharm*, 1981. 15(11): p. 867-75.
130. Beal JE, O.R., Laubenstein L, Morales JO, Bellman P, Yangco B, Lefkowitz L, Plasse TF, Shepard KV, Dronabinol as a treatment for anorexia associated with weight loss in patients with AIDS. *J Pain Symptom Manage*, 1995. 10(2): p. 89-97.
131. Cunha, J.M., et al., Chronic administration of cannabidiol to healthy volunteers and epileptic patients. *Pharmacology*, 1980. 21(3): p. 175-85.
132. Merritt, J.C., et al., Effect of marijuana on intraocular and blood pressure in glaucoma. *Ophthalmology*, 1980. 87(3): p. 222-8.
133. Gessa, G.L., et al., Inhibition of hippocampal acetylcholine release by cannabinoids: reversal by SR 141716A. *Eur J Pharmacol*, 1997. 327(1): p. R1-2.
134. Shen, M., et al., Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *J Neurosci*, 1996. 16(14): p. 4322-34.
135. Schlicker, E., et al., Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1997. 356(5): p. 583-9.
136. Ishac, E.J., et al., Inhibition of exocytotic noradrenaline release by presynaptic cannabinoid CB1 receptors on peripheral sympathetic nerves. *Br J Pharmacol*, 1996. 118(8): p. 2023-8.

137. Consroe, P., Brain cannabinoid systems as targets for the therapy of neurological disorders. *Neurobiol Dis*, 1998. 5(6 Pt B): p. 534-51.
138. Parolaro, D., Presence and functional regulation of cannabinoid receptors in immune cells. *Life Sci*, 1999. 65(6-7): p. 637-44.
139. Dewey, W.L., Cannabinoid pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1986. 38(2): p. 151-78.
140. Mechoulam, R., et al., Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*, 1995. 50(1): p. 83-90.
141. Howlett, A.C. and R.M. Fleming, Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol*, 1984. 26(3): p. 532-8.
142. Matsuda, L.A., et al., Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, 1990. 346(6284): p. 561-4.
143. Haller, J., et al., The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci*, 2002. 16(7): p. 1395-8.
144. Rinaldi-Carmona, M., et al., Characterization of two cloned human CB1 cannabinoid receptor isoforms. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996. 278(2): p. 871-8.
145. Xiao, J.C., et al., Similar in vitro pharmacology of human cannabinoid CB1 receptor variants expressed in CHO cells. *Brain Res*, 2008. 1238: p. 36-43.
146. Gerard, C.M., et al., Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem J*, 1991. 279 (Pt 1): p. 129-34.
147. Henry, D.J. and C. Chavkin, Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett*, 1995. 186(2-3): p. 91-4.
148. Matsuda, L.A., T.I. Bonner, and S.J. Lolait, Localization of cannabinoid receptor mRNA in rat brain. *J Comp Neurol*, 1993. 327(4): p. 535-50.
149. Magistretti, P.J. and L. Pellerin, [Functional brain imaging: role metabolic coupling between astrocytes and neurons]. *Rev Med Suisse Romande*, 2000. 120(9): p. 739-42.
150. Costa, B. and M. Colleoni, Changes in rat brain energetic metabolism after exposure to anandamide or Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Eur J Pharmacol*, 2000. 395(1): p. 1-7.
151. Rivest, S., Cannabinoids in microglia: a new trick for immune surveillance and neuroprotection. *Neuron*, 2006. 49(1): p. 4-8.

152. Romero-Sandoval, A. and J.C. Eisenach, Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology*, 2007. 106(4): p. 787-94.
153. Nunez, E., et al., Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse*, 2004. 53(4): p. 208-13.
154. Di Marzo, V., et al., Metabolism of anandamide and 2-arachidonoylglycerol: an historical overview and some recent developments. *Lipids*, 1999. 34 Suppl: p. S319-25.
155. Cadas, H., S. Schinelli, and D. Piomelli, Membrane localization of N-acylphosphatidylethanolamine in central neurons: studies with exogenous phospholipases. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1996. 14(1-3): p. 63-70.
156. Cadas, H., et al., Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci*, 1996. 16(12): p. 3934-42.
157. Katayama, K., et al., Equilibrium in the hydrolysis and synthesis of cannabimimetic anandamide demonstrated by a purified enzyme. *Biochim Biophys Acta*, 1999. 1440(2-3): p. 205-14.
158. Di Marzo, V., et al., Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur J Biochem*, 1999. 264(1): p. 258-67.
159. Sugiura, T., et al., 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995. 215(1): p. 89-97.
160. Stella, N., P. Schweitzer, and D. Piomelli, A second endogenous cannabinoid that modulates long-term potentiation. *Nature*, 1997. 388(6644): p. 773-8.
161. Maccarrone, M., et al., Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem*, 1998. 273(48): p. 32332-9.
162. Day, T.A., et al., Role of fatty acid amide hydrolase in the transport of the endogenous cannabinoid anandamide. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(6): p. 1369-75.
163. Schmid, P.C., et al., Metabolism of N-acylethanolamine phospholipids by a mammalian phosphodiesterase of the phospholipase D type. *J Biol Chem*, 1983. 258(15): p. 9302-6.
164. Deutsch, D.G. and S.A. Chin, Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol*, 1993. 46(5): p. 791-6.
165. Maurelli, S., et al., Two novel classes of neuroactive fatty acid amides are substrates for mouse neuroblastoma 'anandamide amidohydrolase'. *FEBS Lett*, 1995. 377(1): p. 82-6.

166. Hillard, C.J., et al., Characterization of the kinetics and distribution of N-arachidonylethanolamine (anandamide) hydrolysis by rat brain. *Biochim Biophys Acta*, 1995. 1257(3): p. 249-56.
167. Cravatt, B.F., et al., Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature*, 1996. 384(6604): p. 83-7.
168. Yu, M., D. Ives, and C.S. Ramesha, Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 1997. 272(34): p. 21181-6.
169. Acosta-Urquidi, J. and R. Chase, The effects of delta9-tetrahydrocannabinol on action potentials in the mollusc *Aplysia*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1975. 53(5): p. 793-8.
170. Schuel, H., et al., Cannabinoids reduce fertility of sea urchin sperm. *Biochem Cell Biol*, 1987. 65(2): p. 130-6.
171. Schuel, H., et al., Reduction of the fertilizing capacity of sea urchin sperm by cannabinoids derived from marihuana. I. Inhibition of the acrosome reaction induced by egg jelly. *Mol Reprod Dev*, 1991. 29(1): p. 51-9.
172. Schuel, H., et al., Anandamide (arachidonylethanolamide), a brain cannabinoid receptor agonist, reduces sperm fertilizing capacity in sea urchins by inhibiting the acrosome reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(16): p. 7678-82.
173. Chang, M.C., et al., Evidence for a cannabinoid receptor in sea urchin sperm and its role in blockade of the acrosome reaction. *Mol Reprod Dev*, 1993. 36(4): p. 507-16.
174. Bisogno, T., et al., Occurrence and metabolism of anandamide and related acyl-ethanolamides in ovaries of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Biochim Biophys Acta*, 1997. 1345(3): p. 338-48.
175. Sepe, N., et al., Bioactive long chain N-acylethanolamines in five species of edible bivalve molluscs. Possible implications for mollusc physiology and sea food industry. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1389(2): p. 101-11.
176. Kempe, K., et al., Isotope dilution mass spectrometric measurements indicate that arachidonylethanolamide, the proposed endogenous ligand of the cannabinoid receptor, accumulates in rat brain tissue post mortem but is contained at low levels in or is absent from fresh tissue. *J Biol Chem*, 1996. 271(29): p. 17287-95.
177. De Petrocellis, L., et al., Finding of the endocannabinoid signalling system in *Hydra*, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience*, 1999. 92(1): p. 377-87.

178. Lomis, T.J., et al., First place winner of the Conrad Jobst Award in the gold medal paper competition. Nitric oxide synthase inhibitors N-monomethylarginine and aminoguanidine prevent the progressive and severe hypotension associated with a rat model of pancreatitis. *Am Surg*, 1995. 61(1): p. 7-10.
179. Pierobon, P., et al., Biochemical and functional identification of GABA receptors in *Hydra vulgaris*. *Life Sci*, 1995. 56(18): p. 1485-97.
180. Stefano, G.B., Y. Liu, and M.S. Goligorsky, Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem*, 1996. 271(32): p. 19238-42.
181. Elphick, M.R., Y. Satou, and N. Satoh, The invertebrate ancestry of endocannabinoid signalling: an orthologue of vertebrate cannabinoid receptors in the urochordate *Ciona intestinalis*. *Gene*, 2003. 302(1-2): p. 95-101.
182. Matias, I., J.M. McPartland, and V. Di Marzo, Occurrence and possible biological role of the endocannabinoid system in the sea squirt *Ciona intestinalis*. *J Neurochem*, 2005. 93(5): p. 1141-56.
183. Schmidt, H.H. and F. Murad, Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. 181(3): p. 1372-7.
184. Yui, Y., et al., Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J Biol Chem*, 1991. 266(19): p. 12544-7.
185. Forstermann, U., et al., Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, 1991. 42(10): p. 1849-57.
186. Bredt, D.S. and S.H. Snyder, Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem*, 1994. 63: p. 175-95.
187. Kwon, N.S., et al., L-citrulline production from L-arginine by macrophage nitric oxide synthase. The ureido oxygen derives from dioxygen. *J Biol Chem*, 1990. 265(23): p. 13442-5.
188. Leone, A.M., et al., Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem*, 1991. 266(35): p. 23790-5.
189. Stuehr, D.J., et al., N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem*, 1991. 266(10): p. 6259-63.
190. Marletta, M.A., Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem*, 1993. 268(17): p. 12231-4.
191. Mayer, B., et al., Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett*, 1991. 288(1-2): p. 187-91.

192. Lyons, C.R., G.J. Orloff, and J.M. Cunningham, Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem*, 1992. 267(9): p. 6370-4.
193. Geller, D.A., et al., Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. 90(2): p. 522-6.
194. Ignarro, L.J., Haem-dependent activation of cytosolic guanylate cyclase by nitric oxide: a widespread signal transduction mechanism. *Biochem Soc Trans*, 1992. 20(2): p. 465-9.
195. Pou, S., et al., Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1992. 267(34): p. 24173-6.
196. Knauf, C., et al., Variation of endothelial nitric oxide synthase synthesis in the median eminence during the rat estrous cycle: an additional argument for the implication of vascular blood vessel in the control of GnRH release. *Endocrinology*, 2001. 142(10): p. 4288-94.
197. McDonald, D.S., et al., Regenerative arrest of inflamed peripheral nerves: role of nitric oxide. *Neuroreport*, 2007. 18(16): p. 1635-40.
198. Duncan, A.J. and S.J. Heales, Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*, 2005. 26(1-2): p. 67-96.
199. Lipton, S.A., Redox sensitivity of NMDA receptors. *Methods Mol Biol*, 1999. 128: p. 121-30.
200. Meyer, W., NADPH diaphorase (nitric oxide synthase) in the central nervous system of spiders (Arachnida: Araneida). *Neurosci Lett*, 1994. 165(1-2): p. 105-8.
201. Green, I.C., et al., Effects of cytokines and nitric oxide donors on insulin secretion, cyclic GMP and DNA damage: relation to nitric oxide production. *Biochem Soc Trans*, 1994. 22(1): p. 30-7.
202. Elofsson, R., et al., Is nitric oxide (NO) produced by invertebrate neurones? *Neuroreport*, 1993. 4(3): p. 279-82.
203. Franchini, A., A. Conte, and E. Ottaviani, Nitric oxide: an ancestral immunocyte effector molecule. *Adv Neuroimmunol*, 1995. 5(4): p. 463-78.
204. Cheng, C.W., P.Y. Lin, and M.D. Chen, Zinc and nitric oxide synthase inhibitor L-NAME attenuate NPY-induced feeding in mice. *Biol Trace Elem Res*, 2000. 75(1-3): p. 21-7.
205. Leake, L.D. and L.L. Moroz, Putative nitric oxide synthase (NOS)-containing cells in the central nervous system of the leech, *Hirudo medicinalis*: NADPH-diaphorase histochemistry. *Brain Res*, 1996. 723(1-2): p. 115-24.

206. Bernhardt, R.V. and J.G. Nicholls, Transformation of leech microglial cell morphology and properties following co-culture with injured central nervous system tissue. *J Exp Biol*, 1999. 202 (Pt 6): p. 723-8.

MALDI Imaging Mass Spectrometry

STATE OF THE ART TECHNOLOGY IN CLINICAL PROTEOMICS*

Julien Franck‡§, Karim Arafah‡§, Mohamed Elayed‡, David Bonnel‡, Daniele Vergara‡, Amélie Jacquet‡, Denis Vinatier¶, Maxence Wisztorski‡, Robert Day||, Isabelle Fournier‡**, and Michel Salzet‡ ††

A decade after its inception, MALDI imaging mass spectrometry has become a unique technique in the proteomics arsenal for biomarker hunting in a variety of diseases. At this stage of development, it is important to ask whether we can consider this technique to be sufficiently developed for routine use in a clinical setting or an indispensable technology used in translational research. In this report, we consider the contributions of MALDI imaging mass spectrometry and profiling technologies to clinical studies. In addition, we outline new directions that are required to align these technologies with the objectives of clinical proteomics, including: 1) diagnosis based on profile signatures that complement histopathology, 2) early detection of disease, 3) selection of therapeutic combinations based on the individual patient's entire disease-specific protein network, 4) real time assessment of therapeutic efficacy and toxicity, 5) rational redirection of therapy based on changes in the diseased protein network that are associated with drug resistance, and 6) combinatorial therapy in which the signaling pathway itself is viewed as the target rather than any single "node" in the pathway. *Molecular & Cellular Proteomics* 8:2023–2033, 2009.

MS has become a versatile tool that we are familiar with in large part due to important electronic and informatics advancements. The ability to obtain the molecular weight is one of the first steps in the identification of a molecule. With the addition of primary structural information mass spectrometry has become a useful technique to identify molecules within complex mixtures.

Biological specimens, such as tissues, urine, or plasma, are complex and highly heterogeneous, which makes them inherently difficult to analyze. Further research and developments are necessary to achieve reliable biological models for understanding and studying pathologies. Therefore, it is of primary

importance to identify the constituents of these systems and subsequently understand how they function within the framework of the tissue. With regard to clinical proteomics, there is the added dimension of disease, and therefore, the main goal is to characterize the cellular circuitry with a focus on the impact of the disease and/or therapy on these cellular networks.

Mass spectrometry has become a centerpiece technology predominantly in the field of proteomics. Nonetheless a more comprehensive understanding of the constituents of biological systems will be aided by determining the constituent distribution. This anatomical dimension has been added through mass spectrometry imaging (MSI)¹ especially using MALDI-MSI.

MALDI is an ion source that is well compatible with the introduction of raw materials and surfaces. Shortly after its introduction, MALDI was used for direct tissue profiling. The first applications were neurobiological studies on dissected organs from the mollusk *Lymnaea stagnalis* (1–8), crustaceans (9), and other mollusks (10, 11). More recently, MALDI was used to generate profiles from tissue sections and ion images using a scanning method to analyze the surface (12) (Fig. 1). This led to the first MALDI MS tissue section imaging micrographs in 1997 (13–15). These studies were followed by 10 years of intense efforts to improve the sensitivity, reproducibility, data processing, tissue preservation, and preparation treatments to fully characterize the proteome leading to a clear improvement of molecular images (16–39) (Fig. 2).

These developments led to clinical studies using MALDI-MSI technology. Clinical proteomics has many objectives including 1) diagnosis based on signatures as a complement to histopathology, 2) early disease detection, 3) individualized selection of therapeutic combinations that best target the patient's entire disease-specific protein network, 4) real time assessment of therapeutic efficacy and toxicity, 5) rational redirection of therapy based on changes in the diseased protein network that are associated with drug resistance, and 6) combinatorial therapy in which the signaling pathway itself is viewed as the target rather than any single "node" in the pathway.

From the ‡MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, IFR 147, CNR-FRE 2933, University of Lille1, 59655 Villeneuve d'Ascq, France, ¶Service de gynécologie, Hôpital Jeanne de Flandre, 59037 Lille, France, and ||Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Received, December 8, 2008, and in revised form, May 5, 2009
Published, MCP Papers in Press, May 18, 2009, DOI 10.1074/mcp.R800016-MCP200

¹ The abbreviations used are: MSI, mass spectrometry imaging; PCA, principal component analysis; XRT, x-ray therapy; EGFR, epidermal growth factor receptor; MRI, magnetic resonance imaging.

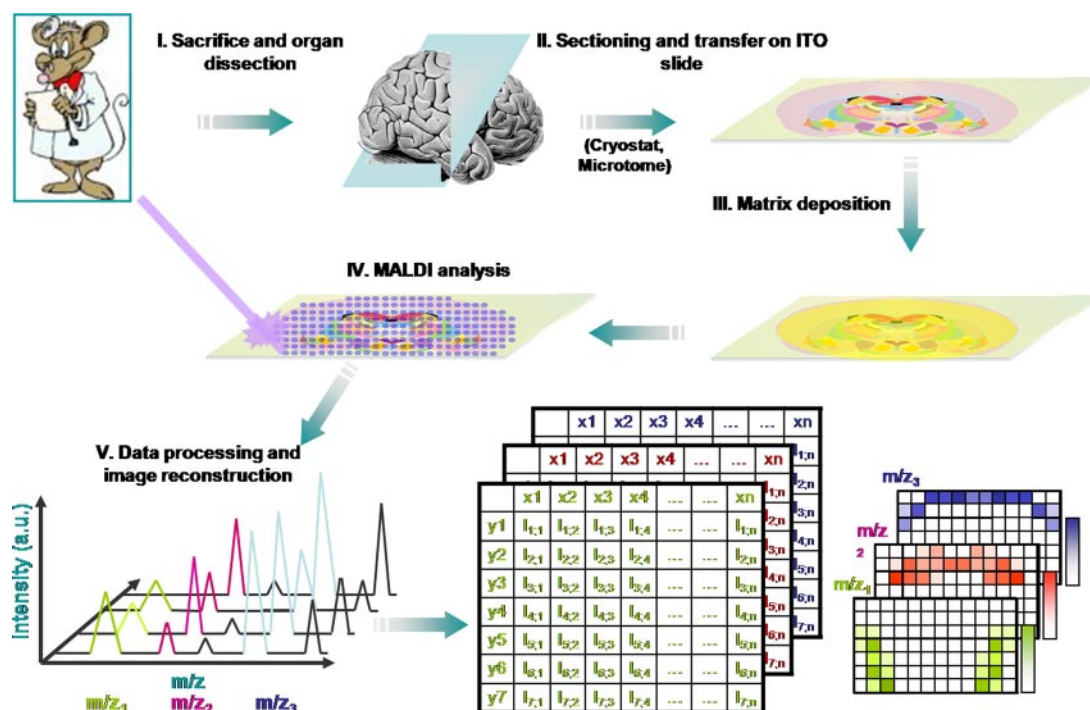


FIG. 1. **Schematic representation of the MALDI-MSI work flow.** After tissue sectioning and transfer onto a conductive and transparent sample plate, the MALDI matrix is deposited, and data are acquired by recording mass spectra according to a raster of points covering the surface to be analyzed. Mass spectra recorded with their coordinates on the tissue are processed, and molecular images of the localization of molecules can be reconstructed. *a.u.*, arbitrary units; *ITO*, idium tin oxide.

Based on these key objectives, can we consider MALDI-MSI a mature technology for use in clinical studies? What is the potential impact of this technology in anatomy/pathology and disease? By reviewing each objective, do we have sufficient evidence that MALDI-MSI satisfies the criteria imposed by clinical proteomics? We will now specifically address each of these key points.

DIAGNOSIS BASED ON SIGNATURES AS A COMPLEMENT TO HISTOPATHOLOGY

In some cases, diagnosis or tissue classification cannot be easily achieved through standard histological staining. Further refinements based on molecular signatures and statistical data, which are currently missing, are crucial for improved diagnostics. The development of rapid and reliable screening of human tissues for diagnostics (e.g. biopsies or smears) has been improved with modern proteomics. By using MALDI-MSI, a molecular diagnosis could be done on tissue directly in the environment of the tumors. MALDI-MSI could help to detect the tumor boundary or infiltration of adjacent normal tissue that presents a normal histology. It could also help to detect the early stage of pathology that presents no histological modifications and to prevent tumor recurrence at the site of surgical resection. One of the major advances of MSI is the correlation of the MALDI images with histological information. MALDI-MSI software (for a review, see Ref. 40) superimposes the MALDI images over a macroscopic or microscopic optical

image of the sample taken before MALDI measurement. Although the primary macroscopic optical image is sufficient to recognize the outline of the tissue and define the measurement area, it is not usually possible to observe histological features in the image (in contrast to microscopic images). For a histological interpretation, it is necessary to use stained tissue sections. Two approaches have been used to correlate histology with MALDI-MSI results: performing MALDI-MSI and histological staining on consecutive sections (41, 42) or staining the sample after MALDI measurement (43). The latter technique has been successfully used by pathologists (Fig. 3) (44), which suggests that combining MALDI-MSI and classic histological staining provides pathologists with more information to make better diagnoses. The next step is not only to perform a diagnosis based on *m/z* signatures but also on molecular data generated from identification of specific biomarkers that have been characterized as pathological signatures.

However, another challenge for pathologists is tissue classification, which is required to catalogue tumors or benign tissues. The major technological improvement that MALDI-MSI provides is the direct identification of novel markers within an *in situ* context from fixed sections/biopsy embedded in paraffin (e.g. archived material) (42). Several studies on cancer and neurodegenerative diseases have demonstrated that MALDI-MSI is a key technology for identifying biomark-

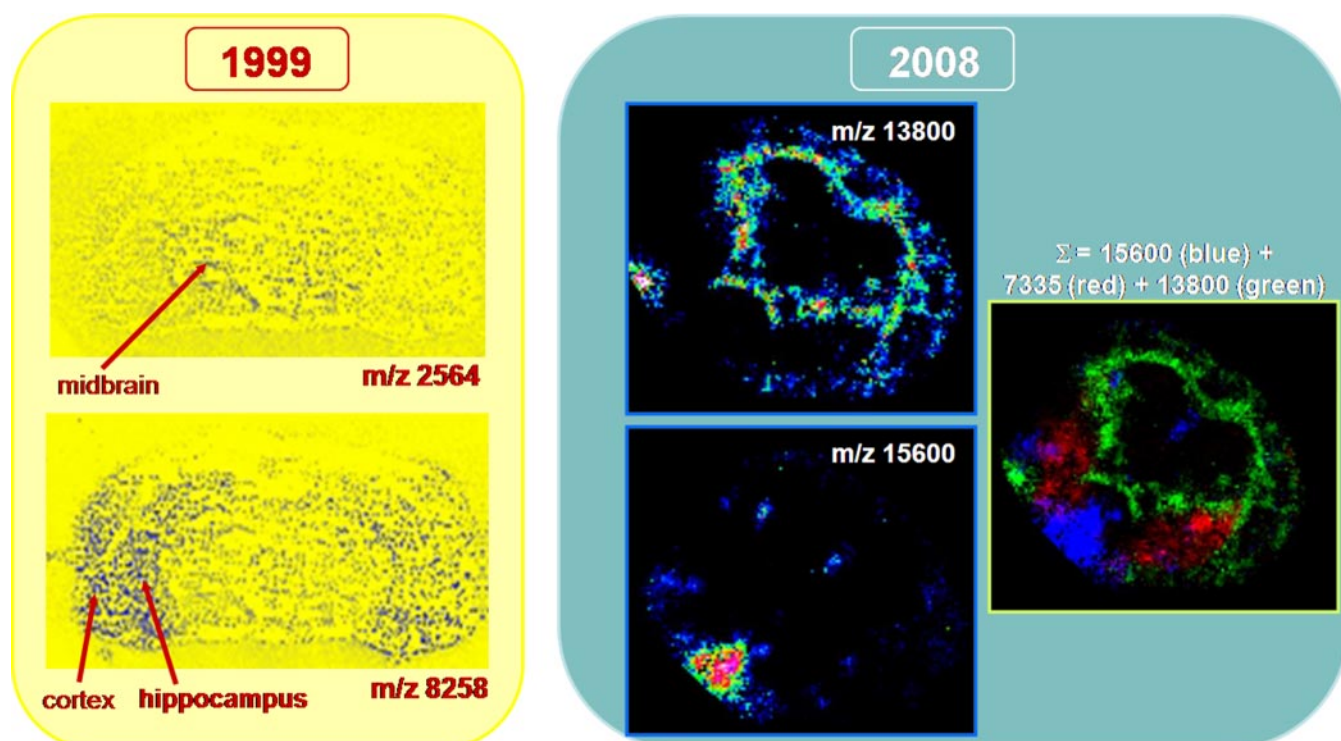


FIG. 2. Ten years' evolution from one of the first MALDI images presented in 1999 at the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (*left*) (reprinted with permission of Caprioli and co-workers (84)) and molecular images obtained by our group for mouse stem cells injected in brain tissue sections (*right*) (M. Wisztorski, C. Meriaux, M. Salzet, and I. Fournier, unpublished results).

ers, assessing their localization, and cross-validation (29, 45–51). The use of archived, formalin-fixed, paraffin-embedded tissue from hospital pathology departments represents a “gold mine” of existing data (42, 52–54). The application of MALDI MS imaging to archived materials could lead to the creation of an international disease marker database that would facilitate the development of early diagnostics for various pathologies as well as for follow-up examination of disease progression.

Therefore, the addition of statistical analysis will be very important for the comparison of the different tissue components (e.g. tumor *versus* benign or healthy). Each tissue type depends upon the nature of its composition of cells. Thus, biocomputational methods are absolutely necessary to identify individualized molecular patterns to aid in diagnosis and prognosis.

The advantage of MALDI-MSI is the ability to obtain a large collection of mass spectra spread out over a tissue section while retaining the absolute spatial location of these measurements for subsequent analysis and imaging. One of the statistical techniques to reduce the complexity of the information in multidimensional data sets in MALDI-MSI is principal component analysis (PCA) (55). PCA is a multivariate preanalysis tool that allows for the correlation and identification of the major spatial and mass-related trends in the data that guide further downstream analysis (56). PCA reduces the

dimensionality of the data set but does not classify the spectra. This is a transformation of the original coordinate system defined by peak intensities to a coordinate system that better explains the variance within the data set. This has been recently used in a prostate cancer study (43).

The next required step is the hierarchical clustering of the tissue based on PCA statistical analyses that reflect the most important variance of ions within the tissue (57). Dendrograms can be constructed, and each branch represents ions present in the same group of cells (e.g. epithelial cancer cells *versus* benign cells). Thus, this representation provides access to huge numbers of individual spectra and reduces the complexity of the data set. It can also be correlated with histology as previously used for mouse kidney (Fig. 4) (44), gastric (58), and ovarian cancer (Fig. 5).

EARLY DISEASE DETECTION

Based on MALDI MS profiling (Fig. 6a) and imaging strategies (Fig. 6, b and c), several biomarkers have been identified in various cancer studies. In stage III and IV ovarian cancer, a highly prevalent (80%) biomarker has been identified using MALDI MS and nano-LC-nano-ESI MS using MS and MS/MS after separation by reverse phase HPLC and trypsin enzymatic digestion. This marker with an *m/z* of 9744 corresponds to an 84-amino acid fragment from the 11 S proteasome activator complex (PA28 α or REG- α) (33). This biomarker was

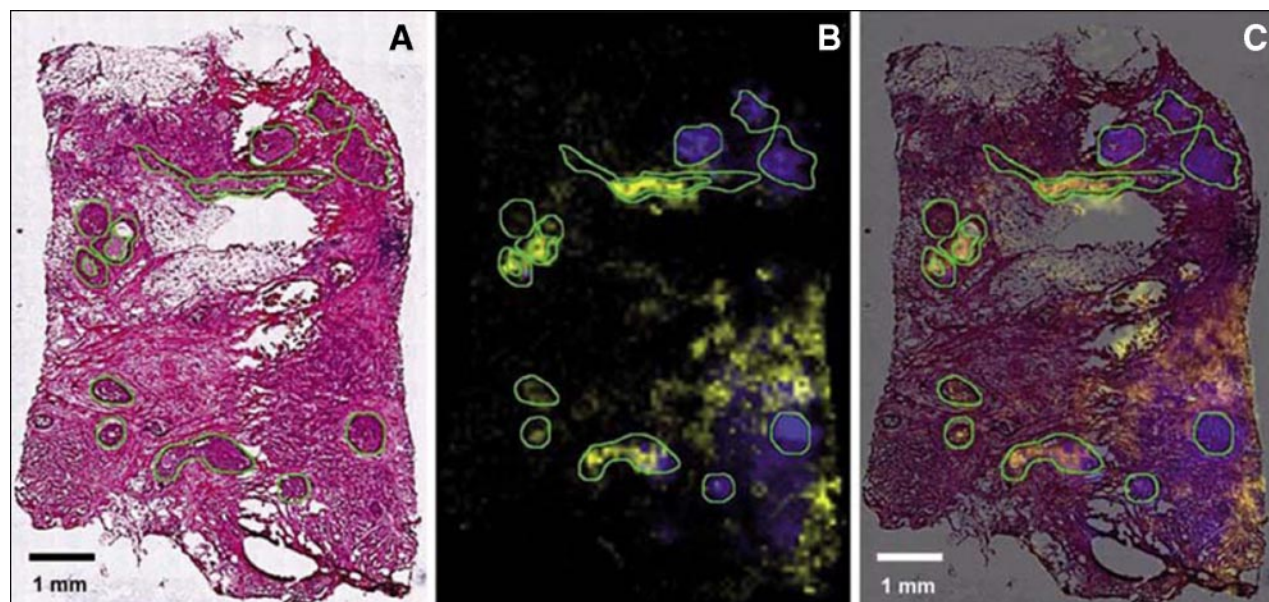
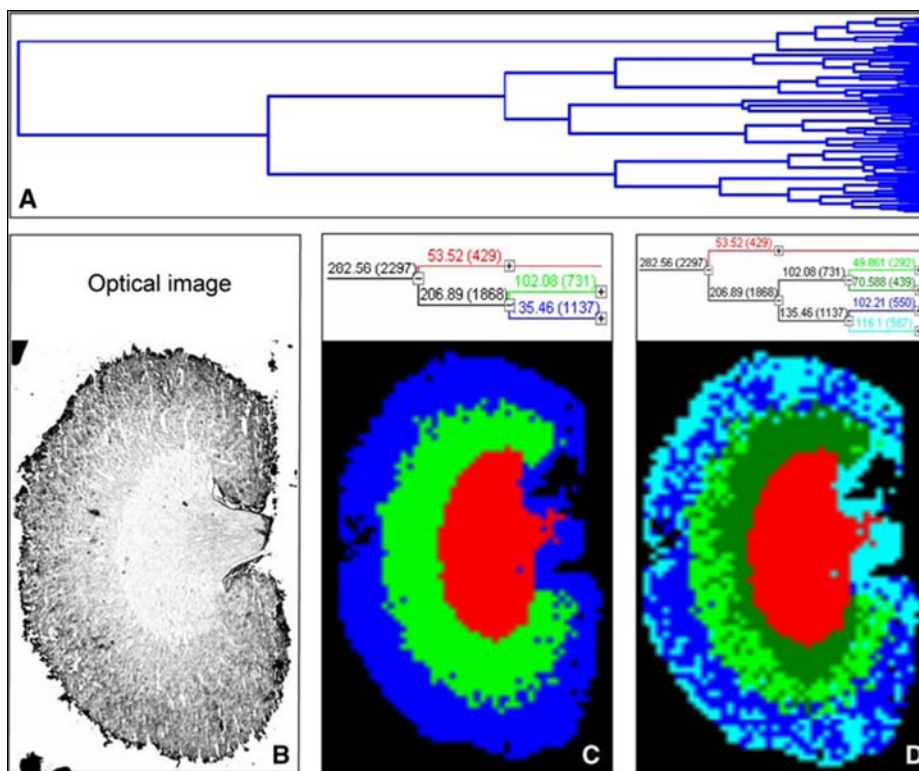


FIG. 3. Mass species representing molecular features of preinvasive and invasive lesions of the breast. *A*, optical microscopic image of hematoxylin- and eosin-stained tissue section showing several carcinomatous *in situ* regions (outlined in green). The staining was done after MALDI measurement of the tissue section. This allows an unambiguous correlation with MALDI imaging results. *B*, visualization of ion density images of two selected masses (m/z 9750 shown in yellow and m/z 4519 shown in blue). *C*, overlay of hematoxylin and eosin staining and MALDI molecular image. The distribution of these two masses suggests a divergent clonal evolution of the preinvasive lesions. These two masses are also present in the invasive cancer cells surrounding some carcinomas *in situ* (right site). Scanning resolution, 80 μm . Scale bar, 1 mm. (Reprinted with permission of Walch *et al.* (44).)

FIG. 4. Hierarchical clustering of a mouse kidney data set achieved by MALDI-MSI. *A*, full dendrogram of all spectra in a mouse kidney data set. *B*, optical image of the mouse kidney analyzed by MALDI-MSI. *C* and *D*, reconstruction of selected dendrogram branches and corresponding images. The three main branches reflect the renal cortex (blue), medulla (green), and pelvis (red). *C*, the medulla branch separates into two distinct areas, whereas the cortex branch further differentiates into fat and connective tissue of the renal capsule and hilus and the actual cortex (*D*). (Reprinted with permission of Walch *et al.* (44).)



validated using MALDI MSI (Fig. 6, *b* and *c*), classic immunohistochemistry with an antibody raised against the C-terminal part of the protein containing the fragment of interest (Fig. 6,

d, *e*, and *f*), specific MALDI-MSI using the Tag-mass concept (Fig. 6g) (59), quantitative PCR, and Western blot (Fig. 6h). Recently, we confirmed the REG- α expression in an ovarian

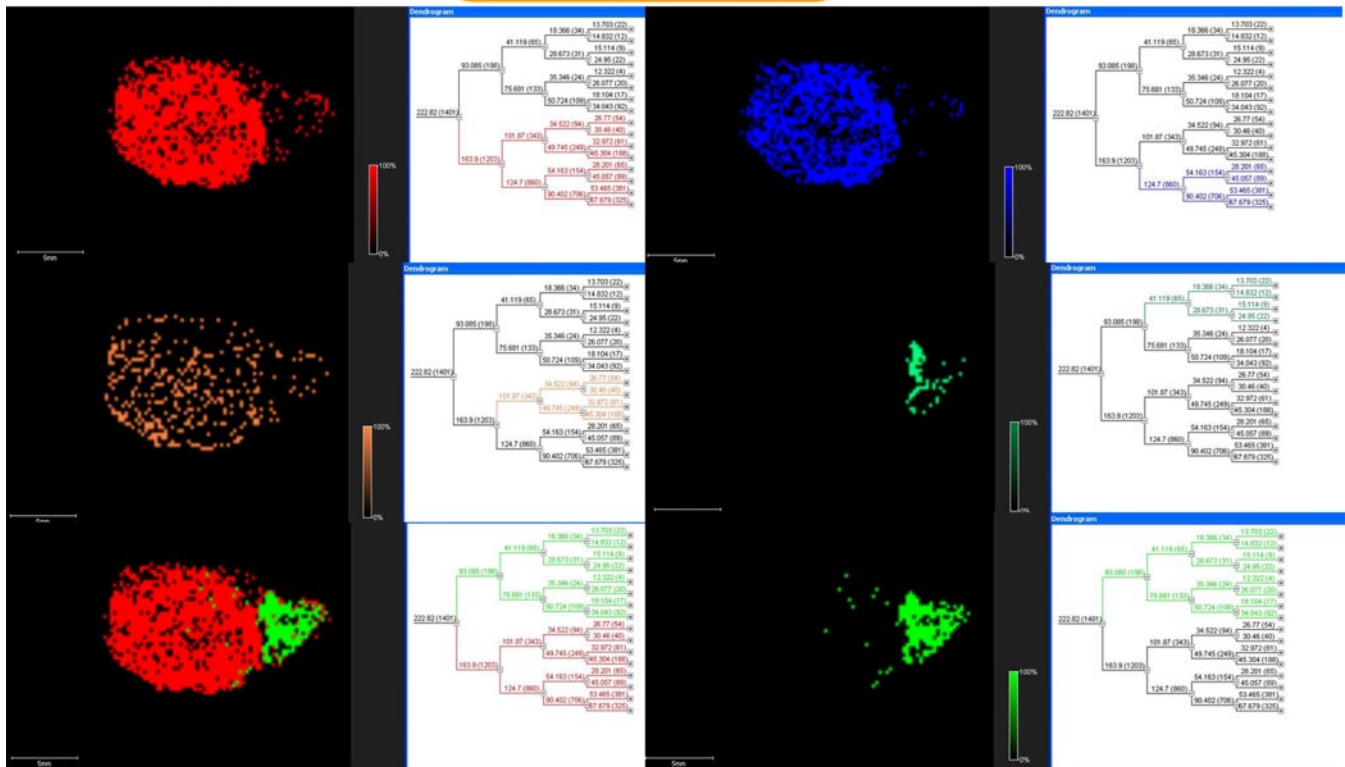
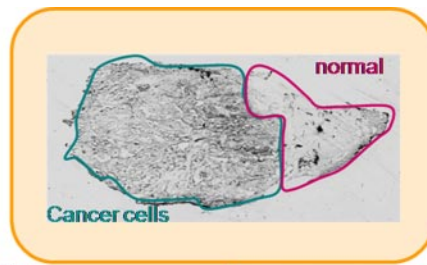


FIG. 5. Hierarchical clustering using the ClinProt tool (Bruker Daltonics) after PCA of a stage 4 mucous ovarian carcinoma section covered with ionic matrix using the Shimadzu CHIP 1000 microspotter. *a*, optical image of the ovarian carcinoma section. *b–f*, reconstructed selected dendrograms and corresponding images. The two main branches reflect the carcinoma (*red*; *a*) and the healthy (*green*; *f*) parts in the section. *b* and *c* are two carcinoma subclasses, and *d* is a subclass of the healthy part. *e* represents a merge of the two branches.

epithelial cell line by quantitative PCR.² Immunohistochemistry confirmed the epithelial expression of this fragment with a nuclear localization in benign epithelial cells and a cytoplasmic localization in carcinoma cells (Fig. 6, *d* and *e*). This localization pattern indicates that this antibody can be used to discriminate borderline tumor cases, which are the most difficult to diagnose. Thus, a specific antibody that discriminates between cells transitioning from benign to malignant will be an asset for early diagnosis. Taken together, these studies indicate that direct tissue analysis and specific MALDI-MSI strategies facilitate biomarker identification and validation.

In addition, data can be obtained from fundamental studies by analyzing the ontogeny of protein expression during mor-

phogenesis and tumorigenesis, and proteins that could potentially serve as biomarkers for diagnosing diseases can be identified as demonstrated by an MSI study on murine prostate cancer development (60). Murine prostate during development (1–5 weeks of age), at sexual maturation (6 weeks of age), and in adulthood (at 10, 15, or 40 weeks of age) was compared with prostate tumors from 15-week-old mice genetically engineered to express the large T antigen gene under the control of the prostate-specific probasin promoter (LPB-Tag mice). This approach identified proteins that were differentially expressed at specific time points during prostate development. The expression of probasin and spermine-binding protein, which are associated with prostate maturation, decreased during prostate tumor formation (60). This study was the first use of MALDI-MSI to follow ontogeny to tumorigenesis (60).

² M. El Ayel, D. Bonnel, I. Fournier, and M. Salzet, unpublished data.

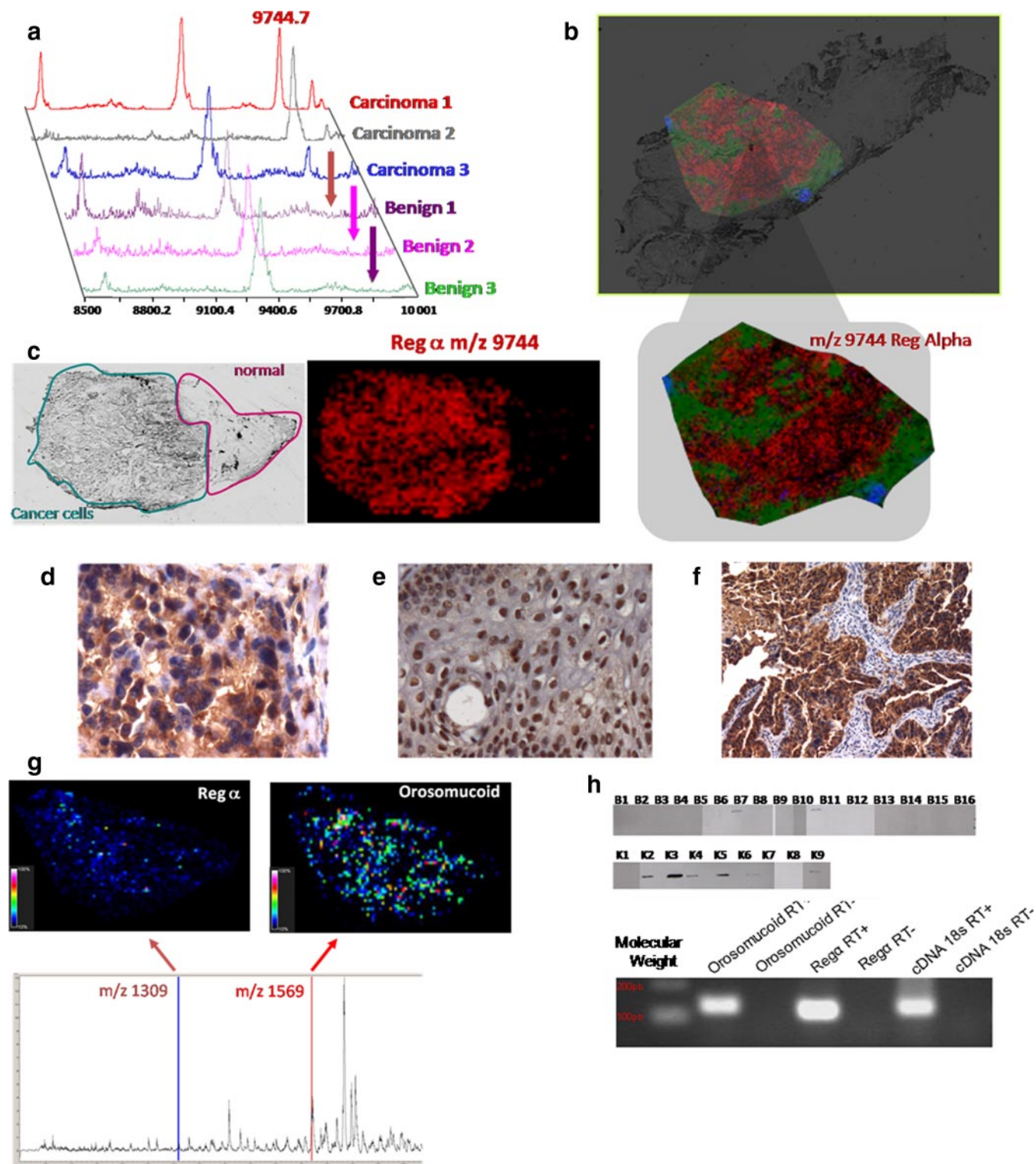


FIG. 6. Validation of C-terminal fragment of the immunoproteasome REG- α and orosomuroid as ovarian biomarkers. *a*, MALDI-MS profiles of three ovarian carcinomas versus benign tumor samples. *b*, MALDI-MSI molecular image of REG- α fragment (m/z 9744) at a resolution of $50\ \mu\text{m}$ from an ovarian carcinoma tissue section. *c*, optical image of the tissue section with the region of interest defined (cancerous versus healthy part) and MALDI-MSI of the REG- α fragment showing its presence exclusively in the cancer part. *d-f*, immunocytochemical data obtained after the antigen retrieval technique and H&E coloration with the anti-C-terminal REG- α antibody: *d*, cytoplasm localization of the anti-C-terminal REG- α labeling in ovary carcinoma; *e*, nucleus localization of the anti-C-terminal REG- α labeling in ovary benign tumor; *f*, epithelial cells labeled with the anti-C-terminal REG- α in ovarian carcinoma. *g*, specific MALDI imaging analysis using the

There is no doubt of the usefulness of MALDI-MSI in biomarker development for early diagnosis. However, MALDI-MSI is still not being routinely used in a clinical setting and has not yet been adjusted to conform to clinical proteomics procedures. Only a limited number of international groups have used this technology effectively in clinical settings; however, the number of clinical studies applying MSI has dramatically increased in the past 2 years (43, 44, 54, 61–66).

INDIVIDUALIZED SELECTION OF THERAPEUTIC COMBINATIONS THAT BEST TARGET THE PATIENT'S ENTIRE DISEASE-SPECIFIC PROTEIN NETWORK

MALDI-MSI is highly advantageous for *in situ* drug tracking. In fact, it enables the detection of both endogenous and exogenous compounds present in tissues with molecular specificity and preserves their spatial orientation. This unique combination coupled with excellent sensitivity and rapid analysis presents potential advantages for a wide range of applications in diverse biological fields. As described previously, recent advances have demonstrated that the technique can be applied to cancer research, neuroscience, and pharmaceutical development (67). MALDI-MSI can be used in clinical studies to provide a molecular *ex vivo* view of resected organs. This allows for the label-free tracking of both endogenous and exogenous compounds with spatial resolution and molecular specificity (67–77). Several examples support the idea that MALDI-MSI technology will become a key tool in drug development (67–73), including novel drug design through the ability to analyze metabolic pathways directly in tissues (*e.g.* through *in situ* multiplex metabolite analysis), as well as in the elucidation of secondary effects and unexpected feedback loops (78). Currently MSI of biomolecules and chemical compounds in cell-based assays and highly complex tissue sections is used in parallel with classic mass spectrometry ionization techniques to identify chemical compounds interfering with enzymatic function, receptor-ligand binding, or molecules modulating a protein-protein interaction.

There is evidence supporting MSI as a key technique that can be used in combination with other therapeutic technologies. Recently the efficacy of combining radiation (XRT) with a dual epidermal growth factor receptor (EGFR)/vascular endothelial growth factor receptor inhibitor, AEE788, in prostate cancer models with different levels of EGFR expression was analyzed using Doppler sonography, tumor blood vessel destruction (visualized by immunohistochemistry), and MSI (76). Tumor xenografts established from DU145 or PC-3 prostate cancer cell lines inoculated into the hind limbs of athymic nude mice were assigned to four treatment groups: 1) control,

2) AEE788, 3) XRT, and 4) AEE788 and XRT. AEE788 had a radiosensitization effect in human umbilical vein endothelial cells and increased their susceptibility to apoptosis. Therefore, concurrent AEE788/XRT treatment compared with either treatment alone led to a significant delay in tumor growth in animals bearing DU145 tumors. Conversely there was no effect on the growth of PC-3 tumors with combination therapy. In DU145 tumors, there was a significant decrease in tumor blood flow with combination therapy as assessed by using Doppler sonography and tumor blood vessel destruction. MSI demonstrated that AEE788 is bioavailable and heterogeneously distributed in DU145 tumors receiving therapy, supporting the efficacy of the combination of AEE788 and XRT *in vitro* and *in vivo* in DU145-based models. In contrast, in PC-3-based models, the tumors were adequately treated with XRT alone without any added benefit from combination therapy. These findings correlated with differences in EGFR expression. Overall this study demonstrated the effects of therapeutics on both tumor cell proliferation and vascular destruction using complementary technologies, including MALDI-MSI in a clinical proteomics protocol.

REAL TIME ASSESSMENT OF THERAPEUTIC EFFICACY AND TOXICITY

MSI technology will also help significantly advance the analysis of novel therapeutics and may provide deeper insight into therapeutic and toxicological processes, revealing the mechanism of efficacy or side effects at the molecular level (79). A study by Atkinson *et al.* (80) using AQ4N (baxoxatrone) (1,4-bis-5,8-dihydroxyanthracene-9,10-dione) as a prodrug demonstrated that MSI can be used for both drug and clinical development. In hypoxic cells, AQ4N is reduced to AQ4 (cytotoxic form), which is a topoisomerase II inhibitor. By inhibiting topoisomerase II within these hypoxic areas, AQ4N sensitizes tumors to existing chemo- and radiotherapy treatments. The distribution of AQ4N and AQ4 in treated H460 human tumor xenografts has been examined by MALDI-MSI, and images of the distribution of AQ4N and AQ4 show little overlap (80). The distribution of ATP in the tumor xenografts was studied as an endogenous marker of hypoxia because concentrations of ATP are known to decrease with hypoxia. The ATP distribution was similar to that of AQ4N, suggesting that in regions with abundant ATP expression (*i.e.* normoxic tissue) there was no evidence of conversion of AQ4N to AQ4. This indicates that the cytotoxic metabolite AQ4 is confined to hypoxic regions of the tumor (80).

Tag-mass concept with anti-C-terminal REG- α and an anti-human IgG tag (reporter m/z 1309) and anti-orosomuroid and anti-human monoclonal antibody (reporter m/z 1569). *h, top*, Western blot analyses with the anti-C-terminal REG- α (immunoproteasome 11 S) of the 16 benign tumors and nine carcinomas (33); *bottom*, quantitative PCR validation of REG- α and orosomuroid from the SKVO3 ovarian cancer epithelial cell line.

RATIONAL REDIRECTION OF THERAPY BASED ON CHANGES IN THE DISEASED PROTEIN NETWORK THAT ARE ASSOCIATED WITH DRUG RESISTANCE

There are no studies that have used MALDI-MSI to redirect therapy. However, this objective will be the next challenge for this research field.

COMBINATORIAL THERAPY IN WHICH THE SIGNALING PATHWAY ITSELF IS VIEWED AS THE TARGET RATHER THAN ANY SINGLE NODE IN THE PATHWAY

Similar to the fifth objective, there are no studies on combinatorial therapy that focus on a signaling pathway as a whole because of the infancy of this technology.

CONCLUSION

MALDI MSI emerged only 10 years ago, so it is still a young technology that is continuously evolving. Further developments are still needed to establish this technology in a clinical setting. For example, standardization of protocols must be undertaken between tissue collection, storage, preparation, and data acquisition. Moreover improvements in resolution will be sought because the minimum area that can be examined is currently in the range of a few cells. The actual resolution that can be routinely achieved while keeping good sensitivity (*i.e.* sufficient ion yields) is $50 \times 50 \mu\text{m}^2$. To achieve increased resolution it is necessary to reduce the surface area irradiated by the laser beam, which most obviously can be achieved by decreasing the laser beam diameter. However, under 30–40- μm laser beam diameter a decrease in ion production resulting in decreased sensitivity is observed. Thus, active research to decrease the size of the irradiated area without loss of sensitivity or attempts to better understand and optimize the ionization processes involved in MALDI are underway. From our own work, we have developed masks that achieve a resolution of $30 \times 30 \mu\text{m}$ without reducing the production of ions and result in an increased sensitivity of 2–3-fold (81). A new generation of masks at $10 \times 10 \mu\text{m}$ is now being developed. Nonetheless the present levels of sensitivity allow the detection of a small group of cells but are not sufficient to detect discrete modification at a single cell level. However, detection limits are the same as those obtained for the analysis of a complex mixture using classical MALDI-TOF procedures. Contrary to the predictions that the most abundant proteins are the only ones to be detected with MALDI, it has been observed that ionization efficiency is an important parameter and that a low abundance molecule that is well ionized can also be detected. The detection of low abundance proteins can also be improved with the development of statistical software allowing the treatment of large cohorts of patient with large data sets for biomarkers, tissue classification, and stage of disease development. Other limitations include the detectable mass range, which is typically between m/z 400 and 30,000. The lower limit is due to the use of matrix that masks the analysis below this m/z . The upper limitation is not understood, and various protocols are being tested to

overcome this limitation, such as new tissue treatments, new matrices, or development of new ion sources to generate multicharged ions. One difficulty that has been overcome is the direct identification of biomarkers on tissues. Bottom-up strategies using on-tissue trypsin digestion have been developed for frozen (31) and formalin-fixed, paraffin-embedded (42, 54) tissues. Ideally the ability to perform on-tissue top-down protein characterization is one of our future objectives. MALDI imaging will ultimately provide high resolution molecular imaging but will also result in direct biomarker identification with statistical validation such that it will become an essential proteomics tool in clinical histopathology.

Additional needed developments will be three-dimensional reconstruction to obtain tumor maps (82). MALDI-MSI will improve tissue classification necessary to perform retrospective studies, will assist clinical studies from the bench to bedside, and will provide a remarkable follow-up procedure. Improved tissue classification using MALDI-MSI on the same tissues used by pathologists for diagnosis will speed up the process of molecular diagnosis. Molecular tissue classification after MALDI-MSI based on known biomarkers or using unsupervised multivariable analyses can positively affect patient treatment. For example, borderline ovarian cancers are difficult to detect clinically until they are advanced in size or stage. The most common presenting symptoms are abdominal pain, increasing girth or abdominal distension, and abdominal mass. Approximately 23% of patients are asymptomatic. With such tumors, correct diagnosis is difficult to reach, and the molecular profiles provided by MALDI-MSI may facilitate classification and aid the development of a treatment strategy. Moreover depending on the nature of the malignancy (*e.g.* serous or mucous with or without cell infiltration), the therapeutic strategy is different. Should MALDI-MSI tumor classification libraries be created, these could permit clinicians to individually tailor patient treatments in a practical manner. Based on the tissue biomarkers identified by MSI, it could be important to follow up the evolution of the malignancy during treatment, for example after cisplatin treatment to define whether resistance to the treatment may appear. Furthermore in cases where traditional biomarkers cannot be clearly detected in biopsies, MALDI-MSI could become critical to the outcome. This points to the importance of establishing tumor MSI libraries to facilitate multicenter studies and the creation of MSI classification maps.

At this point, it is obvious that further clinical studies using MALDI-MSI technology are required. Nonetheless MALDI-MSI has opened the door to molecular tissue classification, which could be of great use to pathologists with regard to diagnosis but also in drug development and diagnosis coupled with magnetic resonance imaging (MRI) technology. A major advance for MALDI-MSI will be its coupling with positron emission tomography, x-ray, computed tomography instrumentation, and MRI for both preclinical and clinical research. The complementarities between non-invasive tech-

niques and molecular data obtained from MALDI MS imaging will result in a more precise diagnosis. In clinical studies, the need for information on the spatial localization of pathologically gene-encoded products has become more pressing. The three-dimensional volume reconstructions generated by MALDI-MSI data (83) now offer the possibility to compare the molecular data with data obtained using positron emission tomography or MRI. These associations will enhance the use of MALDI-MSI. Ultimately comparing the MRI image of a tumor and the image generated by MALDI-MSI at a molecular level will provide a comprehensive data set for diagnosis and treatment selection.

* This work was supported by grants from the CNRS Département de la politique industrielle (to M. S. and I. F.), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Institut National du Cancer (to I. F.), Agence National de la recherche (to I. F.), the Institut National du Cancer (to I. F.), and the Canadian Institutes of Health Research (to R. D. and M. S.).

§ Co-authors.

** To whom correspondence may be addressed. E-mail: isabelle.fournier@univ-lille1.fr.

‡‡ To whom correspondence may be addressed. E-mail: michel.salzet@univ-lille1.fr.

REFERENCES

- van Veelen, P. A., Jiménez, C. R., Li, K. W., Wildering, W. C., Geraerts, W. P., Tjaden, U. R., and van der Greef, J. (1993) Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1542–1546
- Jiménez, C. R., van Veelen, P. A., Li, K. W., Wildering, W. C., Geraerts, W. P., Tjaden, U. R., and van der Greef, J. (1994) Neuropeptide expression and processing as revealed by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of single neurons. *J. Neurochem.* **62**, 404–407
- Li, K. W., Hoek, R. M., Smith, F., Jiménez, C. R., van der Schors, R. C., van Veelen, P. A., Chen, S., van der Greef, J., Parish, D. C., and Benjamin, P. R. (1994) Direct peptide profiling by mass spectrometry of single identified neurons reveals complex neuropeptide-processing pattern. *J. Biol. Chem.* **269**, 30288–30292
- Li, K. W., Jiménez, C. R., Van Veelen, P. A., and Geraerts, W. P. (1994) Processing and targeting of a molluscan egg-laying peptide prohormone as revealed by mass spectrometric peptide fingerprinting and peptide sequencing. *Endocrinology* **134**, 1812–1819
- Li, K. W., van Golen, F. A., van Minnen, J., van Veelen, P. A., van der Greef, J., and Geraerts, W. P. (1994) Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of Lymnaea: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **25**, 355–358
- Dreisewerd, K., Kingston, R., Geraerts, W. P., and Li, K. W. (1997) Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in Lymnaea stagnalis. *Int. J. Mass Spectrom.* **169**, 291–299
- Jiménez, C. R., and Burlingame, A. L. (1998) Ultramicroanalysis of peptide profiles in biological samples using MALDI mass spectrometry. *Exp. Nephrol.* **6**, 421–428
- Jiménez, C. R., Li, K. W., Dreisewerd, K., Spijker, S., Kingston, R., Bateman, R. H., Burlingame, A. L., Smit, A. B., van Minnen, J., and Geraerts, W. P. (1998) Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of single neurons reveals differential peptide patterns in a small neuronal network. *Biochemistry* **37**, 2070–2076
- Redeker, V., Toullec, J. Y., Vinh, J., Rossier, J., and Soyey, D. (1998) Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells. *Anal. Chem.* **70**, 1805–1811
- Rubakhin, S. S., Li, L., Moroz, T. P., and Sweedler, J. V. (1999) Characterization of the Aplysia californica cerebral ganglion F cluster. *J. Neurophysiol.* **81**, 1251–1260
- Sweedler, J. V., Li, L., Floyd, P., and Gilly, W. (2000) Mass spectrometric survey of peptides in cephalopods with an emphasis on the FMRFamide-related peptides. *J. Exp. Biol.* **203**, 3565–3573
- Caprioli, R. M., Farmer, T. B., and Gile, J. (1997) Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **69**, 4751–4760
- Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., and Caprioli, R. M. (2001) Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* **7**, 493–496
- Chaurand, P., Schwartz, S. A., and Caprioli, R. M. (2002) Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 676–681
- Fournier, I., Day, R., and Salzet, M. (2003) Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol. Lett.* **24**, 9–14
- Caldwell, R. L., and Caprioli, R. M. (2005) Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 394–401
- Jurchen, J. C., Rubakhin, S. S., and Sweedler, J. V. (2005) MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1654–1659
- Maddalo, G., Petrucci, F., Iezzi, M., Pannellini, T., Del Boccio, P., Ciavardelli, D., Biroccio, A., Forli, F., Di Ilio, C., Ballone, E., Urbani, A., and Federici, G. (2005) Analytical assessment of MALDI-TOF imaging mass spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation. *Clin. Chim. Acta* **357**, 210–218
- Aerni, H. R., Cornett, D. S., and Caprioli, R. M. (2006) Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal. Chem.* **78**, 827–834
- Altelaar, A. F., Klinkert, I., Jalink, K., de Lange, R. P., Adan, R. A., Heeren, R. M., and Piersma, S. R. (2006) Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 734–742
- Crossman, L., McHugh, N. A., Hsieh, Y., Korfmacher, W. A., and Chen, J. (2006) Investigation of the profiling depth in matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 284–290
- Lemaire, R., Tabet, J. C., Ducoroy, P., Hendra, J. B., Salzet, M., and Fournier, I. (2006) Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal. Chem.* **78**, 809–819
- Lemaire, R., Wisztorski, M., Desmons, A., Tabet, J. C., Day, R., Salzet, M., and Fournier, I. (2006) MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal. Chem.* **78**, 7145–7153
- Stauber, J., Lemaire, R., Wisztorski, M., Ait-Menguellat, S., Lucot, J. P., Viatier, D., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudolf, I., Salzet, M., and Fournier, I. (2006) New developments in MALDI imaging mass spectrometry for pathological proteomic studies: introduction to a novel concept, the specific MALDI imaging. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, S247–249
- Wiseman, J. M., Iffa, D. R., Song, Q., and Cooks, R. G. (2006) Tissue imaging at atmospheric pressure using desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 7188–7192
- Wisztorski, M., Brunet, L., Dreisewerd, K., Hillenkamp, F., Berkenkamp, S., Salzet, M., and Fournier, I. (2006) Effect of metals coating for UV MALDI-a-TOF mass spectrometry imaging (MALDI IMS) and direct tissue analysis in UV/IR MALDI-o-TOF mass spectrometry, in *Proceedings of the 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, May 30–June 2, 2006*, Abstract No. ThP 328, American Society for Mass Spectrometry, Santa Fe, NM
- Chaurand, P., Schriver, K. E., and Caprioli, R. M. (2007) Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections. *J. Mass Spectrom.* **42**, 476–489
- Cornett, D. S., Reyzer, M. L., Chaurand, P., and Caprioli, R. M. (2007) MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nat. Methods* **4**, 828–833
- Dreisewerd, K., Lemaire, R., Pohlentz, G., Salzet, M., Wisztorski, M., Berkenkamp, S., and Fournier, I. (2007) Molecular profiling of native and

- matrix-coated tissue slices from rat brain by infrared and ultraviolet laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **79**, 2463–2471
30. Garrett, T. J., Prieto-Conaway, M. C., Kovtoun, V., Bui, H., Izgarian, N., Stafford, G., and Yost, R. A. (2007) Imaging of small molecules in tissue sections with a new intermediate-pressure MALDI linear ion trap mass spectrometer. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 166–176
 31. Groseclose, M. R., Andersson, M., Hardesty, W. M., and Caprioli, R. M. (2007) Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **42**, 254–262
 32. Hankin, J. A., Barkley, R. M., and Murphy, R. C. (2007) Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 1646–1652
 33. Lemaire, R., Menguellet, S. A., Stauber, J., Marchaudon, V., Lucot, J. P., Collinet, P., Farine, M. O., Vinatier, D., Day, R., Ducoroy, P., Salzet, M., and Fournier, I. (2007) Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J. Proteome Res.* **6**, 4127–4134
 34. McLean, J. A., Ridenour, W. B., and Caprioli, R. M. (2007) Profiling and imaging of tissues by imaging ion mobility-mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **42**, 1099–1105
 35. Taban, I. M., Altelaar, A. F., van der Burgt, Y. E., McDonnell, L. A., Heeren, R. M., Fuchser, J., and Baykut, G. (2007) Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **18**, 145–151
 36. Chen, Y., Allegood, J., Liu, Y., Wang, E., Cachón-Gonzalez, B., Cox, T. M., Merrill, A. H., Jr., and Sullards, M. C. (2008) Imaging MALDI mass spectrometry using an oscillating capillary nebulizer matrix coating system and its application to analysis of lipids in brain from a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease. *Anal. Chem.* **80**, 2780–2788
 37. Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P., and Caprioli, R. M. (2008) Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **19**, 1069–1077
 38. Taira, S., Sugiura, Y., Moritake, S., Shimma, S., Ichiyanagi, Y., and Setou, M. (2008) Nanoparticle-assisted laser desorption/ionization based mass imaging with cellular resolution. *Anal. Chem.* **80**, 4761–4766
 39. Trim, P. J., Atkinson, S. J., Princivalle, A. P., Marshall, P. S., West, A., and Clench, M. R. (2008) Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1503–1509
 40. Jardin-Mathé, O., Bonnel, D., Franck, J., Wisztorski, M., Macagno, E., Fournier, I., and Salzet, M. (2008) MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software. *J. Proteomics* **71**, 332–345
 41. Chaurand, P., Schwartz, S. A., Billheimer, D., Xu, B. J., Crecelius, A., and Caprioli, R. M. (2004) Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal. Chem.* **76**, 1145–1155
 42. Lemaire, R., Desmons, A., Tabet, J. C., Day, R., Salzet, M., and Fournier, I. (2007) Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. *J. Proteome Res.* **6**, 1295–1305
 43. Schwamborn, K., Krieg, R. C., Reska, M., Jakse, G., Knuechel, R., and Wellmann, A. (2007) Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging. *Int. J. Mol. Med.* **20**, 155–159
 44. Walch, A., Rauser, S., Deininger, S. O., and Höfler, H. (2008) MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem. Cell Biol.* **130**, 421–434
 45. Brown, L. M., Helmke, S. M., Hunsucker, S. W., Netea-Maier, R. T., Chiang, S. A., Heinz, D. E., Shroyer, K. R., Duncan, M. W., and Haugen, B. R. (2006) Quantitative and qualitative differences in protein expression between papillary thyroid carcinoma and normal thyroid tissue. *Mol. Cell. Oncol.* **45**, 613–626
 46. Chaurand, P., Sanders, M. E., Jensen, R. A., and Caprioli, R. M. (2004) Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am. J. Pathol.* **165**, 1057–1068
 47. Johnson, M. D., Floyd, J. L., and Caprioli, R. M. (2006) Proteomics in diagnostic neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 837–845
 48. Marko-Varga, G., Lindberg, H., Löfdahl, C. G., Jönsson, P., Hansson, L., Dahlbäck, M., Lindquist, E., Johansson, L., Foster, M., and Fehniger, T. E. (2005) Discovery of biomarker candidates within disease by protein profiling: principles and concepts. *J. Proteome Res.* **4**, 1200–1212
 49. Meistermann, H., Norris, J. L., Aerni, H. R., Cornett, D. S., Friedlein, A., Erskine, A. R., Augustin, A., De Vera Mudry, M. C., Ruepp, S., Suter, L., Langen, H., Caprioli, R. M., and Ducret, A. (2006) Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol. Cell. Proteomics* **5**, 1876–1886
 50. Sköld, K., Svensson, M., Nilsson, A., Zhang, X., Nydahl, K., Caprioli, R. M., Svenningsson, P., and Andrén, P. E. (2006) Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse. *J. Proteome Res.* **5**, 262–269
 51. Stoekli, M., Knochenmuss, R., McCombie, G., Mueller, D., Rohner, T., Staab, D., and Wiederhold, K. H. (2006) MALDI MS imaging of amyloid. *Methods Enzymol.* **412**, 94–106
 52. Groseclose, M. R., Massion, P. P., Chaurand, P., and Caprioli, R. M. (2008) High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry. *Proteomics* **8**, 3702–3714
 53. Ronci, M., Bonanno, E., Colantoni, A., Pieroni, L., Di Ilio, C., Spagnoli, L. G., Federici, G., and Urbani, A. (2008) Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to MALDI-TOF imaging MS investigations. *Proteomics* **8**, 3702–3714
 54. Stauber, J., Lemaire, R., Franck, J., Bonnel, D., Croix, D., Day, R., Wisztorski, M., Fournier, I., and Salzet, M. (2008) MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J. Proteome Res.* **7**, 969–978
 55. Van de Plas, R., Ojeda, F., Dewil, M., Van Den Bosch, L., De Moor, B., and Waelkens, E. (2007) Prospective exploration of biochemical tissue composition via imaging mass spectrometry guided by principal component analysis. *Pac. Symp. Biocomput.* 458–469
 56. Djidja, M. C., Carolan, V., Loadman, P. M., and Clench, M. R. (2008) Method development for protein profiling in biological tissues by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22**, 1615–1618
 57. McCombie, G., Staab, D., Stoekli, M., and Knochenmuss, R. (2005) Spatial and spectral correlations in MALDI mass spectrometry images by clustering and multivariate analysis. *Anal. Chem.* **77**, 6118–6124
 58. Deininger, S. O., Ebert, M. P., Fütterer, A., Gerhard, M., and Röcken, C. (2008) MALDI imaging combined with hierarchical clustering as a new tool for the interpretation of complex human cancers. *J. Proteome Res.* **7**, 5230–5236
 59. Lemaire, R., Stauber, J., Wisztorski, M., Van Camp, C., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudlof, I., Woods, A. S., Day, R., Salzet, M., and Fournier, I. (2007) Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J. Proteome Res.* **6**, 2057–2067
 60. Chaurand, P., Rahman, M. A., Hunt, T., Mobley, J. A., Gu, G., Latham, J. C., Caprioli, R. M., and Kasper, S. (2008) Monitoring mouse prostate development by profiling and imaging mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 411–423
 61. Din, S., Lennon, A. M., Arnott, I. D., Hupp, T., and Satsangi, J. (2007) Technology insight: the application of proteomics in gastrointestinal disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **4**, 372–385
 62. Fournier, I., Wisztorski, M., and Salzet, M. (2008) Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev. Proteomics* **5**, 413–424
 63. Francese, S., Dani, F. R., Traldi, P., Mastrobuoni, G., Pieraccini, G., and Moneti, G. (2009) MALDI mass spectrometry imaging, from its origins up to today: the state of the art. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **12**, 156–174
 64. Norris, J. L., Cornett, D. S., Mobley, J. A., Andersson, M., Seeley, E. H., Chaurand, P., and Caprioli, R. M. (2007) Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis. *Int. J. Mass Spectrom.* **260**, 212–221
 65. Titz, G. P., Wiltgen, M., Demel, U., Faschinger, C., Schmidinger, H., and Hermetter, A. (2007) Insights into molecular medicine: development of new diagnostic and prognostic parameters. *Wien. Med. Wochenschr.* **157**, 122–129
 66. Wisztorski, M., Lemaire, R., Stauber, J., Menguelet, S. A., Croix, D., Mathé, O. J., Day, R., Salzet, M., and Fournier, I. (2007) New developments in

- MALDI imaging for pathology proteomic studies. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 3317–3324
67. Reyzer, M. L., and Caprioli, R. M. (2007) MALDI-MS-based imaging of small molecules and proteins in tissues. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **11**, 29–35
68. Hsieh, Y., Casale, R., Fukuda, E., Chen, J., Knemeyer, I., Wingate, J., Morrison, R., and Korfmacher, W. (2006) Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 965–972
69. Hsieh, Y., Chen, J., and Korfmacher, W. A. (2007) Mapping pharmaceuticals in tissues using MALDI imaging mass spectrometry. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **55**, 193–200
70. O'Brien, E., Dedova, I., Duffy, L., Cordwell, S., Karl, T., and Matsumoto, I. (2006) Effects of chronic risperidone treatment on the striatal protein profiles in rats. *Brain Res.* **1113**, 24–32
71. Reyzer, M. L., Hsieh, Y., Ng, K., Korfmacher, W. A., and Caprioli, R. M. (2003) Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **38**, 1081–1092
72. Rubakhin, S. S., Jurchen, J. C., Monroe, E. B., and Sweedler, J. V. (2005) Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discov. Today* **10**, 823–837
73. Wang, H. Y., Jackson, S. N., McEuen, J., and Woods, A. S. (2005) Localization and analyses of small drug molecules in rat brain tissue sections. *Anal. Chem.* **77**, 6682–6686
74. Dekker, L. J., van Kampen, J. J., Reedijk, M. L., Burgers, P. C., Gruters, R. A., Osterhaus, A. D., and Luiders, T. M. (2009) A mass spectrometry based imaging method developed for the intracellular detection of HIV protease inhibitors. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 1183–1188
75. Hopfgartner, G., Varesio, E., and Stoeckli, M. (2009) Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of complete rat sections using a triple quadrupole linear ion trap. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 733–736
76. Huamani, J., Willey, C., Thotala, D., Niermann, K. J., Reyzer, M., Leavitt, L., Jones, C., Fleishcher, A., Caprioli, R., Hallahan, D. E., and Kim, D. W. (2008) Differential efficacy of combined therapy with radiation and AEE788 in high and low EGFR-expressing androgen-independent prostate tumor models. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **71**, 237–246
77. Trim, P. J., Henson, C. M., Avery, J. L., McEwen, A., Snel, M. F., Claude, E., Marshall, P. S., West, A., Princivalle, A. P., and Clench, M. R. (2008) Matrix-assisted laser desorption/ionization-ion mobility separation-mass spectrometry imaging of vinblastine in whole body tissue sections. *Anal. Chem.* **80**, 8628–8634
78. Reyzer, M. L., Caldwell, R. L., Dugger, T. C., Forbes, J. T., Ritter, C. A., Guix, M., Arteaga, C. L., and Caprioli, R. M. (2004) Early changes in protein expression detected by mass spectrometry predict tumor response to molecular therapeutics. *Cancer Res.* **64**, 9093–9100
79. Khatib-Shahidi, S., Andersson, M., Herman, J. L., Gillespie, T. A., and Caprioli, R. M. (2006) Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* **78**, 6448–6456
80. Atkinson, S. J., Loadman, P. M., Sutton, C., Patterson, L. H., and Clench, M. R. (2007) Examination of the distribution of the bioreductive drug AQ4N and its active metabolite AQ4 in solid tumours by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**, 1271–1276
81. Wisztorski, M., Verplanck, N., Thomy, V., Stauber, J., Camart, J. C., Salzet, M., and Fournier, I. (2007) Use of Masks in MALDI-IMS: an easy tool for increasing spatial resolution of images by decreasing irradiated area, in *Proceedings of the 55th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, June 4–7, 2007*, Abstract No. WPD-066, American Society for Mass Spectrometry, Santa Fe, NM
82. Sinha, T. K., Khatib-Shahidi, S., Yankeelov, T. E., Mapara, K., Ehteshami, M., Cornett, D. S., Dawant, B. M., Caprioli, R. M., and Gore, J. C. (2008) Integrating spatially resolved three-dimensional MALDI IMS with in vivo magnetic resonance imaging. *Nat. Methods* **5**, 57–59
83. Andersson, M., Groseclose, M. R., Deutch, A. Y., and Caprioli, R. M. (2008) Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction. *Nat. Methods* **5**, 101–108
84. Stoeckli, M., Chaurand, P., and Caprioli, R. M. (1999) Applications of MALDI MS imaging to biological samples, in *Proceedings of the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Dallas, June 13–17, 1999*, Abstract No. TPG-264, American Society for Mass Spectrometry, Santa Fe, NM

MALDI Imaging Mass Spectrometry in ovarian cancer

Mohamed Elayed^{1*}, David Bonnel^{1*}, Daniele Vergara^{1*}, Aurelie Tasiemski¹, Karim Arafah¹, Julien Franck¹, Denis Viniatier², Robert Day³,
Isabelle Fournier^{1@}, Michel Salzet^{1@}

1 : Université de Lille1, CNRS, MALDI Imaging team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE 2933, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

2 : Clinique de Gynécologie, Hôpital Jeanne De Flandre, CHRU Lille, 59000 Lille, France

3 : Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

@: co-corresponding authors

* : joint first authors

Abstract:

MALDI imaging mass spectrometry is a new analytical tool that provides information about the spatial distribution and relative abundance of proteins in tissue. Ovarian carcinomas (stages III and IV) and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. Principal component analysis (PCA) in non-supervised mode was carried out to classify tissues and find biomarker signatures. PCA was used to differentiate tumorous and healthy tissue regions based on proteomic composition determined by MALDI-MSI. Two stage II tumor regions, as well as two healthy regions, were identified by this approach and confirmed by immunohistochemistry. To validate our procedure, several biomarkers identified in the two carcinoma regions were characterized by MALDI-TOF-TOF in the MS/MS mode after a wash procedure and trypsin digestion. It was then confirmed by nanoLc-IT-MS/MS and validate by molecular biology using SKOV-3 ovarian epithelial cancer cells. From the biomarkers identified, proteins involved in immune response modulation and cell proliferation have been pointed out in this study.

Keywords: MALDI imaging, Pathologies, Innate immunity, Proteomics

Introduction

Ovarian cancer is the fourth leading cause of cancer death among women in Europe and the United States. Among biomarkers, CA 125 is the most studied. CA125 has a sensitivity of 80% and a specificity of 97% in epithelial cancer (stage III or IV). However, its sensitivity is around 30% in stage I cancer, its increase is linked to several physiological phenomena and it is also detected in benign situations¹. CA 125 is particularly useful for at-risk population diagnosis and for following illness evolution during therapeutic treatment. In this context, CA 125 is insufficient as a single biomarker for ovarian cancer diagnosis. Thus, other biomarkers are required to employ a proteomic strategy for diagnosis²⁻¹⁰. At this time, two strategies have been undertaken by researchers. Indeed, several groups have tried to identify ovarian cancer markers in plasma or serum using SELDI-TOF profiling or chromatography coupled to mass spectrometry^{3, 11-16}. Other groups have developed a classical proteomic strategy using comparative 2D-gels and mass spectrometry^{10, 17-19}.

Here, we propose another strategy based on direct tissue analysis and peptide profiling followed by MALDI Imaging. Ovarian carcinomas (stages III and IV) and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. Principal component analysis (PCA) was carried out using ClinProTools software to classify tissues. PCA was used in the unsupervised mode to differentiate tumorous and healthy regions based on their proteomic composition as determined by MALDI-MSI. Two stage IV tumor regions as well as two healthy regions were identified. In order to validate the procedure, two biomarkers identified in the two carcinoma regions were characterized using tissue MS-MS and nanolc-IT-MS. Validation was performed by specific MALDI imaging using the Tag-mass concept, and PCR was performed on mRNA extracted from patients or from an epithelial cancer cell line (SKVO3). The first biomarker was identified as a fragment of the immunoproteasome Reg-Alpha²⁰ and the second was identified as orosomucoid.

Taken together with recent results from gastric cancer diagnosis^{21, 22}, our results suggest that MALDI-MSI is a promising technology for tumor classification and for the identification of specific biomarkers in various types of tumors.

MATERIAL AND METHODS

Materials

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), ammonium bicarbonate, trisma base, xylene, ethanol, Angiotensin II, Des-Arg-Bradykinin, Substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38 and bovine insulin were obtained from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Trypsin was from Promega. AspN, LysC enzyme was from Roche. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. were from J.T. Baker.

Samples

Tissues, ascites and cyst fluids were obtained with informed consent and institutional review board approval (CCPPRBM Lille: CP 05/83) from patients undergoing any ovarian tumor resection at Hospital Jeanne de Flandre. A total of 48 tissue samples from 25 patients with grade III and IV ovarian cancer and 23 benign tumors were analyzed. Patient information was collected, including gender, age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of original pathologic diagnosis. Samples were collected at the time of surgery, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis. Typically, 10–12 μm thick sections were cut using a cryostat and thaw-mounted on flat electrically conductive sample slices. Histopathologic diagnoses were made by an anatomopathologist blinded to the original clinical diagnosis from subsequent H&E-stained sections.

Tissue preparation

Frozen ovary sections 10 μm in thickness were sliced on a cryostat and immediately transferred onto a conductive Indium-Tin Oxide (ITO) glass (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France). After drying the sections for 5 minutes at room temperature, tissues were heated to 37°C for 20 seconds to adhere to slides and placed under vacuum for 10 minutes. They were then rinsed in chloroform and analyzed in MALDI ms for MALDI imaging analyses²³.

Peptide tissue extractions

Slices were washed with acetonitrile (60%) acidified with HCl 1N (w/5v). The collected supernatants were incubated overnight at 4°C with gentle rocking. After centrifugation at 12,000 rpm for 30 min at 4°C, supernatants were loaded on Sep-Pak C18 cartridges (500 µl extract/cartridge; Waters). After washing with 5 ml acidified water (0.05% TFA, Pierce), samples were eluted with 5 ml 60% acetonitrile in acidified water (0.05% TFA). 60% of the eluted fraction was reduced in a vacuum centrifuge (Savant). This fraction was resuspended in 100 µl acidified water (0.05% TFA) and fractionated on a C18 Reversed-phase HPLC column (4.6 mm x 25 cm, Interchim) equilibrated with acidified water (0.05 % TFA). Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water (0.05%) from 0 to 70% at a flow rate of 500 µl/min. Each fraction was collected manually before being evaporated in a SpeedVac vacuum and resuspended with 50 µl of HPLC grade water. Each fraction was analyzed by MALDI-TOF-MS before trypsin digestion.

Trypsin digestion

After drying, samples (extracted peptides) were placed on ice for 30 min in 50 µl of protease solution (sequence grade-modified trypsin, Promega, at 0.02 mg/ml in 25 mM ammonium bicarbonate). Digestion was performed overnight at 37 °C. Peptide extraction was performed twice for 15 min with 50% acetonitrile, 1% TFA for further MALDI-MS analysis or with 50% acetonitrile, 1% formic acid for further ESI-MS/MS analysis. Trypsin digests were then lyophilized in a SpeedVac concentrator and resuspended in 5 µl of 0.1% formic acid.

For nanoLC-ESI MS analysis, on a section of 2 cm², *in situ* enzymatic digestion is performed by adding 15 µL of trypsin enzyme (0.033µg/µL in 25mM Tris buffer pH 7.4) for 1H hour at room temperature. After enzymatic digestion, purification of resulting digestion peptides was achieved by using reverse phase C₈ coated silica magnetic beads (ClinProts™, Bruker Daltonics, Germany) according to the protocol of the manufacturer modified for tissues. For this, 15µL of binding solution was directly applied onto the tissue during 1 minute, then 15µL of magnetic bead was added on the section. Extraction occurred during 10 minutes. During this step, beads and digested products were mixed 3 times using a micropipette directly onto the tissue. Digestion solution and beads were, then, deposited in a polypropylene tube

and washed 3 times using 500 μ L of H₂O/TFA 0.1%. Peptides were eluted from the beads with 30 μ L of ACN/H₂O (1:1, v/v) and solution was dried by vacuum centrifugation. For nano LC-MS/MS identification, peptides were re-dissolved in H₂O/MEOH 0.1% formic acid (9:1 v/v) after elution and evaporation.

MALDI Imaging and Specific MALDI Imaging

Automatic trypsin digestions

The printed array of the CHIP-1000 (Shimadzu, Japan) on the tissue section was composed of spots spaced by 150 μ m center-to-center. A total of 20 nL of solution containing 25 μ g/mL of trypsin in water was applied to each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Forty iterations were necessary to obtain the final volume. Tissue sections were washed with a bath of cold EtOH for 30 s.

MALDI Imaging

Solid ionic matrix (Sinapinic acid/3 acetylpyridine)²⁴ was deposited using the CHIP-1000 device. Ten nanoliters of ionic matrix solution and 10 mg/mL in ACN/aqueous TFA 0.1% (6/4, v:v) was spotted at each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Twenty iterations were necessary to reach the total final volume. The images were acquired using an UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a smart beam laser with a repetition rate of 200 Hz²⁵ and controlled by FlexControl 2.5 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Images were performed in positive reflectron mode and MALDI-MS spectra were acquired in the mass range from 550 to 5000 Da. Six-hundred spectra were acquired at each spot using a laser frequency of 100 Hz. The images were recorded and reconstructed using Fleximaging II 2.5 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) software

Specific MALDI Imaging

For specific MALDI imaging studies, ovary sections were incubated at room temperature with 500 μ L buffer (0.1M PBS / 1% BSA / 1% normal goat serum / 0.05% triton X100) for 30 minutes^{26, 27}. The same buffer was used to dilute the Reg alpha

antibody (1/100) (Zymed Laboratories, Invitrogen, ref. 38-2400), and incubation was performed overnight at 4°C. After three washes in PBS, sections were incubated overnight with anti-Human IgG photocleavable tagged rabbit antibody (1/100) (Eurogentec²⁹) at 4°C²⁸. The tissues were then rinsed three times for five minutes with ultra pure water to remove salts, and sections were dried at room temperature before matrix application. In the case of the orosomucoid (alpha 1 glycoprotein) biomarker, a monoclonal antibody (MCA3312Z) was purchased from AbD Serotec and used at a dilution of 1/50. The secondary antibody is an anti-human IgG photocleavable tagged mouse antibody (1/100) (Eurogentec).

MS/MS of digested and derived tissues

MALDI-TOF MS/MS experiments on digested and derived tissue sections were performed using an Ultraflex II TOF-TOF instrument equipped with a LIFT III cell. For MS/MS experiments, the following parameters were set: laser repetition rate of 100 Hz with 33% attenuation, ion source voltages of 8 kV and 7.3 kV on the MALDI sample plate and 1st electrode, respectively; LIFT cell pulse from ground for electrode 1 and 2 to 19 kV and in the last step, electrode 3 was decreased to 3.2 kV; reflector end voltage was set to 29.5 kV and mid-grid to 13.85 kV. For each MS/MS spectrum, 1000 total shots were averaged including 200 for parent ions and 800 for fragments. Laser fluence was constant over the experiments.

Protein identification in databanks was performed using Biotoools 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected to the Phenyx search engine interrogating the NCBI, Swissprot, EST or MSDB databases. Methionine oxidation was set as the variable modification and no fixed modification was used. Taxonomy was specified to be human. Trypsin was selected as the enzyme and two missed cleavages were settled. The mass tolerance was set at 1 and 0.5 Da, respectively, for the MS and MS/MS.

Nano LC-nanoESI-IT MS and MS/MS

Analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000 plus, Bucker Daltonics, Germany) equipped with a nano ESI ion source and on-line coupled to a nano HPLC system. 0.5µL of digest were injected with a Switchos Autosampler (Dionex corporation) and separation performed on a C18 silica bonded

stationary phase (75 μ m i.d., 150mm long, 3 μ m 100 Å pore size, Dionex). Samples were washed for 2 minutes at 10 μ L/min with 100% mobile phase A (95% H₂O, 5% ACN 0.1% formic acid). Peptides were then eluted using a linear gradient of 1%/min mobile phase B (ACN 80%, H₂O 20%, formic acid 0.08%) for 70 minutes at a flow rate of 0.2 μ L/min. The Esquire was operated in a data dependent MS/MS mode in which one MS full scan was followed by one MS/MS scan on the most abundant peptide ion. Collision energy was set to 35%. The heated capillary temperature and electrospray voltage were 160°C and 1.5kV respectively.

Protein identification was performed under MASCOT sequence query search program using SwissProt database filtered for the taxonomy "*human*". A tolerance of 1 Da for peptide and 0.5 Da for MS/MS was set. Only protein sequences with MOWSE score higher than 20 (indicating significant homology or identity) and identified in several samples representing at least 4 significant MS/MS were considered. Methionine oxydation and acetylation of N –terminal were defined as variable modification.

Statistical data analysis. Symbolic discriminant analysis (SDA) was used to analyze protein profiles. SDA determines discriminatory signals and builds functions using these signals that distinguish sample populations based on their classification. Peak lists from MALDI spectra obtained with *Flex analysis 2.4* and *Flex control 2.5* input into the analysis program were clustered according to similarity using a presence/absence criterion. Statistical analyses were carried out using the ClinProTools 2.2 Software. For statistical analyses, mass spectra were internally recalibrated on common peaks (also known as spectral alignment) and normalized to the total ion count. An average spectrum created from all single spectra was used for peak selection and to define integration ranges. These integration ranges were used to obtain the intensities or areas of single spectra. Signal intensities were used for all calculations. For the principal component analysis and hierarchical clustering, the individual peak intensities were standardized across the data set. The PCA was carried out using Pareto scaling, which uses the square root of the standard deviation as a scaling factor to reduce the dominance of large-scale intensity changes in the matrix and other high-abundance ions, as these may mask variations in lower abundance ions during PCA. The overall outcome of PCA is greatly affected by the

masking of the underlying relevant information by ions related to matrix coating and other endogenous molecules. A plot of principal component 1 (PC1) versus principal component 2 (PC2) was chosen since these components resulted in the highest overall degree of separation of the spectra within the PCA score plots. Under unsupervised PCA, each spectrum is classed as an individual so the principal components are selected and account for the greatest separation of each of the individual spectra. At the top of each of the scores and loading plots (Fig. 1), the principal components that have been plotted are shown with the percentage variance or the percentage of the variance accounted from each of the principal components.

RNA isolation and PCR analysis

mRNA from biopsies or from the SKOV-3 cell line was extracted in 2 ml tubes prefilled with Qiazol reagent (Qiagen, France) and 1.4 mm ceramic beads. The mixture was shaken twice for 45 s at 6500 rpm in a Precellys®24 homogenizer (Bertin distributed by Ozyme, France). RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions and total extracted RNA was treated with RQ1Dnase1 (Promega, France) to prevent genomic DNA contamination. First strand cDNA was generated from 2 µg of total RNA using random primers (Promega, France) and the Superscript III reverse transcriptase (RT) kit (Invitrogen, France) in a final volume of 60 µl. Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in non-amplification and no-template controls, respectively. cDNA was treated with RNaseH (Promega, France) to optimize the amplification. For the TLR, Reg-alpha fragment and orosomuroid genes, forward and reverse primers (Table 1) were designed with the Primer3 Input software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). TLR primer pairs were obtained from Krug *et al.*²⁹. ACTB, GAPDH and 18S were used as reference genes. In each case, PCRs were performed for 30 cycles using Advantage 2 polymerase (Clontech) with an elongation time of 2 min. All PCR products were sub-cloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and cDNA clones were sequenced with an ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Table 1: forward and reverse primer sequences used in RT-PCR are shown 5' to 3'.

Primer designation	Foward Primer	Reverse Primer
Orosomuroid	CTGGGAGAGTTCTACGAAGC	CCTCCTGTTTCCTCTCCTT
Actin	AGCGCAAGTACTCCGTGTG	GACTGGGCCATTCTCCTTAG
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA

SKOV-3 cells stimulation and immunohistochemistry

The human epithelial ovarian cancer cell line SKOV-3 was grown in RPMI-1640 medium with glutamine, supplemented with 10% FBS, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. Cells were treated with TGF-β (10 ng ml⁻¹) for 24 h in the absence of serum (B). Controls cells were left untreated (A). For confocal microscopy analysis, cells were fixed for 5 min with 3.7% formaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) solution, permeabilized with a 0.1% solution of Triton X-100 in PBS followed by 30 min incubation at room temperature with phalloidin-TRITC (Sigma). Slices were then mounted in glycergel and examined using a confocal microscope (Zeiss LSM 510). Control cells have a typical epithelial-like morphology in culture flask/Petri with the tendency to form dense colonies.

Western blotting

Whole cell lysates (in lysis buffer as described above) containing 50 µg of total proteins (COF1, PROF1) (Sigma) were diluted in cold RIPA buffer, resolved on 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrilamide gels (Mini Protean II electrophoresis system, BioRad) and blotted onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% w/v nonfat dry milk in TBS containing 0.1% Tween-20 (Sigma) and probed with selected primary antibodies. After incubation with a secondary antibodies, immunoblots were visualized with the ECL detection kit (Amersham Biosciences).

Results and Discussion

We previously compared stage III and IV ovarian carcinomas to benign tissues using MALDI profiling and MSI and determined a list of potential biomarkers. We focused our attention on the most prevalent biomarkers (80%)²⁰ and identified a fragment of the 11S immunoproteasome named the Reg alpha fragment²⁰. Its validation through MSI (Figures 1A, 1B), and immunocytochemistry (Figure 1C) confirmed its specificity to ovarian carcinoma.

In this study, we developed a complementary strategy to validate the Reg alpha fragment as a specific biomarker and to find new biomarkers through unsupervised principal component analysis and hierarchical clustering. This strategy was cross-validated by specific MALDI Imaging, PCR and the use of SKOV-3 ovarian epithelial cancer cells.

MALDI Imaging, PCA and clustering analyses

The analysis of a MALDI imaging data set by molecular mass images can be illustrated as a pseudo-gel thanks to ClinProTools software. The specific localization of the fragment of Reg alpha ($m/z/ 9744$) (Figure 2A) was elucidated in this pseudo-gel and is presented in Figure 2. Principal component analysis (PCA) was used to attempt to identify hidden variables between spectra taken from various regions of ovarian biopsies (Figure 2B). Figure 2B shows the score plots for unsupervised PCA. Plot PC1/PC2 shows the best separation and two groups can be identified, *i.e.*, tumor vs. healthy regions, which is in line with the histological data (Figure 2C). A zoom of the most separated ions from the PC1/PC2 plot is presented in Figure 2D, and a group of specific biomarkers was detected. Their localization in the tumor region is presented in Figure 3. From the PCA results, we confirmed that the fragment of Reg alpha is present in the cancer group with the other biomarkers and not present in healthy tissue (Figure 2C). The cellular localization of the Reg alpha fragment in the cancer region validates the PCA strategy (Fig. 2C). Some specific biomarkers detected by PCA are present in the carcinoma region (Figure 3), whereas other markers are specifically localized in the healthy region, such as the group presented in Figure 4. Thus, PCA data generated in the unsupervised mode allows the detection of specific biomarkers, and clustering analysis confirmed the two regions as carcinoma (Figure 5 a,b,c) and healthy (Figure 5 d,e,f). Moreover, due to clustering performance analyses, it was possible to detect that the carcinoma region contained

two main components (Figures 5b, 5c) that were divided into eight subclasses. Each subclass contained specific biomarkers. Similarly, the healthy region contained two main parts (Figures 5e, 5f) that could also be divided into eight subclasses.

Using this clustering analysis, we wanted to establish a molecular classification of ovarian cancer, *i.e.*, serous, mucous or infiltrating, and the stage. For this purpose, we characterized some of the detected biomarkers and analyzed their tissue localization.

Biomarker characterization

From the list of biomarkers detected by PCA analysis, we were able to detect the localization of the C-terminal fragment of Reg-alpha²⁰. This was consistent with putative biomarkers already found in genomic studies that share the same mass, e.g., protein S100-A12 (m/z 10568) and apolipoprotein A1 (m/z: 10155)³⁰. We decided to remove the MALDI matrix from the slides through a washing procedure and analyze samples by MALDI before and after trypsin digestion (Figure 6). The differentiated ions were then subjected to MS/MS analysis by MALDI before analysis by nanoLC-IT/MS in MS/MS mode. For example, the ion at m/z 1160.5 detected by MALDI in a patient sample after trypsin digestion (Figure 6) was subjected to MS/MS analysis (Figure 7a). The obtained sequence of WFYIASAFR with a score of 30 (Figure 7b) was confirmed by the IT-MS/MS data, and it belongs to orosomuroid 1. Five others fragments were characterized and gave 30.3% sequence coverage (Figure 7b). The presence in the biopsy of the mRNA coding for this protein was confirmed by RT-PCR from patient with ovarian carcinoma (Figure 7c). A 150-bp fragment coding for orosomuroid was amplified (Figure 7c). Similarly, RT-PCR performed on RNA extracted from SKOV-3 epithelial carcinoma cells confirmed the expression of both the orosomuroid and reg-alpha genes (Figure 7d), further supporting the biochemical data. Finally, antibodies raised against the C-terminus of Reg alpha and a monoclonal against orosomuroid were used for immunocytochemistry using the specific MALDI imaging procedure²⁸ (Figure 8a). Both biomarkers were detected using the tag-mass procedure in the carcinoma region with specific localization (Figure 8b), which was consistent with the clustering distribution (Figure 8c).

A combination of MALDI TOF-TOF and nanoLC-IT MS/MS analyses (Table 2) allowed us to characterize 17 biomarkers (Table 2) from the 20 samples (10 patients with ovarian cancer and absent in 10 benign tumors). Some of these have been previously reported as secreted proteins in large-scale analyses of human plasma from ovarian cancer patients³¹, human ovarian cancer tumors³² or ovarian ascites analyses³³. Moreover, their localization was performed by MSI using bottom-up strategy. After on tissue trypsin digestion, proteins were reconstructed based on their *in silico* tryptic digested peptides detected on the digested tissue (Table 3, Figure 9). MSI images from digested fragments for the same protein were cumulated and gave the molecular image of its tissue repartition. Interestingly, all the detected proteins have the same localization e.g. the carcinoma part.

These proteins can be grouped into functional categories such as cell proliferation, immune response modulation, signaling to the cytoskeleton and tumor progression.

Proteins associated with cell proliferation

The S100 protein family has previously been detected in aggressive ovarian tumors¹⁶. In our study we detected S100 A11 (Table 2) and S100 A12 (PCA analyses) proteins in tumors. S100 A11 has already been detected in ovarian ascites³³. S100 A11 (or calgizzarin) is known to regulate cell growth by inhibiting DNA synthesis^{34, 35}. S100 A12 is known to contribute to leukocyte migration in chronic inflammatory responses³⁶.

Proteins involved in immune response modulation

Recent studies have shown that ovarian cancer-associated ascites may provide an immunosuppressive environment³⁷. In fact, a high CD4/CD8 ratio, which may indicate the presence of regulatory T-cells, is associated with poor outcomes. Reduced IL-2 and elevated IL-6 and IL-10 levels favor a Th2 inhibitory immune response. This immunosuppressive climate may explain the observation of non responsiveness in ascites-derived T-cells³⁷. Considering these data, we tried to identify biomarkers from our pool that could be involved in such immunosuppression. In fact, we detected five factors involved in immune response modulation in our mucinous tumors: a C-terminal fragment of the 11S immunoproteasome (reg-alpha), orosomucoid, apolipoprotein A1, hemopexin and lumican.

PSME1 (proteasome activator complex subunit 1, 11S regulator complex (syn.: PA28 alpha)) cleaved into the reg-alpha fragment could lead to default self-antigen presentation²⁰. In fact, PA28 is a regulatory complex associated with the 20S proteasome that consists of three subunits, alpha, beta and gamma³⁸. Binding of the 11S regulator complex to the 20S proteasome does not depend on ATP hydrolysis, and unlike the 19S regulatory subunit, the 11S regulator complex does not catalyze the degradation of large proteins. Rather, it is responsible for MHC-class I antigen processing,³⁹⁻⁴¹ which is greatly improved by interferon gamma-induced expression of the alpha and beta subunits⁴². A number of viral proteins that interact with these proteasome subunits have been reported, and they may interfere with host anti-viral defenses and thereby contribute to cell transformation⁴³. The manner in which it binds to the core particle via its subunits' C-terminal tails and induces an α -ring conformational change to open the 20S gate suggests a mechanism similar to that of the 19S particle³⁸. No role in ovarian cancer has been demonstrated for the 11 S regulator complexes. Our data demonstrate a high level of expression of PA28 in carcinomas, especially in epithelial cells. The PA28 activator belongs to the antigen processing machinery (APM). Its alteration by cleavage in ovarian carcinomas may be a mechanism to evade immune recognition. Such a hypothesis has already been proposed for the case of APM chaperones such as TAP, LMP2, LMP10 and tapasin in colon carcinoma, small cell lung carcinoma and pancreatic carcinoma cell lines. In fact, IFN- γ treatment of these carcinoma cell lines corrects the TAP, LMP and Tapasin deficiencies and enhances PA28 α , LMP7, calnexin and calreticulin expression, which is accompanied by increased levels of MHC class I antigens⁴⁴. Recently, PSEM2 (proteasome activator complex subunit 2, PA28 Beta) has also been detected in ascites fluid, which implicates it in immune cell tolerance towards carcinoma cells and confirms the dysregulation of self-antigen processing in ovarian tumors³³.

In addition, among the four other factors that might participate in the tolerance phenomenon by inhibiting immune activation, the acute phase protein Orosomocoid (ORM, also known as alpha1-acid glycoprotein or AGP) is normally found to be increased in infection, inflammation and cancer and it seems to have immunosuppressive properties in ovarian carcinoma ascites through the inhibition of IL-2 secretion by lymphocytes⁴⁵. Similarly, apolipoprotein A1 has been detected in

conjunction with transthyretin and transferrin in early-stage mucinous tumors⁴⁶. ApoA-I is known to decrease expression of surface molecules such as CD1a, CD80, CD86 and HLA-DR in dendritic cells, and it stimulates the production of IL-10⁴⁷.

Interestingly, hemoplexin has recently been demonstrated to reduce TNF and IL-6 from macrophages during inflammation, and it limits TLR4 and TLR2 agonist-induced macrophage cytokine production⁴⁸. We demonstrate that in SKOV-3 epithelial ovarian carcinoma cells, all TLRs are over-expressed with the exception of TLR9 and TLR10 (Figure 10). This point is also in line with the over-expression of lumican, which is a small LRR proteoglycan in the extracellular matrix. Along with other proteoglycans such as decorin, biglycan, prolargin, lumican is known to be over-expressed in breast cancer and to play a role in tumor progression^{49, 50}. However, as demonstrated for biglycan, which interacts with TLR2/4 on macrophages^{51, 52}, we can speculate that lumican is also involved in activation of the inflammasome through TLR2/4 interaction. The activation of all danger-sensing receptors in carcinoma cells can be explained by the regulation of inflammation by carcinoma cells to facilitate tumor progression. It seems that ovarian cancer cells act as parasites and use molecular mimicry⁵³ to escape the immune response, and they produce immunosuppressors to achieve tolerance.

Signaling to the cytoskeleton

Several candidate proteins, including profilin-1, cofilin-1, vimentin and cytokeratin 19, are involved in intracellular signaling to the cytoskeleton. Changes in cell phenotype, such as the conversion of epithelial cells to mesenchymal cells, are integral not only to embryonic development but also to cancer invasion and metastasis. Cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) lose their epithelial morphology, reorganize their cytoskeleton and acquire a motile phenotype through the up- and down-regulation of several molecules, including tight and adherent junction proteins and mesenchymal markers. TGF- β has been described to induce EMT in ovarian adenocarcinoma cells⁵⁴. In the human lung adenocarcinoma cell line A549, this differentiation is accompanied by modification in the expression of several cytoskeleton proteins including β -actin, cofilin1, moesin, filamin A and B, heat-shock protein beta-1, trangelin-2, S100 A11 and calpactin. These changes presumably increase migratory and invasive abilities⁵⁵. We demonstrated that treatment of the ovarian cancer cell line SKOV-3 with TGF- β (10 ng/ml, 24 h)

increases the expression of cofilin and profilin-1 at mRNA and protein level and modifies its cytoskeletal organization as assessed by confocal microscopy analysis (Figure 10a). After binding to its receptor, TGF- β stimulates the reorganization of the actin cytoskeleton and triggers the formation of stress fibers and cellular protrusions (Figures 11b, 11c).

Tumor progression

In conjunction with S100 proteins and cytoskeleton modifying proteins, we also detected the expression of oviduct-specific glycoprotein (OGP, Mucin-9), a marker of normal oviductal epithelium. Our data are in line with that of Woo et al., who found that OGP is a tubal differentiation marker and may indicate early events in ovarian carcinogenesis^{56, 57}.

In summary, PCA and clustering performed after MALDI imaging analysis allow molecular tissue classification and will be of great help for pathological diagnoses. We confirmed that biomarkers detected in our tissue samples such as orosomucoid and lumican are highly glycosylated, which is in line with the mucinous phenotype of ovarian cancers. Thus, clustering analysis in conjunction with specific biomarker detection can enhance tumor tissue classification and sub-classification and lead to better diagnoses. Moreover, based on the biomarkers identified in this study, we propose that ovarian cancer cells act to suppress immune responses. These findings also suggest that ovarian cancer can have a viral etiology. Viruses are known to orientate the immune response to immunosuppression⁵⁸. Further studies are now in progress to explore this possibility.

Acknowledgements

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Agence Nationale de la Recherche (ANR PCV to IF), Institut du Cancer (INCA to IF), Institut de Recherche en Santé du Canada (ISRC to MS & RD).

References

1. Lambaudie, E.; Collinet, P.; Vinatier, D., [Ovarian cancers and CA 125 in 2006]. *Gynecol Obstet Fertil* **2006**, 34, (3), 254-7.
2. Edwards, B. K.; Brown, M. L.; Wingo, P. A.; Howe, H. L.; Ward, E.; Ries, L. A.; Schrag, D.; Jamison, P. M.; Jemal, A.; Wu, X. C.; Friedman, C.; Harlan, L.; Warren, J.; Anderson, R. N.; Pickle, L. W., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **2005**, 97, (19), 1407-27.
3. Ardekani, A. M.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F., 3rd, Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* **2002**, 2, (4), 312-20.
4. Bandera, C. A.; Tsui, H. W.; Mok, S. C.; Tsui, F. W., Expression of cytokines and receptors in normal, immortalized, and malignant ovarian epithelial cell lines. *Anticancer Res* **2003**, 23, (4), 3151-7.
5. Conrads, T. P.; Fusaro, V. A.; Ross, S.; Johann, D.; Rajapakse, V.; Hitt, B. A.; Steinberg, S. M.; Kohn, E. C.; Fishman, D. A.; Whitely, G.; Barrett, J. C.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F., 3rd; Veenstra, T. D., High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer* **2004**, 11, (2), 163-78.
6. Conrads, T. P.; Zhou, M.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L.; Veenstra, T. D., Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn* **2003**, 3, (4), 411-20.
7. Fields, M. M.; Chevlen, E., Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs* **2006**, 10, (1), 77-81.
8. Johann, D. J., Jr.; McGuigan, M. D.; Patel, A. R.; Tomov, S.; Ross, S.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Fishman, D. A.; Whiteley, G. R.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L. A., Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann N Y Acad Sci* **2004**, 1022, 295-305.
9. Kohn, E. C.; Mills, G. B.; Liotta, L., Promising directions for the diagnosis and management of gynecological cancers. *Int J Gynaecol Obstet* **2003**, 83 Suppl 1, 203-9.
10. Rapkiewicz, A. V.; Espina, V.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L. A., Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* **2004**, 40, (17), 2604-12.
11. Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A.; Levine, P. J.; Fusaro, V. A.; Steinberg, S. M.; Mills, G. B.; Simone, C.; Fishman, D. A.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A., Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **2002**, 359, (9306), 572-7.
12. Bergen, H. R., 3rd; Vasmatazis, G.; Cliby, W. A.; Johnson, K. L.; Oberg, A. L.; Muddiman, D. C., Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis Markers* **2003**, 19, (4-5), 239-49.
13. Diamandis, E. P., Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* **2002**, 360, (9327), 170; author reply 170-1.
14. Engwegen, J. Y.; Gast, M. C.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H., Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, 27, (5), 251-9.
15. Fung, E. T.; Yip, T. T.; Lomas, L.; Wang, Z.; Yip, C.; Meng, X. Y.; Lin, S.; Zhang, F.; Zhang, Z.; Chan, D. W.; Weinberger, S. R., Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer* **2005**, 115, (5), 783-9.

16. Kikuchi, N.; Horiuchi, A.; Osada, R.; Imai, T.; Wang, C.; Chen, X.; Konishi, I., Nuclear expression of S100A4 is associated with aggressive behavior of epithelial ovarian carcinoma: an important autocrine/paracrine factor in tumor progression. *Cancer Sci* **2006**, 97, (10), 1061-9.
17. Rai, A. J.; Zhang, Z.; Rosenzweig, J.; Shih le, M.; Pham, T.; Fung, E. T.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* **2002**, 126, (12), 1518-26.
18. Xiao, Z.; Prieto, D.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Issaq, H. J., Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* **2005**, 230, (1-2), 95-106.
19. Zhu, Y.; Wu, R.; Sangha, N.; Yoo, C.; Cho, K. R.; Shedden, K. A.; Katabuchi, H.; Lubman, D. M., Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics* **2006**, 6, (21), 5846-56.
20. Lemaire, R.; Menguellat, S. A.; Stauber, J.; Marchaudon, V.; Lucot, J. P.; Collinet, P.; Farine, M. O.; Vinatier, D.; Day, R.; Ducoroy, P.; Salzet, M.; Fournier, I., Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J Proteome Res* **2007**, 6, (11), 4127-34.
21. Deininger, S. O.; Ebert, M. P.; Futterer, A.; Gerhard, M.; Rocken, C., MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *J Proteome Res* **2008**.
22. Walch, A.; Rauser, S.; Deininger, S. O.; Hofler, H., MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol* **2008**, 130, (3), 421-34.
23. Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I., MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem* **2006**, 78, (20), 7145-53.
24. Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I., Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* **2006**, 78, (3), 809-19.
25. Holle, A.; Haase, A.; Kayser, M.; Hohndorf, J., Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J Mass Spectrom* **2006**, 41, (6), 705-16.
26. Fournier, I., Lemaire, R., Wisztorski, M., Stauber, J., Jardin-Mathè, O., Van Camp, C., Deschamps, M., Proess, G., Day, R., Salzet, M., New insight in sample preparation for MALDI imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome. *Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Wastington, May 30-June 2* **2006**.
27. Stauber, J., Lemaire, R., Wisztorski, M., Ait-Menguellat, S., Lucot, J.P., Vinatier, D., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudolf, I., Salzet, M., Fournier, I. , New developments in MALDI imaging mass spectrometry for pathological proteomic studies; Introduction to a novel concept, the specific MALDI imaging. *Mol Cell Proteomics* **2006**, 5, S247-S249.
28. Lemaire, R.; Stauber, J.; Wisztorski, M.; Van Camp, C.; Desmons, A.; Deschamps, M.; Proess, G.; Rudlof, I.; Woods, A. S.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I., Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res* **2007**, 6, (6), 2057-67.
29. Krug, A.; Towarowski, A.; Britsch, S.; Rothenfusser, S.; Hornung, V.; Bals, R.; Giese, T.; Engelmann, H.; Endres, S.; Krieg, A. M.; Hartmann, G., Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid

- dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **2001**, 31, (10), 3026-37.
30. Hibbs, K.; Skubitz, K. M.; Pambuccian, S. E.; Casey, R. C.; Burlison, K. M.; Oegema, T. R., Jr.; Thiele, J. J.; Grindle, S. M.; Bliss, R. L.; Skubitz, A. P., Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol* **2004**, 165, (2), 397-414.
31. Schweigert, F. J., Characterisation of protein microheterogeneity and protein complexes using on-chip immunoaffinity purification-mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic* **2005**, 4, (1), 7-15.
32. Bengtsson, S.; Krogh, M.; Szigyarto, C. A.; Uhlen, M.; Schedvins, K.; Silfversward, C.; Linder, S.; Auer, G.; Alaiya, A.; James, P., Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers. *J Proteome Res* **2007**, 6, (4), 1440-50.
33. Gortzak-Uzan, L.; Ignatchenko, A.; Evangelou, A. I.; Agochiya, M.; Brown, K. A.; St Onge, P.; Kireeva, I.; Schmitt-Ulms, G.; Brown, T. J.; Murphy, J.; Rosen, B.; Shaw, P.; Jurisica, I.; Kislinger, T., A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res* **2008**, 7, (1), 339-51.
34. Makino, E.; Sakaguchi, M.; Iwatsuki, K.; Huh, N. H., Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med* **2004**, 82, (9), 612-20.
35. Sakaguchi, M.; Miyazaki, M.; Sonogawa, H.; Kashiwagi, M.; Ohba, M.; Kuroki, T.; Namba, M.; Huh, N. H., PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol* **2004**, 164, (7), 979-84.
36. Yang, Z.; Tao, T.; Raftery, M. J.; Youssef, P.; Di Girolamo, N.; Geczy, C. L., Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol* **2001**, 69, (6), 986-94.
37. Giuntoli, R. L., 2nd; Webb, T. J.; Zoso, A.; Rogers, O.; Diaz-Montes, T. P.; Bristow, R. E.; Oelke, M., Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity. *Anticancer Res* **2009**, 29, (8), 2875-84.
38. Yang, Y.; Fruh, K.; Ahn, K.; Peterson, P. A., In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* **1995**, 270, (46), 27687-94.
39. Kloetzel, P. M., The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Ther* **1998**, 5, (10), 1297-8.
40. Rivett, A. J.; Gardner, R. C., Proteasome inhibitors: from in vitro uses to clinical trials. *J Pept Sci* **2000**, 6, (9), 478-88.
41. Rotem-Yehudar, R.; Groettrup, M.; Soza, A.; Kloetzel, P. M.; Ehrlich, R., LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* **1996**, 183, (2), 499-514.
42. Kuckelkorn, U.; Ruppert, T.; Strehl, B.; Jungblut, P. R.; Zimny-Arndt, U.; Lamer, S.; Prinz, I.; Drung, I.; Kloetzel, P. M.; Kaufmann, S. H.; Steinhoff, U., Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med* **2002**, 195, (8), 983-90.
43. Regad, T.; Saib, A.; Lallemand-Breitenbach, V.; Pandolfi, P. P.; de The, H.; Chelbi-Alix, M. K., PML mediates the interferon-induced antiviral state against a

complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J* **2001**, 20, (13), 3495-505.

44. Delp, K.; Momburg, F.; Hilmes, C.; Huber, C.; Seliger, B., Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* **2000**, 25 Suppl 2, S88-95.

45. Elg, S. A.; Mayer, A. R.; Carson, L. F.; Twiggs, L. B.; Hill, R. B.; Ramakrishnan, S., Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovaria carcinoma. *Cancer* **1997**, 80, (8), 1448-56.

46. Nosov, V.; Su, F.; Amneus, M.; Birrer, M.; Robins, T.; Kotlerman, J.; Reddy, S.; Farias-Eisner, R., Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* **2009**, 200, (6), 639 e1-5.

47. Kim, K. D.; Lim, H. Y.; Lee, H. G.; Yoon, D. Y.; Choe, Y. K.; Choi, I.; Paik, S. G.; Kim, Y. S.; Yang, Y.; Lim, J. S., Apolipoprotein A-I induces IL-10 and PGE2 production in human monocytes and inhibits dendritic cell differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, 338, (2), 1126-36.

48. Liang, X.; Lin, T.; Sun, G.; Beasley-Topliffe, L.; Cavaillon, J. M.; Warren, H. S., Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J Leukoc Biol* **2009**, 86, (2), 229-35.

49. Leygue, E.; Snell, L.; Dotzlaw, H.; Hole, K.; Hiller-Hitchcock, T.; Roughley, P. J.; Watson, P. H.; Murphy, L. C., Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res* **1998**, 58, (7), 1348-52.

50. Leygue, E.; Snell, L.; Dotzlaw, H.; Troup, S.; Hiller-Hitchcock, T.; Murphy, L. C.; Roughley, P. J.; Watson, P. H., Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol* **2000**, 192, (3), 313-20.

51. Babelova, A.; Moreth, K.; Tsalas-Greul, W.; Zeng-Brouwers, J.; Eickelberg, O.; Young, M. F.; Bruckner, P.; Pfeilschifter, J.; Schaefer, R. M.; Groene, H. J.; Schaefer, L., Biglycan: A danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem* **2009**.

52. Schaefer, L.; Babelova, A.; Kiss, E.; Hausser, H. J.; Baliova, M.; Krzyzankova, M.; Marsche, G.; Young, M. F.; Mihalik, D.; Gotte, M.; Malle, E.; Schaefer, R. M.; Grone, H. J., The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest* **2005**, 115, (8), 2223-33.

53. Salzet, M.; Capron, A.; Stefano, G. B., Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today* **2000**, 16, (12), 536-40.

54. Kitagawa, K.; Murata, A.; Matsuura, N.; Tohya, K.; Takaichi, S.; Monden, M.; Inoue, M., Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-beta1. *Int J Cancer* **1996**, 66, (1), 91-7.

55. Keshamouni, V. G.; Michailidis, G.; Grasso, C. S.; Anthwal, S.; Strahler, J. R.; Walker, A.; Arenberg, D. A.; Reddy, R. C.; Akulapalli, S.; Thannickal, V. J.; Standiford, T. J.; Andrews, P. C.; Omenn, G. S., Differential protein expression profiling by iTRAQ-2DLC-MS/MS of lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition reveals a migratory/invasive phenotype. *J Proteome Res* **2006**, 5, (5), 1143-54.

56. Woo, M. M.; Alkushi, A.; Verhage, H. G.; Magliocco, A. M.; Leung, P. C.; Gilks, C. B.; Auersperg, N., Gain of OGP, an estrogen-regulated oviduct-specific glycoprotein, is associated with the development of endometrial hyperplasia and endometrial cancer. *Clin Cancer Res* **2004**, 10, (23), 7958-64.

57. Woo, M. M.; Gilks, C. B.; Verhage, H. G.; Longacre, T. A.; Leung, P. C.; Auersperg, N., Oviductal glycoprotein, a new differentiation-based indicator present in early ovarian epithelial neoplasia and cortical inclusion cysts. *Gynecol Oncol* **2004**, 93, (2), 315-9.
58. Wahl, A.; McCoy, W.; Schafer, F.; Bardet, W.; Buchli, R.; Fremont, D. H.; Hildebrand, W. H., T Cell Tolerance for Variability in a Class I HLA Presented Influenza A Virus Epitope. *J Virol* **2009**.

Figures Legends

Table 1: forward and reverse primer sequences used in RT-PCR are shown 5' to 3'.

Table 2: Biomarkers identified by nanoLC-IT-MS in MS/MS mode from 10 patients with ovarian cancer absent in 10 benign tumors

Figure 1: MALDI imaging localization of the fragment of Reg alpha (m/z 9744) in ovarian carcinoma (A, B) validated with a specific antibody directed against the C-terminal part of Reg alpha (the specific region of the fragment) (C).

Figure 2: Example of Principal component analysis (PCA) of an ovary tumor section using the Clinprot tool (Brucker).

A- A mucinous ovarian carcinoma section containing tumor and healthy parts submitted to automatic matrix deposition using a micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu). Localization of the C-terminal part of reg-alpha (m/z 9744) biomarker confirming the localization of the tumor portion of the biopsy slice

B- PCA analyses through PC1, PC2 and PC3 of the mucinous ovarian carcinoma.

C- Statistical PCA analyses with PC1 as tumor and PC2 as healthy tissue. Localization of tumor biomarker vs. protein present in the healthy part.

D- Zoomed view of the most differentiated m/z corresponding to part of the specific tumor biomarkers. (same experiments were conducted on

Figure 3 : Molecular localization in tumors of the most differentiated m/z corresponding to specific tumor biomarkers.

Figure 4 : Molecular localization in the healthy part of the most differentiated m/z corresponding to specific healthy makers.

Figure 5 :

Clustering analysis after an unsupervised PCA statistical study of the mucinous ovarian carcinoma biopsy.

a,b,c correspond to the carcinoma branches

d,e,f correspond to the healthy part branches

The subdivided branches sub-classify tissue into tumor and healthy regions.

Figure 6 :

MALDI-MS profiles of three ovarian carcinomas after tissue trypsin digestion using an automatic micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu) vs. benign tumor; a zoom of the peptide 1160.5 is performed. This peptide is present in the three ovarian carcinomas and absent in the benign tumor.
(Inset corresponds to the zoom of the 1160.5 region.)

Figure 7 :

- a- MALDI MS/MS sequencing of 1160.5 using MALDI TOF-TOF
- b- Sequence (WFYIASAFR) in red corresponding to the fragment identified by MS-MS and localized in the orosomucoid-1 protein.
- c- RT-PCR amplification of orosomucoid from mRNA extracted biopsy (5 carcinoma vs 5 benign).
- d- RT-PCR amplification of orosomucoid and Reg-alpha (PSME1) from SKOV-3 cell lines.

Figure 8:

- a- MALDI specific imaging using the TAG-MASS concept with a polyclonal anti-Ct Reg alpha antibody tagged with a reporter (with a mass of 1309) and a monoclonal anti-orosomucoid tagged with another reporter (with a mass of 1569).
- b- Merge of specific MALDI imaging molecular images of the C-terminal fragment of Reg alpha and orosomucoid.
- c- MALDI imaging molecular images of the C-terminal fragment of Reg alpha and orosomucoid with the correspondence of the two subclass's localization in the tumor part; each biomarker is characteristic of one region.

Figure 9 : MALDI Molecular images of the identified proteins by nanoLC-ITMS reconstructed on their tryptic digested fragment. Directly detected on tissue.

Figure 10

RT-PCR amplification of Toll-like receptors from SKOV-3 cell lines.

Figure 11

a- Gene expression of cofilin-1 and profilin mRNA in SKOV-3. After 24 h of TGF- β stimulation,

GAPDH and actin were used as loading controls. The expression of cofilin-1 and profilin is higher in SKOV-3 cells treated with TGF- β than in control cells. Inset: Western blot characterization of cofilin-1 (COF) and profilin-1 (PROF). Protein lysates were prepared from control cells and cells treated with TGF- β 10 ng/ml for 24 h. The bands were visualized using an ECL system. The proteins are located at 18 and 15 kDa, respectively

b,c- Confocal analyses of SKOV-3 cells after TGF- β stimulation. Antibody raised against actin was used to detect filamentous actin cytoskeleton under stimulation (b) or not (a). Protusive structures and actin stress fibers are clearly visible only in treated cells (b)

Table 2: identified protein as biomarkers after nanoLC-IT-MS in MS/MS mode from collected samples after slice tissue washing and trypsin digestion.

Access Number	Protein Name	Mascot Score (average)	Sequence coverage (Average)
P08670_CHAIN_0	Vimentin	89.6 \pm 22.3	27 \pm 10%
P51884_CHAIN_0	Lumican Precursor	63.6 \pm 5.7	19.3 \pm 4%
P02647_CHAIN_1	Apolipoprotein 1	49.9 \pm 4	21.6 \pm 4.9 %
P51888_CHAIN_0	Prolargin	52.5 \pm 0.7	17 \pm 0.8 %
Q12889_CHAIN_0	Oviductin (mucin-9)	47.8 \pm 1.3	13.3 \pm 1.2%
Q01995_CHAIN_0	Transgelin	49.5 \pm 2.48	26 \pm 2.44%
P02765	Orosomuroid	45 \pm 2.44	20.8 \pm 1.8%
P02787_CHAIN_0	Siderophilin	38.1 \pm 2.2	12 \pm 4.8%
P01009_ISOFORM_2	Alpha 1 antiprotease	29.8 \pm 1.6	21 \pm 3.2%
P08727	Cytokeratin 19	29.3 \pm 1.75	10 \pm 1.6%
	Phosphatidyl Ethanolamine Binding		
P30086_CHAIN_0	Protein	28.1 \pm 0.9	23 \pm 2%
P31949	Protein S100 A11	22.6 \pm 0.25	24.5 \pm 0.5%
P02790_CHAIN_0	Hemopexin	21.0 \pm 0.4	6.5 \pm 1.2%
P07737_CHAIN_0	Profilin -1	18.3 \pm 0.9	15.4 \pm 4.7%

Table 3 : Trypsic digested fragment of proteins identified by NanoLC-IT-MS in MS/MS and found on tissue after bottom-up strategy

Orosomucoide		Oviductal Glycoprotein 1		Alpha Anti-Protease 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1160.59	WFYIASAFR	1118.68	FIASVISLLR	1015.6	SVLGQLGITK
1559.83	ITGKWFYIAS AFR	1120.6	LIMGIPTYGR	1110.59	LSITGTYDLK
1752.83	YVGGQEHFA HLLILR	1288.62	FTTMLSTFAN R	1568.78	ECGGVFTDPKGI FK
		1248.54	SSAYAMNYW R		
		1508.77	TLLSIGGWNF GTSR		
Siderophilin		Reg alpha C-terminal		Profilin-1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1577.8	TAGWNIPMGL LYNK	1500.98	QLVHELDEAE YR	1643.9	TFVNITPAEVLG LVGK
		1518.2	IEDGNNFGVA V QEK	1470.7	SSFYVNGLTLGG QK
Prolargin		Transgelin		Hemopexin	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.5 9	SFPNLAFIR	1204.7	TLMALGSLAV TK	1141.5 8	GGYTLVSGYPK
1309.7	LPGLVFLYME K	1530.7	TDMFQTVDLF EGK	1120.5 99	NFPSPVDAAFR
1352.7 1	NQLEEVPSALP R	1221.62	QMEQVAQFLK		
1549.8 56	NLMQLNLAHN ILR				

Vimentin		S100		Lumican	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1254.5	LGDLYEER MR	1060.48	DGYNYTLSK	1178.63	LKEDAVSAAF K
1169.70	ILLAELEQL K	1849.89	TEFLSFMNTELAAF TK	1024.55	FNALQYLR
1428.7	SLYASSPGG VYATR			1297.66	SLEDLQLTHNK
1533.84	KVESLQEEI AFLK			1180.65	RFNALQYLR
1570.88	ISLPLPNFSS LNLR				
Cytokeratin 19		Phosphatidylethanolamine-binding		Apolipoprotein 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.09	SFPNLAFIR	1560.8	LYTLVLTDPDAPS R	1031.51	LSPLGEEMR
1365.7	SRLEQEIA TYR	1632.79	NRPTSISWDGLDS GK	1301.64	THLAPYSDEL R
1389.67	AALEDTL AETEAR	1949.93	GNDISSGTVLSDY VGSGPPK	1386.7	VSFLSALEEY T K
1586.83	LEHLYLNN NSIEK			1230.7	QGLLPVLESFK

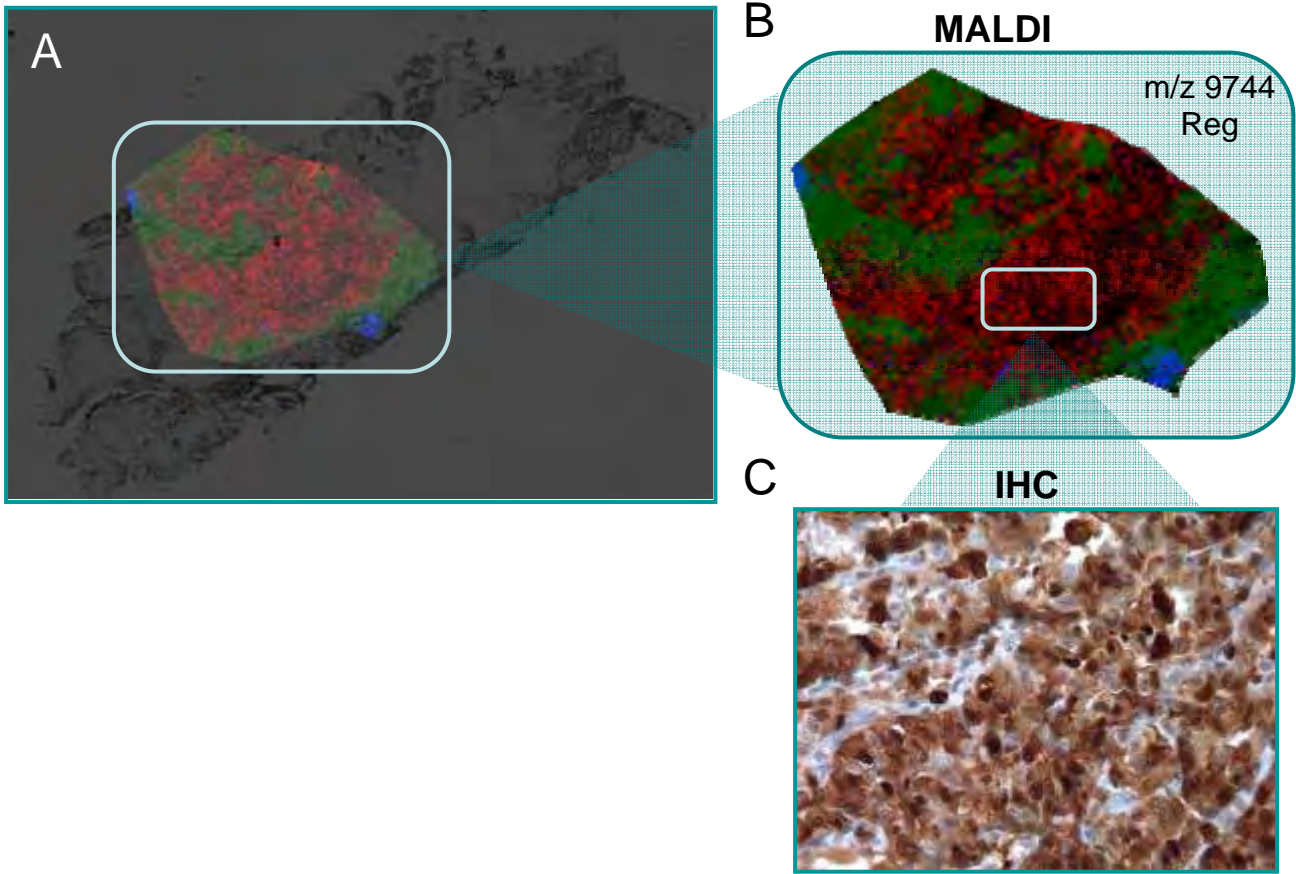


Figure 1

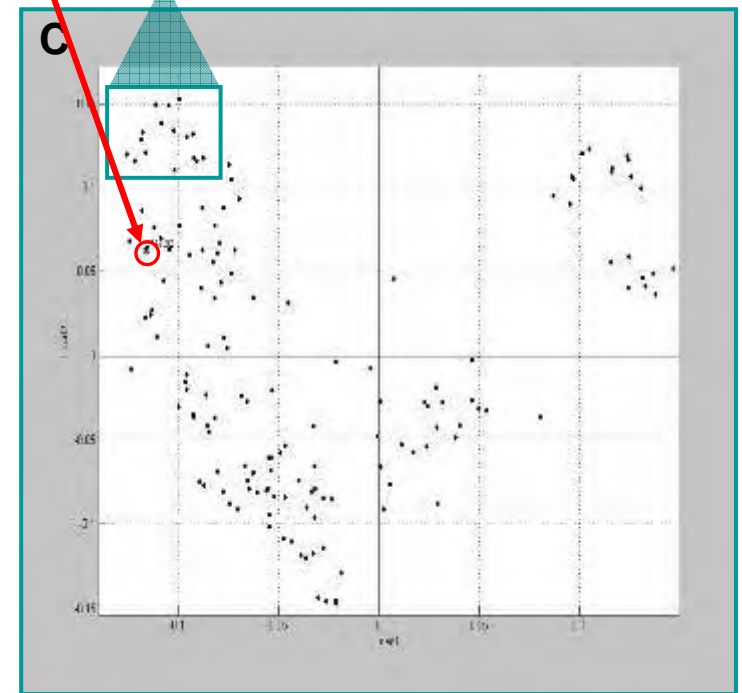
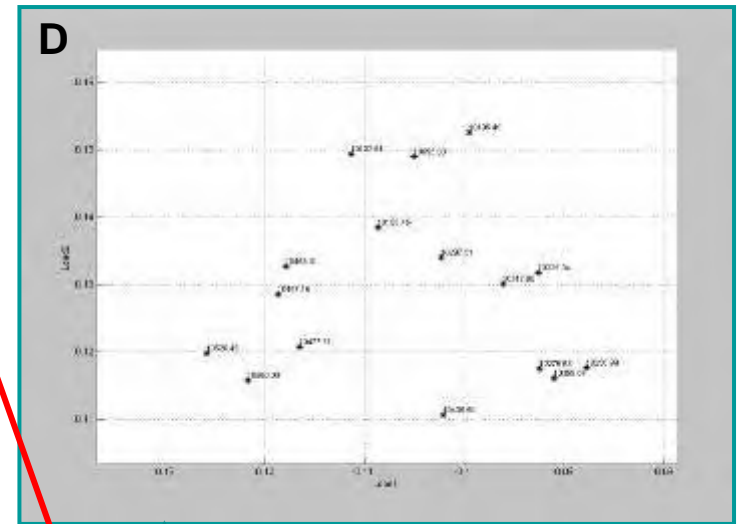
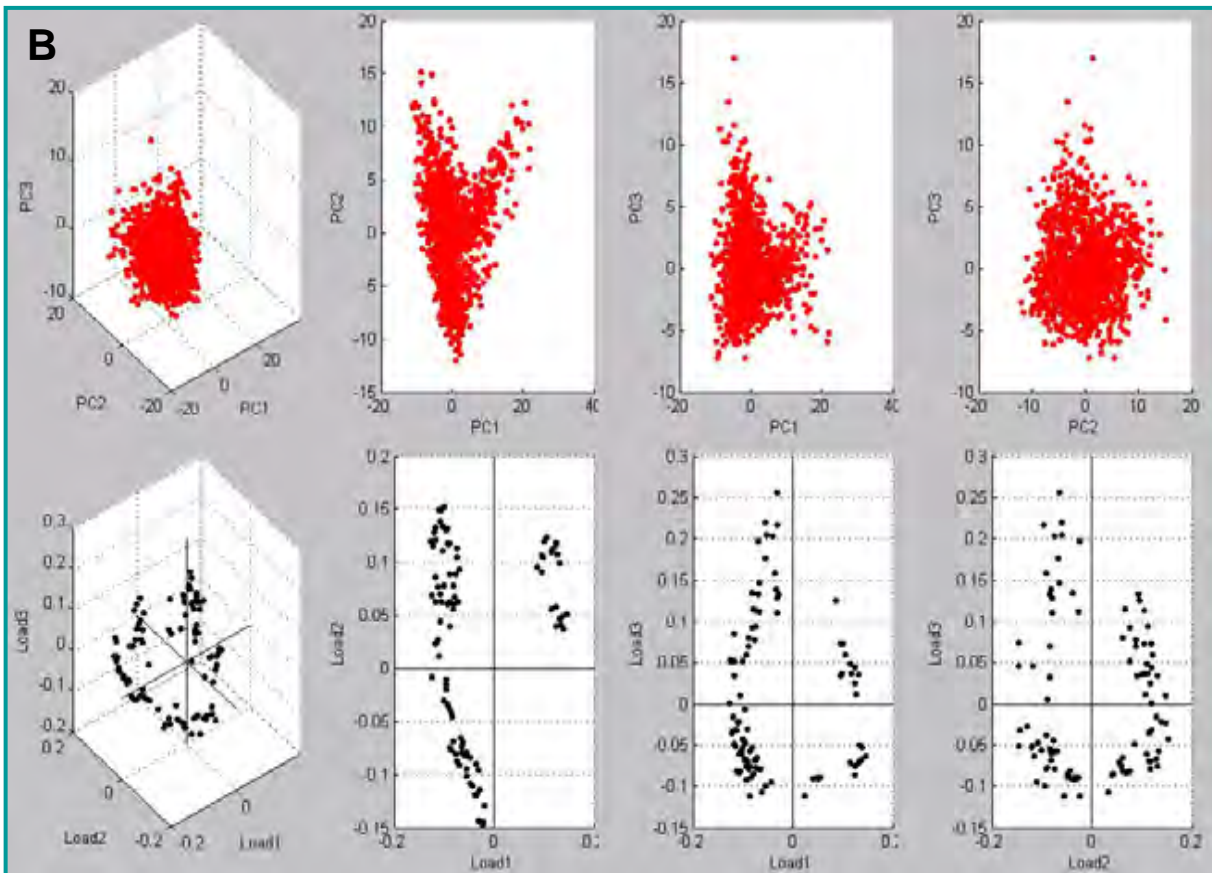
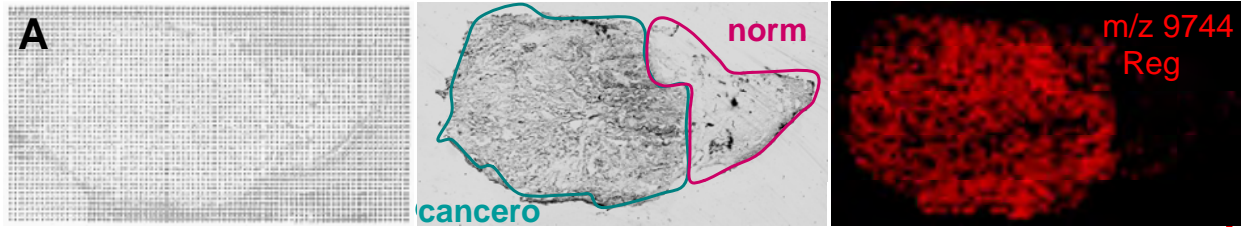


Figure 2

Figure 3

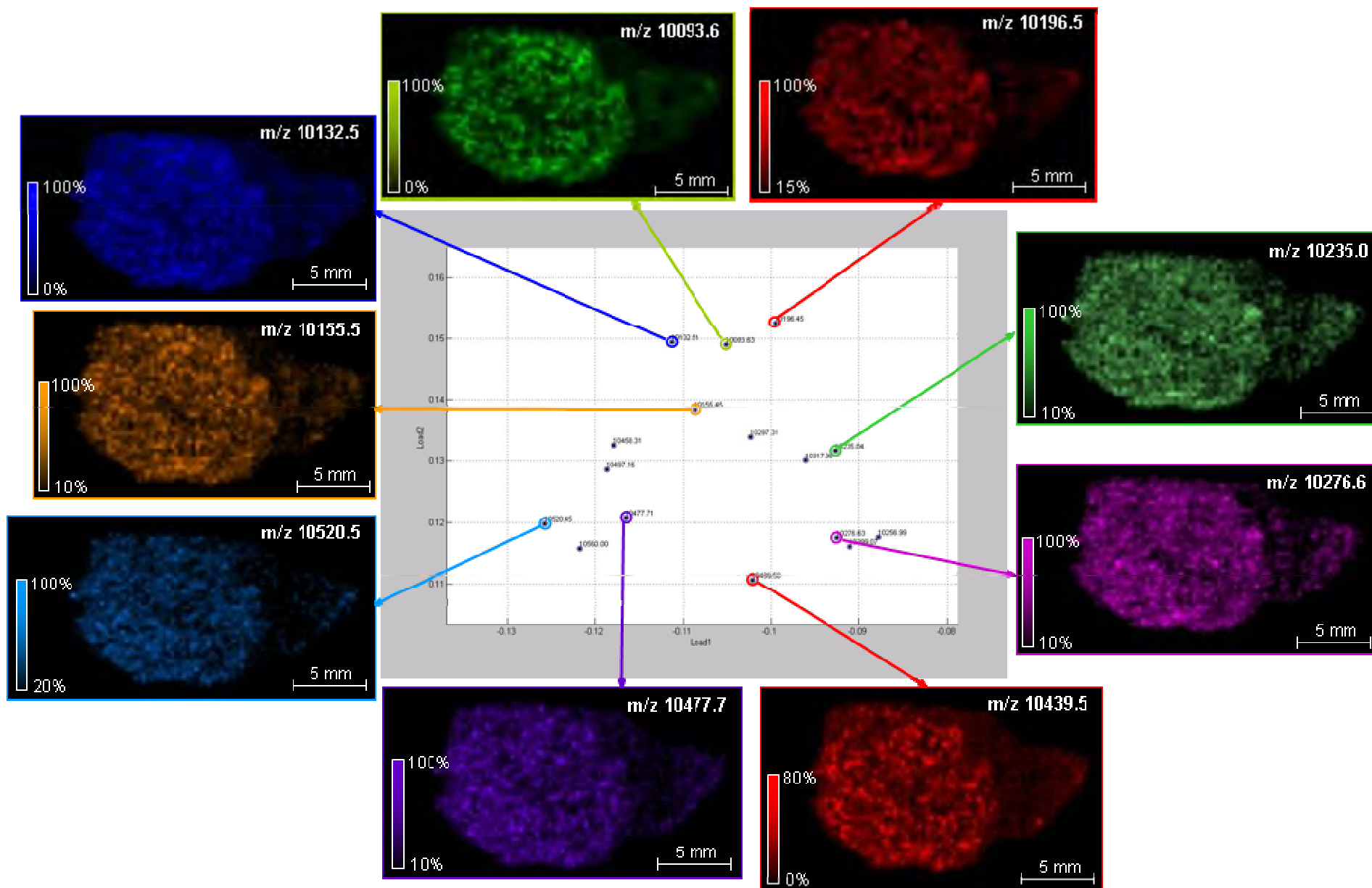


Figure 4

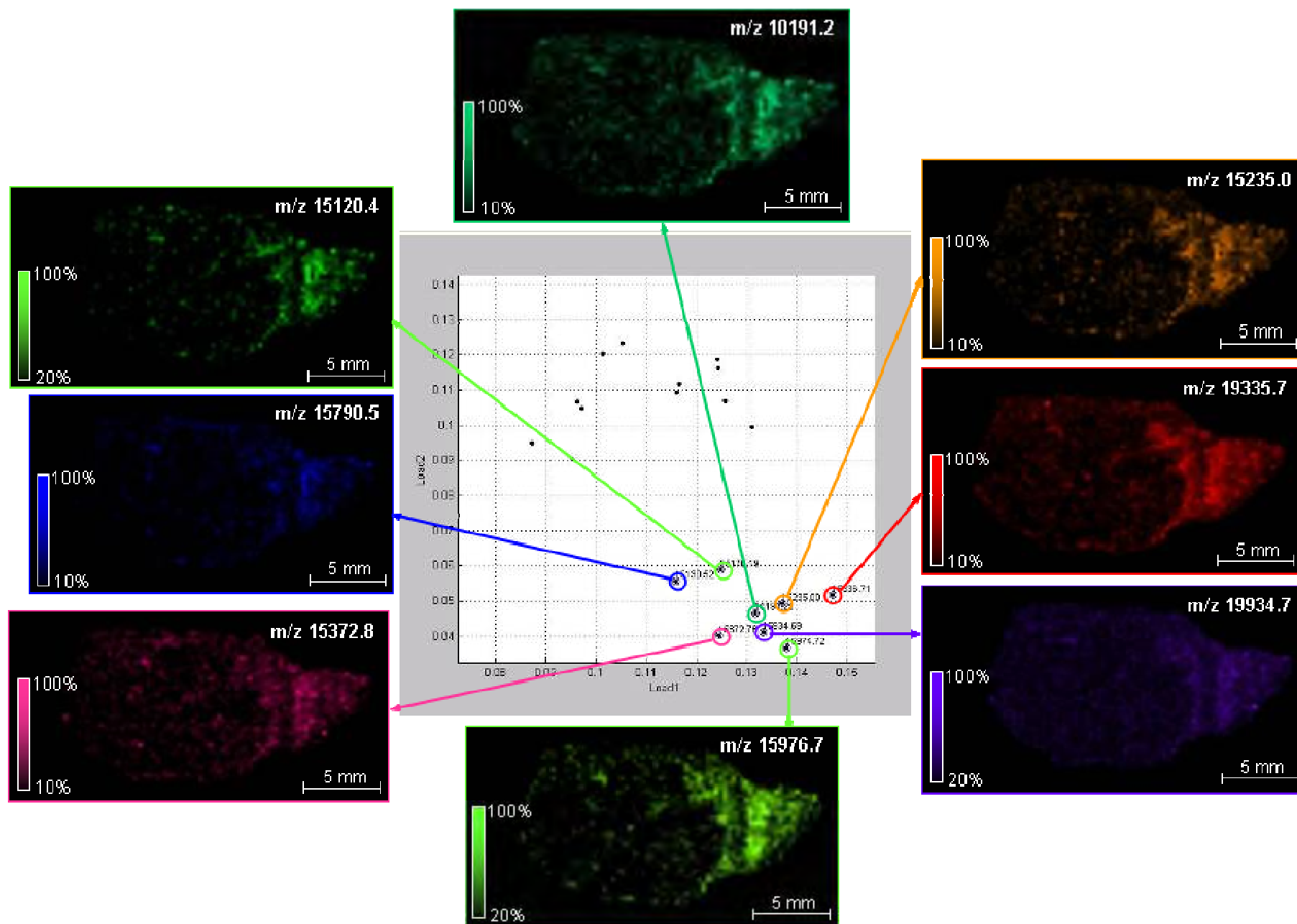


Figure 5

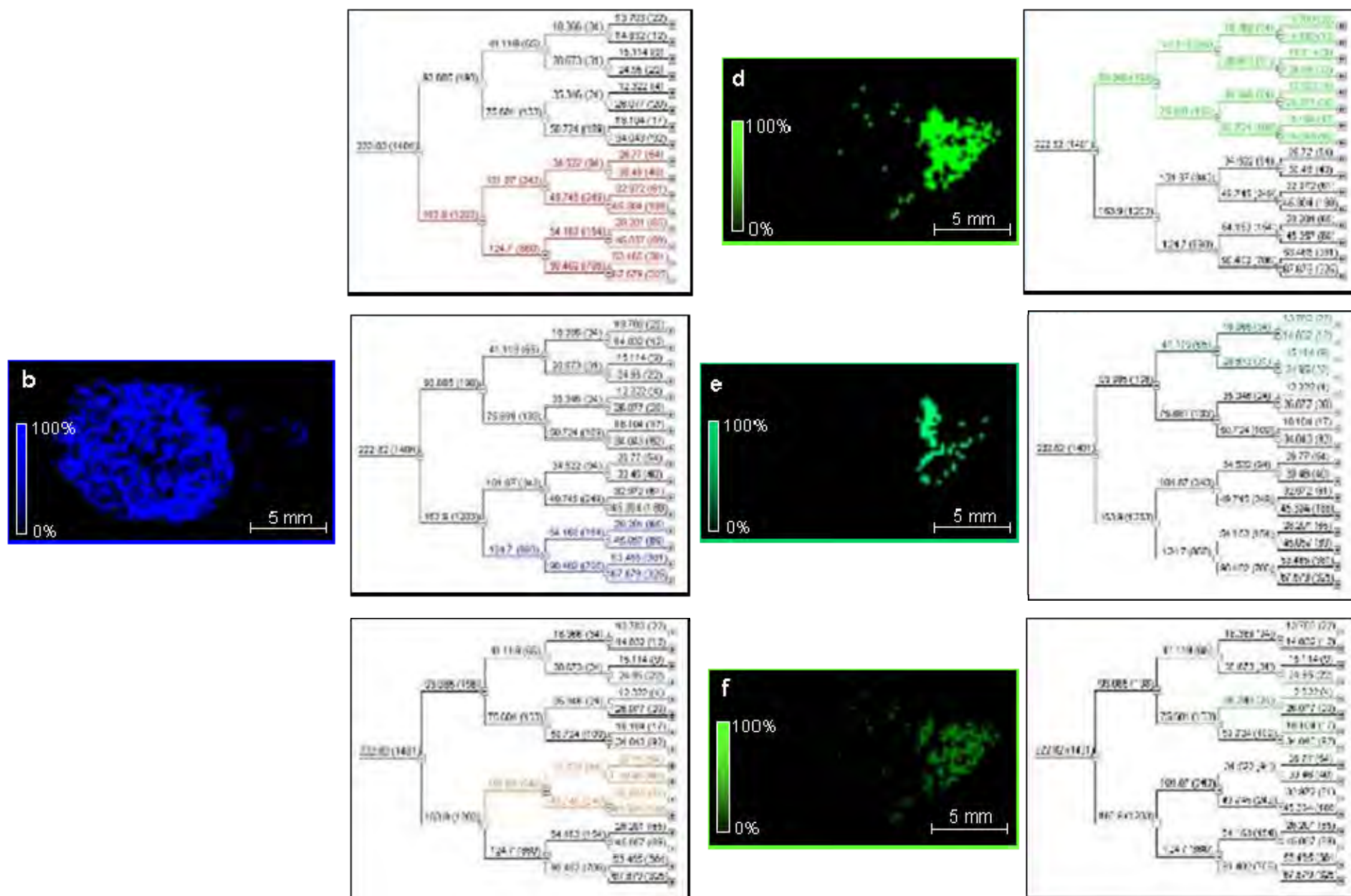


Figure 6

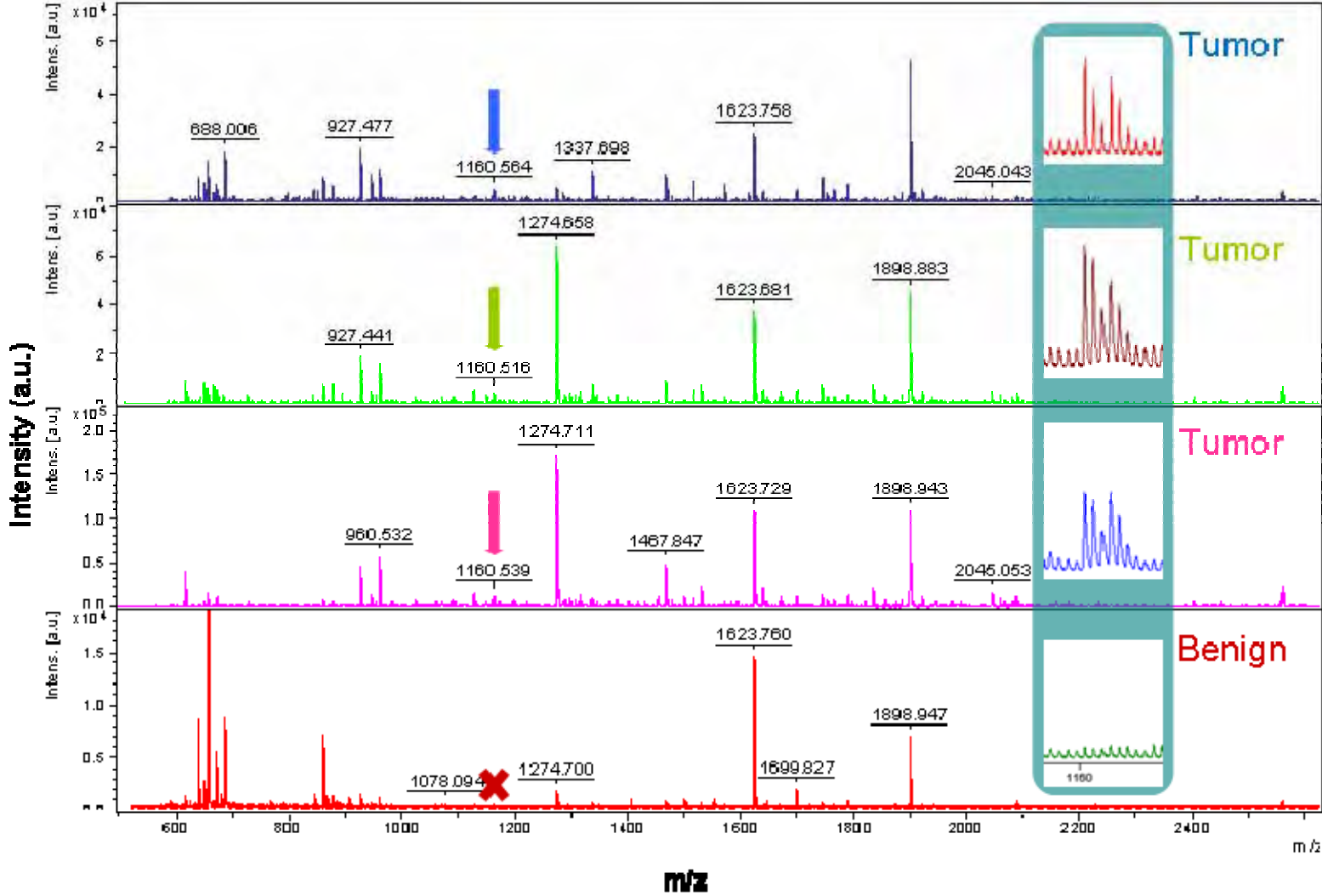


Figure 7

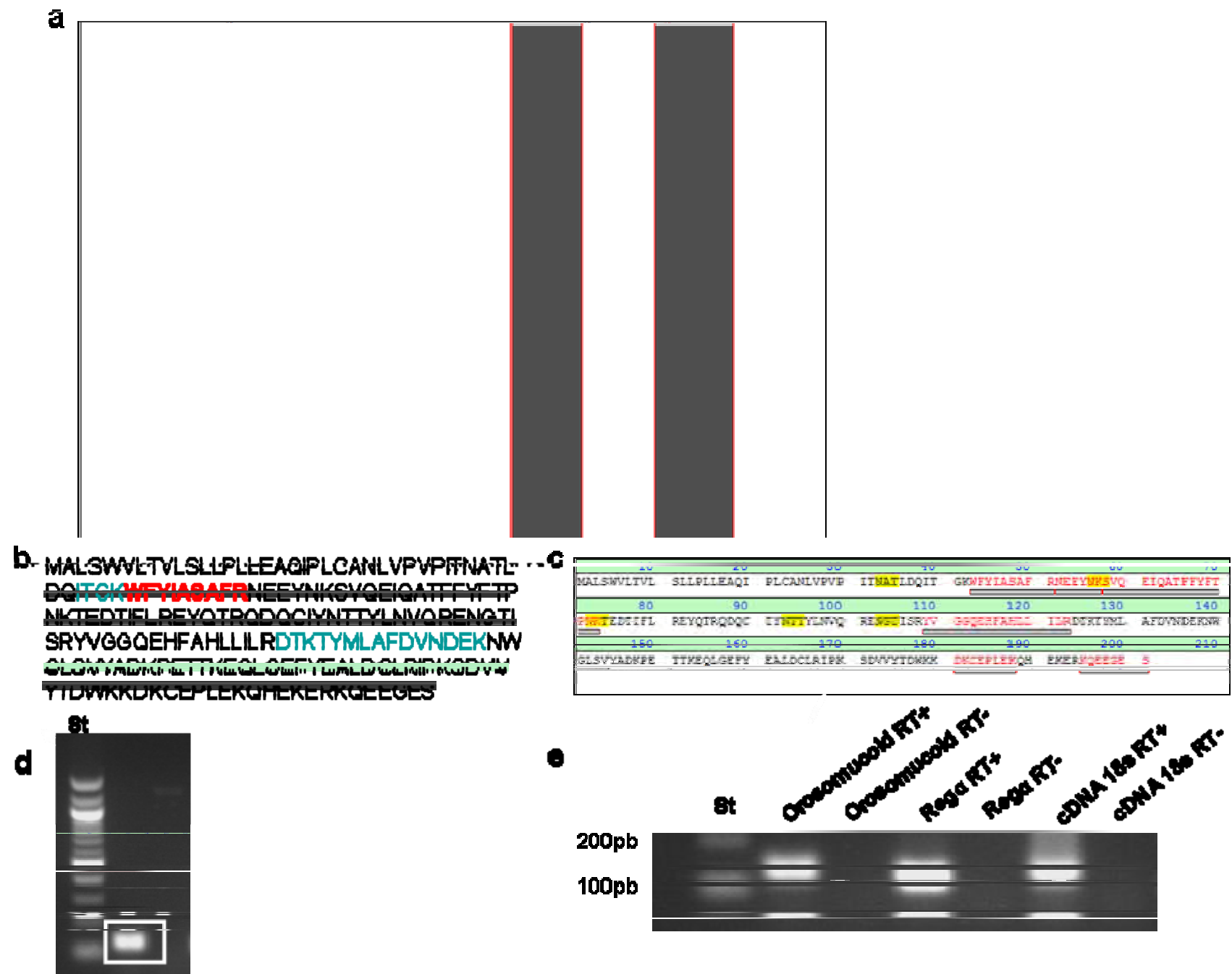


Figure 8

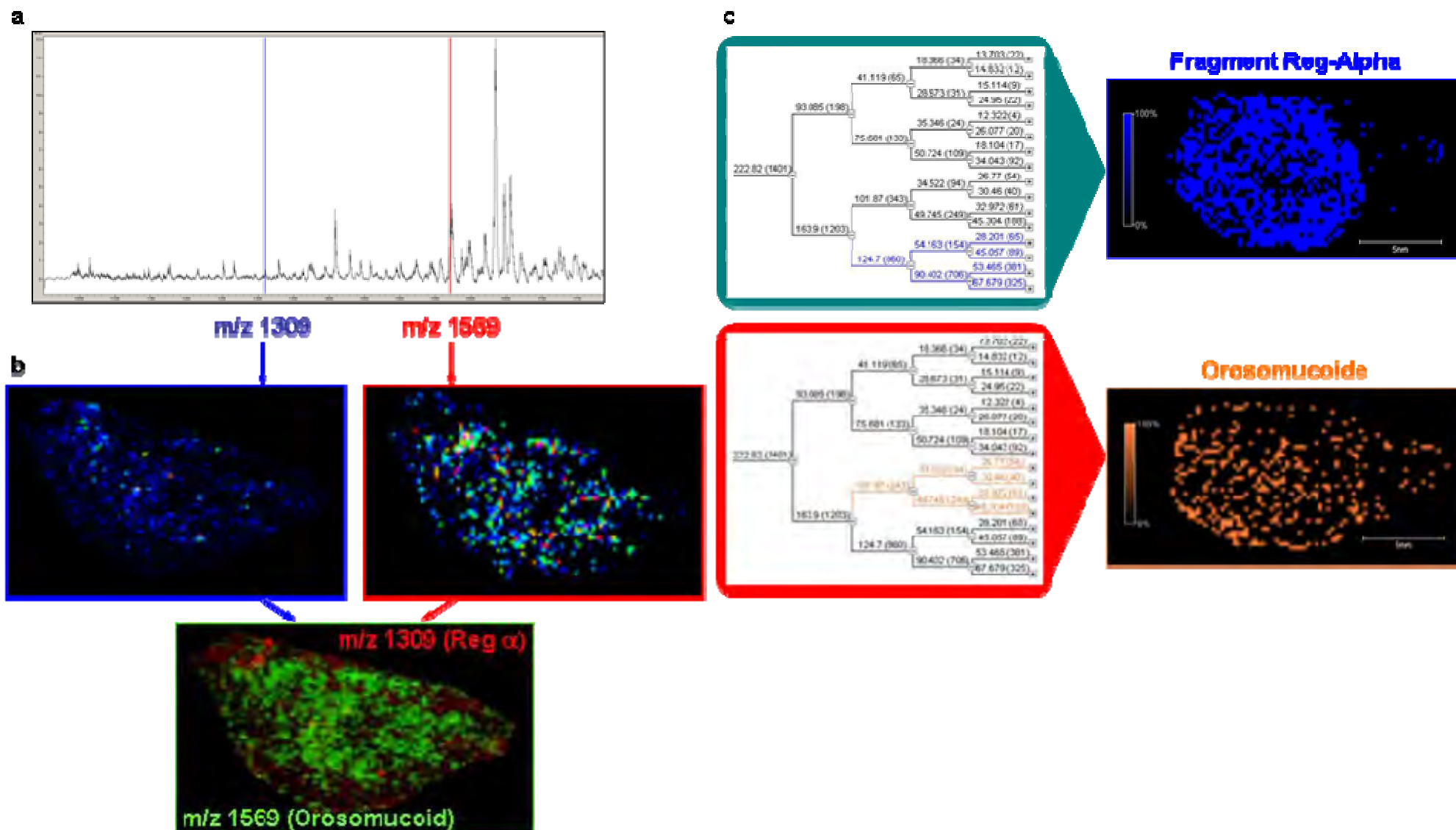
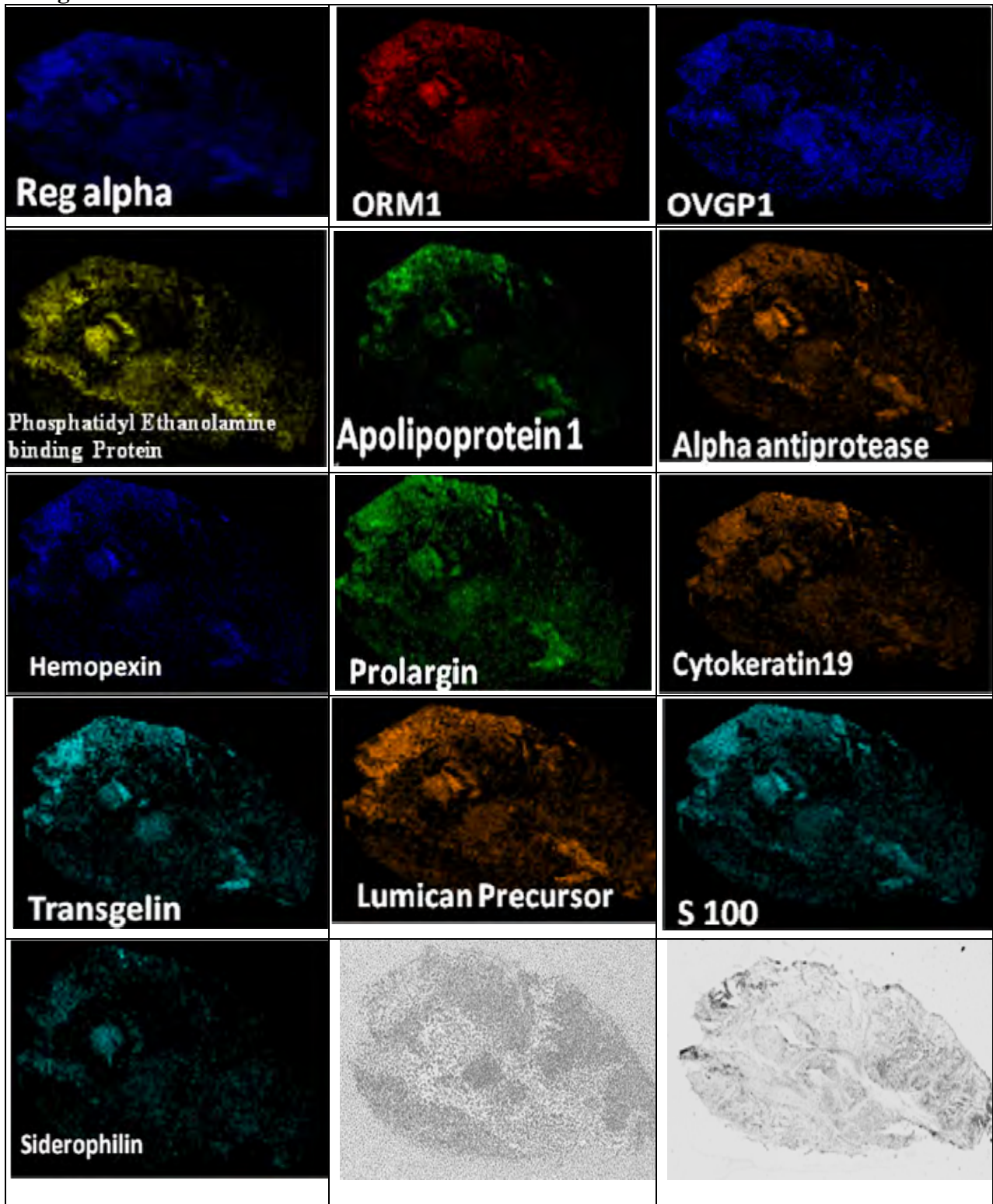


Figure 9



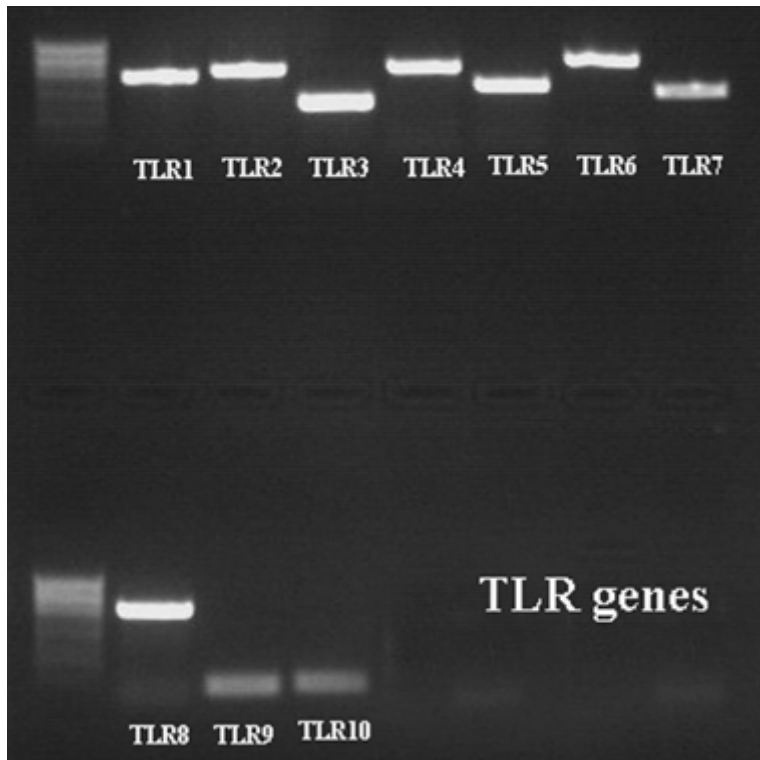


Figure 10

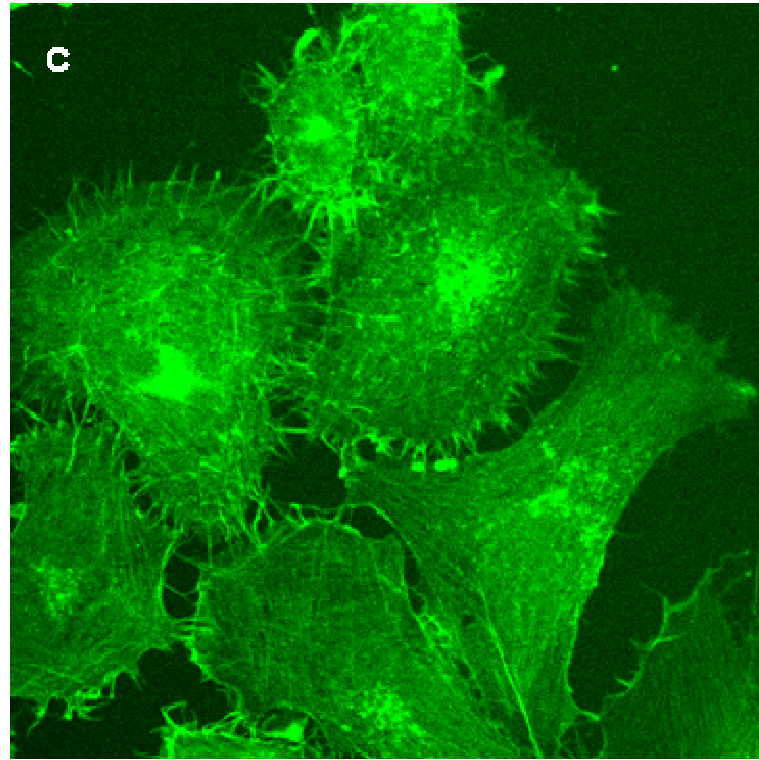
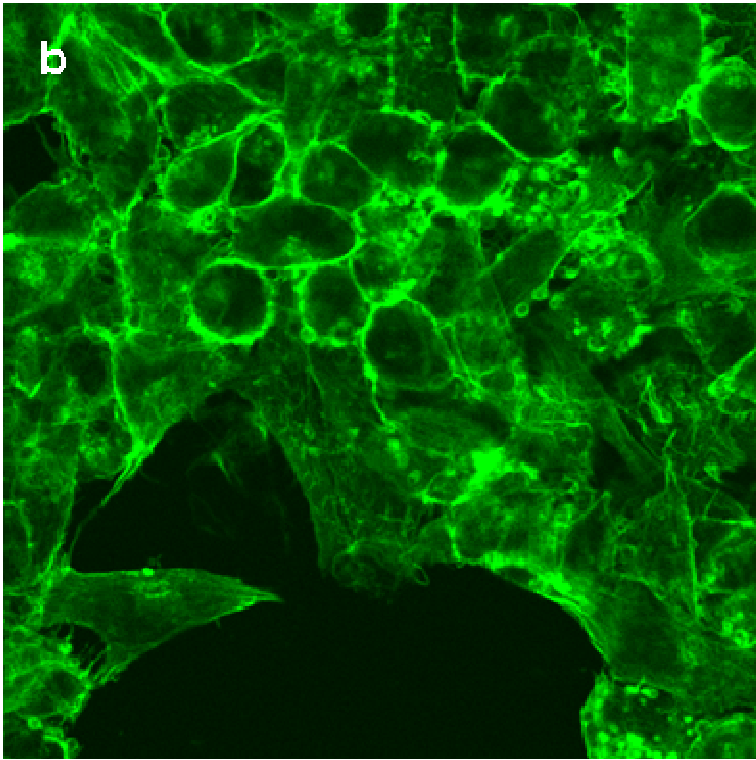
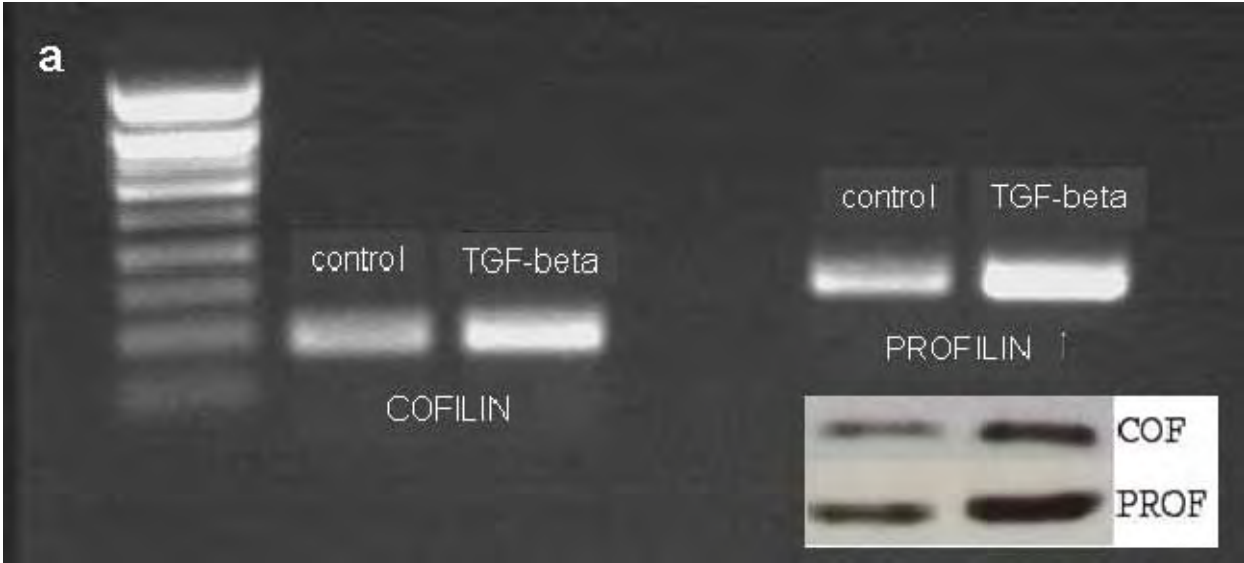


Figure 11

Abstract

Lipids are metabolites which can be declined in many classes. Most of them are known to figure as structural molecules in the cell membrane but a significant key role is also played as cellular messenger when interacting with specific membrane receptors. The leech *Hirudo medicinalis* which is a model for the neurosciences is able to regenerate its central nervous system (CNS) after a lesion in opposition with the CNS of vertebrate. In this way, we showed by Tof-SIMS imaging changes in the lipidome of harmed leech brain directly on tissue. In particular lipids such as fatty acids and triglycerides have been characterized during injuries of the leech CNS. These lipids were expressed in specific areas of damaged neurons. We also characterized endocannabinoids in crude lipid extracts of harmed leech brain by MALDI-Tof mass spectrometry. The identified endocannabinoids anandamide (AEA) and 2-arachidonyl glycerol (2AG) are lipids which act as cellular messenger. During the injury of the leech brain, an increase in the 2AG concentration in the brain were demonstrated while AEA was decreasing. As a consequence, a modulation in the chemotactic effect on microglial cells was observed in the harmed connective. 2AG and AEA have also been demonstrated to regulate the NO release in activated microglia under neurotoxic rate.

A new approach in developmental research in lipidomic using MALDI imaging mass spectrometry allowed us to validate for the first time the use of specific histochemical dyes for lipids as a way to detect and characterize lipids directly on rat brain tissue. This new approach of studying lipids using dyes named DALDI Tof-Tof (Dye-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-flight) has been successfully applied to the ovarian cancer where different patterns in the lipid content were detected on tissue slices between benign and malignant areas. This work highlighted in one hand the roles played by cannabinoids on the microglia chemotaxis and the regulation of NO secretion at the lesion site and in the second hand, the expression of specific lipids on neurons close to the lesion site during the regeneration process of the damaged leech CNS. Moreover, by using histological dyes specific for the lipid staining as matrices, we showed that MALDI imaging of lipids allowed to detect lipids which could be potentially biomarkers for ovarian cancer. A cross-talk with scientist and medical fields can emerge since using both the same way to detect lipids on tissue for diagnosis purposes.