

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE (France)**

**UFR DE BIOLOGIE**

**UNIVERSITE DE MONASTIR (Tunisie)**

**INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR**

**LABORATOIRE DE BIOCHIMIE**

Thèse de doctorat

De l'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE  
Spécialité Biologie et Santé

Et de l'UNIVERSITE DE MONASTIR  
Spécialité Sciences Biologiques et Biotechnologies

Présentée par

**MOHAMED EL AYED**

**Applications de l'Imagerie par Spectrométrie de masse MALDI à  
la Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire**

Soutenue le 22 Octobre 2010

*Thèse en cotutelle co-dirigée par le Pr. Isabelle FOURNIER et Pr Abderraouf KENANI*

Membres du Jury :

<b>M. le Professeur Claude LAZURE</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. le Professeur Ahmed Saleheddine MASMOUDI</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>M. le Professeur Denis VINATIER</b>	<b>Examinateur</b>
<b>M. le Docteur Adnéne MOUSSA</b>	<b>Examinateur</b>
<b>M. le Professeur Michel SALZET</b>	<b>Examinateur</b>
<b>Mme le Professeur Isabelle FOURNIER</b>	<b>Directrice de Thèse</b>
<b>M. Professeur Abderraouf KENANI</b>	<b>Co- directeur de Thèse</b>

## **Remerciements**

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Michel Salzet qui m'a permis de réaliser une thèse dans son laboratoire ainsi que pour ses conseils éclairés, ses idées excellentes et sa disponibilité pour gérer nos petits soucis de la recherche.

Je souhaite associer à ses remerciements Madame le Professeur Isabelle Fournier qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse. Je lui témoigne ma profonde gratitude pour sa disponibilité et les connaissances qu'elle m'a transmises tout au long de mes années de recherche.

A vous deux, un grand merci pour votre soutien, votre confiance et votre patience le long de ces années de travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur Abderraouf Kenani pour sa confiance, ses conseils et pour m'avoir permis de réaliser ce travail en cotutelle.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Claude LAZURE et Monsieur le Professeur Ahmed Saleheddine MASMOUDI pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur Denis VINATIER et Monsieur le Professeur Adnène MOUSSA, ma reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury et en venant de si loin.

Je remercie aussi toute l'équipe des internes en gynécologies qui est passée au laboratoire Amélie, Céline, Thomas, Benjamin.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe d'imagerie MALDI. Maxence, David, Rémi, Céline et Laurent pour leurs conseils et leurs sens du partage.

Comment faire le bilan des remerciements aux membres du laboratoire sans évoquer Christelle, Céline et Nathalie et surtout Annie à qui je tiens à rendre un grand hommage pour son sens de l'organisation, sa disponibilité sans compter et pour son énorme gentillesse.

Je souhaite aussi exprimer toute ma gratitude à l'ensemble du personnel du laboratoire Jacopo, Françoise, Virginie, Aurélie, Christophe, Franck et Pierre Eric pour leur soutien continual, pour leur sympathie quotidienne et pour leur aide et disponibilité.

Julien Franck, je t'adresse mes sincères remerciements pour ton soutien et tes encouragements.

Un grand merci aussi à l'ancien compagnon du bureau Arafah Karim grâce à qui j'ai fait la découverte du laboratoire en 2005 après ma licence, pour tous ses conseils et son aide qu'il n'hésite pas à apporter.

Et à tous ceux que j'ai oublié, Merci

*A la mémoire de mes parents, pour leur amour, sacrifice et pour tous ce qu'ils m'avaient appris.*

*A ma femme Wiem, pour son aide, son courage de m'avoir soutenu jusqu'au bout, pour ce qu'elle m'a apporté et m'apporte encore et pour ce qu'elle m'a offert, mon ange et ma petite puce Ranim ...*

*A Ranim, je t'aime fort.*

*A mes frères et à toute la famille El AYED et à la famille BELGHITH.*

## **Table des matières**

### **Publications**

#### **Liste des abréviations**

#### **Introduction ..... 14**

#### **Chapitre 1 : Généralités..... 19**

1.1. De l'imagerie par spectrométrie de masse à l'imagerie MALDI .....	19
1.1.1. Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse .....	19
1.1.2 Imagerie par spectrométrie de masse MALDI .....	21
1.1.2.1 Les sources MALDI .....	21
1.1.2.1.1 Du LDI au MALDI .....	21
1.1.2.1.2 Les matrices MALDI .....	22
1.1.3. De l'analyse directe à l'imagerie MALDI.....	25
1.1.4. L'imagerie MALDI et les développements.....	25
1.1.4.1. Préparation et traitement des échantillons.....	27
1.1.4.2. Le Choix de la matrice et le dépôt de matrice.....	30
1.1.4.3. Imagerie MALDI et instrumentations .....	34
1.1.4.4. Imagerie MALDI, développements informatiques et traitement des données	37
1.1.4.5. Temps d'acquisition en imagerie MALDI et Résolution spatiale.....	43
1.1.4.6. Les méthodes dérivées de l'imagerie MALDI .....	44
1.1.5. Quelques applications de l'imagerie MALDI .....	50
1.2. Le cancer de l'ovaire .....	54
1.2.1. Le cancer de l'ovaire et incidence.....	54
1.2.2. Facteurs de risque .....	54
1.2.3. Propagation et Symptômes.....	55
1.2.4. Données histologiques.....	56
1.2.5. Le Pronostic.....	58
1.3. Etudes protéomiques du cancer de l'ovaire .....	60
1.3.1. Les tests sériques et les biomarqueurs spécifiques.....	60
1.3.2. Le SELDI et les profils protéiques .....	61
1.3.2.1. Principe de SELDI .....	61
1.3.2.2. SELDI et cancer de l'ovaire .....	62
1.3.2.3. Imagerie MALDI-TOF et le cancer de l'ovaire .....	64
1.3.3 Conclusion.....	66

<b>Chapitre 2 : Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire.....</b>	<b>68</b>
2.1. Recherche à partir de biopsie ovarienne.....	68
2.1.1. Patientes et échantillons .....	68
2.1.1.1 Critères d'inclusion .....	68
2.1.1.3. Recueil des échantillons .....	69
2.1.2. Résultats des colorations histologiques HES .....	71
2.1.3. Analyses MALDI d'échantillons tumoraux .....	73
2.1.4. Automatisation de l'analyse MALDI sur coupe de tissu ovarien frais .....	77
2.1.4.1. Analyse MALDI des peptides sur tissu ovarien:.....	77
2.1.4.2. Analyse directe des petites protéines : .....	78
2.1.4.3. Analyse directe des protéines de haute masse.....	84
2.2. Stratégies d'identification des protéines.....	86
2.2.1 Indentification directe sur tissu afin de garder la régionalisation spatiale des biomarqueurs.....	86
2.2.2. Identifications des biomarqueurs : Stratégies « <i>bottom up</i> » sur extraits peptidiques et protéiques à partir de coupes de tissus ovariens frais.....	90
2.2.2.1 Validation de la démarche d'extraction peptidiques/protéiques à partir de coupes: recherche du fragment de l'activateur de l'immunoprotéasome 11S (Reg alpha).....	90
2.2.2.2. Développement de la stratégie d'identification sur extrait.....	92
2.2.2.3. Caractérisation des ions spécifiques liés à la pathologie par MALDI-TOF/TOF en mode MS/MS.....	94
2.2.2.4. Caractérisation des ions spécifiques liés à la pathologie par nanoLC couplée à une trappe d'ion (ESI-MS) : approche shot-gun .....	95
2.2.2.5 Rôle potentiel des protéines identifiées.....	96
2.3. Validation des biomarqueurs .....	100
2.3.1. Immunohistochimie.....	101
2.3.2. Validation par TAG MASS.....	102
2.3.3. Validation des biomarqueurs par biologie moléculaires sur cellules cancéreuses SKOV3.....	104
2.3.4. Conclusion.....	105
2.4. Analyse des virus.....	106
2.4.1. Recherche de virus parmi les échantillons ovariens.....	106

2.4.2. Extraction de l'ADN des échantillons ovariens .....	107
2.4.3. Validation des premiers résultats en cas de virus positifs dans les échantillons cancéreux.....	108
2.4.4. Résultats en virologie .....	108
2.4.5. Une tolérance immunitaire .....	110
2.4.6. Conclusion et perspectives .....	110
2.5. Analyse dans les fluides .....	112
2.5.1. Analyse par Western Blot .....	114
2.5.2. Analyse par MALDI des bandes du gel de migration après digestion trypsique	116
2.5.3. Conclusion.....	119
2.6. Conclusions et perspectives .....	120
<b>Chapitre 3 : Nouvelle approche de quantification par MS.....</b>	<b>123</b>
3.1. Etat de l'art .....	123
3.2. Nouveaux tests diagnostiques immunoenzymatiques couplés a une détection par spectrométrie de masse : ISA-MS et PCR-MS.....	133
3.2.1. ISA-MS .....	135
3.2.2. PCR-MS .....	141
3.3. Conclusions et perspectives.....	146
<b>4. Conclusion générale .....</b>	<b>149</b>
<b>5. Matériels &amp; Méthodes.....</b>	<b>153</b>
5.1. Préparation des échantillons et des tissus .....	153
5.2. Préparation des matrices .....	154
5.3. Analyse des peptides .....	154
5.4. Digestion enzymatique in situ .....	154
5.5. Identification des protéines.....	155
5.6. Traitements des données.....	155
5.7. Préparation des échantillons pour coloration HES .....	155
5.8. Extraction des peptides des liquides biologiques (cas du Liquide d'ascite et lavage péritonéale) .....	158
5.9. Extraction des peptides à partir de biopsies.....	158
5.10. Western Blot .....	158
5.11. Immunoprécipitation .....	160
<b>1. Annexes.....</b>	<b>178</b>



### Articles publiés :

- ✓ El Ayed M, Bonnel D, Longuespée R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M.  
**MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers.** Med Sci Monit. 2010 Aug 1; 16(8):BR233-45.
- ✓ Stauber J\*, El Ayed M\*, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M.  
**Polymerase chain reaction and immunoassay--matrix assisted laser desorption mass spectrometry using tag-mass technology: new tools to break down quantification limits and multiplexes.** Anal Chem. 2009 Nov 15;81(22): 9512-21.
- ✓ Franck J., El Ayed M., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.  
**On tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing proteins identification in bottom-up imaging strategies.** Anal Chem. 2009 Oct 15; 81(20):8305-17.
- ✓ 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 Sep; 8(9):2023-33. Epub 2009 May 18. Review

### Chapitres de livre :

- ✓ Vergara D., El Ayed M., Merlot B., Franck J., Wisztorski M., Vinatier D., Salzet M., Fournier I. **Developing MALDI Imaging Technology for Cancer Profile.** BIOforum Europe.
- ✓ Jonathan Stauber Mohamed El Ayed, Maxence Wisztorski, Michel Salzet, Isabelle Fournier **Specific MALDI-MSI: TAG-MASS,** Methods Mol Biol. 2010;656:339-61.
- ✓ Julien Franck, Mohamed El Ayed, Maxence Wisztorski, Michel Salzet, Isabelle Fournier **On Tissue Proteins Identification Improvement by N-Terminal Peptides Derivatization.** Methods Mol Biol. 2010;656:323-38.

### Communications orales :

- ✓ 27èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (SFSM), 2010 à Clermont-Ferrand, France **Tissue proteomics of ovarian cancer.**

- ✓ XIIIèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (RCJSM) 2008 à Blainville-sur-Mer, France  
**Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire par imagerie MALDI.**

**Communication orale sur invitation :**

- ✓ Forum Labo & Biotech, 2008 à Paris, France  
**Automatic spotting solution for MALDI Imaging: process optimization and new developments.**

**Posters:**

- ✓ **El Ayed M**, Jacquet A., Deschamp M., Proess G., Wisztorski M., Fournier I., Salzet M. **Specific MALDI Imaging Using Oligonucleotides, Antibodies and Lectins**, HUPO 2008, Amstardam, Pays Bas
- ✓ **El Ayed M**, Jacquet A., Collinet P., Lucot JP., Vinatier D., Fournier I., Salzet M. **Tissue Proteomics of Ovarian Cancer**, HUPO 2008, Amstardam, Pays-Bas
- ✓ **M. El Ayed**, B. Merlot, T. Dennis, D. Vergara, P. Collinet, J-P Lucot, D. Vinatier, A. Goffard, D. Hober, A. Kenani, M. Salzet, I. Fournier: **Ovarian Cancer Biomarkers: A clinical Proteomics Application of MALDI IMAGING**, Journée André VERBERT 2009, Lille, france
- ✓ Franck J., **El Ayed M**, Stauber J., Wisztorski M., Schmit P.O., Boukheroub R., Fournier I., Salzet M. **Improving Peptides de novo Sequencing for MALDI-MSI by in situ N-terminal Derivatization**, ASMS 2007, USA
- ✓ Franck J., **El Ayed M**, Stauber J., Wisztorski M., Jardin-Mathé O., Boukheroub R., Salzet M., Fournier I. **Biomarkers Identification by MALDI-Imaging: Improving de novo sequencing by in situ N-Terminal Derivatization**, HUPO 2007, Seoul, Corée
- ✓ Arafah K., **El Ayed M**, Desmons A., Wistorski M., Fournier I., **Introduction to DALDI Imaging Mass Spectrometry of Lipids. Application to the ovarian cancer biomarkers hunting**
- ✓ Franck J., Wisztorski M., **El Ayed M**, Bonnel D., Barnes A., Fournier I., Salzet M. **Automatic spotting solution for MALDI Imaging: process optimization and new developments**, ASMS 2008, Denver, USA



## Liste des abréviations

**3AP** : 3-acétylpyridine  
**3HPA** : Acide 3-hydroxypicolinique  
**AcN** : Acetonitrile  
**ANI** : Aniline  
**ADN** : acide desoxyribonucléique  
**ARNm** : acide ribonucléique (messager)  
**ALICE** : Acid-Labile Isotope-Coded Extractants  
**AGP**: alpha-1-glycoprotéine acide  
**BRAC 1/2** : Breast Cancer n°1/2  
**CA125** : Cancer Antigen 125  
**DART** : Direct Analysis in Real time  
**DESI** : Desorption Electrospray Ionization  
**DIOS**: Desorption Ionization On Silicon  
**2,5-DHB** : acide 2,5-dihydroxybenzoïque  
**DHAP** : 2,6-dihydroxyacetophenone  
**ELDI** : Electrospray assisted Laser Desorption Ionization  
**ESI** : ElectroSpray Ionization  
**EtOH** : Ethanol  
**EGFR** : Récepteur au Facteur de Croissance Epidermidique  
**FT-ICR** : Fourrier Transform-Ion Cyclotron Resonance  
**FIGO** : Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique  
**HCCA** : acide  $\alpha$ -cynao-4-hydroxycinnamic  
**HFIP** : 1,1,1,3,3-Hexafluoro-2-propanol  
**H&E** : Haematoxyline-Eosine  
**HPLC** : High Performance Liquid Chromatography  
**Hz**: Hertz  
**HE4** : Human Epididymis protein 4  
**IR** : Infra Rouge  
**ICAT** : Isotope-Coded Affinity Tag  
**IL-6**: Interlekin 6  
**iTRAQ** : Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantitation  
**IT** : Ion Trap  
**ITO** : Indium-Tin Oxide  
**LAMMA** : Laser Activated Microprobe Mass Spectrometry  
**LDI** : Laser Desorption Ionization  
**LMMS** : Laser Microprobe Mass Spectrometry  
**LC-MS** : Couplage Chromatographie Liquide-Spectrométrie de Masse  
**LCR** : Liquide Céphalorachidien  
**JEDI**: Jet Desorption Ionization  
**MeOH** : Methanol  
**SELDI** : Surface Enhanced Laser Desorption Ionization  
**SIMS**: Secondary Ion Mass Spectrometry  
**MS** : Spectrométrie de masse  
**MSI**: Imagerie par Spectrométrie de Masse  
**MALDI**: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization  
**MRM**: Multiple Reaction monitoring  
**MS<sup>E</sup>** : Expression mode Mass Spectrometry  
**MUC 16** : Mucine 16  
**MMP-7** : Matrice Métalloprotéinase-7  
**MSLN** : Mésothéligne  
**m/z** : rapport masse sur charge  
**MS/MS** : Spectrométrie de masse en tandem  
**OCT** : Optimal Cutting Temperature  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**6-OHDA** : 6 hydroxydopamine  
**PCA** : Principal Component Analysis (Analyse en Composante Principale)  
**PMF** : Peptide Mass Fingerprint

**PhIAT** : Phosphoprotein Isotope-coded Affinity Tag  
**PSAQ**: Protein Standard Absolute Quantification  
**PA 28** : Proteasome activator 28  
**PA700** : Proteasome activator 700  
**SA** : Acide Sinapinique (acide 3,5-diméthoxy 4-hydroxycinnamique)  
**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis  
**SIMS** : Secondary Ion Mass Spectrometry  
**SRM** : Selected Reaction Monitoring  
**SILAC** : Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture  
**TFE**: TrifluoroEthanol  
**TFA** : Trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)  
**TOF** : Time-Of-Flight  
**TQ** : Triple Quadripôle  
**TLR** : Toll-like receptor  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor.  
**UV** : Ultra Violet  
**IR** : Infra Rouge  
**RT-PCR** : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction  
**YAG** : yttrium aluminium garnet  
**WFDC2**: WAP four-disulfide core domain 2

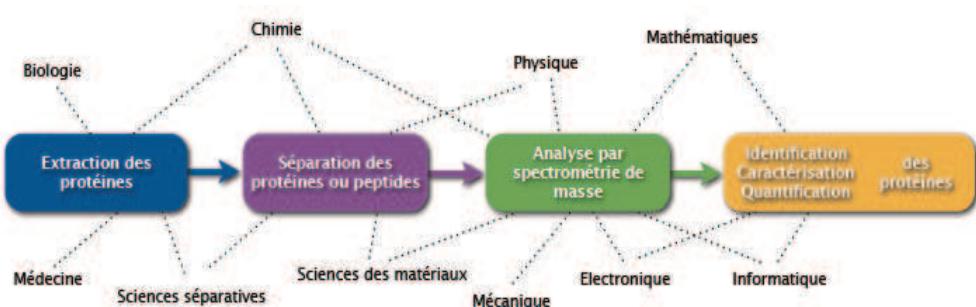
## Introduction

En 1994, le terme «**protéome**» a été proposé pour la première fois par Mark Wilkins. Ce mot-valise, construit à partir des substantifs **protéine** et **génome** pour désigner «l'ensemble des protéines produites par un génome, dans une cellule ou un tissu», a rapidement séduit la communauté scientifique.

Beaucoup de définitions plus précises ont été proposées avec plus ou moins de succès. A la différence du génome, le protéome n'est pas unique à chaque organisme et il est vain de tenter de figer sa conceptualisation. Les protéines présentes dans une cellule, ainsi que leur fonction, leur localisation et même leur structure peuvent évoluer selon l'âge, la différenciation ou l'état pathologique de la cellule, les stress environnementaux ou de multiples autres évènements.

Alors, pour désigner l'étude du protéome, le terme « **protéomique** » s'est imposé de lui-même. Il désigne non seulement l'analyse des protéines produites dans une cellule, mais aussi l'ensemble de leurs isoformes et des modifications qu'elles portent, les interactions qu'elles nouent, les organisations structurales et les complexes dans lesquels elles sont engagées. Par conséquent, l'**analyse protéomique** vise à l'identification, la caractérisation et la quantification des protéines d'une cellule ou d'un système défini pour établir comment leurs propriétés varient dans l'espace, le temps et les états physiologiques.

Durant ces dernières décennies, de nouvelles technologies d'analyse protéomique sont apparues. Parmi celles-ci, la **spectrométrie de masse (MS)** a pris son essor grâce au développement simultané de multiples disciplines académiques (**Figure 1**).



**Figure 1:** Disciplines académiques ayant permis l'essor de l'analyse protéomique montrant le rôle central de la spectrométrie de masse

Cette méthode a connu, au fil des années, de nombreuses avancées. Elle a acquis rapidement une maturité lui permettant de devenir un outil remarquable d'analyse des biomolécules, tout particulièrement des protéines [1]. Ce développement s'est nourri, dans un champ interdisciplinaire, de l'émergence conjointe de nouvelles stratégies analytiques d'innovations instrumentales et de nouvelles techniques préparatives et séparatives d'échantillons protéiques. Alors que les projets de séquençage du génome de multiples organismes notamment celui de l'Homme ont abouti, l'analyse de protéines par MS est entrée dans une nouvelle ère : celle de l'analyse protéomique par MS [2].

Avec l'accumulation des séquences d'ADN dans les banques génomiques, il s'est avéré qu'il n'était pas suffisant de disposer de séquences complètes de génomes pour comprendre les fonctions biologiques des protéines pour lesquelles ces séquences codent [3]. En effet, l'identification des protéines, la caractérisation de leurs séquences en acides aminés et de leurs modifications post traductionnelles, la découverte de produits de l'épissage alternatif ne sont possibles qu'en étudiant les protéines elles-mêmes. Les mécanismes de régulation et la dynamique de l'expression protéique font également partie des défis à relever pour traduire l'information issue des données génomiques en connaissances biologiques [4].

Pour y parvenir, la MS s'est imposée comme l'outil de choix puisqu'aucune autre technologie ne peut aujourd'hui recueillir autant d'informations avec autant de sensibilité, de limite de détection et de rapidité d'analyse. Les développements technologiques et méthodologiques pour l'analyse protéomique par MS conduisent encore à la mise au point ou à l'amélioration de stratégies toujours plus poussées pour mieux comprendre les fondements moléculaires de processus cellulaires et physiologiques [5].

Issue des recherches en physique, la MS s'est progressivement orientée, dans la seconde moitié du 20<sup>ème</sup> siècle, vers la chimie, grâce à l'analyse des composés organiques. Dès les années 1970, la MS devient une technique phare pour l'analyse des biomolécules. L'apparition de nouvelles sources de production d'ions dans les années 1985, notamment les sources electrospray (ESI) [6] d'une part et les sources de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) [7] d'autre part, a définitivement permis à cette méthode d'analyse d'avoir des applications en biologie et dans de nombreux autres domaines. Ces sources permettent la production d'ions en phase gazeuse à partir de composés polaires et pour des masses pouvant atteindre jusqu'à 1 000 000 u. Les deux modes de production des ions sus-cités sont particulièrement bien adaptés pour l'analyse et l'étude de différentes

familles de molécules biologiques comme les lipides, les peptides et les protéines sous leur forme intacte [7-9].

Les progrès en matière d'instrumentation et d'analyse bioinformatique ont permis un essor considérable de cette discipline et son ouverture vers des champs d'analyse de plus en plus complexes telle que la protéomique clinique comme en témoignent les nombreuses recherches [10-12]. De nombreux composés biologiques (protéines, peptides, lipides et saccharides) provenant de différents organismes, voire de différents organes ou de cellules dans des états physiologiques distincts à un instant « *t* » donné, ont ainsi pu être caractérisés. Dans ce contexte, la MS a ouvert des perspectives intéressantes pour l'identification de nouveaux biomarqueurs tumoraux co-exprimés, notamment par l'établissement d'un profil protéique spécifique de la pathologie cancéreuse. Une telle signature moléculaire associée aux données cliniques et anatomo-pathologiques pourrait permettre le dépistage primaire des cancers à des stades précoce.

Toutefois, cette méthode présente un inconvénient majeur puisqu'elle nécessite l'homogénéisation de l'échantillon avant extraction, séparation et caractérisation. Toutes ces étapes peuvent occasionner la perte irrémédiable de composés faiblement exprimés et aboutissent souvent à la mise en évidence de protéines majeures telles que les protéines du cytosquelette ou du métabolisme.

Il est donc très important de pouvoir caractériser de façon spécifique les molécules d'intérêt mais surtout de pouvoir les localiser afin de voir leurs répartitions au sein d'un tissu biologique. Certaines techniques telles que « l'immunohistochimie » et « l'immunofluorescence » sont connues pour l'observation et l'étude des protéines à fonction particulière présente dans une structure biologique. Ces techniques sont utilisées depuis de très nombreuses années mais présentent certains inconvénients. En effet les techniques basées sur la reconnaissance anticorps/antigène sont des approches ciblées nécessitant la connaissance de l'antigène recherché et par conséquent la capacité à générer un anticorps spécifique dirigé contre cette dernière.

D'autres techniques permettant la localisation de différents composés existent, notamment dans le domaine de l'imagerie *in vivo* ou *ex vivo*, on trouve ainsi la tomographie [13], l'autoradiographie [14] et les nanotechnologies [15]. Cependant, on assiste ici aussi à des limites au sein de ces techniques particulièrement, la nécessité d'un marquage spécifique

des molécules afin de les détecter, ce qui les rend relativement lourdes et nécessitant un temps de mise en œuvre long.

Dans ce contexte, le développement de nouvelles technologies permettant l'analyse en moins d'étapes de plusieurs molécules en même temps, prend tout son sens. La technique d'imagerie idéale doit permettre de détecter, de localiser et de caractériser simultanément des nombreuses molécules connues et inconnues. La sensibilité de la technique et la résolution spatiale de l'image sont évidemment des paramètres clefs de cette méthode.

A travers une analyse basée sur la mesure du rapport m/z (soit indirectement la masse moléculaire) l'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) répond à ces conditions [16]. Ainsi, l'imagerie basée sur l'utilisation de la MS permet de répondre à de nombreux problèmes, notamment ceux liés à la détection de composés inconnus [17]. Il n'est plus nécessaire de marquer les molécules ni de posséder un anticorps pour les détecter. Cette méthode peut se décliner par l'utilisation de différents types de sources de production d'ions compatibles avec un maintien de l'information sur la localisation des composés telles que le MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation*), le DESI (*Desorption Electrospray Ionisation*) et le TOF-SIMS (*Time of flight-Secondary Ion Mass Spectrometry*) [18-20]. Cependant, dans le cadre de l'analyse des peptides et protéines, les sources MALDI restent encore les sources les plus performantes pour le fonctionnement en mode imagerie [21-24].

L'imagerie MALDI est apparue il y a 13 ans [25]. C'est une technologie innovante, qui nécessite de nombreux développements [26-28]. Ainsi, les données générées par la MS et MSI restent principalement qualitatives et les rendre quantitatives constitue donc un enjeu majeur pour l'avenir. Actuellement, les méthodes de quantification par MS permettent uniquement de comparer des quantités de lots de protéines différentes provenant de plusieurs conditions d'analyses et dont la mise en œuvre reste parfois compliquée et coûteuse. La plupart de ces méthodes sont basées sur le principe de marquage isotopique [29].

En milieu hospitalier, l'ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) et la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) demeurent parmi les méthodes biologiques les plus utilisées [30-32]. Elles sont accessibles, spécifiques et sensibles. Toutefois, l'inconvénient majeur de la technique d'ELISA est la limite de détection qui est relativement faible (0.01 mg/ml pour l'ELISA en sandwich) [33], ainsi que le risque de faux positif par contamination extérieure

et le risque de vrai négatif par inhibition de l'ADN polymérase pour la PCR. Cependant, avec l'essor de la MS, des nouvelles méthodes sont apparues telles que l'approche *MASS TAG PCR* qui utilise des amorces marquées par un lien photoclavable de masses moléculaires différentes. Ce système rapide et sensible a été utilisé pour identifier différents agents pathogènes [34].

L'ELISA-MS et la PCR-MS consistent en une utilisation conjointe des tests ELISA, PCR et de la MS afin de gagner en sensibilité, en rapidité et à la possibilité de réalisation des études en multiplexe pour quantifier plusieurs molécules dans une même expérience.

C'est dans ce contexte que mes travaux de thèse ont portés sur le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse appliquée à la recherche des biomarqueurs du cancer de l'ovaire en tant que nouvel outil dans le domaine de la protéomique. Le présent manuscrit s'articulera donc en trois parties

**Le chapitre 1** est un chapitre bibliographique, où sera détaillé le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse où nous procéderons à une revue de l'état de l'art de la technologie ainsi des généralités sur le cancer de l'ovaire et les études protéomiques existantes.

**Le chapitre 2** traitera d'une application clinique via la recherche des biomarqueurs spécifiques du cancer de l'ovaire en utilisant la MS et la MSI.

**Le chapitre 3** abordera un nouveau concept de quantification par spectrométrie de masse i.e. L'ELISA-MS et la PCR-MS. Une comparaison des outils déjà présents permettra d'évaluer le concept et les avantages qui leur sont propres.

# **Chapitre 1 :**

## **Généralités**

# Chapitre 1 : Généralités

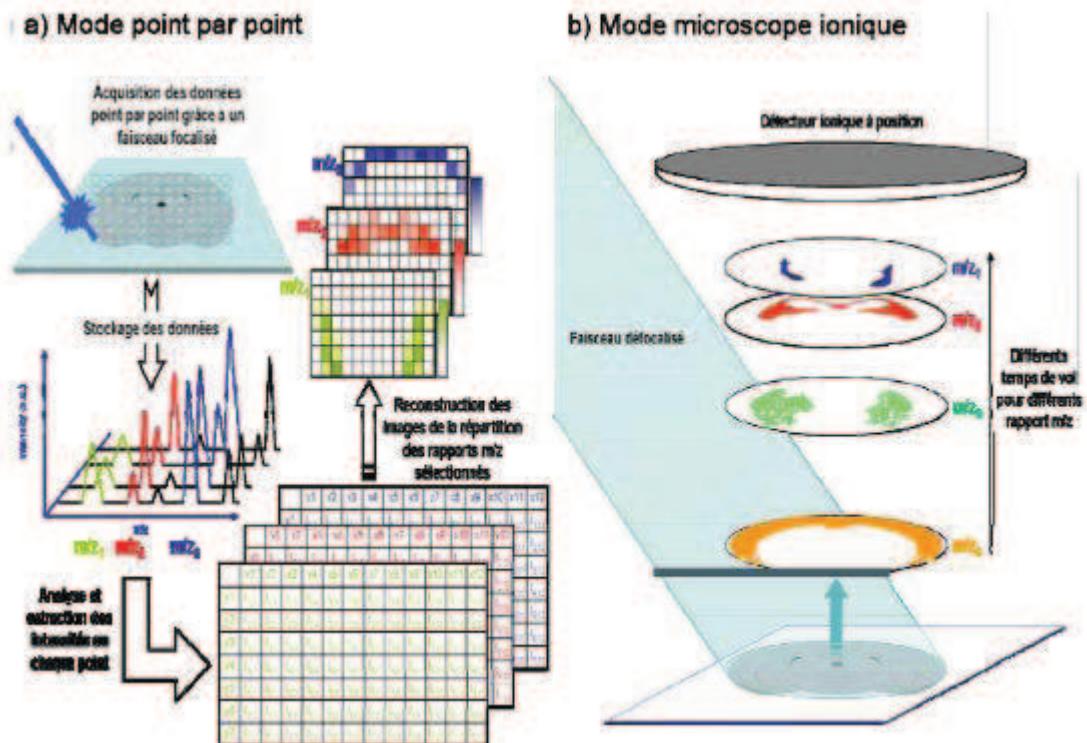
## 1.1. De l'imagerie par spectrométrie de masse à l'imagerie MALDI

### 1.1.1. Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse

Le principal but de la MSI est d'utiliser le pouvoir analytique de la MS pour créer des images moléculaires représentant la distribution d'un certain nombre des 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 sont séparés en fonction du rapport  $m/z$  sous vide pour être détectés. Tout comme en MS classique, la MSI peut se décliner selon différentes méthodes principalement dépendantes de la source de production d'ions utilisée.

Il existe plusieurs modes d'acquisition d'images utilisés en MSI. Dans une première approche, 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 ou mode microonde, 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 mesurer l'intensité du signal pour chaque point puis de stocker la valeur de la mesure dans un tableau à 2 dimensions (**Figure 2.a**). 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.

Dans le cas du mode microscope ionique, les images moléculaires sont créées de manière similaire à l'imagerie optique. Dans ce cas, la position relative, par rapport au plan de la surface de l'échantillon, des ions formés est conservée par l'utilisation d'optiques ioniques particulières (**Figure 2.b**). Grâce à un système de guidage d'ions particulier, l'information spatiale est préservée à l'intérieur du spot puisque les ions conservent leur position relative pendant leur déplacement de la coupe jusqu'à un détecteur de position. Cette méthode est rarement utilisée car elle est plus difficile à mettre en œuvre et plus coûteuse.



**Figure 2:** Principe de la MSI en mode point par point (a) et microscope ionique (b)

### 1.1.2 Imagerie par spectrométrie de masse MALDI

#### 1.1.2.1 Les sources MALDI

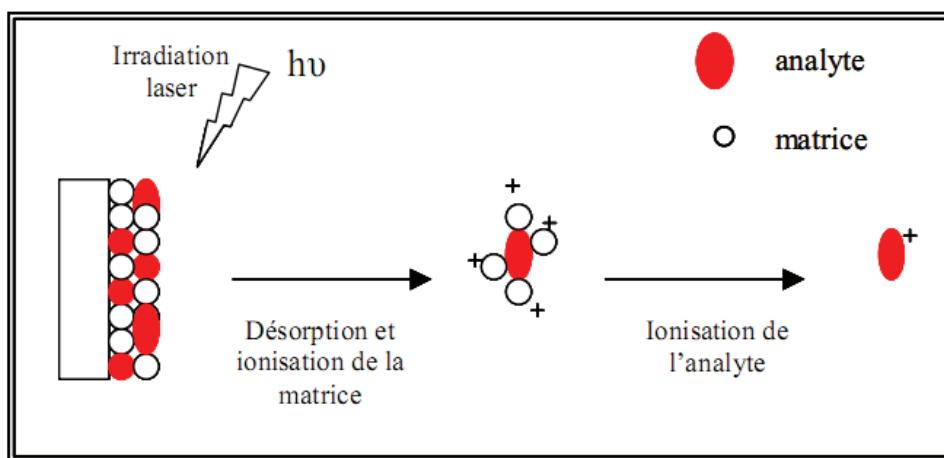
##### 1.1.2.1.1 Du LDI au MALDI

La source MALDI découle directement des méthodes de désorption/ionisation laser (LDI) [35] qui utilisent des impulsions laser pour produire des ions à partir d'échantillons solides (extraits biologiques, tissus,...). Les sources LDI, ont permis, le développement des méthodes telles que la LMMS (Laser Microprobe Mass Spectrometry) [36] ou le LAMMA (*Laser Microprobe Mass Analyzer*) utilisées comme outil d'analyse et d'imagerie biomoléculaire. Ces méthodes ont été utilisées pour réaliser des images à partir de nombreux échantillons, notamment d'origine biologiques, en montrant les différentes répartitions de certains cations intracellulaires liés à l'effet de drogues sur des bactéries [37]. En focalisant le laser au maximum, il était possible d'obtenir des images avec une résolution spatiale d'environ 500 nm [38]. Cependant, ce processus de désorption cause de nombreuses fragmentations et cette approche s'avère limitée en terme de gamme de masse (environ 300

da). Cette technique reste utile pour l'étude des compositions élémentaires telles que les transitions de métaux dans les tissus tout en ayant une bonne sensibilité.

Plusieurs études biomédicales ont été réalisées avec succès en utilisant la désorption laser (LDI) [39, 40]. Par la limitation de gamme de masse pour la technique LDI et le besoin de plus en plus insistant d'analyser des biomolécules de grande taille, plusieurs équipes se sont intéressées à développer des sources plus performantes. C'est ainsi qu'en 1988, Hillenkamp et Karas [41] ont présenté pour la première fois la détection d'une protéine de 67 kDa, l'albumine avec l'acide nicotinique comme matrice organique. Ces travaux ont donné naissance aux sources d'ions MALDI qui sont encore utilisées de nos jours. Le MALDI est une technique de production d'ions permettant l'analyse de composés jusqu'à des poids moléculaires élevés, quelque soit la polarité de l'échantillon, sous leur forme intacte. Le MALDI repose donc sur l'utilisation d'un composé organique appelé matrice absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé et nécessaire au processus de désorption/ionisation des composés à analyser [42-44]. Le mélange de la matrice à forte proportion par rapport à l'analyte, permet d'obtenir après évaporation du solvant des cristaux de matrice où sont inclus en partie les analytes. Le mélange est déposé sur une surface plane, généralement métallique, appelée cible MALDI (**Figure 3**).

Les mécanismes conduisant à l'observation des ions en phase gazeuse sont encore mal connus. Principalement, les espèces observées en MALDI sont des ions monochargés. En mode d'ionisation positif, les espèces se trouvent généralement sous la forme protonée  $[M+H]^+$  mais elles peuvent être également cationisées si l'échantillon contient des traces de sels. Il est alors possible d'observer des espèces cationisées par le sodium ( $[M+Na]^+$ ) ou le potassium ( $[M+K]^+$ ). De la même façon, en mode d'ionisation négatif, les espèces les plus abondantes sont généralement sous la forme  $[M-H]^-$ .



**Figure 3:** Schéma du processus MALDI

### **1.1.2.1.2 Les matrices MALDI**

La matrice MALDI est un composé permettant le transfert d'énergie tout en protégeant l'analyte de la réception d'une trop forte énergie. Généralement la matrice est un composé organique dont la principale propriété est d'absorber à la longueur d'onde du laser même si cette propriété nécessaire n'est pas suffisante. Ces composants sont fonctionnalisés avec des groupes polaires, pour une utilisation en solutions aqueuses. La matrice est la partie fondamentale de l'analyse MALDI puisqu'elle va déterminer la classe de biomolécules détectées mais aussi influencer la qualité des spectres, la formation d'adduits et la stabilité des analytes. La cristallisation de la matrice est également un paramètre primordial. En effet, la formation de cristaux hétérogènes rend plus difficile et plus longue les analyses ce qui est défavorable lors de la recherche d'une quantification des composés analysés. A l'heure actuelle, de nombreuses substances ont été testées afin de vérifier leur éventuelle performance en tant que matrice. Il semble que la capacité d'incorporation des analytes (co- cristallisation) au sein des cristaux de matrice est un paramètre important et notamment pour l'analyse de composés tels que les peptides et les protéines. Généralement, en UV-MALDI, les matrices sont des petites molécules organiques absorbant entre 266 et 355 nm dépendamment du laser utilisé. Ainsi différentes matrices adaptées à l'analyse de différentes familles de composés (protéines, peptides, lipides, sucres, acides nucléiques, polymères,...) ont pu être sélectionnées dans les analyses de routine.

Aujourd'hui, il existe plusieurs composés couramment utilisés pour les analyses MALDI tel que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) [45], bien adapté pour l'analyse d'une grande variété de molécules tels que les polymères, les peptides, les lipides ou encore les protéines. Les dérivés d'acides cinnamiques constituent également une classe de molécules intéressantes comme matrices tels que l' $\alpha$ -cyano 4-hydroxycinnamique (HCCA) pour l'analyse de peptides et protéines [12-13], l'acide férulique (FA) ou l'acide 3,5-diméthoxy-4hydroxycinnamique (SA) pour l'analyse de protéines intactes [46]. Les polyhydroxyacetophénones telles que la 2,3,4-trihydroxyacetophenone (THAP) ou la 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP) possédant un groupement hydroxyle faiblement acide sont, quant à elles, préférentiellement utilisées pour l'analyse des lipides ou des oligonucléotides [47]. Les hétérocycles aromatiques tels que l'acide 3-hydroxypicolinique (3HPA) ou l'ATT sont des matrices également utilisées pour la détection des lipides ou des oligonucléotides

[48]. Le **tableau 1** présente quelques exemples de matrices couramment utilisées en MALDI ainsi que leurs champs d'applications.

Matrices	Formules semi-développées	Utilisation
Acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		Protéines, peptides
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)		Protéines, peptides, oligosaccharides, polymères, lipides
Acide 3,5-diméthoxybenzoïque ou acide sinapinique (SA)		Protéines, polymères
6-aza-2-thiothymine (ATT)		Oligonucléotides, protéines
2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP)		Oligonucléotides, Lipides
Acide 3-hydroxypicolinique (HPA)		Oligonucléotides, glycoprotéines

**Tableau 1** : Les matrices les plus utilisées pour l'analyse des biomolécules en MALDI

Un phénomène souvent observé en MALDI est l'hétérogénéité de la répartition des analytes dans les cristaux de matrices conduisant à une variation dans l'intensité du signal et dans la résolution spectrale [49]. Ce phénomène est connu sous le nom de « *hot spot* » et est particulièrement observé pour certaines matrices comme le 2,5-DHB. Ce phénomène

contribue à dégrader la limite de détection et de générer des problèmes de reproductibilité rendant difficiles l'automatisation de l'analyse et la quantification de l'analyte [50].

Alternativement, l'homogénéité des dépôts peut être améliorée par l'utilisation de matrices liquides qui par définition présentent une grande homogénéité. Des différents types de matrices liquides ont été proposées pour l'analyse MALDI. Elles sont généralement retrouvées en IR (Infra rouge)-MALDI où la matrice doit présenter des bandes de vibrations fortes à la longueur d'onde du laser utilisé ce qui ouvre le panel de composés utilisables. Par exemple, en AP (*Atmospheric Pressure*)-MALDI en mode IR, l'EtOH, l'AcN ou l'eau peuvent servir de matrice [51-54]. Une autre approche est l'utilisation du glycérol dans lequel des matrices telles que la 2,5-DHB ou l'HCCA sont solubilisées [55]. Malgré tous les avantages de ces matrices liquides, en mode UV-MALDI, de nombreux inconvénients persistent tels que la formation d'adduits, une mauvaise résolution spectrale, une faible sensibilité ou encore une instabilité sous vide.

En 2001, Armstrong et coll. [56] ont proposé des matrices dites ioniques en se basant sur les propriétés des liquides ioniques qui sont des sels organiques de formule générale  $[A^+, B^-]$  obtenus par réaction acido-basique. En 2006, Lemaire et coll ont proposé des matrices ioniques solides [26]. Les matrices ioniques(MI) sont obtenues par mélange équimolaire entre des matrices « conventionnelles » comme HCCA, ou SA avec une base organique (e.g. aniline, butylamine, pyridine). Le choix du couple acide/base définit les propriétés de la matrice. Ainsi, dépendamment du couple acide/base utilisé ces matrices peuvent se présenter soit sous la forme liquide (LIM) [57], soit sous la forme solide (SIM) [26, 58]. Différentes MI ont été, à ce jour, synthétisées et étudiées. Elles présentent toutes des propriétés analytiques différentes et permettent donc de détecter les différentes classes de composés dont les biomolécules et notamment les peptides [59, 60], les phosphopeptides [61], les protéines [62], les lipides [63] et les saccharides [64, 65].

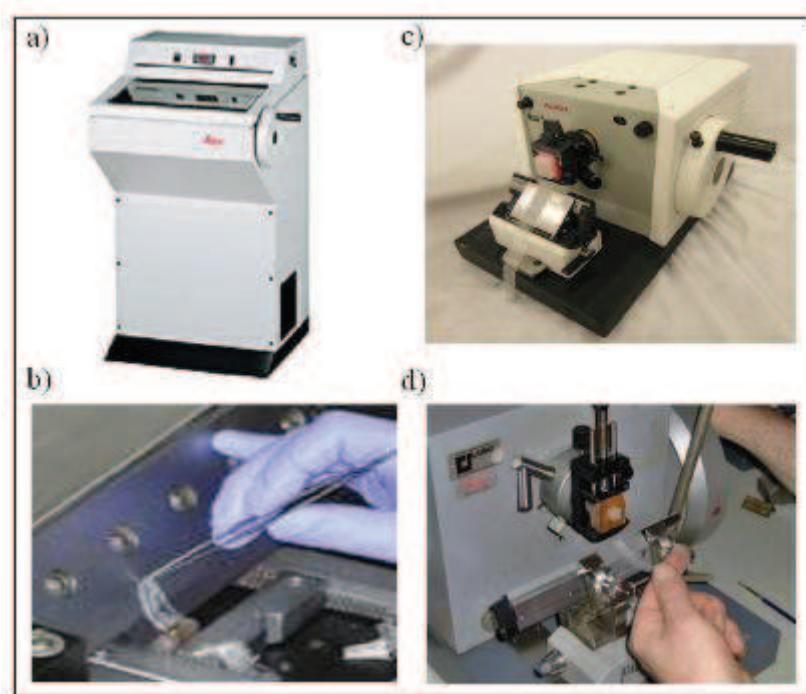
### 1.1.3. De l'analyse directe à l'imagerie MALDI

Avec la possibilité d'introduire des échantillons solides dans la source MALDI, les premières analyses directes sur coupe arrivent en 1994 avec les travaux sur les neurones de *Lymnaea stagnalis* [66, 67]. Par la suite de nombreuses études ont été menées sur des cellules nerveuses d'invertébrés [68-70] et en particulier sur des neurones d'aplysie [71, 72], et sur des neurones de Limnée [73-75]. Des études différentielles sur des cerveaux de rat ont également

été développées [76]. Dans le cadre de l'analyse par imagerie, les premiers travaux ont été réalisés par le groupe de R. Caprioli en 1997 [25]. Dès lors, des nombreux développements ont été entrepris jusqu'à l'automatisation de la méthode [77].

#### 1.1.4. L'imagerie MALDI et les développements

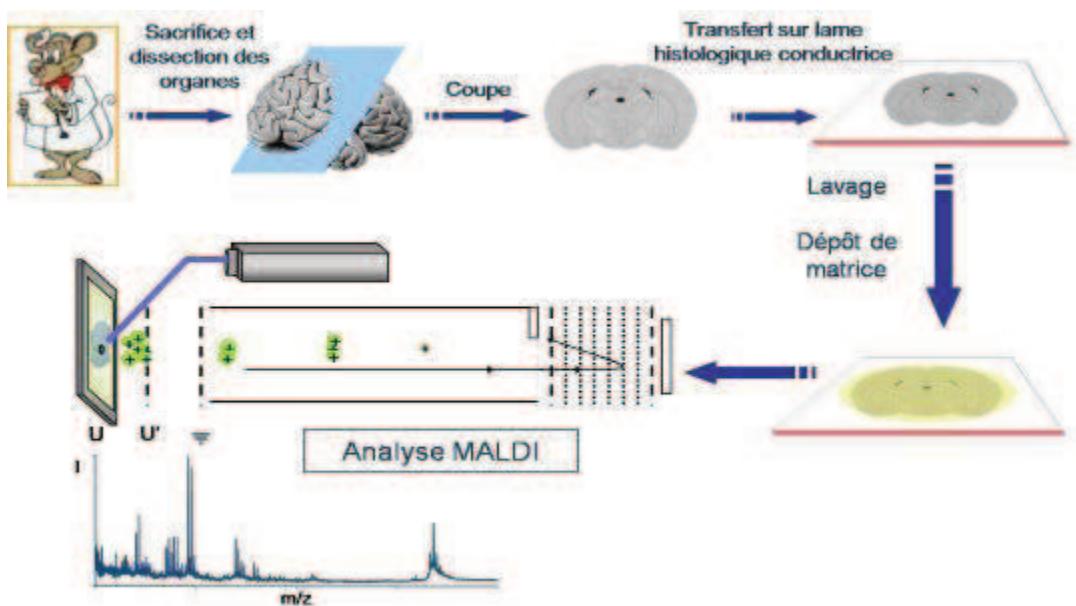
L'imagerie MALDI consiste à générer des images à partir d'échantillons solides par acquisition automatisée des données en mode microonde ou microscope comme décrit précédemment. Les solides étudiés se présentent généralement sous la forme de surfaces minces obtenues par coupes dans les blocs de tissus. Nous nous focaliserons, ici, sur l'analyse de surface obtenue à partir des échantillons biologiques, domaine d'application privilégié de l'imagerie à l'heure actuelle. Les échantillons étudiés sont alors, en général sous la forme de sections minces (5 à 20 $\mu$ m) de tissus obtenues par différentes méthodes de coupe (**Figure 4**).



**Figure 4:** Processus de réalisation de coupes histologiques (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 d'un métal conducteur (*Indium Tin oxyde ITO*)) puis déshydratées ou au vide. Si l'étape d'imagerie par elle-même est le point central de la procédure, la préparation des

échantillons pour l'analyse est une étape primordiale influençant de manière importante la qualité des résultats obtenus lors de l'analyse en mode imagerie. Ainsi l'obtention d'images MALDI ne peut être réalisée que par une suite d'étapes de préparations préalables à l'acquisition puis au traitement des données. La **Figure 5** présente de manière schématique les différentes étapes constituant une séquence complète permettant de réaliser des images MALDI à partir de sections de tissus. Les grandes étapes de cette séquence sont la préparation du tissu pour sa conservation, la réalisation des coupes, le dépôt de la matrice nécessaire à l'analyse MALDI, l'acquisition des données en mode imagerie et le traitement des données pour leur visualisation sous forme d'images.



**Figure 5:** Schéma représentatif d'une expérience d'imagerie MALDI

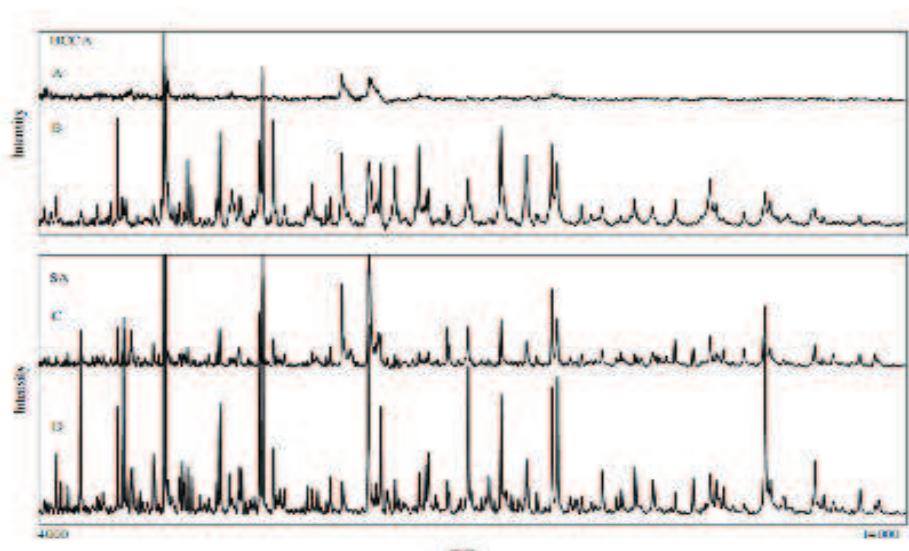
Lors de ces différentes étapes, plusieurs difficultés peuvent cependant subvenir :

#### 1.1.4.1. Préparation et traitement des échantillons

La manipulation des échantillons ainsi que la préparation des coupes sont des étapes particulièrement importantes dans l'obtention de spectres de qualité reproductibles. Différentes méthodes de conservation sont connues et utilisées en biologie pour la conservation des tissus. Trois grandes méthodes s'ouvrent au choix de l'utilisateur indépendamment s'il choisit de conserver les échantillons congelés dans l'azote liquide ou

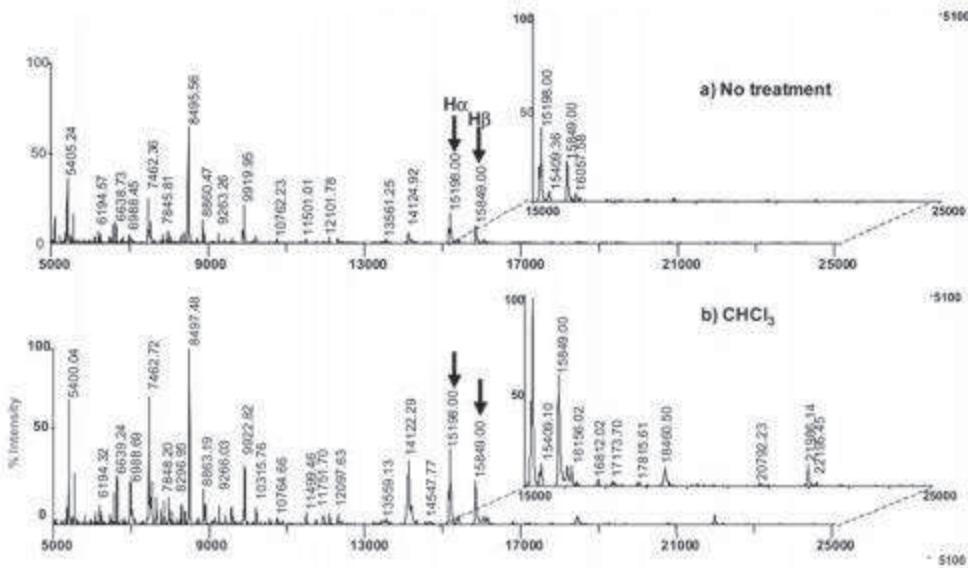
dans l’isopentane refroidi, fixés (déshydratés à l’alcool (EtOH), acide acétique et au paraformaldéhyde) puis congelés rapide à -80°C ou fixés puis inclus dans un milieu (le plus souvent la paraffine). Le paraformaldéhyde entraîne des modifications moléculaires et en particulier une réticulation des protéines par formation de ponts méthylènes par réaction sur les amines primaires (NH<sub>2</sub> terminale, lysines), les thiols ou les fonctions alcools des chaînes latérales des acides aminés [78-80]. La fixation offre une meilleure stabilité aux échantillons du point de vue moléculaire et permet ainsi de les conserver sur de plus longues périodes. Une des méthodes de préparation fréquemment utilisée pour la conservation des échantillons est la fixation au paraformaldéhyde suivie d’une inclusion en paraffine. Ces tissus dits « *Formalin Fixed and Paraffin Embedded* » ou FFPE présentent une très grande stabilité dans le temps (possibilité de conservation à température ambiante) et une grande finesse de préservation des structures tissulaires après coupes [81]. Cette méthode de préservation des tissus est la méthode de référence pour la conservation des échantillons tissulaires (biopsies) en milieu hospitalier. C’est ainsi que des banques des tissus hospitaliers ont été créées et y sont conservées sur plusieurs décennies.

Les étapes de préparation, de conservation et de coupe des tissus sont primordiales. Elles conditionnent la stratégie de l’analyse et sa qualité. Les étapes de traitement de l’échantillon peuvent également être ajoutées avant l’étape de dépôt de la matrice. Ainsi, la qualité des spectres en termes d’intensité, de résolution spectrale ou de pics détectés peut être notamment améliorée par des étapes de lavages des tissus avec des solvants. Les tissus peuvent être lavés à l’alcool pour retirer les sels et certains lipides des coupes de tissus [82, 83]. Comme montré en (**Figure 6**), de tels traitements se traduisent sur les spectres par une augmentation de l’intensité des signaux et du nombre de pics détectés.



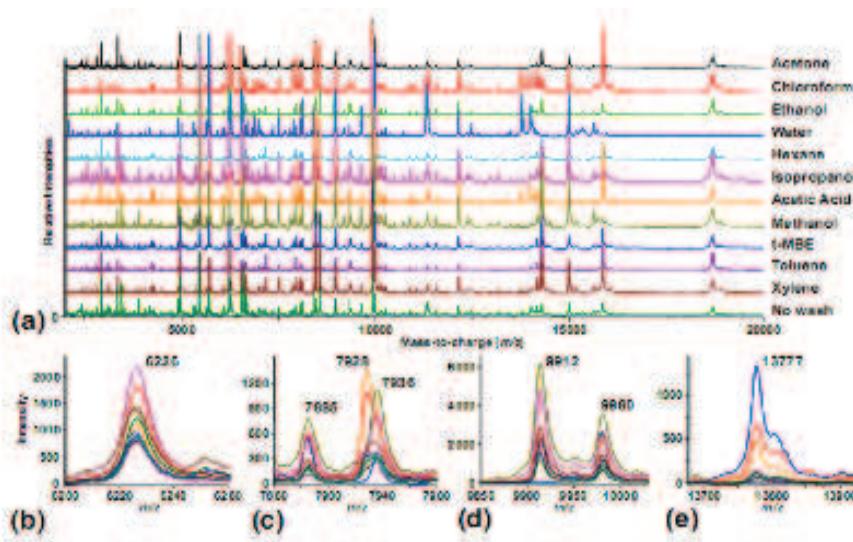
**Figure 6:** Analyse directe après dépôt de HCCA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH (A-B). Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH (C-D) [82].

L'utilisation de solvants peu polaires ou hydrophobes comme le xylène, le chloroforme ou l'hexane améliorait sensiblement la qualité des spectres (intensité des signaux et nombre de signaux détectés) pour l'analyse des peptides et des protéines en permettant le retrait d'un grand nombre de lipides tels que les phospholipides [27] (**Figure 7**). En jouant sur les propriétés physico-chimiques des solvants utilisés, il est possible de favoriser l'observation de certaines classes de composés, comme les peptides ou les protéines. Ces étapes de lavage sont donc très importantes mais doivent être utilisées avec précaution. En effet, il faut garder en mémoire que certains des composés d'intérêts pourraient présenter une solubilité élevée pour les solvants utilisés lors des lavages, ce qui peut entraîner leur retrait ou leur délocalisation dans le tissu étudié. L'éthanol, par exemple, peut conduire au retrait de nombreux peptides mais aussi à la délocalisation de certaines des protéines les plus hydrophiles du tissu et doit donc être utilisé avec précaution[81].



**Figure 7:** Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée et (b) après traitement chloroforme [27].

D'autres travaux réalisés par le groupe de R. Caprioli et coll. [83] ont confirmé le rôle des étapes de lavages sur l'amélioration de la qualité des spectres de protéines. Dans leurs travaux, de nombreux solvants ont été testés incluant différents alcools ou des solvants plus hydrophobes (le xylène, le chloroforme ou l'isopropanol). La **Figure 8** présente les spectres obtenus en fonction de chacun des traitements employés.

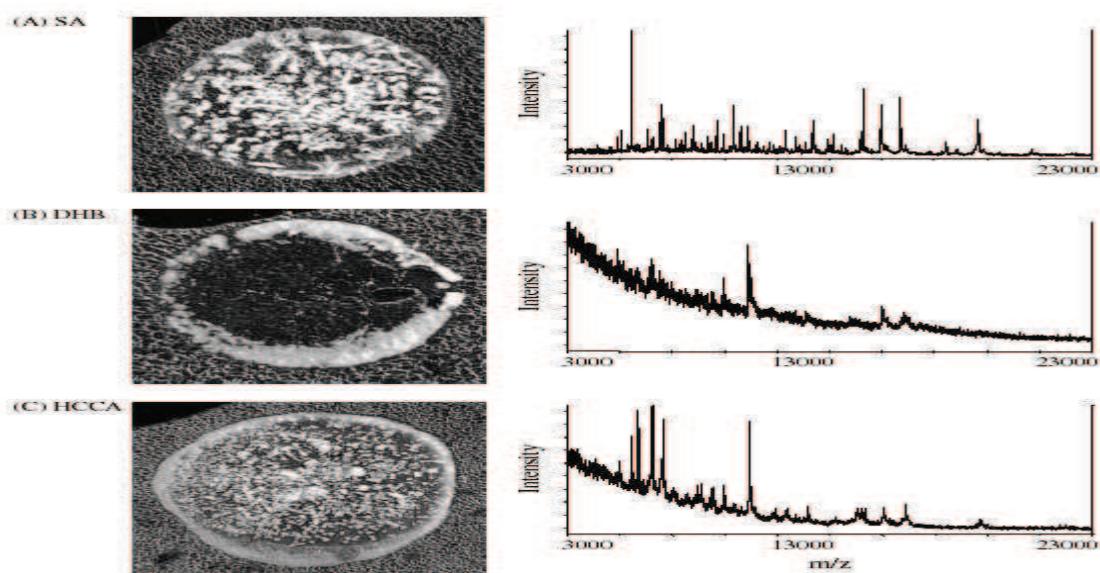


**Figure 8:** Spectre moyen de protéines obtenu à partir d'une coupe de foie de souris. (a) Spectre moyen pour chaque lavage, (b-e) Profil des pics obtenus pour 4 protéines après chaque traitement [83].

Il est clair que le traitement des échantillons notamment par des étapes de lavages est un paramètre important. Ces traitements sont à la fois dépendant des molécules à détecter mais également de l'échantillon lui-même. Cependant, il faut rappeler que certains de ces traitements peuvent induire la délocalisation de molécules d'intérêt tel que les peptides.

#### 1.1.4.2. Le Choix de la matrice et le dépôt de matrice

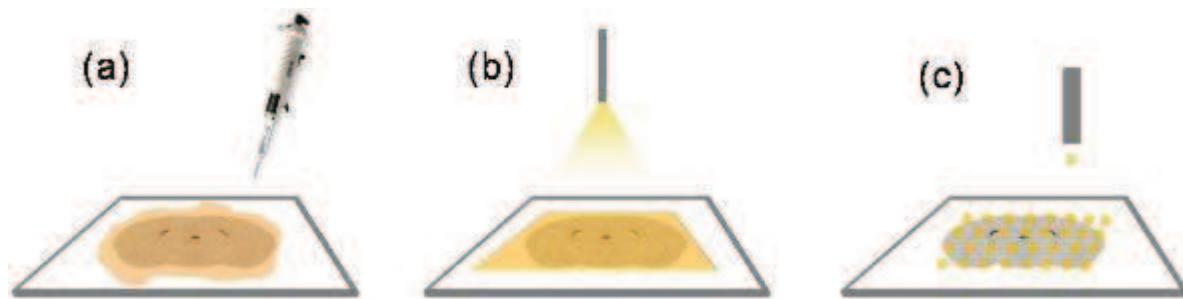
Le choix de la matrice est un paramètre fondamental dans la réalisation d'expériences d'imagerie MALDI puisqu'elle va déterminer la classe de biomolécules détectées mais aussi influencer la qualité des spectres. Généralement pour l'analyse de petites molécules tels que les lipides et les peptides, la matrice employée est la 2,5-DHB [84, 85] puisqu'elle présente peu de pics dans les basses masses. Concernant la détection des protéines, celle-ci est, dans la plupart des cas, effectuée après dépôt de la matrice SA [86] (**Figure 9**). Depuis quelques années, de nouvelles matrices ont été développées permettant d'améliorer la qualité des spectres et donc des images. Il a récemment été montré que les matrices ioniques peuvent offrir des nombreux avantages pour l'imagerie MALDI. Les études réalisées par Lemaire et coll. [26] ont permis de démontrer que l'utilisation des matrices ioniques solides (SIM) augmentent les performances analytiques à partir des tissus et donc conséquemment la qualité des images



**Figure 9:** Cristallisation des trois matrices SA, DHB et HCCA sur une coupe de tissu et les spectres leur correspondant ; les matrices ont été préparées à 20mg/mL dans une solution d'ACN/0,1% TFA dans H<sub>2</sub>O et appliquées à l'aide d'une micropipette. (Schwartz et al. [82]).

La matrice HCCA/ANI montre une cristallisation très homogène comparée à la matrice classique HCCA. D'un point de vue analytique, cette matrice présente une meilleure sensibilité, une meilleure résolution spectrale, une meilleure résistance aux tirs laser ainsi qu'une meilleure stabilité sous vide. La grande stabilité sous vide de cette matrice ainsi que sa résistance aux tirs laser permettent la réalisation d'acquisitions plus longues ou multiples pour des images à plus haute résolution spatiale ou en mode positif puis négatif. HCCA/ANI a été montrée comme étant une matrice très performante pour l'analyse directe de peptides ou pour l'imagerie MALDI [26]. Depuis, d'autres groupes ont utilisé ces matrices dans la cadre des expériences d'imagerie MALDI pour la détection de peptides de digestion enzymatique [87] dans le cadre de la recherche de biomarqueurs du cancer du sein, pour la détection de gangliosides [88] ou encore pour la détection de biomarqueurs du cancer de l'ovaire [89].

En MALDI, les méthodes de dépôt les plus connues sont le dépôt « *dried-droplet* », le dépôt en couche mince ou le dépôt en sandwich [90]. Toutefois, les deux méthodes sont mal adaptées à l'imagerie MALDI. Elles entraînent des délocalisations au sein des tissus. Aujourd'hui, de nombreuses méthodes d'applications des matrices sur les tissus existent dont des méthodes automatisées offrant une meilleure reproductibilité des résultats. Trois stratégies principales d'application de la matrice se sont développées au cours du temps. La **Figure 10** présente ces trois stratégies de dépôt de la matrice *i.e.* le dépôt par micropipette, par spray et par micro-dépôts.



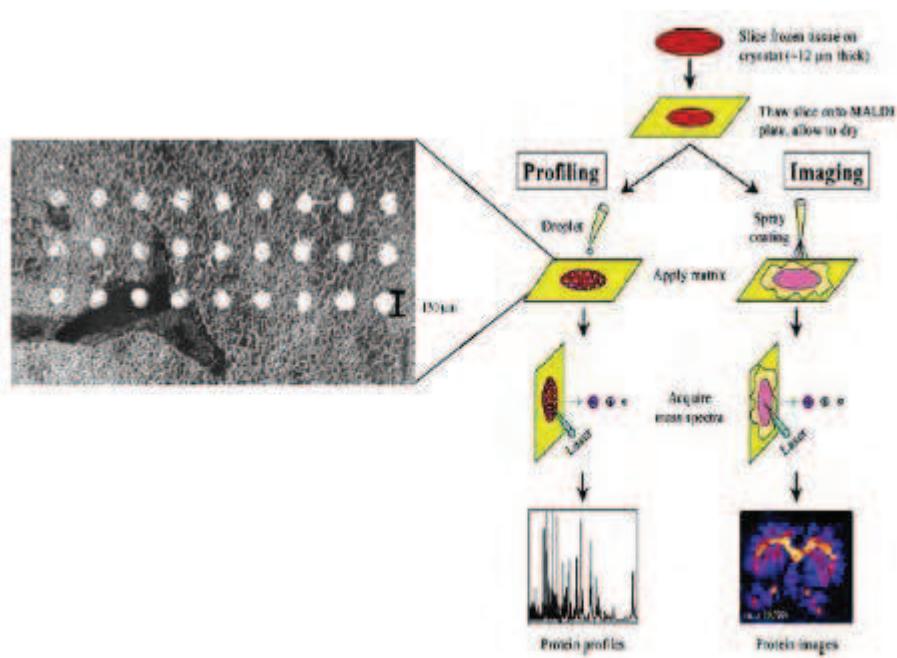
**Figure 10:** Dépôt de matrice manuel(a), par spray (b) et par micro-dépôts(c).

L'approche la plus rapide et la plus simple est le dépôt de la matrice avec la micropipette (**Figure 10.a**). Cette technique de dépôt permet une bonne extraction des molécules mais elle souffre d'une faible reproductibilité et entraîne la délocalisation de certaines molécules dans le tissu. De plus, le dépôt pipette ne génère pas une cristallisation homogène à la surface du tissu pour toutes les matrices.

La deuxième méthode permettant l'application de la matrice sur les tissus consiste à nébuliser la solution de matrice (**Figure 10.b**). Cette nébulisation fournit un dépôt très homogène de la matrice sur la coupe dépendant du débit du spray.

La méthode la plus simple et la moins onéreuse consiste à utiliser un nébulisateur manuel par l'utilisation d'un sprayeur pneumatique [82, 91]. Pour plus de reproductibilité, la nébulisation peut être automatisée et différents types de robots peuvent alors être utilisés [92, 93]. Les dimensions des cristaux sont le plus souvent inférieures au diamètre du faisceau laser et permettent par conséquence de réaliser des images à haute résolution spatiale. De plus, ce mode de dépôt est extrêmement reproductible et parfait pour atteindre une très grande résolution spatiale. Cependant, avec ce type de dépôt, l'efficacité d'extraction des composés des tissus est relativement faible.

Ainsi, il faut trouver le meilleur compromis entre la résolution spatiale des images et la qualité des analyses. L'un des systèmes de nébulisation automatique, l'ImagePrep (*Bruker Daltonics*, Brême, Allemagne), récemment développé, permet de créer un aérosol de matrice par vaporisation vibrationnelle sous atmosphère contrôlée [94]. Une alternative aux méthodes de spray est le dépôt de micro ou nano volumes de solution de matrice sur le tissu (**Figure 10.c**). Cette technique de micro-dépôts permet de couvrir soit l'ensemble de la coupe pour des analyses d'imagerie, soit de pratiquer des dépôts ponctuels dans des régions bien définies de la coupe de tissu pour des analyses directes en mode « *profiling* » (**Figure 11**).



**Figure 11:** Schéma général pour réaliser des expériences de « *profiling* » ou d'imagerie par MS MALDI (D'après Reyzer et coll [95] et Schwartz et coll. [82])

Il existe à l'heure actuelle, des nombreuses procédures pour l'application de la matrice sur les coupes mais elles ne possèdent pas le même pouvoir d'extraction et ne permettent pas d'obtenir la même résolution spatiale. Il est donc nécessaire de choisir la bonne méthode en fonction des besoins de l'analyse. Le **Tableau 2** répertorie certains instruments disponibles à l'heure actuelle pour le dépôt automatique de matrice.

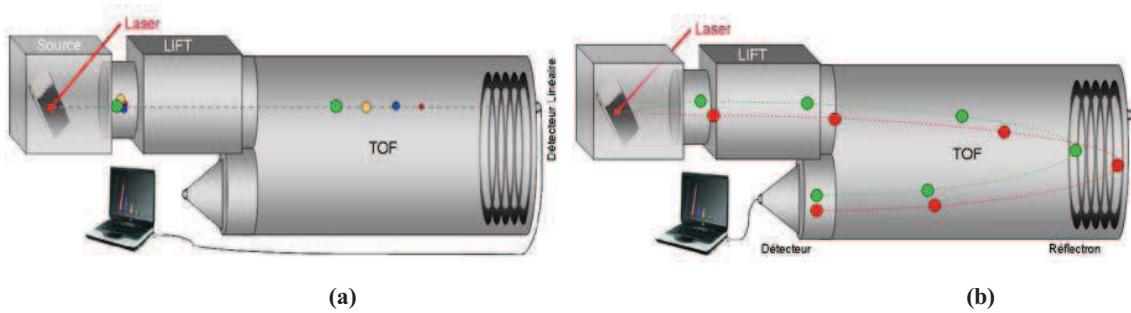
Nom	Constructeur	Méthode de dépôt	Taille du dépôt
ImagePrep	Bruker	Vaporisation vibrationnelle	25 µm
Chemical inkjet printing [96]	Shimadzu Biotech	Piézo-électrique	100-150 µm
TMiD	LEAP Technologies	Ejection par Nano-Pompe	200 µm
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Dépôt par un Capillaire	100-150 µm
Portrait™ 630 Reagent Multi-Spotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	150 µm
NC	Siliflow	Piézo-électrique	~300 µm

**Tableau 2:** La liste de certains appareils utilisés pour le dépôt automatique de la matrice sur les tissus.

#### 1.1.4.3. Imagerie MALDI et instrumentations

Après avoir préparé les échantillons, l'acquisition des données s'effectuera dans le spectromètre de masse. Différents types d'analyseurs peuvent être couplés à la source MALDI. La majorité des expériences d'imagerie MALDI s'effectuent avec un analyseur de type TOF (*Time Of Flight*) dont la gamme de masse est illimitée. Cet analyseur est parfaitement adapté à l'analyse des biomolécules mono-chargées et donc aux ions produits en MALDI. Actuellement, le TOF reste le seul analyseur permettant l'imagerie des composés de

haut poids moléculaire tels que certains peptides ou les protéines. Le TOF possède deux modes de séparation. Un mode linéaire sensible et moins résolutif, en rapport direct avec la longueur du tube de vol. Ce mode est adapté pour les molécules de haut poids moléculaires (**Figure 12.a**). L'autre mode est le mode réflecteur, moins sensible mais plus résolutif (**Figure 12.b**). Cependant, les réflecteurs équipant les instruments commerciaux ne sont utilisables que pour des  $m/z$  restreints (<8000-10000 Da) de par leur faible diamètre. Ainsi, les TOF sont des instruments permettant de réaliser des images à haut débit en augmentant la fréquence de répétition des tirs laser sans qu'existe une collision avec le temps d'analyse. Cependant, l'une des limites du TOF reste sa résolution spectrale. En moyenne, la résolution spectrale est d'environ 10 000-15 000 pour un  $m/z$  de 1500 en routine. Ainsi, des composés présentant des masses très proches peuvent ne pas être distinguables sur les spectres TOF.



**Figure 12:** Principe du MALDI-TOF en mode linéaire (a), en mode Réflectron (b)

Néanmoins, si les TOF sont le plus souvent couplés aux sources MALDI, d'autres couplages existent et peuvent être utilisés aux fins de l'imagerie et notamment des analyseurs permettant d'atteindre des résolutions spectrales plus grandes. L'utilisation d'instruments de type FT-ICR [97] peut palier à ces problèmes de résolution spectrale puisque sur ces analyseurs des résolutions spectrales jusqu'à 1 000 000 peuvent être atteintes [98]. En revanche, les analyseurs FT-ICR sont limités en gamme de masse et présentent un cycle utile assez long. De plus les instruments MALDI/FT-ICR sont sensibles lors de l'analyse des composés de faible poids moléculaire comme les lipides ou des médicaments [99]. En revanche, ils sont moins sensibles lors de l'analyse de composés de plus haute masse. Une autre approche pour palier à la difficulté de séparation de composés de  $m/z$  proches, consiste à rajouter une dimension de séparation suivant un critère différent de  $m/z$ . C'est ce qui peut être obtenu par utilisation d'une cellule de mobilité ionique [100-105] couplée à une source MALDI. La mobilité ionique permet, dans une première dimension, de séparer les ions suivant leur conformation en phase gazeuse (section efficace). Ces ions sont ensuite de nouveau séparés selon leur  $m/z$  dans un analyseur conventionnel. L'utilisation d'une mobilité ionique couplée à

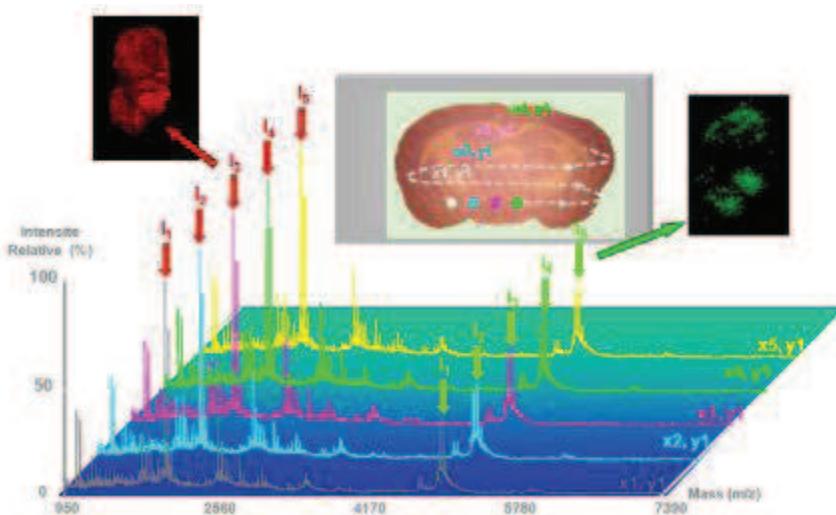
une source MALDI est efficace pour ces problématiques et permettent des distinguer des ions isobares (rapport m/z presque identique) à partir de tissus [106]. D'autres part, il est possible de coupler la source MALDI avec des analyseurs plus adaptés à la fragmentation pour des analyses structurales poussées comme le couplage avec des analyseurs quadripolaires et notamment avec un triple quadripôle (TQ) ou des analyseurs de type trappes à ions qu'ils s'agissent de pièges de Paul ou de trappes linéaires (LTQ). Ces analyseurs à champ quadripolaire sont particulièrement employés pour la recherche de médicaments et de leurs métabolites à partir de tissus [107-109] ainsi que des lipides [110]. Avec les avancés dans le domaine de la MS, des nombreux appareils dits « hybrides » sont disponibles comme les instruments quadripôles-temps de vol (Q-TOF) [111], les quadripôles-trappes ioniques (QIT) couplées à un TOF [112] ou les MALDI dits TOF/TOF [113]. Le **Tableau 3** répertorie certains des instruments disponibles actuellement pour l'imagerie MALDI.

Instrument	Fournisseur	Type	Laser	Gamme de masse	Résolution Max	Logiciel	Format de fichier
QSTAR Elite System	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	Nd-YAG 1 kHz	40-40kDa	150µm	oMALDI Server 5.1, TissueView	Wiff, Analyse
QSTAR Pulsar i System	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	Nd-YAG 1 kHz	40-40kDa	150µm	oMALDI Server 5.1, TissueView	Wiff, Analyse
QSTAR XL system	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	Nd-YAG 1 kHz	40-40kDa	150µm	oMALDI Server 5.1, TissueView	Wiff, Analyse
4800 MALDI TOF/TOF Analyser	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF/TOF	Nd-YAG 200Hz	Full	50µm	4800 Img, TissueView	Analyse
4700 Proteomics Analyser	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF/TOF	Nd-YAG 200Hz	Full	50µm	4700 Img, TissueView	Analyse
Voyager DE STR Workstation	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF	N2 20 Hz	Full	100µm	MMSIT, Biomap	Analyse
Voyager DE PRO Workstation	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF	N2 20 Hz	Full	100µm	MMSIT, Biomap	Analyse
UltraFlex III	Bruker	TOF/TOF	SmartBeam Nd-YAG 200Hz	Full	50µm	FlexImaging	Xmass, XML
UltraFlexTreme	Bruker	TOF/TOF	SmartBeam II Nd-YAG 1kHz	Full	10µm	FlexImaging	Xmass, XML
AutoFlex III	Bruker	TOF	SmartBeam Nd-YAG 200Hz	Full	50µm	FlexImaging	Xmass, XML
AXIMA QIT	Shimadzu	Ion trap/TOF	N2 10Hz	20kDa	100µm	Axima2Anlyse	Analyse
AXIMA series	Shimadzu	TOF	N2 50Hz	500kDa	100µm	Axima2Anlyse	Analyse
AXIMA Performance	Shimadzu	TOF/TOF	N2 50Hz	500kDa	100µm	Axima2Anlyse	Analyse
MALDI Q-TOF Premier	Waters	Qq-oaTOF	Nd-YAG 200Hz	40kDa	100µm	MassLynx, Biomap	XML
MALDI micro MX	Waters	TOF	N2 20Hz	Full	200µm	MassLynx, Biomap	XML
MALDI Synapt HDMS	Waters	Q-IMS- oaTOF	Nd-YAG 200Hz	40kDa	100µm	MassLynx, Biomap	XML
MALDI Synapt MS	Waters	Q-TWave- oaTOF	Nd-YAG 200Hz	40kDa	100µm	MassLynx, Biomap	XML
MALDI-LTQ-Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific	LTQ- orbitrap	N2 laser 60 Hz	5 kDa	80-100 µm	Imagequest Biomat	XML

**Tableau 3 :** La liste des différents spectromètres de masse disposant d'une source MALDI compatible avec l'IMS ainsi que leurs logiciels utilisés pour l'acquisition et la reconstruction des images.

#### 1.1.4.4. Imagerie MALDI, développements informatiques et traitement des données

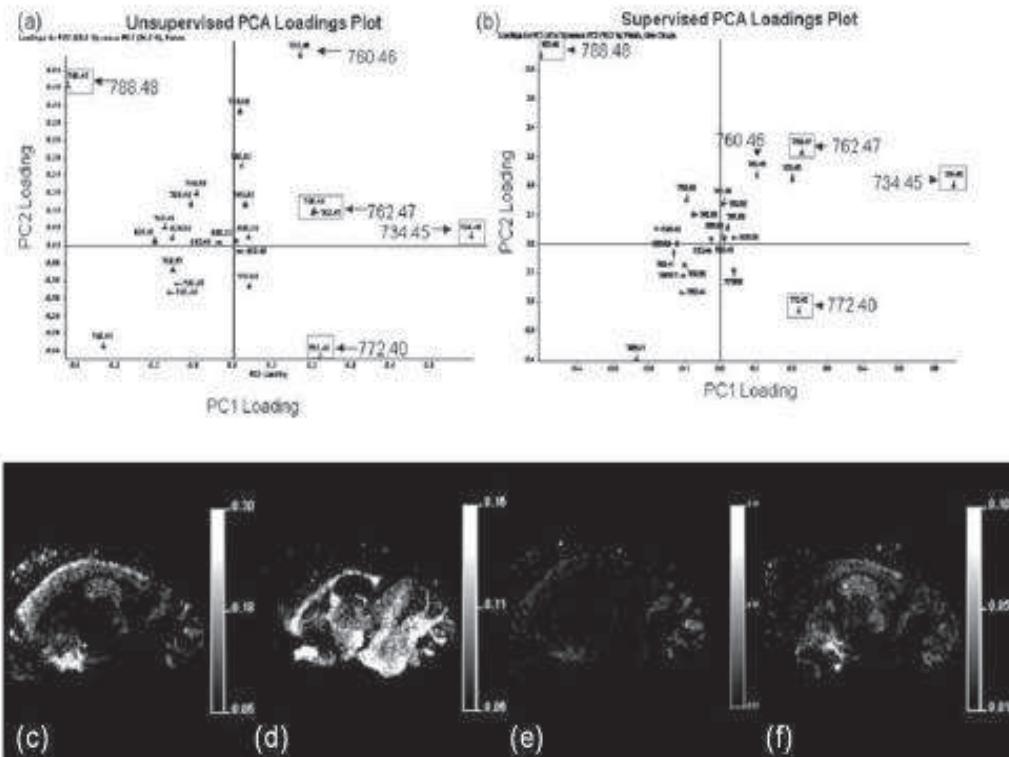
Dans la très grande majorité des cas, l'acquisition des données est réalisée en mode point par point. Ainsi les données se présentent sous la forme d'une matrice à trois dimensions où sont stockées les valeurs des couples ( $m/z$ , I) pour chaque point de coordonnées (x, y) analysé. Pour la reconstruction de l'image d'un  $m/z$  donné, le logiciel fait correspondre les variations d'intensité sur une gamme de variation de couleurs qui seront reportées pour toutes les coordonnées analysées. Le logiciel de reconstruction des images peut présenter différentes fonctions supplémentaires facilitant la présentation des données à l'utilisateur. Il est également possible de réaliser un traitement des données avant la reconstruction des images, en proposant par exemple un lissage des spectres, un retrait du bruit de fond ou un réalignement des spectres (Figure 13).



**Figure 13:** Représentation schématique du principe de réalisation des images à partir d'ions moléculaires détectés au sein d'un tissu par MS

Indépendamment de l'appareil utilisé, il existe plusieurs logiciels permettant l'acquisition et la reconstruction des images. Plusieurs d'entre eux sont disponibles librement sur le site <http://maldi.ms> développé par Markus Stoeckli (Novartis). Par exemple MMSIT pour les appareils Voyager commercialisés par *Applied Biosystems* ou MITICS développé au sein de l'unité pour les appareils *Bruker* et *Applied Biosystems*) [94]. Si aujourd'hui tous les constructeurs proposent leur propre logiciel pour l'acquisition des images, la reconstruction est souvent réalisée à l'aide d'un logiciel appelé Biomap (Novartis). Concernant la société

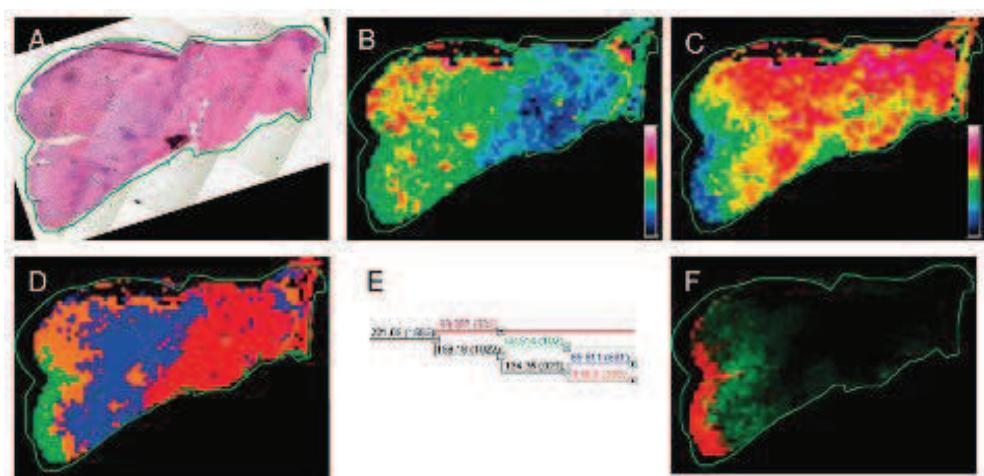
Bruker (Brême, Allemagne), celle-ci propose un logiciel capable de réaliser à la fois l'acquisition des images et aussi leur reconstruction à l'aide du logiciel *FlexImaging*. Ce dernier possède des nombreuses options notamment sur le traitement des données comme le lissage ou le retrait de la ligne de base qui sont des paramètres importants pour la qualité des images. Quelque soit la classe des biomolécules étudiées, l'information collectée à partir de l'analyse MALDI est conséquente. Plus d'une centaine d'ions peuvent être détectés et l'analyse peut devenir rapidement importante si chaque pic doit être analysé séparément. Afin de réduire le temps d'analyse et de simplifier l'interprétation des jeux de données, de nombreux outils informatiques se sont progressivement développés. L'utilisation de l'analyse statistique multivariée permet de réduire la complexité de l'information notamment avec l'utilisation de l'analyse en composante principale (*PCA*) [114-118] en conservant le plus d'information possible. Cet outil permet de transformer le système de coordonnées original défini par l'intensité des pics en un système de coordonnées dit en composantes principales (PC1, PC2, PC3) qui définit de manière plus simple les variances dans le jeu de données. En réduisant la dimensionnalité, d'un ensemble des données (l'échantillon), on obtient un nouvel ensemble plus petit que l'ensemble d'origine de variables, qui néanmoins contient la plupart de l'information de l'échantillon. Il devient alors très facile de mettre en évidence des variances au sein d'un même groupe (échantillon) ou entre deux groupes, soit au sein d'une même coupe ou entre deux coupes de tissus correspondant à des conditions différentes et par conséquent de mettre en évidence les biomolécules régulées (**Figure 14**).



**Figure 14:** Résultats PCA non supervisés (a) et supervisés (b) montrant des lipides différemment exprimés dans le cerveau de rat. Image de l'ion  $m/z$  734.45 (c) présent dans la matière grise, de l'ion  $m/z$  788.48 (d) présent dans la matière blanche, de l'ion  $m/z$  762.47 (e) et de l'ion  $m/z$  772.40 (f) présents dans le cortex cérébral [115].

De plus, les scores de la première composante principale peuvent aussi être utilisés afin de générer une image significative représentant les zones où il y a le plus de variances dans le jeu de données. En effet, la première composante principale contient la variation principale et les différentes régions du tissu doivent contribuer à cette variation principale. Il est donc très probable que l'image des scores *PCA* reflète assez bien les caractéristiques histologiques du tissu. Cependant, bien que l'analyse *PCA* permette une extraction rapide des informations, il reste possible que les spectres soient similaires sur une composante principale et, très distants sur une autre. La (**Figure 15.B**) présente l'image des scores obtenus à partir de la première composante principale. Cette image présente une bonne corrélation avec les caractéristiques histologiques de la coupe, alors que l'image obtenue à partir de la deuxième composante principale ne semble pas être cohérente (**Figure 15.C**). Pour palier à ce problème, une hiérarchisation des spectres en clusters peut alors être réalisée [119] en regroupant par classes les spectres présentant des similarités. Un dendrogramme contenant tous les spectres est alors généré (**Figure 15.E**). Chaque branche du dendrogramme pouvant être considérée

comme une classe de spectres sélectionnable et correspondant à une caractéristique histologique. Chaque branche est représentée par une couleur spécifique permettant de reconstruire une image complète de la répartition de chaque branche (**Figure 15.D**). Par cette technique, il devient possible de mettre en évidence les différentes caractéristiques histologiques qui peuvent être propres à un état physiologique ou à une pathologie. Avec cette voie, la création des modèles correspondant à différents stades d'une pathologie permettant de faire du diagnostic peut être réalisée.



**Figure 15 :** Coloration H&E d'une biopsie de cancer de l'estomac (A). Représentation des scores obtenus à partir de la première composante principale (B) et à partir de la seconde composante principale (C). Image reconstruite en utilisant les jeux de couleurs du dendrogramme Image MALDI de l'ion  $m/z$  3371 (vert) (E), et de l'ion ( $m/z$  3328) déterminés par PCA (D) (F) [120].

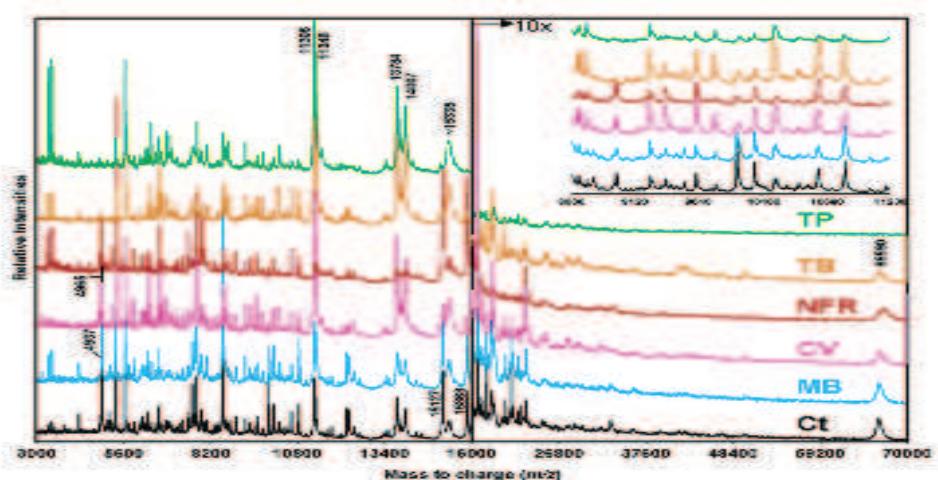
L'imagerie MALDI offre de nombreuses possibilités pour la recherche de biomarqueurs et avec l'arrivée de nouveaux outils informatiques telle que la hiérarchisation, une nouvelle voie d'application est maintenant ouverte vers le diagnostic [121].

Tous ces outils statistiques permettent de mettre en évidence des biomolécules différenciellement exprimées au sein du tissu (PCA) ou des régions qui présentent des caractéristiques différentes (*Clustering*). Dans le cadre des applications cliniques, il est particulièrement important pour interpréter les données issues de l'imagerie MALDI de corrélérer les images moléculaires avec les informations histologiques. Les outils bioinformatiques actuels permettent de superposer les images MALDI avec des images optiques du tissu enregistrées avant la préparation des tissus pour l'imagerie MALDI.

S'il est possible de reconnaître la forme du tissu pour pouvoir définir la zone où effectuer les analyses MALDI, il est cependant très difficile d'observer les caractéristiques

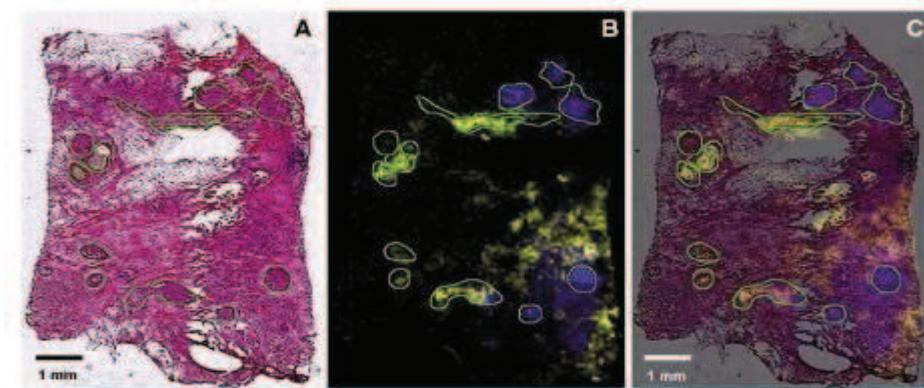
histologiques sur de telles images. Trois approches peuvent être employées afin de corrélérer les caractéristiques histologiques avec l'approche MALDI-MSI. Ces différentes approches peuvent aussi aider les histopathologistes, pour l'interprétation des résultats histologiques en ajoutant aux données habituelles des données moléculaires.

- ✓ La première consiste à effectuer deux coupes consécutives à partir d'un tissu puis de réaliser sur l'une d'entre elles l'analyse MALDI et sur l'autre la coloration histologique. Cette procédure permet d'utiliser n'importe quel type de coloration en particulier la coloration Hematoxyline–Eosine (H&E). Cependant l'inconvénient de cette technique résulte dans le fait que l'image histologique et l'image MALDI ne proviennent pas de la même coupe ne permettant pas une corrélation parfaite des informations.
- ✓ La seconde procédure consiste à réaliser la coloration histologique et l'imagerie MALDI sur la même coupe [122, 123] conduisant à une corrélation sans ambiguïté. La coloration la plus employée dans le cas d'études pathologiques reste l'H&E mais cette procédure n'est pas compatible avec l'imagerie MALDI. Afin de remédier à ce problème, des protocoles ont été développés permettant l'analyse histologique et l'imagerie MALDI sur la même coupe de tissu. Cette procédure implique l'utilisation de colorants compatibles avec la MS tels que le violet de crésyl et le bleu de méthylène ainsi que d'autres colorants n'affectant pas le signal (**Figure 16**). Néanmoins, cette technique nécessite une étape supplémentaire avant l'analyse MALDI pouvant entraîner la délocalisation de certains composés.



**Figure 16:** Profil de protéines obtenu par MALDI-MS à partir d'un tissu non coloré (Ct: contrôle) et de 5 tissus colorés au Polychrome de Terry (TP), au Bleu de toluidine (TB), Nuclear Fast Red (NFR); au Violet de Crésyl (CV) et au Bleu de Méthylène (MB) [122].

- ✓ Une troisième approche introduit récemment [124] montre qu'il est possible de réaliser l'analyse MALDI puis de retirer la matrice afin d'effectuer la coloration à posteriori. Par cette procédure, il devient possible d'utiliser la coloration H&E permettant d'obtenir une très bonne corrélation entre les deux techniques sans pertes d'informations (**Figure 17**).



**Figure 17:** Coupe d'une lésion de sein après (A) coloration H&E après analyse MALDI. (B) Image moléculaire de l'ion  $m/z$  9750 (jaune) et l'ion  $m/z$  4519 (bleu). (C) Superposition des images MALDI et de la coloration H&E [121].

#### 1.1.4.5. Temps d'acquisition en imagerie MALDI et Résolution spatiale

L'imagerie MALDI permet d'acquérir des données sur plusieurs centaines de composés en une seule étape d'acquisition. Cependant cette étape d'acquisition requiert un temps non négligeable. Le temps d'acquisition est influencé par plusieurs paramètres tels que la vitesse d'acquisition des données, autrement dit la fréquence des tirs lasers, mais aussi par la résolution spatiale désirée pour l'image. La vitesse d'acquisition des données dépend elle-même de la fréquence de répétition des tirs laser, du nombre de tirs moyennés par point ainsi que de la vitesse de déplacement d'un point à un autre. Concernant la résolution spatiale des images, deux cas de figure se présentent :

- ✓ Le premier concerne l'acquisition des images à partir d'un échantillon dont la matrice a été déposée par micro-dépôts. La résolution spatiale n'est alors pas modifiable et conditionnée par la distance entre les micro-dépôts soit généralement environ 250  $\mu\text{m}$  centre à centre. Le temps d'analyse ne dépend alors que de la fréquence des tirs laser et du nombre de spectres accumulés à chaque position.
- ✓ Le deuxième cas concerne un échantillon dont la matrice a été déposée de façon homogène sur l'ensemble de la coupe à l'aide d'un nébuliseur automatique par exemple.

Le temps d'analyse est limité par la résolution spatiale de la technologie (i.e. au minimum le diamètre de l'aire d'intersection entre le faisceau laser et la surface), la fréquence des tirs laser et le nombre de spectres accumulés en chaque position.

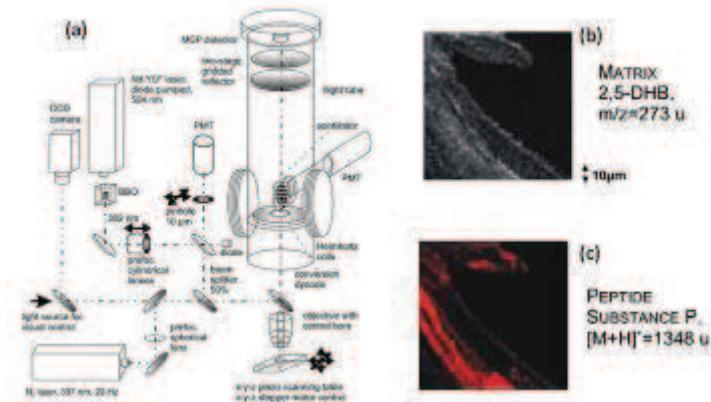
Traditionnellement la majorité des sources MALDI ont été équipées de laser azote émettant dans l'UV à 337 nm. Ces lasers ayant montré au début du MALDI des performances analytiques supérieures à d'autres lasers de type IR. De nos jours, afin de pouvoir atteindre une répétition des tirs laser plus grande, les sources MALDI sont souvent équipées de laser de type Nd :YAG. Ces lasers de type « solide state » présentent une durée de vie plus grande et peuvent fonctionner facilement à de grandes fréquences. La troisième harmonique de ces lasers qui émettent en IR, est utilisée pour atteindre l'UV avec une longueur d'onde de 355 nm. Depuis quelques années, des lasers présentant des fréquences de répétition des tirs allant jusqu'à 20 kHz sont apparus [125, 126]. Il faut donc supposer que le temps d'acquisition va encore grandement diminuer dans les années à venir ce qui permettrait la réalisation d'images à plus haut débit. En 2009, les constructeurs de spectromètre de masse présentent les premiers instruments équipés de lasers ayant une fréquence de 1 kHz (**Tableau 3**). Ceci permettrait d'offrir des temps d'acquisition alors parfaitement compatible, par exemple, avec une utilisation de l'imagerie MALDI en clinique pour le diagnostic extemporané.

Ainsi, l'imagerie MALDI est une technique qui arrive progressivement au niveau cellulaire. Permettre à l'imagerie MALDI de parvenir au niveau subcellulaire comme l'imagerie SIMS qui travaille en routine avec une résolution spatiale de 1 µm reste l'un des développements majeurs pour l'imagerie MALDI dans les prochaines années.

#### 1.1.4.6. Les méthodes dérivées de l'imagerie MALDI

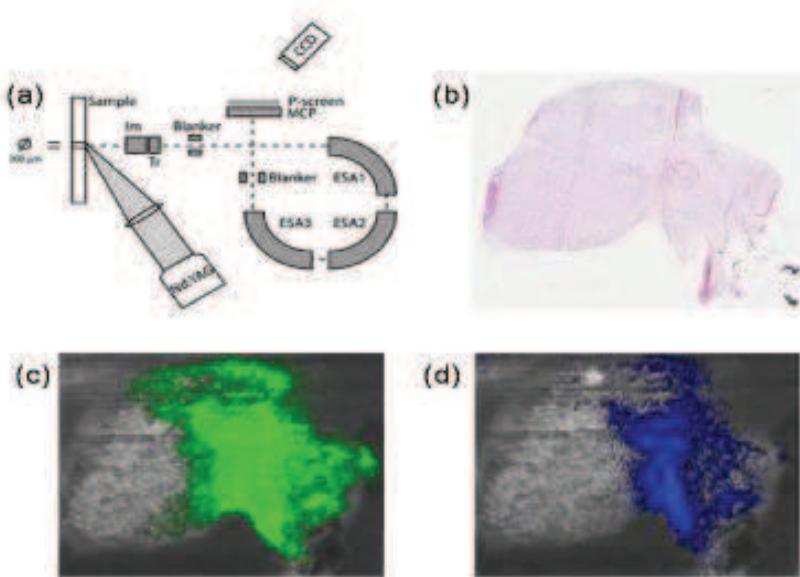
D'autres techniques d'imagerie ont été développées prenant appui sur l'imagerie MALDI. Il s'agit de l'imagerie SMALDI (*Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). Cette technique a été présentée par l'équipe de B. Spengler en 2002[127]. Cet appareil hybride entre le LAMMA et le MALDI (**Figure 18.a**) présente une focalisation du laser jusqu'à 1 micromètre permettant d'obtenir une résolution spatiale au niveau subcellulaire. Un exemple de cette application montre qu'il est possible d'observer la distribution de peptides et des cations contenus dans les cristaux de la matrice 2,5-DHB [128]

**(Figure 18.b-c).** Le système SMALDI, couplé à un instrument de type orbitrap a permis l'acquisition d'images à 5-10  $\mu\text{m}$  de résolution spatiale de lipides. Même si les peptides ne sont pas encore analysables avec une bonne sensibilité sur ce système il représente néanmoins un développement clef pour l'imagerie MALDI vers l'échelle sub-cellulaire.



**Figure 18:** Schéma du système SMALDI(a) [127]. Images SMALDI de cristaux de 2,5-DHB (b) et de la répartition de la substance P dans les cristaux de 2,5-DHB(c) [128].

Un concept très différent permettant d'obtenir des images de haute résolution spatiale consiste à travailler en mode microscope. Ce mode microscope permet à partir d'une source MALDI de générer des ions qui conserveront leurs positions relatives jusqu'à un détecteur de position. Dans ce cas, la résolution spatiale est conditionnée par la taille des cristaux de la matrice, la précision des optiques ioniques et la résolution du détecteur de position. Un tel concept a été proposé par R. Heeren et coll. [130]. Il est possible de défocaliser le laser et d'atteindre une résolution jusqu'à quelques microns [131] (**Figure 19**). Bien que cette approche présente de nombreux avantages, il faut souligner que cet appareil reste exclusivement dédié à la MSI des petites molécules et qu'il n'offre pas la possibilité d'effectuer des analyses structurales par MS/MS.



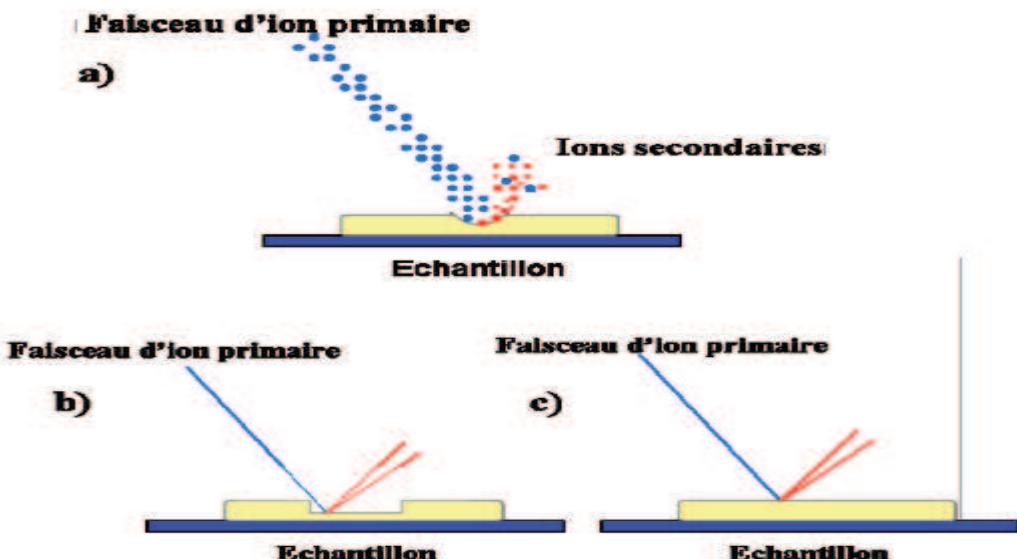
**Figure 19:** Schéma du dispositif microscope (a). Image optique d'un coupe d'hypophyse humain (b) et les images moléculaires de neuropeptides tels que la vasopressine (c) et l'ocytocine(d) [132].

#### - L'imagerie SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*)

Le SIMS est une technique qui repose sur le bombardement de l'échantillon par un faisceau d'ions mono/poly-atomique ou sous forme de cluster (agrégats) d'ions ayant une énergie de l'ordre du KeV ou du MeV. Différents types de sources d'ions primaires peuvent être utilisées. Les plus classiques sont des sources de types LMI (*Liquid Metal Ion*) produisant un faisceau d'ions primaires  $\text{Ga}^+$  ou  $\text{In}^+$  avec une énergie cinétique jusqu'à 25 keV et un faisceau primaire pouvant être focalisé jusqu'à  $\sim 1\mu\text{m}$ . Les sources d'ions primaires  $\text{Cs}^+$  (sources d'ions solides) sont également utilisées, avec un faisceau accéléré à 10 keV et une focalisation jusqu'à  $\sim 2\text{-}3\mu\text{m}$ . Une large variété d'autres types d'ions ou de clusters d'ions peut être utilisée comme les clusters  $\text{Au}^{n+}$  ou  $\text{Bi}_n^{m+}$ . L'irradiation de la surface par ces ions primaires conduit à l'émission de particules secondaires de différents types parmi lesquels des ions (positifs ou négatifs) qui seront analysés par l'analyseur associés. La possibilité de visualiser la distribution des macromolécules par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) directement à partir d'échantillons organiques a été démontrée au début des années 60 par Castaing et Slodzian.

Le SIMS peut fonctionner suivant différents modes. En mode classique (SIMS dynamique) (**Figure 20.b**), la densité d'ions reçue par la surface conduit à une érosion rapide permettant une analyse en profondeur du matériau. En diminuant la densité d'ions projetée sur

la surface (mode SIMS statique) (**Figure 20.c**), les dommages générés à la surface du matériau seront pratiquement restreints à la première couche de matériau permettant une analyse de surface [133]. Le SIMS statique est bien adapté à la réalisation d'images [134, 135]. De plus, dans ce mode des masses plus élevées de composés organiques peuvent être détectées contrairement au mode dynamique utilisé pour l'analyse d'éléments monoatomiques ou de petits groupements (ex  $\text{CN}^-$ ). L'avantage du SIMS provient de la possibilité de focaliser le faisceau primaire incident jusqu'à un diamètre de quelques microns, rendant possible la réalisation des images à un niveau subcellulaire [136]. Lors de la réalisation des images, si la zone à balayer est petite ( $256 \times 256$ ), le faisceau incident se déplace à la surface de l'échantillon en utilisant des jeux de lentilles d'extraction. Pour des surfaces plus grandes (coupe entière de cerveau de rat) c'est le support de l'échantillon qui se déplace sous le faisceau.



**Figure 20:** Principe d'ionisation SIMS (a) et fonctionnement en mode (b) dynamique et statique (c)

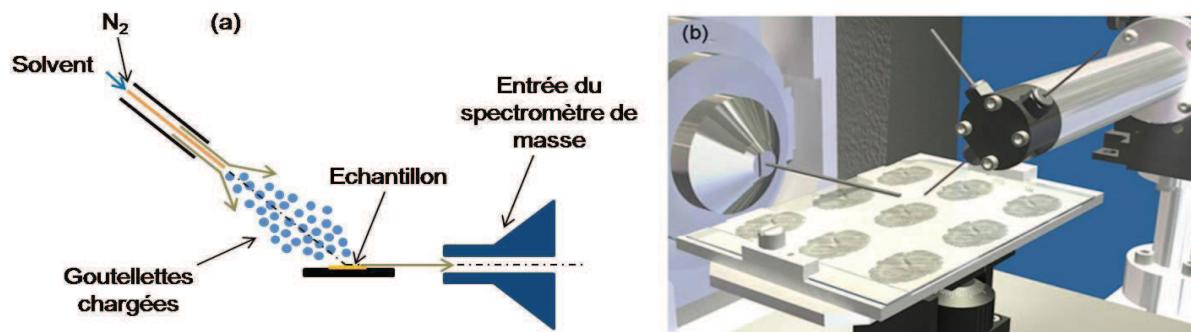
En revanche, la gamme de masse accessible avec cette technique est très restreinte et limitée à des composés de masse  $M < 1000$  u. Elle permet facilement l'étude des éléments monoatomiques, tels que les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  qui sont particulièrement abondants dans les organismes ou encore de certains composés de faible masse comme la famille des lipides [134]. Depuis plusieurs années, des développements sont réalisés dans le but de rendre analysable des composés de plus haute masse tels que les peptides. Il faut en particulier noter les développements de SIMS avec une matrice (*ME-SIMS : Matrix Enhanced-Secondary Ion*

*Mass Spectrometry)*[137], l'utilisation de source d'agrégats comme ions primaires incidents [19, 138] ou la réalisation d'un dépôt métallique en surface de l'échantillon (*Meta-SIMS : metal-assisted-Secondary Ion Mass Spectrometry*) [139, 140]. Ces développements permettent d'augmenter le nombre et la masse des composés analysables en SIMS. Le SIMS est donc devenu une méthode d'imagerie moléculaire particulièrement performante et en particulier pour l'analyse de composés de faible masse (lipides) avec une grande résolution spatiale.

### - Autres sources pour l'imagerie

Il existe d'autres technologies utilisant un faisceau laser ou ionique, parmi celle-ci, la *Desorption Electrospray Ionization (DESI)*. En 2004, Graham Cooks présente cette nouvelle source de production d'ions [141]. Dans cette source, un solvant est propulsé à travers un capillaire sous haute tension vers la surface de l'échantillon (**Figure 21**). Les gouttelettes chargées vont rebondir en emportant des molécules de la surface.

Cette technique a été employée pour étudier de nombreuses classes de composés présents sous forme de trace, incluant des médicaments, des explosifs mais aussi des peptides, des protéines, des nucléotides [142]. Par la suite, il a été démontré la possibilité de suivre des composés alcaloïdes au sein de tissus végétaux [143].

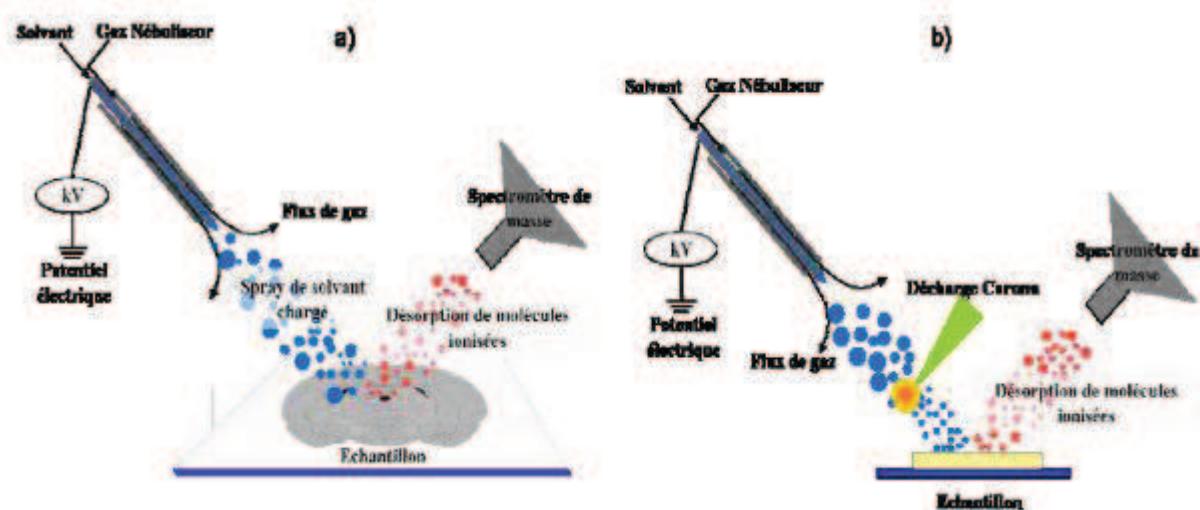


**Figure 21:** Schéma de la source DESI (a) et de la procédure pour l'MSI (b)

Grâce à l'automatisation du déplacement du support de l'échantillon, des plaques de chromatographie ont pu être analysées [144]. Il a également été démontré la possibilité de détecter directement des lipides à partir de tissus prélevés du pancréas de souris, du cerveau de rat ou dans des tissus cancéreux [145]. Cette technique ouvre la voie à une analyse directe voire une imagerie de surface de tissu in-vivo puisqu'elle n'est que peu destructrice et ne nécessite pas de préparation pour l'échantillon. Evolution directe de cette technique, le **JEDI**

(Jet Desorption ionization) utilise un jet de solvant à autre pression et permet une analyse en profondeur de l'échantillon (**Figure 22.a**).

Une autre technique récemment introduite nommée Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (**DAPCI**) utilise des ions projetés en phase gazeuse générés sous pression atmosphérique par une décharge corona dans des vapeurs de toluène ou autres composés (**Figure 22.b**). Certains composés donnent des intensités ioniques insuffisantes en DESI alors qu'ils fournissent une sensibilité accrue en DAPCI [146].



**Figure 22:** Principe des sources JEDI (a) et DAPCI (b)

Une autre méthode s'inspire de ces mécanismes de désorption. Il s'agit du *Direct Analysis in Real Time* (**DART**) [147]. Ce procédé utilise un gaz ayant un haut potentiel d'ionisation (généralement de l'hélium) sur lequel un potentiel électrique est appliqué (**Figure 23.a**). Un plasma va alors être formé, constitué d'atomes excités et d'ions. En percutant la surface, une désorption d'ions de faibles masses moléculaires va avoir lieu. Une étude comparant le DESI, le DART et le DAPCI a été publiée [148].

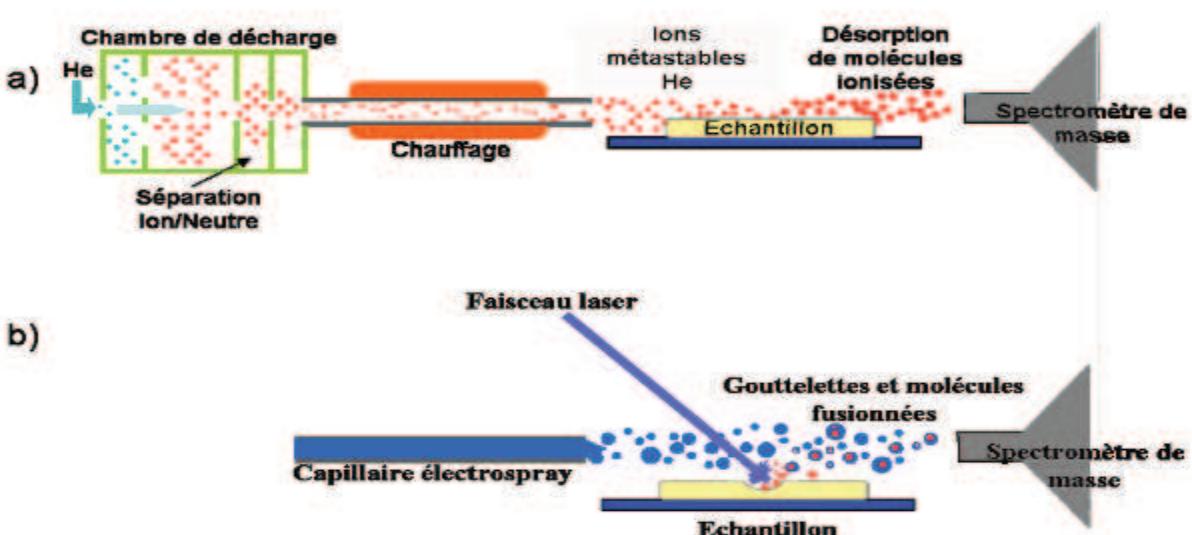


Figure 23: Principe des sources DART (a) et ELDI (b)

L’ELDI, est une technique qui couple l’ESI et la désorption laser: l’*electrospray assisted laser desorption/ionisation*. Un laser va entraîner la désorption de matériel sur la surface de l’échantillon qui va rentrer en contact et fusionner avec les gouttelettes chargées de solvant produites par ESI, gouttelettes qui seront transmises au spectromètre de masse (**Figure 23.b**).

Le tableau 4 offre un aperçu des différents types de sources qui peuvent appliqués à la MSI

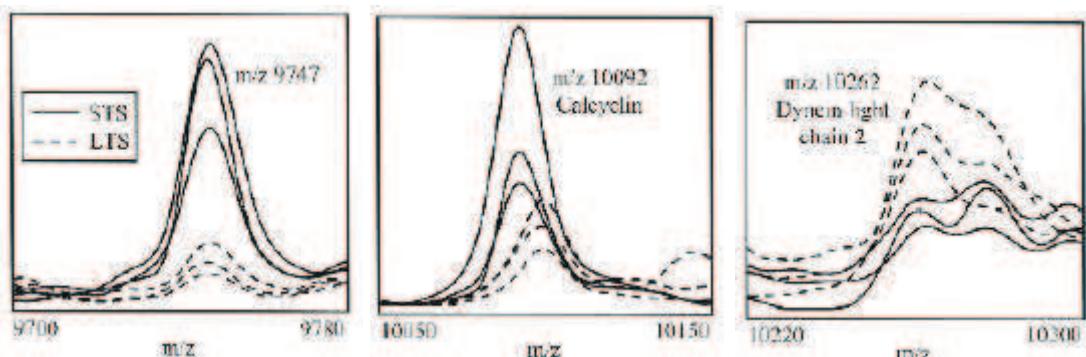
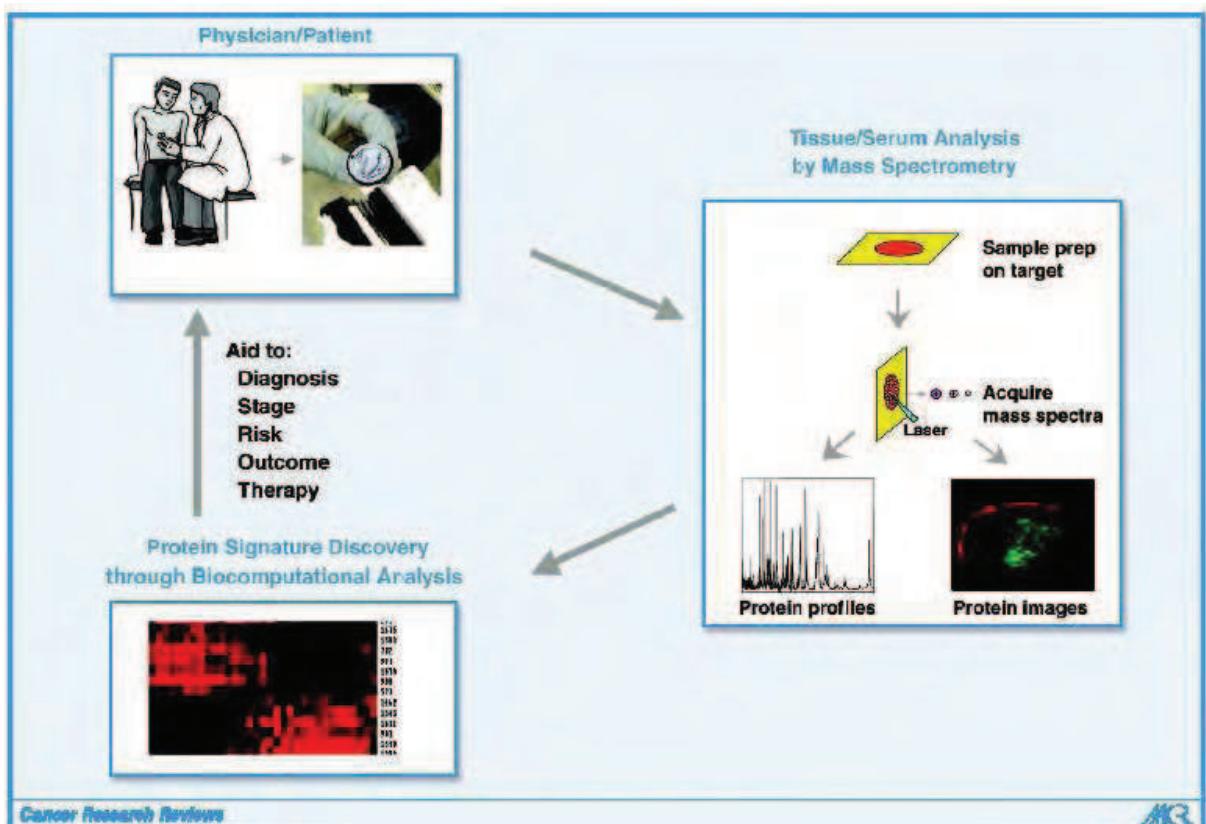
Source d’ionisation	Gamme de masse	Résolution spatiale
SIMS	m/z<1500	100nm à 10 µm
MALDI MSI	0-1000 000	25 à 200 µm
ICP MS	m/z<500	
DIOS	m/z<5000	10à 20µm
SNOM-MS	-	50µm
SMALDI	m/z<2000	500µm à 10µm
LA-ICP-MS	m/z<1000	40 à 100µm
Microscope MALDI	5-1 00 000	<5 µm
MILDI	0-10 000	100µm
ESI MS	m/z<1000	>300 µm
DESI	m/z<2000	500µm
JEDI	m/z<5000	1µm
ELDI	5-100 000	150µm

Tableau 4: Récapitulatif des techniques d’ionisation utilisées en MSI

### **1.1.5. Quelques applications de l'imagerie MALDI**

Avec une source MALDI, l'imagerie des peptides, des protéines, des lipides, et des nombreuses biomolécules peut être réalisée. Par conséquent, de nombreuses applications peuvent être recensées en imagerie MALDI ou en analyse directe de tissus ou de cellules. Depuis l'introduction de l'imagerie MALDI en 1997 par l'équipe de Caprioli [25], des très nombreuses applications ont été réalisées à la fois sur des modèles animaux et sur des tissus humains dans le cadre de pathologies [16,149].

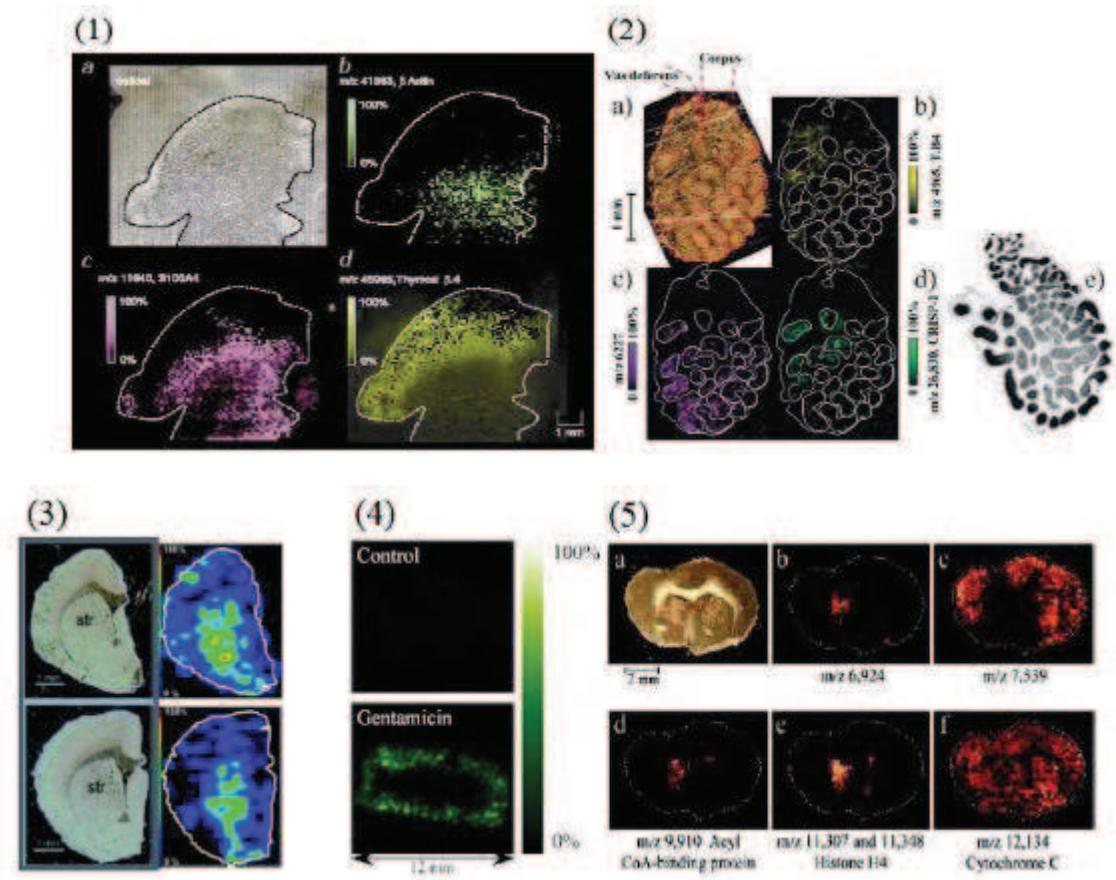
Dans la plupart de ces études, plusieurs protéines peuvent être détectées en imagerie MALDI dans une gamme de masse allant de 2000 Da à 30000 da. Cette possibilité de screening à haut débit de plusieurs molécules en une seule acquisition, sans aucune connaissance préalable de l'analyte, et sans étape d'extraction et de purification, s'intercale parfaitement dans la recherche de nouveaux biomarqueurs de pathologies souvent réalisée lors d'études protéomiques [150]. Différentes maladies ont ainsi été étudiées avec une partie importante concernant les cancers [16] (cancer du colon [151], adénocarcinomes de la prostate [152], tumeurs du cerveau [153]). Grâce à cette technique, il est devenu possible de déterminer un « profil signature » de la pathologie [154], celui-ci pouvant être utilisé pour le suivi des thérapies, de l'évaluation, de la maladie et surtout dans le diagnostic précoce qui manque cruellement dans la plupart des pathologies cancéreuses. Dans le cas de tissus provenant de gliomes, l'équipe de Caprioli est parvenue à identifier ce type de signature protéique, permettant même de corrélérer le taux de survie des patients avec le profil protéique détecté en analyse directe MALDI [155] (**Figure 24**).



**Figure 24:** Découverte de signatures protéiques à partir de biopsies issues de patients et analysées par MALDI MS sur tissu (A) et variation des signaux observés pour trois protéines (B), la calycyclin ( $m/z$  10092), la Dynein light ( $m/z$  10262) et une protéine de masse  $m/z$  9747, dans le cas de tumeurs du cerveau entre des patients STS (Short-Term Survival : survie < 15 mois) et LTS (Long-Term Survival : survie > 90 mois). (D'après Schwartz et coll. [155])

Hormis le cancer, d'autres pathologies ont également été étudiées par imagerie/profiling MALDI des protéines et peptides telles que la maladie d'Alzheimer [156], la maladie de Parkinson (lésion au 6-OHDA) [157] ou au MPTP) [86] mais également dans le cas d'administration de drogue telle que la gentamicine (nephrotoxicité) [158].

Quelques exemples de localisations de ces protéines sont résumés dans la **Figure 25**.



**Figure 25:** Expériences de MSI MALDI:

3protéines d'un glioblastome humain ( $\beta$  actin en vert, S100A4 en violet, et thymosine  $\beta$ 4 en jaune) (1), ayant une forte concentration dans la zone proliférative de la tumeur (D'après Stoeckli, et coll), imagerie moléculaire de 3 protéines

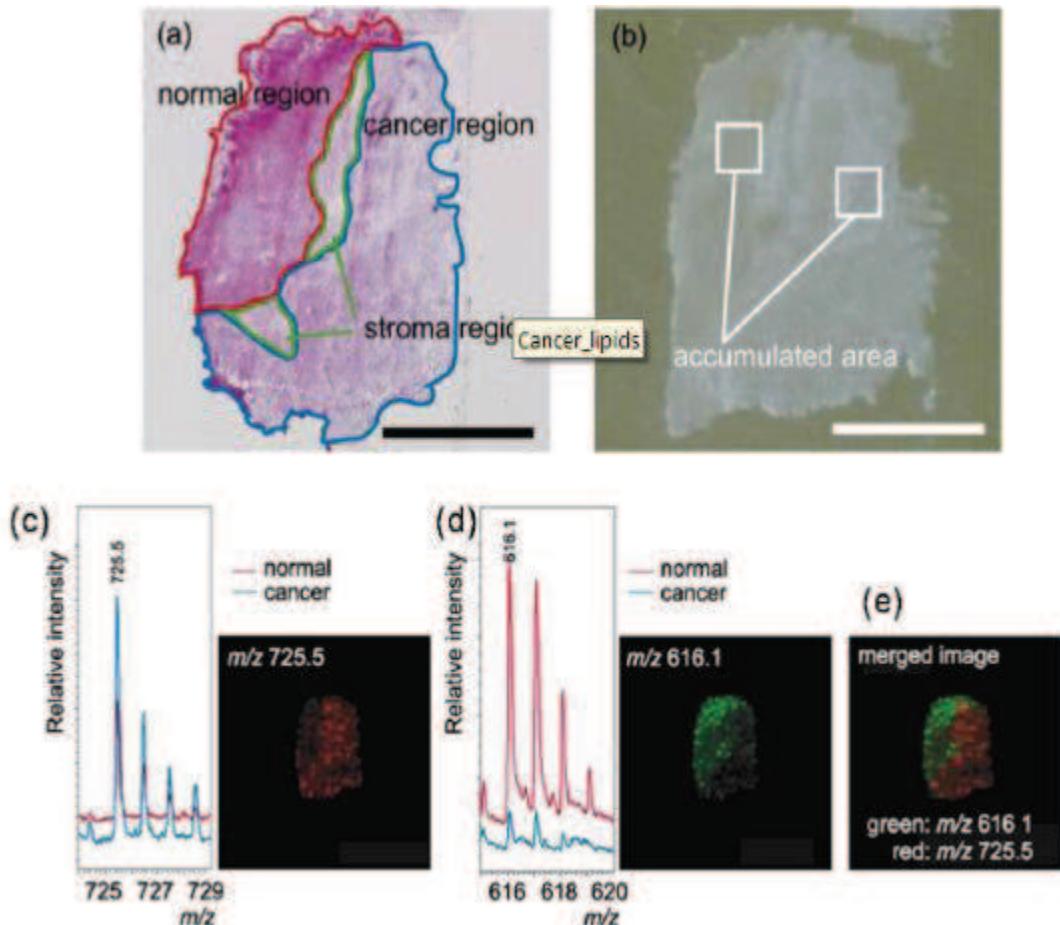
dont la thymosine  $\beta$ 4 en jaune, et la CRISP-1 en vert détectées dans l'épididyme de souris (2); la figure (e) représente la localisation de CRISP-1 par technique d'immunohistochimie classique, où la répartition obtenue est équivalente à celle reconstruite en imagerie MALDI (d'après Chaurand et coll[149]).

Protéine PEP 19 dans du cerveau de rat sain (en haut) et dans un rat atteint de la maladie de Parkinson (en bas) (3). (D'après Sköld et coll [86].

Imagerie de la transthyretine dans le rein de rat stimulé à la gentamicine (4) (réponse à une toxine) [158]. Localisation de plusieurs protéines dans une tumeur de souris (5) (d'après Reyzer [95] et coll.)

Généralement, l'identification des protéines et des peptides, est effectuée par la comparaison des masses détectées et des masses théoriques. Une extraction du tissu réalisée en parallèle, suivi par les techniques classiques de protéomique (digestion trypsique et identification par LC-MS/MS) permettent de confirmer ou de réaliser cette identification. Lors de l'étude de biomarqueurs, cette identification est elle-même appuyée par une validation utilisant les techniques biochimiques classiques, telles que l'immunohistochimie (IHC) ou l'hybridation *in situ* (HIS) pour l'ARNm.

Appliquée à la cancérologie, l'imagerie MALDI des lipides a permis d'observer par exemple, des localisations différentes des lipides dans la zone cancéreuse et la zone bénigne [159] (**Figure 26**). En effet 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.



**Figure 26:** Coloration d'une coupe de cancer du colon montrant les régions cancéreuses et normales (a). Coupe utilisée pour l'analyse directe MALDI avec indication des zones qui seront comparées (b). Image de l'ion  $m/z$  725 sur exprimé dans la zone cancéreuse (c) et (d) image de l'ion  $m/z$  616 fortement exprimé dans la zone normale (d). Superposition des deux images (e) (d'après Shimma et coll [159])

Ainsi, l'imagerie MALDI est capable de nous donner la localisation simultanée de nombreuses biomolécules contenus dans un tissu. Des études de profiling par MALDI permettent la recherche de nouvelles molécules régulées et notamment des protéines modifiées entre 2 états physiologiques.

Dans ce contexte, ma thèse s'est donc porté sur l'application de l'imagerie MALDI dans le cadre du cancer de l'ovaire afin de rechercher des marqueurs spécifiques de cette pathologie, de les valider et de mettre en place une technologie permettant de les quantifier dans les tissus et les fluides mais aussi d'avoir accès à leur modulation génique en même temps que celle protéique tout en gardant la notion de localisation spatiale des composés.

## 1.2. Cancer de l'ovaire

### 1.2.1. Cancer de l'ovaire et incidence

Le cancer de l'ovaire est une maladie de l'appareil génital féminin. Il se développe généralement à partir du revêtement de surface des ovaires. C'est un cancer grave car il évolue sournoisement sans signe d'alerte.

En 2008, l'incidence des cancers en France est estimée à 333 000 nouveaux cas, dont 144 000 cas chez des femmes. Le cancer de l'ovaire est la septième cause de cancer chez la femme en incidence avec 4 430 nouveaux cas estimés en 2008 (derrière le cancer du sein, du côlon, du poumon, de la thyroïde, de l'endomètre et les lymphomes non hodgkiniens), avec 3 300 décès en 2006. Il est la quatrième cause de décès par cancer chez la femme et la première cause de décès par cancer gynécologique. Il est responsable de 6,1% de l'ensemble des décès par cancer chez la femme [160]. En France, le cancer de l'ovaire atteint une femme sur soixante-dix. Son incidence est de 14,9 pour 100 000 habitants. Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 9 pour 100 000 [160]. La vitesse d'évolution des cancers de l'ovaire est mal connue. Certains possèdent une longue période de latence clinique propice à un diagnostic précoce. D'autres évoluent rapidement vers une dissémination péritonéale.

### 1.2.2. Facteurs de risque

Les facteurs de risque du cancer de l'ovaire ont principalement été étudiés pour les tumeurs épithéliales; quelle que soit leur variété histologique, et ces facteurs semblent être identiques. Le facteur de risque le plus important de cancer de l'ovaire est d'origine génétique. Environ 10 % des cancers de l'ovaire surviennent dans un contexte de prédisposition génétique. Ils sont souvent liés à une mutation des gènes BRCA 1 ou 2 et

surviennent avant 60 ans [161]. Cependant, il existe un lien entre le risque plus élevé du cancer de l'ovaire et la survenue précoce des premières règles, l'âge de la ménopause et la nulliparité (aucune grossesse). Le risque augmente avec le nombre de cycles ovulatoires survenus dans la vie d'une femme. L'utilisation d'une contraception orale (combinant œstrogène et progestatif) réduit le risque du cancer de l'ovaire ; il s'agit de la donnée épidémiologique la plus documentée. En effet, une femme qui, à un moment donné de sa vie, a utilisé une contraception orale pendant une période d'au moins un à trois ans, a un risque relatif du cancer de l'ovaire plus faible de 40 % par rapport à une femme n'ayant jamais utilisé de contraceptifs oraux. Par ailleurs, ce risque diminue d'autant que la durée de prise de contraceptifs oraux a été plus longue.

La plupart des cancers de l'ovaire sont sporadiques, seuls 5 à 10% résultent de facteurs héréditaires [162]. Cependant, il ne faut pas méconnaître l'association d'un cancer de l'ovaire avec d'autres types de tumeurs malignes ou même bénignes : un antécédent de cancer du sein multiplie par quatre le risque de tumeur ovarienne, et un antécédent de tumeur bénigne du sein l'augmente de presque trois fois. A l'inverse, une patiente ayant eu un cancer de l'ovaire a un risque plus élevé qu'à l'accoutumée de tumeur du sein, du colon, du rein et de leucémie aiguë myéloblastique.

### **1.2.3. Propagation et Symptômes**

Le mode de propagation du cancer de l'ovaire est essentiellement pelvien ou péritonéal. Localement, la tumeur envahit la trompe, l'utérus, le grand épiploon et le colon sigmoïde. L'aspect réalisé est celui d'une carcinose diffuse de type miliaire avec ascite. Les symptômes du cancer de l'ovaire sont peu significatifs, ce qui complique la détection et rend le pronostic médiocre. Il s'agit de douleurs peu intenses, saignements anormaux et gonflements de l'abdomen. Une échographie permet de poser aisément le diagnostic en distinguant le cancer des affections bénignes comme les kystes

### **1.2.4. Données histologiques**

Le cancer de l'ovaire se classifie en 4 stades et sous stades dépendant de l'étendue prise par la tumeur. Le **tableau 5** donne un aperçu sur les différents types histologiques.

Classification TNM	Stades FIGO	Description	Survie à 5 ans
<b>Tx</b>		Tumeur primitive non évaluable	
<b>T0</b>		Pas de lésion ovarienne	
<b>T1</b>	<b>Stade I</b>	Tumeur limitée aux ovaires	
<b>T1a</b>	Ia	Un ovaire, capsule intacte, pas d'ascite	
<b>T1b</b>	Ib		
<b>T1c</b>	Ic	Deux ovaires, capsules intactes, pas d'ascite Limitée aux ovaires, ascite positive.	<b>84%</b>
<b>T2</b>	<b>Stade II</b>	Tumeur limitée au pelvis	
<b>T2a</b>	IIa	Extension sur utérus ou trompes	
<b>T2b</b>	IIb	Extension aux autres tissus pelviens,	
<b>T2c</b>	IIc	Idem + Ascite positive	<b>59%</b>
<b>T3</b>	<b>Stade III</b>	Tumeur limitée à l'abdomen	
<b>T3a</b>	IIIa	Extension péritonéale	
<b>T3b</b>	IIIb	microscopique	
<b>T3c</b> <b>et/ou N1</b>	IIIc-p et IIIc-g	Implants péritonéaux ≤ 2cm, N- Implants péritonéaux > 2 cm et/ou Ganglions + sous pelviens, para aortiques ou inguinaux	<b>35%</b>
<b>M1</b>	<b>Stade IV</b>	Métastase à distance Epanchement pleural (cytologie +).	<b>22%</b>

**Tableau 5:** Classification FIGO et correspondance avec la classification TNM (2002) (Registre des tumeurs de l'Hérault (2005) - Expertise collective Cancers Pronostics à long terme. Inserm)

Il faut particulièrement noter que 75% des cancers de l'ovaire sont diagnostiqués tardivement, aux stades III ou IV. A ce stade le temps de survie des patientes est alors estimé à 5 ans et le taux de survie est faible (tableau6) [163].

	Taux de survie	
Stade du cancer	Cancer type invasif	Cancer frontière
<b>Stade I</b>	80%	98%
<b>Stade II</b>	60%	80%
<b>Stade III</b>	25%	50%
<b>Stade IV</b>	15%	-

**Tableau 6:** Taux de survie en fonction du type et du stade du cancer de l'ovaire

Sur le plan histologique, on distingue trois grands types de tumeurs primitives de l'ovaire.

- **Les tumeurs épithéliales :** Elles représentent 80 à 87 % des tumeurs malignes de l'ovaire. Quatre critères principaux sont utilisés pour leur classification : le type cellulaire, le degré de malignité, la richesse en éléments épithéliaux et conjonctifs et la situation de la tumeur par rapport à la corticale ovarienne. Concernant le type cellulaire, la classification reconnaît cinq types cellulaires et huit catégories tumorales. Concernant le degré de malignité, on individualise des tumeurs malignes et des tumeurs à la limite de la malignité (*tumeur Borderline*). Ces dernières tumeurs se caractérisent par la coexistence de lésions morphologiquement bénignes et des lésions à l'évidence malignes. Elles présentent des caractères communs à ceux des adénocarcinomes, mais elles se distinguent par l'absence de signes objectifs d'invasion du stroma. Ce signe pathognomonique doit être recherché soigneusement sur l'ovaire tumoral. Ces tumeurs touchent la femme jeune et représentent 20% des tumeurs malignes de l'ovaire. Leur évolution est lente et le traitement est essentiellement chirurgical et leur pronostic est excellent (90 % de survie à cinq ans).

- **Les tumeurs du mésenchyme et des cordons sexuels :** Elles représentent 6 % des tumeurs ovariennes. La classification O.M.S. reconnaît les tumeurs à cellules de la granulosa et stromales, les androblastomes ou tumeurs à cellules de Sertoli et Leydig, les gynandroblastomes et les tumeurs non classées.

- **Les tumeurs germinales :** Elles sont développées à partir des cellules germinales primordiales issues de la gonade embryonnaire et représentent environ 15 % des tumeurs

ovariennes. Touchant la femme jeune, 95 % des tumeurs germinales sont représentées par des tératomes kystiques bénins. L'Alpha-foeto-protéine et la gonadotrophine sont des marqueurs tumoraux essentiels pour le diagnostic et la surveillance des tumeurs germinales malignes. La classification O.M.S. reconnaît plusieurs types de tumeurs germinales : le dysgerminome, tumeur des sinus endodermique (sac vitellin), le carcinome embryonnaire, le polyembryome, choriocarcinome, le tératome (immature, mature, monodermique), et les formes mixtes.

Parmi les tumeurs secondaires de l'ovaire, on retiendra quatre grandes origines possibles : une origine colique (la métastase ovarienne est parfois révélatrice), une origine gastrique (tumeur de Krukenberg), une origine mammaire (où elles sont souvent bilatérales, asymptomatiques découvertes lors d'une castration chirurgicale, plus fréquente dans les carcinomes lobulaires *in situ*, avec un aspect en file indienne caractéristique), et enfin au cours des lymphomes ou de leucémies.

### 1.2.5. Le Pronostic

Le principal facteur pronostic reste donc son diagnostic à un stade précoce et la mise en place d'un dépistage représente l'élément déterminant pouvant influencer le pronostic. Plusieurs stratégies de dépistage ont été évaluées, en particulier celles utilisant les marqueurs tumoraux et l'échographie endo-vaginale. Sur le plan biologique, le CA 125 (MUC16, qui peut être élevé par la seule présence d'un épanchement péritonéal même bénin) est le traceur le plus fiable et le plus étudié [160, 164]. Le CA 125 a globalement une sensibilité de 80% et une spécificité de 97% dans les cancers épithéliaux.

Toutefois, il faut signaler sa sensibilité n'est que de 30 à 50% dans les stades I et son élévation peut être liée à de nombreuses situations physiologiques ou bénignes [163, 165]. La spécificité et la sensibilité du CA 125 restent insuffisantes pour l'utiliser comme seul marqueur pour le dépistage dans la population générale.

Les seuls cas où le dosage du CA 125 présente un intérêt sont :

- Les femmes présentant des antécédents familiaux ou personnels du cancer de l'ovaire, du sein, du côlon et celles ayant une prédisposition génétique en rapport avec une mutation des gènes BRCA1 et BRCA2. Il est alors recommandé de

réaliser un dosage du CA 125 (MUC16) en association avec l'échographie et l'examen clinique dont la fréquence reste à déterminer [166].

- Les patientes ménopausées présentant un kyste ovarien persistant asymptomatique sans critères échographiques de malignité (kyste uniloculaire, de grand axe inférieur à 5 cm, à parois fines, sans cloison ni vascularisation anormale au Doppler). Dans ce cas, la négativité du CA 125 permet d'éviter une chirurgie abusive
- En pré opératoire afin de suivre l'évolution de la maladie durant la prise en charge thérapeutique associé au suivi clinique et radiologique.

Concernant l'échographie pelvienne endo-vaginale, les études montrant des taux de faux négatifs et de faux positifs trop élevés pour que ce test soit un outil de dépistage selon les critères de l'OMS [165]. Le dépistage sur un mode multimodal (dosage du CA 125 associé à une échographie transvaginale) offre la meilleure spécificité et la meilleure valeur prédictive positive pour la détection des stades précoces mais la valeur prédictive positive (VPP) restant insuffisante (20%) et la fréquence de réalisation de ces examens est encore imprécise [167]. Finalement, c'est la chirurgie exploratrice par voie médiane sus et sous ombilicale qui reste la plus fiable pour affirmer le diagnostic du cancer de l'ovaire et d'en préciser l'extension. Ainsi, on comprend mieux l'urgence à développer un test de dépistage de masse ayant une sensibilité et une spécificité de 100% pour la détection des stades précoces du cancer de l'ovaire afin de diminuer la mortalité de cette maladie et pour comprendre les mécanismes mis en jeu qui reste à nos jours incompréhensibles [168]. D'autant plus qu'à ces stades une chirurgie +/- associée à une chimiothérapie permet des taux de survie meilleurs.

## **1.3. Etudes protéomiques du cancer de l'ovaire**

### **1.3.1. Les tests sériques et les biomarqueurs spécifiques**

Les marqueurs tumoraux sont des constituants cellulaires caractéristiques d'un ou de plusieurs types de cancers. Ils sont accessibles aux études de biologie clinique et d'anatomopathologie. Les marqueurs sériques peuvent être des protéines, des glycoprotéines ou des peptides sécrétés ou libérés par les cellules tumorales et ils sont plus ou moins spécifiques de celles-ci. La quantité détectée dans le sérum oriente fortement vers le diagnostic de cancer. Dans certains cas cette quantité permet d'estimer la masse tumorale et de suivre l'efficacité thérapeutique des traitements. Plus récemment les méthodes d'analyse de protéomique sérique permettent de détecter des profils d'expression protéique spécifique de certains cancers.

Pour le cancer de l'ovaire, le gène MUC16 qui code pour le CA 125 a été l'objet de plusieurs recherches depuis 2003. Une trentaine de biomarqueurs sériques, comme HE4, la mésothéline, la kallikréine, WFDC2, MSLN, MMP7, l'EGFR ont été testés. L'EGFR soluble ou sERB1 ou p110 sEGFR décroît en cas de cancer ovarien [169]. Le sEGFR serait moins discriminant chez les femmes jeunes pré-ménopausiques pour les stades de début. Sa sensibilité est de 64 % alors que pour les stades avancés, elle est de 75 %. Le sEGFR serait plus fiable chez les femmes ménopausées 89 % avec une spécificité de 95 % [169].

L'équipe d'Irène Visintin a publié et commercialisé un test de dépistage (*Ovasure labcorp*) de cancer de l'ovaire. Ce test analyse, en méthode ELISA, comprend six biomarqueurs sériques : Leptine, prolactine, ostéopontine, insulin-like growth factor II, macrophage inhibiteur factor et le CA 125. Ce test de dépistage à une sensibilité de 95,3 et une spécificité de 98,7 % contre une sensibilité de 72 % et une spécificité de 95 % pour le CA125 [170]. Il faut signaler que ce test n'est valable que pour les patientes à haut risque de cancer de l'ovaire. Il existe de faux positifs : la grossesse, l'allaitement, les kystes ovariens (10% de faux positifs). Les tests ont été validés sur des populations à majorité de cancers avancés avec une incidence très élevée de cancers (19 %). Ces résultats ne peuvent pas être extrapolés pour les cancers débutants [170].

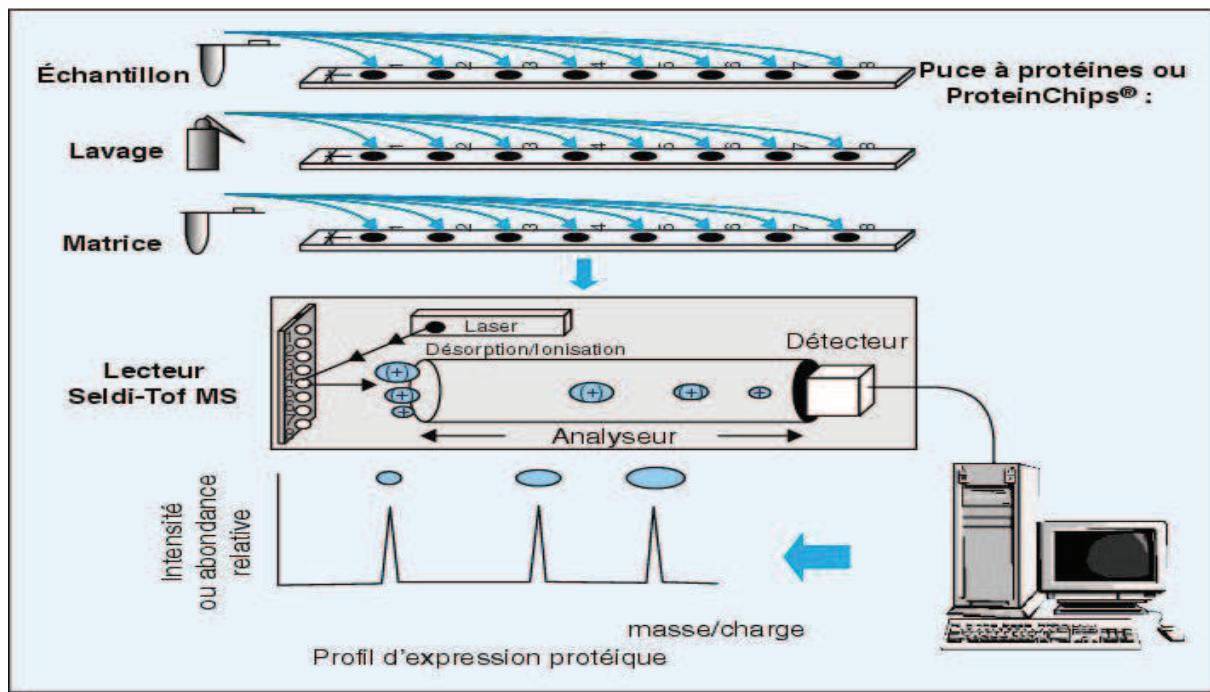
En 2009, Nosov et coll. ont identifié trois protéines sériques (apolipoprotéine A-1, transthyrétine (TTR) et transferrine(TF)) dont le dosage, combiné à celui du CA-125 avait une sensibilité élevée de 95 % pour la détection des tumeurs mucineuses de l'ovaire à un stade précoce [171]. Le même groupe de recherche évalue dans cette étude les performances de ce

panel de biomarqueurs (Apo A1, TTR, TF et CA-125) dans la détection d'autres types histologiques du cancer épithelial de l'ovaire. Au total, 358 prélèvements sériques de témoins et de patientes présentant des tumeurs bénignes, des cancers de l'ovaire de stade précoce ou avancé, ont été analysés. Les valeurs de la sensibilité et de la spécificité ont été calculées sur la base de la comparaison avec les sujets en bonne santé sans antécédents de masse ovarienne [171]. C'est le meilleur résultat rapporté à ce jour pour des tests biologiques dans le cadre de cette pathologie. Une étude clinique prospective est cependant nécessaire pour valider ce panel de biomarqueurs comme outil de dépistage du cancer de l'ovaire.

### **1.3.2. Le SELDI et les profils protéiques**

#### **1.3.2.1. Principe de SELDI**

L'approche SELDI-TOF-MS consiste à simplifier le mélange peptidique/protéique à analyser en utilisant diverses surfaces chromatographiques qui sont greffées sur des barrettes. Les différentes protéines vont interagir spécifiquement avec les différentes surfaces chromatographiques en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les échantillons sont ensuite lavés dans des conditions plus ou moins rigoureuses, ce qui permet d'éliminer les protéines interagissant de façon aspécifique. Les analytes qui sont spécifiquement fixés sur les surfaces chromatographiques sont analysés par MALDI TOF-MS (**Figure 27**).



**Figure 27:** Schéma de la technique SELDI

### 1.3.2.2. SELDI et cancer de l'ovaire

En 2002, les premiers travaux publiés par l'équipe de Petricoin et coll., utilisant les puces à protéines ont analysé le sérum des malades atteints du cancer de l'ovaire [172]. Il s'agit d'une étude rétrospective analysant en SELDI TOF le sérum de 100 patientes (50 cancers et 50 non cancers). Dans cette étude, il paraît possible d'identifier à l'aide des outils biostatistiques un profil protéique sérique discriminant parfaitement ces deux groupes de patientes mais sans identification de marqueur d'intérêt. Cette étude montre aussi qu'il est possible de diagnostiquer ce cancer au stade infra-clinique avec une spécificité de 95%, une sensibilité de 100 % et une (VPP) valeur prédictive positive de 94 %. Les auteurs suggèrent que le profil lui même, sans nécessairement passer par l'identification des protéines y participant, peut servir d'autentique test diagnostique. Ces résultats initiaux se sont rapidement associés à d'autres études concernant le diagnostic des cancers ovariens [173].

Le principal défaut de la technologie SELDI réside dans sa faible reproductibilité [174]. Plusieurs groupes de recherche utilisant les mêmes approches expérimentales et travaillant sur la même pathologie n'ont pas mis en évidence les mêmes pics permettant de discriminer le tissu normal du tissu pathologique et ont proposé des marqueurs ou des profils

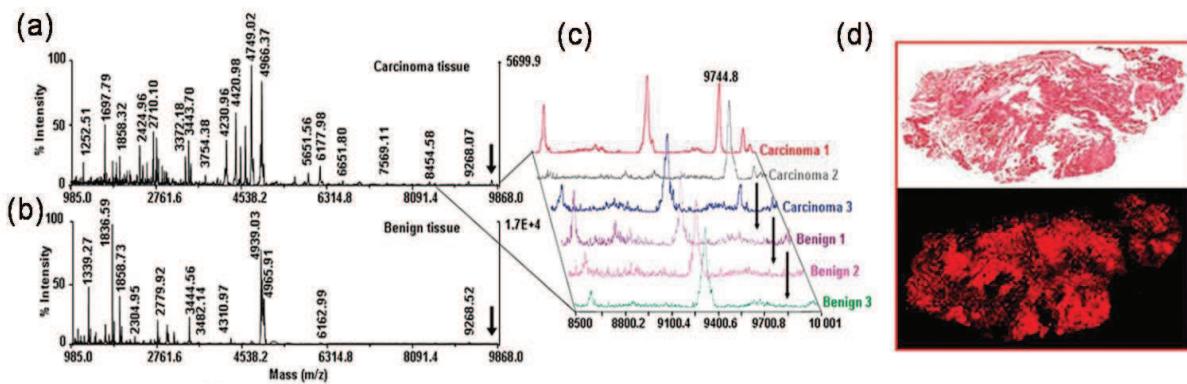
protéiques différents [175]. Les différences observées dans les profils protéiques entre sérum témoin et sérum des malades porteurs de cancer n'étaient pas exclusivement liés au cancer.

L'équipe de Diamandis a mis en exergue de nombreux paramètres qui affectent la reproductibilité de cette technique: la variabilité dans le recueil des échantillons, leur traitement, le type de conservation, la diversité des groupes de patients, leur statut hormonal, leurs habitudes alimentaires, l'usage de médicament, ainsi que les biais statistiques ou la variation de la stabilité des spectromètres de masse et /ou des puces à protéines [176]. De même la complexité des outils informatiques augmente la probabilité d'interprétation erronée et des résultats non reproductibles. Par ailleurs, la sensibilité de la détection n'atteint pas les concentrations inférieures à un microgramme par mL alors que les marqueurs tumoraux usuels sont à des concentrations beaucoup plus faibles et ne sont donc pas suffisamment détectés. De sorte que jusqu'à présent, dans les quelques cas où la caractérisation des marqueurs a été effectuée, les protéines identifiées correspondent à des protéines majoritaires du sérum. Il s'agit de l'apolipoprotéine A, des formes tronquées de la transthyrétine, de la chaîne lourde de l'inhibiteur de l'alpha trypsine dans le cancer de l'ovaire[175], de la sous-unité alpha de l'haptoglobine dans une autre étude sur le cancer de l'ovaire[177], Les biomarqueurs identifiés jusqu'ici par SELDI-TOF s'avèrent, pour la plupart, être des protéines majoritaires de la réponse inflammatoire produites par l'environnement péri-tumoral ou par les cellules immunitaires plutôt que par la tumeur elle-même [176, 178, 179]. Ces protéines sont néanmoins potentiellement instructives s'il est démontré qu'il s'agit de fragments protéolytiques dérivés des protéines inflammatoires de la tumeur, spécifiques de chaque tumeur en fonction de son contenu enzymatique [179].

L'observation par l'équipe de Liotta que certains des marqueurs identifiés par SELDI-TOF sont des formes clivées des protéines sériques de plus haut poids moléculaire, fait avancer l'hypothèse que l'abondance de ces marqueurs clivés est le reflet direct d'événements pathologiques induits par le microenvironnement tumoral [180]. Des études récentes montrent que l'équilibre entre des protéases et leurs inhibiteurs cellulaires est modifié dans le sérum et le tissu des patients en réponse à la prolifération tumorale [181]. Différentes familles de protéases comme les métalloprotéases ou kallikréines plasmatiques et tissulaires ont leur expression augmentée ou diminuée dans certains cancers [182, 183]. Ces modifications de l'expression auraient alors un retentissement direct sur la capacité des protéases à cliver des protéines sériques et à générer ainsi une signature moléculaire spécifique.

### 1.3.2.3. Imagerie MALDI-TOF et le cancer de l'ovaire

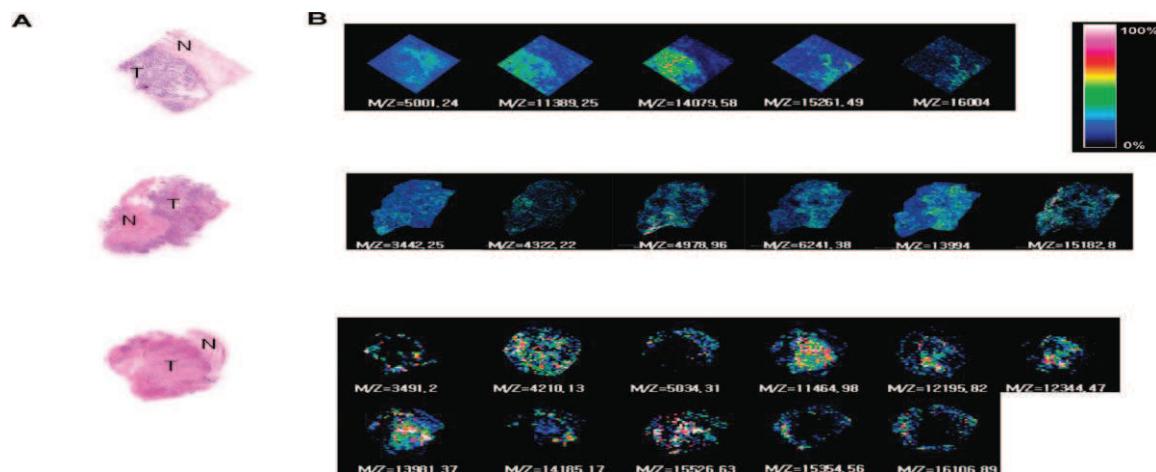
L'imagerie MALDI est devenue un nouvel outil dans la recherche de biomarqueurs dans le cas d'études sur le cancer. Appliqués au cancer de l'ovaire, cette technique permet de localiser des biomarqueurs potentiels. Une étude réalisée au laboratoire par Lemaire et coll [89] a permis de mettre en évidence plusieurs marqueurs potentiels du cancer de l'ovaire. L'un des biomarqueurs de plus grande prévalence a pu être identifié par MALDI-MS directement à partir des biopsies du cancer épithéliales de l'ovaire à des stades III et IV et par nano ESI-MS/MS après extraction et digestion trypsique. Cette protéine détectée a une masse  $m/z$  de 9744,8 [89]. Elle correspond à un fragment C terminal de 84 acides aminés, de la protéine Reg Alpha [184]. La forme entière de cette protéine (28kDa) est connue pour être impliquée dans l'activation du protéasome 11S [185, 186]. La validation de ce biomarqueur a pu être obtenue en combinant l'imagerie MALDI et l'immunhistochimie. L'analyse directe sur biopsie ovarienne s'est révélé un outil de choix pour la recherche de biomarqueurs de cancer de l'ovaire (**Figure 28**).



**Figure 28:** Spectres MALDI-MS obtenus à partir d'une coupe d'ovaire cancéreuse(a) et d'une tumeur bénigne d'ovaire (b). Profile MS de 3 cancers d'ovaire vs. 3 tumeurs bénignes (c). Coloration H&E et image MALDI de l'ion  $m/z$  9744 identifié comme biomarqueur potentiel (d) (D'après Lemaire et coll.[89])

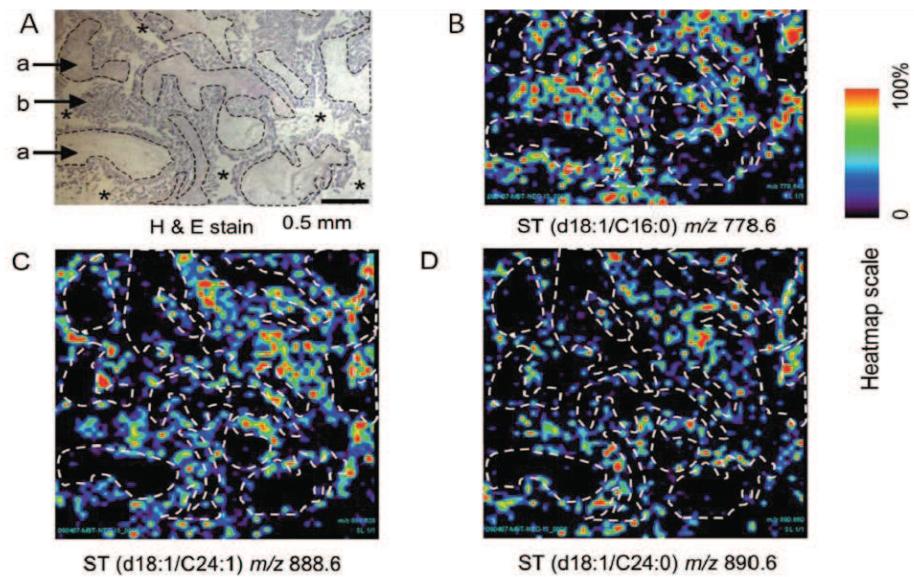
Une autre étude sur le cancer de l'ovaire mené par l'équipe de Kang et coll. [187], a démontré l'intérêt de l'imagerie MALDI pour l'identification de biomarqueurs potentiels. Dans cette étude, la zone d'interface qui se situe entre la zone tumorale et la zone normale a été évaluée en utilisant la MSI. Trois carcinomes ovariens séreux ont ainsi été analysés par MALDI MSI. Deux protéines spécifiques d'interface (la Plastine 2 et la Peroxiredoxine 1) ont

été identifiées comme régulées de façon différentielle entre les deux zones. Cette étude protéomique comparative sur tissus ovariens a suggéré que la zone d'interface est différente à proximité de la tumeur et des zones normales, et que la plastine 2 et la peroxiredoxine 1 peuvent être des marqueurs d'interface spécifiques pour les tumeurs ovariennes (**Figure 29**).



**Figure 29:** Coloration histologique H&E (A) Image MALDI MS de différentes protéines exprimées de façon différentiels dans le cancer de l'ovaire (B) T: Tumeur N : Normal ( d'après Kang et coll.[187])

Deux études plus récentes du cancer de l'ovaire montrent que les tissus ovariens cancéreux ont une grande quantité de sulfatides par rapport aux tissus normaux. En outre, les structures des espèces les plus fréquemment observées par MALDI MSI (**Figure 30**) ont été confirmées par MALDI MS/MS [188]. Ainsi que l'analyse des ARNm recueillies à l'aide de la microdissection par capture au laser a révélé que l'expression de GalCer synthétase et du Gal ST1 étaient d'environ 11 fois plus élevée dans les cellules de carcinome épithelial de l'ovaire par rapport au tissu normal ovarien. [189].



**Figure 30:** Coloration histologique H & E d'un tissu ovarien (A) Images MALDI MS de différentes de Sulfatides sur tissu ovarien (A-C-D) (D'après Liu et coll[189])

### 1.3.3 Conclusion

Les nouvelles technologies d'analyse protéomique prennent leur place dans l'ère post-génomique. Appliquée au cancer de l'ovaire, les premiers résultats bibliographiques mettent en évidence le potentiel des analyses à large échelle en particulier pour l'identification des profils protéiques différents dont il est nécessaire d'établir le rapport avec les mécanismes physiopathologiques du processus tumoral ovarien. Des limitations technologiques et des défis analytiques sont encore élevés et des progrès importants s'imposent pour établir la complémentarité entre protéomique d'expression et protéomique d'interaction. Néanmoins, il est nécessaire d'établir une Carte d'Identité des Tumeurs Humaines par l'analyse protéomique dont le but est de concrétiser dans les meilleurs délais, la caractérisation des marqueurs et le développement de tests non invasifs prédictifs pour un diagnostic précoce du cancer de l'ovaire.

Mon travail de thèse a consisté à rechercher des marqueurs spécifiques de cette pathologie par MSI puis de les valider afin de pouvoir les rechercher dans les fluides biologiques et en particulier le sang. En effet, comprendre les différentes étapes permettant le passage d'une lésion localisée à une tumeur invasive est particulièrement important car elles conditionnent la prévention et la prise en charge du cancer de l'ovaire. C'est pourquoi, il est nécessaire d'élaborer de nouvelles stratégies pour identifier les protéines impliquées dans des

mécanismes physiologiques ou pathologiques en ligne directe avec l'initiation et/ou la progression tumorale. L'identification de nouveaux marqueurs tumoraux, notamment par l'établissement d'un profil protéique spécifique de la pathologie cancéreuse est rendu possible grâce à la MS. Afin de cartographier ces marqueurs tumoraux sur tissu ovarien, l'imagerie par spectrométrie de masse MSI offre un outil intéressant. Cependant comme toute technologie récente, il est nécessaire de repousser ses limites pour tenter d'améliorer certains points et de valoriser cette stratégie. De plus, afin d'étendre le type de molécule pouvant être localisé en imagerie MALDI, nous avons développé un nouveau concept appelé TAG MASS, qui nous a permis de réaliser des images du protéome directement sur la coupe tout en gardant la possibilité d'étudier l'ensemble des biomolécules avoisinantes. Ce type de localisation demeurait inaccessible par les techniques classiques jusqu'à présent, l'imagerie spécifique ouvre la possibilité de réaliser des études multiplexes.

**Chapitre 2 :**

**Recherche de biomarqueurs du cancer**

**de l'ovaire**

## **Chapitre 2 : Recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire**

### **2.1. Recherche à partir de biopsie ovarienne**

#### **2.1.1. Patientes et échantillons**

##### **2.1.1.1 Critères d'inclusion**

Dans un premier temps nous avons poursuivi le recrutement initié en 2004, à savoir que toute patiente opérée d'une tumeur ovarienne dans le service de chirurgie gynécologique de l'hôpital Jeanne de Flandre (CHRU de Lille) est incluse de façon prospective dans l'étude :

- Après consentement oral et information sur la nature de l'étude et des prélèvements enconsultation préopératoire. Dans ces conditions, le projet avait été approuvé par le Comité Consultatif Pour la Recherche BioMédicale (CCPPRBM) de Lille qui avait estimé en Avril 2003 que ce projet « n'entraînait aucune contrainte pour les patientes et qu'il ne s'inscrivait pas dans le cadre de la loi Huriez ».
- Quelque soit son type histologique si celui-ci est connu avant l'intervention. A la réception des résultats anatomopathologiques définitifs, seuls sont retenus les prélèvements issus de patientes dont le diagnostic est celui d'une tumeur épithéliale d'origine primitive ovarienne.
- En effet, les tumeurs des cellules germinales et du stroma ovarien possèdent déjà des marqueurs sériques de diagnostic précoce relativement fiables (HCG, apha FP, LDH, oestrogène, testostérone, inhibine). Par conséquent un dépistage de masse ciblerait spécifiquement les tumeurs épithéliales qui présentent 87 % des tumeurs malignes de l'ovaire.

##### **2.1.1.2. Critères d'exclusion**

Les patientes suivantes ont été systématiquement éliminées :

- Les patientes présentant une sérologie positive pour le VIH, l'Hépatite B ou l'Hépatite C pour des raisons d'agrément de laboratoire.

- Les patientes ayant déjà bénéficié d'un traitement par chimiothérapie néo-adjuvante.
- Les patientes présentant des antécédents de pathologies cancéreuses autres que l'ovaire.

### **2.1.1.3. Recueil des échantillons**

Pour chaque patiente incluse dans l'étude, sont prélevés au bloc opératoire en cours d'intervention les échantillons suivants:

- Une biopsie tumorale ovarienne (voire une biopsie de lésion péritonéale suspecte) d'environ 125 mm<sup>3</sup> (5mm\*5mm\*5mm). En cas de présence importante de sang sur la biopsie lors de son prélèvement, un lavage au sérum physiologique est immédiatement pratiqué.
- 10ml de liquide d'ascite ou à défaut, de liquide de lavage péritonéal (effectué au sérum physiologique avant toute exérèse)
- Un prélèvement de sérum sur tube sec
- Un prélèvement de plasma sur tube EDTA.

La biopsie et l'ascite (ou le liquide de lavage péritonéal) ne représentent pas d'actes supplémentaires dans le cadre d'une intervention de tumorectomie ovarienne. Les deux prélèvements sanguins sont réalisés sous anesthésie et à partir de la voie veineuse mise en place pour les besoins de celle ci et ne constituent donc pas de contrainte supplémentaire pour la patiente. L'ensemble de ces prélèvements sont conservés dans un premier temps à +4°C dans le réfrigérateur de la réserve du bloc opératoire sauf la biopsie ovarienne. Cette dernière est congelée par congélation rapide dans l'azote liquide ou l'isopentane refroidi. Ces échantillons sont acheminés le plus rapidement possible dès la réalisation du prélèvement jusqu'au notre laboratoire (environ 15 minutes de temps de transport entre les deux sites) et sont transportés sur glace ou carboglace. La biopsie ovarienne sera congelée à -80°C afin de préserver au mieux les constituants du protéome.

Une fiche d'information est remplie précisant la date d'intervention, l'identification de la patiente, son statut sérologique, la nature bénigne ou maligne suspectée et le cas échéant la valeur du taux sérique de CA125 pré-opératoire.

### **2.1.1.4. Conditionnement des échantillons**

Dès leur arrivée au laboratoire d'imagerie, les biopsies tissulaires sont étiquetées et congelées à -80°C sans autre conditionnement. Les liquides d'ascite ou liquides péritonéaux, le sérum et le plasma sont conditionnés à +4°C. Ils sont aliquotés en volume de 1ml, centrifugés 30

minutes à 10000rpm, épurés du culot globulaire, à nouveau aliquotés par 500µl, étiquetés et enfin congelés à -80°C.

Pour chaque patiente, la totalité de la **pièce opératoire est analysée par le service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique du CHRU de Lille** par le Dr Farine qui collabore également à ce projet pour les travaux d'immunohistochimie. Une fois le diagnostic anatomopathologique définitif, celui-ci nous est remis. Bien que la totalité de la pièce opératoire ait été analysée afin d'établir ce diagnostic définitif, l'analyse MALDI étant pratiquée à partir des biopsies réalisées au bloc opératoire, nous avons dû vérifier que ces biopsies avaient bien été effectuées en zone tumorale pour valider des résultats obtenus lors des analyses peptidomiques de chacune de ces tumeurs bénignes ou malignes. Pour cela une coloration histologique HES est réalisée sur des coupes immédiatement adjacentes à celles utilisées en analyse MALDI détaillée ci-après.

Au cours de ma thèse, les expérimentations ont concerné 47 échantillons au total : **18 cancers et 29 tumeurs bénignes**. Les différents types anatomopathologiques de tumeurs ovariennes étudiées et le nombre de patientes testées, sont résumés dans le **Tableau 7** ci-dessous.

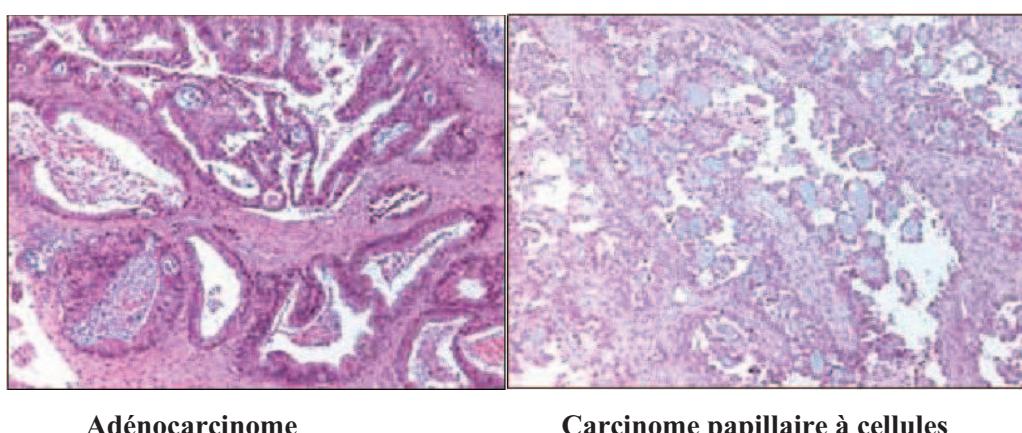
<b>Biopsies cancers ou borderlines (n= 18)</b>	<b>Biopsies bénignes (n=24)</b>
C1 : border line (n =4)	B1 : Cystadénome mucineux n=3
C2 : Adénocarcinome (n=2)	B2 : Kyste endométriosique n=5
C3 : Adénocarcinome à cellules claires (n = 1)	B3 : Cystadénome séreux n=5
C4 : Adénocarcinome muqueux (n=2)	B4 :Cystadénome endométrioide n=2
C5 : Adénocarcinome séreux (n= 4)	B5 : Kyste endométriosique n=5
C6 : Seromucineux invasif (n=2)	B6 : Kyste dermoïde n=2
C7 : Border Line + foyer de micro-invasif (n= 1)	B7 : Cystadénome séreux-papillaire n=5
C8 : Carcinome endométrioïde (n=1)	B8 : kyste fonctionnels n=2
C9 : Carcinome peu différencié (n=1)	

**Tableau 7:** Différents types anatomopathologiques de tumeurs ovariennes étudiés

## 2.1.2. Résultats des colorations histologiques HES

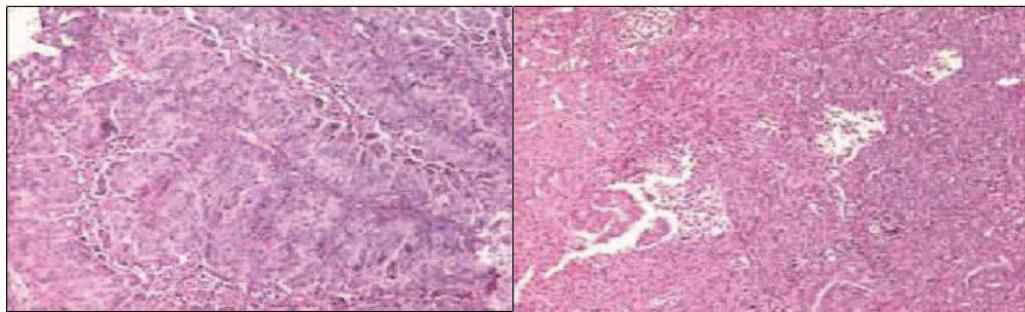
Toutes les pièces opératoires des patientes incluses dans notre étude ont été analysées en totalité par le laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHRU de Lille. Ceci nous a permis de classer ces patientes en 2 catégories de tumeurs épithéliales : cancer versus tumeur bénigne. Cependant, nous ne savions pas si les biopsies ovariennes effectuées au bloc opératoire et qui nous étaient transmises, avait été réalisées en zone tumorale maligne. Dans ce contexte, nous avons choisi de réaliser des colorations HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) sur coupe de biopsies ovariennes recueillies et d'utiliser la coupe directement adjacente (si nous étions en zone tumorale) pour l'analyse MALDI afin de s'assurer de la pertinence des résultats obtenus. La coloration HES permet la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. En effet, cette coloration à l'hématoxyline-éosine-safran est une coloration de routine dite «topographique». C'est une coloration trichromique c'est-à-dire une coloration nucléaire bleue résultant de l'action de l'hémalun et une coloration cytoplasmique de fond orangé-rouge provenant de l'action de l'éosine. Quant au safran, c'est un colorant naturel anionique capable de se fixer sur des structures acidophiles lâches telles que les fibres de collagène. Après fixation la couleur safranée se diffuse dans tout le tissu grâce à un phénomène d'absorption.

**La planche 1** résume quelques résultats histologiques pour les coupes colorées en HES et montre que nous étions bien en zone tumorale. Nous avons donc pu réaliser des analyses MALDI (analyse directe ou analyse après traitement par des solvants sur coupes tissulaires malignes) en utilisant les **coupes directement adjacentes**.

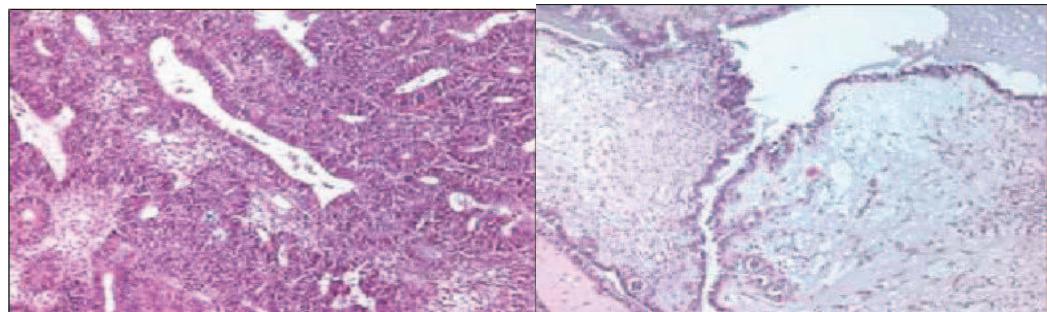


Adénocarcinome

Carcinome papillaire à cellules

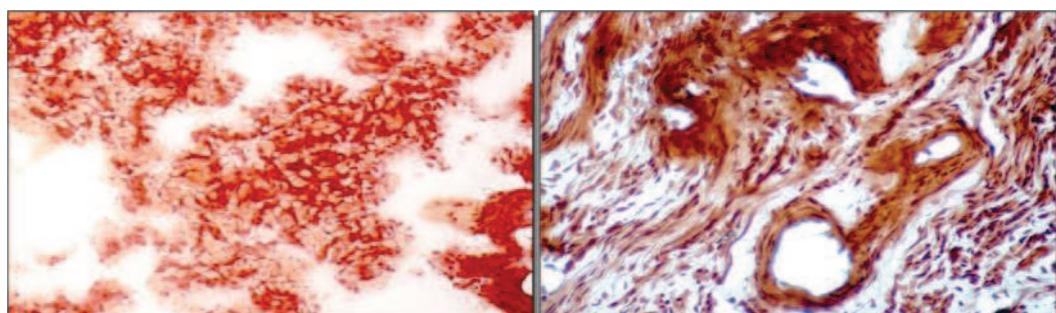


Adénocarcinome séromucineux invasif Adénocarcinome séreux peu différencié



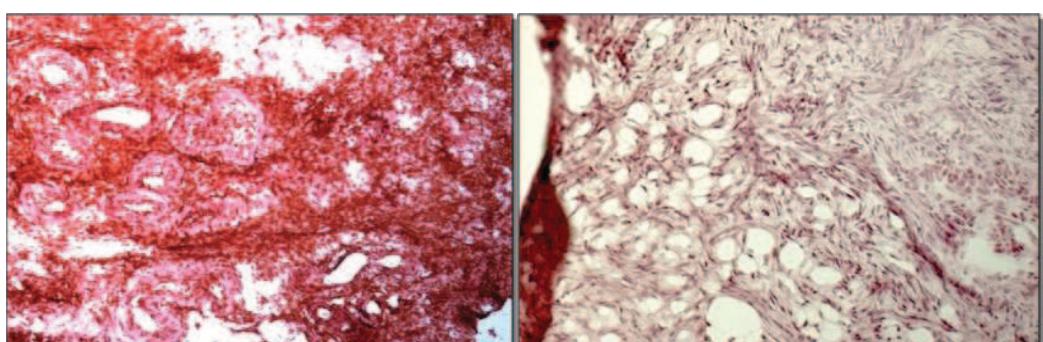
Carcinome endométrioïde

Kyste borderline



Adénocarcinome ovarien mucineux

Cystadénofibrome ovarien



Kyste ovarien séreux

Ovaire sain

Planche 1: Résultats obtenus après coloration HES

### **2.1.3. Analyses MALDI d'échantillons tumoraux**

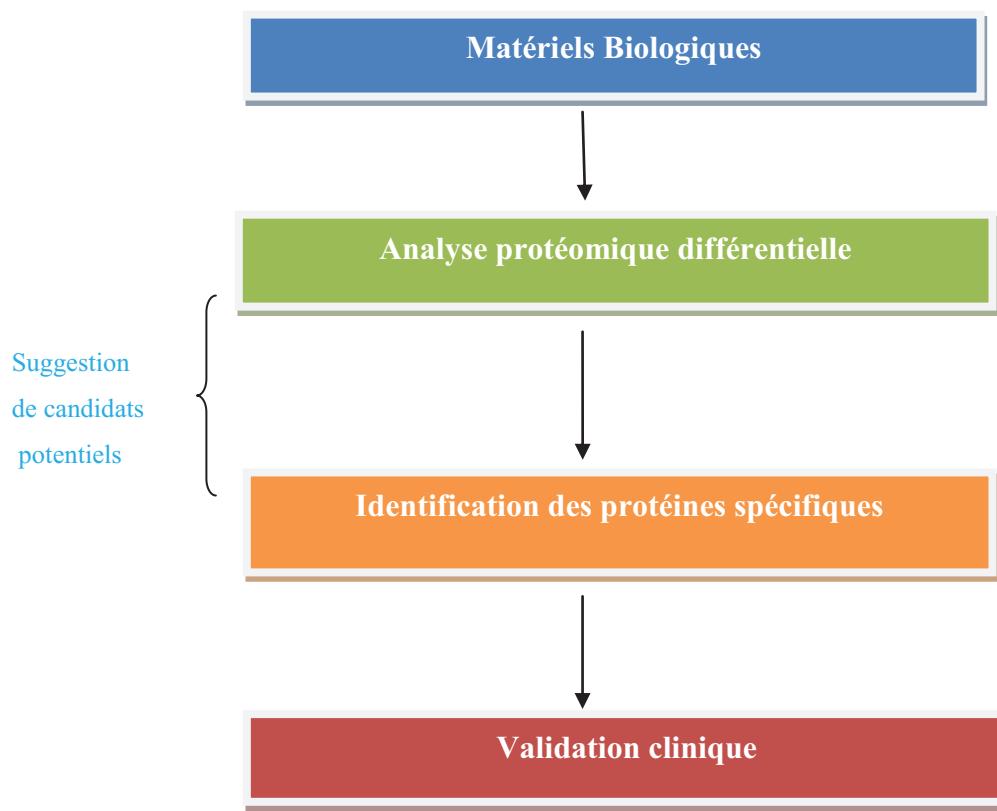
Face aux difficultés des méthodes d'analyse classiques, les approches d'analyse protéomiques par spectrométrie de masse présentent un intérêt certain. En effet, elles ne sont pas limitées par la taille et la composition de banques de données protéiques et peuvent identifier non seulement des cibles connues mais aussi de nouveaux candidats cliniques. Les avantages analytiques inhérents à la spectrométrie de masse (MALDI TOF) incluent sa sensibilité, sa résolution, sa vitesse et son débit d'analyse, combinés aux méthodes poussées d'interprétation des données grâce aux outils bioinformatiques. Cette approche permet l'identification rapide et systématique de centaines de protéines candidates. Au-delà de la simple identification, les stratégies mises au point doivent offrir la possibilité de comparer des échantillons et de proposer des éléments discriminants. Par exemple, l'analyse comparative du protéome du cancer de l'ovaire issu de patientes présentant des pathologies différentes peut produire une information sur les modifications induites par la maladie directement au niveau protéique ainsi que l'implication de ces modifications dans le processus de la cancérogénèse ovarienne.

La procédure permettant de découvrir de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou des cibles thérapeutiques suit un cheminement long et complexe allant de la collecte et la préparation d'échantillons prélevés sur des patients, à la validation clinique des résultats, en passant par l'analyse protéomique différentielle permettant de proposer des candidats biomarqueurs potentiels. Le défi reste qu'à chaque étape, de nombreux éléments peuvent affecter la reproductibilité et des biais peuvent influer sur le résultat final (**Figure 31**).

Nous avons choisi d'appliquer cette approche à l'identification de nouveaux marqueurs dans le cas du cancer de l'ovaire. Dans ce contexte, une large part du travail a d'abord consisté en la mise au point de conditions et d'outils expérimentaux pour une analyse ciblée et la plus complète possible des protéines spécifiques mal régulés du cancer de l'ovaire.

Des travaux antérieurs sur le cancer de l'ovaire, se sont focalisés sur la recherche de marqueurs dans le but de trouver des molécules prédictives, permettant de suivre l'évolution de la maladie au travers d'analyses d'échantillons pathologiques ou de liquides biologiques. Récemment, le concept de profils peptidiques et/ou protéiques cancéreux a été proposé. Cette notion propose la détection de plusieurs marqueurs pour identifier les tumeurs de manière spécifique avec fiabilité. Dans ce contexte, l'analyse directe des tissus cancéreux par MALDI

et l'imagerie MALDI répondent parfaitement à ces critères. L'imagerie MALDI permettant à partir de biopsies ovariennes de cartographier l'expression des marqueurs de la pathologie reflétant ainsi le niveau de cancérogenèse et/ou sa régression suite au traitement. Nos études ont été plus particulièrement focalisées sur les différences de présence des peptides ou protéines dans différentes biopsies ovariennes, dont le but est de détecter par études différentielles ces biomarqueurs potentiels dans les tissus à l'aide des outils statistiques. Par la suite, après caractérisation, ces biomarqueurs pourront être validés par d'autres approches comme l'immunohistochimie, une approche western blot plus quantitative utilisant des anticorps spécifiques et la biologie moléculaire.



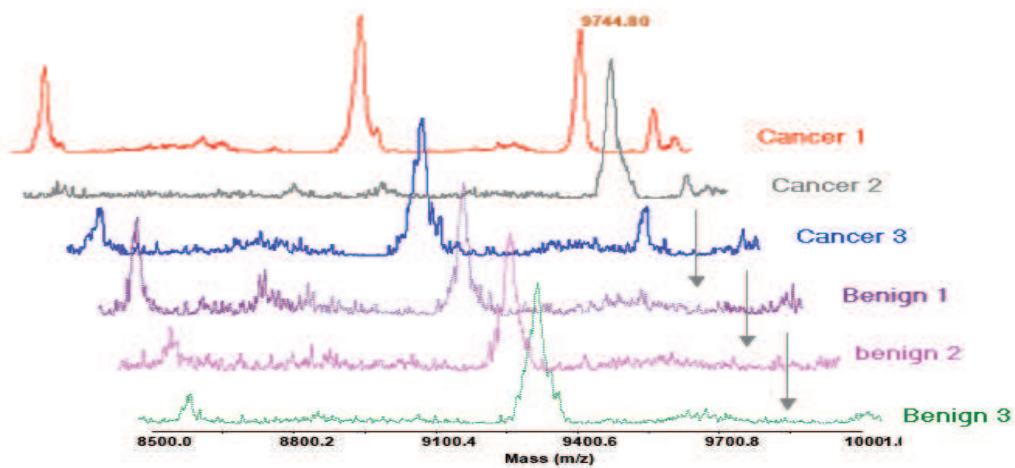
**Figure 31:** Démarche de recherche de biomarqueurs par approche protéomique par SM

Plusieurs difficultés pour ce type de projet sont à souligner. Ces difficultés résident dans les différences entre les tissus en contenu peptidique/protéique liés à la variabilité entre les patientes. Nous avons choisi dans un premier temps de travailler sur des tissus frais puisque ont été disponibles des tissus de patientes opérées. De plus, un soin particulier a été apporté pour que les échantillons soient traités le plus rapidement possible et dans les mêmes conditions. Pour ce faire ces échantillons sont ramenés au moment de l'intervention

chirurgicale puis traités et préparés immédiatement. Les analyses sur tissus cancéreux sont comparées aux analyses réalisées sur des tissus issus de biopsies provenant de patientes atteintes de pathologies bénignes (kyste non cancéreux).

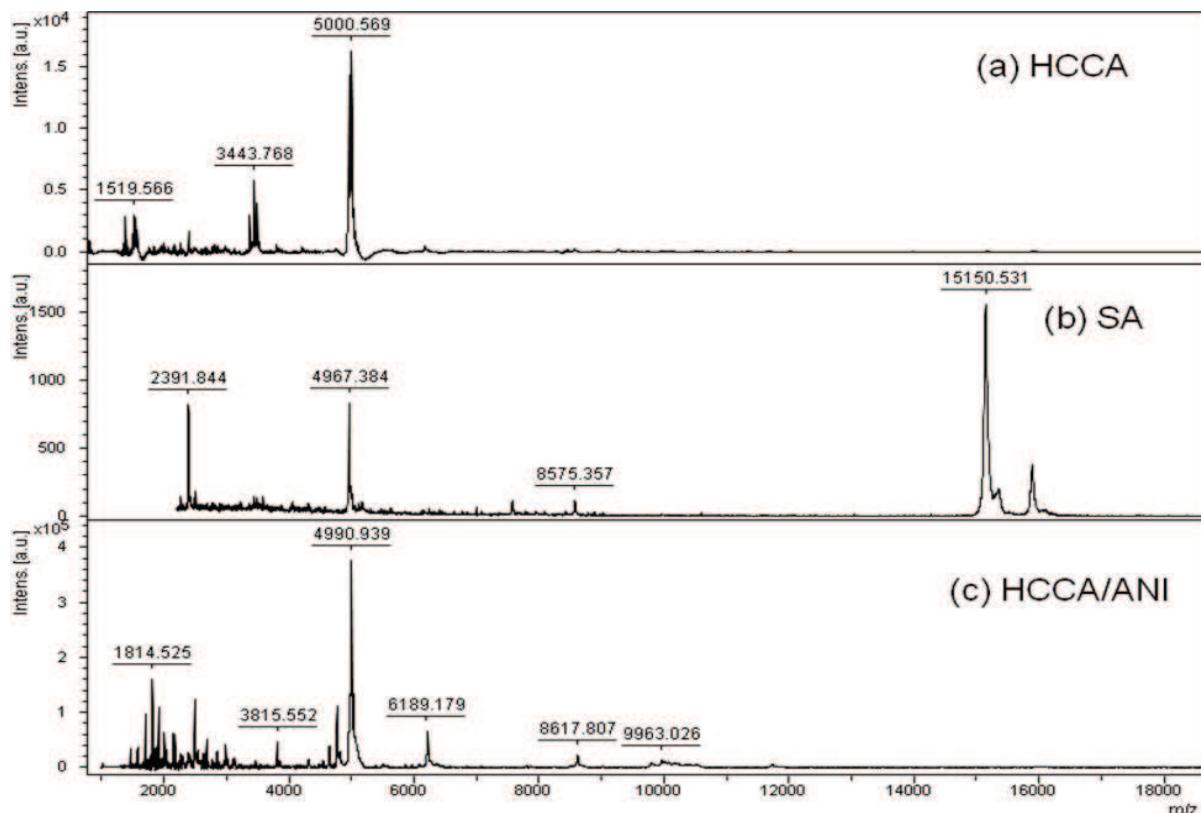
Une autre difficulté réside, comme pour toute approche protéomique, à contrôler la variabilité naturelle intra-patient. Pour une bonne représentation du profil peptidique détectable sur le tissu, une coupe a été analysée en plusieurs points couvrant les principales régions de celle-ci, en accumulant un nombre de tirs suffisant à l'obtention d'un bon rapport S/N (généralement 500 tirs par positions). Plusieurs coupes dans des régions différentes de la biopsie ovarienne ont été analysées afin d'assurer une bonne reproductibilité de l'analyse. La dernière se trouve dans la variabilité inter-patient ; cette modification est beaucoup plus difficile à contrôler et nécessite un grand nombre d'échantillons pour être palliée. Dans cette étude, tous les tissus obtenus ont été confirmés par les anatomopathologistes comme étant de stade III ou IV, et les analyses ont été conduites sur des tissus histologiquement comparables. De plus, nous n'avons considéré que les marqueurs absents/présents entre les biopsies cancéreuses et les tumeurs/kystes bénins. Les pics présentant simplement une modulation d'intensité n'ont pas été considérés.

Une étude par imagerie MALDI précédemment réalisée au laboratoire a permis de mettre en évidence plusieurs biomarqueurs potentiels du cancer de l'ovaire [89]. L'un de ces nouveaux biomarqueurs a pu être identifié par MALDI-MS directement à partir des coupes de biopsies du cancer de l'ovaire stade III et IV (**Figure 32**) et par nanoESI-MS/MS après digestion enzymatique. Cette protéine détectée à m/z 9744 correspond au fragment C-terminal, de 84 acides aminés, de la protéine Reg-alpha. Cette protéine est connue pour être impliquée dans l'activation du protéasome 11S. La validation croisée de ce biomarqueur a pu être obtenue en combinant l'imagerie MALDI et l'immunohistochimie. L'analyse directe sur coupe s'est donc révélée être un outil de choix pour la recherche de biomarqueurs.



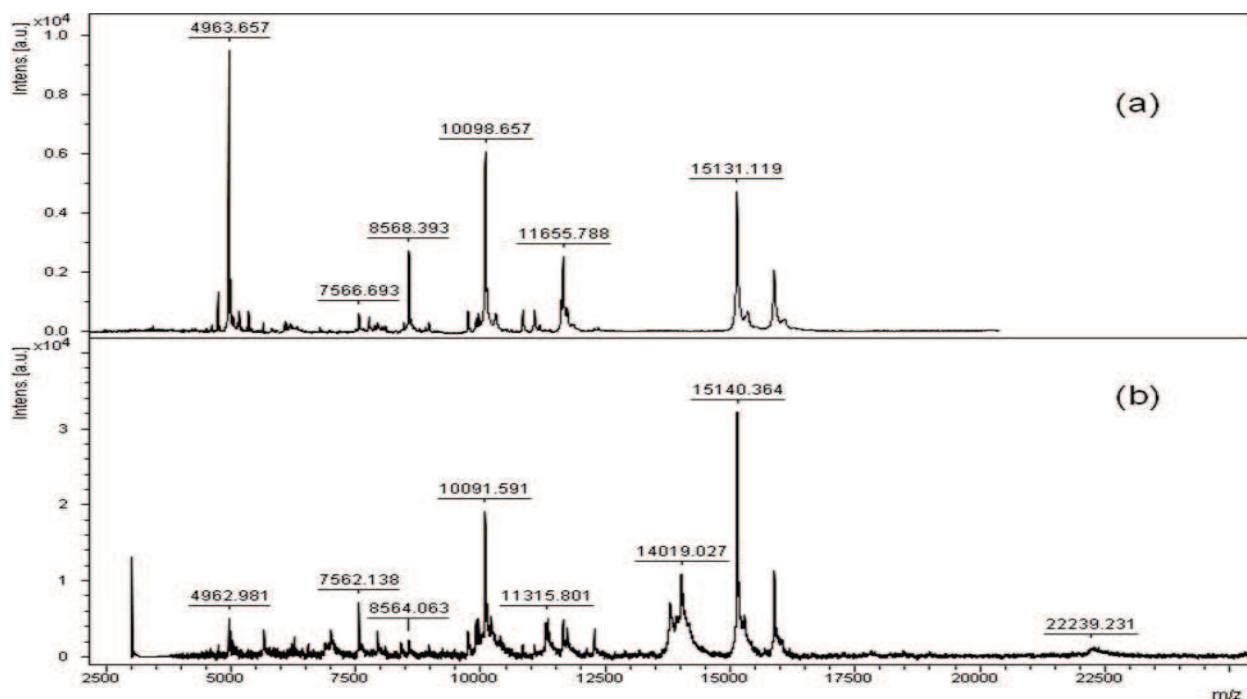
**Figure 32:** Spectres MALDI enregistrés à partir de 3 coupes d'ovaire présentant des tumeurs cancéreuses et 3 coupes présentant des tumeurs bénignes

Au début de nos études, des profils d'analyses directes sur des coupes ovariennes de 10 $\mu$ m d'épaisseur ont été réalisés en utilisant différentes matrices (HCCA, SA, HCCA/ANI). Les profils ont été effectués suivant les mêmes conditions d'analyse, et notamment en ce qui concerne les matrices (**Figure 33**).



**Figure 33:** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA (a) , SA(b) HCCA/ANI (c) sans traitement

Comme nous l'avons précédemment décrit dans la section « traitements des tissus », les coupes de tissus de l'ovaire ont subi un traitement chimique (chloroforme, acétone froid, éthanol 70% 96%) qui améliore les signaux spectraux en extrayant des coupes une partie des lipides des biopsies. Comme nous l'espérions, des profils différents semblent être détectés suivant la pathologie, même si certains signaux restent en commun entre les deux analyses. **Figure 34.** Cependant, une partie de ces signaux apparaissant comme variables sont le reflet de la variabilité inter et intra patientes. Ces spectres reflètent ainsi très bien la nécessité de réaliser plusieurs acquisitions en différents points du tissu et également en plusieurs endroits de la biopsie. Nous avons renouvelé l'expérience sur des échantillons provenant de 15 patientes cancéreuses et 15 patientes bénignes.



**Figure 34:** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien bénin (a) et malin (b) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice SA après traitement par les solvants organiques

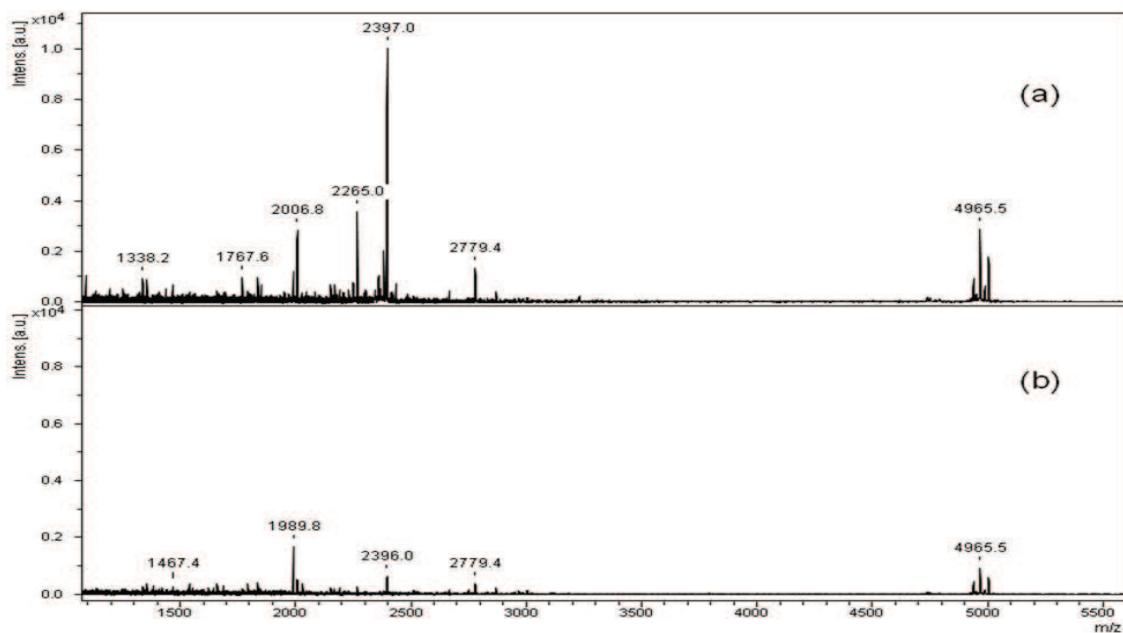
#### 2.1.4. Automatisation de l'analyse MALDI sur coupe de tissu ovarien frais

Les coupes tissulaires ovariennes ont été déposées sur les mêmes lames quelque soit le type d'échantillon (bénin, malin ou borderline) et soumis aux analyses des peptides, puis des petites protéines et finalement des protéines de haute masse en utilisant trois méthodes l'une après l'autre, basées sur le dépôt de matrice classique et les traitements par solvants. Après

chaque étape, la matrice est enlevée par une solution de méthanol 100%.

#### 2.1.4.1. Analyse MALDI des peptides sur tissu ovarien:

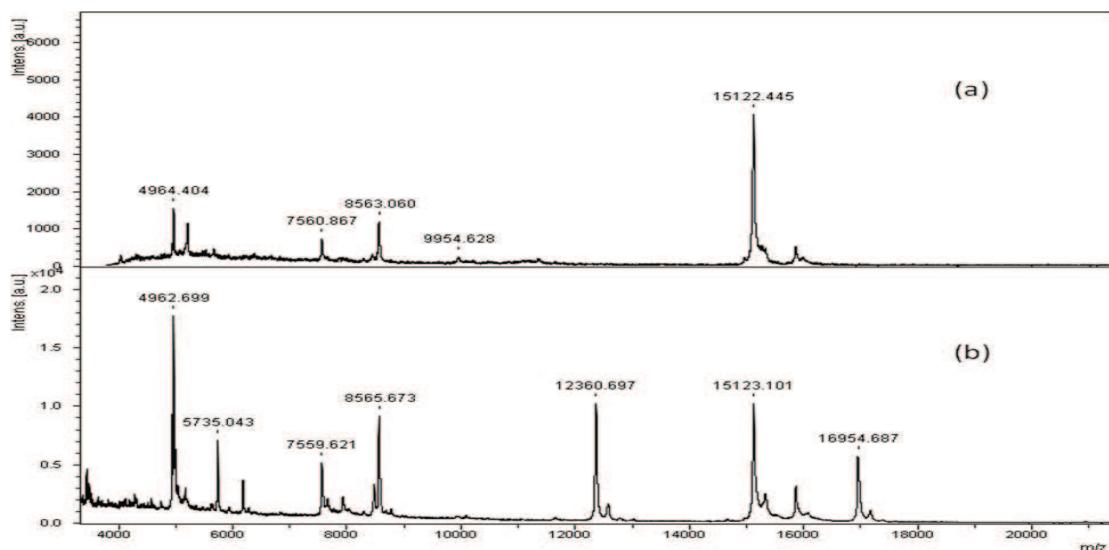
L'analyse des tissus cancéreux comparée à l'analyse de tissus sains, révèle des profils peptidiques différents. La **Figure 35** présente un exemple de profils types obtenus sur ces échantillons. Comme le montre la figure, les ions présents dans les deux spectres sont relativement différents, mettant en évidence une modification du contenu peptidique des tissus dans le cas de cancer de l'ovaire. Ces analyses ont été répétées pour chacune des biopsies issues des patientes atteintes de cancer. Afin d'éviter les faux positifs, n'ont été retenus que les ions absents/présents dans les spectres des patientes atteintes de cancer (i.e. les pics présentant simplement une modulation d'intensité n'ont pas été retenus). Sur l'ensemble des analyses n'ont par la suite été sélectionnés que les ions présents dans les cas de cancer mais toujours absents chez les patientes ne présentant pas la pathologie. Cette classification est réalisée par des outils statistiques (PCA).



**Figure 35:** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien bénin (a) et d'un tissu malin (b) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA

#### 2.1.4.2. Analyse directe des petites protéines :

Différentes matrices sont couramment employées en MALDI pour l'analyse des protéines comme la SA, le 2,5-DHB ou l'HCCA. En imagerie MALDI, la matrice la plus classiquement utilisée pour l'analyse des protéines est la matrice SA, l'HCCA ayant démontré peu d'aptitudes pour l'analyse des protéines à partir des tissus et le 2,5-DHB présentant une cristallisation peu homogène (phénomène de « hot-spot » pouvant entraîner une perte d'information) avec certains moyens de dépôt. Pour l'analyse des petites molécules, de nombreuses méthodes de dépôt peuvent être mises en œuvre et conduisent à de bonnes performances analytiques. Dans ce cas, les performances ne sont pas dépendantes du volume de solution déposé. Il en va tout autrement dans le cas des protéines. Le volume de solution déposée devient un paramètre non négligeable pour des raisons d'extraction, de solubilisation et d'incorporation dans les cristaux de matrice. La matrice est déposée par pipette. La **Figure 36** présente un exemple de profils types obtenus sur ces échantillons ovariens (malin Vs bénin).

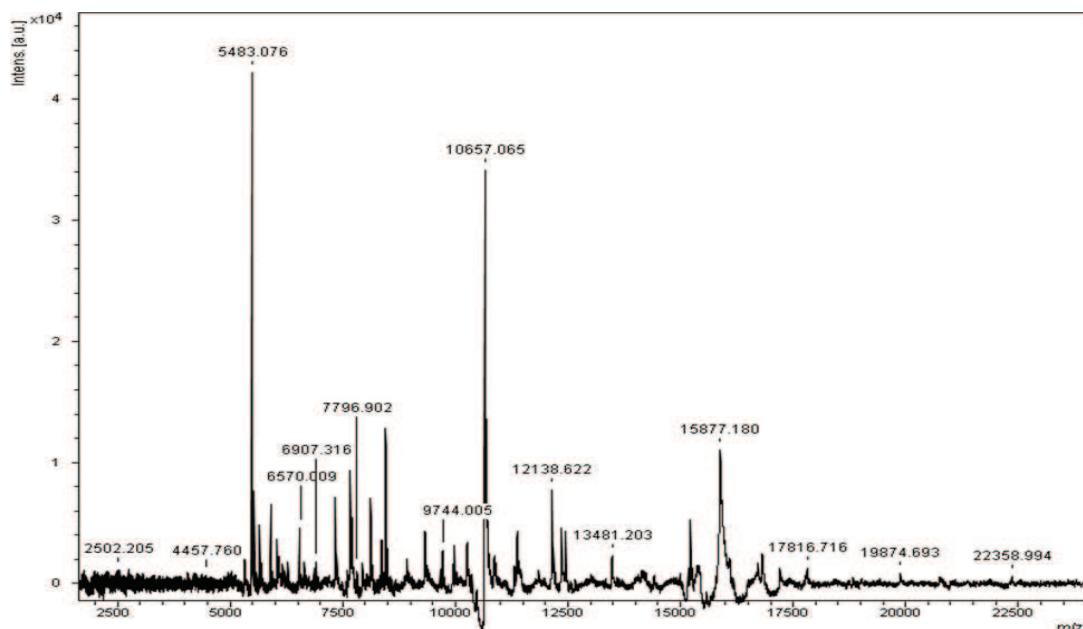


**Figure 36 :** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien bénin (a) et d'un tissu malin (b) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice SA

Compte tenu de l'intérêt des matrices ioniques tant du point de vue analytique que de la cristallisation et de la facilité de dépôt, cette famille de matrice a été étudiée pour l'analyse des protéines. Il a été précédemment montré que les matrices HCCA/ANI et HCCA/3AP amélioraient la détection des peptides et dans une certaine mesure des protéines. Ainsi, pour l'analyse des protéines la matrice ionique SA/3AP a été testée après synthèse par comparaison avec l'acide sinapinique (SA).

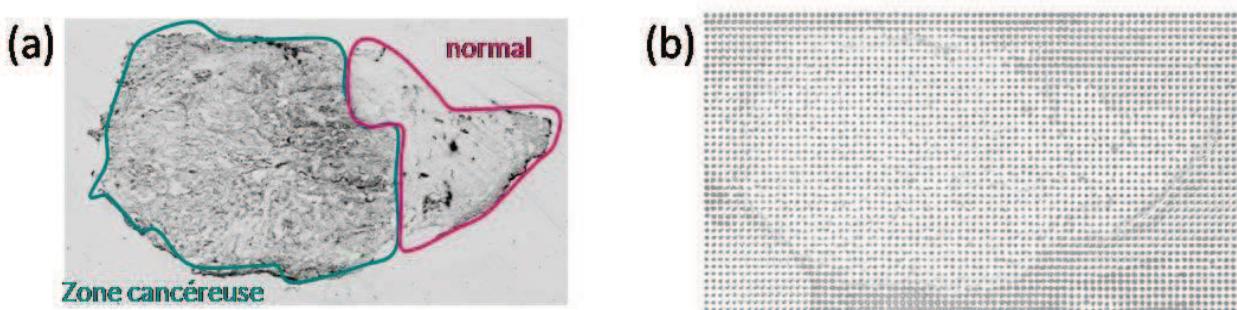
L'application de la matrice SA/3AP est très stable et conduit à l'obtention de dépôts extrêmement homogènes. Encore une fois, les dépôts générés avec la matrice ionique sont

plus homogènes que ceux obtenus pour la matrice SA. Concernant l'analyse, la matrice ionique SA/3AP présente des signaux d'intensité plus élevée et un rapport signal/bruit supérieur à la matrice SA (**Figure 37**). En observons certaines régions du spectre, force est de constater que le matrice SA/3AP présente des pics d'intensité supérieure dans la gamme de  $m/z$  considérée (6 000 à 17 000) Ainsi, si l'extraction est un paramètre primordial à l'obtention de spectres de qualité, il ne s'agit pas d'un paramètre suffisant, et la co-cristallisation matrice/analyte est également une étape cruciale expliquant ainsi que seules certaines matrices ioniques présentent des performances intéressantes pour l'analyse des protéines.



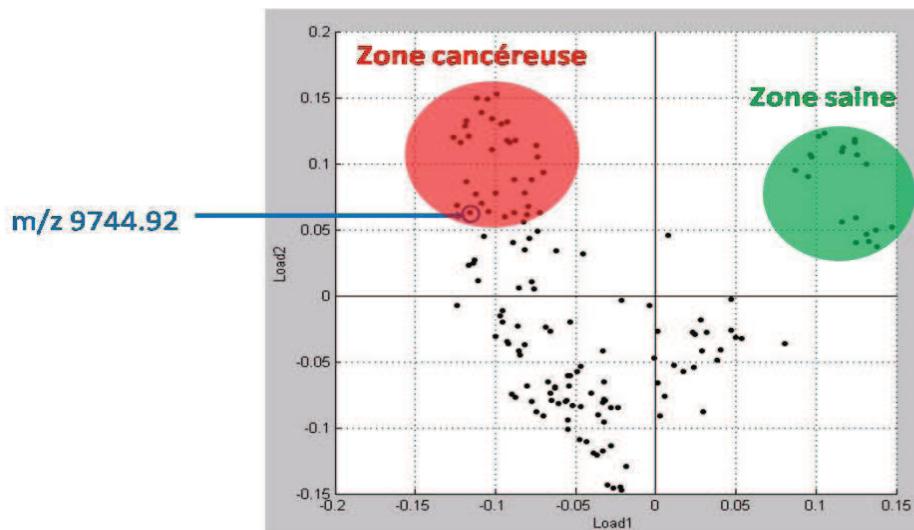
**Figure 37:** Spectre de masse obtenu à partir de coupe de tissu frais ovarien malin enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice SA/3AP

Afin de mettre en application les développements réalisés, une coupe de biopsie du cancer de l'ovaire présentant une zone tumorale et une zone saine (**Figure 38.a**) a été étudiée avec la matrice SA/3AP déposée de manière automatique par système piézoélectrique à l'aide d'un robot de micro-dépôt (**Figure 38.b**). Les micro-dépôts sont réalisés de façon à recouvrir l'ensemble de la coupe incluant les deux zones d'intérêt.



**Figure 38 :** Images optiques d'une coupe d'ovaire cancéreuse (a) avant dépôt de la matrice et présentant les deux zones d'intérêt et (b) le même coupe après dépôt de la matrice SA/3AP.

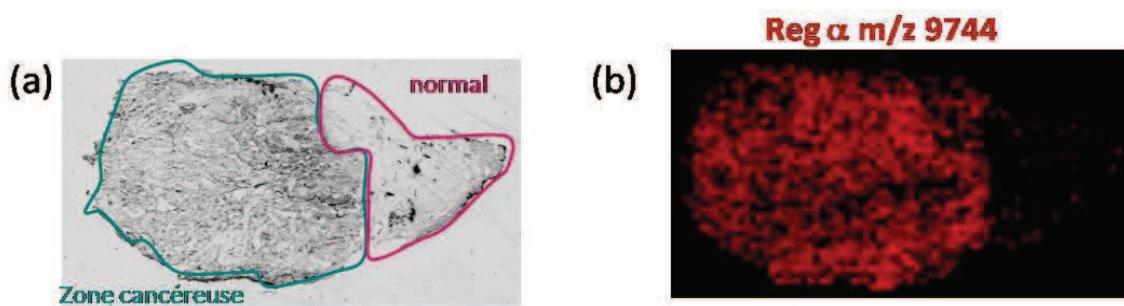
Comme décrit précédemment, l'utilisation de la matrice ionique permet d'obtenir un dépôt stable durant les deux heures et demie nécessaires pour recouvrir l'ensemble de la coupe avec une résolution de  $150\mu\text{m}$ . Après acquisition des données en mode imagerie, il est possible d'étudier la distribution des protéines. Afin de mettre en évidence les ions présentant la plus grande variabilité entre les deux régions, des outils statistiques tels que l'analyse en composante principale peuvent être combinées avec les résultats de l'imagerie MALDI. Les analyses PCA réalisées à partir des données permettent de mettre en évidence deux groupes d'ions distincts et différentiels (**Figure 39**).



**Figure 39:** Analyse PCA non supervisée obtenue à partir des spectres enregistrés sur une coupe d'ovaire après imagerie MALDI présentant les ions différemment exprimés

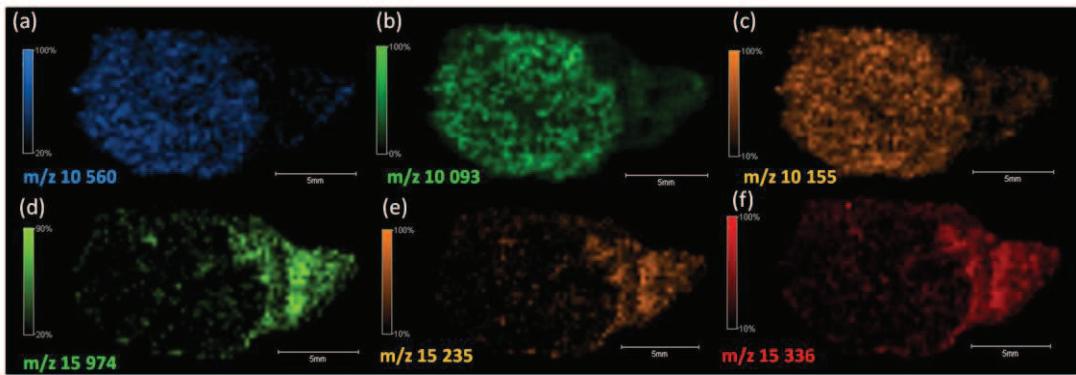
L'analyse non supervisée des spectres permet de mettre en évidence des ions détectés uniquement dans la zone cancéreuse ou dans la zone saine. Par cette méthode il est très facile de pouvoir mettre en évidence des biomarqueurs « potentiels » qui doivent ensuite être validés

par une approche croisée avec d'autres méthodes complémentaires. Un exemple concret de cette application est obtenu avec l'ion à  $m/z$  9 744.92 correspondant au fragment de la protéine Reg alpha précédemment mis en évidence. L'utilisation des analyses PCA permet de démontrer que ce fragment est différentiellement présent au sein du tissu dans la région cancéreuse. Il est possible de rechercher la localisation de cet ion particulier et de vérifier que la répartition corrèle avec la zone cancéreuse (**Figure 40**). Après reconstruction de l'image, Reg alpha est bien détecté dans la zone cancéreuse montrant par la même occasion que l'utilisation de la bioinformatique et plus particulièrement la PCA est essentielle afin de simplifier les jeux de données.



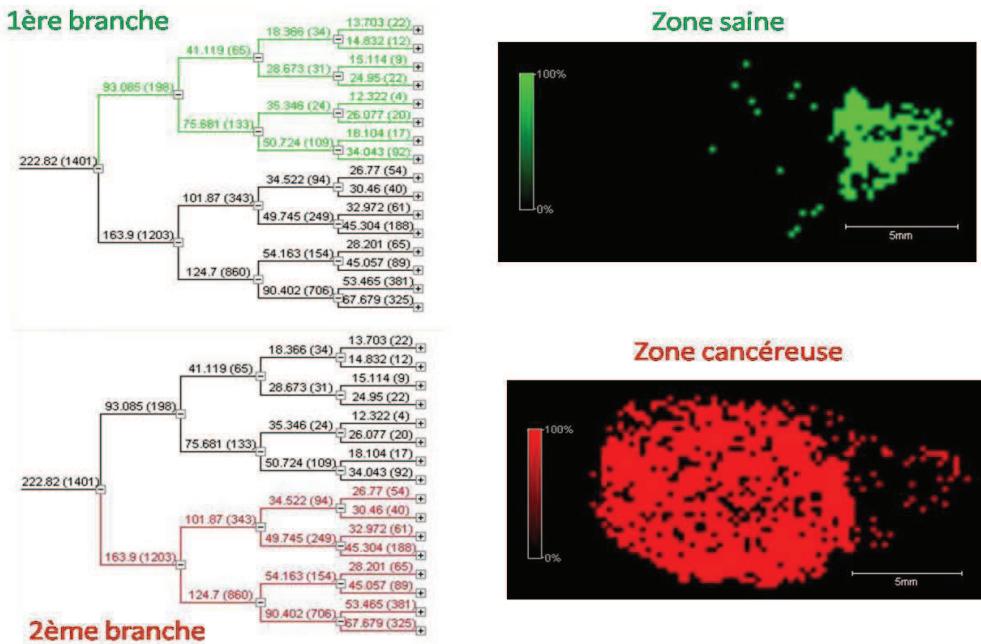
**Figure 40:** Image optique de la coupe d'ovaire présentant la zone cancéreuse et la zone saine (a) et image MALDI représentant la distribution de Reg alpha ( $m/z$  9744) (b).

Il devient alors plus simple de mettre en évidence les  $m/z$  des ions correspondant à des biomarqueurs. En reprenant les résultats de l'analyse PCA, les  $m/z$  correspondants aux protéines détectées uniquement dans la zone cancéreuse sont de fait déterminés. De la même façon, il est possible de retrouver les  $m/z$  correspondants aux protéines uniquement détectées dans la zone saine de la biopsie. En **Figure 41** sont représentés la distribution d'ions correspondants aux protéines présentant des distributions spécifiques dans l'une ou l'autre des régions de la biopsie.



**Figure 41 :** Images MALDI d’ions mis en évidence par PCA et détectés uniquement dans la zone cancéreuse (a-c) et dans la zone saine (d-f).

Partant de ce principe, il serait très facile d'affirmer que les ions détectés dans la zone cancéreuse (**Figure 41.a-c**) seraient des biomarqueurs éventuels. En effet, il convient de noter que ces ions correspondent à des protéines uniquement détectées dans la zone cancéreuse mais ne sont pas forcément exprimés que dans cette région. L'ionisation des espèces et aussi leur détection dépendent de nombreux paramètres et peuvent être grandement influencés par le milieu environnant. Par exemple, rien ne dit que l'ion à  $m/z$  10 560 (**Figure 41.a**) détecté dans la zone cancéreuse n'est pas non plus présent dans la zone saine mais que l'environnement dans cette dernière zone n'entraîne pas une impossibilité de détection de cette protéine par phénomène desuppression de signal. Bien que l'analyse PCA permette de simplifier de façon significative les données pour trouver des ions différentiellement présents, cet outil ne prend pas en compte l'effet de l'environnement. Si l'ensemble des spectres et non plus les individus constituants les spectres sont pris en considération, il est alors possible de mettre en évidence les variations causées par les caractéristiques histologiques du tissu et donc l'environnement. Cet outil basé sur la PCA ne permet pas de mettre en évidence la variation d'un ion mais d'un ensemble de spectres. Ces variations dépendent d'une part de l'environnement mais aussi de l'état physiologique qui dépend de la pathologie. Les spectres sont regroupés en fonction de leur similarité et un dendrogramme est obtenu. Chaque branche du dendrogramme correspond à un environnement différent sur la coupe. Par cette technique il devient alors possible de retrouver les deux zones distinctes de la coupe d'ovaire (**Figure 42**).



**Figure 42:** Dendrogramme créé à partir de l’analyse en cluster regroupant les spectres par similarité (a). Image du cluster correspondant à la zone saine et à la branche supérieure du dendrogramme (b). Image du cluster correspondant à la zone cancéreuse et à la branche inférieure du dendrogramme (c).

Chaque branche du dendrogramme peut ensuite être divisée en d’autres branches représentant des zones différentes dans la première sélectionnée. L’imagerie MALDI associée à l’analyse statistique multi-variée apporte une nouvelle approche en permettant de mettre en évidence un état physiologique qui peut être influencé par une pathologie. Ainsi, l’ensemble de ces développements tendent à faire de l’imagerie MALDI une méthode permettant de réaliser un diagnostic clinique.

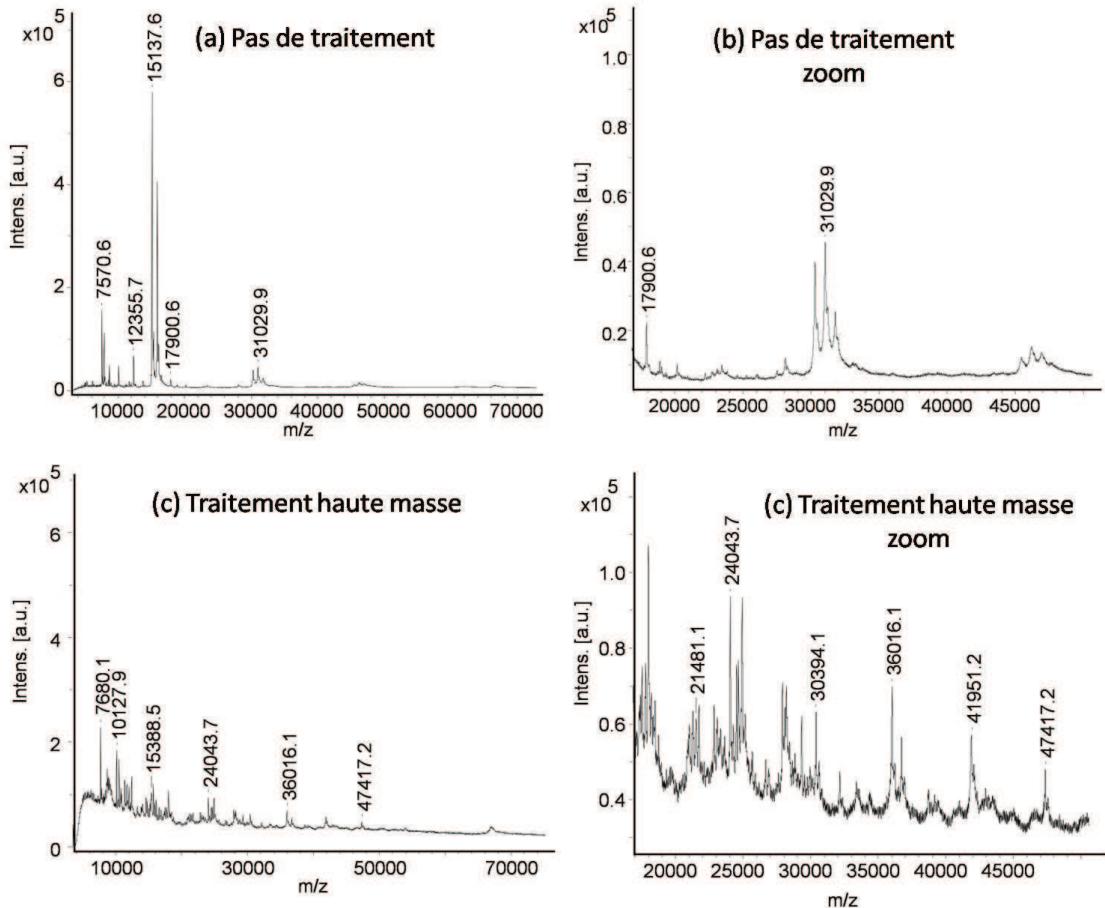
#### 2.1.4.3. Analyse directe des protéines de haute masse

Lors d’analyses protéomiques classiques, les protocoles d’extraction des protéines sont beaucoup plus complexes et mettent en jeu différentes étapes permettant de rompre les interactions non covalentes afin de séparer les molécules les unes des autres pour une meilleure extraction. En dehors des ponts disulfures, les principales interactions assurant la cohésion des protéines les unes aux autres sont de types non covalents *i.e.* des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes. Ces interactions hydrophobes sont aussi responsables des interactions protéines/protéines et des interactions

protéines/ligand telles que les interactions lipides/protéines. Afin d'améliorer l'extraction des protéines des tissus, il semble nécessaire de trouver un protocole permettant de rompre les liaisons électrostatiques, les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et les ponts disulfures. Le meilleur moyen de rompre les interactions hydrophobes est de créer un environnement hydrophobe. Ainsi, l'utilisation de solvants hydrophobes tels que HFIP [190-192] et TFE [193, 194] pour l'extraction des protéines membranaires [195-197] combinée à la rupture des interactions non covalentes par répulsion de charges a été testée.

Le HFIP connut pour son efficacité d'extraction des protéines hydrophobes permet leur solubilisation avec la matrice SA et donc une co-cristallisation directe des protéines avec la matrice. L'incorporation des protéines hydrophobes est donc effectuée par l'addition d'une solution de SA 20mg/mL dans une solution pure de HFIP suivie d'une solution de SA à 20mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) pour résolubiliser les cristaux de matrice formés avec HFIP. Cette procédure permet la détection de protéines jusqu'à m/z 70 000 avec une grande sensibilité (**Figure 43**). Cependant, cette stratégie nécessite une très grande attention lors du dépôt de la solution de SA contenue dans le HFIP pure car celle-ci diffuse très rapidement hors du tissu.

Cependant, il est possible d'appliquer le traitement par des solvants chimiques afin d'améliorer la détection des protéines de plus hautes masses [198]. Deux coupes d'ovaire successives présentant une tumeur bénigne et une tumeur maligne ont été réalisées puis ont été soumises aux lavages acétone, chloroforme et EtOH. L'une de ces deux coupes est ensuite soumise au traitement haute masse HFIP avant d'appliquer la solution de matrice contenant 20mg/mL de SA sur les deux coupes. Les résultats obtenus sont présentés la figure ci-dessous.



**Figure 43:** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien enregistrés en mode linéaire positif après (a) dépôt de la matrice SA sans traitement et (b) après traitement haute masse. (c-d) Zoom des spectres dans la gamme  $m/z$  20000 et  $m/z$  50000.

Les résultats montrent clairement que les traitements réalisés apportent de nombreuses informations qui ne peuvent pas être obtenues par une analyse « classique ». En effet, l'analyse directe d'une coupe de biopsie du cancer de l'ovaire sans traitement conduit à l'observation de nombreux pics jusqu'à  $m/z$  15000. Les seuls pics de plus haute masse sont généralement dus à la présence de l'hémoglobine. Après traitement haute masse, le spectre obtenu présente de très nombreux pics et en particulier au dessus de  $m/z$  15000, pics qui n'étaient pas observés sans traitement. Il est donc très important pour la suite de pouvoir adapter cette procédure pour la réalisation d'expériences d'imagerie MALDI afin d'augmenter les chances de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs spécifiques du cancer de l'ovaire. Néanmoins, l'augmentation du nombre de protéines détectées par les traitements devrait permettre d'établir un nouveau jeu de biomarqueurs potentiels. Par comparaison des masses des protéines détectées par analyse directe après traitement haute masse et par gel 2D, une identification putative des protéines en tant que marqueurs a pu être

établie et est présentée dans le **Tableau 8**. Ces résultats suggèrent que les traitements haute masse pourrait permettre de détecter des biomarqueurs connus directement dans les zones tumorales à partir des biopsies. Il serait alors possible de réaliser du diagnostic en se basant sur la détection des multiples biomarqueurs connus.

<b>Nom des protéines</b>	<b>Poids moléculaire (Da) déterminé par analyse directe après traitement haute masse</b>	<b>Poids moléculaire (Da) de protéines identifiées dans le cancer de l'ovaire</b>
Tetranectin (CAA45860)	17 775	17 776
Neutropil Gelatinase- associated lipocalin precursor	22 576	22 571
Plasma retinol- binding protein precursor	22 986	22 990
Metalloproteinase inhibitor 1 precursor	23 152	23 153
Kallikrein 5 Precursor	26 842	26 838
Isoform 1 of Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	36 940	36 949

**Tableau 8 :** Poids moléculaire de biomarqueurs connus dans le cancer de l'ovaire détectés par analyse directe sur coupe de cancer de l'ovaire après traitement HFIP.

## **2.2. Stratégies d'identification des protéines**

### **2.2.1 Indentification directe sur tissu afin de garder la régionalisation spatiale des biomarqueurs**

L'identification des protéines directement sur tissus peut s'effectuer suivant deux stratégies, à savoir, l'imagerie en mode « Top-Down » ou l'imagerie en mode « Bottom-Up ». L'approche « Top-Down » se repose sur le principe de l'ISD et se base sur l'identification et l'analyse directe des protéines sous leur forme intacte par MS. Cette technique reste néanmoins peu employée. Elle mérite d'être améliorée et approfondie car prometteuse pour l'obtention d'informations de séquences en une seule étape et avec un gain de temps assez conséquent.

Dans la stratégie « *Bottom-Up* » les protéines sont tout d'abord soumises à une digestion enzymatique (e.g. trypsine) ou chimique (e.g. CNBr, chlorosuccinimide), puis les fragments de digestion sont analysés par MS. Cette étape qui consiste à déterminer le rapport masse/charge de tous les fragments peptidiques de digestion est nommée empreinte de digestion trypsique (ou Peptide Masse Fingerprint, PMF). Les fragments de digestion, quant à eux, peuvent être caractérisés en réalisant des analyses MS/MS [199]. Si les protéines étudiées sont déjà connues et référencées dans des banques de données, il sera alors possible de les identifier en comparant les masses des fragments de digestion obtenues grâce au spectre MS à des ions fragments mesurés à partir des spectres MS/MS. Si la protéine n'est pas connue en banques, il faudra alors obtenir *de novo* la séquence des peptides (avec ou sans assistance d'outils informatiques) avant de remonter à la séquence de la protéine. Cette dernière procédure est plus longue et requiert généralement la connaissance de la séquence des peptides afin de remonter à la séquence complète de la protéine.

Cette approche présente des résultats assez satisfaisants puisqu'elle permet d'une part de réaliser l'image des protéines à partir des fragments peptidiques de digestion, y compris certaines protéines ne pouvant habituellement pas être observées et d'autre part de pouvoir identifier ces protéines par une analyse en mode MS/MS des peptides [23, 89].

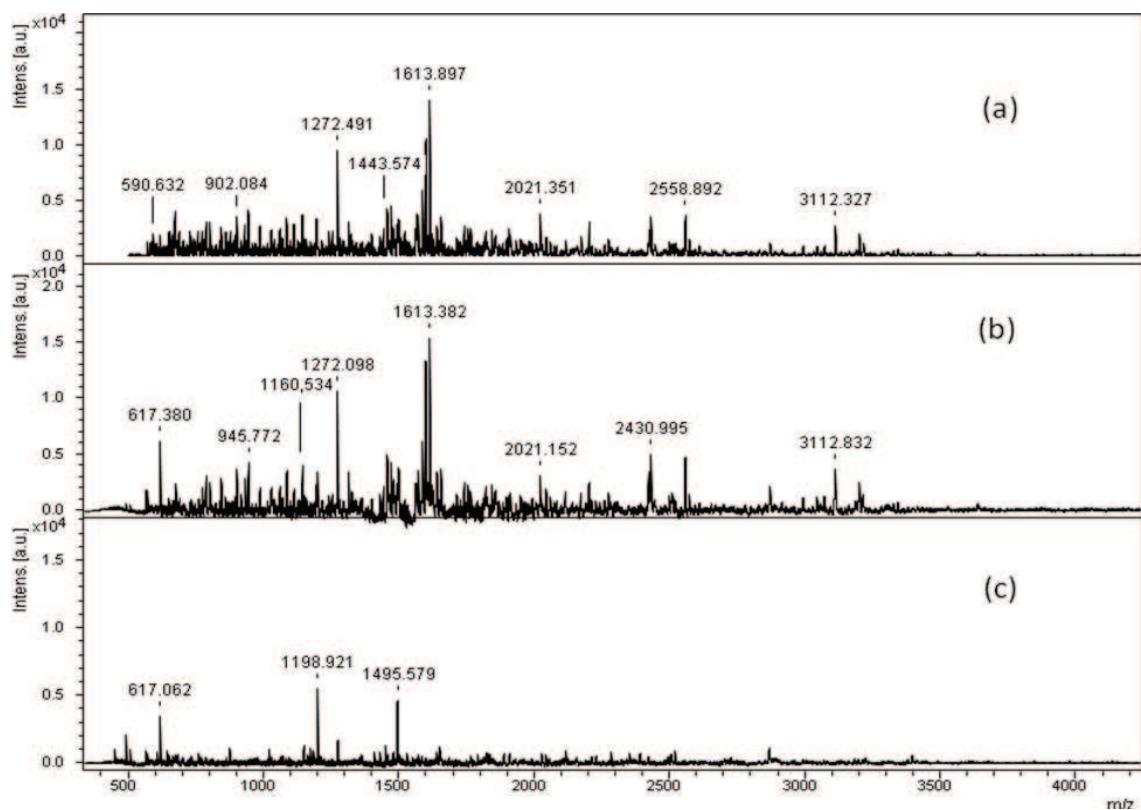
L'utilisation de la digestion enzymatique *in situ* semble être à l'heure actuelle une des meilleures stratégies pour l'identification des protéines directement à partir des tissus. Cependant, dans certains cas, il arrive que la séquence du peptide ne puisse être déterminée, ne permettant pas alors de remonter à l'identification de la protéine correspondante. Ceci

s'explique souvent par la complexité ou la manque des informations des spectres MS/MS pour certains peptides issus de la digestion trypsique *in situ*. Dans d'autres cas, les spectres sont trop complexes et révèlent parfois la présence d'ions provenant de deux peptides différents. Il reste donc de nombreux développements à effectuer afin de faciliter et rendre plus fiable l'interrogation en banque de données pour l'identification des protéines. Cependant, la stratégie d'imagerie MALDI en mode « *Bottom-up* » requiert différents développements pour une amélioration de ses performances.

La stratégie « *Bottom-Up* » pour l'imagerie MALDI implique une procédure de digestion enzymatique *in situ* par une enzyme. La trypsine étant l'enzyme la plus fréquemment employée dans les analyses protéomiques classiques, elle a été choisie pour l'ensemble des études réalisées.

La première étude a concerné l'optimisation de la concentration de trypsine permettant d'obtenir le meilleur rendement de digestion. Des solutions contenant 10 $\mu$ g/mL, 25 $\mu$ g/mL et 50 $\mu$ g/mL de trypsine dans un tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (pH=8) ont donc été déposées sur des coupes ovariennes adjacentes. Après digestion, la matrice HCCA/ANI est déposée.

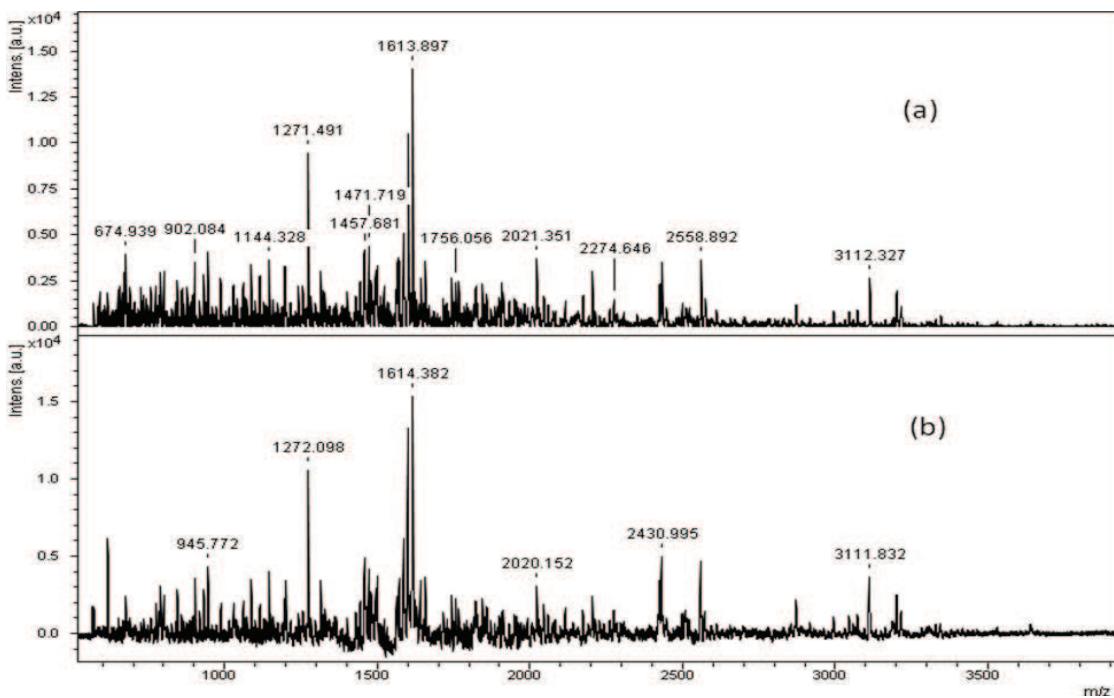
Les coupes ovariennes sont ensuite analysées et comparées en retenant comme critères le nombre de peptides détectés, l'intensité des pics et le rapport signal sur bruit. Les spectres obtenus pour les trois conditions de digestion sont présentés (**Figure 44**). Les signaux peptidiques observés sur les trois spectres sont presque équivalents. La seule différence apparente réside dans l'intensité des pics issus de l'autolyse de la trypsine. On peut en déduire qu'une solution de trypsine à 25 $\mu$ g/mL semble être suffisante pour une atteindre un rendement de digestion efficace.



**Figure 44:** Spectres de masse obtenus à partir des coupes ovariennes digérées avec la trypsine à (a) 10 µg/mL (a), (b) 25 µg/mL (b) et (c) 50 µg/mL (c). Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de HCCA/ANI.

Le MALDI est une source assez tolérante aux sels, cependant, l'ajout des tampons en trop forte concentration peut entraîner un abaissement élevé du rapport signal/bruit par apparition de bruit dans les spectres mais surtout entraîner des problèmes de cristallisation de la matrice. Il est donc important de pouvoir minimiser l'apport en sels et en tampons sur les coupes. La digestion enzymatique étant réalisée sur une coupe de tissu, il doit être possible d'effectuer la digestion sans ajout de tampon. En effet, la coupe de tissu doit normalement être au pH physiologique, si aucun réactif pouvant modifier le pH n'a été ajouté. Ainsi, nous avons comparé les rendements de digestion pour une digestion réalisée en tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  classique et dans l'eau. La trypsine est donc déposée à 25 µg/mL dans l'eau pure ou dans une solution de tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . La matrice HCCA/ANI est ensuite déposée sur les deux coupes. Les spectres enregistrés et présentés dans la **Figure 45** montrent qu'aucune différence n'est observée entre les spectres que ce soit en termes du nombre de peptides détectés, d'intensité qu'en termes de rapport signal/bruit. Les spectres sont quasiment identiques et des pics sont observés jusqu'à m/z 4000. Ainsi, la digestion enzymatique peut-être

indifféremment réalisée dans l'eau ou dans  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . Afin de minimiser l'apport de sels et tampons, une digestion dans l'eau sera préférentiellement retenue.



**Figure 45:** Spectres moyens de digestion obtenus sur coupes de cancer de l'ovaire après dépôt de la trypsine à  $25\mu\text{g}/\text{mL}$  reprise dans un tampon  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50Mm (a) et dans l'eau pure (b). Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA/ANI.

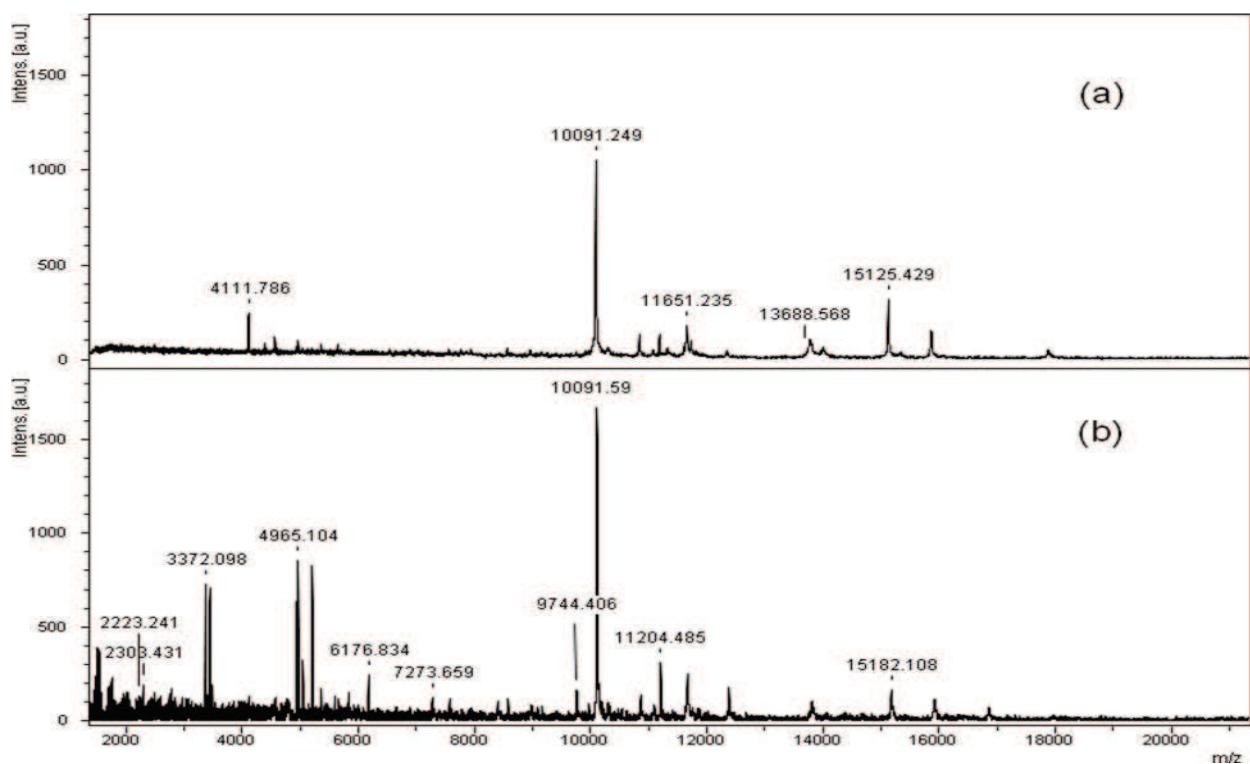
Ainsi, si l'imagerie MALDI permet dans la grande majorité des cas de mettre en évidence des protéines différemment régulées entre des échantillons à des stades physiologiques différents ou au sein d'un même échantillon, il faut par la suite pouvoir disposer de l'identification de ces protéines. La stratégie la plus directe consiste à pouvoir réaliser l'identification directement à partir des tissus sans avoir recours aux étapes d'exactions et de séparations préalables à l'identification dans les stratégies employées en protéomique classique. L'identification directe des protéines est impossible sur tissu ovarien car l'approche « *Top-Down* » n'est pas réalisable suite aux faits qu'il n'y a que très peu d'ions multichargés générés après analyse MALDI. Ces développements sont en cours au laboratoire par des approches hybrides de type MALDI-ESI (MALDESI) ou ELDI par l'utilisation de sources MALDI à pression atmosphérique couplé à un analyseur de type *Electrospray*.

Dans ce contexte, la digestion des protéines au préalable par des enzymes de type trypsine est nécessaire. Deux approches ont été réalisées i.e. une approche de digestion directe sur tissu et/ou une approche de type *shotgun* sur produits de lavages des coupes et digestion enzymatique.

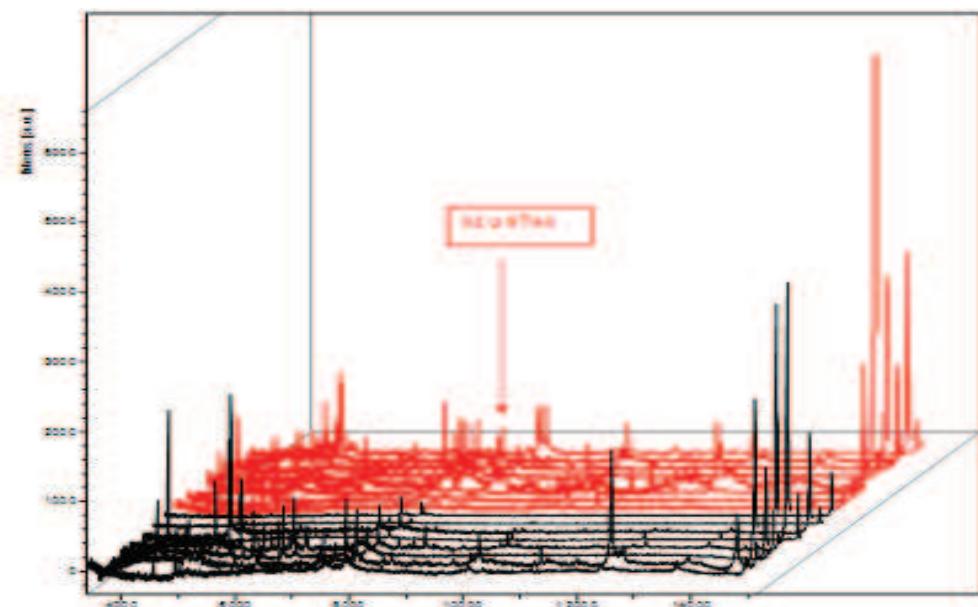
## **2.2.2. Identifications des biomarqueurs : Stratégies « *shotgun*» sur extraits peptidiques et protéiques à partir de coupes de tissus ovariens frais**

### **2.2.2.1 Validation de la démarche d'extraction peptidiques/protéiques à partir de coupes : recherche du fragment de l'activateur de l'immunoprotéasome 11S (Reg alpha)**

Un traitement des coupes de tissu ovarien a été réalisé avec l'utilisation de l'éthanol, de l'acétone et du chloroforme. Les meilleurs résultats ont été enregistrés avec un lavage chloroforme, solvant apolaire. Ce lavage est réalisé avec 200 µL de chloroforme disposé sur lame. Le chloroforme semble désordonner la bicouche lipidique de la membrane et donner accès plus facilement au cytoplasme des cellules. Ces résultats ont été observés par d'autres équipes en utilisant notre protocole [131]. Sur ces mêmes coupes sont déposés dans un premier temps de (AcN) 50% dont l'une des actions est de fixer les peptides hydrophiles pendant 30 secondes puis dans un seconde temps, d'acide formique 5% ou HCl. Grâce à cette approche, le fragment Reg alpha de m/z 9744 a pu être détecté ainsi que d'autres peptides et protéines de petite taille (**Figure 46**).



**Figure 46:** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien bénin (a) et d'un tissu malin (b) enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA



**Figure 47:** Analyse différentielle en MALDI après extraction peptidique simple  
Mise en évidence de Reg Alpha ( $m/z$  9744) dans les spectres malins  
(en rouge) et absents dans les spectres bénins (en noir).

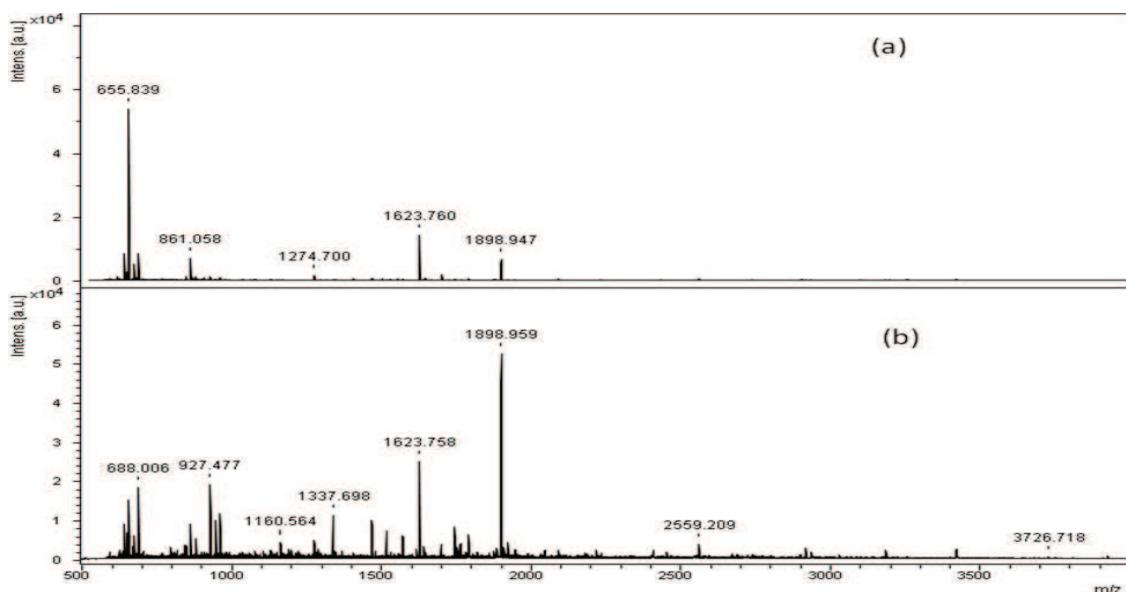
Les analyses sur les extraits peptidiques après lavage à l'AcN ont permis de retrouver le fragment de  $m/z$  9744 dans les échantillons cancéreux alors qu'il n'a été retrouvé dans

aucun des spectres de tumeurs bénignes, ce qui est en concordance avec les résultats des travaux des années précédentes (**Figure 47**).

### 2.2.2.2. Développement de la stratégie d'identification sur extrait de lavage tissulaire

La MS présente des avantages particulièrement intéressants pour parvenir à l'identification des molécules et notamment des biomolécules telles que les protéines. Toutefois, face aux problèmes rencontrés lors de l'indentification directe sur tissu par les deux approches traditionnelles, nous avons opté pour une nouvelle stratégie passant par une étape de lavage des coupes tissulaires ovariennes.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une digestion trypsique en solution sur nos extraits après validation de la présence de l'ion à 9744. Une différence de profil peptidique a donc put être relevée en MALDI. En effet, des peptides ( $m/z$  1160.54,  $m/z$  1337.69,  $m/z$  927.477, 1632.79, 1518.2...) sont présents dans les fractions malignes mais absents dans les fractions bénignes (**Figure 48**).



**Figure 48 :** Spectres de masse obtenus à partir de coupe de tissu frais ovarien bénin (a) et d'un tissu malin (b) après digestion trypsique enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA

Les analyses de l'extraction peptidique après lavage à l'AcN ont permis de retrouver le fragment de  $m/z$  9744 dans 64% des échantillons cancéreux alors qu'il n'a été retrouvé

dans aucun des spectres de tumeurs bénignes (**Tableau 9**), ce qui est concordant avec les résultats des travaux des années précédentes.

CANCERS	Type histologique	pic de m/z 9744 sur lavage simple	pic de m/z 1160 après digestion
patiente C1	ADK séromuqueux bien différencié	présent	absent
patiente C2	carcinome papillaire à cellules claires	présent	absent
patiente C3	ADK séromucineux invasif	absent	présent
patiente C4	ADK séreux peu différencié	absent	présent
patiente C5	ADK invasif peu différencié	présent	présent
patiente C6	kyste border line	présent	absent
patiente C7	carcinome endométrioïde	présent	présent
patiente C8	cystadénocarcinome séromuqueux	présent	présent
patiente C9	ADK séreux	présent	présent
patiente C10	ADK séreux	absent	présent
patiente C11	kyste border line	absent	présent
pourcentage de détection		<b>64%</b>	<b>73%</b>
BENINS	Type histologique	pic de m/z 9744 sur lavage simple	pic de m/z 1160 après digestion
patiente B1	cystadénofibrome séreux	absent	absent
patiente B1	cystadénome séreux	absent	absent
patiente B1	léiomyome	absent	absent
patiente B1	cystadénome mucineux	absent	absent
patiente B1	kyste séreux	absent	absent
patiente B1	cystadénome mucineux	absent	présent
patiente B1	kyste endométriosique	absent	absent
patiente B1	kystes fonctionnels	absent	présent
pourcentage de détection		absent	<b>20%</b>

**Tableau 9 :** Tableau récapitulatif du profiling MALDI pour les 2 biomarqueurs Reg Alpha et le pic m/z 1160.5 chez 11 échantillons cancéreux et 8 échantillons bénins

### 2.2.2.3. Caractérisation des ions spécifiques liés à la pathologie par MALDI-TOF/TOF en mode MS/MS

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la caractérisation du fragment à m/z 1160.6 par fragmentation MS/MS en MALDI TOF/TOF afin de remonter vers la séquence de la protéine correspondante. La séquence identifiée est la suivante **WFYIASAFR**. Après interrogation de la banque de données MASCOT, le peptide correspondant a été identifié comme étant un fragment de l'AGP (Orosomucoïde). L'attribution des ions sur les spectres MS/MS après identification montre que certains ions ne sont pas attribués. La **Figure 49** représente la séquence complète de la protéine AGP (43 kDa) avec en rouge, la partie identifiée lors de la digestion trypsique et les expériences MS/MS

AQIPLCANLVPVPITNATLDRITGK**WFYIASAFR**NEEYNKSVQEIQATFFYFTPNKTED  
TIFLREYQTRQDQCIYNTTYLNVQRENGTISR<sup>Y</sup>VGGQEHFAHLLILRDTKTYMLAFDV  
NDEKNWGLSVYADKPETTKEQLGEFYEALDCLRIPKSDVVYTDWKDKCEPLEKQH  
EKERKQEEGES

**Figure 49** : Séquence de la protéine AGP

Les analyses de la digestion **théorique** et la recherche dans les spectres MALDI des fragments issus de la digestion de la protéine retrouvée, nous ont permis d'identifier 6 fragments donnant une couverture de séquence de 35% pour la protéine AGP (**Tableau 10**).

	position	Séquence identifié
Peak 13	52-57	NEEYNK
Peak 14	195-201	KQEEGES
Peak 26	181-188	DKCEPLEK
Peak 37	43-51	<b>WFYIASAFR</b>
Peak 63	109-123	YVGGQEHFAHLLILR
Peak 71	58-73	SVQEIQATFFYFTPNK

**Tableau 10** : Séquences identifiées pour l'AGP

#### **2.2.2.4. Caractérisation des ions spécifiques liés à la pathologie par nanoLC couplée à une trappe d'ion (ESI-MS) : approche shot-gun**

Afin d'identifier les biomarqueurs potentiels du cancer de l'ovaire, une approche complémentaire par couplage d'une chromatographie liquide type HPLC (LC) à un spectromètre de masse a été élaborée en association avec une analyse par digestion sur coupes et une analyse par MS/MS par MALDI TOF/TOF. Les peptides obtenus après digestion trypsique ont été séparés par nano LC en fonction de leur degré d'hydrophobicité. Puis fragmentés en mode MS/MS. Les fragments générés ont permis de déterminer une couverture de séquences pour une protéine donnée et d'identifier celle-ci par comparaison des séquences avec celles de composées connus et référencés dans des banques de données, de type MASCOT. Ces analyses ont permis d'identifier 14 biomarqueurs potentiels qui sont résummés dans le **tableau 11**.

Numéro Access	Nom de la protéine	Mascot Score (average)	Sequence coverage (Average)
P08670_CHAIN_0	Vimentin	89.6 ± 22.3	27 ± 10%
P51884_CHAIN_0	Lumican Precursor	63.6 ± 5.7	19.3 ± 4 %
P02647_CHAIN_1	Apolipoprotein 1	49.9 ± 4	21.6 ± 4.9 %
P51888_CHAIN_0	Prolargin	52.5 ± 0.7	17 ± 0.8 %
Q12889_CHAIN_0	Oviductin (mucin-9)	47.8 ± 1.3	13.3 ± 1.2%
Q01995_CHAIN_0	Transgelin	49.5 ± 2.48	26 ± 2.44%
P02765	Orosomucoid	45 ± 2.44	20.8 ± 1.8%
P02787_CHAIN_0	Siderophilin	38.1 ± 2.2	12 ± 4.8%
P01009_ISOFORM_2	Alpha 1 antiprotease	29.8 ± 1.6	21 ± 3.2%
P08727	Cytokeratin 19	29.3 ± 1.75	10 ± 1.6%
P30086_CHAIN_0	Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein	28.1 ± 0.9	23 ± 2%
P31949	Protein S100 A11	22.6 ± 0.25	24. 5 ± 0.5%
P02790_CHAIN_0	Hemopexin	21.0 ± 0.4	6.5 ± 1.2%
P07737_CHAIN_0	Profilin -1	18.3 ± 0.9	15.4 ± 4.7%

**Tableau 11 :** Liste des biomarqueurs identifiés

Certains biomarqueurs identifiés sont déjà connus pour être secrétés dans le plasma des patientes atteintes d'un cancer ovarien. D'autres seraient exprimés directement au sein de la tumeur elle-même [200], ou excrétés dans le liquide d'ascite [201]. Dans tous les cas ces protéines peuvent être impliquées dans plusieurs domaines différents que ce soit dans la prolifération cellulaire, la modulation de la réponse immunitaire ou même dans les voies de

signalisation concernant la progression tumorale et les modifications du cytosquelette. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier avec plus de précision ces protéines jouant un rôle potentiel dans le processus de cancérogénèse.

### **2.2.2.5. Rôle potentiel des protéines identifiées**

#### **- Protéines associées à la prolifération cellulaire**

La famille de la protéine S100 a déjà été détectée dans les tumeurs ovariennes cancéreuses [202]. Nous avons détecté grâce aux analyses PCA, la protéine S100. Sa présence en zone tumorale mais aussi dans le liquide d'ascite avait déjà été démontrée par différentes études La protéine S100 A11 ou calgizzarine est connue pour réguler la croissance cellulaire en inhibant la synthèse d'ADN [203]. S100 A12 participe à la migration des leucocytes lors des phénomènes inflammatoires notamment en phase chronique.

#### **- Protéines impliquées dans la réponse immunitaire**

De récentes études évoquent la possibilité qu'un contexte plus ou moins relatif d'immunodépression facilite le développement d'ascite en cas de cancer ovarien [204]. Un rapport élevé du ratio CD4/CD8 révélerait la présence de lymphocyte [204].

Un taux réduit en IL2 et à l'inverse élevé en IL-6 et IL-10 seraient en faveur de l'inhibition d'une réponse immunitaire de type Th2. L'absence de réponse des LT dérivés du liquide d'ascite de ces patientes serait également en adéquation avec l'hypothèse d'une régulation inhibitrice de la réponse immunitaire [204].

En tenant compte de ces informations, nous avons essayé d'identifier des biomarqueurs qui pourraient tenir un rôle dans des phénomènes de régulation de la réponse immunitaire. Nous avons retrouvé cinq candidats potentiels : un fragment C-terminal du 11S immunoprotéasome (Reg Alpha), l'AGP, l'Apolipoprotéine A1, l'Hémopexine et le Lumican.

La protéine Reg Alpha est une protéine activatrice du complexe 20 S du protéasome qui est lui-même responsable de la dégradation de nombreuses protéines intracellulaire chez les eucaryotes, régulant ainsi la présence des protéines synthétisées à partir du génome [186, 205]. Deux voies de dégradation sont envisageables : dans le premier système, ATP

dépendant, les protéines à dégrader sont marquées par l'ubiquitine et régulées par une protéine appelée PA700 (ou 19S). Dans le deuxième cas, les protéines ne sont pas ubiquitinées et les complexes activateurs sont les protéines REG (ou PA 28, ou 11S) composées de différentes sous-unités. Le protéasome participe aussi à la présentation de l'antigène du soi via les molécules de CMH de classe I, par dégradation des protéines intracellulaires destinées à leur présentation antigénique via les molécules du CMH I. La protéine Reg Alpha participe donc à l'intégrité de la cellule et à la réponse immunitaire [206]. D'autre part, la protéine Reg alpha participe également au contrôle du cycle cellulaire par la régulation des voies de signalisation intracellulaires impliquant les facteurs Myc, Fos, p53 et NK-kB. L'inhibition du protéasome 20S est décrite dans l'induction ou l'inhibition de l'apoptose [205]. Cependant cette protéine a jusqu'à ce jour été très peu décrite en cancérogenèse. Le déficit en Reg Alpha a été cité dans les maladies auto-immunes telles que le syndrome de Sjogren et le lupus. Son altération, décrite dans le cancer du colon, est responsable d'un défaut de présentation des antigènes du soi via les molécules de CMH de classe I et induit une tolérance immunitaire au cancer [185, 186, 206]. Plus récemment, une étude démontre que Reg- $\alpha$  jouerait un rôle dans la transformation des lésions précancéreuses orales de type leucoplasie en carcinome épidermoïde oral [207].

Concernant l'orosomucoïde, cette protéine fait partie des quatre autres facteurs qui participent au phénomène de tolérance ou d'une possible inhibition de la réponse immunitaire. Elle est surexprimée en cas d'infection, d'inflammation et de cancer et semble posséder des capacités d'immunosuppression notamment dans les cancers ovariens avec ascite à travers une inhibition de sécrétion IL-2 par les lymphocytes [208]. Cette protéine de 43kDa est constituée de 183aa et présente des motifs post-traductionnels fortement glycosylés. Il existe plusieurs isoformes de la protéine dues au polymorphisme du gène codant la protéine et la présence de 5 sites possibles de glycosylation [209]. L'AGP est synthétisée par le foie en réponse à certaines situations telles que : le stress, la réaction inflammatoire, l'infarctus du myocarde, les infections néonatales [210]. Cette protéine possède aussi une action immunomodulatrice *in vivo* bien connue [211]. C'est une des principales protéines modulatrices des réponses immunitaires et inflammatoires en phase aigüe.

Le groupe d'Imre et coll a retrouvée une multiplication de la concentration sérique par un acteur 1,6 chez les patientes porteuses d'un cancer ovarien (différence statistiquement significative bien que moins importante dans les néoplasies ovariennes par rapport à d'autres

types de cancers) [212]. Cette concentration est multipliée par un facteur 2 à 5 en cas d'inflammation systémique et par un facteur 2,5 dans les cancers du sein et du poumon. De plus, la présence de cette protéine a été démontrée dans le liquide d'ascite des patientes porteuses d'un cancer ovarien.

Ce biomarqueur potentiel présente donc un double intérêt dans notre démarche :

- Sa surexpression sérique et sa présence dans le liquide d'ascite chez les patientes porteuses d'une néoplasie ovarienne en font un candidat particulièrement intéressant en vue d'un dépistage sérique à grande échelle du cancer de l'ovaire
- Son action immunomodulatrice connue *in vivo* et *in vitro* est cohérente avec l'hypothèse d'un phénomène de tolérance immunitaire dans le mécanisme de cancérogenèse ovarienne, qui avait été émise suite à la découverte de la protéine Reg.

En ce qui concerne l'Apoprotéine A1, cette protéine a été détectée dans les stades précoces du cancer mucineux [171]. Elle diminue l'expression de certaines molécules de surface comme les CD1a, CD80, CD86 et HLA-DR notamment au niveau des cellules dendritiques et stimulerait la production IL-10 [213].

L'hémoplexine, quant à elle a récemment fait l'objet d'une étude qui indique un rôle dans la réduction de sécrétion de TNF et les IL-6 par les macrophages, elle limite aussi la production de cytokine induite par des agonistes des récepteurs TLR 2 et TLR 4 [214]. Dans ce contexte, nous avons testé l'expression des TLR dans les lignées cellulaires SKOV3, nos résultats montrent une surexpression de tous les TLR hormis le TLR9 et le TLR 10.

Les protéoglycans comme le lumican, le biglycan et la prolargin seraient surexprimés dans le cancer du sein et intervient dans la progression tumorale [215, 216]. Par ailleurs, il a été démontré que le biglycan entre en interaction avec les récepteurs TLR2 et TLR4 des macrophages [217, 218]. Nous pouvons supposer que le lumican serait aussi impliqué dans l'activation de l'inflammation via ces mêmes récepteurs.

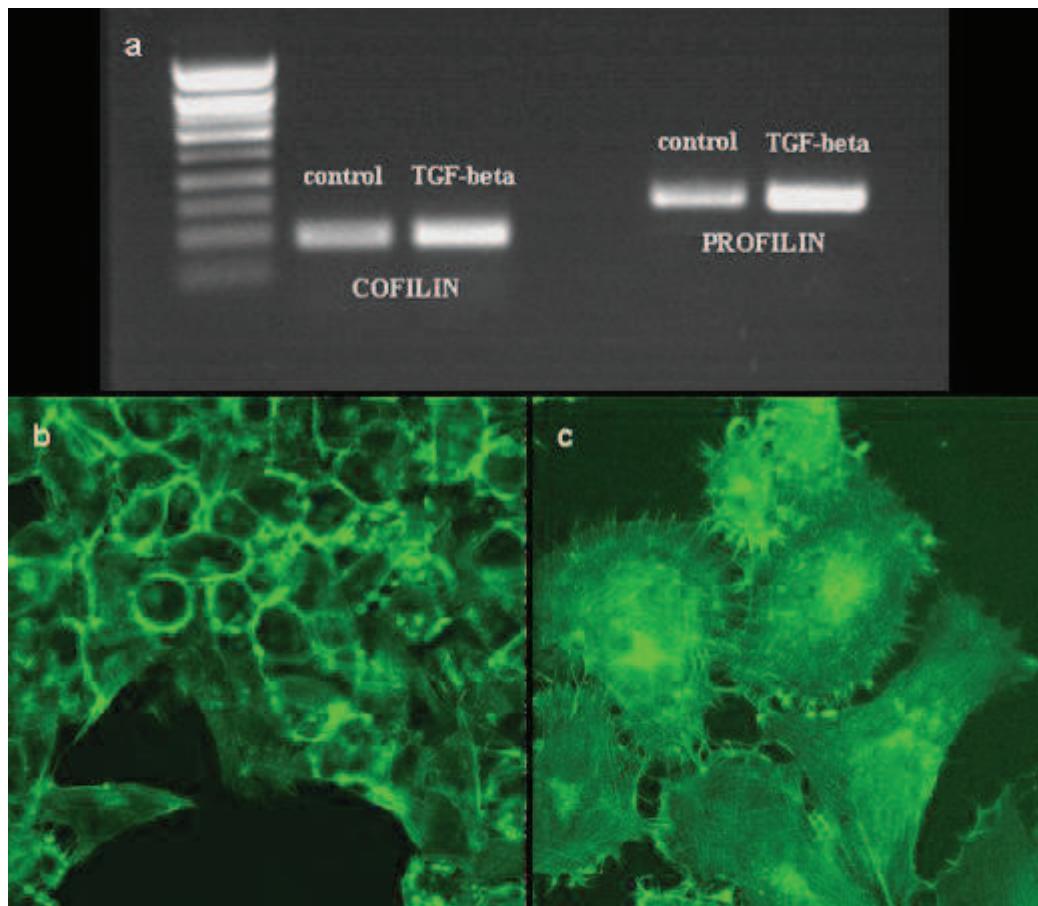
Il semble donc que les cellules cancéreuses ovaries utilisent plusieurs procédés pour tenter d'échapper à une réponse immunitaire permettant ainsi une progression tumorale facilitée. Elles produisent aussi des molécules immunsuppressives entraînant une tolérance immunitaire.

## - Protéines et Cytosquelette

Plusieurs protéines candidates incluant la profiline-1, la cofiline-1, la vimentine et la cytokeratine 19 sont impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire influant le cytosquelette. Une modification phénotypique de ces cellules, comme une conversion d'un type épithéliale à mésenchymateux, peut apparaître dans le développement embryologique mais aussi dans des processus d'invasion cancéreuse et de métastases.

Lors du processus de transition épithélial-mésenchymateux (EMT), les cellules perdent leur morphologie épithéliale pour réorganiser leur cytosquelette et acquérir un nouveau phénotype grâce à une régulation différente de l'expression de plusieurs molécules incluant des protéines de jonction et des marqueurs mésenchymateux. Le facteur de croissance TGF- $\beta$  est connu pour induire cette transition EMT pour des cellules ovariennes sarcomateuses [219]. En ce qui concerne la lignée cellulaire adénocarcinomateuse A549, cette différenciation est accompagnée d'une modification de l'expression de plusieurs protéines du cytosquelette incluant la  $\beta$ -actine, la cofiline, Moesin-filamine A et B, protéine  $\beta$ -1, la transgéline-2, S100 à A11 et la calpactine. Ces changements comportent l'acquisition de capacités de migration et d'invasion [220].

Par la suite, nous avons démontré qu'une stimulation des lignées cellulaires cancéreuses ovariennes par TGF (10 ng/ml/24h) entraînait une surexpression des mRNA de la Cofiline et de la Profiline-1 (**Figure 50a**) provoquant des modifications dans l'organisation du cytosquelette visible au microscope confocal (**Figure 50b**). On peut observer que cette stimulation ainsi que la réorganisation des actines du cytosquelette déclenchent la formation des fibres et de sprotrusions cellulaires (**Figure 50b, 50c**).



**Figure 50 :** Surexpression des ARNm de la Cofiline et la Profilin dans les lignées SKOV-3 après 24 h de stimulation par TGF-beta(a). Analyse en microscope confocal des cellules SKOV 3 après stimulation par TGF- $\beta$ . Un anticorps dirigé contre l'actine a été utilisé pour détecter les filaments d'actine du cytosquelette après stimulation (c) ou sans (b).

### - Progression tumorale

En complément de la protéine S100 et des protéines squelettes, nous avons également détecté dans nos analyses PCA la présence de la Mucine 9, un marqueur de l'épithélium de l'oviducte. Nos résultats sont donc en accord avec les travaux de groupe Woo et coll, qui montre que l'expression de ce type de protéine serait en faveur d'une différenciation témoin probable d'un phénomène précoce de carcinogénèse ovarienne lien avec une infection virale de type EBV [221, 222].

## 2.3. Validation des biomarqueurs

La validation clinique des candidats est un travail nécessaire et indispensable pour proposer un biomarqueur utilisable en routine en milieu hospitalier. A ce jour, toutes pathologies confondues, l'analyse protéomique n'a pas rencontré un succès indiscutables à l'origine d'une application diagnostique vis-à-vis d'une pathologie. Ce faible retour sur investissement, imputable à la difficulté de franchir le guet entre les phases d'identification et de validation, a soulevé de sérieux doutes quant à des possibles futurs succès. Dans ce contexte, il est primordial de faire une collaboration étroite entretenue avec d'autres équipes sur ce projet permettant de déboucher la phase initiale d'identification de cibles potentielles sur un début de processus de validation clinique des candidats proposés.

### 2.3.1. Immunohistochimie

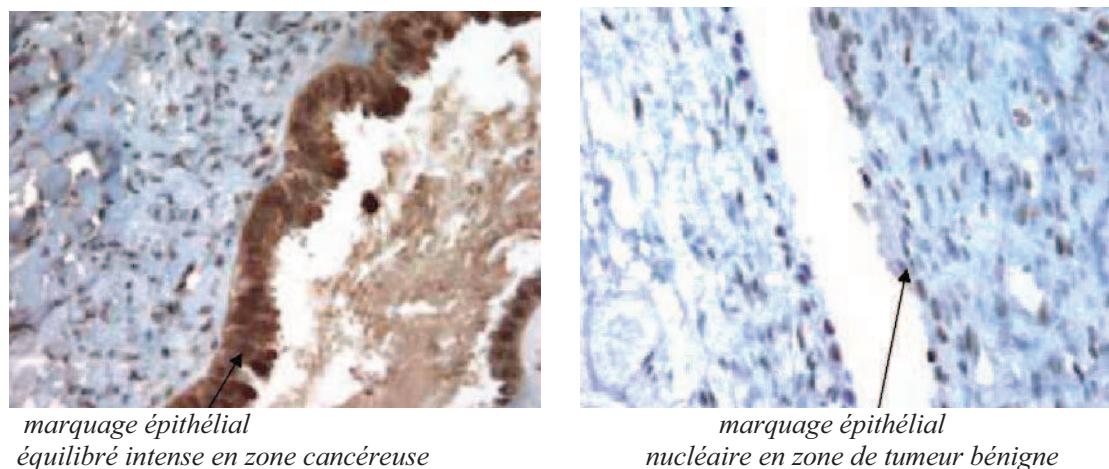
Les premières expériences sur ce sujet ont consisté à étudier l'évolution de la protéine Reg alpha sur des tissus cancéreux par immunohistochimie en utilisant un anticorps Anti -Reg α polyclonal dirigé vers la partie C-Terminale de la protéine. C'est dans cette zone que se situe le fragment détecté en analyse directe MALDI.

Ces expériences ont été réalisées sur une partie des échantillons analysés en MALDI ainsi que des échantillons stockés dans les banques hospitalières des anatomopathologistes, incluant des tumeurs malignes épithéliales. Les analyses ont permis de comparer le marquage obtenu à l'aide de l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la protéine Reg alpha contenant le fragment à m/z 9744 détecté chez les patientes atteintes de cancer.

L'analyse a porté sur 30 tissus ovariens : 16 cancers (dont 5 métastases péritonéales) versus 14 tumeurs bénignes. Cette étude avait retrouvé un marquage de toutes les tumeurs ovariennes malignes et bénignes portant spécifiquement sur les épithéliums tumoraux et met particulièrement en évidence une différence d'intensité et de localisation du marquage entre les tumeurs bénignes et malignes (**Figure 51**) :

- le signal épithelial est systématiquement de **localisation équilibrée** voire cytoplasmique **en cas de cancer** (87,5% de marquage équilibré soit n=14/16 et un marquage spécifiquement cytoplasmique dans le cas d'un carcinome endométrioïde)

- le signal épithelial est majoritairement de **localisation nucléaire dans les tumeurs bénignes** (12,5% de marquage nucléaire soit n=2/14).



**Figure 51 :** Immunohistochimie d'une tumeur épithéliale maligne (à gauche) et d'une tumeur bénigne (à droite). Marquage de REG  $\alpha$  (en marron)

Toutefois, aucune différence significative n'est observée en ce qui concerne les intensités du marquage dans les cancers versus les tumeurs bénignes (62% de marquage d'intensité forte dans les cancers versus 57% dans les tumeurs bénignes).

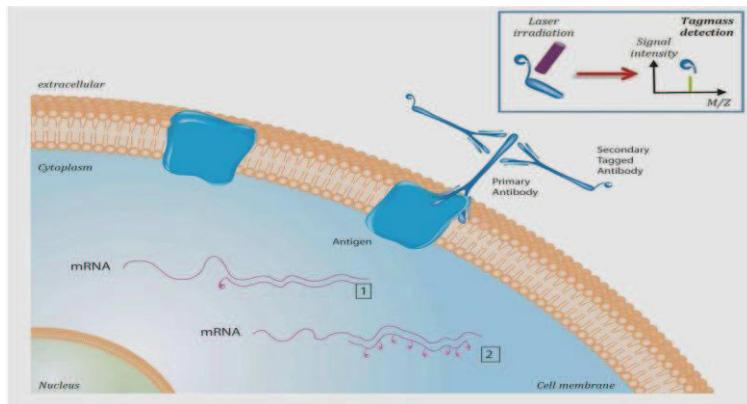
L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine REG  $\alpha$  est impliquée et elle est plus abondante dans le cancer de l'ovaire. Elle semble donc être un marqueur du cancer de l'ovaire et non une molécule impliquée dans la synthèse d'épithélium.

En conclusion, la protéine Reg alpha apparaît surexprimée au niveau de l'épithélium des tumeurs bénignes et malignes de l'ovaire avec une localisation cellulaire différente selon le caractère malin ou bénin.

### 2.3.2. Validation par TAG MASS

Afin d'imager directement les protéines de haute masse comme les enzymes ou des récepteurs directement sur tissu, une nouvelle approche a été développée au laboratoire, la technologie TAG MASS [223]. Cette méthode utilise une molécule photoclivable à la longueur d'onde du laser contenant deux parties distinctes : le ligand et le rapporteur (voir généralités). La molécule sous certaines conditions se fixe sur un substrat spécifique par

l'intermédiaire de son ligand. Il est nécessaire d'avoir pour cette partie une affinité très forte avec le substrat. On utilise alors soit un anticorps soit une sonde complémentaire d'ADN ou d'ARNm. La seconde partie (le rapporteur) va être libérée par le tir laser lors de l'imagerie MALDI et sera ainsi détectée par l'analyseur (**Figure 52**). Le rapporteur peut être une molécule organique ou un peptide connu. L'image sera reconstruite par l'intermédiaire du logiciel d'imagerie en recherchant la masse précise du rapporteur. Ces rapporteurs sont définis en fonction du spectromètre de masse utilisé. Pour le MALDI, une matrice permettant la cristallisation est envisageable comme molécule de petite taille facilement détectable. Dans le cas du SIMS par exemple, il est plus judicieux d'utiliser le brome ou l'or facilement détectable par MS.



**Figure 52 :** Principe du Tag mass sur tissu

Avec cette approche, il est possible de réaliser des études en multiplexes ciblant plusieurs protéines en une seule analyse. Avec cette technique, nous avons confirmé la présence de deux marqueurs (Reg alpha et AGP) au sein des zones cancéreuses mais avec une répartition différente au sein du tissu. Cette répartition est en droite ligne avec les études statistiques réalisées en multivariable non supervisées. Cette étude PCA a permis de mettre en évidence deux zones i.e. une cancéreuse et une saine. L'analyse par classification hiérachique a mis en évidence plusieurs sous zones au sein de la zone cancéreuse suggérant la possibilité de cellules exprimant des phénotypes différents liés à la pathologie. Dans ce cadre les deux marqueurs (Reg Alpha et l'orsomucoïde) ont une répartition différente.

### **2.3.3. Validation des biomarqueurs par biologie moléculaire sur les cellules cancéreuses SKOV3**

L'intérêt de travailler sur une culture cellulaire pour notre étude est double :

- Elle permet la validation des biomarqueurs en RT-PCR après extraction de l'ARN cellulaire.
- Elle permet d'observer des modifications d'expression de certains gènes ou même des modifications du cytosquelette de la cellule après stimulation par des facteurs de croissance comme TGF-β.

La réalisation dans un premier temps d'une rétrotranscription (RT), qui permet à partir d'ARNm (messager) d'obtenir de l'ADNc (complémentaire), substrat d'une PCR classique.

Pour les gènes des TLR, Reg Alpha et Orosmucoïde, les amorces ont été recherchés par le logiciel «primer3 input» ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Les gènes témoins utilisés sont les gènes GAPDH et 18S.

L'ensemble des résultats de cette étude sont présentés dans l'article :

*MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers. Med Sci Monit. 2010 Aug 1; 16(8):BR233-45.*

El Ayed M, Bonnel D, Longuespée R, Castelier C, Franck J, Vergara D, Desmons A, Tasiemski A, Kenani A, Vinatier D, Day R, Fournier I, Salzet M.

### **2.3.4. Conclusion**

Les études réalisées à partir d'une quarantaine de biopsies issues de patientes atteintes du cancer de l'ovaire de stade III et IV ou de kystes bénins ont permis de mettre en évidence 14 biomarqueurs potentiels de cette pathologie. Le marqueur le plus important présent dans cette liste est le fragment identifié comme appartenant à la protéine REGα qui est un activateur puissant du protéasome. Ce dernier ayant déjà été décrit comme impliqué dans certains cancers et dans la régulation de l'apoptose ou du cycle cellulaire.

Les études immunohistologiques laissent apparaître une augmentation de cette protéine dans les biopsies tumorales, avec une localisation parfois plus cytoplasmique que nucléaire comme c'est le cas dans les tissus bénins.

Des expériences de biologie moléculaires ont confirmé la présence et l'augmentation de l'expression de REG dans le cas des cancers par rapport à des kystes bénins.

Ainsi, le fragment détecté lors des analyses directes semble être le résultat d'une augmentation de la quantité de REG alpha dans les tumeurs malignes.

La technologie d'imagerie MALDI a permis de découvrir et de localiser cette molécule sur tissu ovarien à des stades III et IV, elle peut être ensuite appliquée pour des stades plus précoce afin de commencer une étude pour le diagnostic de cette maladie. Ce travail pourra être mené en parallèle à l'étude du sang, afin de savoir si l'activateur du protéasome ou ses métabolites sont présents dans le sang des patientes cancéreuses.

Cependant, la présence d'un marqueur comme celui de la mucin 9 va permettre de mettre en place de nouvelles stratégies cliniques. La validation de la présence de ces marqueurs sur des stades précoce de la maladie permettra la mise en place d'essai clinique à l'aide d'anticorps cytotoxiques liés à l'activation des natural killers. En effet, nos marqueurs serviront de cibles à ces anticorps afin qu'ils puissent rechercher les cellules malignes dans le tissu. L'efficacité de l'utilisation de ces anticorps cytotoxiques (WO/2007/051926) développés par le LFB ou Innate pharma sera suivie par dosage grâce à la technique Tag-Mass par ELISA (ISA-MS) en mode multiplexe en dosant les oncoprotéines virales d'EBV et HHV6 comme les protéines MAF (liés à l'entrée virale) ou gp116 de HHV6 par exemple. Comme présenté dans la partie suivante (2.4.), une étiologie virale pour le cancer de l'ovaire s'avère à la vue des résultats trouvés en imagerie et par PCRq sur les biopsies. Ces éléments montrent donc l'intérêt de l'imagerie MALDI dans un processus de recherche de biomarqueurs et de développements de nouveaux outils de traitements de la pathologie.

## **2.4. Analyse des virus**

### **2.4.1. Recherche de virus parmi les échantillons ovariens**

L'association virus-cancer semble de plus en plus importante et plusieurs études épidémiologiques montrent l'intérêt des vaccinations préventives vis-à-vis de certains cancers et les antigènes de virus associés aux cancers seront les premiers utilisés. Les virus d'hépatite, les papillomavirus, l'EBV et le virus HTLV (*Human T-cell Leukemia Virus*) sont en première ligne, et il est d'ores et déjà évident qu'une vaccination contre l'EBV ou contre le virus de l'hépatite C diminuerait de façon significative les lymphomes de Burkitt, le cancer du nasopharynx postérieur ou les cancers primitifs du foie. Un meilleur contrôle des HPV et une vaccination vis-à-vis d'un antigène d'enveloppe pourrait permettre de lutter contre les cancers gynécologiques [11]. La surexpression de MUC-1 et MUC-9 dans les cancers gynécologiques est liée à l'intégration d'EBV et révélateur de la pathologie (U.S. Pat. No. 7,407,762). Or, dans nos études (voir ci-après) nous avons mis en évidence la MUC-9, oviductin ou oviduct-specific glycoprotein, ce qui est en accord avec ce qui a été récemment décrit dans la bibliographie. L'implication de certains virus dans le processus de cancérogénèse est déjà connue notamment dans le cancer du col utérin pour le Papillomavirus ou dans le lymphome de Burkitt pour l'Epstein Barr Virus.

De par le rôle de la protéine Reg alpha dans le complexe du protéasome pouvant entraîner un phénomène de tolérance immunitaire au cancer lié au non présentation du soi suite au clivage de l'immuno-protéasome Et celui du CMH 1 dans la tolérance immunitaire, il semble raisonnable d'émettre l'hypothèse d'une étiologie virale. Nous avons recherché la présence de la signature de virus dans les biopsies des patients par biologie moléculaire et par protéomique sur les mêmes échantillons et nous avions déterminé la présence des biomarqueurs. En effet, la protéine PA 28 semble être une cible pour le virus EBV et le virus de l'herpès. Elle joue un rôle dans la dégradation des peptides viraux. Les différents résultats obtenus auparavant montrent le niveau élevé d'expression de PA 28 dans les cancers et en particuliers au niveau des cellules épithéliales. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un virus herpétique dont le génome est un ADN double brin long de 175.000 pdb [224]. Lorsque ce virus infecte une cellule, l'expression de certaines protéines virales dites « précoces » survient après un bref laps de temps. Ces protéines sont appelées EBNA pour « antigènes nucléaires associés au virus EB ». Ces antigènes précoces sont présents dans toutes les cellules infectées

par le virus EB, y compris les cellules tumorales. Plus tardivement sont exprimées des protéines de localisation membranaire dénommées LMP pour « latent membrane proteins » [224]. Il en existe 3 types, les LMP1, 2A et 2B. Enfin, sont exprimés également deux ARN de localisation nucléaire, non codants, les ARN EBER 1 et 2 (pour EB encoded small RNAs) [225]. Les EBER sont abondamment exprimés, à raison de  $10^7$  copies par cellule. Ils jouent un rôle dans la maturation des ARN viraux. En pratique, la mise en évidence du virus EB repose sur la détection de la protéine LMP1 par immunohistochimie et sur la détection des EBER à l'aide d'une sonde ADN spécifique. Le virus EBV est étroitement associé à deux types de cancers chez l'homme : le carcinome du nasopharynx que nous avons pris pour modèle dans notre travail et le lymphome de Burkitt.

Dans cet objectif, une collaboration avec le laboratoire de virologie du CHRU de Lille (Pr Hober) a débuté en 2008. Un travail préliminaire sur une petite cohorte de 10 échantillons et portant uniquement sur les virus HHV6 (Herpès Viridae 6), le Papillomavirus et l'EBV a été réalisé. Les résultats les plus prometteurs ont concernés l'EBV avec une présence de plus de 60% dans les échantillons cancéreux.

#### **2.4.2. Extraction de l'ADN des échantillons ovariens**

Nous avons réalisés des extractions de ADN à partir des échantillons tumoraux ovariens dans les quelles nous avons identifiés les marqueurs par technique de protéomique. Les manipulations de PCR sont faites dans le service de virologie diagnostique du centre de Biopathologie du CHRU de Lille. La recherche de virus est effectuée sur 10 échantillons ovariens : 5 cancers et 5 tumeurs bénignes. Initialement les virus de la famille Herpes Viridae ont été recherchés en deux manipulations distinctes selon les virus. Une PCR quantitative a été réalisée pour HSV et VZV, et une PCR semi quantitative pour CMV, EBV et HHV6.

#### **2.4.3. Validation des premiers résultats en cas de virus positifs dans les échantillons cancéreux**

La recherche de HSV, VZV et CMV par PCR était négative dans les 10 échantillons ovariens.

- Parmi les 5 échantillons de cancers ovariens :
- Un échantillon était positif pour EBV et HHV6
- Un échantillon était positif pour EBV en faible quantité (CT=43,2583)
- Un échantillon était positif pour HHV6
- Les 2 derniers échantillons étaient négatifs pour EBV et HHV6.

Parmi les 5 échantillons de tumeurs bénignes :

- Un échantillon est positif pour EBV et faiblement positif pour HHV6 (CT=39,528)
- Ues 4 autres échantillons sont négatifs pour EBV et HHV6.

Le contrôle d'inhibiteurs est négatif validant les 5 réactions de PCR.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le **Tableau 12**.

Ces premiers résultats ayant été obtenus sur une faible cohorte, ils ont été complétés par

#### 2.4.4. Résultats en virologie

Numéro d'accès	Protéine	Patiene 1	Patiene 2	Patiene 3	Patiene 4	Patiene 5	Virus
Q01014	HELI_SHV21	oui	oui	oui	oui	oui	<b>Herpes</b>
P50809	VE2 HPV36	oui	non	oui	oui	non	<b>Papillomavirus</b>
P24830	VE2 HPV39	non	oui	non	non	oui	<b>Papillomavirus</b>
P24836	VE6 HPV56	non	non	oui	oui	non	<b>Papillomavirus</b>
P03221	UL16_EBV	oui	oui	oui	oui	oui	<b>EBV</b>
Q03245	VN35_ROTHW	non	non	oui	non	non	<b>Rotavirus</b>

**Tableau 12** : Récapitulatif des analyses par Nano LC-IT-MS des peptides de virusidentifiés à partir des biopsies cancéreuses

Le contrôle d'inhibiteurs est négatif validant les 5 réactions de PCR.

La recherche de HSV, VZV et CMV par PCR était négative dans les 10 échantillons ovariens

Parmi les 5 échantillons de cancers ovariens :

- -un échantillon était positif pour EBV et HHV6
- -un échantillon était positif pour EBV en faible quantité (CT=43,2583)
- -un échantillon était positif pour HHV6
- -les 2 derniers échantillons étaient négatifs pour EBV et HHV6.

Parmi les 5 échantillons de tumeurs bénignes :

- un échantillon est positif pour EBV et faiblement positif pour HHV6 (CT=39,528)
- les 4 autres échantillons sont négatifs pour EBV et HHV6.

L'ensemble de ces résultats est résumé dans le **Tableau 13**.

Ces premiers résultats ayant été obtenus sur une faible cohorte, ils doivent être compléter par -une sérologie EBV et HHV6 des patientes positives effectuées sur leurs prélèvements sanguins.

-une recherche par PCR des virus EBV et HHV6 sur les extraits d'ARN de lignées cellulaires ovariennes cancéreuses SKOV3.

	<b>Patientes</b>	<b>diagnostic anatomo-pathologique</b>	<b>HSV</b>	<b>VZV</b>	<b>CMV</b>	<b>EBV</b>	<b>HHV6</b>
<b>cancers ovariens n=5</b>	1	Adénocarcinome à cellules claires	-	-	-		-
	2	adénocarcinome séreux infiltrant	-	-	-	positif	positif
	3	adénocarcinome séromuqueux	-	-	-	-	-
	4	cystadénocarcinome séreux	-	-	-	--	positif
	5	adénocarcinome peu différencié infiltrant	-	-	-	positif	-
<b>tumeurs ovariennes bénignes n=5</b>	6	cystadénome fibreux	-		-	-	-
	7	kyste séreux	-	-	-	Faible positif	-
	8	kyste séreux	-	-	-	Faible positif	Faible positif
	9	corps jaune hémorragique	-	-	-	-	-
	10	cystadénome fibreux	-	-	-	-	-

**Tableau 13** : Récapitulatif des résultats des PCR pour la famille des Herpès Viridae sur 10 échantillons ovariens

#### 2.4.5. Une tolérance immunitaire du cancer ?

Dans la logique de cette hypothèse, la possibilité d'une étiologie virale a été envisagée. Toutefois, en raison du faible nombre d'échantillons ovariens analysés, il ne peut s'agir pour l'instant que d'une étude préliminaire mais les premiers résultats montrent la présence de

virus EBV et HHV6 dans les échantillons cancéreux de façon plus importante que dans les échantillons bénins.

L'EBV nous intéresse particulièrement dans la mesure où nous étudions les tumeurs épithéliales de l'ovaire [226] et d'autre part étant donné son action connue dans le mécanisme de Cancérogenèse du lymphome de Burkitt.

Cependant, le HHV-6 peut également contribuer à un cancer des détours par la suppression immunitaire. Le HHV-6 peut infecter directement les lymphocytes CD4<sup>+</sup> et induire l'apoptose. Le HHV-6 peut aussi infecter les cellules épithéliales thymiques, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules tueuses naturelles, qui sont essentielles pour la maturation immunitaire et la protection contre le cancer et les infections virales. [227]. Les cellules transfectées par le HHV-6 peuvent provoquer des tumeurs [228]. L'EBV et les herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi-(KSHV ou HHV-6) sont oncogènes. Ces deux virus ayant un mécanisme d'action épigénétique, un mécanisme par infection virale de la patiente à l'origine de la Cancérogenèse semble plus logique. L'absence de ces virus dans les lignées de cultures cellulaires est cohérente avec cette hypothèse d'infection virale, ces deux virus ne pouvant s'intégrer dans le génome des cellules infectées.

#### **2.4.6. Conclusion et perspectives**

Nos premiers résultats montrent la présence d'EBV et de HHV6 au sein des tissus cancéreux des patientes et rien au niveau des tissus bénins. Le virus EBV est un virus ubiquitaire du groupe herpès humain. Il infecte les cellules lymphoïdes et les cellules épithéliales. Les propriétés biologiques particulières de l'EBV sont à l'origine de la variété des pathologies associées à ce virus. De récentes études ont confirmé l'association de EBV et des virus de types Herpes dans des pathologies de type cancer et l'inhibition de la réponse immunitaire par attaque au niveau du complexe ubiquitine et protéasome [229] comme nous l'avons trouvé pour l'activateur de l'immunoprotéasome Reg-alpha.

La validation de ces résultats sur de cohorte plus importantes et la recherche des oncoprotéines virales dans le plasma des patients est en cours au sein de l'unité.

## 2.5. Analyse dans les fluides

En cancérologie de l'ovaire, il est possible d'explorer le protéome tumoral et le protéome circulant qui est plus facile à accéder. L'exploration du protéome tumoral se fait directement sur la tumeur (biopsie ovarienne) (**Chapitre 2.1**). Elle vise à mieux classer les tumeurs en établissant des profils d'expression protéiques ayant une valeur pronostique et à comprendre la maladie dans sa globalité ou pour son traitement par anticorps cytotoxiques. L'exploration du protéome circulant est plutôt dédiée à la recherche de nouveaux marqueurs circulants caractéristiques d'un type de cancer. Les marqueurs circulants offrent en théorie la possibilité de détecter un cancer par l'examen d'un fluide biologique comme le sang, le liquide d'ascite, le lavage péritonéal, LCR, les urines, ect... Ils sont soit dérivés de protéines secrétées ou libérées par les cellules cancéreuses dans la circulation sanguine, soit traduisent au niveau sanguin des modifications engendrées par la présence d'une tumeur dans un organe. L'exploration du protéome circulant de cancer de l'ovaire par des techniques protéomiques, devrait engendrer la découverte de nouveaux marqueurs circulants permettant le diagnostic précoce, l'évaluation du pronostic et la surveillance des cancers ovariens.

L'hypothèse proposée pour cette étude est de vérifier la présence du fragment de la protéine Reg alpha dans les fluides biologiques (liquide d'ascite et liquide péritonéal) des patientes de cancer de l'ovaire pour différents états pathologiques.

Pour commencer, nous avons réalisé un immuno dot-blot, technique inspiré de la technique du western blot. Mais, contrairement à cette dernière, les protéines ne sont pas transférées d'un gel d'acrylamide sur une membrane de nitrocellulose, mais sont directement appliqués sur des bandelettes sous forme de spots pour former des « dots ». La fixation est rapide, voir instantanée, ce qui réduit le risque de dénaturation des antigénés. Cette technique a été développée au laboratoire. La lecture des résultats par simple appréciation visuelle de la coloration fournit des résultats semi quantitatifs si l'en tient compte de l'intensité de la coloration.

La reconnaissance d'un antigène spécifique (la protéine Reg-alpha) par un anticorps (Ac Anti Reg Alpha N-terminal et C-terminal) primaire, se traduit par la formation d'un complexe mis en évidence par un anticorps secondaire sans purification ni séparation des différentes protéines du milieu.

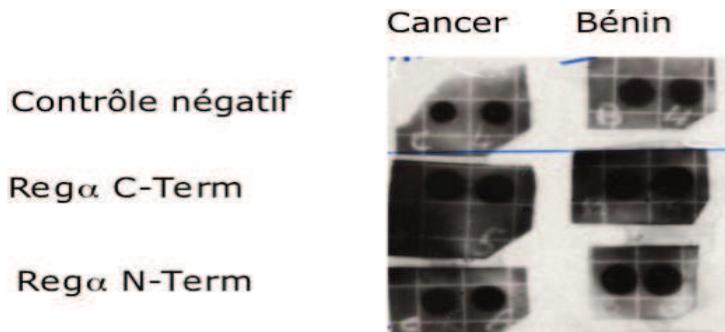
Cependant, une des difficultés majeures a été la mise au point d'une technique de purification protéique, étant donné que l'ascite contient beaucoup de protéines majoritaires, dont les protéines de l'inflammation et les immunoglobulines. Pour ne pas perdre trop d'échantillons, nous n'avons testé initialement qu'un seul échantillon d'ascite bénigne et qu'un seul échantillon d'ascite maligne.

Les peptides sont extraits en milieu acide à l'acide chlorhydrique 1M puis purifiés sur une cartouche contenant des billes de silice greffées en phase inverse par des chaînes alkyles en C18 (Sep-Pak® C18 1g). Après conditionnement de la cartouche, la solution extraite est passée sur celle-là permettant la rétention des molécules d'intérêt sur la phase contrairement aux autres familles de composés qui ne sont pas retenues. La cartouche est ensuite rincée puis les composés élusés en différentes fractions par ajout de solutions d'AcN:H<sub>2</sub>O respectivement à 10, 60 et 80% d'AcN. Les 3 fractions d'élution ainsi obtenues sont par la suite lyophilisées par centrifugation sous vide.

Dans une seconde étape, la fraction AcN 60% (fraction la plus riche) est soumise à repurification sur colonne (Microcon®) permettant de réaliser un cut-off en masse à 50 kDa puis 10 kDa. Les fractions 10 et 10-50 kDa sont récupérées et conservées pour analyse.

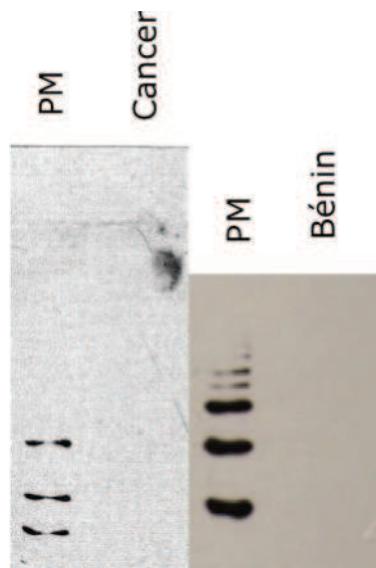
Dans une première étude, des Dot-Blot ont été réalisés. Le Dot-blot est une technique de reconnaissance d'un antigène spécifique (ici Reg-α) par un anticorps primaire, complexe mis en évidence par un anticorps secondaire, sans purification ni séparation des différentes protéines du milieu (à la différence du Western Blot). La révélation est réalisée par chimio-luminescence.

Les premiers résultats obtenus n'étaient pas satisfaisants. En effet, nous avons observé une reconnaissance non spécifique de l'anticorps secondaire vis-à-vis des protéines présentes dans le milieu étudié (**Figure 53**). Ainsi notre contrôle négatif se révélait positif, posant un réel souci d'interprétation des résultats.



**Figure 53 :** Analyse en Dot Blot avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  C-Terminal et l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  N-Terminal

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse en Western Blot (**Figure 54**)



**Figure 54 :** Analyse en Western Blot avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  C-Terminal

La **Figure 54** montre qu'aucune protéine n'est reconnue par l'anticorps puisqu'aucune bande n'est visible sur le Western Blot des échantillons bénins et cancéreux. Ces résultats ont soulevé diverses interrogations. L'absence de mise en évidence de Reg- $\alpha$  nous a conduit à supposer que cette protéine était peut-être éliminée par les étapes de purification. Nous avons répété les Western Blot sans les techniques de purification préalables. Cependant, les résultats se sont encore révélés négatifs. Nous avons alors supposé que la présence de protéines très majoritaires rendait difficile la détection de Reg- $\alpha$  présente en plus faible quantité. Afin de réaliser une approche plus performante en éliminant les protéines majoritaires (en particulier les immunoglobulines) du liquide d'une part, et en concentrant la protéine d'intérêt (Reg- $\alpha$ ) d'autre part, nous avons utilisé une technique d'immunoprécipitation[231]. Cette technique

permet la précipitation d'un antigène en solution par un anticorps qui agglutine spécifiquement une protéine particulière. Elle permet d'isoler et de concentrer une protéine précise parmi des milliers d'autres

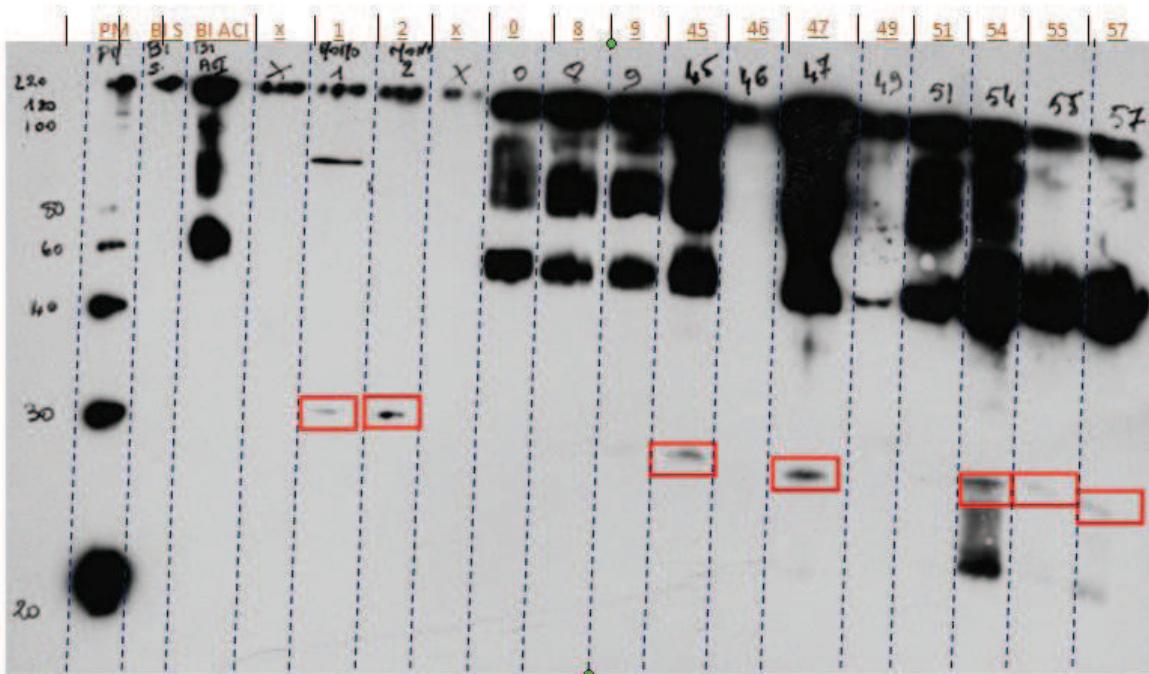
Pour cette étude, nous avons utilisé 18 échantillons (9 échantillons d'ascites malignes et 9 liquides péritonéaux bénins) dont les types anatomopathologiques sont détaillés dans le **Tableau 14.**

Liquide péritonéal (bénin)	Liquide d'ascite (malin)
B0 Cystadénofibrome	C1 Adénocarcinome à cellules claires
B45 Cystadénome séreux bénin	C2 Carcinome peu différencié
B47 Tératome mature bénin	C5 Adénocarcinome séreux
B51 Cystadénome séreux	C6 Adénocarcinome séreux
B52 Ovaire sain	C7 Adénocarcinome peu différencié
B53 Ovaire sain	C8 Carcinome peu différencié
B54 Cystadénome mucineux	C9 Carcinome intra-épithérial
B55 Cystadénofibrome	C48 Adénocarcinome infiltrant à cellules claires
B57 Endométriose	C49 Adénocarcinome infiltrant peu différencié

**Tableau 14 :** Types anatomopathologiques des tissus ovariens correspondant au liquides biologiques analysées en Western Blot

### 2.5.1. Analyse par Western Blot

La protéine Reg- $\alpha$  intacte présente une masse moléculaire d'environ 28 kDa alors que le fragment clivé présente une masse de 9744 Da. Dans une première série, nous avons retrouvé une bande à 28 kDa (protéine entière) dans 7 échantillons sur 10 : dans 2 ascites malins sur 3 et dans 5 ascites bénin sur 7 (**figure 55**). Il faut noter que la protéine Reg-alpha est reconnue sous sa forme entière. Ces westerns ne nous ont pas permis de détecter le fragment de 9744 Da repéré lors des analyses directes MALDI. Cette absence est probablement due à la migration plus délicate dans cette gamme de masse qui ne nous permet pas de visualiser ce composé sur le gel (en conditions dénaturantes). Il est aussi possible que la sensibilité de cette technique ne soit pas suffisante pour nous permettre de l'observer ou tout simplement que l'anticorps ne reconnaissse pas la partie clivée.



**Figure 55 :** Analyse en Western Blot avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  C-Terminal

De gauche à droite :

#### Contrôles

PM : Poids moléculaires contrôles

BI S : Protéines A/G seules

BI ACI : Protéines A/G + anticorps primaire

#### Dépôts

X, 46, 49 : Puits vides

1 : Extraction protéique totale Tris HCl/Na

Cl/Sodium Azide sur coupe de tissu malin

2 : Extraction ACN 50% et Acide formique 0.5% sur coupe de tissu malin

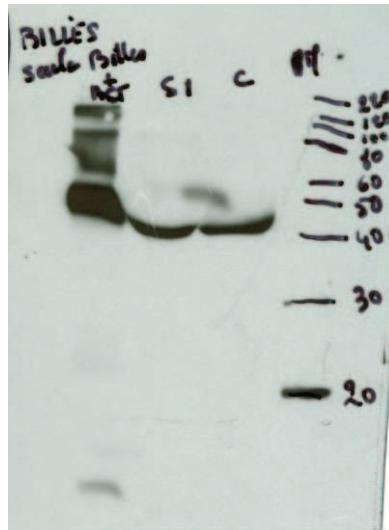
0 à 57 : Ascites traitées par immunoprécipitation sauf 46 et 49

8 et 9 : ascites malignes

0, 45, 47, 51, 54, 55 et 57 : ascites bénignes

#### Validation des analyses de Western Blot : Réactions Croisées

Puisque l'anticorps secondaire reconnaissait de manière non spécifique des protéines présentes dans le milieu étudié, lors de l'analyse en Dot Blot (**Figure 53**), il nous fallait éliminer l'existence de cette même réaction croisée avec la technique de Western Blot et réaliser un témoin négatif. Nous avons donc réalisé le même Western Blot sans anticorps primaire (**Figure 56**). Comme en témoigne la Figure 13 aucune réaction croisée de l'anticorps secondaire avec d'autres protéines de l'ascite traitée par immunoprécipitation n'est observée (**Figure 56**).



**Figure 56 :** Analyse en Western Blot sans l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  C-Terminal et révélation avec l'anticorps secondaire seul

Billes seules : Protéines A/G seules

Billes +ACI : Protéines A/G + anticorps primaire

S1 : Premier surnageant de l'immunoprécipitation de l'ascite maligne 49

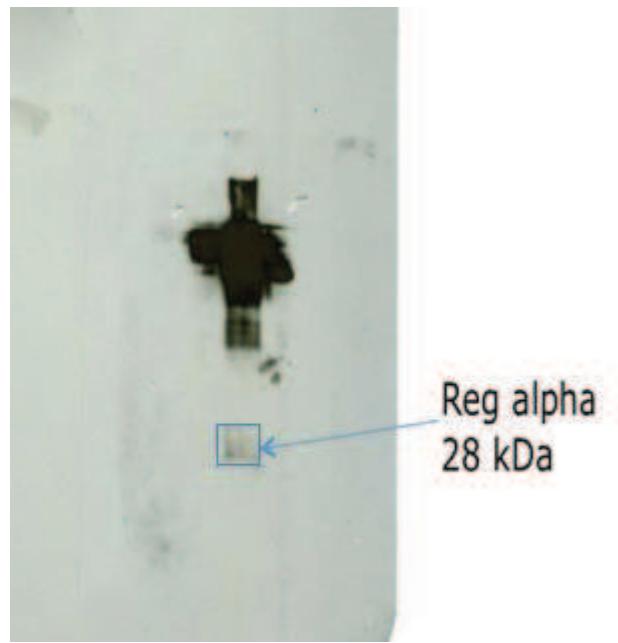
C : Culot de l'immunoprécipitation de l'ascite maligne 49

PM : Poids moléculaires

#### Validation de la technique d'immunoprécipitation

Pour confirmer les résultats obtenus, nous avons réalisé un témoin positif à partir d'extraits de tissus. Une extraction AcN/Acide formique a été réalisée à partir d'un tissu malin puis le produit d'extraction a été analysé en parallèle par MALDI (**Figure 46**).

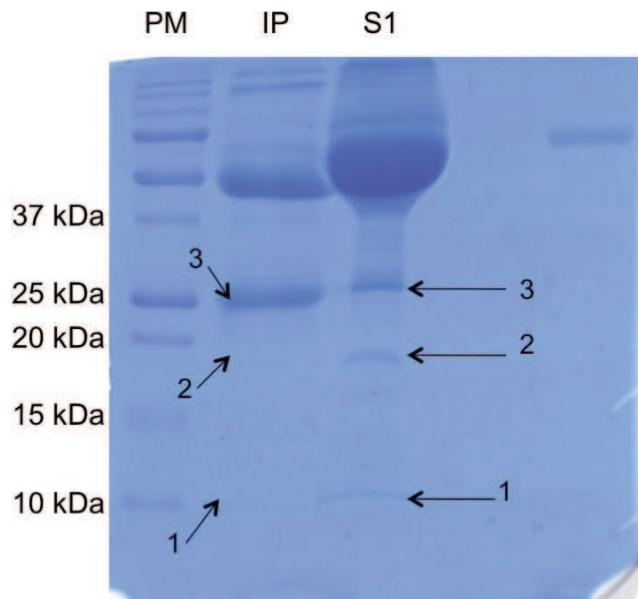
Sur le Western-Blot, une bande à 28 kDa est observée avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  (**Figure 55, échantillon 2**). Ces deux résultats par deux techniques complémentaires signent la présence de Reg- $\alpha$  dans le tissu considéré. Ce même produit d'extraction est ensuite immunoprécipité pour se placer dans les mêmes conditions que les échantillons d'ascite puis analysé par Western Blot (**Figure 57**). Dans ces conditions, le Western Blot présente une bande aux alentours de 28 kDa avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  (**Figure 57**). Ceci permet de confirmer que la technique d'immunoprécipitation utilisée n'élimine pas la protéine d'intérêt et qu'il n'y a pas de faux positif.



**Figure 57** : Analyse en Western Blot avec l'anticorps anti-Reg- $\alpha$  C-Terminal

### 2.5.2. Analyse par MALDI des bandes du gel de migration après digestion trypsique

Sur un gel de migration par électrophorèse d'une immunoprécipitation d'un ascite malin (49), réalisé selon les mêmes conditions que celles pour le Western Blot, puis coloré par le bleu de Coomassie, nous avons réalisé l'analyse MALDI des bandes marquées par le bleu de Coomassie (1, 2 et 3) (**figure 58**). Nous avons émis l'hypothèse que la bande migrant aux alentours de 9 kDa peut contenir Reg-alpha sous sa forme tronquée (9744), forme que nous ne pouvions pas mettre en évidence en Western Blot car le fragment C-Terminal (de m/z 9744 en spectrométrie de masse) n'est pas reconnu ainsi que l'épitope est dénaturé par le gel en conditions dénaturantes ainsi les difficultés de détection dans cette zone du gel.



**Figure 58 :** Gel de migration par électrophorèse après coloration au bleu de Coomassie

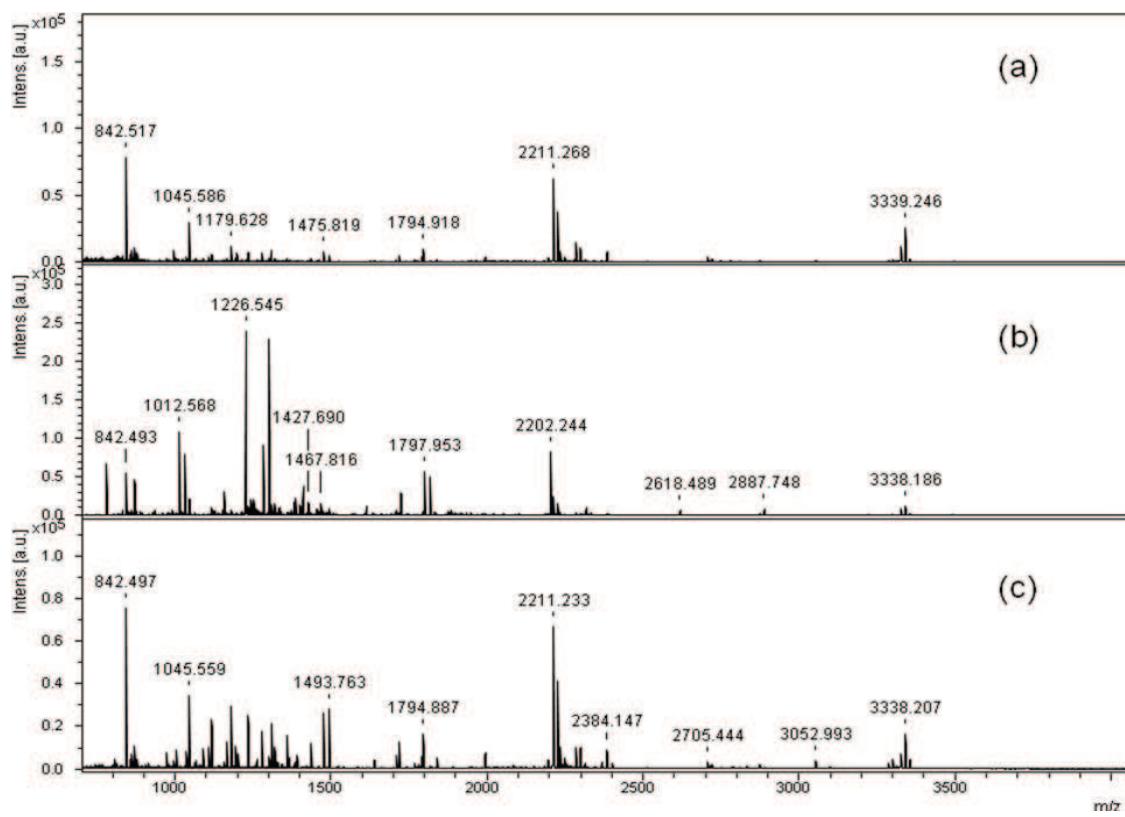
PM : Poids moléculaires

IP : Ascite maligne (49) traitée par immunoprécipitation

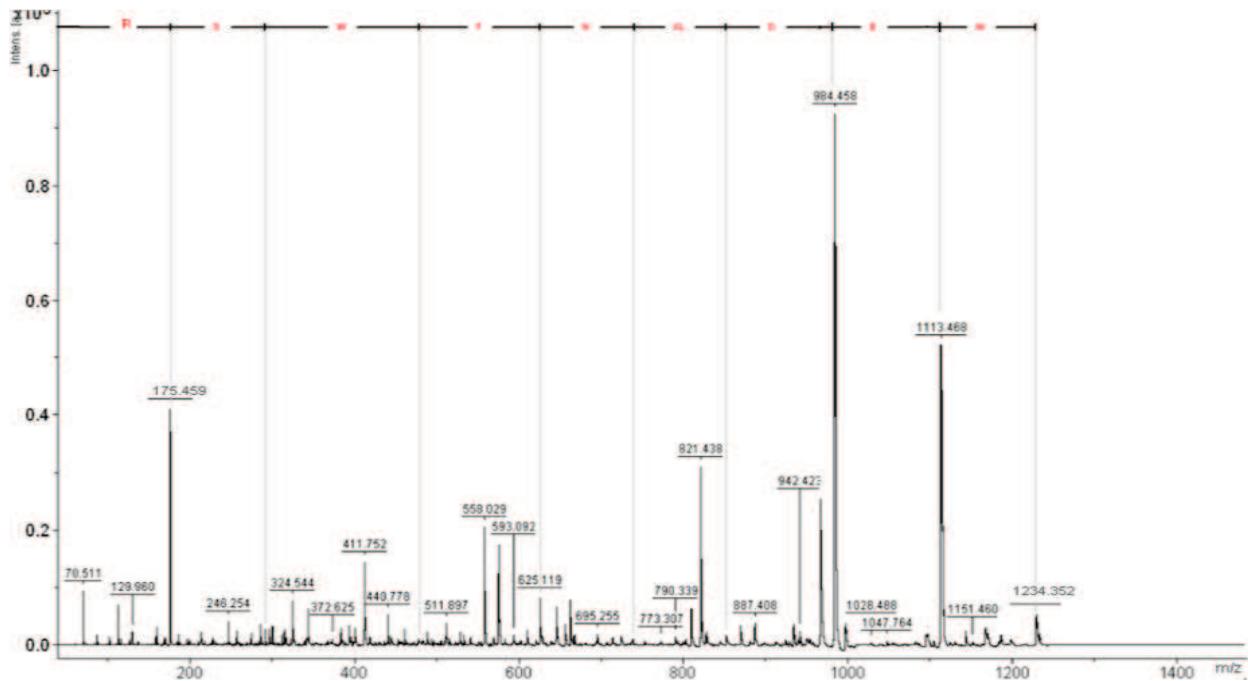
S1 : Premier surnageant de l'immunoprécipitation de l'ascite maligne (49)

Les résultats de l'analyse MALDI montrent les profils de différentes fractions de digestion par la trypsine (1, 2, 3) avec des ions communs entre la bande de 19000 et 29000 (**Figure 59**). Les analyses MS/MS sont en cours.

L'analyse en mode MS/MS d'un des fragments de digestion trypsique de la protéine de 29000 Da de masse m/z 1234 Da a confirmé que celui-ci appartient à l'immunoprotéasome (**figure 60**). La séquence interrogée en banque de donnée est la suivante **RDWFNI/LDFM**. Les études sont en cours pour les autres fragments afin de permettre de corrélérer les 3 protéines entre elles et de confirmer leur identification.



**Figure 59 :** Spectres de masse obtenus à partir des bandes du gel SDS-PAGE: 9000 (a) 19000 (b) et 28000 (c) après extraction et digestion trypsique pour un échantillon malin, enregistrés en mode linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA



**Figure 60 :** Spectre en mode MS/MS de l'ion 1234 après digestion trypsique de la fraction (3) matrice HCCA

### **2.5.3. Conclusion**

L'exploration du protéome circulant du cancer de l'ovaire (liquide d'ascite et liquide péritonéal) à travers des approches d'analyse protéomique nécessite encore beaucoup de développements techniques (séparation des protéines, analyse des modifications post traductionnelles, identifications des biomarqueurs tumorales et analyse à haut débit). En effet, on parvient à trouver des profils protéiques différents. Toutefois, il demeure essentiel d'établir un rapport avec les mécanismes physiopathologiques du processus tumoral. Les limites technologiques et les défis analytiques sont encore élevés et des progrès importants s'imposent pour établir la complémentarité entre protéomique d'expression et protéomique d'interaction.

## **2.6. Conclusion et perspectives**

L'ensemble de ces résultats suggère donc que le fragment c-terminal de l'immunoprotéasome 11 S est un biomarqueur de cancer de l'ovaire, avec une prévalence de plus de 80%. Le protéasome est responsable de la dégradation de nombreuses protéines incluant les protéines ayant de mauvaises conformations, les protéines virales et les protéines mutées. Nous avons mis en évidence l'existence d'un lien entre l'inhibition de la réponse immunitaire et le développement du cancer au travers les biomarqueurs que nous avons identifiés. La cellule cancéreuse semble opérer comme un parasite en inhibant la réponse immune de l'hôte aux travers la stimulation de cytokine inhibitrice de type IL-10, en inhibant la production d'IL-2 et provoquant la tolérance immunitaire par l'inhibition de la présentation du soi. Cet axe doit également être en lien avec une infection virale qui reste à reconfirmer du point de vue moléculaire pour une large gamme d'échantillon. Nous avons pu mettre en évidence qu'un grand nombre des biomarqueurs identifiés par MS consistent en des protéines clivées qui peuvent être liées à une infection virale ou une surexpression d'enzyme protéolytique. Dans ce contexte, nous avons recherché la présence de protéines de la famille des pro-hormones convertases et avons confirmé la surexpression d'un certain nombre dont la furine. Or, la furine est connue pour être impliquée dans l'édification des protéines virales de type EBV. On peut donc suggérer une étiologie virale avec une inhibition de la réponse immunitaire. Dans ce contexte, si cela s'avère nous aurions donc une cible thérapeutique.

Durant ces dernières années, le domaine de l'analyse des protéines par spectrométrie de masse s'est élargi rapidement en intégrant des nombreuses innovations technologiques. Toutefois, beaucoup d'avancées méthodologiques, instrumentales et bioinformatiques sont encore nécessaires pour être en mesure de caractériser toutes les protéines contenues dans des échantillons complexes. Mon travail de thèse a permis d'améliorer la préparation d'échantillons. Appliquées à des problématiques biologiques, ces avancées ont permis une utilisation plus fine et plus fiable de la MS en protéomique. Cela est particulièrement vrai en ce qui concerne les approches de comparaison du contenu protéique d'échantillons biologiques complexes tel que le cancer de l'ovaire. Une telle approche nous a permis de découvrir un panel de 14 biomarqueurs de cancer de l'ovaire.

D'une manière générale, il me semble important de garder à l'esprit que l'analyse protéomique par spectrométrie de masse est une discipline relativement jeune et en plein essor. Nous avons tenté dans l'introduction bibliographique et tout au long de la présentation des résultats de ce travail de thèse, de mettre en lumière les tendances actuelles dans l'évolution de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse.

Trois axes de développement nous semblent particulièrement importants :

- De nouveaux instruments, toujours plus sensibles, résolutifs et aux vitesses d'acquisition accrues sont constamment développés. Les techniques de séparation de peptides et de protéines gagnent en résolution, en robustesse et sont capables de séparer des mélanges toujours plus complexes.
- Parallèlement, les stratégies d'identification, de caractérisation et de quantification des protéines gagnent en maturité. Tout particulièrement ces dernières années, la prise de conscience de la nécessité d'évaluer systématiquement la confiance des résultats d'identification de protéines en analyse protéomique s'est installée.
- Les outils bioinformatiques de validation, d'évaluation et partage des informations jouent alors un rôle de plus en plus déterminant dans la formalisation et la régulation des résultats produits en analyse protéomique par spectrométrie de masse.

De nombreux défis restent toutefois en suspens en ce qui concerne la caractérisation qualitative et quantitative de protéomes. La multitude et la diversité des modifications post-traductionnelles possibles ajoutent un degré de complexité difficile à maîtriser et nécessitent des technologies et stratégies analytiques encore meilleures. Il reste qu'un des plus gros défis de l'analyse protéomique par spectrométrie de masse réside dans l'utilisation de l'information générée : son maniement, sa validation et son partage ne sont toujours pas parfaitement établis.

Received: 2010.03.24  
Accepted: 2010.04.12  
Published: 2010.08.01

BR

## MALDI imaging mass spectrometry in ovarian cancer for tracking, identifying, and validating biomarkers

**Mohamed El Ayed**\*<sup>1,2BCD</sup>, **David Bonnel**\*<sup>1,3BCD</sup>, **Remi Longuespée**<sup>1,3BF</sup>,  
**Céline Castellier**<sup>1,4B</sup>, **Julien Franck**<sup>1BD</sup>, **Daniele Vergara**<sup>1B</sup>, **Annie Desmons**<sup>1B</sup>,  
**Aurélie Tasiemski**<sup>1B</sup>, **Abderraouf Kenani**<sup>2EF</sup>, **Denis Vinatier**<sup>4AG</sup>, **Robert Day**<sup>3EG</sup>,  
**Isabelle Fournier**<sup>1ADEFG</sup>, **Michel Salzet**<sup>1ADEFG</sup>

\* join first authors

<sup>1</sup> Université Nord de France, CNRS, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, Université Lille 1, Lille, France

<sup>2</sup> Laboratoire de Biochimie – Unité de Recherches “Mécanismes Moléculaires et Pathologies”, Faculté de Médecine de Monastir, Monastir, Tunisie

<sup>3</sup> Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

<sup>4</sup> Clinique de Gynécologie, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille, Lille, France

**Source of support:** 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), Région Nord-Pas de Calais (to DB & RL), Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ to RD)

### Summary

#### Background:

Among biomarkers, cancer-antigen 125 (CA-125) is the most studied. We propose an analytical tool to track ovarian carcinoma biomarkers, that is, the MALDI mass spectrometry imaging.

#### Material/Methods:

Ovarian carcinomas and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. After automatic profiling and mass spectrometry imaging analyses, hierarchical clustering based on principal component analysis in nonsupervised mode was carried out. On the same samples, preparations were performed to investigate peptides, then proteins, followed by high mass proteins, in an automatic profiling to specific signatures for diagnosis. Using tissue bottom-up strategy on tissue digestion, and mass spectrometry imaging after by shotgun sequencing by nanano-LC-IT-MS in MS/MS mode from washing samples from on tissue digested peptides, several biomarkers were found.

#### Results:

A list of specific biomarkers from the ovarian carcinoma regions was obtained and classified as proteins associated with cell proliferation, involved in immune response modulation, signaling to the cytoskeleton, and tumor progression. These specific biomarkers were then validated by immuno-cytochemistry using Tag-mass technology, cell biology, Western blot, and by PCR (using SKOV-3 ovarian epithelial cancer cells). A link between the immune regulation (innate immunity, tolerance) and virus cause is also discussed.

#### Conclusions:

From the biomarkers identified, proteins involved in immune response modulation and cell proliferation have been pointed out in this study. Two new markers have been identified using such a strategy, that is, fragment C-terminal of the PSME1 (Reg-Alpha) and mucin-9.

#### key words:

**MALDI imaging • pathologies • innate immunity • proteomics • PCA • hierarchical clustering**

#### Full-text PDF:

<http://www.medscimonit.com/fulltxt.php?ICID=881095>

#### Word count:

5539

#### Tables:

4

#### Figures:

7

#### References:

76

#### Author's address:

Michel Salzet, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, FRE CNRS 3249, 59650 Villeneuve d'Ascq, France, e-mail: michel.salzet@univ-lille1.fr



## BACKGROUND

Ovarian cancer is the fourth leading cause of cancer death among women in Europe and the United States. Among biomarkers, cancer-antigen 125 (CA-125) is the most studied. CA-125 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 situations [1]. 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 use a proteomic strategy for diagnosis [2–10].

At this time, 2 strategies have been undertaken by researchers. Several, 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 classic 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 profiling and imaging. Ovarian carcinomas (stages III and IV) and benign ovaries were directly analyzed by MALDI-TOF-MS. Hierarchical clustering based on principal component analysis (PCA) was carried out using ClinProTools software to classify tissues. Principal component analysis was used in the unsupervised mode to differentiate tumorous and healthy spectra based on their proteomic composition as determined by MALDI-MSI. Two stage IV tumor regions as well as 2 healthy regions were identified. To validate the procedure, 2 biomarkers identified in the 2 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 (SKOV3). The first biomarker was identified as a fragment of the immunoproteasome Reg-Alpha [20], 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 identifying specific biomarkers in various types of tumors.

## MATERIAL AND METHODS

### Materials

$\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 3-acetylpyridine (3AP), 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol (HFIP) ammonium bicarbonate ( $\text{NH}_4\text{CO}_3$ ), tris base, xylene, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acetonitrile (AcN), 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 (CCPPRB M 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 sex, 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  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Typically, 10- to 12- $\mu\text{m}$  thick sections were cut using a cryostat and thaw-mounted on flat, electrically conductive sample slices. Histopathologic diagnoses were made by an anatomopathology blinded to the original clinical diagnosis from subsequent H&E-stained sections.

### Tissue preparation

Frozen ovary sections were 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  $37^{\circ}\text{C}$  for 20 seconds to adhere to slides and placed under a vacuum for 10 minutes. They were then rinsed in chloroform and analyzed in MALDI ms for MALDI imaging analyses [23].

### MALDI Imaging and Specific MALDI Imaging

#### Automated tissue profiling

For automated profiling assays, markers of 3 mass ranges were screened for each section. After the tissue treatment, 10  $\mu\text{L}$  of HCCA 10 mg/mL in ACN/TFA 0.1% 7:3 were dropped to perform the analysis of peptides. The laser settings for these analyses were power 40%, offset 65%, range 20%, small focus, and 150 ns of pulsed ion extraction. A methanol 100% wash was then used to remove the matrix, and 10  $\mu\text{L}$  per section of SA 20 mg/mL in AcN/TFA 0.1% were dropped to perform the analysis on the proteins mass range. The laser settings were power 45%, offset 65%, range 20% small focus, and 150 ns of pulsed ion extraction. Ten  $\mu\text{L}$  of SA 10 mg/mL in HFIP 100%, then 10  $\mu\text{L}$  of SA 20 mg/mL in ACN/TFA 0.1% 7:3 were then dropped to perform the analysis on high-mass proteins after their extraction from the tissue section [24]. For each analysis, 1000 shots were accumulated for 50 spectra per tissue section.

#### MALDI Imaging

A solid ionic matrix (sinapinic acid SA/3AP) was prepared just before use and was deposited using a Chemical Inkjet Printing CHIP-1000 device (Shimadzu, Kyoto, Japan) after a raster of spots spaced by 250  $\mu\text{m}$  center to center. Briefly, 4.8  $\mu\text{L}$  (1 equivalent) of 3AP was added to a solution containing 10 mg/mL of SA in ACN/aqueous TFA 0.1% (6/4, v: v). The solution was agitated for several minutes before use. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Twenty iterations were necessary to reach the total final volume of 10 nL. 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 Hz [25] and controlled by FlexControl 2.5 software (Bruker Daltonics). 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) software.

### Specific MALDI Imaging

For specific MALDI imaging studies, ovary sections were incubated at room temperature with 500  $\mu$ L buffer (0.1 M PBS/ 1% BSA / 1% normal goat serum / 0.05% triton  $\times$ 100) 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 3 washes in PBS, sections were incubated overnight with anti-Human IgG photocleavable tagged rabbit antibody (1/100) (Eurogentec) at 4°C [28,29]. The tissues were then rinsed 3 times for 5 minutes with ultrapure 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 polyclonal 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).

### Automatic trypsin digestions

The printed array of the CHIP-1000 on the tissue section was composed of spots spaced by 250  $\mu$ m center-to-center. A total of 40 nL of solution containing 25  $\mu$ 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.

### 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 first electrode; 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 Biotools 3.0 software (Bruker Daltonics) 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 2 missed cleavages were settled. The mass tolerance was set at 1 and 0.5 Da for the MS and MS/MS.

### Bottom-up analyses

#### 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 minutes at 4°C, the supernatants were loaded on Sep-Pak C18 cartridges (500  $\mu$ L extract/cartridge; Waters). After washing with 5 mL acidified water (0.05% TFA, Pierce), samples were eluted with 5 mL 60% AcN in acidified water (0.05% TFA). Sixty percent of the eluted fraction was reduced in a vacuum centrifuge (Savant). This fraction was resuspended in 100  $\mu$ L acidified water (0.05% TFA) and fractionated on a C18 reversed-phase HPLC column (4.6 mm  $\times$  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  $\mu$ L/min. Each fraction was collected manually before being evaporated in a SpeedVac vacuum and resuspended with 50  $\mu$ L 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 minutes in 50  $\mu$ L of protease solution (sequence grade-modified trypsin, Promega, at 0.02 mg/mL in 25 mM ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ). Digestion was performed overnight at 37°C. Peptide extraction was performed twice for 15 minutes 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  $\mu$ L of 0.1% formic acid.

#### For nanoLC-ESI MS samples

Ten patients with grade III and IV ovarian cancer and 10 benign tumors were analyzed.

The cancer tissue sample contains serous cystadenoma, mucinous cystadenoma, and borderlines tissue.

**For nanoLC-ESI MS analysis,** on a section of 2  $\text{cm}^2$ , *in situ* enzymatic digestion is performed by adding 15  $\mu$ L of trypsin enzyme (0.033  $\mu$ g/ $\mu$ L in 25 mM Tris buffer pH 7.4) for 1 hour at room temperature. After enzymatic digestion, purification of resulting digestion peptides was achieved by using reverse phase C<sub>8</sub> coated silica magnetic beads (ClinProts, Bruker Daltonics) according to the protocol of the manufacturer modified for tissues. Then, this, 15  $\mu$ L of binding solution was directly applied onto the tissue during 1 minute, and then 15  $\mu$ L of magnetic bead was added on the section. Extraction occurred for 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  $\mu$ L of H<sub>2</sub>O/TFA 0.1%. Peptides were eluted from the beads with 30  $\mu$ L of ACN/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) and solution was dried by vacuum centrifugation. For the nano LC-MS/MS identification, peptides were redissolved in H<sub>2</sub>O/MEOH 0.1% formic acid (9:1 v/v) after elution and evaporation.



**Table 1.** Forward and reverse primer sequences used in RT-PCR are shown 5' to 3'.

Primer designation	Forward primer	Reverse primer
Orosomucoid	CTGGGAGAGTTCTACGAAGC	CCTCTTCTCTCTCTCT
Actin	AGCGCAAGTACTCCGTGTG	GACTGGGCCATTCTCCTAG
GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCAACCTGTGCTGTA

### Nano LC-nanoESI-IT MS and MS/MS

Analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (Esquire 3000 plus, Bucken Daltonics) equipped with a nano ESI ion source and on-line coupled to a nano HPLC system. An injection of 0.5 µL of digest was made with a Switchos Autosampler (Dionex corporation) and separation was performed on a C18 silica bonded stationary phase (75 µm id, 150 mm long, 3 µm 100 Å pore size, Dionex). Samples were washed for 2 minutes at 10 µL/min with 100% mobile phase A (95% H<sub>2</sub>O, 5% ACN 0.1% formic acid). Peptides were then eluted using a linear gradient of 1%/minute mobile phase B (ACN 80%, H<sub>2</sub>O 20%, formic acid 0.08%) for 70 minutes at a flow rate of 0.2 µL/min. The Esquire was operated in a data-dependent MS/MS mode in which 1 MS full scan was followed by 1 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 oxidation and acetylation of N-terminal were defined as variable modification.

### Statistical data analysis

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 Principal Component Analysis (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. 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.

### RNA isolation and PCR analysis

mRNA from biopsies or the SKOV-3 cell line was extracted in 2 mL tubes pre-filled with Qiazol reagent (Qiagen, France) and 1.4 mm ceramic beads. The mixture was shaken twice for 45 seconds at 6500 rpm in a Precellys 24 homogenizer (Bertin distributed by Ozyme, France). RNA extraction was performed according to the manufacturer's instructions, and the 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 nonamplification and no-template controls. cDNA was treated with RNaseH (Promega, France) to optimize the amplification. For the TLR, Reg-alpha fragment and orosomucoid 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](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Toll Like Receptor (TLR) primer pairs were obtained from Krug et al. [29]. Actin, 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 minutes. All PCR products were subcloned into the pGEM-T easy vector (Promega) and cDNA clones were sequenced with an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems).

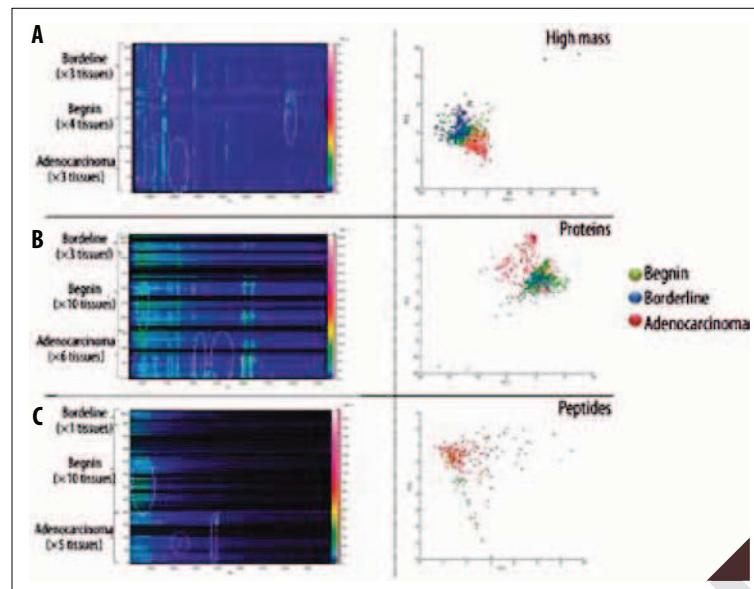
### qPCR analyses for virus detection genes

Epstein-Barr Virus R-gene quantification kit and CMV HHV6,7,8 R-Gene diagnostic kit (CE-IVD labeled) are purchased at Argene and performed on Applied Biosystems 7500 as recommended by the manufacturer.

### 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<sup>-1</sup>) for 24 hours in the absence of serum (B). Control cells were left untreated (A). For confocal microscopy analysis, cells were fixed for 5 minutes 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 minutes incubation at room temperature with phalloidin-TRITC (Sigma). Slices were then mounted in glycerol 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.





**Figure 1.** Automatized MALDI profiling on three ovarian tissues classes: adenocarcinoma, borderline and benign. (A) Pseudogel and supervised PCA loading plot obtained for a high mass procedure. (B) Protein procedure. (C) Peptide procedure.

BR

### 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-polyacrylamide 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 secondary antibodies, immunoblots were visualized with the ECL detection kit (Amersham Biosciences).

## RESULTS

### Automatic profiling and PCA for biomarkers tracking

Automatic profiling was performed on 20 samples (10 benign, 6 carcinoma, 3 borderline) laid on the same slides and submitted to peptides, then small proteins, and finally high mass proteins tracking using 3 in-house methods, 1 after 1 based on classical matrix deposition and solvent treatments [23,24,30–32]. The analyses of a MALDI imaging data set by molecular mass images can be illustrated as a pseudogel (Figure 1). In peptides conditions (with HCCA as a matrix), carcinoma specific signatures can be found for m/z around 3300 and 4800, whereas in a benign larger zones for m/z ranged from 1200 to 2000 can be found. As can be seen, the borderline profile resembles the benign one. The principal component analysis (PCA) analyses confirm the observation (Figure 1). For small proteins (with SA as matrix), 2 signatures can be seen for m/z comprised between 9500 and 14 000 and 1 around 17 500 in carcinoma samples.

It is difficult to discriminate between borderline and benign profiles except for a specific signature at m/z, ranging between 4900 and 5200 which is, specifically detected in benign samples, and is absent in both carcinoma and borderline profiles (Figure 1). In high-mass proteins, a specific zone comprised between m/z 23 000 and 25 000 in carcinoma whereas in benign and borderline profiles a zone between

m/z 65 000 and 68 000 is detected (Figure 1). Principal component analyses (PCA) confirmed the eyes detected zones but 2 others are detected through statistics in carcinoma; that is, 1 around m/z 9000 and 12 000; 1 between m/z 23 000 and 24 000, and the last 1 around m/z 35 000–37 000 (Figure 1). In a borderline profile PCA analyses detected a zone between m/z 5300 and 5000 and in begin a cross-zone with the malignant 1 at m/z 10 000 and 11 000 (Figure 1).

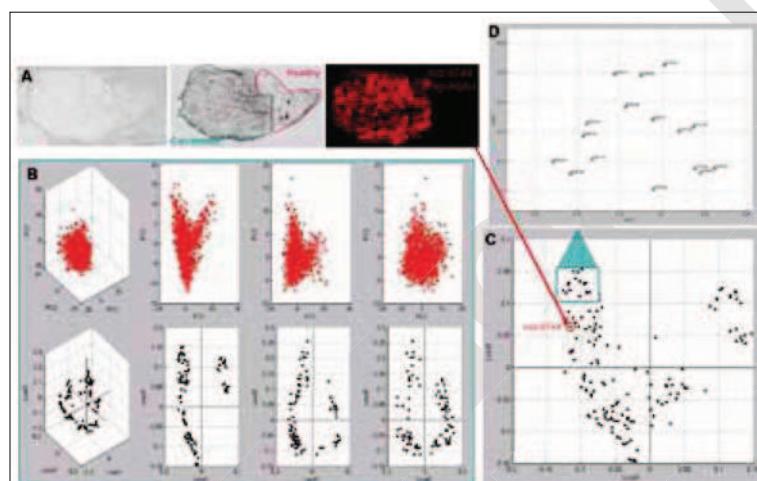
All together, the data shows that it is necessary to perform on same samples the 3 procedures, helped with PCA analyses to have a clear overview of different classes of biomolecules present in the samples and to drive the biomarker hunting. In this context, as it can be seen in Figure 1B, a classic procedure using SA as matrix for peptides and small proteins did not allow one to detect high-mass proteins, only polar ones can be obtained. Thus, the HFIP procedure [24] was applied, and the number of peaks detected in the m/z 20 000 to 50 000 range was clearly increased (Figure 1A). Interestingly, several of these peaks are consistent with previously identified biomarkers using classic 2D proteomic procedures (Table 2), suggesting that the chemical treatments could enable known biomarkers to be recorded directly from tumor regions in tissue biopsies. These show that MSI can be more complementary to the classic proteomic for biomarker tracking.

### MALDI Imaging Mass Spectrometry and Principal Component Analyses for biomarkers tracking

MALDI imaging mass spectrometry analyses were performed on carcinomas tissues (stage III or IV) followed by PCA analyses using SA/3AP as matrix (Figure 2A). Unsupervised PCA was used to attempt to identify hidden variables between spectra taken from various regions of ovarian biopsy (Figure 2B). Figure 2B shows the score plots for unsupervised PCA. Plot PC1/PC2 shows the best separation, and 2 groups can be separated; that is, tumor versus healthy regions, which is in line with the histologic data (Figure 2C). A zoom of the most-separated ions from the PC1/PC2 plot is presented in Figure 2D, and a group of

**Table 2.** Molecular masses of known ovarian cancer protein biomarkers and masses found by MALDI MSI after using the HFIP high-mass protein preparation procedure compared to molecular masses of previously identified ovarian cancer markers.

Protein Name	Mw (Da) MALDI MSI with high mass procedure	Mw (Da) Protein previously identified in OVC	References
Tetranectin (CAA45860)	17 775	17 776	[67–70]
Neutropil Gelatinase-associated lipocalin precursor	22 576	22 571	[71]
Plasma retinol-binding protein precursor	22 986	22 990	[72]
Metalloproteinase inhibitor 1 precursor	23 152	23 153	[73]
Kallikrein 5 Precursor	26 842	26 838	[74]
Isoform 1 of Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	36 940	36 949	[75,76]

**Figure 2.** MALDI MSI analyses of a mucinous adenocarcinoma stage IV. (A) mucinous ovarian carcinoma section containing tumor and healthy parts submitted to automatic matrix deposition using a micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu). Location of the C-terminal part of Reg-alpha ( $m/z$  9744) biomarker confirming the location 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. Location 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.

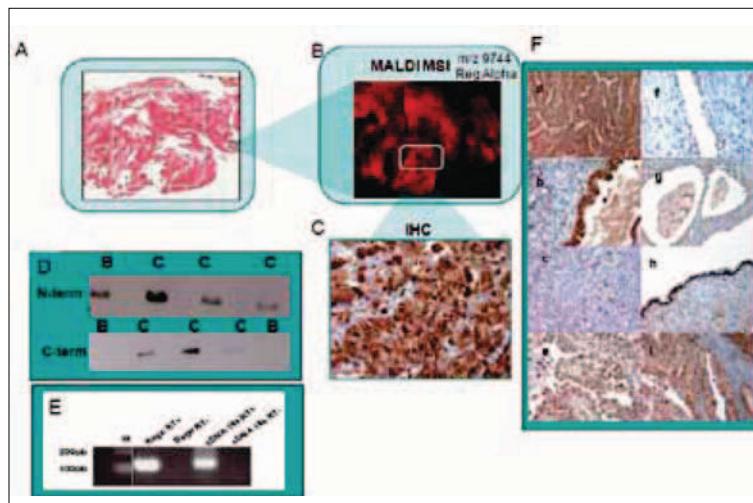
specific biomarkers was detected. Their locations in the tumor region are presented in Frank et al. (2009) [33]. From the PCA results, we detected a fragment of the (PSME 1: Proteasome activator complex subunit 1, named the Reg alpha fragment), previously identified [20], is present in the cancer group with other biomarkers and not present in healthy tissue.

#### Biomarker identification

From the list of biomarkers detected by PCA analyses, we detect the ion at  $m/z$  of 9744, which corresponds to the fragment C-terminal of Reg alpha [20]. We validate it here through MSI (Figures 2A, 3A,B), immunocytochemistry (Figure 3C,F), Western blot (Figure 3D), and molecular biology (Figure 3E) confirmed its specificity to ovarian carcinoma. Ion at  $m/z$  of 9744 corresponding to the C-terminal part of PSME1 is detected in the carcinoma area by MSI (Figure 3A,B), which is confirmed by immunocytochemistry, with an antibody raised against the C-terminal part of the protein (Figure 3C). Western blot analyses of benign and carcinoma samples were performed either with an antibody raised against the N-terminal of PSME1 or the 1 directed against the C-terminal part (Figure 3D).

The data reflect the antibody raised against the N-terminal part recognizes the protein in both carcinoma and benign samples, whereas the antibody raised against the C-terminal recognizes its epitope only in carcinoma samples, which is in line with previous data [20] and the immunocytochemical results (Figure 3F). Figure 3F shows that this C-terminal fragment is over-present in epithelial cells of carcinoma (Figures 3F a, b, e, i). It can be detected in endometrioid nondifferentiated (Figure 3F c) or differentiated (Figure 3F a) carcinoma, sero-mucinous adenocarcinoma (Figure 3F e), and clear-cell adenocarcinoma (mesonephroma) (Figure 3F i). In benign tissues, the immunolabeling is also at the level of the epithelial cells, but more nucleus than in carcinoma can be observed in (Figures 3F f, h) the adenofibromatous tumor (Figure 3F g). All together, the data is in line with the transcriptomic results performed on the SKOV-3 epithelial carcinoma cells (Figure 3E), confirming overexpression of PSME1 gene in this carcinoma cell line. These data confirm that Reg-alpha is a specific ovarian biomarker. We recently discovered it in ascites liquid (data not shown).

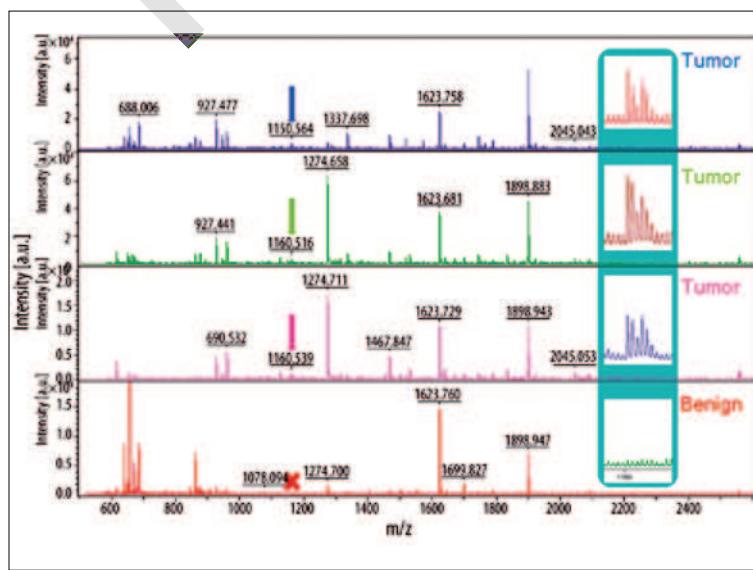
For the other biomarkers detected by PCA analyses, we could detect that some have already been found in genomic



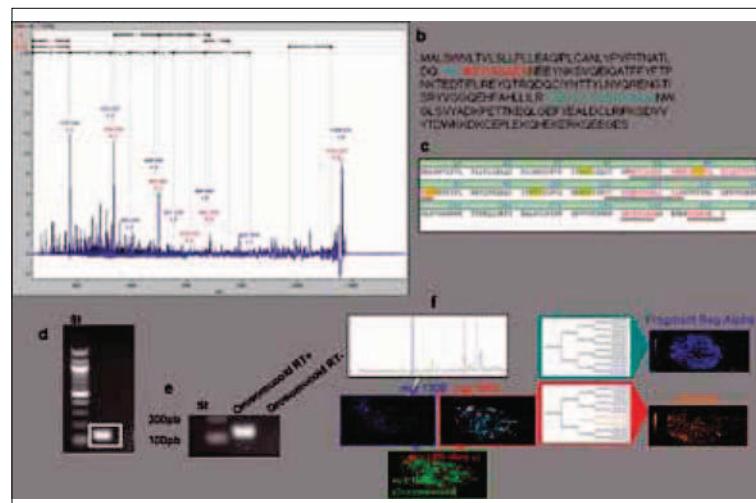
**Figure 3.** (A) Ovarian carcinoma section stained with Hematoxilin, Eosin, Safran (H&S) colorants. (B) MSI image of the ion at  $m/z$ : 9744, reg alpha fragment. (C) Immunocytochemical analyses with antibody raised against the C-terminal fragment on stage IV carcinoma sections. Most of the epithelial cells are labeled. (D) Western blot analyses with benign (B) or carcinoma from different patients (C) with antibodies directed against either the N-terminal or C-terminal parts of PSME1. (E) RT-PCR analyses of PSME1 of mRNA extracted from SKVO3. (F) Immunocytochemical studies with polyclonal antibody raised against the c-terminal part of Reg alpha. (a) Epithelial cells of immunolabeled differentiated endometrioid carcinoma, (b) Epithelial cells of immunolabeled in carcinoma region, (c) Cytoplasmic epithelial cells immunolabeling of nondifferentiated endometrioid carcinoma, (d) Epithelial cells of immunolabeled in clear cells adenocarcinoma (mesonephroma), (e) Nuclear epithelial cells immunolabeling of benign tumor, (f) Nuclear epithelial cells immunolabeling of adenofibromatous tumor, (g) Nuclear epithelial cells immunolabeling of seromucous area in benign tumor, (h) Cytoplasmic epithelial cells immunolabeling of sero-mucinous adenocarcinoma.

studies, and share the same mass, for example, protein S100-A12 ( $m/z$  10568) and apolipoprotein A1 ( $m/z$  10155) [34]. We decided to remove the MALDI matrix from the slides through a washing procedure and analyze samples by MALDI before and after trypsin digestion [32] (Figure 4). The differentiated ions then were 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 4) was subjected to MS/MS analysis (Figure 5A). The obtained sequence of WFYIASAFR with a score of 42 (Figure 5B) was confirmed by the IT-MS/MS data, and it belongs to orosomucoid 1. Five others fragments were characterized and gave 30.3% sequence coverage (Figure 5B). The presence in the biopsy of the mRNA coding for this protein was confirmed by RT-PCR from patient with ovarian carcinoma (Figure 5C). A 150-bp fragment coding for orosomucoid was amplified (Figure 5D). Similarly, RT-PCR performed on RNA extracted from SKOV-3 epithelial carcinoma cells confirmed the expression of the orosomucoid (Figure 5E), further supporting the biochemical data. Finally, antibodies raised against the C-terminus of Reg alpha and a

monoclonal against orosomucoid were used for immunocytochemistry using the specific MALDI imaging procedure [28] (Figure 5F). Both biomarkers were detected using the



**Figure 4.** MALDI-MS profiles of 3 ovarian carcinomas after tissue trypsin digestion using an automatic micro-spotter (CHIP-1000, Shimadzu) versus benign tumor; a zoom of the peptide 1160.5 is performed. This peptide is present in 3 ovarian carcinomas and absent in the benign tumor. (Inset corresponds to the zoom of the 1160.5 region.)



tag-mass procedure in the carcinoma region with specific localization (Figure 5F b), which was consistent with the clustering distribution (Figure 5F c).

A combination of MALDI TOF-TOF and nanoLC-IT MS/MS analyses (Table 3) allowed us to characterize 15 biomarkers (Table 3) from 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 patients [35], human ovarian cancer tumors [36] or ovarian ascites analyses [37]. Moreover, their location was determined by MSI using a bottom-up strategy. After tissue trypsin digestion, proteins were reconstructed based on their

**Figure 5.** (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) Sequence of the orosomucoid obtained by nano-LC-ITMS after trypsin digestion and by tissue MALDI TOF/TOF analyses. (D) RT-PCR amplification of orosomucoid from mRNA extracted biopsy (5 carcinoma versus 5 benign). (E) RT-PCR amplification of orosomucoid from SKOV-3 cell lines. (F) (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 2 subclass's location in the tumor part; each biomarker is characteristic of 1 region.

*in silico* trypsic digested peptides detected on the digested tissue (Table 4, Figure 6). MALDI imaging mass spectrometry images from digested fragments for the same protein were cumulative and gave the molecular image of its

**Table 3.** Biomarkers identified by nanoLC-IT-MS in MS/MS mode from 10 patients with ovarian cancer absent in 10 benign tumors.

Access number	Protein name	Molecular mass	Mascot score (average)	Sequence coverage (average)
P08670_CHAIN_0	Vimentin	53651	89.6±22.3	27±10%
P51884_CHAIN_0	Lumican Precursor	38428	63.6±5.7	19.3±4%
P02647_CHAIN_1	Apolipoprotein 1	11183	49.9±4	21.6±4.9%
P51888_CHAIN_0	Prolargin	43809	52.5±0.7	17±0.8%
Q12889_CHAIN_0	Oviductin (mucin-9)	75372	47.8±1.3	13.3±1.2%
Q01995_CHAIN_0	Transgelin	22610	49.5±2.48	26±2.44%
P02765	Orosomucoid	23511	45±2.44	20.8±1.8%
P02787_CHAIN_0	Siderophilin	77049	38.1±2.2	12±4.8%
P01009_ISOFORM_2	Alpha 1 antiprotease	39066	29.8±1.6	21±3.2%
P08727	Cytokeratin 19	44635	29.3±1.75	10±1.6%
P30086_CHAIN_0	Phosphatidyl Ethanolamine Binding Protein	21056	28.1±0.9	23±2%
P31949	Protein S100 A11	11740	22.6±0.25	24.5±0.5%
P02790_CHAIN_0	Hemopexin	51676	21.0±0.4	6.5±1.2%
P07737_CHAIN_0	Profilin -1	15054	18.3±0.9	15.4±4.7%



**Table 4.** Trypsic digested fragment of proteins identified by NanoLC-IT-MS in MS/MS and found on tissue after bottom-up strategy and characterized by MS/MS.

Orosomucoid		Oviductal glycoprotein 1		Alpha anti-protease 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1160.59	WFYIASAFR	1118.68	FIASVISLLR	1015.6	SVLGQLGITK
1559.83	ITGKWFYIASAFR	1120.6	LIMGIPTYGR	1110.59	LSITGTYDLK
1752.83	YVGGQEHFAHLLILR	1288.62	FTTMLSTFANR	1568.78	ECGGVFTDPKGIFK
		1248.54	SSAYAMNYWR		
		1508.77	TLLSIGGWNFGTSR		
Siderophilin		Reg alpha C-terminal		Profilin-1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1577.8	TAGWNIPMGLLYNK	1500.98	QLVHELDEAEYR	1643.9	TFVNITPAEVGVLVGK
		1518.2	IEDGNNGFGVAV QEK	1470.7	SSFYVNGLTLGGQK
Prolargin		Transgelin		Hemopexin	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.59	SFPNLAFIR	1204.7	TLMALGSLAVTK	1141.58	GGYTLVSGYPK
1309.7	LPGLVFLYMEK	1530.7	TDMFQTVDLFEGK	1120.599	NFPSPVDAAFR
1352.71	NQLEEVPSALPR	1221.62	QMEQVAQFLK		
1549.856	NLMQLNLAHNILR				
Vimentin		S100		Lumican	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1254.5	LGDLYEEEMR	1060.48	DGYNYTLSK	1178.63	LKEDAVSAAFK
1169.70	ILLAELEQLK	1849.89	TEFLSFNMTELAAFTK	1024.55	FNALQYLR
1428.7	SLYASSPGGVYATR			1297.66	SLEDQLTHNK
1533.84	KVESLQEEIAFLK			1180.65	RFNALQYLR
1570.88	ISLPLPNFSSLNLR				
Cytokeratin 19		Phosphatidylethanolamine-binding		Apolipoprotein 1	
Mass	Fragment	Mass	Fragment	Mass	Fragment
1064.09	SFPNLAFIR	1560.8	LYTIVLTDAPS	1031.51	LSPLGEEMR
1365.7	SRLEQEIA TYR	1632.79	NRPTSISWDGLDSGK	1301.64	THLAPYSDEL R
1389.67	AALEDTLAETEAR	1949.93	GNDI SGT VLS DYVGSGPPK	1386.7	VSFLSALEYTK
1586.83	LEHLYLNNNSIEK			1230.7	QGLLPVLESFK

tissue repartition. Interestingly, all the detected proteins have the same location.

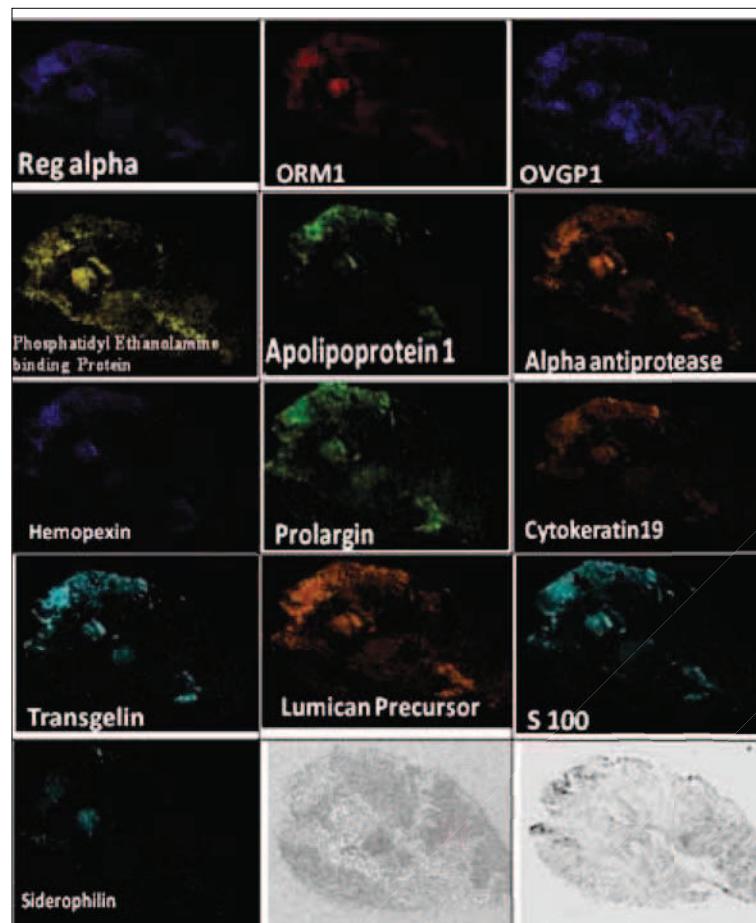
## DISCUSSION

These characterized 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 been previously detected in aggressive ovarian tumors [16]. In our study, we detected S100 A11 (Table 3) and S100 A12 (PCA analyses) proteins in tumors. S100 A11 has already been detected in ovarian ascites [37]. S100 A11 (or calgizzarin) is known to regulate cell growth by inhibiting DNA synthesis [38,39]. S100 A12 is known to contribute to leukocyte migration in chronic inflammatory responses [40].





**Figure 6.** MALDI molecular images of the identified proteins by nanoLC-ITMS reconstructed on their trypsic digested fragment. Directly detected on tissue.

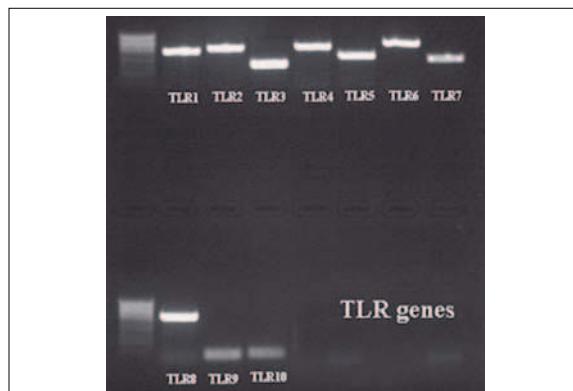
#### Proteins involved in immune response modulation

Recent studies have shown that ovarian cancer-associated ascites may provide an immunosuppressive environment [41]. 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 cells [41]. Considering these data, we tried to identify biomarkers from our pool that could be involved in such immunosuppression. In fact, we detected 5 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 presentation [20]. In fact, PA28 is a regulatory complex associated with 20S proteasome that consists of 3 subunits: alpha, beta, and gamma [42]. 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 degradation of large proteins. Rather, it is responsible for MHC-class I antigen processing [43–45], which is greatly improved by interferon gamma-induced expression of the alpha and beta subunits [46].

Several viral proteins that interact with these proteasome subunits have been reported, and they may interfere with host anti-viral defenses, thereby contributing to cell transformation [47]. The manner in which they bind to the core particle via its subunits' C-terminal tails, and induce an  $\alpha$ -ring conformational change to open the 20S gate, suggests a mechanism similar to that of the 19S particle [42]. 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- $\gamma$  treatment of these carcinoma cell lines corrects the TAP, LMP, and tapasin deficiencies and enhances PA28  $\alpha$ , LMP7, calnexin and calreticulin expression, which is accompanied by increased levels of MHC class I antigens [48]. Recently, PSEM2 (proteasome activator complex subunit 2, PA28 Beta) has also been detected in ascites fluid, which implicates it in immune cell tolerance toward carcinoma cells and confirms the dysregulation of self-antigen processing in ovarian tumors [37]. Moreover, PA28 alpha seems to be a target for Epstein-Barr virus (EBV) and herpes virus (HV), as we preliminary detected by qPCR (data not shown). In fact, Pudney and colleagues [49] have shown that, as EBV-infected cells move





**Figure 7.** RT-PCR amplification of Toll-like receptors from SKOV-3 cell lines.

through the lytic cycle, their susceptibility to EBV-specific CD8<sup>+</sup> T-cell recognition falls dramatically, concomitant with a reduction in transporter associated with antigen processing (TAP) function and surface human histocompatibility leukocyte antigen (HLA) class I expression. Implication of virus in the cause of ovarian cancer is also sustained by the overexpression of furin enzyme (data not shown), which is known to be implicated in glycoprotein B cleavage through a motif R-X-K/R-R in both EBV and HV [50,51].

Among the 4 other factors that might participate in the tolerance phenomenon by inhibiting immune activation, the acute phase protein, orosomucoid (ORM, also known as alpha1-acid glycoprotein or AGP), is normally increased in infection, inflammation, and cancer, and it seems to have immunosuppressive properties in ovarian carcinoma ascites through inhibition of IL-2 secretion by lymphocytes [52]. Similarly, apolipoprotein A1 has been detected in conjunction with transthyretin and transferrin in early-stage mucinous tumors [53]. 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-10 [54].

Interestingly, hemopexin has recently been demonstrated to reduce TNF and IL-6 from macrophages during inflammation, and it limits TLR4 and TLR2 agonist-induced macrophage cytokine production [55]. We demonstrate that in SKOV-3 epithelial ovarian carcinoma cells, all TLRs are overexpressed with the exception of TLR9 and TLR10 (Figure 7). This point is also in line with the overexpression of lumican, which is a small LRR proteoglycan in the extracellular matrix. Along with other proteoglycans, such as decorin, biglycan, and prolargin, lumican is known to be overexpressed in breast cancer and to play a role in tumor progression [56,57]. However, as demonstrated for biglycan, which interacts with TLR2/4 on macrophages [58,59], we speculate that lumican is also involved in the activation of the inflammasome through TLR2/4 interaction. The activation of all danger-sensing receptors in carcinoma cells can be explained by regulation of inflammation by carcinoma cells to facilitate tumor progression. It seems that ovarian cancer cells act as parasites and use molecular mimicry [60] 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 cells [61].

In the human lung adenocarcinoma cell line A549, this differentiation is accompanied by modification in the expression of several cytoskeleton proteins including β-actin, cofilin 1, moesin, filamin A and B, heat-shock protein beta-1, transgelin-2, S100 A11, and calpastatin. These changes presumably increase migratory and invasive abilities [62]. We recently 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 [63]. After binding to its receptor, TGF-β stimulates the reorganization of the actin cytoskeleton and triggers the formation of stress fibers and cellular protrusions [63].

### Tumor progression

In conjunction with S100 proteins and cytoskeleton modifying proteins, we also detected expression of oviduct-specific glycoprotein (OGP, Mucin-9), a marker of normal oviductal epithelium. Our data are in line with that of Woo and associates, who found that OGP is a tubal differentiation marker and may indicate early events in ovarian carcinogenesis [64,65].

### CONCLUSIONS

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 subclassification 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 cause. Viruses are known to orient the immune response to immunosuppression [66]. Further studies are now in progress to explore this possibility to consider as potential biomarkers for ovarian cancer diagnosis Reg alpha fragment, mucin-9 in conjunction with oncoviral proteins specific from EBV and HHV6 viruses

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.



## Authors' contributions

AM performed NanoLC-ITMS and MALDI imaging analyses; DB: performed PCA analyses RL and CC: performed automatic profiling studies; JF design the new ionic matrices and on tissue bottom-up strategy for biomarker identification; DV performed the EMT studies; AT carried out the molecular studies; AD performed immunocytochemistry and Western blotting, DV realized the surgeries, and the follow-up of the study; AK and RD follow-up the study though the codirection of AM and DB theses; and IF and MS conceived of the study and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

## REFERENCES:

- Lambaudie E, Collinet P, Vinatier D: [Ovarian cancers and CA 125 in 2006]. *Gynecol Obstet Fertil*, 2006; 34: 254-57
- Edwards BK, Brown ML, Wingo PA et al: 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: 1407-27
- Ardekani AM, Liotta LA, Petricoin EF III: Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002; 2: 312-20
- Bandera CA, Tsui HW, Mok SC, Tsui FW: Expression of cytokines and receptors in normal, immortalized, and malignant ovarian epithelial cell lines. *Anticancer Res*, 2003; 23: 3151-57
- Conrads TP, Fusaro VA, Ross S et al: High-resolution serum proteomic features for ovarian cancer detection. *Endocr Relat Cancer*, 2004; 11: 163-78
- Conrads TP, Zhou M, Petricoin EF III et al: Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn*, 2003; 3: 411-20
- Fields MM, Chevlen E: Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs*, 2006; 10: 77-81
- Johann DJ Jr, McGuigan MD, Patel AR et al: Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann NY Acad Sci*, 2004; 1022: 295-305
- Kohn EC, Mills GB, Liotta L: Promising directions for the diagnosis and management of gynecological cancers. *Int J Gynaecol Obstet*, 2003; 83(Suppl.1): 203-9
- Rapkiewicz AV, Espina V, Petricoin EF III, Liotta LA: Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer*, 2004; 40: 2604-12
- Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA et al: Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002; 359: 572-77
- Bergen HR III, Vasmatzis G, Cliby WA et al: Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis Markers*, 2003; 19: 239-49
- Diamandis EP: Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet*, 2002; 360: 170; author reply 171
- Engwegen JY, Gast MC, Schellens JH, Beijnen JH: Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci*, 2006; 27: 251-59
- Fung ET, Yip TT, Loma L et al: Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer*, 2005; 115: 783-89
- Kikuchi N, Horiuchi A, Osada R et al: 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: 1061-69
- Rai AJ, Zhang Z, Rosenzweig J et al: Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med*, 2002; 126: 1518-26
- Xiao Z, Prieto D, Conrads TP et al: Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol*, 2005; 230: 95-106
- Zhu Y, Wu R, Sangha N et al: Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics*, 2006; 6: 5846-56
- Lemaire R, Menguellet SA, Stauber J et al: 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: 4127-34
- Deininger SO, Ebert MP, Futterer A et al: MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers. *J Proteome Res*, 2008; 7(12): 5230-36
- Walch A, Rausch S, Deininger SO, Hofler H: MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol*, 2008; 130: 421-34
- Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A et al: MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem*, 2006; 78: 7145-53
- Franck J LR, Wisztorski M, Van Remoortere A et al: MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30000 Da. *Med Sci Monit*, 2010; In press
- Holle A, Haase A, Kayser M, Hohndorf J: Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *J Mass Spectrom*, 2006; 41: 705-16
- Lemaire R, Lucot JP, Collinet P et al: New developments in direct analyses by MALDI mass spectrometry for study ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2005; 4: S305-8
- Stauber J, Lemaire R, Wisztorski M et al: 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-S49
- Lemaire R, Stauber J, Wisztorski M et al: Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res*, 2007; 6: 2057-67
- Krug A, Towarowski A, Britsch S et al: 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: 3026-37
- Franck J, Arafa K, Barnes A et al: Improving tissue preparation for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging. Part 1: using microspottting. *Anal Chem*, 2009; 81: 8193-202
- Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P et al: Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem*, 2006; 78: 809-19
- Fournier I, Wisztorski M, Salzet M: Tissue Imaging Using MALDI Mass Spectrometry: The New Frontier of Histopathology Proteomics Expert Review Proteomics, 2008; 5(3): 413-24
- Franck J, Arafa K, Elayed M et al: MALDI imaging mass spectrometry: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2009; 8: 2023-33
- Hibbs K, Skubitz KM, Pambuccian SE et al: Differential gene expression in ovarian carcinoma: identification of potential biomarkers. *Am J Pathol*, 2004; 165: 397-414
- Schweigert FJ: Characterisation of protein microheterogeneity and protein complexes using on-chip immunoaffinity purification-mass spectrometry. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2005; 4: 7-15
- Bengtsson S, Krogh M, Szgyarto CA et al: Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers. *J Proteome Res*, 2007; 6: 1440-50
- Gortzak-Uzan L, Ignatchenko A, Evangelou AI et al: A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers. *J Proteome Res*, 2008; 7: 339-51
- Makino E, Sakaguchi M, Iwatsuki K, Huh NH: Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death. *J Mol Med*, 2004; 82: 612-20
- Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonegawa H et al: PKCalpha mediates TGFbeta-induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol*, 2004; 164: 979-84
- Yang Z, Tao T, Raftery MJ et al: Proinflammatory properties of the human S100 protein S100A12. *J Leukoc Biol*, 2001; 69: 986-94
- Giuntoli RL II, Webb TJ, Zoso A et al: Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for anti-tumor immunity. *Anticancer Res*, 2009; 29: 2875-84
- Yang Y, Fruh K, Ahn K, Peterson PA: *In vivo* assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem*, 1995; 270: 27687-94
- Kloetzel PM: The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Ther*, 1998; 5: 1297-98
- Rivett AJ, Gardner RC: Proteasome inhibitors: from *in vitro* uses to clinical trials. *J Pept Sci*, 2000; 6: 478-88
- Rotem-Yehudar R, Grotterup M, Soza A et al: LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class I MHC molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med*, 1996; 183: 499-514



46. Kuckelkorn U, Ruppert T, Strehl B et al: Link between organ-specific antigen processing by 20S proteasomes and CD8(+) T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med*, 2002; 195: 983–90
47. Regad T, Saib A, Lallemand-Breitenbach V et al: PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J*, 2001; 20: 3495–505
48. Delp K, Momburg F, Hilmes C et al: 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
49. Padney VA, Leese AM, Rickinson AB, Hislop AD: CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med*, 2005; 201: 349–60
50. Sorem J, Jardetzky TS, Longnecker R: Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes. *J Virol*, 2009; 83: 6664–72
51. Sorem J, Longnecker R: Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol*, 2009; 90: 591–95
52. Elg SA, Mayer AR, Carson LF et al: Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovarian carcinoma. *Cancer*, 1997; 80: 1448–56
53. Nosov V, Su F, Amneus M et al: Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2009; 200: 639 e1–5
54. Kim KD, Lim HY, Lee HG et al: 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: 1126–36
55. Liang X, Lin T, Sun G et al: Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages. *J Leukoc Biol*, 2009; 86: 229–35
56. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H et al: Expression of lumican in human breast carcinoma. *Cancer Res*, 1998; 58: 1348–52
57. Leygue E, Snell L, Dotzlaw H et al: Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol*, 2000; 192: 313–20
58. Babelova A, Moreth K, Tsalastra-Greul W et al: Biglycan: A danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors. *J Biol Chem*, 2009; 284(36): 24035–48
59. Schaefer L, Babelova A, Kiss E et al: The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages. *J Clin Invest*, 2005; 115: 2223–33
60. Salzet M, Capron A, Stefano GB: Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today*, 2000; 16: 536–40
61. Kitagawa K, Murata A, Matsura N et al: Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenosarcoma by transforming growth factor-beta1. *Int J Cancer*, 1996; 66: 91–97
62. Keshamouni VG, Michailidis G, Grasso CS et al: 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: 1143–54
63. Vergara D, Merlot B, Lucot JP et al: Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett*, 2010; 291: 59–66
64. Woo MM, Alkushi A, Verhage HG et al: 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: 7958–64
65. Woo MM, Gilks CB, Verhage HG et al: Oviductal glycoprotein, a new differentiation-based indicator present in early ovarian epithelial neoplasia and cortical inclusion cysts. *Gynecol Oncol*, 2004; 93: 315–19
66. Wahl A, McCoy W, Schafer F et al: T Cell Tolerance for Variability in a Class I HLA Presented Influenza A Virus Epitope. *J Virol*, 2009; 83(18): 9206–14
67. Begum FD, Hogdall CK, Kjaer SK et al: The prognostic value of plasma soluble urokinase plasminogen activator receptor (suPAR) levels in stage III ovarian cancer patients. *Anticancer Res*, 2004; 24: 1981–85
68. Deng X, Hogdall EV, Hogdall CK et al: The prognostic value of pretherapeutic tetrancetin and CA-125 in patients with relapse of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2000; 79: 416–19
69. Hogdall EV, Hogdall CK, Tingulstad S et al: Predictive values of serum tumour markers tetrancetin, OVX1, CASA and CA125 in patients with a pelvic mass. *Int J Cancer*, 2000; 89: 519–23
70. Lundstrom MS, Hogdall CK, Nielsen AL, Nyholm HC: Serum tetrancetin and CA125 in endometrial adenocarcinoma. *Anticancer Res*, 2000; 20: 3903–6
71. Lim R, Ahmed N, Borregaard N et al: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) an early-screening biomarker for ovarian cancer: NGAL is associated with epidermal growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *Int J Cancer*, 2007; 120: 2426–34
72. Gericke B, Raila J, Sehouli J et al: Microheterogeneity of transthyretin in serum and ascitic fluid of ovarian cancer patients. *BMC Cancer*, 2005; 5: 133
73. Rauvala M, Puistola U, Turpeenniemi-Hujanen T: Gelatinases and their tissue inhibitors in ovarian tumors; TIMP-1 is a predictive as well as a prognostic factor. *Gynecol Oncol*, 2005; 99: 656–63
74. Diemandis EP, Borgono CA, Scorilas A et al: Immunofluorometric quantification of human kallikrein 5 expression in ovarian cancer cytosols and its association with unfavorable patient prognosis. *Tumour Biol*, 2003; 24: 299–309
75. Pedersen N, Schmitt M, Ronne E et al: A ligand-free, soluble urokinase receptor is present in the ascitic fluid from patients with ovarian cancer. *J Clin Invest*, 1993; 92: 2160–67
76. Sier CF, Stephens R, Bizik J et al: The level of urokinase-type plasminogen activator receptor is increased in serum of ovarian cancer patients. *Cancer Res*, 1998; 58: 1843–49

BR



# **Chapitre 3 :**

## **Nouvelle approche de quantification par**

## **Spectrométrie de masse**

## **Chapitre 3 : Nouvelle approche de quantification par MS**

### **3.1. Etat de l'art**

Le domaine de la protéomique se définit comme l'étude de l'ensemble des protéines d'un échantillon biologique donné. Il s'est développé de façon spectaculaire au cours des dernières années. Les progrès majeurs réalisés dans le domaine de l'instrumentation pour la protéomique (spectrométrie de masse, chromatographie liquide nano-débit), associés à la masse d'informations en évolution permanente, disponible dans les banques de données et à la conception de nouveaux outils logiciels, ont conduit à la mise en place des stratégies qui permettent d'analyser le protéome des échantillons biologiques de manière efficace et fiable. Ainsi, des inventaires de protéines de plus en plus complets ont pu être établis dans le cadre de travaux menés chez l'homme et chez des organismes modèles. Ces inventaires réalisés à partir d'échantillons plus ou moins complexes et ciblés (tissus, cellules, compartiments subcellulaires, complexes protéiques, etc.) ont participé à une meilleure connaissance des acteurs moléculaires impliqués dans les grands « mécanismes du vivant ».

Cependant, le protéome est une entité hautement dynamique. De ce fait, un enjeu majeur pour la protéomique consiste aujourd'hui à développer la protéomique quantitative alliant les outils et les méthodes qui permettront d'appréhender cette nouvelle dimension de l'analyse. Le décryptage systématique des variations d'abondance du protéome en réponse à divers facteurs (hormone, stress, délétion de gène, pathologie, etc.) constitue en effet un moyen puissant pour approfondir notre connaissance des mécanismes cellulaires ou rechercher de nouveaux marqueurs de maladies. Ces techniques présentent un avantage sur les techniques de transcriptomique puisqu'elles s'intéressent aux protéines, les principaux acteurs du vivant et non à leurs précurseurs, les ARNm dont le niveau d'expression n'est pas toujours corrélé à l'abondance des protéines correspondantes, mais dont la quantification est nécessaire aussi.

La MS s'est imposée comme une technique de référence en analyse protéomique, mais les données générées restent principalement qualitatives. Rendre les données de MS quantitatives constitue donc un enjeu majeur pour l'avenir. Actuellement, les méthodes de quantification par MS permettent uniquement de comparer des quantités de lots de protéines différents provenant de plusieurs conditions d'analyses (sans avoir la quantité réelle présente).

Ceci met en évidence une augmentation ou une diminution de la concentration en peptides ou protéines présents.

Plusieurs méthodes génériques basées sur le marquage isotopique se sont révélées être un outil efficace mais souvent très cher et difficile à mettre en œuvre. Toutes ces approches sont résumées dans le **tableau 15**. Actuellement la plupart de ces méthodes permettent une comparaison des concentrations en protéines présentes dans différents échantillons biologiques, mais ne fournissent pas d'information sur la quantité exacte « absolue » présente dans l'échantillon analysable. Pourtant, une **quantification exacte** est requise dans des domaines clefs tels que l'analyse clinique, l'évaluation de candidats biomarqueurs, la génétique, l'immunologie et le contrôle qualité des médicaments ou des aliments.

Marquages	Cibles	Stratégies	Avantages	Inconvénients
<i>marquages métaboliques</i>		Enrichissement en <sup>15</sup> N et <sup>13</sup> C	Ne s'appuie pas seulement sur un AA pour le marquage. Très peu d'erreurs expérimentales.	La différence de masse induite dépend de la séquence en acide aminé. Limité à la culture cellulaire
		SILAC	Relativement peu chères, Analyse précise et assez simple.	Limitées à la culture cellulaire
<i>marquages chimiques</i>	<i>groupements thiols des cystéines</i>	ICAT	Peptides contenant une cystéine sont isolés : échantillons moins complexes, quantification plus accessible.	Les peptides lourds et légers ont des temps de rétention différents en chromatographie : Ionisations différentes causées par la variation du bruit de fond. Fragmentations des tags pendant la collision CID, complique l'interprétation des spectres.
		ALICE	Tous les échantillons biologiques, Incorporation tôt dans le processus, Tag petit donc ne se fragmente pas en CID.	Uniquement pour peptides avec au moins une cystéine.
		NEM/d5-NEM et IAA/13C6-IIAA	Elimine l'étape de chromatographie.	2D longue, peu de reproductibilité.

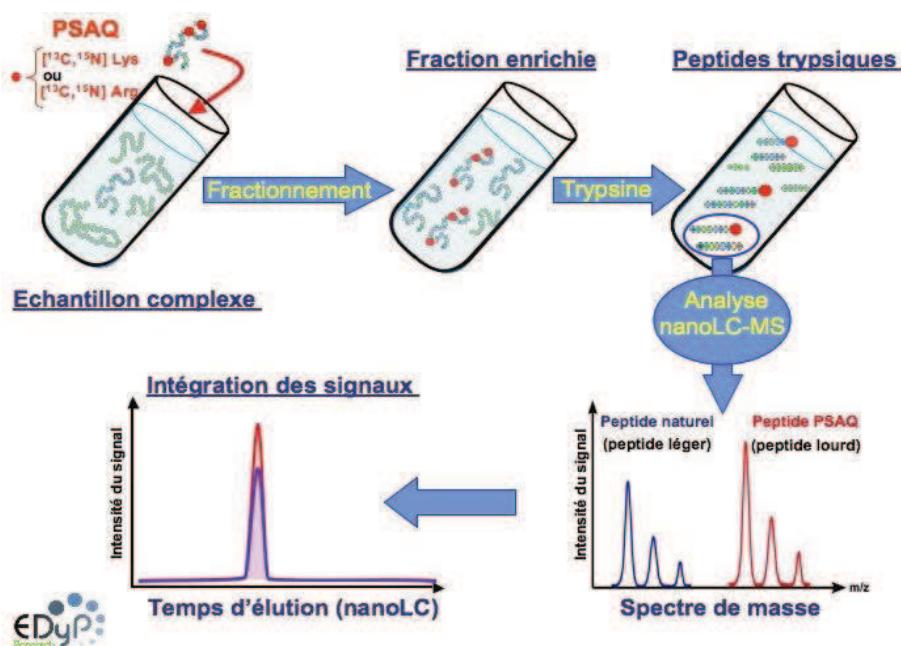
<i>groupements amines</i>	ITRAQ	Travailler simultanément avec quatre échantillons différents, Augmente l'intensité du signal en MS, Quantification absolue possible.	Cher
	Marquage en N terminal	Succinylation spécifique, Pas de modification d'autres groupes amines, Favorise la formation d'espèces monochargées.	Délicatesse du traitement informatique des données
<i>C-terminal</i>	Méthanol	Ne nécessitent aucun acide aminé spécifique pour que le marquage ait lieu.	Dérive chaînes latérales des acides aspartique et glutamique.
	<sup>18</sup> O/ <sup>16</sup> O	Les atomes d'oxygène ne s'échangent pas avec l'eau en absence de digestion enzymatique, Le séquençage de novo est possible.	Marquage tard dans la préparation de l'échantillon, Les peptides doivent être suffisamment grands pour être digérés.
<i>MPTs</i>	PhIAT	Concentration de protéines peu abondantes.	Réalisation lente

**Tableau 15 :** Les différentes méthodes de quantification par spectrométrie de masse et leurs méthodes de marquages correspondantes [29, 230-238]

Cependant, il existe d'autres méthodes de quantification absolue qui se reposent sur le principe de la dilution isotopique, une quantification exacte d'un composé peut être obtenue en spectrométrie de masse en ajoutant dans l'échantillon à analyser une quantité connue d'un étalon interne chimiquement identique au composé à doser, mais alourdi par l'incorporation d'isotopes stables. Ainsi, deux méthodes de quantification exacte utilisant des peptides marqués (<sup>13</sup>C et/ou <sup>15</sup>N) comme étalons internes avaient été publiées (**stratégies AQUA et QconCAT**) [239, 240]. Ces deux méthodes reposent sur l'utilisation d'un peptide rapporteur (standard interne) par protéine à doser. Ce peptide rapporteur, marqué (<sup>13</sup>C et/ou <sup>15</sup>N) est identique à un peptide trypsique identifié exclusivement dans la protéine à doser, mais ces deux techniques ne prennent pas en compte les rendements de toutes les étapes biochimiques nécessaires à la préparation de l'échantillon biologique (**Figure 62**).

Il existe aussi de nouvelles techniques comme la **méthode de quantification PSAQ** qui utilise comme étalons internes des protéines recombinantes entières biochimiquement

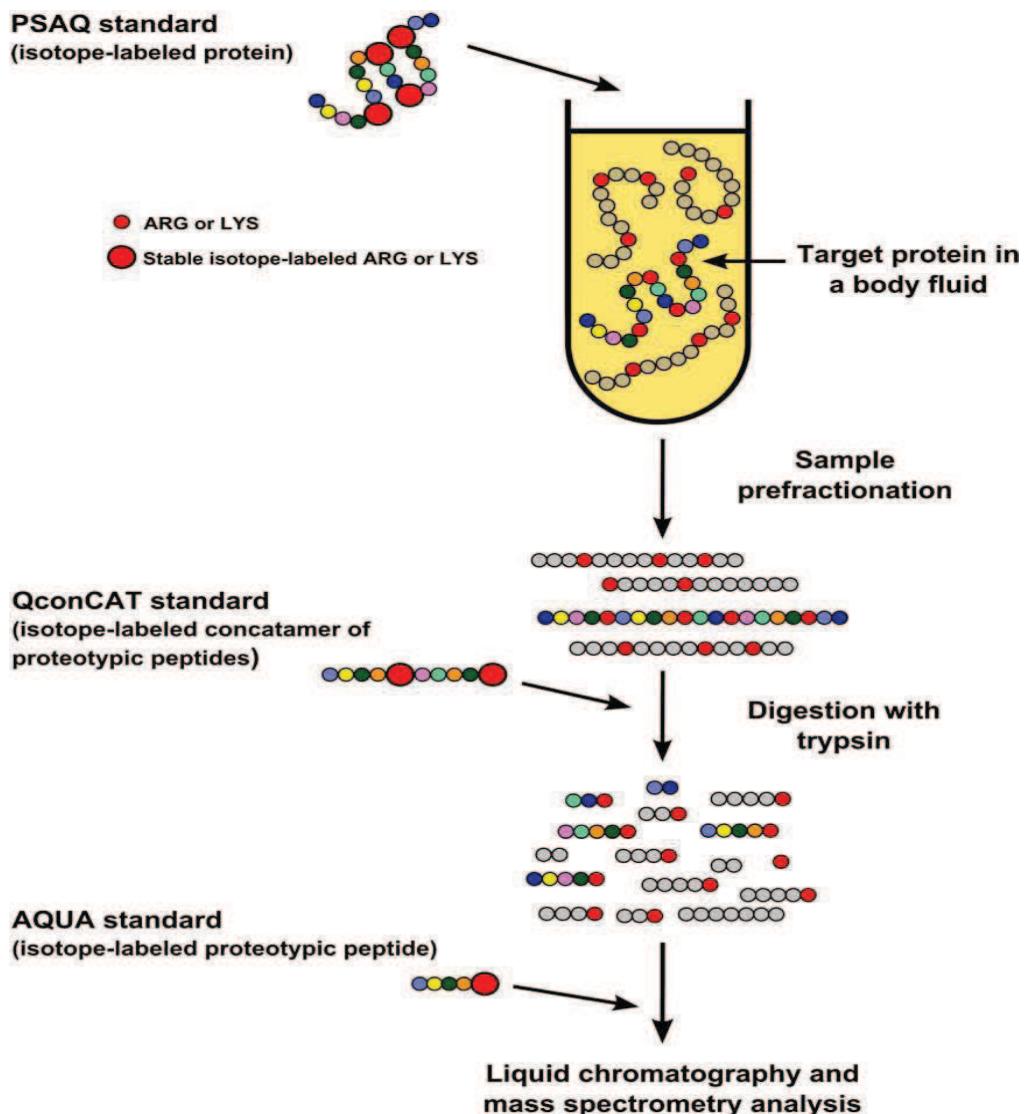
identiques aux protéines naturelles à doser. Ces étalons PSAQ sont alourdis par incorporation de [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_2$ ] L-lysine et [ $^{13}\text{C}_6$ ,  $^{15}\text{N}_4$ ] L-arginine lors de leur biosynthèse en système « *Cell-Free* ». Les étalons internes PSAQ, se comportant comme leurs « contreparties » naturelles, peuvent être ajoutés préalablement à tout traitement de l'échantillon, ce qui permet d'éviter tout biais dû au processus analytique. Cette méthode repose sur la biosynthèse *in vitro* d'étalons protéiques marqués isotopiquement. Ces étalons, biochimiquement équivalents aux protéines à doser, sont ajoutés à chaque échantillon préalablement à tout traitement. L'échantillon est ensuite fractionné, digéré à la trypsine puis analysé en nanoLC-MS. Chaque peptide issu d'un étalon PSAQ va ainsi produire un massif isotopique caractéristique décalé du peptide naturel à doser. L'intégration des signaux « léger » et « lourd » résultants nous permet de déterminer la concentration exacte du peptide cible (**Figure 61**).



**Figure 61:** Principe de la méthode PSAQ (d'après Brun et coll . [241])

La méthode PSAQ s'avère beaucoup plus robuste et juste pour la quantification des protéines dans des échantillons biologiques complexes que les méthodes concurrentes développées précédemment. Sa justesse, sa précision, sa très grande spécificité et sa compatibilité avec des dosages multiplexes, font de cette méthode une alternative très

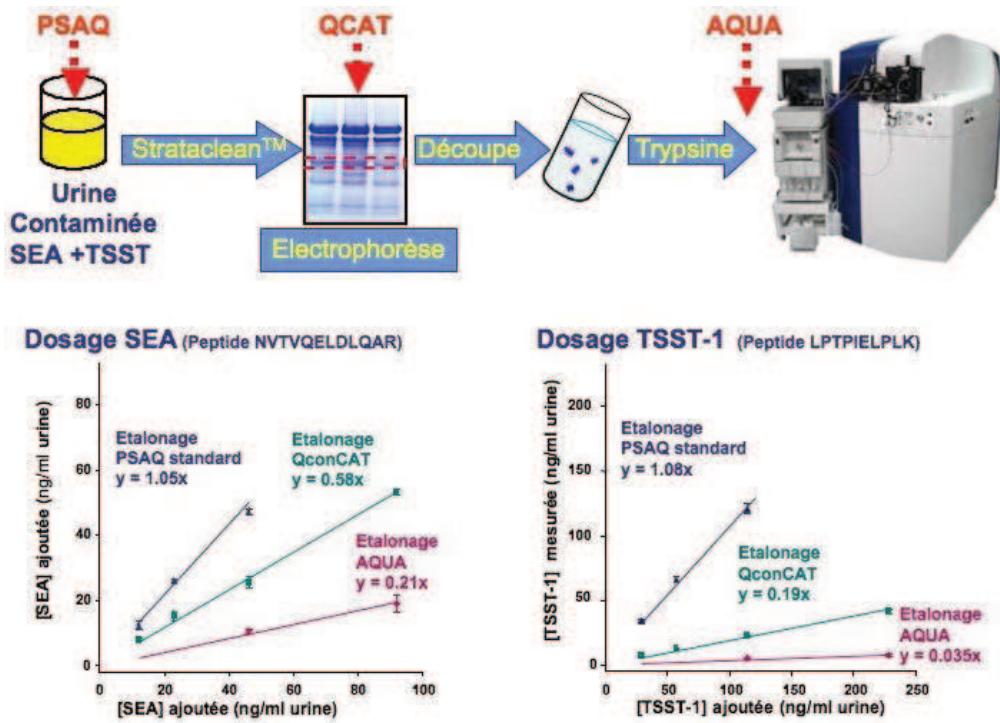
intéressante à l'ELISA pour de nombreuses applications, dont l'évaluation à grande échelle de biomarqueurs dans les fluides biologiques tels que le sérum.



**Figure 62:** Principe de trois techniques de quantification absolue (d'après Brun et coll. [241])

Une étude comparative de ces trois méthodes, sur un échantillon urinaire contaminé avec des quantités connues d'entérotoxines staphylococciques SEA et TSST a récemment été publiée [241]. Chaque échantillon urinaire est respectivement enrichi en toxine cible par concentration sur une colonne de purification qui est une résine dont la phase solide à base de silice contenant des groupes hydroxyles. Ils réagissent avec les protéines dans une grande partie. Ces échantillons sont ensuite séparés par électrophorèse et quantifié de manière comparative par les 3 méthodes. Les trois types d'étalon utilisés sont ajoutés comme indiqué par les

flèches. Pour chaque toxine, la titration d'un même peptide est représentée pour les trois méthodes ( $y$  = pente de la droite de titration) (Figure 63).



**Figure 63:** Evaluation comparative des méthodes AQUA, QconCAT et PSAQ pour la quantification exacte des entérotoxines SEA et TSST (toxines naturelles) (d'après Brun *et al.* [241])

Cependant il existe d'autres approches intéressantes de quantification sans marquage car elles n'impliquent pas de modification majeure de l'échantillon [242]. Pour quantifier une protéine sans marquage, deux méthodes distinctes peuvent être mises en œuvre en ionisation electrospray :

- La mesure et la comparaison de l'intensité du signal de ses peptides (intégration et somme de leurs chromatogrammes d'ions).
- Le comptage et la comparaison du nombre de spectres acquis de ses peptides (empiriquement, le nombre de spectres MS/MS acquis pour les peptides d'une protéine est proportionnel à son abondance dans l'échantillon).

Une normalisation globale sur toute l'analyse (somme des intensités ou du nombre de spectres total) ou l'utilisation de standards internes permettent une quantification relative ou absolue.

Deux modes d’acquisition sont décrits comme étant particulièrement intéressants pour les expériences de quantification :

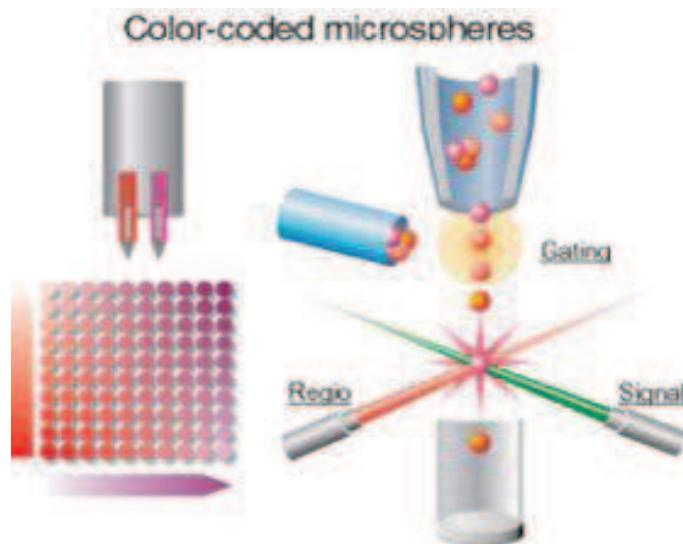
**L’acquisition ciblée par MRM** « *Multiple Reaction Monitoring* » est un mode d’acquisition permettant une détection et une quantification très sensible de molécules ciblées dans des mélanges complexes. Son avantage principal est de permettre la détection d’un ion même lorsque celui-ci est masqué par d’autres présents sur le même spectre [243]. Le mode MRM est généralement mis en œuvre grâce à l’analyseur triple quadripolaire. Il permet le suivi d’un seul ion spécifique, détecté par filtrage dans le premier quadripôle du précurseur cible parmi tous les autres et après fragmentation, par la sélection dans le troisième quadripôle des fragments spécifiques attendus. Seules les molécules répondant à ces deux critères (précurseur de m/z fixé produisant les fragments attendus) seront détectées. Cette méthode ne s’applique donc que pour les études ciblées de protéines aux espèces dont le profil de fragmentation est établi.

Le **mode MS<sup>E</sup>** qui utilise l’approche opposée [244] : tous les précurseurs et les fragments de tous les précurseurs sont détectés quasi simultanément. Ce mode est très favorable aux approches de quantification sans marquage, car il n’impose pas de sous échantillonnage comme en mode classique. Cependant, il présente des désavantages importants : une faible sensibilité sur les spectres de fragmentation des peptides peu abondants est notamment à déplorer [245].

A côté de ces nouvelles méthodes, s’est récemment développée sur le marché la technologie **LUMINEX** qui est fondée sur le principe de la cytométrie de flux, l’utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Actuellement, un panel de 100 billes de taille de 5,6 µm de diamètre, renfermant un ratio différent de fluorescence rouge et orange est utilisable. Ces différentes billes peuvent être couplées à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des peptides ou des anticorps, permettant ainsi la détection d’allèles, d’anticorps ou de peptides.

Les billes, mélangées au début de l’analyse, sont entraînées dans la veine liquide de manière à ce qu’elles soient les unes à la suite des autres (analogie avec la cytométrie de flux), séparées et identifiées pendant la phase d’acquisition des données [246, 247]. À la sortie de la veine liquide, les billes excitées par le laser rouge à 633 nm vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm). Chaque bille émet de nouveau d’une façon différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux. Chaque bille a ainsi son propre code couleur d’identification et

plusieurs billes différentes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube ce qui multiplie considérablement les possibilités d'analyses (**Figure 64**).



**Figure 64:** La technologie LUMINEX (d'après *Luminex Corp.*)

Utilisée en immunologie pour quantifier des cytokines pro-inflammatoires (TNF, IL-6 IL-8), dans le sérum de sujets sains, cette méthode a des performances de dosages équivalents à ceux réalisés avec un test ELISA [248]. Une étude plus récente prouve la détection et la quantification de 15 cytokines simultanément dans le surnagent de culture cellulaire mononucléées issus d'individus sains et de patients atteints par des maladies auto-immunes. Les résultats étaient satisfaisants, et d'une sensibilité comparable à un test ELISA classique [249].

D'autres équipes ont utilisé la technologie LUMINEX comparativement à une technique ELISA ou à l'immunofluorescence, afin de quantifier des auto-anticorps, les résultats montrent une concordance entre cette technologie et les méthodes de routine [250]. Malgré l'émergence de toutes ces techniques, actuellement en milieu hospitalier, le test ELISA est toujours le test prévalent pour la quantification de biomarqueurs sériques par exemple. Ce test utilise un anticorps marqué par une enzyme (souvent une peroxydase) qui se lie au substrat spécifique en solution. L'anticorps se fixe proportionnellement au nombre de marqueurs présentes en solution. Le substrat réagissant avec l'enzyme couplé à l'anticorps colore la solution. Le spectroscope UV détermine une absorbance pour la solution à analyser qui est comparée à une gamme étalon. Cette approche permet d'établir la quantité d'anticorps fixée et par conséquent la quantité des protéines présentes (**Figure 65**).

# ELISA

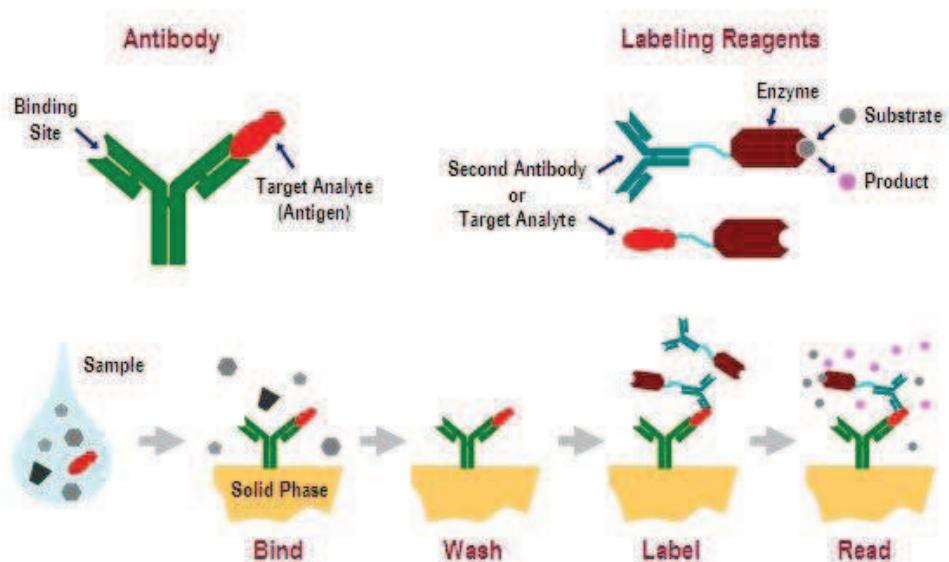
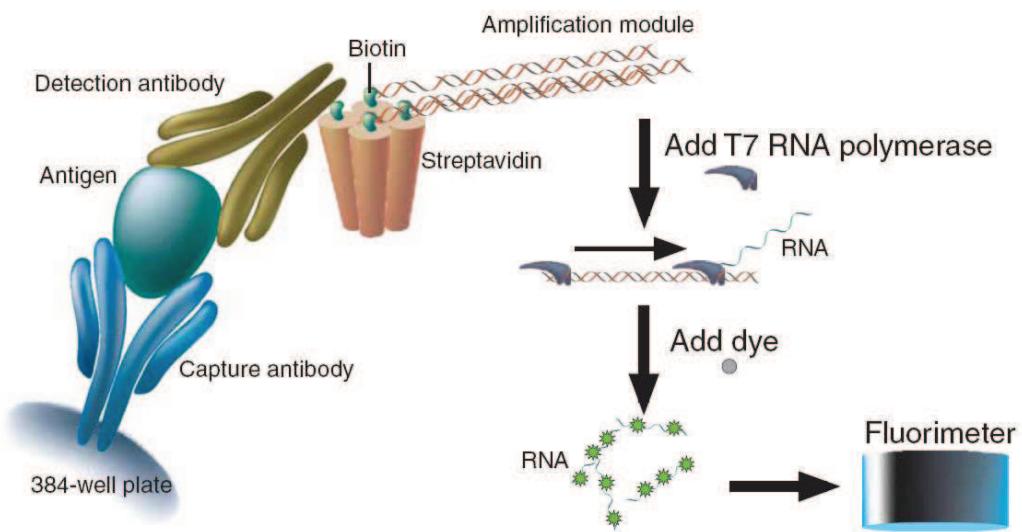


Figure 65: Principe ELISA (d'après *Methods of Study of Viruses*)

La recherche de nouveaux moyens de détection de marqueurs dans les fluides biologiques a pris de l'importance au cours de ces dix dernières années dans le but d'augmenter la sensibilité, la reproductibilité et la vitesse de l'analyse. Mais, la méthode la plus utilisée pour la détection et la quantification de marqueurs reste la méthode ELISA (*Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay*). L'inconvénient majeur de cette méthode est son limite de détection relativement faible. Cependant, avec l'essor de la MS, des nouvelles méthodes essayant de combiner ces nouvelles techniques avec la technique d'immunoassay ont surgi.

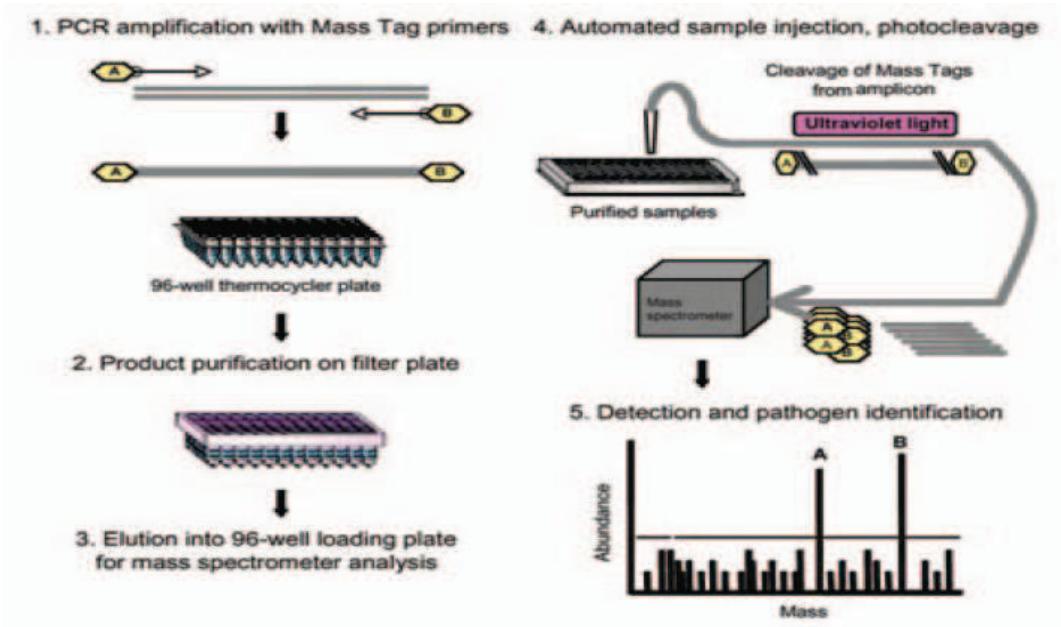
Les premiers travaux réalisés dans ce sens ont mis en évidence en 2001, l'association de la technique ELISA avec la spectrométrie de masse par l'intermédiaire de cônes de pipette greffés avec des anticorps afin de récupérer l'antigène correspondant et de l'analyser par spectrométrie de masse [251]. Des travaux ont par la suite adaptés cette approche combinatoire entre l'ELISA et la MS à la détection des acides nucléiques. Pour ce faire, une molécule de biotine jouant le rôle de ligand fonctionnalisable, est couplée à un site couplé à un substrat chromogène molécule de streptavidine). Ce procédé a tout d'abord mis en évidence la détection d'ADN et d'ARN par cette méthode [252].

D'autres approches ont également été développées en proposant un couplage entre des anticorps greffés sur des billes magnétiques destinées à capturer et quantifier des protéines dans un échantillon biologique, par spectrométrie de masse [253]. Dans le même temps, une approche similaire s'est destinée à la détection des protéines sériques par fluorimétrie (**Figure 66**) [254].



**Figure 66 :** Représentation d'une méthode de quantification par couplage PCR (d'après Zhang et coll. [254])

En 2005, des travaux concernant un système de diagnostic pour la détection différentielle d'acides nucléiques provenant d'agents pathogènes ont été publiés [34]. Ce système rapide et sensible, utilise une nouvelle approche **MassTag PCR**. Des acides nucléiques microbiens sont amplifiés par RT-PCR utilisant des amores marquées par un lien photoclivable de masses moléculaires différentes. Apres réaction d'amplification les amores non incorporées sont enlevées et les étiquettes sont libérées par irradiation UV (**Figure 67**). L'identité de l'agent pathogène est ainsi déterminée par le tag apparenté. Les sondes oligonucléotidiques sont conçues dans les régions génomiques conservées pour détecter le plus grand nombre d'une espèce pathogène donnée. Ce concept MassTag PCR a permis de détecter à ce jour, une vingtaine de pathogènes.



**Figure 67:** Principe Mass Tag PCR (d'après Briese et al [34]).

C'est dans ce contexte de recherche et de quantification des biomarqueurs très concurrentiel que nous proposons une variante de ces principes en utilisant une molécule photoclivable permettant la détection et la quantification des protéines dans un échantillon biologique par l'intermédiaire de la MS.

### 3.2. Nouveaux tests diagnostiques immunoenzymatiques couplés à une détection par spectrométrie de masse : ISA-MS et PCR-MS

En raison de la différence fondamentale entre petites et grandes molécules, leur quantification dans les milieux biologiques fait appel à des techniques différentes.

Les études analytiques des petites molécules se font essentiellement par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse, alors que les macromolécules sont quantifiées par des dosages d'affinité de ligands. Les protéines sont ainsi majoritairement quantifiées par immunodosages, techniques basées sur la reconnaissance de l'analyte par un anticorps, que ce soit par ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ou RIA (*Radio Immuno Assay*).

Les immunodosages regroupent l'ensemble des méthodes analytiques quantitatives mettant en jeu la réaction antigène-anticorps. Depuis la première description du dosage de l'insuline en 1959 par Rosalyn YALOW [255] et Solomon BERSON [256], de nombreux

développements sont intervenus, donnant un essor important à ces méthodes. Les progrès de l'immunologie ont permis, dans un premier temps, d'obtenir des anticorps polyclonaux de bonne qualité, dirigés à la fois contre des petites molécules et contre des molécules de masses moléculaires élevées.

En 1975, Köhler et Milstein ont obtenu des anticorps monoclonaux, dont l'utilisation améliore notamment la spécificité et la sensibilité des techniques d'immunodosages [257].

Pour pouvoir suivre, à l'échelle macroscopique, les associations antigène-anticorps, un troisième élément est utilisé : le traceur. Celui-ci résulte de la modification de l'anticorps ou de l'antigène par ajout d'un marqueur. Longtemps, seuls les marqueurs radioactifs ont été utilisés et dont les qualités essentielles sont liées à leurs propriétés d'émission non modifiées par l'environnement physicochimique, et à leurs sensibilités de détection. Cependant, l'utilisation de la radioactivité présente un inconvénient majeur puisqu'elle est restreinte aux seuls laboratoires agréés pour la manipulation des radioéléments. Des développements méthodologiques importants ont permis de remplacer les éléments radioactifs par des enzymes. Ainsi, des dosages immunoenzymatiques utilisant la technique ELISA ont été développés par Engvall et Perlmann en 1971 pour quantifier une immunoglobuline G [258].

Aujourd'hui, les marqueurs enzymatiques et les marqueurs luminescents ont pris une réelle importance en pratique courante et ont supplanté les traceurs radioactifs. D'autres approches ont été développées comme les marqueurs fluorescents. Les immunodosages sont actuellement les méthodes de choix pour la bioanalyse, à cause de la facilité de leur mise en œuvre, leur faible coût d'analyse et leur haut débit associé à ces techniques.

Malgré une facilité de mise en œuvre, les immunodosages ne permettent pas d'identifier formellement et sans ambiguïté le composé analysé. La spécificité des anticorps utilisés ne permet toujours pas d'éliminer les réactions croisées avec les molécules interférentes. Ainsi en termes de limites de détection [259], il est alors nécessaire de se tourner vers des techniques alternatives permettant d'identifier les molécules analysées avec un seuil de sensibilité plus élevé.

Parmi ces techniques, de nouvelles méthodes de quantification par spectrométrie de masse font leur apparition, avec l'utilisation d'anticorps pour capter la molécule d'intérêt. Etant donné qu'ils peuvent être appliqués dans le cadre des SNP[260], nous avons développé des nouvelles approches qui consistent en utilisation conjointe des tests ELISA, PCR et de la spectrométrie de masse (ISA-MS et PCR-MS respectivement) afin de gagner en sensibilité,

en rapidité et la possibilité de réaliser des études en multiplexe pour quantifier plusieurs molécules dans une même expérience.

### 3.2.1. ISA-MS

Cette approche s'appuie sur les caractéristiques de la MS et le principe de la technique ELISA utilisant un antigène (de concentration connue) permettant d'établir une droite étalon après immunodosage (signal obtenu en fonction de la concentration en antigène présent). La MS est devenue un outil puissant pour la quantification des protéines dans un mélange grâce à sa haute sensibilité, sa rapidité d'exécution et sa spécificité. L'un des modes utilisé pour quantifier les protéines et les peptides par MS est le mode MALDI. Cette technologie permet d'effectuer des analyses simples et rapides d'un échantillon simplement déposé sur une cible métallique.

Habituellement, afin de quantifier une biomolécule (épitope) d'intérêt après reconnaissance spécifique par un anticorps marqué, un système de révélation enzymatique (anticorps couplé à la peroxydase ou FITC) permet de détecter le signal antigène-anticorps ou aptamère ou lectines. L'intensité de la coloration étant mesurée par un spectrophotomètre est proportionnelle à la quantité d'anticorps et par conséquent à la quantité d'antigène présent. En ISA-MS, la détection du signal (peptide tag) se fait dans le spectromètre de masse. Une quantification est alors réalisable après corrélation entre la quantité d'anticorps, aptamers, lectines marqués et la quantité d'antigène déposé dans le puits. La droite étalon réalisée permet la quantification de la molécule recherchée dans les fluides en reportant la valeur enregistrée lors de l'analyse sur la droite étalon (intensité relative MALDI en fonction de la concentration d'antigène). L'intersection des deux donne la concentration en antigène contenue dans les puits de microtitration.

Des études par ISA-MS pourront être conduites sur des fluides biologiques (plasma, liquide céphalorachidien, liquide d'ascite) mais aussi à partir de frottis ou de tissus afin de rechercher la présence de marqueurs spécifiques (biomarqueurs, pathogènes, polluants biotiques ou abiotiques) de pathologies et ce très rapidement et avec une très grande sensibilité. Le suivi du traitement par antibiothérapie par exemple ou d'autres drogues sera favorisé par cette technologie.

L'ISA-MS (Immuno Sorbent Assay-Mass Spectrometry) est une technique qui couple la technique d'ELISA et la MS. Dans ce contexte, une liaison photoclavable sous UV entre un

anticorps et un peptide marqueur est réalisée (Figure 68). Le peptide libéré est ensuite analysé par MS.

La synthèse de molécules portant un groupement photoclavable étant peu aisée, celle-ci a été réalisée en collaboration avec la société Eurogentec (Liège, Belgique). Nous avons choisi de débuter nos recherches en utilisant différents peptides de séquences connues comme marqueurs.

Le système photoclavable est globalement constitué de trois parties (Figure)

- Une partie correspondant à l'élément de reconnaissance comme l'anticorps dans le cas de ELISA-MS mais peut être remplacé par un aptamère, une lectine ou une bille de biotine-streptavidine,
- Un groupement (**PC**) constitué **d'un bras de liaison** plus de la **partie photo clivable** dans le domaine de l'UV (photodissociation),
- a partie **peptidique interchangeable**, détectable par son m/z lors de sa libération après photoclavage et liée par sa partie C-terminale au bras de liaison au travers d'un pont disulfure formé par ajout d'une cystéine.

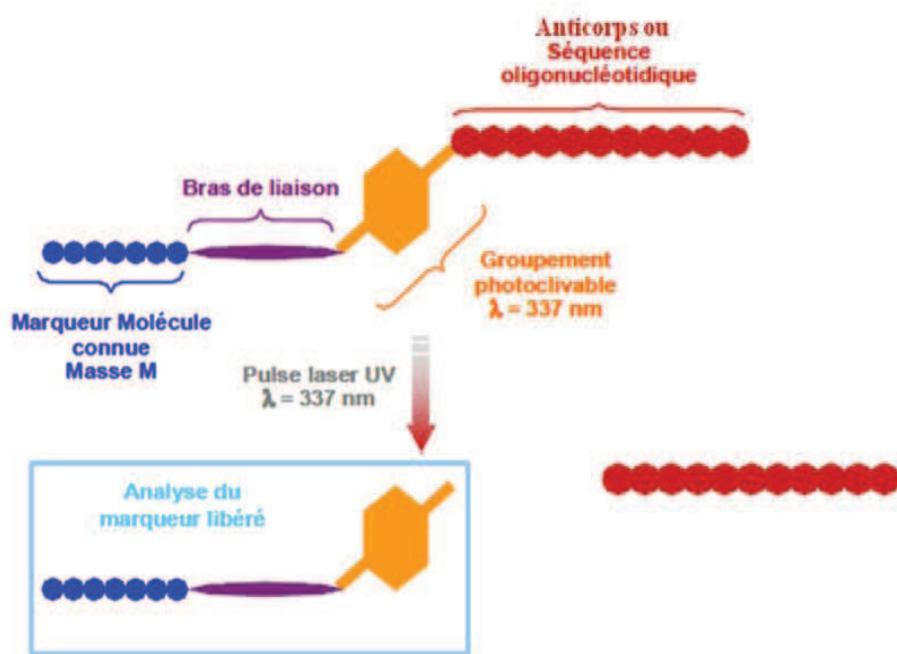


Figure 68: Schéma de principe de l'analyse indirecte par tag-mass

## Protocole de l' ISA-MS

La technique d'hybridation est comparable à celle de l'analyse par ELISA, où un antigène A est fixé au fond d'un puits (différents types de surfaces de plaques existent offrant des caractéristiques physiques et de fixation différentes). Un anticorps spécifique dirigé contre l'antigène est ajouté, se fixant sur l'antigène. A l'issue de la fixation de cet anticorps marqué, l'ensemble est placé sous UV afin de libérer le peptide issu du photoclavage du lien présent entre le peptide et l'anticorps taggé, permettant ainsi la récupération du peptide et sa quantification par spectrométrie de masse (**Figure 69**).



**Figure 69:** Schéma de l'ISA-MS

Les étapes sont les suivantes :

- La première étape consiste à fixer l'antigène pendant 1 heure à 37° C dans un incubateur. 50µL de l'échantillon sont déposés en mélange avec 50µL de solution carbonate/bicarbonate pH 9,6. L'anticorps est successivement dilué dans les puits adjacents. Plusieurs lignes sont ainsi réalisées à partir d'une solution mère à 5µg/mL.
- La deuxième étape consiste à faire 3 lavages dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline 0,1M) afin d'éliminer le surplus d'antigène non fixé au fond des puits.

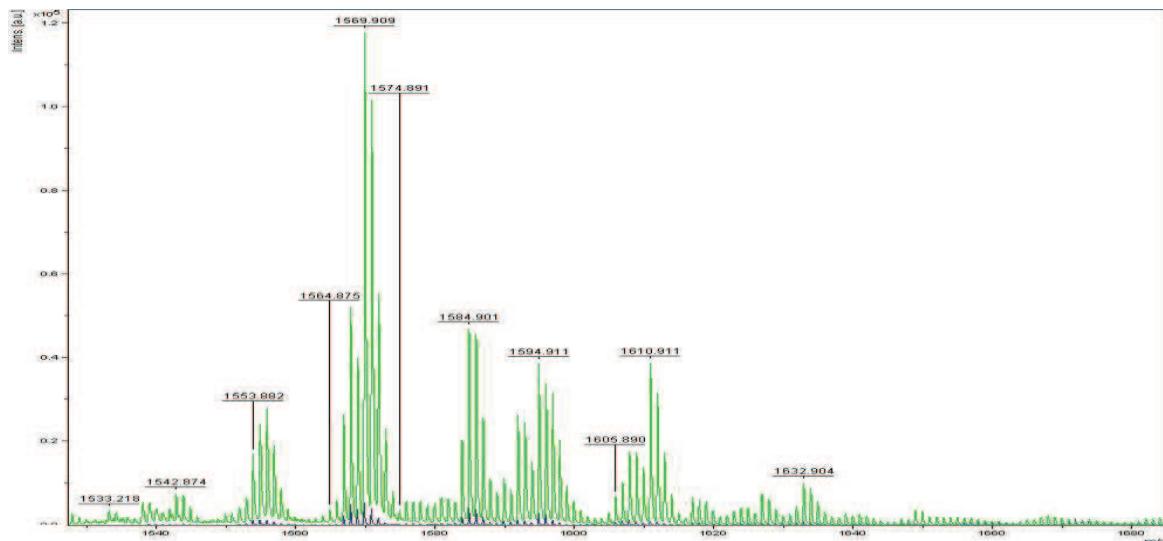
- La troisième étape consiste à saturer les sites non spécifiques par l'intermédiaire d'une solution de lait à 15 % dans du PBS (incubation 1heure à 37° C, sous agitation) et la fixation de l'anticorps primaire.
- La quatrième étape est une étape de 3 lavages successifs dans une solution de PBS afin de préparer la fixation de l'anticorps marqué avec la liaison photoclavable associée au peptide rapporteur.
- La cinquième étape consiste à fixer l'anticorps secondaire marqué sur l'antigène.
- La sixième étape consiste à laver 3 fois avec la solution de PBS 0,1M et de l'eau afin d'éliminer l'anticorps marqué en excès et non fixé et de préparer l'analyse en MS.
- La septième étape consiste à cliver la liaison photoclavable sous une lampe UV (incubation pendant 15 minutes) et ajouter 30µL d'eau pour resuspendre l'ensemble.
- La huitième étape consiste à analyser par MALDI-TOF de la solution obtenue. Pour cette analyse l'échantillon est déposé (1µL) sur une cible avec de la matrice HCCA (10mg/mL) qui permet le transfert d'énergie du laser (337nm) à l'échantillon et l'ionisation-désorption de celui-ci. Les spectres obtenus montrent l'ensemble des molécules ionisées en fonction du rapport masse sur la charge (m/z). Ici nous recherchons l'ion caractéristique du peptide rapporteur i.e. la bradykinine (H2N RPPGFSPFRC-CONH2) (avec l'ajout de la cystéine associée à la liaison photoclavable). Le rapport m/z attendu est de 1163,6 (**Tableau 16**).
- L'intensité du pic après normalisation (débruitage qui permet la suppression du bruit de fond et l'alignement spectral sans affection du signal) des spectres permet la quantification du peptide rapporteur ainsi corrélé à la quantité d'antigène déposé dans le puits de microtitration.

Nom	Peptide	Massé peptide seul	Massé attendue après clivage	Remarques
Ac-Tag	H2N-RPPGFSPFRC-CONH2 (bradykinine+Cystéine)	$(M+H)^+ = 1163,6$	$(M+H)^+ = 1569,9$ $(M+H+O)^+ = 1684,9$	AC secondaire anti- lapin Groupement photoclivable M= 406,3 u

**Tableau 16:** Exemple de Tag utilisé dans nos études, ainsi que les masses attendues après clivage

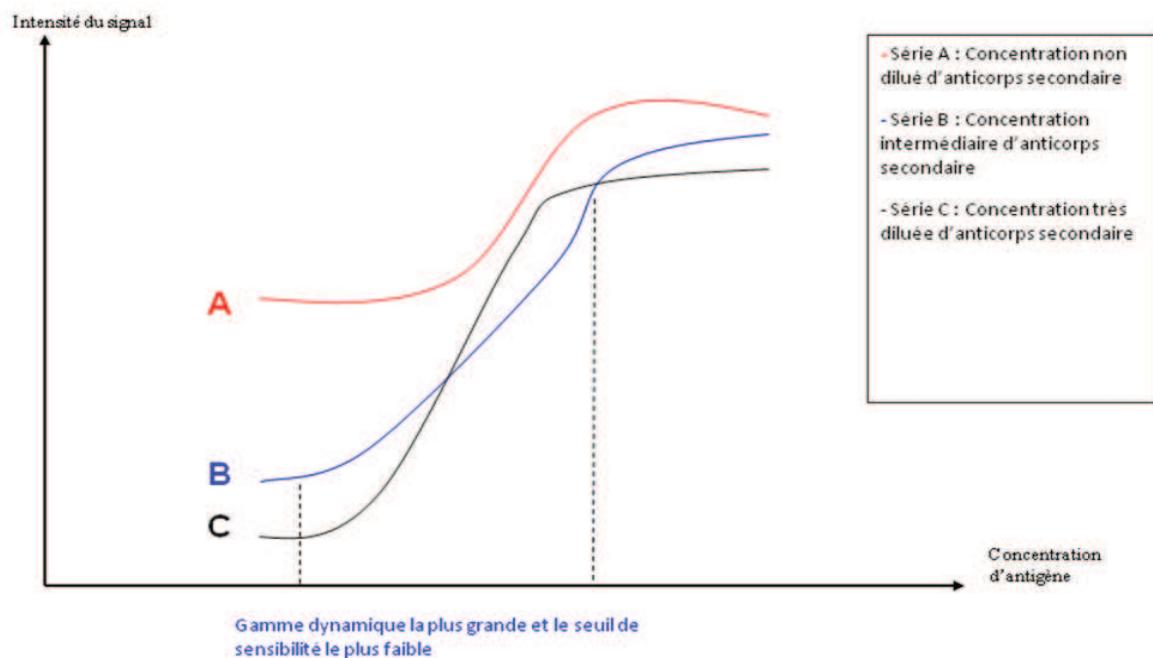
### 3.2.1.1. Application

Dans ce cadre, notre approche, comme c'est le cas pour l'ELISA, l'anticorps se fixe à l'antigène vers lequel il est dirigé. Après clivage par UV, le peptide est libéré en solution puis analysé par spectrométrie de masse. Cette approche nécessite donc d'optimiser le temps d'incubation sous la lampe UV de la plaque contenant les anticorps. Les tests montrent que 15 minutes sont suffisantes pour atteindre le plafond de libération du peptide rapporteur (**Figure 70**).



**Figure 70 :** Spectres MALDI du Tag-Mass. En bleu, le signal obtenu sans utilisation de lampe UV. En vert signal obtenu avec irradiation 15 minutes sous lampe UV

Dans un second temps, différentes gammes de dilution ont été réalisées afin de déterminer la gamme de concentration la plus large ayant la sensibilité la plus forte et un bruit de fond faible. Le bruit de fond correspond au puit n'ayant pas reçu d'anticorps primaire et où seul l'antigène et l'anticorps secondaire sont déposés. On a alors un signal provenant de la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire. (**Figure 71** ).



**Figure 71:** Représentation graphique des différentes séries de mesures d'intensité relative MALDI en fonction de la concentration d'antigène. Chaque série est réalisée avec une concentration d'anticorps secondaire différente de la moins diluée vers la plus diluée.

Cette valeur doit être la plus faible possible et elle détermine le seuil minimum de détection (visible sur la valeur basse la **Figure 71 graphe B**). L'étude de la variation de la dilution de l'anticorps primaire marqué en fonction de la concentration d'antigène montre que la gamme de lecture est obtenue pour une dilution d'anticorps au 1/16ème. De plus cette gamme de dilution détermine en une seule réaction la sensibilité de l'approche ISA-MS, et la plage d'utilisation de l'anticorps marqué. Le seuil de détection est atteint avec une dilution de  $2^{15}$  soit une dilution de l'antigène de 1/32768. La quantité d'antigène détectée est de l'ordre de 10 fg d'antigène. La performance de l'analyse MALDI couplée à l'utilisation de matrice ionique spécifique et d'un système de concentration du produit à analyser permet de détecter des concentrations en antigène de l'ordre  $10^{-16}$  moles repoussant ainsi les limites de la quantification par test immuno-enzymatique couramment employé dans le milieu hospitalier et clinique.

Les résultats sont présentés dans l'article Stauber J\*, El Ayed M\*, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. (Polymerase chain reaction and immunoassay--matrix assisted laser desorption mass spectrometry using tag-mass technology: new tools to break down quantification limits and multiplexes. Anal Chem. 2009 Nov 15; 81(22):9512-21.

A côté de l'ISA-MS, il est également possible de développer une stratégie pour les ANR et l'analyse transcriptomique par PCR couplée à la spectrométrie de masse.

### 3.2.2. PCR-MS

Deux types de stratégies peuvent être développées, soit l'utilisation d'une sonde oligonucléotique marquée du côté 5', soit d'une base de type Uracile est marquée directement (**Figure 72**). Les procédés de synthèses sont déjà présentés dans la publication et il fait état d'un brevet (WO2007/00669)

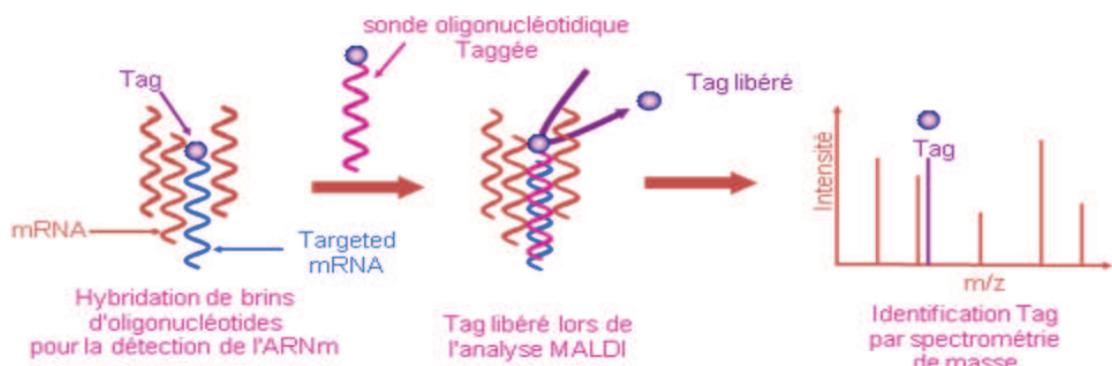


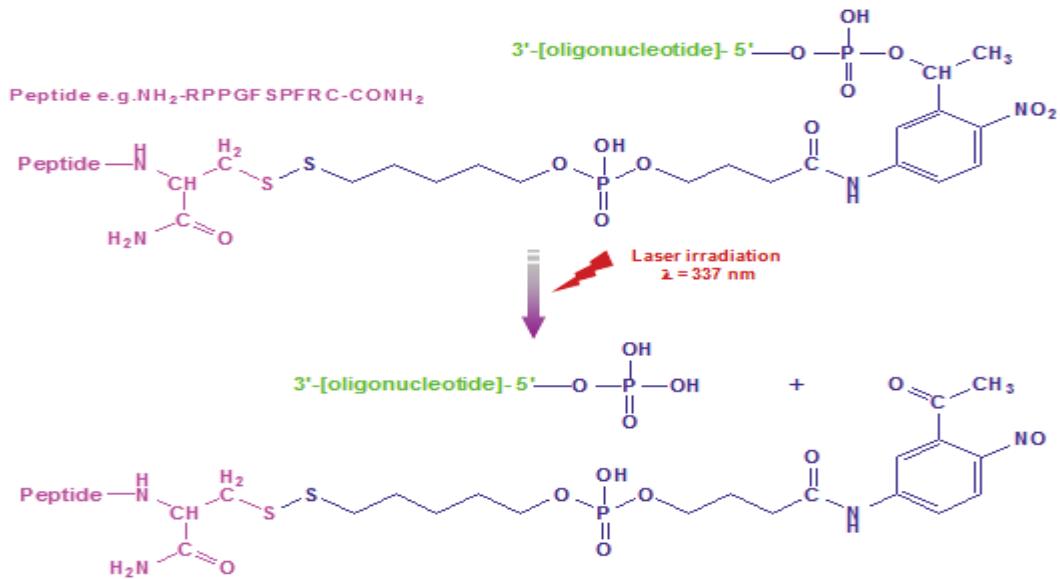
Figure 72: Schéma du principe de la PCR-MS

#### Cas 1 : Primer marqué en 5'

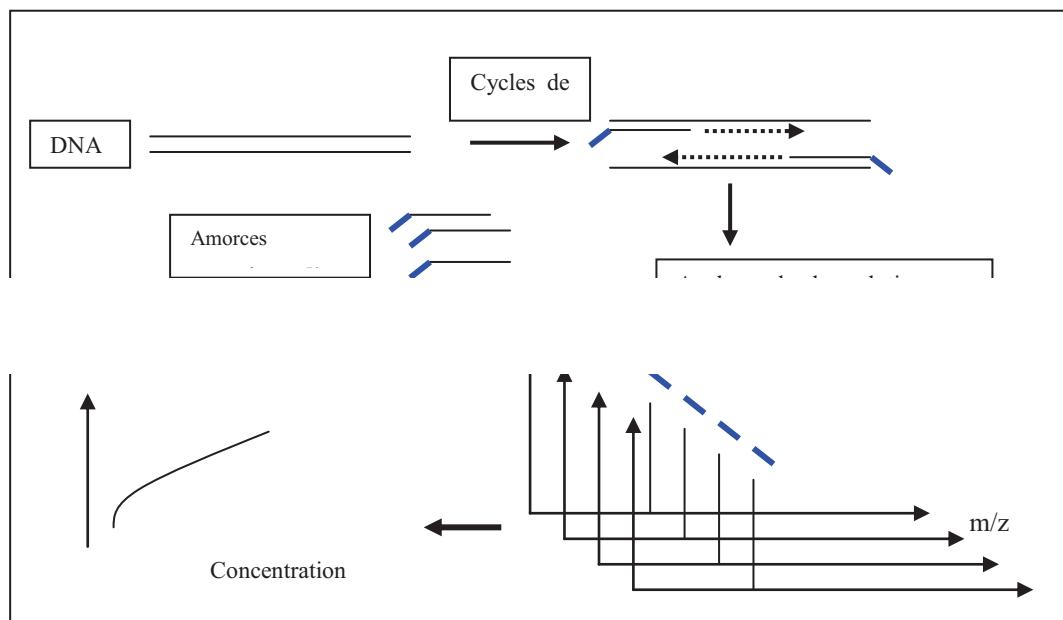
##### Amplification d'Oligopeptides Marqués par Technique PCR

La stratégie choisie consiste à synthétiser des amores PCR portant les marqueurs Tag-mass puis de réaliser l'amplification de la sonde par technique de PCR classique (**Figure 73 et 74**). La première étape de cette étude consiste à tester la compatibilité des oligonucléotides marqués avec la technique PCR et de vérifier la possibilité d'utiliser l'ensemble des sondes dans une même approche. Cette approche a été validée dans notre étude avec une séquence correspondant à la protéine Calmodulin Binding Protein (CBP) de souris, protéine redondante chez la souris (la séquence marquée GAC CAG ATC TTG CCG

TCT). Différents températures ont été utilisées dans le but d'optimiser la PCR. Un gel d'agarose avec bromure d'éthidium (BET) a été réalisé afin d'observer la bonne synthèse des sondes ADN marqués. Les résultats ont validé le concept mais avec une sensibilité relative. Il a donc fallu développer une nouvelle stratégie de poly-marquage.



**Figure 73:** Formule développée du marqueur utilisé pour l'amplification PCR.



**Figure 74 :** Méthode de PCR MS. La PCR est réalisée avec une séquence marquée avec un Tag-Mass. Une gamme étalon avec des concentrations connues est réalisée avec un échantillon test. Une courbe est tracée en fonction de la concentration des échantillons témoins et du signal obtenu avec le spectromètre de masse, donnant ainsi la concentration de l'échantillon test.

### **3.2.2.1. Application du cas 1**

Les amorces marquées sont utilisées pour amplifier un fragment de la proenképhaline. Le gel d'agarose avec BET présente une seule et même bande pour toutes les conditions correspondant à un fragment d'amplification de 400 pb. Il est intéressant de constater que la présence du marqueur sur l'une des amorces voir sur les deux simultanément ne gêne pas l'expérience et permet d'amplifier le fragment attendu. Les fragments obtenus par amplification ont été séquencés et les séquences montrent qu'ils correspondent bien à un fragment de la proenképhaline. Des analyses en MALDI ont été essayées après purification sur colonne de silice des produits de PCR afin de vérifier (malgré la difficulté d'analyse sur échantillons issus de PCR) si le marqueur n'avait pas subi d'endommagement lors des différentes étapes.

Les résultats sont présentés dans l'article

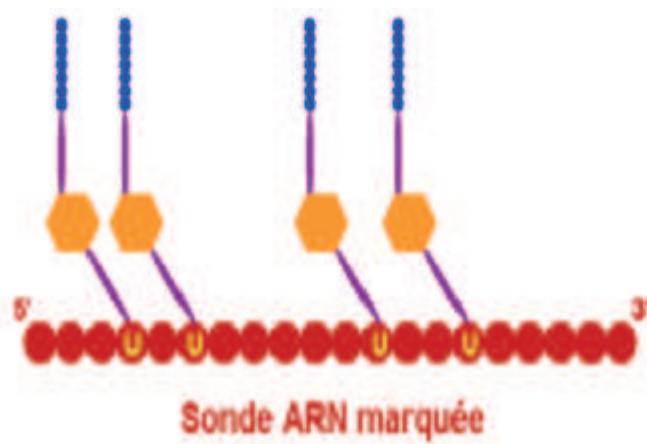
Stauber J\*, El Ayed M\*, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. (Polymerase chain reaction and immunoassay--matrix assisted laser desorption mass spectrometry using tag-mass technology: new tools to break down quantification limits and multiplexes. Anal Chem. 2009 Nov 15; 81(22):9512-21.

### **Cas 2 : Uracile Taggé**

Afin d'augmenter la sensibilité pour la détection des marqueurs, une seconde génération de marqueurs a été conçue. Cette nouvelle génération de molécules a aussi été dessinée pour pouvoir réaliser des ribosondes, sondes couramment utilisées à l'heure actuelle en HIS et qui permettent d'assurer que l'hybridation se fait uniquement sur les ARNm et non sur de l'ADN génomique. Cependant, la réalisation des ribosondes passe par une transcription *in vitro* impliquant que les deux extrémités 5' et 3' de la sonde soient libres. Hors, le marqueur de premières générations présenté précédemment est fixé sur la partie 5' des oligonucléotides. Le concept proposé, ici est de greffer le marqueur sur la base du nucléotide afin de dégager les extrémités. La stratégie choisie est de réaliser la synthèse de nucléotides modifiés portant sur la base le marqueur. Nous avons choisi de modifier la base uracile dans une première approche. Cette stratégie conduira alors, lors de la réalisation de la ribosonde, à l'incorporation d'une uracile modifiée par le marqueur à la place de chaque uracile devant être introduite dans la séquence de la sonde. Au final, la sonde possèdera autant de marqueurs

que d'uraciles dans sa séquence (**Figure 75**). Ceci devrait permettre, outre la possibilité de travailler en ribosondes, d'augmenter la quantité de marqueurs et devrait faciliter nettement la détection du peptide attendu.

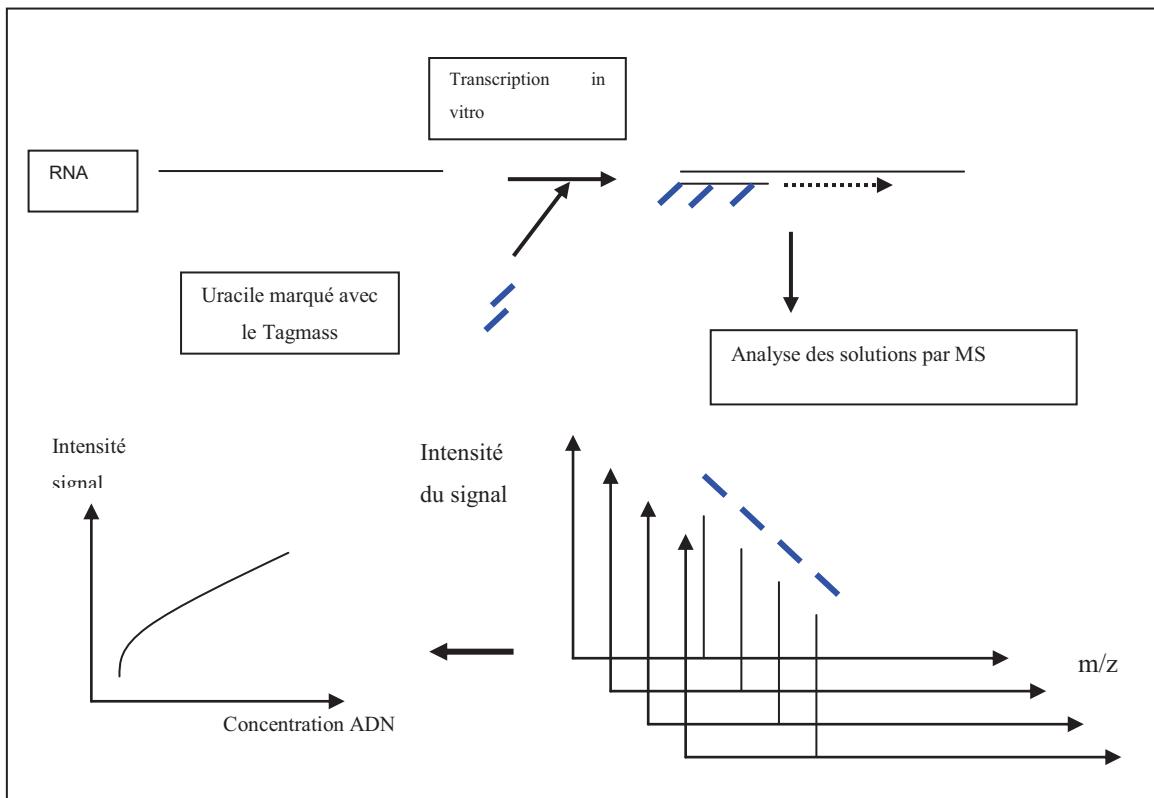
Un concept similaire a été développé par le groupe de Bai avec clivage à l'aide d'une lampe UV puis analyse par MALDI –TOF [261]. Ce concept se rapproche également des sondes avec uracile marquée à la digoxigénine couramment utilisées actuellement pour l'HIS [262]



**Figure 75 :** Schéma de principe d'uraciles marqués permettant la réalisation de ribosondes

Cette fois-ci des amorces conventionnelles sont utilisées dans les deux cas. La première ribosonde est amplifiée avec des uraciles et la deuxième avec des uraciles marqués (**Figure 76**). Nous avons choisi comme peptide marqueur de cette séquence la Bradykynine. A titre d'exemple, en reprenant la séquence de la sonde proenképhaline précédemment amplifiée, la réalisation de la sonde devrait entraîner l'incorporation de 79 uraciles modifiés, et en conséquence conduire à une bien meilleure sensibilité de détection.

Après transcription et purification, ces deux sondes sont analysées par spectrométrie de masse MALDI et en gel d'agarose avec BET (pour vérifier la taille des transcrits).



**Figure 76 :** Méthode de PCR-MS. La transcription est réalisée avec un uracile marqué avec un Tag-Mass. Une gamme étalon avec des concentrations connues est réalisée avec un échantillon test. Une courbe est tracée en fonction de la concentration des échantillons témoins et du signal obtenu avec le spectromètre de masse, donnant ainsi la concentration de l'échantillon test

### 3.2.2.2. Application cas 2

Les uraciles modifiées ont été utilisées pour réaliser l'amplification de la même sonde Proenképhaline (400 pb.) que précédemment. Cette fois-ci des amorces conventionnelles sont utilisées dans les deux cas. La première sonde est amplifiée avec des uraciles et la deuxième avec des uraciles marquées. Après RT-PCR et purification, ces deux sondes sont analysées par spectrométrie de masse MALDI. En parallèle, les produits de PCR sont séparés en gel d'agarose avec BET. En utilisant les bases C, G, A en quantités classiques et l'uracile modifiée, les gels ne présentent pas de bande d'amplification. Les paramètres de RT-PCR sont donc modifiés en modifiant les quantités de dNTP. C, G et A sont alors utilisées en quantité classique avec un mélange dU marquée et dTPP dans un rapport 1 :3. Les difficultés rencontrées sont similaires à celles rencontrées dans le cas de l'uracile marquée à la digoxigénine nécessitant également la modification des quantités de dNTP pour obtenir des

amplifications. Ce phénomène est vraisemblablement lié à un problème d'encombrement stérique par le marqueur. Dans ces conditions, les gels d'agarose obtenus permettent d'observer pour les deux cas une bande d'amplification à la même valeur de poids moléculaire et correspondant au poids attendu pour le fragment de proenképhaline étudié.

Les résultats sont présentés dans l'article

Stauber J\*, El Ayed M\*, Wisztorski M, Day R, Fournier I, Salzet M. (Polymerase chain reaction and immunoassay--matrix assisted laser desorption mass spectrometry using tag-mass technology: new tools to break down quantification limits and multiplexes. Anal Chem. 2009 Nov 15; 81(22):9512-21.

### 3.3. Conclusions et perspectives

Nous proposons ici deux méthodes nouvelles de quantification par Tag-mass par spectrométrie de masse avec une très bonne sensibilité (gain d'un facteur 1000 par rapport aux méthodes classique d'ELISA) et la réalisation d'analyse de transcrit en multiplexe par PCR-MS. Ces deux nouveaux tests permettent à la fois de détecter des concentrations très faibles d'analytes en un temps très court (deux heures) avec une sensibilité beaucoup plus faible que celle utilisée actuellement en ELISA dans le milieu clinique et celui de la recherche biologique. Sans avoir atteint ses limites de sensibilité, la méthode montre déjà certains avantages : **La sensibilité** est bonne puisque 1000 fois inférieur à la méthode d'ELISA. De plus, elle a l'avantage de pouvoir quantifier un nombre très important de molécules dans une même expérience.

Il est possible d'utiliser entre 20 et 30 sondes différentes et ainsi réunir en unique expérience un marquage simultanée de biomolécules appelée **multiplexe**. Le gain de temps inhérent est important si on considère par exemple 4 ou 5 marqueurs. Aujourd'hui il est reconnu qu'un seul biomarqueur spécifique n'est probablement pas suffisant pour déterminer une pathologie de façon précise. On considère alors que plusieurs marqueurs sont à corrélér et à quantifier dans une même approche pour déceler une éventuelle maladie. Il est donc nécessaire de posséder des outils permettant de les quantifier et de réaliser un diagnostic facile à mettre en œuvre et sûre. L'outil développé de quantification par spectrométrie de

masse et Tag-mass répond à ces dispositions avec un gain de temps et une sensibilité qu'aucune approche ne permette aujourd'hui.

De plus, l'utilisation d'autres sondes comme les aptamers va également permettre de diminuer l'encombrement stérique et augmenter le nombre de marquage par molécule : la sensibilité en sera alors augmentée. Cette sensibilité est un enjeu important aujourd'hui pour la mise en place d'outils diagnostiques ou pronostiques. Dans un très grand nombre de cas pathologique ou simplement de recherche de molécules, le seuil est un facteur limitant. L'adjonction d'un outil puissant de spectrométrie de masse avec les anticorps, les ribosondes ou les aptamers permet d'entrevoir de belles perspectives d'applications.

Cependant, des optimisations rapides sont envisagées avec l'utilisation par exemple de plaque Anchorchips (cible MALDI de surface hydrophobe avec des points de dépôts hydrophiles) qui permettent de gagner généralement un gain de sensibilité d'un facteur 10. De plus, la totalité de l'échantillon n'est pas reprise lors du dépôt sur la plaque MALDI. En effet, un microlitre est déposé parmi les 30 µL utilisés pour reprendre l'échantillon après clivage aux UV. On peut estimer qu'un gain d'un facteur 20 à 30 est envisageable ce qui donnerait un gain d'un facteur 10000 à 20000 par rapport à une approche de type ELISA. Il est bien évident que cette approche peut être développée sur d'autres appareils de spectrométrie de masse puisque le peptide est en solution. Il peut être injecté en electrospray par exemple qui a l'avantage de ne pas utiliser de matrice et de réaliser des études en mode SRM pour la quantification du peptide ou MRM en mode multiplexe. Cette approche permet d'utiliser toute la sensibilité de la spectrométrie de masse (atomole) et la spécificité des anticorps ou des aptamers mais aussi des lectines. De plus, avec un mode multiplexe envisageable, il est alors possible de réaliser des quantifications rapides de plusieurs molécules d'ARNm ou des protéines en une étape unique.

Cependant, plusieurs aspects restent encore à étudier :

- 1.** L'optimisation des protocoles PCR avec la base modifiée
- 2.** L'étude de différents type de marqueurs (peptides, petits composés organiques, biotine, matrice) afin de déterminer ceux présentant la plus grande sensibilité d'analyse et permettant d'atteindre les plus faibles quantités d'ARNm
- 3.** L'estimation du taux d'hybridation de la sonde marquée avec des ARNm extraits de tissus par technique du DOT-BLOT

- 4.** La réalisation d'études de multi hybridations (détermination du nombre maximum de sondes pouvant être hybridées et analysées par MALDI par expérience)
- 5.** La quantification par mode SRM puis MRM en mode multiplexe
- 6.** L'application aux pathologies

# Polymerase Chain Reaction and Immunoassay—Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry Using Tag-Mass Technology: New Tools to Break Down Quantification Limits and Multiplexes

J. Stauber,<sup>†</sup> M. El Ayed,<sup>†</sup> M. Wisztorski,<sup>†</sup> R. Day,<sup>‡</sup> I. Fournier,<sup>\*,†</sup> and M. Salzet<sup>\*,†</sup>

University de Lille1, CNRS, MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Villeneuve d'Ascq F-59655, France, and Université de Sherbrooke, Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

We present a new development of the Tag-Mass concept based on a photocleavable linker with tagged molecules for polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantification coupled to mass spectrometry. PCR-MS and immunosorbent assay-MS with tagged oligonucleotides, bases, and antibodies will allow the acquisition of multiplexed information from genomic, transcriptomic, and proteomic experiments. This is a novel application of Tag-Mass from tissue imaging to fluid quantification and will open doors to several clinical applications ranging from biomarker-driven gene modulation to use at the patient's bedside following treatment.

Detection and quantification methods are nowadays unavoidable in the process for characterizing molecules. Since the development of the first quantification methods, new applications have been developed in both public and private domains, including antidoping control and clinical and fundamental research. Three major developments in the quantification domain, directly linked to technological advances of the 20th and 21st centuries, have allowed for increased sensitivity and reproducibility, two key factors in quantification.

The first methods of quantification for biological assays were colorimetric chemical methods, which are linked to the specific reactivity of substrates present in urine<sup>1</sup> or blood.<sup>2</sup> These methods are not often used or are employed for a peculiar domain of study. Other more general methods, such as the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),<sup>3</sup> Lowry method<sup>4,5</sup> and Biruet method,<sup>6</sup> have been used for many years. For these approaches, increasing

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: michel.salzet@univ-lille1.fr (M.S.); isabelle.fournier@univ-lille1.fr (I.F.).

<sup>†</sup> University de Lille1, CNRS.

<sup>‡</sup> Université de Sherbrooke.

(1) Gaskell, J. F. *J. Physiol.* **1907**, *36*, 142–148.

(2) Berger, H.; Antener, I.; Brechbuehler, T.; Stalder, G. *Ann. Paediatr.* **1964**, *202*, 465–482.

(3) Engvall, E.; Perlmann, P. *Immunochemistry* **1971**, *8*, 871–874.

(4) Traul, K.; Larson, D.; Stephens, R.; Wolff, J.; Munch, K.; Mayyasi, S. *J. Clin. Microbiol.* **1975**, *2*, 253–260.

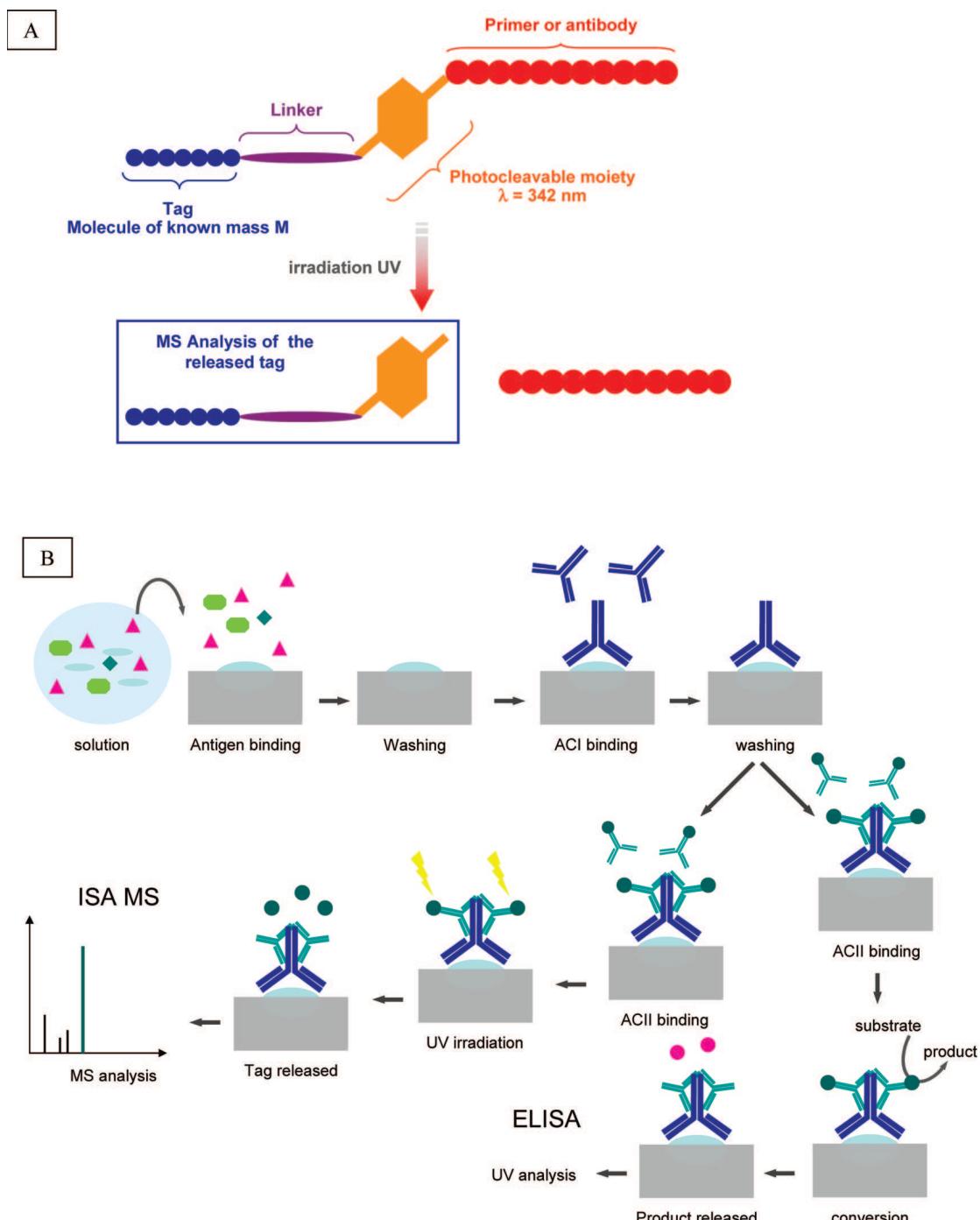
(5) Stephens, R.; Traul, K.; Woolf, D.; Lowry, G.; Lelek, J. *J. Clin. Microbiol.* **1975**, *1*, 225–233.

the sensitivity and reproducibility appear to be the major foci for improving quantification performances. These methods measure components down to a concentration of approximately 1 mg/mL. In ELISA, with the sandwich method,<sup>7,8</sup> the use of a more specific antibody increases the sensitivity to 0.01 mg/mL.

At the end of the 1970s, the development of novel analytical chemical methods such as mass spectrometry (MS) opened the door for expression method studies in the 1980s and innovative discoveries using proteomics in the 1990s. The most current methods routinely employed are ELISA and polymerase chain reaction (PCR). These methods are both robust and sensitive. In 1995, novel techniques using antibodies for assessing the component of interest<sup>9</sup> before analysis by MS were developed; these techniques were refined in 1997 to allow assessment of single nucleotide polymorphisms.<sup>10,11</sup> The technique consisted primarily of using a set of nucleoside triphosphates for selective PCR replication of DNA. One or more of the nucleoside triphosphates were made much heavier by attaching a chemical group, but in such a way that replication was not disturbed. With the use of this technique, a single nucleotide polymorphism in DNA fragments of 40–50 base pairs could easily be made visible by mass spectrometry without further manipulation.<sup>10,11</sup>

Two novel developments have recently been published, with one based on the use of cryodetection for large masses. This technique was used to analyze an antigen–antibody complex.<sup>12</sup> Conversely, Lou et al.<sup>13</sup> used antibodies conjugated to a polymer tag that contained multiple metal chelates and was loaded with lanthanide ions to analyze antibody complexes. Interchain disulfide bonds in the antibody were partially reduced, and the polymer

- (6) Fields, J. P.; Chodosh, S. *Clin. Chem.* **1970**, *16*, 773–775.  
(7) Kato, K.; Hamaguchi, Y.; Okawa, S.; Ishikawa, E.; Kobayashi, K.; Katunuma, N. *J. Biochem.* **1977**, *81*, 1557–1566.  
(8) Kato, K.; Hamaguchi, Y.; Okawa, S.; Ishikawa, E.; Kobayashi, K. *J. Biochem.* **1977**, *82*, 261–266.  
(9) Nelson, R. W.; Krone, J. R.; Bieber, A. L.; Williams, P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1153–1158.  
(10) Luft, F. C. *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 692–693.  
(11) Little, D. P.; Braun, A.; Darnhofer-Demar, B.; Frilling, A.; Li, Y.; McIver, R. T., Jr.; Koster, H. *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 745–750.  
(12) Nazabal, A.; Wenzel, R. J.; Zenobi, R. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 3562–3570.  
(13) Lou, X.; Zhang, G.; Herrera, I.; Kinach, R.; Ornatsky, O.; Baranov, V.; Nitz, M.; Winnik, M. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 6111–6114.



**Figure 1.** (A) Schematic diagram of the photocleavable linker/tag system for indirect detection after photodissociation under the MALDI UV laser wavelength. (B) Schematic representation of ELISA versus ISA-MS procedure.

was attached through its terminal maleimide group to sulphydryl residues on the Fc portion of the antibody.<sup>13</sup> This concept is similar to one our laboratory developed for specific matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) imaging, which allows transcriptome and proteome identification using Tag-Mass.<sup>14</sup> In the Tag-Mass method, the presence of the probe is revealed by the signal in the MS spectra of the Tag reporter. This is obtained by using tagged probes for which reporters are linked to the probe via a photocleavable group. Photocleavage is specific of UV

irradiation at a wavelength close to the wavelength of the laser used in MALDI allowing the release of the reporter during the MALDI analysis (Figure 1A). The reporter has been chosen to be easily detectable in MALDI and indirectly give information on the presence of the probe. Moreover, a quantification assay combined with a modified antibody for detection by IPC-MS was recently developed.<sup>15</sup> The sensitivity of this novel method was similar to that of the classical ELISA method. This method, however, allows multiplexing, whereas ELISA does not.

(14) 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.

(15) Baranov, K.; Volkova, O.; Chikaev, N.; Mechetina, L.; Laktionov, P.; Najakshin, A.; Taranin, A. *J. Immunol. Methods* **2008**, *332*, 73–81.

On the basis of previously proposed Tag-Mass technology, we have developed two novel quantification methods for both transcriptomes and proteomes, the PCR-MS method and the immunoassay-MS method (ISA-MS) (Figure 1B). These methods have revealed to be very sensitive. Using ISA-MS, we were able to detect approximately 250 amol of antigen per well. Thus, immunoassay combined with MS detection is approximately 1000-fold more sensitive than the classical ELISA method.

## MATERIAL AND METHODS

**Materials.**  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), aniline (ANI), 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA), trifluoroacetic acid (TFA), angiotensin II, des-arg-bradykinin, substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38, and bovine insulin were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and used without any further purification. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. were from J.T. Baker.

For Tag synthesis, solvents (DMF, dichloromethane) purchased from Biosolve were of peptide synthesis grade and used without modification. Amino acids, 4-[4-[1-(Fmoc-amino)ethyl]-2methoxy-5-nitrophenoxy] butanoic acid (photocleavable linker) were purchased from Novabiochem. *N*-Methylmorpholine (NMM), *N,N*'-diisopropylcarbodiimide (DIPCD), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), and *N,N*'-diisopropylethylamine (DIPEA) were purchased from Aldrich. Trifluoroacetic acid, 2-(1*H*-benzotriazole 1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate/*N*-hydroxybenzotriazole (TBTU) were purchased from Biosolve, and goat antirabbit IgG and PD 10 (G 25 resin column) were purchased from Sigma. 3-Maleimidobenzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) was purchased from Pierce.

**Solid Ionic Matrixes Synthesis (SIM).** A total of 50 mg of HCCA was dissolved in 20 mL of methanol. An equimolar amount of base aniline was then added. The solution was mixed for 1 h and the solvent evaporated in a vacuum evaporator for 45 min ( $T = 50^\circ\text{C}$ ,  $P = 40$  mbar). The resulting solid ionic matrix [HCCA<sup>-</sup>, ANI<sup>+</sup>] was placed in a desiccator for 30 min to eliminate residual solvent and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Immediately before use, the ionic matrixes were prepared by dissolving 10 mg of compound in 1 mL of acetonitrile/water (2:1, v/v, 0.1% TFA).

**Peptide-Tagged Photocleavable Molecule Synthesis. Photocleavable Tagged Oligonucleotide.** The peptide was synthesized using Symphony (Protein Technologies Inc.) and purified using a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  100A column (Waters Corp., Milford, MA). The oligonucleotide was synthesized from 3' to 5' using Expedite (Applied BioSystem). The amine function with photocleavable linker was added at the 5' terminus before cleavage and deprotection. These steps were performed using a 28% NH<sub>4</sub>OH solution over a 24 h period in the dark. The amino oligonucleotide was then purified using a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  300A column. The amino function of the oligonucleotide was coupled with a heterobifunctional reagent containing a maleimide function. The maleimido oligonucleotide was solubilized in water and added to 1.2 equivalents of peptide in solution. The mixture was then stirred for 16 h. The oligo-peptide conjugate was then purified using a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  300A column and characterized using MALDI-MS (see Mass Spectrometry).

**Photocleavable Tagged Antibody.** Peptides were custom-made by Eurogentec S.A. using solid phase peptide synthesis (SPPS)

on a 0.25 mmol scale using 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) amino-terminus protection (standard synthesis protocols for the equivalent of Fmoc-AA) with double coupling reactions (twice at 40 min each) and TBTU/NMM as an activator on a Symphony synthesizer (Rainin Instrument Co., Woburn, MA). The photocleavable linker (4 equiv) was introduced manually using DIPCDI/DIPEA (2 h) as an activator. Purifications were performed using RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 [15  $\mu\text{m}$ -100A-25  $\times$  100 mm] column using a Waters liquid chromatography system consisting of a model 600 solvent delivery pump, a Rheodine injector, and an automated gradient controller (solvent A, H<sub>2</sub>O/0.125% TFA; solvent B, CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; gradients, 5–15% to 30–60% B in 20 min). Detection was carried out using a model M2487 variable wavelength UV detector connected to the Waters Millenium software control unit. Quality control was performed by analytical RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 column [5  $\mu\text{m}$ -100A-150  $\times$  3.9 mm] (solvent A, H<sub>2</sub>O/0.125% TFA; solvent B, CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFA; gradient, 100% A to 60% B in 20 min) using a Waters Alliance 2690 separation module equipped with a Waters 996 photodiode array detector and by MALDI-TOF MS (see Mass Spectrometry).

Functional analysis using the photolinker derivatized peptide A was performed as follows: a solution of 0.5 mg of MBS in 300  $\mu\text{L}$  of DMF was added to a solution of 4 mg of goat antirabbit IgG in 2 mL of PBS and mixed for 30 min. The solution was then desalted on a PD 10 column using 50 mM phosphate buffer at pH 6. A solution of 1 mg of the photocleavable derivatized peptide in 300  $\mu\text{L}$  of DMF and 1 mL of PBS was then added and stirred for 3 h at room temperature. The reaction mixture was then dialyzed overnight against PBS (membrane cutoff 12–14 000).

**Synthesis of dUTP–Peptide Conjugates with a Photocleavable Linker.** To prepare the triphosphate, an Fmoc-protected CPG resin was required. The succinate was prepared from GT115A (100 mg). The sample was relatively pure but contained a small amount (by TLC) of a higher running nontritylated compound. Since it was not possible to purify the succinate, the reaction was slightly modified to use 1.5 equiv. The reaction did not go to completion (TLC indicated that it reached greater than 50% completion), as determined by comparison of the intensity of the components on TLC (254 nm) and the intensity of the DMT cation on treatment with HCl fumes. Since the nonsuccinylated product did not react, the resin was functionalized using this mixture. However, the loading concentration was very low (5.4  $\mu\text{mol g}^{-1}$  [180 mg]).

The resin was detritylated using 2% TCA/DCM washed with DCM until the DMT cation was completely removed. It was then dried using argon, and the resin was soaked in pyr/DMF 1:3 (0.4 mL) for 5 min before a solution of 0.1 M Eckstein's reagent in dioxane was added (0.1 mL). The reaction was allowed to stand for 15 min. The resin was then washed (dioxane, MeCN) and dried (argon). The resin was again soaked in a solution of 0.5 M bis(tributylammonium) pyrophosphate in anhydrous DMF and tri-*n*-butylamine for 20 min, washed (DMF, MeCN), and dried (argon). The product was oxidized (iodine/water/pyridine/THF for 30 min), washed (MeCN), and dried (argon). The Fmoc protecting group was removed (20% piperidine/DMF, 0.5 mL, 20 min) and the resin washed thoroughly (DMF, MeCN) and dried (argon). The product was then washed with DCI and a solution of DCI/photolabile amino linker CEP (1:1, 0.5 mL) was added.

The reaction was allowed to stand for 20 min. The solution was removed, and the resin was washed (MeCN) and dried (argon). A mixture of cap A/cap B (1:1, 0.5 mL) was added, and the resin was soaked for 5 min before removal of the capping reagents and washing/drying of the resin as before. The product was oxidized ( $I_2$ /THF/pyr/H<sub>2</sub>O, 5 min), and the resin was washed and dried again. The product was then cleaved from the resin with cNH<sub>4</sub>OH at room temperature for 30 min, then purified by anion exchange HPLC on a Dionex NucleoPac100 HPLC column using the solvent system buffer A (0.1 M NH<sub>4</sub>Cl with 10% acetonitrile) and buffer B (1 M NH<sub>4</sub>Cl with 10% acetonitrile) at a flow rate of 2.5 mL/min using 6Triphos.mth. This yielded three fractions (A, -7 min; B, -7.9 min; and C, -10.3 min). All three fractions were lyophilized overnight before desalting by reverse phase HPLC using buffer A (water) and buffer B (acetonitrile) at a flow rate of 4 mL/min. The three fractions were again lyophilized overnight before being suspended in 200  $\mu$ L of water. Mass spectrometry showed that CMM661A pk 1 was definitely not the triphosphate. Rather, the triphosphate was either CMM661pk 2 or 3, which had similar MS profiles (CMM662A was formed from CMM661A pk 2 and CMM663A was formed from CMM661A pk 3). Both samples were then used for the subsequent reaction. Bicarbonate buffer (10  $\mu$ L) and the maleimide NHS ester (50  $\mu$ L) were added to each sample, and the reactions were agitated overnight. The samples were diluted with Milli-Q water (500  $\mu$ L) and filtered. The samples were then purified by RP-HPLC using buffer A (0.1 M TEAA) and buffer B (MeCN) at a flow rate of 4 mL/min with MeCN50.mth. The coupling of the peptide was carried out using these fractions.

**PCR-MS.** Total RNA were extracted from rat brains using Qiazol lysis reagent by homogenizing the samples with 1.4 mm ceramic beads (2  $\times$  45 s, 6500 rpm) in a Precellys24 homogenizer (Bertin, Ozyme, France). RNA extractions were performed according to the manufacturer's instructions. Samples were then treated or not with RQ1 DNase1 (Promega).<sup>16</sup>

One sixth of the first-strand synthesis reaction was amplified for 40 cycles using 1 U Taq polymerase (Eurogentec, Liege, Belgium) and 100 pmol of each forward and reverse primer. The cycling parameters were 94 °C for 90 s, 65 °C for 90 s, and 72 °C for 120 s. Omitting RT or RNA from the reaction mixture resulted in negative control RT-PCR reactions. A 100 bp calmodulin messenger fragment was amplified with tagged or not primer (5' AA GCG GTA CGA GTA GCA 3' reverse primer and oligodT forward primer). Proenkephalin mRNA (mRNA) was also amplified. Tagged or untagged sense (5' CAG GAC TCC CCA AAG GAG AAC AGG A 3') and antisense (5' GAC GTA CCA GGC GGT AGC TGC ATT T 3') primers were deduced from 3' and 5' extremities of the proenkephalin transcript and used to amplify a 400 bp fragment.<sup>17</sup> All PCR products were subcloned into pGEM-T easy vector (Promega), and cDNA clones were sequenced on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). For tagged nucleotides, the best ratio was 1:3 of tagged dUTP and desoxyribo thymine triphosphate (dTTP). The amplified PCR fragments, i.e., 100 pb for the calmodulin and 400 pb for the proenkephalin were

separated in 10% agarose-BET gel. The specific band was directly cut before extracted from the gel. A total of 1  $\mu$ L of the extracted PCR amplified fragment is analyzed in MALDI using 3HPA (3 hydroxypicolinic acid) for complete primers analysis or HCCA/ANI for analyzing the amplified probe to improve the reporter signal.

**Immunoassays. Classical Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.** Indirect ELISA was conducted as previously described<sup>18,19</sup> with pig immunoglobulin (Sigma Aldrich) as the antigen (250 ng/well, then serial dilution). Briefly, antipig IgG raised in rabbit (Sigma Aldrich, P0916) was used as the primary antibody. Serial dilution of the primary antibody against serial dilution of the antigen were performed to determine the optimal concentration of primary antibody. These experiments show that broadest linear range is obtained for a dilution of 1:100. The secondary antibody was a peroxidase affinity-pure goat antirabbit IgG (H+L, Min XHu Ser Protease, Jackson) and was used at a dilution of 1:5000. In classical ELISA, antigen quantity is determined via the absorbance measurement ( $\lambda = 490$  nm) of a colorimetric reaction product generated by reaction of the peroxydase enzyme on its substrate (*ortho*-phenylenediamine, OPD).

**Indirect ISA-MS.** The hybridization technique was similar to classical ELISA. The pig immunoglobulin was coated on the microtitration plate wall (1 h, 37 °C). After incubation, the excess of antigen was removed by three washing baths in PBS (0.1 M, pH 7.4). The antipig IgG raised in rabbit primary antibody (dilution 1:100) was then added and incubated for 1 h at 37 °C. After three washing steps in PBS (0.1 M, pH 7.4) to remove the excess of primary antibody, the modified photocleavable antibody (modified antirabbit IgG raised in goat, Eurogentec SA, Belgium) was added and incubated for 1 h at 37 °C. Different dilutions of the tagged secondary antibody were tested to define the optimal conditions (1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512). After antibody fixation, two washing steps using PBS (0.1 M, pH 7.4) followed by one washing step with pure water were performed. Pure water is used to avoid the presence of salts that would hamper MALDI matrix crystallization and thereof MALDI analysis. The complex was then placed under UV light for 15 min in order to release the reporter (peptide-linker) attached by UV-cleavage and linked to the antibody. This reporter was then quantified using MALDI (Figure 1B). In these experiments, bradykinin was used as the reporter. After photocleavage, the reporter corresponds to the bradykinin peptide bonded to a linker. The reporter has a mass of *m/z* 1702. The peak intensity after normalization of the spectra allowed the quantitative measurement of the peptide tag to be correlated with the amount of antigen/well.

**Mass Spectrometry.** For classical analysis, 1  $\mu$ L of sample solution and 1  $\mu$ L of matrix solution were mixed on the MALDI sample one after each other before crystallization and let to dry at room temperature according to the dried-droplet preparation procedure. MALDI-TOF mass spectra were performed on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) with delayed extraction (DE) and a 337 nm pulsed nitrogen laser. For routine analysis of oligopeptides, HCCA/ANI was used at concentrations of 10 mg/mL in ACN /H<sub>2</sub>O (2:1, v/v,

- (16) Chopin, V.; Salzet, M.; Baert, J.; Vandenbulcke, F.; Sautiere, P. E.; Kerckaert, J. P.; Malecha, J. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 32701–32707.  
 (17) Tasiemski, A.; Hammad, H.; Vandenbulcke, F.; Breton, C.; Bilfinger, T. J.; Pestel, J.; Salzet, M. *Blood* **2002**, *100*, 553–559.

- (18) Salzet, M.; Wattez, C.; Slomiany, M. C. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **1993**, *104*, 75–81.  
 (19) Salzet, M.; Bulet, P.; Van Dorsselaer, A.; Malecha, J. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 897–903.

0.1% TFA) and 3-HPA at 50 mg/mL in H<sub>2</sub>O/ammonium citrate (100 mM). For tagged PCR products, acquisition parameters were an acceleration voltage of 20 kV, first grid voltage of 94%, the guide-wire voltage at 0.05%, and an extraction delay time of 200 ns. Each recorded MS result was the average of 100 laser shots. For tagged antibodies, the acquisition was performed with a MALDI-TOF (Voyager STR, Applied Biosystem, Framingham, MA) with HCCA as the matrix. The accelerating voltage, 20 kV; grid voltage, 94%; extraction delayed time, 100 ns; guide wire, 0.05%; laser repetition rate, 3 Hz. For each spectrum, 800 shots over 15 spots were averaged. Peak intensity were subsequently measured on the spectra after baseline correction using DataExplorer 5.0 software (Applied BioSystem, Framingham, MA).

## RESULTS

**PCR-MS.** *Amplification with Tagged Oligonucleotides.* The strategy used was to synthesize PCR primers (tagged or not) for PCR amplification. The first step was to check the compatibility of tagged primers using this technique. The left primer (5' AA GCG GTA CGA GTA GCA 3') was used for PCR amplification against an oligodT primer. This primer was designed in order to amplify a ubiquitous protein (the calmodulin binding protein (CBP)) from the mouse brain.

Before amplification experiments the tagged left primer was analyzed by MALDI MS to check the efficiency of the photocleavage process. The tagged primer (or oligopeptide) used includes three moieties which are, respectively, the oligonucleotide sequence (5' AA GCG GTA CGA GTA GCA 3'), the photocleavable group, and the reporter group, here chosen to be a peptide of known sequence (H-RPPGFSPFRC-CONH<sub>2</sub>  $M_w$ (avg) = 1161.37). The analysis was performed using 3-HPA matrix in order to provide both detection of the peptide and the whole oligopeptide. The recorded MS spectrum (Figure 2A) shows several signals. First, we can observe that the peptide tag is well detected. However, two signals are observed for the reporter, respectively, at *m/z* 1163.9 and *m/z* 1637.26 corresponding, respectively, to the [M + H]<sup>+</sup> ion of the peptide (P) itself and to the [M + H]<sup>+</sup> ion of the peptide bonded to a part of the linker (P-PC). This second form (PC-P) is the expected form after photocleavage of the structure since the structure presents a linker between the peptide and the photocleavable moiety. The second signal corresponding to the peptide (P) is attributed to a prompt fragmentation in the early moments of desorption because of the presence in the structure of a disulfide bridge because of the instability of such functions in the gas phase. For this reason the disulfide bridge was further on replaced by a maleimide group. Later experiments with the maleimide group reveal that prompt fragmentation process can be suppressed, and then only a single signal is observed for the reporter. Concerning Figure 2A, the higher mass signals are attributed to either the whole oligopeptide with respectively [M + H]<sup>+</sup> ion at *m/z* 6970.50 and [M + 2H]<sup>2+</sup> at *m/z* 3489.92; or the oligonucleotide (O) alone with, respectively, [M + H]<sup>+</sup> ion at *m/z* 5351.03 and [M + 2H]<sup>2+</sup> at *m/z* 2678.79. This demonstrates that photocleavage is not total. Nevertheless, we can observe that the reporter group signal is very well detected.

In a first PCR test series, several annealing temperatures (52, 54, 56, and 58 °C) were tested on total RNA extracted from mouse

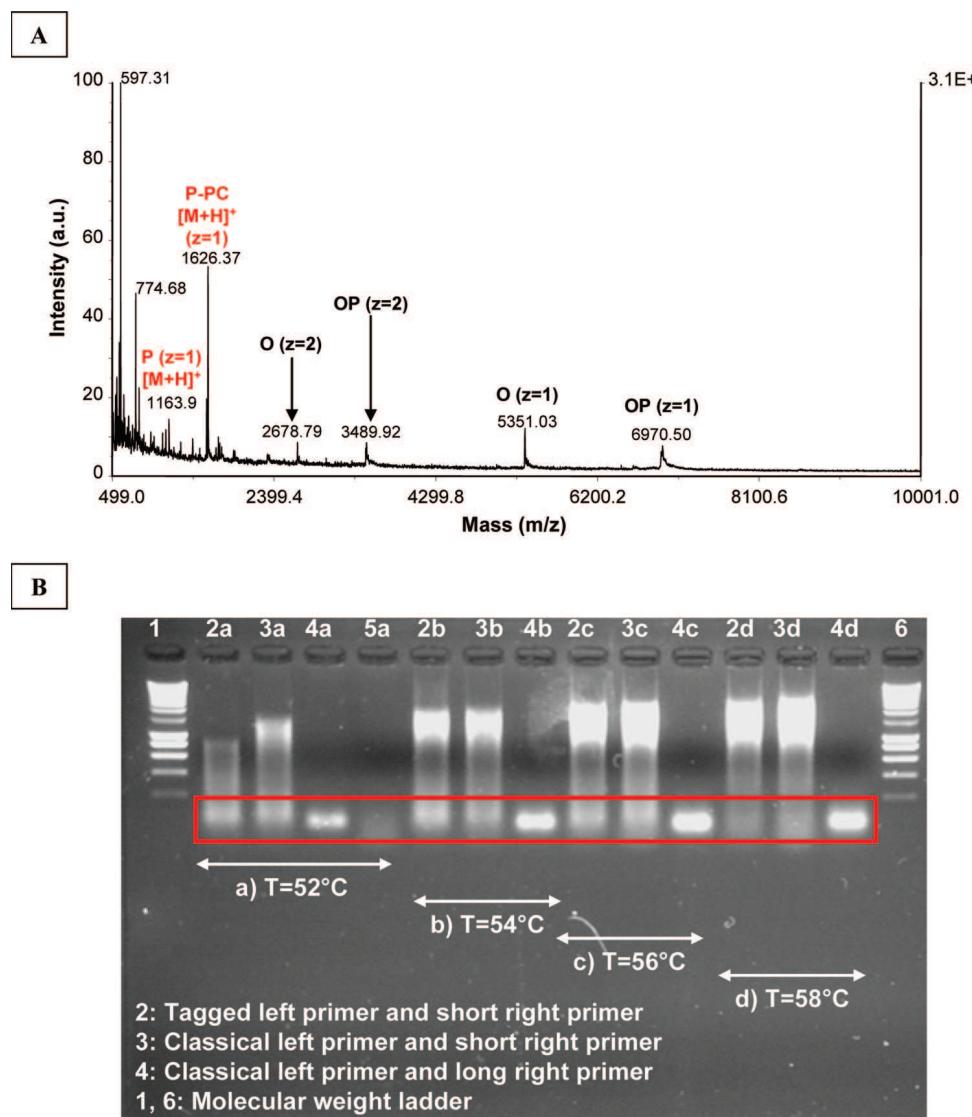
brain without using either with tagged primers (2, 6, 9, 12) performed or with classical primer (3, 7, 10, 13) (Figure 2B). In all cases, two bands are amplified one at 2.5 Kb and the other one at 100 bp whatever the primer used. This points out that the tagged primer can be used for PCR amplification. In a second step, RNA extractions were performed according to the manufacturer's instructions, and samples were then treated for DNA contamination by RQ1 DNase1 (Promega). PCR were performed with classical primers (4, 8, 11, 14). A single band at 100 pb is amplified. This demonstrates that the 2.5 Kb is amplified from the genomic DNA present in the extract whereas the 100 pb is amplified from the cDNA. These data reflects that tagged primers can amplified either small or large PCR DNA fragment.

With the use of the same principle, proenkephalin was chosen as the model target mRNA (Figure 3), as previous studies have shown a low background for this molecule's mRNA distribution in the rat brain.<sup>20</sup> Standard untagged and tagged primers bearing the photocleavable linker/tag system were added to the proenkephalin cDNA sequence (Figure 3A). The left primer sequence was CAG GAC TCC CCA AAG GAG AAC AGG A, and the right primer sequence was GAC GTA CCA GGC GGT AGC TGC ATT T. For the tagged primers, the reporter peptide is linked to a spacer using a maleimide group to avoid prompt fragmentation itself bonded to the photocleavable group and the primer. The reporter peptide used is the same peptide than for previous experiments (H-RPPGFSPFRC-CONH<sub>2</sub>  $M_w$ (avg) = 1161.37). Both types of primers were used for RT-PCR amplification and gave the same results in terms of product and yield of amplification. RT-PCR was used to make a 400 bp double-stranded cDNA oligonucleotide probe (Figure 3B). MALDI-MS analyses of the amplified band with either the left tagged primer and right free or the left free and right tagged primer revealed the same detected compound at an *m/z* of 1720.41, corresponding to the [M + H]<sup>+</sup> ion of the P-PC form as expected from the structure after photodissociation. This confirmed the ability to detect the tagged peptide after PCR amplification (Figure 3C). Two other mains signals are observed in the same *m/z* range. A first signal is observed at *m/z* 1722.03 which corresponds to the [M + Na]<sup>+</sup> ion of the P-PC form. A peak corresponding to the P-PC form with an oxygen loss (P-PC - O) is also observed at *m/z* 1703.84. This last ion corresponds to a side product of the photodissociation process and has already been described previously.<sup>21</sup> Several other signals marked with asterisks are also detected. These signals are regularly spaced by 44 u and can be attributed to polymer (PEG) remaining in the solution even after purification.

*Desoxyribonucleotide Tag for PCR Amplification.* An alternative approach was developed based on the labeling of a single desoxyribonucleotide triphosphate (dNTP). For these experiments, desoxyribo uracile triphosphate (dUTP) was chosen and chemically modified with the same photocleavable linker/tag system described above (Figure 4A,B). In this new design, both the 5' and 3' ends of the nucleotide were kept free, allowing direct incorporation in the amplified cDNA. Use of a tagged nucleotide led to the incorporation of one tag for each T nucleotide,

(20) Lansac, G.; Dong, W.; Dubois, C. M.; Benlarbi, N.; Afonso, C.; Fournier, I.; Salzet, M.; Day, R. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *171*, 57–71.

(21) Olejnik, J.; Ludemann, H. C.; Krzymanska-Olejnik, E.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F.; Rothschild, K. *J. Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 4626–4631.



**Figure 2.** (A) MALDI mass spectrum in the linear positive mode of an oligopeptide, including a 20-mer oligonucleotide sequence and the photocleavable tag/system with 3-HPA as a matrix. (B) PCR product run on agarose gel stained with ethidium bromide. (5' AA GCG GTA CGA GTA GCA 3') was used for PCR amplification against an oligo(dT) primer. This primer was designed to amplify a ubiquitous protein (the calmodulin binding protein, or CBP) from the mouse brain (agarose 2%; migration voltage, 100 V; intensity, 150 mA). (1) Molecular size standard, (a) PCR conducted at  $T = 52\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (b) PCR conducted at  $T = 54\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (c) PCR conducted at  $T = 56\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (d) PCR conducted at  $T = 58\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; (2) PCR with left primer tagged and the right primer free; (3) PCR with the left primer free and right primer tagged; (4) PCR with left and right primers tagged; and (5) control H<sub>2</sub>O.

increasing sensitivity. Finally, the use of tagged nucleotides is practical as these nucleotides can be incorporated using standard procedures, regardless of the probe being amplified. The dUTP-tagged system was used for amplifying the proenkephalin probe by RT-PCR (Figure 4C). Figure 4C illustrates the MALDI spectra obtained with the classical probe (b) or with the tagged one (a). The tagged probe gave a peak serial at an  $m/z$  of 1128.23, 1163.06, 1201.75, and 1243.26 that corresponded to the tag peptide attached to the probe; these signals were not detected with the untagged probe. The characteristic signal of the tag corresponding to the peptide with part of the spacer peptide is observed at  $m/z$  1163.23 ( $[\text{M} + \text{H}]^+$  ion) with good S/N ratio and signal intensity, demonstrating that the maleimide group incorporation prevents fast fragmentation. At an  $m/z$  of 1201.75 and 1243.26, the peaks are separated by 38–40 u, corresponding to potassium cations linked to the reaction medium. The peak at  $m/z$  1128.23 comes

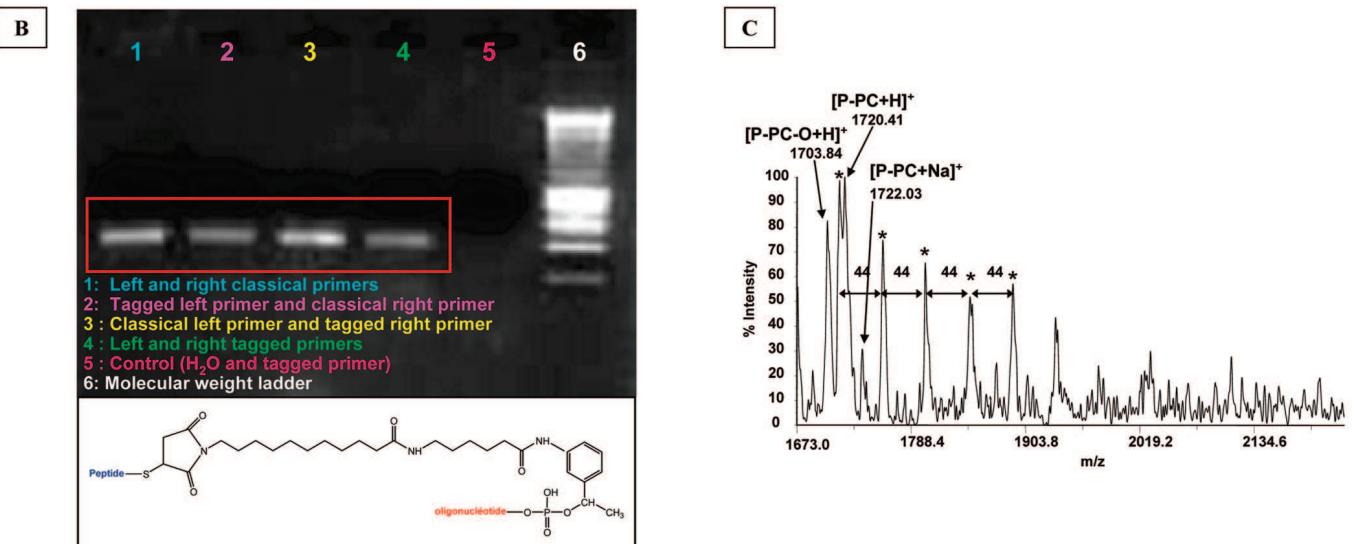
from a prompt fragmentation process of the lateral chain of the cysteine in front of the S–S bridge.

Taken together, these data suggest that it is possible to perform PCR-MS analyses with tagged oligonucleotides and tagged nucleotides. This opens the door for studies employing the multiplexing technique as we have demonstrated with a mixture of three different peptides tagged with three different oligonucleotides.<sup>14</sup> Previous work by Lipkin and colleagues developed MassTag-PCR technology based on 5'oligo(dT) sequences<sup>22</sup> and applied it to multiplex studies<sup>23–25</sup> for identification of a respiratory virus. This technology, however, is based on a simple mass spectrometric method, the PinPoint assay, for SNP typing of PCR products.<sup>22</sup> Our technique is completely different,

- (22) Haff, L. A.; Smirnov, I. P. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3749–3750.
- (23) Lamson, D.; Renwick, N.; Kapoor, V.; Liu, Z.; Palacios, G.; Ju, J.; Dean, A.; St. George, K.; Briese, T.; Lipkin, W. I. *J. Infect. Dis.* **2006**, *194*, 1398–1402.

**A**

```
TGATCGCTCTANGGGTTCTGGCCGACGTCGCATGCTCCGGTGCATGGCGCCGCCGGAAATCGATTCAGGACTCCCCAA
AGGAGAACAGGA TGCCATCAGGGAGACAGGACTCCCCGTGGAAGATAGGATACCTCCAGGAAGACAGAATGCCCGGAGG
CAGCCCTGGGACAGCGGGAAACACTAGGGACCAAGCTATCCCTGGTCACTCGGGATTTGTTGGGTTGTTGGGCTCAG
GAAAGATTGTCCTGCTGGTCCCTGCTCCACGACCACCCACCCGGCAAGGTTCCCTAGAGAACCTTGTCAGAGACAGAACG
GGTCCCCACAGGCGCATCTTCTTCCAACAGGCCATGGCGCAGTTCTGAGACTTGACATCTGGCTGCTAGCGCTGGTCT
GCCTCCTGGCTACAGTGCAGGCAGACTGCAGCAGGACTGCGCTTAAATGCACTACCGCCTGGTACGTCAATACTAAGT
GAATTCGGCCGCTTGCACCATTGGGANAACTCCCCAACCGTTGGATGCTAGCTTGAGTATTCTATAN
NGTCNCCTAAAAAAACTTGGCTAAANCATTGGCAATANCTGTTCTNGGGGGAAAATTGTTATCCNCCTCAAATT
CCNCCCAAACNATTCCNAACCGGAANNATNAAANGGNTAAANACCTTGGGGGGNCCN
```



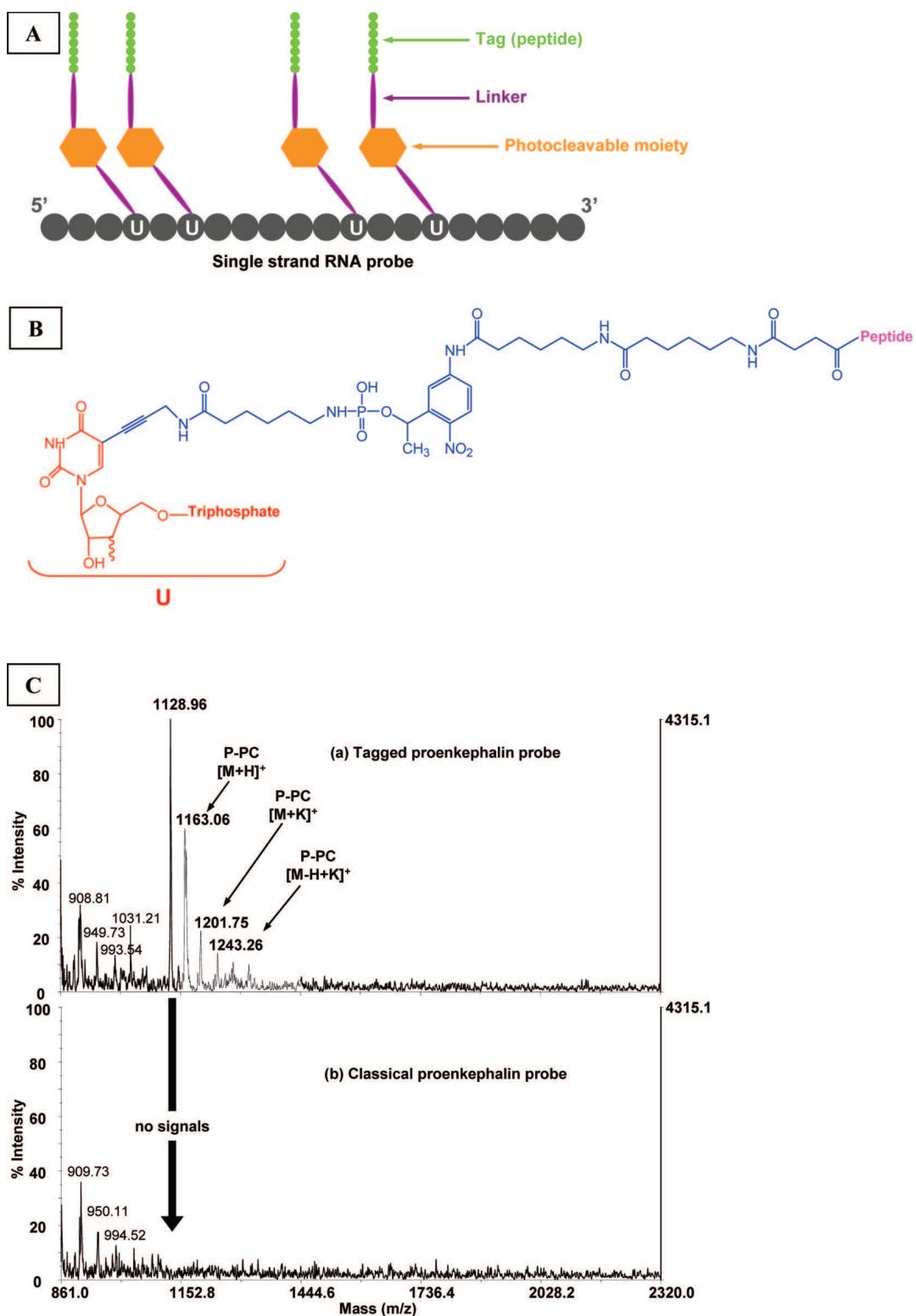
**Figure 3.** (A) Rat proenkephalin sequence obtained after cloning and sequencing of the PCR amplified cDNA (orange, vector arm; red, primers; black, the amplified probe of 413 bp). (B) Agarose gel stained with ethidium bromide showing proenkephalin cDNA fragments amplified with different types of tagged or untagged primers. Inset: structure of the oligonucleotide tagged by the photocleavable linker/tag system. (C) MALDI mass spectrum of the tagged primers amplified by PCR after extraction from the agarose gel and purification in the reflectron positive mode (matrix, HCCA/ANI).

although the idea is similar. Thus, Tag-Mass can be another technique used for identification of pathogens exhibiting resistance.

**ISA-MS.** The ISA-MS method is identical to the classical ELISA method with the exception of the detection mode. In the classical ELISA method (Figure 1B), detection is based on oxidation of peroxidase in the presence of *o*-phenylenediamine dihydrochloride to yield a colored product that is detected by absorbance at 490 nm. The absorbance is linearly dependent on the concentration of the antigen based on a fixed concentration of primary and secondary antibodies (in our case, 1:100 for the primary and 1:5000 for the secondary). In ELISA, the linearity is limited by (i) in the low concentration range, the limit of detection, and (ii) in the high concentration range by the maximum capacity of adsorption of antigens on the plate wells. This gives curves presenting a typical shape with a linear region in the middle and two stages at the extremities (Figure 5). In ISA-MS, no color was detected, but the secondary antibody was connected by a photocleavable link to a peptide tag (bradykinin). After the reaction, the microtitration plate was then placed under UV light in order to release the reporter. In the present experiments, the peptide with the spacer generated by photocleavage gives a signal at  $m/z$  1703.87 for the  $[M + H]^+$ +

ion of the P-PC form and  $m/z$  1688.8 for the  $[M + H]^+$  ion of the  $[(P\text{-}PC) - O]$  as previously observed as a side photodissociation product. After UV exposure, solution was analyzed in MALDI (Figure 5A). The signal of the tag peptide is dominating this portion of the spectrum and is observed with a good sensitivity and signal/noise ratio (Figure 5A). A first experiment was performed to verify the linearity between the tagged antibody and the tag peptide released (Figure 5B). As observed from Figure 5B, the peak intensity is linearly varying with antigen concentration (picograms per milliliter) on a wide range (a few to 2500 pg/mL) except for the highest concentrations (~5000 pg/mL) and lowest ones <5 pg/mL). In the higher concentration, the curves are presenting a stage depicting that the maximum binding capacity of the antigen has been reached. In the lower mass range, values are dramatically decreasing traducing limit of detection effects. Optimal experimental conditions for antigen quantification (i.e., maximum of linear evolution) were determined by varying the secondary antibody concentration by serial dilution. In Figure 5C are reported the evolution of the peak intensity measured by MALDI MS versus the concentration of antigen for different secondary antibody dilutions (1:16, 1:32, 1:64, 1:128). It is clear that linearity on the larger antigen concentration range is observed for a dilution of the secondary antibody of 1:64. For other dilutions, linearity is also observed but on a narrower concentration range. For a 1:64 dilution of the secondary antibody linearity is observed between 9 and 5000 pg/mL showing a broad range of linearity.

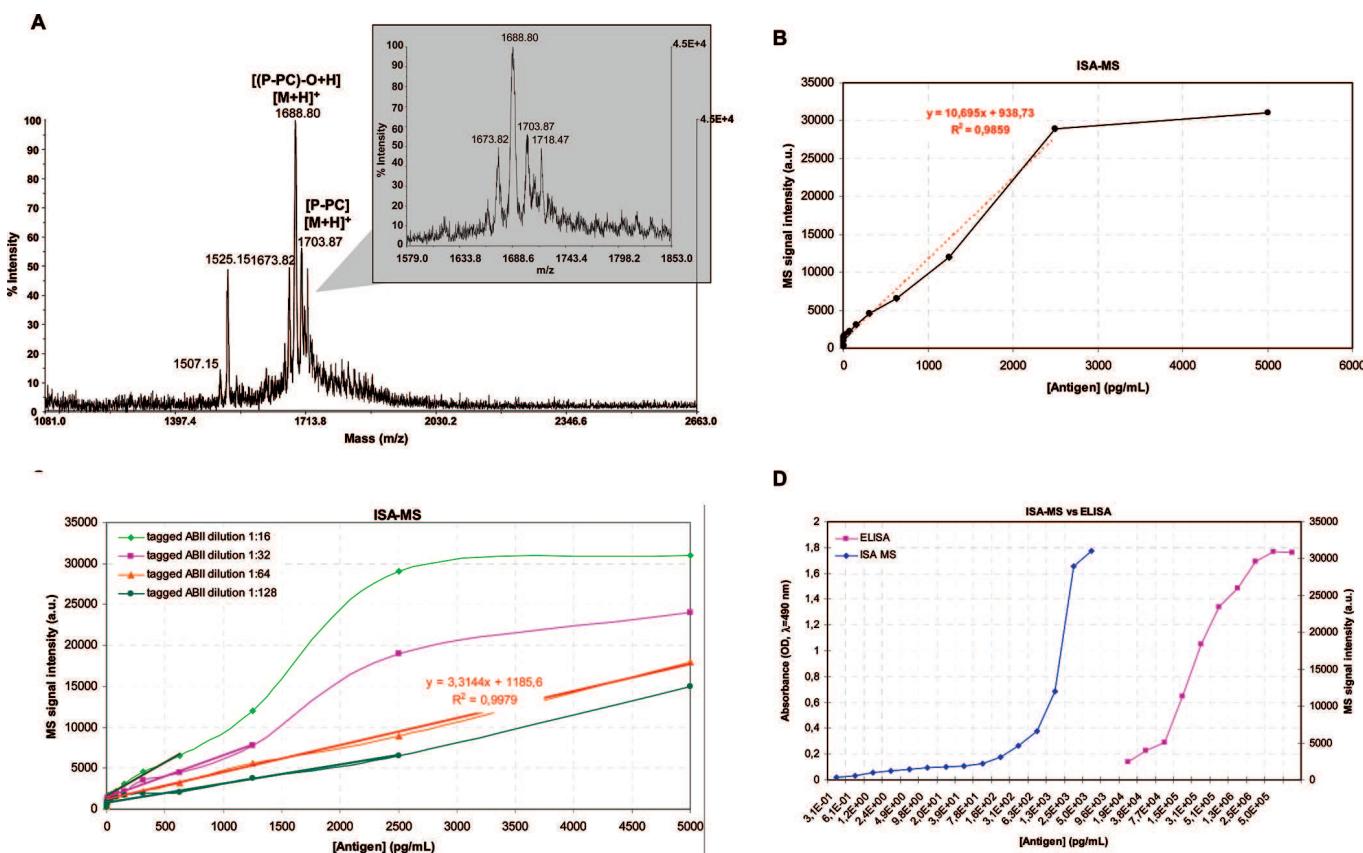
- (24) Palacios, G.; Briese, T.; Kapoor, V.; Jabado, O.; Liu, Z.; Venter, M.; Zhai, J.; Renwick, N.; Grolla, A.; Geisbert, T. W.; Drosten, C.; Towner, J.; Ju, J.; Paweska, J.; Nichol, S. T.; Swanepoel, R.; Feldmann, H.; Jahrling, P. B.; Lipkin, W. I. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 692–695.  
(25) Renwick, N.; Schweiger, B.; Kapoor, V.; Liu, Z.; Villari, J.; Bullmann, R.; Miethling, R.; Briese, T.; Lipkin, W. I. *J. Infect. Dis.* **2007**, *196*, 1754–1760.



**Figure 4.** (A) Schematic representation of the incorporation of the tagged U nucleotide in a single-strand RNA probe. (B) Structure of the U-tagged nucleotide. (C) MALDI mass spectrum in the reflectron positive mode of the U-tagged probe (proenkephalin) in a solution with HCCA/ANI as matrix.

Below 5 pg/mL, the signal drastically decreases below the linearity curve because the detection limit is reached. For a dilution of 1:16, the maximum binding is reached at 1250 pg/mL and 2500 for a dilution of 1:32 whereas for 1:64 the curve is still linear at a value of 5000 pg/mL. In our experiments, we thus decided to use 1:64 as the dilution for the secondary antibody in indirect ISA-MS. Under these conditions, we attempted to compare the sensitivity

of the ISA-MS method to the classical ELISA method (Figure 5D). The results showed that the limit of detection with ISA-MS (few picograms per milliliter) is 1000-fold lower than for ELISA (few nanograms per milliliter). With ISA-MS it is possible to detect up to 200 amol of antigens whereas only 200 fmol were detected using classical ELISA. The ISA-MS method is therefore approximately 1000-fold more sensitive than the classical ELISA method, which



**Figure 5.** (A) MALDI mass spectrum in the linear positive mode of the tagged antibody after ISA-MS experiment and UV postcleavage. (B) ISA-MS titration curves of MS signal intensity vs antigen concentration. (C) ISA-MS titration curves of MS signal intensity vs antigen concentration with secondary antibody dilutions ranging from 1:16 to 1:128. (D) Comparison of the titration of antigen concentration between the ISA-MS and ELISA methods.

is highly promising for titration of biological markers present at low concentration like pathology markers in body fluids. ISA-MS is clearly more sensitive than ELISA with UV detection. Although, various strategies of assays and different detections were proposed in the last 10 years, currently, much detection are performed by on fluorescence measurements which also prove to be very sensitive. Fluorescence assays can be performed according very different strategies, including beads grafted with antibodies, microarrays<sup>26–30</sup> with fluorescence detection, or by classical ImmunoSorbent Assays with fluorescence detection (FLISA). Fluorescence is much more sensitive than UV detection and present a limit of detection ranging from hundreds of picograms per milliliter up to 10 pg/mL according to the strategy used. In this respect, ISA-MS is at least as sensitive as fluorescence detection, but sensitivity of ISA-MS can still improve taking into account the increasing sensitivity of new mass spectrometers or by changing the reporter for an even more easily detectable reporter. ISA-MS as fluorescence presents the great advantage of multiplexing capabilities. In fact, multiplexing conditions can

be easily reached only by varying the mass of the reporter. It is also possible to access more easily comparative analysis by using isotope coded reporter (e.g., deuterated reporters) that will present exactly the same response for MS analysis but giving different specific MS signals. This is more difficult with fluorescence since fluorophores can present different response in term of detection and are also not always incorporated with the same rate, which can render quantification more difficult. Also, we must notice that fluorescence can be hampered by the lifetime of the fluorescence signal, quenching problems, and residual fluorescence. Such problems are avoided by using MS measurement using photo-cleavable tags. Thus, ISA-MS is a good alternative to other detection systems for titration of antigens that could be used in multiplexing conditions with a good limit of detection.

## CONCLUSIONS

In the present study, we developed novel multiplex quantitative methods using Tag-mass concept, i.e., PCR-MS and ISA-MS. The PCR-MS based on the Tag-mass technology is an alternative to MS-PCR<sup>31</sup> or PCR-MS.<sup>32</sup> The PCR-MS assay offers the additional, unique advantages of type-specific identification and quantitation. This technology is well established for SNP (single nucleotide

- (26) Kondo, Y.; Ahn, J.; Komatsubara, R.; Terada, A.; Yasuda, T.; Tsuge, I.; Urisu, A. *Allergol. Int.* **2009**, *58*, 295–299.
- (27) Li, N.; Tang, H.; Gai, H.; Dong, X.; Wang, Q.; Yeung, E. S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 1879–1885.
- (28) Oelschlaeger, P.; Srikanth-Iyer, S.; Lange, S.; Schmitt, J.; Schmid, R. D. *Anal. Biochem.* **2002**, *309*, 27–34.
- (29) Sasakura, Y.; Kanda, K.; Fukuzono, S. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *564*, 53–58.
- (30) Swartzman, E. E.; Miraglia, S. J.; Mellentin-Michelotti, J.; Evangelista, L.; Yuan, P. M. *Anal. Biochem.* **1999**, *271*, 143–151.

- (31) Rust, S.; Funke, H.; Assmann, G. *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3623–3629.
- (32) Patel, D. A.; Shih, Y. J.; Newton, D. W.; Michael, C. W.; Oeth, P. A.; Kane, M. D.; Opipari, A. W.; Ruffin, M. T. t.; Kalikin, L. M.; Kurunit, D. M. *J. Virol. Methods* **2009**, *160*, 78–84.

polymorphism) studies.<sup>31,33</sup> With the Tag-mass concept, a novel dimension is open: the multiplexing ISA-MS also offers multiplexing and the quantitation less than a femtomole. These data are in line with the ones obtained in fluorescence ELISA but without quenching problems for ISA-MS. These novel tools will have application directly in clinics for bedside patients following or biomarker tracking in body fluids.

- 
- (33) Ran, P.; Li, Y. B.; Yan, J.; Zhang, B. L.; Zhang, J.; Shan, H. X.; Ye, Z. P.; Hou, Y. P.; Zhang, L.; Liao, M.; Wu, J. *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* **2007**, *24*, 63–66.

#### ACKNOWLEDGMENT

J.S. and M.E.A. contributed equally to this work. This study was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, Ministère de L'Education Nationale), the L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, and the Agence Nationale de la Recherche (to I.F.).

Received for review June 28, 2009. Accepted October 1, 2009.

AC901416S

## **Conclusion générale**

## **4. Conclusion générale**

L'évolution de la génomique vers la protéomique dans le but de caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans les pathologies et les traitements, a ouvert des perspectives intéressantes pour la recherche clinique et les traitements. En effet, l'essor de la protéomique clinique apporte des nouveaux challenges, et des nouvelles opportunités qui promettent de transformer les moyens de détecter, de traiter et de suivre les pathologies. Ceci en suivant l'évolution des variations d'expression protéique ou des modifications post-traductionnelles. Cette information peut être la cause ou la conséquence de processus pathologiques.

Ainsi, basée sur un outil récent mais devenu incontournable qui est la spectrométrie de masse, la protéomique clinique tend à jouer un rôle prépondérant dans les différentes étapes associées à une démarche diagnostique appropriée en allant de la détection précoce de la maladie dans les fluides biologiques (sang, urines,...), du diagnostic basé sur la signature protéique identifiée de la maladie qui complète l'analyse histopathologique, de la sélection individualisée de différentes thérapies afin de cibler l'anomalie d'expression protéique spécifique du patient (on parle alors de pharmaco-protéomique en opposition à la pharmacogénomique), jusqu'à l'évaluation de l'efficacité et la toxicité d'une thérapie, ou encore sa redirection en fonction des résultats obtenus après analyse et le suivi des marqueurs protéiques.

L'analyse directe et l'imagerie par spectrométrie de masse sont devenues des technologies puissantes, permettant la détection et la localisation simultanée de nombreux composés (peptides, protéines, lipides, sucres, oligonucléotides) en une seule analyse.

Cependant un grand nombre de développements s'imposent dans le but d'augmenter la sensibilité et la reproductibilité des analyses si contraignantes mais nécessaires pour des applications en protéomique de haut débit telle que la recherche de biomarqueurs. Le MALDI quant à lui, offre la possibilité de détecter des protéines de masses relativement importantes directement dans le tissu, permettant la réalisation de « profils » pour la recherche des biomarqueurs potentiels sans extraction préalable ni traitement délicat de l'échantillon.

Appliquée sur des biopsies de patientes atteintes du cancer de l'ovaire dans le cadre de mes travaux de recherche, la technique d'analyse directe et par extension d'imagerie MALDI sur tissus nous a révélé la présence de 14 Biomarqueurs potentiels du cancer de l'ovaire. Parmi ces biomarques, on trouve le fragment C-terminal de la protéine Reg alpha (PA28 $\alpha$ ),

un activateur du protéasome. Ces travaux, réalisés en partenariat avec des gynécologues et des anatomo-pathologistes du CHU de Lille, ont permis de valider par approche immunologique, l'existence d'un changement d'adressage de PA28 $\alpha$  dans les tumeurs ovariennes (bénins vs malins). En couplant la digestion trypsique à un spotter automatique ayant une grande précision, nous sommes parvenus à réaliser des images de la localisation de ces biomarqueurs sur le même tissu ovarien malin, permettant ainsi, la co-localisation de plusieurs protéines en une seule analyse. Ces différents Biomarquers ont été identifiés par Nano LCMS/MS.

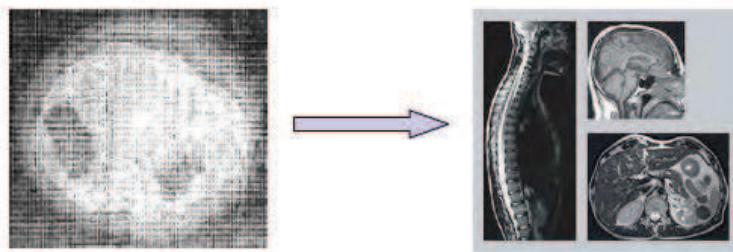
Ainsi, nous avons mis aussi, en évidence l'existence d'un lien entre l'inhibition de la réponse immunitaire et le développement du cancer à travers les biomarqueurs que nous avons identifiés. La cellule cancéreuse semble opérer comme un parasite en inhibant la réponse immunimunitaire du tissu hôte via la stimulation de la cytokine inhibitrice de type IL-10, en inhibant la production d'IL-2 et provoquant une tolérance immunitaire par l'inhibition de la présentation du soi. Cet axe doit également être en lien avec une infection virale qui reste à reconfirmer du point de vue moléculaire pour une cohorte plus importante. Nos premiers résultats montrent la présence d'EBV et de HHV6 au sein des tissus cancéreux des patientes.

Dans le but de réaliser des études plus fondamentales en biologie ou dans la recherche d'un diagnostic plus précoce en médecine, nous avons développé un nouveau concept appelé Tag-Mass, basé sur la détection indirecte d'un composé (rapporteur) relargué après photolivage sous UV de la molécule. Par cette technique, il est possible de détecter spécifiquement sur tissus des molécules de haut poids moléculaire, inaccessibles jusqu'à présent en imagerie MALDI, telles que les ARNm, les ADN et des protéines de plusieurs centaines de kilodaltons. Cette nouvelle approche cible les molécules d'intérêts sur le tissu avec de forte affinité liée à la forte interaction entre le ligand choisi et son substrat. Appliquée au cancer de l'ovaire, cette technique permettrait de co-localiser le peptide de masse 9744, avec la protéine native. Avec cette approche il est aussi possible de réaliser des études en multiplexe et de voir la répartition de la protéine reg alpha ainsi que de l'alpha 1 acide glycoprotéine sur un tissu ovarien en une seule analyse. Ce développement ouvre donc la voie de l'imagerie spécifique, et avec l'utilisation de plusieurs Tag sur une même coupe, permettrait la réalisation des cartes de co-localisation telles qu'ARNm/protéines, protéines/peptides, protéines/drogues etc. L'avantage majeur réside dans la possibilité de réaliser des multi-localisations des composés en une seule analyse, avec peut-être

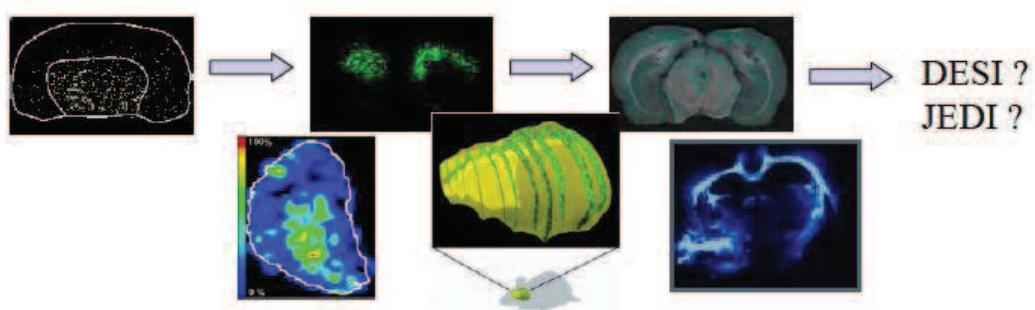
prochainement la répartition sur un tissu d'une dizaine de composés en une seule analyse. Plusieurs développements dans ce domaine restent encore à réaliser.

L'analyse spécifique par le concept de Tag-mass a ouvert également de nouveaux horizons concernant la localisation et la détection de nouvelles molécules par spectrométrie de masse. Les tests de sensibilité et de spécificité de l'approche d'imagerie restent encore à démontrer sur le tissu. Cependant, les tests obtenus en milieu liquide ont été au delà de nos espérances avec une sensibilité cent fois plus importante que celle des approches routinière d'ELISA. Ces approches d'ISA-MS et PCR-MS ont donné lieu à un troisième brevet en cours de validation. Reprenant la fonctionnalité du Tag-mass pour la détection et la quantification de molécules par spectrométrie de masse, l'ISA-MS et la PCR-MS quantifient rapidement de nombreuses molécules en une étape unique d'analyse. Une fois de plus, le caractère universel du Tag-mass permet de l'utiliser dans de nombreux cas, pour la quantification d'oligonucléotides, de protéines, de drogues, de biomarqueurs et cela dans différents appareils de spectrométrie de masse. L'imagerie nécessite cependant quelques développements afin d'augmenter sa résolution spatiale pour atteindre un niveau subcellulaire. La technique d'imagerie idéale, que nous espérons pouvoir utiliser un jour, doit être capable de nous permettre de travailler sur tous les types de tissus. Pour cela, de nombreux tests pourront être réalisés pour améliorer la détection dans ce niveau de champ d'application. Plusieurs axes de recherches peuvent être envisagés, tel que l'utilisation d'un instrument doté d'une source de mobilité d'ions donnant l'accès à des cartographies peptidiques/protéiques à plusieurs dimensions ou l'apport d'un analyseur ayant une très haute résolution (FTICR). L'utilisation des matrices ioniques peut aussi être envisagée.

Les développements actuels en imagerie MALDI et l'ensemble des perspectives dans ce domaine permettront peut être un jour à l'MSI de connaître le succès de son homologue médical qui est l'IRM. Ceci implique que l'imagerie MALDI « de recherche » soit introduite comme technique d'imagerie moléculaire en diagnostic dans les hôpitaux à partir d'un prélèvement (imagerie clinique ou pathologique). Cet outil peut trouver son intérêt dans le cas des tumeurs frontières qui sont parfois difficiles à classer pour les anatomopathologistes, ou pour le chirurgien afin de différencier les parties tumorales des parties saines pendant une opération. Ce genre d'utilisation serait probablement facilité par l'introduction de sources à pression atmosphérique compatibles avec l'analyse *in vivo* telle que le DESI.



*De l'IRM des années 1960 à celle des années 2000...*



L'imagerie est toujours en cours de développement dans différentes voies i.e. quelle soit au niveau d'études de distributions des médicaments, la caractérisation *in situ* de biomarqueurs identifiés, l'amélioration de la résolution des images et son intégration avec les imageries non invasives. L'utilisation de cette technologie dans un processus clinique en utilisant des anticorps cytotoxiques ouvre de nouvelles perspectives. En effet, Les anticorps monoclonaux cytotoxiques permettent de lyser les cellules portant les antigènes qu'ils visent de façon très spécifique. Ces antigènes seront identifiés grâce à l'imagerie MALDI. On peut donc penser que l'imagerie MALDI va devenir une technique indispensable dans cette recherche de cible rapide dans le cadre d'une stratégie clinique par anticorps cytotoxiques avec la possibilité de délivrer localement des médicaments au cœur de la tumeur. L'imagerie MALDI va devenir dans quelques années une technologie incontournable à l'hôpital comme l'est l'IRM, le PET-SCAN.



## **5. Matériaux & Méthodes**

### **5.1. Préparation des échantillons et des tissus**

#### **- Réalisation des Coupes**

Les coupes tissulaires ovariennes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées avec un cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) à une température de -20°C. Les coupes sont ensuite transférées sur des lames ITO (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) qui sont des lames histologiques recouvertes d'une couche conductrice.

#### **- Solutions de standards**

La calibration des peptides est effectuée à l'aide de la solution *Peptide Calibration Standard* proposée par Bruker incluant l'Angiotensine II (m/z 1046.54180), l'Angiotensine I (m/z 1296.68480), la Substance P (m/z 1347.73540), la Bombésine (m/z 1619.82230), l'ACTH 18-39 (m/z 2465.19830) et la Somatostatine 28 (m/z 3147.47100).

La calibration des lipides est réalisée avec la même solution que celle utilisée pour la calibration des peptides en ajoutant les pics de la matrice.

Les spectres des protéines sont calibrés avec la solution *Protein Calibration Standard I* proposée par Bruker incluant l'Insuline (m/z 5734.52), l'Ubiquitine (m/z 8565.89), le Cytochrome C (m/z 12360.97) et la Myoglobine (m/z 16952.31).

#### **- Traitement des coupes**

Les coupes sont transférées dans un dessiccateur pendant 30 minutes afin d'enlever l'eau résiduelle. Pour l'analyse des protéines, les coupes sont soumises à un bain d'acétone froid, de chloroforme, d'EtOH 70% froid et d'EtOH froid. Tous les bains sont réalisés pendant 30 secondes. Pour l'analyse des lipides et des peptides aucun traitement n'est appliqué.

- **Digestion enzymatique in situ**

Une solution contenant 25µg/mL de trypsine est préparée dans de l'H<sub>2</sub>O et dans un tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM (pH=8)

## 5.2. Préparation des matrices

- **Pour l'analyse de peptides**, une solution contenant 20mg/mL de HCCA dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v), une solution de HCCA à 10mg/mL contenant 1.5éq d'ANI dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) et une solution de HCCA à 10mg/mL contenant 1.5éq de 3AP dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) sont préparées.

- **Pour l'analyse de protéines**, une solution de SA à 20mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) Une solution de SA à 10mg/mL contenant 1éq de 3AP dans un mélange AcN/TFA 0.1% (6:4, v/v) est préparée.

- **Pour la détection des protéines de hauts poids moléculaires**, une solution de SA à 20mg/mL dans du HFIP puis une solution de SA à 20mg/mL dans l'AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) sont déposées à la micropipette de façon à recouvrir l'ensemble de la coupe. Les spectres sont ensuite enregistrés en mode linéaire positif en accumulant 10000 spectres sur la gamme m/z 3000 à m/z 70000.

## 5.3. Analyse des peptides

- **Pour l'imagerie des protéines**, les solutions de matrices sont déposées à l'aide du CHIP-1000 en définissant des aires constituées de spots séparés de 250µm centre à centre. Sur chaque spot, 15nL de la solutions de SA/3AP sont déposées. 5 gouttelettes étant déposées sur chaque spot, 30 cycles sont nécessaires pour obtenir le volume final. Les spectres sont ensuite enregistrés en mode linéaire positif avec l'UltraFlex II sur une gamme allant de m/z 3000 à m/z 40000. Sur chaque spot, 500 spectres sont accumulés avec une fréquence laser de 200Hz et les images sont reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

#### **5.4. Digestion enzymatique in situ**

- **Les digestions automatiques** sont réalisées en utilisant le CHIP-1000. Les dépôts de trypsine sont définis par des spots espacés de 250µm centre à centre. 20nL d'une solution de trypsine à 25µg/mL dans l'H<sub>2</sub>O ou le tampon NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> sont appliqués à chaque spot. 5 gouttelettes de 100pL sont déposés sur chaque spots et par conséquent 40 cycles sont nécessaires afin d'obtenir le volume final. Les coupes sont ensuite mises à incuber à 37°C dans une boîte saturée en MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) pendant 2 heures. La matrice HCCA/ANI ou HCCA/3AP est ensuite déposée en suivant le quadrillage décrit pas les spots de digestion. Les spectres sont ensuite enregistrés en mode réflecteur positif avec l'UltraFlex II sur une gamme allant de m/z 700 à m/z 5000. Sur chaque spot, 500 spectres sont accumulés avec une fréquence laser de 200Hz et les images MALDI des peptides de digestion sont reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

- **Les digestions à la micropipette** sont effectuées en appliquant une solution de trypsine à 25µg/mL dans de l'eau pure de sorte que l'ensemble de la coupe soit recouverte. La coupe est ensuite mise à incuber à 37°C pendant 1heure dans une boîte saturée en MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

#### **5.5. Identification des protéines**

L'identification des protéines est effectuée par analyse MS/MS directement sur coupe de tissu avec l'UltraFlex II équipé d'une cellule LIFT III. A partir des coupes digérée ou digérée et dérivée, 5000 spectres sont enregistrés incluant 1000 spectres pour l'ion parent

#### **5.6. Traitements des données**

Les spectres enregistrés sont ensuite retraités avec le logiciel FlexAnalysis 2.4 (Build 11) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). L'identification des protéines est réalisée avec le logiciel Biotoools 3.0 (Build 188) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) connecté à Mascot 2.2.0.3 et en interrogeant la base de données Swiss-Prot avec oxydation comme modification variable et aucune modification fixe. La taxonomie sélectionnée est *Rattus norvegicus*. La

trypsine est ensuite sélectionnée en tant qu'enzyme et deux clivages manqués sont autorisés. Les tolérances en masse sont fixées respectivement à 0.5Da et 1Da pour la l'ion parent et les ions fragments.

## 5.7. Préparation des échantillons pour coloration HES

Les blocs de tissus paraffinés présélectionnés sont coupés au microtome (Leica RM 2135) en rubans de 4µm d'épaisseur sur lames jetables puis déposés sur papier pur avant étalement sur lames superfrost plus (Labomodern, France) dont le prétraitement permet une meilleure adhérence de la coupe : les coupes sont alors fixées sur les lames par de l'albumine glycérinée diluée à 4% puis étirées sur plaques chauffantes à 42°C pendant 10 à 20 secondes. Le séchage des coupes s'effectue à l'étuve à 56°C pendant une nuit.

### - Protocole de la coloration H.E.S.

Chauder la lame sur la platine 10 secondes (à température inférieure à 60°). Le travail est effectué sous hotte et utilise exclusivement des pipettes à usage unique pour chaque colorant.

- Colorer à l'**hématoxyline** et laisser déposer 3 min
- Rincer à l'eau courante
- Différencier à l'**éthanol acide** (ETOH\_HCL : 6à8 gouttes d'HCl diluées dans 200ml d'alcool à 95°) et rincer immédiatement
- Vérifier au microscope : coloration des noyaux en violet
- Bleuir à la **solution ammoniacale** (NH 3%) et rincer immédiatement
- Laver à l'**alcool à 95%**(verser directement à la bouteille) si éosine alcoolique
- Colorer à l'**éosine alcoolique** et laisser déposer 1 minute
- Rincer à l'eau courante
- Déposer l'**éthanol 70%**
- Vérifier au microscope : coloration des cytoplasmes en rose
- Colorer au **safran alcoolique** et laisser déposer de 1 à 8 minutes
- Déposer l'**éthanol 70%**, voire laisser tremper la lame quelques minutes dans l'éthanol pour retirer le safran.

- Vérifier au microscope : coloration du tissu conjonctif en jaune

En cas de coloration « trop foncée » on conclura à un probable surdosage en safran : il faut alors redéposer l'hématoxyline 1 minute puis rincer et ajouter éthanol acide et ammoniac.

#### - **Protocole automatique de marquage et révélation**

Les différentes étapes décrites ci-dessus sont effectuées en mode automatique par un appareil Benchmark XT (Ventana).

Une étude préliminaire a permis de comparer la qualité du marquage avec notre anticorps primaire sur des coupes d'adénocarcinome peu différencié en utilisant 3 protocoles de tampons différents pour l'étape 2 :

- Tampon citrate CC1 30 minutes + chaleur et 60 minutes
- Tampon EDTA 30 minutes
- Protéase III

Le marquage le plus net ayant été obtenu avec le tampon citrate CC1 60 minutes, ce protocole a été retenu pour la suite des travaux.

1. déparaffinage à 70°C puis réhydratation par des bains successifs dans un tampon Ezprep dilué de pH très proche de celui du savon puis dépôt d'huile de paraffine pour empêcher l'évaporation des protéines à l'étape 2
2. prétraitement à la chaleur à 95°C 8 minutes permettant le démasquage les sites antigéniques. Il se réalise donc dans un tampon citrate de pH 6 pendant 60 minutes
3. inhibition de l'activité peroxydase endogène des tissus par une solution 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après dépôt du tampon Reaction Buffer nécessaire à la réaction immunitaire
4. incubation avec l'Ac primaire (déposé manuellement) 32 minutes à 37°C
5. incubation avec l'Ac secondaire 8 minutes à 37°C
6. révélation au D.A.B pendant 8 minutes à température ambiante par de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
7. contre-colorations par 3 bains successifs de sulfate de cuivre (pour accentuer la coloration marron de l'anticorps), d'hématoxyline (entraîne une coloration violette des noyaux) et enfin de carbonate de lithium (qui atténue la coloration des noyaux afin de renforcer le contraste du marquage).

#### - **Lecture des lames**

Celle-ci se fait en collaboration avec les Dr MO Farine et O Kerdraon (anatomopathologistes) et prend en compte

- L'intensité du signal épithéial côté absent, faible ou fort
- La localisation cellulaire du marquage épithéial côté nucléaire ou cytoplasmique ou équilibré
- L'intensité et la localisation cellulaire du marquage conjonctif.

## **5.8. Extraction des peptides des liquides biologiques (cas du Liquide d'ascite et lavage péritonéale)**

Les extractions sont réalisées à partir des sérums obtenus après élimination des globules rouges. 200µL d'HCl 2N sont rajoutés au 200µL de sérum (concentration finale 1N) et agités à 4°C pendant une heure. Une fois les protéines précipitées, la solution est centrifugée (8000g, 30', 4°C) et le surnageant contenant les peptides est extrait. Le culot protéique peut être conservé pour des analyses ultérieures.

La fraction peptidique est purifiée sur une mini cartouche SPE C18 (Machery Nagel) de 10mg. 2 élutions de 10% puis de 60% d'ACN/H<sub>2</sub>O TFA 0,1% sont réalisées pour préfractionner les peptides. Les solutions d'extractions sont lyophilisées et reprises dans 50µL d'H<sub>2</sub>O pour l'analyse.

## **5.9. Extraction des peptides à partir de biopsies**

Une partie de l'échantillon solide conservé à -80°C est broyé à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est reprise dans de 5mL d'HCl 1N et le mortier est rincé avec la solution d'extraction ; le tout est versé dans un tube de 20mL et centrifugé à 12000g pendant 30' à 4°C. Les peptides contenus dans le surnageant sont purifiés sur cartouche C18 (seppack C18, 2g) puis élués avec des solutions de 10%, 60%, et 100% d'ACN/H<sub>2</sub>O TFA

0,1%. Après lyophilisation des fractions, les protéines sont reprises dans 100µL d'H<sub>2</sub>O TFA 0,05% pour analyse ou séparation.

## **5.10. Western Blot**

### **- Electrophorèse en gel de polyacrylamide**

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'acrylamide.

- Gel de séparation (16% acrylamide) : Acrylamide 40%-Bisacrylamide 0.8% /

Tris HCl 4X pH 8.8 / H20mQ. La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate 10% (w/v) et le Temed (N,N,N,N'-tétra-méthyléthylénediamide) ajoutés extemporanément.

- Gel de concentration (4% acrylamide) : préparé comme précédemment.

Après polymérisation du gel à température ambiante, les solutions de protéines sont déposées dans les puits :

Les protéines déposées sont les protéines dénaturées. (i.e. la solution [surnageant d'extraction + tampon dénaturant de Laemmli]).

- 5 échantillons de protéines sont déposés par gel, laissant un puits libre entre chaque dépôt : 1 marqueur de poids moléculaire et 4 échantillons de protéines (correspondant à 4 biopsies ovariennes différentes).

- L'équivalent de 18 µg en protéines totales est déposé dans chaque puits.

La migration des protéines en SDS-PAGE est réalisée dans un tampon de migration Tris/Glycine /SDS (2mM / 129mM/0.1%w/v pH 8.3), à température ambiante. La tension appliquée pendant les premières 15 minutes est de 80 V avant d'être augmentée à 150 V pendant 60 minutes (la migration sera surveillée et le gel est arrêté lorsque le front de migration atteint le bas du gel).

### **- Transfert sur membrane de nitrocellulose**

L'électrophorèse terminée, les gels et les membranes de nitrocellulose sont équilibrés pendant 30 minutes dans un bain de tampon de transfert réfrigéré à 10°C, sous agitation douce. Les protéines contenues dans le gel sont alors transférées sur une membrane de nitrocellulose dans un bain de tampon de transfert Tris base / Glycine / MeOH / H2O réfrigéré à 10°C. Le transfert se réalise dans des cuves (marque) (Biorad) réfrigérées à 10°C, par application d'un courant de 45 mA pendant 45 minutes

#### - Incubation avec l'Ac primaire et secondaire

Avant incubation avec l'Ac primaire, la membrane est saturée par un bain de PBS-Lait 5% pendant 45 minutes, à température ambiante et sous agitation douce. Cette étape permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. La membrane est alors mise en contact avec l'Ac primaire (Cterm) dilué au 1/250° dans du PBS-Lait 5% (5g de lait/ 100mL PBS), toute la nuit (18 heures) à 4°C et sous agitation douce. Le lendemain, la membrane est rincée trois fois 5 minutes dans un volume de PBS-Tween 0.05%, puis elle est alors incubée avec l'Ac secondaire, dilué au 1/5000° dans une solution de PBS-Lait 5%, pendant une heure à température ambiante et sous agitation douce. La membrane est alors rincée deux fois 5 minutes dans un volume de PBS puis 5 minutes dans un tampon phosphate.

#### - Révélation

Les protéines sont maintenant marquées spécifiquement et peuvent être révélées par le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique. La membrane est mise au contact du luminol pendant une minute : par bain dans un mélange des solutions 1 et 2 du kit ECL dans une proportion de 1/1. La membrane est ensuite mise en contact avec un film radiographique en chambre noire, puis séchés et annotés.

### 5.11. Immunoprecipitation

Cette technique permet la précipitation d'un antigène en solution par un anticorps qui agglutine spécifiquement une protéine particulière. Elle permet d'isoler et de concentrer une protéine précise parmi des milliers d'autres.

L'anticorps primaire utilisé est l'anticorps polyclonal anti-PA28α C-Term (Rabbit anti-PA28α C-Term, invitrogen™)

Le protocole réalisé est le suivant :

- Incubation de 500 µL de milieu brut (ascite ou sérum) avec 10 µL d'anticorps primaire pendant 1 nuit, à 4°C, sous agitation douce

- Ajout de 20 µL de protéines A/G (Protein A/G PLUS-Agarose, immunoprecipitation reagent sc 2003, tebu-bio) puis agitation douce, pendant 1 nuit, à 4°C
- Centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes à 4°C et récupération du surnageant S1
- Ajout de 1 mL de Complete Rippa Buffer (préparé à partir de 5mL de Rippa Buffer 1X + 50 µL de PMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) + 50 µL d'orthovanadate de sodium + 75 µL d'inhibiteur de protéases)
- Centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes à 4°C et récupération du surnageant S2
- Les trois dernières étapes sont répétées encore 3 fois pour récupérer les surnageants S3, S4 et S5
- Récupération du culot, après retrait de S5
- Ajout de 40 µL de tampon Lämlli dans le culot
- Avant utilisation pour le Western Blot, le culot est enfin chauffé pendant 5 min à 95°C

## **5.12. Digestion des protéines après migration sur gel SDS-PAGE**

Afin de réaliser une analyse en spectrométrie de masse des protéines isolées sur Western Blot, on réalise une digestion trypsique après excision de la bande d'intérêt à partir du gel de migration, selon le protocole suivant :

- Excision de chaque bande d'intérêt dans le gel au bleu de Coomassie et fractionnement de celle-ci en cubes d'environ 1mm<sup>3</sup> puis dépôt de ces fragments dans un eppendorf de 0,2 ml. On réalise un lavage du gel pour éliminer le bleu de Coomassie et le SDS qui inhibe l'activité de la trypsine par :
- Ajout de 100 µL d'ABS (ammonium bicarbonate) 25 mM/ACN 50%
- Chaque tube est alors vortexé pendant 1 minute puis soniqué pendant 5 minutes puis on en retire de 100 µL de surnageant puis les deux précédentes étapes sont répétées deux fois
- Rinçage par ajout de 100 µL d'ABS (ammonium bicarbonate) 25 mM/ACN 80%

- Chaque tube est alors vortexé pendant 1 minute puis soniqué pendant 5 minutes puis on en retire 100 µL de surnageant

On fait ensuite une réduction des ponts disulfures :

- Ajout de 100 µL de DTT (dithiothreitol) 10mM (15,4 mg dans 1mL d' H<sub>2</sub>0mQ)
- Mise à l'étuve à 56°C pendant 1 heure puis retrait de 100 µL de surnageant

Puis une alkylation des cystéines :

- Ajout de 100 µL de iodoacétamide (10,2 mg dans 1mL d' H<sub>2</sub>0mQ) et incubation pendant 15 minutes, dans le noir, à température ambiante puis retrait de 100 µL de surnageant

Enfin, on répète les lavages :

- Rinçage par ajout de 100 µL d'ABS (ammonium bicarbonate) 25 mM/H<sub>2</sub>0mQ puis vortex puis retrait de 100 µL de surnageant
- Ajout de 100 µL d'ABS (ammonium bicarbonate) 25 mM/ACN 50%, puis vortex puis retrait de 100 µL de surnageant, à répéter une deuxième fois
- Ajout de 100 µL d'ABS (ammonium bicarbonate) 25 mM/ACN 80%, puis vortex puis retrait de 100 µL de surnageant

La digestion trypsique se fait comme suit :

Ajout de 50 µL de trypsine à 50µg/mL dans un tampon NH4HCO3 50mM (pH=8), dans chaque tube et incubation, sur une nuit, à l'étuve à 30°C

- Ajout de 50 µL d'H<sub>2</sub>0mQ dans chaque tube puis vortex et centrifugation 3 minutes
- Retrait des 100 µL de surnageant qui sont transvasés dans un eppendorf de 1,5mL
- Ajout de 100 µL d'ACN 50%/H<sub>2</sub>0mQ 50%/TFA 1 % () puis vortex et centrifugation 3 minutes

On réalise enfin une lyophilisation par SPEED-VAC® à 4°C pendant 3 heures.

Les solutions sont reprises dans 20µL d' H<sub>2</sub>0mQ pour l'analyse MALDI.

La matrice utilisée pour l'analyse MALDI est le HCCA.

### **5.13. Tag-Mass**

Les synthèses des Tags ont été réalisées par la société Eurogentec (Liège Belgique) ; les protocoles sont réunis dans la publication Tag mass et le chapitre de livre (Annexe).

Les sondes ADNc ont été préparées à partir d'ARNm extraits du cerveau de rat au trizol. Les ARNm sont traités à la DNase pour empêcher les amplifications d'ADN génomique lors de la réaction de RT-PCR. Cette dernière est réalisée sur un fragment de la proenképhaline (414pb) en utilisant les primers CAGGACTCCCCAAAGGAGAACAGGA (gauche) et GACGTACCAGGCGGTAGCTGCATT. Le mix de PCR (50µL) était constitué de 1µL de chaque primer (20pmol), 2µL de cDNA, et 0,2µL Taq polymérase. Les conditions d'amplifications sont classiques (94°C, 60°C (hybridation), 72°C). L'ADN amplifié est ensuite purifié sur colonne de silice (Proméga) selon le protocole du fabricant. Pour le primer taggé, la PCR est réalisée en utilisant cette molécule à la place des primers habituels. Pour l'UTP tag, cette dernière est utilisée en mix avec du dTTP en proportion 1/3 (Tag/dTTP). Le témoin positif est réalisé à partir du même ADN amplifié mais marqué à la digoxigénine (DIG) selon le protocole Roche pour produits PCR.

## Références bibliographiques

1. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass spectrometry and protein analysis*. Science, 2006. **312**(5771): p. 212-7.
2. Patterson, S.D. and R.H. Aebersold, *Proteomics: the first decade and beyond*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 311-23.
3. Fields, S., *Proteomics. Proteomics in genomeland*. Science, 2001. **291**(5507): p. 1221-4.
4. Pandey, A. and M. Mann, *Proteomics to study genes and genomes*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 837-46.
5. Cravatt, B.F., G.M. Simon, and J.R. Yates, 3rd, *The biological impact of mass-spectrometry-based proteomics*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 991-1000.
6. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
7. 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.
8. Liu, Z. and K.L. Schey, *Optimization of a MALDI TOF-TOF mass spectrometer for intact protein analysis*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(4): p. 482-90.
9. Hayter, J.R., et al., *Proteome analysis of intact proteins in complex mixtures*. Mol Cell Proteomics, 2003. **2**(2): p. 85-95.
10. Lescuyer, P., M. Chevallat, and T. Rabilloud, *[Concepts and therapeutic perspectives of proteomics]*. Med Sci (Paris), 2004. **20**(5): p. 587-92.
11. Solassol, J., et al., *[Clinical proteomics: towards early detection of cancers]*. Med Sci (Paris), 2005. **21**(8-9): p. 722-9.
12. Solassol, J., et al., *Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection*. Expert Rev Proteomics, 2006. **3**(3): p. 311-20.
13. Blankenberg, F.G., *Molecular imaging: The latest generation of contrast agents and tissue characterization techniques*. J Cell Biochem, 2003. **90**(3): p. 443-53.
14. Solon, E.G., et al., *Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS imaging in pharmaceutical discovery and development*. AAPS J. **12**(1): p. 11-26.
15. Koo, O.M., I. Rubinstein, and H. Onyuksel, *Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review*. Nanomedicine, 2005. **1**(3): p. 193-212.
16. Stoeckli, M., et al., *Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 493-6.
17. Stauber, J., et al., *MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting*. J Proteome Res, 2008. **7**(3): p. 969-78.
18. Touboul, D., et al., *Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy*. J Lipid Res, 2005. **46**(7): p. 1388-95.
19. 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.
20. Wiseman, J.M., et al., *Desorption electrospray ionization mass spectrometry: Imaging drugs and metabolites in tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18120-5.

21. Seeley, E.H. and R.M. Caprioli, *Molecular imaging of proteins in tissues by mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(47): p. 18126-31.
22. Wisztorski, M., et al., [MALDI imaging: a new technology to discover and validate new biomarkers]. Med Sci (Paris), 2007. **23 Spec No 1**: p. 31-6.
23. Groseclose, M.R., et al., *Identification of proteins directly from tissue: in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2007. **42**(2): p. 254-62.
24. Chaurand, P., et al., *Imaging mass spectrometry of intact proteins from alcohol-preserved tissue specimens: bypassing formalin fixation*. J Proteome Res, 2008. **7**(8): p. 3543-55.
25. 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.
26. Lemaire, R., et al., *Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging*. Anal Chem, 2006. **78**(3): p. 809-19.
27. Lemaire, R., et al., *MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments*. Anal Chem, 2006. **78**(20): p. 7145-53.
28. Lemaire, R., et al., *Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections*. J Proteome Res, 2007. **6**(4): p. 1295-305.
29. Bantscheff, M., et al., *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*. Anal Bioanal Chem, 2007. **389**(4): p. 1017-31.
30. Doxiadis, I., U. Westhoff, and H. Grosse-Wilde, *Quantification of soluble HLA class I gene products by an enzyme linked immunosorbent assay*. Blut, 1989. **59**(5): p. 449-54.
31. Levis, J., et al., *Strategy for the maximization of clinically relevant information from hepatitis C virus, RT-PCR quantification*. J Clin Virol, 2001. **20**(3): p. 163-71.
32. Fabrizi, F., et al., *Novel assay using total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification for diagnosis of HCV infection in dialysis patients*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(1): p. 414-20.
33. Kato, K., et al., *Use of rabbit antibody IgG-loaded silicone pieces for the sandwich enzymoimmunoassay of macromolecular antigens*. J Biochem, 1977. **81**(5): p. 1557-66.
34. Briese, T., et al., *Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(2): p. 310-3.
35. Posthumus, M.A., et al., *Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules*. Anal Chem, 1978. **50**: p. 985.
36. Bouschen, W., et al., *Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells*. Rapid Commun Mass Spectrom. **24**(3): p. 355-64.
37. 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.
38. Hillenkamp, F., et al., *A high-sensitivity laser microprobe mass analyzer*. Applied Physics A, 1975. **8**: p. 341-348.
39. Iancu, T.C., et al., *The application of laser microprobe mass analysis to the study of biological material*. Biometals, 1996. **9**(1): p. 57-65.
40. Verbueken, A.H., et al., *Laser microprobe mass spectrometric identification of cyclosporin-induced intrarenal microliths in rat*. Biol Mass Spectrom, 1992. **21**(11): p. 590-6.

41. Karas, M., D. Bachmann, and F. Hillenkamp, *Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules* Anal Chem, 1985. **57**: p. 2935-2939.
42. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
43. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
44. Karas, M., et al., *Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry*. 1990. **241**: p. 175-185.
45. Strupat, K., M. Karas, and F. Hillenkamp, *2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry*. int J Mass Spectrom Ion Proc, 1991. **111**: p. 89-102.
46. Teramoto, K., et al., *A simple intact protein analysis by MALDI-MS for characterization of ribosomal proteins of two genome-sequenced lactic acid bacteria and verification of their amino acid sequences*. J Proteome Res, 2007. **6**(10): p. 3899-907.
47. Pieles, U., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(14): p. 3191-6.
48. Karas, M., et al., *Matrix Dependence of Metastable Fragmentation of Glycoproteins in MALDI TOF Mass Spectrometry*. Anal Chem, 1995. **67**: p. 675-679.
49. Garden, R.W. and J.V. Sweedler, *Heterogeneity within MALDI samples as revealed by mass spectrometric imaging*. Anal Chem, 2000. **72**(1): p. 30-6.
50. Lin, Y.S. and Y.C. Chen, *Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on sol-gel-derived 2,5-dihydroxybenzoic acid film*. Anal Chem, 2002. **74**(22): p. 5793-8.
51. Turney, K. and W.W. Harrison, *Liquid supports for ultraviolet atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(6): p. 629-35.
52. Berkenkamp, S., M. Karas, and F. Hillenkamp, *Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7003-7.
53. Laiko, V.V., et al., *Desorption/ionization of biomolecules from aqueous solutions at atmospheric pressure using an infrared laser at 3 microm*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(4): p. 354-61.
54. Laiko, V.V., N.I. Taranenko, and V.M. Doroshenko, *On the mechanism of ion formation from the aqueous solutions irradiated with 3 microm IR laser pulses under atmospheric pressure*. J Mass Spectrom, 2006. **41**(10): p. 1315-21.
55. Sze, E.T., T.W. Chan, and G. Wang, *Formulation of matrix solutions for use in matrix-assisted laser desorption/ionization of biomolecules*. J Am Soc Mass Spectrom, 1998. **9**(2): p. 166-74.
56. Armstrong, D.W., et al., *Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal Chem, 2001. **73**(15): p. 3679-86.
57. Zabet-Moghaddam, M., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the characterization of ionic liquids and the analysis of amino acids, peptides and proteins in ionic liquids*. J Mass Spectrom, 2004. **39**(12): p. 1494-505.
58. Carda-Broch, S., A. Berthod, and D.W. Armstrong, *Ionic matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight detection of DNA oligomers*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(6): p. 553-60.

59. Tholey, A., M. Zabet-Moghaddam, and E. Heinze, *Quantification of peptides for the monitoring of protease-catalyzed reactions by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry using ionic liquid matrixes*. Anal Chem, 2006. **78**(1): p. 291-7.
60. Zabet-Moghaddam, M., et al., *Pyridinium-based ionic liquid matrices can improve the identification of proteins by peptide mass-fingerprint analysis with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2006. **384**(1): p. 215-24.
61. Tholey, A., *Ionic liquid matrices with phosphoric acid as matrix additive for the facilitated analysis of phosphopeptides by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(11): p. 1761-8.
62. 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.
63. Li, Y.L., M.L. Gross, and F.F. Hsu, *Ionic-liquid matrices for improved analysis of phospholipids by MALDI-TOF mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(5): p. 679-82.
64. Snovida, S.I., J.M. Rak-Banville, and H. Perreault, *On the use of DHB/aniline and DHB/N,N-dimethylaniline matrices for improved detection of carbohydrates: automated identification of oligosaccharides and quantitative analysis of sialylated glycans by MALDI-TOF mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008. **19**(8): p. 1138-46.
65. Snovida, S.I., V.C. Chen, and H. Perreault, *Use of a 2,5-dihydroxybenzoic acid/aniline MALDI matrix for improved detection and on-target Derivatization of glycans: A preliminary report*. Anal Chem, 2006. **78**(24): p. 8561-8.
66. Li, K.W., et al., *Direct Peptide Profiling by Mass Spectrometry of Single Identified Neurons Reveals Complex Neuropeptide-processing Pattern*. J. Biol. Chem., 1994. **269**: p. 30288-30292.
67. Jimenez, C.R., et al., *Neuropeptide expression and processing as revealed by direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of single neurons*. J Neurochem, 1994. **62**(1): p. 404-7.
68. Dreisewerd, K., et al., *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, 1997. **169**: p. 291-299.
69. Jimenez, C.R. and A.L. Burlingame, *Ultramicroanalysis of peptide profiles in biological samples using MALDI mass spectrometry*. Exp Nephrol, 1998. **6**(5): p. 421-8.
70. Jimenez, C.R., et al., *Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of single neurons reveals differential peptide patterns in a small neuronal network*. Biochemistry, 1998. **37**(7): p. 2070-6.
71. Rubakhin, S.S., W.T. Greenough, and J.V. Sweedler, *Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons*. Anal Chem, 2003. **75**(20): p. 5374-80.
72. Rubakhin, S.S. and J.V. Sweedler, *Quantitative measurements of cell-cell signaling peptides with single-cell MALDI MS*. Anal Chem, 2008. **80**(18): p. 7128-36.
73. Moroz, L.L., R. Gillette, and J.V. Sweedler, *Single-cell analyses of nitrergic neurons in simple nervous systems*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 4): p. 333-41.
74. Li, L., R.W. Garden, and J.V. Sweedler, *Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 151-60.

75. Hummon, A.B., J.V. Sweedler, and R.W. Corbin, *Discovering new neuropeptides using single-cell mass spectrometry*. Anal Chem, 2003. **22**: p. 515.
76. Fournier, I., R. Day, and M. Salzet, *Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain*. Neuro Endocrinol Lett, 2003. **24**(1-2): p. 9-14.
77. 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.
78. Kieman, J.A., *Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: what they are and what they do*. Microscopy Today, 2000: p. 8-14.
79. Plenat, F., et al., [Formaldehyde fixation in the third millennium]. Ann Pathol, 2001. **21**(1): p. 29-47.
80. Plenat, F., et al., [Molecular consequences of fixation and tissue processing: the examples of nucleic acids and proteins]. Ann Pathol, 2006. **26**(1): p. 8-21.
81. Wisztorski, M., et al., *MALDI direct analysis and imaging of frozen versus FFPE tissues: what strategy for which sample?* Methods Mol Biol. **656**: p. 303-22.
82. 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.
83. Seeley, E.H., et al., *Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections*. J Am Soc Mass Spectrom, 2008. **19**(8): p. 1069-77.
84. Jackson, S.N., et al., *MALDI-ion mobility-TOFMS imaging of lipids in rat brain tissue*. J Mass Spectrom, 2007. **42**(8): p. 1093-8.
85. Verhaert, P.D., et al., *Neuropeptide imaging on an LTQ with vMALDI source: The complete 'all-in-one' peptidome analysis*. Int J Mass Spectrom, 2007. **260**: p. 177-184.
86. Skold, K., et al., *Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse*. J Proteome Res, 2006. **5**(2): p. 262-9.
87. Djidja, M.C., et al., *Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections*. Proteomics, 2009. **9**(10): p. 2750-63.
88. Chan, K., et al., *MALDI mass spectrometry imaging of gangliosides in mouse brain using ionic liquid matrix*. Anal Chim Acta, 2009. **639**(1-2): p. 57-61.
89. Lemaire, R., et al., *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): p. 4127-34.
90. Dai, Y., R.M. Whittal, and L. Li, *Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures*. Anal Chem, 1999. **71**(5): p. 1087-91.
91. Reyzer, M.L., et al., *Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(10): p. 1081-92.
92. Sugiura, Y., S. Shimma, and M. Setou, *Two-step matrix application technique to improve ionization efficiency for matrix-assisted laser desorption/ionization in imaging mass spectrometry*. Anal Chem, 2006. **78**(24): p. 8227-35.
93. Chen, Y., et al., *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, 2008. **80**(8): p. 2780-8.

94. Jardin-Mathe, O., et al., *MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software*. *J Proteomics*, 2008. **71**(3): p. 332-45.
95. Reyzer, M.L. and R.M. Caprioli, *MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery*. *J Proteome Res*, 2005. **4**(4): p. 1138-42.
96. Anderson, D.S., et al., *High-throughput matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry method for quantification of hepcidin in human urine*. *Anal Chem*. **82**(4): p. 1551-5.
97. Marshall, A.G., C.L. Hendrickson, and G.S. Jackson, *Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: a primer*. *Mass Spectrom Rev*, 1998. **17**(1): p. 1-35.
98. Comisarow, M.B. and A.G. Marshall, *The early development of Fourier transform ion cyclotron resonance (FT-ICR) spectroscopy*. *J Mass Spectrom*, 1996. **31**(6): p. 581-5.
99. Cornett, D.S., S.L. Frappier, and R.M. Caprioli, *MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue*. *Anal Chem*, 2008. **80**(14): p. 5648-53.
100. Verbeck, G., et al., *A fundamental introduction to ion mobility mass spectrometry applied to the analysis of biomolecules*. *J Biomol Tech*, 2002. **13**(2): p. 56-61.
101. Ruotolo, B.T., et al., *Peak capacity of ion mobility mass spectrometry: separation of peptides in helium buffer gas*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002. **782**(1-2): p. 385-92.
102. Koomen, J.M., et al., *Oligonucleotide analysis with MALDI-ion-mobility-TOFMS*. *Anal Bioanal Chem*, 2002. **373**(7): p. 612-7.
103. Ruotolo, B.T., et al., *Observation of conserved solution-phase secondary structure in gas-phase tryptic peptides*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(16): p. 4214-5.
104. Ruotolo, B.T., et al., *Distinguishing between phosphorylated and nonphosphorylated peptides with ion mobility-mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2002. **1**(4): p. 303-6.
105. McLean, J.A., et al., *Ion mobility-mass spectrometry: a new paradigm for proteomics*. *Int J Mass Spectrom*, 2005. **240**: p. 301.
106. Jackson, S.N., et al., *Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(2): p. 133-8.
107. Sleno, L. and D.A. Volmer, *Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005. **19**(14): p. 1928-36.
108. Drexler, D.M., et al., *Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2007. **55**(3): p. 279-88.
109. Hopfgartner, G., E. Varesio, and M. Stoeckli, *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging of complete rat sections using a triple quadrupole linear ion trap*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009. **23**(6): p. 733-6.
110. Landgraf, R.R., et al., *MALDI-linear ion trap microprobe MS/MS studies of the effects of dichloroacetate on lipid content of nerve tissue*. *Anal Chem*, 2007. **79**(21): p. 8170-5.
111. Hsieh, Y., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006. **20**(6): p. 965-72.

112. Goto-Inoue, N., et al., *High-sensitivity analysis of glycosphingolipids by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight imaging mass spectrometry on transfer membranes*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **870**(1): p. 74-83.
113. Yew, J.Y., S. Dikler, and A.O. Stretton, *De novo sequencing of novel neuropeptides directly from Ascaris suum tissue using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003. **17**(24): p. 2693-8.
114. Van de Plas, R., et al., *Prospective exploration of biochemical tissue composition via imaging mass spectrometry guided by principal component analysis*. Pac Symp Biocomput, 2007: p. 458-69.
115. Trim, P.J., et al., *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, 2008. **22**(10): p. 1503-9.
116. Djidja, M.C., et al., *Method development for protein profiling in biological tissues by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(10): p. 1615-8.
117. Zaima, N., Y. Matsuyama, and M. Setou, *Principal component analysis of direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric data related to metabolites of fatty liver*. J Oleo Sci, 2009. **58**(5): p. 267-73.
118. Yao, I., et al., *In situ proteomics with imaging mass spectrometry and principal component analysis in the Scrapper-knockout mouse brain*. Proteomics, 2008. **8**(18): p. 3692-701.
119. McCombie, G., et al., *Spatial and spectral correlations in MALDI mass spectrometry images by clustering and multivariate analysis*. Anal Chem, 2005. **77**(19): p. 6118-24.
120. Deininger, S.O., et al., *MALDI Imaging Combined with Hierarchical Clustering as a New Tool for the Interpretation of Complex Human Cancers*. J Proteome Res, 2008.
121. Walch, A., et al., *MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology*. Histochem Cell Biol, 2008. **130**(3): p. 421-34.
122. Chaurand, P., et al., *Integrating histology and imaging mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(4): p. 1145-55.
123. Cornett, D.S., et al., *A novel histology-directed strategy for MALDI-MS tissue profiling that improves throughput and cellular specificity in human breast cancer*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1975-83.
124. Schwamborn, K., et al., *Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging*. Int J Mol Med, 2007. **20**(2): p. 155-9.
125. McLean, J.A., W.K. Russell, and D.H. Russell, *A high repetition rate (1 kHz) microcrystal laser for high throughput atmospheric pressure MALDI-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry*. Anal Chem, 2003. **75**(3): p. 648-54.
126. Moskovets, E., et al., *High-throughput axial MALDI-TOF MS using a 2-kHz repetition rate laser*. Anal Chem, 2006. **78**(3): p. 912-9.
127. Spengler, B. and M. Hubert, *Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(6): p. 735-48.
128. Bouschen, W. and B. Spengler, *Artifacts of MALDI sample preparation investigated by high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization (SMALDI) imaging mass spectrometry*. Int J Mass Spectrom, 2007. **266**: p. 129-137.
129. Koestler, M., et al., *A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier*

- transform ion cyclotron resonance mass spectrometer.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. **22**(20): p. 3275-85.
- 130. 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.
  - 131. Altelaar, A.F., et al., *Imaging mass spectrometry at cellular length scales.* Nat Protoc, 2007. **2**(5): p. 1185-96.
  - 132. Altelaar, A.F., et al., *High-resolution MALDI imaging mass spectrometry allows localization of peptide distributions at cellular length scales in pituitary tissue sections.* Int J Mass Spectrom, 2007. **260**: p. 203-211.
  - 133. Belu, A.M., D.J. Graham, and D.G. Castner, *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces.* Biomaterials, 2003. **24**(21): p. 3635-53.
  - 134. Todd, P.J., et al., *Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization.* J Mass Spectrom, 2001. **36**(4): p. 355-69.
  - 135. Pacholski, M.L. and N. Winograd, *Imaging with mass spectrometry.* Chem Rev, 1999. **99**(10): p. 2977-3006.
  - 136. Colliver, T.L., et al., *Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS.* Anal Chem, 1997. **69**(13): p. 2225-31.
  - 137. Szymczak, W. and K. Wittmaack, *Effect of water treatment on analyte and matrix ion yields in matrix-assisted time-of-flight secondary ion mass spectrometry: the case of insulin in and on hydroxycinnamic acid.* Rapid Commun Mass Spectrom, 2002. **16**(21): p. 2025-33.
  - 138. Touboul, D., et al., *Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment.* Anal Chem, 2004. **76**(6): p. 1550-9.
  - 139. 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.
  - 140. Delcorte, A., et al., *Sample metallization for performance improvement in desorption/ionization of kilodalton molecules: quantitative evaluation, imaging secondary ion MS, and laser ablation.* Anal Chem, 2003. **75**(24): p. 6875-85.
  - 141. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization.* Science, 2004. **306**(5695): p. 471-3.
  - 142. Takats, Z., J.M. Wiseman, and R.G. Cooks, *Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology.* J Mass Spectrom, 2005. **40**(10): p. 1261-75.
  - 143. Talaty, N., Z. Takats, and R.G. Cooks, *Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization.* Analyst, 2005. **130**(12): p. 1624-33.
  - 144. Van Berkel, G.J., M.J. Ford, and M.A. Deibel, *Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization.* Anal Chem, 2005. **77**(5): p. 1207-15.
  - 145. Wiseman, J.M., et al., *Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization.* Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(43): p. 7094-7.
  - 146. Takats, Z., et al., *Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry.* Chem Commun (Camb), 2005(15): p. 1950-2.

147. Cody, R.B., J.A. Laramee, and H.D. Durst, *Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions*. Anal Chem, 2005. **77**(8): p. 2297-302.
148. Williams, J.P., et al., *The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(9): p. 1447-56.
149. Chaurand, P., et al., *Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry*. Proteomics, 2003. **3**(11): p. 2221-39.
150. Hanash, S., *Integrated global profiling of cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(8): p. 638-44.
151. Chaurand, P., et al., *Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Proteomics, 2001. **1**(10): p. 1320-6.
152. Masumori, N., et al., *A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential*. Cancer Res, 2001. **61**(5): p. 2239-49.
153. Schwartz, S.A., et al., *Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 981-7.
154. Caprioli, R.M., *Deciphering protein molecular signatures in cancer tissues to aid in diagnosis, prognosis, and therapy*. Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 10642-5.
155. Schwartz, S.A., et al., *Proteomic-based prognosis of brain tumor patients using direct-tissue matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Cancer Res, 2005. **65**(17): p. 7674-81.
156. Stoeckli, M., et al., *Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry*. Anal Biochem, 2002. **311**(1): p. 33-9.
157. Pierson, J., et al., *Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry*. J Proteome Res, 2004. **3**(2): p. 289-95.
158. Meistermann, H., et al., *Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(10): p. 1876-86.
159. Shimma, S., et al., *MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2007. **855**(1): p. 98-103.
160. Bast, R.C., Jr., et al., *New tumor markers: CA125 and beyond*. Int J Gynecol Cancer, 2005. **15 Suppl 3**: p. 274-81.
161. Menon, U., et al., *Views of BRCA gene mutation carriers on preimplantation genetic diagnosis as a reproductive option for hereditary breast and ovarian cancer*. Hum Reprod, 2007. **22**(6): p. 1573-7.
162. Breedlove, G. and C. Busenhart, *Screening and detection of ovarian cancer*. J Midwifery Womens Health, 2005. **50**(1): p. 51-4.
163. Williams, T.I., et al., *Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers*. J Proteome Res, 2007. **6**(8): p. 2936-62.
164. Chan, K.K. and T.J. Selman, *Testing for ovarian cancer*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2006. **20**(6): p. 977-83.
165. Rapkiewicz, A.V., et al., *Biomarkers of ovarian tumours*. Eur J Cancer, 2004. **40**(17): p. 2604-12.

166. Ulusoy, S., et al., *The risk of malignancy index in discrimination of adnexal masses*. Int J Gynaecol Obstet, 2007. **96**(3): p. 186-91.
167. Lambaudie, E., P. Collinet, and D. Vinatier, [Ovarian cancers and CA 125 in 2006]. Gynecol Obstet Fertil, 2006. **34**(3): p. 254-7.
168. Naora, H. and D.J. Montell, *Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(5): p. 355-66.
169. Baron, A.T., et al., *Soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) [corrected] and cancer antigen 125 (CA125) as screening and diagnostic tests for epithelial ovarian cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(2): p. 306-18.
170. Visintin, I., et al., *Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(4): p. 1065-72.
171. Nosov, V., et al., *Validation of serum biomarkers for detection of early-stage ovarian cancer*. Am J Obstet Gynecol, 2009. **200**(6): p. 639 e1-5.
172. Petricoin, E.F., et al., *Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer*. Lancet, 2002. **359**(9306): p. 572-7.
173. Kozak, K.R., et al., *Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12343-8.
174. Diamandis, E.P., *Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(4): p. 367-78.
175. Zhang, Z., et al., *Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5882-90.
176. Diamandis, E.P., *Analysis of serum proteomic patterns for early cancer diagnosis: drawing attention to potential problems*. J Natl Cancer Inst, 2004. **96**(5): p. 353-6.
177. Ye, B., et al., *Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(8): p. 2904-11.
178. Diamandis, E.P., *Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 170; author reply 170-1.
179. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
180. Liotta, L.A., M. Ferrari, and E. Petricoin, *Clinical proteomics: written in blood*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 905.
181. Mehta, A.I., et al., *Biomarker amplification by serum carrier protein binding*. Dis Markers, 2003. **19**(1): p. 1-10.
182. Yousef, G.M. and E.P. Diamandis, *The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease*. Endocr Rev, 2001. **22**(2): p. 184-204.
183. Mok, S.C., et al., *Prostasin, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology*. J Natl Cancer Inst, 2001. **93**(19): p. 1458-64.
184. Knowlton, J.R., et al., *Structure of the proteasome activator REGalpha (PA28alpha)*. Nature, 1997. **390**(6660): p. 639-43.
185. Li, J. and M. Rechsteiner, *Molecular dissection of the 11S REG (PA28) proteasome activators*. Biochimie, 2001. **83**(3-4): p. 373-83.
186. Johnston, S.C., et al., *The proteasome 11S regulator subunit REG alpha (PA28 alpha) is a heptamer*. Protein Sci, 1997. **6**(11): p. 2469-73.
187. Kang, S., et al., *Molecular proteomics imaging of tumor interfaces by mass spectrometry*. J Proteome Res, 2008. **9**(2): p. 1157-64.

188. Meriaux, C., et al., *Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids*. J Proteomics. **73**(6): p. 1204-18.
189. Liu, Y., et al., *Elevation of sulfatides in ovarian cancer: An integrated transcriptomic and lipidomic analysis including tissue-imaging mass spectrometry*. Mol Cancer. **9**: p. 186.
190. Redeby, T., J. Roeraade, and A. Emmer, *Simple fabrication of a structured matrix-assisted laser desorption/ionization target coating for increased sensitivity in mass spectrometric analysis of membrane proteins*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(10): p. 1161-6.
191. Redeby, T. and A. Emmer, *Membrane protein and peptide sample handling for MS analysis using a structured MALDI target*. Anal Bioanal Chem, 2005. **381**(1): p. 225-32.
192. Redeby, T., et al., *A screening procedure for the solubilization of chloroplast membrane proteins from the marine green macroalga Ulva lactuca using RP-HPLC-MALDI-MS*. Int J Biol Macromol, 2006. **39**(1-3): p. 29-36.
193. Zhang, H., et al., *Differential recovery of membrane proteins after extraction by aqueous methanol and trifluoroethanol*. Proteomics, 2007. **7**(10): p. 1654-63.
194. Wang, H., et al., *Development and evaluation of a micro- and nanoscale proteomic sample preparation method*. J Proteome Res, 2005. **4**(6): p. 2397-403.
195. Chertov, O., et al., *Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry*. Proteomics, 2004. **4**(4): p. 1195-203.
196. Ferro, M., et al., *Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins*. Electrophoresis, 2000. **21**(16): p. 3517-26.
197. Wang, W., et al., *Membrane proteome analysis of microdissected ovarian tumor tissues using capillary isoelectric focusing/reversed-phase liquid chromatography-tandem MS*. Anal Chem, 2007. **79**(3): p. 1002-9.
198. Franck, J., et al., *MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30 000 daltons*. Med Sci Monit. **16**(9): p. BR293-299.
199. McLafferty, F.W., *Tandem mass spectrometry*. Science, 1983. **214**: p. 280-287.
200. Bengtsson, S., et al., *Large-scale proteomics analysis of human ovarian cancer for biomarkers*. J Proteome Res, 2007. **6**(4): p. 1440-50.
201. Gortzak-Uzan, L., et al., *A proteome resource of ovarian cancer ascites: integrated proteomic and bioinformatic analyses to identify putative biomarkers*. J Proteome Res, 2008. **7**(1): p. 339-51.
202. Kikuchi, N., et al., *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): p. 1061-9.
203. Makino, E., et al., *Introduction of an N-terminal peptide of S100C/A11 into human cells induces apoptotic cell death*. J Mol Med, 2004. **82**(9): p. 612-20.
204. Giuntoli, R.L., 2nd, et al., *Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for antitumor immunity*. Anticancer Res, 2009. **29**(8): p. 2875-84.
205. Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister, *The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 1015-68.
206. Sijts, A., et al., *The role of the proteasome activator PA28 in MHC class I antigen processing*. Mol Immunol, 2002. **39**(3-4): p. 165-9.

207. Wang, Z., et al., *Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 383.
208. Elg, S.A., et al., *Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovarian carcinoma*. Cancer, 1997. **80**(8): p. 1448-56.
209. Fournier, T., N.N. Medjoubi, and D. Porquet, *Alpha-1-acid glycoprotein*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1482**(1-2): p. 157-71.
210. Vasson, M.P., et al., *Serum alpha-1 acid glycoprotein in chronic renal failure and hemodialysis*. Int J Artif Organs, 1991. **14**(2): p. 92-6.
211. Laine, E., et al., *Modulation of human polymorphonuclear neutrophil functions by alpha 1-acid glycoprotein*. Inflammation, 1990. **14**(1): p. 1-9.
212. Imre, T., et al., *Mass spectrometric and linear discriminant analysis of N-glycans of human serum alpha-1-acid glycoprotein in cancer patients and healthy individuals*. J Proteomics, 2008. **71**(2): p. 186-97.
213. Kim, K.D., et al., *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): p. 1126-36.
214. Liang, X., et al., *Hemopexin down-regulates LPS-induced proinflammatory cytokines from macrophages*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(2): p. 229-35.
215. Leygue, E., et al., *Expression of lumican in human breast carcinoma*. Cancer Res, 1998. **58**(7): p. 1348-52.
216. Leygue, E., et al., *Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma*. J Pathol, 2000. **192**(3): p. 313-20.
217. Babelova, A., et al., *Biglycan, a danger signal that activates the NLRP3 inflammasome via toll-like and P2X receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(36): p. 24035-48.
218. Schaefer, L., et al., *The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2223-33.
219. Kitagawa, K., et al., *Epithelial-mesenchymal transformation of a newly established cell line from ovarian adenocarcinoma by transforming growth factor-beta1*. Int J Cancer, 1996. **66**(1): p. 91-7.
220. Keshamouni, V.G., et al., *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): p. 1143-54.
221. Woo, M.M., et al., *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): p. 7958-64.
222. Woo, M.M., et al., *Oviductal glycoprotein, a new differentiation-based indicator present in early ovarian epithelial neoplasia and cortical inclusion cysts*. Gynecol Oncol, 2004. **93**(2): p. 315-9.
223. Lemaire, R., et al., *Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag*. J Proteome Res, 2007. **6**(6): p. 2057-67.
224. Vasseur, M., *Les virus oncogènes : Introduction à la biologie moléculaire du cancer*. 1989, Paris: Hermann.
225. Wu, T.C., et al., *Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens*. Am J Pathol, 1991. **138**(6): p. 1461-9.

226. Littman, A.J., et al., *Association between late age at infectious mononucleosis, Epstein-Barr virus antibodies, and ovarian cancer risk*. Scand J Infect Dis, 2003. **35**(10): p. 728-35.
227. Krueger, G.R., et al., *Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands*. Lancet, 1990. **336**(8725): p. 1255-6.
228. Puri, R.K., P. Leland, and A. Razzaque, *Antigen(s)-specific tumour-infiltrating lymphocytes from tumour induced by human herpes virus-6 (HHV-6) DNA transfected NIH 3T3 transformants*. Clin Exp Immunol, 1991. **83**(1): p. 96-101.
229. Salzet, M., C. Wattez, and M.C. Slomianny, *Epitope mapping with ELISA of an antibody against oxytocin used for the characterization of an oxytocin-like epitope in the sex segmental ganglia of the leech Erpobdella octoculata*. Comp Biochem Physiol Comp Physiol, 1993. **104**(1): p. 75-81.
230. Ong, S.E. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative*. Nat Chem Biol, 2005. **1**(5): p. 252-62.
231. Lanquar, V., et al., *15N-metabolic labeling for comparative plasma membrane proteomics in Arabidopsis cells*. Proteomics, 2007. **7**(5): p. 750-4.
232. Gygi, S.P., et al., *Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 994-9.
233. Ross, P.L., et al., *Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents*. Mol Cell Proteomics, 2004. **3**(12): p. 1154-69.
234. Yao, X., et al., *Proteolytic 18O labeling for comparative proteomics: model studies with two serotypes of adenovirus*. Anal Chem, 2001. **73**(13): p. 2836-42.
235. Munchbach, M., et al., *Quantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety*. Anal Chem, 2000. **72**(17): p. 4047-57.
236. Goodlett, D.R., et al., *Differential stable isotope labeling of peptides for quantitation and de novo sequence derivation*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2001. **15**(14): p. 1214-21.
237. Jiang, H. and A.M. English, *Quantitative analysis of the yeast proteome by incorporation of isotopically labeled leucine*. J Proteome Res, 2002. **1**(4): p. 345-50.
238. Spellman, D.S., et al., *Stable isotopic labeling by amino acids in cultured primary neurons: application to brain-derived neurotrophic factor-dependent phosphotyrosine-associated signaling*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(6): p. 1067-76.
239. Beynon, R.J., et al., *Multiplexed absolute quantification in proteomics using artificial QCAT proteins of concatenated signature peptides*. Nat Methods, 2005. **2**(8): p. 587-9.
240. Gerber, S.A., et al., *Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(12): p. 6940-5.
241. Brun, V., et al., *Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(12): p. 2139-49.
242. Patel, V.J., et al., *A comparison of labeling and label-free mass spectrometry-based proteomics approaches*. J Proteome Res, 2009. **8**(7): p. 3752-9.
243. Lange, V., et al., *Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 222.
244. Silva, J.C., et al., *Absolute quantification of proteins by LCMS: a virtue of parallel MS acquisition*. Mol Cell Proteomics, 2006. **5**(1): p. 144-56.
245. Wilm, M., *Quantitative proteomics in biological research*. Proteomics, 2009. **9**(20): p. 4590-605.
246. Fulton, R.J., et al., *Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system*. Clin Chem, 1997. **43**(9): p. 1749-56.

247. Vignali, D.A., *Multiplexed particle-based flow cytometric assays*. J Immunol Methods, 2000. **243**(1-2): p. 243-55.
248. Prabhakar, U., E. Eirikis, and H.M. Davis, *Simultaneous quantification of proinflammatory cytokines in human plasma using the LabMAP assay*. J Immunol Methods, 2002. **260**(1-2): p. 207-18.
249. de Jager, W., et al., *Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells*. Clin Diagn Lab Immunol, 2003. **10**(1): p. 133-9.
250. Rouquette, A.M., C. Desgruelles, and P. Laroche, *Evaluation of the new multiplexed immunoassay, FIDIS, for simultaneous quantitative determination of antimicrobial antibodies and comparison with conventional methods*. Am J Clin Pathol, 2003. **120**(5): p. 676-81.
251. Nelson, R.W., et al., *Mass spectrometric immunoassay*. Anal Chem, 1995. **67**(7): p. 1153-8.
252. Hahner, S., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of DNA using photocleavable biotin*. Biomol Eng, 1999. **16**(1-4): p. 127-33.
253. Rumpel, L., Scott, Neubert, Pfizer Global Research & Development,, *ASMS june 2006, Seattle*. 2006 Seattle.
254. Zhang, H., et al., *A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum*. Nat Med, 2006. **12**(4): p. 473-7.
255. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods*. Nature, 1959. **184 (Suppl 21)**: p. 1648-9.
256. Berson, S.A. and R.S. Yalow, *Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody*. J Clin Invest, 1959. **38**: p. 1996-2016.
257. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. **256**(5517): p. 495-7.
258. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
259. Hayashi, Y., et al., *Precision, limit of detection and range of quantitation in competitive ELISA*. Anal Chem, 2004. **76**(5): p. 1295-301.
260. Haff, L.A. and I.P. Smirnov, *Multiplex genotyping of PCR products with MassTag-labeled primers*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(18): p. 3749-50.
261. Bai, X., et al., *Design and synthesis of a photocleavable biotinylated nucleotide for DNA analysis by mass spectrometry*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(2): p. 535-41.
262. Rees, J.L. and C. Fisher, *Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin*. Trends Genet, 1992. **8**(1): p. 8.

## **1. Annexes**

**Annexe I:** MALDI IMAGING Mass Spectrometry: State of the art technology in clinical proteomics.

**Annexe II:** Developing MALDI Imaging Technology for Cancer Profile.

**Annexe III:** On tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing proteins identification in bottom-up imaging strategies

**Annexe IV:** Specific MALDI-MSI: TAG-MASS.

**Annexe V:** On Tissue Proteins Identification Improvement by N-Terminal Peptides Derivatization.

# MALDI Imaging Mass Spectrometry

STATE OF THE ART TECHNOLOGY IN CLINICAL PROTEOMICS\*

**Julien Franck†§, Karim Arafa†§, 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

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

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.

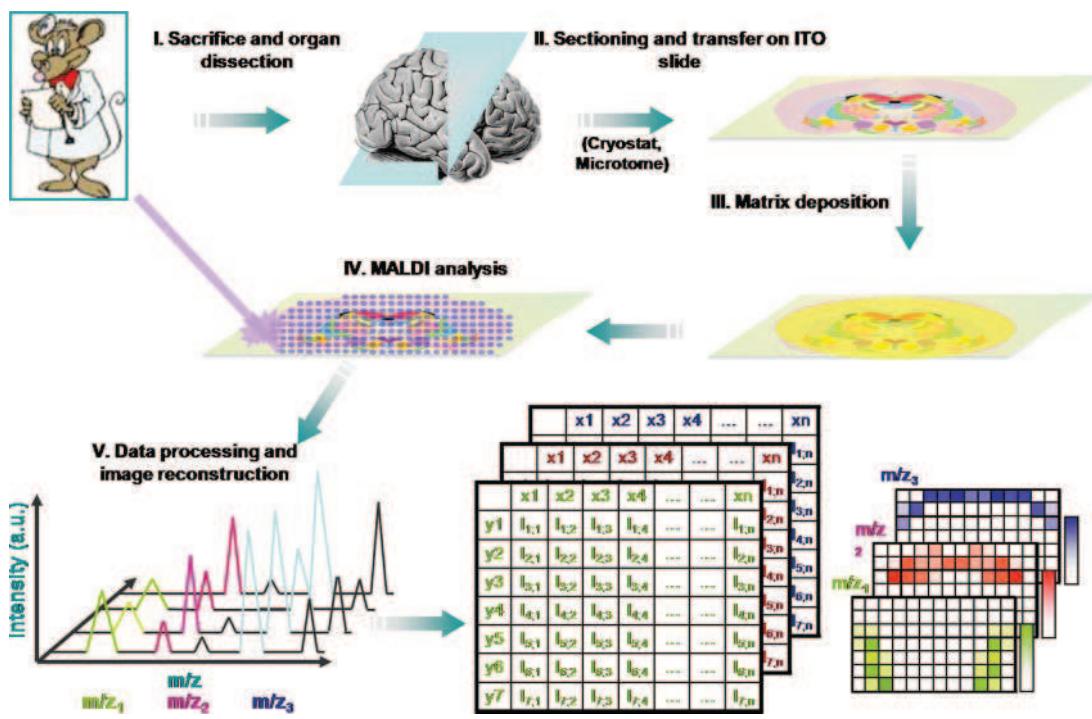
Mass spectrometry has become a centerpiece technology predominantly in the field of proteomics. Nonetheless a more comprehensive understanding of the constituents of biological systems will be aided by determining the constituent distribution. This anatomical dimension has been added through mass spectrometry imaging (MSI)<sup>1</sup> 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.

<sup>1</sup> 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.

## MALDI Imaging Mass Spectrometry



**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*, indium 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-

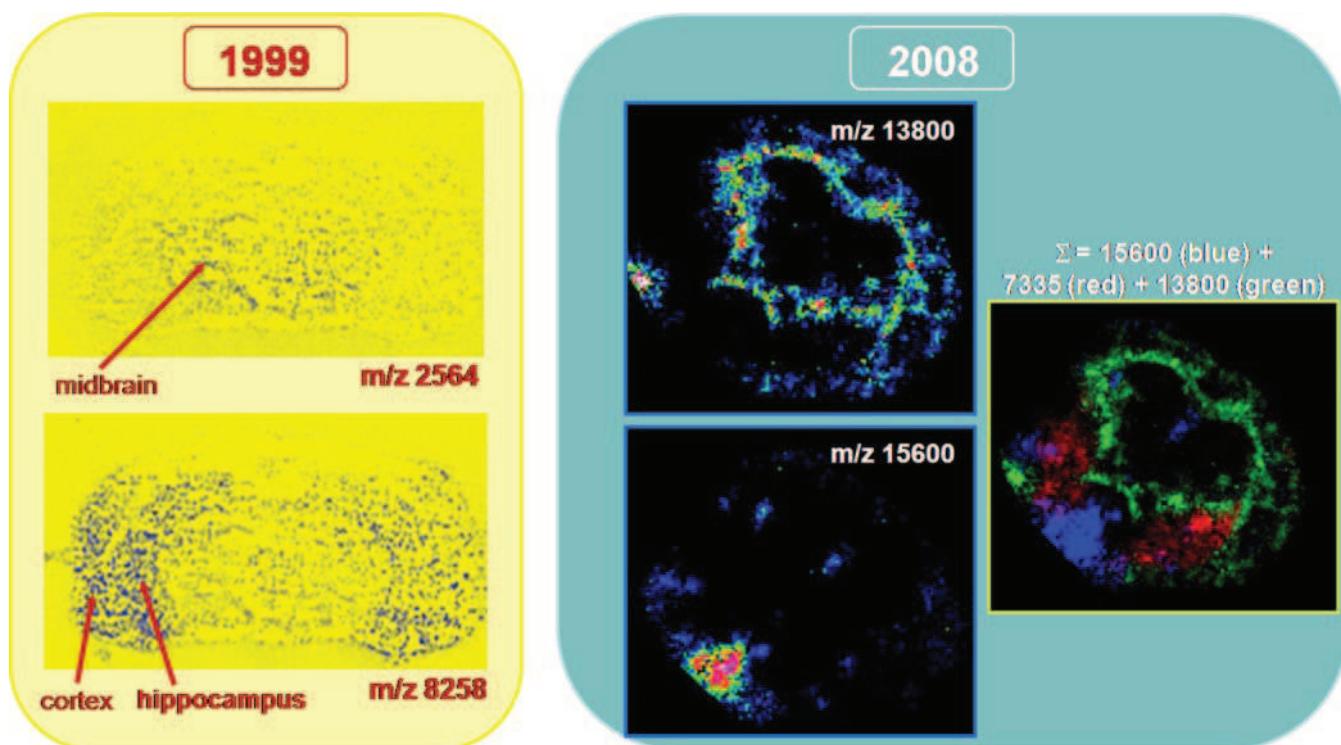


FIG. 2. Ten years' evolution from one of the first MALDI images presented in 1999 at the 47th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics (left) (reprinted with permission of Caprioli and co-workers (84)) and molecular images obtained by our group for mouse stem cells injected in brain tissue 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.

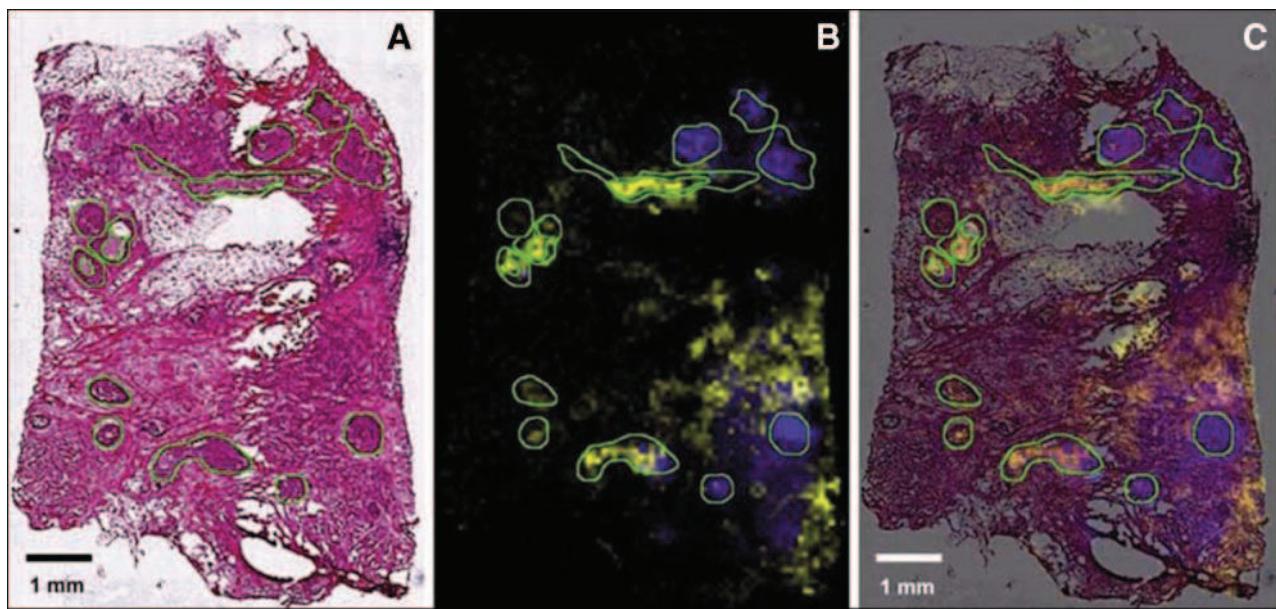
The advantage of MALDI-MSI is the ability to obtain a large collection of mass spectra spread out over a tissue section while retaining the absolute spatial location of these measurements for subsequent analysis and imaging. One of the statistical techniques to reduce the complexity of the information 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). Dendograms 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).

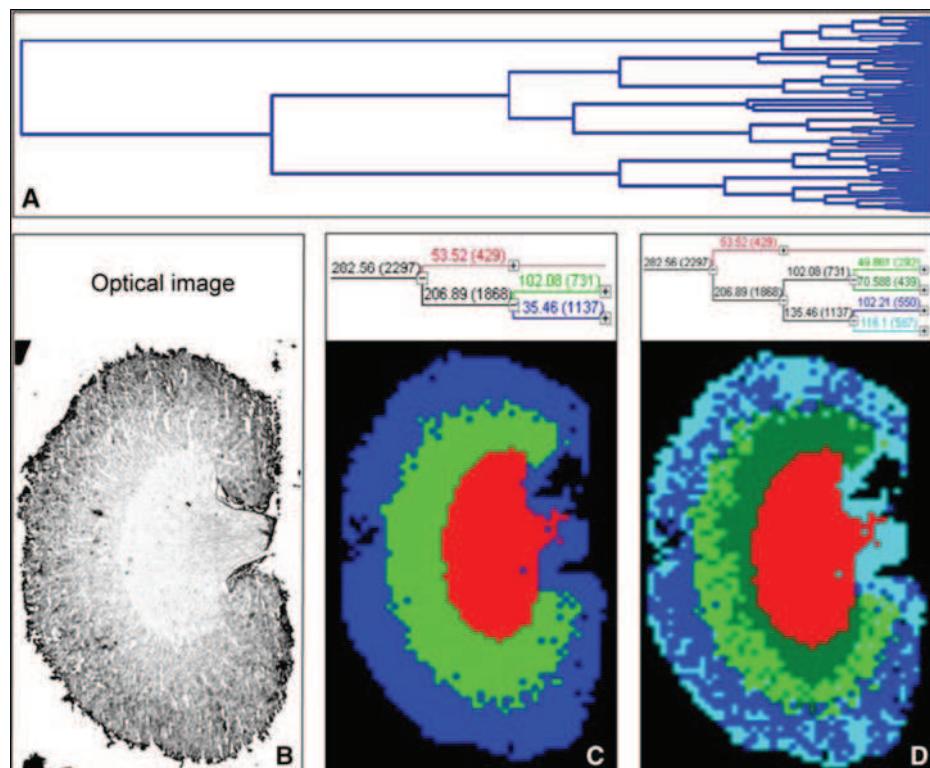
#### EARLY DISEASE DETECTION

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 $\alpha$  or REG- $\alpha$ ) (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  $\mu\text{m}$ . Scale bar, 1 mm. (Reprinted with permission of Walch *et al.* (44).)

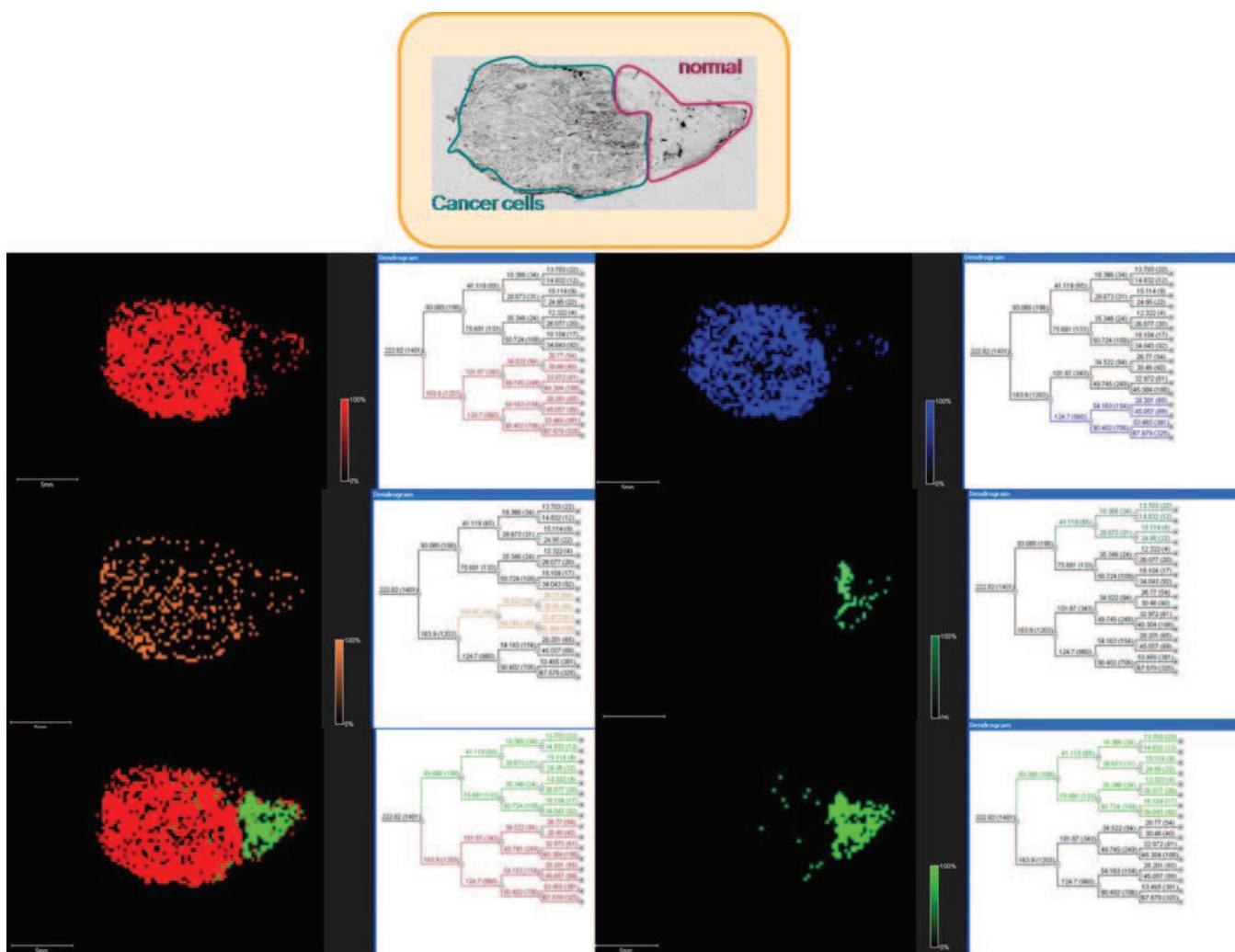
Downloaded from www.mcponline.org at INSERM on September 10, 2009



**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. 6*g*) (59), quantitative PCR, and Western blot (Fig. 6*h*). Recently, we confirmed the REG- $\alpha$  expression in an ovarian



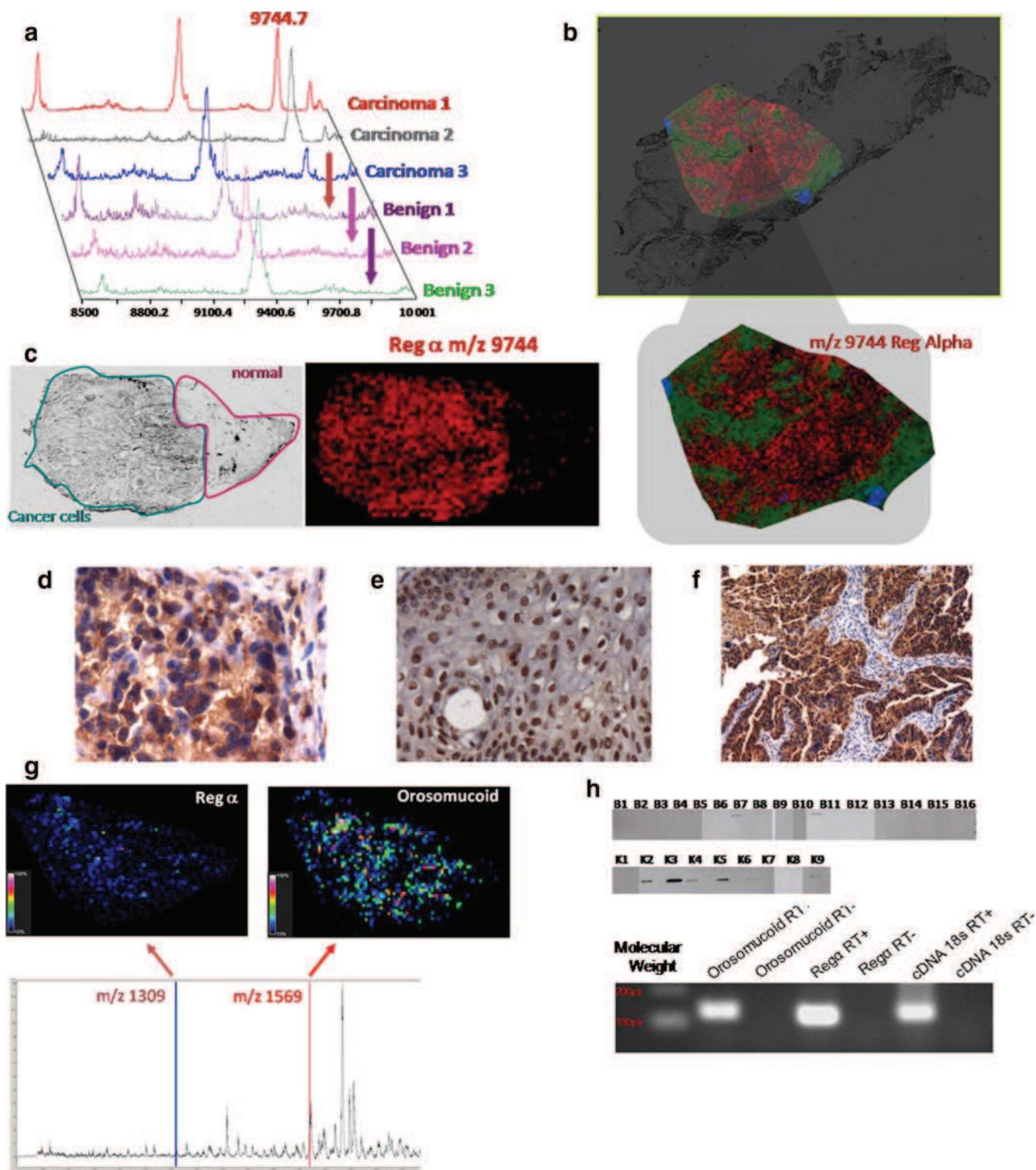
**Fig. 5.** Hierarchical clustering using the ClinProt tool (Bruker Daltonics) after PCA of a stage 4 mucinous ovarian carcinoma section covered with ionic matrix using the Shimadzu CHIP 1000 microspotter. *a*, optical image of the ovarian carcinoma section. *b–f*, reconstructed selected dendrograms 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.<sup>2</sup> 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).

<sup>2</sup> M. El Ayel, D. Bonnel, I. Fournier, and M. Salzet, unpublished data.



**FIG. 6. Validation of C-terminal fragment of the immunoproteasome REG- $\alpha$  and orosomucoid as ovarian biomarkers.** *a*, MALDI-MS profiles of three ovarian carcinomas versus benign tumor samples. *b*, MALDI-MSI molecular image of REG-alpha 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- $\alpha$  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- $\alpha$  antibody: *d*, cytoplasm localization of the anti-C-terminal REG- $\alpha$  labeling in ovary carcinoma; *e*, nucleus localization of the anti-C-terminal REG- $\alpha$  labeling in ovary benign tumor; *f*, epithelial cells labeled with the anti-C-terminal REG- $\alpha$  in ovarian carcinoma. *g*, specific MALDI imaging analysis using the Orosomucoid R1' and REG $\alpha$  RT+ fragments. *h*, RT-PCR analysis of Orosomucoid R1', REG $\alpha$  RT+, and cDNA 18s RT+ and RT- mRNA levels in ovarian carcinoma tissues (B1-B16) and normal ovarian tissues (K1-K9).

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 (bansoxatrone) (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- $\alpha$  and an anti-human IgG tag (reporter  $m/z$  1309) and anti-orosomucoid and anti-human monoclonal antibody (reporter  $m/z$  1569). *h, top*, Western blot analyses with the anti-C-terminal REG- $\alpha$  (immunoproteasome 11 S) of the 16 benign tumors and nine carcinomas (33); *bottom*, quantitative PCR validation of REG- $\alpha$  and orosomucoid from the SKVO3 ovarian cancer epithelial cell line.

## MALDI Imaging Mass Spectrometry

### 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  $30\text{--}40\text{-}\mu\text{m}$  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

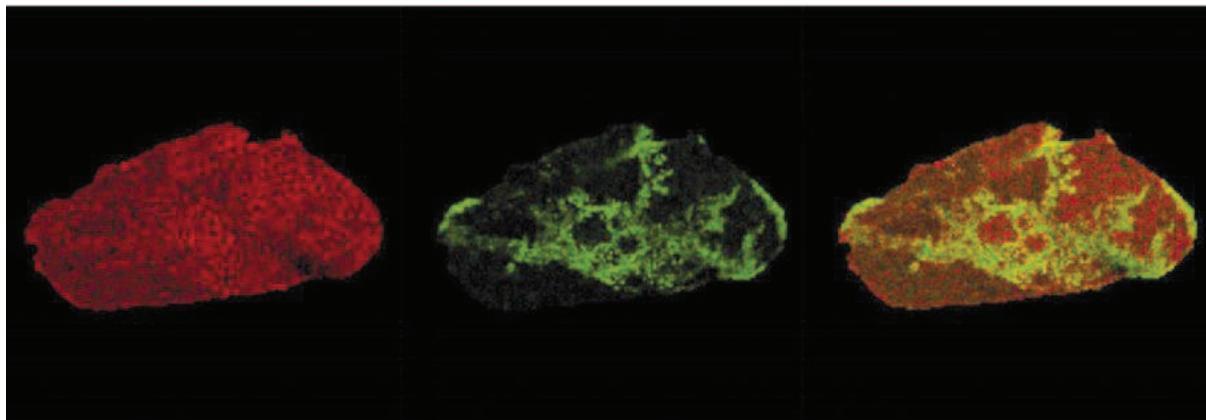
- van Veelen, P. A., Jiménez, C. R., Li, K. W., Wildering, W. C., Geraerts, W. P., Tjaden, U. R., and van der Greef, J. (1993) Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Org. Mass Spectrom.* **28**, 1542–1546
- Jiménez, C. R., van Veelen, 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 Velen, 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 Soyez, 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., Biocchio, 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-Menguellet, S., Lucot, J. P., Vinatier, 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., Ifa, 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., Dreiserwer, 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., Schiriver, 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



## MALDI Imaging Mass Spectrometry

- 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., Ichiyangai, 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. Carcinog.* **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., Svenssonsson, 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. Stoeckli, 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**, 3715–3724
  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., Stoeckli, 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. Francesc, 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. Tilz, 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., Menguellet, 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 Korfomacher, 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 Korfomacher, 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., Korfomacher, 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 Luijder, 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., Fleischcher, 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 pros-
  - tate 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., Yankelev, T. E., Mapara, K., Ehtesham, 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



**Fig. 1:** MALDI-IMS of a tissue section of ovarian borderline cancer. Left: Shows the distribution on a whole section of a protein at  $m/z$  8700. Middle: Shows the differential distribution of a protein at  $m/z$  11717. Right: Merge of left and middle.

## Developing MALDI Imaging Technology for Cancer Profile

**Normal and diseased tissues are complex mixtures of different cell populations. A better understanding of protein expression changes that occur during diseases needs sensitive and specific technologies for each of these cell types. Mass spectrometry based tissue imaging (MALDI-MSI) is a newly developed technique, allowing the visualization of proteins, peptides, lipids and small molecules directly on thin sections cut from fresh frozen or fixed paraffin embedded tissues. The major breakthrough is the possibility to study spatial localization of molecules without long and tedious steps of separation and extraction. This technology is being used to characterize tumors at molecular level leading to the improved classification of neoplastic and normal sample and new biomarkers discovery.**

### Introduction

To study molecular markers associated with human pathologies, tissue obtained both for diagnostic and therapeutic purposes represent one of the best sources. However, the great heterogeneity of cancer tissues represents a limit in the investigation of biomarkers. Accumulated evidences demonstrated that altered cellular pathways in cancer cells and interactions between surrounding stroma cells are both critical to the onset and progression of neoplastic diseases [1].

This close association leads to alterations in the cellular structure as well as modifications in the proteomic pattern [2]. In this picture, every cellular type has a pivotal role and distinct information can be obtained at the proteomic level for each of these components. The current proteomics approach used to investigate cancer biomarkers, show some limitations which must be overcome to address the problem of protein localization.

Classical approaches for routine diagnostics in pathology, such as immunohistochemistry, can provide information of protein localization, but are limited by the presence of antibody reagents and by the quantification of the staining that is subjective.

Isolation techniques, such as two dimensional electrophoresis (2-DE) or surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectrometry (SELDI), have been coupled to laser capture microdissection to enrich sub-populations of cells [3, 4]. Despite their suitability these techniques are limited by several shortcomings, including the number of cells required for the analysis [5].

Compared to these methods, MALDI-MSI has the potential to overcome these drawbacks, providing information about the relative abundance and spatial distribution of molecules. MALDI-MSI combines the specificity and sensitivity of mass spectrometry with the ability to obtain information about their spatial localization in tissues, without sophisticated steps of sample preparations, while maintaining cellular and molecular integrity (fig. 1).

Since its introduction by Caprioli et al., over ten years ago [6], MALDI-MSI has been applied to the study of biochemical changes of proteins, peptides, lipids

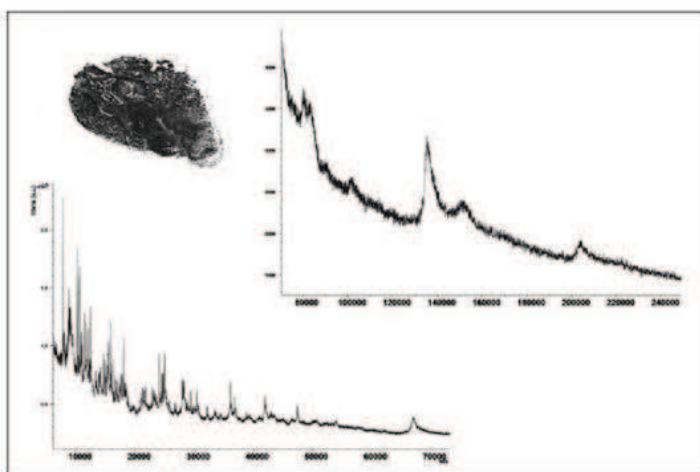


Fig. 2: Ionic matrix is the best choice for the analysis of intact proteins. MALDI-TOF mass spectra derived from a human ovarian cancer tissue in ionic matrix. The 60 to 80 and 80 to 240 kDa regions of the spectra are showed. Proteins above 200.000 m/z were detected.

and small molecules, associated with several diseases. Here, we review some recent applications of MALDI-MSI in cancer research.

#### Technological Aspects

In a typical MALDI-MSI experiment, a focused laser beam is used to analyze a tissue slice placed on a conductive indium tin oxide (ITO) glass slide. Basically, for sample preparation the tissue is cut on a cryo-microtome, washed several times with organic solvents, covered with a chemical matrix and allowed to dry to form a crystalline material. Obviously, sample handling during all these processes is extremely important to avoid any type of tissue modification, which can adversely affect MALDI results [7].

Notably, direct analysis of both, frozen tissue section, and formalin-fixed paraffin-embedded tissue (FFPE), usually 10 µm thick, can be performed. Many investigators reported the use of FFPE tissue analysis by MALDI-MSI. Ronci et al. described a procedure, that combines heat induced antigen retrieval, EDTA treatment and on target trypsin digestion [8]. Additionally, proteomic analysis of FFPE tissue microarrays (TMA) and *in situ* enzymatic digestion were proposed [9].

In our laboratory, we have previously developed a method for the analysis of longer stored (>1 year) FFPE tissue, which is based on *in situ* enzymatic digestion with *in situ* extraction of the tissue section. We also used a reactive matrix, 2,4-dinitrop-

henylhydrazine, together with HCCA for FFPE tissues stored less than 1 year [10].

The intensity of the signal can be improved by washing tissue with organic solvents to remove salts and other contaminants that make the spectra more complex and also cause suppression of ionization. It has been described that the treatment with chloroform, acetone, hexane, toluene, or xylene makes it possible to investigate peptides and proteins more in depth by removing lipids from the tissue surface [11]. Alternative approaches to reduce ion suppression have been described in the literature or are under investigations in our laboratory [12, 13].

Matrix application and matrix solvent conditions greatly affect tissue analysis (fig. 2). For peptide direct tissue analysis, ionic matrixes, in particular CHCA/ANIS, should be preferred in respect to classical matrixes such as CHCA [14]. The use of detergents like Triton X-100 has also been demonstrated to increase the detection of higher m/z proteins in tissue [15]. In addition, the ability of matrix to access to tissue interior and extract analyte molecules to the tissue surface is influenced by tissue slice thickness and matrix solvent evaporation [16].

Matrix deposition can be performed either manually using an automatic pipette or by automated devices. In the second approach, using robotic spotter or spraying devices, the matrix is deposited uniformly on the tissue section to achieve high-reproducible spectra, without pro-

## GO FISHING!



#### SEQUENCE CAPTURE

### HybSelect™

#### CATCH YOUR REGION OF INTEREST FOR YOUR NEXT GENERATION SEQUENCING!

- Excellent SNP detection
- Deep sequence coverage
- Automation minimizes hands-on time
- Simple and streamlined workflow

#### HYBSELECT NOW AVAILABLE

- as a full-service from febit Analytical Services
- as the newest application for the Geniom RT Analyzer



READ, WRITE, UNDERSTAND THE CODE OF LIFE

Europe: phone +49 6221 6510-300 • info@febit.eu  
Americas: phone +1 781 391 4360 • info@febit.com

[www.febit.com](http://www.febit.com)

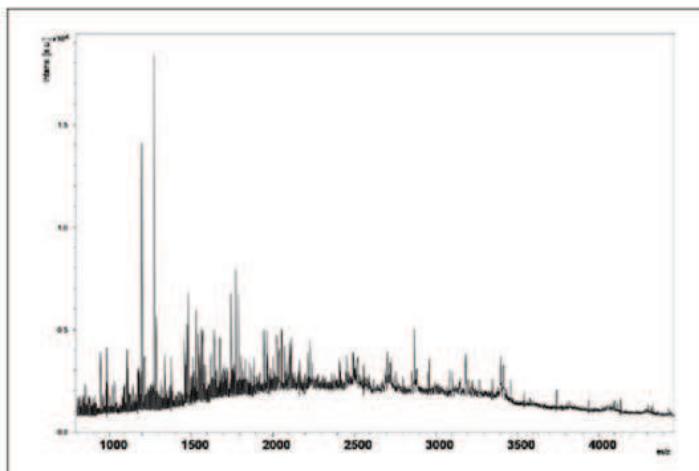


Fig. 3: Peptide profile obtained by MALDI-MS from a 10  $\mu$ m ovarian cancer tissue section. After trypsin digestion matrix coating was performed by adding manually a solution of HCCA/Aniline.

tein delocalization. Recently, a new method that employs acoustics to eject droplets of matrix onto the tissue has also been proposed [17].

Other important advancements include the possibility to visualize lipids and peptides at a resolution of 15  $\mu$ m in mammalian tissues, using amorphous small nanoparticles (fNP) with a diameter of 3.7 nm [18], and the unique opportunity to extend the range of molecules that can be studied by MALDI-IMS to nucleic acids, using molecular probe, which binds to a molecule of interest [19].

Finally, data are analyzed by specific software-tools to pre-process all these information for statistical analysis [20]. Advances in bioinformatic tools have facilitated the analysis of spectra of a given tissue specimen and several software-solutions are now commercially available. However, most of this software is specific to an application or a particular instrument. Validated software was developed in our laboratory for the analysis of MALDI-IMS data. This tool was compatible with all MALDI instruments, and is available on our web site ([www.maldi-imaging.com](http://www.maldi-imaging.com)) [21].

#### Application of MALDI-IMS to Cancer

IMS has been successfully used to identify subsets of markers useful for cancer diagnosis, as well as for improving proteomic classification of tumor samples. Oral squamous cell carcinoma (OSCC) and prostate cancer have been imaged to

differentiate between tumor- and normal tissue [22, 23]. Principal component analysis (PCA) and clustering algorithms were used to compare tissue samples of gastric cancer by separating tumorous tissue from tumor-free mucosa from the same patient [24].

For biomarkers discovery, MALDI-IMS analysis of human colon cancer liver metastasis visualized two phospholipids as differentially expressed molecules between the cancerous and normal areas [25]. Furthermore, an increased expression of Thymosin  $\beta$ .4 (T $\beta$ .4) was observed in the proliferating area of the tumor glioblastoma [26] and in the stroma region of human breast carcinoma tissue [27]. IMS was also applied to study the therapeutic-response of tumors treated with erbB receptor inhibitors OSI-774 and Herceptin [28].

We used MALDI-IMS to study ovarian cancer (stage III/IV) and benign ovarian biopsies.

Ovarian cancer is one of the most common cancers worldwide and the seventh-most cause of cancer related deaths in women. Widely asymptomatic, the great majority of cancers are diagnosed as high stage, characterized by peritoneal spread and low survival. For this reason the need of biomarkers for early cancer diagnosis and prognosis remains a priority.

Using MALDI MSI we identified a fragment of PA28 alpha or immunoproteasome 11s protein as a new putative biomarker for ovarian cancer. This marker was validated by immunocytochemistry

and western blot. In addition, the protein showed a nuclear localization in benign tumors and a cytoplasmic localization in carcinoma cells with possible application in the correct diagnosis of borderline ovarian tumors [29].

#### Future Outlook

Our studies clearly demonstrate the impact of MALDI-IMS in cancer research. Imaging of tumor- and non-tumor areas could improve the understanding of cancer onset and progression and the possible application to FFPE tissues, a still unexplored resource for biomarker research, can enlarge drastically the number of analyzed samples.

Although certain advancements in sample preparation and automation have been introduced, some limitations still remain, including the detection of low-abundance and high molecular weight proteins. Many of these drawbacks are actually under investigation in our laboratory with the aim to translate these results into clinical research.

**References are available from the author.**

#### Authors:

Daniele Vergara, Mohamed Elayed, Benjamin Merlot, Julien Franck, Maxence Wiszierski, Michel Salzet, Isabelle Fournier; University of Lille1 Denis Vinatier, Hôpital Jeanne de Flandre, service de gynécologie, Lille

#### CONTACT:

**Michel Salzet**  
University of Lille1  
FRE CNRS 2933  
MALDI Imaging Team  
Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides  
Lille, France  
Tel.: +33 3 2033 7277  
Fax: +33 3 2043 4054  
[michel.salzet@maldi-imaging.com](mailto:michel.salzet@maldi-imaging.com)  
[www.univ-lille1.fr/lea](http://www.univ-lille1.fr/lea)

# On-Tissue N-Terminal Peptide Derivatizations for Enhancing Protein Identification in MALDI Mass Spectrometric Imaging Strategies

J. Franck, M. El Ayed, M. Wisztorski, M. Salzet, and I. Fournier\*

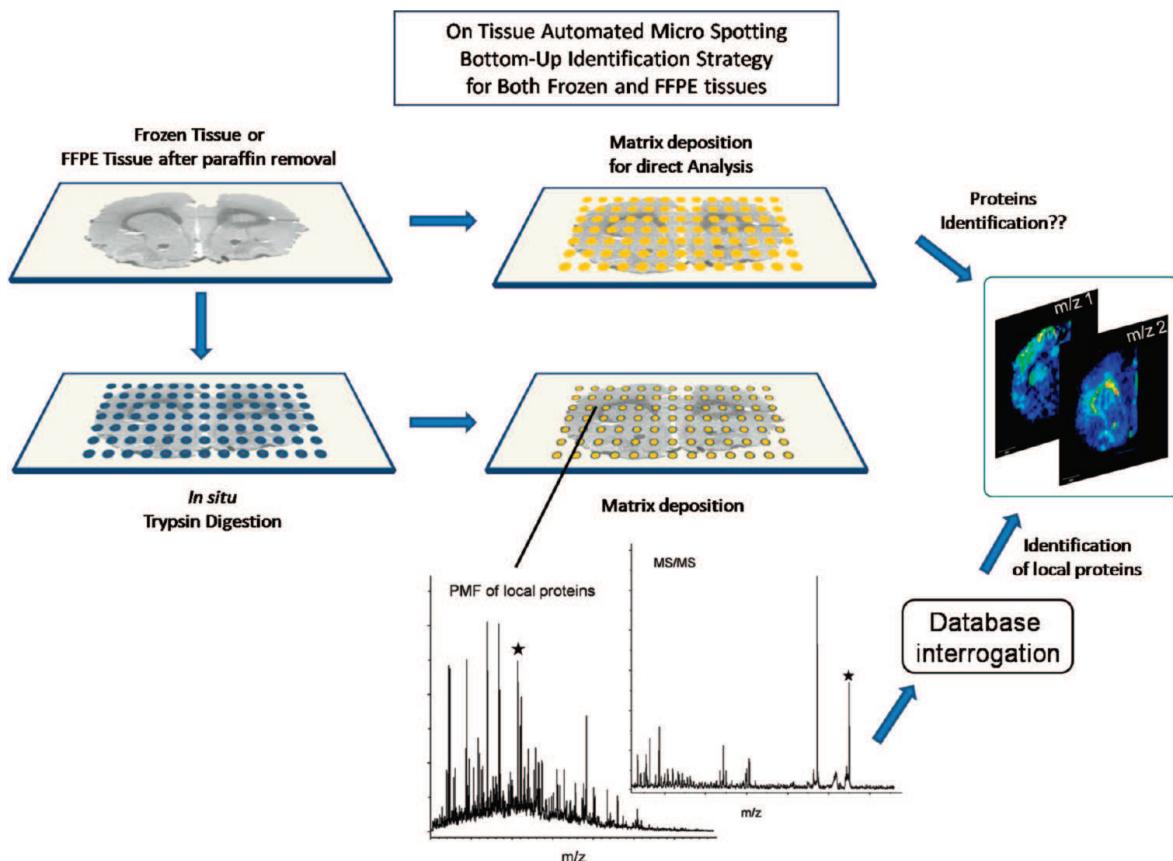
MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, CNRS-FRE 2933, Université de Lille1, IFR 147, Bâtiment SN3, 1er étage, F-59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) is a new tool that can acquire the localization of various compounds, including peptides and proteins, directly from tissue sections. Despite the important developments recently performed in the field of MALDI imaging in tissue, the precise identification of compounds still needs improvement. We have developed N-terminal chemical derivatization strategies to improve tissue identification of proteins, including *de novo* sequencing performance. We have first focused on sulfonation agents, such as 4-SPITC and 3-SBASE. These two derivatizations were optimized to be performed directly on tissue sections. By adding a negative charge at the N-terminus of a tryptic digest peptide, we were able to generate a complete y fragment series directly from the tissue. Of these derivatizations, 3-SBASE has shown to be more efficient, as loss of the derivative group is one of the major fragmentation pathways for 4-SPITC. 3-SBASE was optimized so that the derivatization reaction could be automatically performed using an automatic microspotting device. It was then included in an automatic process that included automated trypsin digestion and matrix deposition. Derivatizations allowed the acquisition to be easily interpretable by MS<sup>2</sup> spectra, leading to very precise identification as well as easy manual reading of sequences for *de novo* sequencing. It was observed that only arginine-terminated peptides were observed after derivatization, likely due to the high gas-phase basicity of such peptides compared to those that are lysine-terminated. We also observed a stop in the y fragmentation series for peptides presenting a miscleavage. We have now begun to study a different derivatization using N-succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxypyphenyl)phosphonium bromide (TMPP). This derivatization allows the orientating of a fragmentation toward a series of fragment ions, and thus it is independent of the presence of basic residues in the sequence. This derivatization can be performed at room temperature, which greatly facilitates the automation of the process. The TMPP derivatization therefore yields an advantageous new generation of derivatives suited for use in tissue.

Since its introduction in 1997 by the group of Caprioli,<sup>1</sup> direct tissue analysis and imaging by mass spectrometry (MS) has become a favorable alternative to classical techniques. Directly analyzing tissues gives access to the detection of hundreds of biomolecules while maintaining tissue integrity and molecular localization.<sup>2–5</sup> By automating this approach, molecular images of the distribution of biomolecules can be obtained in a single-step analysis.<sup>6–12</sup> Recent applications demonstrate the potential of such technology, in particular for pathology studies.<sup>13–16</sup> This tool is well-suited to facilitate biomarkers research, to better understand molecular mechanisms implicated in diseases, and to track drugs within tissues.<sup>17–23</sup>

- (1) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751–4760.
- (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) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9–14.
- (5) Rubakhin, S. S.; Greenough, W. T.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5374–5380.
- (6) Stoeckli, M.; Farmer, T. B.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 67–71.
- (7) Chaurand, P.; Foucheau, S.; DaGue, B. B.; Xu, B. J.; Reyzer, M. L.; Orgebin-Crist, M. C.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2003**, *3*, 2221–2239.
- (8) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 245–252.
- (9) Altehaar, A. F.; van Minnen, J.; Jimenez, C. R.; Heeren, R. M.; Piersma, S. R. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 735–741.
- (10) Altehaar, A. F.; Luxembourg, S. L.; McDonnell, L. A.; Piersma, S. R.; Heeren, R. M. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1185–1196.
- (11) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606–643.
- (12) Rubakhin, S. S.; Churchill, J. D.; Greenough, W. T.; Sweedler, J. V. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7267–7272.
- (13) Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 828–833.
- (14) Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 29–35.
- (15) Wisztorski, M.; Lemaire, R.; Stauber, J.; Menguelet, S. A.; Croix, D.; Mathe, O. J.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3317–3324.
- (16) 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.
- (17) Bunch, J.; Clench, M. R.; Richards, D. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3051–3060.
- (18) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 1081–1092.
- (19) Hsieh, Y.; Casale, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 965–972.
- (20) Atkinson, S. J.; Loadman, P. M.; Sutton, C.; Patterson, L. H.; Clench, M. R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1271–1276.
- (21) Hsieh, Y.; Chen, J.; Korfmacher, W. A. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *55*, 193–200.

\* To whom correspondence should be addressed.



**Figure 1.** Schematic workflow of MALDI-MSI “bottom-up” strategy used to perform protein identification.

With the use of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI), molecular data on a wide range of compounds (peptides, proteins, lipids, sugars, etc.) can be retrieved with localization using limited cellular levels. The correlation of molecular images to histological features highlights markers of interest. Conversely, MALDI imaging of known compounds adds another dimension to our knowledge of biological processes by accessing the spatial distribution of peptides and proteins. Thus, the localization of molecules of interest can be obtained; however, identification of these specific biomolecules remains to be performed. The most straightforward method of identification is to return to classical proteomic strategies using extraction, prepurification, and separation of peptides/proteins prior to their identification. Such strategies, however, are time- and sample-consuming and can lead to peptide/protein modifications if reagents degrade and/or chemically modify the compounds. Moreover, to access high-throughput identification of markers and to correlate them with a histological feature, it is necessary to develop tissue identification strategies. Such strategies are also of significant interest for peptides/proteins that are extremely localized in a tissue section, making them difficult to retrieve using a global extraction approach because of their dilution over the whole sample. Because MALDI does not generate multiply charged ions, currently, tissue identification of proteins is not directly accessible by “top-down” approaches. It is therefore

necessary to dispose of peptides by developing “bottom-up” strategies. The principle of “bottom-up” strategies is to generate peptides from proteins by enzymatic digestion directly at the tissue level (Figure 1). “Bottom-up” strategies for MALDI mass spectrometric imaging (MALDI-MSI) were introduced two years ago, demonstrating a good ability to generate digestion fragments up to  $m/z$  3 500. This approach allows both the acquisition of images of proteins based on their digestion peptides (if suited deposition methods are used) as well as the retrieval of structural information of the proteins by performing  $MS^2$  experiments on the peptides. Identifying endogenous peptides or proteins directly from tissue sections has shown to be more difficult compared to on target preparation. In fact, we can assume that the tissue section underneath the matrix layer could decrease the internal energy of the ions formed in the gas phase by allowing part of the energy resulting from photon excitation to be evacuated (i.e., thermal energy). Moreover, the insulating nature of the tissue section and its thickness render MS/MS parameters more difficult to control, especially when the instrument is an axial MALDI time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometer. Thus, in most cases, MS/MS is used to verify the sequence of an expected endogenous peptide or digestion peptides, and few examples are found where in-tissue MS/MS was used to identify unidentified markers. In addition, MS/MS spectra generated from instruments equipped with a MALDI ion source are often more complex to analyze because of the different types of fragment series generated during the fragmentation process. This is especially true on MALDI-TOF systems that frequently have weak fragmentations (especially in the higher

- (22) Drexler, D. M.; Garrett, T. J.; Cantone, J. L.; Ditters, R. W.; Mitroka, J. G.; Prieto Conaway, M. C.; Adams, S. P.; Yost, R. A.; Sanders, M. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2007**, *55*, 279–288.  
 (23) Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Stoeckli, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 733–736.

*m/z* range of the MS/MS spectrum) and a significantly different series of fragment ions. These features can consequently create a largely incomplete set and only allow the observation of small sequence tags. The sequencing of peptides can be very difficult to establish due to the different fragmentation ions observed during MS/MS experiments, such as immonium ions,<sup>24</sup> internal fragments, N-terminal ions,<sup>25,26</sup> or C-terminal ions.<sup>27</sup> A nomenclature of these ions has been proposed by Roepstorff and Fohlman.<sup>28</sup>

Even using classical identification strategies, many efforts have been made to simplify data interpretation (especially for MALDI systems) by increasing fragmentation ion yield and orienting fragmentations toward a specific series of fragment ions. In this respect, derivatization at the C- or N-terminal part of peptides by adding positive or negative charges has shown to be an efficient strategy,<sup>29</sup> especially for post source decay (PSD) spectra. In general, N-terminal modifications are easier because of amine reactivity, and they have been shown to be more efficient for fragmentations. Sulfonation at the N-terminal part of peptides appears to be especially advantageous when working on tryptic digestion peptides that are naturally positive at their C-terminal part. Keough and co-workers have shown that if a negatively charged group is added at the N-terminus of tryptic peptides using chlorosulfonylactetyl chloride<sup>30,31</sup> or 2-sulfobenzoic acid cyclic anhydride,<sup>32</sup> it is possible to orientate fragment ions toward  $y_i^+$  ions, thereby allowing de novo sequencing to be performed.<sup>33</sup> This method was later improved by using 3-sulfopropionic acid *N*-hydroxysuccinimide (NHS) ester as the derivatization agent,<sup>34</sup> allowing the reaction to be performed in the aqueous phase. This reagent is fast and water compatible, and it has now been marketed<sup>35</sup> and is quite expensive. Alternatively, 4-sulfophenyl isothiocyanate<sup>36–38</sup> was proposed for derivatization, allowing liquid chromatography<sup>39</sup> and quantification with isotope coding<sup>40</sup> to be performed. These derivatizations are simple and can be performed quickly, showing good reaction yields, and

they often lead (depending on the peptide sequence) to the loss of the derivative group as a major fragmentation pathway. In this context, the benefits of derivatization are lowered by the recovery of the native peptide ion. More recently, another water compatible reagent, 3-sulfobenzoic acid NHS ester, was proposed.<sup>41</sup> This sulfonation agent presents more efficiency, since no loss of the derivative group is observed. This also results in the observation of a complete  $y$  ion series. Derivatization by addition of a positive charged at the N-termini part of the peptides was also studied. In particular, derivatization with *N*-succinimidylcarbonylmethyl)-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP), introduced by Huang et al.,<sup>42</sup> was successfully used for peptide sequence identification. Derivatization using TMPP orients fragmentation toward N-terminus fragment ions, with a strong  $a_i^+$  series of fragment ions and only a few  $b_i^+$ ,  $c_i^+$ , and  $d_i^+$  fragment ions. For this derivatization, fragmentation orientation is independent of the presence and/or position of basic amino acid residues in the peptide sequence, which makes it of wider use.

In this study, we have investigated N-terminal chemical derivatization of peptides in tissue for protein identification using bottom-up imaging strategies. Derivatization of digestion peptides at the tissue level allows for the orientation of fragmentation patterns toward a specific series of fragment ions and eases peptide identification. We have focused our study on two types of derivatizations. First, we have studied sulfonation agents such as 4-sulfophenyl isothiocyanate and sulfobenzoic acid succinimidyl ester, giving orientation toward  $y_i^+$  fragments for peptides presenting a basic amino acid residue at their C-termini (i.e., tryptic digestion peptides). We have also investigated derivatization independent of the presence of a basic residue at the N-termini part of peptides, such as TMPP derivatization. Studies and optimizations of reactions were first performed at the whole tissue section scale. Protocols were then modified and adapted to allow derivatization to be performed at the microscale level using MALDI-MSI, with automation, if required. This was achieved using a microspotting piezoelectric automatic deposition device. Here, we report that in-tissue derivatization is a highly efficient strategy for protein identification in MALDI-MSI and can be performed by automatic derivatization at the microscale level. This is a key point for direct and confident in-tissue identification of markers using MALDI-MSI.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Materials.** 4-Sulphophenyl isothiocyanate (4-SPITC), 3-sulfobenzoic acid (3-SBA), dicyclohexylcarbodiimide (DCC), NHS,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), trifluoroacetic acid (TFA), dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, acetonitrile (ACN), aniline (ANI), triethylamine (TEA), and TMPP were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and used as received. The trypsin enzyme was from Promega France.

**Chemical Synthesis of 3-Sulfobenzoic Acid Succinimidyl Ester (3-SBASE).** The reagent was synthesized according to a previously established protocol.<sup>41</sup> Briefly, 1.0 g of 3-SBA was

- (24) Ambihapathy, K.; Yalcin, T.; Leung, H. W.; Harrison, A. G. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 209–215.
- (25) Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *131*, 355–385.
- (26) Yalcin, T.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7*, 233–242.
- (27) Biemann, K. *Methods Enzymol.* **1990**, *193*, 455–479.
- (28) Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed. Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
- (29) Roth, K. D.; Huang, Z. H.; Sadagopan, N.; Watson, J. T. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17*, 255–274.
- (30) Keough, T.; Youngquist, R. S.; Lacey, M. P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 7131–7136.
- (31) Keough, T.; Lacey, M. P.; Youngquist, R. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 2348–2356.
- (32) Samyn, B.; Debyser, G.; Sergeant, K.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1838–1852.
- (33) Keough, T.; Youngquist, R. S.; Lacey, M. P. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 156A–165A.
- (34) Keough, T.; Lacey, M. P.; Strife, R. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 2227–2229.
- (35) Keough, T.; Lacey, M. P.; Youngquist, R. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1003–1015.
- (36) Gevaert, K.; Demol, H.; Martens, L.; Hoorelbeke, B.; Puype, M.; Goethals, M.; Van Damme, J.; De Boeck, S.; Vandekerckhove, J. *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1645–1651.
- (37) Marekov, L. N.; Steinert, P. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 373–377.
- (38) Wang, D.; Kalb, S. R.; Cotter, R. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 96–102.
- (39) Lee, Y. H.; Kim, M. S.; Choie, W. S.; Min, H. K.; Lee, S. W. *Proteomics* **2004**, *4*, 1684–1694.

- (40) Lee, Y. H.; Han, H.; Chang, S. B.; Lee, S. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3019–3027.
- (41) Alley, W. R., Jr.; Mechref, Y.; Klouckova, I.; Novotny, M. V. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 124–132.
- (42) Huang, Z. H.; Wu, J.; Roth, K. D.; Yang, Y.; Gage, D. A.; Watson, J. T. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 137–144.

completely dissolved in 10 mL of DMSO. A 1.5 M excess of DCC and equimolar amount of NHS were then added to the solution, and the mixture was stirred overnight at room temperature. The precipitated DCU, a side product of the reaction, was then filtered and discarded. The remaining solution was filtered to remove side products. After filtration, 60 mL of cold acetone (4 °C) was slowly added to precipitate 3-sulfobenzoic acid succinimidyl ester (3-SBASE), which was then filtered and washed four times with cold acetone and then dried.

**Tissue Preparation.** Thin 10  $\mu\text{m}$  tissue sections were obtained from frozen rat brains using a cryostat (Leica, Germany) and applied onto indium–tin oxide (ITO)-coated conductive glass slides (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Tissue sections were then submitted to a washing step using 70% ethanol and 95% ethanol for 30 s each, followed by a washing step using chloroform for 30 s to partially remove abundant phospholipids, as described by Lemaire et al.<sup>43</sup>

#### On-Tissue Digestion.

*Whole tissue trypsin digestions* were performed by applying a solution of trypsin (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in pure H<sub>2</sub>O using a micropipet. Tissue sections were then incubated for 1 h at 37 °C in an atmosphere saturated with MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

*Automatic trypsin digestions* were performed using a high accurate position chemical inkjet printer (CHIP-1000, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). The printed array of the CHIP-1000 on the tissue section was composed of spots spaced 250  $\mu\text{m}$  center-to-center. A total of 20 nL of solution containing 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of trypsin in pure H<sub>2</sub>O was applied to each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited on each spot per cycle. A total of 40 iterations were thus necessary to obtain the final volume. Tissue sections were then incubated at 37 °C for 2 h in a box saturated in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).

**On-Tissue Derivatization. 4-SPITC Derivatization.** 4-SPITC derivatization was performed manually on the whole tissue section. Manual derivatization was performed by depositing a solution of 4-SPITC (10 mg/mL) in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer on the tissue section. The tissue was then incubated in a box saturated in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) at 50 °C for 1 h. The tissue was then allowed to dry at room temperature, and a solution of 1% TFA was deposited to improve ionization of derivate peptides prior to matrix deposition.

**3-SBASE Derivatization.** 3-SBASE derivatization was either performed manually on the whole tissue section or automatically using the microspotting device. Manual derivatization was performed by depositing a solution of 3-SBASE (20 mg/mL) in 25 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer on the tissue section. The tissue was then incubated in a box saturated in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) at 50 °C for 1 h. The tissue was then allowed to dry at room temperature, and a solution of 1% TFA was deposited to improve ionization of derivate peptides prior to matrix deposition.

**TMPP Derivatization.** For TMPP derivatization, a solution of 1 mg/mL in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v) was deposited using a micropipet on the whole tissue section. The section was then left until the complete solution was dried. A solution of ACN/H<sub>2</sub>O containing 1% of TEA was then deposited using a micropipet and incubated for 1 h at room temperature.

Automatic derivatization was performed using the automatic microspotting device. The CHIP-1000 was used to deposit TMPP on the tryptic spots according to the same procedure previously described for trypsin digestion. A total of 10 nL of solution containing 1 mg/mL of TMPP in ACN/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v) was deposited at each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. Twenty iterations were thus necessary to obtain the final volume on each spot. A solution of ACN/H<sub>2</sub>O containing 1% of TEA was then spotted, initiating the derivatization reaction. The automated microspotting was performed either according to a global square area of points or by dividing this area into smaller squares, each including 10-by-10 spots to increase the reaction yield.

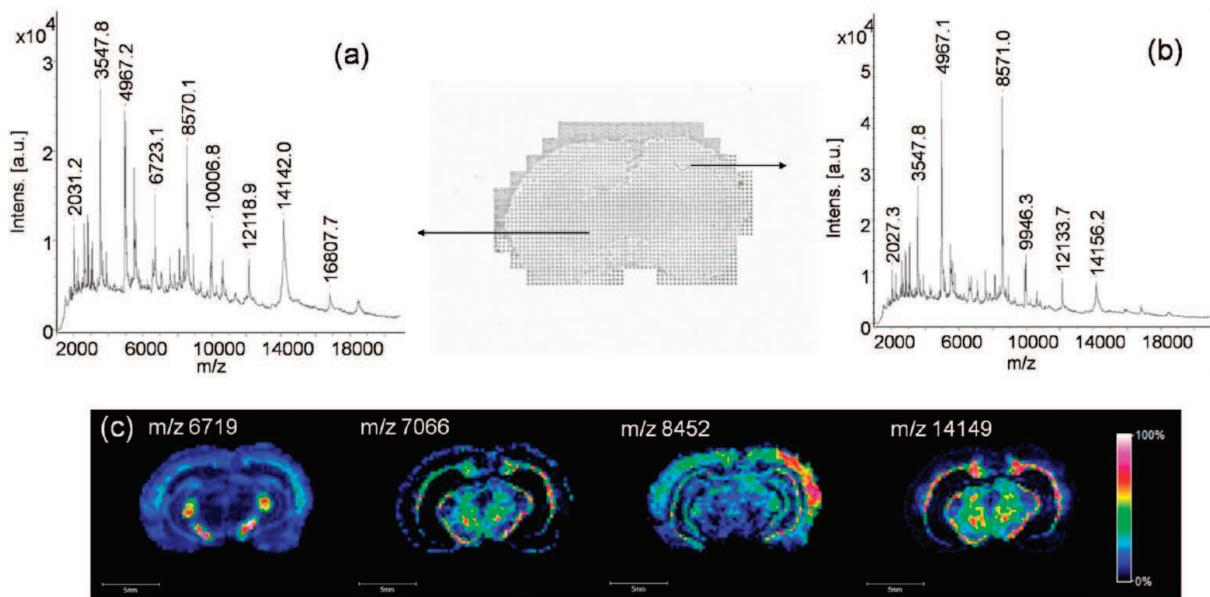
**Imaging Mass Spectrometry of Proteins.** A solid ionic SA/aniline matrix was used to image the proteins. The matrix solution was deposited using a chemical inkjet printer CHIP-1000. A total of 20 nL of ionic matrix solution, containing 10 mg/mL of SA and 8.1  $\mu\text{L}$  of aniline in 0.1% ACN/TFA (6:4, v/v), was deposited at each spot. The printed array on the tissue section was composed of spots spaced by 250  $\mu\text{m}$  center-to-center. 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 up to 200 Hz<sup>44</sup> controlled by FlexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Images were performed in the positive linear mode, and MALDI-MS spectra were acquired in the *m/z* range from 2000 to 35 000. A total of 300 spectra were acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were recorded and reconstructed using Fleximaging 2.1 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) software.

**Imaging Mass Spectrometry of Peptides.** Solid ionic matrix HCCA/aniline was used as the matrix for imaging experiments of peptides and was prepared following a previously established procedure.<sup>45</sup> Matrix solution was deposited using the CHIP-1000 printer. A total of 40 nL of ionic matrix solution containing 10 mg/mL of HCCA and 7.2  $\mu\text{L}$  of aniline in 0.1% ACN/TFA (6:4, v/v) was spotted at each spot. Five droplets of approximately 100 pL were deposited at each spot per cycle. A total of 20 iterations were thus necessary to reach the total final volume. The images were acquired using the UltraFlex II MALDI-TOF/TOF instrument. Images were performed in the positive reflectron mode, and MALDI-MS spectra were acquired in the *m/z* range from 550 to 5000. A total of 300 spectra were acquired at each spot at a laser frequency of 100 Hz. The images were recorded and reconstructed using the Fleximaging 2.1 software.

**MS/MS of Digested and Derivatized Tissues.** MALDI-TOF MS/MS experiments on digested and derivatized tissue sections were performed using the Ultraflex II TOF–TOF instrument equipped with LIFT III cells. For MS/MS experiments, parameters were set as follows: the laser repetition rate was 100 Hz with 33% attenuation; ion source voltages were 8 and 7.3 kV on the MALDI sample plate and first electrode, respectively; the LIFT cell was pulsed from ground to 19 kV for electrodes 1 and 2, and in the last step, electrode 3 was decrease to 3.2 kV; the reflector end voltage was set to 29.5 kV; the midgrid was set to 13.85 kV. For

(44) Holle, A.; Haase, A.; Kayser, M.; Hohndorf, J. *J. Mass Spectrom.* 2006, 41, 705–716.

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



**Figure 2.** (a and 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  $m/z$  6719, 7066, 8452, and 14149.

each MS/MS spectrum, 5000 total shots were averaged, including 1000 for parent ions and 4000 for fragments.

**Data Analysis.** Protein identification in databanks was performed using the Biotools 3.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) connected to the Mascot search engine. The NCBI, Swissprot, or ESTs databanks with oxidation as variable modification and no fixed modification were also used. Taxonomy was specified to be *Rattus norvegicus*. Trypsin was selected as an enzyme, and two missed cleavages were used. The mass tolerance was set at 1 and 0.5 Da for the MS and MS/MS, respectively. For derivatized peptides, the mass of the parent ion used was the mass without the N-terminal derivatization, taking into account that C-terminal fragment ions do not present mass variations after derivatization.

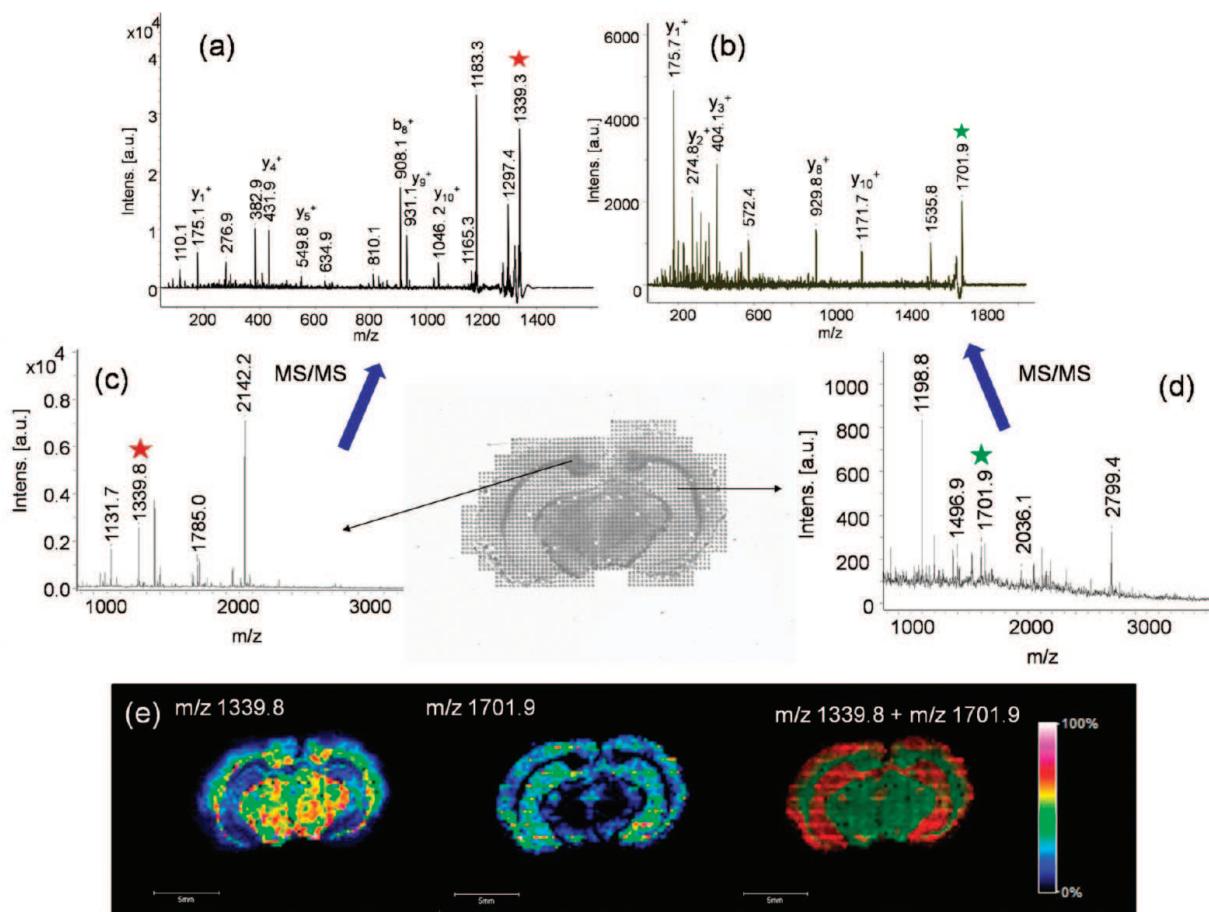
## RESULTS

**MALDI-MSI of Proteins.** Using a strategy aiming to localize and identify proteins, MALDI images of intact proteins were first recorded. Automatic microspotting of the matrix was used in combination with solid ionic matrix SA/ANI, since these matrixes have been shown to be better suited for microspotting compared to classical matrixes. Under these experimental conditions, hundreds of protein signals were observed from the different regions of the tissue section (Figure 2, parts a and b). Sensitivity can be increased by moving within the matrix spot and averaging spectra from different locations. Even though microspotting does not offer the highest spatial resolution (100–150  $\mu\text{m}$  spot size and  $\sim 250 \mu\text{m}$  spot-to-spot center in along  $x$  and  $y$ ), the observed proteins do present a highly specific distribution in the tissue section, as illustrated in Figure 2c. If protein distribution across the tissue section is obtained, however, it is not possible to obtain information concerning the primary structure of these proteins using direct analysis, and mass measurement is not sufficient to yield identification beyond a doubt. Since top-down strategies are not currently accessible for use with MALDI from mixtures, bottom-up strategies, involving sample digestion, are therefore required. It was previously shown that direct in-tissue enzymatic

digestion is feasible both from frozen<sup>46</sup> and FFPE<sup>16,47–49</sup> tissue sections. Such “MALDI-MSI” strategies allow digestion while keeping the generated peptide localization, when using appropriate systems for the enzyme deposition. It is therefore possible to image proteins based on their digestion fragments and to reach identification of the proteins by performing  $\text{MS}^2$  experiments. Moreover, by combining the spatial distribution of peptides with their identification by MS/MS experiments, the proteins can be more accurately identified, thereby avoiding their extraction and separation.

**MALDI-MSI of Digested Proteins and Identification.** A MALDI-MSI strategy involving *in situ* enzymatic digestion and using trypsin was performed to identify proteins contained in the rat brain tissue section. To prevent delocalization of the digested peptides, the enzyme was deposited using the automatic microspotting system. Conditions were optimized to reach the best digestion conditions. The concentration of trypsin was set to 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and 40 iterations were performed to obtain a total volume of 20 nL per spot, followed by an incubation step for 2 h at 37 °C. This procedure was found to be the more effective, and images of peptides were then obtained by rastering the whole tissue section after deposition of HCCA/ANI according to the same raster of points used for trypsin digestion. Spectra were also recorded on an adjacent tissue section after digestion, except we used a matrix suited for proteins analysis to check out the effectiveness of the digestion. Almost no signals above  $m/z$  5000 were observed from these sections, certifying that a major part of the proteins were digested under these conditions. From the digested tissue sections using HCCA/ANI, hundreds of digested

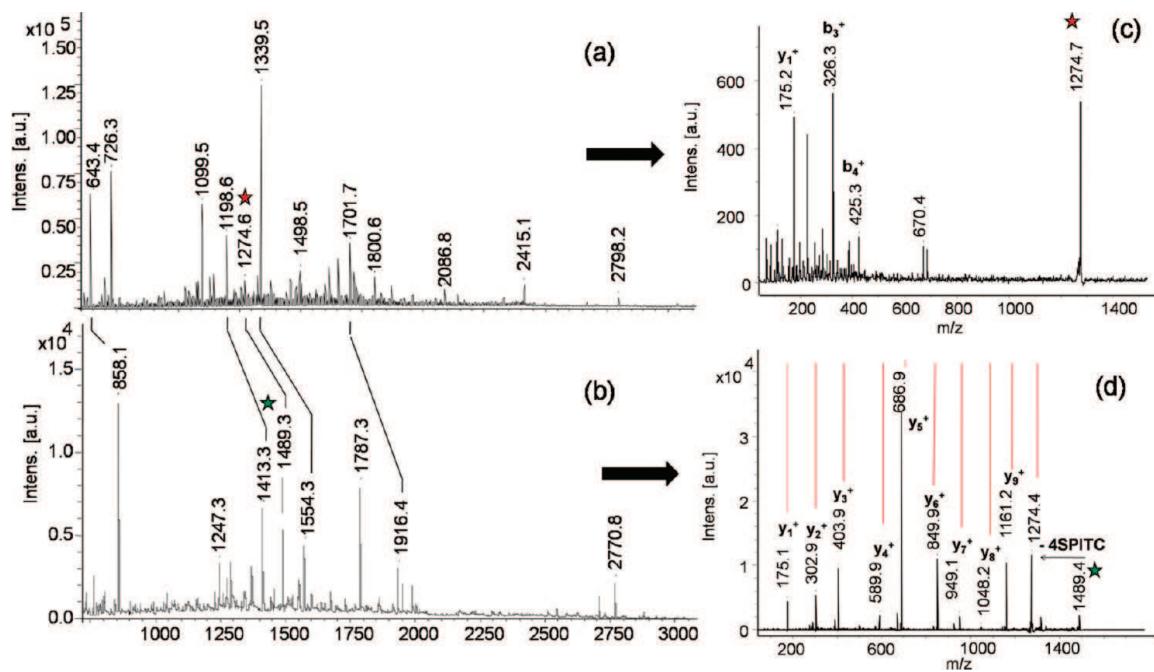
- (46) Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42*, 254–262.
- (47) Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6*, 1295–1305.
- (48) Groseclose, M. R.; Massion, P. P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3715–3724.
- (49) 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.



**Figure 3.** MALDI-MSI of a rat brain tissue section after in-tissue trypsin digestion followed by matrix deposition (HCCA/ANI) using an automated microspotting device. (a and b) MS spectra recorded at two different locations of the tissue section and (c and 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, 1701.9, and colocalized image of both ions.

peptides were detected. Peptide profiles were extremely different according to the position of the spot on the tissue section, reflecting the differences in protein expression according to the cell's phenotype. Figure 3 presents the digestion profiles recorded in the corpus callosum (Figure 3a) and in the thalamic nucleus (Figure 3b). Two ions specific of each region were thus selected from these profiles,  $m/z$  1339.23 for the corpus callosum and  $m/z$  1701.94 for the thalamic nucleus, respectively. For each of these ions, MALDI molecular images were reconstructed (Figure 3c). Molecular images revealed that these ions present an opposing localization in the rat brain. These ions were further studied in  $MS^2$  for identification. The  $MS^2$  spectrum of  $m/z$  1339.23 ion presents a rather poor fragmentation pattern, with only a few intense peaks. This peptide was identified using a databank query, with *R. norvegicus* as the taxonomy, to be a fragment of myelin basic protein (MBP) with a rather poor identification score (score 42, expect 0.0015). On the basis of this identification, postassignment of peaks demonstrated that many different fragment ion types were observed in the spectrum, as expected for MALDI/TOF MS/MS spectra. A few sequence ions were observed, and the  $y$  series of ions was clearly incomplete. For such a peptide, de novo sequencing would have been extremely difficult, and still the database identification would not be very reliable. This clearly highlights difficulties of identification using classical strategies. Identical observations can be seen from the  $MS^2$  spectrum recorded for the  $m/z$  1701.94 parent ion. For this ion, more fragments were observed; however,

these fragments were primarily in the low-mass region of the spectrum and had a clear lack of fragment ions in the intermediate  $m/z$  range. This again rendered identification difficult. Databank queries allowed for the identification of this peptide as a fragment of the tubulin  $\alpha$  protein, but with a relatively poor identification score (score 58, expect  $6.2 \times 10^{-5}$ ). For this peptide, the  $y$  series of ions was partially observed; however, the fragments were overwhelmed in many other fragments, including internal fragments and immonium ions. Thus, as demonstrated, a strategy simply based on trypsin fingerprint identification is not sufficient, especially when considering that proteins were not separated before digestion. In fact, peptides are generated in tissue from the digestion of hundreds of proteins, requiring high-quality  $MS^2$  spectra to be obtained in order for true identification to be performed. To overcome this drawback, N-terminal chemical derivatizations were employed. N-Terminal derivatizations of peptides are known to orient fragmentation toward a specific series of fragment ions, thus improving the yields of these fragments. 4-SPITC (see the Supporting Information) and 3-SBASE (see the Supporting Information) N-terminal derivatizations were thus evaluated. These derivatizations orient fragmentation toward  $y_i^+$  ion series and should allow for better protein identification. Both of these derivatizations were previously studied by several groups<sup>39,41</sup> on model peptides such as ASHLGLAR, but in our approach, this was performed directly in the tissue section. It was shown that both 4-SPITC and 3-SBASE derivatizations are efficient



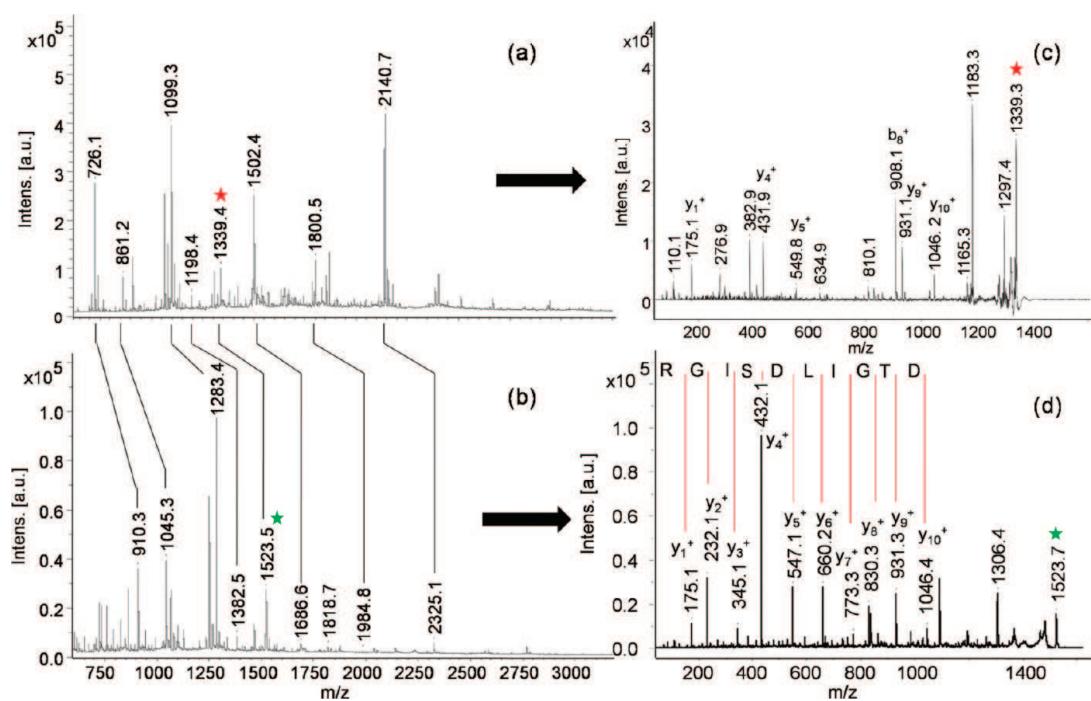
**Figure 4.** (a and b) MALDI MS spectra recorded on a rat brain tissue section after in-tissue trypsin digestion (a) and in-tissue trypsin digestion followed by derivatization with 4-SPITC (b). (c and d) MALDI MS/MS spectra of one of the peptides ( $m/z$  1274.7) from digestion (c) and the same peptide after derivatization with 4-SPITC ( $m/z$  1489.9) (d).

and greatly improve  $MS^2$  spectra interpretation by generating a complete and highly predominant  $y_i^+$  ion series. Under such conditions, the peptide's primary structure can even be determined by de novo sequencing with great ease. It should be noted, however, that most of derivatives are lost during the fragmentation, generating an intense fragment and decreasing the global intensity of the  $y_i^+$  ion series. In an ASHLGLAR model peptide, 4-SPITC derivatization leads to the observation of an intense peak, corresponding to the loss of the 4-SPITC group and hindering the observation of the  $y_i^+$  series. For 3-SBASE derivatization, such a loss of the derivative group is not observed, and consequently, the  $y_i^+$  series of fragment ions is observed with higher intensity. Taking into account the behavior of both reagents, 3-SBASE derivatization should be preferred to 4-SPTIC, but both were evaluated for performance on tissue derivatization.

**On-Tissue N-Terminal Derivatization for Protein Identification by MALDI Profiling.** 4-SPITC and 3-SBASE were used for protein identification, and protocols were optimized for on-tissue derivatization. The more sensitive points concerning within tissue derivatization are the incubation of the reagent on the tissue sections ( $\sim 50^\circ\text{C}$  for both derivatizations) and the buffer used for the reaction, since it is not possible to avoid altering compound localization when performing washing or purification of compounds on the tissue sections. Full derivatization of the whole tissue section can be obtained by covering the digested section with 4-SPITC solution and placing it under saturated conditions at  $50^\circ\text{C}$  (Figure 4). It is clearly noticeable that fewer signals with slightly lower general intensities occurred after derivatization, evident from a direct comparison of the spectra recorded immediately after trypsin digestion (Figure 4a) to those collected after trypsin digestion followed by 4-SPITC derivatization (Figure 4b) on the scale of the whole tissue section. This phenomenon, observed for all tissue sections and all areas of the tissue sections,

was previously described by different groups for within solution derivatization.<sup>38</sup> The most reasonable hypothesis is that ionization suppression is due to the presence of sodium, thereby hampering matrix crystallization. It was shown that the use of matrixes containing 2,4,6-trihydroxyacetophenone with diammonium citrate (THAP/DAC) reduced ionization suppression and thus improved detection of 4-SPITC-derivatized peptides.<sup>50</sup> For this reason, THAP matrix containing DAC was tested to improve detection of derivatized peptides in the tissue sections. As expected for tissue analysis using THAP as a matrix, highly abundant lipid signals were observed, but peptide signals were not increased (data not shown). Thus, the classical HCCA matrix was preferred for the remaining experiments. Even with slightly lower intensities, however, derivatized peptides were observed at their expected mass from tissue sections. Within tissue MS/MS experiments performed on the  $[M + H]^+$  ion of a tryptic peptide after 4-SPITC derivatization (Figure 4d) showed that addition of 4-SPTIC moiety allowed an increased and orientated fragmentation toward the  $y_i^+$  series of ions, as observed from the MS/MS spectrum with a complete and quite intense  $y$  series. In addition, it should be noted that an intense peak corresponding to the loss of the 4-SPITC moiety was observed in the spectrum, as expected. This is a drawback of 4-SPITC derivatization that is commonly observed for within solution derivatization. Despite this, the peptide sequence is easily and beyond a doubt obtained by databank query with a high score (score 103, expect  $1.8 \times 10^{-9}$ ); it can be attributed to a hemoglobin subunit  $\beta$  1 fragment (LLVVYWPWTQR). The sequence, however, can also be easily obtained de novo automatically or even manually. Concerning 3-SBASE derivatization, identical general observations similar to those for 4-SPITC were made. Mass spectra recordings in tissue after trypsin digestion (Figure 5a) and after digestion

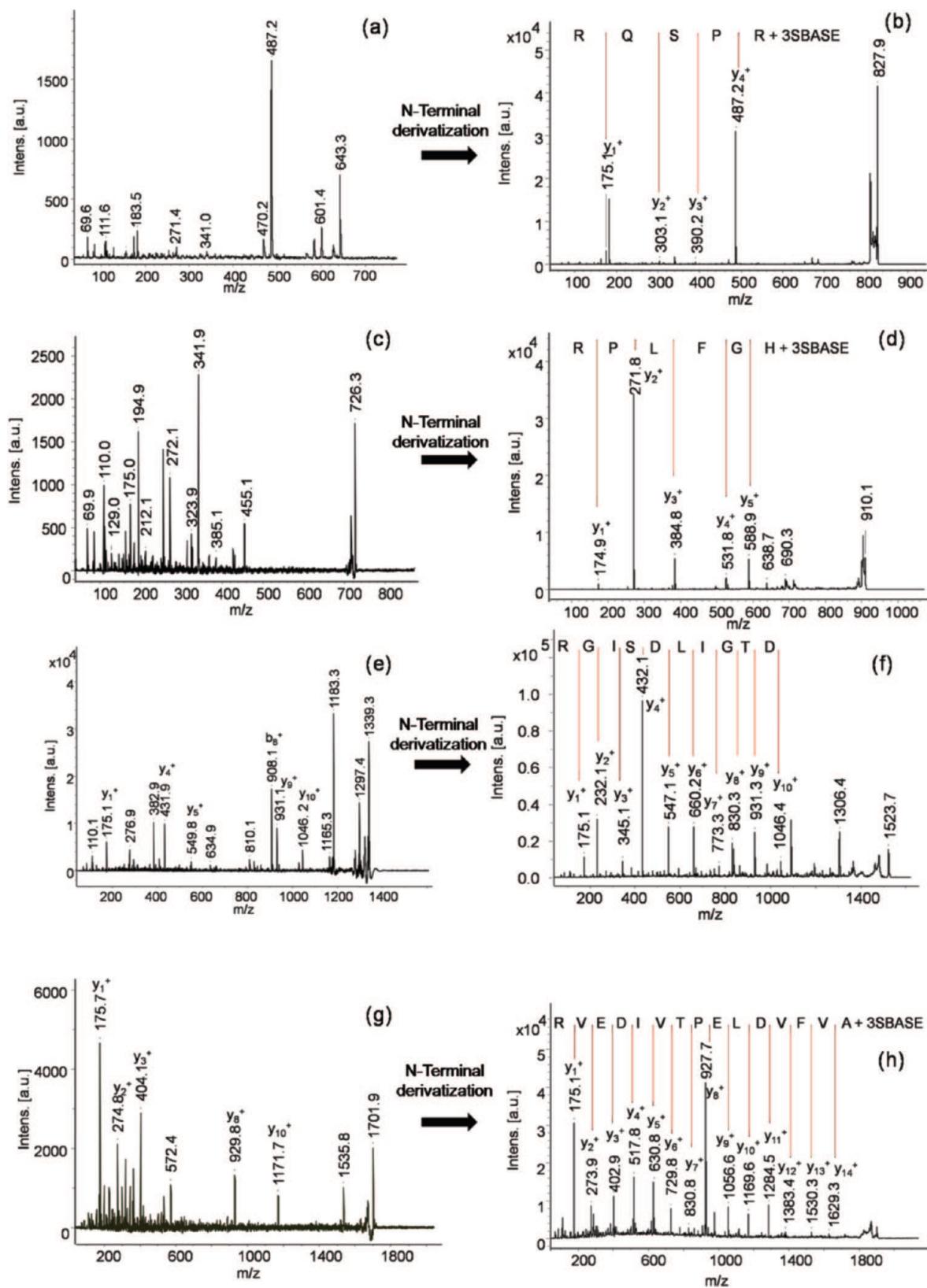
(50) Oehlers, L. P.; Perez, A. N.; Walter, R. B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 752–758.



**Figure 5.** (a and b) MALDI MS spectra recorded on a rat brain tissue section after in-tissue trypsin digestion (a) and in tissue with trypsin digestion followed by derivatization with 3-SBASE (b). (c and d) MALDI MS/MS spectra of one of the peptides generated from digestion ( $m/z$  1339.3) (c) and the same peptide after derivatization with 3-SBASE ( $m/z$  1523.7) (d).

followed by 3-SBASE derivatization (Figure 5b) showed that a part of the digestion peptides can be directly derivatized from tissue sections. For 3-SBASE, the number of detected peaks and their intensities were higher than for 4-SPITC. This can be attributed to a higher reaction yield, a better compatibility of the buffers used for the reaction, or a formation of derivatized species with higher ionization efficiency. By comparison with the nonderivatized spots, a mass shift of 184 u was observed for many tryptic peptides, proving the efficiency of the reagent to perform N-terminal derivatization directly in tissue. In particular, the peptide found at  $m/z$  1339.23, corresponding to a fragment of MBP, and the peptide at  $m/z$  1701.94, from tubulin  $\alpha$  protein, were both shifted with the expected mass and appear at  $m/z$  1523.67 and  $m/z$  1902.78, respectively. It should also be noted that derivatized spectra do not contain lysine-terminated peptides, leading to the suppression of signals by the dominant arginine-terminated peptide. For both ions, the  $MS^2$  spectra obtained after derivatization present a very different fragmentation pattern from those without derivatization. As expected, a clear increase of the fragmentation ion yield and orientation of the fragmentation was observed. For both spectra, the most intense and quasi-unique observed fragments were  $y$  fragments. For  $m/z$  1902.78, the complete  $y_i^+$  series of the fragment ion was observed. This allowed doubtless identification of a fragment of tubulin  $\alpha$  (VFVDLEPTVIDEVR) by databank query with a high confidence score (score 142, expect  $1.1 \times 10^{-12}$ ). It was also evident from the  $MS^2$  spectrum that this peptide can also be identified using automatic de novo sequencing bioinformatics tools or by manual identification. We must note that, for this particular peptide, the native peptide has an  $m/z$  of 1701.94 and of 1902.78 after N-terminal derivatization; thus the mass shift is not 184 u, as expected, but 184 + 17 u. The peptide sequence, however, corresponded to the expected sequence for a classically

derivatized peptide. As all observed mass fragments show the expected  $m/z$ , we must conclude that the modification is a result of the derivative group and does not change the fragmentation properties. For the derivatized peptide at  $m/z$  1523.67, a clear  $y$  series of fragments was also observed, although in this case the sequence is not fully complete. This peptide, however, can be easily identified as a fragment of MBP (HRDTGILD(SIGR) with a high score (score 94, expect  $9.6 \times 10^{-9}$ ). Two amino acids were lacking to complete the sequence. The stop in the sequence corresponded to the presence of an arginine residue. This precise peptide contains a miscleavage site, a phenomenon quite often observed for trypsin digestion from tissue sections. This is likely due to a lack of accessibility of the enzyme to some basic residues due to peptide conformation and/or inclusion in the tissue. For all peptides containing a miscleavage, a stop in the  $y_i^+$  series of the ion was observed due to the benefit of N-terminal  $b_i^+$  fragments, such as for the fragment at  $m/z$  1092.32 corresponding to the  $b_8^+$  ion. In the present case, the miscleavage is situated at the end of the sequence and does not significantly hamper the identification. If the miscleavage site is in the middle of the rather long peptide sequence, however, identification can be rendered more difficult. For peptides not presenting any miscleavage site, the entire sequence was obtained as observed for  $m/z$  1902.78. In all tested cases, derivatization eased protein identification and rendered it more confident. Figure 6 shows the  $MS/MS$  spectra of four different peptides issued from on-tissue trypsin digestion, both before and after derivatization with 3-SBASE, and Table 1 summarizes the identification scores obtained with and without derivatization. For all peptides, 3-SBASE derivatization greatly simplified  $MS/MS$  spectra and eased sequence determination (Figure 6). An increase in the identification score (Table



**Figure 6.** In-tissue MALDI MS/MS spectra recorded after global trypsin digestion (a, c, e, g) or global trypsin digestion followed by derivatization with 3-SBASE (b, d, f, h) of a rat brain tissue section.

1) was clearly observed for all peptides, but the increase was more pronounced for higher mass peptides for which the combination of possible expected  $m/z$  (i.e., different fragments) highly increased with the number of residues in the sequence. All of these

observations clearly show that derivatization is an interesting approach for helping protein identification directly from tissue sections, especially when integrated in a completely automated sequence.

**Table 1. Comparison of Identification Scores as Found from Mascot Query Using the SwissProt Database and *R. norvegicus* Taxonomy for Four Peptides before and after Automated Derivatization with 3-SBASE**

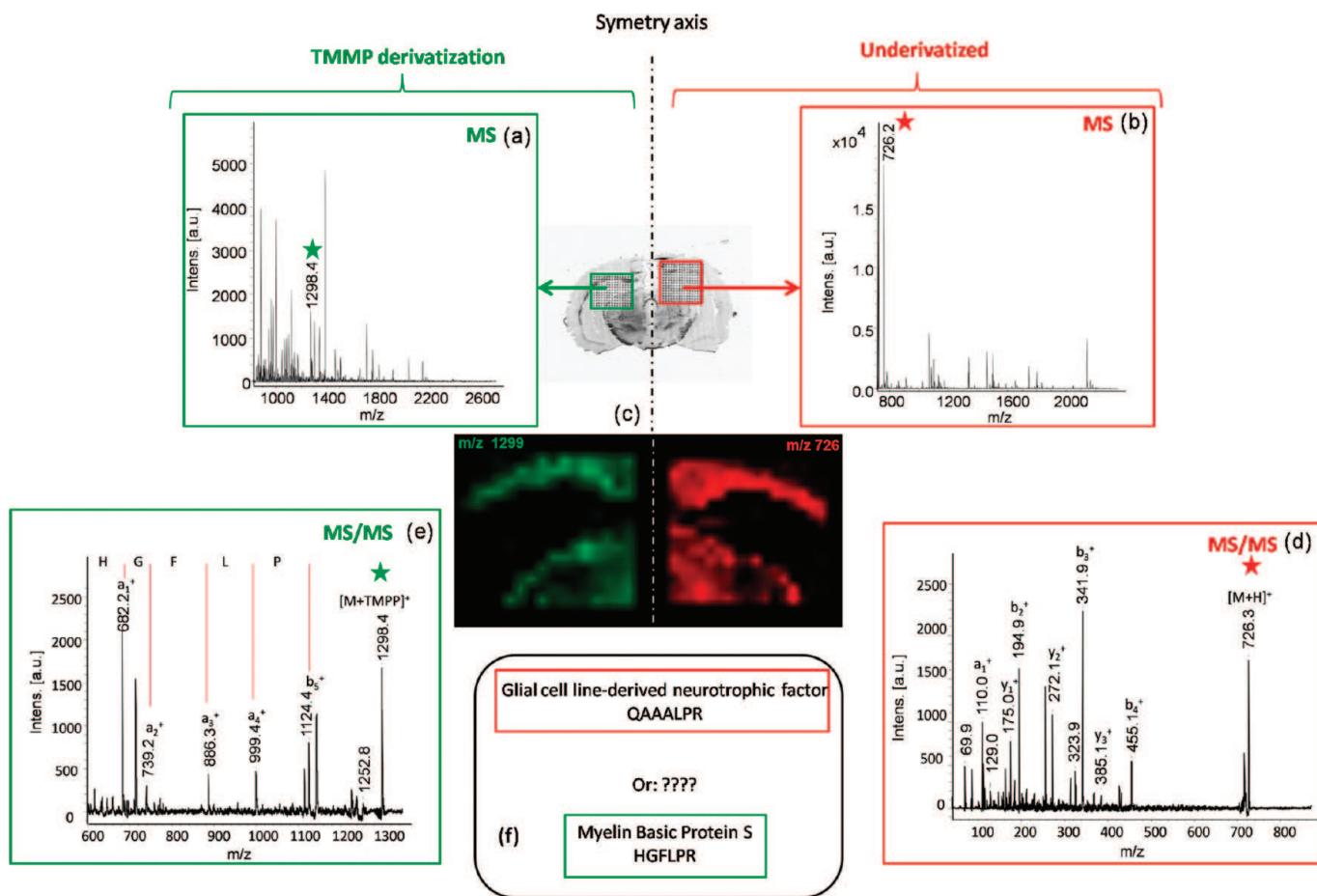
	<i>m/z</i> observed	<i>m/z</i> expected	ion score	rank	$\delta$	expect	sequence
peptide	643.35	642.32	NI <sup>a</sup>	NI	NI	NI	RPSQR myelin
peptide + derivatization (3-SBASE)	827.9		46	1	-0.0314	0.0064	basic protein
peptide	726.23	725.22	28	2	-0.1765	0.044	HGFLPR myelin
peptide + derivatization (3-SBASE)	910.1		30	1	-0.3046	0.029	basic protein
peptide	1339.24	1339.71	42	1	-0.4706	0.0015	HRDTGILDSIGR
peptide + derivatization (3-SBASE)	1523.7		93	1	-0.277	$9.6 \times 10^{-19}$	myelin basic protein
peptide	1701.92	1701.91	57		0.0162	$6.2 \times 10^{-5}$	AVFVDLEPTVIDEVR
peptide + derivatization (3-SBASE)			142		-0.0058	$1.1 \times 10^{-12}$	tubulin $\alpha$ -1A chain

<sup>a</sup> NI: not identified.

**In-Tissue N-Terminal Derivatization for MALDI Imaging by Automatic Microspotting.** In order to combine the valuable in-tissue identification strategy and localization of the identified protein, derivatizations were tested at the microscale level using a microspotting device. In particular, the number of drops per cycle, number of cycles, and time between depositions were studied to optimize the reaction yield. Different buffer solutions were also tested to determine which buffer was most compatible with the piezoelectric deposition. The complete workflow integrated a first step of automated enzymatic digestion (here we used trypsin), followed by an automated derivatization process, and ending with an automated step of matrix deposition. Because 3-SBASE derivatization was shown to be the most efficient derivatization in terms of reaction efficiency (lower reaction temperature, higher yield of derivatization, more peaks detected on tissue) and fragmentation (no loss of the 3-SBASE group as the main fragmentation pathway), this reagent was chosen for automatic derivatization. After automatic trypsin digestion using the microspotter and an incubation period at 37 °C for 1 h, a solution containing 20 mg/mL of 3-SBASE in NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer (50 mM) was then deposited onto the raster of digestion spots. After 20 iterations, the slide was then incubated (37 °C, 2 h) before matrix deposition. The solid ionic matrix HCCA/ANI was then deposited onto the raster of spots using the same procedure described for tissue digestion. It must be noted that matrix crystallization was difficult or impossible. The spots were then analyzed, but no ion signals were detected. Next, 2,5-DHB was tested; however, similar problems were observed. The concentration of 3-SBASE was then decreased to 10 and 1 mg/mL, respectively, but no N-terminal derivatizations were observed at these concentrations. It was clear that, after derivatization, the ionization efficiency of these peptides was very low in the positive mode. A similar phenomenon was previously observed for these derivatizations in solution.<sup>38</sup> It was shown that the detection of the derivatized peptides were decreased 10-fold in the positive mode due to both the presence of the negative charge of the sulfonic acid group in N-terminal moiety and the presence of salts, which should be considered as impurities that could affect the detection of derivatized peptides. If a decrease in signal intensity is observed after derivatization, intense signals are still observed if sufficient amounts of reagents are used (i.e., micropipet deposition), even when almost no signals are observed by using automated microspotting. Thus, we can assume that the extraction efficiency was lowered for the microspotting due to the small amount of matrix solution deposited. By considering the poor

ionization of these derivatized peptides and the low efficiency of extraction using microspotting, it clearly appears that these sulfonation reagents are difficult to introduce in an automatic workflow.

On-tissue derivatization has been shown to be an interesting strategy for confident identification of digestion peptides. Furthermore, 3-SBASE derivatization has shown to be more efficient in terms of reaction yield and fragmentation, though some difficulties can be encountered for peptides containing miscleavages or with the predominance of arginine toward lysine-containing peptides due to higher gas-phase basicity. Other such derivatizations require the presence of a basic amino acid at the N-terminal part of the peptide and must be used in combination with trypsin digestion. For such reasons, derivatization with TMPP was also investigated. Parts d and e of Figure 7 show an example of the resulting MS/MS spectra recorded from a rat brain tissue section after in-tissue trypsin digestion, followed or not by TMPP derivatization. Figure 7d presents the MS<sup>2</sup> spectrum recorded on the tissue section after trypsin digestion. As observed from the MS<sup>2</sup> spectrum presented in Figure 7e, for the underderivatized peptide, many fragments of very different types were again present. Most of these fragments were in the low *m/z* range of the spectrum, and almost no fragments were observed in the upper *m/z* range, thereby making interpretation difficult. A databank query using this MS<sup>2</sup> spectrum yields an unclear identification. The first protein appearing with the highest identification (score 40, expect 0.0028) was the glial cell line-derived neurotrophic factor for a peptide sequence QAAALPR. The second-ranked protein (28, expect 0.044) was a fragment of the myelin basic protein S, for which the peptide sequence was HGFLPR (Figure 7f). A priori, according to the differences of scores between the two proteins, we could assume our peptide to be a fragment of the glial cell line-derived neurotrophic factor. For identification confirmation, MS<sup>2</sup> was again performed after TMPP derivatization (Figure 7e). As expected for this N-terminal derivatization, the peak corresponding to the peptide of interest was shifted by 573.17 u. After TMPP addition and basic end residue cleavage, the MS<sup>2</sup> spectrum presented a very different fragmentation pattern, with one main fragmentation series corresponding to a<sub>i</sub><sup>+</sup> fragment ions and a few additional weak peaks corresponding to b<sub>i</sub><sup>+</sup> fragment ions. The sequence can easily be manually determined to be HGFLPR. We can therefore confirm that, contrary to what would have been expected from a databank query using the MS<sup>2</sup> spectrum of the underderivatized peptide, the peptide was a fragment of the myelin basic protein S.



**Figure 7.** MALDI MS spectra recorded after (a) enzymatic digestion followed by TMPP derivatization and (b) enzymatic digestion. (c) Images of the digestion peptide at  $m/z$  726 and its corresponding TMPP derivative at  $m/z$  1299, showing an identical distribution for both ions. (d) MALDI MS/MS spectra recorded from a rat brain tissue section in the same area after in-tissue trypsin digestion (e) and in-tissue trypsin digestion followed by TMPP derivatization. (f) Identification results from the databank using *R. norvegicus* taxonomy.

We then tested TMPP to be used in an automated sequence using microspotting deposition. For comparison, after automated digestion of the whole tissue section using microspotting, only half of the brain section (according to the brain symmetry axis) was automatically derivatized by microspotting of the TMPP reagent. This allowed the comparison of the biodistribution of the peptides before and after in-tissue microspotting derivatization by reconstructing molecular images of underderivatized and derivatized peptides issued for the tryptic digestion. On the tissue section, two arrays of points were defined. The first, located in the right part of the brain, corresponded to a sequence only involving in-tissue trypsin digestion followed by matrix deposition, whereas the second, located in the left part of the brain, corresponded to a sequence comprising in-tissue trypsin digestion followed by in-tissue TMPP derivatization and matrix deposition. Parts a and b of Figure 7 present the MALDI spectra recorded at the same location on the tissue section according to the symmetry axis of the brain with (Figure 7a) and without (Figure 7b) derivatization. Molecular images of the previously studied peptide identified as a fragment of myelin basic protein S were reconstructed based on the signal of the underderivatized peptide ( $m/z$  726) and the TMPP-derivatized peptide ( $m/z$  1299) (Figure 7c). It clearly appeared that the peptides at  $m/z$  726 (underderivatized) and at  $m/z$  1299 (TMPP-derivatized) presented the same spatial distribution,

illustrating the potential of TMPP for automated in-tissue derivatization and application in MALDI imaging. This derivatization well orients fragmentation toward  $a_i^+$  fragments, but it also resolves the problems of arginine-containing peptide predominance. Derivatization using TMPP does present the advantage of being easier to perform, since the reaction takes place at room temperature to facilitate automation of the strategy. We must also note that problems due to miscleavage sites are no longer observed, since fragmentation is oriented toward N-terminal fragment ions and because charge can no longer be driven by the basic end amino acid. As demonstrated here, TMPP is also a good solution for identification from tissue sections and can be easily used in the imaging mode. We must, however, note that TMPP requires higher fragmentation energy to induce fragment ions. This is due to the fact that fragmentation is not induced by a mobile proton. This can be overcome by increasing the collision energy in instruments equipped with collision cells for CID (some peptides could require 80–90 V).<sup>51</sup> This is not the case for instruments using metastable ion decay, such as PSD or PSD-like modes. In PSD, with respect to the peptide sequence, metastable decompositions driven by an ion's internal energy might not occur on the instrument's time scale,

(51) Chen, W.; Lee, P. J.; Shion, H.; Ellor, N.; Gebler, J. C. *Anal. Chem.* 2007, 79, 1583–1590.

leading to MS/MS spectra with very few fragment ions. Thus, for some peptides on MALDI-TOF instruments run in metastable decay mode, fragmentations can be difficult to generate. Thus, MALDI-MSI has shown to be possible after in-tissue digestion followed by in-tissue derivatization under automated microspotting conditions of the reagents. Derivatization using TMPP has been shown to be easiest to perform at the microscale level, as the derivatization reaction occurs at room temperature.

## DISCUSSION

N-Terminal chemical derivatization of digested peptides has demonstrated to be a valuable strategy for confident and simple protein identification directly from tissue sections. After optimization of derivatization conditions in the tissue, satisfying reaction yield can be obtained and leads to the derivatization of the majority of peptides. Comparison of 4-SPITC and 3-SBASE derivatization has shown that 3-SBASE is more advantageous. 3-SBASE does present higher reaction yields and does not lose the derivative group as one of the main fragmentation pathways. Both 4-SPITC and 3-SBASE derivatization lead to a complete series of  $y_i^+$  fragment ions. In-tissue derivatization can be included in identification strategies directly from tissue sections. We have shown that derivatization can be performed after trypsin digestion to identify peptides, presenting an interesting distribution as determined by MALDI imaging of the peptides resulting from the digestion process. In the identification sequence, derivatization will allow for the confirmation and expedition of the identification of proteins. Derivatizations have been demonstrated to greatly ease identification by databank query or using de novo sequencing approaches, leading to identifications with greater confidence. Despite this, we observed that arginine-terminated peptides were almost the only peptides observed after derivatization. This is due to the strong gas-phase basicity of these peptides compared to the corresponding lysine-terminated ones. In the case of lysine-terminated peptides, a protection using O-methyl-isourea<sup>52,53</sup> to convert lysine into homoarginine could be used to increase peptide basicity and thus increase ionization efficiency. This protection would also prevent peptides from multiple derivatizations, which can occur on the amine group found at the end of lysine side chains. We have also observed that for peptides presenting a miscleavage site, the  $y_i^+$  series of ions was stopped, leading to an incomplete sequence. This illustrates the importance of controlling the digestion conditions from tissue sections prior to the N-terminal derivatization. Derivatization with sulfonation agents was automated using automated microspotting of the reagents. Under these conditions, however, derivatization yields were slightly lower compared to larger scale spotting. In particular, problems for the matrix crystallization were observed for derivatizations at the microscale. Varying reagent concentrations have shown to be important parameters in the subsequent crystallization of the matrix. Better crystallization was achieved for lower reagent concentrations, but in such a case, derivatization yields were also affected.

Such effects were not observed in the same conditions for peptide mixtures in solution. This indicates that the observed effects cannot be attributed to the reagent or buffers themselves. Application of the reagent in its buffer on a tissue section without heating the system leads to a normal crystallization of the matrix. This indicates that such problems are coming from the heating of the tissue section in the presence of the reagent.

Derivatizations using TMPP that are independent of the presence of a basic residue at the N-terminal part of peptides (i.e., compatible with different enzymatic digestion) were also studied. Derivatization using TMPP is also usable at the tissue level and allowed for confident identification by orientating the fragmentation toward a major  $a_i^+$  fragment ion series. Derivatization using TMPP was also studied for automated microspotting. This derivatization has shown to be applicable in an automated microspotting sequence on the tissue sections, allowing for image acquisition even after the derivatization process. TMPP was shown to be easier to set up at the microscale level, as the reaction occurs at room temperature. With TMPP, crystallization difficulties in matrix solution were not observed. This is likely related to the reaction temperature (i.e., the room temperature for this reagent). Because TMPP is also independent of the presence and/or position of a basic residue in the peptide sequence, fragmentation orientation is not hampered by the presence of miscleavage in the peptide sequence. Thus, TMPP requires less control of in-tissue digestion; however, TMPP-derivatized peptides require more activation energy for fragmentations to occur. This indicates that, for this derivatization, fragmentation could be difficult for some peptides of specific sequences on instruments involving metastable decay and not CID.

## CONCLUSION

On-tissue N-terminal derivatization of in-tissue digested peptides has been shown to be a key point for improved identification of proteins from tissue sections in a MALDI-MSI “bottom-up” strategy. Different derivatizations have been shown to be usable and interesting for in-tissue identification. 3-SBASE and 4-SPITC derivatizations by addition of a negatively charged group at the N-terminus of peptides are useful for peptide identification at the tissue level. 3-SBASE has shown to be more efficient than 4-SPITC. Both derivatizations are easily to be performed but must be used in combination with trypsin digestion since they require the presence of a basic amino acid at the C-terminus of peptide. Orientation of fragmentation by derivatization using a positively charged moiety such as TMPP as also proved to be valuable for peptide identification. TMPP presents the advantage to be independent of the presence of basic amino acids at the N-terminus part of the peptides. TMPP derivatization has also shown to be more easily feasible at the microscale level by using automatic microspotting. Inclusion of derivatization procedures in the MALDI-MSI automatic workflow is a good solution for highly confident identification of peptides and proteins directly from tissue sections in MALDI-MSI strategies. This procedure is independent of the conservation of the tissue and can also be used on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues (archived tissues), if required, since FFPE tissue must be submitted to digestion procedures for MALDI-MSI. This will pave the way for

(52) Hale, J. E.; Butler, J. P.; Knierman, M. D.; Becker, G. W. *Anal. Biochem.* **2000**, *287*, 110–117.

(53) Beardsley, R. L.; Reilly, J. P. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 1884–1890.

in-tissue identification of pathological markers directly from archived materials from the hospital.

#### **ACKNOWLEDGMENT**

This research 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 IF), and the Institut du Cancer (INCA to IF).

#### **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 May 14, 2009. Accepted August 25, 2009.

AC901043N

# Chapter 20

## Specific MALDI-MSI: TAG-MASS

**Jonathan Stauber, Mohamed El Ayed, Maxence Wisztorski,  
Michel Salzet, and Isabelle Fournier**

### Abstract

MALDI imaging as a molecular mass spectrometry imaging technique (MSI) can provide accurate information about molecular composition on a surface. The last decade of MSI development has brought the technology to clinical and biomedical applications as a complementary technique of MRI and other molecular imaging. Then, this IMS technique is used for endogenous and exogenous molecule detection in pharmaceutical and biomedical fields. However, some limitations still exist due to physical and chemical aspects, and sensitivity of certain compounds is very low. Thus, we developed a multiplex technique for fast detection of different compound natures. The multiplex MALDI imaging technique uses a photocleavable group that can be detect easily by MALDI instrument. These techniques of targeted imaging using Tag-Mass molecules allow the multiplex detection of compounds like antibodies or oligonucleotides. Here, we describe how we used this technique to detect huge proteins and mRNA by MALDI imaging in rat brain and in a model for regeneration; the leech.

**Key words:** Matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight, mass spectrometry, mass spectrometry imaging, mRNA, antigens, photocleavage.

---

### 1. Introduction

As an innovative technique, MALDI-IMS is a powerful tool for direct detection and localization of endogenous and exogenous molecules within biological samples (1, 2). The last developments have led to use this technique to obtain the distribution of various compounds such as lipids, drugs, peptides, and proteins within tissue sections (1–4). Non-targeted aspect of MALDI-IMS is one of the big advantages of the technology compared to other imaging techniques as well as strength of MS for structural elucidation.

Many successful applications of this technique have been undertaken recently. In particular, MALDI-IMS of lipids, peptides, and proteins for clinical applications by studying pathologies has shown to be a very promising application by providing information on the variations of abundance and localization of markers (3–14). Moreover, biological processes bring into play many different signaling pathways involving various classes of molecules ranging from oligonucleotides, to proteins, peptides, and lipids. In particular, the correlation of mRNA expression with their corresponding protein regulation, or more generally the correlation of transcriptome to proteome, is of special interest for better understanding of biological mechanisms. This is especially an essential aspect when studying pathologies for earlier diagnosis.

However, some specific classes of biomolecules such as oligonucleotides or sugars are still non- or hardly accessible to the direct analysis by MALDI, as are also, very hydrophobic proteins, membrane proteins, high mass proteins ( $>30$  kDa), or lower abundance ones. Ideally, oligonucleotides should be directly detected from tissues, although their large size and low abundance in cells added to analytical difficulties in mass spectrometry (salts adducts and gas phase instability) render their analysis difficult (15). In the same time, multiplex techniques are necessary for diagnosis and prognosis. More and more tissue micro arrays (TMAs) are used today to analyze large number of disease tissues and new, fast, and reproducible multiplex techniques are necessary (9).

We, thus, have proposed a new concept of possible multiplex and specific detection and tracking of biomolecules with a special focus on mRNA and proteins for transcriptome/proteome correlations. This concept relies on affinity detection by using a specific designed probe, called Tag-Mass which can be detected by mass spectrometry (16). Tag-Mass offers more selectivity to MALDI-MSI for selectively and specifically tracking known markers of physiological stages in cohorts of samples with a high sensitivity (3, 16, 17).

### **1.1. The Tag-Mass Concept: Selective Multiplexed Imaging of Biomolecules from Tissue Sections**

The “Tag-Mass” strategy is an affinity-based strategy where a probe is directed against a specific target, using a probe that can be imaged by MALDI-MSI (3, 16, 17). The Tag-Mass is a modified probe bearing a reporter group where the reporter group is used in MALDI-MSI to indirectly obtain the image of the probe. The reporter is designed to be a molecule of known molecular mass that is easily detectable under MALDI conditions taking care to use a molecule that is not corresponding to an endogenous compound. To image a probe indirectly via the direct image of the reporter, the reporter must be linked to the probe and released in the final step just before or during the MALDI sequence.

In the Tag-Mass, the release of the reporter group is obtained by photodissociation under the MALDI laser irradiation using a photocleavable moiety that binds the reporter to the probe (**Fig. 20.1a**). Thus, the reporter is detached from the probe during the MALDI-MSI acquisition. Many different reporters can be used for this purpose, but most of the times peptides were used. The photocleavable linker is chosen to present a specific absorption band in the UV at a wavelength (340 nm) very closed to that of MALDI lasers (i.e., 337–355 nm). Thus, after hybridization of the modified probe to its target, a classical MALDI-MSI sequence is performed. At a specific location of the acquisition, the presence of a probe will be signed by the presence of the reporter released under the MALDI laser irradiation, which traduced by the observation of a peak at the  $m/z$  expected for the reporter (**Fig. 20.1b**). Reconstruction of the reporter molecular image gives, then, the image of the probe, i.e., those of the targeted molecule (3, 16, 17). Such a concept is compatible with all types of probes including mRNA probes, antibody probes, or even lectins or aptamers owing to image with high selectivity, respectively, mRNA, antigens, oligosaccharides (including glycosylated proteins), and drugs. Tag-mass workflow, MALDI-MSI, is combined with hybridization techniques including *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry (IHC) (3, 16, 17). Specific MALDI-MSI or Tag-Mass MSI by using reporter moieties that can be distinguished by their change in  $m/z$  is a technique that can be used in multiplex conditions. Theoretically, there are no limits in the multiplexing conditions except the hybridization step itself because of kinetic competition during the affinity reactions or steric obstruction problems. Tag-Mass can also be used for semi-quantification in multiplex conditions by using a reporter presenting the same physico-chemical properties, i.e., same analytical behavior using, for example, isotopically labeled reporter such as differentially deuterated peptides.

This concept can be extended by looking for alternative ways of releasing the reporter moiety, e.g., chemically released or even released by prompt fragmentation pathways (i.e., before the end of the delay time period). The reporter can also be designed to be observable in LDI conditions avoiding, thus, the use of the MALDI matrix (18, 19). Although this latest solution could be less sensitive than using MALDI conditions but would increase spatial resolution of images. Extension to other ion production sources can also be searched. For secondary ion mass spectrometry (20, 21) (SIMS) or laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (22–24) (LA-ICP), probes bearing directly a monoatomic element easily detectable by these techniques should be used, if the element has a good sensitivity of analysis and is not present naturally in the surface to study. Such techniques induce quite important fragmentation yields and the reporter element

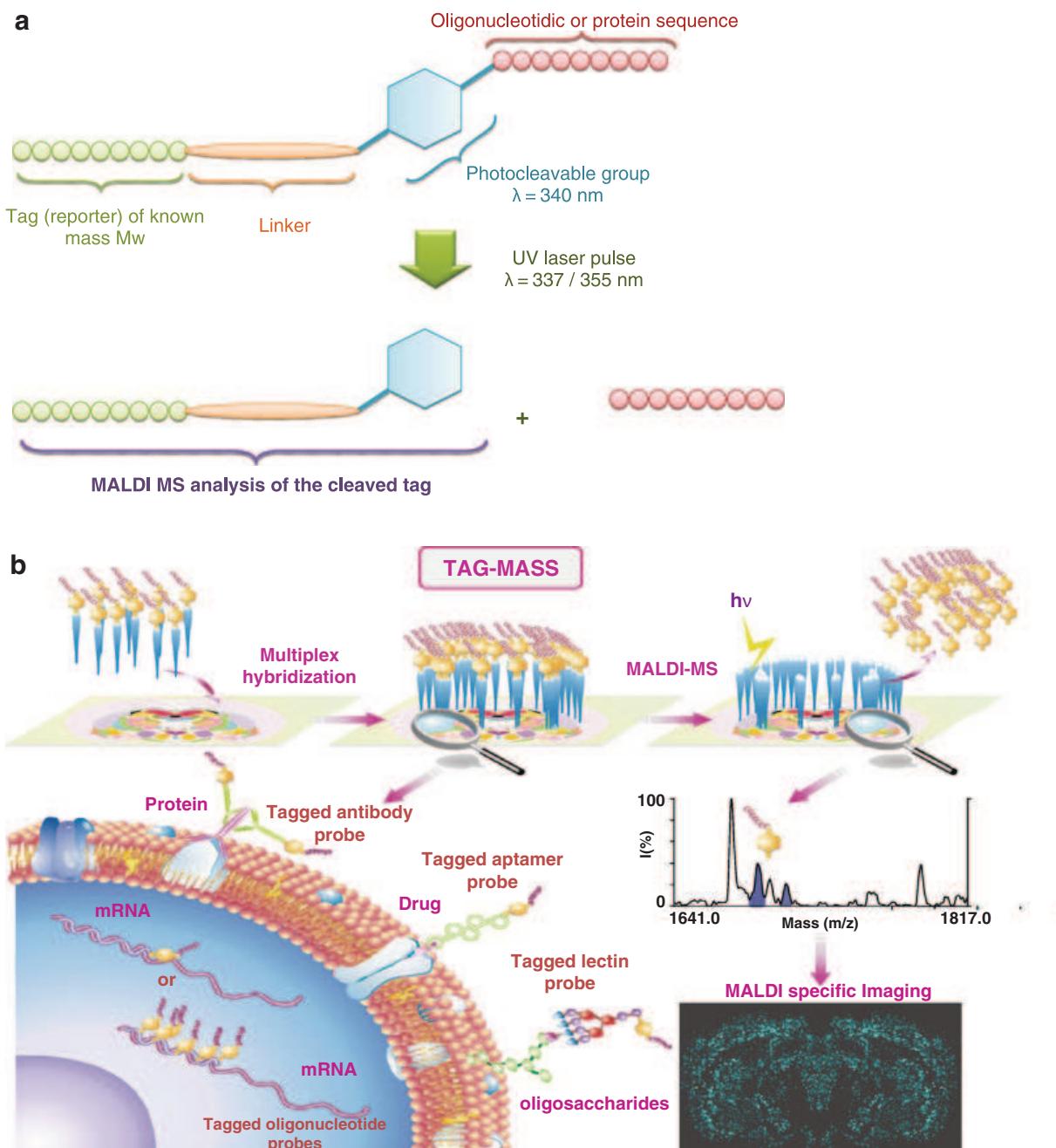


Fig. 20.1. (a) Schematic representation of the reporter release under photodissociation by the MALDI laser using a photocleavable-reporter system coupled to the probe. (b) Workflow of multiplex specific MALDI-MSI (Tag-Mass).

will appear as a fragmentation product. For example, gold-labeled secondary antibodies are a good solution for imaging antigens in LA-ICP MS at a spatial resolution below 10  $\mu\text{m}$ .

We present, here, the workflows for Tag-Mass of antigens and mRNA using a photocleavable probe bearing a peptide as reporter moiety. For antibodies, preference was given to use indirect IHC with a primary–secondary antibody system. Indeed, indirect IHC is known to present better performances by decreasing steric obstruction problems and increasing detection level, since secondary antibodies will recognize consensus epitope present in the

primary antibody sequence allowing attachment of several secondary antibodies. Moreover, secondary antibodies are easier to produce since they require much less specificity. For mRNA, modified uracile nucleotides were used. This requires a specific synthesis in order to add the photocleavable group and reporter moiety directly on the nucleotide basis for keeping both 3' and 5' termini free. In fact, the modified nucleotide is to be used for the probe amplification. In former experiments, modified primers (by the addition of a photocleavable-reporter system) were used. This approach had revealed several disadvantages including lack of sensitivity (only one reporter per probe), high cost (specific synthesis required for each mRNA to be localized), and impossibility to amplify the probe by in vitro translation (only one terminus of the primer free). Development of modified uracile nucleotides was a great advance in this respect. Modified nucleotides are available for all probes construction, the sensitivity is increased by the incorporation of several reporters in the probe sequence (amplification of the signal) and probes can be obtained by in vitro translation. Only tagged Uracile strategy will be presented here. Specific MALDI-MSI can also be performed in multiplexing conditions. An example of duplex imaging of two antigens (Cystatin B/Cathepsin D) from a FPE tissue section of the leech *T. tessulatum* are presented here as an example for multiplexing.

---

## 2. Materials

### 2.1. Preparation of Frozen Tissue Sections

#### 2.1.1. Snap-Frozen Tissues

1. Isopentane cooled at -45°C with dry ice. Vapors may cause drowsiness and dizziness, so work in a hood.

#### 2.1.2. Tissue Cryosection and Thaw Mounted

1. Optimal cutting temperature polymer, OCT.
2. Indium tin oxide (ITO)-coated glass slides or other holder compatible with mass spectrometry analysis.
3. A cryomicrotome, Leica CM150S (Leica Microsystems, Nanterre, France).

#### 2.1.3. Pre-analysis Treatment: Tissue Fixation

1. Ethanol 75% (-20°C): 75 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and water (HPLC grade) to 100 ml. Prepare fresh. Store at -20°C.
2. Ethanol 95% (-20°C): 95 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and water (HPLC grade) to 100 ml. Prepare fresh. Store at -20°C.

**2.1.4. Pre-analysis**

*Treatment: Lipids Removal*

1. Chloroform ( $-20^{\circ}\text{C}$ ): 100 ml of chloroform ( $\geq 99.9\%$ ). Store at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Chloroform is harmful by inhalation, so work in the hood.

**2.2. Preparation**

*of FFPE Tissue Section*

**2.2.1. FFPE Tissue**

*Section*

1. Indium tin oxide (ITO)-coated glass slides or other holder compatible with mass spectrometry.
2. Water: 100 ml of water (HPLC grade). Prepare fresh.
3. A microtome and an hotplate warm at  $50^{\circ}\text{C}$ .

**2.2.2. FFPE Tissue**

*Dewaxing*

1. Xylene: 100 ml of xylene ( $\geq 99.9\%$ ). Xylene is harmful by inhalation, so work in the hood.
2. Ethanol 100%. Prepare fresh.
3. Ethanol 95%: 95 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and water to 100 ml. Prepare fresh.
4. Ethanol 75%: 75 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and water to 100 ml. Prepare fresh.
5. Ethanol 30%: 30 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and water to 100 ml. Prepare fresh.
6. Water: 100 ml of water (HPLC grade). Prepare fresh.

**2.3. Hybridization**

*Buffers for In Situ Hybridization (ISH)*

1. Buffer solution glycine 0.1 M/Tris HCl buffer (pH 7.4).
2. RNase inhibiting activity solution: Proteinase K (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in 1 M/Tris HCl and 0.5 M EDTA, pH 8).
3. Post-fixation buffer: 4% paraformaldehyde (0.1 M Phosphate/ 5 mM MgCl<sub>2</sub> buffer, pH 7.4), 15 min then triethanolamine (0.1 M, pH 8), 10 min.
4. Washing solution: 20 $\times$  SSC buffer: standard sodium citrate solution : for a 20 $\times$  SSC solution dissolve 701.28 g NaCl and 352.92 g NaCitrate in a recipe to make 4 l (check to have pH to 7.0) and bring final volume to 4 l , then Autoclave the solution in order to be RNase free).
5. Dehydration by ethanol ( $30^{\circ}, 70^{\circ}, 96^{\circ}$ ).
6. Probes denaturation ( $100^{\circ}\text{C}$ , 10 min).
7. Hybridization buffer: 0.01 M dextran sulfate, 0.2 M formamide, 20 $\times$  SSC 20%, 100  $\times$  Denhardt's 10%). 16 h,  $55^{\circ}\text{C}$ .
8. Non-hybridized probe degradation buffer: RNase (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),  $37^{\circ}\text{C}$ , 30 min.

9. Rinsed steps:
  - a. 20 and 10 mM 2-mercaptoethanol solutions, 10 min.
  - b.  $0.5\times$  and  $0.1\times$  SSC.
  - c. Ultrapure water.
  
1. Incubation buffer: 0.1 M PBS/1% BSA/1% normal goat serum/0.05% Triton X100.
2. Primary antibody incubation, overnight, 4°C, on rocking.
3. Washing solution: phosphate-buffered saline (PBS). Prepare 10× stock with 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (adjust to pH 7.4 with HCl if necessary) and autoclave before storage at room temperature. Prepare working solution by dilution of one part with nine parts water.
4. Secondary antibody solution: antibody diluted in incubation buffer at room temperature, on rocking. Antibody is either anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat (Jackson ImmunoResearch, Inc., Europe LTD); FITC-conjugated secondary antibody anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat (Jackson ImmunoResearch, Inc., Europe LTD) or photocleaved tagged antibody 1/100 (Imabiotech, France).
5. Revelation
  - a. Photocleavable tagged antibody, precleavage under UV 5 min Staining substrate for peroxidase antibody in chloronaphthol with 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for detection.
  - b. For FITC ICC, slices were prepared using phenylenediamine in glycerol.

## **2.5. Matrix Deposition for Proteins Analysis**

### *2.5.1. Using a Microspotter*

1. SA/ANI solution: 1.5 equivalent of aniline (ANI) were added to a solution containing 40 mg/ ml of sinapinic acid (SA) in acetonitrile/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.
2. Chemical Inkjet Printer CHIP-1000 (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan).

### *2.5.2. Using an Automatic Sprayer*

1. SA/ANI solution: 1.5 equivalent of aniline (ANI) were added to a solution containing 40 mg/ ml of sinapinic acid (SA) in acetonitrile/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.
2. ImagePrep (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## **2.6. Matrix Deposition for Peptides Analysis**

### *2.6.1. Using a Microspotter*

1. ANI solution: 1.5 equivalent of aniline (ANI) were added to a solution containing 10 mg/ml of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in acetonitrile/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.
2. Chemical Inkjet Printer CHIP-1000 (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan).

### *2.6.2. Using an Automatic Sprayer*

1. ANI solution: 1.5 equivalent of aniline (ANI) were added to a solution containing 10 mg/ml of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in acetonitrile/aqueous TFA 0.1% (6:4, v/v). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.
2. ImagePrep (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## **2.7. Mass Spectrometry Analysis**

### *2.7.1. MALDI-MSI Experiment*

1. Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France): Angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, ACTH clip 1–17, ACTH clip 18–39, Somatostatin 28, Bradykinin Fragment 1–7, Renin Substrate Tetradecapeptide porcine. Covered mass range: ~700–3,200 Da. Store at –20°C.
2. Protein Calibration Standard I (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France): Insulin, ubiquitin I, cytochrome C, myoglobin. Covered mass range: ~5,000–17,500 Da. Store at –20°C.
3. An Ultraflex II TOF–TOF equipped with a Smartbeam laser and all the Flex software suite (FlexControl, FlexAnalysis, and FlexImaging) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### *2.7.2. MS/MS Analysis*

1. An Ultraflex II TOF–TOF equipped with a Smartbeam laser and all the Flex software suite (FlexControl, FlexAnalysis, and FlexImaging) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).
2. Biotools (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

## **2.8. MALDI Imaging Analysis**

1. MALDI matrix used for antibody detection:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) and 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA) (Sigma-Aldrich).

2. Calibrant solutions of angiotensin II, Des-Arg-bradykinin, substance P, ACTH 18–39, ACTH 7–38, and bovine insulin (Sigma-Aldrich).
3. Trifluoroacetic acid (TFA) (Applied Biosystems). Acetonitrile and methanol (J.T. Baker).
4. Sprayer of matrix (ImagePrep, Bruker Daltonics).

---

### 3. Methods

The methods are described according to their sequential used in experiments. One part is dedicated to the protocols or hybridization themselves, i.e., ISH and IHC using the photocleavable modified probe for both cryostat sections (from frozen samples or fixed and frozen samples) and microtome sections (for fixed and paraffin-embedded [FPE] samples). It must be noticed that the protocols are tissue and target dependent. This is usual in hybridization. Thus, proposed protocols are given for rat brain tissue sections and shall be slightly modified and optimized for other applications according to the tissue and the probe (specificity, selectivity). **Figures 20.2** and **20.3** give examples of MS spectra and molecular images obtained, respectively, for Proenkephalin mRNA imaging and Carboxypeptidase D (CPD) protein imaging, respectively, using the modified dU for the oligonucleotides probe construction and a rabbit secondary modified antibody for CPD in conjunction with a primary antibody directed against rat CPD and raise in rabbits as antibody. The images are reconstructed based on the reporter signal with a peptide close to the bradykinin sequence. **Figure 20.2** gives the molecular distribution of Proenkephalin mRNA as obtained by specific MALDI-MSI compared to the localization obtained by classical ISH. A good correlation is observed in between ISH and MALDI-MSI images. **Figure 20.3** compared the specific MALDI-MSI localization of CPD with its distribution obtained for classical colorimetric reaction or fluorescence. Specific MALDI-MSI presents higher sensitivity than classical revelation and is not so far from fluorescence detection. Specific MALDI-MSI enables multiplex detection of different epitopes. An example of duplex experiments for proteins is given **Fig. 20.4** where Cystatin B/Cathepsin D system is studied in FPE tissue sections of the leech *Theromyzon tessulatum*. Experiments were performed using two photocleavable secondary antibodies bearing different reporter peptides represented by different *m/z*. In such an experiment, one primary antibody is raised in rabbit

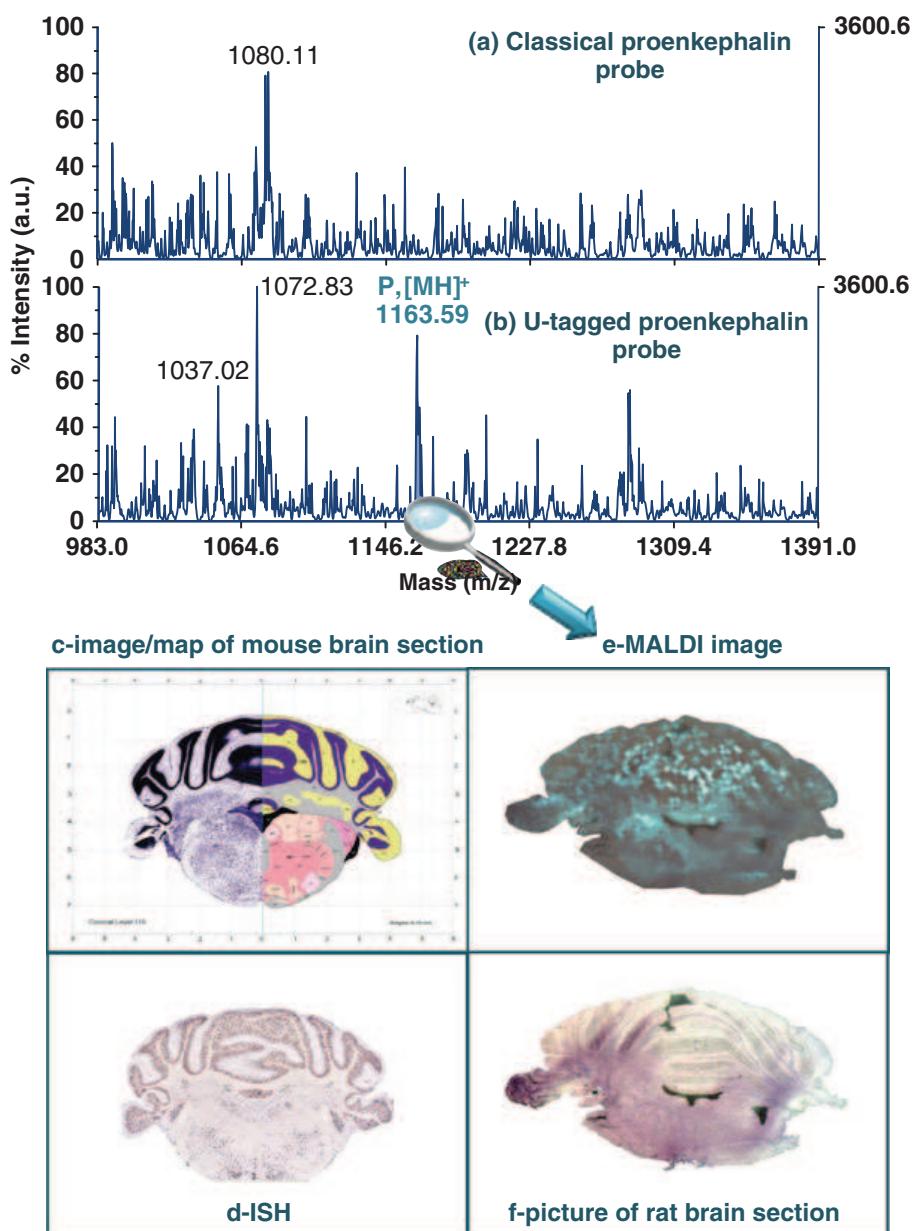


Fig. 20.2. Compared MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ISH of double strand oligonucleotide cDNA probe corresponding to proenkephalin for classical untagged proenkephalin probe (a) and the U-tagged proenkephalin probe (b). (f) Corresponding reconstructed MALDI image on the basis of the tag signal obtained by scanning the tissue section after ISH experiment (7,000 spots separated each of 100  $\mu\text{m}$ ) compared (e) to proenkephalin mRNA localization in 8-weeks old male C57BL/6 J mouse brain using digoxigenin ISH technique by the Allen Institute (<http://www.brainatlas.org/aba>). For this experiment, colorimetric detection of bound probe is generated by the alkaline phosphatase substrates nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) that produce a vivid blue/purple particulate reaction product. Figures (a) presents the map/picture representation of the mouse brain and figure (f) the picture of the rat brain section prior to ISH –MALDI imaging experiment. Reprinted from (14) with permission.

with an anti-rabbit photocleavable secondary antibody, whereas the second one is raised in mouse with an anti-mouse photocleavable secondary antibody. The experiment-exemplified multiplex conditions for proteins, although multiplexing, can also be achieved for mRNA.

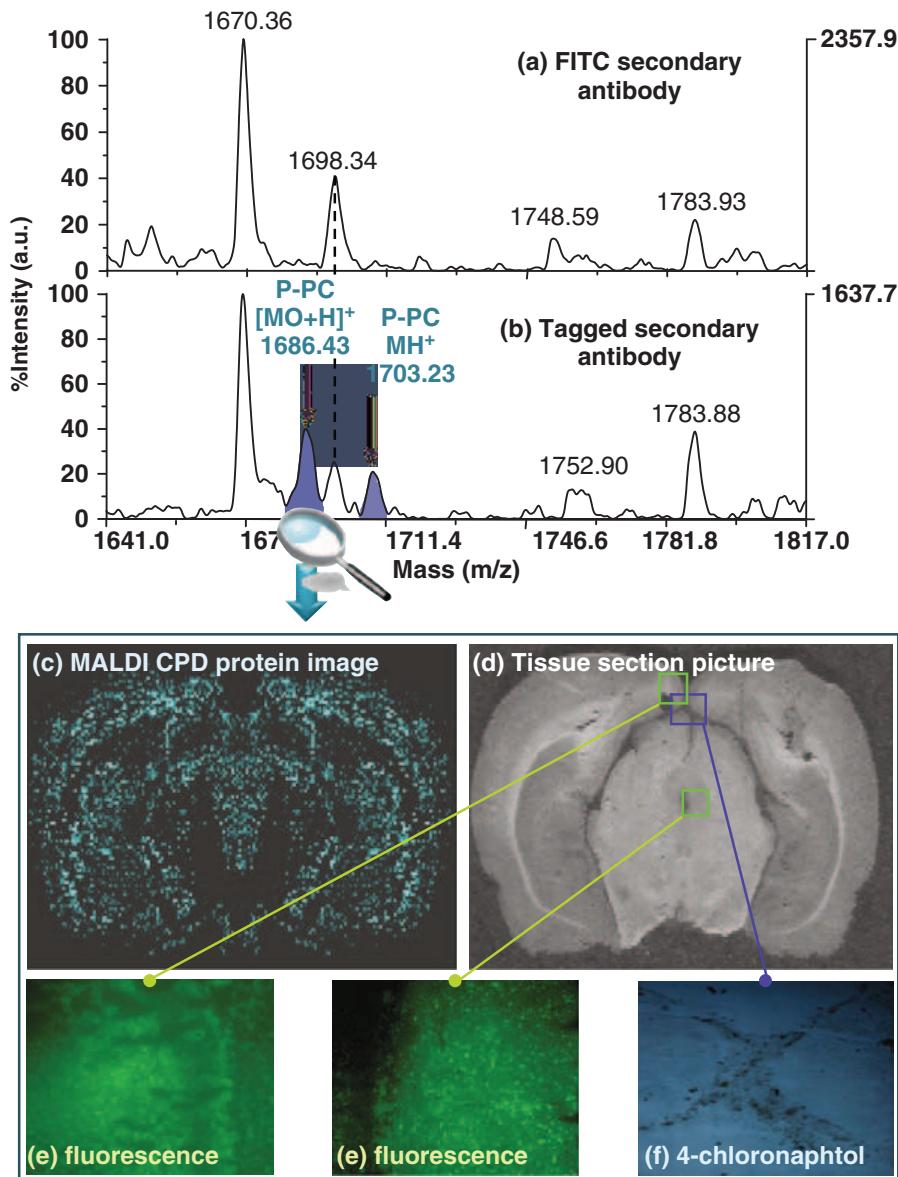


Fig. 20.3. Specific MALDI-MSI of CPD protein from a rat brain tissue section performed using a rabbit anti-rat primary antibody directed against CPD and the modified photo-cleavable goat anti-rabbit secondary antibody. (a–b) MALDI-MS spectra recorder for serial rat brain tissue sections after the IHC experiments for the tagged secondary antibody (b) compared to a FITC secondary antibody (a) for the same IHC conditions. (c) Molecular MALDI images reconstructed using the signal at  $m/z$  1,686.43 of the reporter moiety (d) tissue section image before IHC experiments. (e and f) Comparison with fluorescence and 4-chloronaphthalol detection using, respectively, a FITC or preroxydase tagged secondary antibody. Reprinted from (14) with permission.

### 3.1. Tissue Treatment

#### 3.1.1. Tissue Snap-Frozen

1. The organ is dissected and rinsed with a saline solution suited for the considered tissue to remove blood and other tissue fragment of the surface. Alternative: prior to sacrifice, the animal can be perfused with the saline solution to remove blood inside the organ.

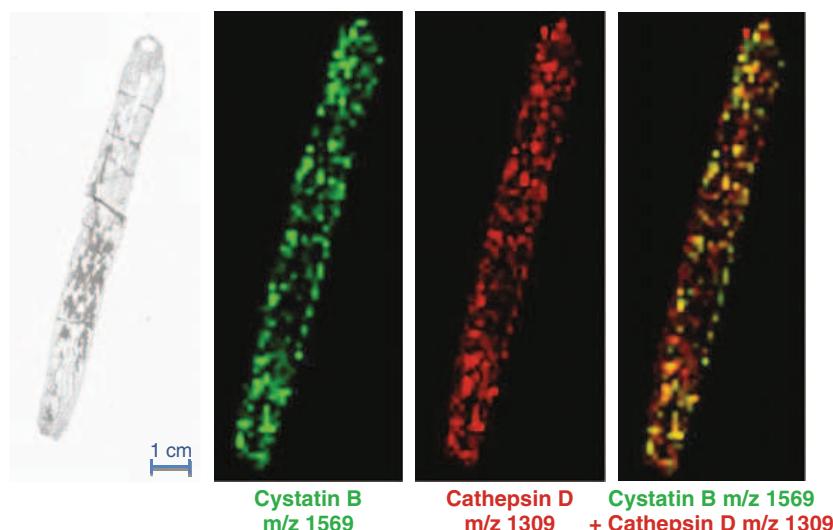


Fig. 20.4. Duplex specific MALDI-MSI of Cystatin B/Cathepsin D from a FPE tissue section of the leech *T. tessulatum* performed using rabbit anti-leech Cathepsin D primary antibody/photocleavable goat anti-rabbit secondary antibody and mouse anti-leech Cystatin B primary antibody/photocleavable goat anti-mouse secondary antibody. Molecular images have been reconstructed on the signals of the two reporter peptides, i.e.,  $m/z$  1,309 for Cathepsin D and  $m/z$  1569 for Cystatin B.

2. Morphology of the organ needs to be carefully maintained. Thus, the tissue should not be placed in a tube or wrap in an aluminum foil to avoid deformation of the organ (adaptation to the outlines of the container).
3. Snap-freezing procedure is applied for tissue conservation to maintain tissue morphology and to prevent ice crystals formation and cell explosion. In fact, different rate cooling of parts of the organ or direct dipping of the organ into liquid nitrogen leads to the formation of cracks and fragmentation of the tissue. Therefore the use of isopentane cooled at  $-45^{\circ}\text{C}$  with dry ice is recommended. Freezing time is dependent on the size of the organ. It is preferable not to use an embedding media. For very small organs or surgical pieces, cutting without embedding material increases deformations and damages of the tissue sections. In such a case, a solution containing non-polymeric compounds, namely 10% gelatin solutions, helps to obtain high-quality tissue section. Tissue is embedded in 10% gelatin directly after dissection and frozen as previously described.
4. After snap freezing, tissue is removed from isopentane and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . We heartily recommend not overpassing a storage period of 6 months. Over 6 months storage, variation in the molecular profiles could be observed if no sample stabilization procedure is performed. Preferentially tissues should be analyzed a few days or weeks after snap freezing.

*3.1.2. Tissue  
Cryosection and Thaw  
Mounted*

1. The use of cryopreservative solutions containing organic polymers such as optimal cutting temperature (OCT) polymer should be restricted to the attachment of the tissue to the sample holder and not used for complete embedding of the tissue. Moreover, all parts of the cryostat in contact with the tissue must be cleaned to prevent any contamination between two different samples or with the polymer containing solution. In the case of contact between the tissue and cryopreservative solutions containing polymers, MS spectra will be dominated by polymer signals such as PEG signal distribution.
2. Tissue is placed in the cryostat during sufficient time before sectioning for slow warming of the sample to the cryostat temperature. If the tissue is too cold, poor-quality sections are obtained.
3. 10 µm thickness tissue sections are cut using cryomicrotome at –20°C. Different tissue types may need other temperature settings. 10 µm thickness is optimal. Smaller sections have not enough molecules for extraction and thicker sections may cause problems of conductivity (due to the insulating nature of tissues) and charge effects by charge accumulation at the sample surface during MALDI analysis. Charge effects will decrease spectral quality in axial TOF configuration instruments resulting in a progressive peak shifting toward the high  $m/z$  ratio.
4. Collect the tissue sections onto ITO glass slides pre-cooled at –20°C. Transfer is performed by applying the cooled ITO slide onto the section. The cuts are thus stick on the cold slide. Adhesion of the frozen sections to the glass slides is obtained by heating putting fingers under the slide or by placing the slide at room temperature. This transfer procedure, contrarily to classical thaw mounting, prevents formation of ice crystals at the surface of the cryostat microtome cutting plate.
5. Care must be taken of air bubbles formation at the surface of the tissue section that may leads to artifacts during MS analysis.
6. Mounted sections are stored in a sealed container at –80°C until their use.

*3.1.3. Pre-analysis  
Treatment: Tissue  
Fixation*

1. A closed container store at –80°C is warmed at room temperature in a vacuum desiccator to prevent water condensation at the surface of the frozen slide.
2. After complete drying, the ITO slide is washed. Washing steps are optional and dependent on the molecules to be

analyzed. Careful washing is crucial for conserving spatial localization of molecules.

3. For analysis of small molecules like lipids or drugs, no washing steps are used. For macromolecules analysis like peptides or proteins washing procedures are generally used. Washing is performed by immersing the glass slide softly in ice-cold 75% ethanol during 30 s. No agitation or shake is needed. This step washes out salts, cells fragments, or residual fluids.
4. Take the slide out and remove the excess of liquid around the section. A stream of nitrogen over the surface could help to remove excess of ethanol.
5. The ITO glass slide is then placed in a vacuum desiccator to completely dry of the tissue. The time of drying is dependent to the size of the section.
6. Optional: a second bath of fresh ice-cold 75% ethanol during 30 s followed by a complete drying under vacuum desiccator can be achieved.
7. After complete drying, the sample is dipped into cold 95% ethanol during 30 s. No agitation or shake is needed. This step prevents degradation of proteome by dehydration and fixation of the tissue.
8. The slide is completely dried like in steps 4 and 5.

#### *3.1.4. Pre-analysis Treatment: Lipids Removal*

1. After complete drying, immerse the glass slide softly in ice-cold chloroform (30 s). No agitation or shake is needed. This step removes lipids (especially phospholipids) present in high concentration in the tissue (components of cell membranes) and may cause signal suppression in MS spectra.
2. Take the slide out and place it in the vacuum desiccator for complete drying of the tissue.

### **3.2. Preparation of FFPE Tissue Section**

#### *3.2.1. FFPE Tissue Section*

1. 10 µm thickness FFPE tissue sections are cut using a microtome at room temperature. Paraffin block can be cooled down –20°C prior sectioning to facilitate tissue sectioning.
2. Sections are transferred onto a conductive ITO glass slide on top of a water droplet.
3. Glass slide is warmed up on a hotplate to leave the cuts unfolds.
4. Excess of water is removed and glass slide is stored in an incubator at 30°C during 20 min for good adherence.

Subsequently obtained glass slides with FFPE tissue sections can be stored during over months at room temperature.

### **3.2.2. FFPE Tissue Dewaxing**

1. After complete drying, the glass slide is gently dipped into a bath of xylene during 5 min. This procedure is repeated to fold. No agitation or shake is needed.
2. The slide is then washed in stepwise immersion, 5 min duration each, into 100% ethanol twice, 95% ethanol, 75% ethanol, and 30% ethanol for rehydration of tissue sections.
3. The ITO glass slide is placed in the vacuum desiccator for complete drying of the sections.

### **3.3. Tissue Preparation for In Situ Hybridization (ISH)**

1. 10 µm thickness FFPE tissue sections obtained as previously described are used for ISH.
2. Paraffin is removed by using xylene baths (two times, 15 min), and then tissue is hydrated during 5 min in three steps of different mixed ethanol/water baths (96°, 70°, 30°).
3. Sections were prepared according to classical ISH protocols. Tissues were incubated in glycine buffer, and then treated for 15 min with proteinase K for protein digestion.
4. After post-fixation with 4% paraformaldehyde for 15 min, then a bath with triethanolamine (0.1 M, pH 8) was carried out for 10 min.
5. Sections were washed with 2× SSC, then ultrapure water for 5 min. Probes were denaturized at 100°C for 10 min, and after a 3 step tissue dehydration (30°, 70°, 96°), hybridization was done for 16 h at 55°C dissolving cDNA probes in hybridization buffer (Dextran sulfate 10%, formamide 50%, 20× SSC 20%, 100× Denhardt's 10%).
6. Tissues were incubated with RNase, then rinsed 10 min with successive SSC solutions and twice 0.5×SSC solutions at 55°C for 30 min. After rinsing slices with 0.1×SSC for 5 min at room temperature, one bath of ultrapure water was carried out to remove the excess of polymers. Tissues were kept drying at room temperature before MALDI matrix application.

### **3.4. Tissue Preparation for Immunocytochemistry (ICC)**

1. Frozen sections of rat obtained as previously described are used for ICC.
2. They were incubated at room temperature with 500 µl of incubation buffer for 30 min. The same buffer was used to dilute anti-rat Carboxypeptidase D (CPD) antibody (1:400), and incubation was performed overnight at 4°C.

3. For the leech, Cystatin B and Cathepsin D primary antibodies are used at different concentrations (1/500 Cystatin B and 1/400 Cathepsin D).
4. After washing three times in PBS, sections were incubated with peroxidase conjugated secondary antibody or FITC-conjugated secondary antibody or using photocleavable tagged antibody for 80 min at room temperature.
5. After another three washing steps in PBS buffer, the sections for peroxydase ICC were incubated in chloronaphthol with 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for detection. Reaction was stopped with several PBS and ultrapure water baths. For FITC ICC, slices were prepared using phenylenediamine in glycerol. For photocleavable tagged antibody, tissues were rinsed three times for 5 min with ultrapure water to remove salts, and sections were kept drying at room temperature in dark before matrix application. Tissues were then compared using microscopy.

### **3.5. Peptide Reporter Analysis**

#### *3.5.1. Peptide Reporter Analysis Using Dry Droplet*

For classical analysis, 1 µl of sample solution and 1 µl of matrix solution (HCCA/ANI) were mixed on the MALDI plate using the dried-droplet technique as a standard control for the different Tag-Mass molecules before imaging.

#### *3.5.2. Peptide Reporter Analysis Using Microspotter*

1. An ITO slide after washing step for frozen tissues or digestion for FFPE or frozen tissues is used.
2. On each defined spot, 20 nl of HCCA/ANI solution is applied. 5 droplets of 100 pl are deposited at each spot per cycle, then 40 iterations are necessary to obtain the total volume. For slides after digestion, the matrix is deposited with the same array than the one used for trypsin deposition. In this case matrix is deposited exactly at the same position than the trypsin.
3. Check matrix coverage using an optical microscope.
4. A rapid MS analysis on one spot is recommended to verify that a sufficient amount of matrix is deposited. Increase of iteration number may improve MSI when signal intensity appears to be low.

#### *3.5.3. Peptide Reporter Analysis Using an Automatic Sprayer*

1. An ITO slide after washing step for frozen tissue or digestion for FFPE or frozen tissues is used.

2. A method with different step of spraying, incubation, and drying phase is needed. The ImagePrep method for HCCA/ANI deposition is based on the normal HCCA method included in the ImagePrep. Optimization is required for each type of tissue. Briefly, the spray time is around 2 s (depending the surface of tissue section). An incubation time of 20 s (except for initialization phase: 10 s) allows an effective extraction of proteins. A particular attention is drawn to correctly set the drying time for complete crystallization on the tissue section. If the time is too short, the section will be too wet and a delocalization of molecules will be observed. The minimum drying time is around 120 s.
3. Check matrix coverage using an optical microscope.
4. A rapid MS analysis at one position can be performed to check out that a sufficient amount of matrix has been deposited. If not, some cycles of the last phase of deposition can be done again and may improve MSI when signals intensity is too low.

### **3.6. Mass Spectrometry Analysis**

#### **3.6.1. MALDI-MSI Experiment: In Linear Mode**

Acquisition parameters were set to acceleration voltage, 20 kV; first grid voltage, 94%; guide-wire voltage, 0.05%; extraction delay time, 200 ns. Each spectrum was an average of 500 laser shots at 100 Hz.

#### **3.6.2. Mass Spectrometry Analysis for Proteins MSI (For Frozen Tissue Analysis Exclusively)**

1. 0.5  $\mu$ l of protein calibration solution is deposited near to the tissue section and mix with 0.5  $\mu$ l of HCCA /ANI solution.
2. The mass spectrometer is calibrated with the calibration spot.
3. Using FlexImaging an area of interest is selected on the tissue after definition of the teaching points.
4. The distance between each measurement point is set. Distance between measurement points is, depending on the method, used for matrix deposition:  
With Chip-1000 deposition, the spots are generally spaced by 250  $\mu$ m center to center. It is possible to define the same raster than the one defined during matrix deposition. Due to the size of the spot it is possible to accumulate spectra at different position in the same spot. This increase statistics and reduce spot-to-spot variability.

With ImagePrep deposition, distance between two measurements can be chosen by the user. Generally the resolution is around 100  $\mu\text{m}$ .

5. In FlexControl, the adequate methods for proteins analysis is set in positive linear mode and a total of 500 spectra are acquired at each position at a laser frequency of 100 Hz.
6. The images are saved and reconstructed using FlexImaging 2.1.
  1. 0.5  $\mu\text{l}$  of peptide calibration solution is deposited near to the tissue section and mixed with 0.5  $\mu\text{l}$  of ANI solution.
  2. The mass spectrometer is calibrated with the calibration spot.
  3. Using FlexImaging an area of interest is selected on the tissue after definition of the teaching points.
  4. The distance between each measurement point is set. Distance between measurement points is dependent of the method used for matrix deposition.
    - 4.1. With Chip-1000, deposition spots are generally spaced by 250  $\mu\text{m}$  center to center. It is possible to define the same raster than for matrix deposition. Due to the size of the spots spectra can be accumulated at different positions in the same spot.
    - 4.2 With ImagePrep deposition, distance between two measurements is chosen by users. Generally the resolution is around 100  $\mu\text{m}$ .
  5. In FlexControl, the adequate methods for peptides analysis is set in positive reflector mode and a total of 500 spectra are acquired at each position at a laser frequency of 100 Hz. Although negative reflectron mode can also be used for specific class of peptides.
  6. The images are saved and reconstructed using FlexImaging 2.1.

---

## 4. Notes

### **4.1. Photocleavable Tagged Oligonucleotide**

The peptide is synthesized on Symphony (Protein Technologies Inc.) and purified on a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  100A column (Waters). The oligonucleotide is synthesized from 3' to 5' on Expedite (Applied BioSystems). The amine function with photocleavable linker is added in 5' before cleavage and deprotection. These steps are performed using a NH<sub>4</sub>OH 28% solution during 24 h in the dark. The amino oligonucleotide is then purified

on a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  300A column (Waters). The amino function of the oligonucleotide is coupled with a heterobifunctional reagent comprising a maleimido function. The maleimido oligonucleotide is solubilized in water and added to a 1.2 equivalent of peptide in solution. The mixture is stirred for 16 h.

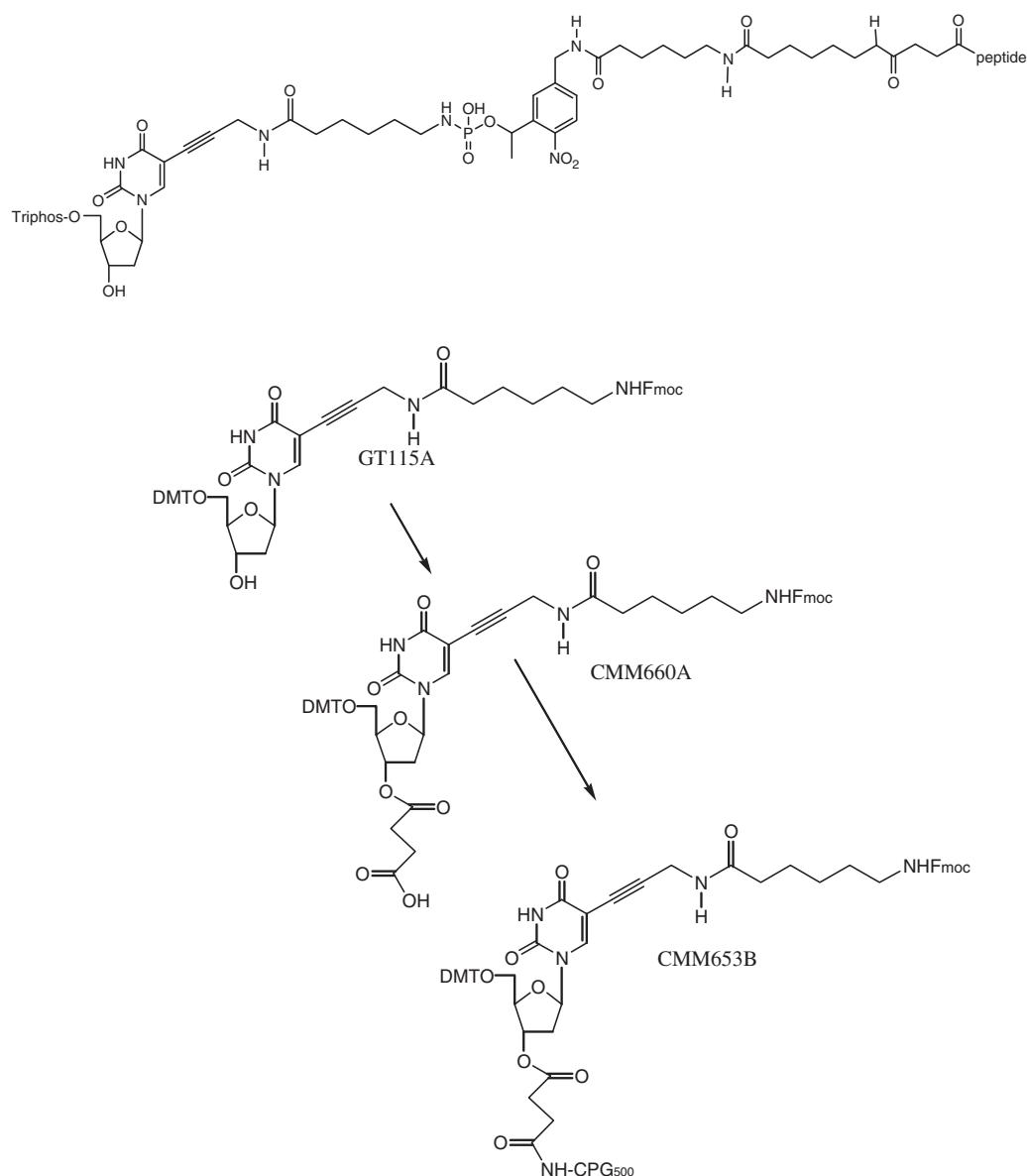
The oligo-peptide conjugate is then purified on a Delta-Pak C18 15  $\mu\text{m}$  300A column (Waters) and characterized by MALDI-MS (Voyager STR, Applied BioSystems).

#### **4.2. Photocleavable Tagged Antibody**

Peptides were custom made by Eurogentec S.A. using solid phase peptide synthesis (SPPS) on a 0.25 mmol (millimole) scale using Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-terminus protection) standard synthesis protocols (4 equivalents of Fmoc-AA) with double-coupling reactions (twice 40 min) using TBTU/NMM as activator on a Symphony (Rainin Instrument Co, Woburn, MA, USA) synthesizer. The photocleavable linker (4 equivalents) was introduced manually using DIPCDI/DIPEA (2 h) as activator. Purifications were performed by RP-HPLC on a Waters (Milford, MA, USA) Delta-Pak C18 (15  $\mu\text{m}$ -100A-25  $\times$  100 mm) column using a Waters liquid chromatography system consisting of Model 600 solvent delivery pump, a Rheodine injector, and a automated gradient controller (solvent A: H<sub>2</sub>O-0.125% TFA; solvent B: CH<sub>3</sub>CN-0.1% TFA, gradients: 5–15 to 30–60% B in 20 min). Detection was carried out using Model M2487 variable wavelength UV detector connected to the Waters Millennium software control unit. The Quality Control was performed by analytical RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 (5  $\mu\text{m}$ -100A-150  $\times$  3.9 mm) column (solvent A: H<sub>2</sub>O-0.125% TFA; solvent B: CH<sub>3</sub>CN-0.1% TFA, gradient: 100% A–60% B in 20 min) using a Waters Alliance 2690 Separation Module equipped with a Waters 996 Photodiode Array Detector and by MALDI-TOF MS (Voyager STR, Applied BioSystems).

The Functionalization with the photolinker derivatized peptide A was done as follow: a solution of 0.5 mg of MBS in 300  $\mu\text{l}$  of DMF is added to a solution of 4 mg of goat anti-rabbit IgG in 2 ml of PBS and mixed for 30 min. The solution is then desalted on a PD 10 column using 50 mM phosphate buffer at pH =6. To this desalted activated IgG, a solution of 1 mg of the photocleavable derivatized peptide in 300  $\mu\text{l}$  of DMF and 1 ml of PBS is added and stirred for 3 h at room temperature. Afterward, the reaction mixture is dialyzed overnight against PBS (membrane cut-off 12–14,000).

In order to prepare this triphosphate, a Fmoc-protected CPG resin was required. The succinylate was prepared from GT115A (100 mg) (Scheme 20.1). The sample was relatively pure but contained a small amount (by TLC) of a higher running non-tritylated compound (originates from the Sonogashira reaction



Scheme 20.1. Synthesis of a dUTP-peptide conjugates with a photocleavable linker (see text for details).

and does not interfere with subsequent reactions and was not visible in the NMR spectra of the sample). Since it was not possible to purify the succinate, the reaction was modified slightly. It is normal to add two equivalents of succinic anhydride to the reaction to get quantitative yield but if this is not removed completely, the amino residues of the cpG resin can become blocked during functionalization. Therefore, 1.5 equivalents were used since the exact purity of the product is undetermined. The reaction did not go to completion (from TLC this was more than 50%) by comparing the intensity of the components on the TLC by UV (254 nm) and the intensity of the DMT cation on treatment with HCl fumes. Since the non-succinylated product will not react, the resin was functionalized using this mixture. The resin was prepared but the loading is very low,  $5.4 \mu \text{mol g}^{-1}$  (180 mg).

The resin was detritylated using 2% TCA/DCM washed with DCM and the process repeated until no orange color due to the DMT cation was observed. This was then dried (suction under argon) and the resin soaked in pyr/DMF 1:3 (0.4 ml) for 5 min before a solution of 0.1 M Eckstein's reagent in dioxane was added (0.1 ml). The reaction was allowed to stand for 15 min after which time the resin was washed (dioxane, MeCN) and dried (suction under argon). The resin was then soaked in a solution on 0.5 M *bis*-(tributylammonium) pyrophosphate in anhydrous DMF and tri-*n*-butylamine for 20 min and the resin washed (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). The product was oxidized (iodine/water/pyridine/THF for 30 min), washed (MeCN), and dried (suction under argon). The Fmoc protecting group was removed (20% piperidine/DMF, 0.5 ml, 20 min) and the resin washed thoroughly (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). This was then washed with DCI and a solution of DCI/photolabile amino linker CEP (1:1, 0.5 ml) was added and the reaction was allowed to stand for 20 min. The solution was removed and the resin washed (MeCN) and dried (suction under argon). A mixture of cap A/cap B (1:1, 0.5 ml) was added and the resin soaked for 5 min before removing the capping reagents and washing and drying the resin as before. The product was oxidized ( $I_2$ /THF/pyr/ $H_2O$ , 5 min) and the resin washed and dried as before. This was cleaved from the resin with cNH<sub>4</sub>OH at room temperature for 30 min, then purified by anion exchange HPLC on a Dionex NucleoPac100 HPLC column using the following solvent system Buffer A:0.1 M NH<sub>4</sub>Cl with 10% acetonitrile; Buffer B: 1 M NH<sub>4</sub>Cl with 10% acetonitrile; flow rate 2.5 ml /min. using 6Triphos.mth. This gave three fractions (A:-7 min, B:-7.9 min, and C:-10.3 min). All three fractions were lyophilized overnight before being desalted by reverse phase HPLC Buffer A: Water; Buffer B: acetonitrile; flow rate 4 ml/min. The three fractions were again lyophilized overnight before being suspended in 200  $\mu$ l of water. MS showed that CMM661A pk 1 was definitely not the triphosphate but it could be either CMM661pk 2 or 3 (very similar MS profiles). (CMM662A was formed from CMM661A pk 2 and CMM663A was formed from CMM661A pk 3). Both samples were then used in the subsequent reaction. Bicarbonate buffer (10  $\mu$ l) and the maleimide NHS ester (50  $\mu$ l) were added to each sample and the reactions agitated overnight. The samples were diluted with milliQ water (500  $\mu$ l) and filtered. The samples were purified by RP-HPLC, buffer A: 0.1 M TEAA, buffer B: MeCN, flow rate 4 ml /min. using MeCN50.mth and the coupling of the peptide was carried out on these fractions.

The use of a cryopreservative solution containing polymer compounds such as a solution with an optimal cutting temperature (OCT) polymer should be restricted to the attachment of

the tissue to the sample holder and not for wholly embedded the tissue. Moreover, all parts of the cryostat in contact with the tissue need to be cleaned to prevent any contamination between two different samples or with a polymer contain solution. In the case of contact between the tissue and a polymer containing cryopreservative solution, MS spectra will be dominated by polymer signals.

## Acknowledgments

This study was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique (DPI), Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche, the Agence Nationale de la Recherche PCV (To IF)

## References

1. Caprioli, R. M. (2008) Perspectives on imaging mass spectrometry in biology and medicine. *Proteomics*, **8**, 3679–3680.
2. Cornett, D. S., Reyzer, M. L., Chaurand, P., Caprioli, R. M. (2007) MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems. *Nat Methods*, **4**, 828–833.
3. Franck, J., Arafah, K., Elayed, M., Bonnel, D., Vergara, D., Jacquet, A., Vinatier, D., Wisztorski, M., Day, R., Fournier, I., Salzet, M. (2009) MALDI imaging: state of the art technology in clinical proteomics. *Mol Cell Proteomics*, **8**, 2023–2033.
4. Murphy, R. C., Hankin, J. A., Barkley, R. M. (2009) Imaging of lipid species by MALDI mass spectrometry. *J Lipid Res*, **50** Suppl, S317–S322.
5. Grey, A. C., Chaurand, P., Caprioli, R. M., Schey, K. L. (2009) MALDI imaging mass spectrometry of integral membrane proteins from ocular lens and retinal tissue (dagger). *J Proteome Res*, **8**, 3278–3283.
6. Dekker, L. J., van Kampen, J. J., Reedijk, M. L., Burgers, P. C., Gruters, R. A., Osterhaus, A. D., Luider, 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.
7. Wolthuis, R., Travo, A., Nicolet, C., Neuville, A., Gaub, M. P., Guenot, D., Ly, E., Manfait, M., Jeannesson, P., Piot, O. (2008) IR spectral imaging for histopathological characterization of xenografted human colon carcinomas. *Anal Chem*, **80**, 8461–8469.
8. Wisztorski, M., Croix, D., Macagno, E., Fournier, I., Salzet, M. (2008) Molecular MALDI imaging: an emerging technology for neuroscience studies. *Dev Neurobiol*, **68**, 845–858.
9. Walch, A., Rauser, S., Deininger, S. O., Hofler, H. (2008) MALDI imaging mass spectrometry for direct tissue analysis: a new frontier for molecular histology. *Histochem Cell Biol*, **130**, 421–434.
10. Stauber, J., Lemaire, R., Franck, J., Bonnel, D., Croix, D., Day, R., Wisztorski, M., Fournier, I., 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.
11. Fournier, I., Wisztorski, M., Salzet, M. (2008) Tissue imaging using MALDI-MS: a new frontier of histopathology proteomics. *Expert Rev Proteomics*, **5**, 413–424.
12. Chaurand, P., Rahman, M. A., Hunt, T., Mobley, J. A., Gu, G., Latham, J. C., Caprioli, R. M., Kasper, S. (2008) Monitoring mouse prostate development by profiling and imaging mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, **7**, 411–423.
13. Burnum, K. E., Tranguch, S., Mi, D., Daikoku, T., Dey, S. K., Caprioli, R. M. (2008) Imaging mass spectrometry reveals unique protein profiles during

- embryo implantation. *Endocrinology*, **149**, 3274–3278.
14. 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. (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.
  15. Nordhoff, E., Kirpekar, F., Karas, M., Cramer, R., Hahner, S., Hillenkamp, F., Kristiansen, K., Roepstorff, P., Lezius, A. (1994) Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2460–2465.
  16. 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. (2007) Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res*, **6**, 2057–2067.
  17. Stauber, J., Lemaire, R., Wisztorski, M., Ait-Menguellet, S., Lucot, J.P., Vinatier, D., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudolf, I., Salzet, M., 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–S49.
  18. Thiery, G., Anselmi, E., Audebourg, A., Darii, E., Abarbri, M., Terris, B., Tabet, J., Gut, I. G. (2008) Improvements of TArgeted multiplex mass spectrometry imaging. *Proteomics*, **8**, 3725–3734.
  19. Thiery, G., Shchepinov, M. S., Southern, E. M., Audebourg, A., Audard, V., Terris, B., Gut, I. G. (2007) Multiplex target protein imaging in tissue sections by mass spectrometry-TAMSIM. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **21**, 823–829.
  20. Brunelle, A., Laprevote, O. (2009) Lipid imaging with cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, **393**, 31–35.
  21. Touboul, D., Halgand, F., Brunelle, A., Kersting, R., Tallarek, E., Hagenhoff, B., Laprevote, O. (2004) Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal Chem*, **76**, 1550–1559.
  22. Becker, J. S., Zoriy, M., Matusch, A., Wu, B., Salber, D., Palm, C. (2009) Bioimaging of metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Mass Spectrom Rev*, **29**, 156–175.
  23. Becker, J. S., Dobrowolska, J., Zoriy, M., Matusch, A. (2008) Imaging of uranium on rat brain sections using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: a new tool for the study of critical substructures affined to heavy metals in tissues. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **22**, 2768–2772.
  24. Becker, J. S., Zoriy, M. V., Dobrowolska, J., Matucsh, A. (2007) Imaging mass spectrometry in biological tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*, **13**, 1–6.

# Chapter 19

## On Tissue Protein Identification Improvement by N-Terminal Peptide Derivatization

**Julien Franck, Mohamed El Ayed, Maxence Wisztorski,  
Michel Salzet, and Isabelle Fournier**

### Abstract

Identification of potential markers of a physiological stage (e.g., pathology) discovered using MALDI-MSI is an important step in the understanding of signaling pathways or for providing sets of diagnosis and prognosis markers for clinical applications. Classically, identification can be achieved by extraction from a piece of tissue and proteomics strategies. However, this induces loss of information especially for low-abundance proteins or proteins localized to a specific region of the tissue. In this respect, identification directly at the tissue level is an attractive alternative. Because the molecular charge states in MALDI are low, on tissue identification is possible using bottom-up MALDI-MSI strategies. Enzymatic digestion using an enzyme such as trypsin can be performed at the micro-scale level to generate peptide collections while avoiding these peptides to be delocalized. It is, therefore, possible to image proteins through the molecular images of their digested peptides. These peptides can also be used to retrieve information on protein sequences by performing MS/MS, although databank interrogation or de novo sequencing using MS/MS spectra does not always lead to a successful or confident identification because on tissue complexities render PMF data problematic. Identification can be improved by increasing MS/MS spectra quality and simplifying their interpretation. This can be achieved by derivatization of peptides. In fact, derivatization of peptides leads to increases in fragmentation yields and orients fragmentations toward a specific series of fragment ions. In this respect, N-terminal chemical derivatization has proven to be particularly efficient. N-terminal chemical derivatization of tryptic peptides has been developed to be performed at the tissue level after on tissue digestion. Specific focus is given to 4-sulfophenyl isothiocyanate (4-SPITC), 3-sulfobenzoic acid NHS ester (3-SBASE), and (*N*-succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) derivatizations. This provides a complete strategy for protein identification in a bottom-up MALDI-MSI approach and opens the way for novel biomarker identification.

**Key words:** Mass spectrometry imaging, de novo sequencing, derivatization, protein identification.

---

## 1. Introduction

MALDI-MSI has shown potential in the field of proteomics to study the distribution of proteins within tissue sections. Specifically, MALDI-MSI can be used to follow protein markers along physiological stages in order to provide information on signaling pathways. In some cases, MALDI-MSI is used to study the distribution of known proteins at different physiological stages. But often, MALDI-MSI leads to the discovery of molecular weight protein markers. In such cases, protein identification remains to be performed. Protein identification can be performed by classical proteomic strategies after extraction from the remaining tissue piece. However, the most straightforward strategy is to perform protein identification directly from the tissue section itself. As for classical proteomics, two approaches may be considered, namely “top-down” and “bottom-up” approaches. Top-down at the level of the tissue section is clearly the most direct way to protein identification since identification is performed directly by fragmentation into the gas phase of the intact molecule ions. Unfortunately, MALDI generates low charge stages, which make it not well-suited for most of the analyzers or ion activation methods. Therefore, MALDI-MSI “bottom-up” strategies were needed. Such strategies are less direct and require the optimization of enzymatic digestion at the tissue level (Fig. 19.1). On tissue digestions can be performed while maintaining localization of digested proteins using micro-spotting of the enzyme. A collection of digestion peptides are generated and protein localization can therefore be obtained indirectly by imaging digestion peptides.  $[M+H]^+$  peptide ions are then available for structural elucidation via MS/MS using classical activation methods such as collision-induced dissociation (CID) or infrared multiphoton dissociation (IRMPD) or metastable decay. On tissue MS/MS performed after on tissue digestion is accessible although it must be noted that fragmentation yields appear lower when working on tissue sections. This could be explained by a lower internal energy of the parent ion by a higher relaxation of energy during the desorption process itself. This is especially true for MALDI-TOF systems that often lead to weak fragmentation especially in the higher  $m/z$  range of the MS/MS spectrum and also leads to different series of fragments creating incomplete sets of series only giving access to small sequence tags. Peptide sequencing can be difficult to establish owing to the multitude of fragment ions generated during MS/MS experiments, like immonium ions (1), internal fragments, N-terminal ions (2, 3), or C-terminal ions (4).

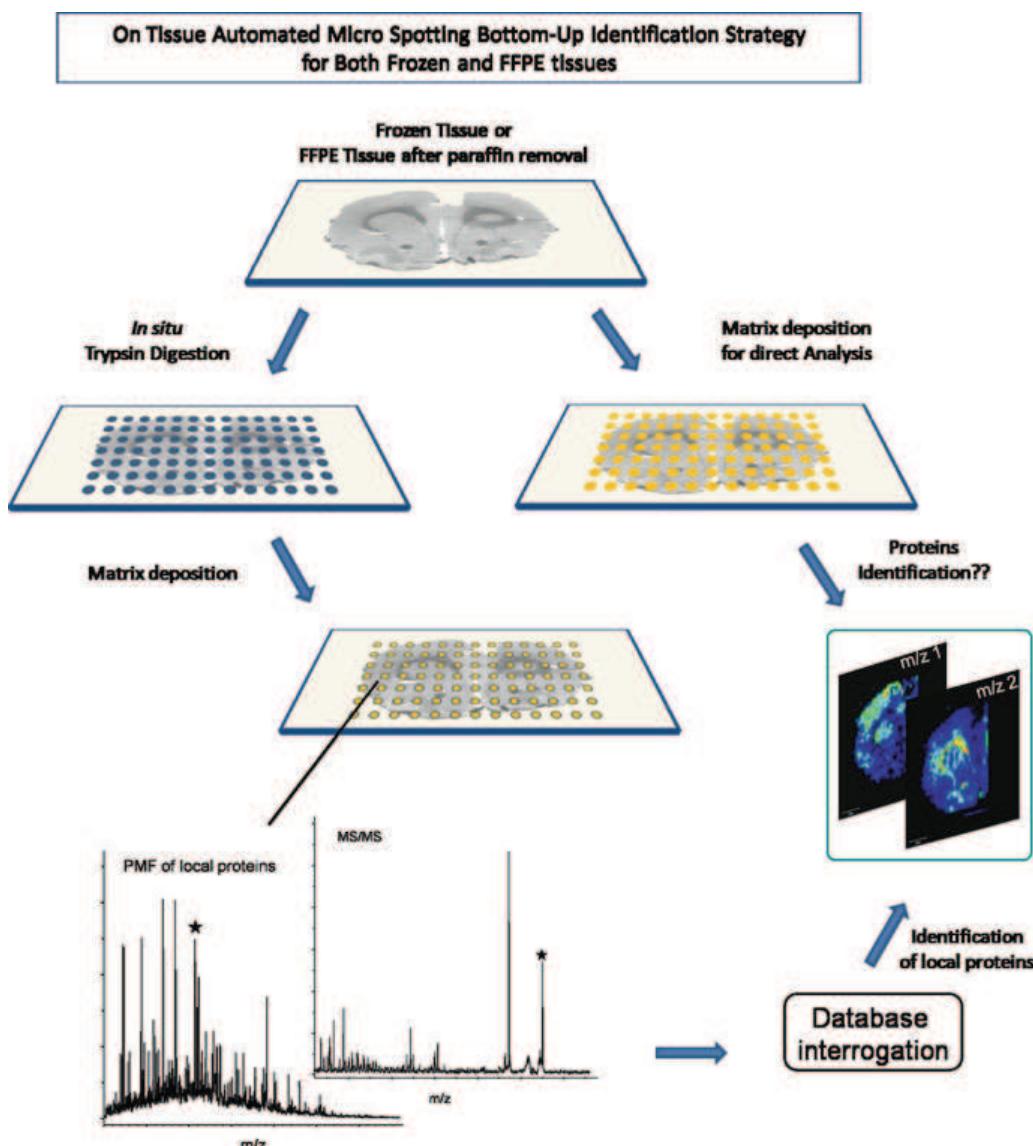


Fig. 19.1. Schematic workflow of MALDI-MSI “bottom-up” strategy used to perform protein identification.

Under classical identification strategies efforts were given to simplify data interpretation by increasing fragmentation ion yield and orienting fragmentations toward a specific series of fragment ions. In this respect, derivatization at the C- or N-terminal part of peptides by addition of positive or negative charges has proved to be an efficient strategy (5), especially for post-source decay (PSD) spectra. In general N-terminal modifications are easier to achieve because of the primary amine reactivity and have proved to be more efficient for fragmentations. Sulfonation at the N-terminal part of peptides seems especially advantageous when working on tryptic digestion peptides that are naturally positive at their C-termini. Keough and coworkers have shown a possible orientation of fragmentations toward the  $\text{y}^+$  series of fragment ions by addition of chlorosulfonylactetyl chloride (6, 7).

or 2-sulfobenzoic acid cyclic anhydride (8) at the N-terminal side of peptides. Fragmentation orientation greatly eases MS/MS spectra interpretation allowing for de novo sequencing to be performed (9). This method was later on improved by using 3-sulfopropionic acid NHS ester as derivatization agents (10) to allow the reaction to be performed in aqueous phase. Alternatively, derivatization for liquid chromatography (11) and quantification with isotope coded (12) were proposed using derivative agents such as 4-sulfophenyl isothiocyanate (13–15). Such derivatizations are fast and easy, showing good reaction yields, although they often lead (according to the peptide sequence) to the loss of the derivative group as one of the fragmentation pathway lowering the benefits of derivatization. More recently, another water-compatible reagent, the 3-sulfobenzoic acid NHS ester, was introduced (16). This sulfonation agent has the advantage not to lead to the loss of the derivative group consecutively resulting in the observation of a complete and unique  $y$  ion series. Alternatively, addition of a positively charged group at the N-terminal part of peptides using (*N*-succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) was successfully used for fragmentation orientation (17). This derivatization has the advantage of being independent of the presence and/or position of basic amino acids (mainly arginine) in the peptide chain and leads to an orientation toward  $a_i^+$  fragment ion series with the presence of a few  $b_i^+$ ,  $c_i^+$ , and  $d_i^+$  ions. TMPP is useful for peptide identification in bottom-up strategies.

Because MS/MS data interpretation from tissue sections is particularly complex, development of peptide derivatization is a good alternative to help protein identification. In fact, on tissue digestion leads to numerous digestion peptides that are not all belonging to the same protein and not separated. In this context, peptide mass fingerprint data interrogation is useless and only MS/MS data interrogation is used. This can render the identification difficult if MS/MS spectra do not contain enough information. Thereof, providing higher quality MS/MS spectra is important for easier and more confident identification of proteins from the tissue sections. Because derivatization of peptides increases fragmentation yields and above all channel fragmentation to specific pathways, protein identification is improved with MS/MS from on tissue experiments.

We describe here on tissue N-terminal chemical derivatization of peptides performed after on tissue enzymatic digestion. Since N-terminal derivatization has proven to be more efficient than the corresponding C-terminal reactions in solution, focus has been given to N-terminal chemical derivatizations. More specifically, among the tested derivatization approaches,

three derivatization protocols appear more compatible and efficient when performed at the tissue level, namely 4-sulfophenyl isothiocyanate (4-SPITC), 3-sulfobenzoic acid NHS ester (3-SBASE), and (*N*-Succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) (18). These derivatives promote efficient charge-site-initiated cleavage of backbone amide bonds enabling selective detection of only a single series of fragment ions that contain either the original C-terminus of the peptide ( $y_i^+$  ions) for 4-SPITC and 3-SBASE or the N-terminus of the peptide (TMPP). All three derivatization reagents have been shown to ease identification by databank interrogation (increase in the identification scores) and with de novo sequencing. Often peptide sequences can also be manually obtained if desired. We also notice that TMPP derivatization is a bit easier to perform at a micro-scale level using a robot than 4-SPITC and 3-SBASE mainly because the room temperature reactions for TMPP enable molecular images to be performed after the derivatization step. However, molecular images after on tissue derivatization are rarely required, which makes all three derivatization approaches available for identification. We describe here procedures for on tissue digestion using trypsin as well as N-terminal chemical derivatization using 4-SPITC, 3-SBASE, and TMPP. For 4-SPITC and 3-SBASE global on tissue derivatization protocols are given whereas micro-spotted derivatization protocol is provided for TMPP.

---

## 2. Materials

### 2.1. Preparation of Frozen Tissue Section

1. Optimal cutting temperature polymer, OCT.
2. Indium tin oxide (ITO)-coated glass slides or other holders compatible with mass spectrometry.
3. A cryomicrotome, Leica CM150S (Leica Microsystems, Nanterre, France).
4. Ethanol 75% ( $-20^\circ\text{C}$ ): 75 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and HPLC-grade water to 100 ml. Prepare fresh and store at  $-20^\circ\text{C}$ .
5. Ethanol 95% ( $-20^\circ\text{C}$ ): 95 ml of absolute ethanol ( $\geq 99.8\%$ ) and HPLC-grade water to 100 ml. Prepare fresh and store at  $-20^\circ\text{C}$ .
6. Chloroform ( $-20^\circ\text{C}$ ): 100 ml of chloroform ( $\geq 99.9\%$ ). Store at  $-20^\circ\text{C}$ . Chloroform is harmful by inhalation, so work in the hood.

## 2.2. In Situ Enzymatic Digestion

### 2.2.1. Using Micropipette

1. Trypsin, sequencing grade modified (Promega, Charbonnieres, France). Suspend in 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer at 40 µg/ml (*see Note 1*).
2. Methanol 50%: 50 ml of absolute methanol completed with water up to 100 ml. Prepare fresh. Methanol is toxic, so work in the hood.

### 2.2.2. Using a Microspotter

1. Trypsin, sequencing grade modified (Promega, Charbonnieres, France). Suspend in 20 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer at 40 µg/ml (*see Note 1*).
2. Methanol 50%: 50 ml of absolute methanol completed with water up to 100 ml. Prepare fresh. Methanol is toxic, so work in the hood.
3. Chemical Inkjet Printer CHIP-1000 (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan).

## 2.3. In Situ N-Terminal Derivatization

### 2.3.1. Synthesis of 3-Sulfobenzoic Acid Succinimidyl Ester (3-SBASE)

1. DMSO: 10 ml of dimethylsulfoxide.
2. 3-SBA: 1 g of 3-sulfobenzoic acid, purity: 98%. 3-SBA is irritating to the respiratory system, so work in the hood.
3. DCC: 1.38 g of *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, purity 99%. DCC is toxic, so work in the hood.
4. NHS: 770 mg of *N*-hydroxysuccinimide, purity 98%.
5. Cold acetone: 60 ml of acetone ( $\geq 99.9\%$ ), store at 4°C. Vapors may cause drowsiness and dizziness, so work in the hood.

### 2.3.2. On Tissue N-Terminal Derivatization with 4-SPITC

1. 20 mg/ml 4-SPITC in pure water.
2. 50% methanol: 50 ml of absolute methanol completed with water up to 100 ml. Prepare fresh. Methanol is toxic, so work in the hood.

### 2.3.3. On Tissue N-Terminal Derivatization with 3-SBASE

1. 20 mg/ml 3-SBASE in pure water.
2. 50% methanol: 50 ml of absolute methanol completed with water up to 100 ml. Prepare fresh. Methanol is toxic, so work in the hood.

### 2.3.4. On Tissue N-Terminal Derivatization with TMPP

1. TMPP: 1 mg/ml (*N*-succinimidoxycarbonylmethyl)tris (2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide, puriss. p.a., for protein sequence analysis (by MALDI-MS),  $\geq 98.5\%$  in acetonitrile/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v).
2. Solution of acetonitrile/H<sub>2</sub>O/TEA (triethylamine) (30:69:1, v/v/v). Prepare fresh (*see Note 2*).
3. Chemical Inkjet Printer CHIP-1000 (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan).

## **2.4. Matrix Deposition for Peptide Analysis**

### *2.4.1. Using a Micropipette*

### *2.4.2. Using a Microspotter*

HCCA/ANI solution: 1.5 equivalents of aniline (ANI) were added to a solution containing 20 mg/ml of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in acetonitrile/aqueous 0.1% TFA (6:4, v/v) (*see Note 3*). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.

1. HCCA/ANI solution: 1.5 equivalents of aniline (ANI) were added to a solution containing 20 mg/ml of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) in acetonitrile/aqueous 0.1% TFA (6:4, v/v) (*see Note 3*). Aniline and TFA are toxic, so work in the hood.

2. Chemical Inkjet Printer CHIP-1000 (Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan).

1. Peptide calibration standard II (Bruker Daltonics, Wissembourg, France): angiotensin II, angiotensin I, substance P, bombesin, ACTH clip 1–17, ACTH clip 18–39, somatostatin 28, bradykinin fragment 1–7, renin substrate tetrapeptide porcine. Covered mass range: ~700–3,200 Da. Store at –20°C.

2. Ultraflex II TOF–TOF equipped with a Smartbeam laser and all the Flex software suite (FlexControl, FlexAnalysis, and FlexImaging) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

### *2.5.1. MALDI-MSI Experiment*

1. Ultraflex II TOF–TOF equipped with a Smartbeam laser and all the Flex software suite (FlexControl, FlexAnalysis, and FlexImaging) (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

2. Biotools (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

---

## **3. Methods**

In situ enzymatic digestion creates a library of peptides from the proteins present at that spot. These peptides can be fragmented using MS/MS; using this peptide fragmentation data and the appropriate database, the peptide can be identified. Using this information, the corresponding protein from which it came can be identified at the tissue level. This strategy can be performed at the scale of an entire tissue section, manually using micropipette deposition providing a fast and sensitive detection of peptides generated from protein digestion. However, this strategy does not provide information on the spatial distribution of the proteins in the tissue. Derivatization can also be performed at the micro-scale level and can be used to prevent migration/delocalization of compounds within the tissue, via an automatic device system such as automatic micro-spotting. Here, a protocol is described

for the automatic piezoelectric micro-spotting using the CHIP-1000 system. The micro-spotting device allows the deposition of the different reagents including trypsin and matrix solutions at the surface of the whole tissue sections or at a predefined location. Using this strategy of defined deposition, protein and peptides are not delocalized, thus providing the opportunity for imaging peptides after the derivatization step.

**Figure 19.1** presents the global workflow for on tissue protein identification in a bottom-up strategy including chemical derivatization at a micro-scale level. The peptides that are characterized can be submitted to databank interrogation after MS/MS experiments to retrieve the protein identification. However, databank identification is not always successful nor does it provide highly confident assignments. To improve protein identification, N-terminal derivatization is used to facilitate peptide fragmentations toward a specific series of fragment ions. It is thereof possible to increase the information content of the resulting MS/MS spectra. 4-SPITC and 3-SBASE derivatizations use sulfonic acid reagents and provide complete  $y_i^+$  series of ions for a peptide, ideally without missing cleavages. We notice that for 4-SPITC, loss of the 4-SPITC group is often observed as one fragmentation pathway in the MS/MS spectra, and this can slightly reduce the resulting MS/MS spectral quality. In addition, spots (i.e., missing cleavages) in the  $y_i^+$  series will be observed if a basic amino acid is present in the peptide sequence. For these reasons, care must be taken with on tissue enzymatic digestion. Because of the higher optimum reaction temperatures (35–60°C), 4-SPTIC and 3-SBASE are a bit more difficult to use than TMPP for micro-spotting.

**Figure 19.2** shows an example of 3-SBASE derivatization obtained from a rat brain tissue section. After interrogation of the database with a search algorithm like MASCOT, the score achieved is at least twofold better than the score obtained for the unmodified peptides as shown in **Table 19.1**. **Figure 19.3** presents TMPP derivatizations used in this micro-spotting strategy. Using MS/MS, the derivatized peptides provide an abundant series of  $a^+$  ions. As shown in **Fig. 19.3**, this reagent is easily compatible with MALDI imaging.

### **3.1. Preparation of Frozen Tissue Section**

1. 10- $\mu$ m thick tissue sections are obtained from snap-frozen tissue using a cryomicrotome at –20°C. The tissue is placed in the cryomicrotome ~15 min prior to sectioning. If the tissue temperature is too low, tissue sections can pleat and crack. If the temperature is too high, tissue sections will roll up.
2. The tissue sections are then applied onto ITO-coated conductive glass slides and placed in a desiccator under vacuum for a minimum of 30 min to dry out the tissue sections.

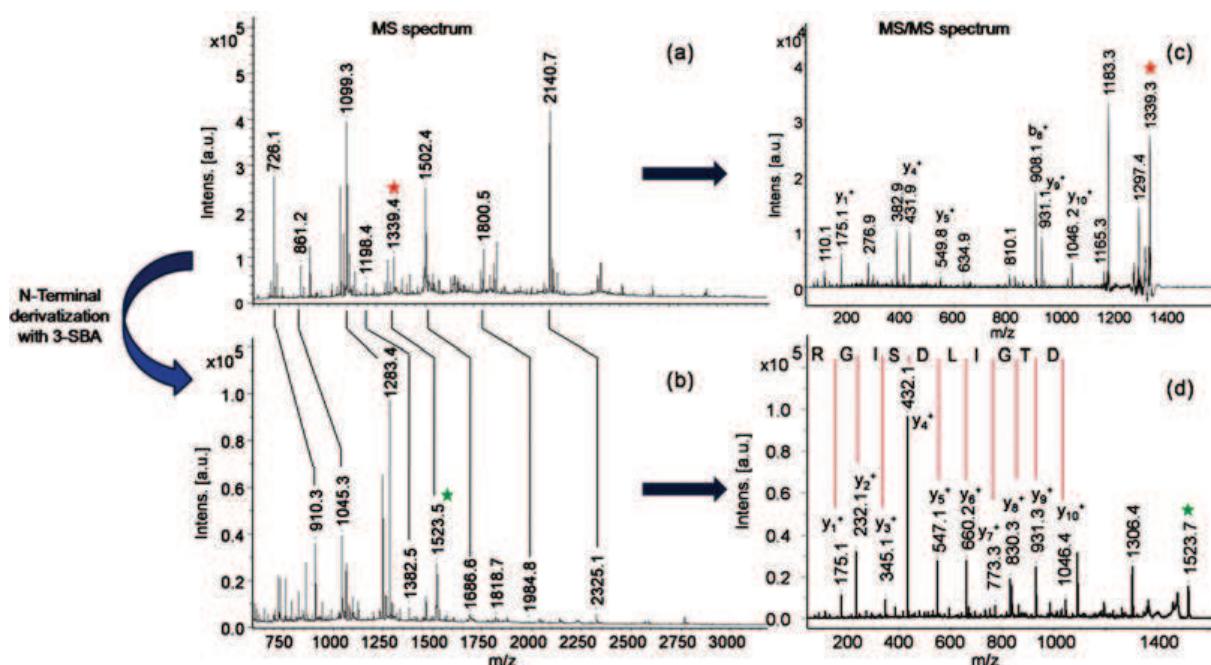


Fig. 19.2. (a–b) MALDI-MS spectra recorded on a rat brain tissue section after on tissue trypsin digestion (a) and on a tissue with trypsin digestion followed by derivatization with 3-SBA (b). (c–d) MALDI-MS/MS spectra of one of the peptides generated from digest ( $m/z$  1,339.3) (c) and the same peptide after derivatization with 3-SBA ( $m/z$  1,523.7) (d).

3. The tissue is fixed. The slide is immersed softly in an ice-cold 75% ethanol bath for 30 s and dried in the vacuum desiccator. After complete drying, the sample is dipped into cold 95% ethanol for 30 s and then dried completely with the vacuum desiccator. This important step removes salts contained in the tissue and prevents sample degradation by dehydration.
4. The lipids are removed. The sample is washed by immersion of the tissue section in a chloroform bath for 30 s to remove abundant phospholipids; these lipids lead to highly abundant signals in the 500–1,500 mass range hampering the observation of peptide signals, generating ionization suppression effects and poor matrix crystallization efficiency (see Note 4).

### 3.2. In Situ Enzymatic Digestion

#### 3.2.1. Using a Micropipette

1. Use a tissue section after washing step (step 4 of 3.1). Whole tissue section is covered by the solution of trypsin using a micropipette.  $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  is used (according to the tissue section size).
2. Tissue sections are then incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  in an atmosphere saturated with MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v).
3. The slide is placed in the vacuum desiccator to completely dry out the tissue prior to matrix deposition.

#### 3.2.2. Using a Microspotter

1. Microspotter like the chemical Inkjet Printer, CHIP-1000, can be used. CHIP-1000 is a piezoelectric solvent delivery

**Table 19.1**  
**Comparison of identification scores as found from MASCOT interrogation using Swiss-Prot database and *R. norvegicus* taxonomy for four peptides before and after automated derivatization with 3-SBASE**

	<i>m/z</i> observed	<i>m/z</i> expected	Ion score	Rank	Delta	Expect	Sequence
Peptide	643.35	642.32	NI	NI	NI	NI	RPSQR myelin basic protein
Peptide + derivati- zation (3- SBASE)	827.9		46	1	-0.0314	0.0064	
Peptide	726.23	725.22	28	2	-0.1765	0.044	HGFLPR myelin basic protein
Peptide + derivati- zation (3- SBASE)	910.1		30	1	-0.3046	0.029	
Peptide	1,339.24	1,339.71	42	1	-0.4706	0.0015	HRDTGILDS IGR myelin basic protein
Peptide + derivati- zation (3- SBASE)	1,523.7		93	1	-0.277	$9.6 \times 10^{-19}$	
Peptide	1,701.92	1,701.91	57		0.0162	$6.2 \times 10^{-5}$	AVFVDLEPTV IDEVR tubulin alpha-1A chain
Peptide + derivati- zation (3- SBASE)			142		-0.0058	$1.1 \times 10^{-12}$	

system, able to deliver picoliter volumes of reagents at defined locations of a surface. The instrument is equipped with an onboard scanning device for imaging the area of interest and thus precisely define and select the print location. An array of micro-spots covering a specific area or the entire tissue section can be defined. Spots of 150 µm in diameter are generated. Micro-spots are spaced by 250 µm.

2. The slide is then loaded in the microspotter and scanned to precisely define the array to be printed with trypsin enzyme. Selection of the whole tissue section, one location, or several locations is possible.

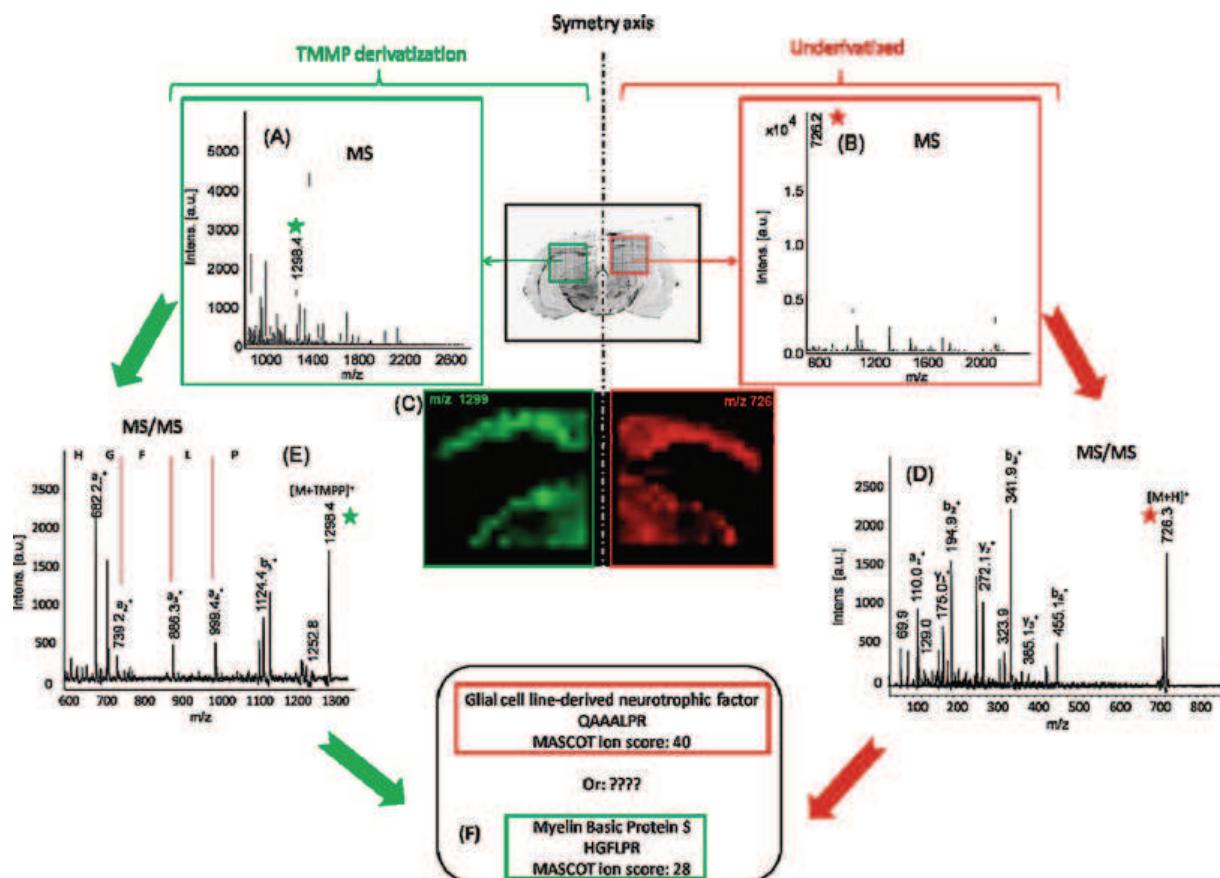


Fig. 19.3. (a–b) MALDI-MS spectra recorded after (a) enzymatic digestion followed by TMPP derivatization and (b) enzymatic digestion. (c) Images of the digestion peptide at  $m/z$  726 and its corresponding TMPP derivative at  $m/z$  1,299 showing an identical distribution for both ions. (d–e) MALDI-MS/MS spectra recorded from a rat brain tissue section in the same area after (d) on tissue trypsin digestion (e) and on tissue trypsin digestion followed by TMPP derivatization. (f) Identification results from the databank using *Rattus norvegicus* taxonomy.

3. A total of 20 nl of trypsin solution is applied on each spot. This is obtained by dropping off five droplets of approximately 100 pl of solution at each spot per cycle. 40 iterations are thus necessary to obtain the final volume.
4. Tissue sections are then incubated at 37°C for 2 h in a MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) saturated atmosphere.
5. After incubation, the slide is placed in the vacuum desiccator for complete drying of the tissue section prior to matrix deposition.

### 3.3. In Situ N-Terminal Derivatization

#### 3.3.1. On Tissue N-Terminal Derivatization with 4-SPITC

1. Whole tissue trypsin digestions are performed by applying 10  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> (according to the tissue section size) of trypsin solution using a micropipette at the surface of the section.
2. Tissue sections are then incubated for 2 h at 37°C in MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) saturated atmosphere.
3. The slide is placed in the vacuum desiccator to let the tissue dry completely prior to 4-SPITC deposition.

4. Manual derivatization is performed by applying the solution of 4-SPITC in pure water. In fact, no buffer is required since  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  is still present on the tissue after trypsin deposition (*see step 1*). Volume of solution is adjusted according to the size of the tissue section or the size of the area to be studied within a tissue section ( $\sim 10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ).
5. Tissue sections are then incubated for 1 h at  $55^\circ\text{C}$  in  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) saturated atmosphere.
6. *Optional step:* The tissue can be washed with cold 95% EtOH for 20 s to remove salts from buffer solutions to avoid signal loss due to poor ionization of derivate peptides. This procedure must be performed carefully to avoid peptide losses. Thus, washing steps in cold 95% EtOH must not exceed 20 s.
7. Place the slide in the vacuum desiccator for complete drying prior to matrix deposition.

### 3.3.2. Synthesis of 3-Sulfobenzoic Acid Succinimidyl Ester (3-SBASE)

1. 1.0 g of 3-SBA is completely dissolved in 10 ml of DMSO.
2. 1.5 molar excess of NHS is then added to the solution up to complete dissolution.
3. 1.5 molar excess of DCC is then added to the solution up to complete dissolution.
4. The mixture is stirred overnight at room temperature.
5. The precipitated dicyclohexylurea (DCU), a side product of the reaction, is filtered and discarded.
6. After filtration, 60 ml of cold acetone ( $4^\circ\text{C}$ ) is slowly added to precipitate 3-SBASE.
7. The product is then washed four times with cold acetone and dried under vacuum.

### 3.3.3. On Tissue N-Terminal Derivatization with 3-SBASE

1. Whole tissue trypsin digestions are performed by applying  $10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$  (according to the tissue section size) of trypsin solution using a micropipette at the surface of the section.
2. Tissue sections are then incubated for 2 h at  $37^\circ\text{C}$  in  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) saturated atmosphere.
3. The slide is placed in the vacuum desiccator to let the tissue dry completely prior to 3-SBASE deposition.
4. Manual derivatization is performed by applying the solution of 3-SBASE in pure water. In fact, no buffer is required since  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  is still present on the tissue after trypsin deposition (*see step 1*). Volume of solution is adjusted according to the size of the tissue section or the size of the area to be studied within a tissue section ( $\sim 10 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ ).
5. Tissue sections are then incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$  in  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (1:1, v/v) saturated atmosphere.

6. *Optional step:* The tissue can be washed with cold 95% EtOH for 20 s to remove salts from buffer solutions to avoid signal loss due to poor ionization of derivate peptides. This procedure must be performed carefully to avoid peptide losses. Thus, washing steps in cold 95% EtOH must not exceed 20 s.
7. Place the slide in the vacuum desiccator for complete drying prior to matrix deposition.

### *3.3.4. On Tissue N-Terminal Derivatization with TMPP*

1. TMPP is deposited by micro-spotting using the piezoelectric device (CHIP-1000). The derivatization must follow the same array as the trypsin one. For trypsin digestion follow the procedure . The automated micro-spotting is performed either following the global scheme of the array or by dividing the total array into smaller areas of  $10 \times 10$  spots which will each be printed one after the other to increase the yield of the derivatization reaction.
2. 10 nl of a solution of TMPP is applied at each spot. Five droplets of approximately 100 pl are deposited at each spot per cycle. 20 iterations are thus necessary to obtain the final volume on each spot.
3. 20 nl of a solution of ACN/H<sub>2</sub>O/TEA is then spotted allowing reaction of derivatization and preventing the use of buffers like NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> which could induce poor ionization of derivate peptides (*see Note 2*). Five droplets of approximately 100 pl are deposited at each spot per cycle. 40 iterations are thus necessary to obtain the final volume on each spot.
4. The slide is then placed in the vacuum desiccator for complete drying of the tissue section prior to matrix deposition.

## **3.4. Matrix Deposition for Peptide Analyses**

### *3.4.1. Using a Micropipette*

1. Whole tissue matrix deposition is performed by applying a solution of HCCA/ANI using a micropipette (~10–20  $\mu$ l according to the surface to cover). Careful attention must be drawn on this step to avoid touching the tissue with the micropipette tip and not induce tissue damages.
2. Check matrix coverage using an optical microscope (*see Note 5*).
3. Perform a rapid MS analysis of one spot to check that a sufficient amount of matrix is deposited.

### *3.4.2. Using a Microspotter*

1. On each defined spot, 20 nl of HCCA/ANI solution is applied. Five droplets of 100 pl are deposited at each spot per cycle, then 20 iterations are necessary to obtain the total volume.
2. Check matrix coverage using an optical microscope (*see Note 5*).

3. A rapid MS analysis at one spot is recommended to check through signal intensity that a sufficient amount of matrix has been deposited. Increasing the number of iterations may improve MSI when signal intensity seems too low but too much matrix may decrease *S/N* ratio by increasing the background noise and decreasing ionization.

### **3.5. Mass Spectrometry Analysis**

#### *3.5.1. MALDI-MSI Experiments*

1. 0.5  $\mu$ l of calibration solution is applied near the tissue section and mixed with 0.5  $\mu$ l of HCCA/ANI matrix solution.
2. The mass spectrometer is calibrated with the calibration spot.
3. Using FlexImaging and after defining teach points, an area of interest is selected on the tissue section.
4. The distance between each measurement point is set. Distance between measurement points is dependent on the method used for matrix deposition. For piezoelectric deposition, spots are generally spaced by 250  $\mu$ m center to center. If required, the same array used for matrix deposition can be used for acquisition. Due to the size of the spot it is also possible to accumulate spectra at different positions within one spot.
5. In FlexControl, the method for peptide analysis involves using positive reflectron mode and a total of 500 spectra acquired at each position at a laser frequency of 100 Hz.
6. Images are saved and reconstructed using FlexImaging 2.1.

#### *3.5.2. MS/MS Analysis*

1. Ultraflex II TOF–TOF is equipped with LIFT III cell. For each MS/MS spectrum, 5,000 total shots are averaged including 1,000 shots for the parent ion and 4,000 for fragments.
2. Peptides are identified by searching MS/MS spectra against an appropriate database using Biotools software for MAS-COT (Matrix Science) interrogation. For MALDI data, peptide mass tolerance is set at 0.5 Da and MS/MS tolerance at 1 Da. Oxidation of methionine is selected as variable modification.
3. When a peptide is identified as a digest fragment of a protein, the total sequence of this protein is used for *in silico* digestion and other digest fragments of this protein are searched in the total spectrum. MS/MS fragmentation is performed to confirm the identification of the proteins based on these fragments.
4. Using FlexImaging, digestion peptide distribution within the tissue is generated to check that all fragments of the same protein really provide the same localization.

#### 4. Notes

1. In some cases, the trypsin can be suspended in various solutions. For example, trypsin in water can be used for frozen sections for which the pH at the tissue surface is close to the optimal pH value required for enzyme efficiency. Mix of water:methanol (1:1, v/v) can also be used with trypsin to achieve better extraction and permit a better access of cleavage sites to the enzyme. Use of water or water/methanol is recommended when using CHIP-1000 device for easier stabilization of droplets ejection.
2. For TMPP derivatization, instead of using a solution containing ACN/H<sub>2</sub>O/TEA (30/69/1), a solution of ACN/NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH=10) (3:7, v/v) can be used, but poor ionization of derivatized peptides can be observed due to the presence of salts.
3. Prior to deposition, 2 µl of matrix solution could be deposited with a micropipette on a classical MALDI sample plate to check the crystallization. Crystallization is expected to be uniform, with long and fine white crystals as shown by Lemaire et al. (*see* Table 2a in ref. (19)).
4. Other organic solvents could be used to perform this step. More information can be obtained in ref. (20, 21). You must be careful not to increase the number of washing steps to avoid delocalization of the peptides.
5. To check matrix coverage, you need to ensure that the crystallization is dense, uniform, and composed of small crystals.

#### References

1. Ambihapathy, K., Yalcin, T., Leung, H. W., Harrison, A. G. (1997) Pathways to immonium ions in the fragmentation of protonated peptides. *J Mass Spectrom.*, **32**, 209–215.
2. Kaufmann, R., Kirsch, D., Spengler, B. (1994) Sequencing of Peptides in a time-of-flight mass spectrometer – evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser-desorption ionization (MALDI). *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, **131**, 355–385.
3. Yalcin, T., Csizmadia, I. G., Peterson, M. R., Harrison, A. G. (1996) The structure and fragmentation of B-n ( $n >= 3$ ) ions in peptide spectra. *J Am Soc Mass Spectrom.*, **7**, 233–242.
4. Biemann, K. (1990) Sequencing of peptides by tandem mass spectrometry and high-energy collision-induced dissociation. *Methods Enzymol.*, **193**, 455–479.
5. Roth, K. D., Huang, Z. H., Sadagopan, N., Watson, J. T. (1998) Charge derivatization of peptides for analysis by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.*, **17**, 255–274.
6. Keough, T., Youngquist, R. S., Lacey, M. P. (1999) A method for high-sensitivity peptide sequencing using postsource decay matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7131–7136.
7. Keough, T., Lacey, M. P., Youngquist, R. S. (2000) Derivatization procedures to facilitate de novo sequencing of lysine-terminated tryptic peptides using postsource decay matrix-assisted laser desorption/ionization

- mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **14**, 2348–2356.
- 8. Samyn, B., Debysen, G., Sergeant, K., Devreese, B., Van Beeumen, J. (2004) A case study of de novo sequence analysis of N-sulfonated peptides by MALDI TOF/TOF mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, **15**, 1838–1852.
  - 9. Keough, T., Youngquist, R. S., Lacey, M. P. (2003) Sulfonic acid derivatives for peptide sequencing by MALDI MS. *Anal Chem*, **75**, 156A–165A.
  - 10. Keough, T., Lacey, M. P., Strife, R. J. (2001) Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization ion trap mass spectrometry of sulfonic acid derivatized tryptic peptides. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **15**, 2227–2239.
  - 11. Lee, Y. H., Kim, M. S., Choie, W. S., Min, H. K., Lee, S. W. (2004) Highly informative proteome analysis by combining improved N-terminal sulfonation for de novo peptide sequencing and online capillary reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Proteomics*, **4**, 1684–1694.
  - 12. Lee, Y. H., Han, H., Chang, S. B., Lee, S. W. (2004) Isotope-coded N-terminal sulfonation of peptides allows quantitative proteomic analysis with increased de novo peptide sequencing capability. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**, 3019–3027.
  - 13. Gevaert, K., Demol, H., Martens, L., Hoorelbeke, B., Puype, M., Goethals, M., Van Damme, J., De Boeck, S., Vandekerckhove, J. (2001) Protein identification based on matrix assisted laser desorption/ionization-post source decay-mass spectrometry. *Electrophoresis*, **22**, 1645–1651.
  - 14. Marekov, L. N., Steinert, P. M. (2003) Charge derivatization by 4-sulfophenyl isothiocyanate enhances peptide sequencing by post-source decay matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*, **38**, 373–377.
  - 15. Wang, D., Kalb, S. R., Cotter, R. J. (2004) Improved procedures for N-terminal sulfonation of peptides for matrix-assisted laser desorption/ionization post-source decay peptide sequencing. *Rapid Commun Mass Spectrom*, **18**, 96–102.
  - 16. Alley, W. R., Jr., Mechref, Y., Klouckova, I., Novotny, M. V. (2007) Improved collision-induced dissociation analysis of peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometry through 3-sulfobenzoic acid succinimidyl ester labeling. *J Proteome Res*, **6**, 124–132.
  - 17. Huang, Z. H., Wu, J., Roth, K. D., Yang, Y., Gage, D. A., Watson, J. T. (1997) A picomole-scale method for charge derivatization of peptides for sequence analysis by mass spectrometry. *Anal Chem*, **69**, 137–144.
  - 18. Franck, J., El Ayed, M., Wisztorski, M., Salzet, M., Fournier, I. (2009) On tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing proteins identification in bottom-up Imaging strategies. *Anal Chem*, **81**, 8305–8317.
  - 19. Lemaire, R., Tabet, J. C., Ducoroy, P., Hendra, J. B., Salzet, M., Fournier, I. (2006) Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem*, **78**, 809–819.
  - 20. Lemaire, R., Wisztorski, M., Desmons, A., Tabet, J. C., Day, R., Salzet, M., Fournier, I. (2006) MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem*, **78**, 7145–7153.
  - 21. Seeley, E. H., Oppenheimer, S. R., Mi, D., Chaurand, P., 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.