

N° d'ordre : 40093

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

Thèse de doctorat

Biologie Santé

Présentée par

JULIEN FRANCK

DEVELOPPEMENT DES STRATEGIES D'IDENTIFICATION EN MODE BOTTOM-UP POUR L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI

Thèse dirigée par le Pr. Isabelle FOURNIER

Jury :

M. le Directeur de Recherche Gérard Bolbach

Président

M. le Professeur Edwin De Pauw

Rapporteur

M. le Professeur Andreas Tholey

Rapporteur

M. le Docteur Liam McDonnell

Examineur

M. le Professeur Michael Karas

Examineur

M. le Professeur Michel Salzet

Examineur

Mme le Professeur Isabelle FOURNIER

Directrice de Thèse

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 et ses idées, au premier abord parfois « farfelues » mais qui se sont toujours révélées excellentes. 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. Je les remercie tout deux pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de ces années de travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Edwin Depauw et Monsieur le Professeur Andreas Tholey pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur Michael Karas et Monsieur le Docteur Liam McDonnell, ma reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury et en venant de si loin.

Je remercie également Monsieur le Directeur de Recherche Gérard Bolbach pour l'attention qu'il a porté à cette étude en acceptant de faire partie de ce jury.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe d'imagerie MALDI. Maxence, David, Mohamed, Karim, Céline, Rémi, Laurent, Benjamin, Thomas et Annie.

Je voudrais bien sûr remercier l'ensemble des permanents du laboratoire pour leur sympathie et leur disponibilité lorsque j'ai eu besoin de leur aide.

J'associe à mes remerciements tous les étudiants du laboratoire, qu'ils soient encore ou non présents, pour l'atmosphère cordiale et dynamique dans laquelle nous travaillons.

Enfin je dois saluer l'immense disponibilité d'Hafida, la femme qui partage ma vie, pour son aide et son indulgence.

Résumé

Depuis leur introduction en 1997 par le groupe de R.M. Caprioli, l'analyse directe sur tissus et l'imagerie par spectrométrie de masse sont devenues des méthodes complémentaires aux techniques « classiques » de protéomique. L'analyse directe sur tissus permet la détection de plusieurs centaines de molécules, tout en maintenant l'intégrité des tissus. Par l'automatisation de cette approche, des images moléculaires peuvent être ainsi obtenues. Cependant, de nombreux développements restent à faire notamment sur l'amélioration de la détection des différentes classes de biomolécules incluant les lipides, les peptides et les protéines. De plus, si la localisation de molécules d'intérêt est possible, l'information structurale de certaines d'entre elles telles que les protéines reste encore un challenge. Si l'identification des protéines peut être délicate par protéomique « classique » cela est encore plus vrai avec l'analyse directe sur tissus. L'approche bottom-up est, à l'heure actuelle, une méthode permettant la mise en évidence de la répartition des peptides générés par digestion enzymatique *in situ* et de leur structure par analyse en mode MS². Dans la plupart des cas, la MS² est utilisée pour vérifier la séquence d'un peptide endogène ou obtenu après digestion, mais les spectres générés par les instruments équipés d'une source MALDI sont souvent complexes à analyser en raison des différentes séries d'ions fragment obtenues au cours du processus de fragmentation. Les séries d'ions obtenues sont largement incomplètes et ne donnent accès qu'à de petites séquences. Dans le but d'améliorer l'identification des protéines en mode bottom-up pour l'imagerie par spectrométrie de masse, nous avons étudié des dérivations chimiques N-terminales de peptides. Les peptides dérivés présentent alors des fragmentations vers une série d'ions majoritaire permettant une meilleure interprétation des spectres MS². Cette méthode permet d'améliorer l'identification des protéines et le séquençage *de novo* directement sur coupes de tissus qui sont des points importants pour l'identification de marqueurs biologiques.

Abstract :

Since its introduction in 1997 by the group of R.M. Caprioli, direct tissue analysis and imaging by Mass Spectrometry has now become a good complementary method of classical proteomics techniques. Direct analysis of tissues gives access to the detection of hundreds of biomolecules while maintaining tissue integrity and by automation of this approach, molecular images of biomolecules distribution can be obtained in one step analysis. However, many developments need to be undertaken especially on the improvement of the detection of different classes of biomolecules including lipids, peptides and proteins. Moreover, if the localization of molecules of interest is possible but no structural information can be obtained from proteins. If proteins identification can be delicate under classical proteomics conditions this is even truer by working directly on tissues. A bottom-up strategy will allow the identification and localization of proteins after MS/MS experiments of peptides generated after *in situ* enzymatic digestion. In most of cases, MS/MS is used to check the sequence of an expected endogenous peptide or obtained after digestion but MS/MS spectra generated from instruments equipped with a MALDI ion source are often 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 for which weak fragmentations (especially in the higher m/z range of the MS/MS spectrum) and to very different series of fragment ions creating largely incomplete set of series only giving access to small sequence tags are often observed. Thus, we have studied on tissue N-terminal chemical derivatization of peptides for proteins identification in bottom-up Imaging strategies. The derivatives promote efficient charge-site initiated cleavage of backbone amide bonds and they enable the selective detection of only a single series of fragment ions. Optimization of reactions was first performed at the whole tissue section scale and then modified and adapted to allow the derivatization to be automatically performed using a micro-spotting piezoelectric automatic deposition device. Finally, we report a whole sequence of on tissue bottom-up strategy followed by automatic derivatization and show that such strategies improve protein assignment and *de novo* sequencing directly from tissue sections, which is a key point for on tissue direct identification of markers.

Résumé	iii
Publications.....	viii
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xxi
Liste des abréviations.....	xxii
Introduction	1
1. Imagerie par spectrométrie de masse.....	6
1.1. Principe.....	6
1.2. Imageries par spectrométrie de masse.....	8
1.2.1. L'imagerie MALDI.....	8
1.2.1.1. Les sources MALDI.....	8
1.2.1.2. Les matrices MALDI	10
1.2.1.3. De l'analyse Directe à l'imagerie MALDI	14
1.2.1.4. Imagerie MALDI et développements	14
Préparation et traitement des échantillons.....	16
Choix de la matrice.	22
Le dépôt de matrice	23
Imagerie MALDI et instrumentation.....	27
Imagerie MALDI, développements informatiques et traitement des données.....	30
Imagerie MALDI et temps d'acquisition.	35
Résolution spatiale de l'imagerie MALDI.	36
1.2.1.5. Imagerie MALDI et Applications.....	39
Imagerie MALDI et études protéomiques.....	39
Imagerie MALDI et lipidomique.	41
Imagerie MALDI et pharmacologie.....	43
1.2.2. Imageries dérivées du MALDI.....	45
1.2.2.1. Imagerie DIOS	45
1.2.2.2. Imagerie ME-SALDI	47
1.2.3. Imagerie SIMS	49
1.2.4. Imagerie et autres sources	54
1.3. Bilan	57
2. Développement en Imagerie MALDI de composés natifs.....	59
2.1. Développements pour l'analyse des lipides	59
2.2. Développements pour l'analyse des peptides.....	72

2.3.	Développements pour l'analyse des protéines.	82
2.3.1.	Développements pour l'analyse de protéines de hauts poids moléculaire	92
2.3.2.	Application au cancer de l'ovaire.....	101
2.4.	Optimisation de la méthode de micro-dépôt	109
2.4.1.	Modification de la géométrie	109
2.4.2.	Diminution du temps de dépôt	111
2.5.	Conclusion.....	113
3.	Identification de protéines sur tissus	115
3.1.	Stratégies d'identification	115
3.2.	Stratégies Top-down	117
3.3.	Stratégie Bottom up.....	119
3.3.1.	Digestions enzymatiques <i>in situ</i> sur tissus	120
3.3.2.	Imagerie MALDI et digestion enzymatique.....	127
3.3.3.	Applications de la digestion enzymatique <i>in situ</i>	132
3.4.	Conclusion.....	136
4.	Dérivations N-Terminale des peptides	137
4.1.	Principe.....	137
4.2.	Dérivations N-Terminales par Addition d'une charge négative	140
4.2.1.	Dérivation N-Terminale avec le 4-SPITC.....	140
4.2.2.	Dérivation N-Terminale avec le 3-SBASE	147
4.3.	Addition d'une charge positive en position N-terminale	156
4.3.1.	Dérivation N-Terminale avec TMPP	156
4.3.2.	Dérivation et imagerie	161
4.4.	Conclusion.....	163
5.	Conclusion.....	166
6.	Matériel & Méthodes	173
6.1.	Réactifs.....	173
6.2.	Préparation des échantillons et des tissus.....	173
6.2.1.	Solutions de standards.....	173
6.2.2.	Coupes de cerveaux de rats	174
6.2.3.	Traitement des coupes	174
6.2.4.	Digestion enzymatique <i>in situ</i>	174
6.2.5.	Dérivations N-Terminales	174
6.2.6.	Préparation des matrices.....	175

6.3.	Préparation des échantillons pour l'analyse MALDI.....	176
6.3.1.	Analyse des lipides.....	176
6.3.2.	Analyse des peptides.....	176
6.3.3.	Analyse des protéines.....	176
6.3.4.	Digestion enzymatique in situ.....	177
6.3.5.	Dérivations N-Terminals.....	178
6.3.6.	Identification des protéines.....	178
6.4.	Traitements des données.....	179
	Références bibliographiques.....	180

Publications

Articles acceptés (8):

- ✓ **Franck J.**, Longuespée R., Wisztorski M., Van Remoortere A., McDonnell L., Salzet M., Fournier I.
MALDI Mass Spectrometry Imaging of proteins exceeding 30kDa. *Accepté.*
- ✓ **Franck J.**, Arafah K., Barnes A., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Improving tissue preparation for MALDI-MSI. Part 1: using microspotting. *Anal. Chem.* 2009, 81, 8193-8202.
- ✓ **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, 80; 8305-8317.
- ✓ Stauber J., MacAleese L., **Franck J.**, Claude E., Snel M., Kaletas B.K., Wiel I.M.V.D., Wisztorski M., Fournier I., Heeren R.M.A.
On-tissue protein identification and imaging by MALDI-Ion mobility Mass Spectrometry. *JASMS.*, *Accepté.*
- ✓ **Franck J.**, Arafah K., El Ayed M., Bonnel D., Vergara D., Jacquet A., Vinatier D., Wisztorski M., Day R., Fournier I., Salzet M.
MALDI Imaging Mass Spectrometry: State of the art technology in clinical proteomics. *Mol. Cell. Proteomics.* 2009, 8, 2023-2033.
- ✓ 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., Salzet M.
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, 1-15.
- ✓ Jardin-Mathé O., Bonnel D., **Franck J.**, Wisztorski M., Macagno E., Fournier I., Salzet M.
MITICS (MALDI Imaging Team Imaging Computing System): a new open source mass spectrometry imaging software. *J Proteomics*, 2008 Aug 21;71(3):332-45.
- ✓ Stauber J., Lemaire R., **Franck J.**, Bonnel D., Croix D., Day R., Wisztorski M., Fournier I., Salzet M.
MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: application to model animals of Parkinson disease for biomarker hunting. *J Proteome Res.*, 2008 Mar;7(3):969-78.

Articles soumis (2):

- ✓ **Franck J.**, Meriaux C., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Ionic liquid matrices as matrix for mass spectrometry imaging of lipids. *Soumis.*

- ✓ El Ayed M., Vergara D., Bonnel D., Tasiemski A., Arafah K., **Franck J.**, Viniatier D., Day R., Fournier I., Salzet M.
MALDI Imaging Mass Spectrometry in ovarian cancer. Soumis.

Chapitres de livre (4):

- ✓ **Franck J.**, Wisztorski M., Fournier I., Salzet M.
On tissue proteins identification improvement by N-terminal peptides derivatization. Methods in Molecular Biology Series, Accepté.
- ✓ Wisztorski M., **Franck J.**, Salzet M., Fournier I.
MALDI Direct Analysis and Imaging of Frozen versus FFPE Tissues : What Strategy for Which Sample. Methods in Molecular Biology Series, Accepté.
- ✓ Fournier I., **Franck J.**, Wisztorski M., Macagno E., Salzet M.
Imaging: A Viewpoint of the Technology. Neuroscience Imaging (Nova Science Publishers), pp. 19-32 Volume 3 Issue 1, Accepté.
- ✓ Fournier I., **Franck J.**, Mériaux C., Salzet M.
MALDI Imaging of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Application to Model Animals of Parkinson Disease for Biomarker Hunting. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Soumis.

Brevets (3):

- ✓ **Franck J.**, Mériaux C., Fournier I., Salzet M.
Développement de nouvelles matrices ioniques pour l'analyse et la quantification sur coupes de petites molécules (médicaments, lipides). PCT.
- ✓ **Franck J.**, Longuespée R., Fournier I., Salzet M.
Développement de nouveaux procédés en vue de l'obtention d'images moléculaires de protéines de hautes masses par spectrométrie de masse à partir de tissus. PCT.
- ✓ **Franck J.**, Fournier I., Salzet M.
Développement d'un nouveau kit de dérivation de peptides directement sur coupes de tissus pour des analyses structurales par spectrométrie de masse. PCT.

Communications orales (4)

- ✓ Spectrométrie de Masse et Analyse Protéomique (SMAP) 2009 à Dijon, France
Detection of High molecular mass for MALDI Imaging and Profiling
- ✓ 18ème Congrès International de Spectrométrie de Masse, 2009 à Brême, Allemagne
Detection of High molecular mass for MALDI Imaging and Profiling

- ✓ 25èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse (SFSM), 2008 à Grenoble, France
Proteins Identification by MALDI-Imaging: Improving de novo sequencing by in situ N-Terminal Derivatization
- ✓ XIIIèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse (RCJSM) 2008 à Blainville-sur-Mer, France
Apport de la dérivation N-Terminale pour le séquençage de novo sur coupe de tissu

Communications orales sur invitation (3)

- ✓ 3ème rencontre du réseau des plateformes protéomiques PACA, 2008 à Luminy, Marseille, France
Automatic spotting solution for MALDI Imaging: process optimization and new developments
- ✓ 3ème Séminaire de Biotechnologie, 2008 à l'Hôpital Saint-Louis, Paris, France
MALDI Imaging: Developments for Moving Towards Clinical Applications
- ✓ Forum Labo & Biotech, 2008 à Paris, France
Automatic spotting solution for MALDI Imaging: process optimization and new developments

Posters (5)

- ✓ **Franck J.**, Wisztorski M., El Ayed M., Bonnel D., Barnes A., Fournier I., Salet M.
Automatic spotting solution for MALDI Imaging: process optimization and new developments, ASMS 2008, Denver, USA
- ✓ **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

(Prix du meilleur poster au 7^{ème} congrès annuel HUPO, Seoul 2007, Corée)

- ✓ **Franck J.**, El-Ayed M., Stauber J., Wisztorski M., Jardin-Mathé O., Boukherroub R., Salzet M., Fournier I.
Biomarkers Identification by MALDI-Imaging: Improving de novo sequencing by in situ N-Terminal Derivatization, HUPO 2007, Seoul, Corée
- ✓ Bonnel D., **Franck J.**, Wisztorski M., Day R., Salzet M., Fournier I.
On tissue fractionation: Unmasking difficult proteins for MALDI profiling, ASMS 2008, Denver, USA
- ✓ Boutin M., Bich C., **Franck J.**, Afonso C., Fournier F., Tabet J.C.
Behavior of Peptide/Copper Complexes in the Gas Phase: Evidencing of Zwitterionic Forms From Doubly Charged Species, ASMS 2006, USA

Liste des figures

Figure 1 : Approche protéomique classique pour l'identification d'une protéine par MS à partir d'un tissu.....	3
Figure 2 : Schéma représentatif des différents modes d'acquisition. Mode (a) point par point ou mode (b) microscope ²⁸	8
Figure 3 : Schéma simplifié du processus MALDI. (a) Les analytes et la matrice co-cristallisent sur la plaque MALDI. (b) Le laser impulsionnel MALDI entraîne la désorption des analytes et de la matrice puis l'ionisation s'effectue en phase gazeuse.....	10
Figure 4 : Formules semi-développées des matrices les plus couramment utilisées: (a) α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), (b) acide 3,5-diméthoxy-4hydroxycinnamique (SA), (c) acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), (d) 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP) et 6-aza-2-thiothymine (ATT).....	12
Figure 5 : Cristallisation obtenue avec (a) 2,5-DHB et (b) 2,5-DHB/Butylamine ⁶⁸	14
Figure 6 : Schéma représentatif d'une expérience d'imagerie MALDI.....	16
Figure 7 : (A) Spectre obtenu à partir d'une coupe de foie juste collée à la base avec l'OCT. (B) Spectre obtenu à partir d'une coupe de foie enrobée dans l'OCT ¹⁰⁵	19
Figure 8 : (A-B) Analyse directe après dépôt de HCCA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH. (C-D) Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH ¹⁰⁵	20
Figure 9 : Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée et après traitement (b) chloroforme ¹⁰⁷	21
Figure 10 : Spectre moyen de protéines obtenues à partir d'une coupe de foie de souris. (a) Spectre moyen pour chaque lavage, (b-e) Profile des pics obtenus pour 4 protéines après chaque traitement ¹⁰⁶	21
Figure 11 : Cristallisation des matrices (a) HCCA/ANI (Aniline), (b) HCCA/2A4M5NP (2-amino-4-methyl-5-nitropyridine), (c) HCCA/DANI (N,N-dimethylaniline) et (d) HCCA ⁶⁶	23
Figure 12 : Dépôt de matrice (a) manuel, (b) par spray et (c) par micro-dépôts.....	24
Figure 13 : Résultats PCA (a) non supervisés et (b) supervisés montrant des lipides différentiellement exprimés dans le cerveau de rat. Image de l'ion (c) m/z 734.45 présent dans la matière grise, de l'ion (d) m/z 788.48 présent dans la matière blanche, de l'ion (e) m/z 762.47 et de l'ion (f) m/z 772.40 présents dans le cortex cérébral ¹⁴⁴	31

Figure 14 : (A) Coloration H&E d'une biopsie de cancer de l'estomac. Représentation des scores obtenus à partir de (B) la première composante principale et à partir de (C) la seconde composante principale. (D) Image des reconstruite en utilisant les jeux de couleurs du dendrogramme (E). (F) Image MALDI de l'ion m/z 3371 (vert) et de l'ion (m/z 3328) déterminés par PCA ¹⁴⁹ .	32
Figure 15 : 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) ¹⁵¹ .	34
Figure 16 : Coupe d'une lésion de sein après (A) coloration H&E après analyse MALDI. (B) Images moléculaire de l'ion m/z 9750 (jaune) et l'ion m/z 4519 (bleu). (C) Superposition des images MALDI est de la coloration H&E ¹⁵⁰ .	34
Figure 17 : (a) Schéma du système SMALDI ⁵¹ . Images SMALDI de (b) cristaux de 2,5-DHB et (c) de la repartition de la substance P dans les cristaux de 2,5-DHB ¹⁵⁷ .	38
Figure 18 : (a) Schéma du dispositif microscope. (b) Image optique d'un coupe d'hypophyse d'humain et images moléculaires de neuropeptides tels que (c) la vasopressine et (d) l'ocytocine ¹⁶⁰ .	38
Figure 19 : Spectres MALDI-MS obtenus à partir d'une coupe (a) d'ovaire cancéreuse et (b) d'une tumeur bénigne d'ovaire. (c) Profil MS de 3 cancers d'ovaire vs. 3 tumeurs bénignes. (d) Coloration H&E et image MALDI de l'ion m/z 9744 identifié comme biomarqueur potentiel ¹¹³ .	39
Figure 20 : Image MALDI de la protéine PEP-19 dans un cerveau de souris avant (a) traitement au MPTP et (b) après traitement au MPTP ¹¹⁰ .	40
Figure 21 : Images MALDI des différentes espèces moléculaires présentent dans les plaques amyloïdes dans le cas de la maladie d'Alzheimer. (A) Image optique d'un cerveau de rat avec la zone présentant une forte concentration de plaques amyloïdes. (B) Spectre moyen obtenu à partir de la zone présentée en A. (C-F) Répartitions de 4 peptides β -amyloïdes ¹⁷⁵ .	40
Figure 22 : (a) Images de neuropeptides obtenues par MALDI-Orbitrap à partir de corpora cardiaca et corpora allata de criquets. (b) Spectres MS contenant les 4 ions d'intérêt ¹⁰⁹ .	41
Figure 23 : Différentes classes des glycérophospholipides (GP) et des sphingolipides (SP) ¹⁹² .	42
Figure 24 : (a) Coloration d'une coupe de cancer du colon montrant les régions cancéreuses et normales. (b) Coupe utilisée pour l'analyse directe MALDI avec indication des zones qui seront comparées. (c) Image de l'ion m/z 725 sur exprimé dans la zone cancéreuse et (d)	

image de l'ion m/z 616 fortement exprimé dans la zone normale. (d) Superposition des deux images ¹⁹⁹	43
Figure 25 : Détection de l'olanzapine et des métabolites à 2h (à gauche) et 6h (à droite) après injection dans une coupe sagittale de rat entier. (a) Image optique de la coupe de rat entier avec les organes entourés en rouge. (b) Image MS/MS de l'olanzapine (m/z 313→m/z 256), (c) image MS/MS du N-desméthyl olanzapine (m/z 299→m/z 256) et (d) image MS/MS du 2-hydroxyméthyl olanzapine (m/z 329→m/z 272) ²⁰²	44
Figure 26 : Publications sur la MSI et l'imagerie MALDI depuis 1998.	45
Figure 27 : Spectres de masse du midazolam obtenus par (a) MALDI et (b) DIOS ²⁰⁵	46
Figure 28 : Imagerie laser-NIMS. (a) Concept de l'analyse directe sur tissu montrant l'ablation de la coupe dans un premier temps suivit de l'analyse laser-NIMS ²¹⁰ . (b) Spectre NIMS présentant la clozapine (m/z 327.13) et la N-desméthylclozapine (m/z 313.11). (c) Trous dans la coupe de cerveau de rat obtenus après la première irradiation laser. (d) Image optique de la coupe et images laser-NIMS de (e) la clozapine (m/z 327.13) et (f) la N-desméthylclozapine (m/z 313.11).....	47
Figure 29 : (a) Image optique d'un coupe de cerveau de souris. Images ME-SALDI du (b) cholestérol (m/z 369.4) et (c-e) de différents lipides ²¹²	47
Figure 30 : (a) Image optique d'un noyau de pomme et images GALDI de (b) l'acide malique, (c) de l'acide quinique, (d) de l'acide linoléique et (e) du sucrose ²¹³	48
Figure 31 : Images optique de l'Arabidopsis thaliana et de trois ions à m/z 503, m/z 515 et m/z 529 ²¹⁵	48
Figure 32 : Schéma représentant l'utilisation du SIMS en mode (a) statique et (b) dynamique.	50
Figure 33 : (a) Courant ionique total représentant la fusion de la membrane de deux Tetrahymena. (b) Image SIMS de l'ion m/z 184 représentant la distribution de la phosphatidylcholine ²²¹	51
Figure 34 : Spectres (A) MALDI et (B) ME-SIMS obtenus à partir d'un extrait de Lymnaea stagnalis avec du 2,5-DHB. (C) Image optique, (D) image ME-SIMS représentant le TIC et (E) image ME-SIMS représentant la distribution du cholestérol dans une coupe de ganglion pariétal de Lymnaea stagnalis ²²³	52
Figure 35 : (a) Image optique d'une coupe de rein colorée au bleu de toluidine. (b) Image Meta SIMS présentant la répartition du cholestérol cationisé par l'argent (m/z 493) ²²⁷	52
Figure 36 : Images obtenus à partir d'une coupe de cerveau de rat des ions Na ⁺ (m/z 23), K ⁺ (m/z 39), choline (m/z 86), phosphocholine (m/z 184), cholestérol [M+H-H ₂ O] ⁺ (m/z 369),	

vitamine E (m/z 430), phospholipides (m/z 769) et du tic. Images réalisés à 62,5µm et avec une source d'ions primaires Au ₃ ⁺ 220	53
Figure 37 : Images d'une coupe de rein stéatose hépatique non alcoolique. (a) Image optique, images SIMS de (b) vitamine E (mode négatif), (c) cholestérol (mode positif), (d) somme des TAG (mode positif) et (e) somme des FA (mode négatif). Images SIMS obtenues à l'aide d'une source d'ions bismuth ²³⁴	54
Figure 38 : (a) Schéma de la source DESI et (b) de la procédure pour l'IMS.	56
Figure 39 : (a) Image optique de la coupe de cerveau de rat et (b-f) images DESI de différents lipides tels que phosphatidylinositoles (PI), des phosphatidylsérines (PS) et des sulfatides (ST) obtenus en mode négatif ²⁷¹	57
Figure 40 : Image optique de micro-dépôts de la 2,5-DHB à 20mg/mL dans un mélange EtOH/TFA (0.1%) (7:3, v/v).	61
Figure 41 : Images optiques d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice ATT (à gauche) et de la matrice DHAP (à droite) enregistrée (a) après dépôts et (b) après une heure sous vide de la source MALDI.	62
Figure 42 : Images optiques de micro-dépôts de (a) ATT et (b) DHAP à 20mg/mL dans un mélange EtOH/TFA (0.1%) (7/3, v:v).	62
Figure 43 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat directement après de dépôts de la matrice (a) ATT et (b) DHAP et après une heure dans le vide de la source (c-d).	63
Figure 44 : Formules semi-développées des matrices ioniques liquides (a) 2,5-DHB/ANI, (b) 2,5-DHB/DANI, (c) 2,5-DHB/DEANI, (d) 2,5-DHB/Pyr et (e) 2,5-DHB/3AP.	65
Figure 45 : Images optiques des micro-dépôts de la matrice (a) 2,5-DHB, (b) 2,5-DHB/ANI, (c) 2,5-DHB/3AP et (d) 2,5-DHB /Pyr.	65
Figure 46 : Spectres de masse enregistrés après dépôt de la matrice 2,5-DHB en mode (a) positif et (b) négatif. Spectres de masse enregistrés après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI en mode (c) positif et (c) négatif.	67
Figure 47 : Images MALDI de la (a) PC {32:0}, de la (b) PC {36:1} et (c) de la somme des deux obtenues en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec une résolution de 250µm et en accumulant 500 spectres par position à 200Hz.	67
Figure 48 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat après dépôt (a) de la matrice 2,5-DHB/ANI et (b) après deux jours dans la source MALDI.	69

Figure 49 : Images MALDI de la répartition des ions (a) m/z 857 correspondant à la phosphoinositols (PI) {36:4}, (b) m/z 888 correspondant au sulfatide (ST) {42:2} et (c) de la somme obtenues en mode réflecteur négatif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec une résolution de 250µm et en accumulant 500 spectres par position à 200Hz.	70
Figure 50 : Images optiques des têtes piézoélectrique et des coupes de cerveau de rat après dépôt de (a) HCCA et (b) HCCA/ANI pendant 30 minutes.	74
Figure 51 : Images optiques des coupes de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH froid pendant 30 sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée à l'acétone froid pendant 30 sec.	75
Figure 52 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée au à l'acétone pendant 30 sec.	76
Figure 53 : Spectres de masse enregistrés à partir d'une coupe de cerveau en mode (a) réflecteur positif et (b) linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA/ANI.	78
Figure 54 : Formules semi-développées de la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/DANI et (c) HCCA/3AP.....	79
Figure 55 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir des coupes de cerveau de rat lavées au chloroforme pendant 30 avec la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/pPA et (c) HCCA/DANI et (d) HCCA/3AP.	80
Figure 56 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir des coupes de cerveau de rat lavées au chloroforme pendant 30 avec la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/3AP.....	81
Figure 57 : Images optiques de coupes de cerveau de rat (a) non traité, (b) lavée à l'EtOH froid pendant 30 secondes, (c) lavée au chloroforme pendant 30 secondes et (d) lavée à l'acétone froid pendant 30 secondes.	83
Figure 58 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée au à l'acétone pendant 30 secondes.	83
Figure 59 : Distribution de l'ion m/z 12210 (vert) et de l'ion m/z 14220 (rouge) enregistré sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée au à l'acétone pendant 30 sec	84
Figure 60 : (a) Spectre de masse enregistré en mode linéaire positif dans la région du corps calleux (rouge) d'une coupe de cerveau de rat (b) lavée à l'acétone puis l'EtOH et au chloroforme pendant 30 sec.	85

Figure 61 : Formules semi-développées des matrices (a) SA/ANI et (b) SA/3AP.	86
Figure 62 : Images optiques des cristaux de (a) SA/ANI et (b) de SA.	86
Figure 63 : Dépôts de SA (à gauche) et SA/ANI (à droite) à 10mg/mL sur la même coupe de cerveau de rat. (b-c) Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif dans deux régions différentes d'une coupe de cerveau de rat avec les deux matrices.	87
Figure 64 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de SA/ANI. (b-d) Images moléculaires représentant la distribution des ions m/z 4959, 18450 et 28412. Images obtenues à en mode linéaire positif à 250µm de résolution. 1000 spectres ont été accumulés par positions avec une fréquence laser de 100Hz.	88
Figure 65 : (a) Dépôts de SA (à gauche) et SA/3AP (à droite) à 10mg/mL sur la même coupe de cerveau de rat.	89
Figure 66 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'un coupe de cerveau de rat dans la région du corps calleux avec (a) SA et (b) SA/3AP. (c-d) Zoom des spectres dans la région m/z 6000 à 13000. 1000 spectres ont été accumulés à chaque position avec une fréquence laser de 100Hz.	91
Figure 67 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat (a) après dépôt d'une solution de TFA 10% et (b) sans traitement. Une solution de SA AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) fut déposée sur les deux coupes.	94
Figure 68 : Spectre de masse enregistré en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) traitée au TFE et (b) traitée au HFIP.	96
Figure 69 : Spectre de masse enregistré en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) traité au HFIP après avoir retiré la matrice et (c) traitée au TFE après avoir retiré la matrice.	97
Figure 70 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec le détecteur (a) MCP et (b) CovalX après dépôt d'une solution de SA dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v).	98
Figure 71 : Images MALDI de 3 ions détectés à partir d'une coupe de souris avec le détecteur CovalX monté sur un AutoFlex III.	99
Figure 72 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif après traitement haute masse sur une coupe de cerveau de souris avec le détecteur (a) MCP et (b-c) le détecteur haute masse.	100
Figure 73 : Spectres MALDI enregistrés à partir de 3 coupes d'ovaire présentant des tumeurs cancéreuse et 3 coupes présentant des tumeurs bénignes ¹¹³	102

Figure 74 : 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.	102
Figure 75 : Analyse PCA non supervisée obtenue à partir des spectres enregistrés sur une coupe d'ovaire présentant les ions différenciellement exprimés sur la coupe.	103
Figure 76 : (a) Image optique de la coupe d'ovaire présentant la zone cancéreuse et la zone saine et (b) image MALDI représentant la distribution de Reg alpha (m/z 9744).	104
Figure 77 : Images MALDI d'ions mis en évidence par PCA et détectés uniquement (a-c) dans la zone cancéreuse et (d-f) dans la zone saine.	104
Figure 78 : (a) Dendrogramme créé à partir de l'analyse en cluster regroupant les spectres par similarité. (b) Image du cluster correspondant à la zone saine et à la branche supérieure du dendrogramme. (c) Image du cluster correspondant à la zone cancéreuse et à la branche inférieure du dendrogramme.	105
Figure 79 : Spectres de masse obtenus à partir de coupe de cerveau de rat 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.	106
Figure 80 : Optimisation de la cible afin d'améliorer la précision et la reproductibilité des dépôts.	110
Figure 81 : (a) Image optique des spots de la matrice SA/ANI déposés sur une coupe de cerveau de rat avec une résolution de 150 μ m. (b) Image optique du zoom de la région de spots. (c) Image MALDI des ions m/z 9976 et m/z 14137.	111
Figure 82 : Diminution du temps d'application. (a) Région d'intérêt divisée en petites aires permettant le dépôt uniquement sur le tissu. (b) Images MALDI de la répartition de deux ions à m/z 6732 et m/z 14179 obtenues après dépôt de SA/ANI à haute fréquence.	112
Figure 83 : (a) Spectre de masse obtenu en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec la matrice SA. (b) Spectre ISD enregistré en mode réflecteur positif avec une extraction retardée 150ns. (c) Spectre MS/MS d'un ion ISD (m/z 1292.8).	118
Figure 84 : Stratégie d'identification en mode bottom up par micro-dépôts sur des coupes de tissus frais et FFPE.	119
Figure 85 : Images optiques de coupes de cerveau de rat adjacentes après dépôt de trypsine à (a) 25 μ g/mL, (b) 50 μ g/mL et (c) 100 μ g/mL. Dépôt de HCCA/ANI sur les spots de digestion des 3 coupes.	121

Figure 86 : Spectres de masse obtenus à partir des coupes digérées avec la trypsine à (a) 25µg/mL, (b) 50µg/mL et (c) 100µg/mL. Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de HCCA/ANI sur les trois coupes.	122
Figure 87 : Spectres de masse obtenus à partir des coupes digérées avec la trypsine présentant les pics d'autolyse de la trypsine mesurés à m/z 842.7, m/z 1045.7, m/z 2211.4 et m/z 2283.5.	123
Figure 88 : Spectres moyens de digestion obtenus sur coupes de cerveau de rat après dépôt de la trypsine à 25µg/mL reprise dans (a) un tampon NH ₄ HCO ₃ 50Mm et (b) dans l'eau pure. Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA/ANI.....	124
Figure 89 : Image optique d'une coupe de cerveau après digestion tryptique dans l'eau pure puis dépôt de la matrice HCCA/ANI (à gauche) et HCCA/3AP (à droite).....	125
Figure 90 : Spectres de masse obtenus en mode réflecteur positif après digestion tryptique dans l'eau pure sur coupe de cerveau avec la matrice (a) HCCA/ANI et (b) HCCA/3AP....	126
Figure 91 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau e rat après micro-dépôt de trypsine et de la matrice HCCA/ANI. (b) Images moléculaires MALDI des ions m/z 1339.2 et m/z 1701.9. (c-d) Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans deux régions différentes du cerveau et spectres MS/MS des ions m/z 1339.3 et 1701.9.....	128
Figure 92 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice SA/ANI. (b) Images MALDI des ions m/z 6752, m/z 8324, m/z 8448 et m/z 14126. Résolution des images : 250µm.	130
Figure 93 : (a) Image optique des aires sélectionnées dans le cerveau de rat pour déposer la trypsine. (b) Image optique de la coupe de cerveau de rat après avoir retiré la matrice SA/ANI et après dépôt de la trypsine et de la matrice HCCA/3AP. (c) Image MALDI de la distribution de l'ion m/z 1339.6. (d) Spectre de masse enregistré en mode réflecteur positif à partir de la région définit en haut du cerveau. (e) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.6.....	131
Figure 94 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 643.3 et (c) de l'ion m/z 1099.5. (c-d) Résultats obtenus après interrogation en banque de données pour les deux ions.....	132
Figure 95 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat FFPE enrobée depuis 9ans après dépôt de la trypsine et de la matrice HCCA/ANI. Images moléculaires MALDI des ions (b) m/z 643, (b) m/z 728 et (d) m/z 1083.....	135
Figure 96 : Nomenclature des ions fragments proposée par Roepstorff.	137
Figure 97 : Formules semi-développées des réactifs (a) 4-SPITC, (b) 3-SBASE et (c) TMPP.	139

Figure 98 : Spectres de masse obtenus en mode réflecteur positif du peptide (a) ASHLAGLAR et (b) ASHLGLAR dérivé avec le 4-SPITC. (c) Spectre MS/MS de peptide natif et (d) du peptide dérivé avec 4-SPITC.....	141
Figure 99 : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation d'ions y_n^+ après modification chimique de peptides avec le 4-SPITC.	142
Figure 100 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif après (a) digestion trypsique et (b) digestion trypsique suivit d'une dérivation N-terminal au 4-SPITC sur une coupe de cerveau de rat.	143
Figure 101 : Spectres MS/MS de l'ion (a) m/z 1274 et (b) m/z 1489 enregistrés respectivement à partir d'une coupe de cerveau de rat digérée et une coupe de cerveau de rat digérée et dérivé au 4-SPITC.	145
Figure 102 : (a) Spectre de masse enregistré en mode réflecteur positif après dérivation du peptide ASHLGLAR dérivé avec le 3-SBASE. (b) Spectre MS/MS.	148
Figure 103 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif après (a) digestion trypsique et (b) digestion trypsique suivit d'une dérivation N-terminal au 3-SBASE sur une coupe de cerveau de rat.	149
Figure 104 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 643 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 827 après dérivation 3-SBASE et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données.....	150
Figure 105 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 726.3 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 726.3 après dérivation 3-SBASE (m/z 910.1) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données....	151
Figure 106 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 après dérivation 3-SBASE (m/z 1523.7) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données..	153
Figure 107 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1701.9 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 après dérivation 3-SBASE (m/z 1523.7) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données..	154
Figure 108 : Spectre MS/MS de l'ion m/z 1396.4 correspondant au peptide ASHLGLAR dérivé avec le TMPP.	157
Figure 109 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat soumise à une digestion enzymatique puis à une dérivation TMPP dans (a) un tampon NH_4HCO_3 et (b) avec la TEA.	159

Figure 110 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) digérée à la trypsine et (b) digérée et dérivée au TMPP..... 160

Figure 111 Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat après (a) digestion trypsique et dérivation TMMP et (b) digestion trypsique. (c) Images MALDI des ions m/z 726 (rouge) et m/z 1299 (vert). Spectres MS/MS enregistrés à partir de l'ion (d) m/z 1298.4 et (e) m/z 726.3..... 162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste de certains appareils utilisés pour le dépôt automatique de la matrice sur les tissus.	27
Tableau 2 : 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.	29
Tableau 3 : Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur positif directement sur coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI.	68
Tableau 4 : Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur négatif directement sur coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI.	71
Tableau 5 : Valeur des intensités et rapports signal sur bruit (S/N) pour les peptides et les protéines détectés après micro dépôts de SA et SA/ANI sur une coupe de cerveau de rat.	88
Tableau 6 : 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.	108
Tableau 7 : Comparaison des biomarqueurs identifiés par différentes approches sur différents modèles ¹⁷³	133
Tableau 8 : Comparaison des scores d'identification obtenus à partir de mascot en utilisant SwissProt comme banque et la taxonomie <i>Rattus norvegicus</i> pour les 4 peptides avant et après dérivation au 3-SBASE.	155

Liste des abréviations

3AP : 3-acétylpyridine
3HPA : Acide 3-hydroxypicolinique
3SBA : acide 3-sulfobenzoïque
3SBASE : acide 3-sulfobenzoïque succinimidyl Ester
4SPITC : 4-sulfophenyl isothiocyanate
AcN : Acétonitrile
ANI : Aniline
APCI : Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ASAP : Atmospheric pressure Analysis Probe
HCCA : acide α -cyno-4-hydroxycinnamic
DAC : Diammonium citrate
DAPCI : Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
DART : Direct Analysis in Real time
DESI : Desorption Electrospray Ionization
2,5-DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DHAP : 2,6-dihydroxyacetophenone
DIOS : Desorption Ionization On Silicon
ELDI : Electrospray assisted Laser Desorption Ionization
ESI : ElectroSpray Ionization
EtOH : Ethanol
FT-ICR : Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance
GALDI : Graphite-Assisted Laser Desorption Ionization
HFIP : 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol
H&E : Haematoxyline–Eosine
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
IEF : Iso Electro Focalisation
IL : Liquide Ionique (Ionic Liquid)
IPG : Immobilized pH Gradient
IR : Infra Rouge
IR-LADESI : Infrared Laser-Assisted Desorption Electrospray Ionization
IR-LDESI : Infrared Laser Desorption Electrospray Ionization
IT : Ion Trap
ITO : Indium-Tin Oxide
LA-ESI : Laser Ablation Electrospray Ionization
LAMMA : Laser Activated Microprobe Mass Spectrometry
LDI : Laser Desorption Ionization
LMMS : Laser Microprobe Mass Spectrometry
MALDESI : Matrix Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization
MB : Bleu de Méthylène (Methylene Blue)
MeOH : Methanol
ME-SALDI : Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption Ionization
ME-SIMS : Matrix-Enhanced Secondary Ion Mass Spectrometry
NIMS : Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry
MS : Mass Spectrometry
MSI : Mass Spectrometry Imaging
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
nano-PALDI : Nanoparticle-Assisted Laser Desorption Ionization
NFR : Nuclear Fast Red
OCT : Optimal Cutting Temperature
OG : Octylglucoside
PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
PC : glycerophosphocholines
PE : glycerophosphoethanolamines
PG : glycerophosphoglycerols
PI : glycerolphosphoinositols
PCA : Principal Component Analysis (Analyse en Composante Principale)
PMF : Peptide Mass Fingerprint

PNA : p-nitroaniline
PS: glycerophosphoserines
PSD : Post Source Decay
Pyr : Pyridine
RASTIR Remote Analyte Sampling, Transport, and Ionization Relay
SA : Acide Sinapinique (acide 3,5-diméthoxy 4-hydroxycinnamique)
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry
SM : Sphingomyelines
SMALDI : Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
ST : Sulfatide
TB: Bleu de Toluidine
TEA: Triéthylamine
THAP :2,4,6-trihydroxyacetophenone
TFE: TrifluoroEthanol
TFA : Trifluoroacetic acid (acide trifluoroacétique)
TMMP : N-Succinimidylloxycarbonylmethyltris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide
TOF : Time-Of-Flight
TP : Polychrome de Terry
TQ : Triple Quadripôle
UV : Ultra Violet
CV : Violet de Crésyl

Introduction

La protéomique englobe l'identification et la quantification des protéines d'une cellule, d'une organelle, d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme à un instant donné et dans des conditions physiologiques définies. L'analyse globale des protéines, dans le cas d'une étude pathologique, permet de mettre en évidence des biomarqueurs, de suivre la progression d'une maladie ou la réponse à un traitement. L'idée de faire l'inventaire de toutes les protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme dans un état physiologique normal ou pathologique a été introduite dans le milieu des années 1990 avec le « projet protéome »¹ puis s'est structurée dans le cadre du « HUMAN PROTEOME PROJECT : HUPO » en 2002 à Versailles. HUPO a pour but de créer une banque protéique internationale de l'ensemble des protéines et leurs modifications post-traductionnelles liées aux pathologies humaines et la mise à disposition d'anticorps spécifiques, contrôlés et validés *i.e.* project PROTEIN ATLAS.

Cet enjeu ne peut désormais que réussir car depuis, de nombreuses avancées technologiques ont permis l'identification et la caractérisation de protéines notamment grâce à la spectrométrie de masse (MS). Il est désormais possible d'analyser des biomolécules polaires et de haut poids moléculaire avec une grande sensibilité. Dès lors, la MS appliquée à la protéomique prend tout son sens et est devenue, aujourd'hui, une technique incontournable pour l'analyse de mélanges complexes de protéines. La MS est généralement utilisée en analyse protéomique après extraction et séparation de biomolécules à partir d'une lyse de cellules ou d'un broyat de tissus.

Après extraction des protéines, celles-ci sont généralement séparées par électrophorèse bidimensionnelle (2D). En 1959, l'électrophorèse en gel formée à partir de la polymérisation de l'acrylamide et du N,N1-méthylènebisacrylamide fut nommée PAGE (poly-acrylamide gel electrophoresis) par Raymond et Weintraub². L'adaptation du gel de polyacrylamide à l'isoélectrofocalisation (IEF) a été introduite par Svensson en 1962³ et fut réellement appliquée à la fin des années 1960⁴⁻⁶. La 2D qui combine l'IEF pour la séparation de protéines non dénaturées en fonction de leur point isoélectrique (pI) avec le SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) pour une séparation des protéines en fonction de leur masse sur une autre dimension a été introduite en 1970 par Kenrick et Margolis⁷. C'est seulement en 1975 que la 2D fut réalisée dans des conditions dénaturantes^{8,9} et la plus grande démonstration de cette technique a été réalisée par O'Farrell

¹⁰ en montrant plusieurs centaines de protéines extraites de bactéries *Escherichia coli*. La méthode d'O'Farrell fut alors la méthode de prédilection pendant les années qui suivirent pour la séparation et l'analyse de mélanges complexes de protéines. Bien que cette méthode soit très utilisée, elle n'en reste pas moins très difficile à réaliser et s'est montrée souvent peu reproductible. Dans le milieu des années 1990, la 2D a pris une nouvelle ampleur avec l'introduction de la technique « Immobilized pH Gradient » (IPG) par Bjellqvist ¹¹ qui fut ensuite optimisée ¹²⁻¹⁴ afin d'obtenir une méthode robuste et reproductible bénéficiant d'une meilleure résolution.

En ce qui concerne l'identification des protéines, la dégradation d'Edman introduite en 1967 ¹⁵, nécessitait plusieurs centaines de picomoles de protéines ce qui était bien supérieur à la quantité obtenue avec la méthode d'O'Farrell jusqu'aux années 2000. A l'heure actuelle, les microséquenceurs de type CLC-procise (Applied), travaillent sur des quantités de l'ordre de 500 fmol.. Pour l'identification, des méthodes telles que l'immunoprécipitation et le Western blot ¹⁶ avaient alors été utilisées et restent des techniques sûres en ce qui concerne la Protéomique fonctionnelle dans le cadre de la recherche de partenaires.

Cependant, le plus gros impact pour la 2D est survenu avec la possibilité d'obtenir des informations à partir des spots. La digestion des protéines en gel par des endoprotéases telle que la trypsine fournit une empreinte de la protéine appelée le « Peptide Mass Fingerprint » (PMF) qui peut ensuite être analysé par MALDI-MS ou ESI-MS. Il est alors possible d'utiliser le PMF pour le comparer à celui calculé par les banques de données ou alors de fragmenter les peptides de digestion par ESI-MS/MS ¹⁷, MALDI-PSD ^{18, 19} ou MALDI-TOF/TOF ²⁰ donnant alors une séquence partielle de la protéine. Avec l'utilisation de la MS, il devient alors possible de détecter et de localiser des modifications post-traductionnelles, d'étudier des interactions protéines-protéines ²¹ mais aussi de quantifier des protéines. En **Figure 1** est représenté le schéma d'une procédure classique pour l'identification d'une protéine par MS à partir d'un tissu.

Les peptides et protéines exprimés ainsi que leurs modifications post-traductionnelles sont généralement très dépendants de leur environnement, du temps mais aussi de la pathologie dans le cas d'études cliniques. Il est aussi bien connu que les protéines exprimées au sein d'un organisme sont très dépendantes de l'organe lui-même mais aussi du type cellulaire et de leur position dans le tissu qui est intrinsèquement reliée à son rôle. Il est donc très important de pouvoir caractériser de façon spécifique les molécules d'intérêt mais surtout

de pouvoir les localiser. Les techniques d'immunohistochimie sont généralement utilisées pour localiser les protéines dans une coupe, mais malgré le large succès de ces méthodes, cette approche nécessite la connaissance au préalable de la cible afin d'obtenir l'anticorps. Il est donc nécessaire d'extraire en premier lieu la protéine, de l'isoler par une méthode séparative et enfin de l'identifier par MS. L'immunohistochimie ne peut donc pas être employée pour localiser des composés inconnus mais surtout le nombre d'analyses simultanées pouvant être réalisées en une seule étape est très limité.

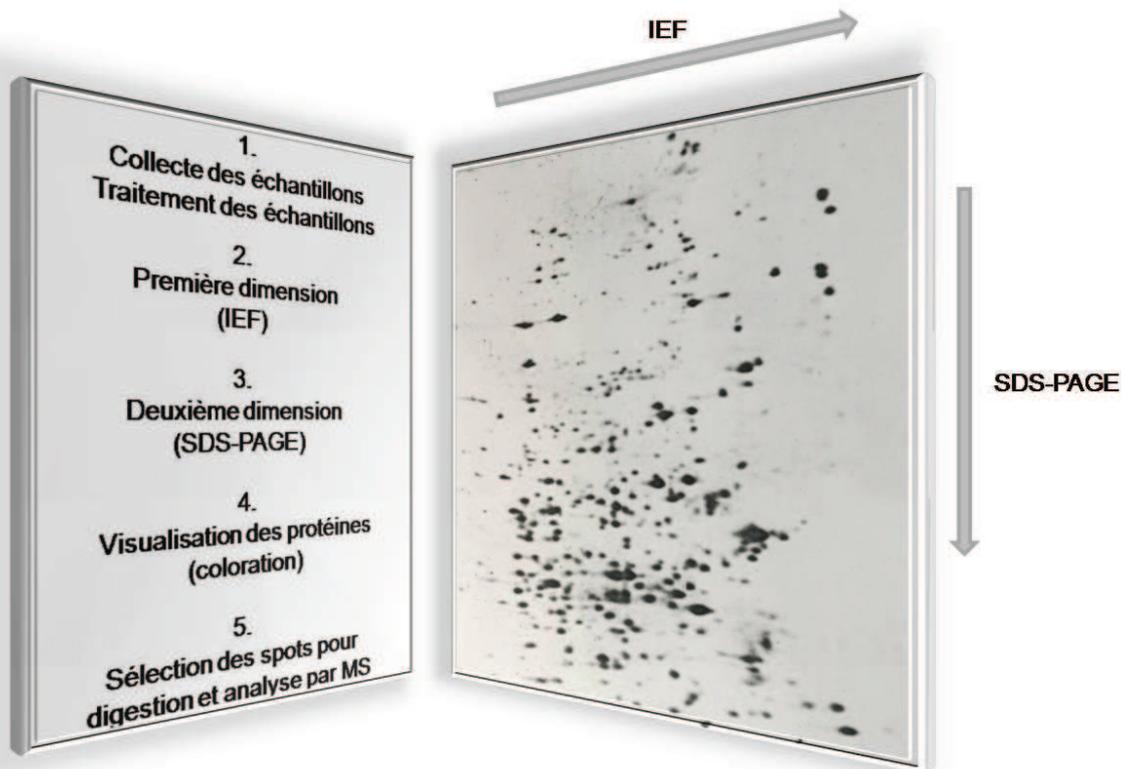


Figure 1 : Approche protéomique classique pour l'identification d'une protéine par MS à partir d'un tissu.

De la même manière, dans le cas d'études pharmaceutiques et plus particulièrement pour comprendre le comportement *in vivo* de médicaments potentiels il est essentiel d'étudier les propriétés des composés (absorption, distribution, métabolisme, élimination et toxicologie) à partir de modèles animaux ^{22, 23}. La complexité des échantillons biologiques (plasma, bile, urine, tissu...) nécessite le passage par des étapes de purification puis de séparation telle que la chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à la MS ²⁴. Il est clair que lorsque les échantillons sont homogénéisés afin d'en extraire les médicaments et/ou leurs métabolites, aucune information concernant leur localisation ne peut être obtenue. Les

techniques d'imagerie *in vivo* ou *ex vivo* telles que la tomographie ²⁵, l'autoradiographie ²⁶ et les nanotechnologies ²⁷ permettent la localisation des composés mais ces méthodes présentent des limites et en particulier par la nécessité de marquer de façon spécifique les molécules afin de les détecter. Ceci rend ces techniques relativement lourdes et longues. De plus, l'utilisation d'un marquage rend impossible la distinction entre le signal lié au médicament et celui lié aux métabolites.

Dans ce contexte, le développement de nouvelles méthodes d'imagerie moléculaire permettant la détection de différents composés endogènes ou exogènes dans un organisme (animal ou végétal) simultanément et sans nécessité de connaissances préalables sur les composés à rechercher i.e. sans marquage à l'échelle cellulaire voire sub-cellulaire, revêt un aspect important. Par 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. Ainsi, l'imagerie basée sur l'utilisation de la MS permet de répondre à de nombreux problèmes, notamment sur la détection de composés inconnus. Il n'est donc plus nécessaire de marquer les molécules, ni de posséder un anticorps pour les détecter. La MSI rend alors possible la détection et la localisation de centaines de composés dans des échantillons biologiques complexes. 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. 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. L'imagerie MALDI reste encore une technologie récente, qui nécessite de nombreux développements pour atteindre des performances compatibles avec les besoins des applications dans le domaine biologique.

La thématique de recherche développée au cours de ma thèse a porté sur l'amélioration des performances de l'imagerie MALDI des lipides, des peptides et des protéines, en abordant cet aspect principalement sous l'angle de la préparation des échantillons. Le présent manuscrit s'articulera donc en cinq parties.

Le **chapitre 1**, est un chapitre bibliographique, où sera détaillé le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse et où nous procéderons à une revue de l'état de l'art de la technologie.

Le **chapitre 2, partie expérimentale**, regroupera les méthodologies utilisées ainsi que les modes opératoires.

Le **chapitre 3** traitera de l'optimisation des méthodes pour la détection des molécules endogènes comme les lipides, les peptides et les protéines. Ce chapitre sera plus particulièrement dédié à l'étude de matrices MALDI plus adaptées à l'analyse des différentes classes de biomolécules d'intérêt ainsi qu'à la recherche de traitements des échantillons permettant une optimisation de l'analyse des composés d'intérêt.

Le **chapitre 4** abordera la problématique de l'identification des protéines à partir des tissus et sera dédié aux développements des stratégies de type imagerie en mode « Bottom-Up ».

Enfin, dans le **chapitre 5**, seront présentées les stratégies de dérivations N-terminales des peptides issus de la digestion enzymatique de protéines, méthodes développées pour améliorer les capacités d'identification des protéines directement à partir des tissus.

1. Imagerie par spectrométrie de masse

1.1. Principe

La MSI est une technique qui utilise les capacités de la spectrométrie de masse afin de détecter et de localiser les composés présents au sein d'un échantillon solide. En se basant sur la mesure du rapport m/z , elle permet en une seule étape d'acquisition d'obtenir la localisation d'un grand nombre de composés constituant la surface, que ceux-ci soient connus ou non, par analyse directe de l'échantillon. La MSI ne nécessite donc pas d'étapes d'extraction et/ou de séparation, mais reste en revanche comme la MS classique une méthode d'analyse destructive puisque les ions étudiés en phase gazeuse proviennent de l'arrachement des composés de la surface. Tout comme en MS classique, la MSI peut se décliner selon différentes méthodes, principalement dépendantes de la source de production d'ions utilisée, dont certaines ne permettent pas le fonctionnement en mode imagerie telles que les sources ESI, qui typiquement fonctionnent à partir d'un échantillon liquide, ou alors de manière indirecte et pour des applications sporadiques. Ainsi, sont principalement utilisées pour le mode imagerie, les sources de production d'ions basées sur un arrachement des composés de la surface suite à un bombardement, quelque soit la source du bombardement i.e. ions ou photons par exemple. Ainsi, en mode imagerie se retrouvent le plus souvent utilisées des méthodes permettant le passage des composés à l'état gazeux par bombardement par des ions, comme dans le cas du SIMS, ou de photons comme en MALDI ou en LA-ICP. Afin de conserver une dimension spatiale permettant de corrélérer à une position donnée une analyse, la MSI requiert la capacité de contrôler soit l'aire à partir de laquelle les molécules seront arrachées puis analysées, soit le maintien du trajet de l'ion pendant l'analyse afin de pouvoir déterminer la position d'origine des composés analysés. C'est ainsi que deux approches se distinguent en MSI, à savoir :

- ✓ **L'analyse en mode point par point (Figure 2a).** L'analyse en mode point par point est l'approche la plus couramment utilisée pour les expériences de MSI. Dans cette approche, il est nécessaire de pouvoir contrôler les dimensions de l'aire à partir de laquelle les composés seront arrachés. C'est alors ce paramètre qui définira la résolution spatiale de l'analyse, soit la résolution de l'image finale. En mode point par point, le faisceau incident (e.g. laser ou faisceau d'ions) est focalisé sur une aire définie de l'échantillon qui est alors analysée. Le spectre de masse résultant est alors

enregistré avec les coordonnées spatiales de l'aire ou spot. Ce procédé est ensuite répété jusqu'à ce que l'ensemble de l'échantillon soit balayé et que chaque spectre de masse associé à chaque position soit enregistré. L'étape d'acquisition génère ainsi une collection de données, i.e. de spectres repérés par leurs coordonnées d'enregistrement, qui se présente sous la forme d'une matrice à trois dimensions $[(x,y), m/z, I]$ regroupant les coordonnées, les m/z et leur valeur d'intensité. Les images moléculaires peuvent alors être générées via un logiciel de traitement des données qui permet d'extraire de cette matrice, pour un ion d'intérêt, soit un m/z donné, les variations d'intensité de ce m/z aux différentes coordonnées, et qui traduit ces variations d'intensité sur une échelle de couleur définie. Il convient de noter que dans cette approche, la limitation de la résolution spatiale est donnée par la taille de la zone irradiée. En mode point par point, dépendamment de la méthode utilisée, le déplacement d'un point à un autre peut s'effectuer de deux manières, par déplacement de l'échantillon sous le faisceau ou par déplacement du faisceau à la surface de l'échantillon.

- ✓ **L'analyse en mode microscope (Figure 2b).** La seconde approche est appelée mode microscope. Elle permet de générer des images moléculaires de la même manière qu'un microscope optique. A la différence du microscope optique qui utilise les photons, en mode microscope la source d'ions est utilisée pour générer les images à partir de la coupe (**Figure 2b**). Cette méthode est beaucoup plus rarement utilisée car beaucoup plus difficile et coûteuse à mettre en œuvre. 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. Par conséquent, cette technique est indépendante des dimensions de l'aire irradiée par le faisceau incident. La résolution spatiale ne dépend alors que du grossissement du microscope et de la résolution du détecteur de position d'ions utilisé. Ainsi, en mode microscope, le faisceau incident est défocalisé afin d'analyser une plus large partie de l'échantillon sans balayage. Cette dernière méthode nécessite l'utilisation d'une machine dédiée qui n'est à l'heure actuelle pas commercialisée, alors que le mode point par point, peut être réalisé avec tous les spectromètres de masse compatibles avec le mode imagerie.

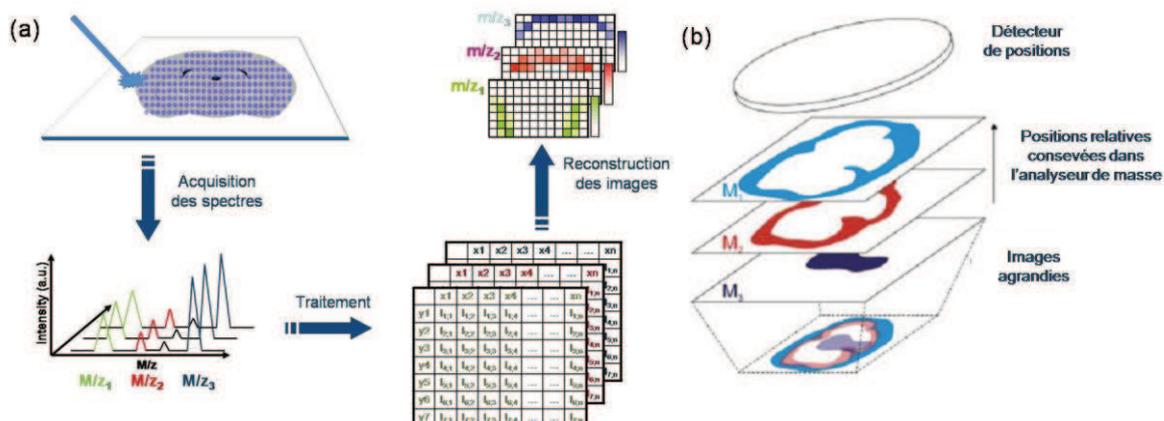


Figure 2 : Schéma représentatif des différents modes d'acquisition. (a) Mode point par point ou (b) mode microscope ²⁸.

1.2. Imageries par spectrométrie de masse

1.2.1. L'imagerie MALDI

1.2.1.1. Les sources MALDI

La source MALDI découle directement des méthodes de désorption/ionisation laser (LDI) ²⁹ qui utilisent des impulsions laser pour produire des ions à partir d'échantillons solides. Les sources LDI, ont permis, le développement de méthodes telles que la LMMS (Laser Microprobe Mass Spectrometry) ou le LAMMA (Laser Microprobe Mass Analyzer) permettant de cartographier des surfaces. Ces méthodes ont été utilisées pour réaliser des images à partir de nombreux échantillons et notamment d'origine biologique. En focalisant le laser au maximum, il était possible d'obtenir des images avec une résolution d'environ 500 nm ³⁰. Cependant, le LDI ne s'applique qu'aux composés de faible masse (< 300 u) et les rendements d'ions sont assez restreints par cette méthode qui entraîne de nombreuses fragmentations. Concernant les échantillons biologiques, cette approche permet l'analyse de compositions élémentaires ou de métaux de transition avec une bonne limite de détection et une très bonne résolution spatiale ^{31,32}.

L'analyse de composés de plus haut poids moléculaire est devenue possible par l'introduction en LDI du concept de matrice dans la seconde moitié des années 80 suite aux

travaux de F. Hillenkamp et M. Karas³³. En effet, lors de travaux sur l'analyse LDI d'acides aminés, les auteurs avaient pu observer une très nette augmentation des rendements de production des ions lors de l'analyse de mélanges d'acides aminés contenant des acides aminés absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé, et ce pour une irradiance inférieure au seuil habituellement nécessaire pour l'observation de ces espèces. C'est ainsi que l'hypothèse que ces acides aminés absorbant dans l'UV à une faible irradiance puissent être une matrice permettant la détection de composés intacts n'absorbant pas dans l'UV est née. La continuité de ces travaux a conduit à définir et utiliser des composés organiques de faible poids moléculaire absorbant dans l'UV comme matrice³⁴. C'est ainsi qu'en 1988, Hillenkamp et Karas purent présenter 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 telles que celles qui sont encore utilisées de nos jours. Parallèlement des travaux utilisant des matrices inorganiques permirent également d'obtenir des résultats. C'est ainsi qu'une fine poudre de métal en suspension dans le glycérol permit d'obtenir un signal pour des protéines et des polymères sans fragmentation³⁵. Cependant, l'intensité des signaux observés par utilisation de matrices inorganiques reste 500 à 1000 fois inférieure à celle obtenue par utilisation de matrices organiques.

Ainsi, 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 de petits composés organiques absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé et nécessaires au processus de désorption/ionisation des composés non volatils³⁶⁻³⁸. Avant l'analyse, un grand excès de matrice placé en solution est mélangé à une solution contenant les analytes puis déposé sur une surface plane, généralement métallique (i.e. inox) couramment appelée, cible MALDI. L'évaporation du solvant entraîne alors la formation d'un solide constitué de micro cristaux de matrice formant un réseau cristallin dans lequel est incorporé l'analyte (**Figure 3a**). Les mécanismes conduisant à l'observation des ions en phase gazeuse sont encore mal connus mais peuvent globalement se résumer comme ci suit. Lors de l'irradiation de ce dépôt par le faisceau laser, les photons émis sont absorbés par les molécules de matrice entraînant des transitions électroniques vers des niveaux plus élevés au sein du solide. La relaxation vers des niveaux électroniques plus stables, qui se traduit par une relaxation d'énergie sous différentes formes (chaleur, fluorescence,...) conduit à une éjection de matière (désorption des molécules de matrice entraînant avec elles les molécules d'analytes). Cette éjection produit un jet moléculaire gazeux appelé plume, principalement constitué de molécules neutres, et dans une

très faible mesure d'ions (quelques %) qui pourront être analysés ³⁹ (**Figure 3b**). Différents mécanismes peuvent être invoqués pour expliquer la formation des ions en MALDI comme la désorption d'espèces pré chargées ou encore l'ionisation par collision en phase gazeuse dans la plume en expansion par transfert de proton. A l'heure actuelle, l'hypothèse la plus raisonnable est de supposer que différents processus de formation des ions peuvent coexister. Quoiqu'il en soit, l'expérience montre que les espèces principalement 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 et 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 $[M-H]^-$.

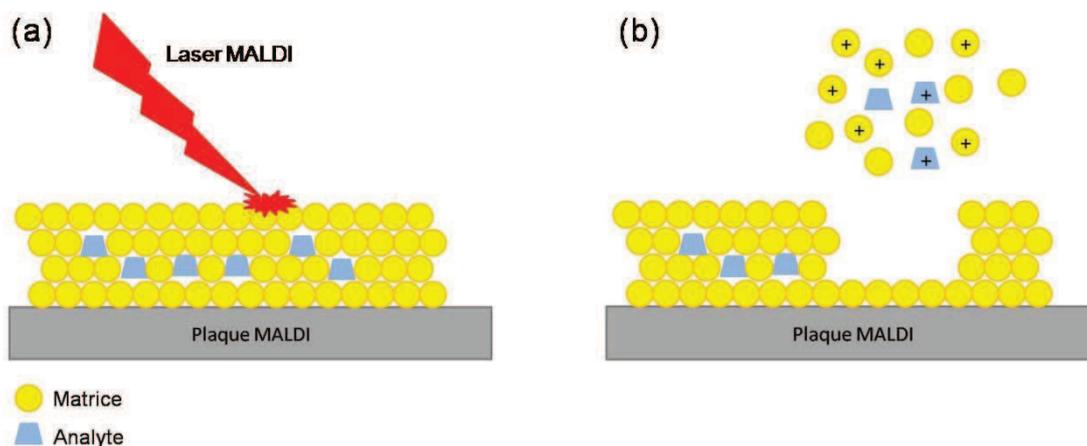


Figure 3 : Schéma simplifié du processus MALDI. (a) Les analytes et la matrice co-cristallisent sur la plaque MALDI. (b) Le laser impulsif MALDI entraîne la désorption des analytes et de la matrice puis l'ionisation s'effectue en phase gazeuse.

1.2.1.2. Les matrices MALDI

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. 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. Une des propriétés nécessaire mais non suffisante de la matrice est l'absorption à la longueur d'onde du laser. Il semble également que la capacité d'incorporation des analytes au sein des cristaux de matrice soit un paramètre important et notamment pour l'analyse de composés tels que les peptides et protéines. Malheureusement, le manque de connaissances des processus MALDI ne permet pas d'établir de règles prédéfinies permettant de sélectionner une matrice conduisant à de bonnes performances analytiques. Dans la plupart des cas, les recherches effectuées sur les matrices sont basées sur une approche empirique en prenant en compte quelques paramètres expérimentaux tels que la solubilité de la substance dans les solvants classiquement utilisés en MALDI ainsi que sa stabilité sous vide. Généralement, en UV-MALDI, les matrices sont de petites molécules organiques absorbant entre 266 et 355 nm dépendamment du laser utilisé. Typiquement, les matrices sont des substances possédant des groupements hydroxyles ou amines et des groupements acides et carbonyles (amide, cétone, acide carboxylique). De nombreuses études ont porté sur la mise au point de nouvelles matrices permettant d'augmenter le rendement d'ionisation, la résolution spectrale ou la classe de biomolécules pouvant être détectées. L'ajout de co-composés à la matrice a aussi été étudié. Par exemple, l'ajout de spermine à la matrice 6-aza-2-thiothymine (ATT) améliore la détection des oligonucléotides⁴⁰. D'autres études ont porté sur le mélange de matrices tel que le mélange acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB)/acide 2-hydroxy-5-methoxy-benzoïque ou super DHB (s-DHB) permettant l'analyse de protéines de haut poids moléculaire ou de protéines glycosylées. L'acide α -cyano-4-chloro-cinnamique (Cl-CCA), une nouvelle matrice dérivée de la matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) conventionnelle⁴¹ a été récemment présentée et montre certaines propriétés intéressantes pour la détection de lipides et de peptides^{42, 43} pour une longueur d'onde de 337 nm.

Aujourd'hui, il existe plusieurs composés couramment utilisés pour les analyses MALDI tel que l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB),⁴⁴ bien adapté pour l'analyse de composés de faible poids moléculaire, de polymères, de peptides, de protéines mais aussi de glycoprotéines. Les dérivés d'acides cinnamiques constituent également une classe de molécules intéressantes comme matrices⁴⁵ tels que l'HCCA⁴⁶ pour l'analyse de peptides et protéines, l'acide férulique (FA) ou l'acide 3,5-diméthoxy-4hydroxycinnamique (SA) pour l'analyse de protéines intactes. Les polyhydroxyacetophénones⁴⁷ 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. Les hétérocycles aromatiques tels que l'acide 3-hydroxycinnolique (3HPA) ou l'ATT sont aussi des matrices utilisées pour la détection des lipides ou des oligonucléotides⁴⁸. La **Figure 4** présente quelques exemples de matrices couramment utilisées en MALDI.

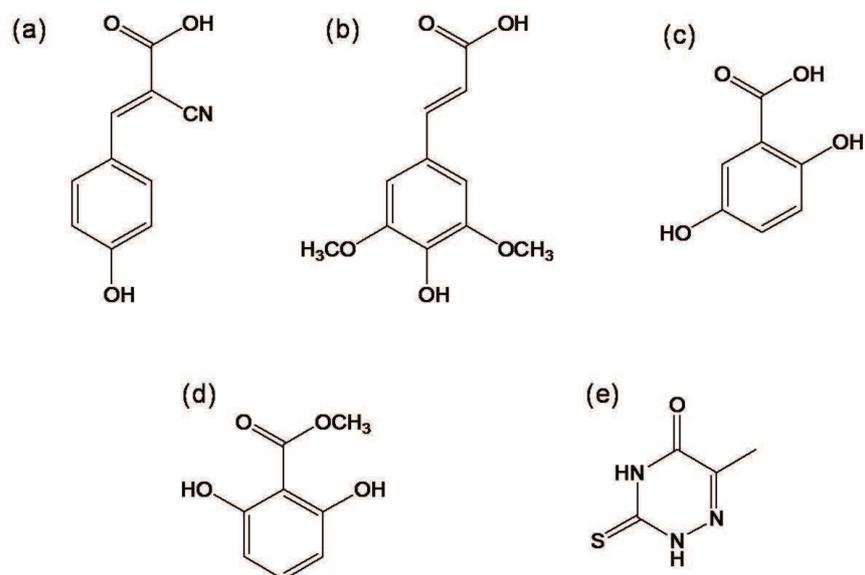


Figure 4 : Formules semi-développées des matrices les plus couramment utilisées: (a) α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), (b) acide 3,5-diméthoxy-4hydroxycinnamique (SA), (c) acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), (d) 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP) et 6-aza-2-thiothymine (ATT).

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 de la résolution spectrale⁴⁹. Ce phénomène connu sous le nom de « hot spot » génère des problèmes de reproductibilité rendant difficiles l'automatisation de l'analyse et la quantification. Ce phénomène est très dépendant de la matrice utilisée et de son mode de préparation (solvant, conditions de cristallisation). La matrice HCCA, par exemple, conduit à la formation de cristaux relativement homogènes en taille et en distribution tandis que dans les mêmes conditions de préparation, la 2,5-DHB conduit à la formation de longs cristaux en forme d'aiguille partant du bord du dépôt avec de nombreux « hot spot ». La suppression de ce phénomène de « hot spot » n'a, à ce jour, pu être obtenue. Différentes études incluant la microscopie confocale à balayage laser⁵⁰ ou l'imagerie MALDI⁵¹ ont porté sur cette problématique. Il est encore difficile de dire si ce phénomène est uniquement lié à la distribution de l'analyte dans les cristaux ou s'il provient de variations locales des interactions

matrice-analyte au sein des cristaux. Afin d'améliorer l'homogénéité des préparations, différentes méthodes de dépôts ont été étudiées et proposées. Parmi les plus connues et utilisées, il est possible de citer des méthodes telles que l'évaporation rapide^{52,53}, le dépôt par spray⁵⁴ ou encore l'utilisation de nouvelles matrices comme le système sol-gel⁵⁵, polymère formé à partir de la 2,5-DHB et permettant d'obtenir un dépôt homogène. Alternativement, l'homogénéité des dépôts peut-être améliorée par l'utilisation de matrices liquides qui ne possèdent généralement pas de « hot spot ». Différents types de matrices liquides existent. Ces matrices sont généralement retrouvées en IR (Infra red)-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 matrice⁵⁶⁻⁵⁹. Une autre approche est l'utilisation de glycérol dans lequel des matrices telles que la 2,5-DHB ou l'HCCA sont solubilisées⁶⁰. 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. ont proposé des matrices dites ioniques⁶¹ se basant sur les propriétés des liquides ioniques. Les liquides ioniques sont des sels organiques de formule du type $[A^+, B^-]$ obtenus par réaction acido-basique. Ces liquides ont des propriétés particulières. Ils possèdent notamment un point de fusion peu élevé ($<100^\circ\text{C}$), une faible pression de vapeur saturante, une bonne conductivité électrique comme le prouve certaines expériences d'électrochimie et de synthèse électrochimique⁶² et sont stables en dessous de 250°C ⁶³. Grâce à leur faible pression de vapeur saturante et à leur capacité à solubiliser de nombreuses substances, ces liquides ioniques ont été utilisés dans de nombreuses applications en chimie. En synthèse organique ils constituent des solvants recyclables. En chimie analytique, et notamment en chromatographie gazeuse, ils peuvent être utilisés en tant que phase stationnaire⁶⁴. Les matrices ioniques (MI) sont des liquides ioniques particuliers. Ce sont des sels organiques formés par un mélange équimolaire entre des matrices « classiques » comme HCCA, 2,5-DHB ou SA avec une base organique (e.g. aniline, butylamine, pyridine). Ainsi, les MI sont obtenues par réaction acido-basique du type : $MH + B \rightarrow [M^-, BH^+]$

Dépendamment du couple acide/base utilisé, ces matrices peuvent se présenter soit sous la forme liquide (ILM)⁶⁵, soit sous la forme solide (ISM)^{66,67}. La **Figure 5** présente à titre d'exemple les cristallisations obtenues avec la matrice 2,5-DHB versus la matrice ionique liquide 2,5-DHB/Butylamine.

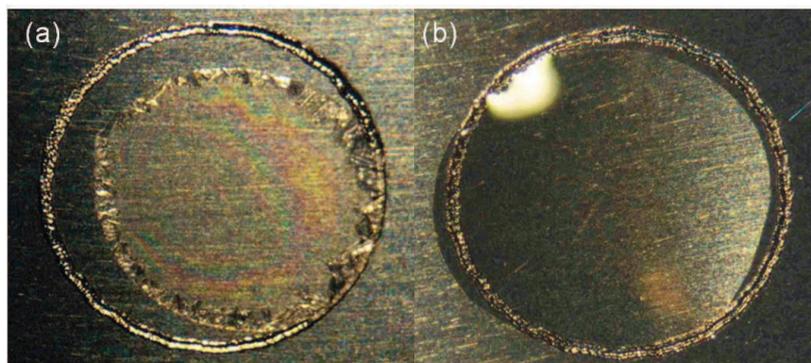


Figure 5 : Cristallisation obtenue avec (a) 2,5-DHB et (b) 2,5-DHB/Butylamine⁶⁸.

Différentes MI ont été, à ce jour, synthétisées et étudiées. Elles présentent toutes des propriétés analytiques différentes et permettent donc de détecter différentes classes de composés dont les biomolécules et notamment les peptides^{69, 70}, les phosphopeptides⁷¹, les protéines⁶⁸, les lipides⁷² et les saccharides^{73, 74}. Les matrices ioniques sous la forme liquide sont parfaitement homogènes en répartition. L'homogénéité des analytes dans ces liquides y est également très nettement améliorée permettant ainsi d'améliorer les performances de quantification^{69, 75}.

1.2.1.3. 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*^{76, 77}. Par la suite de nombreuses études ont porté sur des nerfs, sur des cellules neuroendocrines d'invertébrés⁷⁸⁻⁸⁰ de vertébrés et sur des neurones de l'aplysie^{81, 82}, des neurones de la limnée⁸³⁻⁸⁵. Dans le cadre de l'analyse par imagerie, les premiers travaux ont été réalisés par l'équipe du professeur Caprioli⁸⁶. Dès lors, de nombreux développements ont été entrepris jusqu'à l'automatisation de la méthode⁸⁷.

1.2.1.4. Imagerie MALDI et développements

L'imagerie MALDI consiste à générer des images à partir d'échantillons solides par acquisition automatisée des données en mode point par point ou microscope comme décrit précédemment. Les solides étudiés se présentent généralement sous la forme de surfaces

minces obtenues par coupes dans les blocs de solides. Nous nous focaliserons, ici, sur l'analyse de surface obtenue à partir d'échantillons biologiques et notamment animaux, domaine d'application privilégié de l'imagerie à l'heure actuelle. Dans le cas d'échantillons obtenus à partir d'animaux ou des organes de ces derniers, les échantillons étudiés sont alors, en général sous la forme de sections minces de tissus obtenues par différentes méthodes de coupe. 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 qui seront 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 6** 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 ainsi que le traitement des données pour leur visualisation sous la forme d'images. A tous les niveaux de cette séquence des développements ont été réalisés aux fils des ans depuis l'introduction de la méthode, dans le but d'améliorer les performances de l'imagerie MALDI tant au niveau de la qualité des analyses (sensibilité, reproductibilité, résolution spectrale, rapport signal/bruit, gamme de masse, nombre de composés détectables) que de la résolution spatiale des images ou encore du temps d'acquisition et du traitement des données. Les différents développements réalisés seront abordés dans les paragraphes suivant en les regroupant par thèmes suivant la séquence d'imagerie MALDI.

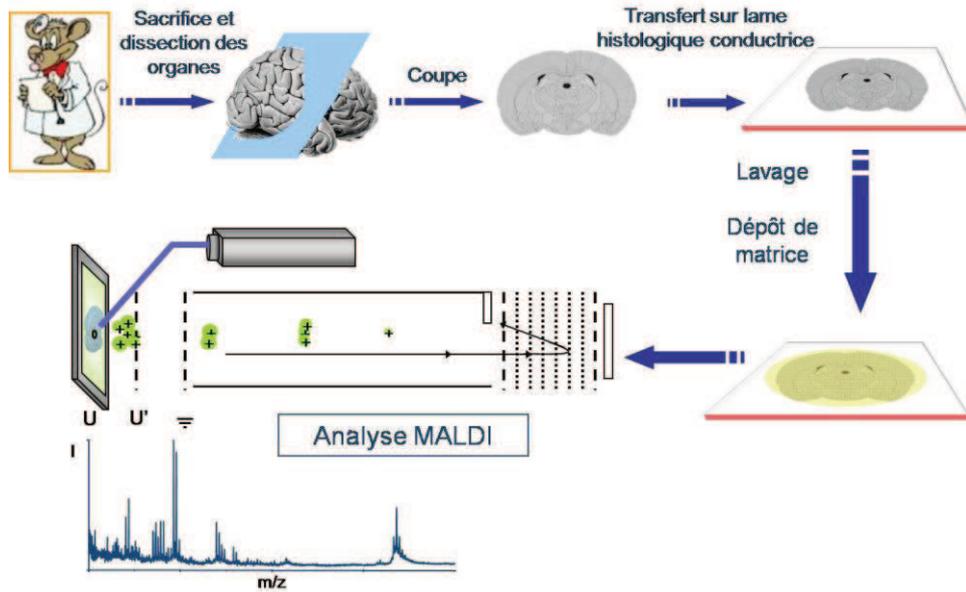


Figure 6 : Schéma représentatif d'une expérience d'imagerie MALDI.

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. Il faut tout d'abord contrôler la préparation du tissu pour sa conservation future. En effet, il faut absolument pouvoir contrôler que le tissu ne subira aucune altération *i.e.* que les composés constituant le tissu ne vont ni subir de dégradations ni diffuser dans le tissu. Après avoir été disséqués le plus rapidement possible, les échantillons subissent un traitement permettant de préserver les structures tissulaires tout au long de la conservation. 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 dépendamment si l'utilisateur choisit de conserver les échantillons congelés, fixés puis congelés ou fixés puis inclus dans un milieu (le plus souvent en milieu paraffine). Dans le premier cas, les échantillons seront congelés par congélation rapide dans l'azote liquide ou l'isopentane refroidi. Cette méthode est rapide et ne met en jeu ni de composés ou de réactions chimiques qui ne seraient pas compatibles avec l'analyse. Cependant, il a pu être observé que la stabilité des échantillons conservés par simple congélation rapide (-80°C) est toute relative et ne dépasse pas quelques mois. De plus, pour ces échantillons, les structures fines des tissus seront moins bien conservées lors de la réalisation des coupes qui seront alors obtenues à froid (-18°C à -20°C) sur un cryostat. Afin d'assurer une plus grande stabilité aux

échantillons, il est également possible de fixer ces derniers. De nombreuses fixations existent et sont connues en histochimie. Couramment les échantillons peuvent être déshydratés à l'alcool (EtOH) ou encore fixés à l'acide acétique ou au paraformaldéhyde. Certaines fixations n'affectent pas les tissus du point de vue moléculaire comme l'EtOH alors que d'autres peuvent entraîner des modifications moléculaires importantes comme le paraformaldéhyde. Malheureusement, de nombreux protocoles de fixation ont été développés de manière empirique et les réactions et modifications chimiques générées par ces fixations ne sont pas toujours bien connues. Le paraformaldéhyde, par exemple, entraîne différentes modifications moléculaires et en particulier une réticulation des protéines par formation de ponts méthyles aux travers des lysines, des thiols, ou des fonctions alcool des chaînes latérales des acides aminés⁸⁸⁻⁹⁰. La fixation offre une bien meilleure stabilité aux échantillons du point de vue moléculaire et permet ainsi de les conserver sur de plus longues périodes de temps en minimisant les altérations moléculaires. La fixation peut être suivie d'une simple congélation à -80°C ou d'une inclusion dans un milieu comme la paraffine. L'inclusion après fixation offre l'avantage de permettre une meilleure préservation des structures après réalisation des coupes dans le bloc de tissu, les coupes étant alors obtenues sur un microtome. Une des méthodes de préparation fréquemment utilisée pour la conservation des échantillons reste 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 et peuvent même être conservés à température ambiante. Cette méthode de préservation des tissus *i.e.* FFPE est la méthode de référence pour la conservation des échantillons tissulaires (biopsies) en milieu hospitalier. C'est ainsi que des banques de tissus hospitaliers ont été créées et sont conservées sur plusieurs décennies. Cependant, si les échantillons FFPE sont particulièrement avantageux pour leur stabilité dans le temps et la finesse de préservation des structures tissulaires après coupes, ces échantillons ne sont pas immédiatement compatibles avec l'analyse MALDI. En effet, si les échantillons congelés peuvent être directement utilisés pour l'acquisition de données à partir des tissus après dépôt de la matrice, il n'en est pas de même pour les tissus FFPE. Une alternative consiste à préserver les échantillons après fixation EtOH suivie d'une inclusion en paraffine. L'EtOH entraîne une déshydratation des tissus mais ne génère pas de modifications moléculaires pouvant rendre difficile l'analyse MALDI des tissus comme l'ont montré les travaux de Caprioli et coll⁹¹. Cependant, si les analyses de ces tissus ne nécessitent pas la mise en œuvre de traitements particuliers, ils ne possèdent pas la même stabilité dans le temps. Pour les tissus FFPE, la paraffine peut être aisément retirée de la coupe de tissu par utilisation de différents solvants bien connus

permettant de solubiliser la paraffine comme les bains de toluène ou d'octane suivis par des étapes de réhydratation des tissus. En revanche, la réticulation des peptides/protéines voir de certains lipides et des oligonucléotides rend leur analyse quasi impossible. Néanmoins, l'utilisation de tels tissus en imagerie MALDI est primordiale pour ouvrir l'accès aux banques de tissus hospitalières dans le cadre des applications dans le domaine clinique. Sachant qu'il n'est pas possible de réverser complètement la réaction de réticulation, des méthodes alternatives ont été développées pour l'analyse de ces tissus. Il est possible de réverser partiellement la réticulation par utilisation de différents réactifs et méthodes comme l'utilisation d'EDTA ou de citrate d'ammonium en combinaison avec des conditions de haute température et pression. Ces processus, initialement développés pour démasquer les épitopes des antigènes en immunohistochimie (IHC) sont connus sous le nom de procédés de démasquages des antigènes ou « Antigen Retrieval (AG) »⁹²⁻¹⁰¹. L'analyse de tissus FFPE tels quels après déparaffinage en MALDI permet d'observer des signaux faibles et peu nombreux qui peuvent être élargis par la présence d'adduits à +12u. traduisant des sous réactions dans les tissus liés au fixateur¹⁰². Cependant, pour des temps de conservation supérieurs à une année, l'analyse de ces échantillons ne permet plus de recueillir de données exploitables. L'utilisation de procédés d'Antigen Retrieval est également efficace pour l'imagerie MALDI, mais, ils ne sont, à eux seuls, pas suffisants pour obtenir des analyses de qualité. Finalement, des procédures spécifiques ont été développées pour l'analyse de ces tissus, par utilisation de digestions enzymatiques *in situ* des tissus et notamment par utilisation de la trypsine afin de générer des fragments de protéines analysables à partir des protéines réticulées¹⁰². Le développement de digestions enzymatiques *in situ* des tissus FFPE permet l'analyse et l'imagerie quelque soit leur temps de conservation¹⁰². Les processus de digestion peuvent être combinés aux AG comme le montrent certains travaux^{103, 104}.

Si la méthode de conservation des échantillons conditionne la stratégie d'analyse MALDI des tissus, la réalisation des coupes est également une étape importante de la préparation, qui doit être standardisée afin d'éviter notamment d'éventuelles contaminations des échantillons qui génèreraient des signaux artéfactuels dans les spectres durant les analyses. Par exemple, pour les coupes réalisées à partir d'échantillons congelés sur un cryostat, l'utilisation de la colle appelée OCT (Optimal Cutting Temperature), qui permet de fixer le tissu sur le support du cryostat pour réaliser la coupe, doit être manipulée avec précaution. Dans le cas d'expériences de coloration histologique, la méthode classique consiste à enrober le tissu dans un milieu tel que l'agar ou l'OCT (**Figure 7B**) permettant de stabiliser le tissu mais aussi de faciliter la réalisation de la coupe. Cependant, cette technique

n'est pas adaptée à la MS, l'OCT étant un polymère pouvant créer une suppression d'ions jusqu'à 50% en MALDI ¹⁰⁵ (**Figure 7**). Il est donc important de coller le tissu sur le support en utilisant la quantité minimum d'OCT, afin d'éviter tout contact avec le tissu à analyser, et de proscrire tout enrobage dans un tel milieu (**Figure 7A**). Il faut également préciser que les tissus utilisés présentent une épaisseur classique allant de 7 à 15 μm suivant les cas de figures. Ces coupes sont ensuite transférées sur le support permettant l'analyse MALDI. Dans ce domaine des progrès ont également été réalisés. Au tout début de l'imagerie MALDI les coupes de tissus étaient simplement transférées sur la cible MALDI. Ceci présentait le net inconvénient de ne permettre aucune observation de l'échantillon avant ou après analyse. Ainsi, sont maintenant utilisées classiquement comme supports, des lames de verre telles que les lames utilisées en histologie. Dépendamment de l'instrument utilisé, de simples lames de verre servent de support ou des lames de verre recouvertes d'une fine couche métallique conductrice comme pour les analyses en MALDI-TOF où les hautes tensions appliquées sur le support requièrent une bonne conductivité. Ces dernières qui permettent de préserver les propriétés de transparence sont obtenues par dépôt d'un alliage d'Oxyde Indium Etain ou Indium Tin Oxyde (ITO). Avant analyse, les coupes sont complètement déshydratées. Cette opération s'effectue en général par utilisation d'une cloche à vide.

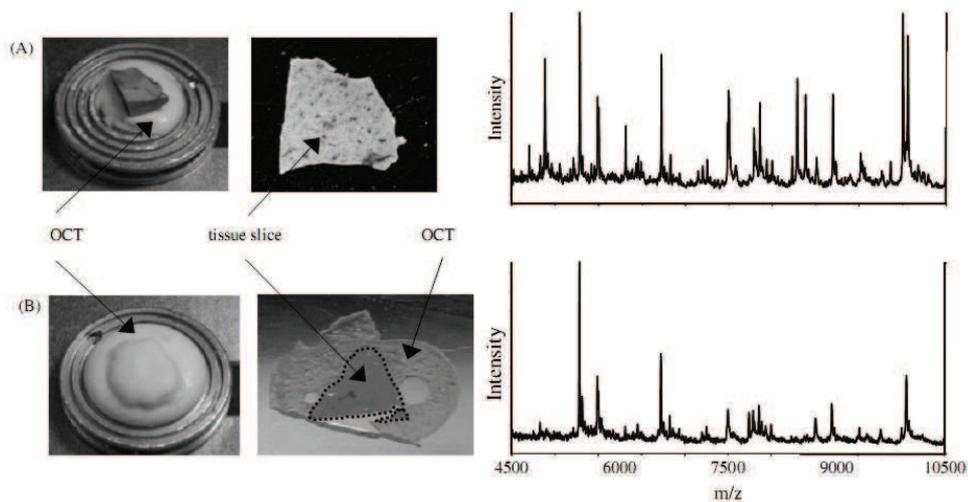


Figure 7 : (A) Spectre obtenu à partir d'une coupe de foie juste collée à la base avec l'OCT. (B) Spectre obtenu à partir d'une coupe de foie enrobée dans l'OCT ¹⁰⁵.

Si les étapes de préparation, de conservation et de coupe des tissus sont primordiales et conditionnent la stratégie d'analyse et la qualité de ces dernières, des 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^{105, 106}. Comme montré en **Figure 8**, de tels traitements se traduisent sur les spectres par une augmentation de l'intensité des signaux et du nombre de pics détectés.

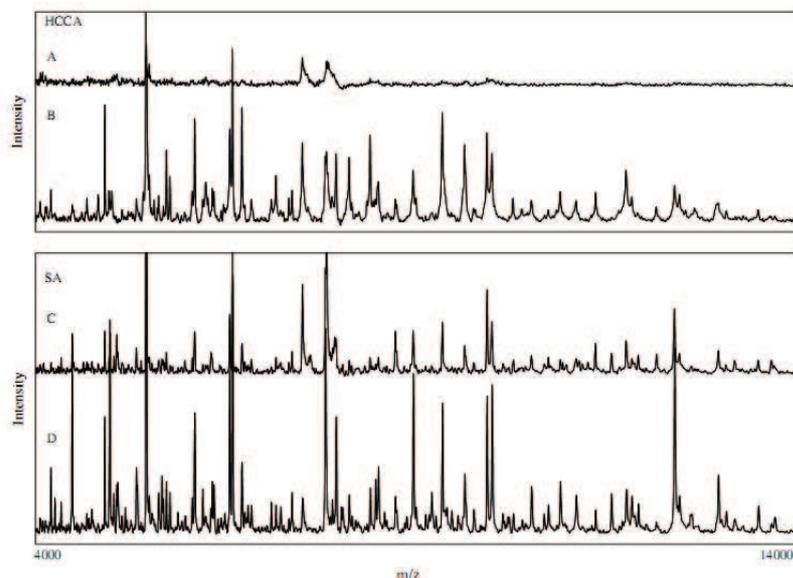


Figure 8 : (A-B) Analyse directe après dépôt de HCCA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH. (C-D) Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe non traité à l'EtOH et traitée à l'EtOH¹⁰⁵.

Il a aussi été montré que l'utilisation de solvants peu polaires ou hydrophobes comme le xylène, le chloroforme ou l'hexane améliorerait grandement la qualité des spectres (intensité des signaux et nombre de signaux détectés) pour l'analyse de peptides et protéines en permettant le retrait d'un grand nombre de lipides tels que des phospholipides¹⁰⁷ (**Figure 9**). 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, en simplifiant le milieu analysé par retrait de composés abondants comme certaines classes de lipides. 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 un produit de solubilité élevé pour les solvants utilisés pour les lavages ce qui pourrait 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.

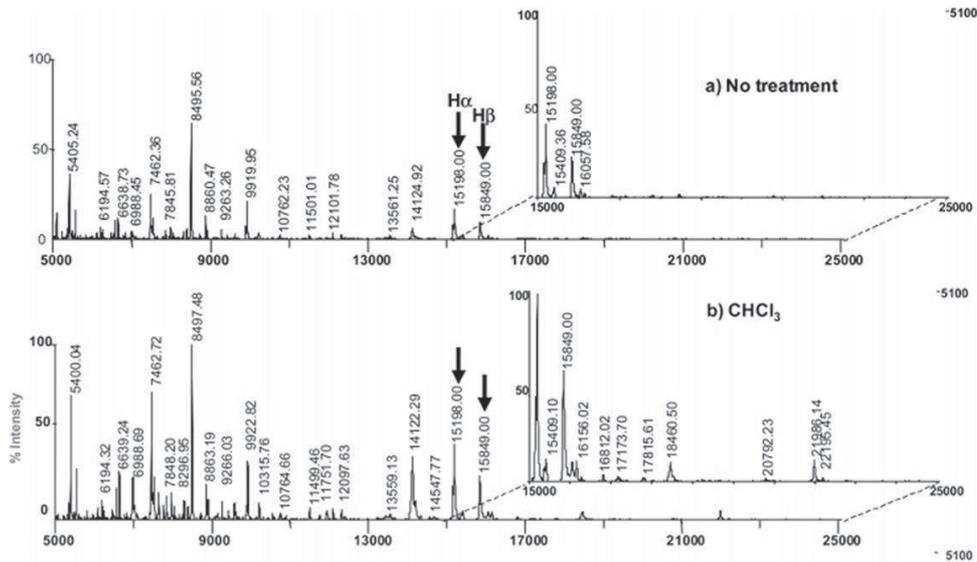


Figure 9 : Analyse directe après dépôt de SA sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée et (b) après traitement chloroforme¹⁰⁷.

D'autres travaux réalisés par Caprioli et coll. ont confirmé le rôle des étapes de lavages sur l'amélioration de la qualité des spectres de protéines¹⁰⁶. Dans ces travaux, de nombreux solvants ont été testés incluant différents alcools ou des solvants plus hydrophobes comme le xylène, le chloroforme ou l'isopropanol. La **Figure 10** présente les spectres obtenus en fonction de chacun des traitements employés.

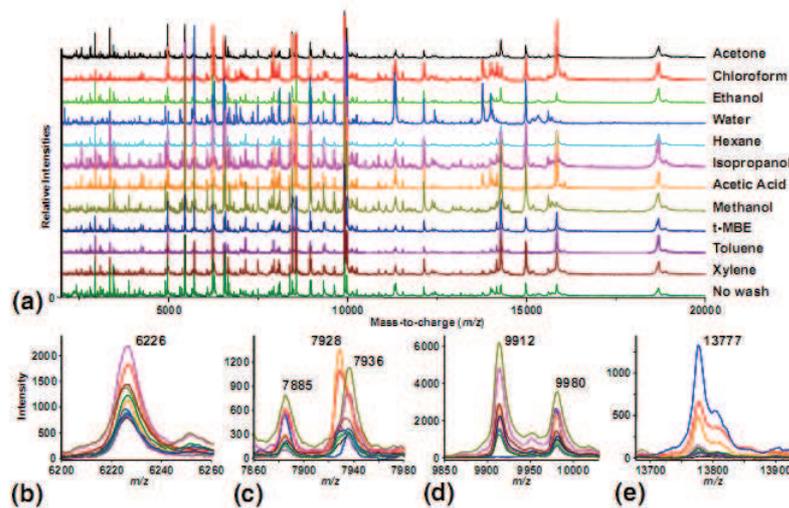


Figure 10 : Spectre moyen de protéines obtenu à partir d'une coupe de foie de souris. (a) Spectre moyen pour chaque lavage, (b-e) Profil des pics obtenus pour 4 protéines après chaque traitement¹⁰⁶.

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 pourraient induire la délocalisation de molécules d'intérêt. Ceci est en particulier observé pour les peptides qui présentent une plus grande solubilité que les protéines. Pour les lipides, aucun traitement n'a été proposé pas plus que dans le cas des médicaments. Il faut souligner la difficulté de trouver des traitements permettant de retirer par exemple des peptides ou protéines sans retirer les lipides eux-mêmes. Pour ces composés de faible masse, il convient en général d'optimiser les méthodes en testant différentes matrices et solvants en fonction des propriétés physico-chimiques des molécules.

Choix de la matrice. Avec la préparation de l'échantillon décrit précédemment, 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 généralement employée est la 2,5-DHB^{108,109} 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 SA¹¹⁰. Bien que ces matrices restent, à ce jour, les plus utilisées en imagerie MALDI, 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 pouvaient offrir de nombreux avantages pour l'imagerie MALDI. Les études réalisées par Lemaire et coll.⁶⁶ ont ainsi permis de démontrer que l'utilisation des matrices ioniques solides (SIM) permettait d'augmenter les performances analytiques à partir des tissus et donc conséquemment la qualité des images. Ainsi, différentes SIM à base d' HCCA ont été testées. La **Figure 11** présente les cristallisations obtenues avec différentes SIM.

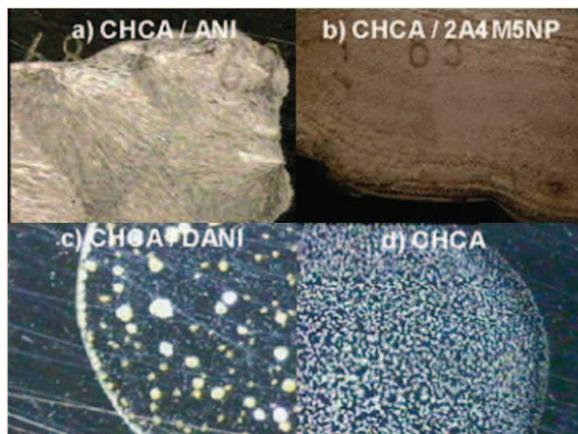


Figure 11 : Crystallisation des matrices (a) HCCA/ANI (Aniline), (b) HCCA/2A4M5NP (2-amino-4-methyl-5-nitropyridine), (c) HCCA/DANI (N,N-dimethylaniline) et (d) HCCA ⁶⁶.

Il apparait clairement que la nature de la base organique ajoutée influence les propriétés de la MI résultante. Ainsi, la cristallisation est extrêmement différente d'une MI à l'autre. La matrice HCCA/Aniline (ANI) notamment montre une cristallisation très homogène en comparaison de la matrice classique HCCA. D'un point de vue analytique, cette matrice s'est révélée présenter 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 ainsi 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. Depuis, d'autres groupes ont utilisé ces matrices dans la cadre d'expériences d'imagerie MALDI pour la détection de peptides de digestion enzymatique ¹¹¹ dans le cadre de la recherche de biomarqueurs du cancer du sein, pour la détection de gangliosides ¹¹² ou encore pour la détection de biomarqueurs du cancer de l'ovaire ¹¹³.

Le dépôt de matrice. Un point incontournable de la préparation des échantillons pour l'imagerie MALDI est le choix et le dépôt de la matrice MALDI. Le choix de la matrice par lui-même conditionnera l'analyse comme présenté précédemment et dans la section matrice MALDI. Lors de l'analyse de tissus, le problème est encore plus complexe. La solution de matrice utilisée doit également permettre l'extraction d'un maximum de composés d'intérêt afin de favoriser la co-cristallisation entre la matrice et les analytes. En imagerie, cette co-cristallisation doit être particulièrement homogène car l'analyse automatisée ne peut souffrir de l'existence de « hot spots » au sein des dépôts. La matrice utilisée doit également être

particulièrement stable sous vide car les acquisitions peuvent être longues. Il faut également que la cristallisation soit la plus homogène possible à la surface de l'échantillon afin de ne pas laisser de zones sans matrice qui ne fourniraient pas de signal. La taille des cristaux de matrice n'est pas non plus à négliger et doit être homogène pour des raisons de reproductibilité. Les cristaux doivent être les plus petits possibles afin de pouvoir atteindre la meilleure résolution spatiale possible. L'ensemble de ces paramètres influencera les performances analytiques et la résolution des images. De plus, le dépôt de la matrice par lui-même ne doit pas conduire à la délocalisation des analytes au sein des tissus. De nombreux développements ont été réalisés ces dernières années dans ce domaine et en particulier de nombreux travaux ont porté sur l'amélioration des méthodes de dépôt de la matrice afin de minimiser la délocalisation des composés et d'obtenir des cristallisations plus homogènes tout en préservant les performances analytiques.

En MALDI, les méthodes de dépôt les plus connus sont le dépôt « dried-droplet », le dépôt en couche mince ou le dépôt en sandwich ¹¹⁴. Cependant ces méthodes sont mal adaptées (couche mince et sandwich) à l'imagerie MALDI ou entraînent des délocalisations au sein des tissus (dried-droplet). Ainsi, différentes procédures alternatives se sont développées pour optimiser le dépôt de la matrice à la surface du tissu. Aujourd'hui, de nombreuses méthodes d'applications de matrices sur tissu 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 12** présente ces trois stratégies de dépôt de la matrice *i.e.* le dépôt par micropipette, par spray et par micro-dépôts.

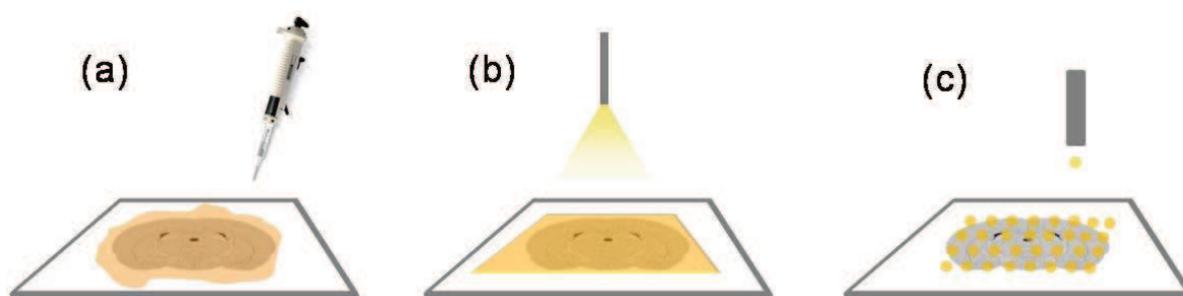


Figure 12 : Dépôt de matrice (a) manuel, (b) par spray et (c) par micro-dépôts.

L'approche la plus rapide et la plus simple est le dépôt de la matrice avec la micropipette (**Figure 12a**), méthode relativement similaire à la dried droplet mais pratiquée à plus grande échelle. Cette technique permet une analyse rapide du tissu avec une bonne extraction des molécules mais ce dépôt souffre d'une faible reproductibilité et entraîne la délocalisation de certaines molécules dans le tissu. De plus, le dépôt pipette ne permet pas de générer une cristallisation homogène à la surface du tissu pour toutes les matrices. Ce dépôt fut le premier utilisé historiquement en imagerie MALDI mais n'est plus utilisé que pour les analyses directes de tissus ne nécessitant pas l'obtention d'images et a été remplacé au profit de méthodes plus performantes.

Une autre méthode permettant l'application de la matrice sur les tissus consiste à nébuliser la solution de matrice (**Figure 12b**). La nébulisation fournit un dépôt très homogène de la matrice sur la coupe dépendant du débit du spray, de la distance à l'échantillon ainsi que du temps de nébulisation. Différentes méthodes permettent de réaliser une nébulisation de la solution de matrice. La méthode la plus simple et la moins onéreuse consiste à utiliser un nébulisateur manuel par utilisation d'un sprayeur pneumatique ^{105, 115}. Pour plus de reproductibilité, la nébulisation peut être automatisée et différents types de robots peuvent alors être utilisés ^{116, 117}. La nébulisation présente l'avantage de générer de petites gouttelettes réparties de façon homogène à la surface des tissus conduisant à la formation de petits cristaux de matrice. Les dimensions des cristaux sont le plus souvent inférieures au diamètre du faisceau laser et permettent par conséquent de réaliser des images à haute résolution spatiale. Parmi les différentes techniques de nébulisation, le spray manuel est facile mais présente le désavantage d'être peu reproductible. La nébulisation idéale serait l'Electronébulisation (ES). En effet, l'ES génère un brouillard de gouttelettes particulièrement fin conduisant à la formation d'une couche fine et homogène de cristaux de matrice de faibles dimensions. De plus, ce mode de dépôt est extrêmement reproductible et est parfait pour atteindre une très grande résolution spatiale. Cependant, avec ce type de dépôt, l'efficacité d'extraction des composés des tissus et donc leur incorporation dans les cristaux de matrice est faible à cause du très faible volume de solvant déposé sur la coupe. Ainsi, si cette technique génère des dépôts quasi parfaits de matrice, les spectres MS résultants présentent une qualité nettement moindre en termes de sensibilité, nombre et intensité des pics, et en particulier dans le cas des peptides et protéines. A l'inverse, les meilleures qualités spectrales sont toujours obtenues pour les dépôts à la micropipette, où le volume de solvant déposé est grand, et même s'il induit une délocalisation de certains composés, il permet une bonne extraction et incorporation de ceux-ci dans les cristaux de matrice. Ainsi, il faut trouver le

meilleur compromis entre la résolution spatiale des images et la qualité des analyses. L'un des systèmes de spray automatique, l'ImagePrep (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne), récemment développé, permet de créer un aérosol de matrice par vaporisation vibrationnelle sous atmosphère contrôlée ¹¹⁸. Cet appareil contrôle la durée de spray, le temps de séchage donc l'extraction ainsi que l'épaisseur de la couche de matrice. D'autres procédés telles que la sublimation de matrice sur la coupe de tissu ¹¹⁹, l'application de matrice sans solvant ¹²⁰ ou l'utilisation d'un aérographe ¹²¹ ont été développés et étudiés afin de couvrir de façon homogène les coupes de tissus. Néanmoins, ces dernières techniques ne peuvent être utilisées que pour l'analyse des petites molécules telles que les lipides ou les composés ne nécessitant pas d'incorporation dans les cristaux de matrice pour leur désorption/ionisation.

Une alternative aux méthodes de spray est le dépôt de micro ou nano volumes de solution de matrice sur le tissu. Cette technique de micro-dépôts permet de couvrir soit l'ensemble de la coupe pour des analyses d'imagerie ou de pratiquer des dépôts ponctuels dans des régions bien définies de la coupe de tissu pour des analyses directes en mode « profiling ». Différents modes de micro-dépôts ont été développés. Cependant, il faut mentionner que quelque soit la méthode de dépôt, la délocalisation des composés n'excède pas la taille du spot généré *i.e.* généralement de l'ordre de 150 μm . Les principaux avantages de cette stratégie sont l'efficacité d'extraction des composés entraînant une meilleure incorporation de ceux-ci dans les cristaux de matrice ainsi que la grande reproductibilité des dépôts. Les micro-dépôts peuvent être réalisés par utilisation d'une onde acoustique ¹²², par jet d'encre ¹²³⁻¹²⁵ mais également par dépôt par capillarité en utilisant par exemple un robot de dépôt de nano LC-MALDI ¹⁰². Il existe à l'heure actuelle, de nombreuses procédures pour l'application de la matrice sur les coupes mais toutes 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 1** répertorie certains des instruments disponibles à l'heure actuelle pour le dépôt automatique de matrice.

Nom	Constructeur	Méthode de dépôt	Taille de dépôt
ImagePrep	Bruker	Vaporisation vibrationnelle	25 μm
Chemical inkjet printing (CHIP 1000)	Shimadzu Biotech	Piézo-électrique	200 μm
TMiD	LEAP Technologies	Ejection par Nano-Pompe	200 μm
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Dépôt par un Capillaire	150 μm
Portrait™ 630 Reagent Multi-Spotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	200 μm
NC	Siliflow	Piézo-électrique	300-600 μm

Tableau 1 : Liste de certains appareils utilisés pour le dépôt automatique de la matrice sur les tissus.

Imagerie MALDI et instrumentation. 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 dont la gamme de masse est illimitée. Cet analyseur est donc parfaitement adapté à l'analyse de biomolécules mono-chargées et donc aux ions produits en MALDI. Actuellement, le TOF reste le seul analyseur permettant l'imagerie de composés de haut poids moléculaire $M > 5000$ u. tels que certains peptides ou les protéines. Le TOF est également extrêmement sensible et possède un cycle utile très rapide puisqu'il faut au maximum (dépendamment des conditions instrumentales) une centaine de μs pour que des ions de plusieurs centaines de milliers en m/z arrivent au détecteur. Ainsi, ces appareils permettent de réaliser des images à haut débit en augmentant la fréquence de répétition des tirs laser sans qu'existe une collusion avec le temps d'analyse. Cependant, l'une des limitations du TOF reste sa résolution spectrale. En moyenne, la résolution spectrale sera d'environ 20 000-30 000 pour un m/z de 1500 environ. Ainsi, des composés présentant des masses très proches

peuvent ne pas être distinguables sur les spectres TOF, les pics des deux ions se trouvant confondus en une seule enveloppe.

Néanmoins, si les TOF sont le plus souvent le couplage naturel 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-ICR¹²⁶ peut palier à ces problèmes de résolution spectrale puisque sur ces analyseurs des résolutions spectrales jusqu'à 1 000 000 peuvent être atteintes¹²⁷. 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 pour l'analyse des composés de faible poids moléculaire comme les lipides ou des médicaments¹²⁸ mais semblent moins sensibles pour l'analyse des composés de plus haute masse comme les peptides. 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 ionique¹²⁹⁻¹³⁴ couplée à une source MALDI. La mobilité ionique permet, dans une première dimension, de séparer les ions suivant leur conformation en phase gazeuse représentée par la grandeur de la section efficace des molécules. Ces ions sont ensuite de nouveau séparés selon leur m/z . Des composés de m/z proches peuvent présenter des séquences et structures très différentes. Ainsi typiquement ces composés ne présenteront pas la même valeur de mobilité ionique. Il devient alors possible de séparer ces ions sur les cartes 2D permettant de visualiser les données en reportant le m/z versus la mobilité des ions. L'utilisation d'une mobilité ionique couplée à une source MALDI est efficace pour ces problématiques et permettent de distinguer des ions isobares à partir de tissus¹³⁵. D'autre 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 tissus¹³⁶⁻¹³⁸ ainsi que des lipides¹³⁹. Avec l'avancé dans le domaine de la MS, de nombreux appareils dits « hybrides » sont également maintenant disponibles comme les instruments quadripôles-temps de vol (Q-TOF)¹⁴⁰, les quadripôles-trappes ioniques (QIT) couplées à un TOF¹⁴¹ ou les MALDI dits TOF/TOF¹⁴². Ces instruments offrent également de bonnes performances pour l'analyse directe et l'analyse structurale des molécules directement à partir des tissus. Chaque analyseur et/ou combinaison d'analyseur offrira alors un instrument avec des spécifications qui lui sont

propres et donc des avantages et inconvénients. Il convient alors de choisir l'instrument le plus adapté aux études à mener. Le **Tableau 2** répertorie certains des instruments disponibles à l'heure actuelle 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	Axima2Analyse	Analyse
AXIMA series	Shimadzu	TOF	N2 50Hz	500kDa	100µm	Axima2Analyse	Analyse
AXIMA Performance	Shimadzu	TOF/TOF	N2 50Hz	500kDa	100µm	Axima2Analyse	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

Tableau 2 : 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.

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 comme décrit dans la **partie 2.1**. 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. Ainsi, pour la reconstruction de l'image d'un m/z donné, le logiciel fera correspondre les variations d'intensité sur une gamme de variation de couleurs qui seront reportées pour toutes les coordonnées analysées. Le logiciel de reconstruction d'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 réaligement des spectres.

Dépendamment 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). Concernant l'acquisition des images, plusieurs logiciels sont disponibles en fonction de l'appareil utilisé comme par exemple MMSIT pour les appareils Voyager de chez Applied Biosystems. 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 mais aussi leur reconstruction à l'aide du logiciel FlexImaging. Ce dernier possède de 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. Le **Tableau 2** répertorie les logiciels utilisés en fonction des instruments utilisés pour l'acquisition.

Quelque soit la classe de biomolécules étudiée, l'information collectée à partir de l'analyse MALDI est conséquente. Plus d'une centaine d'ions peut être obtenue et l'analyse peut devenir rapidement fastidieuse 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)¹⁴³⁻¹⁴⁷. 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 qui définit de manière plus simple les variances dans le jeu de

données. En supprimant les composantes principales qui ne contiennent pas d'informations utiles, la complexité est réduite de manière significative. Il devient alors très facile de mettre en évidence des variances au sein d'un même groupe 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 différentiellement régulées (**Figure 13**).

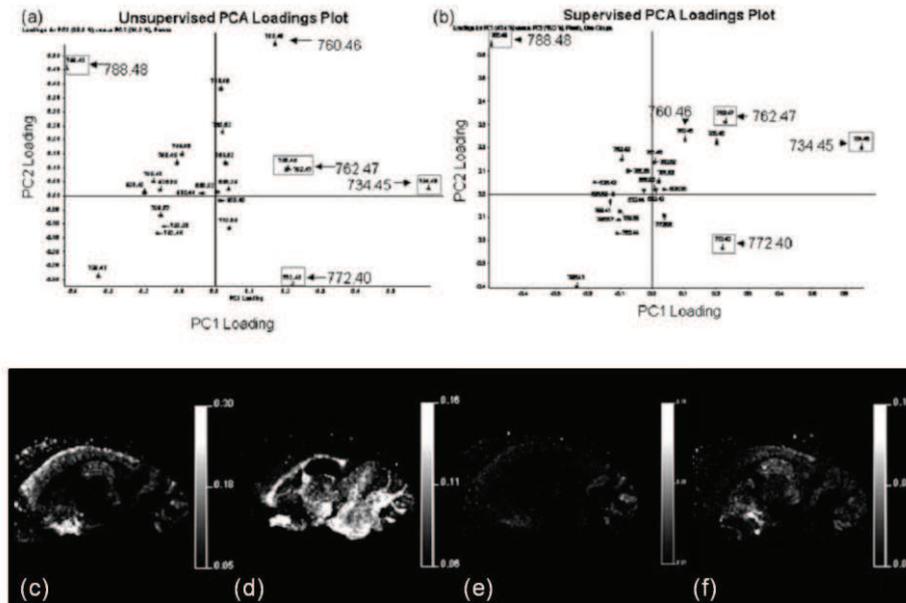


Figure 13 : Résultats PCA (a) non supervisés et (b) supervisés montrant des lipides différentiellement exprimés dans le cerveau de rat. Image de l'ion (c) m/z 734.45 présent dans la matière grise, de l'ion (d) m/z 788.48 présent dans la matière blanche, de l'ion (e) m/z 762.47 et de l'ion (f) m/z 772.40 présents dans le cortex cérébral ¹⁴⁴.

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 14B** 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 14C**). Pour palier à ce problème, une hiérarchisation des spectres en clusters peut alors être réalisée¹⁴⁸ en regroupant par classes les spectres présentant des similarités. Un dendrogramme contenant tous les spectres est alors généré (**Figure 14E**). 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 14D**). 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. Par cette voie, la création des modèles correspondant à différents stades d'une pathologie permettant de faire du diagnostic peut être réalisée.

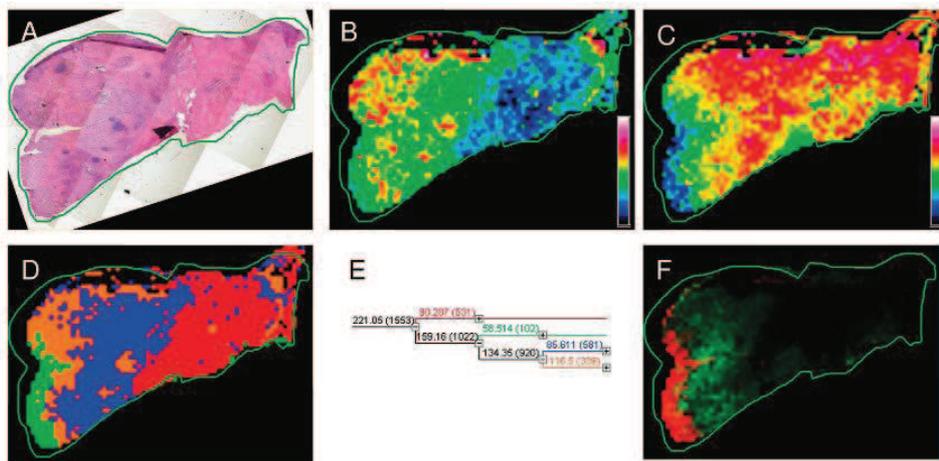


Figure 14 : (A) Coloration H&E d'une biopsie de cancer de l'estomac. Représentation des scores obtenus à partir de (B) la première composante principale et à partir de (C) la seconde composante principale. (D) Image reconstruite en utilisant les jeux de couleurs du dendrogramme (E). (F) Image MALDI de l'ion m/z 3371 (vert) et de l'ion (m/z 3328) déterminés par PCA¹⁴⁹.

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 diagnostic¹⁵⁰.

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 d'applications cliniques, il est particulièrement important pour interpréter les données issues de l'imagerie MALDI de

corrélés 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. Pour les histopathologistes, l'interprétation ne peut être effectuée uniquement après coloration de la coupe. Trois approches peuvent être employées afin de corrélés les caractéristiques histologiques avec l'approche MALDI-IMS.

- ✓ La première consiste à effectuer deux coupes consécutives à partir d'un tissu puis sur l'une d'entre elles l'analyse MALDI est réalisée et sur l'autre la coloration histologique. Cette procédure permet d'utiliser n'importe quel type de coloration en particulier la coloration Hematoxylin–Eosin (H&E). Cette dernière procédure est fortement employée puisqu'elle fournit énormément d'informations à propos du tissu. 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 et la corrélation peut ne pas être parfaite.

- ✓ La seconde procédure consiste à réaliser la coloration histologique et l'imagerie MALDI sur la même coupe ^{151, 152} 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 15**). Néanmoins, cette technique nécessite une étape supplémentaire avant l'analyse MALDI pouvant entraîner la délocalisation de certains composés. Un autre inconvénient est le fait qu'un nombre limité de colorants peut être utilisé et même si le bleu de méthylène permet de localiser les cellules, il ne fournit pas autant d'informations que la coloration H&E. Un grand nombre d'informations peut alors être perdu.

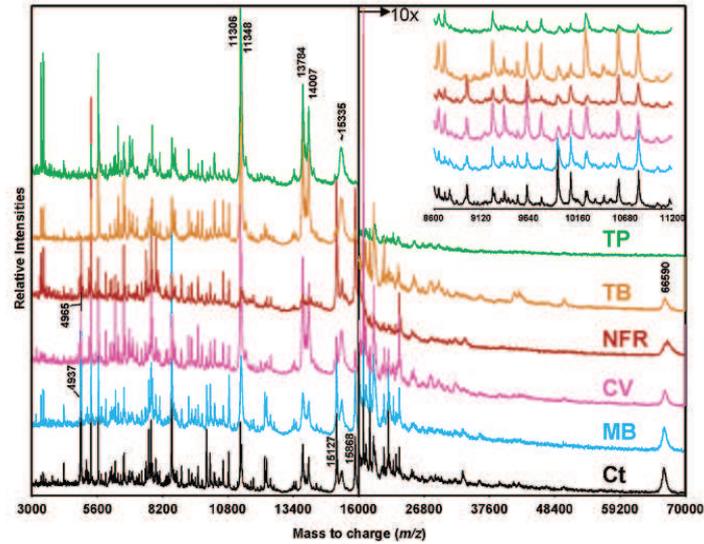


Figure 15 : Profil de protéines obtenu par MALDI-MS à partir d'un tissu non coloré (Ct: contrôle) et de 5 tissus colorés au Polychrome de Terry (TP), au Bleu de toluidine (TB), Nuclear Fast Red (NFR); au Violet de Crésyl (CV) et au Bleu de Méthylène (MB) ¹⁵¹.

- ✓ Une troisième approche introduit récemment ¹⁵³ montre qu'il est possible de réaliser l'analyse MALDI puis de retirer la matrice afin d'effectuer la coloration. 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'information (**Figure 16**).

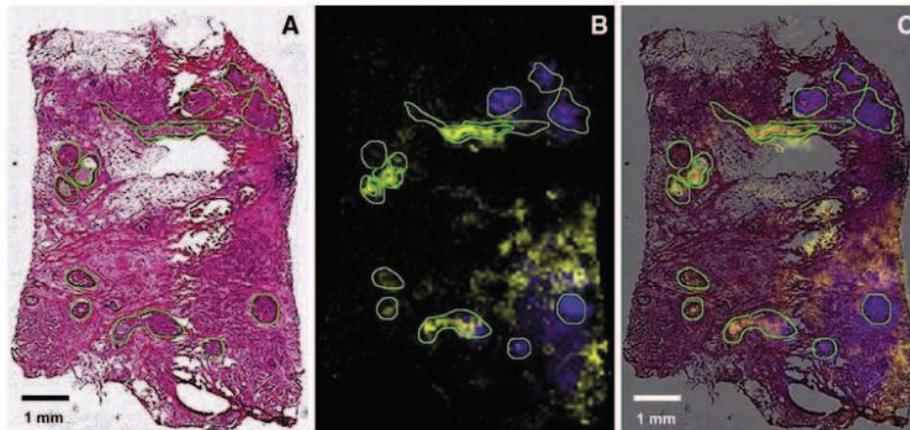


Figure 16 : Coupe d'une lésion de sein après (A) coloration H&E après analyse MALDI. (B) Image moléculaire de l'ion m/z 9750 (jaune) et l'ion m/z 4519 (bleu). (C) Superposition des images MALDI et de la coloration H&E ¹⁵⁰.

Imagerie MALDI et temps d'acquisition. 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 principalement 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 d'images à partir d'un échantillon dont la matrice a été déposée par micro-dépôts. La résolution spatiale n'est alors pas modifiable et est conditionnée par la distance entre les micro-dépôts soit généralement environ 250 μm 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 nébulisateur automatique par exemple. Le temps d'analyse est dans ce cas limité par la résolution spatiale de la technologie (i.e. au minimum le diamètre de l'aire d'intersection entre le faisceau laser la surface), la fréquence des tirs laser et le nombre de spectres accumulés en chaque position.

Quelque soit le mode de dépôt de la matrice utilisé, la fréquence des tirs laser reste un élément commun. Il y a encore quelques années, les lasers équipant les MALDI-TOF travaillaient à une fréquence de l'ordre de 3 Hz. A une telle fréquence, une image de 10 000 points à raison de 50 accumulations par position pouvait prendre environ 2 jours (46H) et ce sans compter les temps de déplacement. Ces longues acquisitions pouvaient engendrer une perte d'information par une trop longue exposition de l'échantillon sous vide poussé entraînant la sublimation de la matrice. Traditionnellement la majorité des sources MALDI étaient équipées de laser azote émettant dans l'UV à 337 nm. Ces lasers ayant montrés au début du MALDI de performances analytiques supérieures que d'autres lasers de type IR. De plus, ces lasers sont peu encombrants et peu onéreux. Malheureusement, ils rencontrent leur limite avec l'imagerie MALDI puisque sur ces lasers la fréquence de répétition des tirs est plus limitée (50 Hz). De plus, leur durée de vie est relativement limitée (quelques centaines de millions de coup). 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 » présente 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. Aujourd'hui la plupart des instruments fonctionnent avec une répétition des tirs laser pouvant atteindre jusqu'à 200 Hz. Ainsi dans les mêmes conditions d'acquisition que décrites précédemment, i.e. 10 000 points avec 50 tirs par point, le temps d'acquisition passe de 46H à 3 Hz à moins d'1H à 200 Hz. Depuis quelques années, des lasers présentant des fréquences de répétition des tirs allant jusqu'à 2 kHz sont apparus ^{154, 155}. 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 2**). 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.

Résolution spatiale de l'imagerie MALDI. La résolution spatiale en imagerie MALDI est un paramètre essentiel puisqu'elle définit la résolution des images et donc la qualité. Le nombre de points des images est équivalent aux nombre de pixels d'une photographie. En imagerie MALDI, la résolution spatiale est définie par différents paramètres. L'un des principaux est l'aire de la zone irradiée par le faisceau laser *i.e.* soit de la zone d'intersection entre le faisceau laser incident et la surface analysée. Habituellement, la réduction de l'aire irradiée est obtenue par une réduction du diamètre du faisceau laser incident. Différentes méthodes permettent d'obtenir une bonne refocalisation du faisceau laser. Il est également possible de développer d'autre systèmes alternatifs comme l'ajout sur la surface à analyser d'un masque présentant des ouvertures de dimensions finies et permettant de couper le faisceau laser afin qu'il n'atteigne qu'une zone plus restreinte de l'échantillon ¹⁵⁶. Un autre paramètre influençant la résolution des images est la taille des cristaux de matrice comme précédemment mentionné plus haut. Ainsi, si les cristaux de matrice sont de taille trop importante et supérieure à la zone irradiée, la résolution spatiale des images sera affectée par la qualité de la préparation. Il faut donc pouvoir balayer la surface selon un réseau de pixels les plus nombreux et petits possibles mais également être capable d'obtenir des cristaux de matrice dont la taille sera inférieure à la dimension des aires irradiées. Ainsi, la meilleure résolution sera atteinte pour des cristaux inférieurs au diamètre de l'aire irradiée, pour une aire la plus petite possible et les points les plus rapprochés

possibles *i.e.* rapprochés du diamètre de l'aire. La résolution spatiale des images a considérablement évolué depuis l'introduction de l'imagerie MALDI par une diminution du diamètre du faisceau laser incident, mais également par l'amélioration des méthodes de dépôt de la matrice. Ainsi, si en 2000, la plupart des images présentées étaient réalisées avec une résolution d'environ 150 μm , cette résolution est actuellement d'environ 50 μm en routine. Cependant, en considérant que le diamètre moyen d'une cellule est de 10-20 μm , cela signifie que chaque irradiation touche 2-3 cellules. 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. Cependant, ceci reste encore difficile car s'il est possible de réaliser des montages avec un laser hautement focalisé, il est encore difficile d'obtenir une bonne sensibilité pour toutes les classes de composés présents dans les tissus à ces résolutions. Ainsi, il convient de mieux comprendre les processus fondamentaux MALDI pour améliorer les rendements ioniques en MALDI. Ainsi l'équipe de B. Spengler a présenté un système à haute résolution appelé SMALDI pour Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization ⁵¹. Cet appareil hybride entre le LAMMA et le MALDI (**Figure 17a**) 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 ¹⁵⁷ (**Figure 17b-c**). Ce système prometteur permettrait la réalisation d'images à haute résolution de biomolécules à partir d'une coupe de tissu. D'autre part, Spengler et coll. ont récemment montré qu'il était possible d'équiper un appareil type FT-ICR avec une source SMALDI offrant la possibilité de coupler haute résolution spatiale avec haute résolution spectrale ¹⁵⁸.

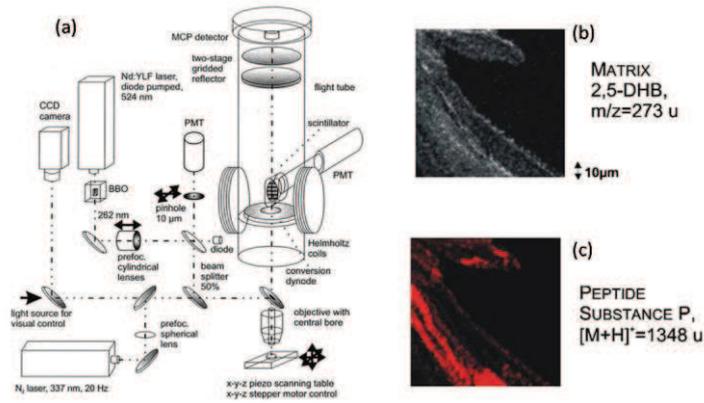


Figure 17 : (a) Schéma du système SMALDI ⁵¹. Images SMALDI (b) de cristaux de 2,5-DHB et (c) de la répartition de la substance P dans les cristaux de 2,5-DHB ¹⁵⁷.

Un concept très différent permettant d’obtenir des images de haute résolution spatiale consiste à travailler, comme précédemment mentionné en **partie 2.1** en mode microscope. Le mode microscope permet à partir d’une source MALDI de générer des ions qui conserveront leur position relative jusqu’à un détecteur de position. Dans ce cas, la résolution spatiale est conditionnée par la taille des cristaux de matrice, la précision des optiques ioniques et la résolution du détecteur de position. Un tel concept a été proposé par R. Heeren et coll. ²⁸. Il est possible de défocaliser le laser et d’atteindre une résolution jusqu’à quelques microns ¹⁵⁹ (**Figure 18**). Bien que cette approche présente de nombreux avantages, il faut souligner que cet appareil reste exclusivement dédié à l’IMS et qu’il n’offre pas la possibilité d’effectuer des analyses structurales par MS/MS.

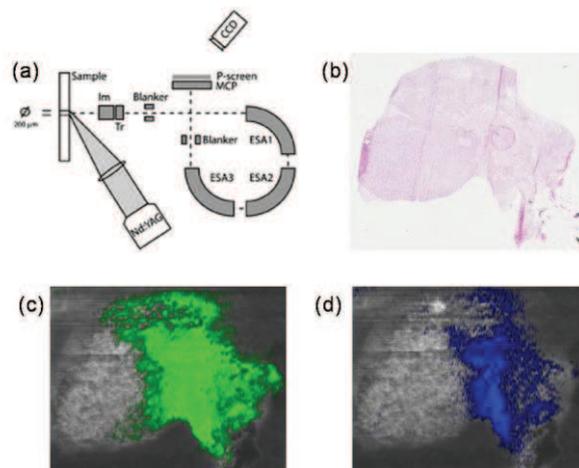


Figure 18 : (a) Schéma du dispositif microscope. (b) Image optique d’un coupe d’hypophyse humaine et images moléculaires de neuropeptides tels que (c) la vasopressine et (d) l’ocytocine ¹⁶⁰.

1.2.1.5. Imagerie MALDI et Applications

Depuis l'introduction de l'imagerie MALDI en 1997, de nombreux développements ont fait de cette technique un outil puissant pour la recherche de biomolécules dans des coupes de tissus. De nombreuses applications ont alors vu le jour à partir d'une grande variété de tissus animaux ou végétaux pour des études fondamentales ou des applications cliniques.

Imagerie MALDI et études protéomiques. La localisation des peptides/protéines peut être déterminée par imagerie MALDI que ce soit sur des modèles invertébrés¹⁶¹ ou vertébrés¹⁶². Cette technique a été appliquée aussi bien pour suivre le développement de la prostate dans un modèle murin¹⁶³ que dans le domaine des applications cliniques en cancérologie notamment sur le cancer du colon¹⁶⁴, le cancer de la prostate¹⁵³, le cancer de l'ovaire¹¹³ (**Figure 19**), le cancer du sein^{165, 166}, le cancer du poumon¹⁶⁷, les adénocarcinomes de la prostate¹⁶⁸ mais aussi les gliomes^{162, 169, 170}.

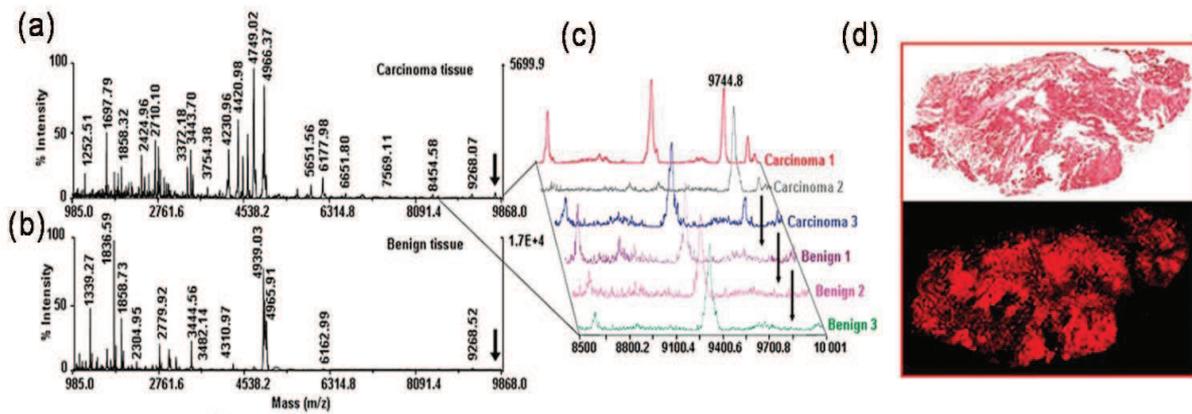


Figure 19 : Spectres MALDI-MS obtenus à partir d'une coupe (a) d'ovaire cancéreuse et (b) d'une tumeur bénigne d'ovaire. (c) Profil MS de 3 cancers d'ovaire vs. 3 tumeurs bénignes (d) Coloration H&E et image MALDI de l'ion m/z 9744 identifié comme biomarqueur potentiel¹¹³.

Il est très clair que l'imagerie MALDI est devenue un outil puissant dans la recherche de biomarqueurs dans le cas d'études sur le cancer mais cette technique est aussi utilisée pour d'autres études pathologiques comme la maladie de Parkinson^{110, 171-173}. La **Figure 20** présente la distribution de la protéine PEP-19 dans un cerveau de souris après injection de 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine (MPTP) qui simule la maladie de Parkinson.

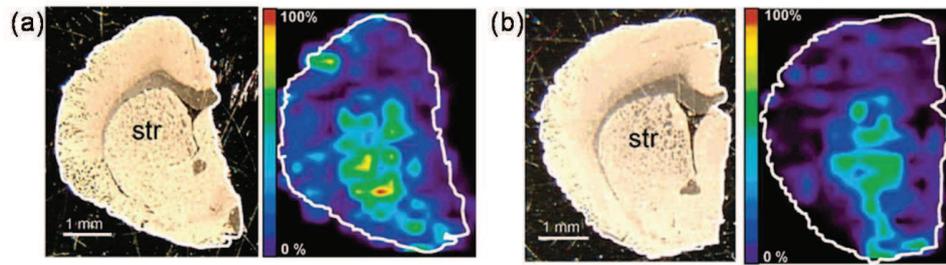


Figure 20 : Image MALDI de la protéine PEP-19 dans un cerveau de souris (a) avant traitement au MPTP et (b) après traitement au MPTP ¹¹⁰.

L'imagerie MALDI a aussi été appliquée à d'autres pathologies comme la maladie d'Alzheimer ¹⁷⁴. On a ainsi pu être obtenues des images de la répartition des peptides β amyloïdes dans un modèle murin (**Figure 21**). Les plaques amyloïdes sont connues pour être impliquées dans les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Habituellement, leur distribution est obtenue par IHC via utilisation d'anticorps spécifiques ou études histologiques via des colorations comme le rouge congo. L'imagerie MALDI présente l'avantage d'être plus spécifique et rapide et permet de distinguer aisément les différentes espèces moléculaires impliquées dans la pathologie.

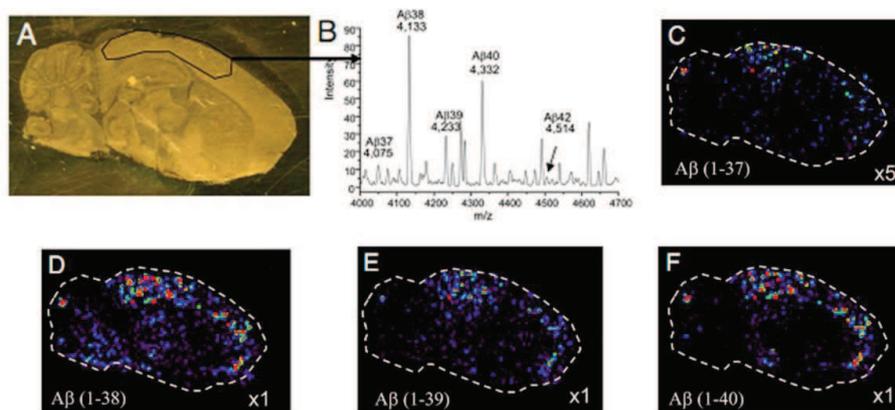


Figure 21 : Images MALDI des différentes espèces moléculaires présentes dans les plaques amyloïdes dans le cas de la maladie d'Alzheimer. (A) Image optique d'un cerveau de rat avec la zone présentant une forte concentration de plaques amyloïdes. (B) Spectre moyen obtenu à partir de la zone présentée en A. (C-F) Répartition de 4 peptides β -amyloïdes ¹⁷⁵.

L'utilisation de cette technique peut être appliquée pour la détection de peptides notamment pour la détection de neuropeptides ^{81, 176-179}, sur des coupes d'animaux entiers ¹⁸⁰

et avec différentes instrumentations dont des instruments à haute résolution spectrale tel que l'analyseur orbitrap pour leur localisation et identification par MS/MS¹⁰⁹ (**Figure 22**).

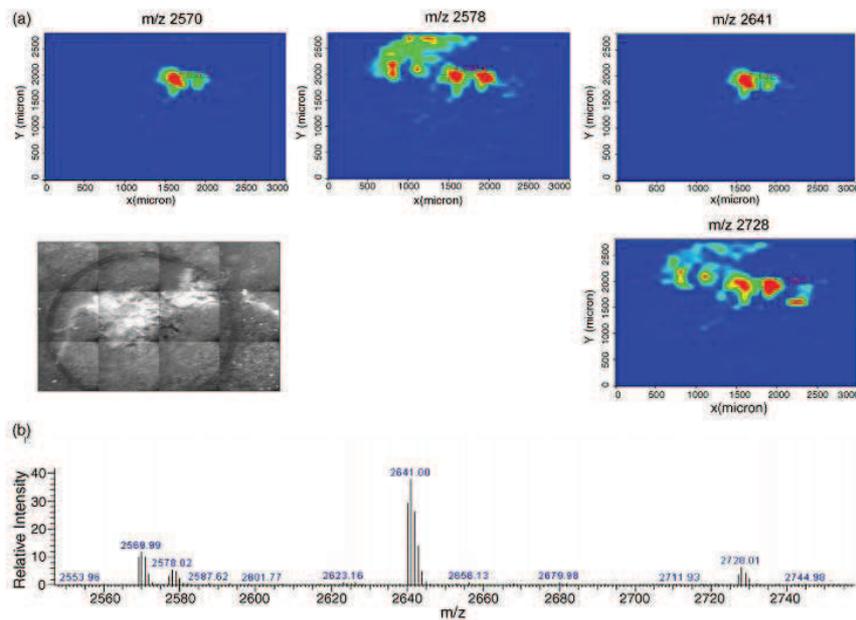


Figure 22 : (a) Images de neuropeptides obtenues par MALDI-Orbitrap à partir de corpora cardiaca et corpora allata de criquets. (b) Spectres MS contenant les 4 ions d'intérêt¹⁰⁹.

Imagerie MALDI et lipidomique. Les lipides ont également été étudiés en imagerie MALDI. Différentes études portent sur l'étude de la distribution de phospholipides et sphingolipides¹⁸¹⁻¹⁸⁵. Les lipides sont des constituants majoritaires des membranes cellulaires et des cellules et jouent un rôle important dans les processus biologiques tel que la transduction des signaux. Des modifications au niveau lipidique sont observées dans de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer¹⁸⁶, le syndrome de Down (trisomie 21)¹⁸⁷, le diabète¹⁸⁸ ou encore lors de processus d'apoptose^{189, 190}. Les lipides peuvent être organisés en 8 catégories : les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides, les sphingolipides, les stérols, les prényls, les saccharolipides et les polykétides¹⁹¹. La plupart des expériences réalisées concernent généralement les glycérophospholipides (GP) et les sphingolipides (SP) (**Figure 23**). Les GP sont très abondants à l'état naturel et plus particulièrement dans les membranes cellulaires. Ils sont divisés en différentes classes en fonction des différents groupements chimiques incluant les glycérophosphocholines (PC), les glycérophosphoéthanolamines (PE), les glycérophosphosérines (PS), les glycérophosphoglycerols (PG), les glycérophosphoinositols (PI), les glycérophosphates (PA)

et les sphingolipides tels que les sphingomyélines (SM), les sulfatides (ST), les céramides, les cérébrosides et les gangliosides.

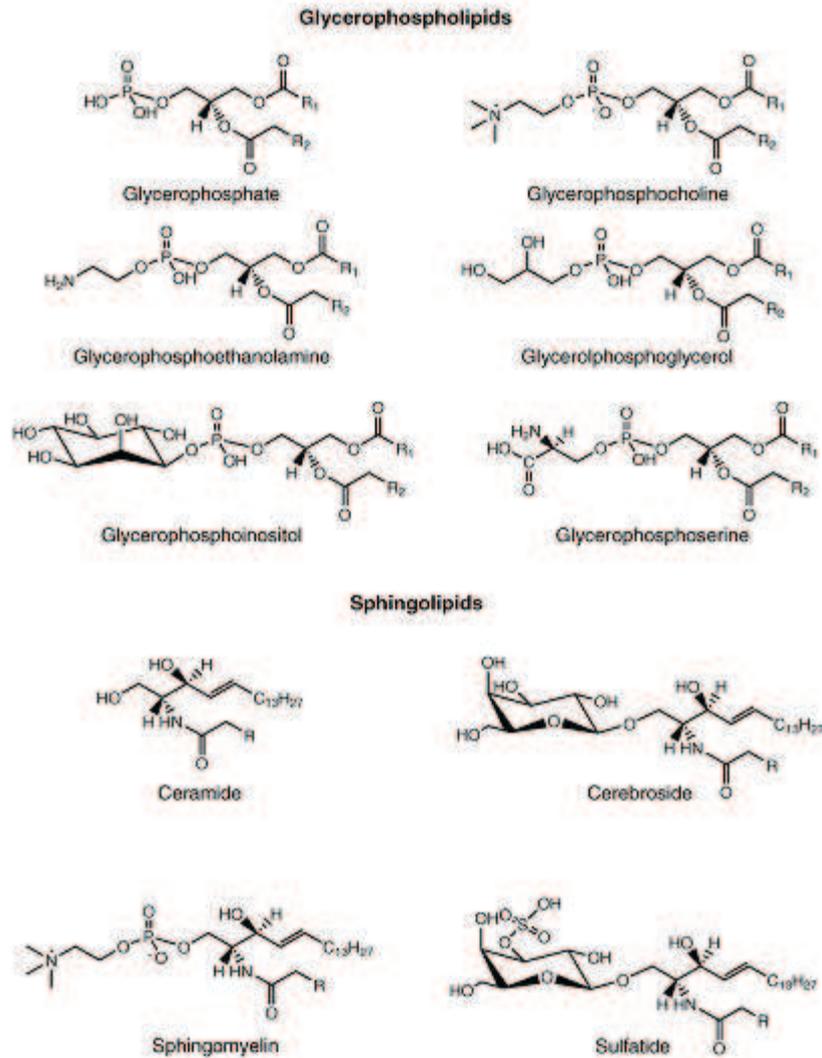


Figure 23 : Différentes classes des glycérophospholipides (GP) et des sphingolipides (SP) ¹⁹².

De nombreux développements ont permis de faire de l'imagerie MALDI une méthode de choix pour l'analyse des lipides. De nombreux efforts ont porté notamment sur la caractérisation de ces espèces directement à partir des tissus par MS/MS ^{141, 193-196}. A ces fins, une grande variété d'instrumentation a été employée. Les lipides requièrent particulièrement une grande résolution spectrale car de nombreuses espèces sont très proches en masse, certaines étant souvent même isobariques. Ainsi, l'utilisation d'une cellule de mobilité

ionique est avantageuse puisque des lipides de même m/z mais de composition différente donc de conformation différente pourront être séparés suivant leur mobilité^{108, 135, 197}. De nombreuses applications montrent l'intérêt de l'utilisation de l'analyse directe de lipides telles que l'étude réalisée sur la dystrophie musculaire de Duchenne à partir d'un modèle murin¹⁹⁸ ou dans le cas de cancer¹⁹⁹ (**Figure 24**).

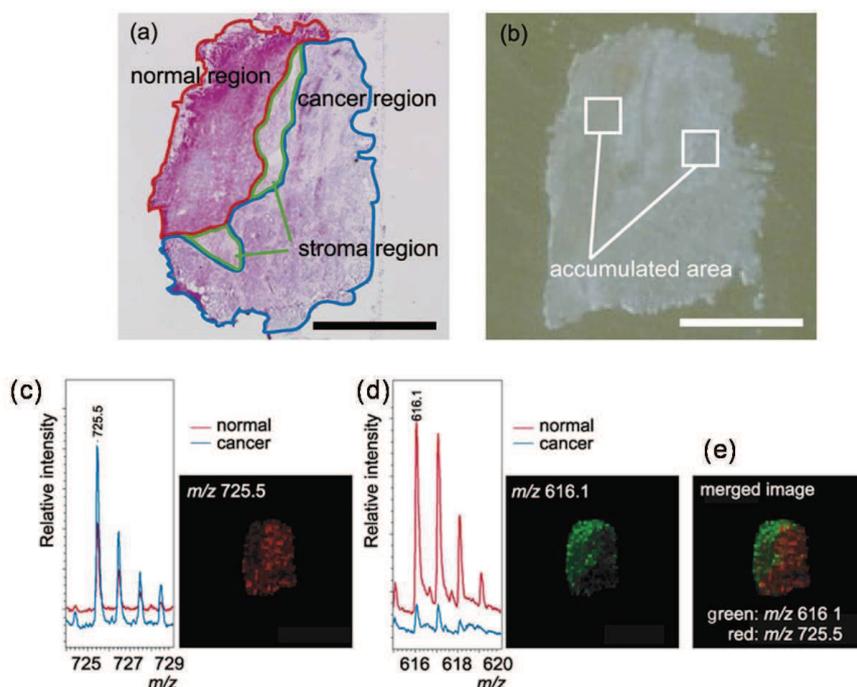


Figure 24 : (a) Coloration d'une coupe de cancer du colon montrant les régions cancéreuses et normales. (b) Coupe utilisée pour l'analyse directe MALDI avec indication des zones qui seront comparées. (c) Image de l'ion m/z 725 surexprimé dans la zone cancéreuse et (d) Image de l'ion m/z 616 fortement exprimé dans la zone normale. (e) Superposition des deux images¹⁹⁹.

Imagerie MALDI et pharmacologie. L'imagerie MALDI ne se contente pas de trouver des applications dans le domaine de l'analyse des biomolécules endogènes. Il est également possible de suivre la biodistribution de molécules exogènes. Ainsi l'imagerie MALDI a trouvé une place de choix dans le domaine pharmaceutique pour l'étude de la biodisponibilité de médicaments et de leurs métabolites. En effet, la localisation des médicaments est habituellement réalisée par des méthodes, comme l'autoradiographie, nécessitant un marquage préalable des composés. Hormis le fait que ces méthodes soient en général longues, coûteuses et difficiles de mise en œuvre même si elles sont très sensibles, elles ne permettent également pas de mettre en évidence et d'étudier la distribution des

éventuels métabolites. De nombreuses applications de l'utilisation de l'imagerie MALDI ont montré qu'il était possible d'une part de localiser de façon spécifique des médicaments dans un tissu^{115, 136, 140} mais aussi de pouvoir localiser les métabolites avec une grande spécificité par utilisation de la MS/MS sur coupe^{137, 200, 201}. Ces expériences peuvent être également réalisées sur coupes d'animaux entiers pour de petits animaux modèles permettant ainsi d'avoir une vue globale de la répartition du médicament et de ses métabolites au sein de l'animal^{202, 203} (**Figure 25**).

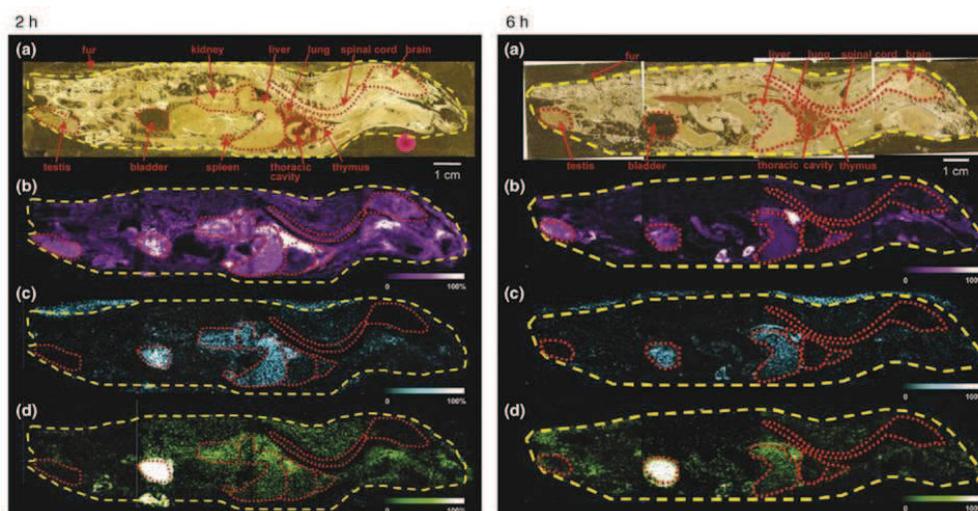


Figure 25 : Détection de l'olanzapine et des métabolites à 2h (à gauche) et 6h (à droite) après injection dans une coupe sagittale de rat entier. (a) Image optique de la coupe de rat entier avec les organes entourés en rouge. (b) Image MS/MS de l'olanzapine (m/z 313→ m/z 256), (c) Image MS/MS du N-desmethyl olanzapine (m/z 299→ m/z 256) et (d) Image MS/MS du 2-hydroxymethyl olanzapine (m/z 329→ m/z 272)²⁰².

Tous ces exemples montrent l'évolution mais aussi le succès de l'imagerie MALDI comme en témoigne le nombre toujours croissant d'applications et de publications (**Figure 26**). Cependant dû à l'utilisation de la matrice, cette technique rend quelquefois l'analyse de molécules de faible poids moléculaire (<500 Da) difficile. De plus, même si la résolution spatiale de l'imagerie MALDI a progressé depuis quelques années, la limite relative rencontrée peut placer l'imagerie MALDI en compétition avec d'autres techniques de MSI.

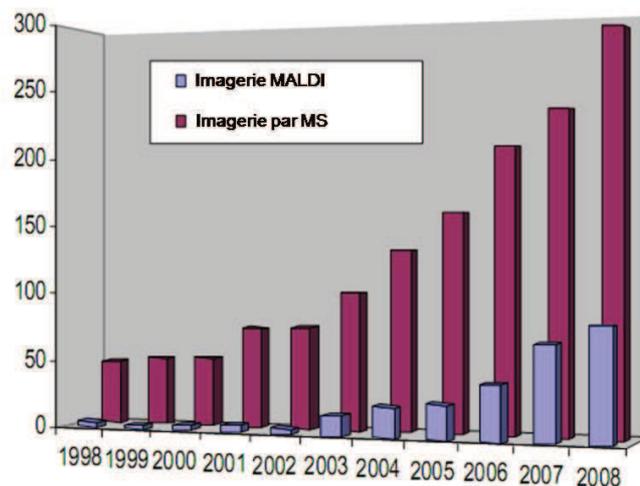


Figure 26 : Publications sur la MSI et l'imagerie MALDI depuis 1998.

1.2.2. Imageries dérivées du MALDI

1.2.2.1. Imagerie DIOS

En 1999, avec l'introduction par Suizdak et coll.²⁰⁴ de la technique DIOS (Desorption Ionization On Silicon), à l'aide de supports de silicium poreux obtenus par gravure électrochimique de wafers de silicium dopés n ou p, il fut permis de détecter des composés sans utilisation de matrice. Dans cette méthode, l'analyte est déposé directement à la surface du support de silicium poreux puis irradié à l'aide d'un faisceau laser. Ainsi, en général, les analyses DIOS peuvent s'effectuer à l'aide d'une source MALDI conventionnelle. Il semble que le support de silicium poreux, mauvais conducteur thermique mais absorbant à la longueur d'onde du laser, joue en quelque sorte le rôle de matrice et permette la désorption/ionisation des composés en phase gazeuse. Cette technique est efficace pour l'analyse de composés de faible poids moléculaire (< quelques 1000 u.) et permet dans certains cas l'analyse de composés parfois difficiles à analyser en MALDI (**Figure 27**). Ces supports permettent l'analyse de composés de différentes natures tels que les médicaments²⁰⁵, les lipides²⁰⁶, les polymères²⁰⁷ et même dans une certaine mesure les protéines²⁰⁸ bien que l'efficacité dans ce cas soit bien loin d'égaliser celle du MALDI.

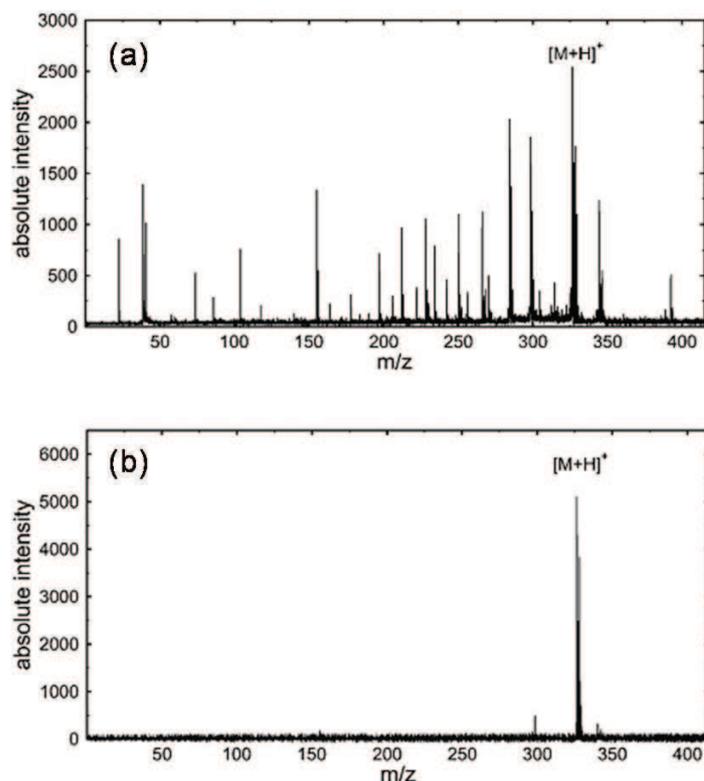


Figure 27 : Spectres de masse du midazolam obtenus par (a) MALDI et (b) DIOS ²⁰⁵

Les premières analyses directes sur des échantillons biologiques furent introduites en 2001 par Sweedler et coll. par l'étude de peptides de la glande atriale et des cellules de l'Aplysie ²⁰⁹. Depuis de nombreux développements ont été apportés à cette technique et notamment par Siuzdak et coll. L'une des variations proposées sur la base du DIOS est une technique connue sous le nom de NIMS (Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry) ^{210, 211}. Cette nouvelle méthode repose sur l'utilisation de molécules appelées « initiateurs » ou « clathrates » tels que des siloxanes fluorés piégés dans le réseau de nanostructures du silicium poreux afin de permettre l'éjection de molécules intactes en phase gazeuse. L'éjection des composés peut être initiée par utilisation d'un laser (laser-NIMS) ou d'un faisceau d'ions (ion-NIMS). La résolution spatiale peut alors atteindre 150 nm tout en préservant la production de molécules intactes en phase gazeuse. Ainsi, cette technique paraît bien adaptée aux expériences de MSI. L'imagerie NIMS s'effectue en deux étapes. La première étape consiste à réaliser l'ablation du tissu en irradiant la coupe avec une haute énergie laser (0,4 J/cm² par pulse) permettant d'exposer les molécules à la surface du silicium poreux. La seconde étape consiste à irradier la même zone avec une plus faible énergie (0,01 J/cm² par pulse) afin de procéder à la désorption/ionisation des molécules. Cette procédure est

réalisée à chaque position afin d'effectuer l'acquisition d'une image en mode point par point. La procédure permettant la réalisation d'une image NIMS est schématisée **Figure 28** ainsi que des exemples d'image d'un médicament (la clozapine) et de l'un de ses métabolites dans une coupe de cerveau de rat.

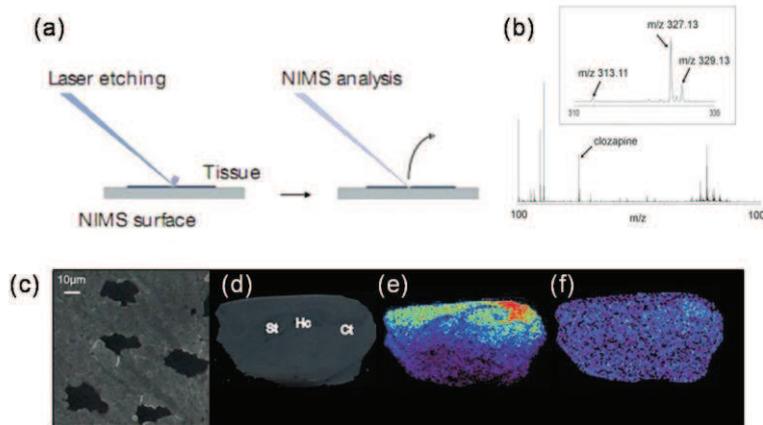


Figure 28 : Imagerie laser-NIMS. (a) Concept de l'analyse directe sur tissu montrant l'ablation de la coupe dans un premier temps suivit de l'analyse laser-NIMS ²¹⁰. (b) Spectre NIMS présentant la clozapine (m/z 327.13) et la N-desmethylozapine (m/z 313.11). (c) Trous dans la coupe de cerveau de rat obtenus après la première irradiation laser. (d) Image optique de la coupe et images laser-NIMS de (e) la clozapine (m/z 327.13) et (f) la N-desmethylozapine (m/z 313.11).

1.2.2.2. Imagerie ME-SALDI

La technique ME-SALDI (Matrix-Enhanced Surface-Assisted Laser Desorption Ionization) ²¹² revient à utiliser le mode DIOS avec de la matrice. Ceci permet d'augmenter la sensibilité. Avec ce mélange entre DIOS et MALDI, des images de lipides parmi lesquels le cholestérol ont été obtenues à partir de coupes de cerveau de rat (**Figure 29**).

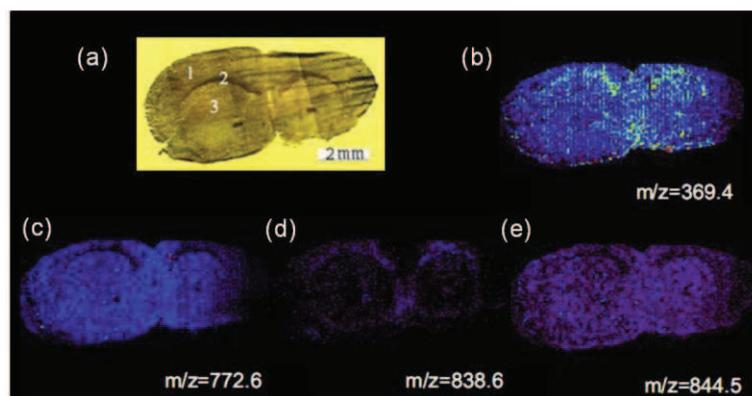


Figure 29 : (a) Image optique d'un coupe de cerveau de souris. Images ME-SALDI (b) du cholestérol (m/z 369.4) et (c-e) de différents lipides ²¹².

Au fil des ans, de nombreux supports et matrices inorganiques ont été utilisés pour permettre la désorption/ionisation et testés en mode imagerie. Quelques exemples illustrent parfaitement bien cette progression. Sont à noter, entre autre, les travaux de Yeung et coll. qui a mis au point l'imagerie de petites molécules par utilisation de particules de graphite colloïdale comme matrice ^{213, 214}. Cette technologie nommée GALDI (Graphite-Assisted Laser Desorption Ionization) est utilisée pour l'analyse de petites molécules comme montré par l'analyse de composés contenus dans des fruits ²¹³ (**Figure 30**) ou encore de lipides dans le cerveau de rat ²¹⁴.

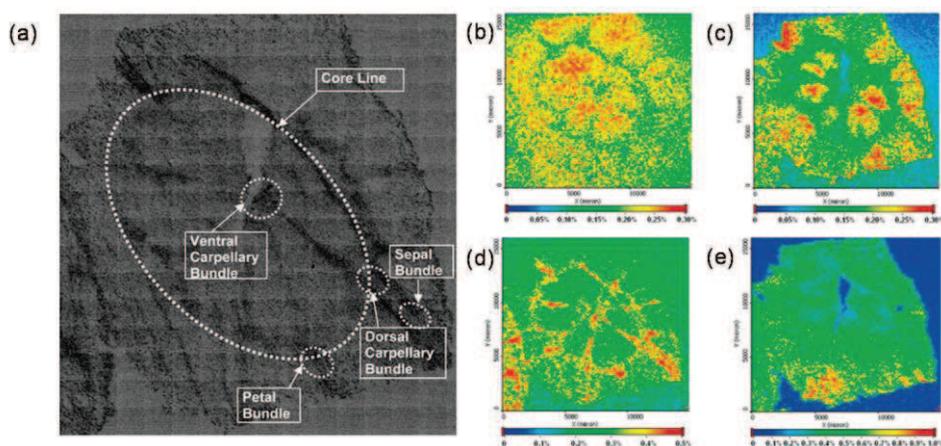


Figure 30 : (a) Image optique d'un noyau de pomme et images GALDI (b) de l'acide malique, (c) de l'acide quinique, (d) de l'acide linoléique et (e) du sucrose ²¹³.

Dans la même ligne directrice, la même équipe a poursuivi ces études dans le domaine des nanoparticules en introduisant des colloïdes d'argent comme matrice ²¹⁵. Cette technique a récemment été présentée avec l'analyse de petites molécules contenues dans l'espèce *Arabidopsis thaliana* (**Figure 31**).

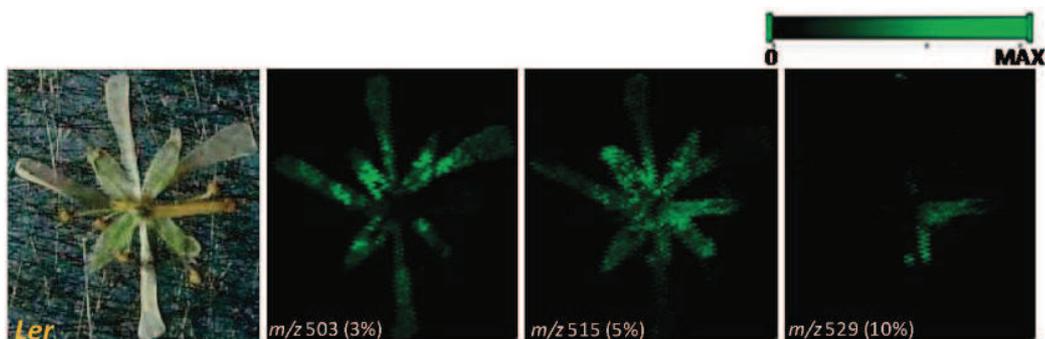


Figure 31 : Images optique d'*Arabidopsis thaliana* et de trois ions à m/z 503, m/z 515 et m/z 529 ²¹⁵.

Il a également été montré qu'il était possible d'utiliser des nanoparticules d'or comme matrice¹⁰⁸. Setou et coll. ont également travaillé sur les nanoparticules et ont proposé le nom de nano-PALDI (nano-Particle-Assisted Laser Desorption Ionization) à cette technologie. Le nano-PALDI a été utilisé pour effectuer des images de peptides et de lipides avec une résolution spatiale de l'ordre d'une dizaine de microns^{216, 217}. Le MILDI (Matrix Implanted Laser Desorption Ionization) est une technique basée sur l'implantation homogène de cluster d'or directement à la surface de l'échantillon à l'aide d'un canon à ions. L'implantation de cluster d'or dans des tissus a permis la détection de molécules jusqu'à 35 kDa²¹⁸.

L'ensemble de ces travaux illustre l'intérêt de rechercher de nouvelles matrices inorganiques et notamment sous forme de nanoparticules. Ces matrices et méthodes se sont révélées utilisables en imagerie, certaines permettant d'atteindre une résolution spatiale supérieure. Cependant, ces techniques se limitent à la détection de molécules de petite masse comme les lipides ou des médicaments et ne permettent pas l'analyse de peptides et protéines avec les performances connues au MALDI par utilisation de matrices organiques.

1.2.3. Imagerie SIMS

Le SIMS est une technique complémentaire du MALDI en mode imagerie. Les deux sources diffèrent principalement par la gamme de masse accessible et la résolution spatiale. En effet, si la résolution spatiale de l'imagerie SIMS est bien supérieure à celle de l'imagerie MALDI, les sources SIMS sont adaptées à l'analyse des composés de faible poids moléculaire comme les lipides mais ne permettent pas l'analyse de composés de plus haut poids moléculaire et plus polaires comme les peptides ou les protéines, contrairement au MALDI.

La technique SIMS repose sur l'utilisation d'un faisceau d'ions primaires, accélérés et focalisés afin de bombarder la surface de l'échantillon. Les sources d'ions primaires les plus classiques sont des sources de type LMI (Liquid Metal Ion) produisant un faisceau d'ions primaires Ga^+ ou In^+ avec une énergie cinétique jusqu'à 25 keV et pouvant être focalisé jusqu'à 100-200 nm^{219, 220}. Les sources d'ions primaires solides, comme le Cs^+ sont également utilisées. Le faisceau est alors accéléré à 10 keV et la focalisation atteint $\sim 2\text{-}3 \mu\text{m}$. Une large variété d'ions primaires a été introduite et étudiée. La nature de l'ion primaire, son énergie cinétique, sa surface efficace ainsi que les doses d'ions envoyées sont autant de paramètres qui jouent sur les ions secondaires qui seront émis à partir de la surface consécutivement au bombardement. L'utilisation de clusters d'ions comme les clusters Au_n^+ ou Bi_n^{m+} présente un intérêt tout particulier pour l'augmentation des rendements d'ions.

L'irradiation de la surface par ces ions primaires conduit à l'émission de particules secondaires de différents types parmi lesquelles des ions seront analysés. Un des paramètres les plus importants en SIMS est la densité ou dose d'ions reçue par la surface. Dépendamment de la dose d'ions, l'énergie transférée à la surface est plus ou moins importante et conduit à un endommagement plus ou moins en profondeur de la surface. De plus, pour des doses d'ions élevées, la plupart des liaisons du solide seront rompues et seuls des éléments monoatomiques ou de petits groupements seront analysables. Ainsi, par convention sont définis deux régimes dépendant de la dose d'ions envoyée. Lorsque les doses d'ions sont supérieures à 10^{13} - 10^{14} ions/cm², l'énergie transférée à l'échantillon est importante, l'échantillon est creusé plus en profondeur, il s'agit du mode dynamique. Pour des doses d'ions inférieures à 10^{13} - 10^{14} ions/cm², il s'agit du SIMS statique. Dans ce cas, seules les premières couches de l'échantillon sont endommagées par l'analyse et moins de fragmentations sont observées. La **Figure 32** présente schématiquement les deux régimes d'analyse. A la différence du SIMS statique, le SIMS dynamique (**Figure 32b**) permet l'analyse en profondeur d'un échantillon en utilisant une densité d'ions beaucoup plus élevée.

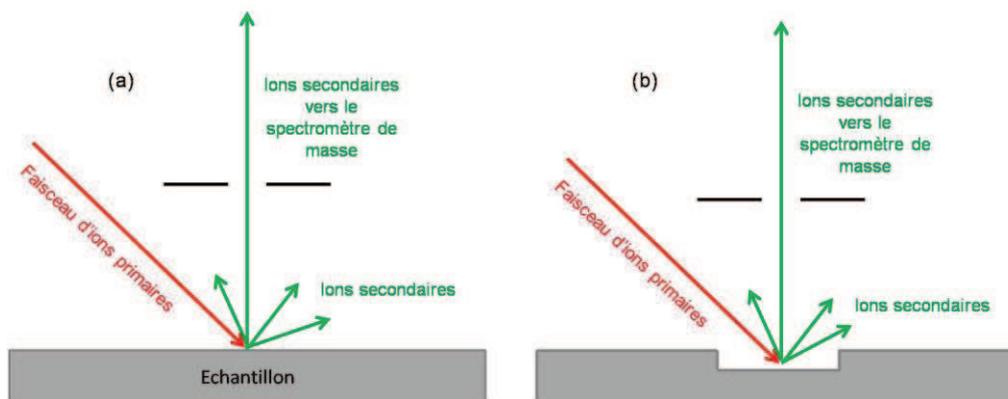


Figure 32 : Schéma représentant l'utilisation du SIMS en mode (a) statique et (b) dynamique.

En SIMS, les espèces détectées sont des ions de petites masses. Pour des ions de plus hautes masses, il est possible d'utiliser un fragment caractéristique d'une molécule ou d'une famille de molécules pour repérer celle-ci. Par exemple, le groupement phosphocholine à m/z 184, est couramment utilisé pour détecter la présence de phosphatidylcholines et il a été montré qu'il était possible de suivre la fusion de la membrane de deux *Tetrahymena* en utilisant cet ion phosphocholine²²¹ (**Figure 33**).

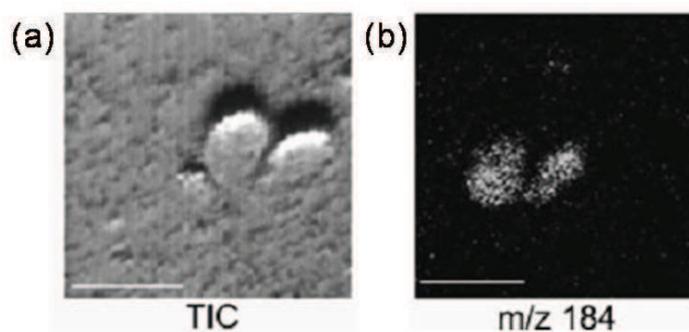


Figure 33 : (a) Courant ionique total représentant la fusion de la membrane de deux *Tetrahymena*. (b) Image SIMS de l'ion m/z 184 représentant la distribution de la phosphatidylcholine ²²¹.

Cependant, cet ion fragment, n'est pas spécifique des phosphatidylcholines puisqu'il est aussi présent dans les sphingomyélines. Il est donc indispensable de pouvoir détecter des molécules intactes et de plus hautes masses. Ceci reste une difficulté en SIMS et de nombreux groupes se sont penchés vers la recherche de voies permettant d'augmenter et les rendements d'ions produits et la gamme de m/z des ions intacts pouvant être détectés.

Il a été montré qu'il était possible de détecter des ions intacts de plus haut poids moléculaire par utilisation d'une matrice organique MALDI classique. Ainsi, le Matrix-Enhanced SIMS (ME-SIMS) utilise une préparation d'échantillons identique à celle de l'imagerie MALDI afin de bénéficier d'une meilleure efficacité d'ionisation et de générer des ions intacts. Des molécules intactes de plus haut poids moléculaire comme l'ubiquitine ont ainsi pu être détectées par ME-SIMS ²²². En ce qui concerne l'analyse de plus petites molécules (<5kDa), les spectres obtenus en ME-SIMS sont très similaires aux spectres MALDI ²²³ (**Figure 34a-b**). Le ME-SIMS permet donc d'améliorer la détection des composés comme le cholestérol ou des petits peptides ^{224, 225}. La **Figure 34c-e** présente les images obtenues en ME-SIMS du cholestérol intact à partir d'une coupe de ganglion pariétal de *Lymnaea stagnalis*. L'inconvénient principal du ME-SIMS est de réimporter à la source SIMS tous les inconvénients du MALDI liés à la couche de matrice comme les problèmes de préparation, de quantification, de reproductibilité, ou de présence de signaux liés à la matrice.

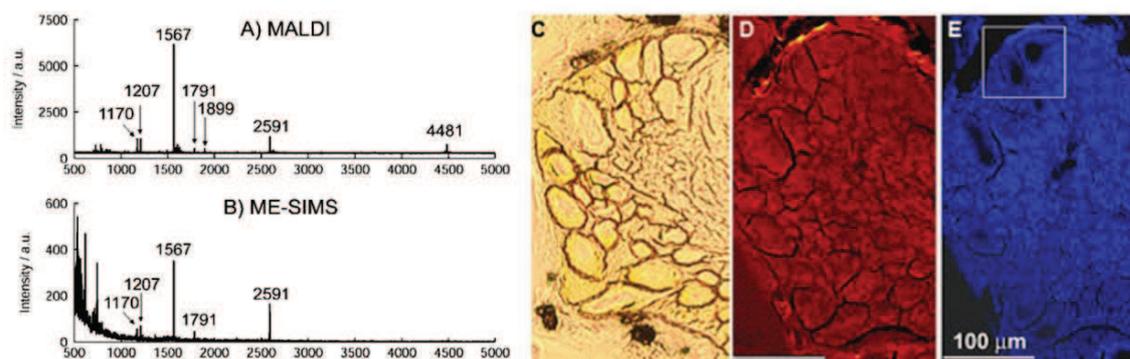


Figure 34 : Spectres (A) MALDI et (B) ME-SIMS obtenus à partir d'un extrait de *Lymnaea stagnalis* avec du 2,5-DHB. (C) Image optique, (D) Image ME-SIMS représentant le TIC et (E) Image ME-SIMS représentant la distribution du cholestérol dans une coupe de ganglion pariétal de *Lymnaea stagnalis* ²²³.

La métallisation de l'échantillon par application d'une fine couche (quelques nm) d'or ou d'argent ou Meta-SIMS, permet également d'augmenter la sensibilité d'un grand nombre de molécules ²²⁶⁻²²⁸. De plus, le dépôt d'une fine couche de métal augmente la conductivité en convertissant un échantillon isolant en échantillon conducteur ²²⁹. Un exemple de cette application montrant la répartition du cholestérol cationisé par l'argent après métallisation de l'échantillon est présenté **Figure 35**. L'utilisation de la métallisation conduit à une augmentation de la sensibilité du SIMS. Cependant, les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas encore bien compris ²²⁶.

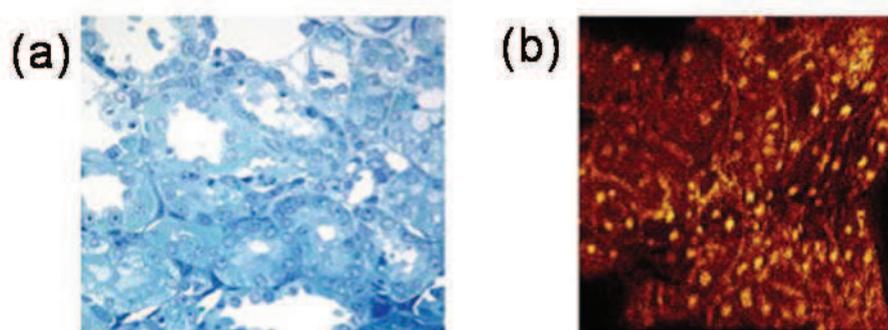


Figure 35 : (a) Image optique d'une coupe de rein colorée au bleu de toluidine. (b) Image Meta SIMS présentant la répartition du cholestérol cationisé par l'argent (m/z 493) ²²⁷.

L'utilisation d'ions primaires polyatomiques tels que l'or, le bismuth ou le $C60^+$ a également été une voie d'étude. Ces développements ont considérablement amélioré l'utilisation du SIMS pour la MSI en fournissant des ions primaires polyatomiques pouvant être focalisés de façon à réaliser des images à haute résolution avec une bonne sensibilité et

présentant des ions intacts ^{220, 230-232}. Ceci présente un réel avantage pour la réalisation d'images à partir d'échantillons biologiques comme le montre l'exemple présenté **Figure 36**.

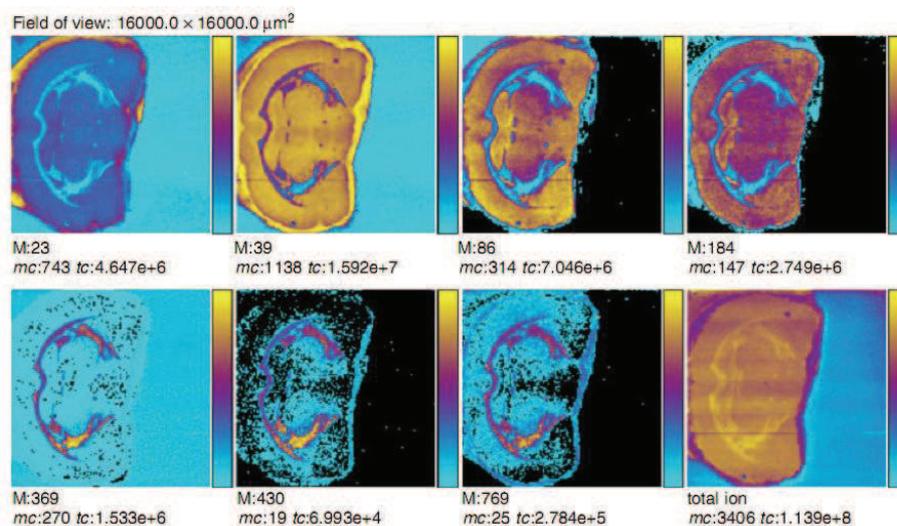


Figure 36 : Images obtenues à partir d'une coupe de cerveau de rat des ions Na⁺ (m/z 23), K⁺ (m/z 39), choline (m/z 86), phosphocholine (m/z 184), cholestérol [M+H-H₂O]⁺ (m/z 369), vitamine E (m/z 430), phospholipides (m/z 769) et du TIC. Images réalisées à 62,5 μm avec une source d'ions primaires Au₃⁺²²⁰.

Depuis l'introduction de l'imagerie SIMS au début des années 1960, de nombreux développements ont donc été réalisés montrant l'efficacité de cette technique pour analyser la distribution de petites molécules telles que les lipides avec une très grande résolution. Depuis son introduction au début des années 60, de nombreuses études confirment l'intérêt de l'imagerie SIMS pour étudier à l'échelle subcellulaire avec une grande résolution la localisation de différents composés allant d'éléments monoatomiques en mode dynamique aux lipides en mode statique. Un exemple d'application de l'imagerie SIMS (Belazi et al.) montre qu'il est possible de localiser le tetroxide d'Osmium (OsO₄), composé généralement utilisé en microscopie électronique et optique pour colorer les lipides insaturés présents dans les tissus ou cellules. Les images obtenues avec une source bismuth montrent clairement une localisation complémentaire après incubation avec l'OsO₄ des acides gras insaturés C18 et des acides gras saturés C18. Cette complémentarité n'est pas observée avant l'étape d'incubation suggérant une possible redistribution des lipides dans le tissu après l'incubation ²³³. Un autre exemple d'application a été réalisé sur la stéatose hépatique non alcoolique ²³⁴. En comparant une coupe de rein présentant cette pathologie avec une coupe de rein saine, il apparaît une modification dans la distribution de certains lipides et en particulier de triacylglycerols

(TAG), de diacylglycérols (DAG), de monoacylglycérols (MAG), d'acides gras (FA), de vitamine E et de cholestérol (**Figure 37**).

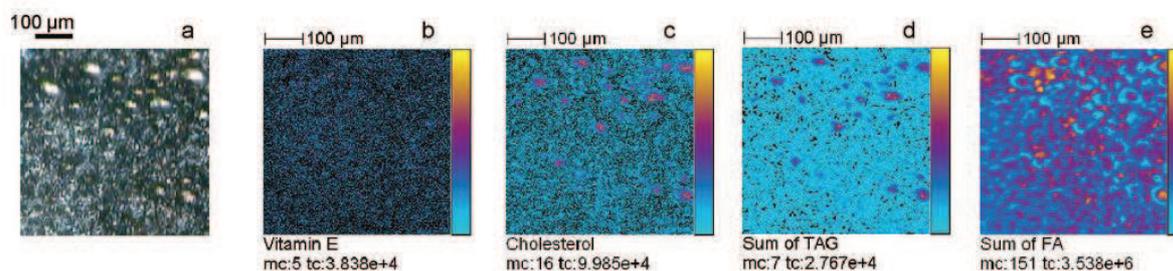


Figure 37 : Images d'une coupe de rein stéatose hépatique non alcoolique. (a) Image optique, images SIMS de (b) vitamine E (mode négatif), (c) cholestérol (mode positif), (d) somme des TAG (mode positif) et (e) somme des FA (mode négatif). Images SIMS obtenues à l'aide d'une source d'ions bismuth ²³⁴.

En présentant des images obtenues à l'échelle subcellulaire, l'imagerie SIMS est devenue une technique incontournable dans l'analyse de petits composés tels que les lipides. Les derniers développements ont permis d'analyser des composés intacts avec une bonne sensibilité et surtout il est possible de détecter des composés de plus haut poids moléculaire tels que des petits peptides. Il n'est cependant pas possible de détecter des protéines et il est impossible de caractériser des composés par MS/MS. Néanmoins, cette technique est complémentaire de l'imagerie MALDI mais ces deux techniques nécessitent l'utilisation d'un vide poussé ce qui exclut l'analyse de composés *in vivo*. D'autres techniques plus récentes permettent ce type d'application comme les sources DESI (Desorption ElectroSpray Ionization) basées sur les sources ESI.

1.2.4. Imagerie et autres sources

Depuis quelques années, de nouvelles sources ont fait leur apparition et permettent l'analyse directe de surfaces à température ambiante et à pression atmosphérique. La facilité d'introduction des échantillons solides fait de ces sources un bon outil pour l'analyse d'échantillons biologiques comme des coupes de tissus ou pour l'analyse *in vivo* ou *ex vivo*.

Parmi ces techniques, il faut mentionner le DART (Direct Analysis in Real time) ²³⁵, l'ASAP (Atmospheric Pressure Analysis Probe) ²³⁶ et le DAPCI (Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation) ²³⁷ pour l'analyse de petites molécules.

En ce qui concerne l'analyse de plus grosses molécules telles que les protéines, d'autres sources ont été développées incluant l'ELDI (Electrospray Assisted Laser Desorption Ionization)²³⁸⁻²⁴² ou le MALDESI²⁴³⁻²⁴⁵ (Matrix Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization) qui correspondent respectivement à un couplage entre une source LDI ou MALDI et une source ESI. Ces deux sources ajoutées au RASTIR (Remote Analyte Sampling, Transport, and Ionization Relay)²⁴⁶ permettent la désorption et la formation d'espèces multichargées en phase gazeuse à partir de la surface d'un échantillon solide qui peut être un tissu.

Dans le même esprit, le LAESI (Laser Ablation Electrospray Ionization)²⁴⁷, le IR-LDESI (Infrared Laser Desorption Electrospray Ionization)²⁴⁸, et l'IRLADESI (Infrared Laser-Assisted Desorption Electrospray Ionization)²⁴⁹ sont des sources basées sur le même principe que l'ELDI. La différence vient uniquement de l'utilisation d'un laser IR qui permet de désorber une grande quantité de matériel mais souffre d'une moins bonne sensibilité que les lasers UV. Ces sources permettent de coupler la désorption laser et l'ionisation par une source ESI permettant la formation d'espèces multichargées mais aucune application en imagerie n'a pu être effectuée par manque d'automatisation de ces techniques.

Une autre source pouvant être utilisée à température ambiante et pression atmosphérique et compatible avec l'analyse de surface mais aussi avec la MSI est la source DESI (Desorption Electrospray Ionization). Le DESI, technique introduite par Cooks et coll. en 2004, repose sur l'utilisation des sources ESI²⁵⁰. Des gouttelettes chargées de solvant produites par ESI vont être dirigées vers une surface pour effectuer un bombardement de cette dernière à l'aide de microgouttelettes chargées. Les gouttelettes atterrissent sur la surface et repartent de celle-ci après avoir arraché les molécules présentes à la surface de l'échantillon. Ainsi les gouttelettes qui repartent de l'échantillon contiennent les analytes extraits²⁵¹ (**Figure 38a**). Après cette étape, les gouttelettes subissent le processus de désolvatation classique de l'ESI de manière à conduire à la formation d'ions nus en phase gazeuse suivant le modèle de Dole²⁵² ou d'Iribarne et Thomson²⁵³.

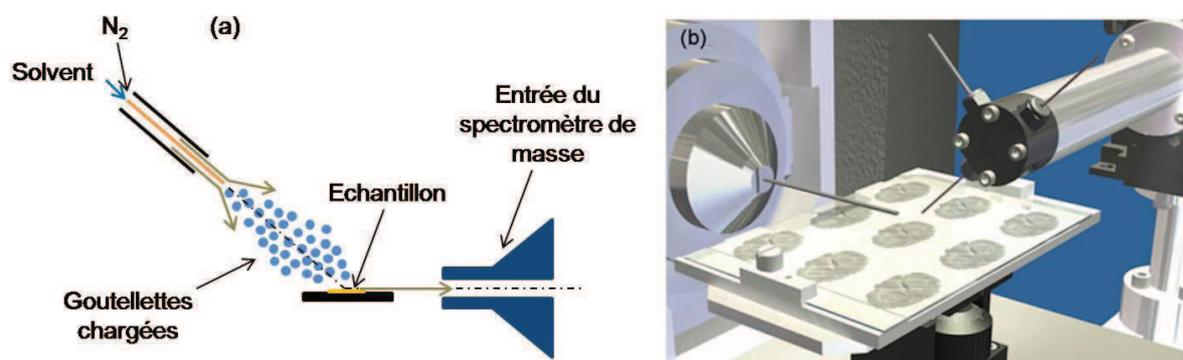


Figure 38 : (a) Schéma de la source DESI et (b) de la procédure pour l'IMS.

Cette technique a été utilisée pour de nombreuses applications notamment dans le domaine du légal^{254, 255}, en métabolomique^{256, 257}, dans le domaine pharmaceutique²⁵⁸⁻²⁶⁰, pour la caractérisation de produits naturels contenus dans des plantes²⁶¹, pour étudier des bactéries^{262, 263}, des polymères^{264, 265}, des protéines^{266, 267}, pour la détection d'explosifs^{237, 268, 269} mais aussi dans le cadre d'expériences de MSI^{270, 271}.

L'utilisation de la source DESI pour la MSI permet d'obtenir la distribution des molécules intactes au sein d'une surface telle qu'une coupe de tissu dans le cas d'analyses de biomolécules. Typiquement, la résolution spatiale avec cette source est de l'ordre de 250 μm ce qui est généralement obtenue en imagerie MALDI avec un dépôt de matrice à l'aide de micro-spotter. Cependant, avec les derniers développements apportés aux sources DESI, il a été possible d'obtenir une résolution spatiale d'environ 40 μm ²⁷². Un exemple de l'utilisation de la source DESI en MSI est présenté **Figure 39** avec l'étude de la distribution de lipides tels que des phosphatidylinositols (PI), des phosphatidylsérines (PS) et des sulfatides (ST) au sein d'une coupe de cerveau de rat.

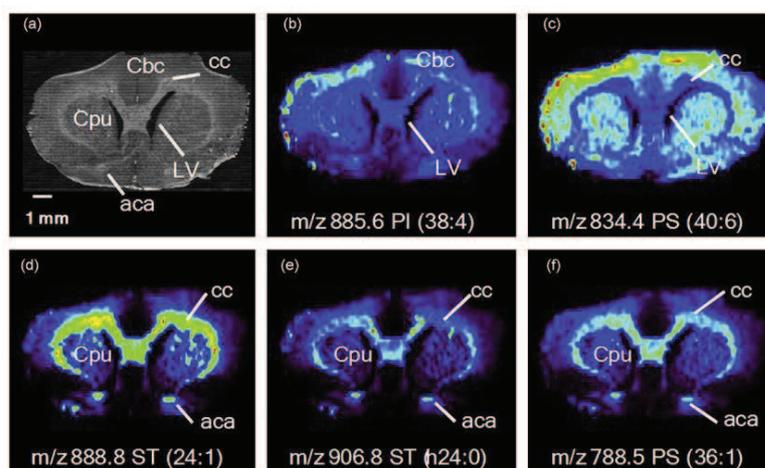


Figure 39 : (a) Image optique de la coupe de cerveau de rat et (b-f) images DESI de différents lipides tels que phosphatidylinositols (PI), des phosphatidylsérines (PS) et des sulfatides (ST) obtenus en mode négatif²⁷¹.

Le DESI est une technique très prometteuse pour l'analyse de tissus *in vivo* puisqu'elle ne demande aucune préparation de l'échantillon. De nombreuses applications peuvent être envisagées comme en témoigne certains articles tels que l'utilisation de l'imagerie DESI dans le cas d'une étude sur l'adénocarcinome de foie²⁷³.

1.3. Bilan

L'imagerie par spectrométrie est donc une technique de choix pour détecter et localiser des composés au sein d'un tissu comme le prouve les nombreuses applications en protéomique notamment pour la recherche de biomarqueurs mais aussi en lipidomique et dans le cas d'études pharmacologique. Les nombreuses études portées sur la préparation de l'échantillon notamment sur les étapes de lavage ont permis d'améliorer la qualité des spectres mais aussi le nombre de composés pouvant être détectés en une seule analyse. De la même manière, l'apport des matrices ioniques dans l'imagerie associé à ces traitements montre que de nombreux développements dans cette voie reste à effectuer afin d'optimiser la détection des biomolécules telles que les lipides, les peptides ou les protéines. Avec l'arrivée de nouvelles sources compatibles avec la MSI, le nombre et le type d'échantillons pouvant être analysés a considérablement augmenté allant de la cellule à la coupe entière de petits animaux. Les nombreux développements instrumentaux ainsi que les nouveaux outils informatiques pour le traitement des données permettent de mettre en évidence des composés

différentiellement exprimés dans le tissu ou des régions présentant des profils différents à plus haut débit et avec une plus grande résolution spatiale. Les nouveaux appareils « hybrides » qui présentent la particularité de pouvoir à la fois localiser les composés mais aussi de pouvoir réaliser des analyses en mode MS/MS, permettent d'identifier les molécules d'intérêt directement sur coupe. De nombreuses études structurales ont pu ainsi être réalisées notamment sur les peptides^{109, 176}, les médicaments^{137, 138} mais aussi les lipides^{194, 195}. Cependant, concernant les protéines, même si à présent il est possible de mettre en évidence certains biomarqueurs potentiels, leur identification directement sur coupe reste encore à optimiser.

Afin de répondre aux besoins actuels de l'analyse directe sur coupe et de l'imagerie MALDI, de nouvelles procédures incluant la préparation des échantillons et la mise au point de nouvelles matrices ioniques ont été développées au cours de cette thèse et rendues compatibles avec le système de micro-dépôt afin d'améliorer la détection des lipides, des peptides et des protéines. La seconde partie de la thèse consistait à mettre au point une procédure afin d'identifier les protéines directement sur coupe en mettant en jeu une stratégie top-down impliquant l'utilisation d'une approche « T3 sequencing » et une stratégie bottom-up impliquant l'utilisation d'une digestion enzymatique *in situ* suivie d'une dérivation N-Terminale des peptides de digestion. Tous ces développements sont présentés et détaillés dans les prochaines parties.

2. Développement en Imagerie MALDI de composés natifs

2.1. Développements pour l'analyse des lipides

Pour l'analyse des lipides, il a été montré que la matrice 2,5-DHB était l'une des matrices les plus couramment employées. Cette matrice présente différents avantages dont le faible nombre de pics de matrice présents dans les basses masses, une très bonne stabilité sous vide et de bonnes performances analytiques pour ces composés autant en mode d'ionisation positif que négatif^{182, 274, 275}. Cependant, il est difficile d'obtenir une cristallisation homogène de cette matrice. En effet, dans les solvants classiquement utilisés pour l'analyse des lipides et des peptides/protéines, la 2,5-DHB conduit à la formation de larges cristaux partant du bord du dépôt dans lesquels les analytes ne sont pas répartis de façon homogène. La matrice DHAP est aussi très employée pour l'analyse de différentes classes de lipides en mode positif et négatif^{182, 193, 194}. Cependant, cette dernière matrice ne présente pas une grande stabilité sous vide empêchant ainsi la détection des composés après 30 ou 45 minutes d'analyse dans une source sous vide poussé²⁷⁶. Plus récemment d'autres substances ont été étudiées comme matrices potentielles pour l'analyse des lipides. Parmi celles-ci, la matrice p-nitroaniline (PNA) a semblé être une bonne alternative pour la détection de lipides tels que les phospholipides²⁷⁷ mais cette matrice est également instable sous vide. Parmi les autres matrices proposées, il faut également mentionner l'ATT qui présente des propriétés très intéressantes pour l'analyse de phospholipides et une grande stabilité sous vide¹³⁵. Très récemment, le 2-Mercaptobenzothiazole (MBT)²⁷⁸ fut proposé pour la détection de lipides à partir de tissus. Cette dernière matrice présente une cristallisation assez homogène et semble bénéficier d'une grande stabilité sous vide. Elle permet ainsi l'analyse d'une grande variété de lipides.

Les lipides sont généralement des espèces solubles dans un grand nombre de solvants car la famille des lipides renferme de nombreuses classes de molécules de propriétés physico-chimiques très variées. Ils peuvent, par conséquent, diffuser rapidement dans la coupe. De plus, il n'est pas certain que les lipides nécessitent une incorporation dans les cristaux de matrice pour conduire à la formation d'ions en phase gazeuse et notamment à cause de leur plus grande volatilité. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes se basant sur des dépôts de matrice sans solvant par sublimation¹¹⁹ ou par dépôt de la matrice sous forme de poudre¹²⁰ furent employées. Ces méthodes de dépôts conduisent à la formation de cristaux fins et

homogènes en taille et en répartition sur la coupe de tissu. Un compromis entre extraction et délocalisation peut être obtenu par utilisation de micro-dépôts garantissant la diffusion des analytes uniquement dans les dimensions du dépôt. En même temps, les analytes bénéficient d'une meilleure extraction et donc d'une meilleure détection. De plus, dans ce mode de dépôt la réduction du volume de solvant déposé conduit à une cristallisation plus homogène composée de cristaux plus petits évitant ainsi l'apparition de « hot-spot ». Un des exemples de l'utilisation de micro-dépôts pour l'analyse de lipides a été réalisé avec l'acide 3-hydroxypicolinique (3HPA) comme matrice, déposée via un système piezoélectrique ²⁷⁹. Cette étude a montré la possibilité d'éviter les phénomènes de « hot-spot » connus pour la matrice 3-HPA. L'utilisation de tels systèmes semble donc un bon compromis pour l'analyse des lipides par la possibilité d'obtenir des dépôts plus homogènes tout en limitant la délocalisation des espèces. Notamment, le micro-dépôt pourrait constituer une solution pour le dépôt de la 2,5-DHB qui présente une cristallisation hétérogène avec la formation de longs cristaux par différentes méthodes de dépôt y compris par nébulisation ²⁷⁸.

Ainsi une amélioration de l'imagerie des lipides passe par la recherche de matrices MALDI adaptées à l'analyse des différentes familles de lipides et stables sous vide. Les matrices doivent également présenter une cristallisation la plus homogène possible avec des cristaux de dimensions les plus faibles possible. La cristallisation peut être améliorée en jouant sur les solvants utilisés et la composition, en cas de mélanges de solvants, mais également en changeant la méthode de dépôt. Ainsi, il apparaît intéressant de s'intéresser aux micro-dépôts qui, comme mentionné, permettent une cristallisation relativement homogène de la matrice tout en minimisant la délocalisation des analytes et en préservant l'extraction de ceux-ci des tissus. Les premières études ont donc porté sur le développement de micro-dépôts de la matrice et la recherche de matrice pour l'analyse des lipides.

Les essais de micro-dépôts ont été réalisés sur des coupes de cerveau de rat. Les premiers tests entrepris ont consisté à déposer une solution de 2,5-DHB à 20 mg/mL dans une solution EtOH/TFA 0.1% (7:3, v/v) généralement employée en MALDI classique pour la détection de lipides. Si le dépôt de la matrice est très stable durant toute la procédure de micro-dépôt, les cristaux de matrice obtenus après évaporation du solvant ne présentent pas une cristallisation homogène. Les cristaux ne sont pas répartis de façon homogène à la surface du dépôt mais localisés sur le bord du dépôt se rapprochant de la cristallisation habituellement observée en MALDI (**Figure 40**).

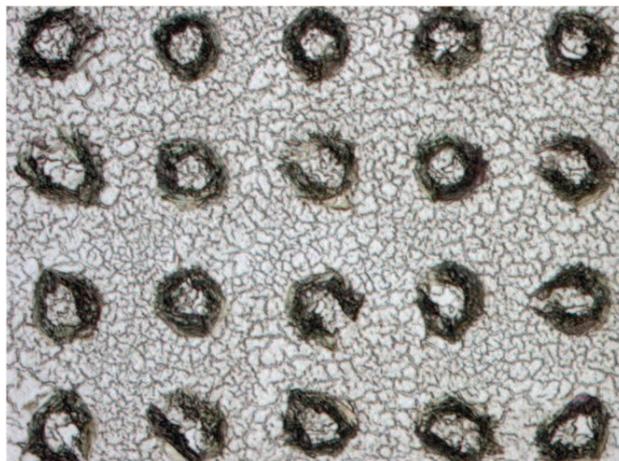


Figure 40 : Image optique de micro-dépôts de la 2,5-DHB à 20 mg/mL dans un mélange EtOH/TFA (0.1%) (7:3, v/v).

Il apparait donc clairement que cette matrice ne permet pas une détection optimale des lipides dans ces conditions. La formation en cercle des cristaux pourrait aussi s'expliquer par les propriétés physico-chimiques du tissu n'ayant subi aucun traitement. La tension de surface entre le tissu et la solution contenant la matrice pourrait être faible et entraîner une diffusion partielle de la solution sur le tissu qui présentera alors des zones peu concentrées conduisant à une hétérogénéité de cristallisation. Néanmoins, les dépôts sont tout de même analysés par imagerie MALDI. Lors de l'acquisition, le laser se déplace de spot en spot. Pour chaque dépôt, 500 spectres sont enregistrés à la position qui correspond au centre du dépôt. Afin de pouvoir obtenir le meilleur signal possible, un mouvement a été appliqué au laser afin que celui-ci se déplace à l'intérieur du spot et sur son ensemble. Malgré tout il reste difficile d'obtenir une parfaite représentation des molécules présentes dans le dépôt et les effets de « hot spot » ne sont pas minimisés par la méthode de dépôt employée.

D'autres matrices ont donc été testées dans les mêmes conditions afin de vérifier s'il était toutefois possible d'obtenir des dépôts de matrice homogènes pour la détection des lipides, comme l'ATT et la DHAP. Bien que la DHAP soit connue pour son instabilité sous vide poussé des études ont été poursuivies en mode micro-dépôt avec cette matrice. Afin d'établir une parfaite comparaison de l'efficacité de ces deux matrices, celles-ci sont déposées sur la même section de cerveau de rat en utilisant l'axe de symétrie de cet organe afin que les mêmes régions du cerveau soient recouvertes par les deux matrices. Les critères retenus pour l'évaluation de la performance des matrices sont la qualité de la cristallisation, l'intensité des pics détectés ainsi que la stabilité sous vide de la matrice. Une fois les dépôts réalisés, une image optique est directement enregistrée afin d'observer la cristallisation de ces deux

matrices avant l'introduction de l'échantillon dans la source MALDI (**Figure 41a**). Immédiatement après introduction de l'échantillon, une première série de spectres est enregistrée à partir des tissus. La même expérience est réitérée après avoir laissé le tissu 1H sous vide poussé (10^{-6} - 10^{-7} Torr) (**Figure 41b**).

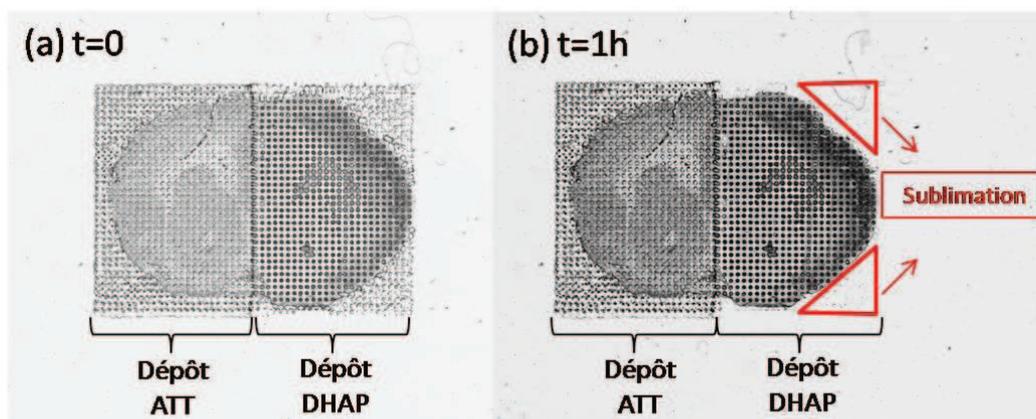


Figure 41 : Images optiques d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice ATT (à gauche) et de la matrice DHAP (à droite) enregistrées (a) après dépôts et (b) après une heure sous vide de la source MALDI.

Les observations faites au cours des expériences sont que la stabilité du dépôt est équivalente pour les deux matrices mais qu'en revanche la cristallisation du DHAP est plus homogène que celle de l'ATT qui présente une cristallisation du même type de celle de la 2,5-DHB (**Figure 42**).

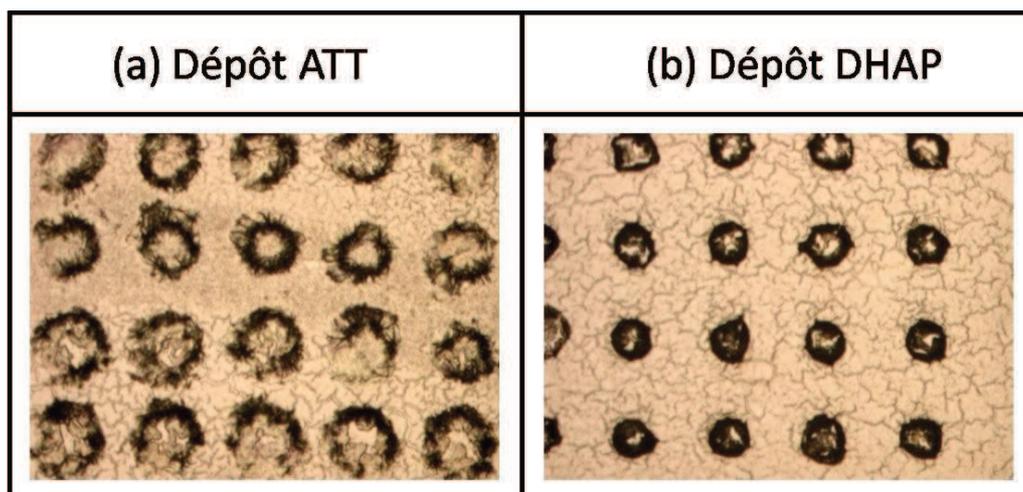


Figure 42 : Images optiques de micro-dépôts de (a) ATT et (b) DHAP à 20 mg/mL dans un mélange EtOH/TFA (0.1%) (7/3, v:v).

Les analyses effectuées juste après introduction des échantillons dans la source montrent que les deux matrices permettent de détecter les mêmes classes de lipides. Des signaux particulièrement intenses sont notamment observés dans la gamme m/z 700-900 (**Figure 43a-b**). Après 1H sous vide poussé, les résultats sont très différents. La matrice DHAP semble s'être sublimée (**Figure 41b**) ce qui se traduit par une perte totale de signal (**Figure 43d**). A l'inverse la matrice ATT semble très stable sous vide comme le confirme le spectre de masse enregistré qui est identique au précédent (**Figure 43c**). Les résultats confirment donc les observations relevées au sujet de l'instabilité de la matrice DHAP qui s'accroît lors de micro-dépôts ou lorsque la quantité déposée est très faible²⁷⁶. Il est donc clair que cette matrice ne peut pas être utilisée dans le cadre d'expériences d'imagerie MALDI mais peut tout de même être utilisée pour des analyses directes de tissus effectuées juste après le dépôt de la matrice. Cependant, bien que l'ATT présente des caractéristiques idéales pour l'imagerie (intensité, sensibilité, stabilité sous vide), son hétérogénéité de cristallisation peut entraîner une perte d'information lors de l'acquisition des données qui ne peut être compensée même par utilisation d'une acquisition où le laser balaiera différents points du micro-dépôt.

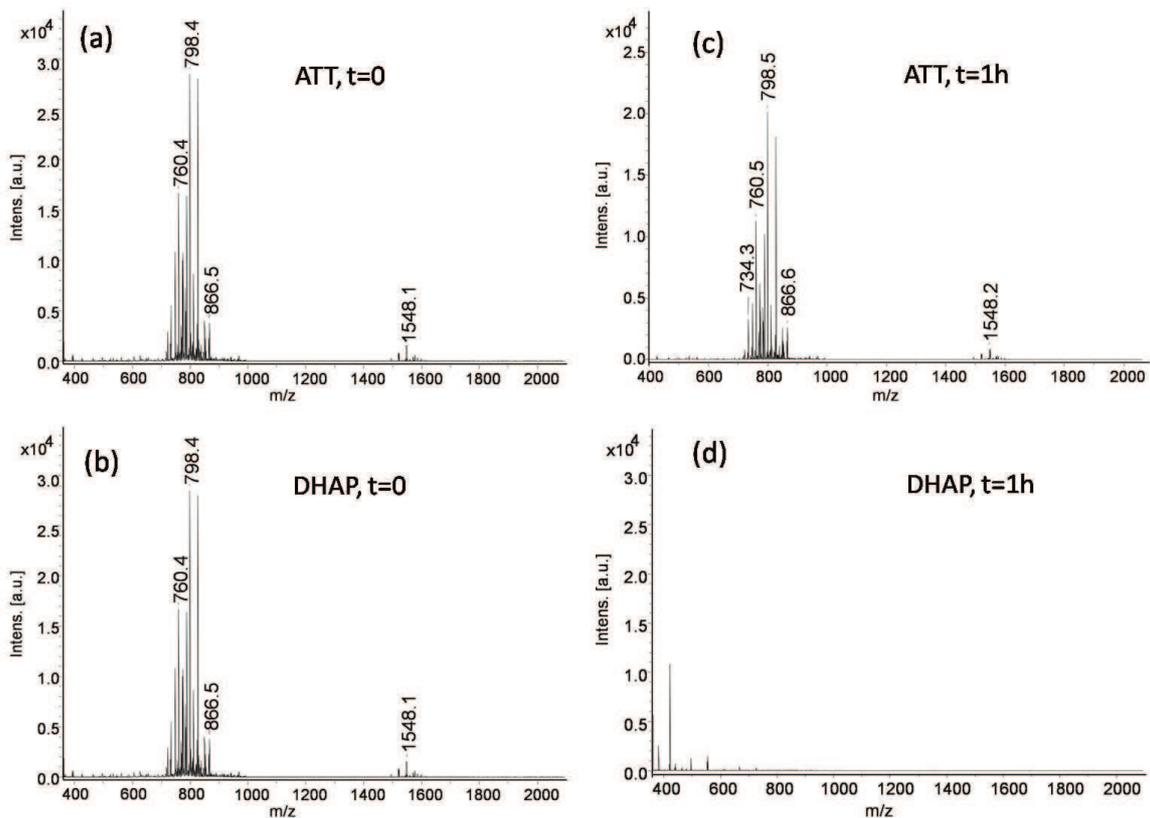


Figure 43 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat directement après dépôts de la matrice (a) ATT et (b) DHAP et après une heure dans le vide de la source (c-d).

Dans la recherche d'une alternative à ces matrices classiques peu stables sous vide ou présentant des cristallisations hétérogènes, les matrices ioniques liquides (ILM) ont semblé offrir des perspectives intéressantes. En effet, ces matrices sont connues pour permettre une cristallisation parfaitement homogène et présenter une grande stabilité sous vide. Ces matrices associées aux micro-dépôts semblent donc tout à fait appropriées pour les expériences d'imagerie MALDI. Des exemples d'applications ont déjà montré l'utilité des matrices ioniques solides dans le cadre d'imagerie MALDI^{111, 113}. Certains groupes ont présenté des travaux basés sur l'utilisation de matrices ioniques liquides pour la détection de gangliosides sur des coupes de tissus¹¹² ou pour la détection de peptides en analyse MALDI classique²⁸⁰. Cependant, les matrices ioniques présentées ne sont pas liquides mais solides contrairement à ce qui est énoncé dans le titre. Il est donc important d'établir une nomenclature afin d'éviter toute confusion sur la classe de matrice utilisée.

La 2,5-DHB étant la matrice la plus utilisée pour l'analyse des lipides, il est donc possible de s'en servir afin de réaliser une matrice ionique. De nombreux exemples illustrent l'utilisation d'ILM à base de 2,5-DHB pour l'étude de sucres^{73, 74} ou de phosphopeptides⁷¹. De nombreuses bases organiques ont donc été testées avec la 2,5-DHB et notamment l'aniline (ANI), la N,N-dimethylaniline (DANI), la N,N-diethylaniline (DEANI), la 3-acétylpyridine (3AP) et la pyridine (Pyr) (**Figure 44**).

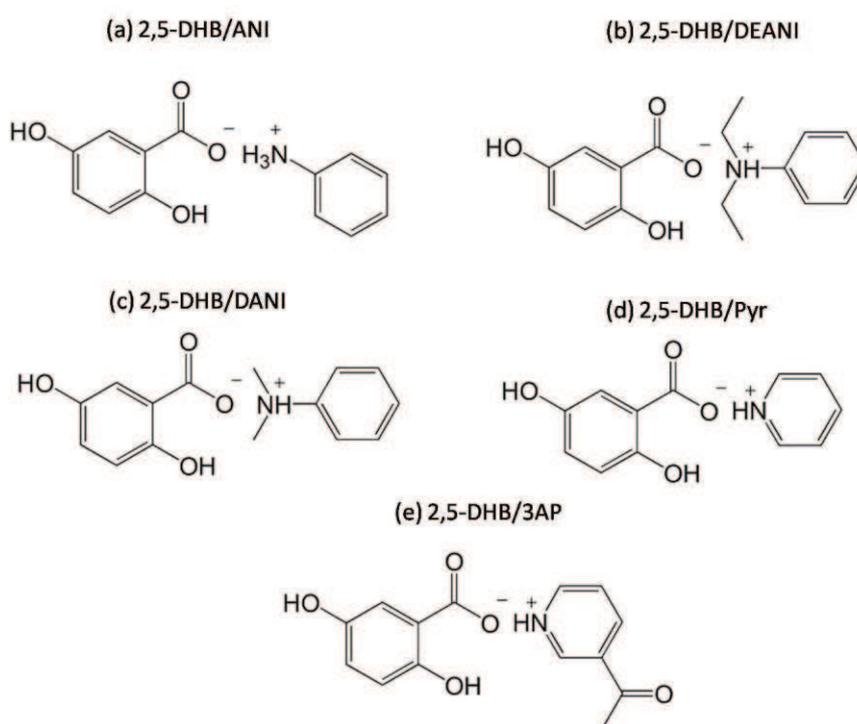


Figure 44 : Formules semi-développées des matrices ioniques liquides (a) 2,5-DHB/ANI, (b) 2,5-DHB/DANI, (c) 2,5-DHB/DEANI, (d) 2,5-DHB/Pyr et (e) 2,5-DHB/3AP.

Ces matrices peuvent être rapidement synthétisées pour un usage extemporané en ajoutant les bases organiques de façon équimolaire à la solution de 2,5-DHB. Les matrices ioniques liquides ainsi formées sont micro-déposées par le système de type piézoélectrique à la surface du tissu. Après dépôt, des images optiques montrant les micro-dépôts de matrice sont enregistrées. La **Figure 45** présente les images enregistrées pour le micro-dépôt de la matrice 2,5-DHB versus 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/3AP et 2,5-DHB/Pyr.

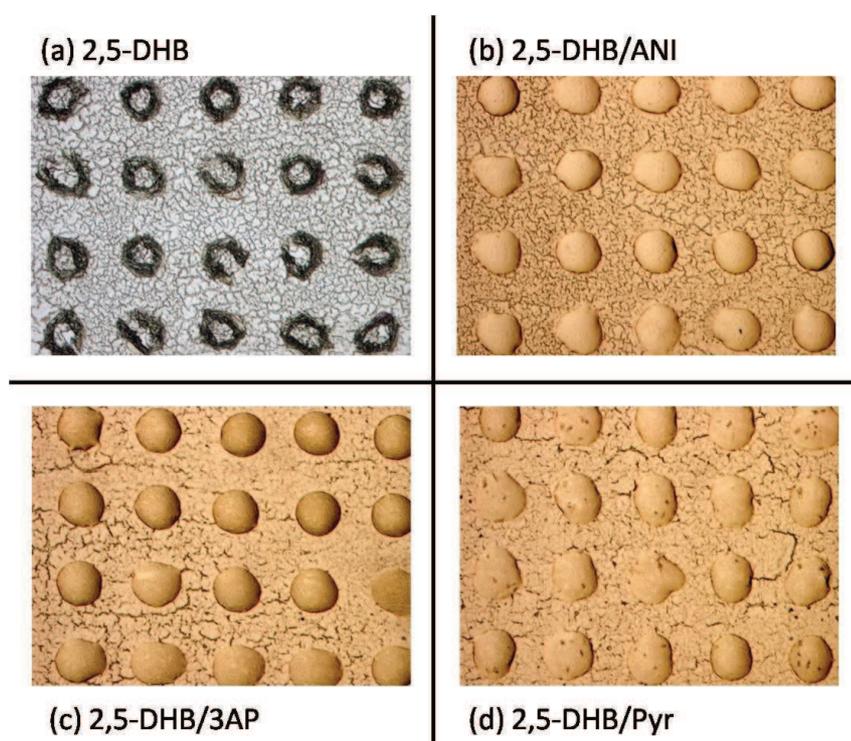


Figure 45 : Images optiques des micro-dépôts de la matrice (a) 2,5-DHB, (b) 2,5-DHB/ANI, (c) 2,5-DHB/3AP et (d) 2,5-DHB /Pyr.

Les premières observations montrent une très grande homogénéité des dépôts obtenus avec toutes les ILM étudiées par rapport à la cristallisation obtenue avec un dépôt de 2,5-DHB (**Figure 45a**). D'après les spectres de masse enregistrés, les ILM montrent une homogénéité quasi parfaite de la répartition des échantillons dans le dépôt comme décrit dans la littérature⁶⁸. Concernant la qualité des spectres, toutes les ILM étudiées présentent les mêmes propriétés en termes de rapport signal/bruit, d'espèces détectées et d'intensité des pics. De plus, les liquides ioniques étant connus pour présenter une pression de vapeur saturante très faible, ces

matrices sont très stables sous vide. Ainsi toutes ces qualités (intensité des signaux, homogénéité du dépôt et stabilité sous vide) font de ces matrices une très bonne alternative aux matrices cristallines pour l'imagerie MALDI de lipides.

Afin d'établir la comparaison de l'efficacité des ILM développées avec la matrice 2,5-DHB, la matrice 2,5-DHB/ANI et la matrice 2,5-DHB sont déposées sur la même section de cerveau de rat en utilisant l'axe de symétrie de cet organe afin que les mêmes régions du cerveau soient recouvertes par les deux matrices. Des spectres sont enregistrés en mode positif et négatif dans les mêmes régions du cerveau afin de comparer ces matrices de manière très précise. Les spectres présentés **Figure 46** montrent clairement que les ILM et la matrice classique 2,5-DHB présentent la même classe de lipides détectés que ce soit en mode positif ou négatif. Cependant, il est difficile d'obtenir un spectre de qualité en irradiant le centre du spot défini par la matrice 2,5-DHB contrairement à la matrice 2,5-DHB/ANI qui présente des spots très homogènes ainsi qu'une répartition très homogène des analytes dans les spots.

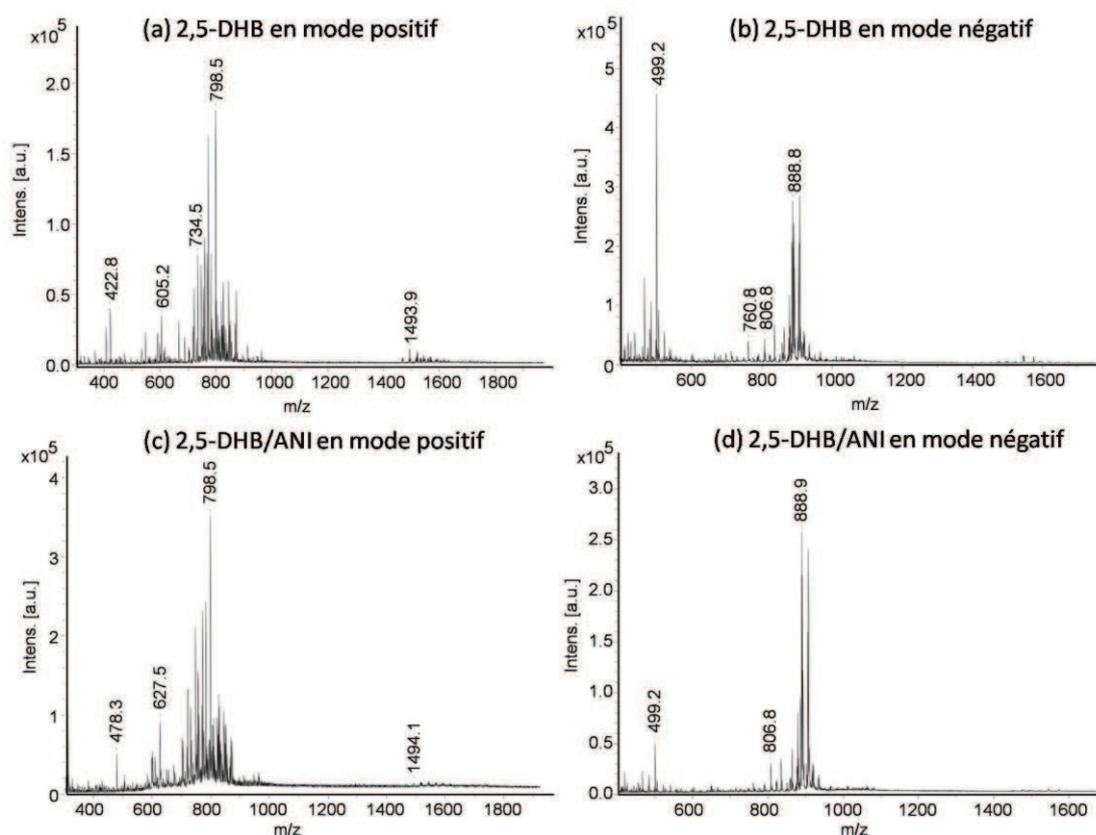


Figure 46 : Spectres de masse enregistrés après dépôt de la matrice 2,5-DHB en mode (a) positif et (b) négatif. Spectres de masse enregistrés après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI en mode (c) positif et (c) négatif.

Afin d'évaluer la qualité des images MALDI avec la matrice 2,5-DHB/ANI, celle-ci est déposée sur la moitié gauche d'une section de cerveau de rat à une résolution de 250 μm . Le dépôt sur coupe s'est réalisé avec une très grande stabilité et les spectres en chaque position sont enregistrés en mode réflecteur positif. La **Figure 47** présente les images de la répartition très spécifique de l'ion $[M+K]^+$ correspondant à la phosphocholine (PC) {32:0} (**Figure 47a**) et de l'ion $[M+H]^+$ correspondant à la phosphocholine (PC) {36:1} (**Figure 47b**).

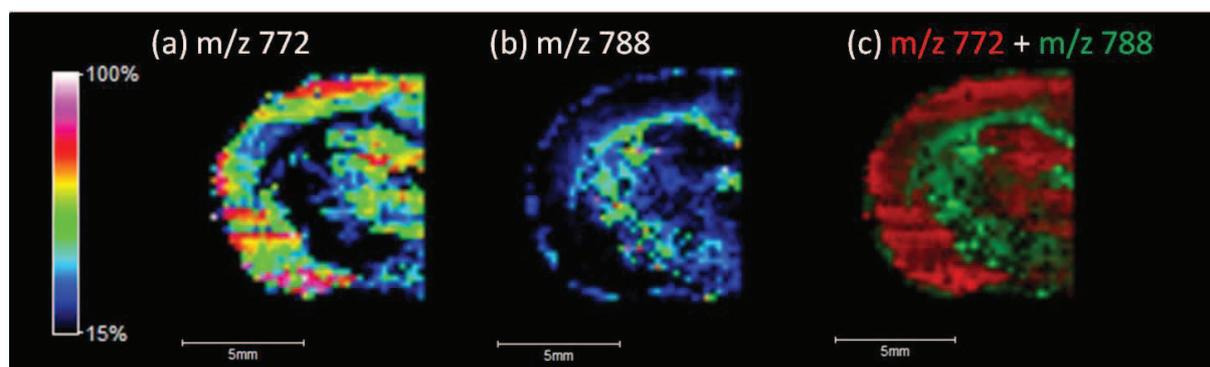


Figure 47 : Images MALDI (a) de la PC {32:0}, (b) de la PC {36:1} et (c) de la somme des deux obtenue en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec une résolution de 250 μm et en accumulant 500 spectres par position à 200 Hz.

L'attribution des espèces est réalisée sur la base de la mesure du m/z et par comparaison avec des banques établies par différentes équipes²⁷⁸. Il apparaît clairement qu'en mode positif, l'utilisation de ces ILM telle que la matrice 2,5-DHB/ANI, permet la détection d'un grand nombre de phospholipides tels que les PC, les PE, PS mais aussi de sphingolipides tels que les sphingomyélines (SM). Un exemple de lipides détectés en mode positif est présenté dans le **Tableau 3**.

Masse mesurée (m/z)	Masse théorique (m/z)	Identification
718.60	718.54	PE {34:1} [M+H] ⁺
731.74	732.61	SM {36:1} [M+H] ⁺
734.57	734.57	PC {32:0} [M+H] ⁺
753.59	753.59 753.59	SM {36:1} [M+Na] ⁺ SM {38:4} [M+H] ⁺
756.53	756.55 756.57	PC {34:3} [M+H] ⁺ PC {32:0} [M+Na] ⁺
760.55	760.59	PC {34:1} [M+H] ⁺
775.70	775.57 775.56	SM {40:7} [M+H] ⁺ SM {38:4} [M+Na] ⁺
782.55	782.56 782.57	PC {34:1} [M+Na] ⁺ PC {36:4} [M+H] ⁺
788.91	788.62	PC {36:1} [M+H] ⁺
806.52	806.56 806.57	PC {36:3} [M+Na] ⁺ PC {38:6} [M+H] ⁺
810.57	810.59 810.60	PC {36:1} [M+Na] ⁺ PC {38:4} [M+H] ⁺
852.48	852.47	PS {38:6} [M-H+2Na] ⁺
868.48	868.57	PS {38:6} [M-H+Na+K] ⁺

Tableau 3 : Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur positif directement sur coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI.

Afin de tester la résistance de cette matrice au vide poussé de la source, la coupe fut laissée pendant 2 jours dans le spectromètre de masse. Après 2 jours, les spots de matrice ne présentent aucune dégradation liée au vide et après analyse en mode réflecteur positif, les spectres enregistrés sont tout à fait semblables à ceux enregistrés juste après introduction dans la source. Le spectre présente des pics d'une très grande intensité ainsi qu'une très bonne résolution (**Figure 48**). La matrice est donc extrêmement stable sous vide.

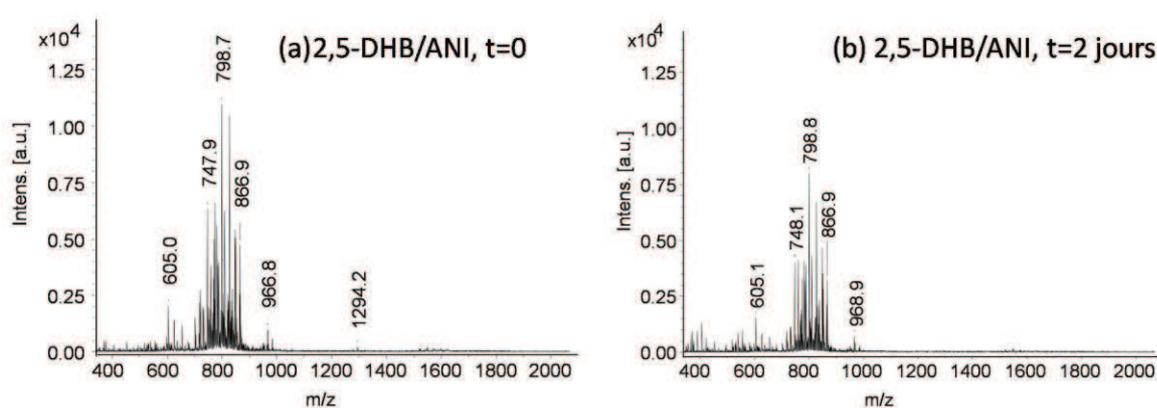


Figure 48 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat (a) après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI et (b) après deux jours dans la source MALDI.

Cette très grande stabilité a permis de réaliser une image de lipides en mode réflecteur négatif après 2 jours sous vide, montrant une fois de plus que cette matrice est compatible avec les deux modes d'ionisation. La **Figure 49** présente les images de la répartition très spécifique de l'ion m/z 857 correspondant au phosphoinositol (PI) {36:4} (**Figure 49a**) et de l'ion (m/z 888) correspondant au sulfatide (ST) {42:2} (**Figure 49b**). Les images montrent que chacun de ces lipides présente une localisation tout à fait spécifique et que les images sont de bonne qualité.

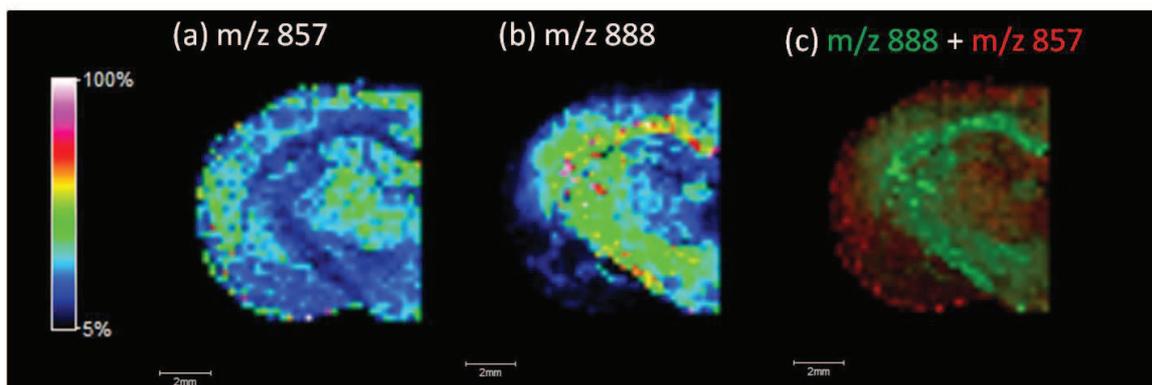


Figure 49 : Images MALDI de la répartition des ions (a) m/z 857 correspondant au phosphoinositol (PI) {36:4}, (b) m/z 888 correspondant au sulfatide (ST) {42:2} et (c) de la somme obtenue en mode réflecteur négatif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec une résolution de $250\ \mu\text{m}$ et en accumulant 500 spectres par position à 200 Hz.

L'attribution des espèces est réalisée sur la base de la mesure du m/z et par comparaison avec des banques établies par différentes équipes¹⁸⁵. Il apparait clairement qu'en mode négatif, l'utilisation de ces ILM permet la détection d'un grand nombre de lipides incluant des phospholipides tels que les PI ainsi que des sphingolipides tels que des sulfatides (ST) et des gangliosides. Le **Tableau 4** présente quelques lipides détectés après dépôt.

Masse mesurée (m/z)	Masse théorique (m/z)	Identification
806.79	806.54	ST {36:1}
834.82	834.58	ST {38:1}
850.82	850.57	ST-OH {38:1}
857.78	857.52	PI {36:4}
860.84	860.59	ST {40:2}
862.86	862.61	ST {40:1}
876.87	876.59	ST-OH {40:2}
878.86	878.59	ST-OH {40:1}
885.81	885.55	PI {38:4}
888.88	888.62	ST {42:2}
890.89	890.64	ST {42:1}
902.88	902.60	ST-OH {42:3}
904.98	904.62	ST-OH {42:2}
906.89	906.63	ST-OH {42:1}
916.93	916.66	ST {44:2}
918.93	918.67	ST {44:1}
932.93	932.65	ST-OH {44:2}
934.94	934.65	ST-OH {44:1}
1544.47	1547.87	GM1 {36:1}
1572.54	1572.90	GM1 {38:1}

Tableau 4 : Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur négatif directement sur coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI.

Les matrices généralement employées pour la détection de lipides incluant la 2,5-DHB, présentent une cristallisation assez hétérogène malgré l'utilisation de micro-dépôts. Ces formations particulières de cristaux pourraient être causées par la tension de surface entre le tissu et la solution de matrice entraînant la solution vers les bords du spot. Il n'est cependant pas possible de réaliser un traitement des coupes afin d'améliorer la cristallisation sans risquer la perte abondante de lipides. Suivant la classe de lipides, ces derniers peuvent être solubilisés aussi bien dans des solvants de type alcool (e.g. EtOH) que des solvants beaucoup moins polaires tels que le chloroforme ou le xylène. Cependant, l'utilisation de matrices ioniques comme les ILM telle que la 2,5-DHB/ANI sont une très bonne alternative aux traditionnelles matrices employées pour la détection des lipides sur coupe. Ces matrices présentent des spectres avec des pics d'une très bonne intensité avec une très bonne résolution spectrale. La stabilité sous vide associée à la possibilité d'enregistrer des images aussi bien en mode d'ionisation positif que négatif, en font des matrices de choix pour l'analyse de lipides par micro-dépôts. De plus, ces matrices, étant synthétisées à partir de la 2,5-DHB, sont aussi des matrices de choix pour la détection de petites molécules incluant les médicaments et leurs métabolites puisqu'elles présentent peu de pics en basse masse.

Les lipides étant une classe de biomolécules assez facilement détectables par MSI, de nombreuses procédures ont été développées afin de déposer la matrice de façon très homogène incluant le dépôt par nébulisation ou par sublimation. Cependant ces modes d'application ne restent réellement compatibles qu'avec l'analyse de petits composés. L'avantage d'un micro-spotter est de pouvoir réaliser des images de quasiment toutes les classes de biomolécules.

2.2. Développements pour l'analyse des peptides

L'imagerie MALDI a beaucoup été employée pour la recherche de neuropeptides^{81, 176-179} notamment dans la maladie d'Alzheimer¹⁷⁴ ou la maladie de Parkinson¹⁷². Cette technique permet l'identification directe des peptides à partir des tissus en réalisant des expériences MS/MS directement sur coupe de tissu¹⁰⁹. La grande majorité des applications présentées dans le cadre de l'imagerie MALDI de peptides a été pratiquée avec la 2,5-DHB comme matrice déposée par nébulisation^{109, 176}. Ainsi les mêmes problèmes que ceux rencontrés pour l'analyse des lipides sont observés pour les peptides. Ainsi, par micro-dépôts, la cristallisation de la matrice 2,5-DHB (voir partie 2.1) est très hétérogène avec formation de

« hot-spot » pouvant entraîner une perte d'information. Perte d'information qu'un mouvement aléatoire du laser à l'intérieur du dépôt pendant l'acquisition ne permet pas de corriger. La matrice HCCA est également très utilisée dans le cadre de l'analyse de peptides. Contrairement à la 2,5-DHB, HCCA présente une cristallisation naturellement plus homogène dans les solvants classiques (petits cristaux répartis de façon homogène). Ainsi, les premières expériences de micro-dépôt de la matrice HCCA furent réalisées avec une solution classique de matrice 10mg/mL dans une solution d'AcN/TFA (0.1%) (7:3, v/v) (**Figure 50a**). Les photographies du réseau de micro-dépôts réalisées après l'expérience montrent une réelle difficulté pour déposer cette matrice. Les dépôts sont mal définis et peu homogènes et ne permettront pas de réaliser des images d'une grande qualité. De plus, au cours de l'expérience il a pu être observé qu'après 10 minutes seulement de dépôt, l'application de la matrice par le micro-spotter devient complètement instable conduisant à la formation de cristaux sur le capillaire de la tête piézoélectrique et à l'apparition de gouttelettes satellites. Au bout de 30 minutes, la formation de cristaux sur la tête piézoélectrique conduit au bouchage de cette dernière. Afin d'obtenir une application stable de la matrice, il est nécessaire de nettoyer la tête piézoélectrique toutes les 5 minutes ce qui est très certainement fastidieux et ne peut convenir à une réelle application de routine. Afin de minimiser ces problèmes dus à la cristallisation de la matrice sur la tête piézoélectrique, la concentration de la solution de HCCA est réduite à 5 mg/mL. Dans cette configuration, l'application de la matrice est stable mais le temps de dépôt est alors logiquement multiplié par 2 puisqu'il faudra alors 2 fois plus de cycles pour atteindre théoriquement la même quantité de matrice déposée. Ceci peut devenir un réel inconvénient dans le cas d'une section de tissu de dimensions importantes. De plus, il faut noter que la réduction de la concentration de la matrice conduit à une nette diminution de la qualité spectrale. En effet, les spectres présentent un bruit important et les signaux correspondant aux peptides sont peu nombreux et de faible intensité. Afin de trouver une alternative à ces problèmes, nous avons étudié différentes matrices ioniques. La matrice ionique liquide 2,5-DHB/ANI, présentée dans la partie 2.1, est écartée d'emblée car elle conduit, comme attendu, majoritairement à la détection de lipides.

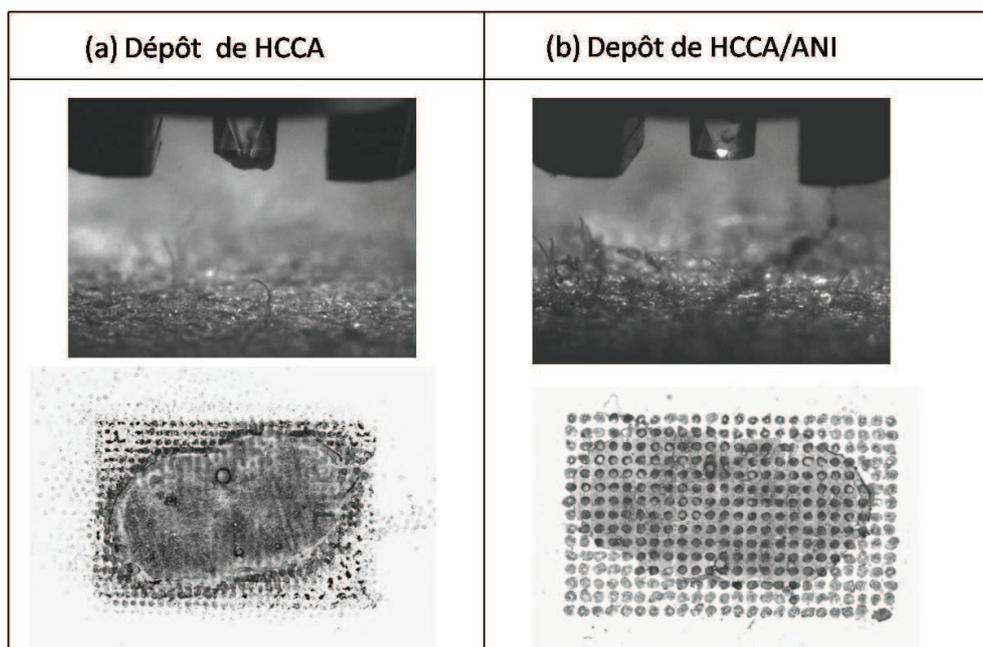


Figure 50 : Images optiques des têtes piézoélectriques et des coupes de cerveau de rat après dépôt de (a) HCCA et (b) HCCA/ANI pendant 30 minutes.

Sachant que certaines matrices ioniques solides, précédemment étudiées et développées au laboratoire, avaient permis d'améliorer l'analyse de peptides par imagerie MALDI telles que les matrices HCCA/ANI ou HCCA/N,N-Diméthylaniline (HCCA/DANI) ⁶⁶ les premières analyses s'orientèrent vers ces matrices déjà étudiées pour le dépôt manuel. Ces matrices ioniques étant préparées à partir d'HCCA, elles semblent donc très adaptées à l'analyse de peptides. De plus, dans les mêmes conditions (solvant et concentration) qu'une solution d'HCCA, la matrice HCCA/ANI présente une cristallisation plus lente permettant une meilleure extraction des composés du tissu. Il faut également noter que ces matrices ioniques solides possèdent un produit de solubilité plus élevé que leurs homologues. En effet, la matrice HCCA à 20 mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (6:4, v/v) est difficile à solubiliser. Cependant, lorsque qu'une base organique telle que l'ANI est ajoutée à la solution de façon équimolaire, la matrice est alors solubilisée très rapidement. Cette propriété pourrait empêcher les phénomènes de cristallisation sur la tête piézoélectrique et ainsi permettre de déposer de manière stable une solution de matrice plus concentrée (20 mg/mL). Les tests réalisés démontrent, en effet, une très grande stabilité d'application sans problèmes de cristallisation de la matrice sur la tête piézoélectrique (**Figure 50b**). Il est ainsi possible de

réaliser l'ensemble du dépôt (> 30 minutes) sans qu'aucune étape de nettoyage ne soit nécessaire. En comparant la qualité des dépôts obtenus pour la matrice HCCA et HCCA/ANI, le résultat est sans appel. Les dépôts réalisés avec la matrice HCCA/ANI montrent une aire contenant des rangées de dépôts bien définis et très homogènes (**Figure 50b**).

Afin d'optimiser la qualité des spectres, il est très important de s'attarder sur la préparation de l'échantillon. Si comme décrit dans la partie 4.1, il n'est pas nécessaire de traiter la coupe pour l'analyse des lipides, il n'en est pas de même pour l'analyse des peptides pour laquelle cette étape est tout particulièrement importante. En effet, de nombreux signaux de lipides peuvent interférer avec ceux des peptides et les masquer sachant que certains lipides sont très abondants dans les tissus. De nombreux lipides sont solubles dans les alcools, dans l'acétone mais aussi dans les solvants beaucoup moins polaires tels que le chloroforme, l'hexane ou le toluène. Cependant, ces étapes de lavage sont à effectuer avec la plus grande précaution car certains peptides peuvent eux aussi être extraits dans ces conditions. Les lavages ont été testés sur quatre coupes adjacentes La matrice HCCA/ANI à 10 mg/mL est déposée par micro-dépôts sur une coupe non traitée, une coupe lavée à l'EtOH froid pendant 30 secondes, une coupe lavée au chloroforme pendant 30 secondes et enfin sur une coupe lavée à l'acétone froid pendant 30 secondes (**Figure 51**).

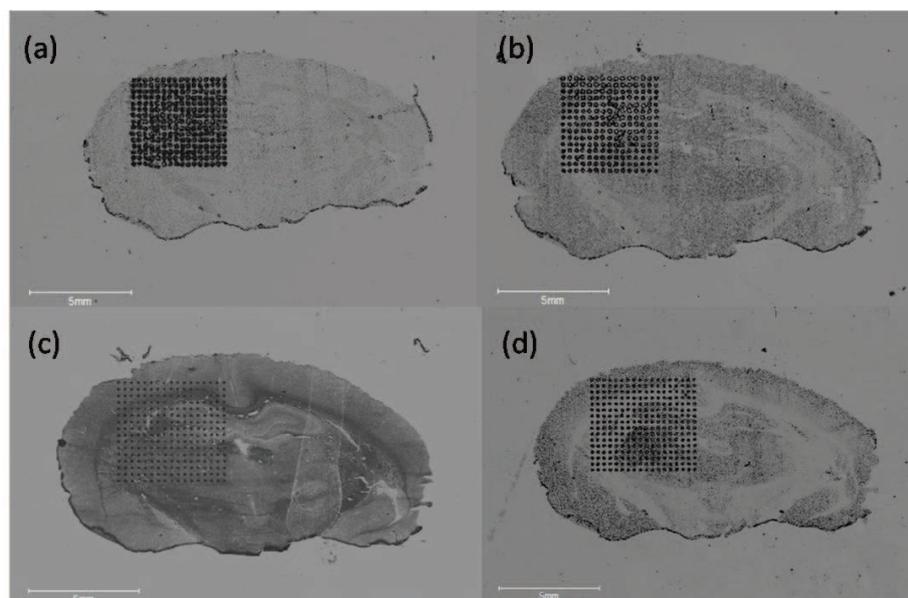


Figure 51 : Images optiques des coupes de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH froid pendant 30 sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée à l'acétone froid pendant 30 sec.

La première constatation à tirer de ces expériences concerne la qualité des spots. Dans le cas des traitements au chloroforme et à l'acétone, ceux-ci sont très petits et la cristallisation est très reproductible. Il convient de noter que ce phénomène peut s'expliquer par la modification de la tension de surface entre la coupe et la solution de matrice par ces traitements qui déshydratent complètement la coupe. La solution de matrice, solubilisée dans un solvant plutôt polaire (60% AcN et 40 % TFA 0.1%) ne mouille pas complètement la coupe et se concentre alors pour conduire à la formation de dépôts plus petits. Concernant la coupe non traitée et celle traitée à l'EtOH, les spots sont moins homogènes et plus larges. La tension de surface entre la coupe et la solution de matrice étant plus faible, les spots s'étalent plus sur la coupe conduisant à une cristallisation plus en périphérie. Une autre remarque concerne la coupe elle-même. Lors du traitement chloroforme, la coupe prend un aspect blanchâtre et les structures du tissu deviennent alors nettement plus visibles comme observé en **Figure 51c**. La qualité des spectres est également comparée pour chacun des traitements en mode réflecteur positif. Les spectres enregistrés dans la région du corps calleux pour chacun des traitements sont présentés **Figure 52**.

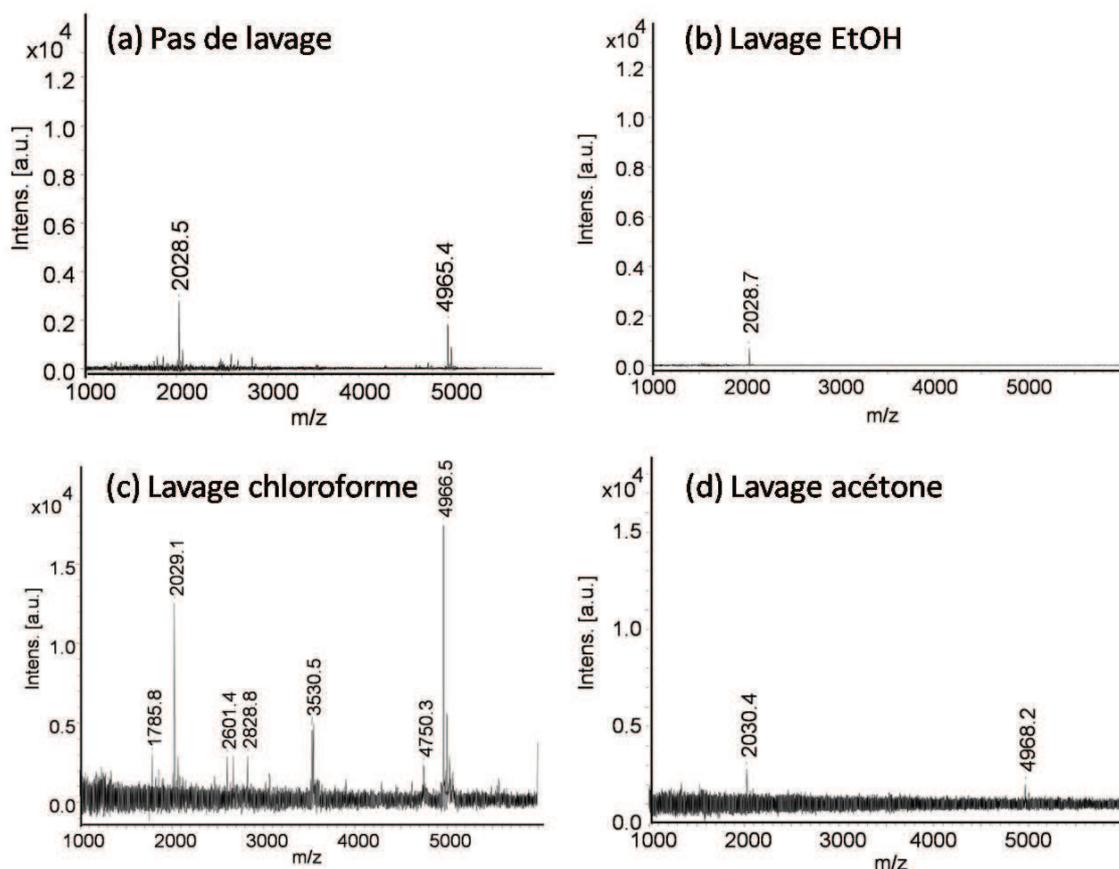


Figure 52 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée à l'acétone pendant 30 sec.

Le lavage chloroforme présente de manière générale les spectres avec le plus grand nombre de peptides détectés et avec la plus grande intensité par rapport aux autres coupes. Ceci s'explique par l'élimination d'un grand nombre de lipides ¹⁰⁷ mais aussi par le fait que de nombreux peptides présentent des interactions non covalentes avec d'autres peptides ou des protéines. Ces interactions étant généralement de type hydrophobes, le lavage chloroforme pourrait permettre de rompre ces interactions hydrophobes facilitant l'extraction des peptides et leur incorporation dans les cristaux de matrices. Dans le cas du traitement EtOH, une perte conséquente de peptides est observée suite au lavage. De la même façon, le lavage acétone conduit à l'élimination d'un grand nombre lipides mais également de peptides. Ces deux derniers solvants ne sont donc pas compatibles pour l'analyse des peptides. Néanmoins, globalement le nombre de peptides détectés est faible. Ceci semble prouver que l'extraction des peptides du tissu à partir de la solution de matrice déposée en micro-dépôts, n'est pas efficace. L'intensité des peptides est donc de manière générale très faible. Bien que l'analyse en mode linéaire ne permette pas la détection des espèces mono isotopiques, ce mode de détection présente une sensibilité bien supérieure à celle obtenue en mode réflecteur. L'analyse directe de peptides en mode linéaire semble donc un bon compromis. Sur une même coupe de cerveau de rat, la matrice HCCA/ANI fut déposée et les spots furent analysés en mode réflecteur positif et linéaire positif. Les résultats obtenus sont présentés en **Figure 53**.

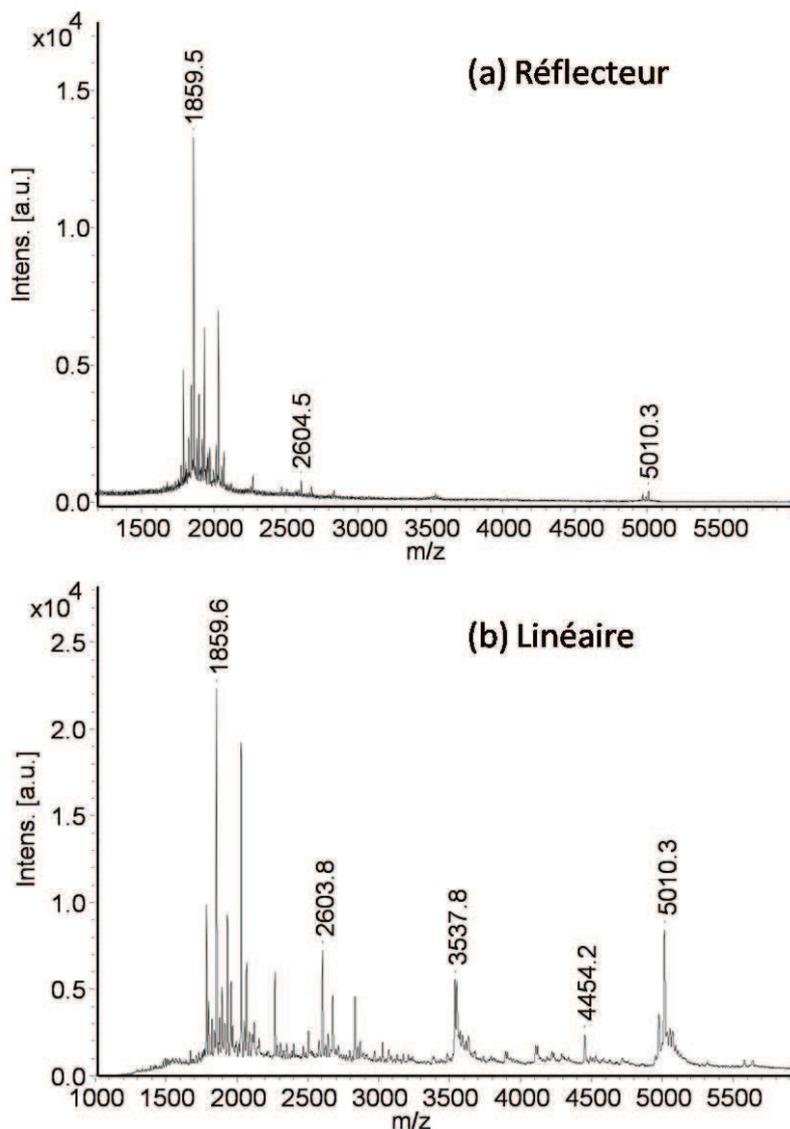


Figure 53 : Spectres de masse enregistrés à partir d'une coupe de cerveau de rat en mode (a) réflecteur positif et (b) linéaire positif après dépôt de la matrice HCCA/ANI.

Il apparaît clairement que de nombreux peptides au delà de m/z 3000 ne sont pas détectés en mode réflecteur positif. La moins bonne sensibilité obtenue en mode réflecteur est attribuable à une plus faible quantité de peptides co-cristallisés avec la matrice. Le mode linéaire étant plus sensible permet donc de palier à ce problème malgré la perte de résolution spectrale. Cependant, une autre explication serait de dire que ce résultat serait attribuable aux fragmentations métastables qui auraient lieu en sortie de source et qui ne seraient pas observables en mode linéaire.

Si HCCA/ANI présente des performances intéressantes en termes d'analyse mais également pour la réalisation de micro-dépôts, d'autres matrices ioniques peuvent être synthétisées et étudiées. La matrice HCCA/DANI, par exemple, bien que présentant une cristallisation assez différente de la matrice HCCA/ANI conduit à des profils de spectres très similaires ¹⁰⁷. Les matrices HCCA/para-phenylènediamine (HCCA/pPA) et HCCA/3-acétylpyridine (HCCA/3AP) ont également été étudiées pour l'analyse des peptides. Les formules de ces quatre matrices ioniques solides sont présentées **Figure 54**.

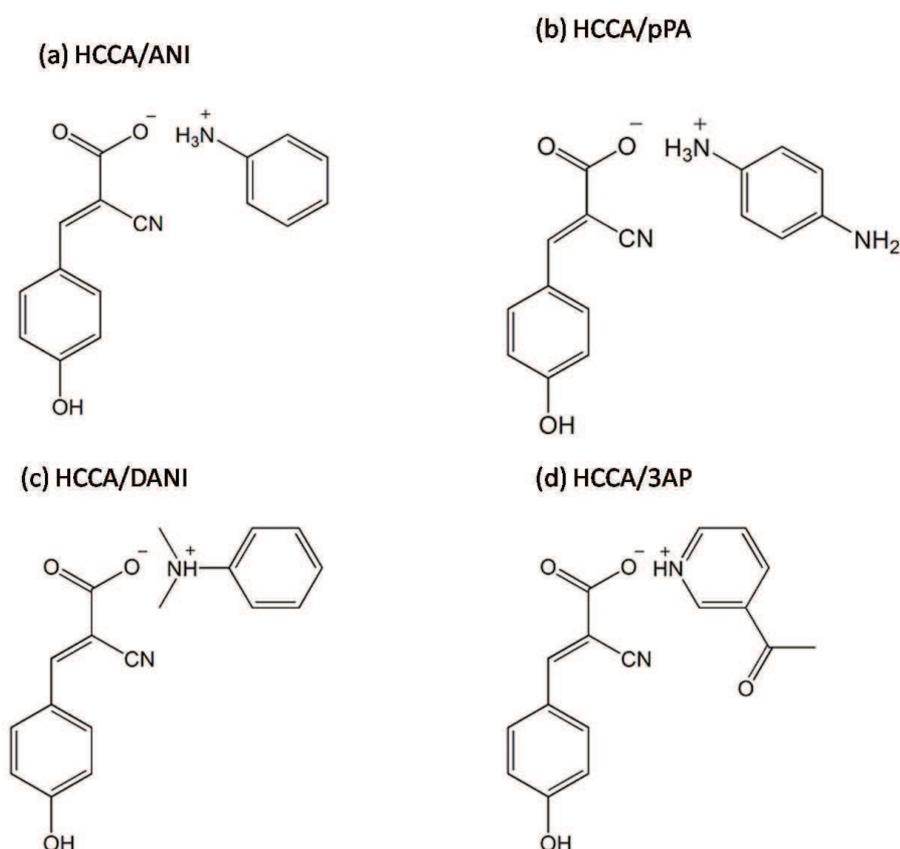


Figure 54 : Formules semi-développées de la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/DANI et (c) HCCA/3AP.

Ces quatre matrices ont été utilisées et comparées en mode micro-dépôts. Concernant le dépôt de la matrice HCCA/3AP, HCCA/pPA et HCCA/DANI, ceux-ci sont également réalisés avec une grande stabilité. Ceci confirme la réelle compatibilité des matrices ioniques avec le mode micro-dépôt. La **Figure 55** présente les spectres comparés pour ces trois matrices et enregistrés à partir de la même région du cerveau de rat. Les spectres obtenus avec HCCA/ANI (**Figure 55a**), HCCA/pPA (**Figure 55b**) et HCCA/DANI (**Figure 55c**) montrent

que de nombreux peptides sont observés dans la gamme m/z 1000-6000 avec une très bonne intensité. Ces trois matrices sont donc très adaptées à l'étude de peptides et présentent une très bonne compatibilité avec le mode de micro-dépôt. Concernant la matrice HCCA/3AP (**Figure 55d**), les résultats obtenus permettent de conclure que cette matrice ne semble pas adaptée à l'analyse des peptides de faible masse puisque les signaux principalement observés se situent dans une gamme de masse plus élevée. Ceci peut s'expliquer par une co-cristallisation très faible des peptides de bas poids moléculaire avec la matrice ou à un phénomène lié aux processus de désorption/ionisation.

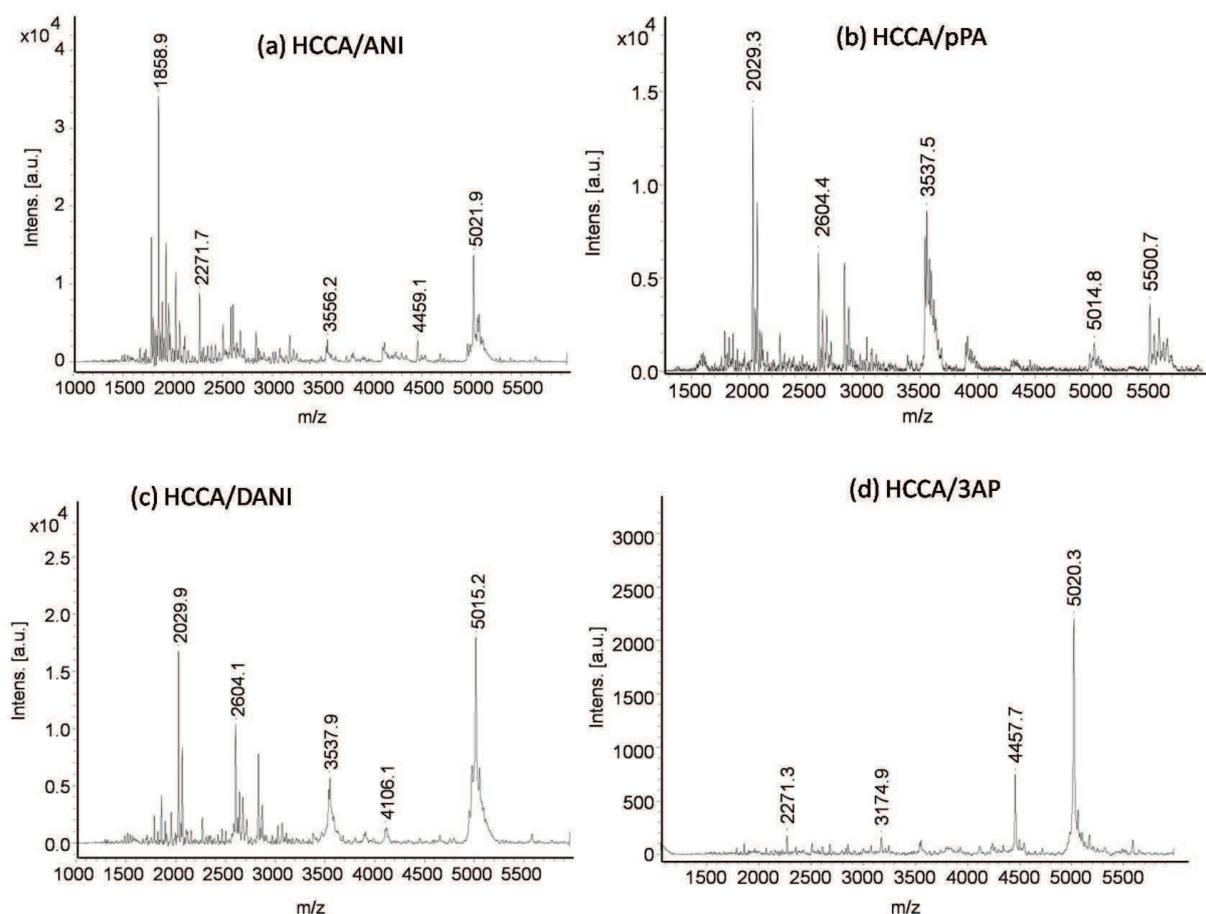


Figure 55 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir des coupes de cerveau de rat lavées au chloroforme pendant 30 avec la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/pPA et (c) HCCA/DANI et (d) HCCA/3AP.

Dans un second temps, les analyses ont été effectuées sur une gamme de masse élargie allant de m/z 1000 à 30000. Les résultats présentés en **Figure 56** montrent une très grande efficacité de la matrice HCCA/3AP pour l'analyse des protéines (**Figure 56b**). Le spectre

obtenu présente de nombreuses similarités avec un spectre généralement obtenu avec la matrice SA. La cristallisation différente de la matrice HCCA/3AP rend alors possible la détection de protéines avec une bonne sensibilité et une bonne résolution contrairement à la matrice HCCA/DANI, HCCA/pPA ou HCCA/ANI (**Figure 56a**).

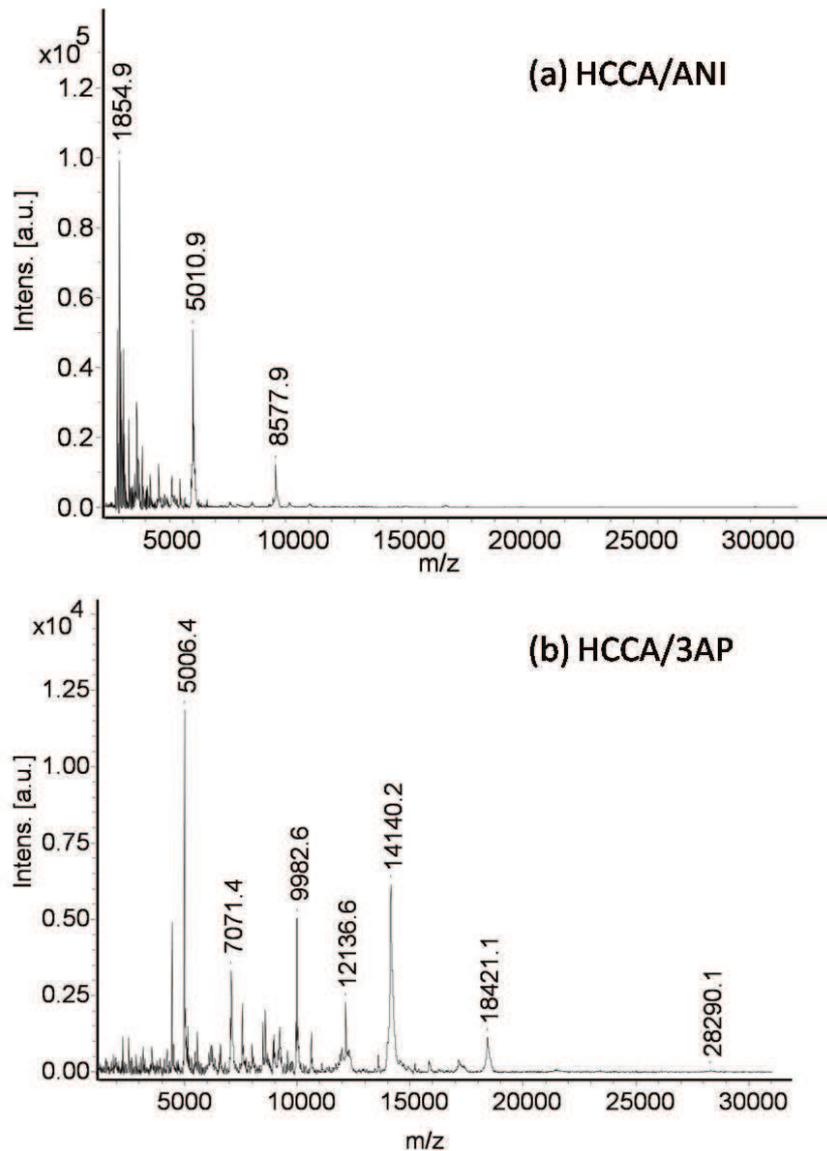


Figure 56 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir des coupes de cerveau de rat lavées au chloroforme pendant 30 avec la matrice (a) HCCA/ANI, (b) HCCA/3AP

Pour l'analyse de peptides endogènes tels que les neuropeptides, l'utilisation des matrices HCCA/DANI, HCCA/pPA ou HCCA/ANI montrent de très bonnes performances. L'utilisation de ces matrices en combinaison avec des traitements de tissus comme le lavage chloroforme permet d'améliorer considérablement l'analyse des peptides par l'élimination d'un grand nombre de composés assez hydrophobes tels que certains lipides particulièrement

abondants et gênants. Les lavages acétone ou alcool entraînent l'élimination des lipides mais aussi d'un certain nombre de peptides. Bien que les autres lavages ne soient pas recommandés pour l'analyse de petits composés, ils pourraient être très intéressants dans le cas d'analyse de protéines moins labiles que les lipides et les peptides.

2.3. Développements pour l'analyse des protéines.

Différentes matrices sont couramment employées en MALDI pour l'analyse des protéines comme la 2,5-DHB, le s-DHB, la SA ou l'HCCA. En imagerie MALDI, la matrice la plus classiquement utilisée est la matrice SA, l'HCCA ayant peu d'aptitude pour l'analyse des protéines à partir des tissus et la 2,5-DHB présentant une cristallisation peu homogène 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 est tout autrement dans le cas des protéines. Le volume de solution déposé devient un paramètre non négligeable pour des raisons d'extraction, de solubilisation et d'incorporation dans les cristaux de matrice. Ainsi, en imagerie MALDI, les protéines sont le plus souvent détectées en appliquant la matrice avec un micro-spotter^{122, 124} fournissant un volume de solution suffisant pour l'extraction des protéines.

La Figure 58a présente un spectre typique obtenu à partir d'une coupe de cerveau de rat préparée dans des conditions habituelles pour l'imagerie *i.e.* par l'emploi d'une solution de 10 mg/mL de SA dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) où la matrice a été déposée par micro-dépôts. Peu de pics sont observés sur ces spectres qui présentent également un faible rapport signal/bruit. Les performances analytiques peuvent être améliorées par utilisation de traitements des tissus par lavage comme précédemment décrit dans la littérature¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. L'utilisation de ces lavages permet d'augmenter le nombre de signaux détectés, correspondant à des protéines, ainsi que leur intensité en retirant les sels mais aussi les lipides pouvant générer des suppressions de signaux lors de l'analyse. Comme pour les peptides, les performances des lavages chloroforme, acétone et éthanol sont évaluées dans le cadre de l'analyse des protéines cette fois-ci. Les différents lavages sont donc réalisés sur trois coupes adjacentes de cerveau de rat avant micro-dépôts de la matrice SA (**Figure 57**).

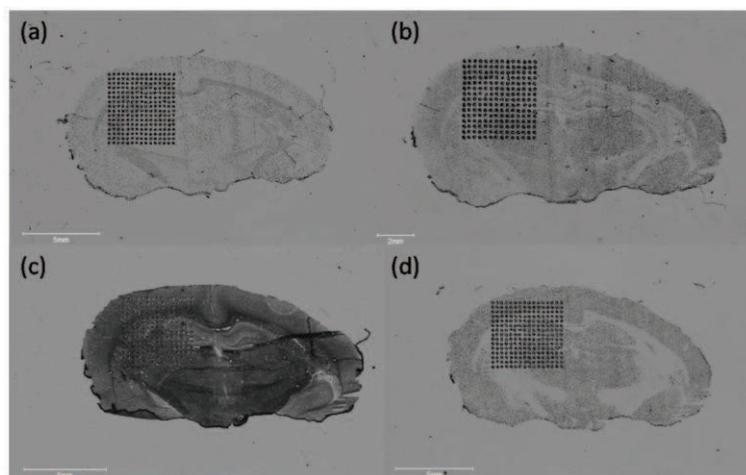


Figure 57 : Images optiques de coupes de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH froid pendant 30 secondes, (c) lavée au chloroforme pendant 30 secondes et (d) lavée à l'acétone froid pendant 30 secondes.

La **Figure 58** compare les spectres obtenus pour les différents lavages versus un témoin non traité après acquisition dans la même région du cerveau (corps calleux) et dans les mêmes conditions.

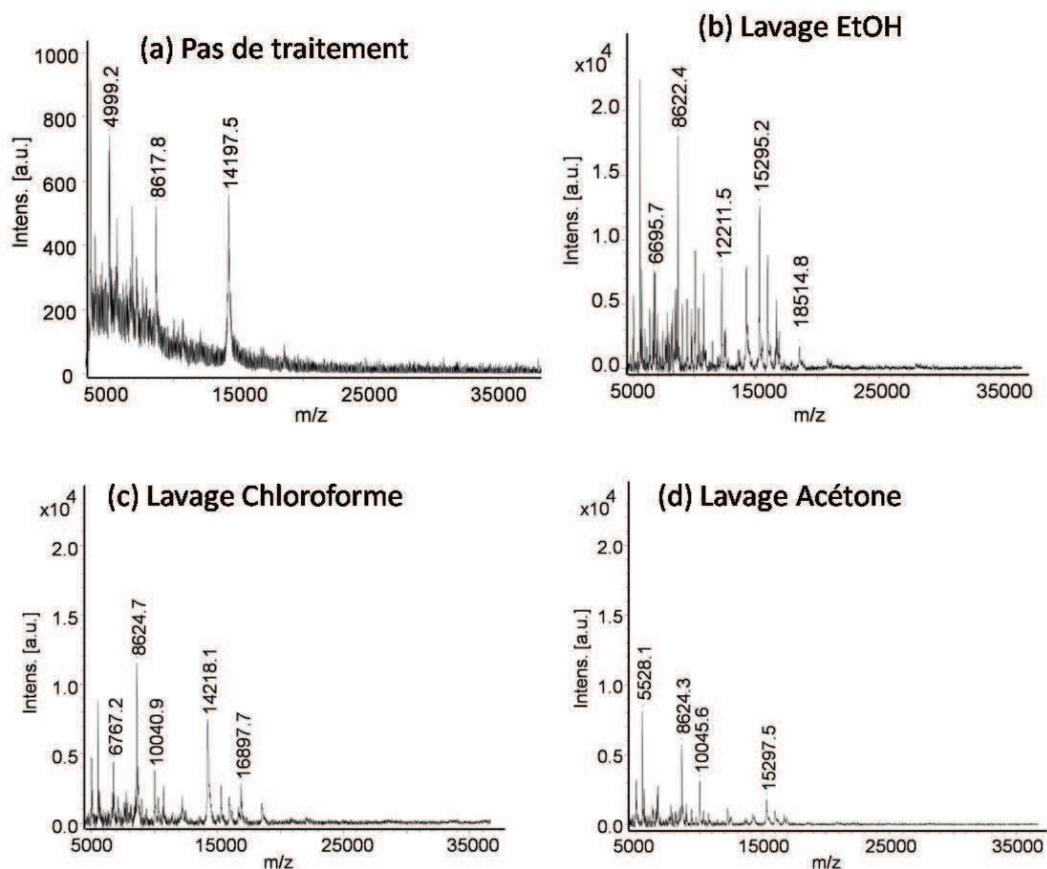


Figure 58 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif dans la région du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée à l'acétone pendant 30 secondes.

Le spectre enregistré après lavage à l'éthanol présente plus de signaux, avec une plus grande intensité, confirmant les précédentes études réalisées¹⁰⁵. Concernant les autres lavages, le chloroforme et l'acétone permettent eux aussi d'améliorer de façon significative la qualité des spectres. Ceci peut s'expliquer par l'élimination d'un grand nombre lipides et de peptides en basse masse réduisant ainsi les phénomènes de suppression d'ions. Les meilleurs résultats obtenus pour le lavage EtOH pourraient s'expliquer par une meilleure élimination des sels que les autres traitements en même temps que les peptides et les lipides. Bien que la distance entre les spots soit de l'ordre de 300 μm , il est possible en comparant la distribution des espèces d'affirmer que ces étapes de lavage n'ont pas entraîné de délocalisation des protéines (**Figure 59**). Ceci est illustré au travers de l'étude de la distribution de deux ions à m/z 12 210 et 14 220 présentant des distributions spécifiques et complémentaires.

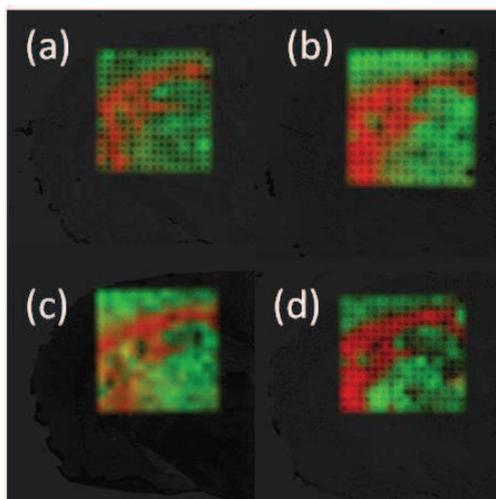


Figure 59 : Distribution de l'ion m/z 12210 (vert) et de l'ion m/z 14220 (rouge) enregistrée sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) lavée à l'EtOH pendant 30sec, (c) lavée au chloroforme pendant 30 sec et (d) lavée à l'acétone pendant 30 sec.

En se basant sur ces résultats, il est possible d'affirmer que chaque traitement apporte une réelle amélioration pour la qualité des spectres de masse tout en n'entraînant pas de délocalisation des protéines. Chaque lavage ayant sa propre spécificité, ils pourraient être combinés pour gagner en performances analytiques. Les trois lavages sont donc réalisés successivement sur une même coupe de cerveau de rat *i.e.* lavage à l'acétone froid pendant 30 secondes puis lavage à l'EtOH froid pendant 30 secondes et enfin lavage chloroforme pendant

30 secondes. La matrice est ensuite micro-déposée dans les mêmes conditions que précédemment. La **Figure 60** présente les résultats obtenus après les trois lavages successifs.

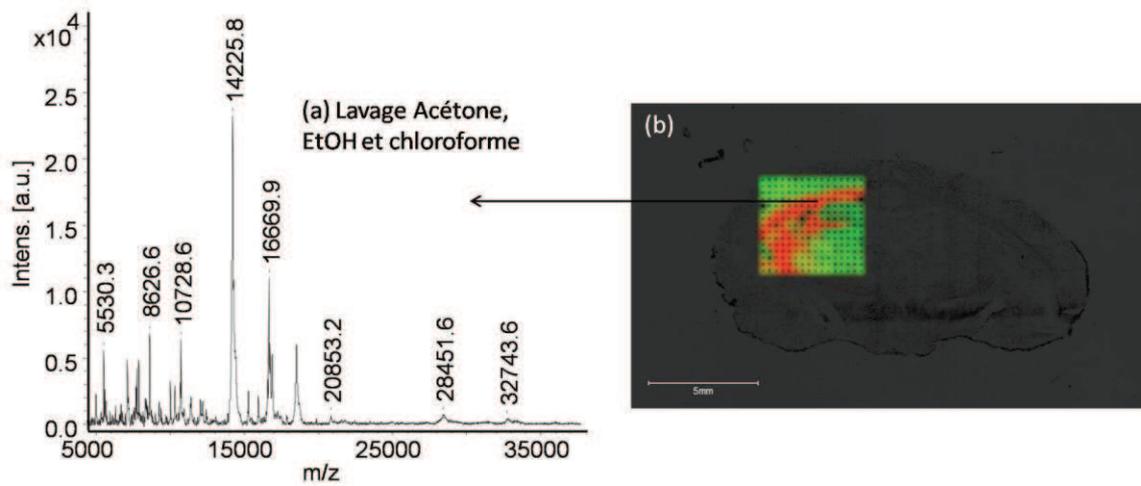


Figure 60 : (a) Spectre de masse enregistré en mode linéaire positif dans la région du corps calleux (rouge) (b) d'une coupe de cerveau de rat lavée à l'acétone puis à l'EtOH et au chloroforme pendant 30 sec.

La qualité des spectres est remarquable au niveau de la résolution et du rapport signal sur bruit des protéines détectées. Aucune délocalisation n'est constatée comme attendu puisque chacun des lavages séparément n'induit pas de délocalisation des protéines. Une amélioration est également observée au niveau de la gamme dynamique avec de nouveaux signaux protéiques observés dans la gamme 28-32 kDa (**Figure 60a**).

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 celle des protéines. Ainsi, pour l'analyse des protéines, les matrices ioniques SA/ANI et SA/3AP ont été testées après synthèse (**Figure 61**) par comparaison avec l'acide sinapinique (SA).

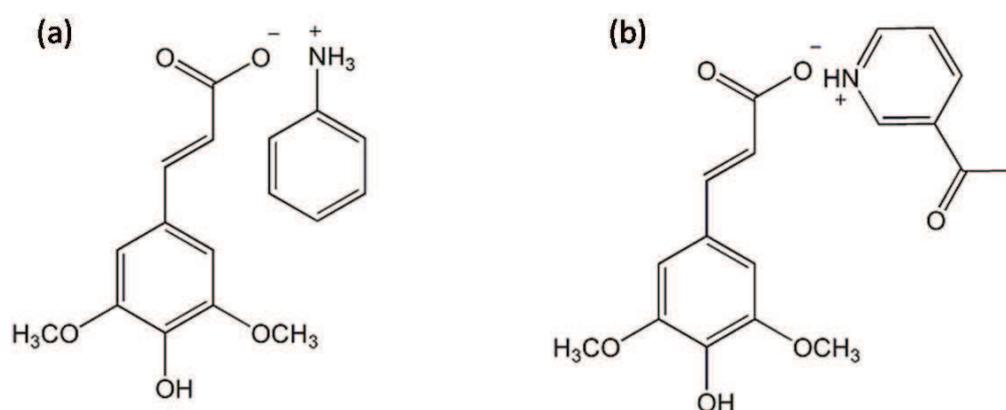


Figure 61 : Formules semi-développées des matrices (a) SA/ANI et (b) SA/3AP.

Les premières expériences ont consisté à comparer SA/ANI et SA en mode micro-dépôts en déposant ces deux matrices sur la même coupe de tissu (**Figure 62**). La comparaison de ces deux matrices s'effectue selon des critères bien définis à savoir la stabilité de l'application sur la coupe en micro-dépôts, la qualité de la cristallisation et les caractéristiques des spectres de masse. En terme de cristallisation, l'acide sinapinique présente une cristallisation relativement homogène (**Figure 62b**) mais la matrice ionique SA/ANI présente une cristallisation plus homogène que son homologue (**Figure 62a**). Pour SA/ANI les spots sont totalement recouverts de microcristaux de matrice régulièrement espacés alors que des zones sans cristaux sont observés pour les dépôts avec l'acide sinapinique.

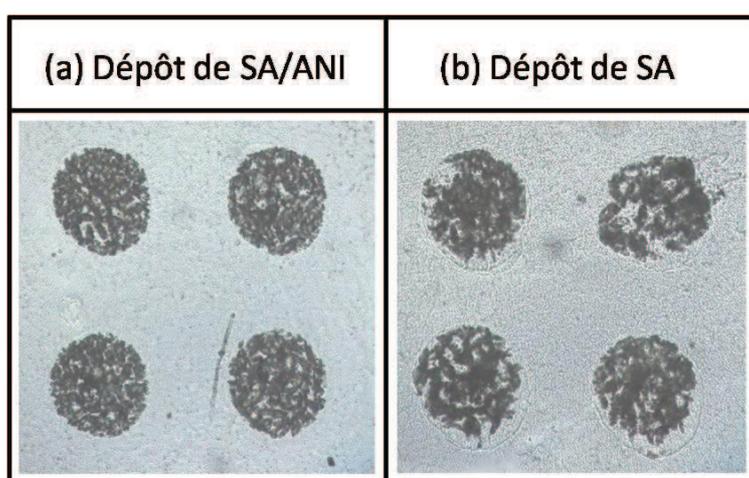


Figure 62 : Images optiques des cristaux de (a) SA/ANI et (b) de SA.

Concernant, la stabilité de l'application, les deux matrices sont stables à 10 mg/mL dans une solution AcN/TFA 0.1% (6:4, v/v). Cependant, l'application de la matrice ionique SA/ANI est encore stable à des concentrations plus élevées jusqu'à 20 mg/mL alors que l'application de SA devient instable à partir de 15 mg/mL. Concernant les analyses, les spectres montrent que la matrice SA/ANI présente des pics de plus forte intensité et d'un meilleur rapport signal sur bruit mais surtout couvrant une gamme de m/z plus grande puisque des peptides vers m/z 3000 sont détectés (**Figure 63b-c**). Le **Tableau 5** présente quelques pics détectés avec les deux matrices ainsi que l'intensité correspondante de ceux-ci. En moyenne, l'intensité des pics est 5 fois plus élevée avec SA/ANI que SA et le rapport signal sur bruit 2 fois supérieur avec la matrice ionique. En conclusion, les deux matrices à 10 mg/mL sont stables et peuvent être micro-déposées sur le tissu mais la matrice ionique SA/ANI présente des performances supérieures en terme de cristallisation et de qualité spectrale.

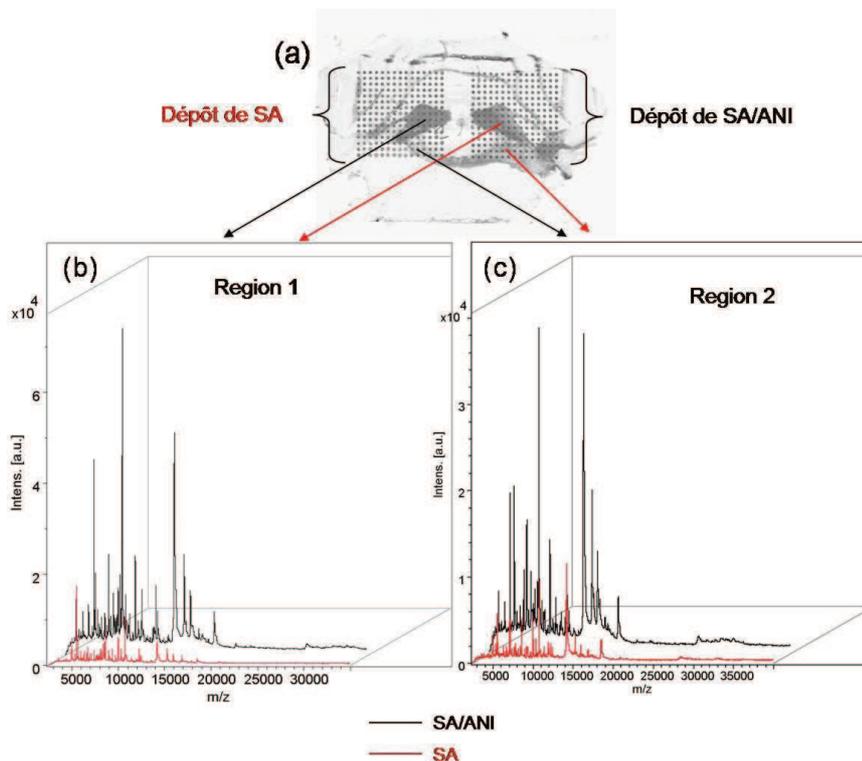


Figure 63 : Dépôts de SA (à gauche) et SA/ANI (à droite) à 10 mg/mL sur la même coupe de cerveau de rat. (b-c) Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif dans deux régions différentes d'une coupe de cerveau de rat avec les deux matrices.

m/z	Intensité		S/N	
	SA/ANI	SA	SA/ANI	SA
3175.750	954.50	242.00	2.8	1.2
3387.949	1023.50	nd	3.0	nd
3549.578	498.00	nd	1.4	nd
3681.870	1128.00	nd	3.3	nd
3837.879	1311.25	nd	3.8	nd
4332.224	379.50	nd	1.1	nd
4976.567	3387.00	598.50	9.5	4.5
5499.559	5352.00	1088.50	14.7	8.2
6736.988	4541.00	666.00	12.0	5.0
7080.038	12665.00	1865.50	33.5	14.0
8589.494	13574.50	2570.50	35.5	19.6
9969.582	7974.00	2438.50	20.8	18.8
14181.465	30010.00	5212.00	89.1	45.9
15264.720	4538.00	1989.00	14.2	18.4
18491.561	3633.00	768.00	13.6	7.9
28405.901	751.50	237.00	4.6	3.2

Tableau 5 : Valeurs des intensités et rapports signal sur bruit (S/N) pour les peptides et les protéines détectés après micro-dépôts de SA et SA/ANI sur une coupe de cerveau de rat.

Par la suite, l'utilisation de la matrice SA/ANI a été combinée avec le traitement des tissus par les trois lavages successifs acétone, éthanol et chloroforme. Les images reconstruites à partir des données acquises dans ces conditions sont présentées **Figure 64**. Comme précédemment décrit, l'application de la matrice par micro-dépôt à l'aide du système piézoélectrique est parfaitement stable durant les 2 heures nécessaires pour couvrir l'ensemble de la coupe (**Figure 64a**). Afin d'augmenter la sensibilité, le laser balaie la surface du micro-dépôt.

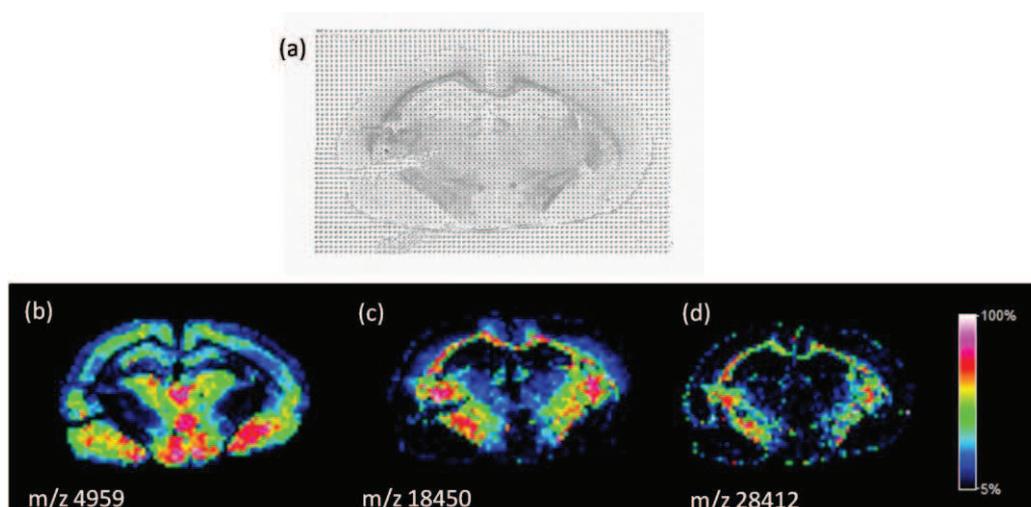


Figure 64 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de SA/ANI. (b-d) Images moléculaires représentant la distribution des ions m/z 4959, 18450 et 28412. Images obtenues en

mode linéaire positif à 250 μm de résolution. 1000 spectres ont été accumulés par position avec une fréquence laser de 100 Hz.

Ces expériences confirment que le protocole précédemment établi présente un intérêt pour l'analyse des protéines tout en n'entraînant pas de délocalisation des espèces considérées au sein de la coupe **Figure 64(b-d)**. La combinaison lavages et utilisation de la matrice ionique SA/ANI, permet de très nettement augmenter les performances analytiques. Il est possible, dans ce cas, de détecter des protéines de plus haut poids moléculaire avec une meilleure intensité.

La matrice SA/3AP a également été testée en suivant le même protocole que précédemment décrit pour SA/ANI. La matrice SA/3AP est, encore une fois, comparée à la matrice classique SA après micro-dépôt des deux matrices sur une même coupe de cerveau de rat (**Figure 65**).

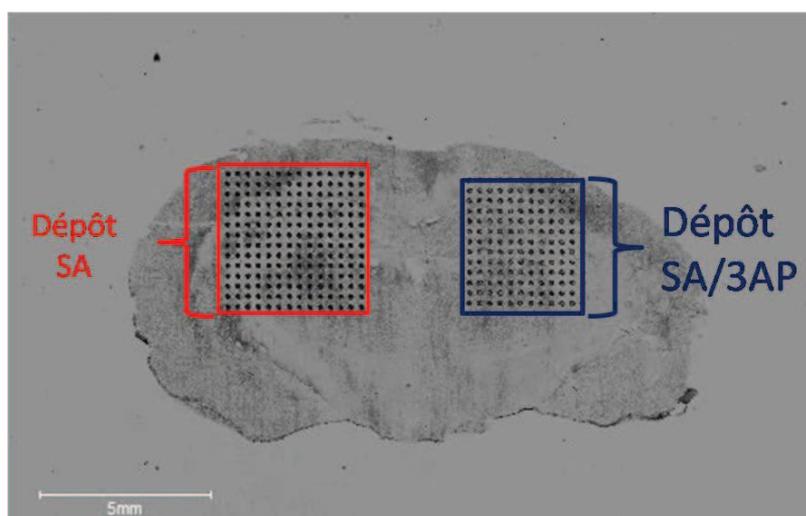


Figure 65 : (a) Dépôts de SA (à gauche) et SA/3AP (à droite) à 10 mg/mL sur la même coupe de cerveau de rat.

Dans ces conditions, 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, à la manière de SA/ANI, SA/3AP présente des signaux d'intensité et un rapport signal/bruit supérieur à la matrice SA (**Figure 66a, b**). En agrandissant sur certaines régions des spectres, force est de constater que le matrice SA/3AP présente des pics d'intensité supérieure dans la gamme de m/z considérée (m/z 6 000 à 12 000) (**Figure 66c, d**).

Quelque soit la matrice ionique utilisée, les spectres enregistrés présentent des pics d'une plus grande intensité et d'une meilleure résolution que ceux obtenus avec leur homologue SA. De plus, ces matrices présentent l'avantage de pouvoir être appliquées très facilement par micro-dépôts et de conduire à une cristallisation plus homogène. Ces matrices sont donc très performantes pour l'imagerie sachant que le dépôt de la matrice est un facteur limitant pour la préparation des échantillons. La meilleure qualité de préparation s'explique par la cinétique de la réaction de cristallisation, celle-ci étant plus lente dans le cas des matrices ioniques. Ainsi, il est non seulement possible d'éviter les problèmes de bouchage du système de dépôt lié à une cristallisation sur la tête piézoélectrique de l'instrument mais également d'augmenter l'efficacité d'extraction des composés. Une seconde hypothèse pouvant expliquer l'amélioration de la qualité spectrale serait liée à l'incorporation des analytes dans les cristaux de matrice. L'incorporation des protéines dans les cristaux de matrice, pour les matrices ioniques testées, pourrait être meilleure, sachant que ce paramètre est essentiel pour le processus de désorption/ionisation. Ceci expliquerait pourquoi certaines des matrices ioniques préparées à partir de la matrice SA ne seraient pas aussi performantes que les matrices SA/ANI et SA/3AP présentées, et ce bien que ces matrices présentent également une cinétique de réaction de cristallisation lente. Ce phénomène est parfaitement illustré par la matrice SA/urée. Après micro-dépôts sur coupe, cette matrice ne s'est pas révélée présenter des performances particulières pour l'analyse des protéines. Cette matrice a été synthétisée pour l'action de l'urée, qui permet la rupture des interactions non covalentes intra ou inter protéines. Généralement, les interactions hydrophobes sont rompues par l'utilisation de surfactants ou de chaotropes incluant l'urée. Cependant, l'action de l'urée est généralement efficace aux alentours de 8M ce qui est très au dessus de la concentration nécessaire pour l'obtention d'un mélange équimolaire avec la matrice SA et permettant la synthèse de la matrice ionique.

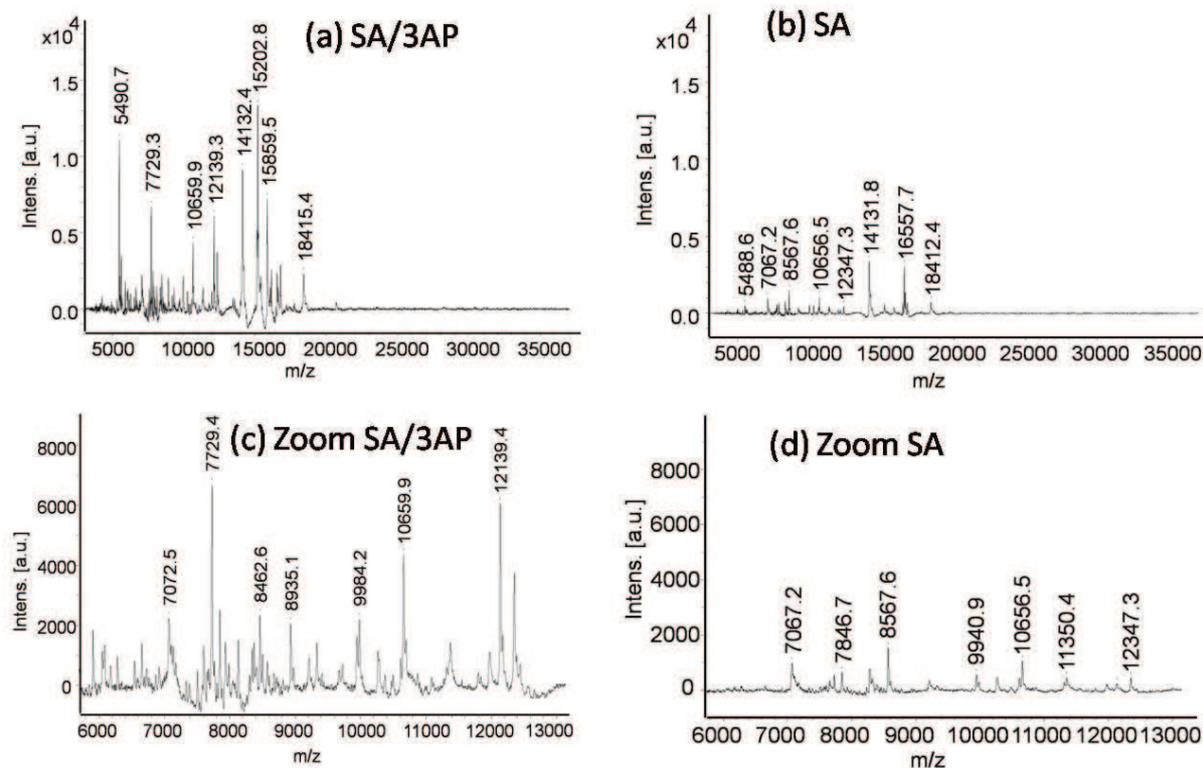


Figure 66 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'un coupe de cerveau de rat dans la région du corps calleux avec (a) SA et (b) SA/3AP. (c-d) Zooms des spectres pour la gamme m/z 6000 à 13000. 1000 spectres ont été accumulés à chaque position avec une fréquence laser de 100 Hz.

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. Néanmoins, les deux matrices ioniques SA/ANI et SA/3AP semblent être d'une très grande efficacité et permettent d'améliorer la détection de protéines pour la recherche de biomarqueurs pour des cas de cancer tel que le cancer de l'ovaire (**Partie 2.3.2**).

Si, comme nous l'avons vu, il est possible d'améliorer les performances de l'imagerie MALDI pour l'analyse de différents types de biomolécules, l'une des limites rencontrées actuellement par l'imagerie MALDI reste la difficulté d'analyse des protéines au dessus de 20 kDa. En effet, généralement, l'analyse de tissus conduit à l'observation de signaux intenses jusque vers m/z 20000 et de quelques signaux de moindre intensité dans la gamme de m/z 20000-30000. Cependant, il n'est généralement plus possible d'observer d'ions pour des $m/z > 30000$. Or, de nombreuses molécules d'intérêt biologique comme les protéines membranaires

ou les récepteurs ont des masses bien supérieures. Ceci suggère que l'extraction de ces composés n'est pas efficace dans les solutions classiquement utilisées pour solubiliser la matrice. Il faut noter que les protéines présentent différentes propriétés physico-chimiques et notamment d'hydrophobicité. Concernant les protéines hydrophobes ou membranaires, certaines procédures utilisant soit des solvants hydrophobes^{281, 282} pour l'analyse directe sur coupe soit du Triton X-100²⁸³ comme détergent ont été réalisées. Il est clairement démontré que l'analyse directe sur coupe permet la détection de différentes classes de protéines suivant les propriétés de la solution contenant la matrice qui est déposée sur la coupe. Dans ce contexte, de nouvelles procédures ont donc été développées afin de faciliter l'extraction de protéines hydrophobes directement sur coupe de tissu et de pouvoir élargir la gamme de masse d'analyse des protéines.

2.3.1. Développements pour l'analyse de protéines de haut poids moléculaire

En considérant les propriétés des solutions qui servent à solubiliser les matrices utilisées pour la détection des protéines, il est assez logique que le rendement d'extraction des protéines soit faible. Lors d'analyses protéomiques classiques, les protocoles d'extraction des protéines sont beaucoup plus complexes et mettent en jeu différentes étapes dont des 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 type non covalentes *i.e.* des interactions électrostatiques, des liaisons hydrogènes ou des interactions hydrophobes. Ces dernières se forment par la présence d'eau ou de solvants très polaires entraînant le regroupement des fonctions hydrophobes afin de minimiser les tensions de surface très défavorables thermodynamiquement. 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. Dans un solvant polaire ou dans l'eau, le seul moyen de créer cet environnement est l'utilisation de surfactants tels que le SDS²⁸⁴. Une autre approche permettant de rompre ces interactions hydrophobes est l'utilisation d'agents chaotropes telle que l'urée²⁸⁵. Ces réactifs ont la

possibilité à forte concentration de modifier les propriétés physico-chimiques (constante diélectrique, polarité, polarisabilité...) du milieu. Ainsi, en réduisant le nombre de liaisons hydrogènes que le solvant peut créer, l'environnement devient plus favorable à une dispersion des fonctions hydrophobes, soit à une rupture des interactions hydrophobes²⁸⁵. Les agents chaotropes permettent également de rompre les liaisons électrostatiques par dénaturation des protéines et modification de la polarisabilité. Cependant, en fonction du milieu et de l'agent chaotrope, il est parfois difficile de rompre ces interactions²⁸⁶. Une autre procédure possible consiste à modifier le pH afin de créer des répulsions de charges entre les protéines pour entraîner leur séparation. L'utilisation d'un pH très basique, par exemple, améliore grandement la solubilisation des protéines. Les rendements obtenus peuvent être proches de ceux obtenus avec le SDS²⁸⁷.

Un deuxième paramètre, pouvant limiter l'observation des protéines de plus haut poids moléculaire, est la détection. Les analyseurs TOF sont généralement équipés de galettes de micro-canaux ou MCP (Micro Channel Plate). Ces détecteurs sont basés sur la conversion des ions en électrons puis une amplification du courant électronique pour obtenir un courant mesurable. Cependant, il est connu que ces détecteurs induisent une discrimination au niveau de la détection lors de la conversion ion-électron. En effet, le facteur de conversion sera proportionnel à la vitesse de l'ion et inversement proportionnel à sa surface efficace de collision. Or, en MALDI-TOF, la vitesse des ions dans le tube de vol et arrivant au détecteur est inversement proportionnelle au rapport m/z . Les ions de plus faible m/z présenteront, donc, une vitesse supérieure aux ions de m/z plus élevé. Donc, pour ces ions de m/z plus important, le rendement de conversion ions-électrons sera plus faible conduisant à une plus faible détection de ceux-ci. D'autres systèmes de détection permettent d'éviter ces effets de discrimination. Ils sont généralement nommés « détecteurs haute masse ». Ces détecteurs peuvent être basés, par exemple, sur une première étape de conversion des différents ions analysés en ions de très faible masse identiques. Ces ions sont ensuite post-accélérés pour permettre de réaliser l'étape de conversion ion-électron. De tels détecteurs sont bien évidemment également essentiels pour une meilleure détection de protéines de haut poids moléculaire à partir des tissus. Ainsi, il apparaît que deux aspects sont à étudier pour améliorer l'analyse des protéines de haut poids moléculaire, à savoir, l'amélioration de l'extraction et de la détection.

Dans un premier temps, nous nous sommes focalisés sur l'amélioration de l'extraction de ces composés de plus haut poids moléculaire. Différents traitements préalables au dépôt de la matrice ont été testés par dépôt micro-pipette sur des coupes de cerveau de rat. Parmi les

premiers essais réalisés, nous avons tenté de jouer sur les répulsions de charge en milieu très acide, sachant qu'un grand nombre de résidus basiques sont présents dans les séquences primaires de protéines, par application d'une solution de TFA 10%. Ainsi, la coupe est d'abord traitée au TFA 10% avant le dépôt de la solution de matrice SA (20 mg/mL) dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v). Cette expérience est comparée à un échantillon témoin *i.e.* une coupe où seule la solution de matrice est déposée. La comparaison des spectres (**Figure 67**) démontre que ce traitement des échantillons n'apporte aucune amélioration quant à la détection des protéines de plus haut poids moléculaire.

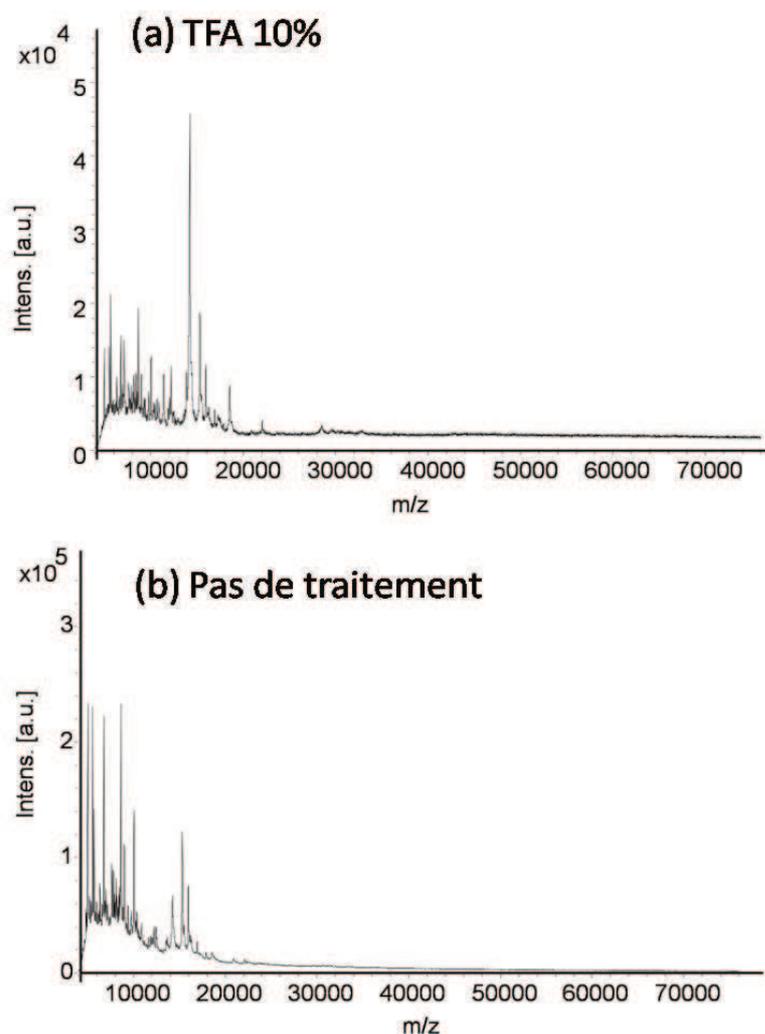


Figure 67 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat (a) après dépôt d'une solution de TFA 10% et (b) sans traitement. Une solution de SA AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) fut déposée sur les deux coupes.

Dans un second temps, l'utilisation de surfactants a été exploitée en utilisant des surfactants compatibles avec l'analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, l'octylglucoside (OGP), surfactant non ionique, a été testé ¹¹¹. Les coupes de cerveau de rat ont donc été

traitées avec une solution TFA 10% contenant 1% OGP afin d'aider à la rupture des interactions non covalentes. Ce traitement est suivi du dépôt de la solution de matrice SA. Encore une fois, la comparaison des spectres montre que le traitement n'apporte aucune amélioration. Ces résultats laissent entrevoir deux hypothèses permettant d'avancer une explication. Dans une première hypothèse, les protéines sont bien extraites mais la non-observation des signaux est liée à des effets de suppression d'ions. Dans une seconde hypothèse, il faut supposer qu'après rupture des interactions non covalentes les protéines ne sont pas miscibles avec la solution de SA (20 mg/mL) contenu dans le mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) empêchant leur co-cristallisation avec les cristaux de matrice et donc leur détection. Une solution permettant à la fois la rupture des interactions non covalentes et l'extraction des protéines semble être nécessaire pour leur détection. Ainsi, l'utilisation de solvants hydrophobes tels que HFIP²⁸⁸⁻²⁹⁰ et TFE^{291, 292} pour l'extraction des protéines membranaires²⁹³⁻²⁹⁵ combinée à la rupture des interactions non covalentes par répulsion de charges a été testée. Deux procédures ont donc été développées afin d'améliorer la détection des protéines de haut poids moléculaire.

La première méthode consiste à déposer dans un premier temps sur la coupe une solution de TFE/TFA 20% (1:1, v/v). Le TFA permet de créer les répulsions de charges entraînant la rupture de liaisons non covalentes et aussi de dénaturer les protéines. Le TFE, connu pour l'extraction de protéines de haut poids moléculaire²⁹⁶ en protéomique classique et pour la solvatisation de peptides et de protéines²⁹⁷ est utilisé pour dénaturer les protéines, les séparer, les extraire mais aussi pour créer un environnement hydrophobe nécessaire à l'exposition des groupements apolaires aux cristaux de matrices. La co-cristallisation des analytes avec la matrice est un élément important pour la désorption/ionisation des protéines de haut poids moléculaire. SA n'étant pas soluble dans le TFE, un autre solvant est donc nécessaire. Une solution de SA à 10 mg/mL dans un mélange EtOH/TFA 0.1% (9:1, v/v) est donc ensuite déposée pour permettre la co-cristallisation des protéines extraites par le mélange TFE/TFA 20%. Ceci conduit à la formation de gros cristaux de SA présentant des spectres de masse avec une élévation de la ligne de base et un bruit très important. La procédure nécessite alors l'addition d'une dernière solution de SA à 20 mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v). Le dépôt de cette dernière entraîne la resolubilisation des cristaux de matrice conduisant alors à la formation de petits cristaux blanc de SA contenant les protéines de haut poids moléculaire. Les spectres de masse enregistrés à partir d'une coupe de cerveau de rat traitée avec la procédure précédemment décrite présentent des pics jusqu'à m/z 50 000 avec un très bon rapport signal sur bruit et une grande intensité (**Figure 68b**). Les

spectres de masse enregistrés à partir de la coupe adjacente n'ayant subi aucun traitement ne présentent aucun pic au dessus de m/z 30000.

Cependant, afin de réduire le nombre d'étapes nécessaires pour dénaturer, extraire et incorporer les protéines dans les cristaux de matrices, une autre stratégie fut développée. Le HFIP connu pour son efficacité d'extraction des protéines hydrophobes permet la solubilisation de 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 20 mg/mL dans une solution pure de HFIP suivie d'une solution de SA à 20 mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) pour resolubiliser les cristaux de matrice formés avec HFIP. Cette procédure permet la détection de protéines jusqu'à m/z 70000 avec une grande sensibilité (**Figure 68a**). Cependant, cette stratégie nécessite une très grande attention lors du dépôt de la solution de SA contenue dans le HFIP pur car celle-ci diffuse très rapidement hors du tissu.

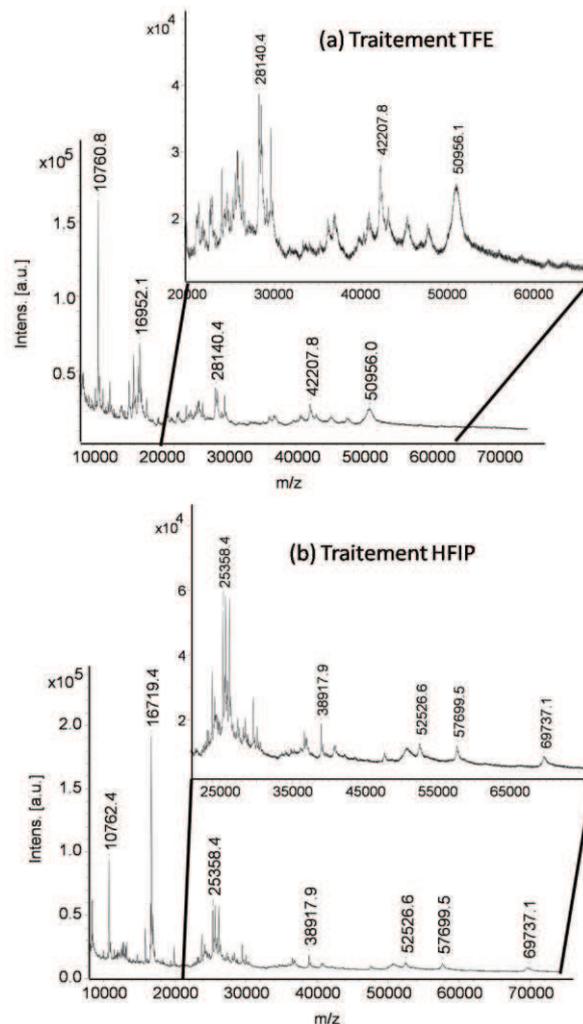


Figure 68 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) traitée au TFE et (b) traitée au HFIP.

Les protéines à extraire étant de manière générale hydrophobes, une autre procédure basée sur l'analyse des protéines polaires dans un premier temps suivie de celle des protéines de plus haut moléculaire est réalisée. Pour cela, sur des coupes de cerveau de rat, une de solution de SA 20 mg/mL dans AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) est déposée de manière à recouvrir l'ensemble de ces coupes. Les protéines polaires sont analysées avant de soumettre les coupes à un bain de MeOH/H₂O (1:1, v/v) pendant une minute afin de retirer la matrice. Après séchage, les coupes sont soumises respectivement à un traitement TFE et HFIP. **Figure 69** sont présentés les spectres obtenus avant et après traitements haute masse. Avant traitement (**Figure 69a**), seules des protéines jusqu'à m/z 2 000 sont détectées comme décrit précédemment. Après avoir retiré la matrice et après traitement HFIP et TFE, des protéines de haut poids moléculaire jusqu'à m/z 70000 dans le cas du traitement HFIP sont détectées (**Figure 69b-c**). Cette stratégie offre la possibilité de détecter les protéines polaires avant d'analyser les protéines masquées par des traitements HFIP ou TFE.

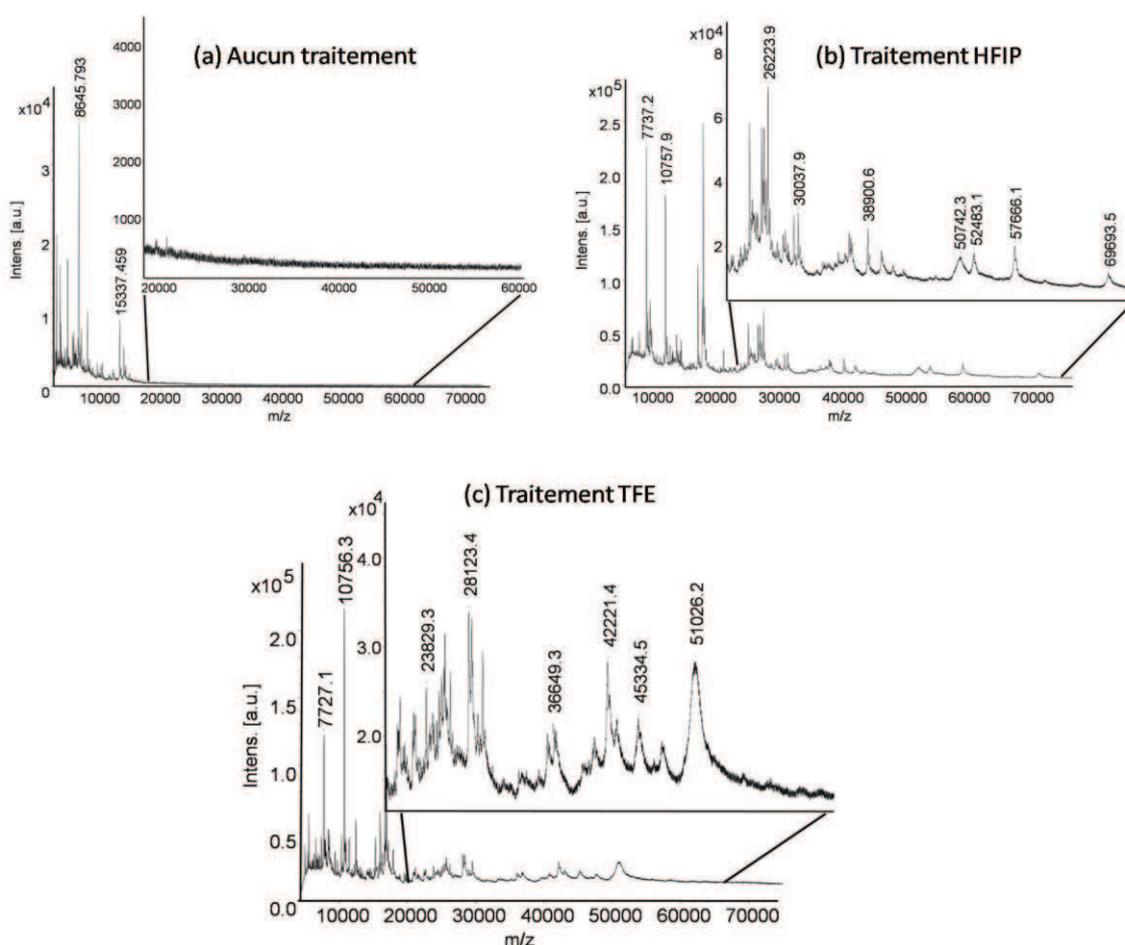


Figure 69 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée, (b) traitée au HFIP après avoir retiré la matrice et (c) traitée au TFE après avoir retiré la matrice.

Les traitements développés ayant permis d'améliorer l'analyse des protéines de plus haut poids moléculaire, il convient également de s'intéresser à l'amélioration de la sensibilité de détection. Un détecteur haute masse a donc été utilisé sur un instrument de type MALDI-TOF. Dans un premier temps, les essais ont été réalisés par dépôt de la solution standard de SA (20 mg/mL) dans AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) sur une coupe cerveau de souris. Les spectres enregistrés sont présentés **Figure 70**.

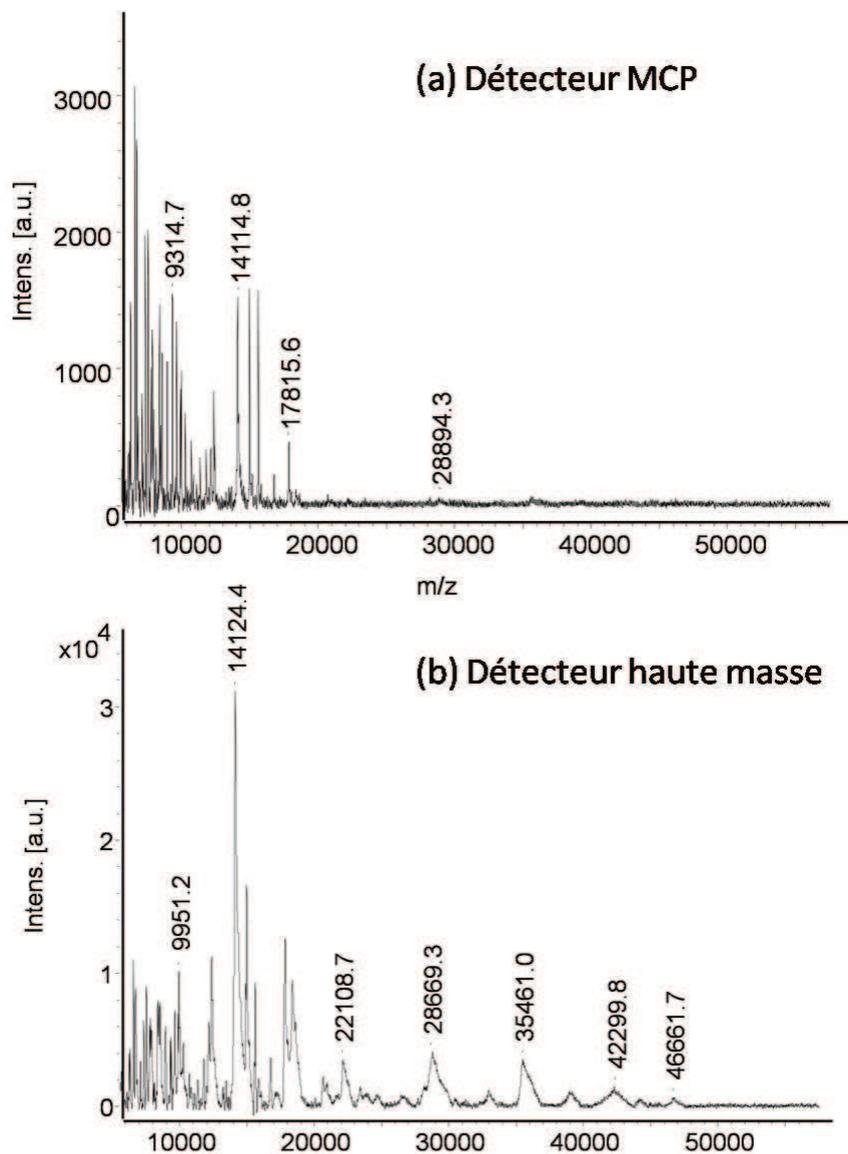


Figure 70 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec le détecteur (a) MCP et (b) CovalX après dépôt d'une solution de SA dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v).

Les résultats présentés ci-dessus montrent que le détecteur haute masse dispose d'une très grande sensibilité par rapport au détecteur conventionnel de type MCP en présentant des spectres avec des pics 10 fois plus intenses. Cependant, il convient de noter que la sensibilité est obtenue au détriment de la résolution. En effet, le spectre obtenu avec le détecteur MCP présente de nombreux pics dans la gamme des m/z 5000-10000 qui ne sont plus observés avec le détecteur haut masse faute de résolution. Ceci est dû au pauvre pouvoir résolutif induit par l'utilisation du détecteur haute masse. Ceci permet, néanmoins, de répondre à la question de savoir si la non-observation de signaux au-delà de m/z 30000 pouvait être simplement due à un défaut de sensibilité de détection. Les spectres de la **Figure 70** montrent que quelques pics supplémentaires sont détectés dans les hautes masses mettant en évidence que la limite n'est pas uniquement instrumentale. Cependant, l'intensité des pics étant tout de même plus intense, une expérience d'imagerie MALDI de protéines à partir d'une coupe de cerveau de souris a été réalisée après dépôt d'une solution contenant 10 mg/mL de SA dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v). Des images de la répartition de trois ions reconstruites à partir des données enregistrées sont présentées en **Figure 71**.

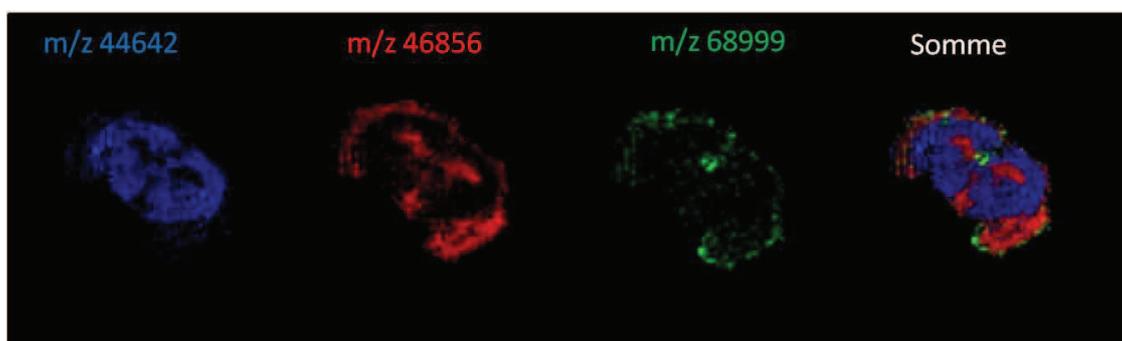


Figure 71 : Images MALDI de 3 ions détectés à partir d'une coupe de souris avec le détecteur CovalX monté sur un AutoFlex III.

Dans le cadre d'une analyse directe, le détecteur haute masse a permis de mettre en évidence quelques protéines de plus haut poids moléculaire, La répartition de trois protéines de haute masse observables uniquement avec le détecteur haute masse est présentée **Figure 71**. Il a été possible de mettre en évidence la distribution d'une protéine d'environ 69 kDa ce qui est habituellement impossible avec les détecteurs équipant la majorité des MALDI-TOF. Compte tenu de la sensibilité de détection gagnée par utilisation du détecteur haute masse, il apparaît intéressant de pouvoir combiner les traitements développés pour l'analyse des protéines de plus haut poids moléculaire avec l'emploi de tels systèmes de détection. Après avoir réalisé les traitements HFIP et TFE précédemment présentés, les spectres sont

enregistrés à partir des coupes de tissus avec le détecteur MCP et le détecteur haute masse (Figure 72).

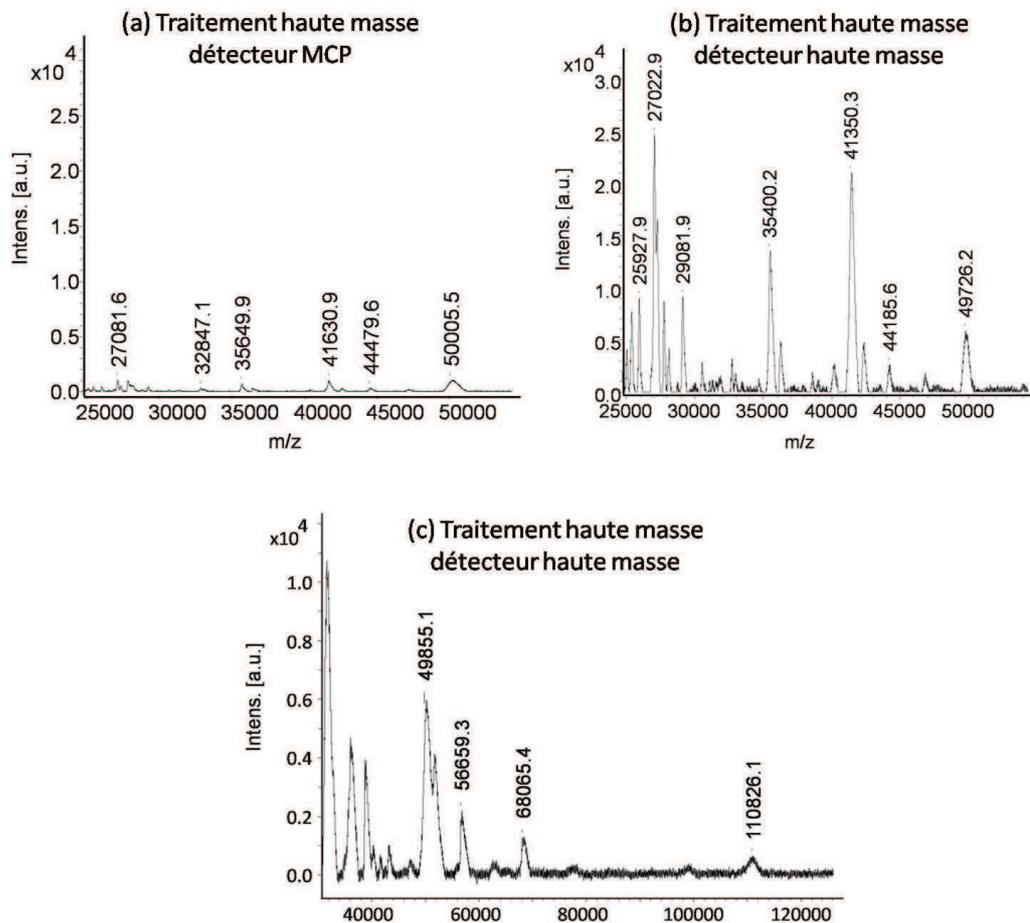


Figure 72 : Spectres de masse enregistrés en mode linéaire positif après traitement haute masse sur une coupe de cerveau de souris avec le détecteur (a) MCP et (b-c) le détecteur haute masse.

Encore une fois, la sensibilité est obtenue au détriment de la résolution mais le résultat est sans appel. Les pics sont quasiment 50 fois plus intenses avec le détecteur haute masse et une protéine d'environ 110 kDa est détectée. Ce détecteur présente un avantage indéniable puisque qu'il permet un gain en sensibilité qui n'est pas négligeable. Cependant même avec un détecteur améliorant la détection de protéines de haute masse, il est très difficile d'obtenir des protéines au dessus de 50 kDa. Ceci pourrait s'expliquer par une mauvaise incorporation de ces protéines dans les cristaux de matrice. L'utilisation de matrices ioniques qui entraîneraient une modification du réseau cristallin de la matrice permettrait peut être d'améliorer leur détection et par conséquent des études sont en cours afin de développer une nouvelle matrice ionique pour améliorer la détection des protéines de haut poids moléculaire.

2.3.2. Application au cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire est responsable de plus de 3500 décès par an en France et représente la quatrième cause de mortalité féminine dans les cas de cancer. Il atteint une femme sur 70 et plus particulièrement les femmes entre 60 et 70 ans. Cette maladie est la première cause de décès gynécologiques. A l'heure actuelle, il n'existe aucun diagnostic précoce efficace et les cas de cancer sont généralement décelés à un stade tardif. 75% des cancers de l'ovaire sont décelés aux stades III et IV sachant que le taux de survie à 5 ans passe à 25% pour les stades II et à 15% pour les stades IV. De plus, il n'existe aucun traitement efficace sur des stades de cancer déjà avancés.

Les signes cliniques de la maladie sont variables. Ils peuvent être ciblés du point de vue gynécologique par une augmentation de l'abdomen, des douleurs pelviennes ou des leucorrhées. Quelques biomarqueurs tumoraux sont utilisés dans le cancer de l'ovaire. Le plus connu de ceux-ci étant le marqueur CA 125 (Cancer Antigen 125). Ce biomarqueur est une glycoprotéine particulièrement abondante dans 80% des tumeurs épithéliales mais seulement dans 50% des patientes évoluant à des stades précoces. Cependant, ce biomarqueur n'est présent que dans 30% des cas au stade I mais surtout sa concentration peut augmenter à cause d'autres phénomènes physiologiques sans lien avec la pathologie du cancer de l'ovaire comme les premiers mois de grossesse, les cancers du sein, les cas d'endométriose ou les irritations péritonéales. CA 125 est très utile dans les populations à risque mais ne permet pas de faire un diagnostic précoce du cancer de l'ovaire par sa seule utilisation. Il est donc indispensable de développer des nouvelles stratégies pour la découverte de jeux de biomarqueurs spécifiques et détectables à des stades précoces de ce cancer.

Une étude précédemment réalisée au laboratoire par imagerie MALDI a permis de mettre en évidence plusieurs biomarqueurs potentiels du cancer l'ovaire. 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 73**) et par nanoESI-MS/MS après digestion enzymatique. Cette protéine détectée à m/z 9744 correspond à un fragment C-terminal, de 84 acides aminés, de la protéine Reg-alpha¹¹³. 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.

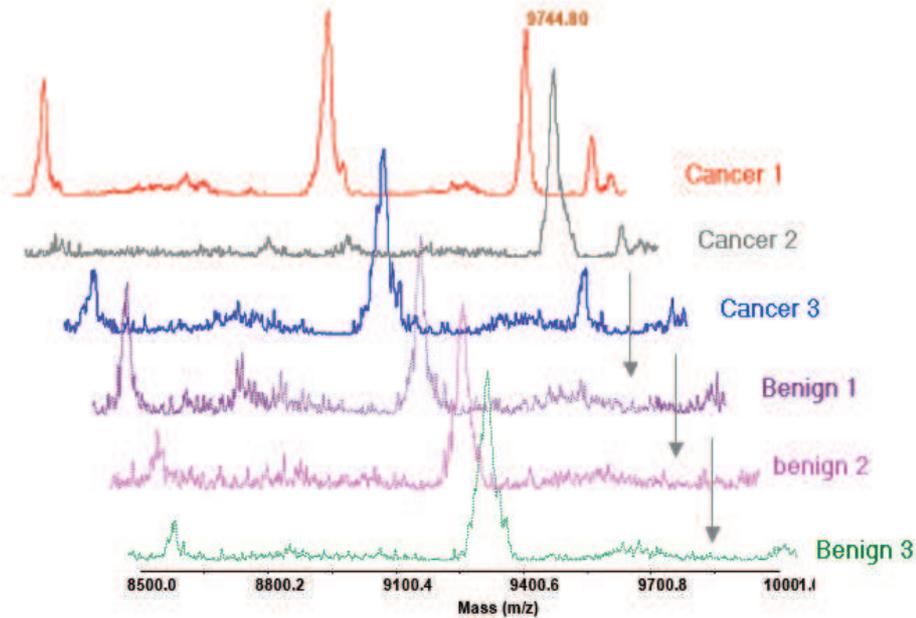


Figure 73 : Spectres MALDI enregistrés à partir de 3 coupes d’ovaire présentant des tumeurs cancéreuses et 3 coupes présentant des tumeurs bénignes ¹¹³.

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 74a**) a été réalisée et la matrice SA/3AP fut déposée de manière automatique par système piézoélectrique à l’aide du robot de micro-dépôts (**Figure 74b**). Les micro-dépôts sont réalisés de façon à recouvrir l’ensemble de la coupe incluant les deux zones d’intérêt.

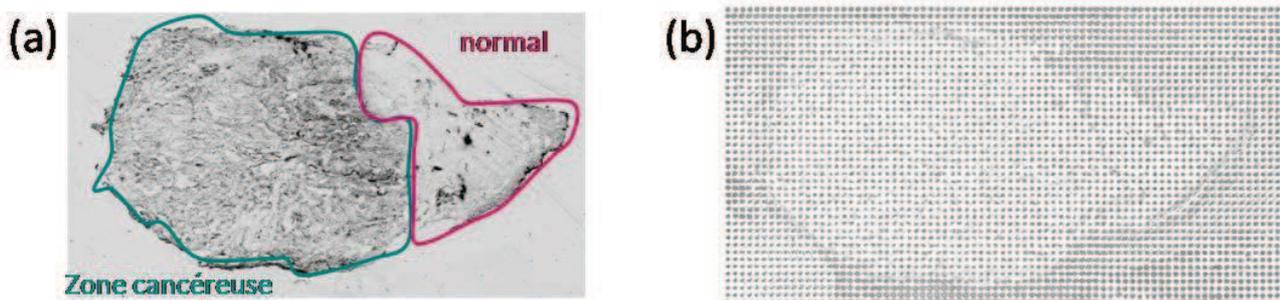


Figure 74 : Images optiques d’une coupe d’ovaire cancéreuse (a) avant dépôt de la matrice et présentant les deux zones d’intérêt et (b) après dépôt de la matrice SA/3AP.

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 250 μm . 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 (PCA) 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 75**).

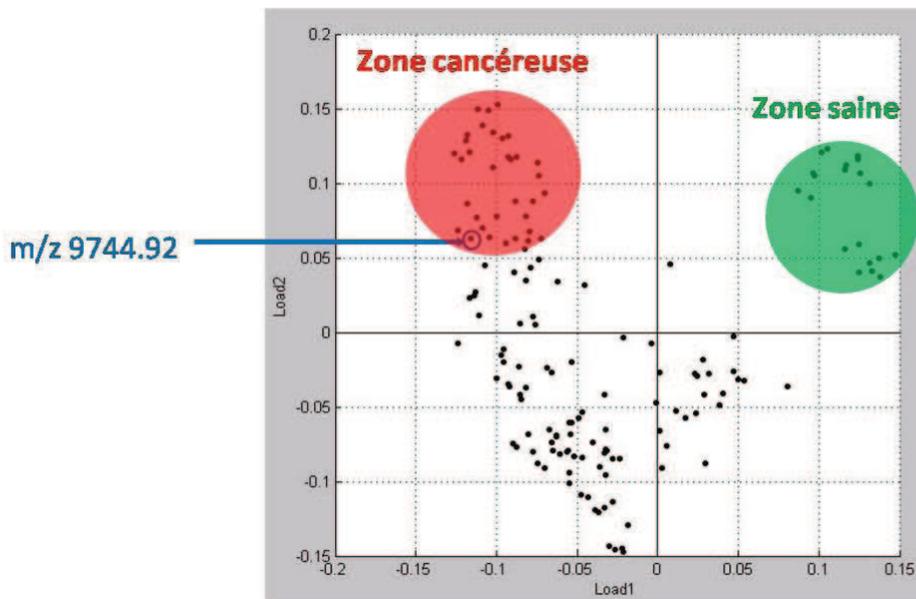


Figure 75 : Analyse PCA non supervisée obtenue à partir des spectres enregistrés sur une coupe d'ovaire présentant les ions différenciellement exprimés sur la coupe.

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 validation croisée avec d'autres méthodes. Un exemple concret de cette application est obtenu avec l'ion à m/z 9744.92 correspondant au fragment de la protéine Reg alpha précédemment mis en évidence. L'utilisation des analyses PCA permet de démontrer que ce fragment est différenciellement présent au sein du tissu. Il est possible de rechercher la localisation de cet ion particulier et de vérifier que la répartition corrèle avec la zone cancéreuse (**Figure 76**). 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.

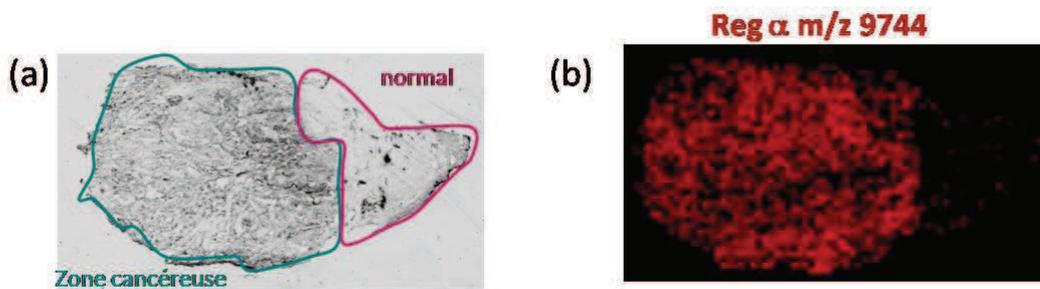


Figure 76 : (a) Image optique de la coupe d'ovaire présentant la zone cancéreuse et la zone saine et (b) image MALDI représentant la distribution de Reg alpha (m/z 9744).

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 77** sont représentés la distribution d'ions correspondants aux protéines présentant des distributions spécifiques dans l'une ou l'autre des régions de la biopsie.

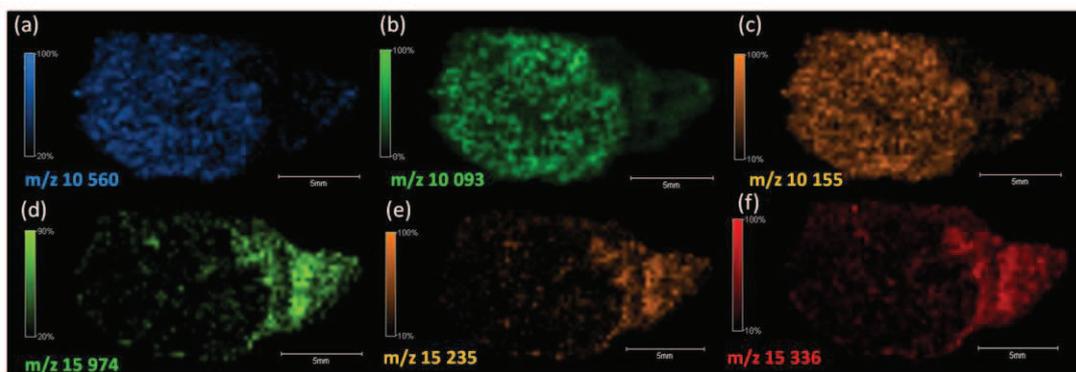


Figure 77 : Images MALDI d'ions mis en évidence par PCA et détectés uniquement (a-c) dans la zone cancéreuse et (d-f) dans la zone saine.

Partant de ce principe, il serait très facile d'affirmer que les ions détectés dans la zone cancéreuse (**Figure 77a-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 exprimées que dans cette région. L'ionisation des espèces ainsi que leur détection dépendent de nombreux paramètres et peuvent être grandement influencées

par le milieu environnement. Par exemple, rien ne dit que l'ion m/z 10560 (**Figure 77a**) 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 suppression d'ionisation. Bien que l'analyse PCA permette de simplifier de façon significative les données pour trouver des ions différenciellement présents, cet outil ne prend pas en compte l'effet de l'environnement. Si l'ensemble des spectres et non plus les individus constituant 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 78**).

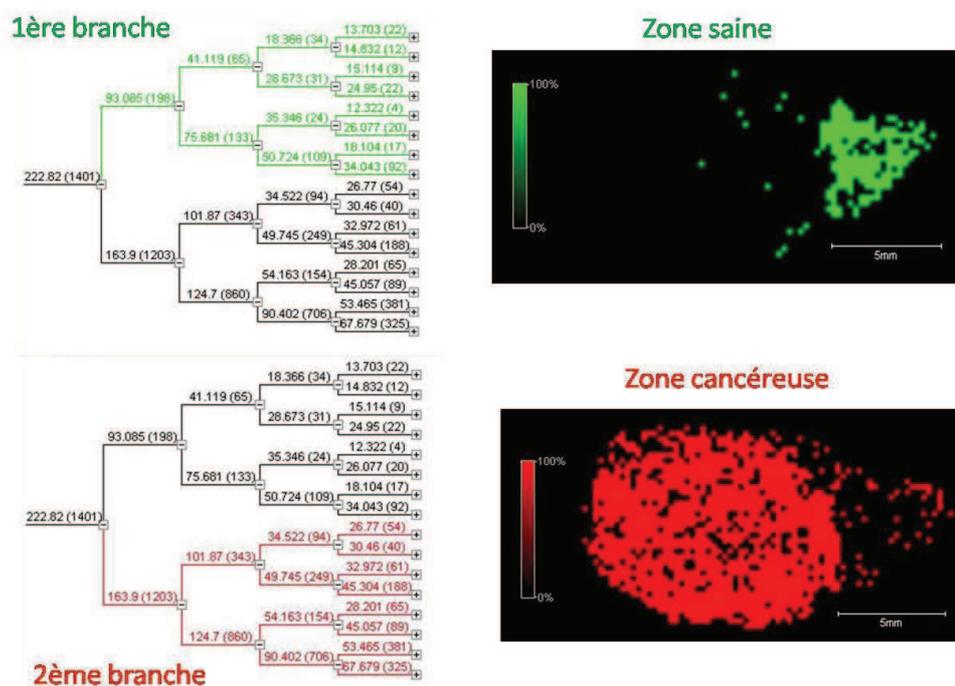


Figure 78 : (a) Dendrogramme créé à partir de l'analyse en cluster regroupant les spectres par similarité. (b) Image du cluster correspondant à la zone saine et à la branche supérieure du dendrogramme. (c) Image du cluster correspondant à la zone cancéreuse et à la branche inférieure du dendrogramme.

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 tend à faire de l'imagerie MALDI une méthode permettant de réaliser un diagnostic clinique.

Les résultats présentés ont été obtenus par un dépôt de matrice ionique SA/3AP après lavages acétone, chloroforme et EtOH de la coupe. Cependant, il est possible d'appliquer le traitement pour améliorer la détection des protéines de plus haute masse. En effet, le protocole présenté dans la partie 2.3.1 développé sur des coupes de cerveau de rat peut être appliqué sur un tissu impliqué dans une étude pathologique comme le cancer de l'ovaire.

Deux coupes d'ovaire successives présentant des tumeurs bénignes 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 20 mg/mL de SA sur les deux coupes. Les résultats obtenus sont présentés **Figure 79**.

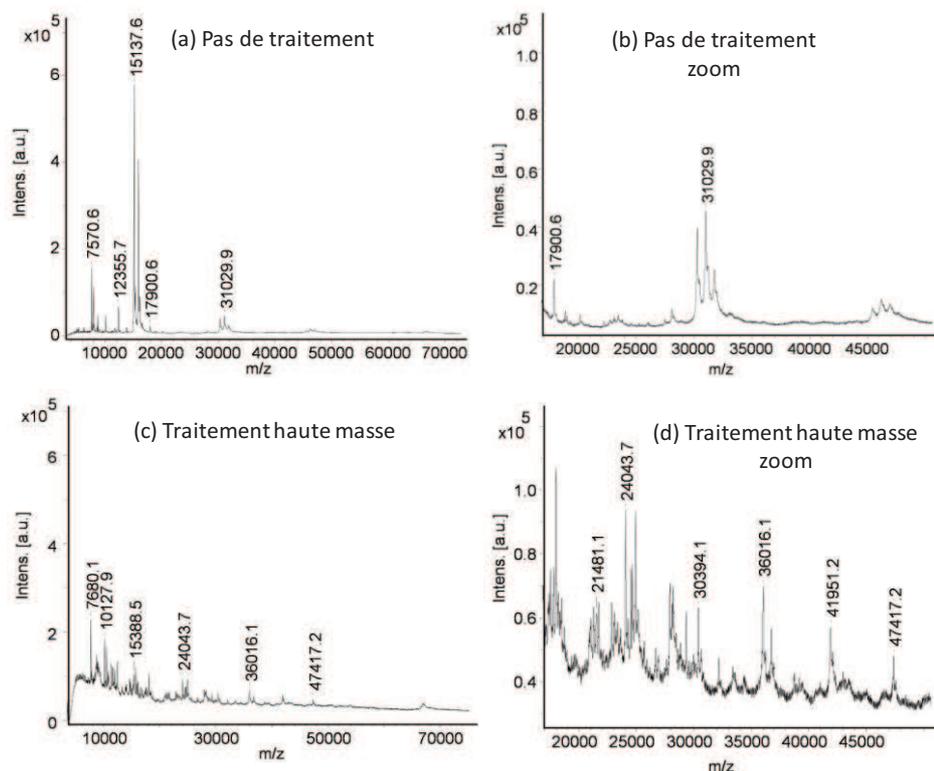


Figure 79 : Spectres de masse obtenus à partir de coupe de cerveau de rat enregistrés en mode linéaire positif après (a) dépôt de la matrice SA sans traitement et (c) après traitement haute masse. (b et d) Zooms des spectres dans la gamme m/z 20000 et m/z 50000.

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 15 000. 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 15 000, 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 putative identification des protéines en tant que biomarqueurs a pu être établie et présentée **Tableau 6**. Ces résultats suggèrent que les traitements haute masse pourraient 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.

Nom des protéines	Poids moléculaire (Da) déterminé par analyse directe après traitement haute masse	Poids moléculaire (Da) de protéines identifiées dans le cancer de l’ovaire	Références
Tetranectin (CAA45860)	17 775	17 776	298-301
Neutropil Gelatinase- associated lipocalin precursor	22 576	22 571	302
Plasma retinol- binding protein precursor	22 986	22 990	303
Metalloproteinase inhibitor 1 precursor	23 152	23 153	304
Kallikrein 5 Precursor	26 842	26 838	305
Isoform 1 of Urokinase plasminogen activator surface receptor precursor	36 940	36 949	306, 307

Tableau 6 : 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.

2.4. Optimisation de la méthode de micro-dépôts

2.4.1. Modification de la géométrie

Les résultats précédents montrent que le dépôt de la matrice par micro-dépôts est une stratégie de choix pour la réalisation d'images de biomolécules endogènes telles que les protéines pour la recherche de biomarqueurs. Comme nous l'avons précédemment abordé, le micro-dépôt de la matrice peut être amélioré par utilisation de matrices de type matrices ioniques. Cependant, les paramètres instrumentaux du système piézoélectrique peuvent également être optimisés. Afin d'améliorer la reproductibilité et la précision des dépôts sur le système de dépôt piézoélectrique, une étude sur les paramètres géométriques a été effectuée. Il a souvent été observé qu'avec la distance entre la tête piézoélectrique et la coupe de tissu, l'application de la matrice ne bénéficiait pas d'une grande précision entraînant alors une mauvaise reproductibilité des dépôts. Ceci représente une difficulté lorsque deux réactifs différents doivent être appliqués exactement à la même position comme par exemple lors d'expériences de digestion enzymatique *in situ* (Partie 3.3). Notamment, des différences de viscosité entre les solutions déposées peuvent entraîner une précision de dépôts empêchant la matrice d'être déposée exactement sur les dépôts de digestion. De plus, durant l'application de la matrice, la formation de petits cristaux au bout de la tête piézoélectrique peut provoquer également une imprécision du dépôt se traduisant notamment par la formation de gouttelettes satellites. Ce phénomène est cependant très diminué par l'utilisation de matrices ioniques solides et supprimé pour des matrices ioniques liquides. Afin de résoudre ce problème, la distance entre la tête piézoélectrique et l'échantillon a été réduite de façon significative en modifiant le support de lame. La cible MALDI classiquement utilisée pour les expériences d'imagerie et qui permet l'insertion de lames de verre (« Slider Adapter II ») (**Figure 80a**) est donc remplacée par une plaque modifiée pour accueillir des cibles MALDI particulières, les cibles AnchorChip de chez Bruker (**Figure 80b**). Pour cela, une lame en métal d'environ 1 mm d'épaisseur est collée sur le porte cible et la lame de verre sur laquelle est déposée l'échantillon est ensuite ajoutée sur cette lame de métal. Cette modification permet une nette diminution de la distance entre la tête piézoélectrique et le tissu permettant ainsi d'accroître la précision des dépôts et par conséquent la reproductibilité. Les tests effectués lors d'expériences de digestion enzymatique *in situ* montrent que la matrice est déposée de façon très précise au même endroit que les dépôts de digestion. L'apparition de gouttelettes satellites n'est plus observée après réduction de la distance. Cependant, il convient de noter

que cette procédure doit être effectuée avec la plus grande précaution afin d'éviter que la tête piézoélectrique ne touche la lame et entraîne son endommagement.

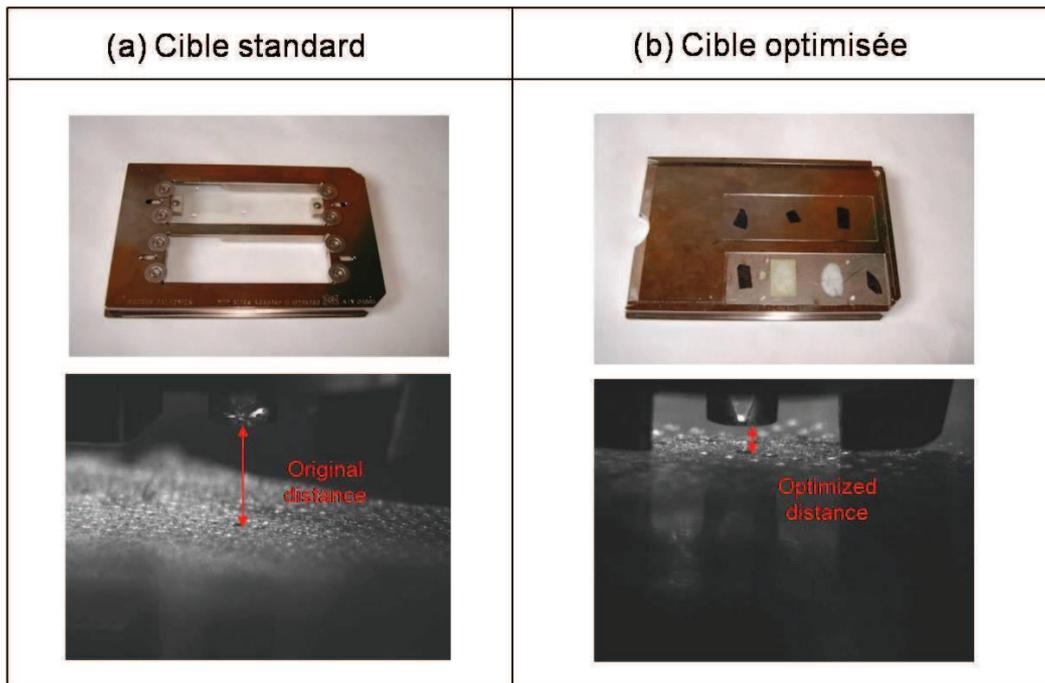


Figure 80 : Optimisation de la cible afin d'améliorer la précision et la reproductibilité des dépôts.

Cette modification, augmentant la précision des dépôts, combinée avec la grande stabilité des matrices ioniques telles que SA/ANI permet ainsi de réduire la taille des dépôts afin d'augmenter la résolution spatiale des images. En ne déposant que 3 gouttes par dépôt lors d'un passage, une résolution spatiale de 150 μm peut être obtenue (**Figure 81a**). **Figure 81c** sont présentées les images de deux protéines reconstruites à partir des données enregistrées à cette résolution. Les deux protéines choisies pour l'exemple présentent des distributions spécifiques et opposées. Ainsi, une simple réduction de la géométrie de l'instrument combinée avec l'utilisation des matrices ioniques permet d'augmenter la précision et la reproductibilité des dépôts et donc indirectement améliorer la qualité et la résolution des images MALDI générées.

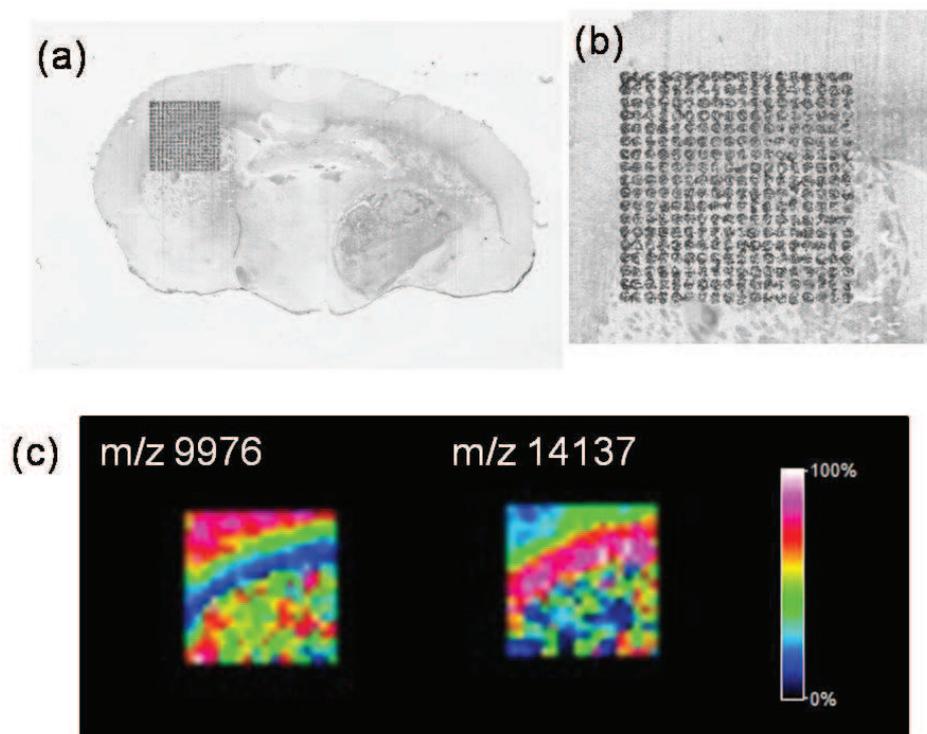


Figure 81 : (a) Image optique des spots de la matrice SA/ANI déposés sur une coupe de cerveau de rat avec une résolution de 150µm. (b) Image optique du zoom de la région de spots. (c) Image MALDI des ions m/z 9976 et m/z 14137.

2.4.2. Diminution du temps de dépôt

Le micro-dépôt présente de nombreux avantages incluant la possibilité de déposer plusieurs réactifs différents dans des zones bien précises de la coupe, l'utilisation d'une très faible quantité de réactifs et l'efficacité d'extraction des composés. Cependant, le temps de dépôt de ces réactifs est relativement long puisque le dépôt s'effectue en mode, position par position. Ce temps de préparation peut devenir très long si les dimensions de la coupe de tissu à étudier sont importantes et si plusieurs réactifs doivent être déposés successivement sur la coupe. Dans tous les travaux d'imagerie MALDI récemment présentés avec préparation par micro-dépôts, les dépôts sont réalisés à partir d'un carré ou d'un rectangle remplis de spots. Ainsi, des micro-dépôts sont effectués dans des zones ne présentant pas de tissu ce qui entraîne une perte significative de temps. A la demande du laboratoire, le logiciel de l'instrument a été modifié par le constructeur (Shimadzu) afin de pouvoir diviser l'aire sélectionnée en plusieurs petites aires constituées généralement de 4x4 spots. Les nouvelles petites aires créées qui ne sont pas sur la coupe peuvent alors être retirées ne laissant que les

aires réellement nécessaires (**Figure 82a**). Il devient alors possible de réaliser un dépôt des réactifs en suivant le contour du tissu (**Figure 82b**) pour un gain temps.

Le temps de dépôt peut également être diminué en augmentant la fréquence d'éjection des gouttelettes. Par défaut, pour les applications d'imagerie, l'instrument fonctionne à 240 Hz, mais cette fréquence peut être augmentée jusqu'à 1000 Hz. Bien entendu cette modification n'est à effectuer que dans le cas où l'application de réactif est très stable. Ainsi, cette modification a été réalisée sur notre instrument car l'utilisation des matrices ioniques permet un dépôt d'une absolue stabilité.

En regroupant ces deux optimisations, il a été possible de gagner 1 heure sur le temps de dépôt pour un tissu présentant la taille d'un cerveau de rat. Les images MALDI reconstruites à partir d'une coupe de cerveau de rat recouverte par micro-dépôts avec la matrice SA/ANI en suivant la forme du tissu et à une fréquence d'éjection des gouttes de 1000 Hz sont présentées **Figure 82b**. L'application est remarquablement stable durant les 20 passages nécessaires pour obtenir une cristallisation parfaite. La qualité des spectres ainsi que les images MALDI n'ont pas été affectées par ces modifications.

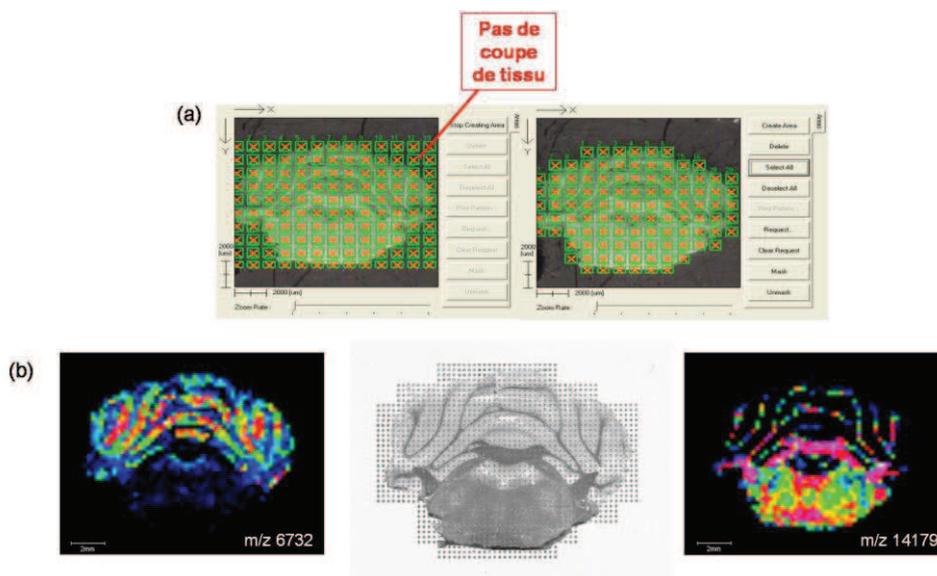


Figure 82 : Diminution du temps d'application. (a) Région d'intérêt divisée en petites aires permettant le dépôt uniquement sur le tissu. (b) Images MALDI de la répartition de deux ions à m/z 6732 et m/z 14179 obtenues après dépôt de SA/ANI à haute fréquence.

2.5. Conclusion

Quelque soit la classe de molécules étudiées (lipides, peptides, protéines...), la préparation des échantillons est une étape cruciale pour la réalisation des expériences en imagerie MALDI. Le choix de la matrice ainsi que la qualité de la cristallisation sont des paramètres fondamentaux pour la qualité des images. Celle-ci est également influencée par le choix de la méthode de dépôt sur la coupe. En effet, il est important de pouvoir minimiser la délocalisation des analytes au sein des tissus lors de l'application de la solution de matrice qui est directement reliée au volume de solution déposé sur la coupe. Il est donc particulièrement important de pouvoir déposer de très faibles volumes de solution de matrice tout en assurant une bonne extraction des composés. L'extraction étant un point crucial pour l'analyse de certains composés comme les protéines.

Le micro-dépôt permet de déposer un faible volume de solution entraînant la formation d'un dépôt limitant la délocalisation des composés à la taille de ce dépôt. L'utilisation d'un micro-spotter automatique par système de type piézoélectrique permet de contrôler les conditions expérimentales ce qui est crucial pour la comparaison d'échantillons. Des dépôts de matrice homogènes et reproductibles peuvent alors être obtenus par l'utilisation d'un tel système basé sur l'utilisation de têtes piézoélectriques. Après modification de la plaque et du logiciel, il devient alors possible de réaliser des dépôts d'une grande précision à une vitesse très élevée en suivant la forme du tissu.

L'utilisation de matrices ioniques pour la détection des lipides, peptides ou protéines s'est avérée très efficace en termes de compatibilité avec le micro-spotter mais surtout de performances analytiques et de stabilité. Les matrices ioniques présentent une meilleure sensibilité que leurs homologues classiques (SA, HCCA,...), un meilleur rapport signal sur bruit, une meilleure stabilité sous vide et une meilleure cristallisation. Par leur cinétique de cristallisation plus lente, une très grande stabilité d'application peut être obtenue sur le système piézoélectrique. Cette même cinétique de cristallisation pourrait entraîner une plus grande incorporation des analytes dans les cristaux de matrices expliquant les signaux plus nombreux et intenses observés avec ces matrices pour l'analyse des peptides et protéines. La grande stabilité d'application de ces matrices a permis d'augmenter la fréquence d'éjection des gouttelettes de la tête piézoélectrique permettant une application beaucoup plus rapide sur l'ensemble de la coupe.

Il a été clairement démontré que pour la détection des analytes et plus particulièrement pour les protéines, les étapes de lavage sont essentielles mais surtout qu'il est possible par des

traitements, de détecter d'autres classes de protéines habituellement non observées et de plus haut poids moléculaire. Tous ces développements apportent de réelles avancées pour la détection de biomolécules et plus précisément pour la recherche de biomarqueurs dans le cas d'études pathologiques comme le cancer de l'ovaire. Avec l'apport de la bioinformatique, il devient alors possible de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs potentiels. Il devient alors indispensable de pouvoir les détecter directement sur coupe de tissu.

Si de nombreux exemples montrent qu'il est possible de pouvoir caractériser par MS/MS des lipides, des peptides et des petites molécules comme les médicaments, il est encore très difficile de pouvoir caractériser les protéines observées. Il est donc indispensable de pouvoir mettre au point des stratégies permettant l'identification des protéines directement à partir des tissus en évitant toutes les étapes d'extraction et de séparation souvent très longues. C'est cette thématique particulière que nous aborderons dans le prochain chapitre.

3. Identification de protéines sur tissus

3.1. Stratégies d'identification

La spectrométrie de masse présente des capacités particulièrement intéressantes pour parvenir à l'identification de molécules et notamment de biomolécules telles que les protéines. Dans les stratégies d'identification classiques en protéomique, les protéines sont tout d'abord extraites à partir d'un tissu avant d'être séparées, généralement par HPLC ou électrophorèse bidimensionnelle, puis identifiées par spectrométrie de masse. L'identification des protéines peut suivre deux stratégies nommées respectivement « Bottom-Up » et « Top-Down ». Dans la stratégie « Bottom-Up » les protéines sont tout d'abord soumises à une digestion enzymatique (e.g. trypsine) ou chimique (e.g. CNBr), puis les fragments de digestion sont analysés par MS. Cette étape qui consiste à déterminer la masse de tous les fragments peptidiques de digestion est nommée empreinte de digestion tryptique (ou Peptide Masse Fingerprint, PMF). Les fragments de digestion, quant à eux, peuvent être caractérisés en réalisant des analyses MS/MS³⁰⁸. Si les protéines étudiées sont déjà connues et référencées dans des banques de données, il sera alors possible de les identifier par comparaison des masses des fragments de digestion obtenues à partir du spectre MS et 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 définitivement plus longue et requière généralement la connaissance de la séquence des peptides afin de remonter à la séquence complète de la protéine en passant par des stratégies de génomique inverse. Une stratégie plus directe d'identification des protéines consiste à analyser directement les protéines intactes par MS et de pouvoir directement caractériser ces protéines par fragmentation dans le spectromètre de masse. Cette stratégie dite « Top-Down » est clairement plus rapide. Elle reste néanmoins peu employée comparativement aux stratégies « Bottom-Up » car elle est limitée à certaines instrumentations de par les modes d'activation des ions particuliers qu'elle requière. Dans le cas de l'utilisation d'un spectromètre de masse de type FT-ICR, par exemple, la capture d'électrons ECD (Electron Capture Dissociation)³⁰⁹,³¹⁰ permet la fragmentation de protéines intactes à partir d'ions multichargés généralement créés par une source ESI. Malheureusement, une telle méthode d'activation n'est pas compatible avec les sources MALDI où le nombre d'états de charge générés reste faible

même pour de très hauts poids moléculaires. D'autres limitations comme la gamme de masse accessible par certains analyseurs expliquent également la non compatibilité des sources MALDI avec le mode « Top-Down » compte tenu du faible nombre d'états de charge.

Ainsi, si l'imagerie MALDI permet dans la grande majorité des cas de mettre en évidence des protéines différenciellement 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'extractions et de séparations préalables à l'identification dans les stratégies employées en protéomique classique. L'identification à partir des tissus peut se révéler particulièrement importante et en particulier pour des protéines abondamment présentes mais dans des régions extrêmement restreintes du tissu, et qui ne pourraient être identifiées par des stratégies classiques, leur signal étant noyé par celui de protéines plus largement réparties au sein de l'échantillon. Il est donc primordial de développer des stratégies d'identification sur tissus. Pour se faire il faut pouvoir développer à l'échelle du tissu, des stratégies Imagerie MALDI en mode « Bottom-Up » ou « Top-Down ». Compte tenu des spécificités instrumentales, et des difficultés de combinaison avec les caractéristiques des sources MALDI, il paraît à l'heure actuelle difficile d'envisager une approche Imagerie MALDI en mode « Top-Down ». La seule approche actuellement possible en MALDI et permettant la fragmentation de protéines intactes est basée sur la décomposition métastable des protéines dans la source de l'instrument. Cette approche connue sous le nom d'ISD (In Source Decay)³¹¹ est très simple et consiste à augmenter l'énergie laser et le temps de retard avant l'extraction pour permettre aux protéines de se fragmenter avant l'étape d'accélération. Cependant, en ISD, les protéines ne sont pas séparées et cette méthode est généralement réservée à l'identification de protéines préalablement purifiées. En quelque sorte, l'ISD pourrait s'apparenter à une dégradation d'Edman par MS. Ainsi, la transposition de l'ISD à l'imagerie est envisageable mais reste une approche particulière. En effet, il est possible de considérer, dans ce cas, la réalisation d'une pseudo MS³ en combinant ISD et MS/MS. Dans ce contexte il faut également envisager le développement de l'imagerie MALDI en mode « Bottom-Up ». Cette approche nécessite donc le développement de digestions enzymatiques sur coupe, sachant que cette étape de digestion ne doit pas induire de perte de la localisation des peptides issus de la digestion. L'utilisation de micro-dépôts est une approche intéressante puisque il devient alors possible de déposer l'enzyme avec précision sur une zone de dimensions bien définies. C'est ainsi que nous nous

sommes tournés vers le développement des stratégies d'identification en Imagerie MALDI en mode « Top-Down » mais surtout « Bottom-Up » par utilisation de micro-dépôts.

3.2. Stratégies Top-down

L'équipe de Brown et Lennon³¹¹ ont été les premiers à observer la fragmentation des protéines le long de leur chaîne principale dans la source MALDI après la désorption/ionisation. Le temps entre l'ionisation des espèces et leur extraction de la source est suffisamment long pour que la fragmentation puisse se réaliser (plusieurs centaines de nanosecondes). Les fragments de protéines générés sont alors généralement des ions de la série c_n , y_n et $(z+2)_n$ suivant la nomenclature établie par Roepstorff³¹². La partie N-terminale ou C-terminale de la protéine est très facilement obtenue et peut ensuite être utilisée pour l'identification dans les bases de données. L'ISD a été utilisée pour de nombreuses études telles que l'analyse d'oligosaccharides³¹³⁻³¹⁵, de carbohydrates^{316, 317}, d'oligonucléotides³¹⁸, d'ADN³¹⁹, de peptides³²⁰ et de protéines³²¹.

En ISD, il est nécessaire que l'échantillon soit pur afin d'éviter que les spectres ISD ne présentent des ions fragments de différentes protéines. Il serait alors impossible d'identifier la molécule d'intérêt. Cependant, comme les ions fragments produits par ISD sont accélérés comme des ions intacts, ces ions pourront à leur tour subir d'autres fragmentations métastables dans le tube de vol. Ces fragments métastables évoluant à la même vitesse que les ions parents (les fragments ISD) dont ils sont issus il sera alors possible de les sélectionner avant leur entrée dans le réflecteur. Il deviendra alors possible de réaliser de la pseudo MS³ plus couramment nommée approche « T3 sequencing »^{322, 323}. Cette pseudo MS³ permet d'isoler un ion ISD pour le caractériser par MS/MS donnant des ions fragments des séries y_n^+ et b_n^+ . L'ion précurseur contenant la partie N ou C-terminale de la protéine permet de connaître le début ou la fin de la séquence de la protéine. Cette stratégie peut être adaptée à l'analyse de tissus après différentes optimisations.

Cette stratégie a été testée de manière préliminaire avec la matrice SA (20 mg/mL) par simple ajout de cette dernière à la micropipette bien que les matrices 2,5-DHB ou 1,5-diaminonaphtalene (1,5-DAN)³²⁴ semblent plus adaptées pour ce type d'expériences. Un premier spectre des protéines est tout d'abord enregistré en mode linéaire (**Figure 83a**) avant d'effectuer l'analyse ISD en mode réflecteur positif (**Figure 83b**). Les résultats montrent qu'il est possible de générer un spectre ISD directement sur coupe de tissu. Le spectre ISD obtenu est généré à partir du mélange de protéines localement extraites par la solution de matrice à

l'endroit de l'analyse. Toutefois il est possible de sélectionner un des ions observés en ISD et de le soumettre lui-même à une fragmentation pour retrouver la protéine correspondante. Cette pseudo MS³ permet de retrouver le début de la séquence de la protéine du côté N ou C-terminale. L'ion à m/z 1293.2 généré par ISD est alors sélectionné pour tenter de retrouver la séquence (**Figure 83c**).

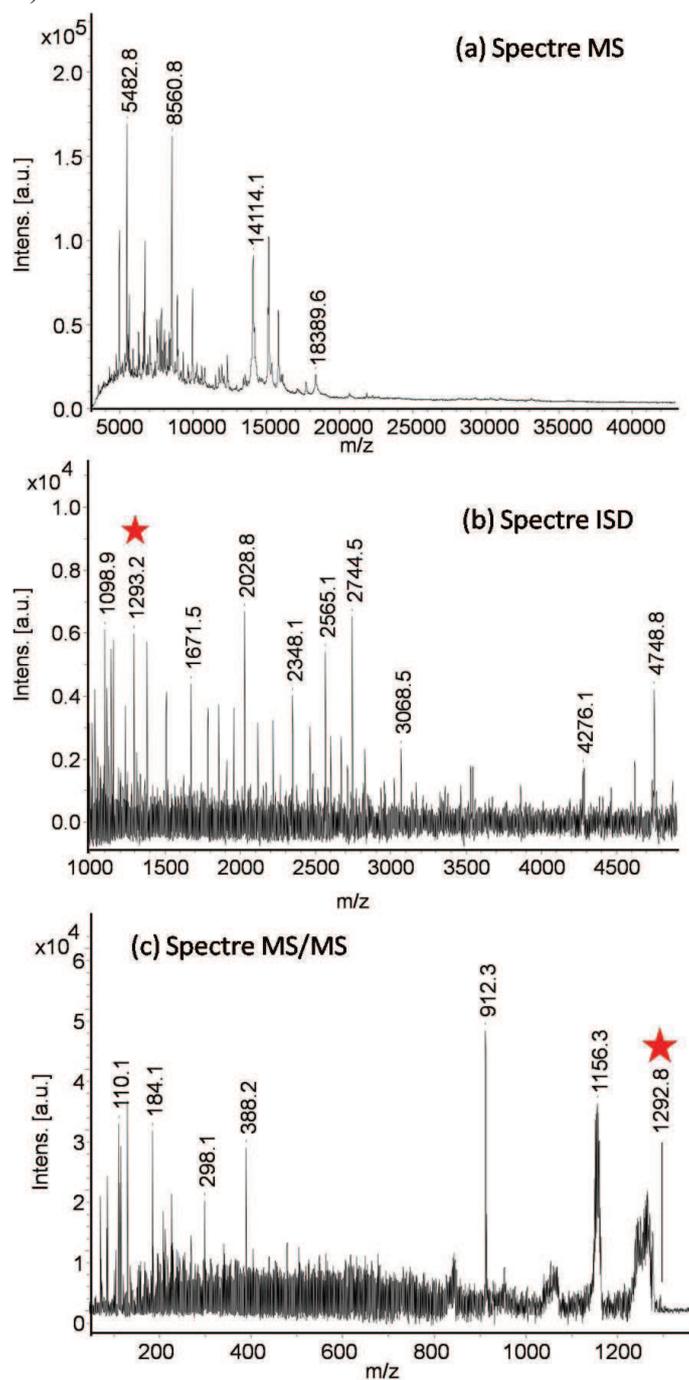


Figure 83: (a) Spectre de masse obtenu en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat avec la matrice SA. (b) Spectre ISD enregistré en mode réflecteur positif avec une extraction retardée 150 ns. (c) Spectre MS/MS d'un ion ISD (m/z 1292.8).

L'interrogation des banques de données ne permet malheureusement pas d'identifier la protéine. Ceci s'explique par la faible intensité des ions fragments observés sur le spectre ISD qui rend difficile l'obtention de spectre d'ions fragments de qualité en MS/MS. Ainsi, la faible qualité du spectre de pseudo-MS³ (**Figure 83c**) ne permet pas d'obtenir une identification en banques de données. Il a été démontré qu'il était possible d'améliorer grandement la production d'ions ISD avec le système de co-matrices 1,5-DAN/acide picolinique (PA)³²⁴. Cette procédure reste donc encore à optimiser mais semble offrir de bonnes perspectives. Il serait alors possible de réaliser l'image des ions ISD puis de les fragmenter afin d'identifier la protéine correspondante.

3.3. Stratégie Bottom up

La deuxième approche permettant l'identification des protéines est l'adaptation de la stratégie « Bottom-up » à l'Imagerie MALDI. L'utilisation d'un système piézoélectrique de micro-dépôts permettant de déposer une solution d'enzyme dans une zone bien définie de la coupe ou sur l'ensemble de la coupe dans le cas d'une expérience d'imagerie fournit une excellente méthode pour le développement de ce type de stratégies. Le principe est de générer directement sur la coupe, tout en étant localisé, des peptides issus de la digestion enzymatique des protéines comme représenté **Figure 84**.

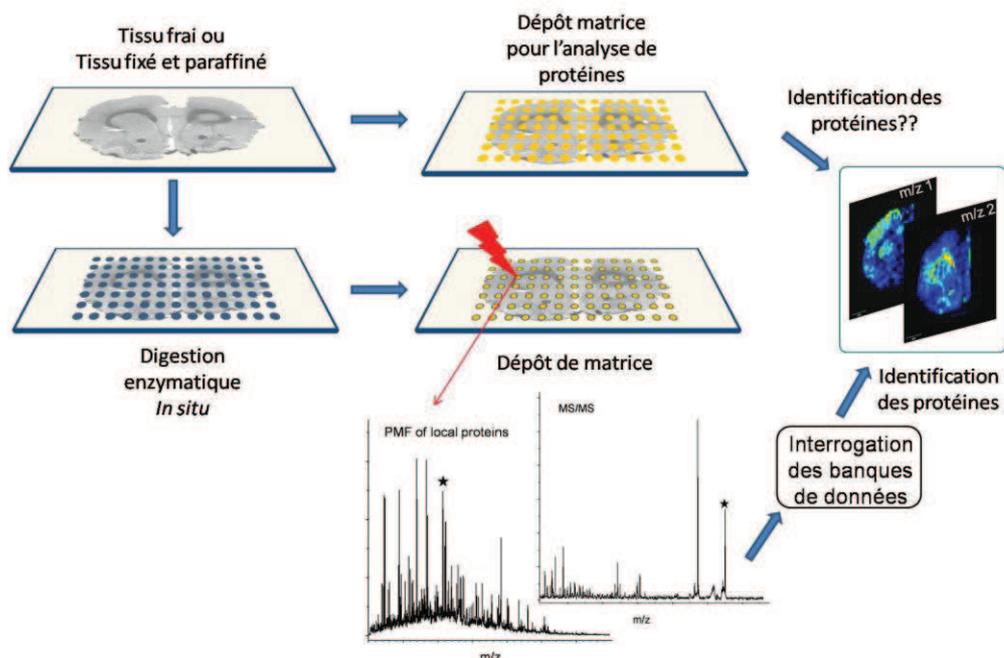


Figure 84 : Stratégie d'identification en mode bottom up par micro-dépôts sur des coupes de tissus frais et FFPE.

La stratégie « Bottom-Up » pour l'identification de protéines directement sur coupe a été récemment introduite^{102, 124} et a montré toute sa potentialité. Cette approche permet à la fois de générer des images de protéines en se basant sur leurs fragments de digestion mais aussi de les identifier en soumettant les peptides de digestion à des analyses en mode MS/MS. Cependant, l'identification des peptides puis des protéines directement sur coupe de tissu se révèle difficile. D'une part, les spectres de digestion, où viennent se juxtaposer tous les signaux des peptides provenant de la digestion de l'ensemble des protéines présentes localement sur le tissu, sont extrêmement complexes. Ceci soulève des difficultés car de nombreux ions isobariques ou très proches en masse sont présents. Ainsi, sur un instrument ne permettant pas d'atteindre une haute résolution spectrale (e.g. Orbitrappe, FT-ICR) ou ne permettant pas de rajouter une dimension de séparation (e.g. Ion-Mobility/MS) comme les MALDI-TOF, il est fréquent de ne pas distinguer la présence de différents ions sous l'enveloppe d'un même pic. Les spectres MS/MS alors générés deviennent difficilement interprétables par la présence d'ions fragments de différents peptides dans le même spectre. De plus, il convient de noter que les spectres d'ions fragments à partir de tissu semblent présenter moins de fragments et de plus faible intensité que ces spectres MS/MS équivalents générés à partir d'une préparation classique sur cible. Ainsi, la plus faible qualité des spectres MS/MS obtenus rend difficile l'interprétation par interrogation en banques de données ou même en mode *de novo*. Il est possible d'envisager, que cette plus faible fragmentation sur tissu puisse être attribuée à une relaxation plus importante de l'énergie transmise lors de l'irradiation conduisant à des ions en phase gazeuse dont l'énergie interne serait plus faible. De plus, de part l'épaisseur du tissu et son caractère isolant, la MS/MS est plus difficile sur des instruments MALDI-TOF axiaux par l'existence de phénomènes d'effets de charge. Néanmoins, actuellement la MS/MS est généralement utilisée directement sur coupe pour vérifier la séquence d'un peptide endogène ou d'un peptide de digestion afin de confirmer la présence de biomarqueurs potentiels. Cependant, la stratégie d'imagerie MALDI en mode « Bottom-up » requière différents développements pour une amélioration de ses performances.

3.3.1. Digestions enzymatiques *in situ* sur tissus

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. L'étude a porté sur le développement des digestions enzymatiques sur tissu en mode automatique par micro-dépôts. Différentes études ont été menées afin d'optimiser les conditions de digestion puis de dépôt de matrice.

La première étude a concerné l'optimisation de la concentration de trypsine permettant d'obtenir le meilleur rendement de digestion. Des solutions contenant 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$ et 100 $\mu\text{g/mL}$ de trypsine dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM (pH=8) ont donc été déposées sur des coupes de cerveau de rat adjacentes. 40 passages ont été effectués à chaque position avec le système piézoélectrique pour obtenir un volume final de 80 nL par dépôt. L'étape d'incubation est ensuite réalisée en plaçant les coupes dans une boîte saturée en MeOH/H₂O (1:1, v/v) à 37°C pendant 2H. Après digestion, la matrice HCCA/ANI est déposée en suivant le même quadrillage de dépôts que pour la digestion (**Figure 85**).

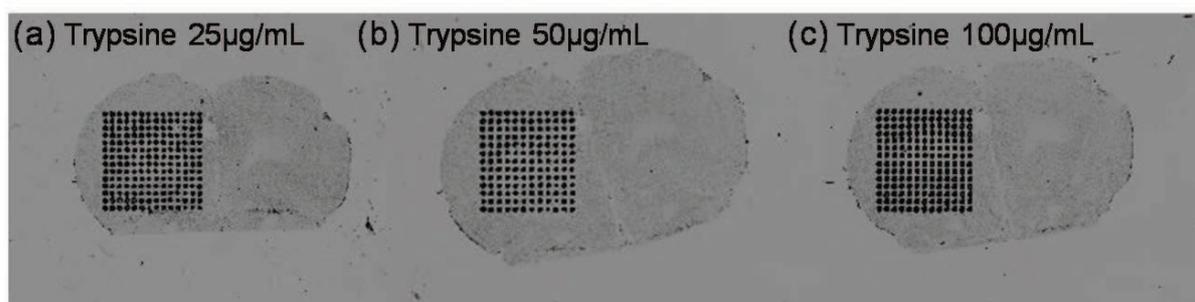


Figure 85 : Images optiques de coupes de cerveau de rat adjacentes après dépôt de trypsine à (a) 25 $\mu\text{g/mL}$, (b) 50 $\mu\text{g/mL}$ et (c) 100 $\mu\text{g/mL}$. Dépôt de HCCA/ANI sur les spots de digestion des 3 coupes.

Les dépôts sont ensuite analysés et comparés 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 86**. Les signaux peptidiques observés sur les trois spectres sont tout à fait équivalents. La seule différence apparente réside dans l'intensité des pics issus de l'autolyse de trypsine qui sont très intenses à 100 $\mu\text{g/mL}$ et peu intenses à 25 $\mu\text{g/mL}$.

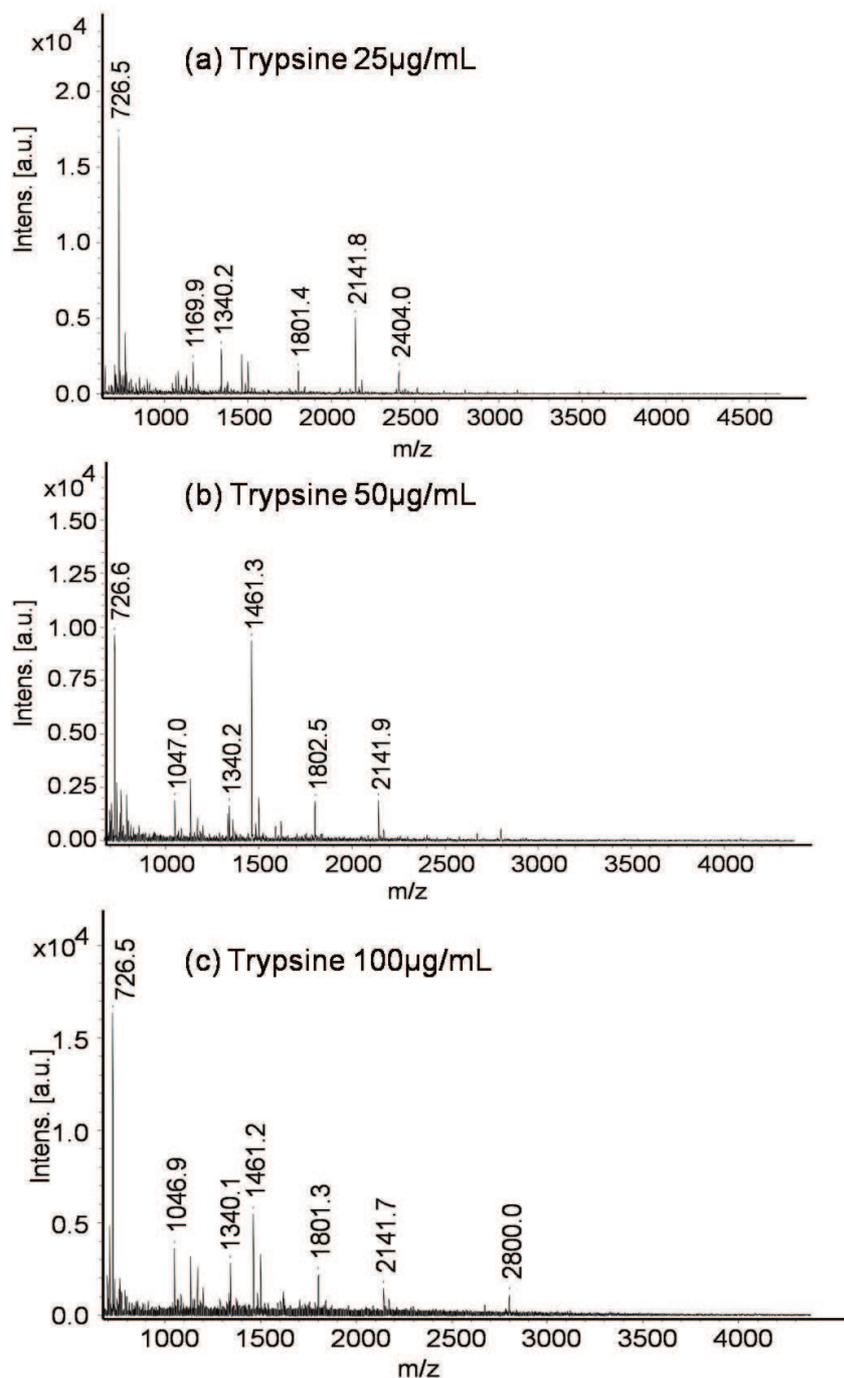


Figure 86 : Spectres de masse obtenus à partir des coupes digérées avec la trypsine à (a) 25 µg/mL, (b) 50 µg/mL et (c) 100 µg/mL. Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de HCCA/ANI sur les trois coupes.

Cependant, même pour la plus faible concentration, les pics d'autolyse de la trypsine à m/z 842.5, m/z 1045.5, m/z 2211.1 et m/z 2283.2 sont toujours détectés offrant de très bon calibrants internes (**Figure 87**). Une solution de trypsine à 25 µg/mL semble être suffisante pour atteindre un rendement de digestion efficace.

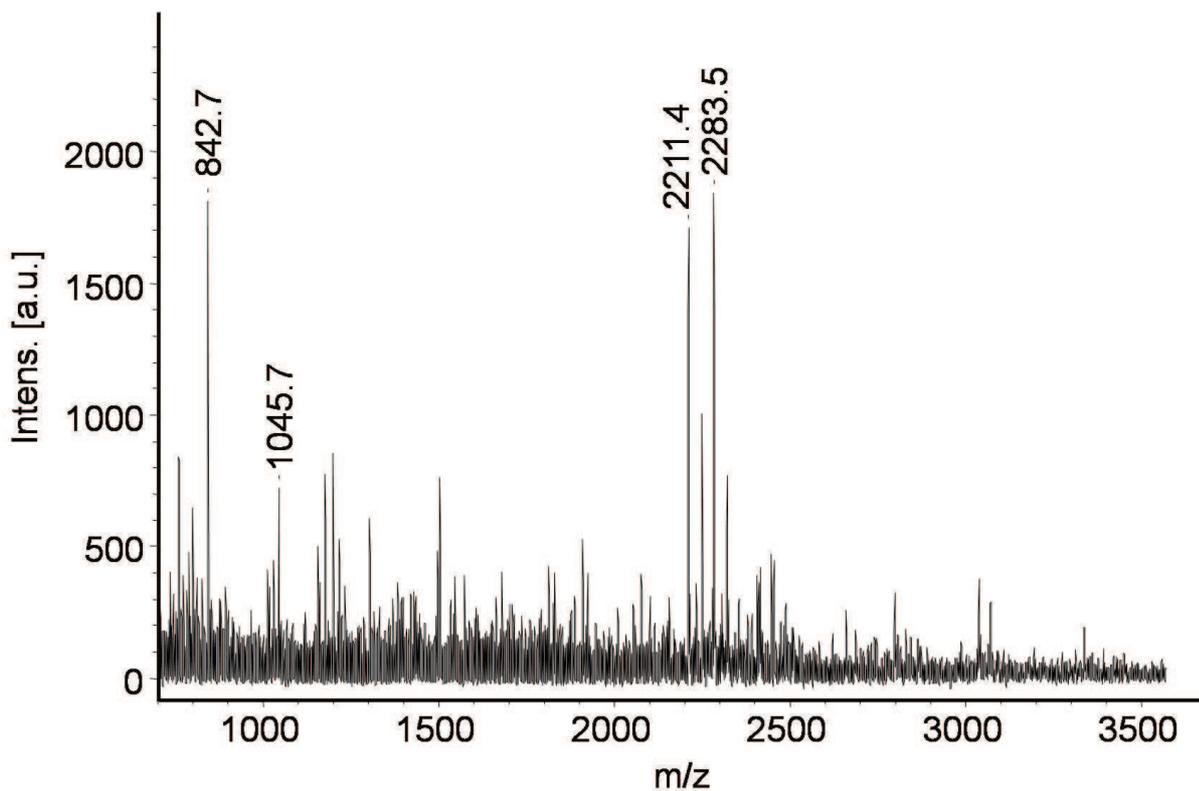


Figure 87 : Spectres de masse obtenus à partir des coupes digérées avec la trypsine présentant les pics d'autolyse de la trypsine mesurés à m/z 842.7, m/z 1045.7, m/z 2211.4 et m/z 2283.5.

Le MALDI est une source assez tolérante aux sels, cependant, l'ajout de tampons en trop forte concentration peut entraîner un fort abaissement 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 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 NH_4HCO_3 classique et dans l'eau. La trypsine est donc déposée à $25 \mu\text{g/mL}$ dans l'eau pure ou dans une solution de tampon NH_4HCO_3 . La matrice HCCA/ANI est ensuite déposée sur les deux coupes. Les spectres enregistrés et présentés **Figure 88** montrent qu'aucune différence n'est observée entre les spectres que se soit en termes du nombre de peptides détectés, d'intensité que de rapport signal/bruit. Les spectres sont quasiment identiques et des pics sont observés jusqu'à m/z 3000. Ainsi, la digestion enzymatique peut-être indifféremment réalisée dans

l'eau ou NH_4HCO_3 . Afin de minimiser l'apport de sels et tampons, une digestion dans l'eau sera préférentiellement retenue.

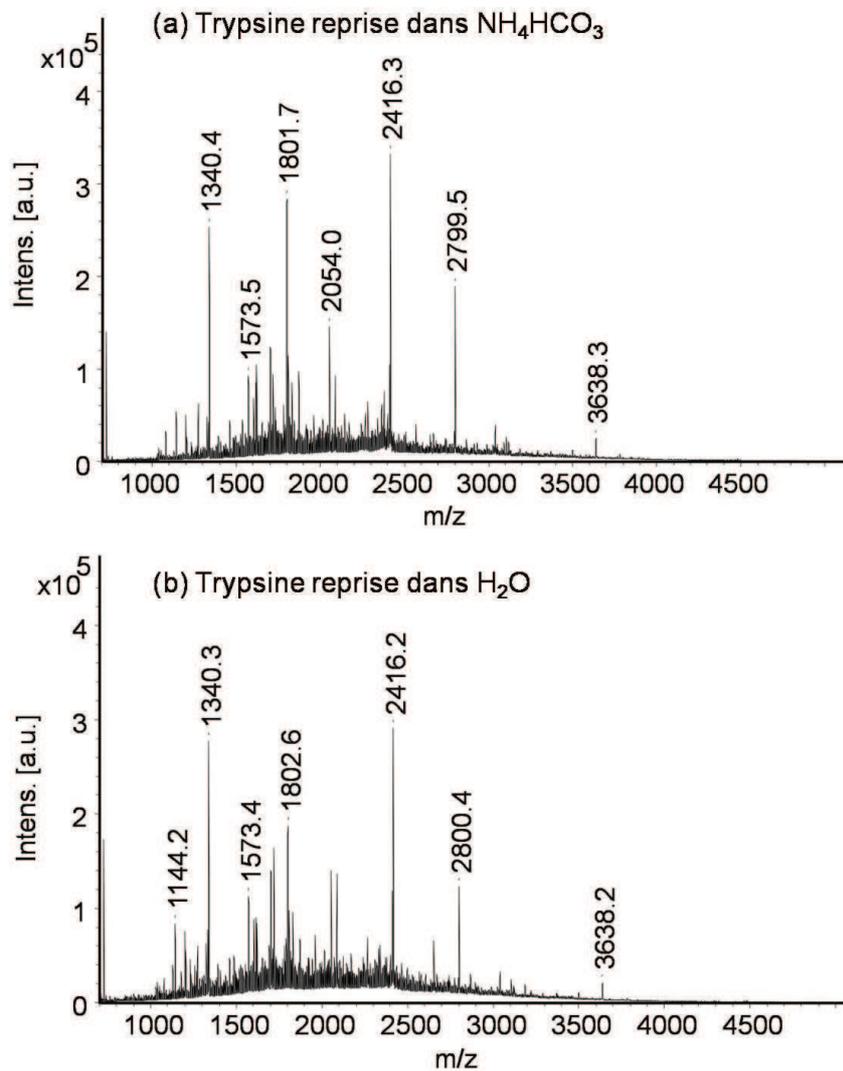


Figure 88 : Spectres moyens de digestion obtenus sur coupes de cerveau de rat après dépôt de la trypsin à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reprise dans (a) un tampon NH_4HCO_3 50 mM et (b) de l'eau pure. Spectres enregistrés en mode réflecteur positif après dépôt de la matrice HCCA/ANI.

Dans la partie 2.2, il a été démontré que l'utilisation des matrices de type matrices ioniques était intéressante pour l'analyse de peptides sur coupe de tissu. Il a été notamment montré que les deux matrices ioniques HCCA/ANI et HCCA/3AP conduisaient toutes les deux à l'obtention de spectres de qualité mais néanmoins différant par la gamme des m/z accessibles. Ces deux matrices ont donc été comparées pour l'analyse après digestion enzymatique *in situ* sur tissu. Dans ces expériences, la digestion a été réalisée avec une solution de trypsin à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dans l' H_2O , puis deux régions symétriques d'une coupe de cerveau de rat ont été micro-déposées avec les deux matrices ioniques (**Figure 89**).

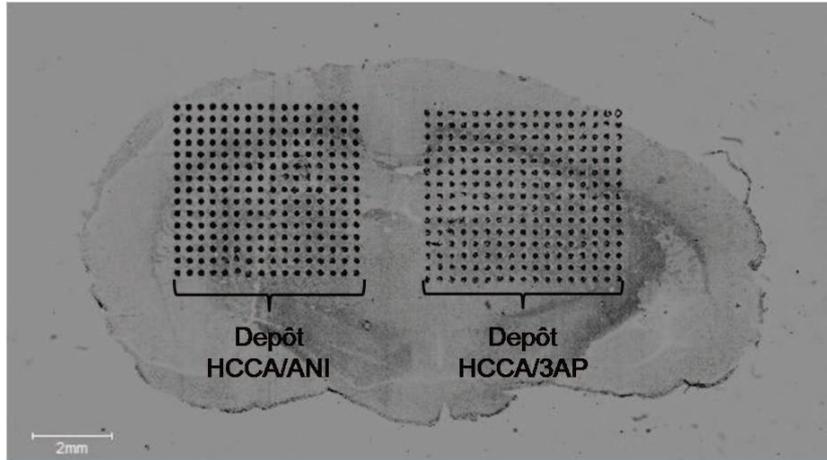


Figure 89 : Image optique d'une coupe de cerveau après digestion trypsique dans l'eau pure puis dépôt de la matrice HCCA/ANI (à gauche) et HCCA/3AP (à droite).

Les spectres enregistrés pour ces deux expériences dans la région du corps calleux sont présentés **Figure 90**. Premièrement, il faut noter qu'une cristallisation homogène a été observée pour les deux matrices après digestion. La matrice HCCA/3AP présente des pics d'une grande intensité jusqu'à des m/z de 5000 alors que sur les spectres obtenus avec la matrice HCCA/ANI des pics d'une bonne intensité allant jusqu'à $m/z \sim 3000$ sont observés. Bien que le rapport signal/bruit de ces deux matrices soit très bon, l'intensité globale des spectres est nettement supérieure avec la matrice HCCA/3AP quelque soit la localisation sur la coupe de tissu. Ceci est un très bon exemple de l'utilisation des matrices ioniques qui en changeant la base organique associée à la matrice permet d'obtenir des spectres ayant des caractéristiques différentes. Dans le cas présent, la différence observée ne semble pas venir de l'extraction des analytes de la coupe puisque ces deux matrices sont solubilisées dans le même mélange. Le phénomène observé, pourrait provenir, en revanche, d'une différence d'incorporation des analytes dans les cristaux de matrice qui dans le cas de la matrice HCCA/3AP permettrait de détecter des peptides de plus haute masse.

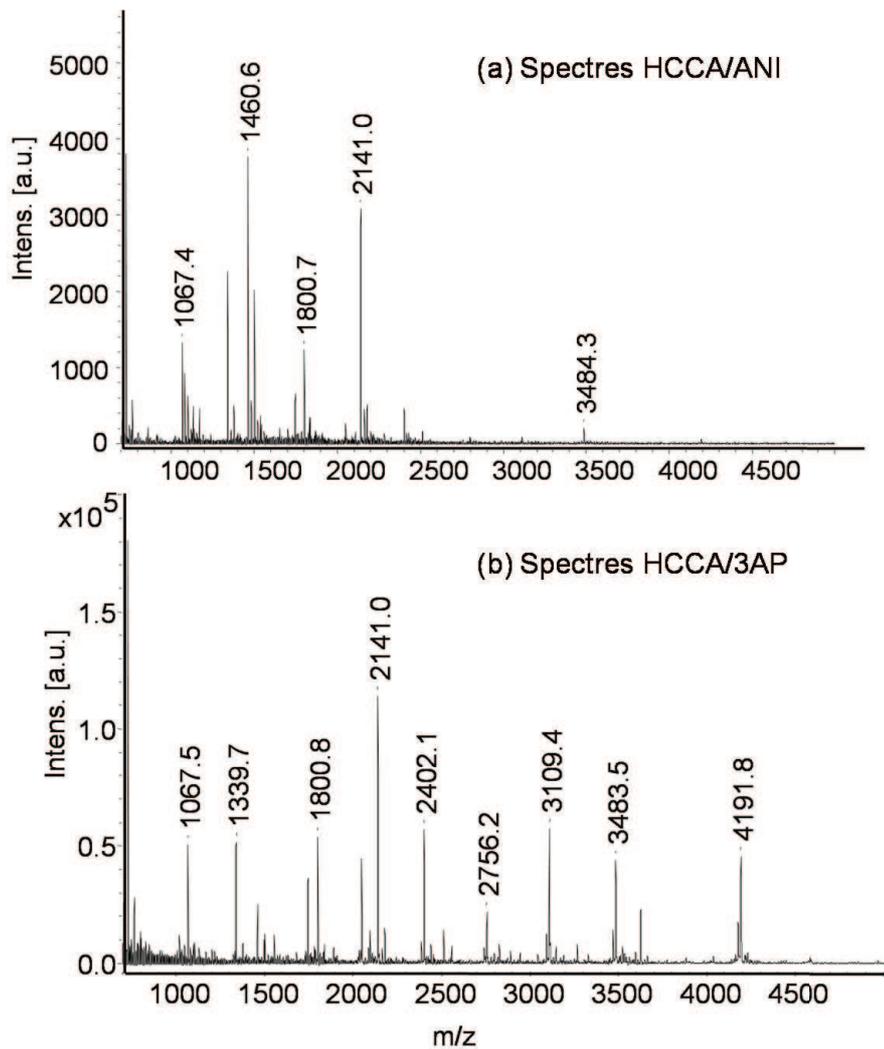


Figure 90 : Spectres de masse obtenus en mode réflecteur positif après digestion trypsique dans l'eau pure sur coupes de cerveau avec la matrice (a) HCCA/ANI et (b) HCCA/3AP.

L'utilisation de trypsine à 25 µg/mL reprise dans de l'eau pure et de la matrice HCCA/3AP semble être une procédure très efficace de digestion enzymatique directement sur tissus pour l'identification de protéines sur coupe de tissu frais. En ce qui concerne les tissus fixés et inclus en paraffine (tissus FFPE) la procédure mise en jeu sera exactement la même. A la différence des tissus frais, les tissus FFPE ne permettent pas l'analyse directe des protéines natives. En effet, la fixation au paraformaldéhyde entraîne la réticulation des protéines entre elles par création de ponts méthylènes. Il devient donc impossible de détecter ces protéines puisqu'elles sont toutes liées les unes aux autres par des liaisons covalentes. Il a été démontré que l'utilisation d'une enzyme telle que la trypsine permettait de générer des peptides issus des protéines réticulées. Ces peptides « libres » peuvent ensuite être analysés et

fragmentés pour identifier la protéine correspondante par le développement d'une stratégie d'imagerie MALDI en mode « Bottom-Up »^{102, 104, 173}.

Quelque soit le mode de conservation des tissus (frais ou FFPE), la digestion enzymatique *in situ* permet à la fois de localiser les protéines sur une coupe de tissu mais également de les identifier par MS/MS.

3.3.2. Imagerie MALDI et digestion enzymatique

Les premières expériences de digestion enzymatique couplées à l'imagerie ont été réalisées sur une coupe de cerveau de rat. La trypsine a été déposée sur l'ensemble de la coupe par micro-dépôts de sorte que les dépôts soient séparés de 250 μm centre à centre. La matrice HCCA/ANI est choisie comme matrice pour l'analyse et déposée suivant le même quadrillage de dépôt que celui employé pour la digestion. A partir de la coupe de cerveau digérée, plusieurs centaines de peptides sont détectés. Les profils peptidiques sont différents suivant la position du dépôt sur le tissu reflétant ainsi les différences de régulation des protéines dépendamment du phénotype cellulaire analysé. La **Figure 91** présente deux ions ayant une répartition bien spécifique dans la section du cerveau de rat : l'ion m/z 1339.23 dans le *corpus callosum* et l'ion m/z 1701.94 dans le *noyau thalamique*. Pour ces deux ions, les images moléculaires MALDI ont pu être reconstruites (**Figure 91b**). Les images permettent de mettre en évidence que ces deux ions présentent une distribution opposée. Les ions peuvent ensuite être sélectionnés afin de déterminer leur séquence en réalisant des études en mode MS/MS afin de remonter vers la séquence de la protéine correspondante.

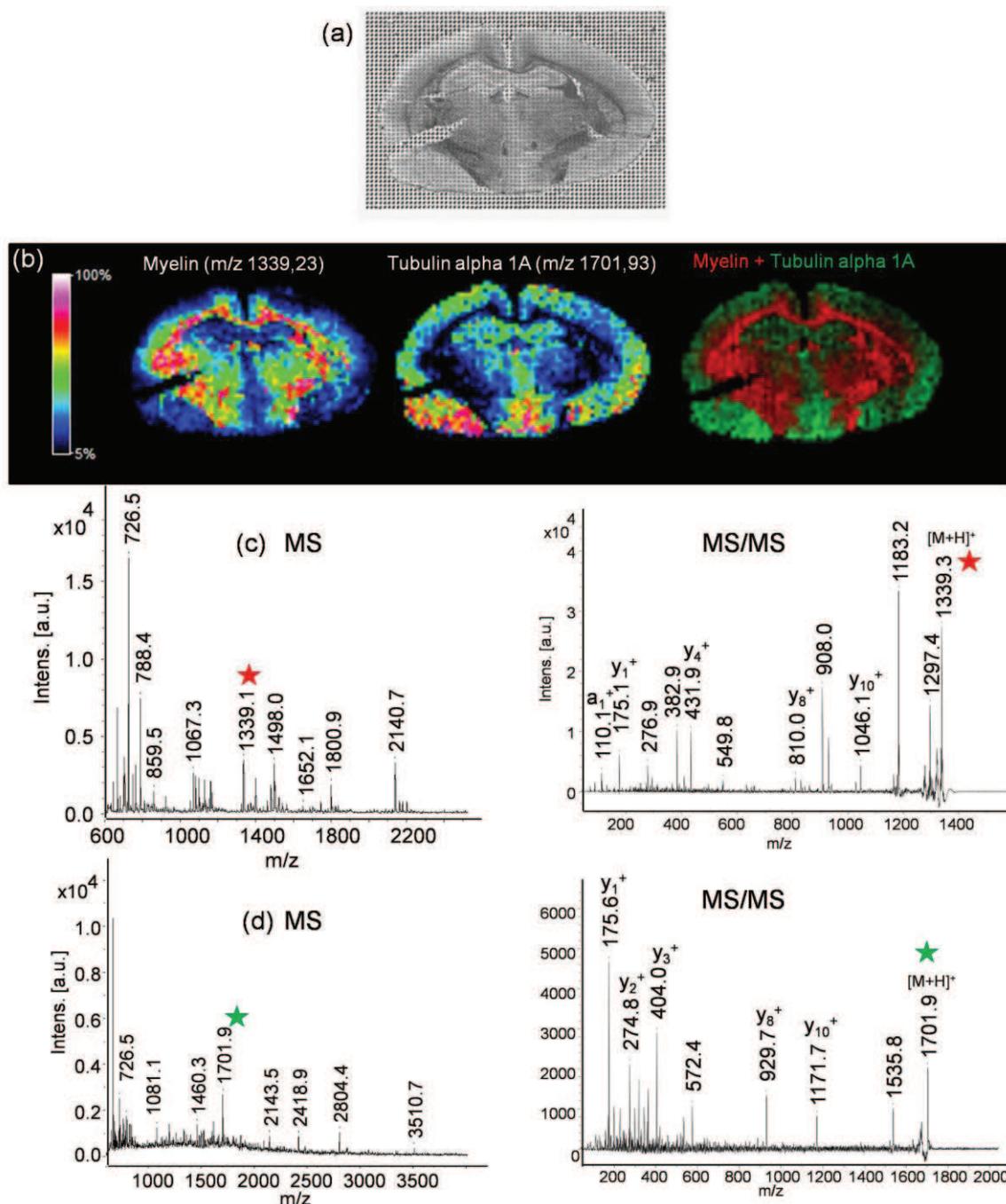


Figure 91 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat après micro-dépôts de trypsine et de la matrice HCCA/ANI. (b) Images moléculaires MALDI des ions m/z 1339.2 et m/z 1701.9. (c-d) Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif dans deux régions différentes du cerveau et spectres MS/MS des ions m/z 1339.3 et 1701.9.

Le spectre MS² de l'ion m/z 1339.3 présente quelques ions de séquence et après interrogation en banques de données, le peptide correspondant a été identifié comme étant un fragment de la *Myelin Basic Protéin* (MBP) avec un faible score d'identification (score 42, Expect 0.0015) pour la séquence HRDTGILDSIGR. L'attribution des ions sur les spectres

MS/MS après identification montre que certains ions ne sont pas attribués. Pour ce peptide, avec les données MS/MS acquises du tissu, il est clair que le séquençage *de novo* serait très difficile. Des observations identiques sont relevées à partir du spectre MS/MS enregistré pour l'ion à m/z 1701.9. Pour celui-ci, beaucoup d'ions fragments sont observés dans les bas m/z et peu dans les plus hauts m/z. Ainsi, le manque d'informations dans les plus hauts rapports m/z rend difficile l'identification du peptide et donc de la protéine correspondante. L'interrogation des banques de données, permet d'identifier la *Tubuline α 1a* avec une identification assez faible (score 58, Expect 6.2×10^{-5}) pour la séquence VFVDLEPTVIDEVR. L'attribution des ions après identification montre que la série d'ions y^+ est partiellement observée mais que beaucoup d'autres ions fragments incluant des ions de séquence, des ions immoniums ou des fragments internes complexifient le spectre.

Idéalement, il serait intéressant de pouvoir combiner les informations issues de la fragmentation directe de protéines par ISD avec les données obtenues par fragmentation des peptides issus de la digestion enzymatique ; et ce afin de pouvoir disposer d'une identification particulièrement fiable. L'idée de faire l'analyse directe des protéines sur coupe puis de retirer la matrice afin d'effectuer la digestion enzymatique *in situ* a donc été envisagée. Pour cela, la matrice ionique SA/ANI a été déposée sur la moitié d'une coupe de cerveau de rat par micro-dépôts (**Figure 92a**). Il est alors possible, après acquisition des données, de reconstruire l'image de la distribution des protéines natives. Il serait possible également de réaliser de la pseudo-MS³ dans ces conditions pour obtenir des informations sur la structure des protéines. Les images MALDI de la distribution de quelques protéines sont présentées **Figure 92b**. Comme décrit précédemment, il est possible grâce à des outils d'analyse statistique tels que l'analyse PCA, de mettre en évidence certains m/z qui seraient différentiellement régulés à l'intérieur même du tissu ou entre deux échantillons différents. La mise en évidence des variations dues à un environnement différent ou qui pourrait être induites par une pathologie peut être effectuée par hiérarchisation. Comme décrit dans la partie 2.3.2. Avec tous ces outils, la mise en évidence de biomarqueurs potentiels ou de régions différentes du tissu nécessite l'identification des protéines à partir de la même coupe pour éviter d'introduire un biais dans l'analyse en effectuant cette opération sur une coupe adjacente.

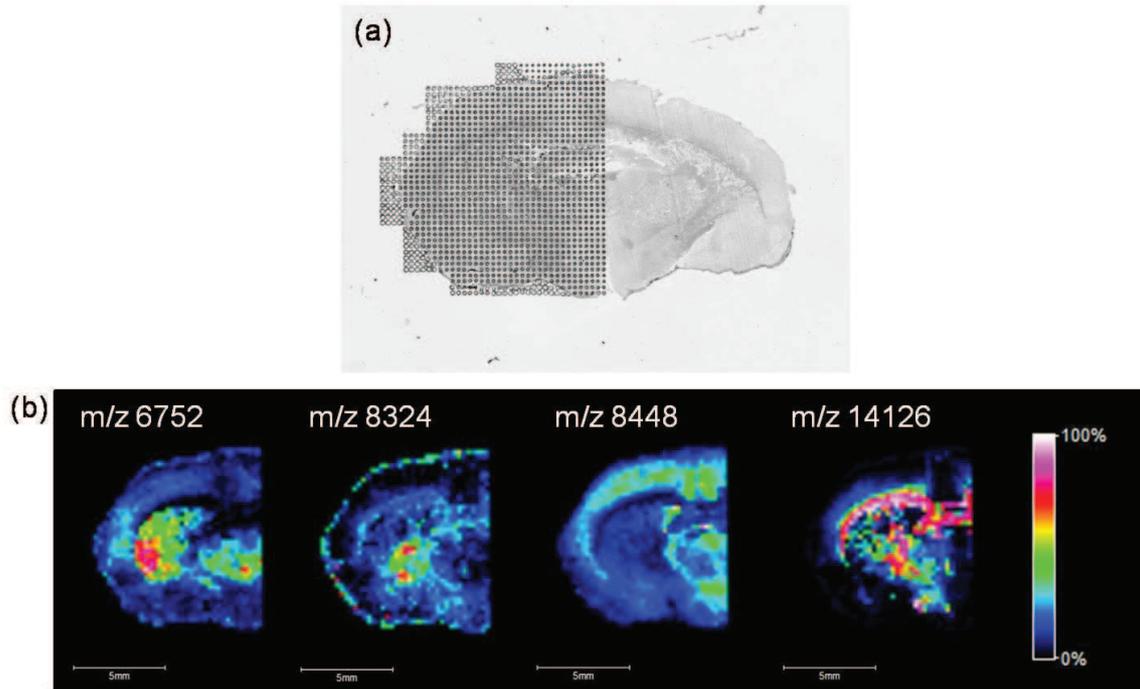


Figure 92 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de la matrice SA/ANI. (b) Images MALDI des ions m/z 6752, m/z 8324, m/z 8448 et m/z 14126. Résolution des images : 250 μm .

Il donc nécessaire de pouvoir retirer la matrice de manière à ce que les protéines contenues dans la coupe ne soient pas délocalisées. Il est donc impossible d'utiliser une solution d'AcN/TFA 0.1%. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe en revanche divers solvants permettant de laver les coupes sans entraîner la délocalisation des protéines. Ces solvants ont donc été utilisés et ont permis de retirer la matrice. Il ne reste plus alors qu'à redéfinir une zone d'intérêt pour la digestion basée sur le quadrillage des dépôts réalisés avec la matrice SA/ANI (**Figure 93a**). Après dépôt de la trypsine sur les aires sélectionnées, la matrice HCCA/3AP est alors déposée (**Figure 93b**). Bien entendu, il est possible de sélectionner l'ensemble de la coupe pour faire l'image des peptides de digestion. Quelque soit la stratégie suivie, chaque ion correspondant à un peptide peut ensuite être sélectionné pour être fragmenté afin d'identifier la protéine. **Figure 93c** est présentée l'image MALDI de la distribution de l'ion m/z 1339.6 dans les aires sélectionnées pour la digestion enzymatique *in situ*. Cet ion qui présente une distribution bien spécifique peut ensuite être soumis à une analyse en mode MS/MS (**Figure 93e**) afin de déterminer la protéine correspondante. Cet ion, déjà identifié précédemment correspond à un fragment de la *Myelin Basic Protéin* (MBP) et ayant pour séquence HRDTGILDSIGR. Il convient de noter que cette stratégie a été rendue

possible grâce à la modification géométrique réalisée sur l'instrument (diminution de la distance entre le tissu de la tête piézoélectrique) et permettant par conséquent d'améliorer la précision des dépôts.

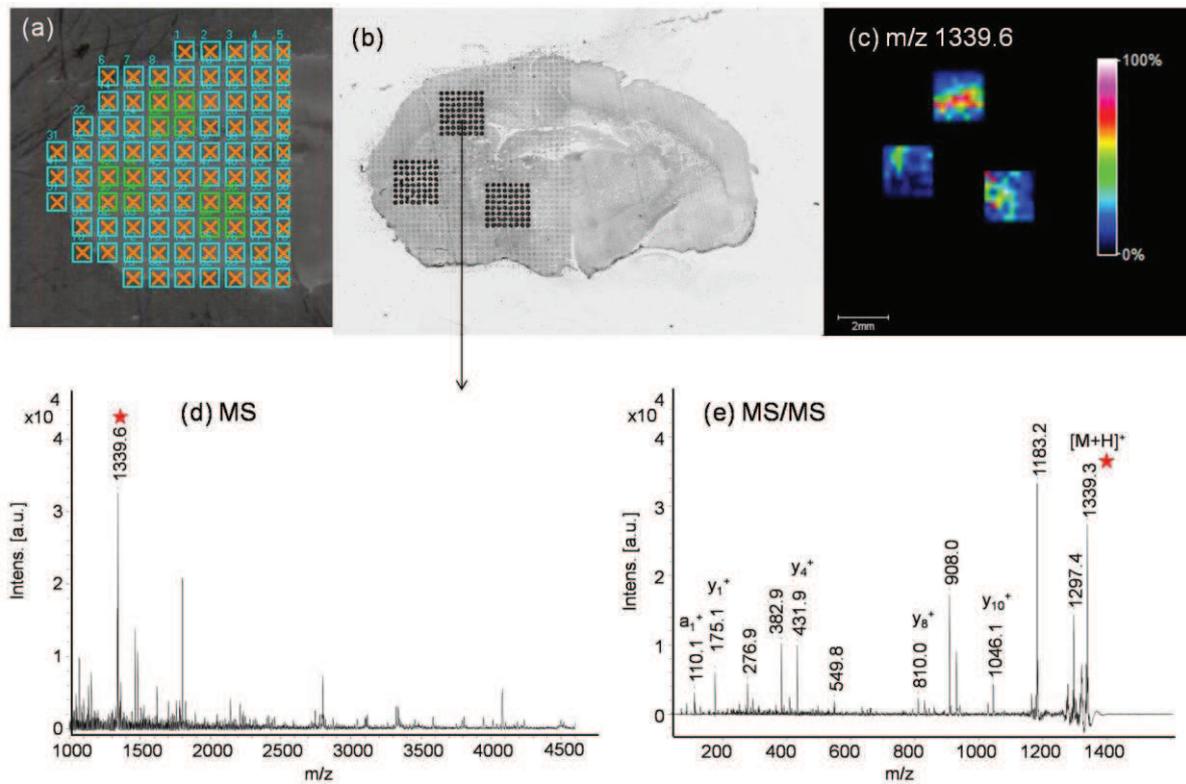


Figure 93 : (a) Image optique des aires sélectionnées dans le cerveau de rat pour déposer la trypsiine. (b) Image optique de la coupe de cerveau de rat après avoir retiré la matrice SA/ANI et après dépôts de la trypsiine et de la matrice HCCA/3AP. (c) Image MALDI de la distribution de l'ion m/z 1339.6. (d) Spectre de masse enregistré en mode réflecteur positif à partir de la région définie en haut du cerveau. (e) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.6.

La stratégie de digestion enzymatique *in situ* présentée précédemment peut donc être optimisée en réalisant sur la même coupe les expériences d'imagerie de protéines suivies d'une digestion enzymatique pour l'identification. Une étape supplémentaire avant la digestion *in situ* pourrait être ajoutée et consisterait à réaliser une image des ions ISD afin d'améliorer l'identification des protéines. 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 par alors de remonter à l'identification de la protéine correspondante. Ceci s'explique souvent par la complexité ou le manque

d'informations des spectres MS/MS pour certains peptides issus de la digestion trypsique *in situ*. La **Figure 94** présente un exemple de peptides de digestion qui après fragmentation ne permettent pas d'identifier clairement la protéine correspondante. Dans le cas présent, les spectres souffrent d'un défaut d'information par manque d'ions fragments. 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 banques de données pour l'identification des protéines (voir partie 4). Néanmoins, à la différence de l'ISD, cette stratégie peut être utilisée sur des tissus FFPE ce qui permet d'accéder aux banques hospitalières.

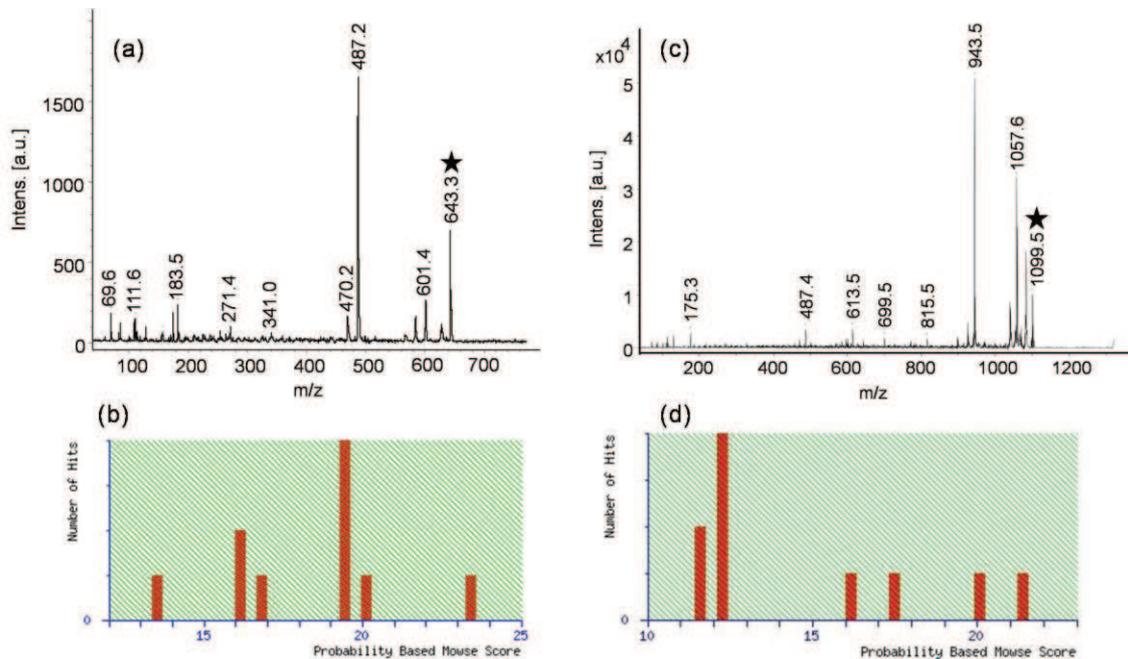


Figure 94 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 643.3 et (c) de l'ion m/z 1099.5. (c-d) Résultats obtenus après interrogation en banque de données pour les deux ions.

3.3.3. Applications de la digestion enzymatique *in situ*

La stratégie d'identification en mode « Bottom-Up » développée a été utilisée dans une étude clinique portant sur la maladie de Parkinson. La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle se caractérise par une dégénérescence des neurones dopaminergiques. Il existe de nombreux symptômes concernant des dysfonctionnements moteurs incluant le déséquilibre postural, la lenteur des mouvements,

la rigidité et l'impossibilité de contrôler les tremblements. Plusieurs biomarqueurs ont pu être identifiés par approches 2D sur des modèles humains et animaux (**Tableau 7**).

model	proteomic approach	protein	modification
Parkin -/-	2D Gel	Pyruvate Deshydrogenase	Down-regulated
		NADH Ubiquinone Oxyreductase 24 kDa	Up-regulated
		NADH Ubiquinone Oxyreductase 30 kDa	Down-regulated
		Cytochrome c Oxydase	Down-regulated
		Peroxioredoxin 1	Down-regulated
		Peroxioredoxin 2	Down-regulated
		Peroxioredoxin 6	Down-regulated
		Lactoylglutathione Lyase	Down-regulated
		Profilin	Down-regulated
		Vacuolar Protein Sorting 29	Down-regulated
		α -Crystallin Chain b	Down-regulated
		Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1	Down-regulated
		Lasp-1	Down-regulated
		α -enolase	Up-regulated
6-OHDA	MDA*	β Actin	Down-regulated
		Calmodulin	Down-regulated
		Cytochrome C	Down-regulated
		Cytochrome C oxidase	Down-regulated
Human	Blood 2D Gel	Ubiquitin	Up-regulated
		Serum Creatine Kinase	Up-regulated
		Neurofilament Triplet L	Down-regulated
		Neurofilament Triplet M	Down-regulated
		Peroxioredoxin 2	Up-regulated
		Mitochondrial Complex III	Up-regulated
		ATP Synthase D chain	Up-regulated
		Profilin	Up-regulated
		L type Calcium Chanel d Subunit	Up-regulated
		Fattu Acid Binding Protein	Up-regulated
MTP G93 A (gene SOD1)	MDA 2D Gel	PEP 19	Up-regulated
		α -Enolase	Down-regulated
		HSP 25	Up-regulated
		HSP 27	Up-regulated
		Phosphatidylinositol Transger Protein a	Up-regulated
		Apolipoprotein E	Up-regulated
Ferritin Heavy Chain	Up-regulated		

* MDA: MALDI Direct Analysis MS.

Tableau 7 : Comparaison des biomarqueurs identifiés par différentes approches sur différents modèles ¹⁷³.

Les premières analyses directes sur coupe appliquées au modèle Parkinson 6-OHDA (6-hydroxydopamine) ont été réalisées par le groupe de Per André ¹⁷². Dans cette étude, il avait été démontré que des protéines telles que la calmoduline, le cytochrome C et le cytochrome C oxydase sont sous-régulées à la différence de l'ubiquitine qui est sur-régulée. Ici, les études ont été réalisées sur des modèles animaux de la maladie, i.e. des modèles rats injectés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Les cerveaux de rat fournis étaient conservés sous forme de tissus FFPE. Ces échantillons ont donc nécessité l'utilisation de digestions enzymatiques par l'emploi des stratégies de type imagerie MALDI en mode « Bottom-Up ». Deux approches ont été employées afin de pouvoir mettre en évidence de nouveaux

biomarqueurs. La première a consisté à réaliser la digestion enzymatique *in situ* à l'aide d'une micropipette puis à extraire les fragments de digestion de la coupe. L'extrait est alors ensuite analysé par nanoLC-ESI/IT MS et MS/MS. Les analyses différentielles réalisées par cette approche sur les animaux 6-OHDA vs. les animaux témoins ont permis de mettre en évidence des protéines régulées entre les deux conditions. La seconde approche consistait à comparer les résultats de l'analyse « shotgun » classique avec l'analyse directe des coupes de tissu permettant après digestion *in situ* d'identifier les protéines. Les résultats obtenus en approche shotgun classique permettent d'identifier plus d'une centaine de protéines parmi lesquelles une dizaine sont trouvées comme étant fortement régulées entre les animaux 6-OHDA et témoins, certaines étant sous-régulées et d'autres sur-régulées. Il est intéressant de constater que les régulations obtenues sont en accord avec celles précédemment trouvées chez les mêmes modèles animaux mais par d'autres approches i.e. génomiques, transcriptomiques, protéomiques classiques. En revanche, certaines des protéines identifiées n'ont jamais été mises en évidence chez ces modèles. C'est en particulier le cas des protéines CRMP1 et CRMP2 de la famille des Collapsin Response Mediator Protein. Ces protéines sont particulièrement intéressantes car elles sont connues pour être impliquées dans la guidance axonale. En particulier, CRMP2, qui si elle n'a pas été décrite dans Parkinson a été décrite dans Alzheimer. Ainsi, nous avons cherché à obtenir la localisation de cette protéine par imagerie MALDI. Pour cela, le tissu FFPE a été soumis à digestion enzymatique *in situ* par micro-dépôt de trypsine. La matrice HCCA/ANI a ensuite été utilisée pour ces expériences. L'ensemble des spots furent ensuite analysés en mode réflecteur positif afin de reconstruire la répartition des fragments de digestion de CRMP2. Après acquisition, les fragments de digestion de la protéine CRMP2 sont recherchés sur les spectres. Ces ions sont soumis à des analyses MS/MS pour confirmer que les pics mis en évidence correspondent bien à des fragments de CRMP2. Les images de la distribution de certains de ces peptides sont présentées **Figure 95**.

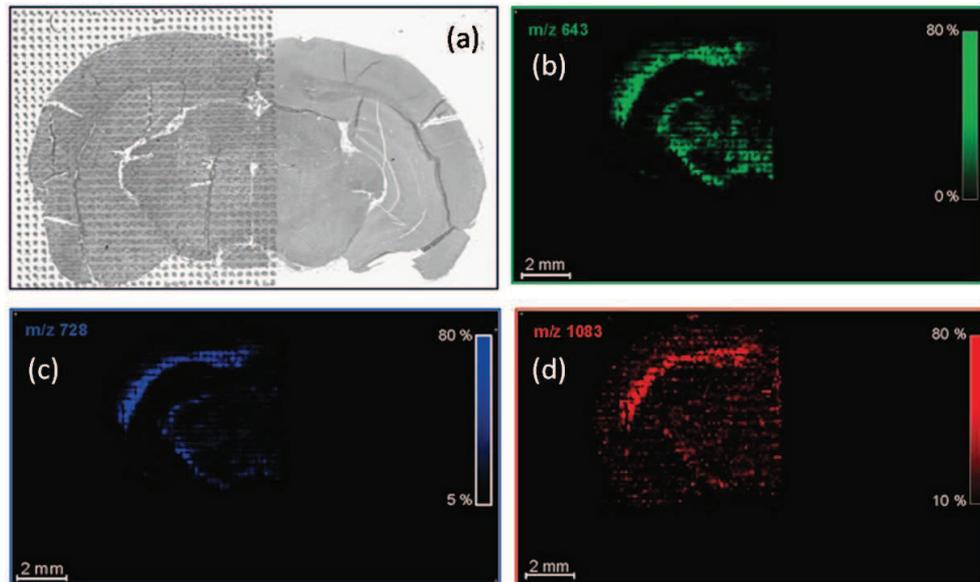


Figure 95 : (a) Image optique d'une coupe de cerveau de rat FFPE enrobé depuis 9ans après dépôt de la trypsine et de la matrice HCCA/ANI. Images moléculaires MALDI des ions (b) m/z 643, (c) m/z 728 et (d) m/z 1083.

Les ions détectés correspondent aux fragments de digestion de CRMP2. Comme attendu, ces ions présentent donc la même localisation dans la coupe de cerveau de rat. La localisation obtenue est très spécifique et en particulier dans la région du corps calleux. Dans la littérature, il a été montré que la protéine CRMP2 n'est normalement pas présente dans la région du corps calleux mais est plutôt présente dans les dendrites de neurones spécifiques³²⁵. La région du corps calleux dans le cerveau étant une région connue pour être impliquée dans les maladies neurodégénératives³²⁶, il n'est donc pas surprenant de trouver CRMP2 dans cette région du cerveau de rat traité au 6-OHDA.

Ainsi, l'utilisation de la stratégie bottom-up directement sur coupe de tissu, a permis à partir de tissus FFPE conservés depuis 9 ans de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs tels que CRMP2 impliqués dans la maladie de Parkinson. De plus, cette stratégie confirme le grand intérêt d'utiliser des tissus FFPE afin de pouvoir accéder aux banques hospitalières pour la recherche de biomarqueurs ou la validation dans le cadre d'études cliniques.

3.4. Conclusion

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 » par l'utilisation de l'ISD reste encore difficile, bien qu'elle mérite d'être améliorée, et prometteuse pour l'obtention d'informations de séquences directement à partir des protéines intactes. Cette voie mérite d'être approfondie et permettrait l'identification directe des protéines avec un gain de temps assez conséquent. En ce qui concerne la stratégie « Bottom-Up » par micro-digestion *in situ*, cette approche présente des résultats très satisfaisants puisqu'elle permet d'une part de réaliser l'image de protéines à partir des fragments peptidiques de digestion, y compris certaines protéines ne pouvant habituellement pas être observées, mais d'autre part de pouvoir identifier ces protéines par une analyse en mode MS/MS des peptides. De plus, cette stratégie est la seule qui puisse réellement permettre l'analyse de tissus FFPE qui permettrait d'orienter les analyses pour accéder aux banques hospitalières.

Cependant, l'identification des protéines reste parfois difficile, voir impossible dans certains cas. En effet, de nombreux ions fragments de différentes natures sont observés dans les spectres MS/MS. Peu de séquences entières sont présentes ce qui rend le séquençage *de novo* extrêmement complexe voir impossible. De plus, aucune séparation des protéines n'étant réalisée il n'est pas possible d'avoir recours au PMF pour effectuer l'identification des protéines en banque et celle-ci n'est basée que sur l'utilisation des différents ions de digestion après MS/MS. Par conséquent, il est nécessaire d'obtenir des spectres de fragmentations d'une grande qualité afin de pouvoir déterminer la séquence de peptide de façon très précise et d'améliorer l'identification des protéines.

Une stratégie pour surmonter ce problème est l'utilisation d'une procédure de dérivation N-terminale des peptides qui permettrait d'orienter la fragmentation vers une série d'ions majoritaire. Il sera alors plus facile de remonter à la séquence du peptide et par conséquent, l'interrogation en banques de données fournira des identifications de protéines avec un plus haut degré de confiance.

4. Dérivations N-Terminales des peptides

4.1. Principe

La stratégie d'imagerie MALDI en mode « Bottom-Up » pour identifier les protéines directement sur coupe de tissu est, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, basée sur la fragmentation des peptides issus de la digestion du mélange complexe de protéines présentes localement en un point du tissu. Cette identification ne pouvant pas être effectuée à partir du PMF de la protéine recherchée, puisque le PMF généré, représente l'ensemble des protéines digérées localement, le spectre de fragmentation du peptide sélectionné doit permettre une identification sans ambiguïté de la protéine. Cependant, les analyses MS/MS directement sur coupe de tissu semblent être plus difficiles à effectuer que sur une cible MALDI classique. Il est probable, d'une part, que la coupe présente sous la matrice puisse absorber une partie de l'énergie apportée par l'irradiation conduisant en un dépôt d'énergie interne plus faible pour les molécules désorbées. D'autre part, la nature isolante du tissu et l'irrégularité de l'épaisseur de la coupe rendent plus difficile la réalisation d'une expérience MS/MS en particulier sur un système MALDI-TOF axial. De plus, les ions fragments générés sur ces systèmes sont variés. Ainsi, le séquençage des peptides peut être très difficile à établir par la présence de ces nombreux ions fragments incluant des ions immoniums³²⁷, des fragments internes, des ions N-terminaux^{328, 329} et des ions C-terminaux³³⁰. La nomenclature des ions fragments issus de peptides a été proposée par Roepstorff³¹² et est rappelée **Figure 96**.

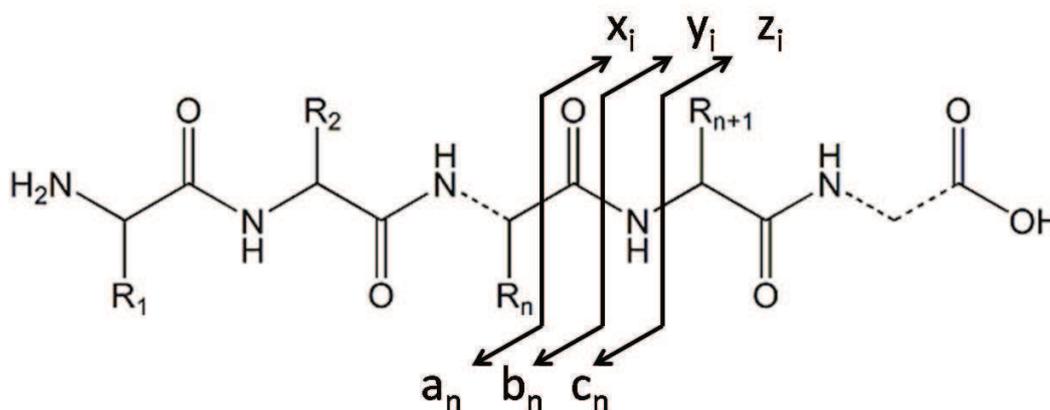


Figure 96 : Nomenclature des ions fragments proposée par Roepstorff.

Afin de simplifier l'interprétation des spectres de fragmentation, de nombreux efforts ont été entrepris pour augmenter le rendement de fragmentation ou pour orienter les fragmentations vers une série d'ion spécifique. Dans cette optique, les dérivations chimiques du côté C ou N-terminal des peptides par addition d'un groupement sont une bonne alternative. Ces réactions sont couramment nommées dérivations chimiques. L'addition d'une charge positive ou négative s'est révélée, entre autre, une approche intéressante³³¹. Il est ainsi possible de simplifier les spectres de fragmentation et donc leur interprétation par orientation de la fragmentation. De part la plus grande réactivité de l'amine primaire due au caractère nucléophile de la fonction, les dérivations chimiques sont plus faciles à réaliser du côté N-terminal. Notamment, l'addition d'une charge négative permanente du côté N-terminal de peptides issus de digestion trypsique de protéines s'est avérée très avantageuse. Keough et coll. ont montré que l'addition d'un groupement chargé négativement sur la partie N-terminale de peptides de digestion trypsique tels que le chlorosulfonylacetyl chloride^{332, 333} ou le 2-sulfobenzoic acid cyclic anhydre^{334, 335} permettait d'orienter les fragmentations vers la série d'ions y_n^+ , rendant de ce fait le séquençage *de novo* des peptides possible. Plus récemment, la méthode a été améliorée par utilisation de l'acide 3-sulfopropionique NHS Ester³³⁶, ce réactif étant utilisable en milieu aqueux. La réaction de dérivation présente également l'avantage d'être très rapide. Le réactif a été commercialisé mais reste malgré tout assez onéreux. D'autres dérivatifs ont également été étudiés. Il est possible de citer, parmi ceux qui ont donné des résultats intéressants, le 4-sulfophenyl isothiocyanate (4-SPITC)³³⁷⁻³³⁹ (**Figure 97a**). Cette dérivation permet aux peptides d'être compatibles avec l'HPLC³⁴⁰ et la quantification avec un réactif marqué au ^{13}C ³⁴¹. Cette dérivation est assez simple à réaliser et présente un très bon rendement de conversion. Cependant, il faut noter que le pic de base détecté dans les spectres MS/MS correspond généralement à la perte du groupement dérivatif. Ce phénomène conduit à une perte sur l'intensité des ions fragments de type y_n^+ pouvant entraîner l'obtention d'une série y_n^+ incomplète. Plus récemment, un autre réactif, l'acide 3-sulfobenzoïque succinimidyl ester (3-SBASE) compatible avec le milieu aqueux³⁴² (**Figure 97b**) a été développé. L'utilisation du 3-SBASE permet généralement d'obtenir une série y_n^+ complète et intense puisque dans ce cas le réactif n'est pas perdu lors de la fragmentation.

Des réactifs permettant l'apport d'une charge positive permanente du côté N-terminal ont également été proposés³³¹. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le (N-Succinimidylloxycarbonylmethyl)tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) (**Figure 97c**) introduit par Huang et al.³⁴³ et utilisé avec succès pour l'identification de séquences peptidiques. Ce réactif présente la particularité d'orienter les fragmentations vers

une série majoritaire d'ions a_n^+ ou b_n^+ permettant de simplifier grandement les spectres MS/MS³⁴⁴. De plus, ce réactif présente l'avantage d'être indépendant de la présence en C-terminal d'un résidu basique. Il est donc possible de travailler sur tous les peptides issus ou non d'une digestion et ce quelque soit cette digestion³⁴⁵. Le TMPP permet donc de réaliser également le séquençage de peptides endogènes.

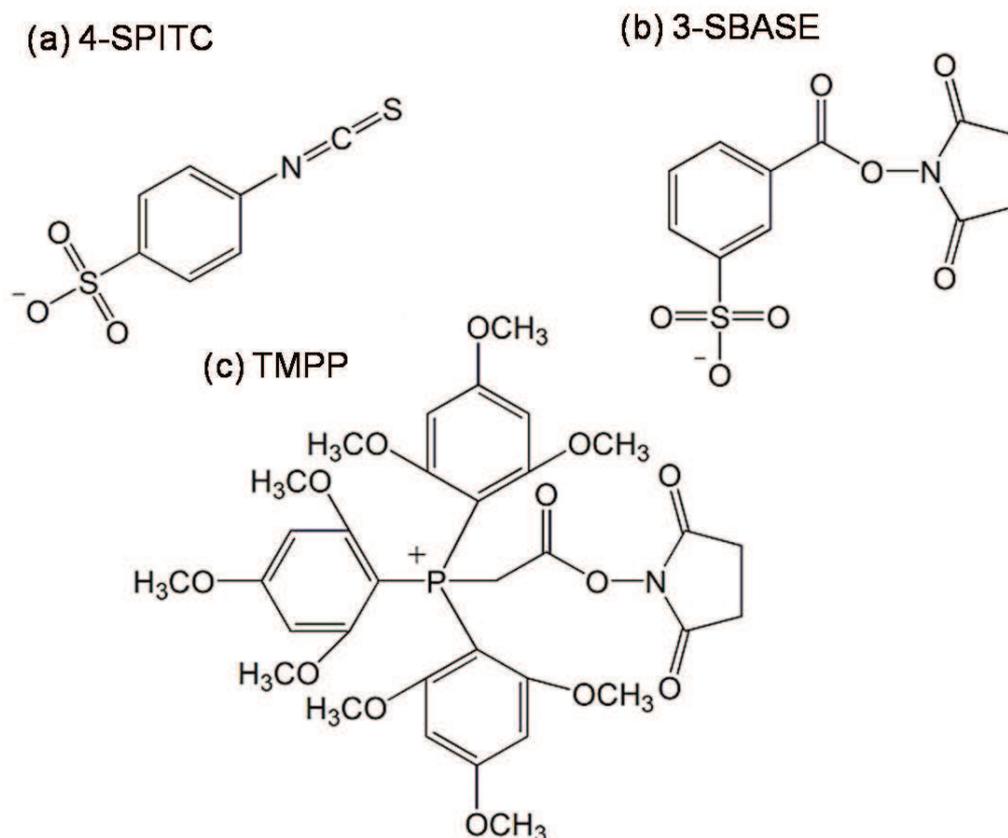


Figure 97 : Formules semi-développées des réactifs (a) 4-SPITC, (b) 3-SBASE et (c) TMPP.

Ainsi, les dérivations chimiques N-terminales sont une solution intéressante pour simplifier les spectres MS/MS en orientant la fragmentation vers une série d'ions spécifique. Appliquée en solution, les dérivations ont ainsi permis une identification plus fiable pour les identifications à partir de banques de données mais également l'identification *de novo* manuelle ou assistée par outils bioinformatiques. Nous avons vu, au chapitre précédent que l'une des limitations à l'identification par les stratégies d'imagerie MALDI en mode « Bottom-Up » était liée à la difficulté d'interprétation des données. Ainsi, nous avons choisi d'étudier et de développer les approches de dérivation N-terminales *in situ* sur les tissus. Dans la stratégie « Bottom-Up » employée, ces dérivations seront réalisées après l'étape de

digestion in situ, préalablement au dépôt de la matrice. Idéalement, les dérivations doivent être pratiquées en automatique à l'aide des robots de dépôt pour réaliser la réaction à petite échelle permettant ainsi de conserver la localisation des espèces dans la coupe. Différentes dérivations ont été étudiées pour l'utilisation en imagerie MALDI comme présenté ci-après.

4.2. Dérivations N-Terminales par Addition d'une charge négative

4.2.1. Dérivation N-Terminale avec le 4-SPITC

Le 4-SPITC a été amplement décrit dans la littérature pour les analyses en solution^{337-339, 340, 341}. La dérivation au 4-SPITC est une réaction facile et rapide, qui donne des résultats intéressants en terme d'orientation de fragmentation, même si la perte du groupement dérivatif est observée durant la fragmentation. Ce réactif est donc un candidat intéressant pour les dérivations N-terminales sur tissus. Dans un premier temps, la dérivation a été testée sur un peptide modèle de séquence ASHLGLAR. Ce peptide par la présence d'une arginine en position C-terminale permet de mimer un peptide généré à partir d'une digestion trypsique de protéine. La réaction de dérivation avec le 4-SPITC se fait à 55°C. Néanmoins, il n'est pas aisé de réaliser une incubation à 55°C à partir d'une coupe de tissu. Nous avons donc testé la dérivation au 4-SPITC à température ambiante et à 55°C. Les résultats montrent qu'aucune modification chimique du peptide n'est observée à température ambiante. A 55°C, en revanche, la réaction semble totale comme présenté **Figure 98b**. Le pic correspondant au peptide natif observé à m/z 824 subit un déplacement de 215 u. pour être observé à m/z 1039 comme attendu par addition du groupement 4-SPITC au peptide ASHLGLAR. Le peptide natif (m/z 824) (**Figure 98a**) ainsi que le peptide dérivé (m/z 1039) (**Figure 98b**) sont ensuite soumis à une analyse en mode MS/MS. Les **Figures 98c et 98d** présentent les spectres MS/MS obtenus pour ces deux ions. Le spectre MS/MS de l'ion correspondant au peptide natif présente de nombreux ions fragments de la série bi^+ , quelques ions yi^+ ainsi que d'autres types d'ions fragments dans une moindre mesure. Les différents types d'ions présents rendent plus difficile la détermination de la séquence peptidique et notamment en mode *de novo*. En revanche, le spectre MS/MS du peptide dérivé montre la présence d'une série complète d'ions fragments yi^+ . Il est, dans ce cas, très facile de remonter à la séquence du peptide. Le séquençage *de novo* est alors possible et l'identification par interrogation des banques de données est plus fiable (score plus élevé). Cependant, il convient de noter que le pic de base dans le spectre MS/MS du peptide dérivé provient de la perte du 4-SPITC. Les ions yi^+ sont

donc détectés avec une intensité moindre. Ceci est un inconvénient pour des analyses biologiques où la quantité des molécules d'intérêt est souvent très faible.

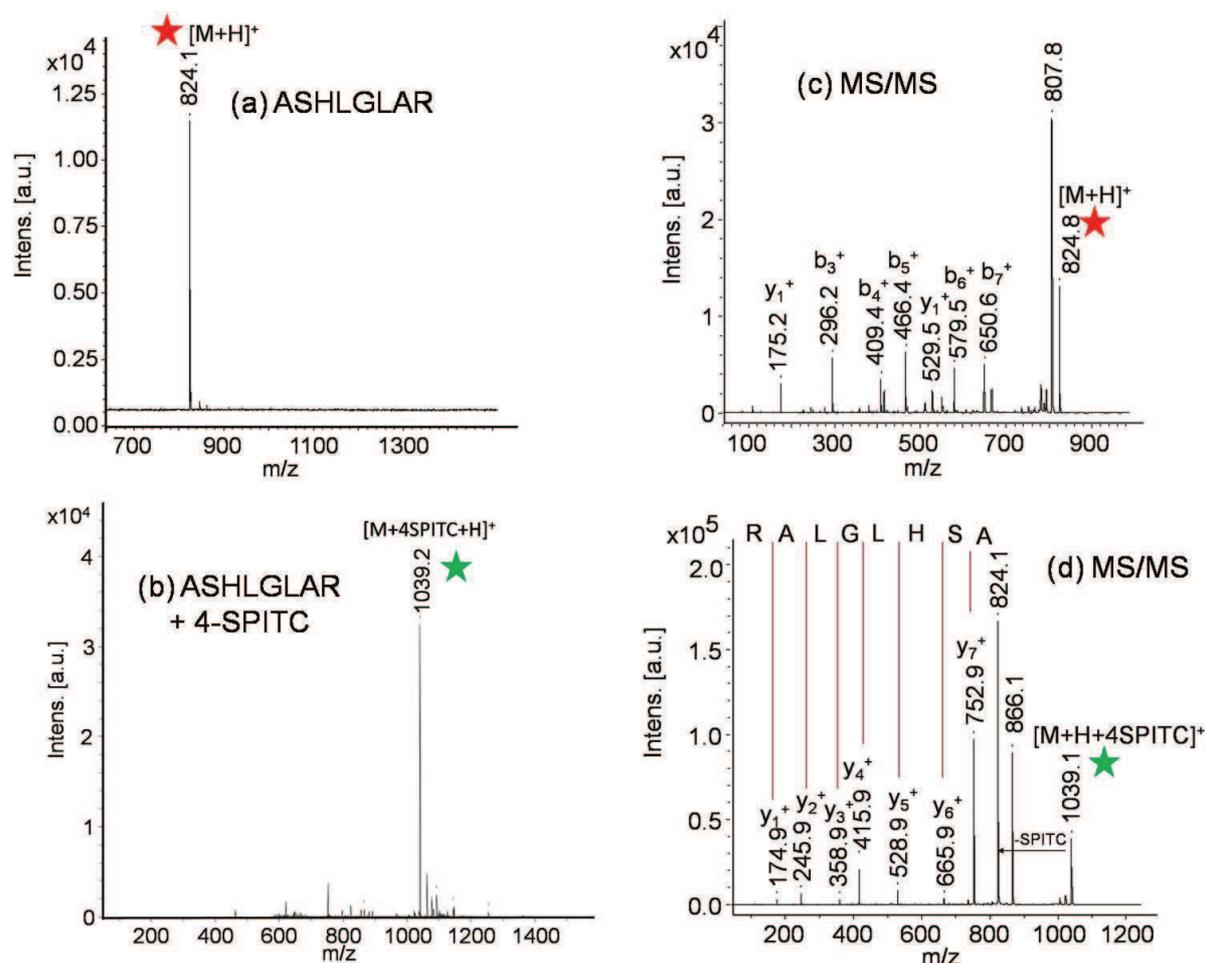


Figure 98 : Spectres de masse obtenus en mode réflecteur positif du peptide (a) ASHLGLAR et (b) ASHLGLAR dérivé avec le 4-SPITC. Spectres MS/MS (c) du peptide natif et (d) du peptide dérivé avec 4-SPITC.

Un mécanisme de fragmentation permettant d'expliquer la formation des ions y_i^+ est proposé **Figure 99**. La charge négative apportée par le 4-SPITC du côté N-terminal du peptide est contrebalancée par l'addition d'une charge positive apportée par un proton sur l'arginine en position C-terminale. Une espèce zwitterionique est obtenue et l'addition d'un deuxième proton apporté lors de l'ionisation permet la formation de l'espèce monochargée qui sera détectée en phase gazeuse. L'arginine présentant une chaîne latérale très basique, le premier proton devrait préférentiellement rester fixe. Si aucun autre résidu basique n'est présent sur le reste du peptide, le deuxième proton pourra alors être mobile et se déplacer le long de la chaîne peptidique entraînant la fragmentation³⁴⁶. Celle-ci entraîne alors la formation d'une

espèce du côté C-terminal du peptide qui sera chargée par la présence du proton sur l'arginine donnant ainsi un ion de séquence y_n^+ . L'autre fragment généré du côté N-terminal sera quant à lui neutre par la présence de la charge négative apportée par le réactif. Ce fragment ne sera donc pas détecté.

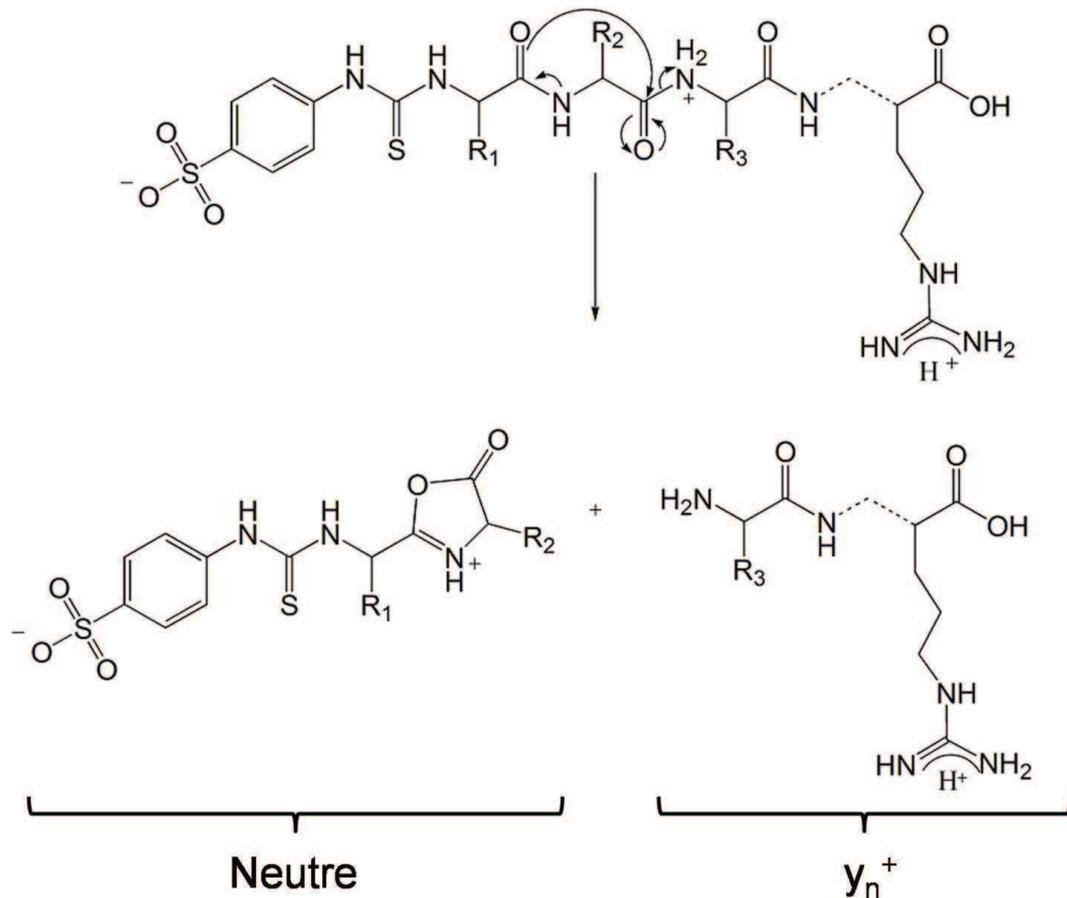


Figure 99 : Mécanisme de fragmentation proposé pour la formation d'ions y_n^+ après modification chimique de peptides avec le 4-SPITC.

Par la suite le 4-SPITC a été utilisé *in situ* sur tissus. Les protocoles ont été optimisés pour permettre la dérivation N-terminale des peptides directement sur coupe. Ainsi, une solution contenant 10 mg/mL de 4-SPITC dans un tampon NH_4HCO_3 (50 mM, pH=8,5), a été déposée sur une coupe préalablement digérée globalement. Après dépôt de la solution de 4-SPITC à la micropipette sur l'ensemble de la coupe, la lame est incubée pendant 1 heure à 55°C sous atmosphère saturée en MeOH/ H_2O (1:1, v/v). Pour l'analyse, la matrice HCCA à 20 mg/mL a été utilisée pour ces expériences. L'échantillon est comparé à un échantillon ayant subi les mêmes traitements hormis l'étape de dérivation. Les spectres enregistrés à

partir d'une coupe de cerveau de rat après digestion et après digestion suivie d'une dérivation au 4-SPITC sont présentés **Figure 100**.

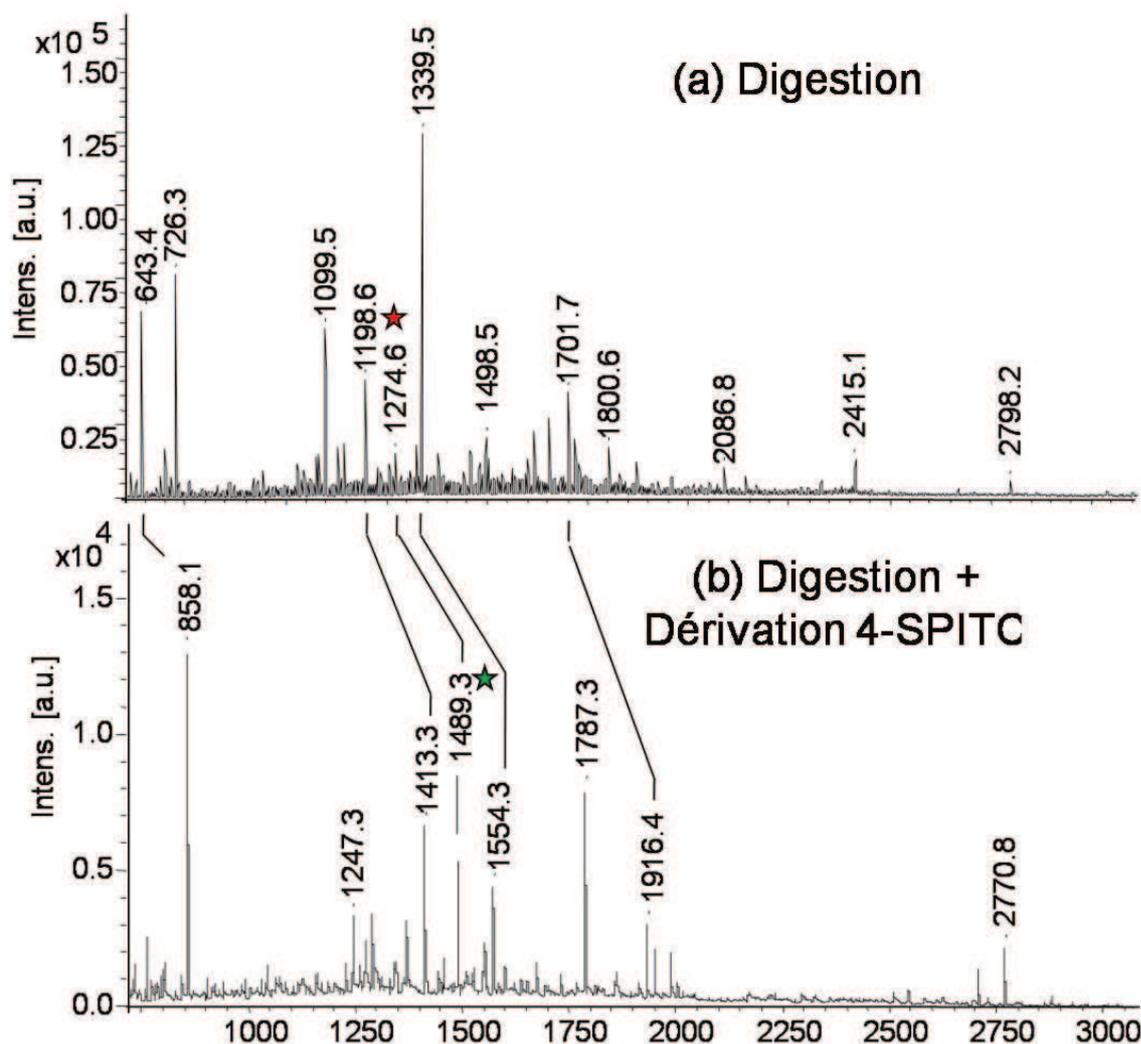


Figure 100 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif après (a) digestion trypsique et (b) digestion trypsique suivie d'une dérivation N-terminale au 4-SPITC sur une coupe de cerveau de rat.

La comparaison des spectres montre que les rendements de dérivation atteints sur tissus sont bons puisque qu'aucun signal correspondant à un peptide « natif » n'a pu être observé sur le spectre après dérivation. Cependant, il apparaît clairement que l'intensité des peptides détectés est 10 fois plus faible pour les peptides de dérivation que pour les peptides non dérivés. Ce phénomène a déjà été mis en évidence par différents groupes dans le cas de la dérivation en solution³³⁹. L'hypothèse la plus raisonnable est que cette perte d'intensité serait liée à une suppression d'ions due à la présence du tampon altérant l'ionisation des espèces.

Lors de la dérivation, deux paramètres jouent un rôle important pour atteindre de bons rendements de réaction. Tout d'abord, il est primordial de chauffer la coupe de tissu à 55°C pour que la réaction se produise. D'autre part les tampons utilisés sont particulièrement importants puisqu'ils permettent de maintenir le pH. Cependant, les tampons utilisés peuvent altérer les conditions de détection des peptides dérivés, comme nous l'avons observé. Or, aucune étape de lavage ne peut être réalisée pour retirer le tampon après dérivation sans risquer de perdre des peptides. De plus, il est impossible aux températures requises par la réaction (55°C) de pouvoir remplacer le tampon par une base organique pour augmenter le pH. D'autres équipes ont travaillé sur l'amélioration de la détection de ces peptides dérivés en utilisant la matrice 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) additionnée d'un co-agent, le diammonium citrate (DAC)³⁴⁷. Nous avons testé cette matrice sur les coupes de tissu après dérivation au 4-SPITC. L'utilisation du mélange THAP/DAC n'a pas permis dans notre cas d'observer d'amélioration. Au contraire, il semblerait même que cette matrice favorise la détection de lipides.

Bien que l'intensité des peptides soit plus faible après dérivation, le déplacement de 215 u. attendu est observé pour un bon nombre de pics (**Figure 100**). Parmi ceux-ci, certains présentent une intensité suffisante pour des études en mode MS/MS. La **Figure 101** présente à titre d'exemple la comparaison des spectres MS/MS obtenus pour l'ion à m/z 1274 et son homologue dérivé à m/z 1489. Les spectres montrent que l'addition du 4-SPITC sur la partie N-terminale du peptide permet d'orienter la fragmentation vers une série complète d'ions y_i^+ comme observée **Figure 101b**. Le spectre MS/MS obtenu après fragmentation de l'ion m/z 1274 permet d'identifier un fragment de l'*Hémoglobine Sub-Unit Beta 1* (LLVVYPWTQR) avec un score assez faible (score 38, Expect 0.0051). Le spectre MS/MS est complexe, avec de nombreux fragments dans la région des faibles rapports m/z alors que la gamme 500-1000 ne présente quasiment aucun ion fragment. Au contraire, les spectres MS/MS du peptide dérivé au 4-SPITC permet d'identifier la même protéine mais avec un score beaucoup plus élevé (score 103, Expect $1.8e^{-9}$). Le spectre MS/MS présente une série y_n^+ complète. Il est donc possible également de déterminer la séquence de ce peptide manuellement par séquençage *de novo*. Il convient de noter que durant l'analyse MS/MS du peptide dérivé, le 4-SPITC est perdu pour redonner l'ion $[M+H]^+$. Cependant, dans le cas du peptide étudié cet ion n'est pas le pic de base. Le pic de base du spectre MS/MS correspond à l'ion y_5^+ . Cet ion est dû à la présence d'une proline dans la séquence. En effet, après l'arginine en position C-terminale et en considérant qu'il n'y pas d'autre résidu basique dans la séquence, l'acide aminé le plus basique est la proline. Le proton mobile va préférentiellement se trouver sur

l'amide tertiaire formé par la proline et par conséquent orienter la fragmentation qui s'effectuera alors principalement à cette position. La faible intensité de l'ion y_4^+ renforce cette idée car la présence d'une proline qui rend difficile la fragmentation du côté C-terminal de cet acide aminé.

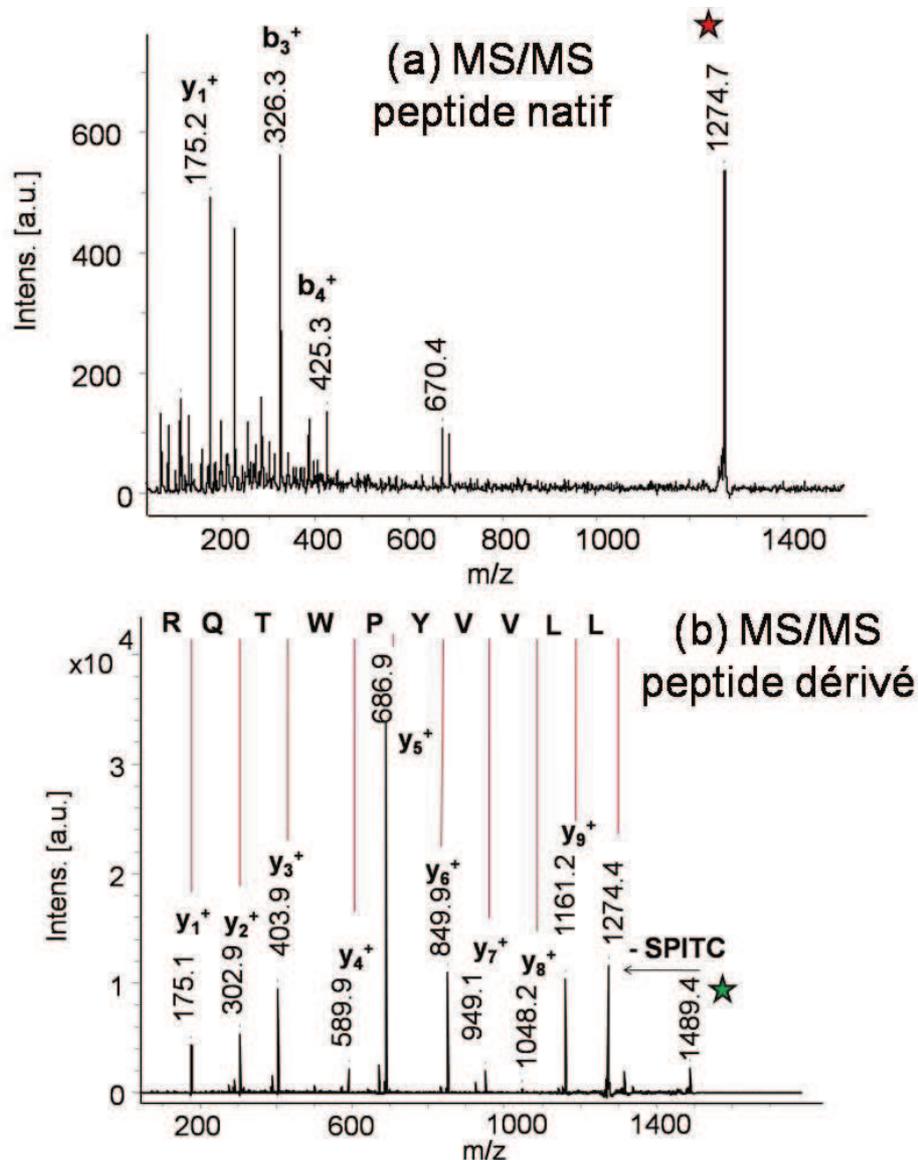


Figure 101 : Spectres MS/MS de l'ion (a) m/z 1274 et (b) m/z 1489 enregistrés respectivement à partir d'une coupe de cerveau de rat digérée et une coupe de cerveau de rat digérée et dérivée au 4-SPITC.

Dérivation en micro-dépôts et imagerie

La dérivation globale des tissus permet de faciliter l'identification des peptides sans pour autant offrir l'accès à la possibilité de réaliser des images. Dans le but de pouvoir réaliser

les dérivations à l'échelle micrométrique et de pouvoir réaliser des images après dérivation, des études ont été menées afin d'adapter la réaction au mode micro-dépôts automatique par système piézoélectrique. Une coupe de cerveau de rat est donc soumise, après réalisation des étapes préalables de lavage à une digestion enzymatique puis une dérivation avant le dépôt de la matrice (HCCA/ANI), les trois étapes étant réalisées successivement en mode micro-dépôts suivant le même quadrillage. La digestion est pratiquée dans l'eau pure pour une concentration en trypsine de 20 µg/mL. Sur les spots de digestion, une solution de 4-SPITC à 20 mg/mL dans un tampon NH₄HCO₃ (50 mM, pH=8.5) est déposée. Après dépôt du 4-SPITC la lame est mise à 55°C pendant 1 heure pour incubation.

Les spectres obtenus dans ces conditions présentent un fort bruit de fond et pratiquement aucuns peptides aussi bien natifs que dérivés ne sont observés. L'absence de signaux sur les spectres peut s'expliquer par une trop grande quantité de réactif déposée sur le tissu pouvant empêcher une bonne extraction des peptides dérivés. Des études à différentes concentrations de réactif ont donc été menées. Cependant, une diminution de la concentration de 4-SPITC n'entraîne aucune amélioration. De plus, il faut noter que sous une concentration seuil, le signal est retrouvé mais les m/z observés pour les pics démontrent alors que la réaction de dérivation ne se produit plus. Afin de déterminer si la suppression des signaux proviendrait du réactif ou du tampon utilisé pour la réaction ou plutôt d'un problème d'extraction et de co-cristallisation des espèces dérivées avec la matrice, le 4-SPITC (10 mg/mL) est déposé par micro-dépôts puis la matrice est ajoutée immédiatement après, sans étape d'incubation, afin de ne pas laisser le temps à la réaction de se produire. Les résultats montrent que le réactif n'est pas responsable de la suppression d'ions puisque les peptides natifs issus de la digestion sont observés avec une bonne intensité. Il nous faut donc privilégier la seconde hypothèse, *i.e.* concernant l'extraction et/ou la co-cristallisation des espèces dérivées avec la matrice pour expliquer le phénomène de suppression des ions. L'ionisation de ces espèces étant déjà plus faible, si une trop faible quantité est extraite alors il devient impossible de détecter ces peptides. Toujours à des fins de surmonter cette difficulté, différentes matrices ont été testées et en particulier la 2,5-DHB, la THAP contenant du DAC ou des matrices ioniques telles que HCCA/3AP. Néanmoins aucune amélioration n'a été observée quelque soit la matrice utilisée. Il semblerait donc que ce réactif ne puisse pas être adapté pour le moment à une utilisation en mode imagerie. En revanche, le 4-SPITC permet une amélioration de l'identification des peptides en analyse directe par dépôt pipette.

4.2.2. Dérivation N-Terminale avec le 3-SBASE

Dérivation en solution

Le 3-SBASE est un réactif permettant d'apporter une charge négative du côté N-terminal des peptides tout comme son homologue le 4-SPITC. Il est donc une bonne alternative à l'utilisation du 4-SPITC. Les mécanismes de fragmentation reposent sur une base commune et conduisent également à l'observation d'une série d'ions fragments de type y_i^+ . Ainsi, comme le 4-SPITC, la dérivation par le 3-SBASE s'utilise conjointement avec une digestion trypsique permettant de générer des peptides présentant des acides aminés basiques en position C-terminale des peptides. Cependant, à la différence du 4-SPITC qui est commercial, le 3-SBASE doit être synthétisé à partir du 3-SBA comme décrit en partie 2. De la même manière que le 4-SPITC, le 3-SBASE a, dans un premier temps, été testé sur le peptide modèle ASHLGLAR. La réaction de dérivation est testée dans deux conditions, à savoir, à température ambiante et à 37°C pendant 1 heure avec une solution contenant 10 mg/mL de 3-SBASE dans un tampon NH_4HCO_3 (50 mM, pH=8.5). Les résultats obtenus permettent de montrer que seul l'échantillon incubé à 37°C conduit à la réaction. Ceci se traduit sur le spectre par la présence d'un pic à m/z 1008 correspondant à un déplacement de 184 u. par rapport à l'espèce native observée à m/z 824 (**Figure 102a**). L'espèce dérivée est ensuite analysée en mode MS/MS afin de vérifier l'efficacité de ce réactif pour sa simplification des spectres de fragmentation (**Figure 102b**).

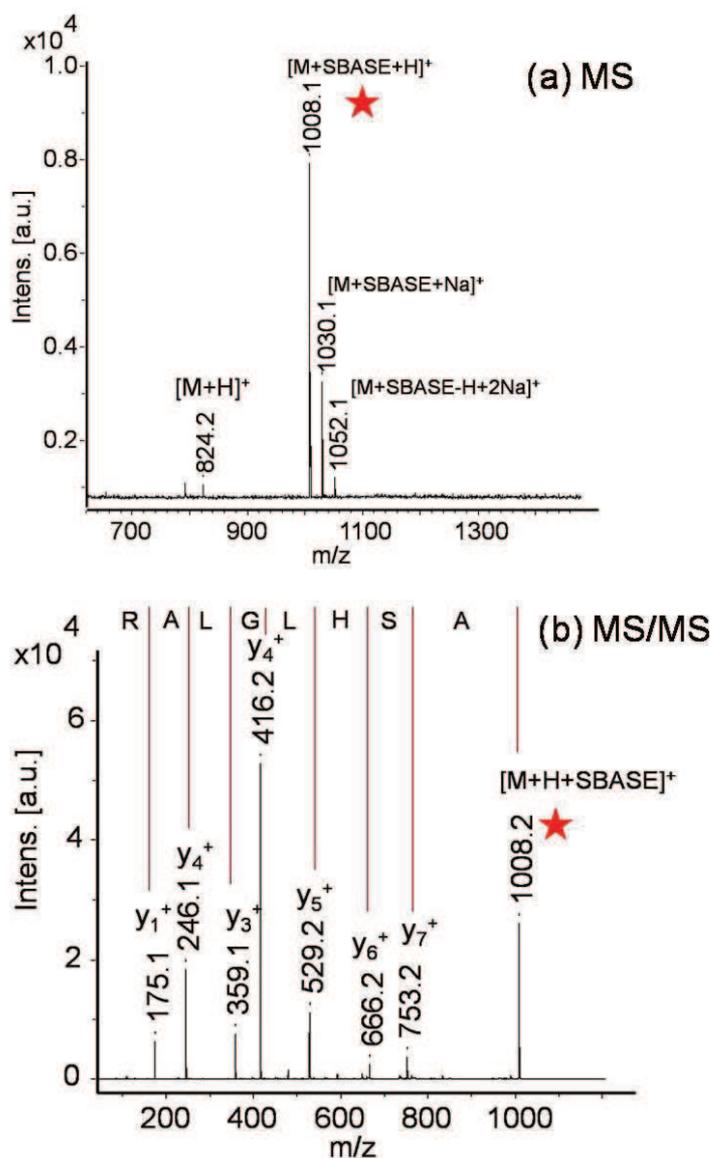


Figure 102 : (a) Spectre de masse enregistré en mode réflecteur positif après dérivation du peptide ASHLGLAR dérivé avec le 3-SBASE. (b) Spectre MS/MS.

Le spectre MS/MS présente une série d'ions y_n^+ complète et quasi exclusive permettant de retrouver la séquence du peptide manuellement. Il convient de noter que contrairement au 4-SPITC, le 3-SBASE ne conduit pas à l'observation d'un pic de fragmentation intense correspondant à la perte du réactif, ce qui permet d'observer plus facilement la série ions y_n^+ . Le mécanisme de fragmentation permettant d'obtenir une série complète d'ions y_n^+ est le même que celui proposé pour la dérivation avec le 4-SPITC (**Figure 99**). La réaction de dérivation au 3-SBASE ayant lieu à plus faible température et le

réactif étant plus stable durant la fragmentation, celui présente un intérêt tout particulier pour une utilisation sur tissus.

Dérivation globale des tissus

Les dérivations sur tissus sont tout d'abord étudiées par dérivation globale du tissu par dépôt pipette. Après digestion à la trypsine d'une coupe de cerveau de rat, une solution de 3-SBASE (10 mg/mL) dans un tampon NH_4HCO_3 (50 mM, pH=8.5) est donc déposée sur le tissu puis la lame est soumise à incubation pendant 1 heure à 37°C. Pour ces expériences la matrice HCCA (20 mg/mL) est utilisée. La **Figure 103** présente la comparaison des spectres enregistrés après simple digestion et après digestion suivie de l'étape de dérivation.

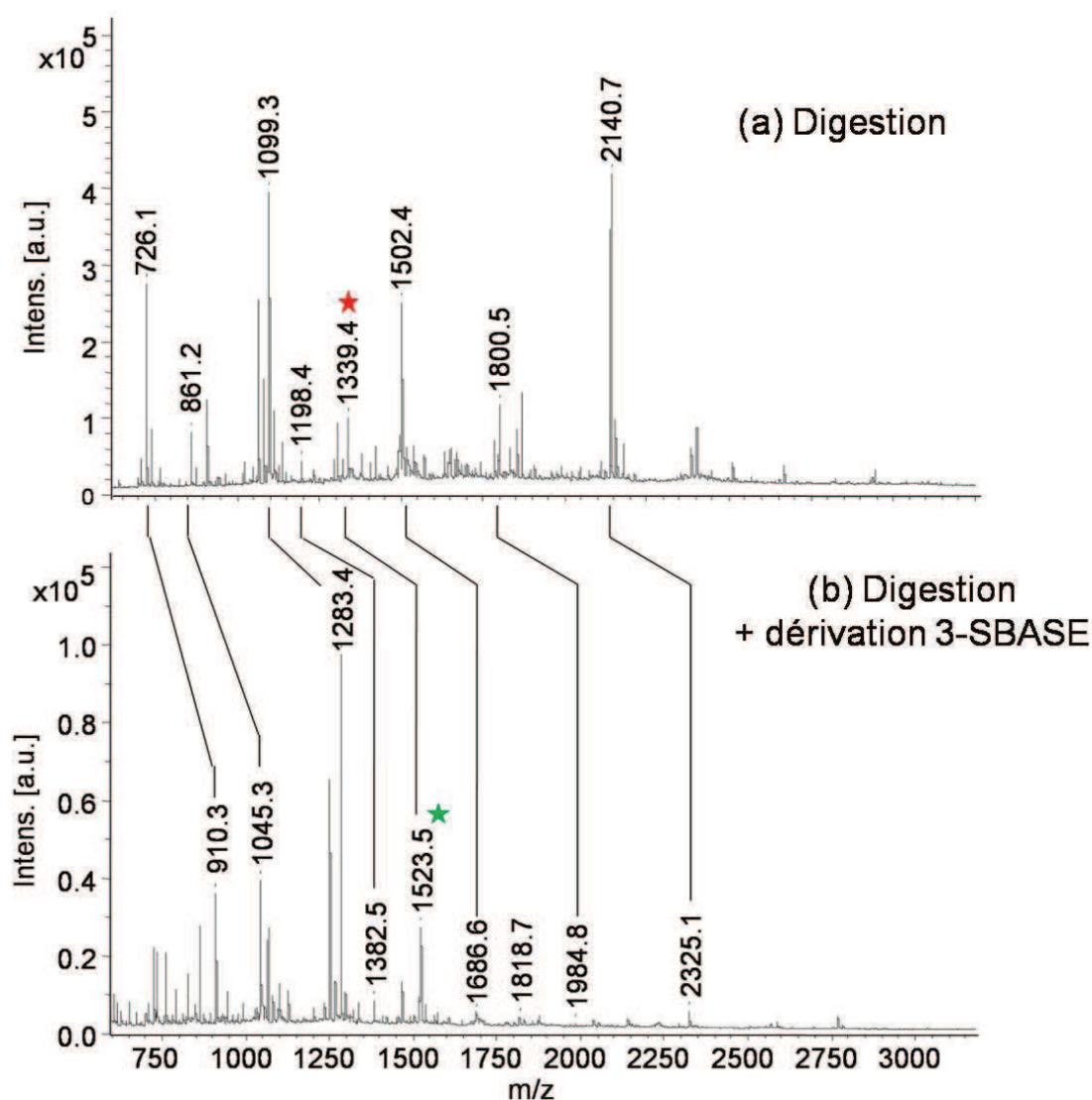


Figure 103 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif après (a) digestion trypsique et (b) digestion trypsique suivie d'une dérivation N-terminale au 3-SBASE sur une coupe de cerveau de rat.

La comparaison des spectres montre que de nombreux peptides présentent un déplacement de 184 u. après dérivation. Le nombre de peptides dérivés ainsi que leur intensité est plus élevé que pour la dérivation au 4-SPITC. Ceci pourrait s'expliquer par une meilleure efficacité d'ionisation des espèces dérivées avec le 3-SBASE. Afin d'évaluer l'efficacité du 3-SBASE pour améliorer l'interprétation des spectres MS/MS directement sur tissus, différents peptides natifs et dérivés sont étudiés en mode MS/MS. Différents exemples sont présentés ci-après afin de mettre en évidence l'apport de la dérivation pour l'interprétation des données de MS/MS.

Le premier exemple concerne l'ion à m/z 643 présent sur le spectre de digestion avant dérivation. Cette ion présente un spectre MS/MS avec peu d'ions fragments et un pic de base à m/z 487,2. Après interrogation des banques de données, aucune identification n'est obtenue comme présenté **Figure 104**. Après dérivation au 3-SBASE, l'ion est déplacé à m/z 827. Le spectre MS/MS obtenu après fragmentation de cet ion présente une série d'ions y_i^+ complète et unique. Ainsi il est aisé de remonter manuellement à la séquence du peptide. Après interrogation en banque de données, la protéine à laquelle le peptide appartient est alors identifiée sans difficulté comme étant la Myéline avec un score significatif (score 46, Expect 0,0064) pour la séquence RPSQR. Les spectres MS/MS et les résultats des interrogations sont présentés **Figure 104**.

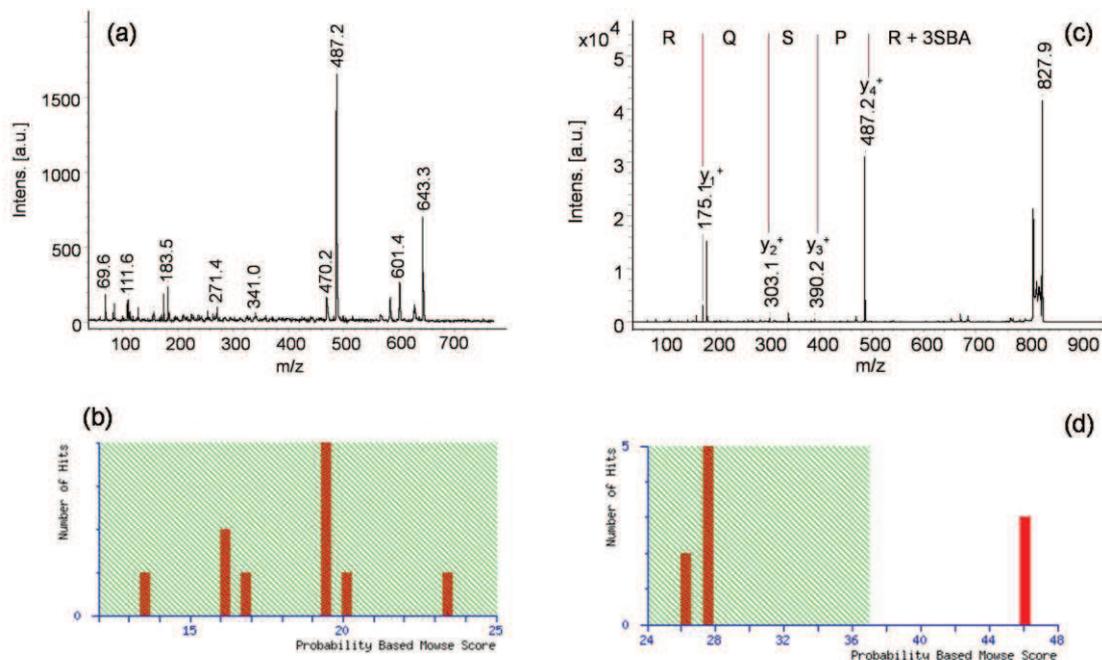


Figure 104 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 643 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 827 après dérivation 3-SBASE et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données.

Un second exemple est abordé pour le cas de l'ion à m/z 726,3 (**Figure 105**). Avant dérivation, cet ion présente un spectre MS/MS complexe présentant de nombreux ions dans les bas m/z et un manque d'informations dans les plus hauts m/z . L'interrogation en banque de données à partir de ce spectre MS/MS conduit, en se basant sur le score le plus significatif, à identifier la protéine *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* (score 40, Expect 0,0028) pour la séquence QAAALPR. Une deuxième protéine, la *Myéline* est aussi identifiée avec un score plus faible (score 28, Expect 0.044) pour la séquence HGFLPR. Après dérivation avec le 3-SBASE, l'ion déplacé à m/z 910,1 présente un spectre MS/MS avec une série d'ions y_i^+ complète et encore une fois unique permettant de déterminer manuellement que la séquence du peptide est HGFLPR. Cette séquence correspondrait au fragment de la *Myéline* identifiée en deuxième position à partir du peptide natif. Après interrogation en banque de données, l'unique protéine identifiée après dérivation est bien la *Myéline* même si le score reste faible (score 30, Expect 0,029) pour la séquence HGFLPR. Dans le cas de l'analyse du peptide natif, cette séquence était obtenue pour un score très faible et en deuxième position montrant une fois de plus l'apport de la dérivation. Les spectres MS/MS et les résultats des interrogations sont présentés **Figure 105**.

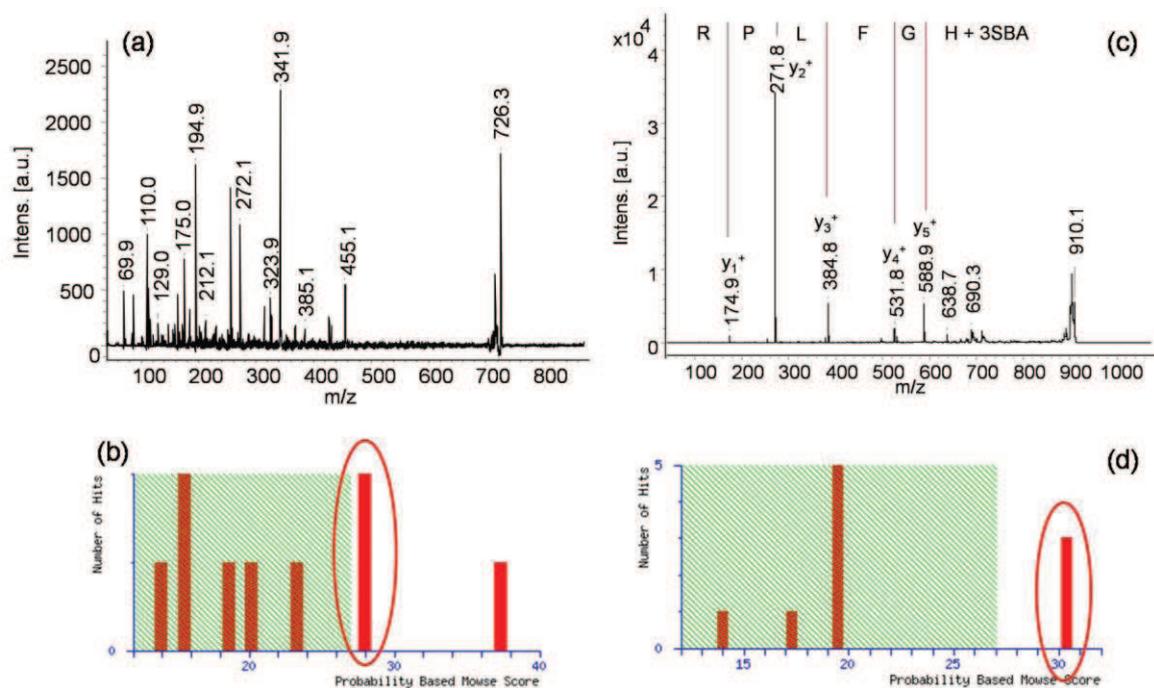


Figure 105 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 726.3 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 726.3 après dérivation 3-SBASE (m/z 910.1) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données.

De la même manière, l'ion à m/z 1339,3 déjà présenté dans la partie 4.3.2 (**Figure 106**) est identifié comme étant un fragment de la Myéline avec un score de 42 (Expect 0.0015) pour la séquence HRDTGILDSIGR par interrogation en banque de données. L'ion m/z 1523,7 correspondant au peptide dérivé présente un spectre MS/MS avec une série pratiquement complète d'ions y_i^+ . Il est possible de retrouver manuellement la séquence DTGILDSIGR et après interrogation en banque de données pour des banques de comparaison de séquences (Logiciels de Blast), les résultats obtenus permettent d'identifier la *Myéline* avec un très bon score (score 93, Expect 9,6 e⁻⁹) pour la séquence HRDTGILDSIGR. Les spectres MS/MS et les résultats des interrogations sont présentés **Figure 106**. De nouveau, la dérivation permet d'obtenir une identification sans ambiguïté alors que l'identification à partir du peptide natif était difficile. Cependant, il convient de noter qu'il manque deux ions y_i^+ au spectre MS/MS du peptide dérivé pour obtenir la séquence complète. Les ions manquants correspondent aux deux derniers acides aminés de la séquence peptidique. Il semblerait que la présence d'une deuxième arginine dans la séquence, *i.e.* d'un site de coupure manqué par l'enzyme, arrêterait la formation des ions y_i^+ . Le proton non mobile qui normalement doit être en position C-terminale peut dans ce cas de figure se trouver sur l'autre arginine conduisant à la formation d'ions fragments différents. Ce cas de figure se produit en présence de non coupure par l'enzyme *i.e.* si une arginine ou une lysine ne sont pas accessibles à la trypsine. Il est donc indispensable que la deuxième arginine ou lysine dans la chaîne peptidique soit le plus près possible de la partie C-terminale afin d'obtenir une série d'ions y_i^+ le plus longue possible pour une bonne identification.

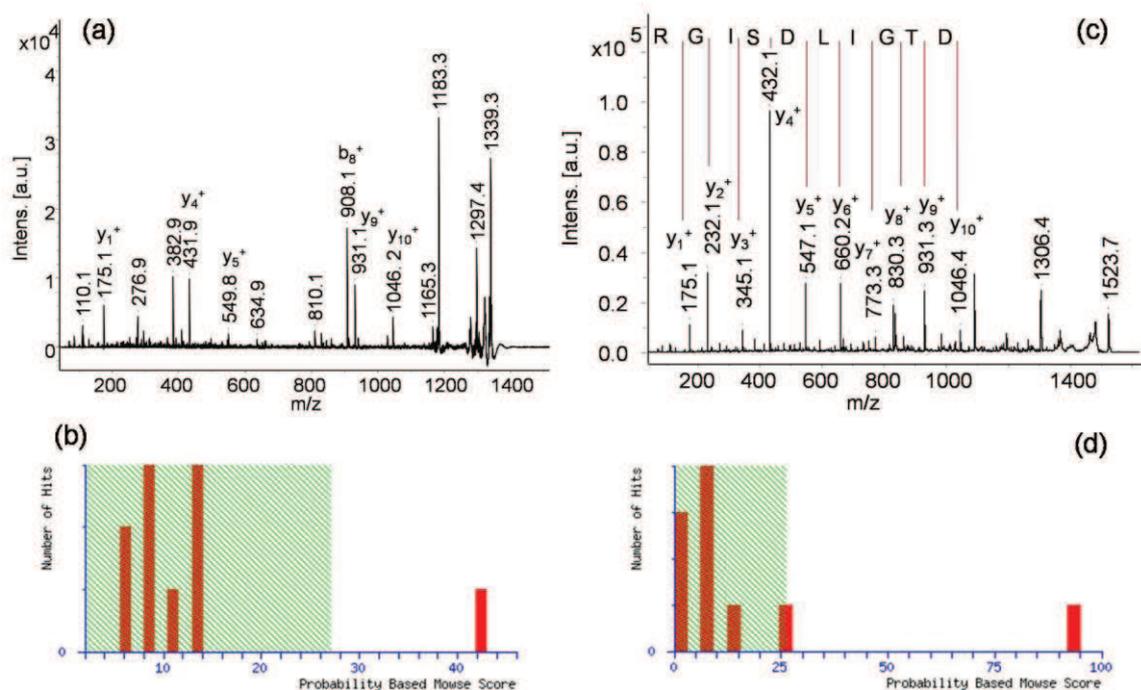


Figure 106 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 après dérivation 3-SBASE (m/z 1523.7) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données.

En ce qui concerne les peptides ne présentant aucun clivage manqué, la série d'ions y_i^+ obtenue par MS/MS est alors complète comme observé précédemment. C'est aussi le cas pour l'ion à m/z 1701,9 déjà présenté dans la partie 3.3.2 (**Figure 91**). Cet ion natif conduit après fragmentation à l'observation de nombreux ions fragments dans les bas m/z mais peu d'informations dans les plus hauts m/z (**Figure 107a**). Après interrogation en banque de données, les résultats obtenus conduisent à identifier la *Tubuline $\alpha 1a$* avec un score de 57 (Expect $6.2e^{-5}$) pour la séquence VFVDLEPTVIDEVR. Comme observé précédemment, une seule arginine est présente dans la séquence du peptide ce qui signifie qu'après dérivation, une série complète d'ions y_i^+ devrait être détecté lors de la fragmentation. L'ion m/z 1902,78 dérivé, conduit comme attendu, après fragmentation à l'observation d'une série complète d'ions y_i^+ (**Figure 107c**). Cependant, la différence de masse entre le peptide natif et son homologue dérivé, n'est pas de 184 u. comme attendu mais de [184+17] u. Aucune explication n'a pu réellement être établie pour expliquer ce déplacement particulier. Il semblerait que ce peptide ait subi une modification autre que l'ajout du réactif en position N-terminale.

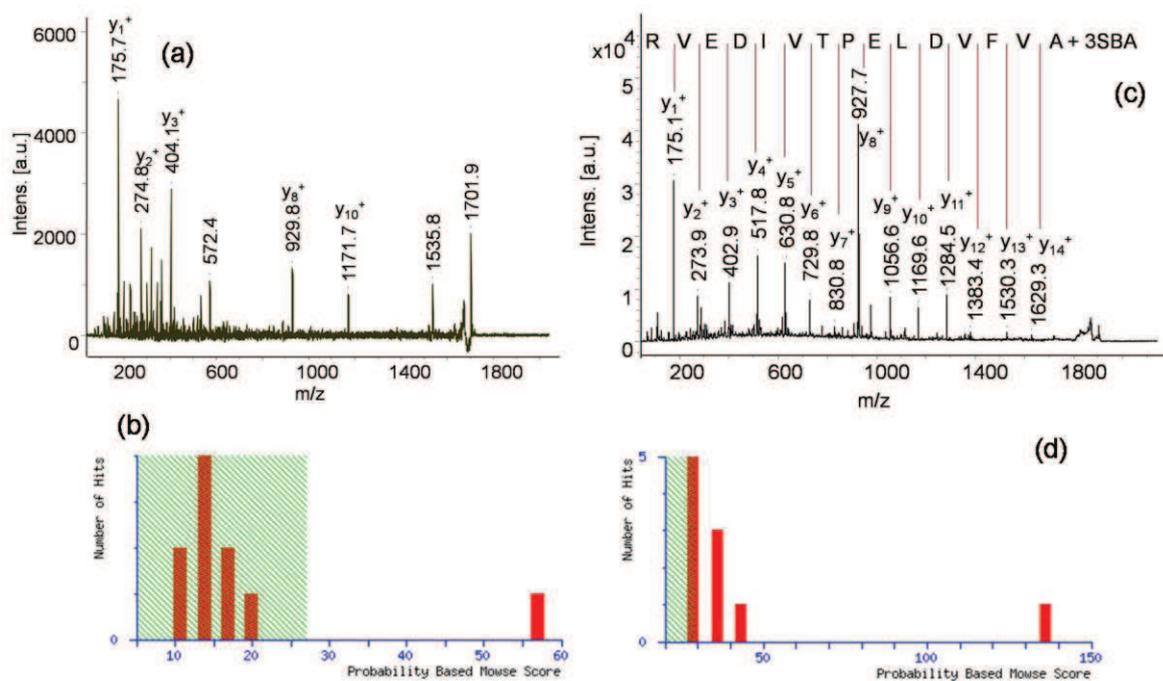


Figure 107 : (a) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1701.9 et (b) résultats obtenus après interrogation en banque de données. (c) Spectre MS/MS de l'ion m/z 1339.3 après dérivation 3-SBSE (m/z 1523.7) et (d) résultats obtenus après interrogation en banque de données.

Dans tous les cas, la dérivation N-terminale au 3-SBSE permet de simplifier considérablement les spectres MS/MS permettant alors une identification aisée et non ambiguë des protéines. Le **Tableau 8** résume les scores d'identification obtenus pour les différents peptides précédemment présentés.

	m/z observés	m/z attendus	Scores	Rang	Delta	Expect	Sequence
Peptide	643.35	642.32	NI	NI	NI	NI	RPSQR Myelin Basic Protein
Peptide + dérivation (3SBASE)	827.9		46	1	-0.0314	0.0064	
Peptide	726.23	725.22	28	2	-0,1765	0.044	HGFLPR Myelin Basic Protein
Peptide + dérivation (3SBASE)	910.1		30	1	-0.3046	0.029	
Peptide	1339.24	1339.71	42	1	-0.4706	0.0015	HRDTGILDSIGR Myelin Basic Protein
Peptide + dérivation (3-SBASE)	1523.7		93	1	-0.277	9.6 10 ⁻¹⁹	
Peptide	1701.92	1701.91	57		0.0162	6.2 10 ⁻⁵	AVFVDLEPTVIDEVR Tubulin Alpha-1A Chain
Peptide + dérivation (3SBASE)			142		-0.0058	1.1 10 ⁻¹²	

NI: Non Identifié

Tableau 8 : Comparaison des scores d'identification obtenus à partir de Mascot en utilisant SwissProt comme banque et la taxonomie *Rattus norvegicus* pour les 4 peptides avant et après dérivation au 3-SBASE.

Il convient aussi de noter que les peptides observés après dérivation présentent tous une arginine en position C-terminale. La trypsine clivant les protéines du côté C-terminal des résidus basiques, des peptides présentant des lysines en position C-terminale devraient être également observés. Cependant, les peptides dérivés présentant une efficacité d'ionisation beaucoup plus faible que leurs homologues non dérivés, il semblerait que seuls ceux présentant une arginine ne soient détectés. C'est pourquoi les peptides dérivés contenant une voir deux arginines ou contenant une proline sont détectés. Il serait possible d'envisager une réaction chimique supplémentaire afin de convertir les lysines en homo-arginines afin d'augmenter l'affinité protonique des peptides présentant une lysine en position C-terminale

Dérivation en micro-dépôt et imagerie

Néanmoins la dérivation avec le 3-SBASE présente de très bonnes caractéristiques en termes de rendement de réaction, nombre de peptides observés après dérivation et intensité des pics dans les spectres de masse. Ce réactif est donc étudié en vue d'une intégration dans un protocole permettant l'identification des protéines mais également l'acquisition d'images. Le réactif est testé de la même manière que pour le 4-SPITC, sur des coupes de cerveau de rat, en mode micro-dépôts. La solution de trypsine est déposée par utilisation du système de micro-dépôts piézoélectrique, puis sur les spots de digestion, des solutions de concentrations différentes de 3-SBASE allant de 1 mg/mL à 20 mg/mL dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM (pH=8.5) sont déposées. Différentes matrices sont également testées comme le 2,5-DHB, la THAP contenant du DAC, HCCA/ANI ou HCCA/3AP. Les spectres obtenus montrent qu'un problème similaire à celui rencontré pour le 4-SPITC est observé avec le 3-SBASE. Lorsque la réaction est effectuée et après dépôt des différentes matrices, les spectres MS enregistrés en mode réflecteur positif ne présentent aucun peptide dérivé ou non. Malgré tous les efforts entrepris pour adapter cette dérivation à une application en mode imagerie, il semblerait que le 3-SBASE ne soit compatible qu'avec une analyse directe des tissus par dérivation sur des régions localisées à l'aide d'une micropipette.

Il est donc nécessaire de trouver un réactif permettant de simplifier les spectres MS/MS mais qui soit également compatible avec les protocoles utilisés pour la préparation des échantillons en mode imagerie. L'addition d'une charge négative en position N-terminale semble entraîner la suppression d'ions dans le cas d'une préparation compatible avec l'imagerie MALDI. L'idée d'ajouter un réactif qui apporterait une charge positive en position N-terminale a donc été envisagée.

4.3. Addition d'une charge positive en position N-terminale

4.3.1. Dérivation N-Terminale avec TMPP

Dérivation en solution

Le TMPP est un réactif qui a été décrit dans la littérature³⁴³⁻³⁴⁵. Il permet d'orienter les fragments vers une série d'ions a_i^+ ou b_i^+ . De plus, le TMPP présente la particularité de réagir à température ambiante. Ceci devrait permettre d'introduire plus simplement une étape de dérivation dans le protocole de préparation d'échantillons pour l'imagerie MALDI. D'autre

part, il a été démontré que ce réactif ne nécessitait pas la présence d'un résidu d'acide aminé basique en position C-terminale du peptide ainsi il n'est pas restreint au séquençage de peptides issus d'une digestion trypsique d'une protéine³⁴⁵. Par conséquent, la position du résidu basique dans la chaîne peptidique n'était pas un handicap avec cette dérivation contrairement au 3-SBASE ou au 4-SPITC. Il est donc possible de pouvoir utiliser ce réactif à la fois pour le séquençage de peptides endogènes ou de peptides issus de la digestion enzymatique de protéines.

Le TMPP a été dans un premier temps étudié sur le peptide standard de séquence ASHLGLAR. A la différence des autres réactifs (3-SBASE et 4-SPITC), la concentration de réactif est fixée à 1 mg/mL dans un mélange AcN/NH₄HCO₃ (50 mM) (3:7, v/v). Le pH du tampon est ajusté à pH 10 pour une meilleure efficacité de conversion. La réaction est effectuée à température ambiante pendant 1 heure. Le spectre de masse obtenu après dérivation du peptide ASHLGLAR présente un pic à m/z 1396,5 correspondant au peptide natif après un déplacement de 573 u. dû à la présence du TMPP. Après fragmentation, le spectre présente un pic de base correspondant au réactif perdu à m/z 573 écrasant les autres signaux. Il est donc indispensable de commencer la mesure à partir de m/z 600. Concernant les ions fragments, une série complète d'ions a_i⁺ est observée. Ceci permet de retrouver la séquence manuellement (**Figure 108**). Ce réactif présente donc de très bonnes caractéristiques pour le séquençage *de novo*.

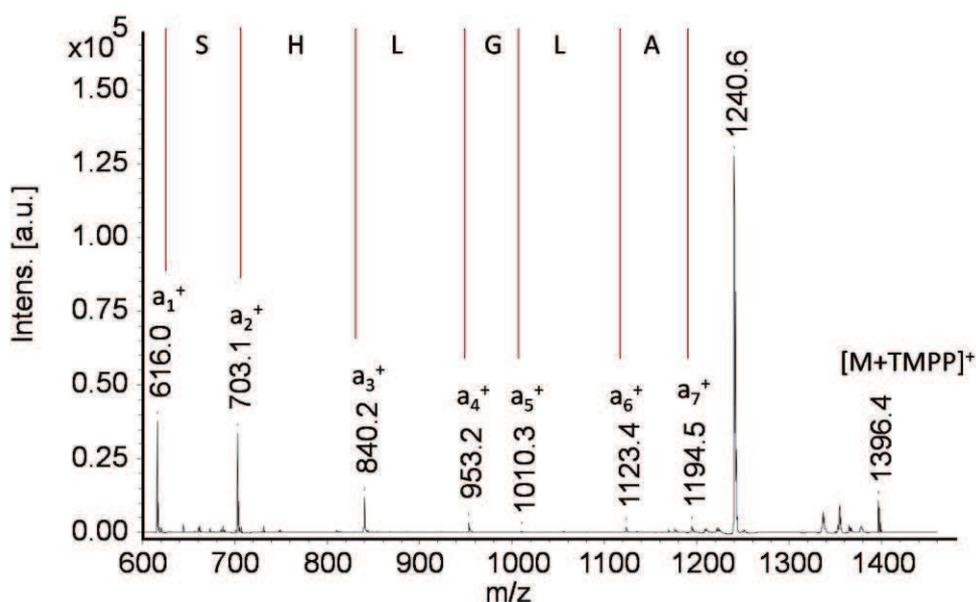


Figure 108 : Spectre MS/MS de l'ion m/z 1396.4 correspondant au peptide ASHLGLAR dérivé avec le TMPP.

Il convient de noter que les ions fragments sont tout de même de faible intensité. Ceci s'explique par le fait que la fragmentation n'est pas induite par la présence d'un proton mobile puisque la charge permettant l'ionisation des espèces est apportée par le TMPP qui est un ion phosphonium. Il est donc nécessaire d'apporter plus d'énergie interne à la molécule pour augmenter les rendements de fragmentation. L'UltraFlex II développé par Bruker présente une cellule LIFT permettant d'améliorer le PSD. Cependant, cette méthode LIFT reste basée sur la décomposition métastable des ions sans cellule de collision. Ainsi l'énergie interne des ions sur la fenêtre de temps considérée n'est pas suffisante sur notre instrument pour conduire à une grande efficacité de fragmentation et se traduit par une faible intensité des ions fragments. Pour augmenter l'intensité des ions fragments, il faudrait travailler sur un instrument présentant une réelle cellule de collision afin d'augmenter l'énergie interne.

Dérivation globale des tissus

Des études sont menées avec le TMPP pour la dérivation *in situ* sur tissus de manière globale. Après digestion trypsique, une solution de TMPP (1 mg/mL) est donc déposée et laissée à incuber pendant 1 heure à température ambiante. La matrice utilisée ici est la matrice conventionnelle HCCA (20 mg/mL). Il convient de noter que toutes solutions sont déposées à la micropipette afin de mettre en évidence l'efficacité de ce réactif. Après analyse de la coupe et comparaison avec une coupe soumise uniquement à la digestion trypsique, il est possible d'établir que la réaction de dérivation s'est effectuée avec succès sur le tissu. De nombreux peptides sont détectés avec un déplacement de 573 u. par rapport au spectre obtenu après digestion trypsique. Cependant, il convient de noter que les spectres de dérivation TMPP présentent un bruit de fond assez important ainsi qu'une intensité des ions assez faible. Le TMPP étant un sel, il faut envisager que le contre ion apporté par le tampon NH_4HCO_3 pourrait générer des difficultés d'analyse et expliquer la faible intensité des peptides dérivés observée sur les spectres. La réaction de dérivation étant effectuée à température ambiante, il est possible de minimiser l'apport de sels en remplaçant le tampon NH_4HCO_3 utilisé pour ajuster le pH par une base organique. Une solution de TMPP (1 mg/mL) dans un mélange AcN/H₂O (3/7, v:v) contenant 1% de Triéthylamine (TEA) est donc utilisée pour dérivation sur une coupe de cerveau de rat digérée à la trypsine. Les spectres enregistrés dans ces conditions par comparaison aux dérivations en tampon NH_4HCO_3 sont présentés **Figure 109**. Il apparaît clairement une nette augmentation de l'intensité des pics (facteur 10 environ) et un meilleur rapport signal/bruit par utilisation de la base organique.

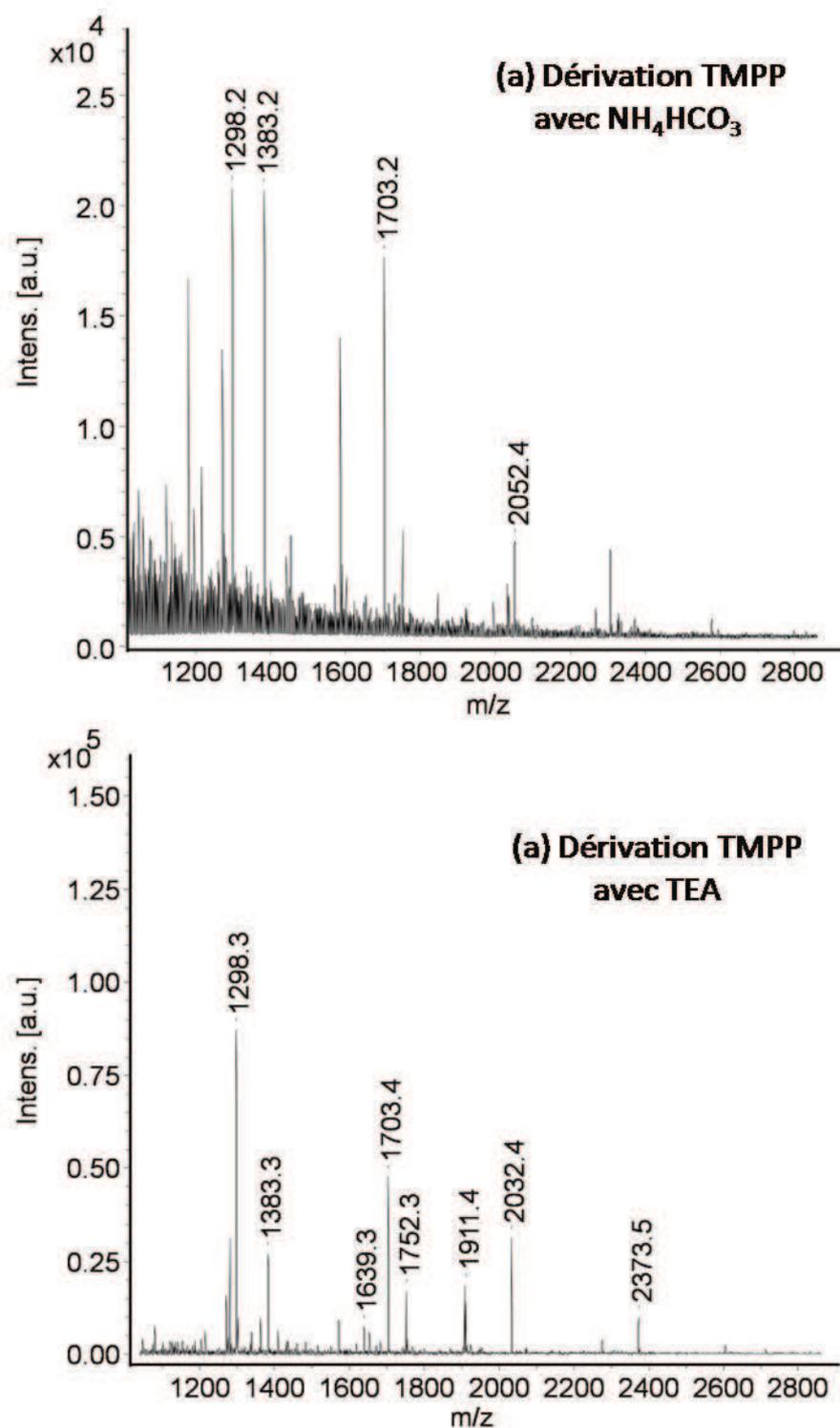


Figure 109 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat soumise à une digestion enzymatique puis à une dérivation TMPP dans (a) un tampon NH_4HCO_3 et (b) avec la TEA.

La triméthylamine (TEA) étant volatile, cette base ne provoque ni baisse d'intensité des espèces dérivées ni gêne de la cristallisation de la matrice. Les peptides dérivés n'étant

plus détectés par l'addition d'un proton qui dépend fortement de l'affinité protonique des espèces, il est possible d'envisager que des espèces moins basiques puissent être détectées. Néanmoins, de nombreux peptides natifs, sont retrouvés après dérivation TMPP (**Figure 110**).

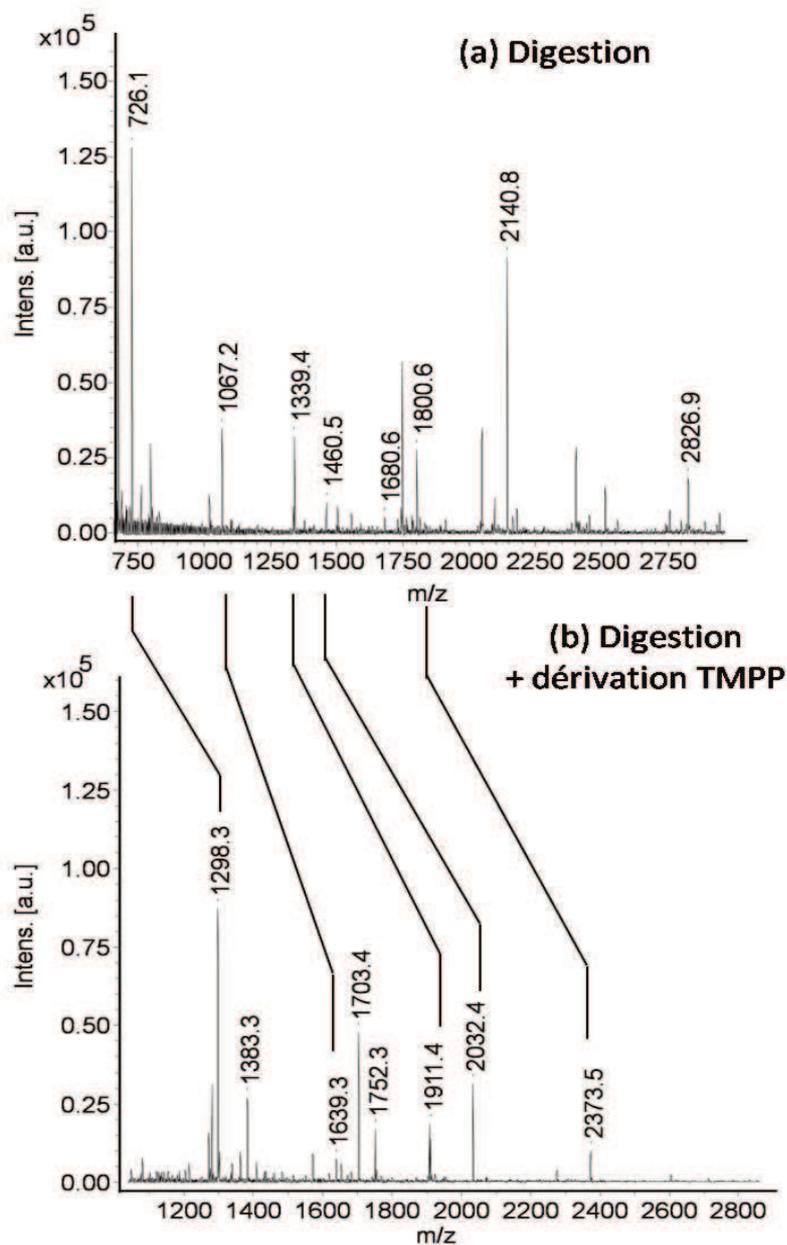


Figure 110 : Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) digérée à la trypsine et (b) digérée et dérivée au TMPP.

4.3.2. Dérivation et imagerie

La bonne sensibilité de détection des peptides dérivés ainsi que la possibilité d'effectuer la réaction à température ambiante sans utiliser de tampon font du TMPP un très bon candidat pour une utilisation en mode imagerie. Des études sont donc réalisées pour utiliser ce réactif en mode micro-dépôts. Les expériences réalisées consistent à effectuer une micro-digestion sur deux zones similaires et symétriques sur une coupe de cerveau de rat. Par la suite, une seule de ces zones sera soumise à micro-dérivation. Il est ainsi possible d'établir une comparaison directe sur la même coupe de tissu. La dérivation est pratiquée en déposant une solution de TMPP (1 mg/mL) dans un mélange AcN/H₂O (3/7, v:v) afin d'éviter que le réactif ne s'hydrolyse dans un pH trop basique durant le temps de dépôt. Dans un second temps, une solution d'AcN/H₂O (3/7, v:v) contenant 1% de TEA est déposée afin d'amorcer la réaction de dérivation. La matrice utilisée pour ces expériences est la matrice ionique HCCA/3AP. Cette dernière est déposée sur les deux aires suivant le même quadrillage de micro-dépôts. Les premiers résultats montrent que le rendement de la réaction de dérivation n'est pas très élevé. Nous avons envisagé que ces mauvais rendements de réaction puissent provenir d'un problème de compétition entre le temps de réaction et le temps d'évaporation des solvants à l'échelle des micro-dépôts. Les aires étudiées étant relativement grandes, la solution peut sécher entre deux passages de micro-dépôts. Une autre expérience est donc alors réalisée en créant de petites aires de 6 par 6 dépôts. Dans ces conditions et en utilisant le même protocole que précédemment, les résultats montrent alors que la réaction de dérivation présente un bon rendement. Il est donc très important de conserver une certaine humidité pour optimiser la réaction.

Une image MALDI de la répartition des ions avant et après dérivation a été réalisée. Les résultats obtenus pour deux ions, l'un natif et l'autre dérivé, présentant donc la même répartition avec une différence de 573 u. sont présentés **Figure 111**. L'ion à m/z 726,3 présenté dans la partie 4.2.2 (**Figure 111e**) peut être identifié après MS/MS et interrogation en banque de données comme étant la protéine *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor* avec un score assez faible mais significatif (score 40, Expect 0.0028) pour la séquence QAAALPR. La *Myéline* est aussi identifiée mais avec un score plus faible (score 28, Expect 0.044) pour la séquence HGFLPR. En revanche, le spectre obtenu après analyse en mode MS/MS de l'ion dérivé à m/z 1298 montre une série quasi complète d'ions a_i⁺ et un ion b_i⁺ même si l'ion fragment du réactif reste le pic de base du spectre (**Figure 111d**). La séquence HGFLPR est facilement retrouvée manuellement. Ainsi, la protéine incluant cette séquence

peptidique est la protéine de plus faible score par identification en banque à partir du peptide natif. Ainsi, la réalisation de dérivation permet d'éviter une erreur d'identification.

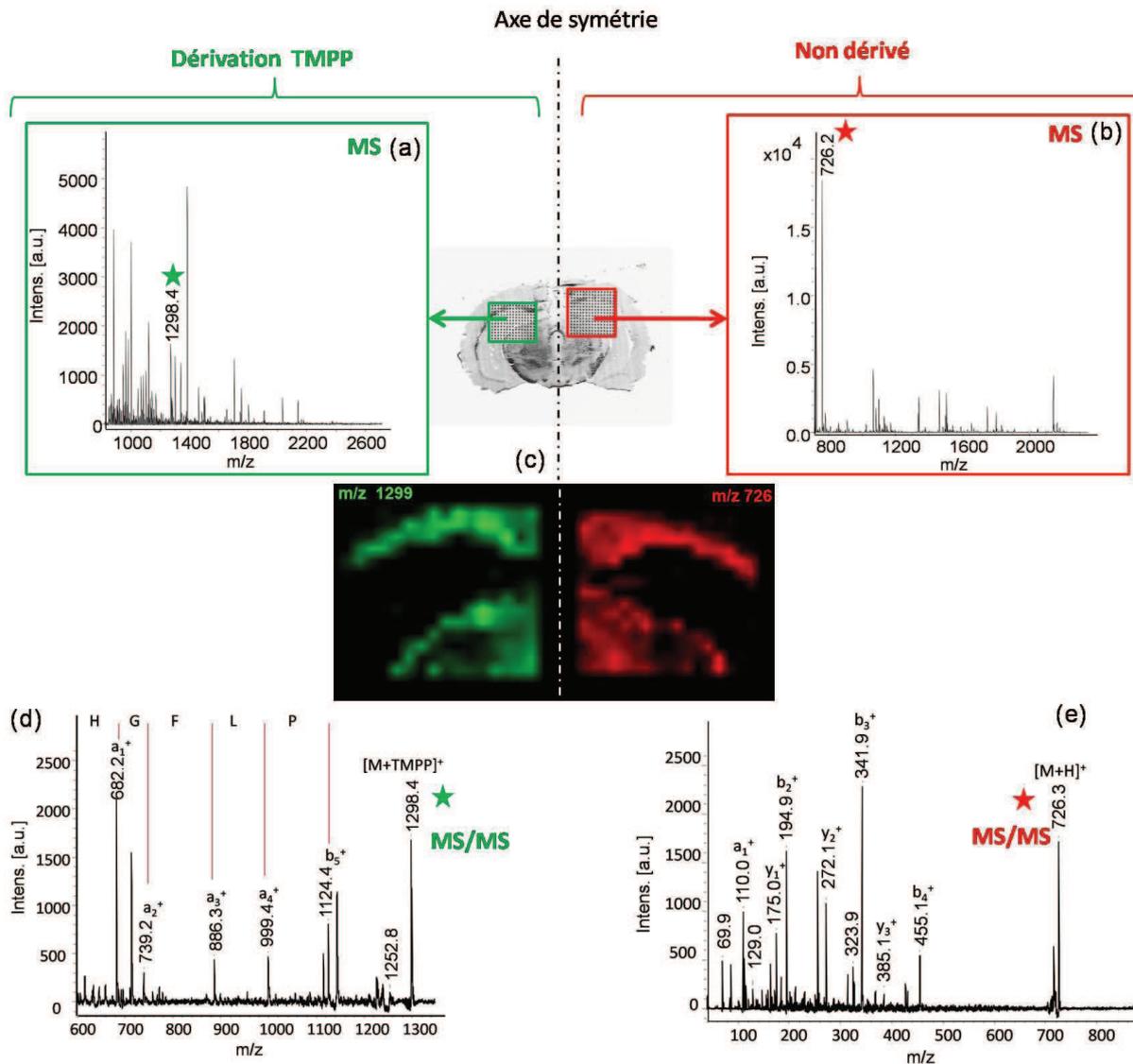


Figure 111 Spectres de masse enregistrés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat après (a) digestion trypsique et dérivation TMPP et (b) digestion trypsique. (c) Images MALDI des ions m/z 726 (rouge) et m/z 1299 (vert). Spectres MS/MS enregistrés à partir de l'ion (d) m/z 1298.4 et (e) m/z 726.3.

D'autres peptides dérivés ont également été testés mais il semblerait que l'utilisation du PSD (ou du LIFT) ne soit pas assez efficace pour permettre la fragmentation de tous les peptides dérivés. Dans de nombreux cas, seul le pic de base correspondant à la perte du TMPP est observé. Il est donc indispensable de disposer d'un appareil permettant d'apporter plus d'énergie interne à ces peptides pour obtenir une fragmentation efficace. Ceci peut être réalisé avec un instrument équipé d'une cellule de collision afin d'effectuer des fragmentations par

CID. Il a, en effet, été montré, que dans ce cas de figure, il fallait tout de même augmenter l'énergie de collision jusqu'à 80-90 V pour obtenir une fragmentation efficace³⁵². Il a aussi été montré qu'il était possible d'utiliser une autre enzyme, la carboxypeptidase B afin de retirer uniquement l'arginine en position C-terminale dans le cas de fragments de digestion trypsique³⁵². Le retrait de l'acide aminé basique en position C-terminale permet d'augmenter la mobilité du proton et entraîne alors une augmentation des rendements de fragmentation. Ceci reste une voie intéressante à explorer par la suite pour renforcer l'efficacité de fragmentation. Le TMPP semble donc être un réactif particulièrement prometteur. En effet, il permet une nette simplification des spectres MS/MS et donc une identification plus sûre des protéines. De plus, la réaction de dérivation s'effectuant à température ambiante, ce réactif peut être utilisé en mode imagerie. Enfin il ne nécessite pas la présence d'un résidu d'acide aminé basique en position C-terminale et est donc compatible avec toutes les digestions.

4.4. Conclusion

L'utilisation des dérivations N-terminales des peptides issus de digestion afin de faciliter l'interprétation des spectres MS/MS est une très bonne stratégie pour obtenir une meilleure identification des protéines directement sur tissus. Après optimisation des protocoles de dérivation, la majorité des peptides ont été dérivés quelque soit le réactif utilisé.

La comparaison des dérivations apportant une charge négative conduit à montrer que le 3-SBASE est un réactif plus efficace que le 4-SPITC. En effet, non seulement le rendement de réaction est supérieur lors de l'utilisation de ce réactif mais, de plus, il ne conduit pas à l'observation de la perte du réactif comme pic de base sur les spectres MS/MS. Du point de vue de la fragmentation, les deux réactifs conduisent à l'observation d'une série complète d'ions y_1^+ . Il a été montré que les dérivations peuvent être effectuées après une digestion trypsique afin d'identifier la séquence des peptides présentant une distribution particulière déterminée par imagerie MALDI. L'interrogation en banque de données est alors facilitée et non ambiguë conduisant à une meilleure identification des protéines. Cependant, dans la plupart des cas, seuls les peptides contenant des arginines en position C-terminale sont détectés après dérivation. Ceci est expliqué par la plus grande basicité des arginines par rapport aux lysines. Il faut donc envisager une réaction de guanidination permettant de convertir les lysines en homo-arginines afin d'augmenter le nombre des peptides dérivés

observés en élargissant aux peptides de digestion présentant une lysine en position C-terminale³⁴⁸⁻³⁵¹. De plus, cette réaction permettrait de protéger les lysines évitant ainsi une double dérivation potentielle des peptides. Il convient aussi de noter que lorsque qu'un peptide présente un clivage manqué, la série d'ions y_i^+ s'arrête à l'arginine interne à la séquence conduisant à l'observation d'une série incomplète d'ions y_i^+ . Il est donc très important de pouvoir améliorer la digestion enzymatique sur coupe pour limiter au maximum ces clivages manqués. Le 4-SPITC ainsi que le 3-SBASE ont été testés pour une utilisation en mode imagerie, mais, malheureusement sans succès. Les hypothèses permettant d'expliquer cet insuccès sont soit un rendement de dérivation pratiquement nul, soit des problèmes de cristallisation avec la matrice. Ceci est d'une part attribué au fait que les peptides présentent une efficacité d'ionisation plus faible que leurs homologues non dérivés mais aussi par une efficacité d'extraction des peptides plus faible compte tenu des volumes déposés en mode micro-dépôts.

L'apport d'une charge positive en position N-terminale des peptides par utilisation du réactif TMPP s'est révélé être une stratégie particulièrement intéressante pour la dérivation *in situ* des peptides. Le TMPP présente plusieurs avantages parmi lesquels il faut notamment citer i) sa capacité à présenter une orientation de fragmentation indépendante de la présence d'un acide aminé basique en position C-terminale, ii) son indépendance vis-à-vis de la composition en acides aminés du peptide et iii) sa réactivité à température ambiante. Ce réactif conduit à la formation d'une série majoritaire d'ions a_i^+ et permet le séquençage *de novo*. Avec la possibilité d'utiliser ce réactif à température ambiante, l'adaptation sur coupe de tissu et plus particulièrement en mode imagerie a pu être possible après optimisation des protocoles. Des images des peptides dérivés ont ainsi pu être réalisées. Cependant, l'utilisation de ce réactif nécessite une méthode d'activation des ions permettant un apport d'énergie interne plus important pour que la fragmentation puisse se produire. En effet, pour un grand nombre de peptides la fragmentation basée sur la décomposition métastable des ions n'est pas suffisante et conduit alors à la détection d'un pic unique provenant de la perte du TMPP.

De manière générale, les dérivations N-terminales des peptides, issues ou non de digestion, se sont révélées une excellente stratégie pour une identification sûre des protéines directement à partir des tissus. Une telle stratégie permet donc d'envisager l'identification *in situ* sur tissu de marqueurs potentiels d'un état physiologique tel que mis en évidence par imagerie MALDI.

5. Conclusion

10 ans après son introduction, l'imagerie MALDI est devenue un outil puissant pour la détection et la localisation de molécules aussi bien endogènes (lipides, peptides, protéines...) qu'exogènes (médicaments) au sein de tissus. L'intérêt de la technologie s'est fait sentir au fil des ans au travers des applications de plus en plus nombreuses rencontrées dans le domaine biologique et en particulier dans le cadre d'études pathologiques. Associée aux nouveaux outils statistiques tels que l'analyse multivariée, l'imagerie MALDI est devenue une technique de choix pour la mise en évidence de molécules différentiellement régulées liées au phénotype des cellules présentes comme dans le cadre d'une pathologie. Ainsi, l'imagerie MALDI se développe comme un nouvel outil de diagnostic apportant un complément moléculaire aux outils de diagnostic classique. Cependant, si la technologie a largement évolué depuis son introduction de nombreux développements restaient encore à effectuer comme nous l'avons abordé dans ce manuscrit.

Ainsi, dans ces travaux de recherche je me suis plus spécifiquement attaché aux développements liés à la préparation de l'échantillon et aux stratégies d'identification. Dans une première partie nous avons optimisé le mode de dépôt de la matrice et des réactifs. Nous nous sommes plus spécifiquement attachés au développement du micro-dépôt automatisé par système piézoélectrique qui permet de délivrer des gouttelettes d'une centaine de picolitre sur une région très localisée ou sur l'ensemble de la coupe. Les différentes optimisations dont celle de la distance entre la tête piézoélectrique et l'échantillon ont permis de très nettement améliorer la précision et la reproductibilité des dépôts, permettant ainsi une augmentation de la résolution des images tout en conservant les mêmes performances analytiques. Ceci est un net avantage dans le cadre de digestion enzymatique *in situ* où la solution de trypsine et de matrice ne présentent pas les mêmes propriétés (viscosité...) ce qui peut entraîner une différence dans l'éjection des gouttelettes.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur les matrices MALDI pour leur rôle incontournable dans le processus MALDI et leur influence pour la qualité spectrale. Nous nous sommes en particulier intéressés aux matrices ioniques certaines de ces matrices ayant précédemment montrées des performances intéressantes pour l'analyse de tissus. Différentes matrices liquides et solides ont ainsi été étudiées pour l'analyse des lipides, peptides et protéines. Les matrices ioniques liquides 2,5-DHB/ANI et 2,5-DHB/3AP se sont révélées particulièrement performantes pour l'analyse des lipides. De plus, ces matrices présentent la

particularité d'être parfaitement homogènes par leur aspect visqueux permettant une meilleure détection des lipides que se soit en mode positif que négatif. Similairement, l'HCCA/ANI et l'HCCA/3AP conduisent à une réelle amélioration de l'analyse des peptides et protéines de faible poids moléculaire. Pour les protéines, des matrices ioniques solides telles que SA/ANI ou SA/3AP permettent un gain net d'intensité et de rapport signal sur bruit par rapport à la matrice conventionnelle SA. Ainsi, en faisant varier le couple acide/base (ou matrice classique/base) il est possible de générer tout un panel de matrices ioniques présentant des performances supérieures aux matrices MALDI conventionnelles et adaptées à différentes famille de composés. Il faut également remarquer que ces matrices ioniques sont facilement compatibles avec le mode de micro-dépôts automatique et permettent ainsi un dépôt stable et précis permettant de réduire le temps de préparation en augmentant la fréquence d'éjection de l'instrument. A l'inverse les matrices conventionnelles restent difficiles à déposer en mode micro-dépôts. Le dépôt est peu stable à cause de problème de cristallisation de la matrice dans la tête piézoélectrique. A ce titre les matrices ioniques sont extrêmement performantes à la fois en terme analytique et de dépôt.

Si l'imagerie MALDI a montré sa capacité pour générer des images moléculaires, elle doit encore faire ses preuves pour permettre une identification *in situ* des molécules étudiées. En effet, l'imagerie MALDI permet en général de mettre en évidence des marqueurs d'un phénotype cellulaire lié au contexte physiologique ou physiopathologique. Cependant, la possibilité de réaliser directement l'identification de ces marqueurs directement sur les tissus, voir sur la même section de tissu offrirait un grand bon à la technologie. Les stratégies d'identification en imagerie MALDI suivent le même schéma que les stratégies de protéomique classique par approches « Bottom-Up » et « Top-Down ». De par les caractéristiques des sources MALDI et des instruments actuellement utilisés les approches « Bottom-Up » représentent une stratégie plus immédiate pour une identification en mode MS/MS classique *i.e.* par décompositions métastables ou par CID pour des peptides de poids moléculaire relativement faible. Ainsi, nous nous sommes intéressés aux développements de l'imagerie MALDI en mode « Bottom-Up ». Ces études ont conduit à développer cette stratégie en mode micro-dépôts de manière à conserver la localisation des peptides issus de digestion tout en atteignant un bon rendement de digestion. Après optimisation de la méthode, de nombreux peptides de digestion ont pu être détectés et localisés. Leur identification a donc pu être entreprise par études en mode MS/MS suivies d'une confrontation aux banques de données. L'obtention de la séquence des peptides étant le premier pas vers l'identification de la protéine dans sa totalité. Si des travaux ont permis d'identifier certaines protéines par cette

technique ¹⁷³, l'identification des protéines dans leur intégralité reste difficile sachant que la digestion de multiples protéines simultanément ne permet pas de bénéficier d'interrogation sur la base du PMF et ne repose alors que sur l'identification directe à partir des interrogations sur la base des données issues de la MS/MS.

Ainsi, afin d'améliorer les capacités d'identification, nous nous sommes intéressés par la suite au développement de stratégies permettant de déterminer la structure primaire des peptides rapidement et sans ambiguïté. Les recherches ont été plus spécifiquement orientées vers l'étude de la dérivation des peptides *in situ* sur tissus afin d'augmenter les rendements de fragmentation tout en orientant ces dernières. En particulier, notre choix s'est porté sur les dérivations N-terminales. Des dérivations chimiques sur la partie N-terminale des peptides de digestion par apport d'une charge négative permanente ont permis d'orienter la fragmentation vers une série d'ions y_i^+ majoritaire facilitant grandement l'interprétation des spectres MS/MS et par conséquent l'identification des protéines. Après optimisation des procédures avec les réactifs 4-SPTIC et 3-SBASE, il a pu être démontré qu'une telle stratégie présentait un apport important pour l'obtention des séquences des peptides sur tissus. Cependant, ces dérivations restent difficilement compatibles en mode imagerie pour l'instant. Les dérivations N-terminales par apport d'une charge positive ont également été abordées par l'utilisation d'un réactif tel que le TMPP. Avec la possibilité de réaliser la réaction de dérivation à température ambiante, le TMPP, s'est montré à la fois compatible avec le mode imagerie mais également de simplifier les spectres MS/MS en orientant les ions fragments vers une série d'ions majoritaire a_i^+ . Cependant, la charge n'étant pas apportée par un proton mobile mais par un phosphonium, la fragmentation nécessite une énergie interne plus importante. Ainsi, les peptides dérivés au TMPP peuvent se fragmenter difficilement sur des instruments pour lesquels la fragmentation est de type métastable et non activée. Il apparaît donc intéressant de pouvoir transplanter les études réalisées à d'autres instrumentations que celles utilisées dans la présente étude. Quoi qu'il en soit, les dérivations N-terminales des peptides représentent une stratégie à exploiter pour l'identification de protéines *in situ* sur les tissus par approche « Bottom-Up ».

Si les approches « Bottom-Up » représentent l'approche la plus immédiate à l'identification des protéines, certaines limitations peuvent être rencontrées dans l'interprétation des données. Les stratégies de dérivations permettent de décomplexifier les données issues de la MS/MS. Cependant, la digestion des protéines génère une complexification des données en multipliant le nombre de composés à analyser. Ainsi, de nombreux peptides isobariques ou de m/z proches sont générés. Ces peptides sont parfois

difficiles à séparer. Sur une instrumentation classique de type MALDI-TOF il est assez fréquent de supputer la présence de plusieurs peptides sous l'enveloppe du même pic. Ceci est évident dans les spectres MS/MS ou les séquences de plusieurs peptides se superposent dans les spectres. L'une des voies alternatives afin de gérer ces complexités consiste à étudier l'apport de nouvelles instrumentations telles que des instrumentations à plus haute résolution spectrale (e.g. analyseur de type FT-ICR ¹²⁸ ou orbitrap ¹⁰⁹) ou à multiple séparation (e.g. Mobilité ionique couplée à la MS ¹¹¹). De telles instrumentations ont été récemment utilisées et permettent de simplifier l'identification des peptides. Il serait intéressant de pouvoir coupler les dérivations N-terminales à ces nouvelles instrumentations. Cependant, d'autres développements restent encore à effectuer. L'aspect bioinformatique n'est pas à négliger. Pour aider l'approche par « Bottom-Up ». Des logiciels permettant d'associer aux identifications des peptides leur localisation dans le tissu constitue entre autre un moyen simple pour éliminer un certain nombre de faux positifs. D'autres développements tels que des logiciels permettant de balayer rapidement l'ensemble des séquences peptidiques correspondant à une masse donnée afin de déterminer le plus grand degré de convergence peuvent également être envisagés.

Cependant, les perspectives implicites de ce travail doivent conduire également à réfléchir au développement des stratégies d'identification sur tissus par approches « Top-Down ». Les approches « Top-Down » constituent un véritable défi pour l'imagerie MALDI mais également une voie qui peut, a priori, lui apporter encore un pas important en avant dans ces développements. La difficulté des approches « Top-Down » réside dans l'incapacité en MALDI à créer de nombreux états de charge comme en ESI. Ceci limite à la fois les instrumentations utilisables en rapport avec les gammes de m/z accessibles des différents analyseurs mais également les modes d'activation pour la fragmentation (e.g. ECD, ETD ^{309, 310}). Deux perspectives s'ouvrent tout naturellement alors pour contourner ce problème. Il faudra dans l'avenir soit se montrer capable de mieux comprendre les processus fondamentaux MALDI de manière à contrôler le nombre d'états de charge, soit trouver une voie alternative permettant de générer plus d'états de charge. Le premier aspect est un programme à long terme pour lequel il ne nous est, dans le contexte actuel, pas possible de statuer sur une éventuelle réussite mais qui mérite d'être exploré. La deuxième partie peut trouver une débouchée au travers de la mise en œuvre de nouvelles sources de production d'ions telles que les sources MALDESI ²⁴³⁻²⁴⁵, ELDI ²³⁸⁻²⁴² ou apparentées utilisant une première étape de désorption et/ou de désorption/ionisation par un laser suivie par une étape d'entraînement de ces molécules en phase gazeuse par des gouttelettes de solvant fortement

chargées générées en mode ESI. Des sources hybrides MALDI/ESI permettraient peut-être d'atteindre des états de charge suffisants pour une bonne comptabilité avec les instrumentations et les modes d'activation des ions. Une telle perspective est à envisager dans un avenir à plus court terme. Il faut également mentionner la possibilité comme dernière alternative de rechercher des modes de fragmentation des protéines intactes ne nécessitant pas d'ions multichargés. A ce titre, il faut en particulier aborder le cas de l'In Source Decay (ISD). Cette méthode permet d'obtenir très rapidement un spectre contenant des ions fragments des protéines par augmentation de l'énergie laser et du temps de décomposition. Facilement employable en MALDI-TOF, l'ISD permet de remonter une partie de la séquence de la protéine en calculant la différence de masse entre les pics ISD. Cette méthode est utilisée sur des composés purifiés puisqu'elle n'implique pas d'étape de sélection des ions en sus et remplace la dégradation d'Edman. Les séquences déterminées permettent de remonter à la séquence protéique et notamment par comparaison de séquences dans des banques de données. Dans le cas d'une application sur coupe ou d'un mélange complexe de protéines, de nombreux ions ISD peuvent être générés. L'image de ces ions ISD peut ensuite être effectuée et si un de ces ions présente une régionalisation particulière, il est alors possible de le fragmenter afin de réaliser une expérience de type pseudo MS³. Les premiers résultats ont montré qu'il était possible de réaliser ce type d'expériences. Il a été démontré que certaines matrices incluant la 1,5-diaminonaphtalène³²⁴ présentaient de bonnes caractéristiques pour arracher un proton (H⁺) aux molécules d'intérêt nécessaire pour les expériences ISD. Une nouvelle matrice ionique permettant d'augmenter le nombre d'ion ISD sera également une bonne alternative. L'ISD à partir de tissus est une alternative à exploiter dans un avenir proche pour essayer d'approcher l'identification directe de protéines. Cependant, la non sélection des ions génère des données également complexes à traiter. L'analyse PCA des ions ISD et leur localisation en lien avec la localisation de la protéine entière devrait permettre de simplifier les informations à traiter.

Quoiqu'il en soit le développement des approches « Top-Down » nécessite une bonne analyse des différentes protéines composant le tissu. Actuellement, dans des conditions classiques d'analyse peu de protéines au-delà de m/z 20000 sont analysées. Il apparaît vital d'améliorer la capacité d'analyse des protéines de plus haut poids moléculaire pour en obtenir une identification et une localisation efficace. L'utilisation de traitements des tissus avant analyses s'est révélée une approche intéressante. Le traitement des tissus par des solvants organiques constitue une première approche permettant d'améliorer l'analyse de ces protéines de haute masse par retrait des sels et de certains lipides comme en témoignent les précédents

travaux ^{106, 107}. La combinaison de traitement à l'acétone puis au chloroforme et à l'éthanol s'est révélée une combinaison efficace conduisant au plus grand nombre de signaux détectés, une intensité des signaux plus importante et un rapport signal sur bruit augmenté. Cependant, malgré l'utilisation combinée de ces traitements et des matrices ioniques, seules des protéines jusqu'à m/z 20000 et quelques protéines entre m/z 20000 et 30000 sont réellement observées. L'observation de plus hautes masses passe par le développement d'approches permettant une meilleure solubilisation et incorporation dans les cristaux de matrices de ces protéines de propriétés physico-chimiques différentes. La détection de ces protéines passe également par l'utilisation de détecteurs plus spécifiquement adaptés ou « détecteur hautes masses ». Nous avons pu montrer qu'il était possible par une utilisation conjointe de traitements, impliquant des solvants peu polaires, une diminution du pH et un détecteur haute masse d'observer des signaux jusqu'à m/z 10 000. Ces études constituent un préliminaire à d'autres études où nous devons rechercher les conditions pour l'analyse des différentes protéines dépendamment de leurs propriétés physico-chimiques mais également pour adapter ces préparations aux conditions permettant de fonctionner en mode imagerie.

Ainsi l'ensemble des travaux réalisés ont permis d'explorer de nouvelles voies et d'améliorer les performances de l'imagerie MALDI en termes d'images mais également d'identification des peptides et protéines *in situ* sur tissus. Cependant, comme nous l'avons abordé ce travail ouvre également à de nombreuses perspectives qui devront être abordées pour faire encore franchir un pas à l'imagerie MALDI.

6. Matériel & Méthodes

6.1. Réactifs

Le 4-sulphophenyl isothiocyanate (4-SPITC), l'acide 3-sulfobenzoïque (3-SBA), le dicyclohexylcarbodiimide (DCC), le N-hydroxysuccinimide (NHS), l' α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide sinapinique (SA), le 2,3,4-trihydroxyacetophenone (THAP), le 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP), le 6-aza-2-thiothymine (ATT), l'acide trifluoroacétique (TFA), le diméthyl sulfoxyde (DMSO), l'acetone, l'acetonitrile (ACN), l'aniline (ANI), le N,N-diméthylaniline (DANI), le N,N-diéthylaniline (DEANI), le para phenylènediamine (pPA), le méthanol (MeOH) l'éthanol (EtOH), le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP), le chloroforme, l'eau CHROMASOLV PLUS (H₂O), le 3-acétylpyridine (3AP), la triéthylamine (TEA) la pyridine (Pyr), le N-succinimidylloxycarbonylméthyl tris(2,4,6-triméthoxyphenyl)phosphonium bromide (TMPP) ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'enzyme trypsine fut obtenue chez Promega (Charbonnières-les-Bains, France).

6.2. Préparation des échantillons et des tissus

6.2.1. 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).

6.2.2. Coupes de cerveaux de rats

Des males adultes Wistar, pesant 250-350g (accréditation du ministère de l'agriculture N° 04860) ont été utilisés durant cette thèse et maintenus sous conditions standards. Les animaux sont sacrifiés par décapitation et immédiatement disséqués pour isoler le cerveau. Les cerveaux sont immédiatement congelés par immersion lente dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide pour éviter l'éclatement des cellules. Ils sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation pour éviter les dégradations causées par la température et l'oxydation.

Des coupes 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.

6.2.3. 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.

6.2.4. Digestion enzymatique in situ

Une solution contenant 25 µg/mL de trypsine est préparée dans de l'H₂O et dans un tampon NH₄HCO₃ 50 mM (pH=8)

6.2.5. Dérivations N-terminales

Les solutions de 4-SPITC sont préparées à 1 mg/mL, 10 mg/mL et 20 mg/mL dans un tampon NH₄HCO₃ 50 mM (pH=8).

L'acide 3-sulfobenzoyl succinimidyl ester (3-SBASE) est préparé suivant le protocole décrit par Alley et al.³⁴². 1g de 3-SBA est solubilisé dans 10 mL de DMSO. L'équivalent molaire de NHS ainsi que 1.5 équivalent de (DCC) sont ajoutés au mélange réactionnel qui est ensuite placé sous agitation toute une nuit. Le produit de réaction secondaire, le dicyclohexylurea (DCU) est ensuite filtré. Le 3-SBASE est obtenu par

précipitation en ajoutant très lentement au mélange environ 60 mL d'acétone froid. Le SBASE est filtré puis lavé deux fois à l'acétone avant d'être séché.

Des solutions de 3-SBASE à 1 mg/mL, 10 mg/mL et 20 mg/mL sont préparées dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM (pH=8).

Le **TMMP** est préparé à 1 mg/mL dans un mélange AcN/ H_2O (3:7, v/v). Une solution d'AcN/ NH_4HCO_3 (50 mM) (3:7, v/v) ainsi qu'une solution d'AcN/ H_2O (3:7, v/v) contenant 1% de TEA sont aussi préparées pour que la réaction puisse être réalisée.

6.2.6. Préparation des matrices

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

Pour l'analyse de lipides, plusieurs solutions de matrice sont préparées. Une solution de 2,5-DHB à 20 mg/mL, une solution de 2,5-DHB à 10 mg/mL contenant 1,2 éq. d'ANI, une solution de 2,5-DHB à 10 mg/mL contenant 1,2 éq. de DANI, une solution de 2,5-DHB à 10 mg/mL contenant 1,2 éq. de DEANI, une solution de 2,5-DHB à 10 mg/mL contenant 1,2 éq. de 3AP, une solution de 2,5-DHB à 10 mg/mL contenant 1 éq. de Pyr, une solution de DHAP à 10 mg/mL et une solution d'ATT à 10 mg/mL. Toutes les matrices sont solubilisées dans un mélange EtOH/TFA 0.1% (7:3, v/v).

Pour l'analyse de protéines, une solution de SA à 20 mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v), une solution de SA à 20 mg/mL dans du HFIP, une solution de SA dans un mélange EtOH/TFA 0.1% (8:2, v/v), une solution de SA à 10 mg/mL dans un mélange AcN/TFA 0.1% (6:4, v/v) une solution de SA à 10 mg/mL contenant 1 éq d'ANI et une solution de SA à 10 mg/mL contenant 1 éq de 3AP dans un mélange AcN/TFA 0.1% (6:4, v/v) sont préparées.

6.3. Préparation des échantillons pour l'analyse MALDI

6.3.1. Analyse des lipides

Les dépôts automatiques des matrices sont réalisés à l'aide du Chemical Inkjet Printer (CHIP-1000, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japon) qui est un microspotter permettant de délivrer des gouttelettes d'une centaine de picolitres. 20 nL des solutions de matrice ATT, DHAP, 2,5-DHB, 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/DANI, 2,5-DHB/DEANI, 2,5-DHB/3AP et 2,5-DHP/Pyr sont déposés sur chaque spot qui sont espacés de 250 μm centre à centre. 5 gouttelettes de 100 pL sont déposées sur chaque spot et par conséquent 40 cycles sont nécessaires afin d'obtenir le volume final. Les images sont ensuite enregistrées en mode réflecteur positif ou négatif avec un UltraFlex II (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) qui est un MALDI-TOF/TOF équipé d'un laser SmartBeam pouvant atteindre une fréquence de 200 Hz. et contrôlé par le logiciel FlexControl 3.0 (Build 158). Sur chaque spot, 500 spectres sont accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz et les images sont reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1 (Build 15) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

6.3.2. Analyse des peptides

Pour l'imagerie des peptides, les solutions de matrices sont déposées à l'aide su CHIP-1000 en définissant des aires constituées de spots séparés de 250 μm centre à centre. Sur chaque spot, 20 nL des solutions de matrice HCCA/ANI, HCCA/pPA et HCCA/3AP sont déposés. 5 gouttelettes de 100 pL sont déposées sur chaque spot et par conséquent 40 cycles sont nécessaires afin d'obtenir le volume final. Les spectres sont ensuite enregistrés en mode réflecteur positif avec l'UltraFlex II sur une gamme allant de m/z 1000 à m/z 5500. Sur chaque spot, 500 spectres sont accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz.

6.3.3. Analyse des protéines

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 250 μm centre à centre. Sur chaque spot, 15 nL des solutions de SA, SA/ANI et SA/3AP sont déposés. 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 200 Hz et les images sont reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

Pour la détection des protéines de haut poids moléculaire, une solution de TFE/TFA 10% (1:1, v/v) est déposée à la micropipette de façon à recouvrir l'ensemble de la coupe. Après séchage, une solution de SA à 20 mg/mL dans l'EtOH/TFA 0.1% (8:2, v/v) puis une solution de SA à 10 mg/mL dans l'AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) sont déposées à la micropipette de manière à recouvrir l'ensemble de la coupe.

Un autre protocole consiste à déposer une solution de SA à 20 mg/mL dans du HFIP puis une solution de SA à 20 mg/mL dans l'AcN/TFA 0.1% (7:3, v/v) 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.

6.3.4. 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 250 μm centre à centre. 20 nL d'une solution de trypsine à 25 $\mu\text{g/mL}$ dans l' H_2O ou le tampon NH_4HCO_3 sont appliqués à chaque spot. 5 gouttelettes de 100 pL sont déposées sur chaque spot 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_2O (1:1, v/v) pendant 2 heures. La matrice HCCA/ANI ou HCCA/3AP est ensuite déposée en suivant le quadrillage décrit par 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 200 Hz 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 25 $\mu\text{g/mL}$ 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 1 heure dans une boîte saturée en MeOH/ H_2O (1:1, v/v).

6.3.5. Dérivations N-Terminales

La dérivation 4-SPITC est effectuée en appliquant une solution de 4-SPITC dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM à la micropipette de sorte que l'ensemble de la coupe soit recouverte. La coupe est ensuite mise à incuber à 55°C pendant 1 heure dans une boîte saturée en MeOH/H₂O (1:1, v/v). Après séchage complet, la matrice HCCA à 20 mg/mL est ensuite déposée à la micropipette sur l'ensemble de la coupe.

La dérivation 3-SBASE est effectuée en appliquant une solution de 4-SPITC dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM à la micropipette de sorte que l'ensemble de la coupe soit recouverte. La coupe est ensuite mise à incuber à 35°C pendant 1 heure dans une boîte saturée en MeOH/H₂O (1:1, v/v). Après séchage complet, la matrice HCCA à 20 mg/mL est ensuite déposée à la micropipette sur l'ensemble de la coupe.

La dérivation TMPP est effectuée en appliquant une solution de TMPP à 1 mg/mL dans une solution d'AcN/H₂O (3:7, v/v) à la micropipette de sorte que l'ensemble de la coupe soit recouverte. Après séchage, une solution d'AcN/H₂O (3:7, v/v) contenant 1% de TEA est ensuite déposée à la micropipette en couvrant l'ensemble de la coupe pour que la réaction puisse être réalisée. La coupe est ensuite mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante. Après séchage complet, la matrice HCCA/3AP est ensuite déposée à la micropipette sur l'ensemble de la coupe. **L'automatisation de la méthode** est réalisée en utilisant le CHIP-1000. 10 nL de la solution de TMPP à 1 mg/mL dans une solution d'AcN/H₂O (3:7, v/v) est déposé suivant le quadrillage décrit par les spots de digestion. Une solution d'AcN/H₂O (3:7, v/v) contenant 1% de TEA est ensuite déposée sur les mêmes spots en suivant un quadrillage défini par 6 spots sur 6 spots afin de conserver une humidité pour que la réaction s'effectue. La matrice HCCA/3AP est ensuite déposée sur les spots de dérivation. Les spectres sont ensuite enregistrés en mode réflecteur positif avec l'UltraFlex II sur une gamme allant de m/z 1000 à m/z 5500. Sur chaque spot, 500 spectres sont accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz et les images sont reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

6.3.6. 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 digérées ou digérées et dérivées, 5000 spectres sont enregistrés incluant 1000 spectres pour l'ion parent.

6.4. 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 BiTools 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 0.5 Da et 1 Da pour l'ion parent et les ions fragments.

Références bibliographiques

- (1) Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F.; Williams, K. L. *Biotechnol Genet Eng Rev* **1996**, *13*, 19-50.
- (2) Raymond, S.; Weintraub, L. *Science* **1959**, *130*, 711.
- (3) Svensson, H. *Acta Chem. Scand.* **1962**, *16*, 456.
- (4) Fawcett, J. S. *FEBS Lett* **1968**, *1*, 81-82.
- (5) Dale, G.; Latner, A. L. *Lancet* **1968**, *1*, 847-848.
- (6) Awdeh, Z. L.; Williamson, A. R.; Askonas, B. A. *Nature* **1968**, *219*, 66-67.
- (7) Kenrick, K. G.; Margolis, J. *Anal Biochem* **1970**, *33*, 204-207.
- (8) Klose, J. *Humangenetik* **1975**, *26*, 231-243.
- (9) Scheele, G. A. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 5375-5385.
- (10) O'Farrell, P. H. *J Biol Chem* **1975**, *250*, 4007-4021.
- (11) Bjellqvist, B.; Ek, K.; Righetti, P. G.; Gianazza, E.; Gorg, A.; Westermeier, R.; Postel, W. *J Biochem Biophys Methods* **1982**, *6*, 317-339.
- (12) Bjellqvist, B.; Hughes, G. J.; Pasquali, C.; Paquet, N.; Ravier, F.; Sanchez, J. C.; Frutiger, S.; Hochstrasser, D. *Electrophoresis* **1993**, *14*, 1023-1031.
- (13) Rabilloud, T. *Electrophoresis* **1994**, *15*, 278-282.
- (14) Rabilloud, T.; Adessi, C.; Giraudel, A.; Lunardi, J. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 307-316.
- (15) Edman, P.; Begg, G. *Eur J Biochem* **1967**, *1*, 80-91.
- (16) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 4350-4354.
- (17) Hunt, D. F.; Yates, J. R., 3rd; Shabanowitz, J.; Winston, S.; Hauer, C. R. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1986**, *83*, 6233-6237.
- (18) Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lutzenkirchen, F. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1993**, *7*, 902-910.
- (19) Spengler, B. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1019-1036.
- (20) Medzihradzky, K. F.; Campbell, J. M.; Baldwin, M. A.; Falick, A. M.; Juhasz, P.; Vestal, M. L.; Burlingame, A. L. *Anal Chem* **2000**, *72*, 552-558.
- (21) Kriwacki, R. W.; Siuzdak, G. *Methods Mol Biol* **2000**, *146*, 223-238.
- (22) Davis, A. M.; Riley, R. J. *Curr Opin Chem Biol* **2004**, *8*, 378-386.
- (23) Li, A. P.; Segall, M. *Drug Discov Today* **2002**, *7*, 25-27.
- (24) Ackermann, B. L.; Berna, M. J.; Murphy, A. T. *Curr Top Med Chem* **2002**, *2*, 53-66.
- (25) Blankenberg, F. G. *J Cell Biochem* **2003**, *90*, 443-453.
- (26) Solon, E. G.; Balani, S. K.; Lee, F. W. *Curr Drug Metab* **2002**, *3*, 451-462.
- (27) Koo, O. M.; Rubinstein, I.; Onyuksel, H. *Nanomedicine* **2005**, *1*, 193-212.
- (28) Luxembourg, S. L.; Mize, T. H.; McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Anal Chem* **2004**, *76*, 5339-5344.
- (29) Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Ten Noever de Brauw, L. C. *Anal Chem* **1978**, *50*, 985.
- (30) Hillenkamp, F.; Unsöld, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R. *Applied Physics A* **1975**, *8*, 341-348.
- (31) Iancu, T. C.; Perl, D. P.; Sternlieb, I.; Lerner, A.; Leshinsky, E.; Kolodny, E. H.; Hsu, A.; Good, P. F. *Biometals* **1996**, *9*, 57-65.
- (32) Verbueken, A. H.; Van Grieken, R. E.; Verpooten, G. A.; De Broe, M. E.; Wedeen, R. P. *Biol Mass Spectrom* **1992**, *21*, 590-596.
- (33) Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Anal Chem* **1985**, *57*, 2935-2939.

- (34) Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* **1987**, *78*, 53-68.
- (35) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- (36) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal Chem* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- (37) Hillenkamp, F.; Karas, M. *Methods Enzymol* **1990**, *193*, 280-295.
- (38) Karas, M.; Bahr, U.; Ingendoh, A.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F. **1990**, *241*, 175-185.
- (39) Karas, M.; Gluckmann, M.; Schafer, J. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*, 1-12.
- (40) Asara, J. M.; Allison, J. *Anal Chem* **1999**, *71*, 2866-2870.
- (41) Jaskolla, T. W.; Lehmann, W. D.; Karas, M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 12200-12205.
- (42) Jaskolla, T.; Fuchs, B.; Karas, M.; Schiller, J. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 867-874.
- (43) Jaskolla, T. W.; Papatotiriou, D. G.; Karas, M. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 3588-3597.
- (44) Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *int J Mass Spectrom Ion Proc* **1991**, *111*, 89-102.
- (45) Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1989**, *3*, 432-435.
- (46) Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T. *Org Mass Spectrom* **1992**, *27*, 156-158.
- (47) Pieles, U.; Zurcher, W.; Schar, M.; Moser, H. E. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 3191-3196.
- (48) Karas, M.; Bahr, U.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Tsarbopoulos, A.; Pramanik, B. N. *Anal Chem* **1995**, *67*, 675-679.
- (49) Garden, R. W.; Sweedler, J. V. *Anal Chem* **2000**, *72*, 30-36.
- (50) Horneffer, V.; Forsmann, A.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Kubitscheck, U. *Anal Chem* **2001**, *73*, 1016-1022.
- (51) Spengler, B.; Hubert, M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 735-748.
- (52) Nicola, A. J.; Gusev, A. I.; Proctor, A.; Jackson, E. K.; Hercules, D. M. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1995**, *9*, 1164-1171.
- (53) Vorm, O.; Roepstorff, P.; Mann, M. *Anal Chem* **1994**, *66*, 3281-3287.
- (54) Onnerfjord, P.; Ekstrom, S.; Bergquist, J.; Nilsson, J.; Laurell, T.; Marko-Varga, G. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1999**, *13*, 315-322.
- (55) Lin, Y. S.; Chen, Y. C. *Anal Chem* **2002**, *74*, 5793-5798.
- (56) Turney, K.; Harrison, W. W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18*, 629-635.
- (57) Berkenkamp, S.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 7003-7007.
- (58) Laiko, V. V.; Taranenko, N. I.; Berkout, V. D.; Yakshin, M. A.; Prasad, C. R.; Lee, H. S.; Doroshenko, V. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 354-361.
- (59) Laiko, V. V.; Taranenko, N. I.; Doroshenko, V. M. *J Mass Spectrom* **2006**, *41*, 1315-1321.
- (60) Sze, E. T.; Chan, T. W.; Wang, G. *J Am Soc Mass Spectrom* **1998**, *9*, 166-174.
- (61) Armstrong, D. W.; Zhang, L. K.; He, L.; Gross, M. L. *Anal Chem* **2001**, *73*, 3679-3686.
- (62) Barhdadi, R.; Courtinard, C.; Nedelec, J. Y.; Troupel, M. *Chem Commun (Camb)* **2003**, 1434-1435.
- (63) Wasserscheid, P.; Keim, W. *Angew Chem Int Ed Engl* **2000**, *39*, 3772-3789.
- (64) Armstrong, D. W.; He, L.; Liu, Y. S. *Anal Chem* **1999**, *71*, 3873-3876.
- (65) Zabet-Moghaddam, M.; Kruger, R.; Heinzle, E.; Tholey, A. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 1494-1505.

- (66) Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2006**, *78*, 809-819.
- (67) Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17*, 553-560.
- (68) Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. *Anal Chem* **2004**, *76*, 2938-2950.
- (69) Tholey, A.; Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E. *Anal Chem* **2006**, *78*, 291-297.
- (70) Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E.; Lasasosa, M.; Tholey, A. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *384*, 215-224.
- (71) Tholey, A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 1761-1768.
- (72) Li, Y. L.; Gross, M. L.; Hsu, F. F. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 679-682.
- (73) Snovida, S. I.; Rak-Banville, J. M.; Perreault, H. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1138-1146.
- (74) Snovida, S. I.; Chen, V. C.; Perreault, H. *Anal Chem* **2006**, *78*, 8561-8568.
- (75) Li, Y. L.; Gross, M. L. *J Am Soc Mass Spectrom* **2004**, *15*, 1833-1837.
- (76) Li, K. W.; Hoek, R. M.; Smith, F.; Jimenez, C. R.; van der Schors, R. C.; van Veelen, P. A.; Chen, S.; van der Greef, J.; Parish, D. C.; Benjamin, P. R.; Geraerts, W. P. M. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30288-30292.
- (77) Jimenez, C. R.; van Veelen, P. A.; Li, K. W.; Wildering, W. C.; Geraerts, W. P.; Tjaden, U. R.; van der Greef, J. *J Neurochem* **1994**, *62*, 404-407.
- (78) Dreisewerd, K.; Kingston, R.; Geraerts, W. P.; Li, K. W. *Int J Mass Spectrom* **1997**, *169*, 291-299.
- (79) Jimenez, C. R.; Burlingame, A. L. *Exp Nephrol* **1998**, *6*, 421-428.
- (80) Jimenez, C. R.; Li, K. W.; Dreisewerd, K.; Spijker, S.; Kingston, R.; Bateman, R. H.; Burlingame, A. L.; Smit, A. B.; van Minnen, J.; Geraerts, W. P. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2070-2076.
- (81) Rubakhin, S. S.; Greenough, W. T.; Sweedler, J. V. *Anal Chem* **2003**, *75*, 5374-5380.
- (82) Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Anal Chem* **2008**, *80*, 7128-7136.
- (83) Moroz, L. L.; Gillette, R.; Sweedler, J. V. *J Exp Biol* **1999**, *202*, 333-341.
- (84) Li, L.; Garden, R. W.; Sweedler, J. V. *Trends Biotechnol* **2000**, *18*, 151-160.
- (85) Hummon, A. B.; Sweedler, J. V.; Corbin, R. W. *Anal Chem* **2003**, *22*, 515.
- (86) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal Chem* **1997**, *69*, 4751-4760.
- (87) Stoeckli, M.; Farmer, T. B.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **1999**, *10*, 67-71.
- (88) Kieman, J. A. *Microscopy Today* **2000**, 8-14.
- (89) Plenat, F.; Antunes, L.; Haller, T.; Piet-Ounnoughene, M.; Klein-Monhoven, N.; Champigneulle, J.; Chenal, P.; Bland, V.; Garcia-Pimenta, F.; Labouyrie, E. *Ann Pathol* **2001**, *21*, 29-47.
- (90) Plenat, F.; Montagne, K.; Weinbreck, N.; Corby, S.; Champigneulle, J.; Antunes, L.; Bonnet, C.; Maire, C.; Monhoven, N. *Ann Pathol* **2006**, *26*, 8-21.
- (91) Chaurand, P.; Latham, J. C.; Lane, K. B.; Mobley, J. A.; Polosukhin, V. V.; Wirth, P. S.; Nanney, L. B.; Caprioli, R. M. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 3543-3555.
- (92) Shi, S. R.; Chaiwun, B.; Young, L.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. *J Histochem Cytochem* **1993**, *41*, 1599-1604.
- (93) Shi, S. R.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. *J Histochem Cytochem* **1997**, *45*, 327-343.
- (94) Taylor, C. R.; Shi, S. R. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2000**, *8*, 173-174.
- (95) Shi, S. R.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2001**, *9*, 107-116.
- (96) Shi, S. R.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. *J Histochem Cytochem* **2001**, *49*, 931-937.
- (97) Emoto, K.; Yamashita, S.; Okada, Y. *J Histochem Cytochem* **2005**, *53*, 1311-1321.
- (98) Yamashita, S.; Okada, Y. *J Histochem Cytochem* **2005**, *53*, 13-21.

- (99) Shi, S. R.; Liu, C.; Young, L.; Taylor, C. *Biotech Histochem* **2007**, *82*, 301-309.
- (100) Shi, S. R.; Shi, Y.; Taylor, C. R. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **2007**, *36*, 7-10.
- (101) Xu, H.; Yang, L.; Wang, W.; Shi, S. R.; Liu, C.; Liu, Y.; Fang, X.; Taylor, C. R.; Lee, C. S.; Balgley, B. M. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 1098-1108.
- (102) Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 1295-1305.
- (103) Groseclose, M. R.; Massion, P. P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3715-3724.
- (104) Ronci, M.; Bonanno, E.; Colantoni, A.; Pieroni, L.; Di Ilio, C.; Spagnoli, L. G.; Federici, G.; Urbani, A. *Proteomics* **2008**, *8*, 3702-3714.
- (105) Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2003**, *38*, 699-708.
- (106) Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1069-1077.
- (107) Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2006**, *78*, 7145-7153.
- (108) Jackson, S. N.; Ugarov, M.; Egan, T.; Post, J. D.; Langlais, D.; Albert Schultz, J.; Woods, A. S. *J Mass Spectrom* **2007**, *42*, 1093-1098.
- (109) Verhaert, P. D.; Prieto Conaway, M. C.; Pekar, T. M.; Miller, K. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *260*, 177-184.
- (110) Skold, K.; Svensson, M.; Nilsson, A.; Zhang, X.; Nydahl, K.; Caprioli, R. M.; Svenningsson, P.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 262-269.
- (111) 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.
- (112) Chan, K.; Lanthier, P.; Liu, X.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D.; Li, J. *Anal Chim Acta* **2009**, *639*, 57-61.
- (113) Lemaire, R.; Menguellet, S. A.; Stauber, J.; Marchaudon, V.; Lucot, J. P.; Collinet, P.; Farine, M. O.; Vinatier, D.; Day, R.; Ducoroy, P.; Salzet, M.; Fournier, I. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 4127-4134.
- (114) Dai, Y.; Whittall, R. M.; Li, L. *Anal Chem* **1999**, *71*, 1087-1091.
- (115) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2003**, *38*, 1081-1092.
- (116) Sugiura, Y.; Shimma, S.; Setou, M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 8227-8235.
- (117) Chen, Y.; Allegood, J.; Liu, Y.; Wang, E.; Cachon-Gonzalez, B.; Cox, T. M.; Merrill, A. H., Jr.; Sullards, M. C. *Anal Chem* **2008**, *80*, 2780-2788.
- (118) Jardin-Mathe, O.; Bonnel, D.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M. *J Proteomics* **2008**, *71*, 332-345.
- (119) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 1646-1652.
- (120) Puolitaival, S. M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 882-886.
- (121) Garrett, T. J.; Prieto-Conaway, M. C.; Kovtoun, V.; Bui, H.; Izgarian, N.; G., S.; Yost, R. A. *Int J. Mass Spectrom* **2006**, *260*, 166-176.
- (122) Aerni, H. R.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 827-834.
- (123) Baluya, D. L.; Garrett, T. J.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2007**, *79*, 6862-6867.
- (124) Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2007**, *42*, 254-262.
- (125) Patel, S. A.; Barnes, A.; Loftus, N.; Martin, R.; Sloan, P.; Thakker, N.; Goodacre, R. *Analyst* **2009**, *134*, 301-307.
- (126) Marshall, A. G.; Hendrickson, C. L.; Jackson, G. S. *Mass Spectrom Rev* **1998**, *17*, 1-35.

- (127) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *J Mass Spectrom* **1996**, *31*, 581-585.
- (128) Cornett, D. S.; Frappier, S. L.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2008**, *80*, 5648-5653.
- (129) Verbeck, G.; Ruotolo, B.; Sawyer, H.; Gillig, K.; Russell, D. *J Biomol Tech* **2002**, *13*, 56-61.
- (130) Ruotolo, B. T.; Gillig, K. J.; Stone, E. G.; Russell, D. H. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, *782*, 385-392.
- (131) Koomen, J. M.; Ruotolo, B. T.; Gillig, K. J.; McLean, J. A.; Russell, D. H.; Kang, M.; Dunbar, K. R.; Fuhrer, K.; Gonin, M.; Schultz, J. A. *Anal Bioanal Chem* **2002**, *373*, 612-617.
- (132) Ruotolo, B. T.; Verbeck, G. F.; Thomson, L. M.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 4214-4215.
- (133) Ruotolo, B. T.; Verbeck, G. F. t.; Thomson, L. M.; Woods, A. S.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. *J Proteome Res* **2002**, *1*, 303-306.
- (134) McLean, J. A.; Ruotolo, B. T.; Gillig, K. J.; Russell, D. H. *Int J Mass Spectrom* **2005**, *240*, 301.
- (135) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 133-138.
- (136) Sleno, L.; Volmer, D. A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 1928-1936.
- (137) Drexler, D. M.; Garrett, T. J.; Cantone, J. L.; Diters, 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.
- (138) Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Stoeckli, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 733-736.
- (139) Landgraf, R. R.; Garrett, T. J.; Calcutt, N. A.; Stacpoole, P. W.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8170-8175.
- (140) Hsieh, Y.; Casale, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 965-972.
- (141) Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Sugiura, Y.; Taki, T.; Li, Y. T.; Matsumoto, M.; Setou, M. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2008**, *870*, 74-83.
- (142) Yew, J. Y.; Dikler, S.; Stretton, A. O. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17*, 2693-2698.
- (143) Van de Plas, R.; Ojeda, F.; Dewil, M.; Van Den Bosch, L.; De Moor, B.; Waelkens, E. *Pac Symp Biocomput* **2007**, 458-469.
- (144) Trim, P. J.; Atkinson, S. J.; Princivalle, A. P.; Marshall, P. S.; West, A.; Clench, M. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 1503-1509.
- (145) Djidja, M. C.; Carolan, V.; Loadman, P. M.; Clench, M. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 1615-1618.
- (146) Zaima, N.; Matsuyama, Y.; Setou, M. *J Oleo Sci* **2009**, *58*, 267-273.
- (147) Yao, I.; Sugiura, Y.; Matsumoto, M.; Setou, M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3692-3701.
- (148) McCombie, G.; Staab, D.; Stoeckli, M.; Knochenmuss, R. *Anal Chem* **2005**, *77*, 6118-6124.
- (149) Deininger, S. O.; Ebert, M. P.; Futterer, A.; Gerhard, M.; Rocken, C. *J Proteome Res* **2008**.
- (150) Walch, A.; Rauser, S.; Deininger, S. O.; Hofler, H. *Histochem Cell Biol* **2008**, *130*, 421-434.
- (151) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1145-1155.
- (152) Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Dias, E. C.; Andersson, M.; Arteaga, C. L.; Sanders, M. E.; Caprioli, R. M. *Mol Cell Proteomics* **2006**, *5*, 1975-1983.

- (153) Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Reska, M.; Jakse, G.; Knuechel, R.; Wellmann, A. *Int J Mol Med* **2007**, *20*, 155-159.
- (154) McLean, J. A.; Russell, W. K.; Russell, D. H. *Anal Chem* **2003**, *75*, 648-654.
- (155) Moskovets, E.; Preisler, J.; Chen, H. S.; Rejtar, T.; Andreev, V.; Karger, B. L. *Anal Chem* **2006**, *78*, 912-919.
- (156) 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.
- (157) Bouschen, W.; Spengler, B. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *266*, 129-137.
- (158) Koestler, M.; Kirsch, D.; Hester, A.; Leisner, A.; Guenther, S.; Spengler, B. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 3275-3285.
- (159) Altelaar, A. F.; Luxembourg, S. L.; McDonnell, L. A.; Piersma, S. R.; Heeren, R. M. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1185-1196.
- (160) Altelaar, A. F.; Taban, I. M.; McDonnell, L. A.; Verhaert, P. D. E. M.; de Lange, R. P. J.; Adan, R. A. H.; Mooi, W. J.; Heeren, R. M.; Piersma, S. R. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *260*, 203-211.
- (161) Kruse, R.; Sweedler, J. V. *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, *14*, 752-759.
- (162) Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat Med* **2001**, *7*, 493-496.
- (163) Chaurand, P.; Rahman, M. A.; Hunt, T.; Mobley, J. A.; Gu, G.; Latham, J. C.; Caprioli, R. M.; Kasper, S. *Mol Cell Proteomics* **2008**, *7*, 411-423.
- (164) Chaurand, P.; DaGue, B. B.; Pearsall, R. S.; Threadgill, D. W.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2001**, *1*, 1320-1326.
- (165) Palmer-Toy, D. E.; Sarracino, D. A.; Sgroi, D.; LeVangie, R.; Leopold, P. E. *Clin Chem* **2000**, *46*, 1513-1516.
- (166) Xu, B. J.; Caprioli, R. M.; Sanders, M. E.; Jensen, R. A. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 1292-1297.
- (167) Bhattacharya, S. H.; Gal, A. A.; Murray, K. K. *J Proteome Res* **2003**, *2*, 95-98.
- (168) Masumori, N.; Thomas, T. Z.; Chaurand, P.; Case, T.; Paul, M.; Kasper, S.; Caprioli, R. M.; Tsukamoto, T.; Shappell, S. B.; Matusik, R. J. *Cancer Res* **2001**, *61*, 2239-2249.
- (169) Schwartz, S. A.; Weil, R. J.; Johnson, M. D.; Toms, S. A.; Caprioli, R. M. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 981-987.
- (170) Schwartz, S. A.; Weil, R. J.; Thompson, R. C.; Shyr, Y.; Moore, J. H.; Toms, S. A.; Johnson, M. D.; Caprioli, R. M. *Cancer Res* **2005**, *65*, 7674-7681.
- (171) Nilsson, A.; Skold, K.; Sjogren, B.; Svensson, M.; Pierson, J.; Zhang, X.; Caprioli, R. M.; Buijs, J.; Persson, B.; Svenningsson, P.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 3952-3961.
- (172) Pierson, J.; Norris, J. L.; Aerni, H. R.; Svenningsson, P.; Caprioli, R. M.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2004**, *3*, 289-295.
- (173) 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.
- (174) Stoeckli, M.; Staab, D.; Staufenbiel, M.; Wiederhold, K. H.; Signor, L. *Anal Biochem* **2002**, *311*, 33-39.
- (175) Seeley, E. H.; Caprioli, R. M. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 18126-18131.
- (176) Chen, R.; Hui, L.; Sturm, R. M.; Li, L. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 1068-1077.
- (177) Monroe, E. B.; Annangudi, S. P.; Hatcher, N. G.; Gutstein, H. B.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Proteomics* **2008**, *8*, 3746-3754.
- (178) Brand, G. D.; Krause, F. C.; Silva, L. P.; Leite, J. R.; Melo, J. A.; Prates, M. V.; Pesquero, J. B.; Santos, E. L.; Nakaie, C. R.; Costa-Neto, C. M.; Bloch, C., Jr. *Peptides* **2006**, *27*, 2137-2146.

- (179) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuro Endocrinol Lett* **2003**, *24*, 9-14.
- (180) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A.; Gardiner, J.; Seebach, D. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 1921-1924.
- (181) Rujoi, M.; Estrada, R.; Yappert, M. C. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1657-1663.
- (182) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *Anal Chem* **2005**, *77*, 4523-4527.
- (183) Jones, J. J.; Borgmann, S.; Wilkins, C. L.; O'Brien, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 3062-3071.
- (184) Garrett, T. J.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2006**, *78*, 2465-2469.
- (185) Dreisewerd, K.; Lemaire, R.; Pohlentz, G.; Salzet, M.; Wisztorski, M.; Berkenkamp, S.; Fournier, I. *Anal Chem* **2007**, *79*, 2463-2471.
- (186) Han, X.; D, M. H.; McKeel, D. W., Jr.; Kelley, J.; Morris, J. C. *J Neurochem* **2002**, *82*, 809-818.
- (187) Murphy, E. J.; Schapiro, M. B.; Rapoport, S. I.; Shetty, H. U. *Brain Res* **2000**, *867*, 9-18.
- (188) Han, X.; Yang, J.; Yang, K.; Zhao, Z.; Abendschein, D. R.; Gross, R. W. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6417-6428.
- (189) Thomas, R. L., Jr.; Matsko, C. M.; Lotze, M. T.; Amoscato, A. A. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 30580-30588.
- (190) Fuchs, B.; Schiller, J.; Cross, M. A. *Chem Phys Lipids* **2007**, *150*, 229-238.
- (191) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H. A.; Glass, C. K.; Merrill, A. H., Jr.; Murphy, R. C.; Raetz, C. R.; Russell, D. W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; VanNieuwenhze, M. S.; White, S. H.; Witztum, J. L.; Dennis, E. A. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 839-861.
- (192) Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2008**.
- (193) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 2052-2056.
- (194) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 17-26.
- (195) Shimma, S.; Sugiura, Y.; Hayasaka, T.; Zaima, N.; Matsumoto, M.; Setou, M. *Anal Chem* **2008**, *80*, 878-885.
- (196) Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Sugiura, Y.; Zaima, N.; Nakanishi, H.; Ohishi, K.; Nakanishi, S.; Naito, T.; Taguchi, R.; Setou, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 3415-3426.
- (197) Jackson, S. N.; Ugarov, M.; Post, J. D.; Egan, T.; Langlais, D.; Schultz, J. A.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1655-1662.
- (198) Touboul, D.; Piednoel, H.; Voisin, V.; De La Porte, S.; Brunelle, A.; Halgand, F.; Laprevote, O. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **2004**, *10*, 657-664.
- (199) Shimma, S.; Sugiura, Y.; Hayasaka, T.; Hoshikawa, Y.; Noda, T.; Setou, M. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *855*, 98-103.
- (200) Signor, L.; Varesio, E.; Staack, R. F.; Starke, V.; Richter, W. F.; Hopfgartner, G. *J Mass Spectrom* **2007**, *42*, 900-909.
- (201) Atkinson, S. J.; Loadman, P. M.; Sutton, C.; Patterson, L. H.; Clench, M. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 1271-1276.
- (202) Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 6448-6456.
- (203) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *260*, 195-202.
- (204) Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243-246.
- (205) Tuomikoski, S.; Huikko, K.; Grigoras, K.; Ostman, P.; Kostianen, R.; Baumann, M.; Abian, J.; Kotiaho, T.; Franssila, S. *Lab Chip* **2002**, *2*, 247-253.
- (206) Budimir, N.; Blais, J. C.; Fournier, F.; Tabet, J. C. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 680-684.

- (207) Thomas, J. J.; Shen, Z.; Blackledge, R.; Siuzdak, G. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *442*, 183.
- (208) Thomas, J. J.; Shen, Z.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 4932-4937.
- (209) Kruse, R. A.; Rubakhin, S. S.; Romanova, E. V.; Bohn, P. W.; Sweedler, J. V. *J Mass Spectrom* **2001**, *36*, 1317-1322.
- (210) Northen, T. R.; Yanes, O.; Northen, M. T.; Marrinucci, D.; Uritboonthai, W.; Apon, J.; Golledge, S. L.; Nordstrom, A.; Siuzdak, G. *Nature* **2007**, *449*, 1033-1036.
- (211) Yanes, O.; Woo, H. K.; Northen, T. R.; Oppenheimer, S. R.; Shriver, L.; Apon, J.; Estrada, M. N.; Potchoiba, M. J.; Steenwyk, R.; Manchester, M.; Siuzdak, G. *Anal Chem* **2009**, *81*, 2969-2975.
- (212) Liu, Q.; Xiao, Y.; Pagan-Miranda, C.; Chiu, Y. M.; He, L. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 80-88.
- (213) Zhang, H.; Cha, S.; Yeung, E. S. *Anal Chem* **2007**, *79*, 6575-6584.
- (214) Cha, S.; Yeung, E. S. *Anal Chem* **2007**, *79*, 2373-2385.
- (215) Cha, S.; Song, Z.; Nikolau, B. J.; Yeung, E. S. *Anal Chem* **2009**, *81*, 2991-3000.
- (216) Taira, S.; Sugiura, Y.; Moritake, S.; Shimma, S.; Ichianagi, Y.; Setou, M. *Anal Chem* **2008**, *80*, 4761-4766.
- (217) Ageta, H.; Asai, S.; Sugiura, Y.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Setou, M. *Med Mol Morphol* **2009**, *42*, 16-23.
- (218) Tempez, A.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A.; Novikov, A.; Della-Negra, S.; Lebeyec, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Smentkowski, V. S.; Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J Proteome Res* **2005**, *4*, 540-545.
- (219) Chabala, J. M.; Soni, K. K.; Li, J.; Gavrillov, K. L.; Levi-Setti, R. *Int J Mass Spectrom* **1995**, *143*, 191-212.
- (220) Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprevote, O. *J Mass Spectrom* **2005**, *40*, 985-999.
- (221) Ostrowski, S. G.; Van Bell, C. T.; Winograd, N.; Ewing, A. G. *Science* **2004**, *305*, 71-73.
- (222) Wu, K. J.; Odom, R. *Anal Chem* **1996**, *68*, 873-882.
- (223) McDonnell, L. A.; Piersma, S. R.; MaartenAltelaar, A. F.; Mize, T. H.; Luxembourg, S. L.; Verhaert, P. D.; van Minnen, J.; Heeren, R. M. *J Mass Spectrom* **2005**, *40*, 160-168.
- (224) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M.; de Lange, R. P.; Fletcher, I. W. *J Am Soc Mass Spectrom* **2006**, *17*, 1195-1202.
- (225) Altelaar, A. F.; van Minnen, J.; Jimenez, C. R.; Heeren, R. M.; Piersma, S. R. *Anal Chem* **2005**, *77*, 735-741.
- (226) Delcorte, A.; Bour, J.; Aubriet, F.; Muller, J. F.; Bertrand, P. *Anal Chem* **2003**, *75*, 6875-6885.
- (227) Nygren, H.; Malmberg, P.; Kriegeskotte, C.; Arlinghaus, H. F. *FEBS Lett* **2004**, *566*, 291-293.
- (228) Altelaar, A. F.; Klinkert, I.; Jalink, K.; de Lange, R. P.; Adan, R. A.; Heeren, R. M.; Piersma, S. R. *Anal Chem* **2006**, *78*, 734-742.
- (229) Scherl, A.; Zimmermann-Ivol, C. G.; Di Dio, J.; Vaezzadeh, A. R.; Binz, P. A.; Amez-Droz, M.; Cochard, R.; Sanchez, J. C.; Gluckmann, M.; Hochstrasser, D. F. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 605-610.
- (230) Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J. C. *Anal Chem* **2003**, *75*, 1754-1764.
- (231) Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B.; Laprevote, O. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1550-1559.
- (232) Touboul, D.; Brunelle, A.; Halgand, F.; De La Porte, S.; Laprevote, O. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 1388-1395.

- (233) Belazi, D.; Sole-Domenech, S.; Johansson, B.; Schalling, M.; Sjoval, P. *Histochem Cell Biol* **2009**, *132*, 105-115.
- (234) Debois, D.; Bralet, M. P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprevote, O. *Anal Chem* **2009**, *81*, 2823-2831.
- (235) Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal Chem* **2005**, *77*, 2297-2302.
- (236) McEwen, C. N.; McKay, R. G.; Larsen, B. S. *Anal Chem* **2005**, *77*, 7826-7831.
- (237) Takats, Z.; Cotte-Rodriguez, I.; Talaty, N.; Chen, H.; Cooks, R. G. *Chem Commun (Camb)* **2005**, 1950-1952.
- (238) Shiea, J.; Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, C. Y.; Yuan, C. H.; Beech, I.; Sunner, J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 3701-3704.
- (239) Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, J. Y.; Jeng, J.; Shiea, J. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 1107-1116.
- (240) Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Wu, C. I.; Lin, S. Y.; Ma, Y. L.; Cheng, T. L.; Shiea, J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 1767-1775.
- (241) Lin, S. Y.; Huang, M. Z.; Chang, H. C.; Shiea, J. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8789-8795.
- (242) Peng, I. X.; Shiea, J.; Ogorzalek Loo, R. R.; Loo, J. A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 2541-2546.
- (243) Sampson, J. S.; Hawkrige, A. M.; Muddiman, D. C. *J Am Soc Mass Spectrom* **2006**, *17*, 1712-1716.
- (244) Sampson, J. S.; Hawkrige, A. M.; Muddiman, D. C. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 1150-1154.
- (245) Sampson, J. S.; Hawkrige, A. M.; Muddiman, D. C. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1527-1534.
- (246) Dixon, R. B.; Sampson, J. S.; Hawkrige, A. M.; Muddiman, D. C. *Anal Chem* **2008**, *80*, 5266-5271.
- (247) Nemes, P.; Vertes, A. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8098-8106.
- (248) Sampson, J. S.; Muddiman, D. C. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 1989-1992.
- (249) Rezenom, Y. H.; Dong, J.; Murray, K. K. *Analyst* **2008**, *133*, 226-232.
- (250) Takats, Z.; Wiseman, J. M.; Gologan, B.; Cooks, R. G. *Science* **2004**, *306*, 471-473.
- (251) Venter, A.; Sojka, P. E.; Cooks, R. G. *Anal Chem* **2006**, *78*, 8549-8555.
- (252) Dole, M.; Mack, L. L.; Hines, R. M.; Mobley, R. C.; Ferguson, L. P.; Alice, M. B. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
- (253) Iribarne, J. V.; Thomson, B. A. *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287.
- (254) D'Agostino, P. A.; Hancock, J. R.; Chenier, C. L.; Lepage, C. R. *J Chromatogr A* **2006**, *1110*, 86-94.
- (255) Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Dill, A. L.; Cooks, R. G. *Science* **2008**, *321*, 805.
- (256) Chen, H.; Pan, Z.; Talaty, N.; Raftery, D.; Cooks, R. G. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 1577-1584.
- (257) Pan, Z.; Gu, H.; Talaty, N.; Chen, H.; Shanaiah, N.; Hainline, B. E.; Cooks, R. G.; Raftery, D. *Anal Bioanal Chem* **2007**, *387*, 539-549.
- (258) Mulligan, C. C.; Talaty, N.; Cooks, R. G. *Chem Commun (Camb)* **2006**, 1709-1711.
- (259) Hu, Q.; Talaty, N.; Noll, R. J.; Cooks, R. G. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 3403-3408.
- (260) Kauppila, T. J.; Wiseman, J. M.; Ketola, R. A.; Kotiaho, T.; Cooks, R. G.; Kostianen, R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 387-392.
- (261) Talaty, N.; Takats, Z.; Cooks, R. G. *Analyst* **2005**, *130*, 1624-1633.
- (262) Song, Y.; Talaty, N.; Tao, W. A.; Pan, Z.; Cooks, R. G. *Chem Commun (Camb)* **2007**, 61-63.

- (263) Meetani, M. A.; Shin, Y. S.; Zhang, S.; Mayer, R.; Basile, F. *J Mass Spectrom* **2007**, *42*, 1186-1193.
- (264) Nefliu, M.; Venter, A.; Cooks, R. G. *Chem Commun (Camb)* **2006**, 888-890.
- (265) Jackson, A. T.; Williams, J. P.; Scrivens, J. H. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 2717-2727.
- (266) Shin, Y. S.; Drolet, B.; Mayer, R.; Dolence, K.; Basile, F. *Anal Chem* **2007**, *79*, 3514-3518.
- (267) Myung, S.; Wiseman, J. M.; Valentine, S. J.; Takats, Z.; Cooks, R. G.; Clemmer, D. E. *J Phys Chem B* **2006**, *110*, 5045-5051.
- (268) Cotte-Rodriguez, I.; Cooks, R. G. *Chem Commun (Camb)* **2006**, 2968-2970.
- (269) Cotte-Rodriguez, I.; Hernandez-Soto, H.; Chen, H.; Cooks, R. G. *Anal Chem* **2008**, *80*, 1512-1519.
- (270) Ifa, D. R.; Gumaelius, L. M.; Eberlin, L. S.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. *Analyst* **2007**, *132*, 461-467.
- (271) Wiseman, J. M.; Ifa, D. R.; Song, Q.; Cooks, R. G. *Angew Chem Int Ed Engl* **2006**, *45*, 7188-7192.
- (272) Kertesz, V.; Van Berkel, G. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 2639-2644.
- (273) Wiseman, J. M.; Puolitaival, S. M.; Takats, Z.; Cooks, R. G.; Caprioli, R. M. *Angew Chem Int Ed Engl* **2005**, *44*, 7094-7097.
- (274) Schiller, J.; Suss, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Lessig, J.; Muller, M.; Petkovic, M.; Spalteholz, H.; Zschornig, O.; Arnold, K. *Prog Lipid Res* **2004**, *43*, 449-488.
- (275) Petkovic, M.; Schiller, J.; Muller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Arnhold, J. *Anal Biochem* **2001**, *289*, 202-216.
- (276) Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 567-577.
- (277) Estrada, R.; Yappert, M. C. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 412-422.
- (278) Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castano, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodriguez-Puertas, R.; Fernandez, J. A. *Anal Chem* **2008**, *80*, 9105-9114.
- (279) Little, D. P.; Cornish, T. J.; Odonnell, M. J.; Braun, A.; Cotter, R. J.; Koster, H. *Anal Chem* **1997**, *69*, 4540-4546.
- (280) Calvano, C. D.; Carulli, S.; Palmisano, F. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 1659-1668.
- (281) Thibault, D. B.; Gillam, C. J.; Grey, A. C.; Han, J.; Schey, K. L. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 814-822.
- (282) Grey, A. C.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M.; Schey, K. L. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 3278-3283.
- (283) Leinweber, B. D.; Tsaprailis, G.; Monks, T. J.; Lau, S. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 89-95.
- (284) Ames, G. F.; Nikaido, K. *Biochemistry* **1976**, *15*, 616-623.
- (285) Herskovits, T. T.; Jaillet, H.; Gadegbeku, B. *J Biol Chem* **1970**, *245*, 4544-4550.
- (286) Sanders, M. M.; Groppi, V. E., Jr.; Browning, E. T. *Anal Biochem* **1980**, *103*, 157-165.
- (287) Horst, M. N.; Basha, S. M.; Baumbach, G. A.; Mansfield, E. H.; Roberts, R. M. *Anal Biochem* **1980**, *102*, 399-408.
- (288) Redeby, T.; Roeraade, J.; Emmer, A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18*, 1161-1166.
- (289) Redeby, T.; Emmer, A. *Anal Bioanal Chem* **2005**, *381*, 225-232.
- (290) Redeby, T.; Carr, H.; Bjork, M.; Emmer, A. *Int J Biol Macromol* **2006**, *39*, 29-36.

- (291) Zhang, H.; Lin, Q.; Ponnusamy, S.; Kothandaraman, N.; Lim, T. K.; Zhao, C.; Kit, H. S.; Arijit, B.; Rauff, M.; Hew, C. L.; Chung, M. C.; Joshi, S. B.; Choolani, M. *Proteomics* **2007**, *7*, 1654-1663.
- (292) Wang, H.; Qian, W. J.; Mottaz, H. M.; Clauss, T. R.; Anderson, D. J.; Moore, R. J.; Camp, D. G., 2nd; Khan, A. H.; Sforza, D. M.; Pallavicini, M.; Smith, D. J.; Smith, R. D. *J Proteome Res* **2005**, *4*, 2397-2403.
- (293) Chertov, O.; Biragyn, A.; Kwak, L. W.; Simpson, J. T.; Boronina, T.; Hoang, V. M.; Prieto, D. A.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Fisher, R. J. *Proteomics* **2004**, *4*, 1195-1203.
- (294) Ferro, M.; Seigneurin-Berny, D.; Rolland, N.; Chapel, A.; Salvi, D.; Garin, J.; Joyard, J. *Electrophoresis* **2000**, *21*, 3517-3526.
- (295) Wang, W.; Guo, T.; Rudnick, P. A.; Song, T.; Li, J.; Zhuang, Z.; Zheng, W.; Devoe, D. L.; Lee, C. S.; Balgley, B. M. *Anal Chem* **2007**, *79*, 1002-1009.
- (296) Thompson, M. R.; Chourey, K.; Froelich, J. M.; Erickson, B. K.; Verberkmoes, N. C.; Hettich, R. L. *Anal Chem* **2008**, *80*, 9517-9525.
- (297) Reiersen, H.; Rees, A. R. *Protein Eng* **2000**, *13*, 739-743.
- (298) Begum, F. D.; Hogdall, C. K.; Kjaer, S. K.; Christensen, L.; Blaakaer, J.; Bock, J. E.; Glud, E.; Hoyer-Hansen, G.; Ring-Larsen, H.; Hogdall, E. V. *Anticancer Res* **2004**, *24*, 1981-1985.
- (299) Deng, X.; Hogdall, E. V.; Hogdall, C. K.; Norgaard-Pedersen, B.; Jorgensen, M.; Nielsen, H.; Engelholm, S. A. *Gynecol Oncol* **2000**, *79*, 416-419.
- (300) Hogdall, E. V.; Hogdall, C. K.; Tingulstad, S.; Hagen, B.; Nustad, K.; Xu, F. J.; Bast, R. C.; Jacobs, I. J. *Int J Cancer* **2000**, *89*, 519-523.
- (301) Lundstrom, M. S.; Hogdall, C. K.; Nielsen, A. L.; Nyholm, H. C. *Anticancer Res* **2000**, *20*, 3903-3906.
- (302) Lim, R.; Ahmed, N.; Borregaard, N.; Riley, C.; Wafai, R.; Thompson, E. W.; Quinn, M. A.; Rice, G. E. *Int J Cancer* **2007**, *120*, 2426-2434.
- (303) Gericke, B.; Raila, J.; Sehouli, J.; Haebel, S.; Konsgen, D.; Mustea, A.; Schweigert, F. J. *BMC Cancer* **2005**, *5*, 133.
- (304) Rauvala, M.; Puistola, U.; Turpeenniemi-Hujanen, T. *Gynecol Oncol* **2005**, *99*, 656-663.
- (305) Diamandis, E. P.; Borgono, C. A.; Scorilas, A.; Yousef, G. M.; Harbeck, N.; Dorn, J.; Schmalfeldt, B.; Schmitt, M. *Tumour Biol* **2003**, *24*, 299-309.
- (306) Pedersen, N.; Schmitt, M.; Ronne, E.; Nicoletti, M. I.; Hoyer-Hansen, G.; Conese, M.; Giavazzi, R.; Dano, K.; Kuhn, W.; Janicke, F.; et al. *J Clin Invest* **1993**, *92*, 2160-2167.
- (307) Sier, C. F.; Stephens, R.; Bizik, J.; Mariani, A.; Bassan, M.; Pedersen, N.; Frigerio, L.; Ferrari, A.; Dano, K.; Brunner, N.; Blasi, F. *Cancer Res* **1998**, *58*, 1843-1849.
- (308) McLafferty, F. W. *Science* **1983**, *214*, 280-287.
- (309) Zubarev, R. A.; Kelleher, N. L.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3265-3266.
- (310) Zubarev, R. A.; Horn, D. M.; Fridriksson, E. K.; Kelleher, N. L.; Kruger, N. A.; Lewis, M. A.; Carpenter, B. K.; McLafferty, F. W. *Anal Chem* **2000**, *72*, 563-573.
- (311) Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal Chem* **1995**, *67*, 3990-3999.
- (312) Roepstorff, P.; Fohlman, J. *Biomed Mass Spectrom* **1984**, *11*, 601.
- (313) Yamagaki, T.; Nakanishi, H. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*, 1300-1307.
- (314) Bashir, S.; Giannakopoulos, A. E.; Derrick, P. J.; Critchley, P.; Bottrill, A.; Padley, H. *J. Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)* **2004**, *10*, 109-120.
- (315) Wuhler, M.; Deelder, A. M. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 943-951.
- (316) Harvey, D. J. *Proteomics* **2001**, *1*, 311-328.

- (317) Harvey, D. J. *Int J Mass Spectrom* **2003**, 226, 1–35.
- (318) Koomen, J. M.; Russell, D. H. *J Mass Spectrom* **2000**, 35, 1025-1034.
- (319) Chifotides, H. T.; Koomen, J. M.; Kang, M.; Tichy, S. E.; Dunbar, K. R.; Russell, D. H. *Inorg Chem* **2004**, 43, 6177-6187.
- (320) Reiber, D. C.; Brown, R. S.; Weinberger, S.; Kenny, J.; Bailey, J. *Anal Chem* **1998**, 70, 1214-1222.
- (321) Reiber, D. C.; Grover, T. A.; Brown, R. S. *Anal Chem* **1998**, 70, 673-683.
- (322) Raska, C. S.; Parker, C. E.; Huang, C.; Han, J.; Glish, G. L.; Pope, M.; Borchers, C. H. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, 13, 1034-1041.
- (323) Suckau, D.; Resemann, A. *Anal Chem* **2003**, 75, 5817-5824.
- (324) Demeure, K.; Quinton, L.; Gabelica, V.; De Pauw, E. *Anal Chem* **2007**, 79, 8678-8685.
- (325) Bretin, S.; Reibel, S.; Charrier, E.; Maus-Moatti, M.; Auvergnon, N.; Thevenoux, A.; Glowinski, J.; Rogemond, V.; Premont, J.; Honnorat, J.; Gauchy, C. *J Comp Neurol* **2005**, 486, 1-17.
- (326) Charrier, E.; Reibel, S.; Rogemond, V.; Aguera, M.; Thomasset, N.; Honnorat, J. *Mol Neurobiol* **2003**, 28, 51-64.
- (327) Ambihapathy, K.; Yalcin, T.; Leung, H. W.; Harrison, A. G. *J Mass Spectrom* **1997**, 32, 209-215.
- (328) Kaufmann, R.; Kirsch, D.; Spengler, B. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, 131, 355-385.
- (329) Yalcin, T.; Csizmadia, I. G.; Peterson, M. R.; Harrison, A. G. *J Am Soc Mass Spectrom* **1996**, 7, 233-242.
- (330) Biemann, K. *Methods Enzymol* **1990**, 193, 455-479.
- (331) Roth, K. D. W.; Huang, Z. H.; Sadagopan, N.; Watson, J. T. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, 17, 255–274.
- (332) Keough, T.; Youngquist, R. S.; Lacey, M. P. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, 96, 7131-7136.
- (333) Keough, T.; Lacey, M. P.; Youngquist, R. S. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, 14, 2348-2356.
- (334) Samyn, B.; Debyser, G.; Sergeant, K.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. *J Am Soc Mass Spectrom* **2004**, 15, 1838-1852.
- (335) Samyn, B.; Sergeant, K.; Memmi, S.; Debyser, G.; Devreese, B.; Van Beeumen, J. *Electrophoresis* **2006**, 27, 2702-2711.
- (336) Keough, T.; Lacey, M. P.; Youngquist, R. S. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2002**, 16, 1003-1015.
- (337) 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.
- (338) Marekov, L. N.; Steinert, P. M. *J Mass Spectrom* **2003**, 38, 373-377.
- (339) Wang, D.; Kalb, S. R.; Cotter, R. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, 18, 96-102.
- (340) Lee, Y. H.; Kim, M. S.; Choie, W. S.; Min, H. K.; Lee, S. W. *Proteomics* **2004**, 4, 1684-1694.
- (341) Lee, Y. H.; Han, H.; Chang, S. B.; Lee, S. W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, 18, 3019-3027.
- (342) Alley, W. R., Jr.; Mechref, Y.; Klouckova, I.; Novotny, M. V. *J Proteome Res* **2007**, 6, 124-132.
- (343) Huang, Z. H.; Wu, J.; Roth, K. D.; Yang, Y.; Gage, D. A.; Watson, J. T. *Anal Chem* **1997**, 69, 137-144.
- (344) Kuyama, H.; Sonomura, K.; Nishimura, O.; Tsunasawa, S. *Anal Biochem* **2008**, 380, 291-296.

- (345) Kuyama, H.; Sonomura, K.; Shima, K.; Nishimura, O.; Tsunasawa, S. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 2063-2072.
- (346) Wysocki, V. H.; Tsapralis, G.; Smith, L. L.; Brechi, L. A. *J Mass Spectrom* **2000**, *35*, 1399-1406.
- (347) Oehlers, L. P.; Perez, A. N.; Walter, R. B. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 752-758.
- (348) Brancia, F. L.; Oliver, S. G.; Gaskell, S. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, *14*, 2070-2073.
- (349) Hale, J. E.; Butler, J. P.; Knierman, M. D.; Becker, G. W. *Anal Biochem* **2000**, *287*, 110-117.
- (350) Beardsley, R. L.; Karty, J. A.; Reilly, J. P. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, *14*, 2147-2153.
- (351) Warwood, S.; Mohammed, S.; Cristea, I. M.; Evans, C.; Whetton, A. D.; Gaskell, S. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 3245-3256.
- (352) Chen, W.; Lee, P. J.; Shion, H.; Ellor, N.; Gebler, J. C. *Anal Chem* **2007**, *79*, 1583-1590.

TITRE :

Développement des stratégies d'identification en mode bottom-up pour l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI

RESUME

Depuis son introduction en 1997 par le groupe de RM Caprioli, l'analyse directe sur tissus et l'imagerie par spectrométrie de masse sont devenues des méthodes complémentaires des techniques « classiques » de protéomique. L'analyse directe sur tissus permet la détection de plusieurs centaines de molécules, tout en maintenant l'intégrité des tissus. Par l'automatisation de cette approche, des images moléculaires peuvent être ainsi obtenues. Cependant, de nombreux développements restent à faire notamment sur l'amélioration de la détection des différentes classes de biomolécules incluant les lipides, les peptides et les protéines. De plus, si la localisation de molécules d'intérêt est possible, l'information structurale des protéines reste encore un challenge. Si l'identification des protéines peut être délicate par protéomique « classique » cela est encore plus vrai avec l'analyse directe sur tissus. L'approche bottom-up est à l'heure actuelle une méthode permettant la localisation de la répartition des peptides générés par digestion enzymatique *in situ* et leur structure par analyse en mode MS/MS. Dans la plupart des cas, la MS/MS est utilisée pour vérifier la séquence d'un peptide endogène ou obtenue après digestion mais les spectres générés par les instruments équipés d'une source MALDI sont souvent complexes à analyser en raison des différentes séries d'ions fragment obtenues au cours du processus de fragmentation. Les séries d'ions obtenues sont largement incomplètes et ne donnent accès qu'à de petites séquences. Dans le but d'améliorer l'identification des protéines en mode bottom-up pour l'imagerie par spectrométrie de masse, nous avons étudié des dérivations chimiques N-terminal de peptides. Les peptides dérivés présentent alors des fragmentations vers une série d'ions majoritaire permettant une meilleure interprétation des spectres MS/MS. Cette méthode permet d'améliorer l'identification des protéines et le séquençage de novo directement sur coupes de tissus qui sont des points importants pour l'identification de marqueurs biologiques.

TITLE :

Development of bottom-up identification strategies for MALDI Mass Spectrometric Imaging

SUMMARY

Since its introduction in 1997 by the group of R.M. Caprioli, direct tissue analysis and imaging by Mass Spectrometry have now become good complementary methods of classical proteomics techniques. Direct analysis of tissues gives access to the detection of hundreds of biomolecules while maintaining tissue integrity and by automation of this approach, molecular images of biomolecules distribution can be obtained in one step analysis. However, many developments need to be undertaken especially on the improvement of the detection of different classes of biomolecules including lipids, peptides and proteins. Moreover, if the localization of molecules of interest is possible but no structural information can be obtained from proteins. If proteins identification can be delicate under classical proteomics conditions this is even truer by working directly on tissues. A bottom-up strategy will allow the identification and localization of proteins after MS/MS experiments of peptides generated after *in situ* enzymatic digestion. In most of cases, MS/MS is used to check the sequence of an expected endogenous peptide or obtained after digestion but MS/MS but spectra generated from instruments equipped with a MALDI ion source are often 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 for which weak fragmentations (especially in the higher *m/z* range of the MS/MS spectrum) and to very different series of fragment ions creating largely incomplete set of series only giving access to small sequence tags are often observed. Thus, we have studied on tissue N-terminal chemical derivatization of peptides for proteins identification in Bottom-up Imaging strategies. The derivatives promote efficient charge-site initiated cleavage of backbone amide bonds and they enable the selective detection of only a single series of fragment ions. Optimization of reactions were first performed at the whole tissue section scale and then modified and adapted to allow for the derivatization to be automatically performed using a micro-spotting piezoelectric automatic deposition device. Finally, we report a whole sequence of on tissue bottom up strategy followed by automatic derivatization and show that such strategies improve protein assignment and de novo sequencing directly from tissue sections, which is a key point for on tissue direct identification of markers.

MOTS-CLES: Protéomique, Spectrométrie de masse, Imagerie MALDI, Matrices ioniques, Identification des protéines, Digestion enzymatique *in situ*, Dérivations N-Terminales *in situ*.