

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE**

THÈSE DE DOCTORAT

**Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences de l'Université de Lille des Sciences et Technologie de Lille**

Par

CELINE MERIAUX

**IMAGERIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL
PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI**

Dirigée par le Pr. Michel SALZET

Soutenue le 18 Novembre 2011

Membres du jury

M. le Professeur Andreas Tholey	Rapporteur
M. le Directeur de Recherche Alain Brunelle	Rapporteur
M. le Professeur Harry Steinbusch	Examineur
Mme le Professeur Isabelle Fournier	Examineur
M. le Docteur Christophe Lefebvre	Invité
M. le Professeur Michel Salzet	Directeur de Thèse

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein du laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique Fondamentale et Appliquée. C'est pourquoi, 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. Je lui adresse mes plus sincères remerciements pour sa confiance et son soutien. Je souhaite associer à ces remerciements, Madame le Professeur Isabelle Fournier, pour sa disponibilité et les connaissances qu'elle m'a transmises.

Je tiens à remercier mes deux rapporteurs, Monsieur le Professeur Andreas Tholey et Monsieur le Directeur de Recherche Alain Brunelle pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

J'adresse, à Monsieur le Professeur Harry Steinbusch et Monsieur le Docteur Christophe Lefebvre ma reconnaissance pour l'attention qu'ils ont porté à cette étude en acceptant de participer à ce jury.

Je voudrais bien sûr, remercier l'ensemble des membres ; actuels et anciens ; de l'équipe d'imagerie MALDI ainsi que les permanents du laboratoire pour l'atmosphère cordiale et dynamique qu'ils ont su créer.

Un grand merci à ma famille et à mes parents pour leur soutien au cours de toutes ces années.

**IMAGERIE DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL
PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI**

Résumé

Ces dernières années, l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI s'est révélée être un outil puissant pour la recherche de biomarqueurs puisqu'elle permet d'effectuer l'analyse d'un large panel de composés endogènes et exogènes dans des coupes de tissu. Des développements restent néanmoins à faire pour l'amélioration de la détection des molécules. La préparation de l'échantillon, incluant les traitements chimiques et le dépôt de la matrice, est dépendante de la nature du tissu et des molécules d'intérêt. Celle-ci influence la qualité des spectres et des images. D'autre part, les outils bioinformatiques tels que les analyses multi variées apportent des informations sur la répartition des marqueurs au sein du tissu en fonction des phénotypes cellulaires. Ces étapes sont donc cruciales pour les applications de l'imagerie dans le domaine de la biologie. Dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis tout d'abord axée sur les développements méthodologiques tels que la création de nouvelles matrices adaptées à l'imagerie MALDI, *i.e.* les matrices ioniques liquides. Forte de ces développements, grâce à cette technologie, j'ai étudié, dans une optique de dynamique, les acteurs moléculaires de la régénération neuronale chez un modèle invertébré, la sangsue médicinale, après une lésion de la chaîne nerveuse. Ensuite, mes études ont porté sur la recherche de biomolécules à partir de biopsies d'hippocampe de patients épileptiques. Mes travaux ont révélé l'existence de protéines associées à une distribution particulière correspondant à des couches des neurones anormalement présents dans l'hippocampe des patients épileptiques. L'ensemble de mes travaux a mis en évidence que cette nouvelle technologie d'imagerie moléculaire a atteint un niveau de maturité suffisant pour réaliser des études biologiques et cliniques en complément des techniques d'imagerie *in vivo* ou cytologique.

**IMAGING OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM
BY MALDI MASS SPECTROMETRY**

Abstract

In recent years, MALDI mass spectrometric imaging has proved to be a powerful tool for biomarker tracking, because it allows the analysis of a wide range of endogenous and exogenous compounds in tissue sections. Developments are still to be done to improve the detection of molecules. The sample preparation, including chemical treatment and deposition of the matrix, is dependent on the nature of the tissue and molecules of interest. It influences the quality of spectra and images. In addition, the bioinformatics tools such as multivariate analysis provide informations on the distribution of markers within the tissue based on cellular phenotypes. These steps are crucial for imaging applications in the field of biology. In this context, during my thesis, I first focused on methodological developments, such as the creation of new matrices suitable for MALDI imaging, *i.e.* liquid ionic matrices. Then, using this technology in dynamic, I studied molecular actors of nerve regeneration in an invertebrate model, the medicinal leech, after lesion of the nerve cord. Finally, my studies focused on research of biomolecules from hippocampus of epileptic patients. My work has revealed the existence of proteins associated with a particular distribution corresponding to layers of neurons abnormally present in the hippocampus of epileptic patients. All my work has shown that this new molecular imaging technology has now reached the maturity sufficient to achieve biological and clinical studies in addition to *in vivo* or cytological imaging techniques.

Table des Matières

Remerciements	i
Résumé	iv
Abstract	vi
Publications	x
Liste des Figures.....	xiv
Liste des Tableaux.....	xxv
Liste des Abréviations	xxvi
Introduction	1
1. Généralités.....	5
1.1. Imagerie par spectrométrie de masse (MSI).....	5
1.1.1. Principe.....	5
1.1.2. Imagerie MALDI.....	7
1.1.3. Imagerie SIMS	42
1.1.4. Bilan	47
2. Développements des matrices pour l'imagerie MALDI	49
2.1. Les matrices ioniques liquides (LIM).....	49
2.1.1. Les LIMs et l'analyse des lipides	49
2.1.2. Les LIMs et l'analyse des médicaments et de leurs métabolites	67
2.2. Les matrices ioniques solides (SIM)	76
2.2.1. Les SIMs et l'analyse des peptides natifs.....	76
2.2.2 Les SIMs et l'analyse des peptides de digestion	89
2.2.3. Les SIMs et l'analyse des saponines (glycosides triterpène).....	95
2.2.4 Les SIMs pour l'analyse des protéines solubles.....	98
2.3. Conclusion	104
3. Etude de la neurogénèse et de la régénération nerveuse chez la sangsue	107
3.1. Introduction	107

3.2. Présentation du modèle.....	108
3.2.1. La sangsue <i>Hirudo medicinalis</i>	108
3.2.2. Le système nerveux central d' <i>Hirudo medicinalis</i>	109
3.3. Préparation des coupes de chaîne nerveuse	110
3.3.1. Coupes longitudinales de chaînes nerveuses isolées	110
3.3.2. Coupes transversales d'animal entier	113
3.4. Etude du peptidome	115
3.4.1. Etude du peptidome au cours de la régénération nerveuse.....	115
3.4.2. Etude du peptidome au cours de la neurogénèse.....	121
3.5. Conclusion	124
4. Etude d'une neuropathie: l'épilepsie.....	126
4.1. Introduction	126
4.2. Présentation du modèle d'étude.....	127
4.2.1. Présentation de l'épilepsie du lobe temporal (TLE).....	127
4.2.2. Présentation de l'hippocampe.....	127
4.3. Etude histologique	130
4.4. Etude du peptidome	132
4.5. Etude du protéome.....	138
4.6. Etude du lipidome.....	150
4.7. Conclusion	156
5. Conclusion générale et Perspectives	159
6. Matériel et Méthodes.....	165
6.1. Réactifs	165
6.2. Préparation des solutions et des coupes d'organes.....	165
6.2.1. Solutions.....	165
6.2.2. Les coupes de tissus.....	166
6.3. Préparation des tissus.....	168
6.3.1. Traitements des coupes.....	168

6.3.2. Digestion enzymatique <i>in situ</i>	168
6.3.3. Préparation des matrices.....	168
6.3.4. Dépôts des matrices.....	169
6.4. Analyses MALDI	171
6.4.1. Analyses des lipides et les médicaments.....	171
6.4.2. Analyses des peptides.....	171
6.4.3. Analyses des protéines	171
6.4.4. Identification des protéines.....	171
6.5. Traitements des données.....	171
6.6. Colorations histologiques	172
6.6.1. Coloration HES	172
6.6.2. Coloration au Bleu de toluidine.....	172
6.7. Imagerie optique	172
Références bibliographiques	174

Publications

Articles acceptés (5)

- ✓ Bruand J., Alexandrov T., Sistla S., Wisztorski M., **Meriaux C.**, Becker M., Salzet M., Fournier I., Macagno E., and Bafna V.
AMASS : Algorithm for MSI Analysis by Semi-Supervised Segmentation
J Proteome Res. 2011; 10 (10):4734-43

- ✓ **Meriaux C.**, Arafah K., Tasiemski A., Wisztorski M., Bruand J., Wichlacz-Boidin C., Desmons A., Debois D., Lapr evote O., Brunelle A., Gaasterland T., Macagno E., Fournier I., Salzet M.
Multiple Changes in Peptide and Lipid Expression Associated with Regeneration in the Nervous System of the Medicinal Leech
PLoS One. 2011; 6 (4): e18359

- ✓ Bruand J., Sistla S., **Meriaux C.**, Dorrestein PC., Gaasterland T., Ghassemian M., Wisztorski M., Fournier I., Salzet M., Macagno E., Bafna, V.
Automated Querying and Identification of Novel Peptides using MALDI Mass Spectrometric Imaging
J Proteome Res. 2011; 10 (4): 1915-28

- ✓ Van Dyck S., Flammang P., **Meriaux C.**, Bonnel D., Salzet M., Fournier I., Wisztorski M.
Localization of Secondary Metabolites in Marine Invertebrates: Contribution of MALDI MSI for the Study of Saponins in Cuvierian Tubules of H. forskali
PLoS One. 2010; 5 (11): e13923

- ✓ **Meriaux C.**, Franck J., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Liquid Ionic Matrixes for MALDI Mass Spectrometry Imaging of Lipids
J Proteomics. 2010; 73 (6): 1204-18

Articles soumis (1)

- ✓ **Meriaux C.**, Franck J., Wisztorski M., Salzet M. and Fournier I.
Improving Tissue Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging of Peptide and Proteins. Part 2: Using Microspraying
J. Proteomics. 2011, Soumis

Chapitres de livre (3)

- ✓ Masuo Y., Hirano M., Shibato J., Nam HW., Fournier I., **Meriaux C.**, Wisztorski M., Salzet M., Hideaki S., Agrawal GK., Rakwal R.
Brain Proteomics: Sampling Preparation Techniques for the Analysis of Rat Brain Samples using Mass Spectrometry
Harvard University. 2011; Sample Preparation in Mass Spectrometry; In Press
- ✓ Fournier I., Franck J., **Meriaux C.**, Salzet M.
MALDI Imaging of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues: Application to Model Animals of Parkinson Disease for Biomarker Hunting
Advances in Neurobiology. 2011; Vol. 2 Genomics, Proteomics, and the Nervous System, Part 5: 537-556
- ✓ Fournier I., **Meriaux C.**, Wisztorski M., Salzet M.
MALDI Imaging Mass Spectrometry for Investigating the Brain
Harvard University. 2011; Sample Preparation in Mass Spectrometry; Part 36: 765-783

Brevet (1)

- ✓ Franck J., **Meriaux C.**, Fournier I., Salzet M.
Développement de Nouvelles Matrices Ioniques pour l'Analyse et la Quantification sur Coupes de Petites Molécules (Médicaments, Lipides)
PCT

Communications orales (4)

- ✓ **Meriaux C.**, Arafah K., Tasiemski A., Wisztorski M., Bruand J., Wichlacz-Boidin C., Desmons A., Debois D., Laprévotte O., Brunelle A., Macagno E., Fournier I., Salzet M.
Multiple Changes in Peptide and Lipid Expression Associated with Regeneration in the Nervous System of the Medicinal Leech by MSI
59th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2011, Denver, Colorado, USA

- ✓ **Meriaux C.**, Franck J., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Liquid Ionic Matrixes for MALDI Mass Spectrometry Imaging of Lipids
27èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, 2010, Clermont-Ferrand, France

- ✓ **Meriaux C.**, Franck J., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Liquid Ionic Matrixes for MALDI Mass Spectrometry Imaging of Lipids
XVèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, 2010, Saint Jean - Saint Nicolas, France

- ✓ **Meriaux C.**, Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Etude du Système Nerveux d'un Modèle Invertébré: de l'Edification à la Régénération
XIVèmes Rencontres du Club Jeune de la Société Française de Spectrométrie de Masse, 2009, Borzée, Belgique

Communications par affiche (4)

- ✓ **Meriaux C.**, Franck J., Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
New MALDI Mass Spectrometry Imaging Procedures to Highlight Potential Proteic and Lipidic Biomarkers in Ovarian Cancer
9th Human Proteome Organisation World Congress, 2010, Sydney, Australie

- ✓ **Meriaux C.**, Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
Spectrométrie de Masse MALDI pour l'Etude du Système nerveux central : Des Invertébrés aux Pathologies Humaines
10ème Journée André Verbert, 2010, Lille, France

- ✓ Franck J., Arafah K., El Ayed M., Bonnel D., **Meriaux C.**, Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.
MALDI-MSI: From developments to Clinical Applications
6ème Edition Matinée des Chercheurs, 2010, Bruxelles, Belgique

- ✓ Wisztorski M., **Meriaux C.**, Bruand J., Franck J., Bonnel D., Bafna V., Macagno E., Salzet M., Fournier I.
Exploring the Assembly of an Organism using MALDI Imaging: A Systems Approach to Understanding Embryonic Development
7th Human Proteome Organisation World Congress, 2008, Amsterdam, Pays-Bas

Liste des Figures

Figure 1. Nombre de publications scientifiques internationales par an concernant l'imagerie MALDI () et la recherche de biomarqueurs par imagerie MALDI () de 2000 à Aout 2011 (Source PubMed).....	3
Figure 2. Schéma représentatif des différents modes d'acquisition (a) Mode point par point ou (b) Mode microscope.	6
Figure 3. Schéma simplifié du processus MALDI. (a) Co-cristallisation des molécules de matrice et d'analytes sur la cible MALDI puis irradiation par un laser impulsionnel. (b) Désorption de la matrice et des analytes puis ionisation en phase gazeuse.	8
Figure 4. Cristallisation obtenue avec (a) HCCA/Aniline et (b) 2,5-DHB/Butylamine ⁴⁰	10
Figure 5. Schéma représentatif d'une expérience MALDI : De la préparation de l'échantillon à la reconstruction des images.....	14
Figure 6. Représentation schématique des différentes méthodes de préparation et de conservation des tissus pour l'imagerie MALDI ⁵⁷	15
Figure 7. Images (a) optiques et moléculaires MALDI des ions (b) m/z 2608.2, (c) m/z 2479.2 et (d) m/z 6724.4 obtenues à partir de coupes de cerveau de souris chauffées à température ambiante pendant différents temps ⁵⁸	16
Figure 8. (a) Comparaison des profils protéiques enregistrés sur la gamme de masse m/z 2000-20000 à partir de coupes de foie de souris congelé (bleu) ou fixé à l'éthanol et paraffiné (rouge). (b) Images optiques et moléculaires MALDI obtenues à partir de coupes de cerveau de souris congelé ou fixé à l'éthanol et paraffiné ⁵⁹	17
Figure 9. Comparaison des images moléculaires MALDI obtenues à partir de cerveaux de souris traités par refroidissement rapide ou par chauffage rapide puis conservés par congélation. Les coupes sont maintenues à température ambiante entre 0 et 5 minutes avant le dépôt de matrice ⁷⁵	18
Figure 10. Spectres de masse MALDI obtenus à partir (a) du polymère OCT (b) d'un foie de rat fixé par la base sur le support du cryostat avec l'OCT (c) d'un foie de rat enrobé dans l'OCT ⁷⁷	19
Figure 11. Images optiques (a) du cerveau de crabe <i>C. borealis</i> (b) des coupes selon l'axe z du cerveau enrobé dans la gélatine et (c) de l'agrandissement d'une coupe avec la superposition d'une image moléculaire MALDI ⁷⁹	20

Figure 12. (a) Images optiques du corps du bourdon <i>B. terrestris</i> et d'une coupe de tissu, (b) Images MALDI-FTICR et spectre de masse moyen enregistrés pour les bas poids moléculaires et (c) Images MALDI-TOF et spectre de masse moyen obtenus pour une gamme de masse élevée ⁸¹ .	21
Figure 13. (a) Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice HCCA sur une coupe de foie de rat (a) non traitée (b) traitée à l'EtOH. Spectre MALDI obtenu après dépôt de matrice SA sur une coupe de foie de rat (c) non traitée (d) traitée à l'EtOH ⁷⁷ .	22
Figure 14. Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice HCCA sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée (b) traitée au chloroforme. Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice SA sur une coupe de cerveau de rat (c) non traitée (d) traitée au chloroforme ⁸³ .	23
Figure 15. (a) Spectres de masse MALDI de protéines obtenus à partir d'une coupe de foie de souris après différents lavages. (b) Profils des pics obtenus pour quatre protéines après les différents lavages.	24
Figure 16. Spectres de masse MALDI de protéines de très haut poids moléculaire obtenus à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée (b) traitée au HFIP (c) traitée au TFE ⁸⁴ .	24
Figure 17. Formules semi-développées des matrices les plus couramment utilisées : (a) acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), (b) acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et (c) acide 3,5-diméthoxy-4hydroxycinnamique ou acide sinapinique (SA).	25
Figure 18. Cristallisation des matrices (a) HCCA/ANI (b) HCCA (c) HCCA/2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2A4M5NP) (d) HCCA/DANI ³⁹ .	26
Figure 19. Différents modes de dépôt de la matrice sur coupe pour les analyses MALDI : (a) manuel (b) par spray (c) par micro-dépôts.	27
Figure 20. Profils lipidiques distincts des structures d'un cerveau de rat mis en évidence par PCA (a) non supervisés et (b) supervisés. Résultats PCA (c) non supervisés et (d) supervisés montrant les lipides exprimés différemment dans ce même cerveau de rat. Images de la répartition des ions (e) m/z 734.45 dans la matière grise, (f) m/z 788.48 dans la matière blanche, (g) m/z 762.47 dans le cortex cérébelleux et (h) m/z 772.46 dans l'hippocampe ¹¹³ .	34
Figure 21. (a) Coloration hématoxyline et éosine d'une biopsie de muqueuse stomacale. Représentation des scores obtenus à partir de (b) la première composante principale, (c) la seconde composante principale et (d) la troisième composante principale. (f) Image reconstruite en utilisant les jeux de couleurs du dendrogramme (e). (g) Image MALDI de l'ion m/z 4152 (rouge), m/z 4962 (vert) et m/z 5697 (bleu) ¹¹⁴ .	35

Figure 22. (a) Cerveau de crabe <i>Cancer borealis</i> et (b) Schématisation des différentes structures du cerveau. Images MALDI de trois familles de neuropeptides retrouvés dans le cerveau : (c) peptide tachykinin-related (CabTRP1a), (d, e) isoformes peptide RFamide et (f) orcokinine ¹³⁴	37
Figure 23. Schématisation de coupes de cerveau de rat réalisées (a) au niveau frontal et (b) au niveau du striatum, issues de l'atlas Paxinos et Watson. La région en bleu correspond à la matière blanche alors que la région en rouge représente le claustrum. Les images MALDI mettent en évidence la sous unité de la protéine Gng2, m/z 7725, dans le claustrum au niveau du striatum (d) mais pas au niveau frontal (c) ¹³⁵	38
Figure 24. Images MALDI des différentes espèces moléculaires présentes dans les plaques amyloïdes chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. (a) Image optique d'un cerveau de souris. Répartition de 5 peptides β amyloïdes (b) A β (1-42) (m/z 4515.1), (c) A β (1-40) (m/z 4330.9), (d) A β (1-39) (m/z 4231.7) (e) A β (1-38) (m/z 4132.6) et (f) A β (1-37) (m/z 4075.5) ¹⁴⁰	39
Figure 25. Images de la distribution de glycérophosphocholines et sphingolipides dans des cerveaux contrôles et de patients atteints de schizophrénie. (a) Images optiques des coupes de cerveaux après coloration H&E. (b) Images MALDI des PC et SM obtenues pour le cerveau contrôle et de patient atteint de schizophrénie ¹⁴⁹	40
Figure 26. Imagerie MALDI sur des coupes d'animaux entiers pour la détection simultanée d'un médicament et de ses métabolites ¹⁵⁰	41
Figure 27. Comparaison des distributions d'un composé et d'un métabolite dans une coupe entière de rat obtenues par autoradiographie et imagerie MALDI ¹⁵⁰	42
Figure 28. Schéma du processus SIMS.	43
Figure 29. (a) Images SIMS obtenues à partir d'une coupe sagittale de cerveau de rat, à 87,5 μ m avec une source d'ions primaires Bi ₃ ²⁺ de la phosphocholine (m/z 184.1), du cholestérol (m/z 385.4), d'un glycérophospholipide [PE 40:4+H] ⁺ ou [PE38:1+Na] ⁺ ou [PC34:2+K] ⁺ (m/z 786.8). (b) Images SIMS obtenues à partir d'une coupe transversale de cerveau de rat à 2 μ m avec une source d'ions primaires Bi ₃ ²⁺ de la vitamine E (m/z 430.4) et d'un glycérophospholipide [PE38:1+Na] ⁺ ou [PC34:2+K] ⁺ (m/z 796.7) ¹⁶⁰	44
Figure 30. (a) Spectre de masse TOF ME-SIMS de la β -endorphin humain (m/z 3465) obtenu en mode positif avec la matrice 2,5-DHB (b) Spectre de masse TOF-SIMS de la β -endorphin humain (m/z 3465) ¹⁶¹	45
Figure 31. (a) Spectres ME-SIMS et MALDI d'un extrait de la commissure de <i>Lymnaea stagnalis</i> obtenus avec la matrice 2,5-DHB. (b) Image optique de la commissure de <i>Lymnaea</i>	

stagnalis. Images ME-SIMS obtenues après dépôt de 2,5-DHB (c) du δ -peptide, (d) du CTP-peptide. (e) Image ME-SIMS composite de la 2,5-DHB (rouge), de l'ion Na^+ (bleu) et de l'ion K^+ (vert) ¹⁶²	45
Figure 32. (a) Comparaison des spectres SIMS et MetA-SIMS après recouvrement d'or obtenus en mode positif avec une source d'ions primaires Bi_3^{2+} . (b) Images MetA-SIMS d'une coupe de cerveau de rat après métallisation à l'or du groupement phosphocholine (m/z 184), du glycérophospholipide $[\text{PC34}:1+\text{H}]^+$ (m/z 761) et du cholestérol (m/z 387) ¹⁶⁴	46
Figure 33. (a) Images SIMS obtenues en mode négatif à partir d'une coupe de graine d' <i>A. thaliana</i> (a) d'un fragment du kaempférol (m/z 285.04), (b) d'un fragment de la quercétine (m/z 301.03) et d'un autre fragment de la quercétine (m/z 447.12). Images réalisées à 1.56 μm avec une source d'ions primaires Bi_3^+ ¹⁷¹	47
Figure 34. Image optique de micro-dépôts de 2,5-DHB sur une coupe de cerveau de rat.....	51
Figure 35. Spectres de masse MALDI enregistrés en périphérie et au centre d'un micro-dépôt de matrice 2,5-DHB, en mode réflecteur, à partir d'une coupe de cerveau de rat.	52
Figure 36. Formules semi-développées des matrices ioniques liquides 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/DANI, 2,5-DHB/DEANI, 2,5-DHB/3-AP et 2,5-DHB/Pyr.	53
Figure 37. Images optiques des micro-dépôts des matrices 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/3-AP et 2,5-DHB/Pyr.	53
Figure 38. Spectres de masse MALDI enregistrés après le micro-dépôt de (a) 2,5 nL, (b) 5 nL et (c) 7,5 nL par position de matrices 2,5-DHB/ANI.....	54
Figure 39. Spectres de masse MALDI enregistrés après dépôt des matrices 2,5-DHB et 2,5-DHB/ANI en mode positif et négatif.	55
Figure 40. Images optiques d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de 2,5-DHB et de 2,5-DHB/ANI et images moléculaires de deux glycérophospholipides.....	56
Figure 41. Spectres de masse MALDI enregistrés à partir d'une coupe de cerveau de rat en mode réflecteur positif et négatif, immédiatement après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI et après deux jours dans la source MALDI.	57
Figure 42. Images moléculaires de lipides présentant une biodistribution complémentaire obtenues à partir d'une coupe de cerveau de rat. En mode réflecteur positif, l'ion mesuré (a) à m/z 753.6 correspond à la sphingomyéline {38:4} et (b) à m/z 788.9 correspond à la phosphadylcholine {36:1}. En mode réflecteur négatif, l'ion mesuré (d) à m/z 806.8 correspond au sulfatide {36:1} et (e) à m/z 857.8 correspond au phosphoinositol {36:4}.	58

Figure 43. Comparaison des spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif après micro-dépôts des matrices (a) 2,5-DHB/ANI et (b) 2,5-DHB/ANI/OGP sur une coupe de cerveau de rat et images optiques obtenues après irradiation des spots.	62
Figure 44. Images MALDI de lipides obtenues après micro-dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP sur une coupe de tissu de cancer ovarien.	63
Figure 45. (a) Analyse PCA non supervisée obtenue à partir des spectres enregistrés sur une coupe d’ovaire présentant les ions différenciellement détectés sur la coupe. (b) Dendrogramme créé par classification des spectres en fonction de leur similarité. (c) Image reconstruite à partir des branches du dendrogramme. (d) Image optique de la coupe d’ovaire après coloration HES et images microscopiques des 5 zones d’intérêt.	64
Figure 46. (a) Spectres de masse MS/MS de deux lipides mesurés à (a) m/z 725.4 et (b) m/z 820.6 correspondant respectivement à la sphingomyéline {34:1} $[M+Na]^+$ et à la phosphatidylcholine {36:4} $[M+K]^+$	66
Figure 47. Image optique et représentation schématique annotée du rein.	68
Figure 48. Image optique d’une coupe de rein de rat $t=2h$ après dépôt de matrice 2,5-DHB/ANI et image moléculaire de l’ion mesuré à m/z 299.1.	69
Figure 49. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif pour la détection de l’olanzapine (0,1mg/ml) avec les matrices (a) HCCA/TEA, (b) HCCA/TMG, (c) HCCA/DEANI et (d) HCCA/Benz.	70
Figure 50. Distribution de l’olanzapine et de ses métabolites dans le rein de rat immédiatement, 2 heures et 6 heures après administration.....	71
Figure 51. Spectres de masse MS/MS de l’olanzapine mesurée à m/z 313.1.	72
Figure 52. Evolution de l’intensité de l’olanzapine (m/z 313) obtenue pour différentes régions des coupes de différents reins de rat ($t=0h$, $t=2h$ et $t=6h$). Extraction de l’olanzapine par micro-jonction liquide et analyse en mode SRM (313 \rightarrow 256) par ESI-MS.	73
Figure 53. Représentation graphique de la distribution de l’olanzapine dans les structures du rein en fonction du temps.	74
Figure 54. Exemples de lipides présentant la même répartition dans les reins de rat immédiatement et 2 heures après administration de l’olanzapine.....	74
Figure 55. Exemples de lipides présentant des distributions différentes dans les reins de rat immédiatement et 2 heures après administration de l’olanzapine.....	75
Figure 56. (a) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de la 2,5-DHB sur coupe de cerveau de rat (b) non traitée et (c) lavée au chloroforme. (d) Formule	

semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA sur coupe de cerveau de rat (e) non traitée et (f) lavée au chloroforme.	78
Figure 57. (a) Image optique et schéma annoté des différentes structures d'une coupe de cerveau de rat. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat traitées au chloroforme après micro-nébulisation de (b) 2,5-DHB et (c) HCCA.	79
Figure 58. (a) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/DANI sur coupe de cerveau de rat (b) non traitée et (c) lavée au chloroforme. (d) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/ANI sur coupe de cerveau de rat (e) non traitée et (f) lavée au chloroforme. (g) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/3-AP sur coupe de cerveau de rat (h) non traitée et (i) lavée au chloroforme.	81
Figure 59. (a) Image optique et schéma annoté des différentes structures d'une coupe de cerveau de rat. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat traitées au chloroforme après micro-nébulisation de (b) HCCA/DANI, (c) HCCA/ANI et (d) HCCA/3-AP.....	82
Figure 60. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat traitée au chloroforme après micro-nébulisation de l'HCCA/3-AP (a) immédiatement, (b) dans la région du corps calleux 5 heures, (c) dans la région de la substance noire 5 heures et (d) 10 heures après introduction dans la source MALDI.	84
Figure 61. (a) Image optique avec annotation des structures et images moléculaires MALDI reconstruites (b, d, f, h, j, l, n et p) sur une moitié de coupe de cerveau de rat avec une résolution spatiale de 250 μm et (c, e, g, i, k, m, o et q) sur une région réduite avec une résolution spatiale de 100 μm . (Au Cortex auditif, CA1, 2 et 3 Champs ammoniens 1, 2 et 3, cc <i>Corpus callosum</i> , DG Gyrus denté, Op Couche de nerfs optiques, SN <i>Substantia nigra</i> , V Cortex visuel).	85
Figure 62. Comparaison des images enregistrées en mode réflecteur positif sur une moitié de coupe de cerveau de rat après la nébulisation des matrices HCCA, HCCA/ANI ou HCCA/3-AP sur la gamme de masse m/z 1000-5000.	86
Figure 63. (a) Image optique annotée et image moléculaire composite d'une coupe longitudinale de cerveau de rat obtenue avec une résolution spatiale de 150 μm . (b) Dendrogramme des spectres enregistrés sur une partie du cervelet de rat et images obtenues après reconstruction des branches du dendrogramme. (cc <i>Corpus callosum</i> , CCo cortex cerebral, cp Pédoncule cérébral, CPu Putamen, Fo Fornix, H Hippocampe, Hy Hypothalamus,	

Int Noyaux interposés cérébelleux, Mb Mésencéphale, MO Bulbe rachidien, pcuf <i>Fissura preculminalis</i> , plf Fissure postérolatérale, ppf Fissure prépyramidale, prf Fissure primaire, Sc Colliculus supérieur, sf Fissure secondaire, SN <i>Substantia nigra</i> , Th Thalamus).....	88
Figure 64. Images moléculaires d'une coupe de cervelet de rat enregistrées avec une résolution spatiale de 40 µm.....	89
Figure 65. Image optique d'une coupe de cerveau de rat et images moléculaires MALDI des ions m/z 1193.1, m/z 1666.3, m/z 2141.3 et m/z 2407.4 enregistrés en mode réflecteur positif.	91
Figure 66. Spectres MALDI enregistrés en mode réflecteur positif d'un digestat de la protéine BSA avec la matrice (a) HCCA et (b) HCCE, d'un digestat de la protéine Lysosyme C avec la matrice (c) HCCA et (d) HCCE.	92
Figure 67. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif après digestion trypsique et dépôt de la matrice (a) HCCA, (b) HCCA/ANI, (c) HCCE et (d) HCCE/ANI à l'aide d'une micropipette sur des coupes de cerveau de rat.	93
Figure 68. (a) Spectre de masse MALDI enregistré en mode réflecteur positif sur une coupe de cerveau de rat après micro-nébulisation de la trypsine et de la matrice HCCE/ANI sur une coupe de cerveau de rat. (b) Image optique de la cristallisation de l'HCCE/ANI après micro-nébulisation. (c) Images MALDI reconstruite pour quatre ions présentant des répartitions différentes au sein d'une coupe de cerveau de rat.	94
Figure 69. Photographies d'un concombre de mer <i>Holothuria forskali</i> (a) à l'âge adulte (b) projetant ses tubes de Cuvier.	95
Figure 70. Spectre de masse moyen MALDI enregistré par analyse directe d'une coupe de tubes de Cuvier d' <i>H. forskali</i> . (b) Images moléculaires MALDI obtenues pour les différents glycosides triterpène (rouge) détectés dans les tubes de Cuvier. La sélection de l'ion m/z 843 (en vert) a été utilisée pour la contre-coloration.	96
Figure 71. (a) Formule semi-développée de la matrice SA. (b) Image optique de la cristallisation de la matrice SA sur une coupe de cerveau de rat lavée à l'acétone, à l'EtOH et au chloroforme. (c) Spectre de masse MALDI enregistré en mode linéaire positif sur une coupe de cerveau de rat lavée à l'acétone, à l'EtOH puis au chloroforme après le dépôt de la matrice SA.	99
Figure 72. Formules semi-développées de la matrice (a) SA/ANI et (b) SA/3-AP. Images optiques de la cristallisation de la matrice (c) SA/ANI et (d) SA/3-AP sur des coupes de cerveau de rat lavées à l'acétone, à l'EtOH et au chloroforme.	100

Figure 73. Comparaison des spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif sur des coupes de cerveau de rat lavées à l'acétone, à l'EtOH puis au chloroforme après le dépôt des matrices SA, SA/ANI et SA/3-AP. 101

Figure 74. Images moléculaires MALDI obtenues à partir une coupe de cerveau de rat, avec une résolution spatiale de 100 µm, en mode linéaire positif, sur la gamme de masse m/z 3000-20000. 103

Figure 75. Photographie d'une sangsue *Hirudo medicinalis* et sa classification phylogénétique. 109

Figure 76. (a) Anatomie du système nerveux de la sangsue médicinale. (b) Schéma d'un ganglion et répartition des différents neurones²²⁰. 110

Figure 77. (a) Coupe transversale d'*Hirudo medicinalis*. (b) Photographie d'un ganglion avec les connectifs inter-ganglionnaires et segmentaires. 111

Figure 78. (a) Image optique des coupes longitudinales de chaîne nerveuse de sangsue *Hirudo medicinalis*. (b) Spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif pour l'analyse directe de la gélatine et de la chaîne nerveuse. 112

Figure 79. Images moléculaires MALDI enregistrées à partir d'un ganglion de chaîne nerveuse de sangsue pour différents peptides répartis sur la gamme de masse m/z 1000 – 5000. 113

Figure 80. (a) Schéma annoté d'une coupe transversale de sangsue adulte. (b) Image optique d'une coupe transversale de sangsue adulte. (c) Image moléculaire MALDI composite reconstruite pour une coupe transversale de sangsue adulte. 114

Figure 81. Spectre de masse MALDI enregistré sur la gamme de masse m/z 2500-10000 au niveau d'un ganglion sur une coupe transversale de sangsue adulte. 115

Figure 82. (a) Schéma de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale lésée au niveau des connectifs inter-ganglionnaires proches de la partie antérieure du ganglion 9. (b) Coupes transversales de 10 µm de la sangsue *H. medicinalis* réparties sur la totalité du ganglion 9. 116

Figure 83. Représentation en deux dimensions de tous les spectres enregistrés dans les régions analysées sur les neuf coupes du ganglion 9. 117

Figure 84. (a) Dendrogramme obtenu à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour les 9 coupes du ganglion 9. (b) Images reconstruites par superposition des branches sélectionnées du dendrogramme avec les images optiques des 9 coupes transversales de sangsue adulte au cours de la régénération. 118

Figure 85. Distribution selon l'axe antéropostérieur (coupes numérotées de 1 à 9) des peptides (a) m/z 5566, (b) m/z 6018 et (c) m/z 2475 au sein du ganglion 9 de chaîne nerveuse contrôlée et lésée.	119
Figure 86. Dendrogrammes obtenus à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour les 9 coupes transversales réalisées au niveau du ganglion 9 et images correspondantes pour la sangsue adulte (a) contrôlée et (b) au cours de la régénération.	121
Figure 87. Distribution de peptides au sein du SNC chez l'embryon de sangsue au stade J12.	122
Figure 88. (a) Exemples de peptides mis en évidence par le test statistique <i>rho</i> dans le système nerveux central de l'embryon de sangsue, défini préalablement comme ROI. (b) Peptides spécifiques de régions présentant les mêmes profils moléculaires, les ganglions segmentaires, chez l'embryon de sangsue.	123
Figure 89. (a) Spectre de masse ESI-QTOF de l'ion m/z 2475. (b) Spectre de masse MS/MS annoté de l'ion m/z 2475. (c) HIS réalisée sur une coupe d'embryon de sangsue au stade J12 avec la sonde <i>HmIF4</i>	124
Figure 90. Représentations schématiques (a) des divisions de l'encéphale et (b) du système limbique.	128
Figure 91. (a) Coloration d'une coupe coronale d'hippocampe au violet de crésyl. (b) Représentation schématique des différentes couches de l'hippocampe dorsal : Les champs ammoniques (CA) (bleu), le gyrus denté (violet) et la fimbria (vert). (c) Représentation schématique des principales connexions ipsilatérales et internes à l'hippocampe ²⁴⁹	129
Figure 92. Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique colorée au bleu de toluidine : Corne d'Ammon (CA), Gyrus denté (DG) et Subiculum (S).	131
Figure 93. Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique colorée au bleu de toluidine : Corne d'Ammon (CA), Gyrus denté (DG) et Subiculum (S) et images microscopiques de 4 régions d'intérêt obtenues à partir d'une coupe sériée après coloration HES.	131
Figure 94. (a) Spectre de masse MALDI moyen enregistré à partir (b) d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique.	133
Figure 95. Distribution des peptides dans les différentes couches du gyrus denté de patients épileptiques : Couche hilare (S.mu), couche granulaire (S.gr) et couche moléculaire (S.mo).	134
Figure 96. (a) Spectre de masse MALDI enregistré dans la région du subiculum. (b) Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1101.4. (c) Résultat de l'interrogation de la banque de	

protéines NCBI. (d) Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1101.4 annoté avec la séquence trouvée par interrogation des banques de données NCBI.	136
Figure 97. Répartition de l'ion m/z 1101.4 dans le gyrus denté.....	137
Figure 98. Image optique colorée par HES et annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique et distributions des protéines au sein du tissu.....	139
Figure 99. Images moléculaires de différents fragments de digestion trypsique obtenues à partir d'une coupe d'hippocampe de patient atteint d'épilepsie.....	140
Figure 100. Images moléculaires de différents ions obtenus après digestion enzymatique de la myéline.	141
Figure 101. Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1304.4.	143
Figure 102. Images moléculaires d'ions très proches en masse obtenues par imagerie (a,d) MALDI-TOF et (b, c, e, f) MALDI-Orbitrap.....	144
Figure 103. Gel de polyacrylamide 12% obtenu pour un extrait protéique d'hippocampe de patients atteints d'épilepsie.	145
Figure 104. (a) Spectre de masse MALDI-TOF enregistré après digestion trypsique de la bande située entre 25 et 37 kDa. (b) Séquence de la protéine chaperonne 14-3-3 et fragments de digestion issus de cette protéine et détectés dans le PMF.	146
Figure 105. (a) Résultat obtenu après interrogation en banque de données (b) Spectre MS/MS annoté de l'ion m/z 1548.7.....	147
Figure 106. (a) Spectre de masse MALDI-TOF enregistré après digestion trypsique de la bande située entre 20 et 25 kDa. (b) Séquence de la protéine phosphatidylethanolamine-binding protein-1 et fragments de digestion issus de cette protéine et détectés dans le PMF.	147
Figure 107. (a) Résultat obtenu après interrogation en banque de données (b) Spectre MS/MS annoté de l'ion m/z 1632.7.	148
Figure 108. Distribution de trois fragments de digestion issus de la protéine PEBP-1 dans une coupe d'hippocampe de patient épileptique.	149
Figure 109. Exemples de distributions de lipides au sein des structures d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique.....	152
Figure 110. Sprayer d'une source electrospray utilisé pour réaliser les dépôts de matrice sur les coupes d'hippocampes humains.	153
Figure 111. Images moléculaires de lipides obtenues sur une coupe d'hippocampe de patient épileptique à une résolution spatiale de 80 μ m.	154

Figure 112. (a) Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe humain après coloration HES. (b) Image reconstruite à partir des résultats de la classification hiérarchique. (c) Dendrogramme obtenu à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour la coupe d'hippocampe de patient atteint d'épilepsie. 155

Liste des Tableaux

Tableau 1. Liste et caractéristiques des différents spectromètres de masse disposant d'une source MALDI et compatibles avec la MSI ⁵⁶	13
Tableau 2. Listes et caractéristiques des différents instruments utilisés pour le dépôt automatique de la matrice sur les tissus en MSI.	29
Tableau 3. Liste des spectromètres de masse utilisés en MSI et caractéristiques des lasers ⁵⁶ . AB : Applied Biosystems ; BD : Bruker Daltonics ; SH : Shimadzu ; TS : Thermo Scientific, WA: Waters.....	32
Tableau 4. Liste des logiciels utilisés pour l'acquisition, la conversion et la reconstruction des images MALDI ⁵⁶ . AB : Applied Biosystems ; BD : Bruker Daltonics ; SH : Shimadzu ; TS : Thermo Scientific, WA: Waters.....	33
Tableau 5. Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.....	59
Tableau 6. Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur négatif à partir de la même coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.....	60
Tableau 7. Exemples de lipides détectés dans les cinq régions mises en évidence sur la coupe de tissu cancéreux ovarien après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.	65
Tableau 8. Liste complète des saponines détectées par analyse directe par spectrométrie de masse MALDI des coupes de tubes de Cuvier d' <i>H. forskali</i>	98
Tableau 9. Comparaison des résultats, en termes d'intensité et de rapport signal sur bruit, obtenus lors de l'analyse en mode linéaire positif des protéines sur une coupe de cerveau de rat après dépôt des matrices SA, SA/ANI et SA/3-AP.	102
Tableau 10. Distribution de quelques peptides du SNC de la sangsue en fonction de la position de la lésion. (Rouge : Peptides « constitutifs », Bleu : Peptides recrutés près du site de lésion au cours de la régénération, Vert : Peptides retrouvés uniquement au cours de la régénération).....	120
Tableau 11. Distribution de quelques peptides au sein du gyrus denté de patients épileptiques.	135
Tableau 12. Liste des peptides de digestion détectés sur coupe obtenus pour les protéines majoritaires.....	143
Tableau 13. Liste des lipides mis en évidence dans les différentes structures d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique.....	156
Tableau 14. Méthodes utilisées pour l'électronébulisation des matrices sur les coupes de tissu.....	170

Liste des Abréviations

- 2,5-DHB** : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
3-AP : 3-acétylpyridine
3HPA: Acide hydroxypicolinique
AcN : Acetonitrile
AG: Antigen Retrieval
ANI : Aniline
ATT: 6-aza-2-thiopyrimidine
Benz: Benzylamine
BSA: Bovin Serum Albumin
DANI: N,N-dimethylaniline
DEANI: N,N-diethylaniline
DESI: Desorption ElectroSpray Ionization
DHAP: 2,6-dihydroxyacetophenone
DTT: Dithiothréitol
ECD: Electron Capture Dissociation
ESI : ElectroSpray Ionization
EST: Expressed Sequence Tag
ETD: Electron Transfert Dissociation
EtOH: Ethanol
FFPE: Formalin Fixed and Paraffin Embedded
FT-ICR: Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
GP: Glycérophospholipide
HCCA: Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HCCE: 4-hydroxycinnamique methyl ester
HES: Hématoxyline Eosine Safran
HIS: Hybridation *In Situ*
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HUPO: Human Proteome Organization
IAA: Iodoacétamide
ISD: In Source Decay
ITO: Indium Tin Oxyde
LC: Chromatographie Liquide

LIM: Matrice Ionique Liquide
LDI: Laser Desorption Ionization
MALDI: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MBP: Myelin Basic protein
ME-SIMS: Matrix-Enhanced Secondary Ion Mass Spectrometry
MeOH: Methanol
MI: Matrice Ionique
MMP: Matrix Metalloprotéase
MND: Maladies Neurodégénératives
MS: Mass Spectrometry
MS/MS: Tandem Mass Spectrometry
MSI: Mass Spectrometry Imaging
N₂: Azote
OGP: Octyl β-D glucopyranoside
PCA: Analyse en Composante Principale
pHPMA: Poly[N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide]
PMF: Peptide Mass Fingerprint
Pyr: Pyridine
ROI: Région d'intérêt
SA: Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique ou Acide sinapinique
SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIMS: Secondary Ion Mass Spectrometry
SIM: Matrice Ionique Solide
SMALDI: Scanning Microprobe Matrix Laser Desorption Ionization
S/N: Rapport Signal/Bruit
SNC: Système Nerveux Central
SP: Sphingolipide
SRM: Single Reaction Monitoring
TEA: Triéthylamine
TFE: 2,2,2-trifluoroéthanol
THAP: 2,3,4-trihydroxyacetophenone
TLE: Epilepsie du Lobe Temporal
TMG: 1,1,3,3-tetraméthylguanidine
TOF: Time of Flight
TQ: Triple Quadripôle
UV: Ultraviolet

Introduction

Les termes « protéomiques » et « protéome » ont été introduits à la fin des années 1990¹. La protéomique ; qui consiste à identifier, à caractériser et à quantifier les protéines spécifiques d'un état physiologique d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe ; est devenue un champ de recherche très actif. En effet, ces macromolécules sont essentielles pour tous les organismes vivants en raison de leur implication dans diverses fonctions cellulaires. Par assimilation, l'expression « peptidomique » a fait son apparition dans le langage scientifique. Les peptides ont également un rôle central dans plusieurs processus physiologiques tels que les réactions immunitaires², le développement du système nerveux^{3, 4}. Aux vues de l'importance de ces biomolécules, il est possible de considérer ces dernières comme d'excellentes cibles thérapeutiques ou molécules médicamenteuses⁵.

L'identification et la caractérisation de ces biomolécules sont désormais en bonne voie grâce aux avancées technologiques réalisées ces dernières années et notamment grâce à la spectrométrie de masse (MS)^{6, 7}. Cet outil de choix permet d'analyser des biomolécules polaires et de haut poids moléculaire avec une grande sensibilité pour une faible consommation d'échantillon. Outre les informations sur le poids moléculaire, la MS permet d'accéder aux modifications post-traductionnelles mais aussi de déterminer la séquence en acides aminés. La MS/MS combinée à l'interrogation de banques de données permet soit de réaliser directement l'analyse structurale des petites molécules, soit de confirmer le « Peptide Mass Fingerprint » obtenu après digestion enzymatique des biomolécules de haut poids moléculaire^{8,9}.

Cependant, lors des recherches effectuées sur de telles biomolécules, en raison de leur complexité, il est courant de réaliser une purification des échantillons biologiques, préalable à l'analyse par MS. Or, les étapes d'extraction, de fractionnement, de séparation et de concentration des protéines demandent du temps et entraînent une perte de certains composés minoritaires. Le problème majeur de ces stratégies conventionnelles d'analyse impliquant la MS reste la perte de la dimension spatiale. En effet, au sein d'un organe, les biomolécules vont être spécifiques de certains types cellulaires et de structures tissulaires, et ceci afin de jouer efficacement leur rôle. C'est pourquoi, la localisation des composés dans leur contexte d'origine, *i.e.* organe, organisme, est essentielle. Parmi les techniques généralement employées pour localiser des protéines dans une coupe de tissu, on retrouve

l'immunohistochimie et l'immunofluorescence. Ces techniques reposent sur la reconnaissance anticorps/antigène et impliquent de connaître au préalable l'antigène d'intérêt et de générer l'anticorps spécifique de cette cible. Le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) constitue donc une avancée importante puisqu'elle permet à la fois la détection et la localisation de centaines de biomolécules directement à partir de sections minces de tissus sans a priori.

Différentes sources de production d'ions sont compatibles avec la MSI. Cependant, les nombreux avantages tels que la possibilité d'introduire des échantillons sous forme solide ou la détection des molécules sur une large gamme de masse, font, de l'instrumentation MALDI, une source très performante pour l'étude de la localisation des peptides ou des protéines¹⁰. Cependant, elle reste, malgré dix années de recherches intensives¹¹⁻²¹, une technologie récente qui nécessite encore de nombreux développements notamment au niveau de l'amélioration de la résolution spatiale pour la détection des peptides et des protéines, de l'identification des biomolécules avec leurs modifications post-traductionnelles directement sur les coupes de tissus, de la détection des protéines de masse supérieure à 30 kDa (*e.g.* les protéines membranaires), de la corrélation avec les images histologiques et *in vivo* (*i.e.* IRM, PET-SCAN), de l'imagerie moléculaire 3D, ou encore des logiciels de « data mining » et de biostatistiques qui permettent de prendre en compte la nature moléculaire de chacune des cellules avec leur phénotype.

Malgré les développements restant à réaliser, on peut considérer que l'imagerie MALDI a atteint une maturité suffisante pour être, à côté de ses grandes sœurs, *i.e.* la protéomique et l'imagerie *ex vivo*, une technologie permettant d'appréhender l'étude du vivant. Ainsi, l'imagerie MALDI trouve de nombreuses applications dans le domaine clinique, notamment pour la recherche de biomarqueurs associés à des processus physiopathologiques²¹⁻²⁶. La **Figure 1** met en évidence une augmentation croissante du nombre d'articles basés sur l'utilisation de l'imagerie MALDI comme outil d'investigation.

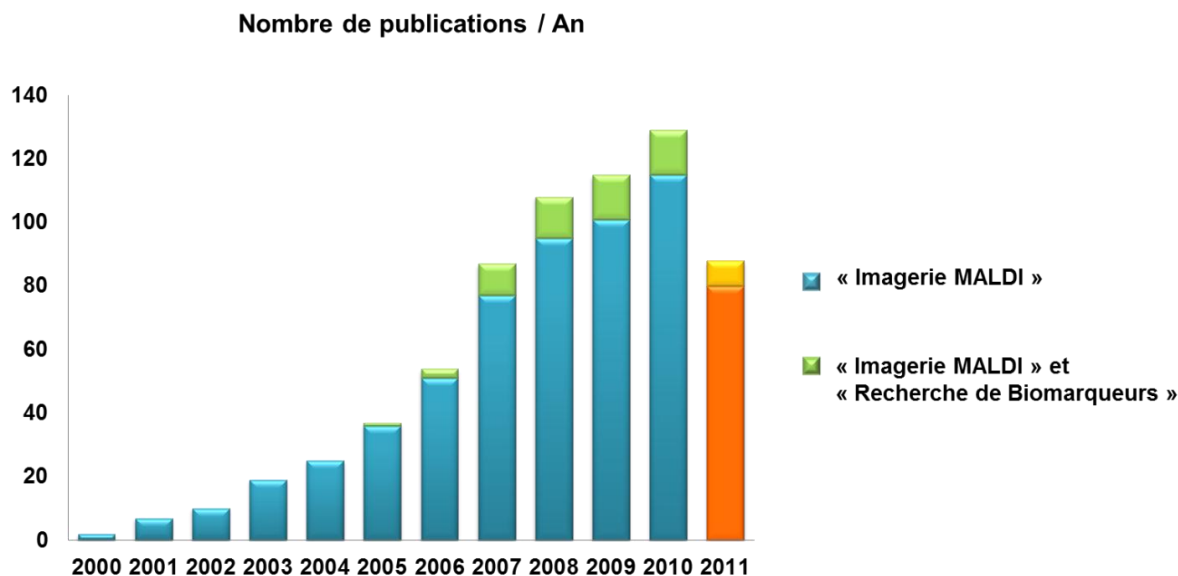


Figure 1. Nombre de publications scientifiques internationales par an concernant l'imagerie MALDI (■) et la recherche de biomarqueurs par imagerie MALDI (■) de 2000 à Aout 2011 (Source PubMed).

Dans ce contexte, ma thèse a donc porté à la fois sur l'amélioration de la technologie et son application dans le domaine des neurosciences. En effet, les nombreux dysfonctionnements et les nombreuses pathologies liés au système nerveux central (SNC) et, en particulier, l'accroissement considérable de l'incidence des maladies neurodégénératives dans les pays industrialisés ont généré une augmentation importante des recherches menées dans ce domaine. Les affections comme l'épilepsie ou les pathologies dites progressives (maladies neurodégénératives, MND) telles qu'Alzheimer ou Parkinson représentent actuellement un réel problème de santé publique.

Ces observations ont, ainsi, conduit à proposer un sujet de recherche portant sur l'étude de la dynamique des biomolécules impliquées au cours des processus de régénération et de dégénérescence du SNC par l'utilisation de l'imagerie MALDI combinée à des méthodes de biochimie classiques. L'ensemble des travaux effectués durant ma thèse sont présentés ici, au travers des 4 chapitres de ce manuscrit comprenant :

Le **chapitre 1** est un chapitre bibliographique, où sera décrit le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse.

Le **chapitre 2** traitera de l'optimisation des méthodes pour la détection des biomolécules. En effet, lors des analyses par imagerie MALDI, la préparation préalable des échantillons se révèle être une étape cruciale. Il est donc important d'appliquer des traitements

chimiques et de choisir la matrice ainsi que son mode de dépôt (micro-dépôt, électronébulisation,...) en fonction du tissu et des molécules d'intérêt. L'apport des outils bioinformatiques tels que les analyses multivariées, afin d'extraire, plus rapidement et avec une plus grande fiabilité, des informations sur les marqueurs en fonction des phénotypes à partir des jeux de données, est également un élément crucial pour les applications de l'imagerie dans le domaine de la biologie.

Le **chapitre 3** abordera l'application de l'imagerie MALDI et de ses développements au modèle invertébré, la sangsue médicinale, aux stades embryonnaire et adulte. Cette partie a pour but de comparer les mécanismes biologiques intervenant lors de l'édification du SNC (neurogénèse) et de la régénération nerveuse après lésion de ce système.

Le **chapitre 4** regroupera les résultats obtenus en MALDI-MSI à partir d'échantillons d'hippocampes humains. Des études sur les atteintes neurologiques ont été entreprises afin de comprendre les facteurs clés impliqués dans la balance régénération/dégénérescence.

1. Généralités

1.1. *Imagerie par spectrométrie de masse (MSI)*

1.1.1. Principe

La MSI est une technique qui utilise le pouvoir analytique de la spectrométrie de masse pour détecter et localiser les biomolécules contenues dans un échantillon solide. En se basant sur la mesure du rapport masse sur charge (m/z), elle permet en une seule étape d'obtenir la localisation d'un grand nombre de composés, connus ou inconnus, constituant la surface par analyse directe de l'échantillon. Ainsi, aucune étape d'extraction et/ou de séparation n'est requise. Cependant, comme en MS classique, cette méthode d'analyse est dite « destructive » puisque les ions étudiés en phase gazeuse sont issus de la désorption des composés à partir de la surface de l'échantillon. Ainsi, en MSI, différentes méthodes d'ionisation existent. Ces méthodes reposent sur l'utilisation de sources de production d'ions basées sur un arrachement des composés de la surface suite au bombardement de l'échantillon par un faisceau d'ions primaires (sources SIMS), un faisceau laser (sources LDI, MALDI) ou encore, un faisceau de gouttelettes chargées (sources DESI). Par conséquent, certaines sources couramment utilisées en MS classique ne sont pas adaptées à l'imagerie, comme les sources ESI qui fonctionnent à partir d'un échantillon liquide. De plus, afin d'obtenir les informations sur la localisation des biomolécules, le contrôle de l'aire à partir de laquelle les ions ont été arrachés ou le maintien de la trajectoire de l'ion au cours de l'analyse est requis. Pour cela, deux approches existent en MSI :

L'analyse en mode point par point (Figure 2a). L'analyse en mode point par point est l'approche la plus simple et donc la plus couramment utilisée pour les expériences de MSI. Pour ce mode, l'aire irradiée par le faisceau incident est contrôlée afin de définir la résolution spatiale de l'analyse, c'est-à-dire la résolution finale de l'image. Le faisceau incident est focalisé sur une aire définie de l'échantillon où un spectre de masse est enregistré avec les coordonnées spatiales de cette aire. Ce procédé est répété de manière automatique jusqu'à ce que la totalité de l'échantillon soit balayée. Le déplacement d'un point à un autre peut s'effectuer soit par le déplacement de l'échantillon sous le faisceau, soit par le déplacement du faisceau lui-même. Les données générées par cette analyse incluant les coordonnées, les m/z et leurs valeurs d'intensité, sont traitées par des logiciels spécialement conçus à cet effet. La reconstruction des images moléculaires est effectuée grâce à ces logiciels de traitement des

données, qui pour un ion d'intérêt, en chaque position analysée, fournissent les variations d'intensité représentées par une échelle de couleur.

L'analyse en mode microscope (Figure 2b). Dans cette approche, la source d'ions permet de générer des images moléculaires à partir d'une coupe comme le fait un microscope optique via les photons. L'information spatiale est préservée à l'intérieur du spot puisque les ions conservent leur position relative pendant leur déplacement de la coupe jusqu'au 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. Avoir recours à son utilisation est beaucoup plus rare et ceci s'explique par sa mise en œuvre plus complexe et plus coûteuse liée au système optique de grande précision nécessaire au guidage des ions jusqu'au détecteur. Aucun appareil dédié à l'imagerie par spectrométrie de masse en mode microscopique n'étant commercialisé à ce jour, seuls les laboratoires ayant développé un instrument compatible utilisent donc cette approche ²⁷.

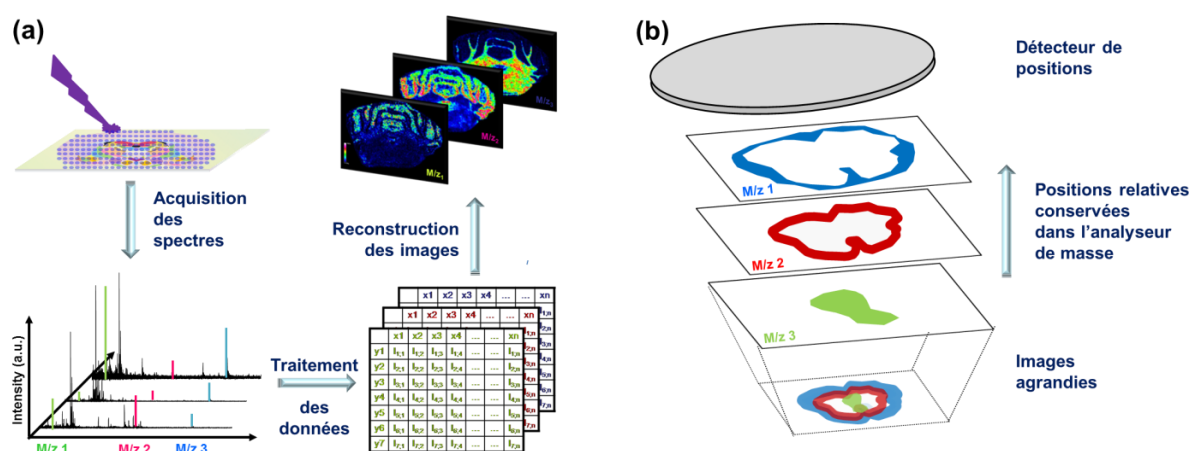


Figure 2. Schéma représentatif des différents modes d'acquisition (a) Mode point par point ou (b) Mode microscope.

1.1.2. Imagerie MALDI

1.1.2.1. Principe

1.1.2.1.1. La source MALDI

La spectrométrie de masse MALDI a été introduite par Karas et Hillenkamp au milieu des années 1980. La source MALDI repose sur les méthodes de désorption laser (LDI) dans lesquelles des impulsions laser engendrent l'ionisation des molécules à partir d'un échantillon solide. La détection offerte par la technique LDI est limitée aux composés de faible masse (<300 u) et ayant des propriétés physiques particulières. Afin de dépasser les limites liées au processus de désorption/ionisation, des recherches ont été effectuées sur les matrices. En effet, lors de travaux préliminaires sur l'analyse LDI d'acides aminés, les équipes de F. Hillenkamp et de M. Karas ont constaté une meilleure ionisation, à une plus faible irradiance, en présence d'acides aminés absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé, tels que ceux possédant un groupement aromatique^{28, 29}. Dans un même temps, un groupe dirigé par K. Tanaka a développé une matrice inorganique élaborée à partir d'une fine poudre de métal (cobalt) en suspension dans du glycérol³⁰. Cette matrice a permis l'ionisation de nombreux polymères et protéines sans induire de fragmentation. La poursuite des travaux de Karas et Hillenkamp a consisté à définir les composés organiques de faible poids moléculaire absorbant dans l'UV et pouvant être employés comme matrice. Ainsi en 1988, ceux-ci sont parvenus à détecter l'albumine, une protéine de 67 kDa, en utilisant l'acide nicotinique comme matrice organique. Par la suite, des expériences ont mis en évidence l'intérêt d'utiliser des dérivés de l'acide cinnamique comme matrice MALDI. Les matrices organiques se sont révélées beaucoup plus sensibles avec des signaux d'une intensité 500 à 1000 fois supérieure à celle obtenue avec la matrice à base de glycérol. C'est pourquoi, elles sont, à ce jour, les plus fréquemment employées.

Le MALDI est une technique de production d'ions permettant l'analyse de composés, sur une large gamme de masse, quelque soit la polarité de l'échantillon, sous leur forme intacte. Le MALDI repose donc sur l'utilisation de petits composés organiques, appelés matrice, absorbant à la longueur d'onde du laser utilisé et nécessaires au processus de désorption/ionisation des composés non volatils. La co-cristallisation du composé à analyser avec un excès de matrice conduit à l'obtention d'un dépôt solide constitué de micro cristaux de matrice formant un réseau cristallin dans lequel est incorporé l'analyte (**Figure 3**). Le dépôt est en général réalisé sur une plaque métallique (*i.e.* inox), couramment appelée cible MALDI, qui est transférée dans le spectromètre de masse. Les mécanismes conduisant à

l'observation des ions en phase gazeuse sont encore mal connus mais peuvent globalement se résumer de la manière suivante. Le dépôt est soumis à une irradiation par un faisceau laser pulsé. Dans les conditions classiques, le MALDI fonctionne avec des lasers émettant dans l'ultraviolet et de manière générale avec un laser N₂ émettant à 337 nm. L'irradiation du dépôt par le faisceau laser provoque une excitation électronique des molécules de matrice par absorption des photons. La relaxation de l'énergie absorbée au sein du solide provoque l'éjection des molécules de matrice entraînant ainsi avec elles les molécules d'analyte. L'éjection produit un jet moléculaire gazeux appelé plume. Il faut cependant noter qu'une grande partie des molécules éjectées restent neutres lors du processus de désorption/ionisation. Parmi les ions, sont formés des ions d'analyte mais également pour une grande partie, des ions de matrice. Les espèces principalement observées en MALDI sont des ions monochargés. En mode d'ionisation positif, les espèces se trouvent généralement sous forme protonée $[M+H]^+$, mais elles peuvent également être cationisées si l'échantillon contient des traces de sels (*i.e.* des ions cationisés par le sodium $[M+Na]^+$ ou par le potassium $[M+K]^+$). De la même façon, en mode d'ionisation négatif, les espèces les plus abondantes sont généralement sous la forme $[M+H]^-$.

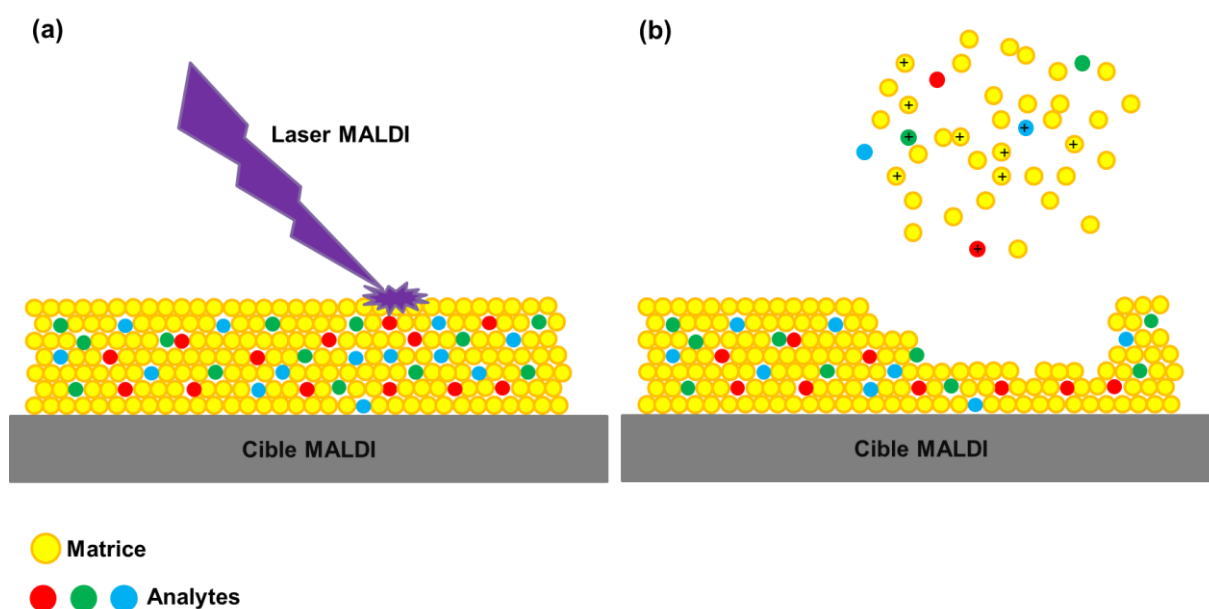


Figure 3. Schéma simplifié du processus MALDI. (a) Co-cristallisation des molécules de matrice et d'analytes sur la cible MALDI puis irradiation par un laser impulsif. (b) Désorption de la matrice et des analytes puis ionisation en phase gazeuse.

1.1.2.1.2. Les matrices

La matrice MALDI joue donc un rôle fondamental dans le processus de désorption/ionisation. Cependant, il n'existe pas de matrice « universelle ». En effet, le choix de celle-ci va déterminer la classe de biomolécules détectées, la formation d'adduits, la stabilité des analytes. Le manque de connaissances concernant les processus MALDI ne permet pas de prévoir à l'avance les performances analytiques d'une matrice. La recherche de nouvelles matrices se fait donc de manière empirique en s'appuyant sur des paramètres expérimentaux tels que la solubilité dans les solvants classiquement employés en MALDI ou la cinétique de sublimation sous vide poussé. La matrice doit former un réseau cristallin incluant l'analyte, être soluble dans les solvants capables de dissoudre l'échantillon et d'absorber à la longueur d'onde du laser. En UV-MALDI, les matrices sont de petites molécules organiques absorbant entre 266 et 355 nm, dépendamment du laser équipant la source. L'acide nicotinique utilisé dans les premières expériences MALDI à 266 nm a été, par la suite, remplacé par des matrices plus performantes à des longueurs d'onde 337 ou 355 nm. L'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), introduite par l'équipe de F. Hillenkamp en 1991^{31, 32}, s'est révélé être une matrice adaptée à l'analyse des composés de faible poids moléculaire, des polymères, des peptides, des protéines mais également des glycoprotéines. Les dérivés d'acides cinnamiques sont également des matrices adéquates pour l'analyse MALDI³³. Parmi eux, on retrouve l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) utilisé pour l'analyse des peptides et des protéines et l'acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique ou acide sinapinique (SA) dédié à l'analyse des protéines intactes³⁴. Pour l'analyse des lipides ou des oligonucléotides, les polyhydroxyacetophenones tels que la 2,3,4-trihydroxyacetophenone (THAP) et la 2,6-dihydroxyacetophenone (DHAP), ou les hétérocycles aromatiques tels que l'acide hydroxypicolinique (3HPA) et l'aza-2-thiotymine (ATT) sont couramment employés^{35, 36}.

Afin d'augmenter le rendement d'ionisation, d'améliorer la résolution spectrale, d'étendre les classes de molécules détectées, de nouvelles matrices ont été mises au point. La spermine a, par exemple, été ajoutée à l'ATT pour améliorer la détection des oligonucléotides³⁷. Des mélanges de matrices ont été testés comme l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque et l'acide 2-hydroxy-5-méthoxy-benzoïque qui a permis d'analyser les protéines de haut poids moléculaire ou les protéines glycosylées.

Le perpétuel développement de nouvelles matrices est également motivé par les inconvénients présentés par les matrices conventionnelles, dans certaines conditions de

préparation. En effet, la répartition des analytes dans les cristaux de matrice peut parfois être hétérogène. Ce phénomène appelé « hot spot » peut entraîner une variation de l'intensité du signal et donc une perte de résolution spectrale. En 2001, de nouvelles matrices dites ioniques ont été synthétisées³⁸. Ces matrices ioniques (MI) sont des sels organiques obtenus par réaction acido-basique tout comme les liquides ioniques en synthèse organique. Ces sels organiques de formule de type $[A^+, B^-]$ sont formés par un mélange équimolaire entre une matrice conventionnelle et une base. L'utilisation de différentes matrices conventionnelles (*e.g.* HCCA, SA, 2,5-DHB) et de différentes bases organiques (*e.g.* aniline, pyridine, butylamine) permet ainsi d'avoir accès à un large panel de matrices sous la forme solide (SIM)^{38,39} ou sous la forme liquide (LIM)^{40,41} (**Figure 4**).

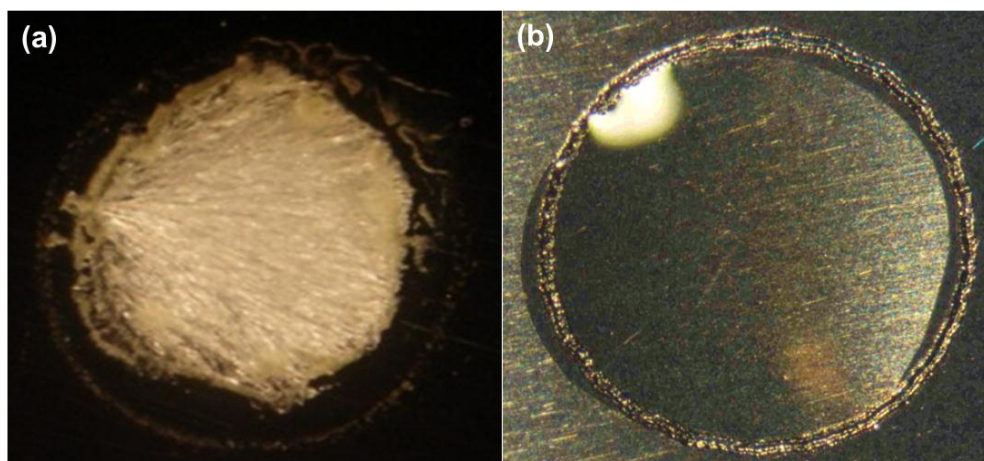


Figure 4. Cristallisation obtenue avec (a) HCCA/Aniline et (b) 2,5-DHB/Butylamine⁴⁰.

Ces différentes MI permettent donc de détecter différentes classes de biomolécules tels que les protéines⁴⁰, les peptides⁴², les lipides⁴³. Les LIMs, en favorisant une répartition parfaitement homogène des analytes dans le liquide, améliore très nettement les performances en terme de quantification^{42,44}.

1.1.2.1.3. Les analyseurs compatibles

Suite à l'étape de désorption/ionisation dans la source MALDI, les ions sont séparés en fonction de leur rapport m/z dans l'analyseur. Différents types d'analyseurs peuvent être couplés à la source MALDI. La gamme de masse théorique illimitée accordée par l'analyseur de type TOF (Time of Flight), permettant autant l'analyse de petites molécules que de

protéines, explique qu'il soit très souvent employé lors des expériences d'imagerie MALDI. En effet, les ions produits en MALDI sont principalement mono-chargés, ce qui implique le couplage à un analyseur de type TOF pour l'analyse des hauts poids moléculaires (>5000 u). De plus, le TOF est extrêmement sensible et possède un cycle utile très court. Ces caractéristiques permettent donc la réalisation d'images à haut débit par augmentation de la fréquence de répétition des tirs laser. En revanche, la résolution spectrale qu'offre le TOF ne permet pas de distinguer des ions ayant des masses très proches. En moyenne, pour un m/z de 1500, la résolution spectrale sera d'environ 20000-30000.

Afin de contourner le problème de séparation des composés de m/z proches, deux stratégies peuvent être employées, d'une part, l'utilisation d'instruments avec une bonne résolution spectrale, et d'autre part, l'ajout d'une dimension supplémentaire.

Les instruments tel que le FT-ICR (*Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*) permettent d'atteindre de meilleures résolutions spectrales⁴⁵. Cependant, le FT-ICR est limité en gamme de masse et possède un cycle utile assez long. En termes de sensibilité, celle-ci est très correcte pour les bas poids moléculaires⁴⁶ (*i.e.* les médicaments et les lipides) mais est moindre pour les peptides. L'orbitrap possède, quant à lui, une résolution spectrale qui lui permet de rivaliser avec celle du FT-ICR. Mais, tout comme le FT-ICR, la gamme de masse de l'orbitrap est limitée, ce qui en fait un excellent instrument pour l'analyse des petits composés jusqu'aux peptides^{47,48}.

La seconde approche consiste à rajouter une dimension supplémentaire de séparation. En effet, des composés de m/z proches peuvent présenter des séquences et des structures différentes. En insérant une cellule de mobilité ionique après la source MALDI, les ions sont, dans un premier temps, séparés en fonction de leur conformation en phase gazeuse, puis sont séparés selon leur m/z . Les données peuvent alors être visualisées sous forme de cartes 2D avec le m/z versus la mobilité ionique des ions^{49,50}.

Concernant l'analyse structurale des molécules, il est possible d'utiliser des analyseurs plus adaptés à la fragmentation. Des analyseurs quadripolaires comme le triple quadripôle (TQ) ou les trappes ioniques peuvent ainsi être couplés à la source MALDI. Ces analyseurs sont, en particulier, dédiés à la recherche, dans les tissus, de médicaments, de leurs métabolites⁵¹ ainsi que de lipides⁵².

La combinaison de plusieurs analyseurs, afin d'obtenir de bonnes performances pour l'analyse directe et structurale à partir des tissus, a conduit à l'apparition de nouveaux

appareils dits « hybrides ». Parmi eux, on trouve les instruments quadripôles-temps de vol (Q-TOF⁵³), les quadripôles-trappes ioniques (QIT) couplés à un TOF^{54, 55}. Les spécifications de ces instruments « hybrides » sont dépendantes du choix de la combinaison des analyseurs. Il est donc judicieux d'opter pour l'instrument le plus adéquat pour mener l'étude. Les instruments actuellement commercialisés et adaptés à l'imagerie MALDI sont répertoriés dans le **Tableau 1**.

Instrument	Constructeur	Analyseur	Gamme de masse
QSTAR Elite System	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	40 - 40kDa
QSTAR Pulsar i System	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	40 - 40kDa
QSTAR XL System	Applied Biosystems/ MDS Sciex	QqTOF	40 - 40kDa
5800 MALDI TOF/TOF Analyser	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF-TOF	Full
4800 MALDI TOF/TOF Analyser	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF-TOF	Full
4700 Proteomics TOF/TOF Analyser	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF-TOF	Full
Voyager DE STR Workstation	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF	Full
Voyager DE PRO Workstation	Applied Biosystems/ MDS Sciex	TOF	Full
UltrafleXtreme	Bruker	TOF-TOF	Full
Ultraflex III : Autoflex III	Bruker	TOF-TOF	Full
Autoflex IV	Bruker	TOF	Full
Solarix MI	Bruker	Hybrid FTMS	100-10kDa
AXIMA QIT	Shimadzu	Ion Trap - TOF	0-20kDa
AXIMA Assurance	Shimadzu	TOF	Full
AXIMA Confidence	Shimadzu	TOF	Full
AXIMA Performance	Shimadzu	TOF-TOF	Full
MALDI LTQ XL	Thermo Fisher Scientific	Ion Trap	50-4kDa
MALDI LTQ Orbitrap Discovery	Thermo Fisher Scientific	Ion Trap – Orbitrap Hybrid	50-4kDa
MALDI LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific	Ion Trap – Orbitrap Hybrid	50-4kDa
MALDI micro MX	Waters	TOF	Full
MALDI Q-ToF Premier	Waters	Qq-oaTOF	20-40kDa
MALDI SYNAPT G2 HDMS	Waters	Q-IMS-oaTOF	20-40kDa
MALDI SYNAPT G2 MS	Waters	Q-TWave-oaTOF	20-40kDa

Tableau 1. Liste et caractéristiques des différents spectromètres de masse disposant d'une source MALDI et compatibles avec la MSI ⁵⁶.

1.1.2.2. Les développements en imagerie MALDI

Bien que l'étape essentielle soit l'analyse MALDI par elle-même, la réalisation des images MALDI fait appel à différentes étapes. La **Figure 5** présente une séquence complète d'imagerie MALDI, comprenant une étape de prélèvement et de conservation du tissu, de réalisation des coupes, de dépôt de matrice, d'acquisition des données en mode point par point et enfin de traitement informatique de ces données. Afin d'améliorer la qualité des images, notamment en terme de résolution spectrale, de résolution spatiale, de gamme de masse, de nombreux développements ont été réalisés et seront abordés dans la suite de ce chapitre.

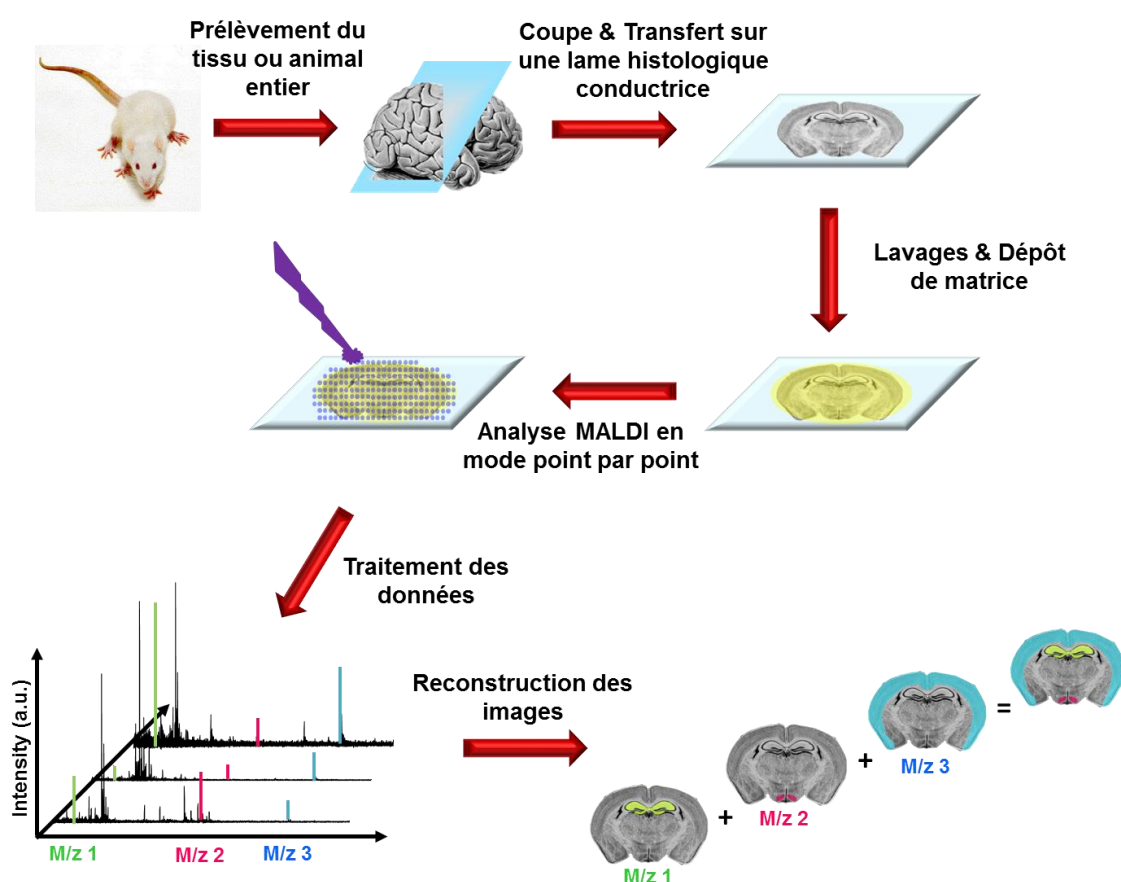


Figure 5. Schéma représentatif d'une expérience MALDI : De la préparation de l'échantillon à la reconstruction des images.

1.1.2.2.1. Le prélèvement et la conservation des tissus

L'imagerie par spectrométrie de masse consiste à l'obtenir des images reflétant fidèlement la localisation des molécules au sein de la coupe. Il est donc important de préserver les structures du tissu lors de l'étape de prélèvement de l'organe. De plus, la

reproductibilité au niveau de la qualité des spectres tient à la préparation du tissu préalablement à sa conservation. En effet, il est important de s'assurer de l'absence de dégradation, de modifications et de diffusion des molécules dans le tissu. Après une dissection rapide, les tissus subissent une préparation pour garantir une bonne conservation. Basés sur les techniques utilisées classiquement dans le domaine de l'histologie et de l'immunohistochimie, trois protocoles de conservation des organes sont utilisés pour les études en MSI. Il est ainsi possible de conserver les tissus par congélation, fixation puis congélation ou fixation et inclusion en paraffine. Ces stratégies sont résumées dans la **Figure 6**.

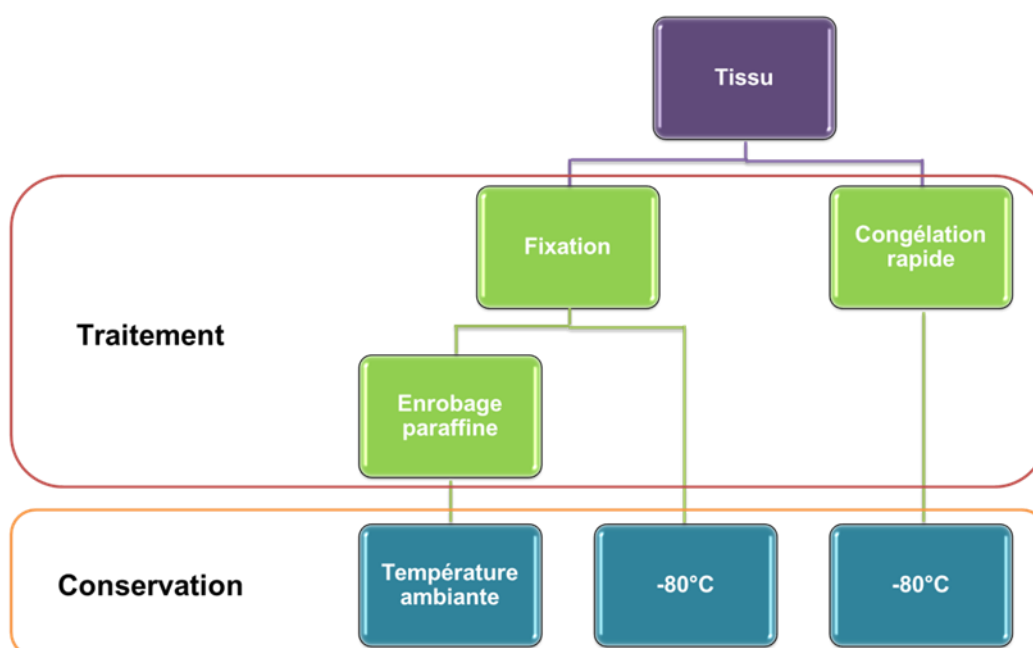


Figure 6. Représentation schématique des différentes méthodes de préparation et de conservation des tissus pour l'imagerie MALDI ⁵⁷.

La première méthode consiste à congeler les échantillons. Pour cela, le tissu subit un refroidissement rapide dans l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Les intérêts de ce protocole sont la rapidité de mise en œuvre et l'absence de composés exogènes ou de réactions chimiques susceptibles d'interférer lors de l'analyse. Plonger l'organe dans l'isopentane refroidi permet une meilleure préservation morphologique qu'avec une congélation brutale dans un bain d'azote. L'échantillon congelé est ensuite conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Cependant, la durée de stabilité étant assez courte, seule une conservation de quelques mois est autorisée. De plus, lors de la réalisation des coupes, dans l'enceinte d'un cryostat, à environ -20°C, les structures fines peuvent être endommagées. Une analyse rapide suite à la

réalisation des coupes est nécessaire car un temps prolongé à température ambiante avant le dépôt de matrice peut entraîner une dégradation des molécules (**Figure 7**)⁵⁸.

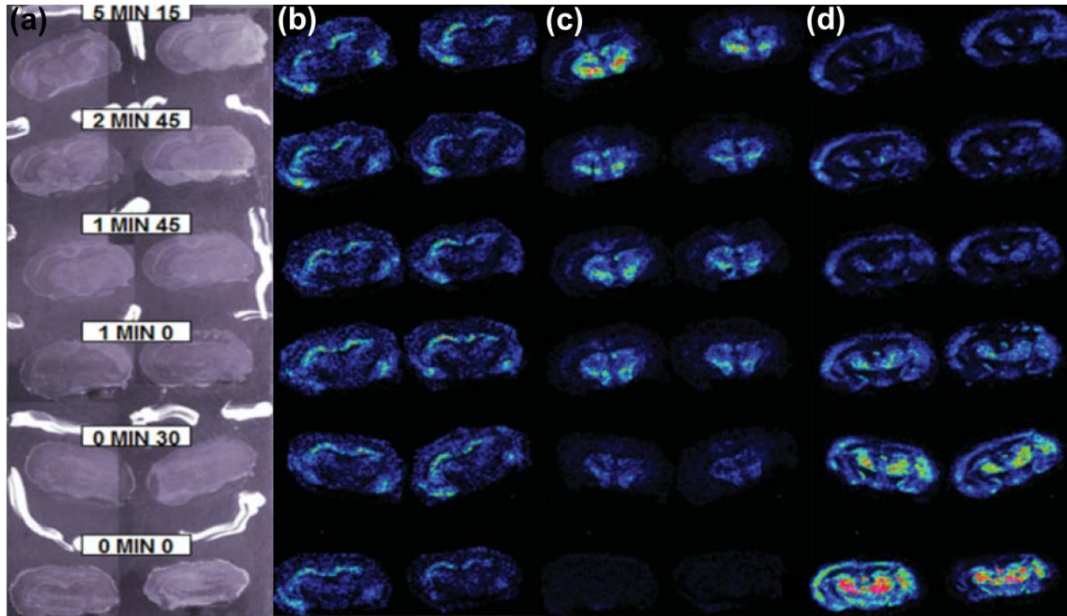


Figure 7. Images (a) optiques et moléculaires MALDI des ions (b) m/z 2608.2, (c) m/z 2479.2 et (d) m/z 6724.4 obtenues à partir de coupes de cerveau de souris chauffées à température ambiante pendant différents temps⁵⁸.

La deuxième possibilité est de fixer chimiquement l'échantillon. Cette méthode permet de le stabiliser sur une plus longue période de temps. Dans ce cas de figure, deux types de fixation sont envisageables, soit par déshydratation à l'alcool (e.g. éthanol (EtOH)), soit par réticulation à l'aide d'aldéhydes (e.g. paraformaldéhyde, glutaraldéhyde). L'avantage de la fixation à l'EtOH (**Figure 8**)⁵⁹ est qu'elle n'induit pas de modification moléculaire contrairement aux aldéhydes qui créent une réticulation des protéines via la formation de ponts méthylène entre les lysines, les thiols ou les fonctions alcool des chaînes latérales des acides aminés⁶⁰⁻⁶². Cependant, une combinaison avec l'acide acétique, un agent dénaturant, est souvent réalisée lors de la fixation à l'EtOH car les alcools utilisés seuls peuvent conduire à une rétraction du tissu et donc à des modifications structurales⁶³.

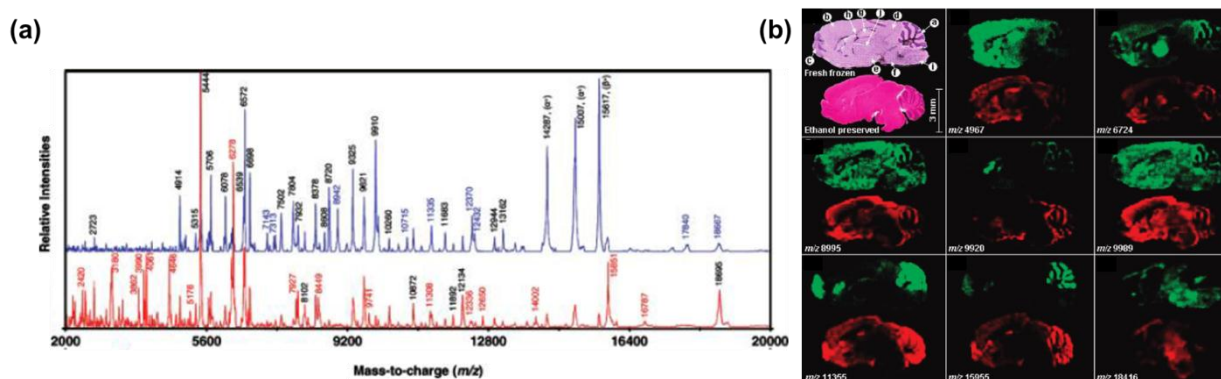


Figure 8. (a) Comparaison des profils protéiques enregistrés sur la gamme de masse m/z 2000-20000 à partir de coupes de foie de souris congelé (bleu) ou fixé à l'éthanol et paraffiné (rouge). (b) Images optiques et moléculaires MALDI obtenues à partir de coupes de cerveau de souris congelé ou fixé à l'éthanol et paraffiné ⁵⁹.

Concernant, la fixation par réticulation, le temps de fixation se détermine en fonction du volume du bloc à fixer. Cependant, toutes les réactions chimiques générées ne sont pas bien connues. En effet, bien que la cinétique de fixation au paraformaldéhyde soit rapide, il semble que le processus de pontage se poursuive au sein du tissu après le retrait de la solution de fixation. En outre, les petits composés, les oligonucléotides et les lipides par exemple, peuvent être délocalisées ou éliminées du tissu à la suite des différentes étapes de préparation ^{64, 65}. Les organes fixés peuvent ensuite être conservés par une simple congélation à -80°C ou par enrobage dans la paraffine. Cette inclusion permet une meilleure préservation des structures lors de la réalisation des coupes, dans les blocs fixés, à l'aide du microtome. Le plus fréquemment, les tissus sont fixés au paraformaldéhyde et inclus dans la paraffine. On parle alors de tissus « Formalin Fixed and Paraffin Embedded » ou FFPE. La préservation FFPE est, depuis des décennies, une méthode de référence pour la conservation des biopsies en milieu hospitalier. Ce choix s'explique par la stabilité des tissus FFPE dans le temps grâce aux pontages irréversibles créés entre les protéines. Cependant, les tissus FFPE ne sont pas directement analysables par spectrométrie de masse. Afin d'accéder aux banques de tissus hospitaliers pour effectuer des études cliniques, des stratégies particulières, préalables au dépôt de matrice, ont donc été développées pour les rendre compatible avec l'imagerie MALDI. Pour cela, la paraffine est retirée de la coupe, par solubilisation de celle-ci dans des solvants tels que le toluène ou l'octane puis une réhydratation du tissu est effectuée. Des méthodes basées sur les techniques de démasquage des antigènes en immunohistochimie, plus connu sous le nom d'« Antigen Retrieval » (AG), permettent une meilleure accessibilité à certains antigènes non piégés dans la maille de réticulation liée au processus de pontage par la formoline. Différentes approches physiques (augmentation de température ^{66, 67} et de pression,

traitement aux ultrasons ⁶⁸) et chimiques ^{69, 70} peuvent être employées ⁷¹. Cependant, pour des tissus conservés depuis plus d'une année, l'AR n'est pas suffisant et des étapes de digestion enzymatique in situ sont requises. La trypsine, utilisée couramment comme enzyme de digestion, permet de générer des fragments de protéines qui sont ensuite analysés par MALDI ⁷²⁻⁷⁴.

Récemment, une dernière méthode de stabilisation des tissus pour la conservation à basse température (-80°C) a été proposée. Il s'agit d'un chauffage rapide de l'organe qui a pour but d'inactiver les enzymes endogènes (**Figure 9**). Cependant, cette méthode comporte l'inconvénient de difficilement conserver la morphologie du tissu ^{75, 76}.

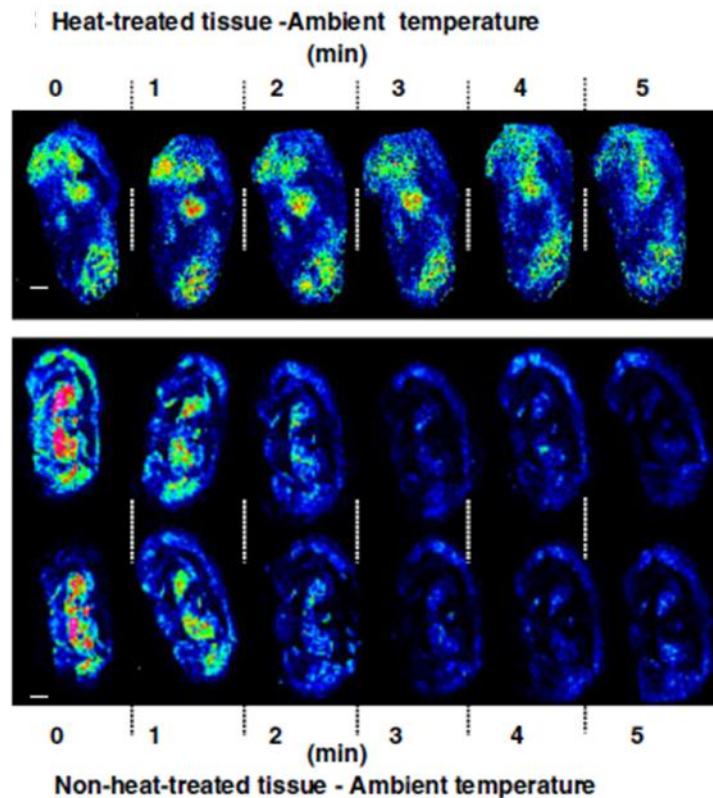


Figure 9. Comparaison des images moléculaires MALDI obtenues à partir de cerveaux de souris traités par refroidissement rapide ou par chauffage rapide puis conservés par congélation. Les coupes sont maintenues à température ambiante entre 0 et 5 minutes avant le dépôt de matrice ⁷⁵.

1.1.2.2.2. Le réalisation des coupes

L'imagerie MALDI a pour but de créer des images moléculaires à partir d'une fine surface solide. Ces minces sections sont obtenues après la coupe d'un bloc solide. Lorsqu'il s'agit d'un échantillon biologique d'origine animale, les coupes proviennent d'un organe ou de l'animal entier. Le choix de la stratégie mise en place pour la réalisation des coupes est directement conditionné par la méthode de conservation des échantillons. Une standardisation du protocole est nécessaire puisque la qualité des spectres de masse est déterminée par cette étape.

Alors que les coupes de tissu FFPE sont réalisées à l'aide du microtome, les tissus conservés par congélation sont sectionnés à l'aide d'un cryostat dont l'enceinte est réglée à environ -20°C . Ces blocs sont maintenus sur le support du cryostat à l'aide d'une colle appelée OCT (Optimal Cutting Température). L'OCT est une solution de polymères se solidifiant à basse température, couramment utilisée lors des expériences d'histologie afin de faciliter la réalisation des coupes. Bien que l'OCT n'interfère pas avec les colorations histologiques, elle n'est pas adaptée à la MS (**Figure 10**). En effet, l'OCT en tant que polymère peut créer des signaux artéfactuels (**Figure 10a**) et donc une suppression d'ions en MALDI (**Figure 10c**)⁷⁷. C'est pourquoi, cette étape requiert de prendre des précautions particulières lors de la manipulation et d'utiliser une quantité minimale d'OCT.

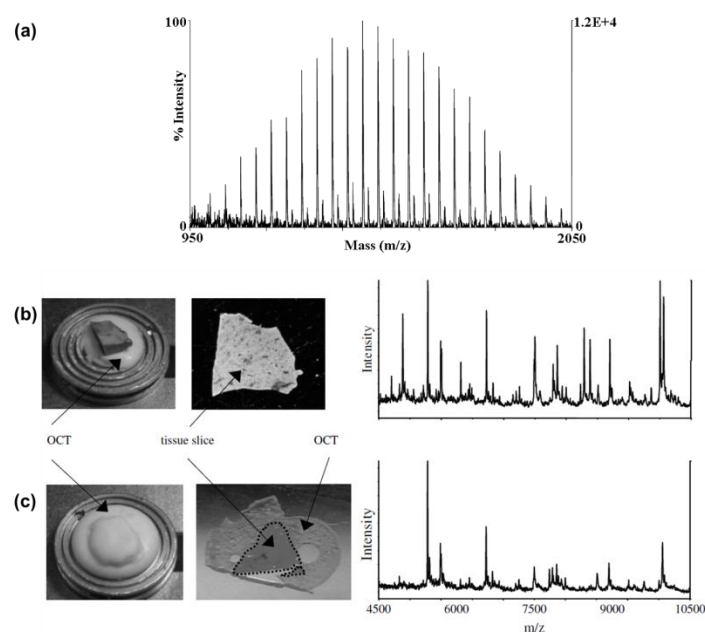


Figure 10. Spectres de masse MALDI obtenus à partir (a) du polymère OCT (b) d'un foie de rat fixé par la base sur le support du cryostat avec l'OCT (c) d'un foie de rat enrobé dans l'OCT⁷⁷.

Afin d'obtenir des coupes de qualité à partir de petits tissus, avec une conservation des structures fines, il est nécessaire de stabiliser le tissu sur le support. Pour cela, il est possible d'utiliser différents milieux d'enrobage. Couramment, un bloc de glace peut être formé autour du tissu mais cette technique s'est révélée peu adaptée pour le support des tissus fragiles qui peuvent être endommagés. D'autres techniques ont été proposées soit en substituant l'OCT par un autre milieu d'enrobage ou soit en utilisant des bandes adhésives. Les bandes adhésives sont souvent utilisées pour les coupes d'animaux entiers ⁷⁸. Il est également possible de recourir à l'utilisation d'une solution de gélatine pour enrober les tissus mous et ainsi conserver leur forme initiale (**Figure 11**) ^{79, 80}.

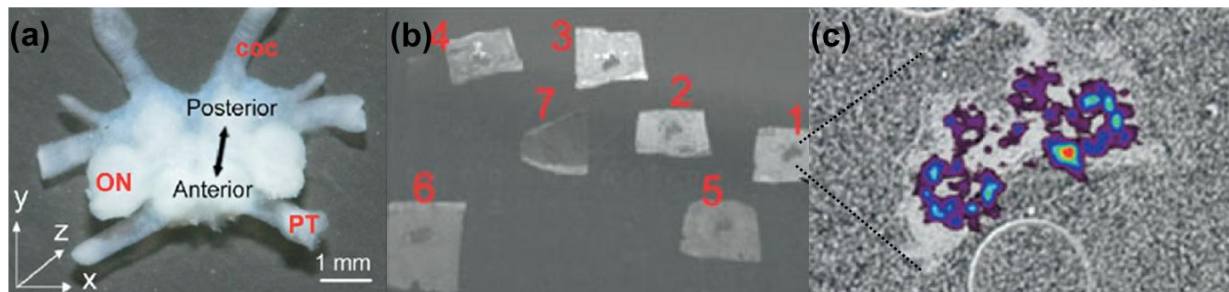


Figure 11. Images optiques (a) du cerveau de crabe *C. borealis* (b) des coupes selon l'axe z du cerveau enrobé dans la gélatine et (c) de l'agrandissement d'une coupe avec la superposition d'une image moléculaire MALDI ⁷⁹.

Récemment, un autre milieu d'enrobage basé sur le polymère hydrophile poly[N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide] (pHPMA) de 145kDa a montré son intérêt pour la réalisation des coupes de tissus fragiles tels que le corps d'un bourdon et sa compatibilité avec l'imagerie MALDI (**Figure 12**) ⁸¹.

En fonction du tissu utilisé, l'épaisseur des coupes est ajustée entre 7 et 12 μm . Ces coupes sont transférées sur une lame histologique. L'intérêt de déposer la coupe sur une lame de verre est de pouvoir procéder à une analyse microscopique avant ou après l'introduction de l'échantillon dans la source MALDI. Lorsque certains analyseurs (e.g. TOF) sont couplés à la source MALDI, les lames de verre doivent être recouvertes d'une fine couche métallique transparente conductrice, tel que l'alliage d'oxyde indium étain (ITO).

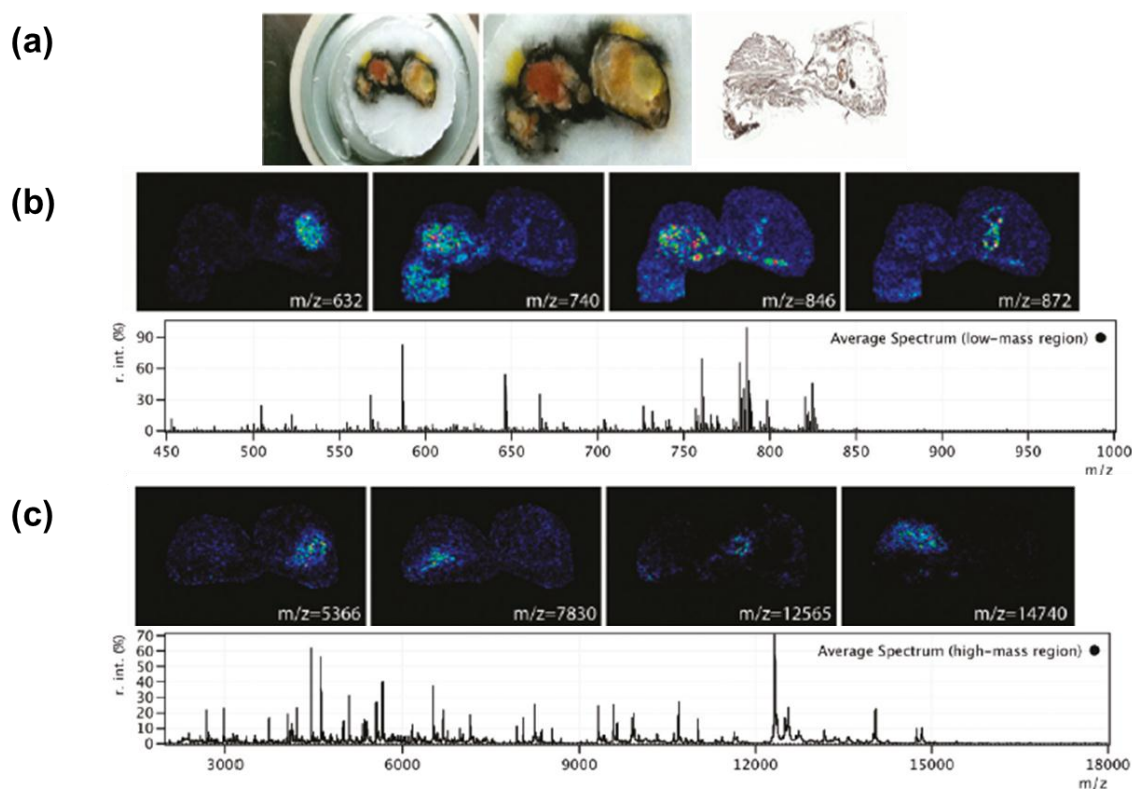


Figure 12. (a) Images optiques du corps du bourdon *B. terrestris* et d'une coupe de tissu, (b) Images MALDI-FTICR et spectre de masse moyen enregistrés pour les bas poids moléculaires et (c) Images MALDI-TOF et spectre de masse moyen obtenus pour une gamme de masse élevée ⁸¹.

1.1.2.2.3. Le traitement des tissus

Comme précédemment discuté, la conservation et la réalisation des coupes déterminent la qualité d'analyse. Une étape de traitement des tissus peut être effectuée préalablement au dépôt de la matrice. Aux vues de la complexité des échantillons, des traitements sont nécessaires pour améliorer la qualité des spectres en termes d'intensité, de résolution spectrale ou de nombre d'ions détectés. Ceux-ci consistent à réaliser des lavages de la coupe à l'aide d'une combinaison de solvants afin de supprimer certains composés majoritaires et de favoriser la détection de certaines familles de molécules. En effet, les nombreuses molécules composant le tissu entraîne des phénomènes de suppression d'ions. Il est donc possible de jouer avec les conditions physico-chimiques des espèces afin de les éliminer ou de les détecter plus aisément. Les alcools dont l'EtOH ont tout d'abord été testés puisqu'ils sont classiquement employés dans les protocoles d'histologie pour la fixation, la déshydratation sans entrainer de dommage tissulaire. Ce traitement permet d'éliminer les sels susceptibles d'interférer au cours des processus de désorption/ionisation et ainsi d'augmenter significativement l'intensité du signal et le nombre de pics détectés (**Figure 13**) ^{77, 82}.

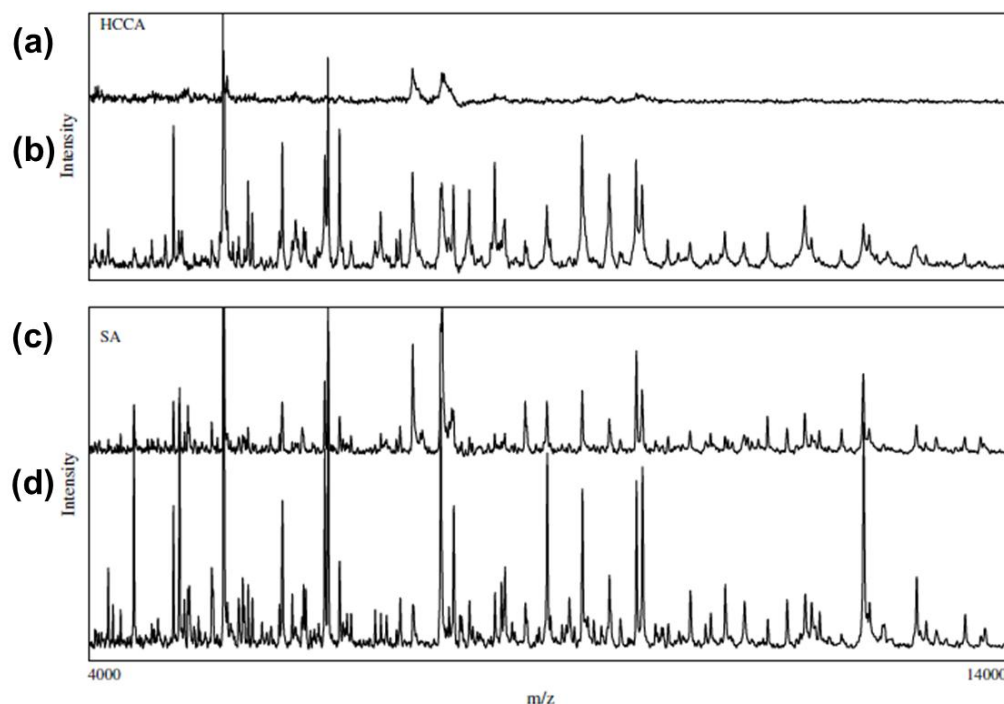


Figure 13. (a) Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice HCCA sur une coupe de foie de rat (a) non traitée (b) traitée à l'EtOH. Spectre MALDI obtenu après dépôt de matrice SA sur une coupe de foie de rat (c) non traitée (d) traitée à l'EtOH ⁷⁷.

L'effet des traitements des tissus par des solvants peu polaires ou hydrophobes, tels que l'hexane, le toluène ou le chloroforme, sur la détection des peptides et des protéines, a également été exploré ⁸³. Ces expériences ont mis en évidence une élimination efficace de certaines classes de lipides (e.g. les phospholipides) (Figure 14a et 14b), permettant par la même occasion une meilleure détection des peptides et des protéines (Figure 14c et 14d).

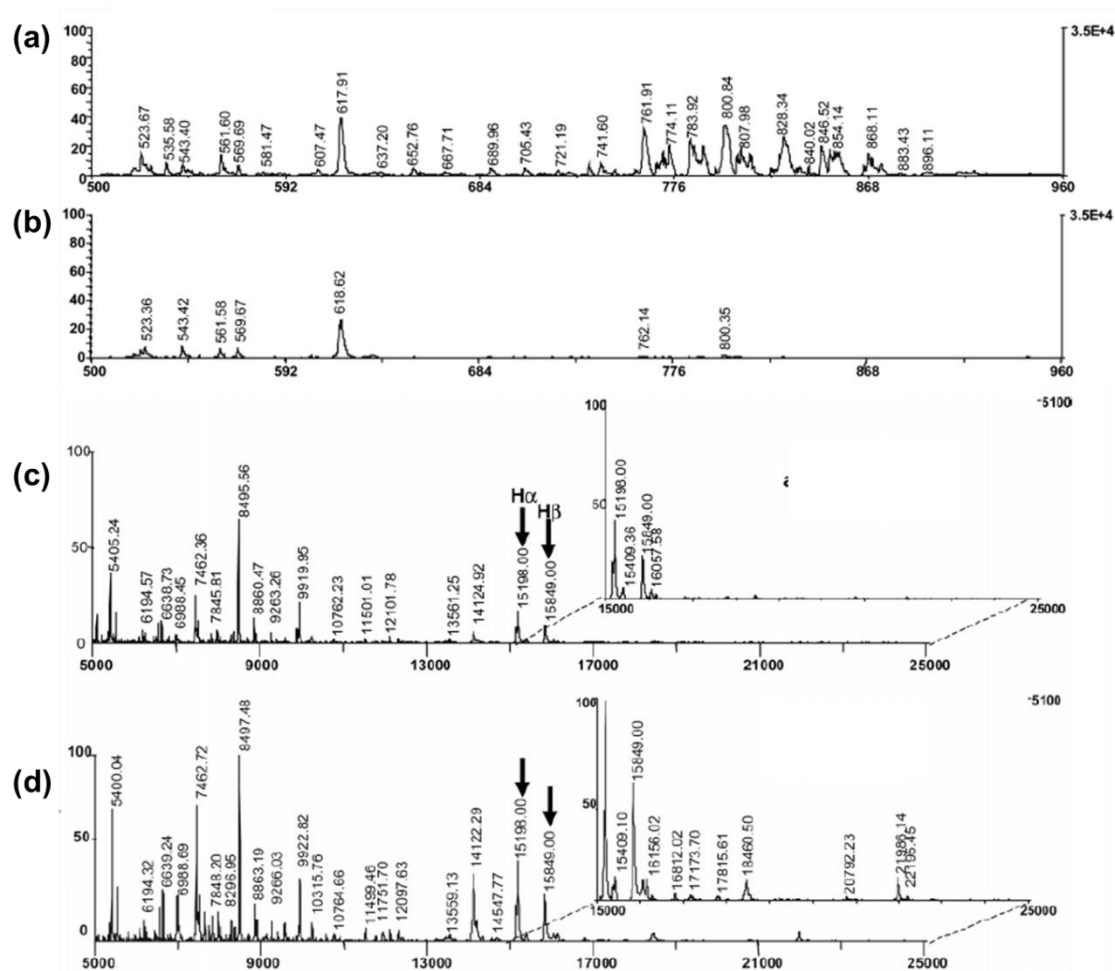


Figure 14. Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice HCCA sur une coupe de cerveau de rat (a) non traitée (b) traitée au chloroforme. Spectres de masse MALDI obtenus après dépôt de matrice SA sur une coupe de cerveau de rat (c) non traitée (d) traitée au chloroforme⁸³.

Ce travail a été poursuivi par l'équipe de Caprioli R., avec une étude sur l'effet d'autres solvants pour l'amélioration des profils protéiques⁸². La **Figure 15** présente les résultats de cette étude complémentaire. De plus, une combinaison de ces traitements est envisageable pour optimiser la qualité de l'analyse, avec par exemple, le lavage successif des coupes à l'acétone, au chloroforme puis à l'éthanol.

L'extraction, la solubilisation et l'incorporation dans les cristaux de matrice des protéines de très haut poids moléculaire (i.e. m/z supérieur à 30000) étant difficile, des protocoles particuliers ont dû être mis au point. L'utilisation de solvants hydrophobes tels que le 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) ou le 2,2,2-trifluoroéthanol (TFE) a permis d'augmenter le nombre de composés de haute masse détectés (**Figure 16**)⁸⁴.

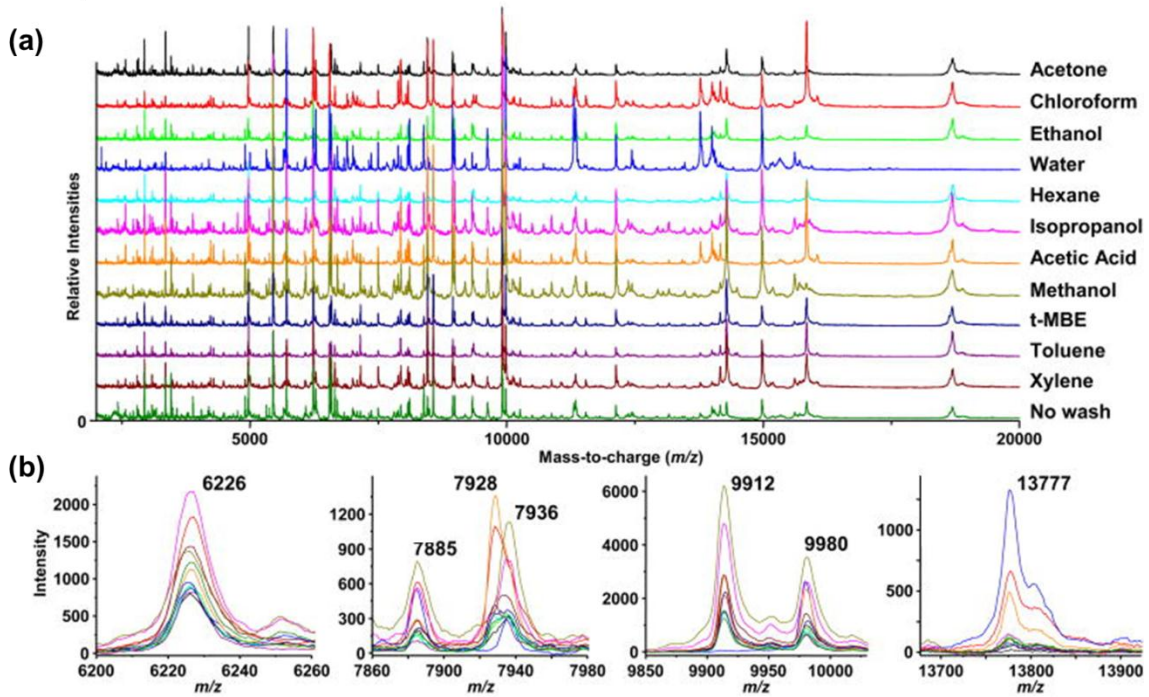


Figure 15. (a) Spectres de masse MALDI de protéines obtenus à partir d'une coupe de foie de souris après différents lavages. (b) Profils des pics obtenus pour quatre protéines après les différents lavages.

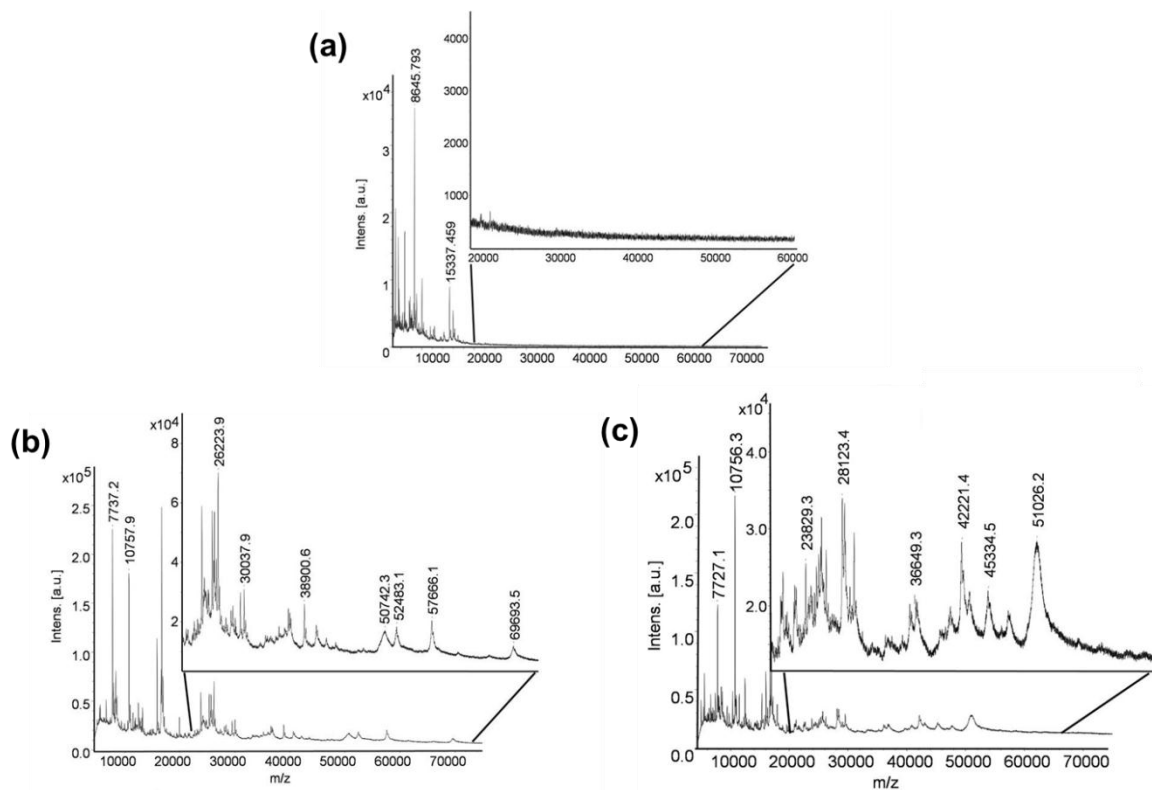


Figure 16. Spectres de masse MALDI de protéines de très haut poids moléculaire obtenus à partir d'une coupe de cerveau de rat (a) non traitée (b) traitée au HFIP (c) traitée au TFE⁸⁴.

Le choix de traitement à appliquer est donc dépendant de la nature du tissu et des molécules à détecter. Cependant, il faut être prudent car certains lavages peuvent entraîner une délocalisation de composés d'intérêt, comme les peptides. A l'heure actuelle, aucun traitement des tissus n'est proposé dans le cas de l'étude des petites molécules, telles que les lipides et les médicaments, du fait de leur très grande solubilité dans ces solvants.

1.1.2.2.4. Les matrices et les modes de dépôt

Outre le traitement de l'échantillon, le choix de la matrice et son mode de dépôt est une étape cruciale puisqu'elle détermine la classe de molécules détectées, la qualité des spectres, et la résolution spatiale de l'image. En MSI, les matrices 2,5-DHB, HCCA et SA sont, à ce jour, les plus utilisées (**Figure 17**). Chaque matrice a ses applications propres. La 2,5-DHB est particulièrement recommandée pour l'analyse des petites molécules telles que les lipides^{85, 86} ou les peptides⁸⁷ puisqu'elle présente peu de pics dans les basses masses. L'HCCA est, généralement, utilisée pour l'analyse des mêmes familles de composés^{88, 89}. La matrice SA est surtout appropriée pour l'étude des composés de haut poids moléculaires comme les protéines⁹⁰.

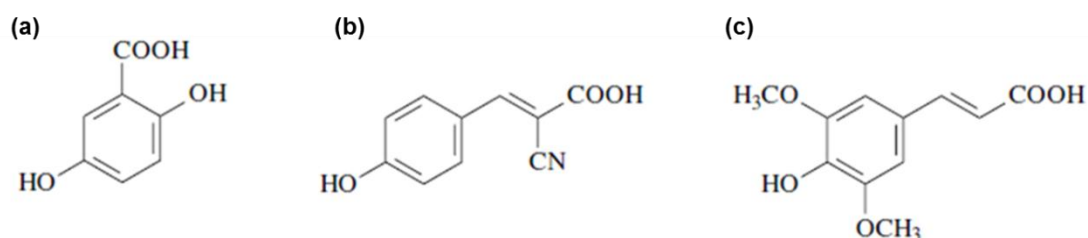


Figure 17. Formules semi-développées des matrices les plus couramment utilisées : (a) acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), (b) acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) et (c) acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique ou acide sinapinique (SA).

Pour pallier à certains inconvénients des matrices conventionnelles, de nouvelles matrices ont récemment été développées pour la MSI. Des matrices ioniques solides (SIM) ont été ainsi élaborées après avoir constaté que l'ajout d'un liquide ionique basique à la matrice MALDI acide permettait de générer de meilleures matrices pour l'analyse de coupes de tissu³⁹. Différentes bases ont été ajoutées à la matrice HCCA pour tester leurs performances analytiques. La cristallisation sur le tissu est un paramètre déterminant en MSI.

Or, cette cristallisation est très différente en fonction de la base organique (**Figure 18**). La matrice HCCA/aniline (ANI), par exemple, présente une cristallisation plus homogène et une capacité de recouvrement plus importante que la matrice conventionnelle HCCA. Au niveau analytique, la matrice HCCA/ANI permet d'obtenir de meilleurs spectres, en termes de sensibilité, de résolution. Cette matrice possède également une meilleure résistance aux irradiations laser de hautes fréquences de répétition et est très stable sous vide, ce qui permet de prolonger le temps d'analyse sans dégradation du signal. Ces SIMs ont été, par la suite, employées pour l'analyse des peptides en MSI, par exemple, dans le cadre de la recherche de biomarqueurs pour l'évaluation de traitements du cancer ⁹¹. Par la suite, d'autres matrices ioniques solides ont été proposées, notamment celles à base de matrice SA ⁹² et ont pu être mises à profit pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire ⁹³.

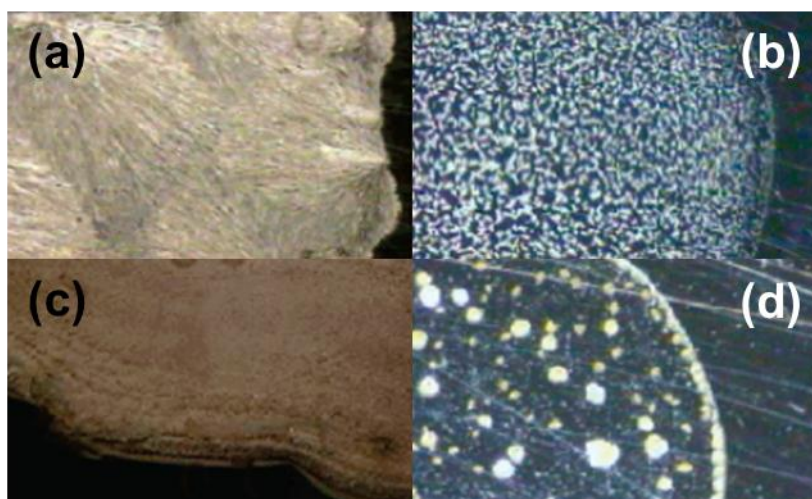


Figure 18. Cristallisation des matrices (a) HCCA/ANI (b) HCCA (c) HCCA/2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2A4M5NP) (d) HCCA/DANI ³⁹.

Le dépôt de la matrice a également une grande importance puisqu'il détermine à la fois la résolution spatiale des images, dépendamment de la taille des cristaux ou des gouttes de solution de matrice déposées, et la qualité des analyses. En effet, lors de l'analyse d'une coupe de tissu, la matrice doit permettre l'extraction maximale des composés et leur incorporation dans les cristaux de matrice. Cette co-cristallisation doit être la plus homogène possible sur la totalité de l'échantillon afin d'éviter des pertes de signal dues à l'absence de matrice. Le dépôt de la matrice ne doit en aucun cas conduire à la délocalisation des composés. La **Figure 19** reprend les trois stratégies de dépôt de matrice sur coupe, i.e. le dépôt par micropipette, par spray et par micro-dépôts.

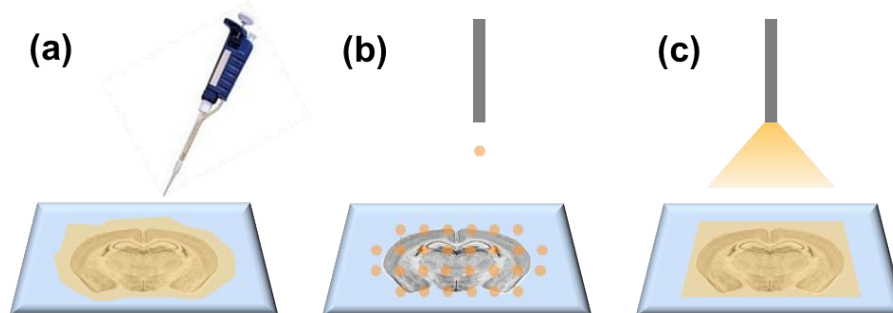


Figure 19. Différents modes de dépôt de la matrice sur coupe pour les analyses MALDI : (a) manuel (b) par spray (c) par micro-dépôts.

En routine, pour les analyses MALDI traditionnelles, les matrices sont déposées à l'aide d'une micropipette (**Figure 19a**). Cependant, cette méthode est inappropriée aux expériences d'imagerie MALDI. En effet, il est tout à fait possible de couvrir le tissu avec la matrice à l'aide d'une micropipette. Cette technique permet d'ailleurs d'obtenir des spectres avec de nombreux pics présentant un bon rapport signal/bruit. Cependant, le volume important de matrice utilisé, et donc de solvant permettant sa solubilisation, peut conduire à une délocalisation des molécules au sein de la coupe. Cette approche est donc employée pour l'analyse directe des coupes. Concernant l'imagerie MALDI, des recherches orientées sur le dépôt de la matrice ont permis de développer des méthodes alternatives.

Un autre mode de dépôt de la matrice est le micro-dépôt (**Figure 19b**). Ce dernier consiste à déposer des micro ou nano volumes de solution de matrice sur des régions bien définies de la coupe. Cette stratégie permet de limiter la délocalisation des composés à la taille du spot formé. Les autres avantages sont la reproductibilité des dépôts et l'efficacité d'extraction. La première possibilité consiste à réaliser le micro-dépôt par capillarité grâce à un système robotisé muni d'un fin capillaire de silice fondu. Ce système peut être mis en place à partir d'un robot de collecte pour la nanoLC. La taille du spot dépend donc ici du diamètre interne du capillaire utilisé ⁷⁴. Le micro-dépôt peut également faire intervenir un système d'éjection de microgouttelettes par onde acoustique ⁹⁴ ou un système de type piézo-électrique ⁹². Les micro-dépôts obtenus, dans ce cas, sont généralement de l'ordre de 150 μm . L'utilisation d'une imprimante à jet d'encre a également permis de réaliser des micro-dépôts en remplissant la cartouche d'encre avec la solution de matrice ^{95, 96}. Avec le micro-dépôt de matrice, l'analyse de l'échantillon est restreinte aux spots, ce qui limite la résolution spatiale de l'image.

La dernière méthode pour déposer la matrice est la nébulisation (**Figure 19c**). Pour nébuliser une solution de matrice, la mise en œuvre la plus simple et la moins onéreuse est l'utilisation d'un nébulisateur pneumatique tels que le sprayeur en verre pour la chromatographie sur couche mince^{77, 97}. Avec cette méthode, les gouttelettes de petite taille forment de fins cristaux de matrice répartis de façon homogène, mais une grande variabilité de résultat est observée d'une expérience à l'autre. Des robots ont donc été mis au point permettant ainsi d'automatiser la nébulisation. L'électronébulisation, par un brouillard de fines gouttelettes, génère une fine couche de cristaux de matrice sur le tissu^{95, 96}. Par conséquent, la taille des cristaux étant souvent inférieure au diamètre du faisceau laser, des images à haute résolution spatiale peuvent être réalisées après le dépôt de matrice par électronébulisation. L'inconvénient de ce mode de dépôt peut être le manque d'efficacité d'extraction des composés puisque contrairement à un dépôt par micropipette, l'électronébulisation ne dépose qu'un très faible volume de solvant sur la coupe. En effet, les spectres obtenus pour les peptides et les protéines présentent très peu de signaux avec de faibles intensités. L'ImagePrep (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) est un des systèmes de spray automatique développé récemment. Cet appareil permet de créer un aérosol de matrice par vibration à très haute fréquence d'une grille. Au cours de la préparation, un flux de nitrogène est envoyé dans la chambre afin d'éviter l'oxydation de l'échantillon et d'obtenir des conditions reproductibles. Le contrôle de la durée de spray, le temps d'incubation et de séchage par un diffractomètre permet d'optimiser l'extraction et l'incorporation des molécules dans la matrice^{98, 99}. D'autres procédés ont été mis au point, tels que la sublimation de matrice¹⁰⁰, l'application sans solvant¹⁰¹ ou l'utilisation d'un aérographe¹⁰² (système pneumatique classiquement employé dans le domaine du graphisme), mais l'incorporation des molécules dans les cristaux de matrice reste faible. Ce type de méthode semble donc idéal pour l'imagerie des petits composés qui, d'après les études effectuées à ce sujet, ne nécessitent pas d'incorporation dans les cristaux de matrice.

En fonction de la classe de molécules à étudier, il est donc nécessaire de choisir la bonne méthode et de trouver le meilleur compromis entre la résolution spatiale des images et la qualité des spectres. Le **Tableau 2** répertorie les instruments pour le dépôt automatique de matrice actuellement disponibles.

Instrument	Constructeur	Mode Dépôt	Taille Dépôt (μm)
NC	Siliflow	Piézo-électrique	300-600
Chemical inkjet printing (CHIP 1000)	Shimadzu	Piézo-électrique	150
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Capillaire	150
PortraitTM 630 Reagent Multispotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	200
TMiD	LEAP Technologies	Ejection par nano-pompe	200
ImagePrep	Bruker	Vaporisation vibrationnelle	25

Tableau 2. Listes et caractéristiques des différents instruments utilisés pour le dépôt automatique de la matrice sur les tissus en MSI.

1.1.2.2.5. L'instrumentation

L'imagerie MALDI permet d'obtenir, en une seule étape d'acquisition, la localisation de plusieurs centaines de molécules. Ce temps d'acquisition dépend de plusieurs paramètres dont la résolution spatiale choisie par l'expérimentateur, le nombre de spectres enregistrés en chaque point, et la fréquence des tirs laser ainsi que la vitesse de déplacement d'une position à l'autre. Ces dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés sur le plan de l'instrumentation, en imagerie MALDI, notamment afin de réduire le temps d'acquisition et d'améliorer la résolution spatiale.

D'un point de vue instrumental, il est possible de jouer sur deux paramètres pour réduire le temps d'acquisition : la vitesse de répétition des tirs laser et le système de digitalisation et de conversion des données. Les premières images MALDI ont été obtenues grâce à des instruments équipés de laser N₂ ($\lambda=337$ nm) de 3 à 20 Hz. Ainsi, une image avec une résolution spatiale et une qualité spectrale correcte prenait une à deux journées. Cette longue exposition de l'échantillon sous vide poussé conduisait souvent à une perte d'informations. C'est pourquoi, par la suite, des lasers N₂ avec une fréquence de répétition de 50 Hz ont remplacé ces premiers lasers. Les limitations en termes de fréquence de répétition des tirs (50 Hz) ainsi que de durée de vie (quelques millions de tirs) des lasers N₂ les ont très rapidement rendus incompatibles avec les expériences d'imagerie MALDI. Des lasers Nd:YAG, dits « solide state », émettant à 355 nm, ont alors équipé les nouveaux spectromètres de masse dédiés à l'imagerie MALDI. Ces lasers Nd:YAG présentent une fréquence de répétition de 200 Hz et peuvent atteindre plus d'un milliard de tirs. Ainsi, pour une image avec un nombre

équivalent de positions analysées et d'accumulations par point, de deux jours d'analyse avec une fréquence de répétition des tirs laser à 50 Hz, on passe à une heure à 200 Hz. Au milieu des années 2000, des instruments avec des fréquences de répétition des tirs laser de 2 kHz ont été commercialisés ¹⁰³. Récemment, une publication a fait mention de l'utilisation d'un laser avec une fréquence de répétition des tirs laser de 20 kHz ¹⁰⁴. Ces développements offrent, à ce jour, la possibilité d'utiliser l'imagerie MALDI, en haut débit, dans le domaine de la recherche clinique, pour la mise en évidence de biomarqueurs. Il est important de noter que l'augmentation de la fréquence de répétition laser augmente proportionnellement le flux d'ions arrivant au détecteur. C'est pourquoi, en parallèle, une optimisation des détecteurs a été requise ¹⁰³. Outre la fréquence de répétition des tirs laser, la rapidité de déplacement du support MALDI a un rôle non négligeable dans le temps d'acquisition. En effet, comme décrit dans le paragraphe sur le principe de l'imagerie, l'acquisition des spectres se fait, dans la plupart des expériences, en mode point par point, par déplacement de l'échantillon sous le faisceau laser. Le déplacement de la cible, portant la coupe de tissu, au sein de la source a donc dû être optimisé.

La résolution spatiale des images est liée au choix du mode de dépôt de la matrice. En effet, les micro-dépôts de matrice sont généralement espacés d'environ 200 μm , centre à centre. La résolution spatiale de l'image est donc conditionnée par cette distance et est incompressible. Lorsque la matrice est déposée de façon homogène sur la coupe de tissu, par nébulisation, la résolution spatiale dépend alors du diamètre du faisceau laser irradiant l'échantillon. Dans ce deuxième cas de figure, une évolution des systèmes de focalisation du faisceau laser a dû être envisagée. Au début de l'imagerie MALDI, la résolution spatiale des images présentées était d'environ 150 μm . Dans la seconde moitié des années 2000, la résolution utilisée en routine atteignait 50 μm permettant ainsi de réaliser des images à l'échelle de quelques cellules. A l'heure actuelle, les instruments commerciaux offrent une focalisation du faisceau laser de l'ordre de 30 μm . Cependant, l'augmentation de la focalisation du laser s'accompagne d'une diminution de la sensibilité pour toutes les classes de composés présentes au sein du tissu. Cette diminution de l'intensité des signaux est, en partie, liée à la plus faible quantité de molécules désorbées. Récemment, l'équipe de B. Spengler a mis au point un système expérimental appelé SMALDI pour Scanning Microprobe Matrix Laser Desorption Ionization ¹⁰⁵. Cet appareil permet d'obtenir des images de qualité avec une résolution de 5-10 μm ¹⁰⁶. De récentes publications ont montré qu'il est possible de coupler la source SMALDI avec des analyseurs à haute résolution, de type FT-ICR ou orbitrap, ce qui permet d'associer à la résolution spatiale, la résolution spectrale. ^{107, 108}. La

technique dite de l'oversampling avec ablation complète de la matrice a également permis de réduire la résolution spatiale des images MALDI ¹⁰⁹. Pour cela, une ablation complète de la matrice pour la première position de l'échantillon est effectuée puis l'échantillon est déplacé d'une distance plus petite que le diamètre du faisceau laser. Ce processus est ainsi répété afin de balayer la totalité de la coupe. Cette méthode peut donc être adaptée à tous les instruments commerciaux puisqu'elle n'est pas limitée par le diamètre du faisceau laser. Cependant, l'ablation complète nécessite d'augmenter le nombre de tirs laser et augmente donc le temps d'analyse. La technique d'étirement du tissu est une alternative permettant d'obtenir une haute résolution spatiale pour l'imagerie de petits tissus ¹¹⁰. Le protocole consiste à former une couche de billes de verre sur une membrane de parafilm puis de déposer une coupe de tissu sur cette couche de billes et enfin d'étirer la membrane de parafilm ¹¹¹. L'étirement manuel de la membrane rend sa réalisation peu reproductible.

Malgré les nombreux efforts effectués dans ce domaine, il reste encore difficile de travailler sur des molécules de haut poids moléculaire tels que les peptides et les protéines. Des travaux de recherche restent donc à mener dans cette voie afin d'atteindre une imagerie subcellulaire pour toutes les familles de molécules. Le **Tableau 3** présente les lasers et leurs caractéristiques équipant les spectromètres de masse MALDI actuellement commercialisés.

Dans le cas de l'acquisition en mode microscope, la résolution spatiale obtenue est de l'ordre de quelques microns. Avec ce type de source, la position relative des ions étant conservée jusqu'au détecteur, seules la taille des cristaux de matrice, la précision des optiques ioniques et la résolution du détecteur de position influencent la résolution spatiale de l'image. L'équipe de R. Heeren a proposé ce concept qui a permis d'obtenir des images de peptides ¹¹. Cependant, cette approche ne permet pas d'effectuer des analyses structurales par MS/MS.

Instrument	Type Laser	Fréquence Répétition Laser	Résolution Maximale
QSTAR Elite System (AB)	Nd-YAG	1 kHz	150 µm
QSTAR Pulsar i System (AB)	Nd-YAG	1 kHz	150 µm
QSTAR XL System (AB)	Nd-YAG	1 kHz	150 µm
5800 MALDI TOF/TOF Analyser (AB)	Nd-YAG	1 kHz	50 µm
4800 MALDI TOF/TOF Analyser (AB)	Nd-YAG	200 Hz	50 µm
4700 Proteomics TOF/TOF Analyser (AB)	Nd-YAG	200 Hz	50 µm
Voyager DE STR Workstation (AB)	N2	20 Hz	100 µm
Voyager DE PRO Workstation (AB)	N2	20 Hz	100 µm
UltrafleXtreme (BD)	Smartbeam II	1 kHz	10 µm
Ultraflex III / Autoflex III (BD)	Smartbeam	200 Hz	30 µm / 10 µm
Autoflex IV (BD)	Smartbeam	1 kHz	10 µm
Solarix MI (BD)	Smartbeam II	1 kHz	20 µm
AXIMA QIT (SH)	N2	50 Hz	100 µm
AXIMA Assurance (SH)	N2	50 Hz	100 µm
AXIMA Confidence (SH)	N2	50 Hz	100 µm
AXIMA Performance (SH)	N2	50 Hz	100 µm
MALDI LTQ XL (TS)	N2	60 Hz	60 µm
MALDI LTQ Orbitrap Discovery (TS)	N2	60 Hz	60 µm
MALDI LTQ Orbitrap XL (TS)	N2	60 Hz	60 µm
MALDI Q-ToF Premier (WA)	Nd-YAG	200 Hz	100 µm
MALDI micro MX (WA)	N2	20 Hz	200 µm
MALDI SYNAPT G2 HDMS (WA)	Nd-YAG	1 kHz	100 µm
MALDI SYNAPT G2 MS (WA)	Nd-YAG	1 kHz	100 µm

Tableau 3. Liste des spectromètres de masse utilisés en MSI et caractéristiques des lasers ⁵⁶. AB : Applied Biosystems ; BD : Bruker Daltonics ; SH : Shimadzu ; TS : Thermo Scientific, WA: Waters.

1.1.2.2.6. Le traitement des données

Dans la très grande majorité des expériences d'imagerie MALDI, l'acquisition des données se fait en mode point par point. La collection des données, i.e. de spectres repérés par leurs coordonnées d'enregistrement, 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. Pour un ion donné, le logiciel fournit la variation d'intensité, grâce à une échelle de couleurs, pour chaque position analysée. Les logiciels proposent également des fonctions supplémentaires pour traiter les spectres avant la reconstruction des images, i.e. le lissage, le retrait du bruit de fond ou le réaligement des spectres. Généralement, les logiciels d'acquisition des images sont fournis avec le spectromètre de masse. Cependant, des logiciels dédiés à l'acquisition et/ou à la reconstruction des images sont disponibles librement sur internet ¹¹². Parmi eux, le logiciel de reconstruction appelé Biomap est le plus souvent utilisé. Les différents logiciels disponibles sont listés dans le **Tableau 4**.

Logiciel	Type Logiciel	Type Format	Compatibilité Instruments MS
4700/4800 Imaging	Acquisition	Analyse	AB MALDI TOF AB MALDI TOF/TOF
MMSIT	Acquisition	Analyse	AB MALDI TOF
Axima 2 Analyse	Acquisition/Conversion	Analyse	SH MALDI IT-TOF SH MALDI TOF SH MALDI TOF/TOF
Create Target Analyse This!	Acquisition/Conversion	Analyse	BD MALDI TOF/TOF
MassLynx	Acquisition/Conversion	XML	WA MALDI Q-IMS-oaTOF WA MALDI TOF
FlexImaging	Acquisition/Reconstruction	Analyse Xmass XML	BD MALDI TOF BD MALDI TOF/TOF BD MALDI FTMS
Image Quest	Acquisition/Reconstruction	imzML RAW	TS MALDI LTQ
oMALDI Server 5.1	Acquisition/Reconstruction	Analyse imzML Wiff	AB MALDI QqTOF
TissueView 1.0	Acquisition/Reconstruction	Analyse imzML Wiff	AB MALDI TOF/TOF AB MALDI QqTOF
BioMap	Reconstruction	Analyse Xmass XML	AB MALDI TOF BD MALDI TOF/TOF BD MALDI FTMS WA MALDI TOF WA MALDI Q-IMS-oaTOF
MITICS	Reconstruction	XML	AB MALDI TOF BD MALDI TOF/TOF

Tableau 4. Liste des logiciels utilisés pour l'acquisition, la conversion et la reconstruction des images MALDI ⁵⁶. AB : Applied Biosystems ; BD : Bruker Daltonics ; SH : Shimadzu ; TS : Thermo Scientific, WA: Waters.

Lors de l'expérience d'imagerie MALDI, une multitude d'informations est générée. L'interprétation de ces données, si elle est réalisée pic par pic, peut être fastidieuse. De plus, il est difficile de trouver l'information précise au milieu de toutes ces données. De nombreux outils statistiques ont donc été mis à disposition afin de faciliter le traitement des résultats. Afin de réduire la complexité des résultats, l'analyse statistique multivariée, notamment l'analyse en composante principale (PCA), est utilisée. Cette méthode consiste à transformer le système de coordonnées original, représenté par l'intensité des pics en chaque position, en un système simplifié, dit en composantes principales. Pour cela, les composantes principales qui ne contiennent pas d'informations utiles, sont éliminées. Ainsi, les variances au sein d'une structure tissulaire, entre deux structures tissulaires d'une même coupe ou entre deux coupes de tissu peuvent être mises en évidence. Cette méthode peut être utilisée de manière supervisée ou non supervisée (**Figure 20**).

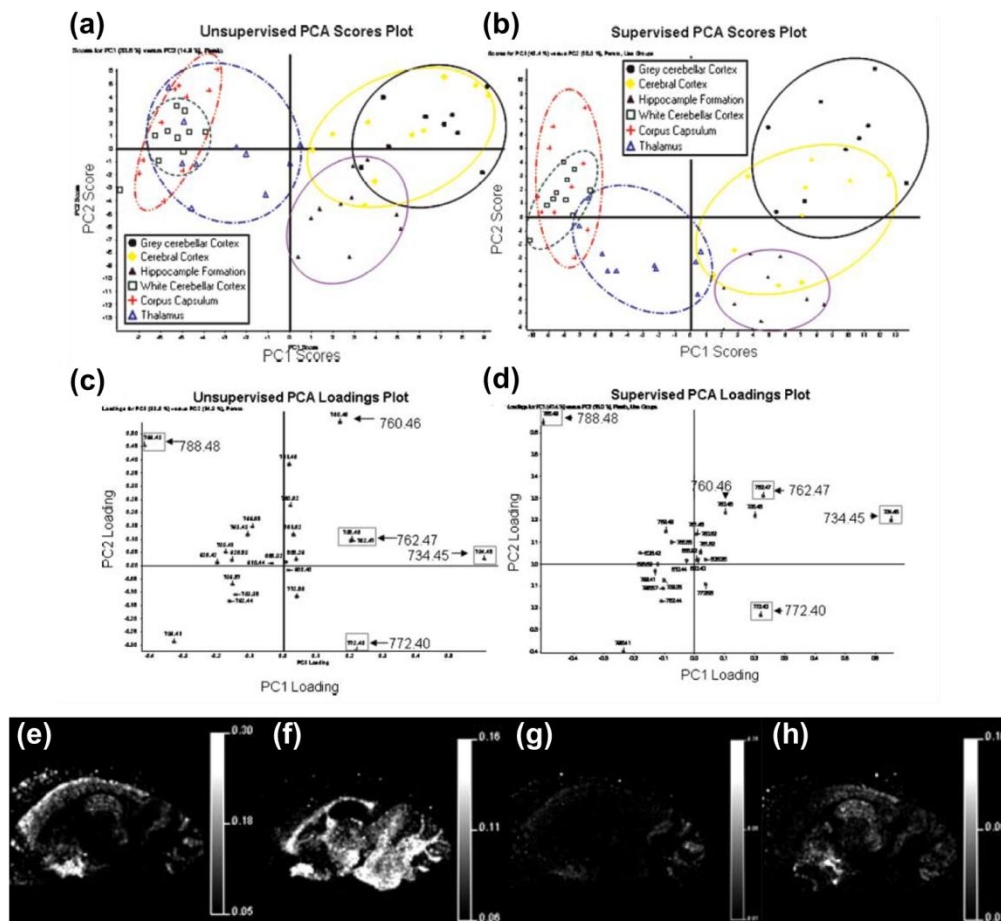


Figure 20. Profils lipidiques distincts des structures d'un cerveau de rat mis en évidence par PCA (a) non supervisés et (b) supervisés. Résultats PCA (c) non supervisés et (d) supervisés montrant les lipides exprimés différemment dans ce même cerveau de rat. Images de la répartition des ions (e) m/z 734.45 dans la matière grise, (f) m/z 788.48 dans la matière blanche, (g) m/z 762.47 dans le cortex cérébelleux et (h) m/z 772.46 dans l'hippocampe¹¹³.

La première composante principale, notée PC1, est représentée par l'axe couvrant la variation majeure entre les différentes structures du tissu et doit prendre en compte un maximum de régions du tissu. Le plus souvent, PC1 et PC2 permettent la meilleure séparation et donc la meilleure comparaison des spectres les uns par rapport aux autres. Ce type de graphique comprenant les spectres est appelé « score plot ». (**Figures 20a et b**). Le « loading plot » est une représentation de la variance des m/z et permet de détecter les m/z spécifiques des groupes de spectres d'intérêt (**Figures 20c et d**). Une hiérarchisation des spectres en clusters est ensuite réalisée afin de regrouper par classe les spectres similaires. Le résultat de cette classification se présente sous la forme d'un dendrogramme.

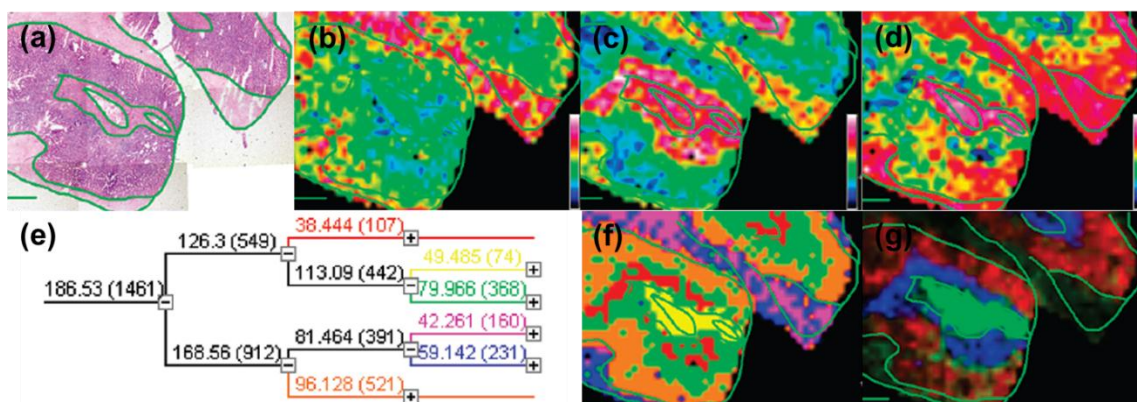


Figure 21. (a) Coloration hématoxyline et éosine d'une biopsie de muqueuse stomacale. Représentation des scores obtenus à partir de (b) la première composante principale, (c) la seconde composante principale et (d) la troisième composante principale. (f) Image reconstruite en utilisant les jeux de couleurs du dendrogramme (e). (g) Image MALDI de l'ion m/z 4152 (rouge), m/z 4962 (vert) et m/z 5697 (bleu) ¹¹⁴.

Les **Figures 21b-d** présentent les différentes structures histologiques du tissu mises en évidence par la première, deuxième ou troisième composante principale. Chaque branche du dendrogramme (**Figure 21e**) correspondant à une classe de spectres et donc à une caractéristique histologique est représentée par une couleur spécifique qui permet ainsi de reconstruire une image complète de la répartition de chaque branche (**Figure 21f**). Cet outil statistique permet de mettre en évidence les différentes caractéristiques histologiques spécifiques d'un état physiologique ou d'une pathologie et ainsi de créer des modèles correspondant aux différents stades d'une pathologie dans le cadre de l'établissement d'un diagnostic. Cependant, cette méthode d'analyse biostatistique n'est pas suffisante et d'autres outils sont en cours de développement telles que la segmentation supervisée ¹¹⁵, la corrélation automatisée ¹¹⁶, la « Probabilistic Latent Semantic Analysis » (PLSA) ¹¹⁷, la « Principal

Component Analysis Symbolic Discreminant » (PCA-SDA)⁷² ainsi que différentes méthodes de classification hiérarchique tels que le k-means clustering¹¹⁸ ou le fuzzy C-Mean Clustering^{119, 120}.

L'interprétation des données issues de l'imagerie MALDI passe également par une comparaison des images moléculaires et des informations histologiques. Pour mettre en évidence des structures tissulaires, des colorations histologiques sont réalisées. La coloration la plus courante est la coloration hématoxyline et éosine (H&E). La corrélation entre les caractéristiques histologiques et les images MALDI peut être réalisée grâce à trois approches. La première approche consiste à réaliser la coloration histologique sur une coupe adjacente à celle utilisée pour la séquence d'imagerie. L'inconvénient de cette approche réside dans le fait que les données ne proviennent pas de la même coupe. Pour la seconde stratégie, la coloration histologique et l'analyse MALDI sont réalisées sur la même coupe. La procédure pour la coloration H&E n'étant pas compatible avec l'imagerie MALDI, l'utilisation d'autres colorants, tels que le violet de crésyl et le bleu méthylène, est requise¹²¹. Cependant, ces colorants ne fournissent pas autant d'informations que la coloration H&E. De plus, cette stratégie peut entraîner une délocalisation des molécules lors de l'étape de coloration préalable à l'analyse MALDI. La dernière approche consiste à réaliser l'analyse MALDI puis à retirer la matrice afin de réaliser la coloration H&E^{114, 122, 123}. Ainsi, on peut obtenir une bonne corrélation entre les données histologiques et les données d'imagerie, tout en évitant les pertes d'informations. Cette corrélation est également possible grâce au logiciel bioinformatique Ilastik développé par le groupe de F.A. Hamprecht¹²⁴. La corrélation entre l'hétérogénéité du tissu d'un point de vue cytologique et l'image moléculaire par MSI est désormais envisageable grâce à ces outils bioinformatiques¹²⁵.

1.1.2.3. Les applications biologiques

Depuis son introduction, l'imagerie MALDI s'est rapidement développée. Si la spectrométrie de masse MALDI est une technique puissante pour l'analyse des échantillons biologiques, la MSI a ajouté une nouvelle dimension : la localisation des composés dans les coupes de tissus. Cette information clé permet de comprendre mieux le rôle physiologique joué par les protéines, les peptides, les lipides ou toutes autres molécules. Ainsi, l'imagerie MALDI a été appliquée pour la mise en évidence de biomolécules dans le cadre d'études

fondamentales et cliniques. Une grande variété de tissus a été analysée : des végétaux aux animaux, des invertébrés aux vertébrés.

1.1.2.3.1. Les études protéomiques

Les développements réalisés ces dernières années ont permis de mettre en évidence la distribution de protéines et de peptides chez des modèles invertébrés¹²⁶ et vertébrés^{127, 128}. L'imagerie MALDI est donc devenue un outil puissant pour la recherche de marqueurs de pathologies ou d'états physiologiques d'un organisme. Dans le domaine de la recherche sur le cancer, de nombreuses études cliniques ont été réalisées, notamment sur le cancer hépatique¹²⁹, stomacal¹³⁰, rénal¹³¹ ou encore ovarien⁹³. Des études ont également été effectuées sur le système nerveux central (SNC)¹³². L'imagerie MALDI a permis d'étudier la distribution des peptides à différents stades du développement. En effet, une étude sur le SNC du criquet *Schistocerca gregaria* a établi un profil d'expression de neuromodulateurs tels que les tachykinines au cours du développement neuronal¹³³. L'imagerie MALDI a également été employée afin de mieux comprendre la régulation des processus physiologiques par le système nerveux. Une étude menée, par MALDI MSI, sur le crabe *Cancer borealis* a démontré la présence de plusieurs familles de neuropeptides au niveau du cerveau¹³⁴. La **Figure 22** présente la distribution de quatre neuropeptides dans le cerveau de crabe.

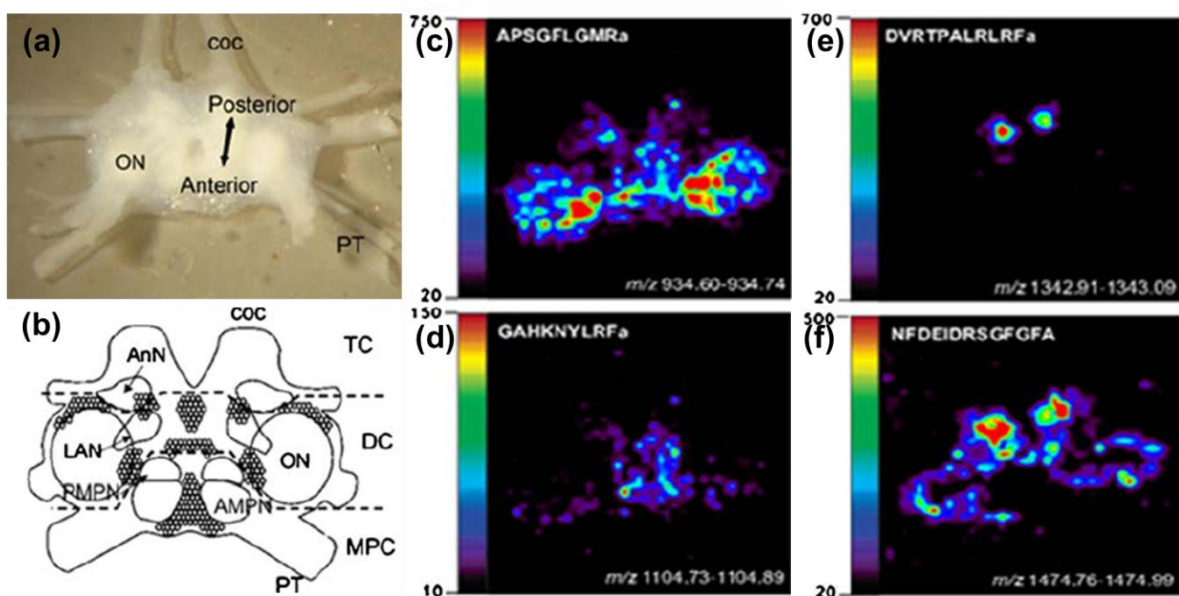


Figure 22. (a) Cerveau de crabe *Cancer borealis* et (b) Schématisation des différentes structures du cerveau. Images MALDI de trois familles de neuropeptides retrouvés dans le cerveau : (c) peptide tachykinin-related (CabTRP1a), (d, e) isoformes peptide RFamide et (f) orcokinine¹³⁴.

Les expériences de MALDI MSI ont également permis de détecter des protéines spécifiques d'une structure tissulaire et ainsi de caractériser plus finement cette structure d'un point de vue anatomique. L'identification d'une protéine spécifique du claustrum, la protéine G gamma2 (Gng2), par spectrométrie de masse MALDI a permis de définir plus précisément cette structure et de mieux comprendre son rôle dans les processus de cognition¹³⁵. La **Figure 23** met en évidence la détection de la sous unité de la protéine Gng2 dans le claustrum au niveau du striatum et l'absence de celle-ci au niveau frontal dans le cerveau de rat.

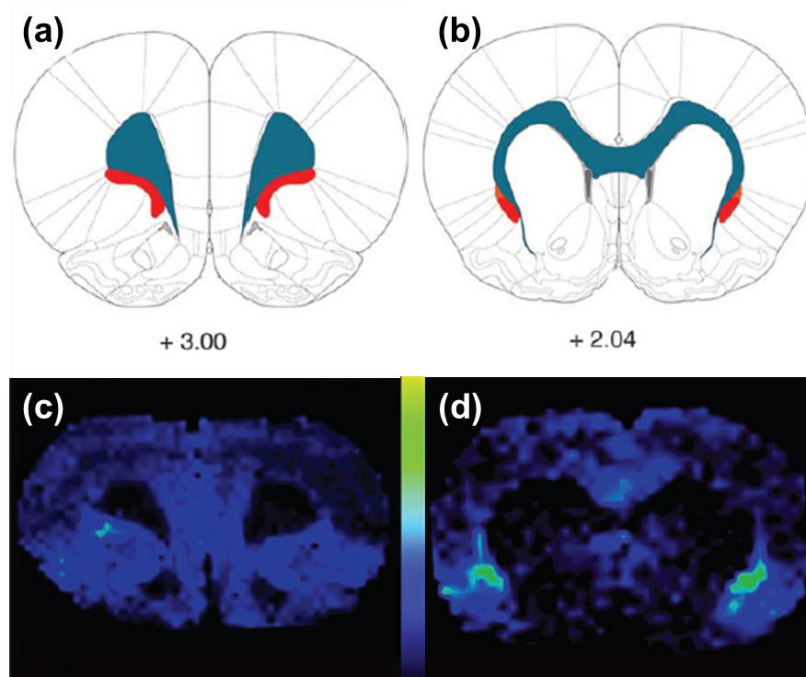


Figure 23. Schématisation de coupes de cerveau de rat réalisées (a) au niveau frontal et (b) au niveau du striatum, issues de l'atlas Paxinos et Watson. La région en bleu correspond à la matière blanche alors que la région en rouge représente le claustrum. Les images MALDI mettent en évidence la sous unité de la protéine Gng2, m/z 7725, dans le claustrum au niveau du striatum (d) mais pas au niveau frontal (c)¹³⁵.

L'imagerie MALDI a été appliquée à l'étude des pathologies du SNC telle que la maladie d'Alzheimer^{136, 137} ou de Parkinson^{138, 139}. Des images de la répartition des peptides β amyloïdes chez un modèle murin ont ainsi pu être obtenues¹⁴⁰. Ces plaques amyloïdes sont connues pour être impliquées dans les maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer. Grâce à l'imagerie MALDI les différentes espèces moléculaires ont pu être aisément distinguées (**Figure 24**).

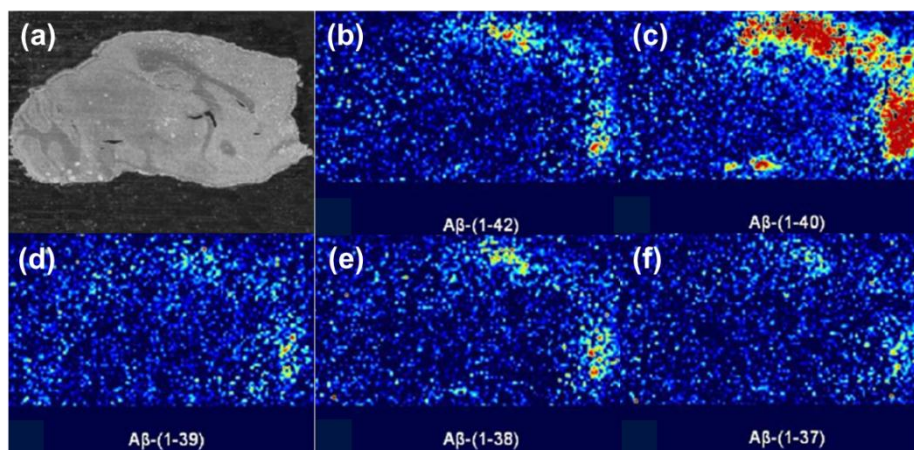


Figure 24. Images MALDI des différentes espèces moléculaires présentes dans les plaques amyloïdes chez un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. (a) Image optique d'un cerveau de souris. Répartition de 5 peptides β amyloïdes (b) $A\beta$ (1-42) (m/z 4515.1), (c) $A\beta$ (1-40) (m/z 4330.9), (d) $A\beta$ (1-39) (m/z 4231.7) (e) $A\beta$ (1-38) (m/z 4132.6) et (f) $A\beta$ (1-37) (m/z 4075.5) ¹⁴⁰.

La détection des peptides/protéines par imagerie MALDI a été possible sur des coupes de nombreux organes mais également sur des coupes d'animaux entiers ¹⁴¹. De plus, le couplage avec des analyseurs à haute résolution spectrale a permis simultanément la localisation et l'identification des peptides sur coupes ⁴⁸.

1.1.2.3.2. Les études lipidomiques

Les lipides ont également été étudiés en imagerie MALDI. Cette famille de biomolécules sont des constituants majeurs des cellules et jouent un rôle important dans de nombreux processus biologiques. Ainsi, des modifications au niveau lipidique ont été observées dans de nombreuses pathologies comme le cancer du sein ¹², le cancer du côlon ¹⁴², ou la maladie de gaucher ¹⁴³, ou dans le cas d'une ischémie cérébrale ¹⁴⁴. Pendant longtemps, les images des lipides ont été obtenues par SIMS. Cependant, la résolution spectrale requise pour la distinction entre espèces proches en masse voire isobariques et l'identification par MS/MS ont été apportées par l'imagerie MALDI. Les lipides sont divisés en 8 catégories ¹⁴⁵ mais la plupart des expériences MALDI concernent l'étude des glycérophospholipides (GP) ⁸⁸ et des sphingolipides (SP) ^{85, 146}. Les différents GP sont classés en fonction de leurs groupements chimiques. On retrouve donc parmi les GP, les glycérophosphocholines (PC), les glycérophosphoéthanolamines (PE), les glycérophosphosérines (GS), les glycérophosphoinositols (PI). De même, les SP regroupent les sphingomyélines (SM), les sulfatides (ST), les céramides, les cérébrosides et les gangliosides ¹⁴⁷.

Ainsi, l'imagerie MALDI a été appliquée à l'étude des lipides chez les plantes, les insectes et les mammifères^{47, 148}. De plus, cette technique a été employée pour la compréhension des atteintes touchant le SNC, telle que la schizophrénie¹⁴⁹. Dans cette étude, la distribution différentielle des PC et des SM au sein de cortex cérébraux contrôle et de patient atteint de schizophrénie a été mise en évidence (**Figure 25**). Ainsi, une augmentation de la glycérophosphocholine PC (diacyl-16:0/20:4) contenant l'acide arachidonique a été constatée au niveau du cortex préfrontal mais pas au niveau du cortex occipital chez le patient atteint de schizophrénie. Cette observation est en accord avec les résultats d'une étude préliminaire montrant une augmentation du rapport acide arachidonique/DHA dans le cortex frontal chez les patients schizophrènes.

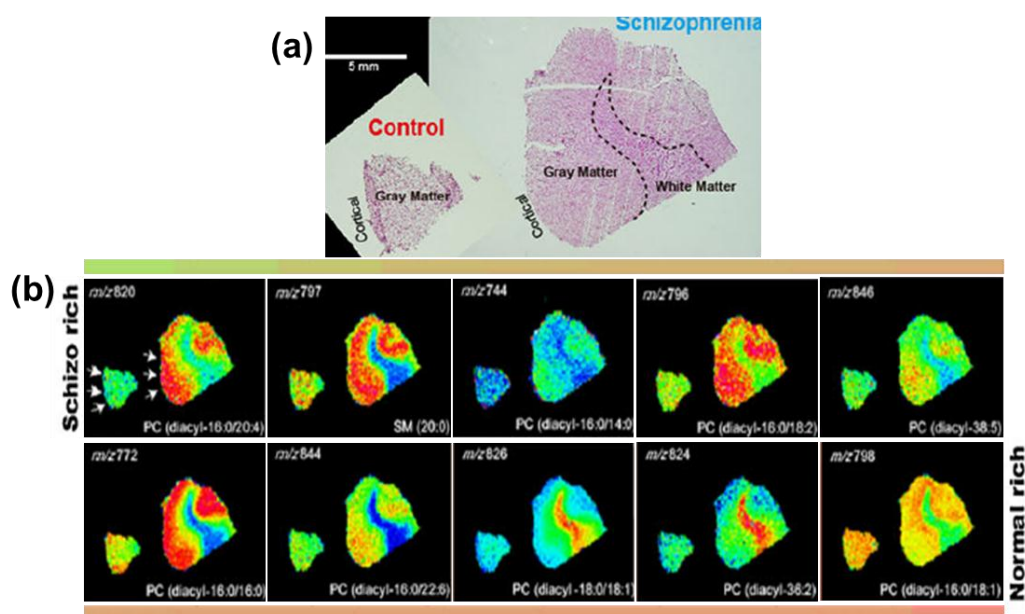


Figure 25. Images de la distribution de glycérophosphocholines et sphingolipides dans des cerveaux contrôles et de patients atteints de schizophrénie. (a) Images optiques des coupes de cerveaux après coloration H&E. (b) Images MALDI des PC et SM obtenues pour le cerveau contrôle et de patient atteint de schizophrénie¹⁴⁹.

1.1.2.3.3. Les études pharmacologiques

Dans le domaine pharmaceutique, pour évaluer les propriétés d'un médicament candidat, suivre la biodistribution d'un médicament candidat dans un tissu est une étape primordiale. Outre la détection des biomolécules, l'imagerie MALDI permet également d'analyser les composés exogènes. De plus, par MALDI MSI, il est possible de mettre en

évidence simultanément la distribution du médicament lui-même, et de ses métabolites, même au sein de coupes d'animaux entiers (**Figure 26**)⁷⁸.

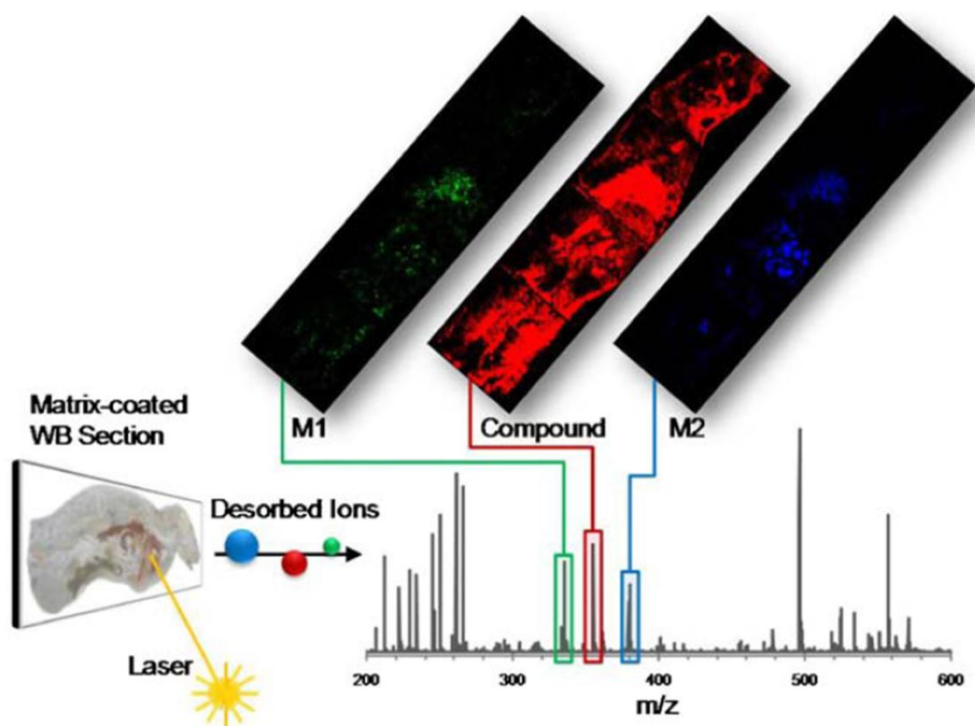


Figure 26. Imagerie MALDI sur des coupes d'animaux entiers pour la détection simultanée d'un médicament et de ses métabolites¹⁵⁰.

La comparaison des résultats obtenus par autoradiographie ; la méthode d'imagerie des médicaments classiquement utilisée ; et par imagerie MALDI a mis en évidence la même localisation d'un composé d'intérêt. Cependant, l'imagerie MALDI a permis de discriminer le médicament et de ses métabolites dans les organes de l'animal modèle (**Figure 27**)¹⁵⁰. De plus, en comparaison à l'autoradiographie, l'imagerie MALDI présente de nombreux avantages puisqu'aucun marquage préalable des composés n'est requis et que le coût et le temps de mise en œuvre sont réduits¹⁵¹. Afin de réduire les problèmes de suppression d'ions et d'efficacité d'ionisation, de nouvelles matrices ont été développées¹⁵² et leur application a été adaptée¹⁵³.

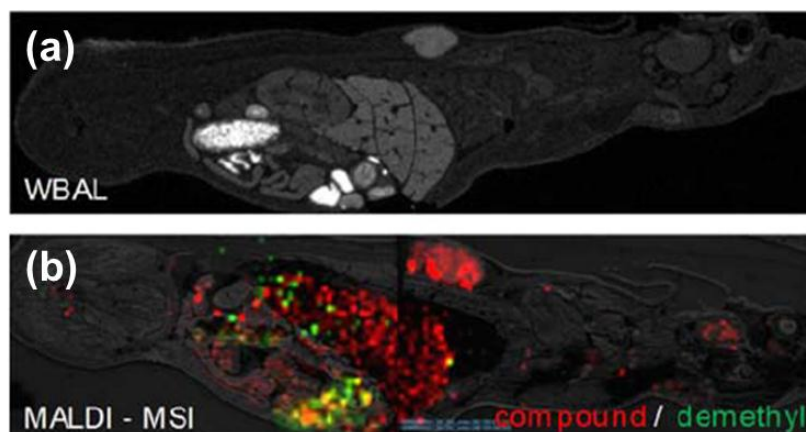


Figure 27. Comparaison des distributions d'un composé et d'un métabolite dans une coupe entière de rat obtenues par autoradiographie et imagerie MALDI ¹⁵⁰.

En dépit des challenges actuels pour la détection des composés pharmaceutiques, l'imagerie MALDI a déjà été employée dans de nombreuses études sur le cancer ¹⁵⁴, les maladies touchant les poumons ¹⁵⁵ ou le cerveau ⁵³. Ces exemples démontrent que l'imagerie MALDI est une technologie attractive pour l'exploration simultanée d'un médicament et de ses métabolites dans une coupe de tissu. Une cinétique des composés pharmaceutiques ⁷⁸ ainsi qu'une corrélation avec les modifications engendrées au niveau des molécules endogènes peut également être envisagée ^{156, 157}.

Bien que des développements soient encore nécessaires, l'imagerie MALDI est, à ce jour, une technologie robuste et accessible en routine pour la recherche sur les tissus. Cependant, les difficultés rencontrées pour l'analyse des molécules de faible poids moléculaire (<500 Da) et la résolution spatiale relativement limitée peut inciter les utilisateurs à recourir à d'autres techniques d'imagerie par spectrométrie.

1.1.3. Imagerie SIMS

Pour les expériences d'imagerie par spectrométrie de masse, le Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS) est une technique complémentaire du MALDI. Bien que la résolution spatiale de l'imagerie SIMS soit supérieure à celle de l'imagerie MALDI, les sources SIMS sont limitées pour l'analyse des composés de faibles poids moléculaire comme les lipides.

1.1.3.1. Principe

En SIMS, sous vide poussé ($<10^{-6}$ torr), un faisceau d'ions primaires, accélérés et focalisés est utilisé afin de bombarder la surface de l'échantillon, conduisant ainsi à une émission de particules secondaires (ions d'analytes) (**Figure 28**). Deux modes d'analyses sont possibles en SIMS et dépendent de la dose d'ions primaires envoyée. Plus la dose d'ions sera élevée, plus les liaisons du solide seront rompues et donc seuls les éléments monoatomiques et les petits groupements seront analysables. Lorsque les doses d'ions sont élevées ($>10^{13}$ - 10^{14} ions/cm²), l'énergie transférée est importante et l'échantillon est creusé en profondeur. On parle de mode dynamique. Pour des doses d'ions plus faibles, seules les premières couches de l'échantillon sont érodées et moins de fragmentations sont observées. Ce dernier mode ainsi permet la détection de composés de plus haute masse. Il s'agit du mode statique.

Différents analyseurs peuvent être couplés avec la source SIMS comme le temps de vol, le quadripôle ou les secteurs magnétiques.

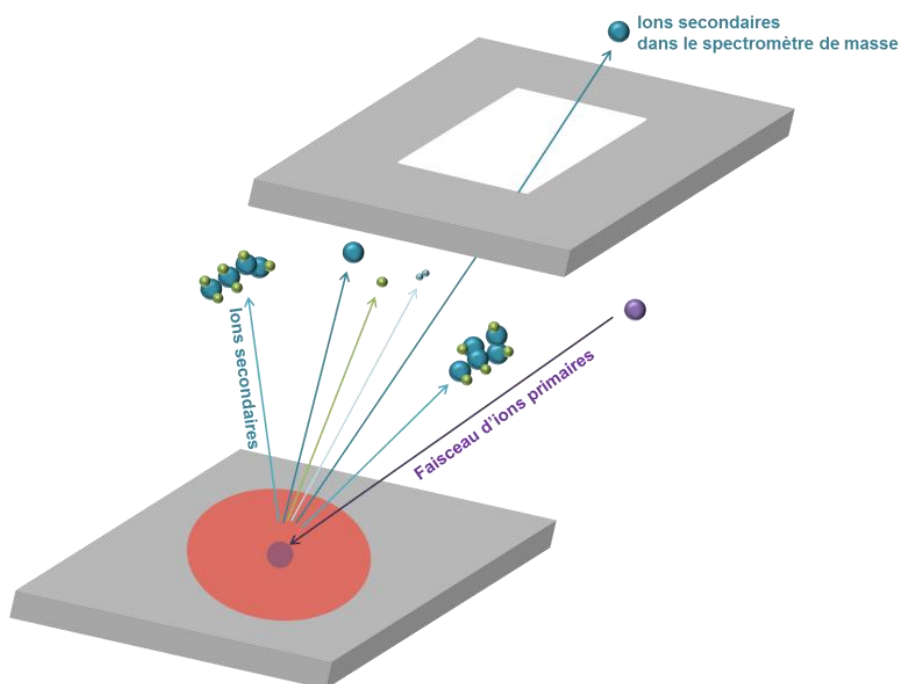


Figure 28. Schéma du processus SIMS.

1.1.3.2. Les développements en imagerie SIMS

Un grand nombre de source d'ions primaires a été étudié. Les sources d'ions primaires de type LMI (Liquid Metal Ion) produisent un faisceau d'ions Ga⁺ ou In⁺ avec une énergie

cinétique jusqu'à 25 keV et focalisés jusqu'à 100-200 nm. D'autres sources d'ions primaires avec un faisceau d'ions Cs⁺, accélérés à 10 keV et focalisés à 2-3 μm ont été utilisés. Il est important de noter que la nature du faisceau de l'ion primaire influence l'émission des ions secondaires. L'utilisation de sources d'ions primaires polyatomiques (Au_n, Bi_n, C60) a permis d'augmenter le rendement d'ions secondaires, tout en limitant la surface irradiée. Ainsi, avec ce type de source d'ions primaires, il est possible d'obtenir des images de lipides avec une résolution de l'ordre du micron (**Figure 29**)^{158, 159}.

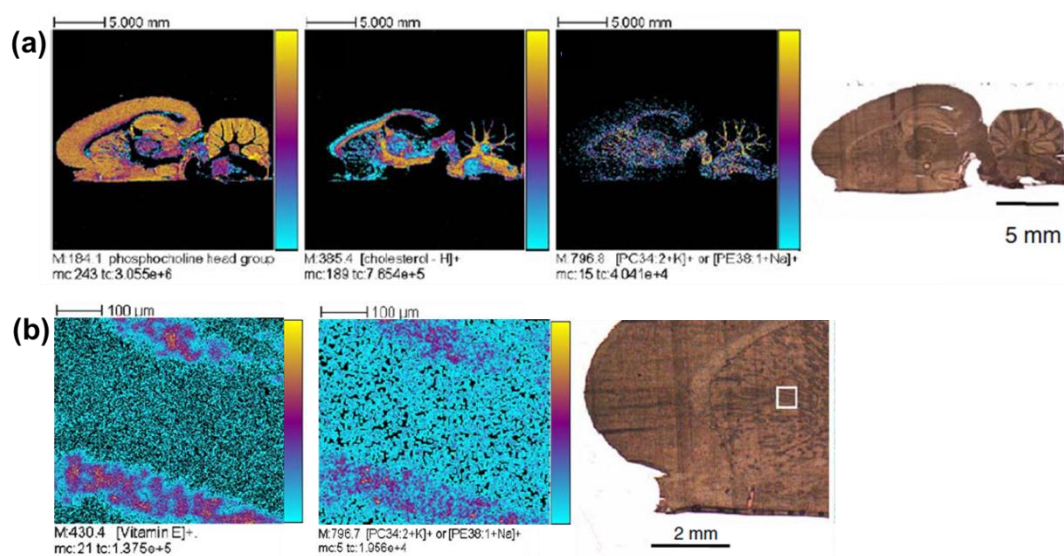


Figure 29. (a) Images SIMS obtenues à partir d'une coupe sagittale de cerveau de rat, à 87,5 μm avec une source d'ions primaires Bi₃²⁺ de la phosphocholine (m/z 184.1), du cholestérol (m/z 385.4), d'un glycérophospholipide [PE 40:4+H]⁺ ou [PE38:1+Na]⁺ ou [PC34:2+K]⁺ (m/z 786.8). (b) Images SIMS obtenues à partir d'une coupe transversale de cerveau de rat à 2 μm avec une source d'ions primaires Bi₃²⁺ de la vitamine E (m/z 430.4) et d'un glycérophospholipide [PE38:1+Na]⁺ ou [PC34:2+K]⁺ (m/z 796.7)¹⁶⁰.

Les espèces détectées en SIMS sont des ions de petite masse. Afin d'augmenter le rendement d'ions produits et la gamme de masse des m/z détectés, de nombreuses recherches ont été entreprises. Il a été démontré que l'ajout d'une matrice organique MALDI permettait de détecter des ions intacts de plus haut poids moléculaire (**Figure 30**)¹⁶¹. Le Matrix-Enhanced SIMS (ME-SIMS), basé sur cette constatation, permet de bénéficier d'une meilleure efficacité d'ionisation et de générer des ions intacts.

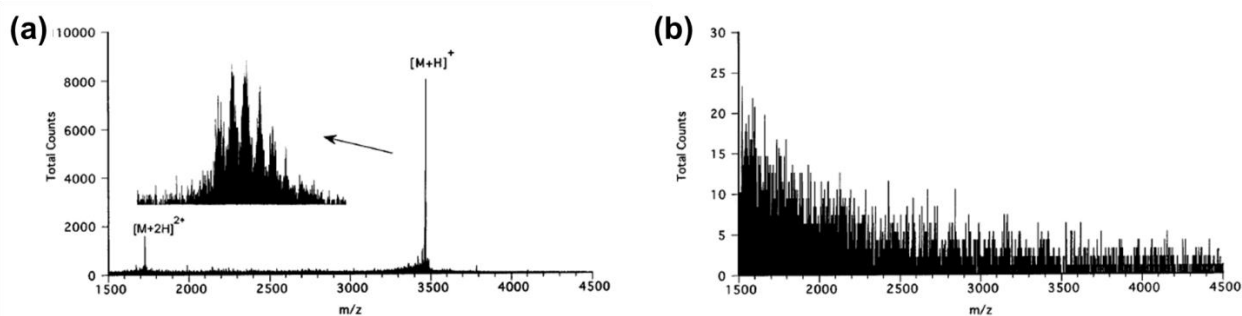


Figure 30. (a) Spectre de masse TOF ME-SIMS de la β -endorphin humain (m/z 3465) obtenu en mode positif avec la matrice 2,5-DHB (b) Spectre de masse TOF-SIMS de la β -endorphin humain (m/z 3465) ¹⁶¹.

Les spectres obtenus en ME-SIMS sont similaires aux spectres MALDI pour les composés d'un poids moléculaire inférieur à 5 kDa (**Figure 31a**). Ainsi, le ME-SIMS permet donc d'améliorer la détection des composés tels que les peptides ¹⁶². La **Figure 31b-e** présente les images obtenues en ME-SIMS du δ -peptide ou du carboxyl terminal peptide (CTP) après dépôt de matrice 2,5-DHB sur une coupe de tissu nerveux de *Lymnaea stagnalis*. Cependant, le dépôt de matrice peut engendrer, comme pour le MALDI, des inconvénients tels que la diminution de la reproductibilité et de la résolution spatiale, la présence de signaux liés à la matrice dans les bas m/z ¹⁶³.

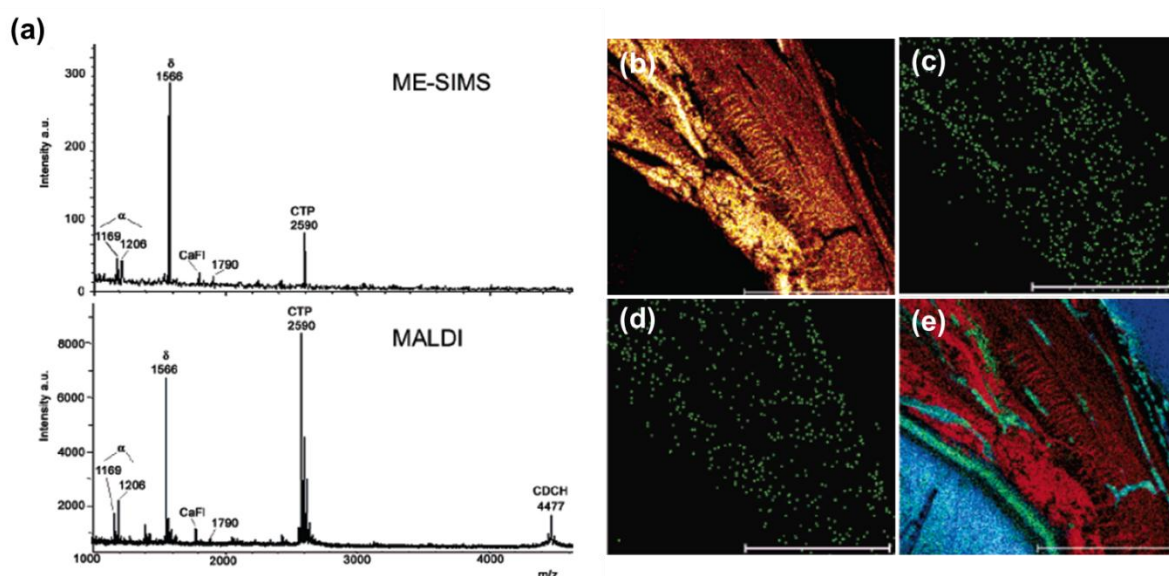


Figure 31. (a) Spectres ME-SIMS et MALDI d'un extrait de la commissure de *Lymnaea stagnalis* obtenus avec la matrice 2,5-DHB. (b) Image optique de la commissure de *Lymnaea stagnalis*. Images ME-SIMS obtenues après dépôt de 2,5-DHB (c) du δ -peptide, (d) du CTP-peptide. (e) Image ME-SIMS composite de la 2,5-DHB (rouge), de l'ion Na^+ (bleu) et de l'ion K^+ (vert) ¹⁶².

La technique de métallisation par recouvrement de l'échantillon à l'aide d'une fine couche d'or ou d'argent, appelée MetA-SIMS, a également permis d'augmenter la sensibilité d'un grand nombre de molécules (**Figure 32**). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène ne sont pas bien compris mais l'explication pourrait être l'augmentation de la conductivité de l'échantillon par le dépôt d'une fine couche de métal.

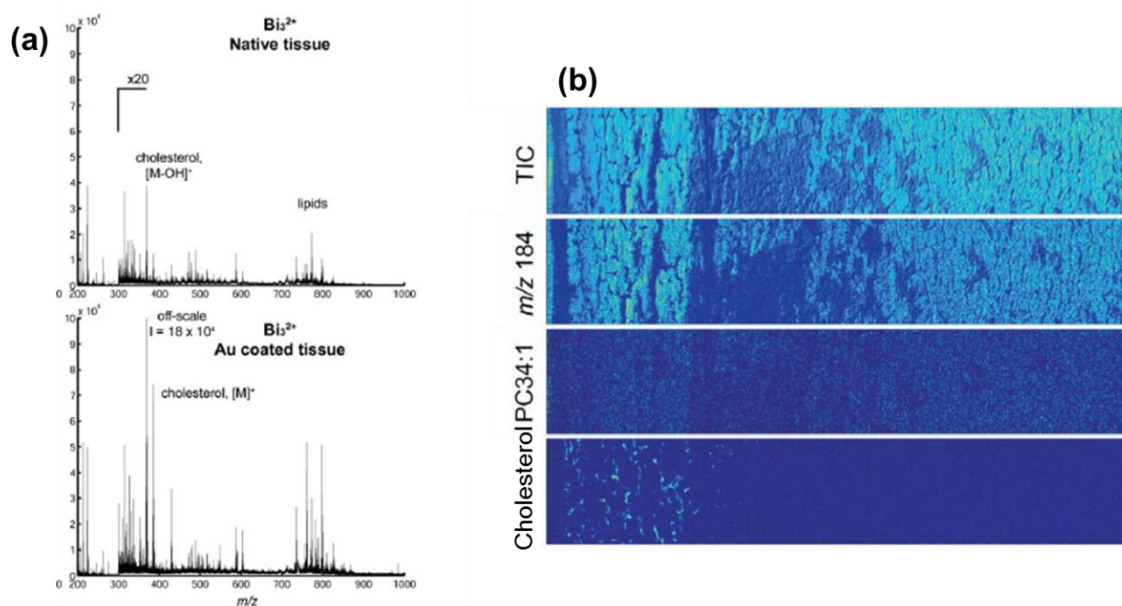


Figure 32. (a) Comparaison des spectres SIMS et MetA-SIMS après recouvrement d'or obtenus en mode positif avec une source d'ions primaires Bi_3^{2+} . (b) Images MetA-SIMS d'une coupe de cerveau de rat après métallisation à l'or du groupement phosphocholine (m/z 184), du glycérophospholipide [PC34:1+H]⁺ (m/z 761) et du cholestérol (m/z 387) ¹⁶⁴.

1.1.3.3. Les applications biologiques

Depuis son introduction dans les années 60, grâce aux développements réalisés, le SIMS permet d'analyser la distribution des petites molécules à l'échelle subcellulaire. Les nombreuses expériences entreprises par imagerie SIMS démontrent l'intérêt de cette technique pour l'étude des pathologies comme l'obésité ¹⁶⁵, l'athérosclérose ¹⁶⁶, la stéatose hépatique non alcoolique ¹⁶⁷, la myopathie de Duchenne ^{168, 169}, la mucoviscidose ¹⁷⁰. Dans toutes ces études, les modifications lipidiques caractéristiques des maladies sont en corrélation avec l'histologie des tissus. L'imagerie SIMS a également été employée pour l'étude des lipides et des flavonoïdes dans des échantillons végétaux. Des fragments de la quercétine et du kaempférol, des flavonoides, ont été détectés dans le tégument de graines

d'*Arabidopsis thaliana*. La distribution de ces composés s'est ainsi révélée être différente entre les plantes de type sauvage et mutante (**Figure 33**)¹⁷¹.

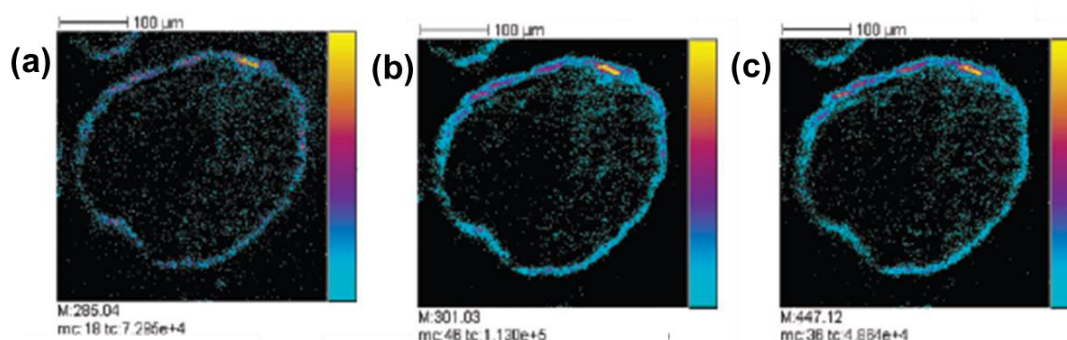


Figure 33. (a) Images SIMS obtenues en mode négatif à partir d'une coupe de graine d'*A. thaliana* (a) d'un fragment du kaempférol (m/z 285.04), (b) d'un fragment de la quercétine (m/z 301.03) et d'un autre fragment de la quercétine (m/z 447.12). Images réalisées à 1.56 µm avec une source d'ions primaires Bi_3^+ ¹⁷¹.

Tous ces exemples illustrent les capacités de l'imagerie TOF-SIMS. Malgré les développements effectués ces dernières années, il n'est pas possible d'analyser des protéines, ni de caractériser les composés par MS/MS. C'est pourquoi, cette technique est complémentaire de l'imagerie MALDI.

1.1.4. Bilan

Comme en atteste les nombreuses applications pour la recherche de biomarqueurs ou pour les études pharmacologiques, l'imagerie par spectrométrie de masse est une technique de choix pour la détection et la localisation des molécules au sein d'un tissu. Ces dernières années, les développements effectués au niveau instrumental, avec notamment l'évolution des sources et des analyseurs, a permis d'atteindre de meilleures résolutions spatiale et spectrale. En parallèle, les nouveaux outils informatiques pour le traitement des données ont permis de mettre en évidence plus facilement et plus rapidement la distribution des molécules dans les structures des tissus.

Grâce aux efforts déjà fournis, il est, à l'heure actuelle, possible de générer des images MALDI, à l'échelle de la cellule ou du groupe de cellules, dépendamment de la famille de molécules détectées. En effet, il est à noter que les différentes catégories de molécules ne sont pas égales face aux processus de désorption et d'ionisation. En effet, l'incorporation des

peptides et des protéines dans les cristaux de matrice joue un rôle important pour la désorption/ionisation de ces molécules. C'est pourquoi, les étapes de préparation de l'échantillon, comprenant le choix de la matrice, du solvant et de la méthode de dépôt, sont primordiales.

Afin de répondre aux besoins de l'imagerie MALDI, en termes de détection des composés, de qualité spectrale et de résolution spatiale, la mise au point des procédures de dépôt compatibles avec les matrices ioniques a été effectuée. Ces stratégies développées ont ensuite été appliquées à la recherche de molécules impliquées dans la régénération du système nerveux central chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. Par la suite, ces méthodes ont été utilisées pour l'étude des peptides et protéines détectées au niveau des hippocampes de patients atteints d'épilepsie. Enfin, les modifications des profils peptidiques et protéiques suite à l'administration d'un traitement chez un modèle murin atteint de neuropathie ont été étudiées.

2. Développements des matrices pour l'imagerie MALDI

2.1. Les matrices ioniques liquides (LIM)

2.1.1. Les LIMs et l'analyse des lipides

Longtemps considérés comme de simples constituants des membranes cellulaires, il est désormais admis que les lipides sont des composés majeurs jouant divers rôles dans les organismes, incluant le transport des protéines, la plasticité neuronale ou encore la régulation de la réponse immunitaire. L'importance des lipides dans le domaine de la biologie s'illustre par l'existence d'une nouvelle spécialité, la lipidomique.

Lors de l'étude des lipides par spectrométrie de masse, la matrice 2,5-DHB est couramment employée. En effet, cette matrice présente de nombreux avantages, dont le faible nombre de pics de matrice dans les basses m/z , une cinétique de sublimation lente sous vide poussé ainsi que de bonnes performances analytiques pour les lipides à la fois en mode positif et négatif¹⁷². Néanmoins, avec les solvants utilisés classiquement pour l'extraction des lipides, la cristallisation de la 2,5-DHB est souvent hétérogène. En effet, dans ces conditions de préparation, de larges cristaux dans lesquels sont répartis les analytes sont formés à l'extérieur de la zone du dépôt. En analyse MALDI classique, le phénomène de « hot-spot » lié à l'hétérogénéité du dépôt de 2,5-DHB peut être contourné par le déplacement manuel de l'échantillon sous le faisceau laser. D'autres matrices sont également employées pour l'analyse des lipides. La DHAP, tout comme la 2,5-DHB, permet l'analyse des lipides en mode positif et négatif mais sa cinétique de stabilité sous vide est rapide¹⁷³⁻¹⁷⁶. Cette caractéristique implique une analyse rapide de l'échantillon après l'introduction dans la source MALDI (environ 30 minutes)^{86, 177}. La matrice p-nitroaniline donne également de bons résultats pour la détection des phospholipides, mais présente également une instabilité sous vide¹⁷⁸. Enfin, l'ATT a été utilisée pour analyser les phospholipides et, contrairement aux matrices précédemment citées, cette matrice ne présente pas de problèmes de cristallisation et de sublimation sous vide⁴⁹.

Ces solutions de matrice sont généralement préparées par dissolution de la matrice dans un mélange d'eau et de solvant organique. Or, les lipides sont connus pour être des espèces solubles dans un grand nombre de solvants. Par conséquent, ils peuvent très facilement être délocalisés dans une coupe de tissu lors du dépôt de matrice. De plus, des travaux ont montré que l'incorporation dans les cristaux de matrice n'était pas nécessaire pour conduire à l'ionisation de certains lipides en phase gazeuse. Cette particularité serait liée à leur volatilité

importante. Ces observations ont conduit à l'utilisation de méthodes alternatives de dépôt de matrice limitant les volumes de solvants appliqués et générant de fins cristaux homogènes. Ces méthodes incluent la sublimation^{100, 179} ou le recouvrement sans solvant par dépôt d'une poudre de matrice¹⁰¹. Cependant, si les cristaux de matrice formés sont fins, le nombre de lipides détectés et l'intensité des signaux sont réduits. De plus, seuls les lipides abondants sont observés.

Pour l'imagerie des lipides, une préparation de l'échantillon spécifique est donc requise. Le dépôt et la cristallisation de la matrice sont des points cruciaux. En effet, le dépôt de la matrice doit être réalisé en utilisant un volume minimal de solvants pour éviter la délocalisation. La cristallisation doit être contrôlée afin de permettre une répartition homogène des analytes dans les cristaux de matrice. De plus, les images MALDI nécessitant un temps d'acquisition long, les matrices doivent présenter une bonne stabilité sous vide.

Concernant le dépôt de la matrice, le micro-dépôt semble être un bon compromis entre délocalisation et extraction des lipides. En effet, concernant la délocalisation des analytes, celle-ci est limitée à la taille du spot. En outre, le volume de solvant déposé dans chaque spot permet d'optimiser l'extraction et donc la détection des biomolécules. Ce mode de dépôt, en réduisant le volume du solvant déposé, permet une cristallisation plus homogène avec la formation de cristaux plus petits, ce qui évite l'apparition de « hot-spot ». Ainsi, le micro-dépôt pourrait être une solution adéquate pour éviter les phénomènes de « hot-spot » de la 2,5-DHB.

En se basant sur les critères précédemment cités, les différentes matrices employées pour les analyses MALDI classiques ont été testées. Les premières études menées par Frank *J et coll.* ont consisté à déposer l'ATT et la DHAP par micro-dépôt⁹². Le micro-dépôt des deux matrices sur des coupes de cerveau de rat a permis de mettre en évidence la détection des mêmes classes de lipides, avec la présence de signaux intenses dans la gamme de masse m/z 700-900. Cependant, après une heure dans la source MALDI sous vide poussé, une sublimation de la DHAP a été constatée conduisant à une perte de signal. De plus, une cristallisation hétérogène dans les spots d'ATT a été observée. La cristallisation hétérogène de l'ATT et la cinétique de sublimation rapide sous vide de la DHAP peuvent donc entraîner une perte d'information lors de l'acquisition des données. Ces matrices sont donc adaptées à l'analyse classique mais ne sont pas idéales pour l'imagerie MALDI des lipides.

Des micro-dépôts de 2,5-DHB ont alors été effectués sur des coupes de cerveau de rat. Le dépôt de 2,5-DHB a conduit à la formation de cristaux répartis de façon hétérogène. En effet, les cristaux sont localisés sur les bords du spot comme pour un dépôt de 2,5-DHB réalisé par micropipette (**Figure 34**).

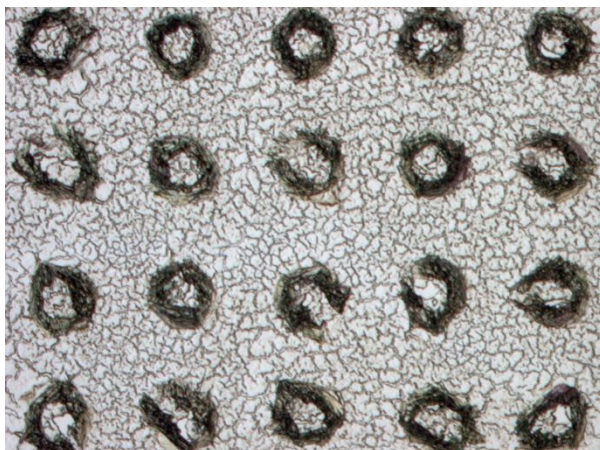


Figure 34. Image optique de micro-dépôts de 2,5-DHB sur une coupe de cerveau de rat.

L'absence de traitement du tissu à l'aide de solvants organiques peut expliquer la disposition des cristaux de matrice en cercle. Or, aucun traitement ne peut être effectué pour améliorer la cristallisation sans entraîner la délocalisation des lipides au sein de la coupe. Une analyse des dépôts de 2,5-DHB a néanmoins été réalisée. Une perte de signal au centre du spot a été mise évidence en comparaison au signal enregistré à la périphérie du micro-dépôt (**Figure 35**). En imagerie, un mouvement peut être appliqué au laser afin qu'il se déplace sur l'ensemble du dépôt. Cependant, le spectre moyenné obtenu avec cette méthode ne traduit pas parfaitement la représentation des molécules présentes dans le spot. La cristallisation de la 2,5-DHB obtenue après micro-dépôt ne permet donc pas une détection optimale des lipides en imagerie MALDI.

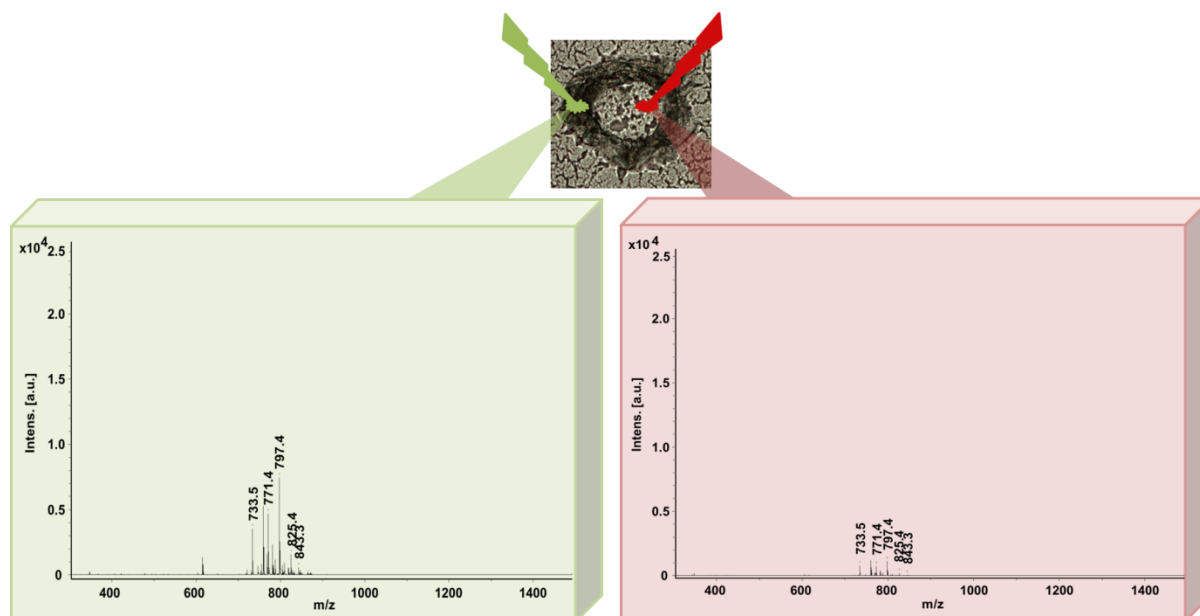


Figure 35. Spectres de masse MALDI enregistrés en périphérie et au centre d'un micro-dépôt de matrice 2,5-DHB, en mode réflecteur, à partir d'une coupe de cerveau de rat.

Afin de pallier aux problèmes de stabilité sous vide ou de cristallisation hétérogène des matrices classiques, de nouvelles matrices ont été développées. Les matrices ioniques solides préparées à partir d'HCCA ont déjà montré leur potentiel pour les expériences d'imagerie MALDI ³⁹. La 2,5-DHB étant la matrice la plus couramment employée pour l'analyse des lipides, il a été donc judicieux de l'utiliser pour la préparation de matrices ioniques. Des précédentes études ont mis en évidence que les matrices ioniques basées sur la 2,5-DHB étaient liquides et efficaces pour l'analyse des oligosaccharides ^{180, 181} et des phospholipides ¹⁸². Les matrices ioniques liquides (LIM) ne présentent pas de cristaux et sont donc considérées comme très homogènes, ce qui permet leur utilisation pour la quantification en spectrométrie de masse ¹⁸³. Le micro-dépôt associé aux LIMs semble donc être une bonne alternative pour les expériences d'imagerie MALDI des lipides.

Afin de synthétiser de nouvelles LIMs, de nombreuses bases organiques ont donc été testées avec la 2,5-DHB telle que l'aniline (ANI), la N,N-diméthylaniline (DANI), la N,N-diéthylaniline (DEANI), la 3-acétylpyridine (3-AP) et la pyridine (Pyr) (**Figure 36**). La préparation de ces matrices consiste à réaliser un mélange équimolaire entre une base organique et la matrice 2,5-DHB.

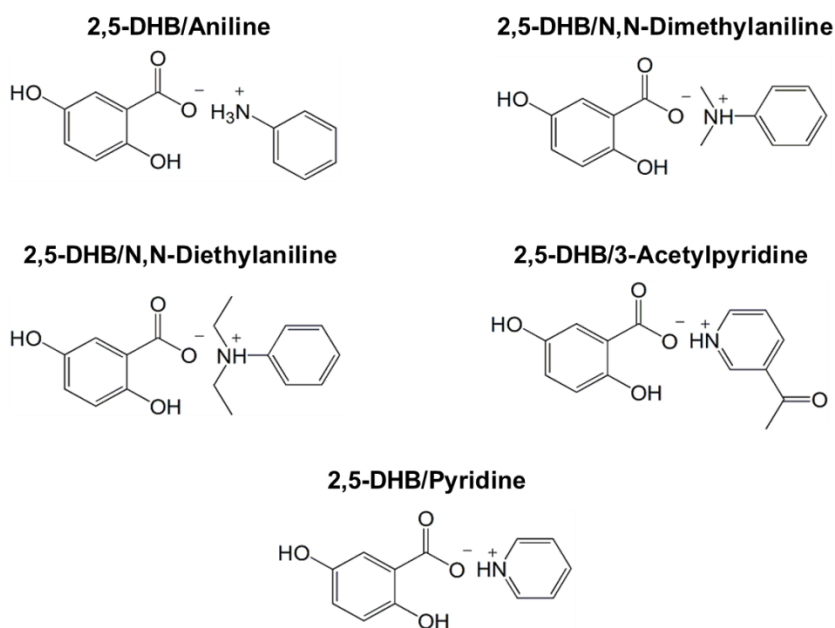


Figure 36. Formules semi-développées des matrices ioniques liquides 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/DANI, 2,5-DHB/DEANI, 2,5-DHB/3-AP et 2,5-DHB/Pyr.

Suite à cette synthèse rapide permettant un usage extemporané, les LIMs sont micro-déposées à la surface du tissu par un système de type piézoélectrique (**Figure 37**). Le micro-dépôt des matrices ioniques liquides se présente sous forme de gouttes visqueuses à la surface du tissu. Cette viscosité empêche leur ruissellement lorsque la cible est placée en position verticale. De plus, les micro-dépôts des LIMs présentent ainsi une très grande homogénéité. Les propriétés intrinsèques des matrices ioniques permettent, en outre, d'éviter la formation des cristaux au niveau de la tête piézoélectrique et ainsi d'obtenir un dépôt très stable et reproductible.

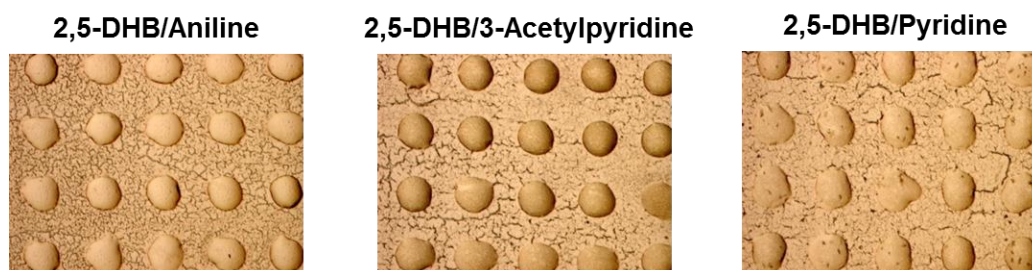


Figure 37. Images optiques des micro-dépôts des matrices 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/3-AP et 2,5-DHB/Pyr.

Une première étude a porté sur la détermination de la quantité de matrice à déposer (**Figure 38**). Cette analyse a révélé qu'un volume de 7,5 nL par position était optimal. En effet, avec un volume inférieur à 7,5 nL, une fine couche de matrice se forme mais la stabilité aux irradiations laser est faible puisque après quelques centaines de tirs laser les lipides ne sont plus détectés. Au contraire, avec des volumes supérieurs à 7,5 nL, les gouttes de matrice formées sont plus larges à la surface du tissu, ce qui peut entraîner une superposition des dépôts et par conséquent une délocalisation des analytes. De plus, dans ce cas de figure, une détection plus difficile des lipides est également observée. Ce phénomène peut être expliqué par la dilution des lipides dans le volume plus important des gouttes de matrice. 7,5 nL de solution de LIM semblent donc être un bon compromis entre la détection des lipides et la stabilité aux irradiations laser. Ainsi, le temps nécessaire au dépôt des LIMs est réduit par rapport au dépôt de la matrice cristalline 2,5-DHB. En effet, pour obtenir des spectres présentant des pics avec une bonne intensité, seuls 7,5 nL de solution de LIM sont déposés par position alors que 20 nL de solution de 2,5-DHB sont nécessaires. Ainsi, pour atteindre le volume de matrice final par position, 13 itérations sont requises dans le cas du dépôt des LIMs contre 40 passages pour la matrice 2,5-DHB. Ce paramètre peut se révéler être un avantage pour la préparation de larges échantillons de tissu.

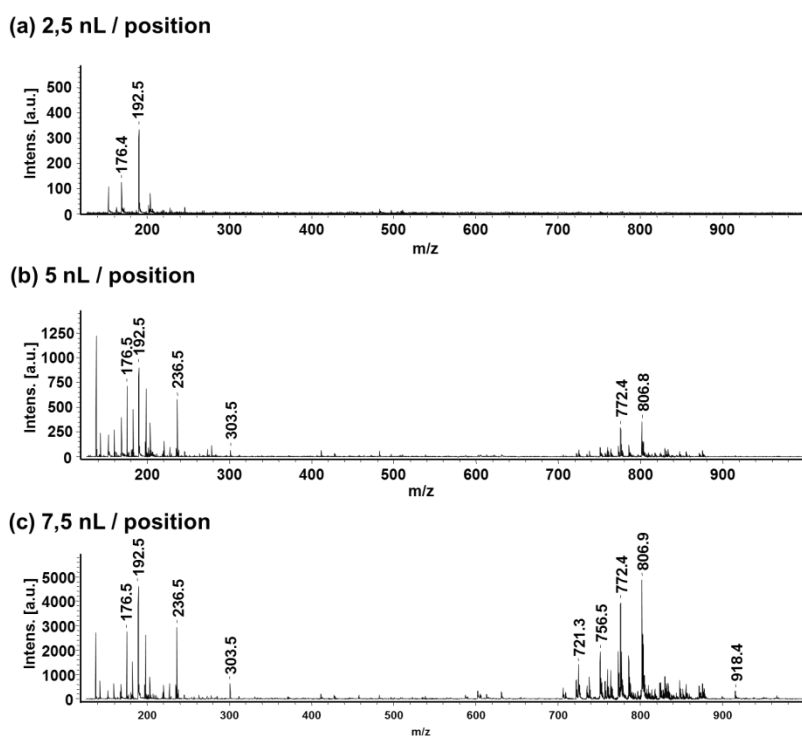


Figure 38. Spectres de masse MALDI enregistrés après le micro-dépôt de (a) 2,5 nL, (b) 5 nL et (c) 7,5 nL par position de matrices 2,5-DHB/ANI.

Afin d'évaluer l'efficacité des nouvelles LIMs, une comparaison avec la matrice 2,5-DHB a été entreprise. Chaque matrice a été micro-déposée sur une coupe de cerveau de rat et des spectres ont été enregistrés en mode positif et négatif dans les mêmes régions (**Figure 39**). Ces spectres mettent en évidence que les mêmes classes de lipides sont détectées avec les LIMs et la 2,5-DHB, en mode positif et en mode négatif. Cependant en mode négatif, les spectres obtenus avec les matrices 2,5-DHB/DANI et 2,5-DHB/DEANI présentent des pics d'intensité moindre. A l'heure actuelle, aucune explication réelle à ce constat n'a été apportée.

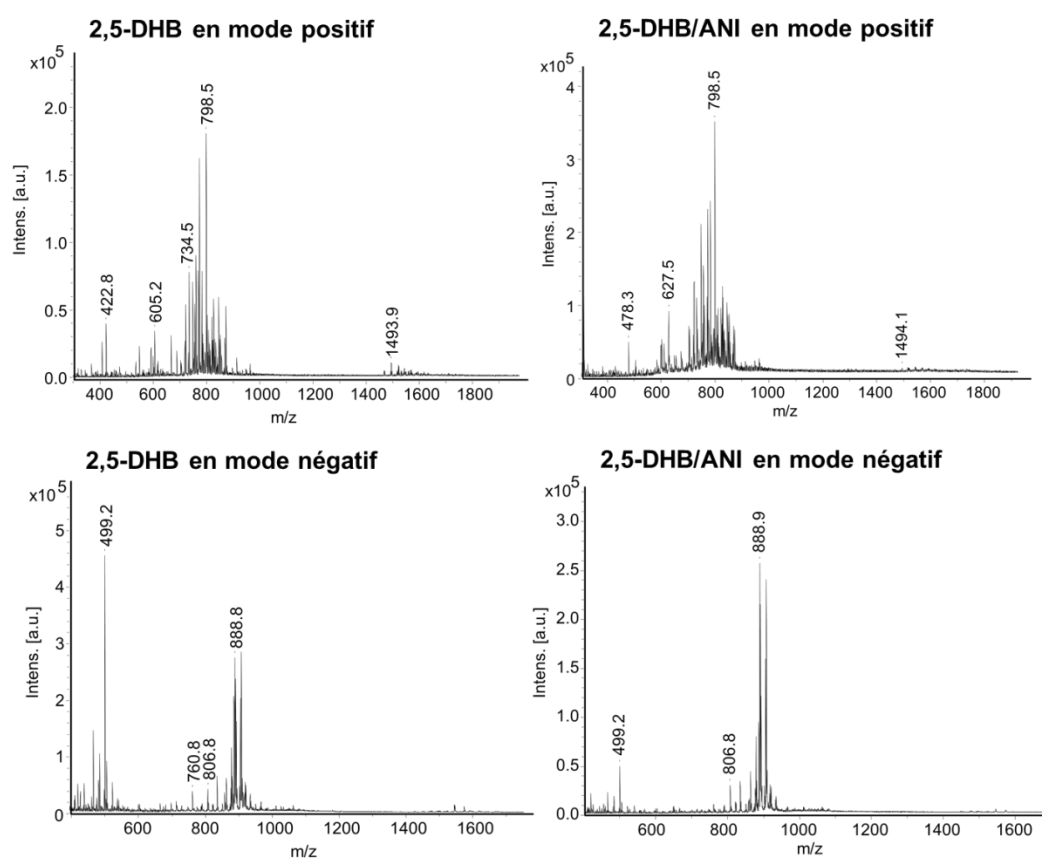


Figure 39. Spectres de masse MALDI enregistrés après dépôt des matrices 2,5-DHB et 2,5-DHB/ANI en mode positif et négatif.

Pour apprécier les performances des LIMs en imagerie MALDI, les matrices 2,5-DHB et 2,5-DHB/ANI ont été micro-déposées chacune sur une moitié d'un même coupe de cerveau de rat, en suivant l'axe de symétrie (**Figure 40**). Les images optiques des micro-dépôts de 2,5-DHB et 2,5-DHB/ANI révèlent une forte homogénéité pour la LIM en comparaison à la matrice cristalline qui présente une cristallisation hétérogène associée à une absence de cristaux au centre. Lors des expériences d'imagerie MALDI, le positionnement du laser se

faisant sur la base de 3 points de référence, généralement définis comme le centre du spot, la répartition hétérogène des cristaux de 2,5-DHB entraîne une perte de signal alors que la LIM, par sa nature liquide, permet d'obtenir une répartition parfaite des analytes et donc un signal intense dans le spot entier. Les images de deux glycérophospholipides acquises en mode réflecteur positif illustrent ce phénomène. En effet, alors que ces lipides sont très faiblement détectés avec la matrice 2,5-DHB, leur distribution sur la moitié de la coupe recouverte par la matrice 2,5-DHB/ANI est bien meilleure. De plus, il faut noter que l'enregistrement des spectres après micro-dépôt de 2,5-DHB a nécessité le déplacement de l'échantillon sous le laser afin d'irradier les cristaux formés en périphérie du dépôt.

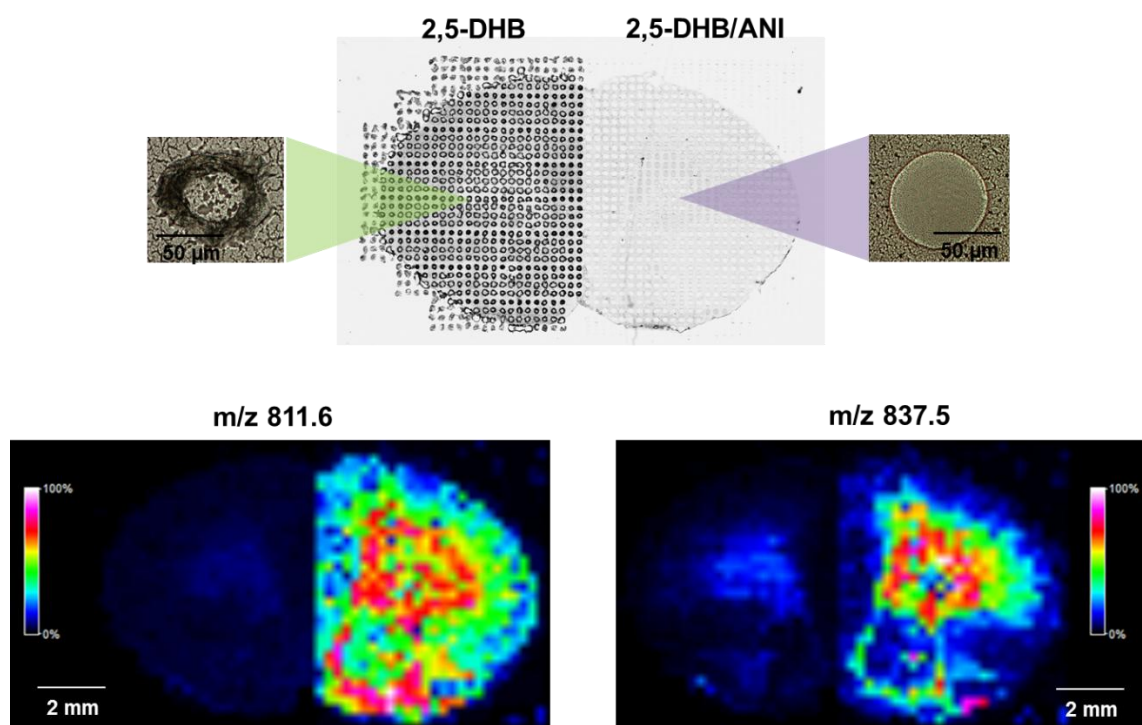


Figure 40. Images optiques d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de 2,5-DHB et de 2,5-DHB/ANI et images moléculaires de deux glycérophospholipides.

Une étude de la cinétique de sublimation des LIMs sous vide poussé a été entreprise. Pour cela, des spectres de références ont été enregistrés immédiatement après l'introduction de l'échantillon dans la source MALDI. La cible a été laissée pendant 2 jours sous vide poussé de la source MALDI. La nouvelle acquisition de spectres a alors été réalisée. Après 2 jours sous vide poussé, aucune dégradation des spots de matrice n'a été constatée. De plus, les spectres obtenus après ce temps sont similaires à ceux enregistrés après l'introduction dans la

source (**Figure 41**). Ces observations permettent de conclure que les LIMs sont très stables sous le vide poussé de la source MALDI.

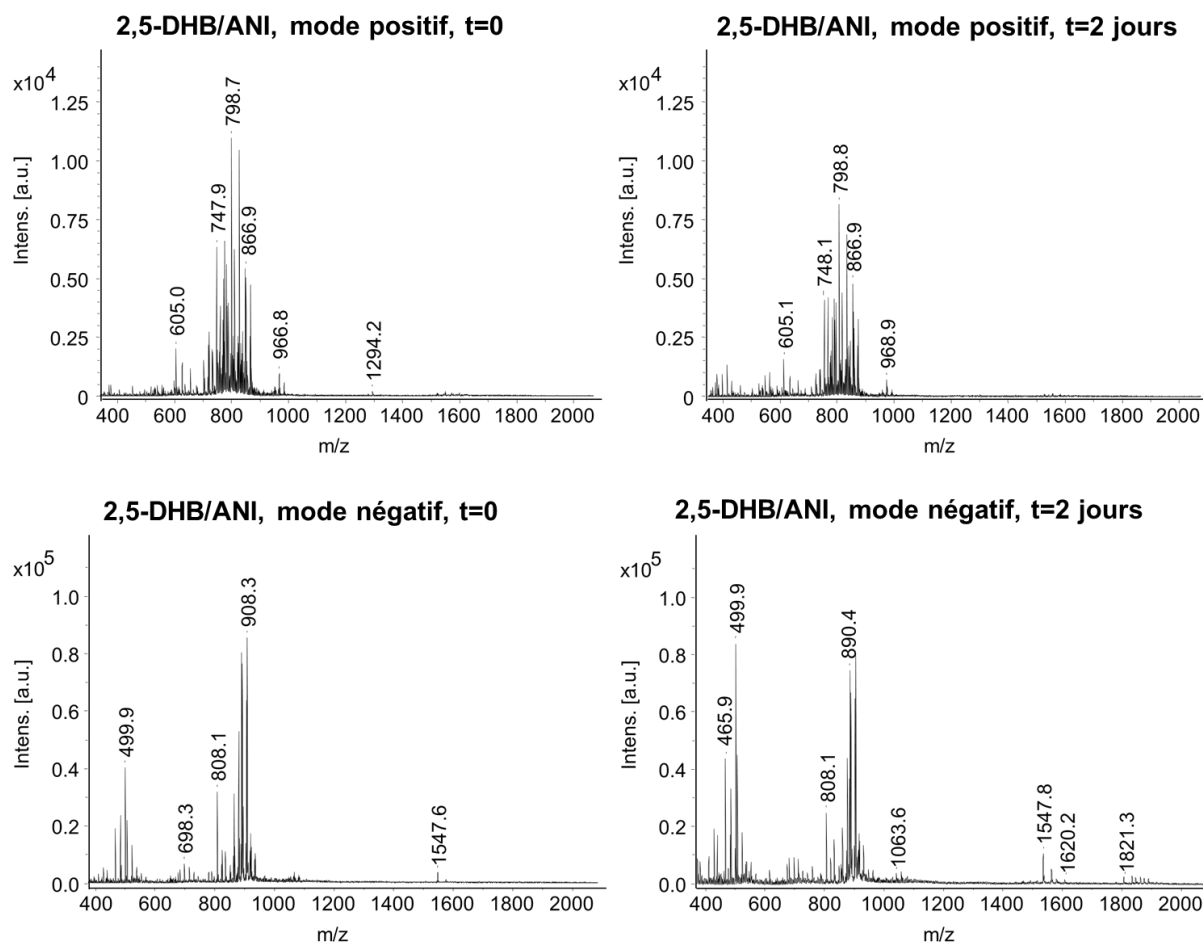


Figure 41. Spectres de masse MALDI enregistrés à partir d'une coupe de cerveau de rat en mode réflecteur positif et négatif, immédiatement après dépôt de la matrice 2,5-DHB/ANI et après deux jours dans la source MALDI.

La stabilité sous vide, l'homogénéité des dépôts ainsi que la possibilité de travailler en mode positif et négatif sont les caractéristiques permettant aux LIMs d'être adaptées à l'imagerie des lipides. La matrice 2,5-DHB/3-AP a donc été déposée sur une coupe de cerveau de rat. Des images de lipides ont, dans un premier temps, été obtenues avec une résolution spatiale de 200 μm en mode réflecteur positif. La **Figure 42** présente la répartition de deux lipides mesurés à m/z 753.6 et à m/z 788.9 correspondant respectivement à la sphingomyéline {38:4} et à la phosphatidylcholine {36:1}. Une large gamme de lipides incluant les phosphatidylcholines, les phosphoéthanolamines et les phosphosérines, ainsi que des sphingolipides tels que les sphingomyélines a été détectée (**Tableau 5**). L'identification

des lipides est basée sur la mesure du m/z et par comparaison avec des banques de données établies par différents groupes¹⁸⁴.

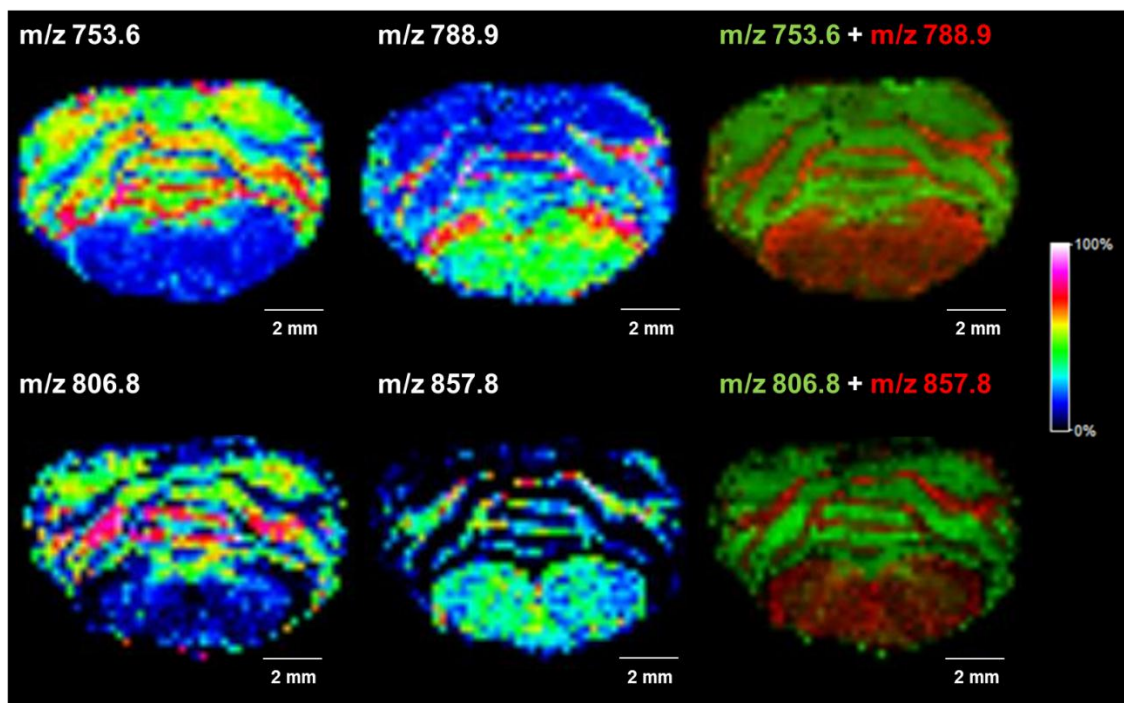


Figure 42. Images moléculaires de lipides présentant une biodistribution complémentaire obtenues à partir d'une coupe de cerveau de rat. En mode réflecteur positif, l'ion mesuré (a) à m/z 753.6 correspond à la sphingomyéline {38:4} et (b) à m/z 788.9 correspond à la phosphatidylcholine {36:1}. En mode réflecteur négatif, l'ion mesuré (d) à m/z 806.8 correspond au sulfatide {36:1} et (e) à m/z 857.8 correspond au phosphoinositol {36:4}.

Masse Expérimentale	Masse Théorique	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	SM {36:1} [M+Na] ⁺
	753.59	SM {38:4} [M+H] ⁺
756.53	756.55	PC {34:3} [M+H] ⁺
	756.57	PC {32:0} [M+Na] ⁺
760.55	760.59	PC {34:1} [M+H] ⁺
775.70	775.56	SM {38:4} [M+Na] ⁺
	775.57	SM {40:7} [M+H] ⁺
782.55	782.56	PC {34:1} [M+Na] ⁺
	782.57	PC {36:4} [M+H] ⁺
788.91	788.62	PC {36:1} [M+H] ⁺
806.52	806.56	PC {36:3} [M+Na] ⁺
	806.57	PC {38:6} [M+H] ⁺
810.57	810.59	PC {36:1} [M+Na] ⁺
	810.60	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 5. Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur positif à partir d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.

Consécutivement à cette première analyse, grâce à la vitesse de sublimation lente sous vide des LIMs et à leur compatibilité dans les deux modes d'ionisation, l'imagerie des lipides en mode réflecteur négatif a pu être effectuée, sur la même coupe de cerveau de rat. Pour cette seconde expérience, la résolution spatiale a été fixée à 200 µm. De nombreux lipides présentant une grande intensité ont été détectés. La **Figure 42** met en évidence la distribution complémentaire de deux ions mesurés à m/z 806.8 correspondant au sulfatide {36:1} et à m/z 857.8 correspondant au phosphoinositol {36:4}. En mode négatif, l'utilisation de la 2,5-DHB/3-AP a permis la détection d'un grand nombre de lipides, incluant les phospholipides tels que les phosphoinositols et les sphingolipides tels que les sulfatides et les gangliosides (**Tableau 6**). L'attribution des espèces a été réalisée sur la base de la mesure du m/z et par comparaison avec des banques constituées par différents équipes^{184, 185}.

Masse Expérimentale	Masse Théorique	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 6. Exemples de quelques lipides détectés en mode réflecteur négatif à partir de la même coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.

L'un des arguments importants pour l'utilisation des LIMs est l'homogénéité des dépôts. Un autre paramètre intéressant est le nombre de tirs laser accru, pour chaque position analysée, possible avec les préparations faisant intervenir les LIMs. Cette augmentation de durabilité est intéressante pour les analyses nécessitant un nombre important de répétition de tirs laser (*i.e.* imagerie MALDI) ou exigeant une reproductibilité des mesures obtenues entre deux spots ou entre deux irradiations laser (*i.e.* étude quantitative).

Comme expliqué précédemment, l'épaisseur du dépôt de LIM a une influence sur les résultats obtenus lors de l'analyse MALDI. En effet, il semblerait que lorsque l'épaisseur du dépôt est trop importante, l'intensité du signal diminue. En revanche, en dessous d'un volume critique de LIM, les signaux disparaissent totalement. C'est pourquoi, nous avons évalué la quantité optimale de LIM micro-déposée en chaque position à 7,5 nL. Après l'analyse MALDI d'une coupe de cerveau de rat, des images optiques des spots de matrice 2,5-DHB/ANI analysés ont été prises. L'irradiation laser des dépôts de 2,5-DHB/ANI a engendré une déplétion de matrice formant des cratères au niveau du fin film (**Figure 43a**). Or, cet aspect non homogène du dépôt de matrice, après quelques irradiations laser, peut conduire à une perte de reproductibilité et d'information, comme par exemple, lors d'expériences d'imagerie MALDI successives en mode positif puis négatif pour un même échantillon. Pour remédier à cela, il n'est cependant pas envisageable de déposer une quantité supérieure de matrice sur la coupe. Les travaux de R. Cramer ont montré l'intérêt d'ajouter de l'octyl β -D glucopyranoside (OGP) dans les solutions de matrice liquide afin de rétablir le film de matrice¹⁸⁶. Cependant, le volume d'OGP ajouté ne doit pas excéder 0,1% au risque d'obtenir une progressive altération de l'apparence de la goutte causée par une perturbation de sa tension de surface. Ainsi, 0,1% d'OGP a été additionné à la solution de matrice 2,5-DHB/ANI. L'analyse MALDI d'une coupe sériée de cerveau de rat avec le micro-dépôt de 2,5-DHB/ANI/OGP associée à l'acquisition d'images optiques ont permis de mettre en évidence, immédiatement après l'irradiation laser, une reformation de la surface du spot de matrice. De plus, une augmentation de l'intensité du signal a été observée lors de l'ajout du surfactant dans la solution de matrice (**Figure 43b**). L'OGP semble donc être une option intéressante pour atténuer les effets de l'irradiation sur le dépôt de matrice.

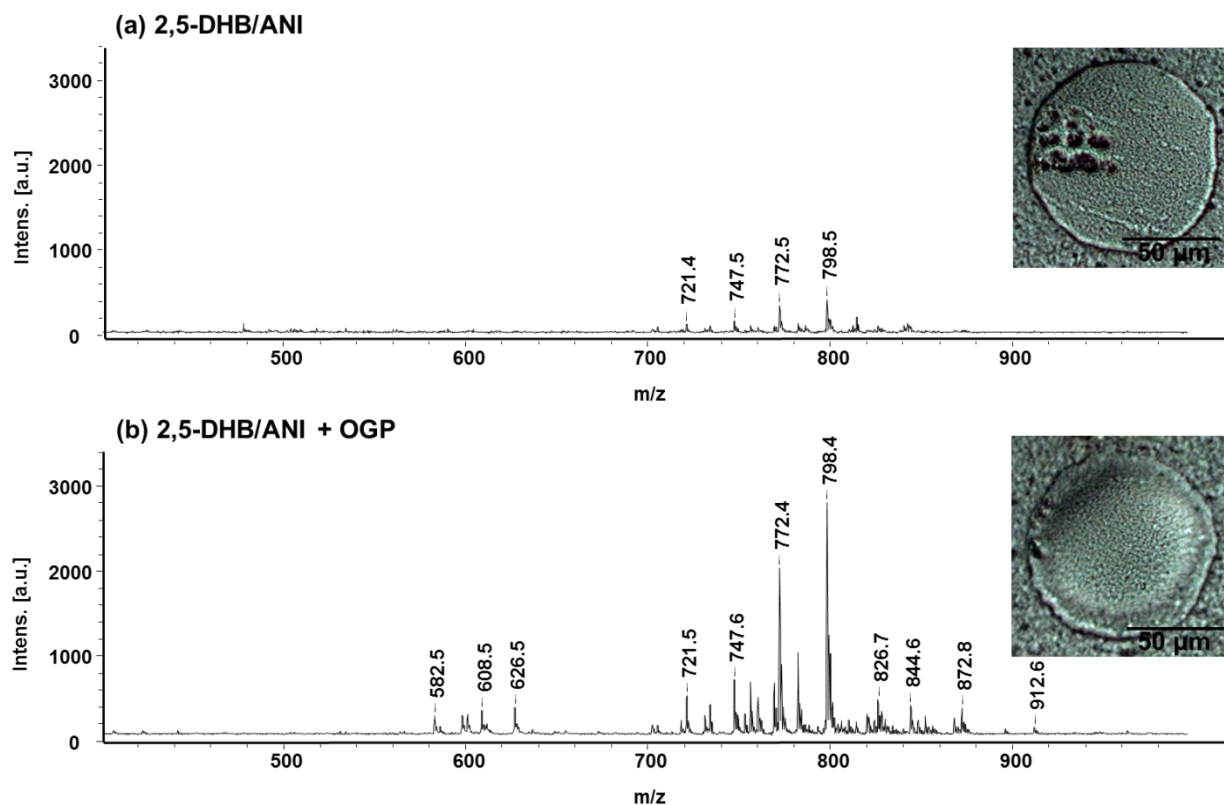


Figure 43. Comparaison des spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif après micro-dépôts des matrices (a) 2,5-DHB/ANI et (b) 2,5-DHB/ANI/OGP sur une coupe de cerveau de rat et images optiques obtenues après irradiation des spots.

Les LIMs se sont révélées être efficaces pour l'imagerie des lipides. Ces développements ont donc été appliqués à l'étude d'une pathologie : le cancer de l'ovaire. Pour cela, le micro-dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP a été réalisé sur des coupes de carcinome ovarien séreux. Des images moléculaires mettant en évidence la distribution de nombreux lipides au sein des coupes ont ainsi été obtenues (**Figure 44**).

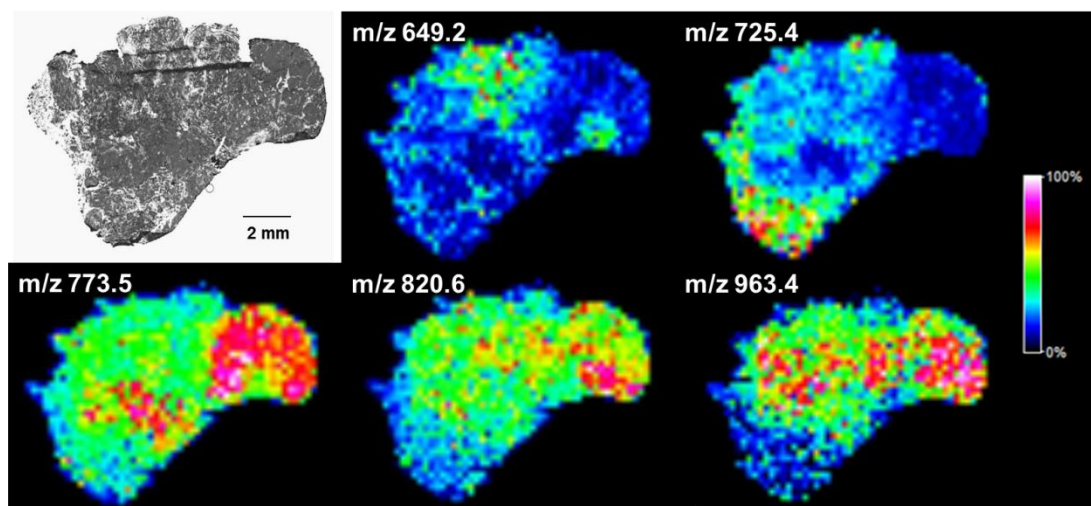


Figure 44. Images MALDI de lipides obtenues après micro-dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP sur une coupe de tissu de cancer ovarien.

Une analyse statistique des données enregistrées pour cette biopsie a été ensuite effectuée. La réalisation de l'analyse en composantes principales a permis de mettre de nombreux ions spécifiques de régions particulières au sein du tissu (**Figure 45a**). Cinq régions se sont alors dessinées et ont pu être validées par classification hiérarchique (**Figures 45b et c**). Les régions désignées lors de l'analyse statistique ont été confirmées par l'analyse histologique du tissu après réalisation d'une coloration hématoxyline éosine safran (HES) (**Figure 45d**).

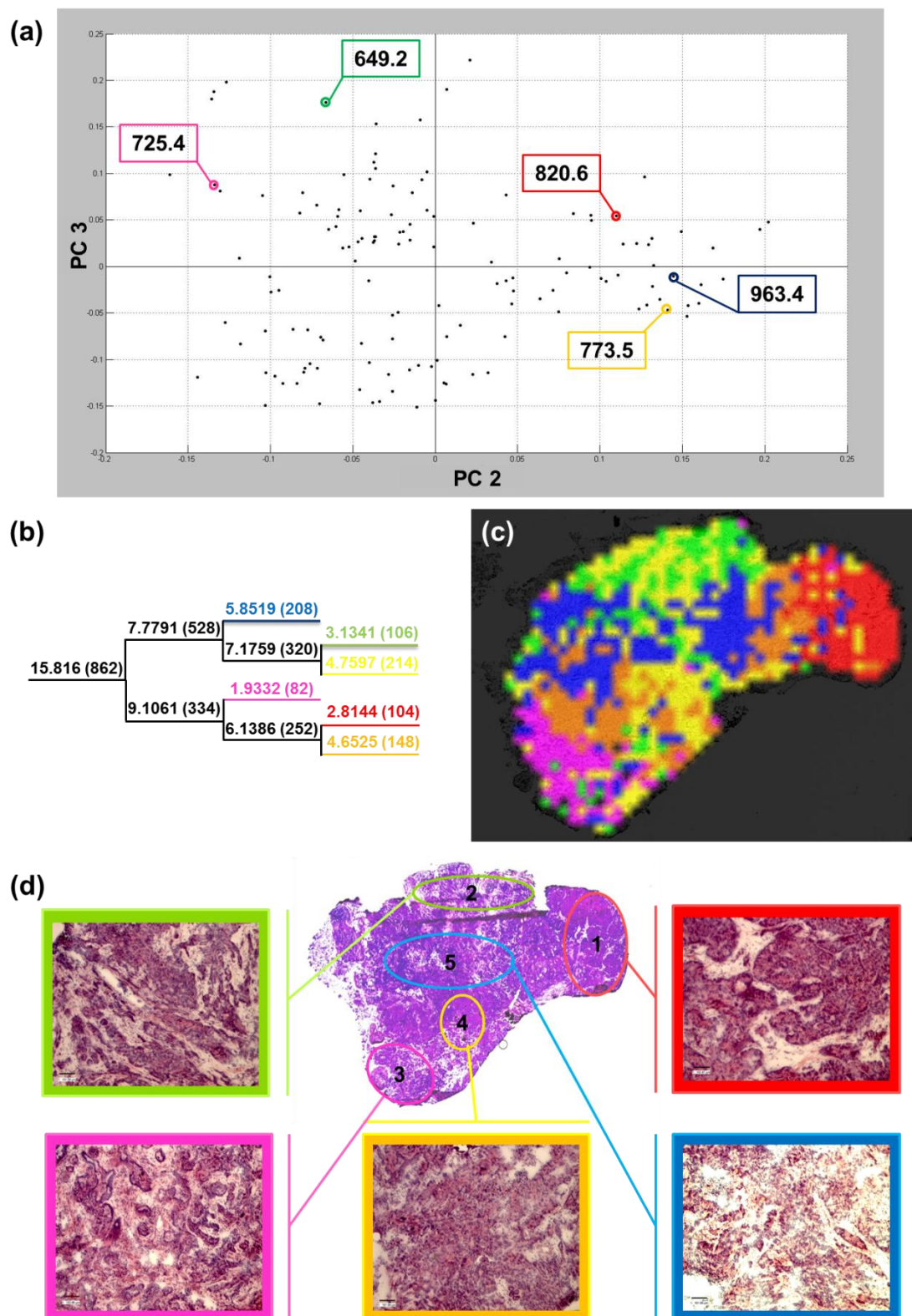


Figure 45. (a) Analyse PCA non supervisée obtenue à partir des spectres enregistrés sur une coupe d'ovaire présentant les ions différemment détectés sur la coupe. (b) Dendrogramme créé par classification des spectres en fonction de leur similarité. (c) Image reconstruite à partir des branches du dendrogramme. (d) Image optique de la coupe d'ovaire après coloration HES et images microscopiques des 5 zones d'intérêt.

Les lipides présentant des localisations différentes au sein des cinq régions ont été identifiés soit par interrogation des banques de données de lipides (**Tableau 7**) ou soit par MS/MS (**Figure 46**).

Masse Expérimentale	Masse Théorique	Intensité (a.u.) / Localisation (Zone)					Identification
		1	2	3	4	5	
478.21	478.33	1624.81	1764.71	634.97	567.59	1308.53	Lyso PC {16:0} [M+H] ⁺
503.94	504.35	624.69	370.15	135.94	5411.70	314.14	Lyso PC {18:0} [M+H] ⁺
547.10	547.47	286.98	306.43	34.73	241.17	503.65	DAG {32:2} [M+H] ⁺
601.91	601.52	114.93	4302.32	6.63	3074.59	81.80	DAG {36:3} [M+H] ⁺
725.45	725.55	309.71	752.47	1086.71	184.25	302.24	SM {34:1} [M+Na] ⁺
741.29	741.48	651.21	683.40	1911.24	302.26	1086.09	PC-N(CH ₃) ₃ {34:0} [M+K] ⁺
753.48	753.59	190.12	1829.30	862.24	332.86	117.82	SM {36:1} [M+Na] ⁺
756.21	756.55	316.74	865.07	775.95	128.22	109.00	PC {32:0} [M+Na] ⁺ PC {34:3} [M+H] ⁺
760.41	760.59	616.71	401.73	1182.04	109.64	519.85	PC {34:1} [M+H] ⁺
770.49	770.55	1805.67	368.86	196.26	542.34	537.10	PE {36:0} [M+K] ⁺ PC {32:1} [M+K] ⁺
772.45	772.53	2120.69	521.56	2.04	525.39	218.36	PC {32:0} [M+K] ⁺
	772.58						PE {38:2} [M+H] ⁺
782.39	782.57	471.97	1224.62	2393.69	653.40	187.22	PC {34:1} [M+Na] ⁺ PC {36:4} [M+H] ⁺
798.43	798.54	5726.17	2038.51	6095.18	2546.82	1576.19	PC {34:1} [M+K] ⁺
804.52	804.55	1061.82	2505.84	99.63	581.54	382.05	PC {36:4} [M+Na] ⁺
806.29	806.57	192.71	410.67	3013.51	977.85	420.36	PC {36:3} [M+Na] ⁺ PC {38:6} [M+H] ⁺
812.50	812.61	455.89	874.51	50.02	210.04	344.32	PC {36:0} [M+Na] ⁺
	812.62						PC {38:3} [M+H] ⁺
820.53	820.53	2489.33	945.04	46.23	815.86	1469.63	PC {36:4} [M+K] ⁺
824.35	824.56	1122.36	298.02	508.80	2041.23	898.51	PC {36:2} [M+K] ⁺
826.41	826.57	1265.44	703.86	149.32	1239.32	255.45	PC {36:1} [M+K] ⁺
828.47	828.50	2353.69	1791.05	255.37	855.16	483.16	PC {38:6} [M+Na] ⁺
832.33	832.58	529.64	449.88	1558.59	29.14	583.96	PC {38:4} [M+Na] ⁺
844.51	844.50	2898.81	284.04	29.20	442.11	1326.31	ST {36:2} [M+K] ⁺ PC {38:6} [M+K] ⁺

Tableau 7. Exemples de lipides détectés dans les cinq régions mises en évidence sur la coupe de tissu cancéreux ovarien après dépôt de matrice 2,5-DHB/3-AP.

L'ion m/z 725.4 spécifiquement détecté dans une des zones du tissu cancéreux et correspondant à une sphingomyéline {34:1} cationisée par le sodium a été récemment retrouvé dans un tissu cancéreux du colon ¹⁴².

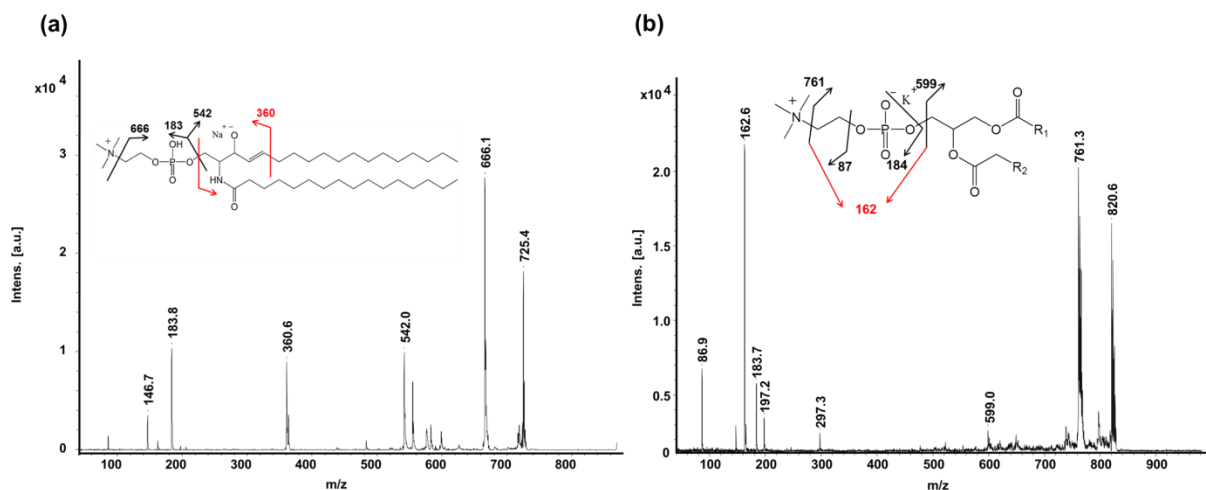


Figure 46. (a) Spectres de masse MS/MS de deux lipides mesurés à (a) m/z 725.4 et (b) m/z 820.6 correspondant respectivement à la sphingomyéline {34:1} $[M+Na]^+$ et à la phosphatidylcholine {36:4} $[M+K]^+$.

La présence d'un tel lipide au sein du tissu cancéreux est cohérente. En effet, dans le cancer séreux, l'accumulation de liquide d'ascite est liée à la production de cytokines telles que TNF- α , IL-1 α/β ou IL-6 qui peuvent à leur tour stimuler la production de certains lipides comme les phosphatidylcholines et les sphingomyélines. L'application des développements sur les LIMs à l'étude d'une pathologie telle que le cancer de l'ovaire a permis de confirmer leur intérêt pour la recherche de biomarqueurs lipidiques.

Les matrices classiquement utilisées pour l'analyse des lipides en spectrométrie de masse MALDI, telles que la 2,5-DHB, présentent une cristallisation assez hétérogène malgré leur micro-dépôt sur les coupes de tissu. Une explication probable à la formation des cristaux en périphérie des dépôts pourrait être la tension de surface existant entre le tissu et la solution de matrice. Cependant, le traitement des coupes à l'aide de différents solvants permettant d'améliorer la cristallisation n'est pas envisageable puisqu'il peut causer la délocalisation ou la perte des lipides. L'utilisation des LIMs après micro-dépôts est donc une bonne alternative pour l'analyse des lipides sur coupe. Les spectres obtenus en mode positif et négatif présentent de nombreux pics avec une bonne intensité et une bonne résolution spectrale. La faible présence de pics dans les basses masses s'explique par la synthèse des LIMs à partir de

matrices cristallines telles que la 2,5-DHB. Cette caractéristique rend les LIMs compatibles avec l'étude de petites molécules incluant les médicaments et leurs métabolites.

2.1.2. Les LIMs et l'analyse des médicaments et de leurs métabolites

La mise au point d'un nouveau médicament, au cours des études précliniques, passe par la compréhension de sa distribution, sa métabolisation et son élimination au sein de l'organisme. Pour cela, l'autoradiographie est une technique régulièrement employée. Cependant, dans ce domaine, l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI se révèle être une méthode de choix. En effet, elle permet d'étudier, en une seule analyse et sans marquage préalable, des molécules endogènes et exogènes à partir de coupes d'organes ou d'animaux entiers. Ainsi, la biodistribution et la pharmacocinétique d'un médicament et de ses métabolites peuvent être réalisées simultanément grâce à la détection de ces composés en imagerie MALDI pour différents temps donnés suite à l'administration du principe actif.

Les médicaments sont des biomolécules facilement détectables en imagerie. Pour cette raison, de nombreuses procédures ont été développées pour le dépôt homogène de matrice telles que la nébulisation¹⁸⁷, l'application sans solvant¹⁵³ et la sublimation. Cependant, ces modes d'application sont parfois incompatibles avec certains petits composés, d'un point de vue de l'extraction ou de la délocalisation. Le micro-dépôt semble donc être une bonne alternative pour le dépôt de la matrice, en alliant pouvoir d'extraction et dépôts localisés. D'autre part, les matrices les plus couramment utilisées pour l'analyse des médicaments par imagerie MALDI sont la 2,5-DHB⁷⁸ et l'HCCA¹⁵⁵. Comme développé dans le paragraphe précédent, la cristallisation de la 2,5-DHB est hétérogène, même avec l'application par micro-dépôts. Des travaux ont mis en évidence une réelle difficulté à micro-déposer la matrice HCCA⁹². De plus, les dépôts peu homogènes de l'HCCA entraînent une perte de qualité des images MALDI. Une solution alternative a donc été trouvée en utilisant aux LIMs.

Les tissus sélectionnés pour cette étude sont des reins prélevés chez le rat immédiatement, 2 heures et 6 heures après l'administration d'olanzapine, un médicament de la classe des thiénobenzodiazépines, indiqué dans le traitement de la schizophrénie. Le choix de cet organe s'explique par son implication dans le processus d'élimination du principe actif et de ses métabolites. En effet, la plupart des médicaments, sous leur forme inchangée ou sous forme de produit de dégradation, sont filtrés par le glomérule au niveau du rein avant d'être éliminés (**Figure 47**).

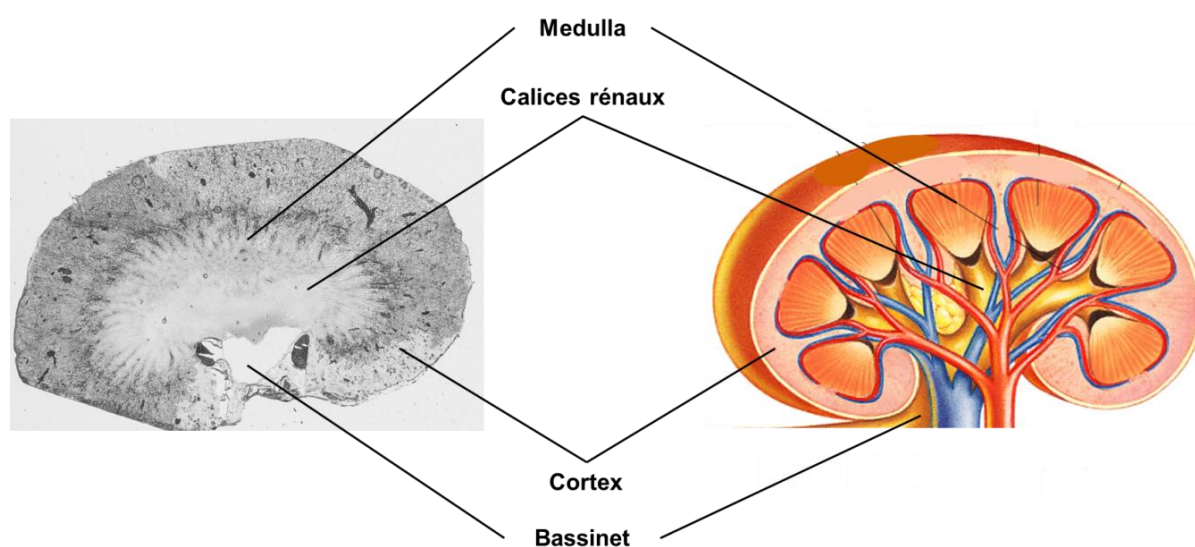


Figure 47. Image optique et représentation schématique annotée du rein.

Dans un premier temps, la matrice 2,5-DHB/ANI, testée précédemment pour l'étude des lipides, a été appliquée sur des coupes de reins de rat prélevés 2 heures après l'injection de l'olanzapine ($t=2h$). En effet, les études par autoradiographie ont révélé la présence de l'olanzapine ou de ses dérivés dans tous les tissus du rat 2 heures après l'administration¹⁸⁸. Cependant, la distinction entre le médicament et ses métabolites n'a pas pu être réalisée. Le spectre moyen obtenu pour cette image présente de nombreux lipides. Cette analyse MALDI a également permis de voir la distribution de l'olanzapine (m/z 313.1). Cependant l'ion correspondant au métabolite 2-hydroxyméthyl olanzapine (m/z 329.1) n'est pas détecté et la sélection du pic m/z 299.1 correspondant à la masse du métabolite N-desméthyl olanzapine met en évidence la présence d'un signal au niveau des calices rénaux et de la medulla mais également en dehors de la coupe de tissu rénal (**Figure 48**).

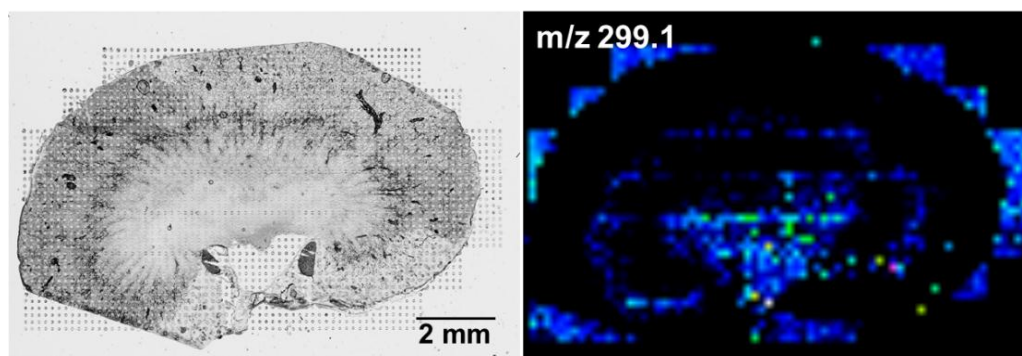


Figure 48. Image optique d'une coupe de rein de rat $t=2h$ après dépôt de matrice 2,5-DHB/ANI et image moléculaire de l'ion mesuré à m/z 299.1.

Le signal artefactuel détecté en dehors de la coupe correspond à un pic de matrice présent dans les bas m/z . Avec le pouvoir résolutif offert par l'appareil, il n'est pas possible de distinguer le pic lié au métabolite de celui de la matrice. La première alternative consiste à réaliser une analyse du métabolite sur la coupe en mode MS/MS et d'effectuer ensuite la reconstruction de l'image sur la base des ions fragments¹⁸⁹. Néanmoins, dans ce cas, le temps d'analyse est considérablement augmenté. L'autre stratégie réside dans l'utilisation d'une autre LIM ne présentant pas de pics sur la gamme de masse d'intérêt. Pour la synthèse de cette nouvelle LIM, la matrice cristalline HCCA a été choisie. Différentes bases organiques ont été testées, parmi elles la triéthylamine (TEA), la N,N-diéthylaniline (DEANI), la 1,1,3,3-tetraméthylguanidine (TMG) et la benzylamine (Benz) ont permis d'obtenir des matrices amorphes. Une évaluation de ces différents couples acide/base pour la détection de l'olanzapine en solution (**Figure 49**) et sur des coupes de reins de rat $t=2h$ a été entreprise.

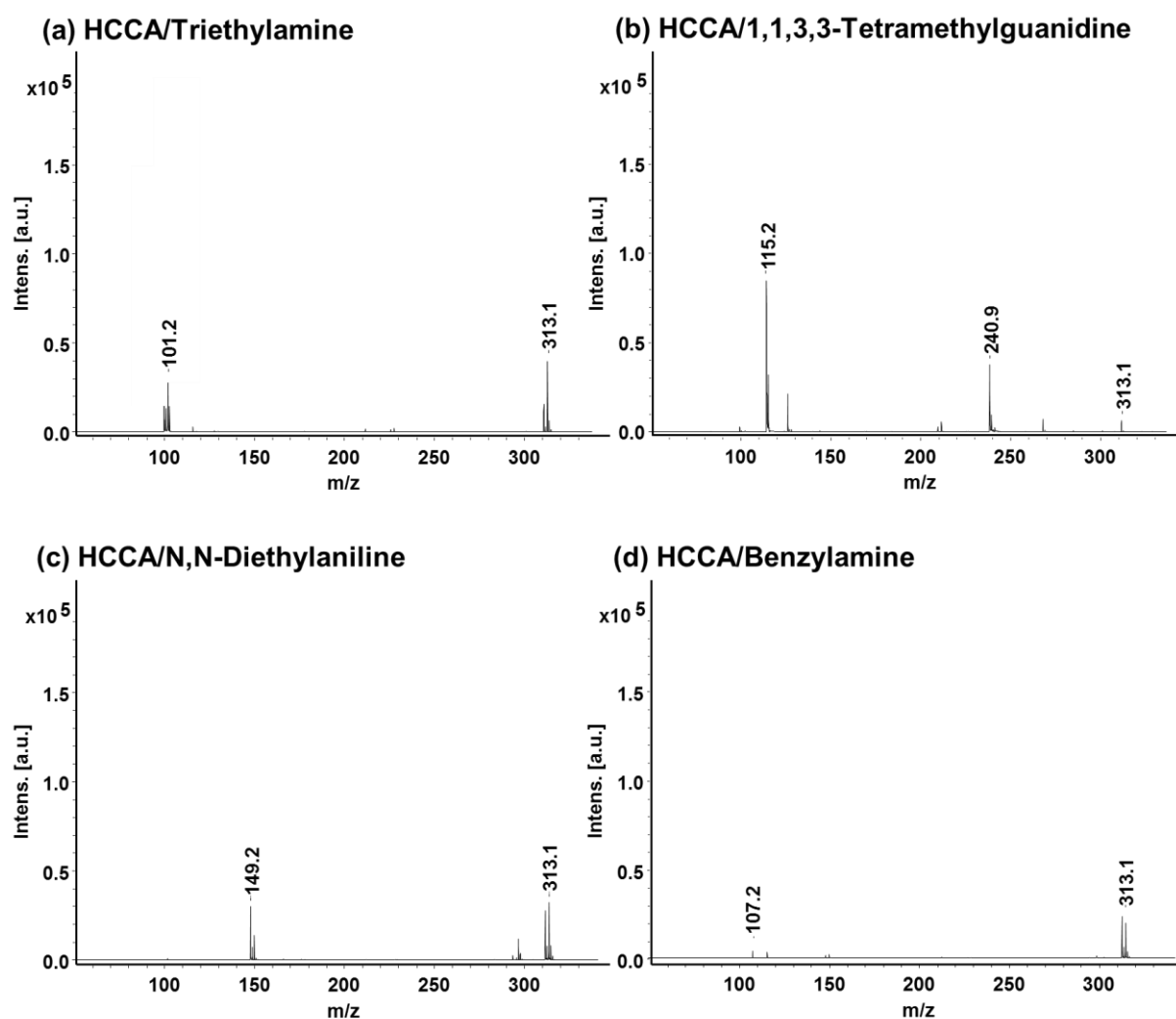


Figure 49. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif pour la détection de l'olanzapine (0,1mg/ml) avec les matrices (a) HCCA/TEA, (b) HCCA/TMG, (c) HCCA/DEANI et (d) HCCA/Benz.

La matrice HCCA/TEA, contrairement à la matrice HCCA/TMG, présente peu de pics liés à la matrice sur la gamme de masse m/z 100-300 (**Figures 49a et b**). De plus, l'HCCA/TEA semble permettre une meilleure détection de l'olanzapine en solution (**Figure 49**). Ces quatre LIMs basées sur l'HCCA ont été micro-déposées sur une coupe de rein de rat $t=2h$. A nouveau, l'HCCA/TEA s'est révélée être la meilleure matrice pour la détection de l'olanzapine et de ses métabolites. Par la même occasion, de nombreux lipides ont pu être mis en évidence. L'étude pharmacocinétique de l'olanzapine a donc été réalisée par imagerie MALDI après le dépôt de la matrice HCCA/TEA sur des coupes de reins de rat (**Figure 50**).

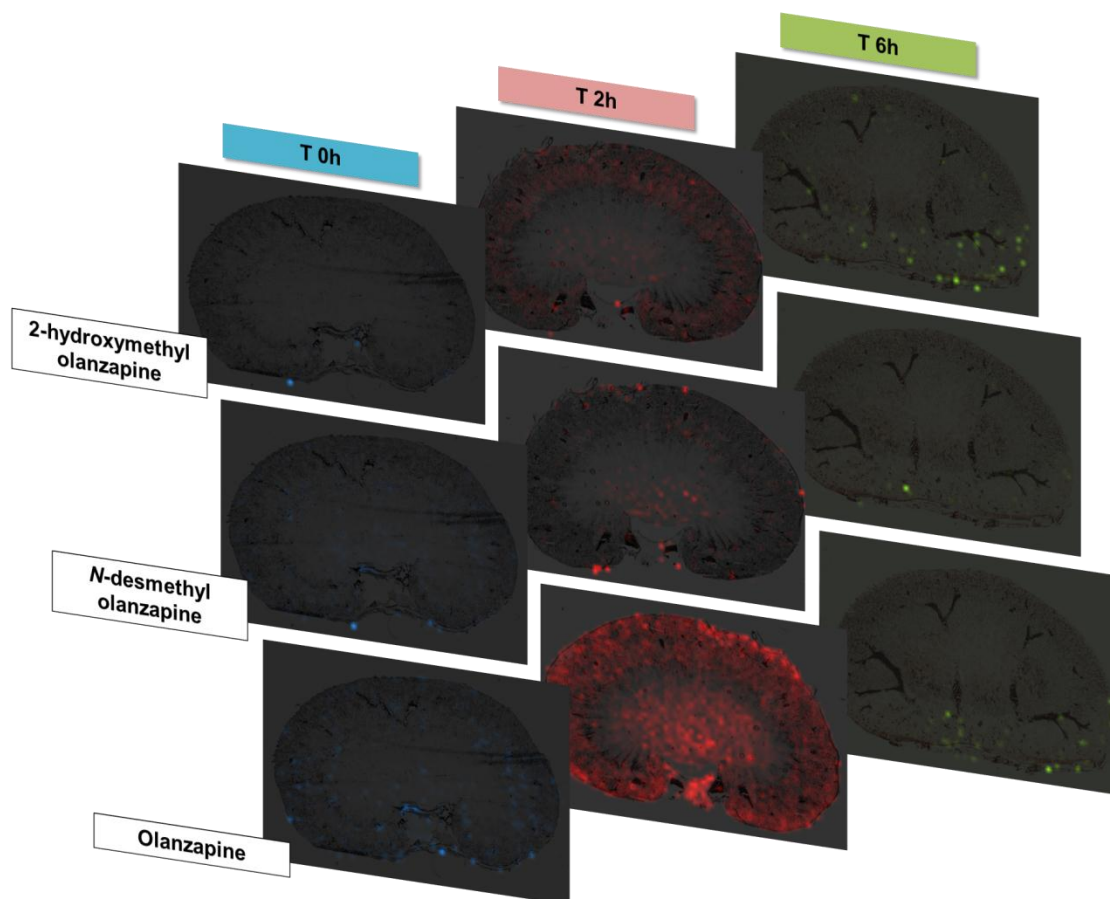


Figure 50. Distribution de l'olanzapine et de ses métabolites dans le rein de rat immédiatement, 2 heures et 6 heures après administration.

Les images MALDI reconstruites à partir de la coupe de rein prélevé immédiatement après l'injection, ne présentent pas de signal pour les masses correspondant au médicament et à ses métabolites. Deux heures après l'administration, l'olanzapine a pu être mise en évidence au niveau du cortex et des calices rénaux. Les métabolites N-desmethyl olanzapine et 2-hydroxymethyl olanzapine sont également retrouvés dans le rein avec des répartitions différentes. Alors que la 2-hydroxymethyl olanzapine a la même répartition que l'olanzapine, la N-desmethyl olanzapine est détectée dans la medulla et les calices rénaux. Ces résultats sont cohérents avec les observations de l'équipe de R. Caprioli ⁷⁸ puisqu'à $t=2h$, ces derniers ont constaté la présence de l'olanzapine et des métabolites dans le foie, le rein et la vessie indiquant un début de métabolisation et d'élimination du médicament. Six heures après l'injection de l'olanzapine, une diminution significative du signal est constatée pour le médicament et ses métabolites. On peut également noter que la 2-hydroxymethyl olanzapine est le métabolite le plus abondant. Ceci peut s'expliquer par le nombre plus important

d'enzymes CYP2D (cytochrome P450) chez le rat qui produit la 2-hydroxyméthyl olanzapine à partir de l'olanzapine¹⁹⁰.

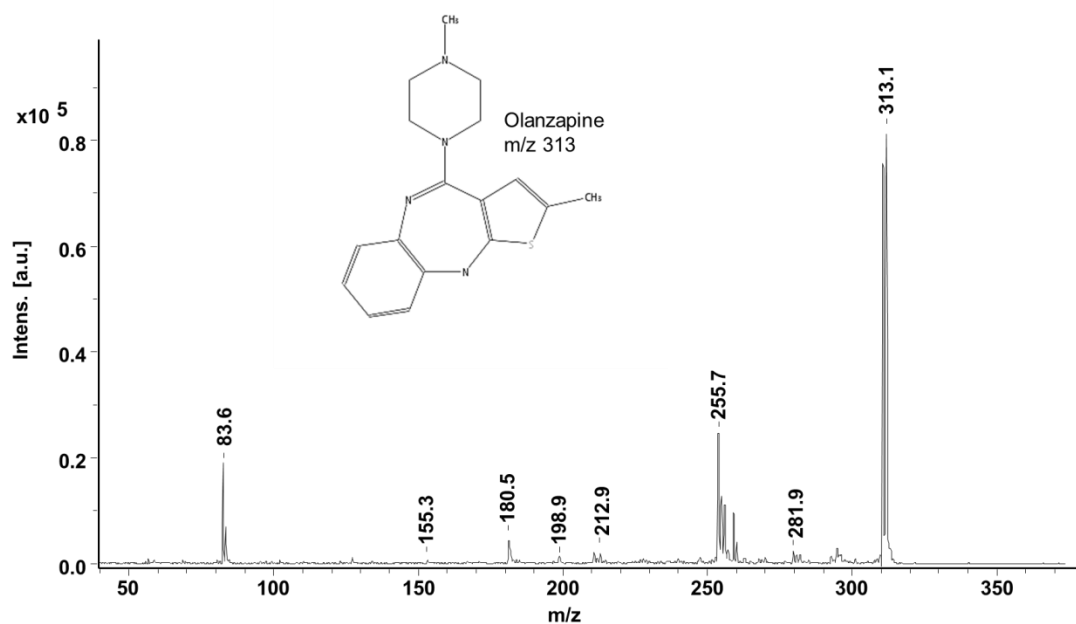


Figure 51. Spectres de masse MS/MS de l'olanzapine mesurée à m/z 313.1.

L'attribution de l'ion mesuré à m/z 313.1 à l'olanzapine a été confirmée par analyse MS/MS directement sur la coupe de rein de rat t=2h avec la matrice HCCA/TEA (**Figure 51**).

Une étude complémentaire a été entreprise afin de confirmer ces résultats. Pour cela, une micro-extraction liquide localisée a été réalisée à partir de coupes des reins de rat prélevés à différents temps (**Figure 52**). L'analyse de ces extraits a ensuite été possible grâce au couplage avec un spectromètre de masse ESI-Trap. Le mode SRM suivant la transition m/z 313 → m/z 256 a été choisi. Un mélange AcN/acide formique 0,1% (8/2, v:v) a été utilisé pour réaliser la micro-extraction. En effet, celui-ci permet, à la fois, une bonne extraction des composés à partir des tissus et une bonne efficacité d'ionisation dans la source ESI. Les solvants à base d'alcool (i.e. EtOH et MeOH) n'ont pas été retenus car ils favorisent l'extraction des lipides. Or, les lipides pourraient entraîner une suppression d'ions pour l'olanzapine et ses métabolites puisqu'aucune technique de séparation de l'extrait par chromatographie liquide n'a été employée préalablement à l'injection dans la source ESI.

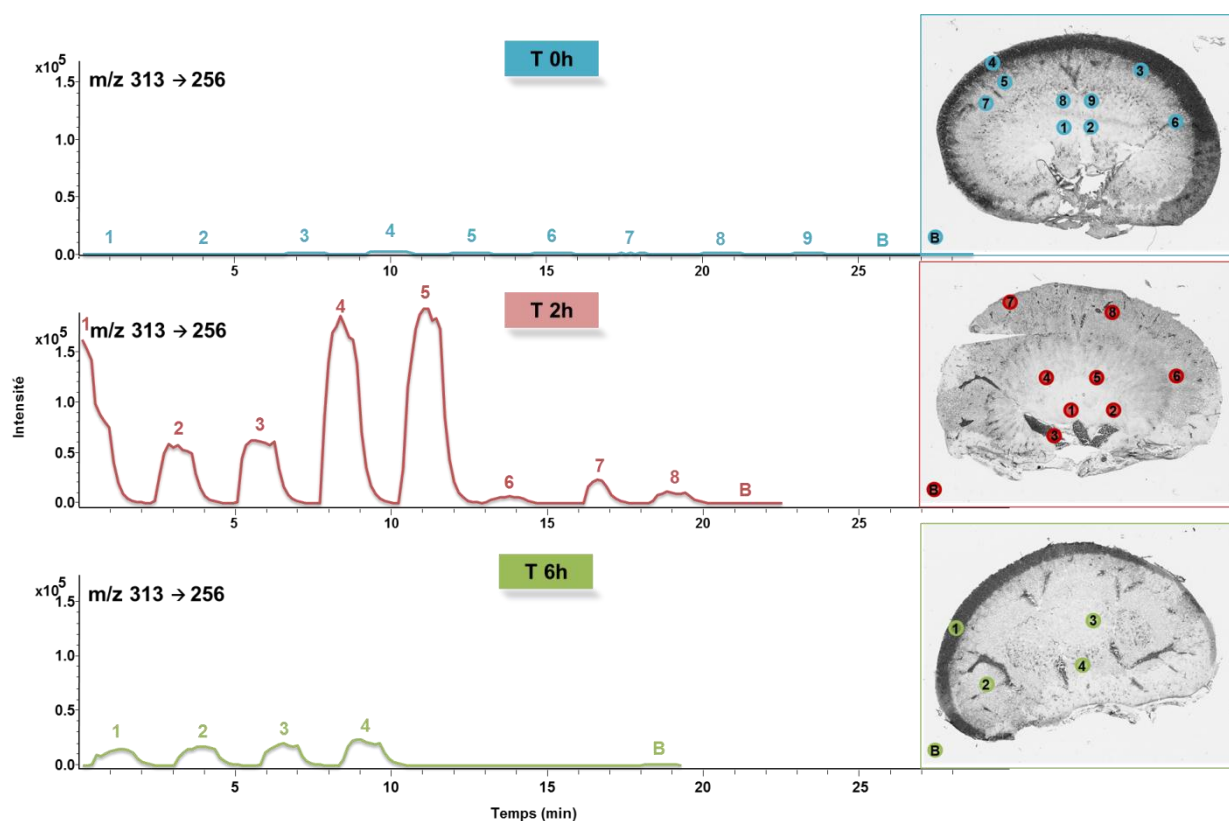


Figure 52. Evolution de l'intensité de l'olanzapine (m/z 313) obtenue pour différentes régions des coupes de différents reins de rat ($t=0h$, $t=2h$ et $t=6h$). Extraction de l'olanzapine par micro-jonction liquide et analyse en mode SRM ($313 \rightarrow 256$) par ESI-MS.

Les micro-extractions réalisées sur la coupe de rein de rat $t=0h$ n'ont pas permis de détecter l'olanzapine quelques soient les structures. En revanche, à $t=2h$, les micro-extractions ont révélé de fortes intensités d'olanzapine au niveau du cortex et à une moindre échelle dans les calices rénaux. Ces données sont en corrélation avec la distribution de l'olanzapine mise en évidence par imagerie MALDI. Enfin, pour les reins de rat $t=6h$, les intensités mesurées pour l'olanzapine sont plus faibles qu'à $t=2h$. Néanmoins, on remarque sa présence au niveau des calices rénaux ; voies par lesquelles les médicaments sont éliminés. La **Figure 53** résume, sous forme de représentation graphique, l'évolution de la distribution de l'olanzapine en fonction du temps dans les trois structures principales du rein de rat.

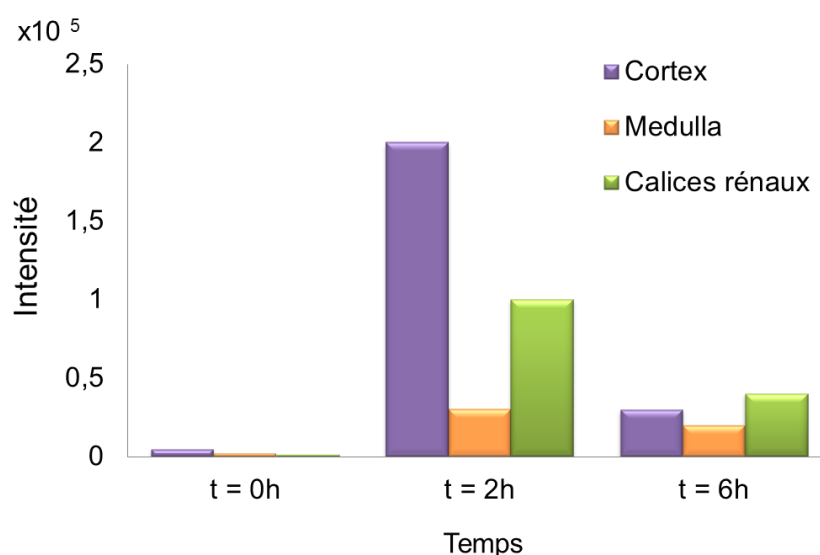


Figure 53. Représentation graphique de la distribution de l'olanzapine dans les structures du rein en fonction du temps.

Les études d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI ont été étendues à la détection des lipides dans les reins de rat prélevés à différents temps après administration de l'olanzapine. L'utilisation de cette technique permet ainsi d'avoir une connaissance plus approfondie sur les éventuels effets liés à l'administration d'un médicament sur les molécules endogènes.

L'analyse par imagerie MALDI a mis en évidence deux catégories de lipides. Certains lipides ne sont pas affectés par l'administration de l'olanzapine puisque leur distribution et leur intensité relative ne varie pas au cours des 2 heures après l'injection du médicament. Parmi eux, on retrouve des acides gras et des glycérophospholipides (**Figure 54**).

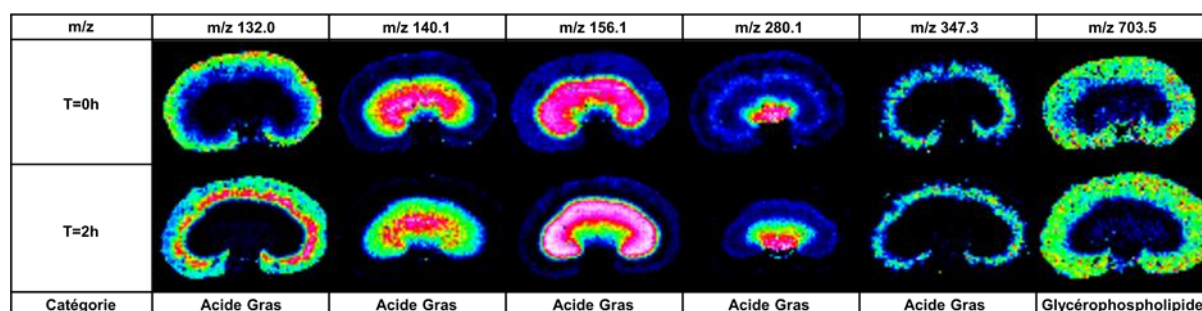


Figure 54. Exemples de lipides présentant la même répartition dans les reins de rat immédiatement et 2 heures après administration de l'olanzapine.

D'autres lipides présentent des répartitions et des intensités différentes (**Figure 55**). Par exemple, à $t=0h$, l'ion mesuré à m/z 162.0 est retrouvé au niveau de la région corticale et de la medulla avec une forte intensité alors que deux heures après l'administration du composé pharmaceutique, sa détection est limitée. Quant au lipide correspondant à l'ion m/z 204.1, celui-ci est mis en évidence spécifiquement au niveau du bassinnet à $t=0h$ et présente un signal de forte intensité au niveau de la médulla et des calices rénaux à $t=2h$. Il est donc probable que l'olanzapine et/ou ses métabolites entraînent des modifications au niveau de la distribution de certains lipides. Cette stratégie permet ainsi de révéler au niveau moléculaire la cause de l'efficacité ou des effets secondaires associés à l'administration d'un médicament.

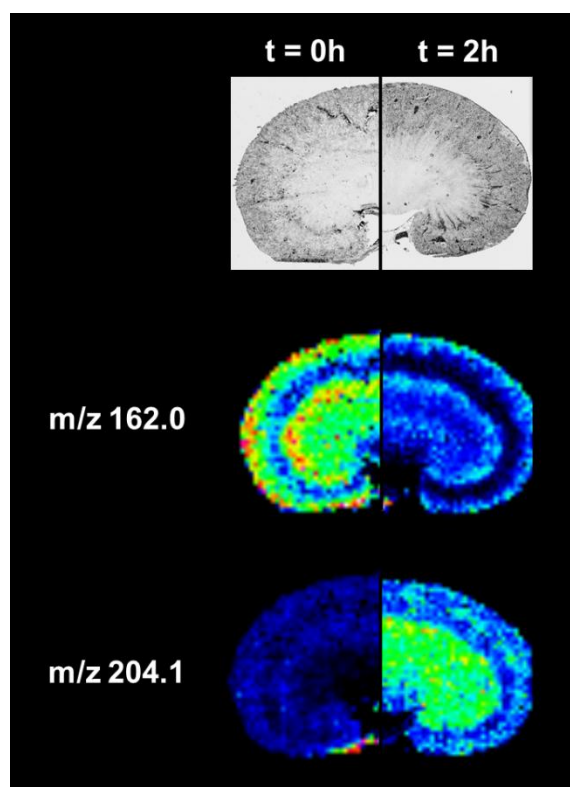


Figure 55. Exemples de lipides présentant des distributions différentes dans les reins de rat immédiatement et 2 heures après administration de l'olanzapine.

Les techniques de micro-dépôt combinées à l'utilisation des matrices ioniques liquides semblent être une bonne stratégie pour l'analyse des petites molécules telles que les lipides et les composés pharmaceutiques. Les exemples présentés ci-dessus ont permis de démontrer l'intérêt des LIMs pour mener des études pharmacologiques et cliniques. En effet, elles peuvent être employées pour la recherche de biomarqueurs d'une pathologie ou pour le suivi

d'un médicament après son administration. De plus, les LIMs permettent l'identification et/ou la validation de l'attribution de ces petites molécules par analyse en mode MS/MS directement sur coupe. Si cette procédure de préparation des tissus convient parfaitement pour la détection des biomolécules de bas poids moléculaire, celle-ci n'est cependant pas applicable à toutes les classes de biomolécules, pour lesquelles d'autres méthodologies doivent être mises au point.

2.2. Les matrices ioniques solides (SIM)

2.2.1. Les SIMs et l'analyse des peptides natifs

Les petites molécules et les peptides/protéines ont des processus de désorption et d'ionisation très distincts. Bien que cette différence ne soit pas clairement visible en analyse MALDI classique, elle est très nettement mise en évidence lors des expériences de profiling et d'imagerie des tissus. En effet, l'analyse MALDI directement sur les coupes de tissu est fortement conditionnée par la préparation de l'échantillon qui comprend le choix de la matrice, des solvants et de la méthode de dépôt. Il a été démontré que la bonne désorption/ionisation des peptides et des protéines est directement liée à leur incorporation dans le réseau cristallin formé par la matrice durant la phase de préparation. L'obtention de spectres et d'images de qualité pour les peptides et les protéines dépend donc de la quantité de solvant utilisée lors du dépôt de matrice. Les premières images MALDI ont été obtenues après un simple dépôt de matrice sur la coupe à la micropipette. Bien que la qualité spectrale obtenue soit bonne, le large volume de solvant ajouté avec la matrice cause une délocalisation des analytes au sein du tissu. Le micro-dépôt de la matrice sur les coupes de tissu a quant à lui l'avantage de permettre le contrôle de la diffusion des analytes à l'échelle des spots tout en conservant une bonne sensibilité pour les peptides et les protéines grâce au volume de solvant utilisé⁹².

Néanmoins, ces dernières années, l'imagerie MALDI a fait l'objet de nombreuses améliorations, notamment en termes de résolution spatiale des images reconstruites. L'imagerie à l'échelle cellulaire voire subcellulaire a été possible suite aux efforts apportés au niveau des systèmes de focalisation des lasers. Cependant, la haute résolution spatiale des images peut être obtenue uniquement si le dépôt de matrice n'engendre pas de délocalisation des biomolécules et si les cristaux de matrices formés sont plus petits que la résolution spatiale attendue. La nébulisation et l'application sans solvant sont des méthodes de dépôts de

matrice permettant d'obtenir une cristallisation fine et homogène. Toutefois, si la sublimation et le dépôt de matrice par électrospray sont adaptés à l'étude des petits composés ne nécessitant pas de réelle co-cristallisation, ces méthodes de préparation ne conviennent pas pour l'analyse des peptides et des protéines. Par ailleurs, la micro-nébulisation est un bon compromis entre résolution spatiale et sensibilité. En effet, aujourd'hui les systèmes automatisés de micro-nébulisation vibrationnelle permettent de déposer des gouttelettes de matrice d'environ 50 μm , qui dans les conditions optimales de dépôt atteignent une taille de 25 μm .

À ce jour, la 2,5-DHB (**Figure 56a**) et l'HCCA (**Figure 56d**) sont les matrices les plus couramment utilisées pour l'analyse directe des peptides par MALDI-TOF. C'est pourquoi, pour la réalisation d'images MALDI, ces matrices ont été choisies pour être micro-nébulisées sur des coupes de tissus par l'ImagePrep. En suivant les méthodes préinstallées sur l'appareil, le dépôt 2,5-DHB a conduit à la cristallisation en forme de longues aiguilles espacées les unes des autres de plus de 100 μm (**Figure 56b**). Cette cristallisation est un inconvénient pour les expériences d'imagerie car le faible recouvrement de la coupe par la matrice peut causer une perte de signal en particulier dans le cas des images haute résolution. En effet, la probabilité pour que le faisceau laser irradie une zone sans cristaux est augmentée lorsque le recouvrement de matrice sur la coupe de tissu est insuffisant. Les spectres de masse acquis sur une coupe de cerveau de rat présentent quelques pics de peptides et de nombreux pics dans la gamme de masse m/z 600-900 qui pourraient être attribués à des phospholipides. En effet, la matrice 2,5-DHB est décrite comme une matrice adaptée à la détection des lipides en mode positif et négatif.

Contrairement à la matrice 2,5-DHB, le dépôt d'HCCA par micro-nébulisation conduit au recouvrement homogène de la coupe de cerveau de rat par des cristaux de très petite taille (**Figure 56e**) ce qui représente un réel avantage pour la réalisation d'images MALDI de haute résolution. Pour les mêmes positions analysées sur la coupe de tissu, le spectre de masse enregistré, après le dépôt de l'HCCA, présente plus de pics correspondant à des peptides que celui obtenu avec la 2,5-DHB. Néanmoins, l'intensité de ces pics et leur rapport signal sur bruit sont faibles. De plus, les spectres de masse sont dominés par la présence de pics dans les bas m/z correspondant aux phospholipides.

Pour les deux matrices cristallines, la faible intensité voire l'absence de pics correspondant aux peptides peut être attribuée à l'effet de suppression d'ions en raison de la présence de nombreux phospholipides au sein de la coupe de tissu. Lemaire et coll.⁸³ ont

montré que l'utilisation de solvants organiques comme traitement chimique, en particulier le chloroforme, permettait de retirer les phospholipides abondants et d'augmenter l'intensité du signal dans la gamme de masse correspondant aux peptides. Des coupes de cerveau de rat ont donc été soumises à une étape de lavage au chloroforme avant l'application de la 2,5-DHB et l'HCCA par micro-électronébulisation. Le dépôt de la 2,5-DHB conduit à la formation de cristaux plus courts et plus dispersés que ceux obtenus sur les coupes non traitées (**Figure 56c**).

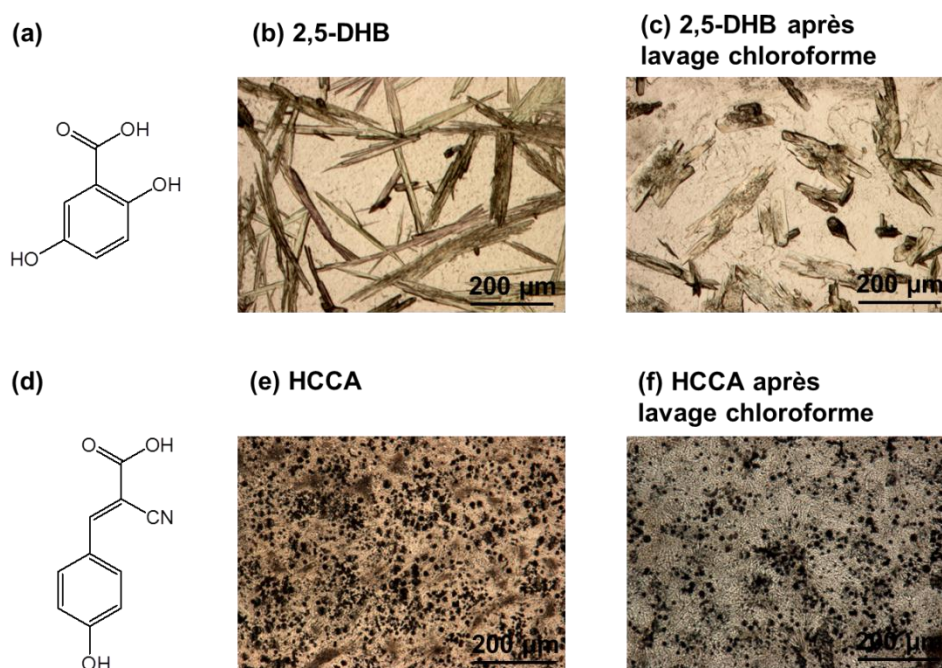


Figure 56. (a) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de la 2,5-DHB sur coupe de cerveau de rat (b) non traitée et (c) lavée au chloroforme. (d) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA sur coupe de cerveau de rat (e) non traitée et (f) lavée au chloroforme.

Concernant le spectre de masse acquis avec la 2,5-DHB, en mode linéaire positif, après 5000 accumulations réparties sur 10 positions distribuées entre le cervelet et la *medulla oblongata* (annotées par des points rouges) (**Figure 57a**) celui-ci présente quelques pics avec un faible rapport signal sur bruit pour la gamme de masse m/z 1000-20000 (**Figure 57b**). Il apparaît clairement que le traitement au chloroforme a une forte incidence sur la suppression d'ions en particulier pour la détection des peptides. Il faut également noter que le lavage au chloroforme entraîne un changement des propriétés de la surface du tissu (*e.g.* tension de surface), ce qui limite la dispersion de la solution de matrice à la surface et conduit à la

concentration des gouttelettes. Ainsi, les cristaux obtenus sont plus petits et plus épais en comparaison avec ceux observés sur les tissus non traités. Les faibles rapports signal sur bruit des peptides sont donc liés au recouvrement hétérogène et l'épaisseur des cristaux.

Les cristaux obtenus avec l'HCCA appliquée après le traitement de la coupe au chloroforme sont assez similaires à ceux observés à partir des tissus non traités (**Figure 56f**). Comme attendu, le spectre MALDI enregistré sur la coupe consécutive à celle recouverte par la matrice 2,5-DHB, et pour les mêmes positions analysées, présente de nombreux pics sur la gamme de masse m/z 1500-3000 et peu de pics sur la gamme de masse supérieure (**Figure 57c**). Néanmoins, en comparaison avec les coupes non traitées, une augmentation du nombre de pics est remarquée après le lavage au chloroforme mais le rapport signal sur bruit reste faible ce qui rend difficile son utilisation pour les expériences d'imagerie MALDI.

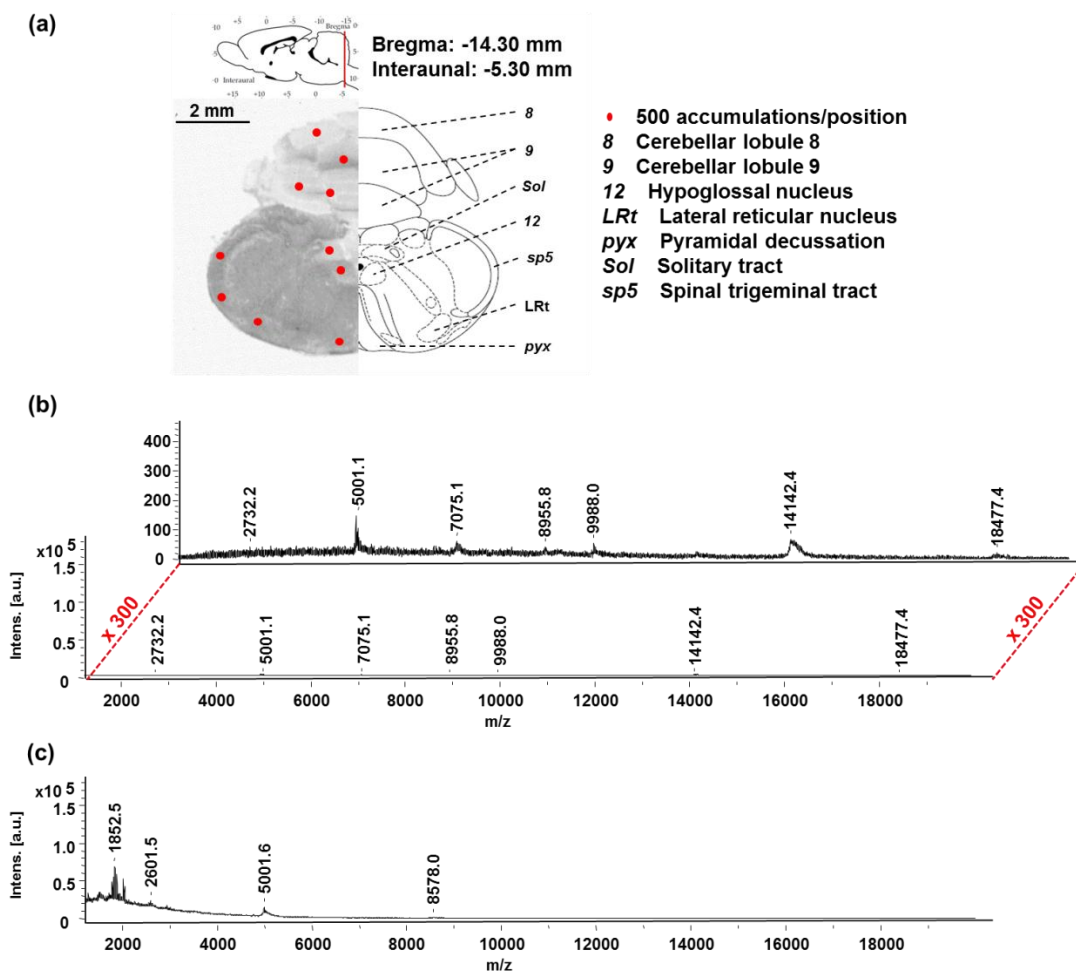


Figure 57. (a) Image optique et schéma annoté des différentes structures d'une coupe de cerveau de rat. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat traitées au chloroforme après micro-nébulisation de (b) 2,5-DHB et (c) HCCA.

En considérant le fait que l'intensité du signal est liée à la morphologie des cristaux, les spectres de masse obtenus pour les tissus traités au chloroforme ou non avec un dépôt d'HCCA devraient être assez similaires. Dans ce cas de figure, le nombre plus important de peptides détectés après le lavage au chloroforme ne s'explique pas par la morphologie des cristaux, mais plutôt par l'élimination des phospholipides. Par ailleurs, les faibles rapports signal sur bruit mesurés peuvent être attribués à la durée de cristallisation très courte de la matrice HCCA qui empêche l'extraction efficace des composés endogènes à partir des tissus tels que les peptides et les protéines.

En résumé, les matrices adaptées à la détection des peptides et des protéines en imagerie MALDI doivent apporter un recouvrement homogène des tissus avec de fins cristaux et une durée de cristallisation suffisamment longue pour permettre l'extraction de ces biomolécules. Lemaire et coll. ³⁹ ont montré que l'utilisation de matrices ioniques solides (SIM) est appropriée et efficace pour l'analyse des peptides et des protéines sur les coupes de tissus ⁹². Ainsi, plusieurs SIMs ont été synthétisées pour l'analyse des peptides en imagerie MALDI : l'HCCA/aniline, l'HCCA/ N,N-dimethylaniline et l'HCCA/3-acétylpyridine. Après électro-nébulisation, une comparaison des paramètres de ces SIMs avec ceux des matrices cristallines 2,5-DHB et HCCA a été entreprise, notamment en termes de dépôts, de cristallisation et de qualité du spectre.

Dans un premier temps, la mise au point d'une méthode pour la micro-nébulisation des SIMs a été élaborée en fonction de leurs propriétés. En effet, les SIMs possèdent la caractéristique d'avoir un temps de cristallisation plus long que celui des matrices « classiques ». Cette particularité nécessite donc des adaptations au niveau de la concentration des solutions de matrice, de la pulvérisation, du temps d'incubation et de séchage du dépôt de matrice. Concernant la préparation des SIMs, contrairement à la matrice HCCA, la concentration de la matrice a pu être augmentée à 10 mg/ml sans obstruer le générateur du nébulisat. Avec une concentration plus élevée, un recouvrement du tissu semblable à celui observé avec la matrice HCCA est obtenu après un nombre de pulvérisations moindre, ce qui permet de réduire le temps moyen de la méthode. Par exemple, la première phase de la méthode pour le dépôt des SIMs, dont le but est d'assurer le bon fonctionnement du capteur contrôlant l'épaisseur de matrice déposée sur la lame de verre, est raccourcie. Dans la phase 1, seules 5 pulvérisations d'une seconde sont nécessaires pour le dépôt des SIMs alors que ce paramètre est réglé à 5-20 pulvérisations de 2,50 secondes pour l'HCCA et à 8-30 pulvérisations de 1,50 secondes pour la 2,5-DHB. Le temps de la cristallisation a également

un impact direct sur l'efficacité d'extraction des composés dans les coupes de tissu, car plus le temps de cristallisation est long, plus la co-cristallisation entre les cristaux de la matrice et les analytes est efficace et meilleure est l'extraction des peptides. Puisque la co-cristallisation se produit durant chaque étape d'incubation ; pendant laquelle aucun séchage par un flux d'azote n'a lieu ; des cycles ont été ajoutés, en phase 2 de la méthode, afin de multiplier ces périodes d'extraction.

Des observations microscopiques de la cristallisation des matrices HCCA/ANI, HCCA/DANI et HCCA/3-AP sur des coupes de cerveau de rat traitées préalablement au chloroforme ont été effectuées. Une cristallisation fine et homogène a été alors mise en évidence pour toutes les SIMs (**Figure 58**). Cette caractéristique est un point crucial pour faire des SIMs des matrices adaptées à l'imagerie MALDI.

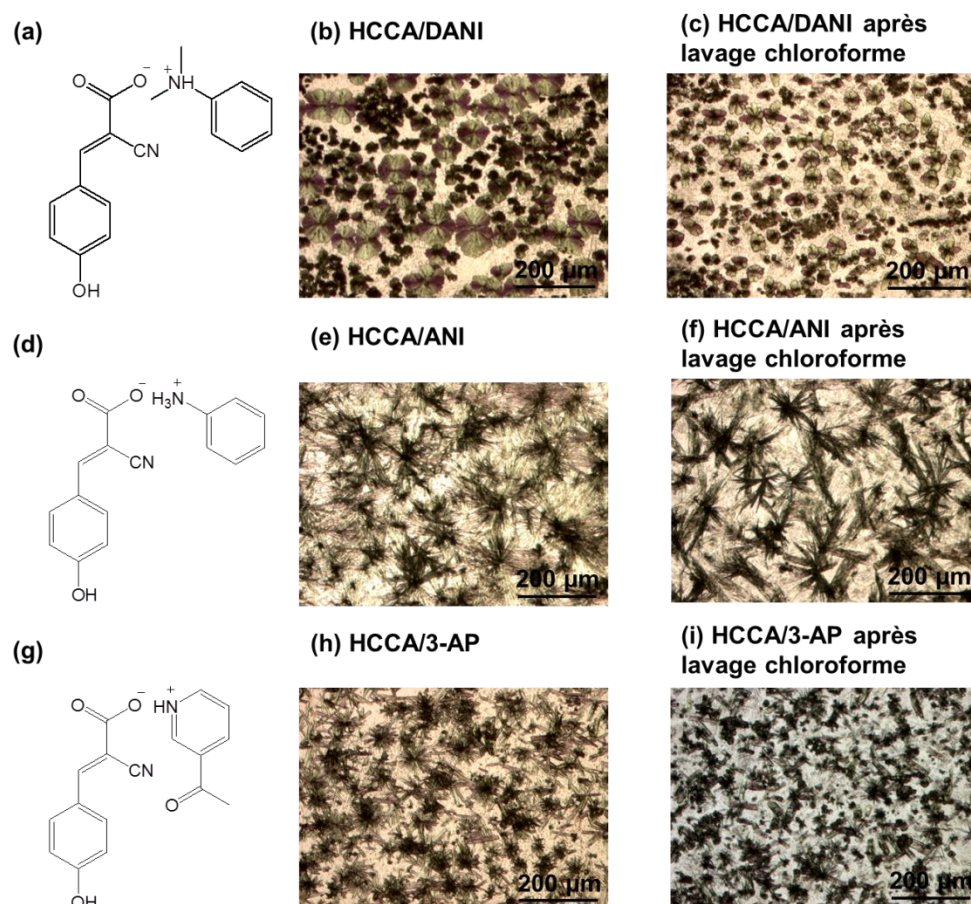


Figure 58. (a) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/DANI sur coupe de cerveau de rat (b) non traitée et (c) lavée au chloroforme. (d) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/ANI sur coupe de cerveau de rat (e) non traitée et (f) lavée au chloroforme. (g) Formule semi-développée et images optiques de la cristallisation de l'HCCA/3-AP sur coupe de cerveau de rat (h) non traitée et (i) lavée au chloroforme.

Les caractéristiques spectrales des SIMs ont été étudiées. Pour cela, une analyse MALDI directe a été réalisée sur des coupes sériées de cerveau de rat après le dépôt de la matrice HCCA/DANI (**Figure 59b**), HCCA/ANI (**Figure 59c**) ou HCCA/3-AP (**Figure 59d**). Comme précédemment, 500 accumulations ont été enregistrées en chacune des 10 mêmes positions (**Figure 59a**). Les spectres moyens ainsi obtenus ont été comparés avec les spectres obtenus avec la 2,5-DHB et l'HCCA. Pour la gamme allant de m/z 1500 à 5000, l'analyse des spectres révèle que les SIMs permettent la détection de pics n'apparaissant pas sur les spectres des matrices classiques, avec la même énergie laser. Par ailleurs, plusieurs ions ont été observés pour des m/z supérieurs à 5000, notamment avec l'HCCA/DANI et l'HCCA/3-AP. L'HCCA/3-AP permet même d'obtenir des signaux pour de plus hauts poids moléculaires (*i.e.* jusqu'à m/z 20 000). Pour l'HCCA/ANI, de nombreux peptides ont été détectés dans le bas m/z avec des intensités plus élevées qu'avec l'HCCA.

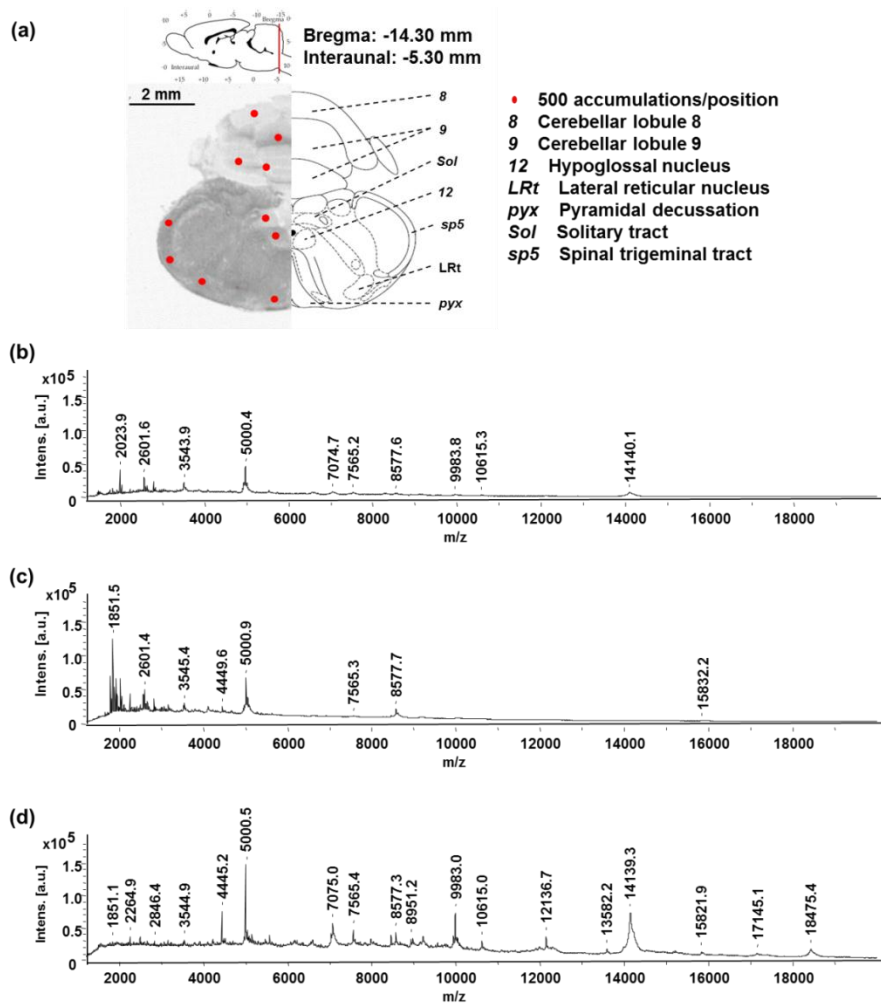
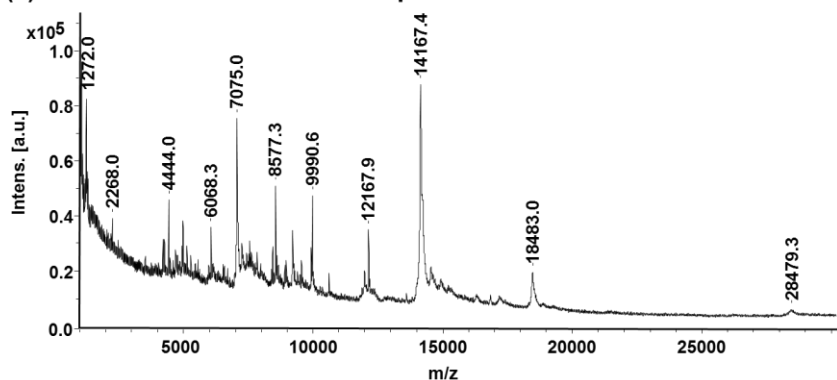


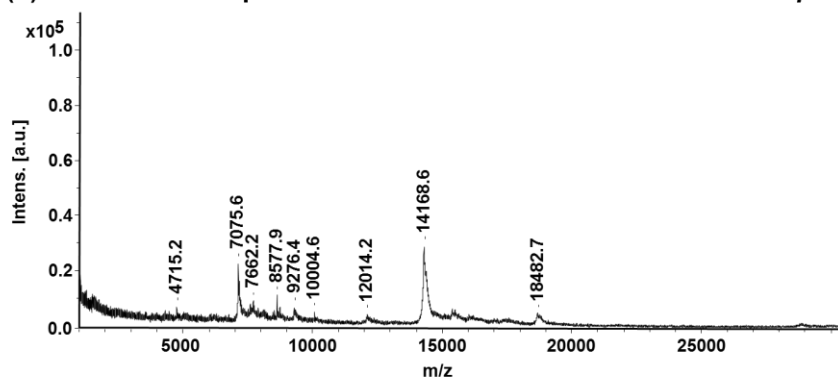
Figure 59. (a) Image optique et schéma annoté des différentes structures d'une coupe de cerveau de rat. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir de coupes de cerveau de rat traitées au chloroforme après micro-nébulisation de (b) HCCA/DANI, (c) HCCA/ANI et (d) HCCA/3-AP.

D'après les informations obtenues concernant la cristallisation, la gamme de masse couverte et l'intensité du signal des SIMs, l'HCCA/3-AP semble être une bonne matrice pour les expériences d'imagerie MALDI. Ainsi, une coupe de cerveau de rat préalablement lavée au chloroforme, a été couverte par micro-nébulisation de matrice HCCA/3-AP. Une analyse directe de la coupe a été effectuée immédiatement après l'introduction de l'échantillon dans la source MALDI. 3000 spectres ont été acquis en mode linéaire positif dans différentes régions de la coupe (**Figure 60a**). Le spectre résultant montre de nombreux pics avec une intensité élevée sur toute la gamme de masse étudiée. Une expérience d'imagerie MALDI a ensuite été entreprise sur cette même coupe. La qualité des images reconstruites pour les peptides sélectionnés n'était pas celle attendue aux vues du spectre enregistré quelques heures auparavant. L'acquisition d'un spectre sur cette même coupe après la séquence d'imagerie a permis de mettre en évidence une diminution considérable de l'intensité des ions détectés sur le premier spectre. Par ailleurs, la déplétion du signal des peptides analysés n'est pas spécifique à une région du cerveau. En effet, une dégradation du signal a été notée à la fois dans le *Corpus callosum* (**Figure 60b**) et dans la *Substantia nigra* (**Figure 60c**) après 5 heures sous le vide poussé de la source MALDI. Ce résultat suggère qu'une dégradation de la matrice HCCA/3-AP est survenue dans la source MALDI dans des conditions de vide poussé. Pour vérifier cette hypothèse, un spectre moyen a été enregistré avec les mêmes paramètres d'analyse, sur la même coupe de tissu, après 10 heures dans la source d'ions MALDI (**Figure 60d**).

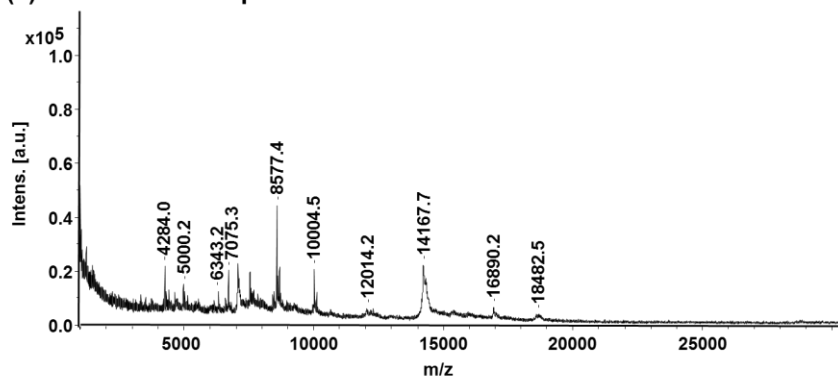
(a) HCCA/3-AP immédiatement après introduction dans la source MALDI



(b) HCCA/3-AP 5h après introduction dans la source MALDI – *Corpus callosum*



(c) HCCA/3-AP 5h après introduction dans la source MALDI - *Substantia nigra*



(d) HCCA/3-AP 10h après introduction dans la source MALDI

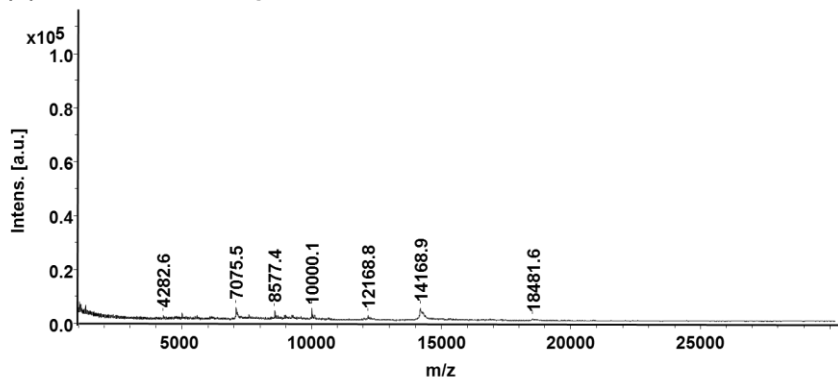


Figure 60. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif à partir d'une coupe de cerveau de rat traitée au chloroforme après micro-nébulisation de l'HCCA/3-AP (a) immédiatement, (b) dans la région du corps calleux 5 heures, (c) dans la région de la substance noire 5 heures et (d) 10 heures après introduction dans la source MALDI.

Compte tenu de sa dégradation rapide sous vide, l'utilisation de la matrice est HCCA/3-AP est appropriée à l'imagerie MALDI lorsque le temps passé dans la source MALDI est court. Ainsi, une préparation similaire a été réalisée sur une coupe adjacente de cerveau de rat afin d'effectuer deux images en mode linéaire sur la gamme de m/z 1500-20000 (**Figure 61a**). La résolution choisie pour lancer la première image sur la moitié droite de la coupe était de 250 μm (**Figures 61b, d, f, h, j, l, n et p**). Pour la seconde image, sur une région restreinte de la même moitié de la coupe de tissu (délimitée par les pointillés rouges), la résolution était de 100 μm (**Figures 61c, e, g, i, k, m, o et q**). L'imagerie MALDI des peptides est réalisable après le dépôt d'HCCA/3-AP, lorsque le temps d'analyse est réduit, c'est-à-dire pour un nombre limité de positions d'acquisition (*e.g.* avec une analyse à haute résolution spatiale sur une région localisée ou à plus faible résolution spatiale sur une grande surface) ou par utilisation d'un instrument équipé d'un laser possédant une fréquence de répétition élevée (*i.e.* 1 kHz ou plus ¹⁰⁴).

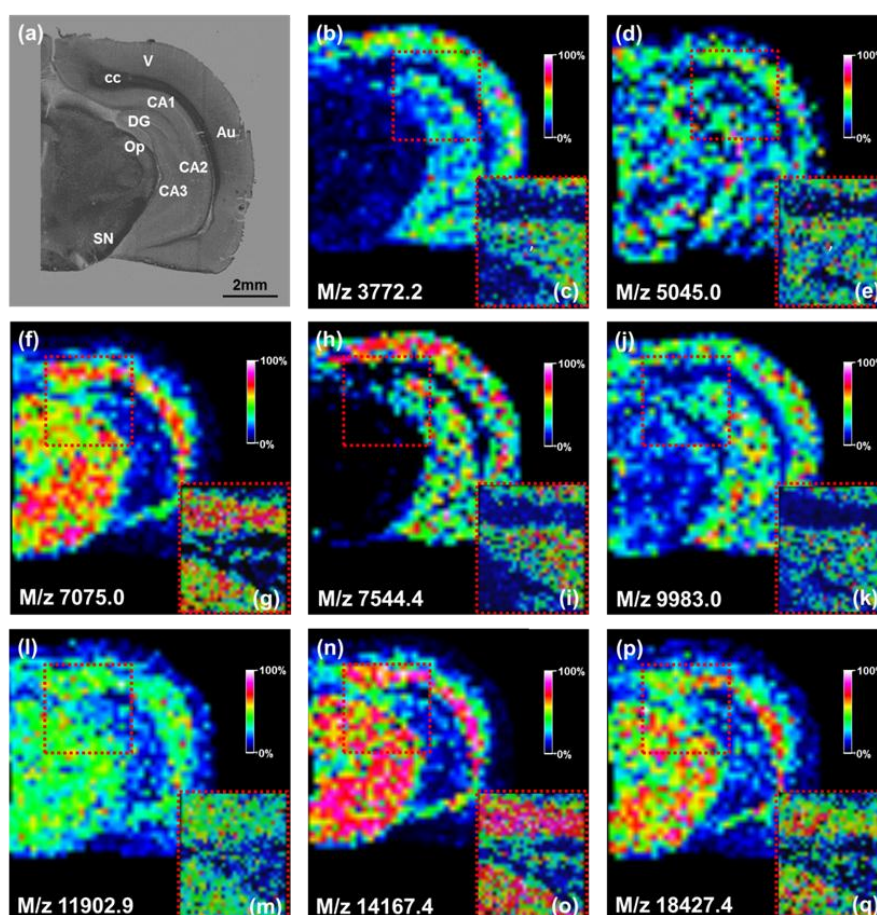


Figure 61. (a) Image optique avec annotation des structures et images moléculaires MALDI reconstruites (b, d, f, h, j, l, n et p) sur une moitié de coupe de cerveau de rat avec une résolution spatiale de 250 μm et (c, e, g, i, k, m, o et q) sur une région réduite avec une résolution spatiale de 100 μm . (Au Cortex auditif, CA1, 2 et 3 Champs ammoniens 1, 2 et 3, cc *Corpus callosum*, DG Gyrus denté, Op Couche de nerfs optiques, SN *Substantia nigra*, V Cortex visuel).

L'HCCA/ANI et l'HCCA/DANI ont donc été étudiées pour évaluer leurs performances en imagerie MALDI. Des coupes adjacentes de cerveau de rat ont été soumises à un lavage chloroforme préalablement au dépôt des SIMs par nébulisation. Les images obtenues en mode réflecteur positif ont été comparées (**Figure 62**) en termes de nombre de pics, d'intensité du signal et de rapport signal/bruit. Certains peptides (*e.g.* les ions mesurés à m/z 1851.5 et m/z 2028.3, ont été détectés à la fois avec la matrice HCCA et les SIMs. Néanmoins, avec une énergie du laser identique, l'intensité était toujours plus élevée avec les SIMs. Pour le peptide correspondant au m/z 1851.5, l'intensité a été augmentée jusqu'à 110 fois pour l'HCCA/DANI et 170 fois pour l'HCCA/ANI tandis que le rapport signal/bruit (S/N) était 25 fois plus élevé pour l'HCCA/DANI et 30 fois plus élevé pour l'HCCA/ANI. La distribution d'autres peptides a pu être mise en évidence uniquement avec les SIMs. Par exemple, seules les matrices HCCA/ANI et HCCA/DANI ont permis de révéler la présence de l'ion m/z 4982.2 dans la *Substantia nigra*. Pour la gamme de masse étudiée, la détection de pics supplémentaires a été possible après le dépôt de la matrice HCCA/ANI, tels que l'ion m/z 1839.2 au niveau de l'hippocampe et du cortex cérébral, l'ion m/z 1931.4 retrouvé dans le *Corpus callosum*, le pédoncule cérébral et le mésencéphale ou l'ion m/z 3464.8 localisé autour de l'hippocampe.

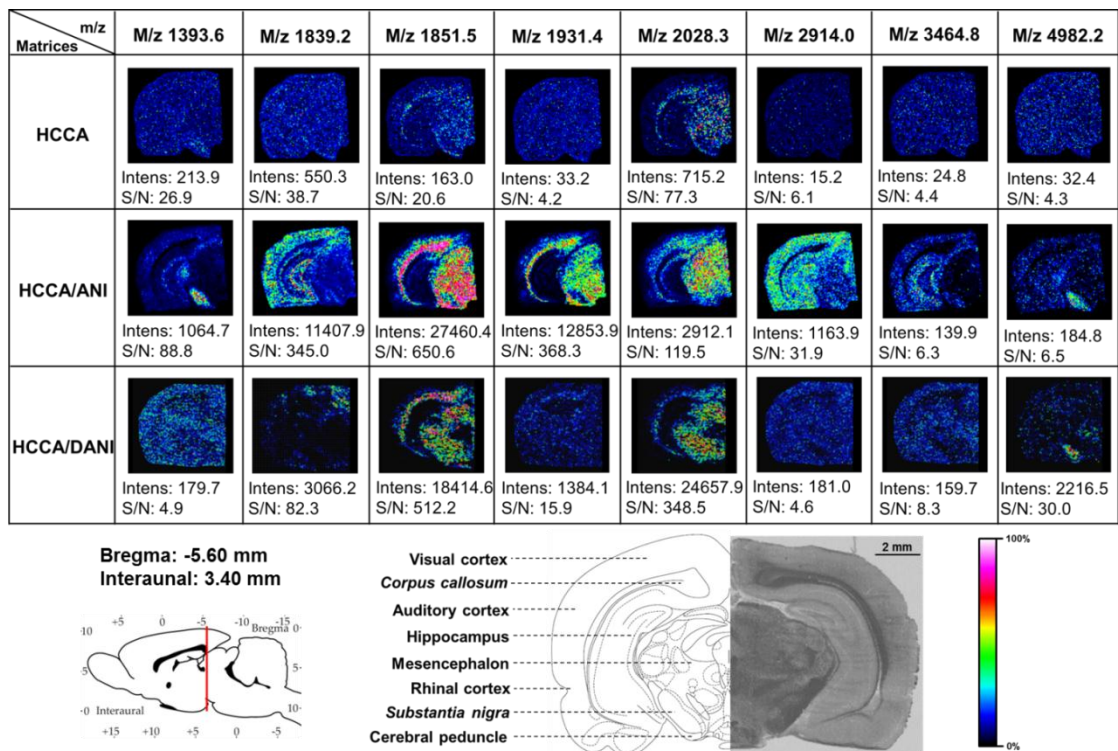


Figure 62. Comparaison des images enregistrées en mode réflecteur positif sur une moitié de coupe de cerveau de rat après la nébulisation des matrices HCCA, HCCA/ANI ou HCCA/3-AP sur la gamme de masse m/z 1000-5000.

Aux vues de ces résultats, la micro-nébulisation de l'HCCA/ANI semble être la préparation la plus adaptée pour la réalisation d'expériences d'imagerie MALDI. Ainsi, des images de coupe longitudinale de cerveau de rat ont été obtenues en mode réflecteur positif avec une résolution spatiale fixée à 150 μm . De nombreux peptides ont été détectés avec une intensité et un rapport S/N élevés. L'image moléculaire composite, présentée **Figure 63a**, montre la répartition de 4 ions possédant des distributions complémentaires. En effet, l'ion à m/z 1392.9 est détecté dans la *Substantia nigra* et dans le putamen alors que le peptide mesuré à m/z 1493.6 est distribué dans le cortex cérébral et dans la couche moléculaire du cervelet. De même, la distribution de l'ion m/z 1785.7 s'étend du bulbe rachidien au corps calleux et du mésencéphale à l'hypothalamus. Quant à l'ion m/z 1839.1, il est spécifiquement localisé au niveau de la couche cellulaire du cervelet, du colliculus supérieur et du pédoncule cérébral. Afin de mettre en évidence les profils moléculaires spécifiques des structures du cerveau, une classification hiérarchique a été réalisée sur l'ensemble des données enregistrées au niveau du cervelet. Une classification des profils, basée sur une comparaison de l'intensité des ions issus de la collection des spectres de masse obtenus sur une partie du cervelet qui s'étend du premier au sixième lobule, a été réalisée (**Figure 63b**). Les résultats de l'analyse statistique, représentés par les différentes branches du dendrogramme, démontrent la présence de deux régions correspondant à la substance blanche (branche rouge) et la couche corticale (branche bleue). En outre, une analyse plus approfondie permet de souligner l'existence de deux sous-classes de profils moléculaires dans la couche corticale: la couche cellulaire (branche verte) et la couche moléculaire (branche violette). Les résultats peuvent également être représentés sous forme d'images où chaque branche du dendrogramme est codée par une couleur, ce qui permet de mettre en évidence la distribution des différents profils moléculaires au sein de la coupe du cervelet.

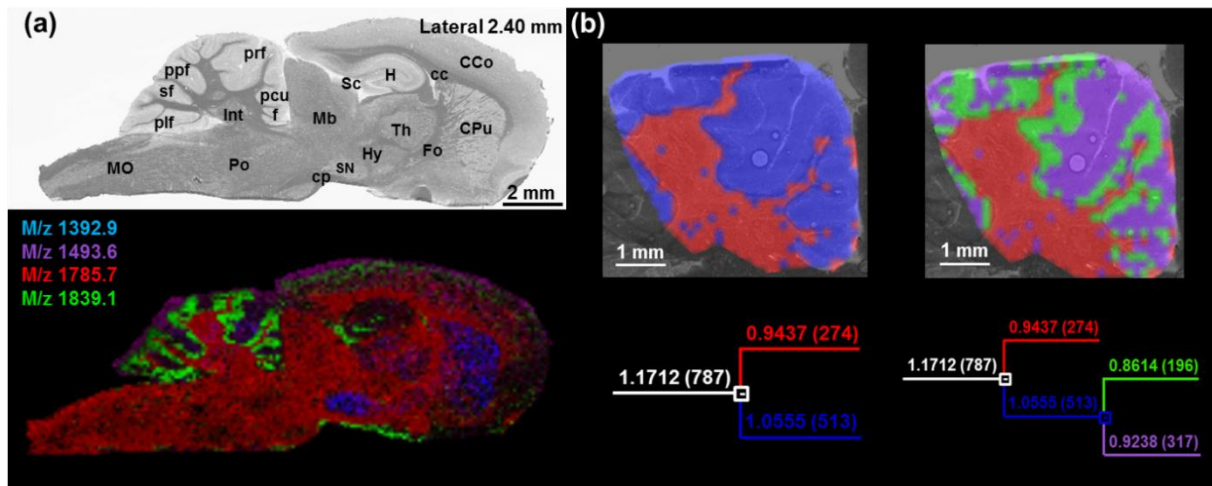


Figure 63. (a) Image optique annotée et image moléculaire composite d'une coupe longitudinale de cerveau de rat obtenue avec une résolution spatiale de 150 μm . (b) Dendrogramme des spectres enregistrés sur une partie du cervelet de rat et images obtenues après reconstruction des branches du dendrogramme. (cc *Corpus callosum*, CCo cortex cerebral, cp Pédoncule cérébral, CPu Putamen, Fo Fornix, H Hippocampe, Hy Hypothalamus, Int Noyaux interposés cérébelleux, Mb Mésencéphale, MO Bulbe rachidien, pcuf *Fissura preculminalis*, plf Fissure postérolatérale, ppf Fissure prépyramidale, prf Fissure primaire, Sc Colliculus supérieur, sf Fissure secondaire, SN *Substantia nigra*, Th Thalamus).

De nombreux développements instrumentaux ont récemment été entrepris dans le but d'augmenter la résolution spatiale des images. Ainsi, une étude portant sur la compatibilité de la micro-nébulisation de la matrice HCCA/ANI avec la réalisation d'expériences d'imagerie à haute résolution a été menée. La cristallisation et le profil spectral observés précédemment suggèrent que l'HCCA/ANI pourrait être une bonne matrice pour ces analyses. En effet, le faible volume de solvant utilisé pour le dépôt par nébulisation permet d'obtenir des fins cristaux d'environ 40 μm et espacés de moins de 20 μm , tout en offrant une intensité élevée des ions pour la gamme de masse m/z 1000-6000. Par conséquent, une image du cervelet de rat a été réalisée avec une résolution spatiale de 40 μm (**Figure 64**). Ces images prouvent qu'il est possible d'obtenir une bonne extraction des peptides avec la nébulisation de l'HCCA/ANI, tout en évitant la délocalisation. Les distributions des peptides observées lors de la reconstruction des images à 150 μm sont similaires à celles obtenues pour les images à 40 μm . Ainsi, l'ion à m/z 1494.2 est détecté dans la couche moléculaire alors que l'ion m/z 1786.0 est retrouvé dans la substance blanche. Les ions m/z 2267.8 et m/z 5007.4 sont co-localisés dans la substance blanche du cervelet. L'image composite montre la présence des ions m/z 1294.4 et m/z 1694.1 au niveau de la couche corticale et plus précisément dans la couche moléculaire et dans la couche cellulaire. Le peptide correspondant à m/z 1932.8 est

distribué dans la substance blanche alors que l'ion m/z 3202.8 est spécifiquement détecté dans le lobule flocculonodulaire.

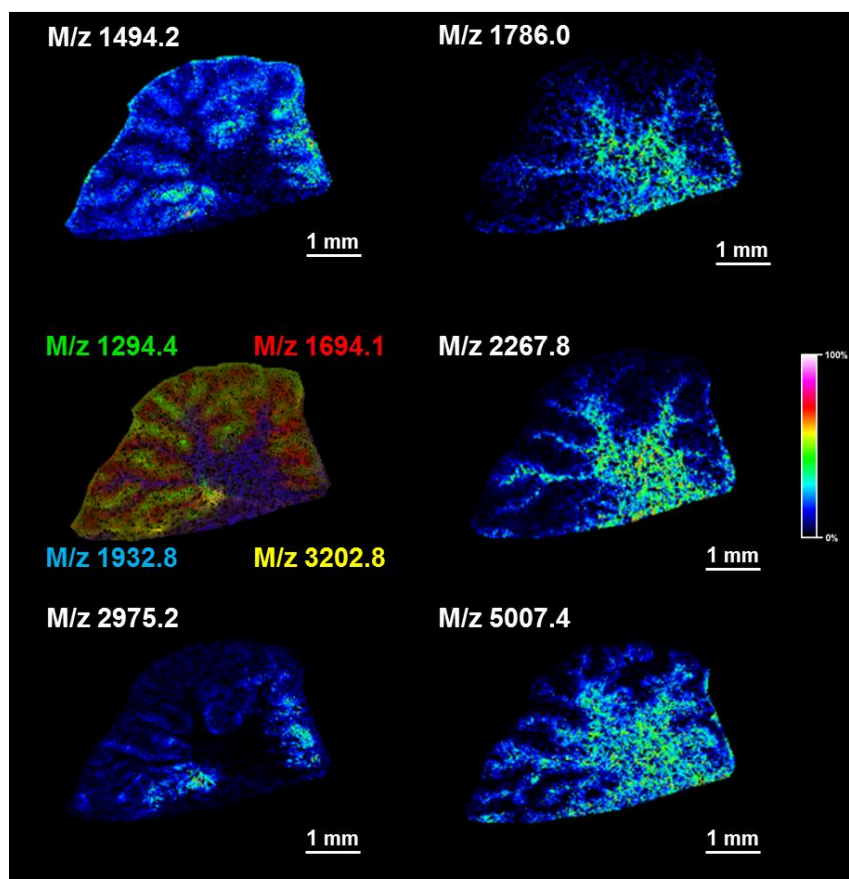


Figure 64. Images moléculaires d'une coupe de cervelet de rat enregistrées avec une résolution spatiale de 40 μm .

2.2.2 Les SIMs et l'analyse des peptides de digestion

La spectrométrie de masse offre la possibilité d'identifier les molécules, et notamment les protéines. Pour cela, deux stratégies nommées « Top-Down » et « Bottom-Up » existent. La stratégie « Top-Down » consiste à caractériser directement les protéines intactes par fragmentation de celles-ci dans le spectromètre de masse. Même si cette méthode est rapide, elle reste peu employée puisque sa réalisation nécessite des modes d'activation des ions particuliers et limite donc le type d'instruments pouvant être utilisés. La stratégie « Bottom-Up » consiste à analyser en MS les fragments peptidiques issus d'une digestion enzymatique (*e.g.* trypsine) ou chimique (*e.g.* CNBr). Ainsi, la masse de tous les fragments de digestion est déterminée et donne l'empreinte de digestion enzymatique ou Peptide Mass Fingerprint

(PMF). La caractérisation des fragments est réalisée par analyse MS/MS. Dans le cas où la protéine étudiée est référencée dans les bases de données, une comparaison des masses des fragments de digestion mesurées par analyse MS et des masses des ions fragments provenant de l'analyse MS/MS est effectuée. Dans le cas contraire, il est nécessaire d'obtenir *de novo* la séquence des peptides de digestion, en recourant ou non à des outils informatiques. Cette deuxième approche peut être adaptée à l'imagerie MALDI. L'enzyme est alors déposée sur la coupe par micro-dépôt⁹² ou par nébulisation.

Pour obtenir des images MALDI à haute résolution spatiale, la technique de micro-nébulisation a été utilisée pour les étapes de digestion enzymatique et d'application de la matrice. La trypsine est l'enzyme classiquement employée dans les analyses de protéomique classique et a donc été choisie pour les études suivantes. Une optimisation du dépôt de trypsine sur coupe a été réalisée. La méthode consiste à nébuliser la trypsine sur la coupe puis à poursuivre avec une incubation de quelques minutes dans la chambre de l'appareil sous atmosphère saturée en MeOH et enfin à procéder au séchage du tissu en faisant intervenir un flux d'azote avant une nouvelle étape de nébulisation. Plusieurs cycles sont ainsi effectués afin d'atteindre un rendement de digestion efficace.

Comme montré précédemment, les matrices ioniques solides, et notamment l'HCCA/ANI, sont intéressantes pour l'obtention de spectres de qualité sur la gamme de masse des peptides. L'HCCA/ANI a donc été utilisée pour l'analyse des peptides résultant de la digestion trypsique *in situ*. La digestion trypsique et le dépôt de matrice HCCA/ANI ont été réalisés sur une coupe de cerveau de rat. La cristallisation observée était homogène. Plusieurs centaines de peptides ont pu être détectés. De plus, les spectres présentent une bonne intensité jusqu'à m/z 3000. La **Figure 65** présente quatre ions ayant une répartition spécifique au sein du tissu. La résolution spatiale des images présentées a été fixée à 100 μm . Ces peptides peuvent ensuite être sélectionnés afin de déterminer leur séquence par des analyses en mode MS/MS et d'obtenir la séquence de la protéine correspondante.

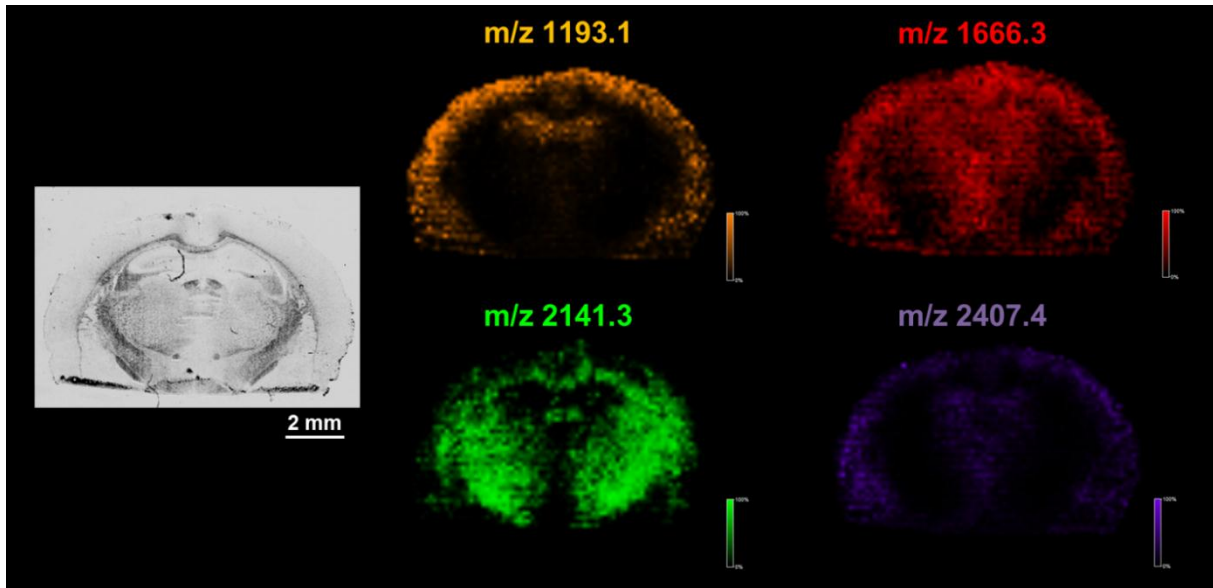


Figure 65. Image optique d'une coupe de cerveau de rat et images moléculaires MALDI des ions m/z 1193.1, m/z 1666.3, m/z 2141.3 et m/z 2407.4 enregistrés en mode réflecteur positif.

Les résultats obtenus mettent en évidence que les SIMs sont adaptées à l'étude des peptides issus de la digestion trypsique. Cette approche permet ainsi de reconstruire des images de protéines à partir des fragments peptidiques de digestion et de pouvoir identifier ces protéines par une analyse en mode MS/MS directement sur coupe.

Majoritairement, les peptides de digestion détectés sur coupes sont basiques car ils présentent au moins une arginine du côté C-terminale et certains d'entre eux possèdent une proline dans leur séquence. Actuellement, il est difficile de mettre en évidence les peptides avec une lysine du côté C-terminale car leur basicité est moins grande que l'arginine. En solution, il existe une stratégie bien connue, appelée guanidination, qui consiste à convertir les lysines en homo-arginine^{191, 192}. La mise en place de cette stratégie est longue et difficile. De plus, sur coupe, cette méthode est peu efficace. L'autre technique envisageable est d'utiliser une matrice aprotique qui réduirait la discrimination entre les peptides présentant une différence de basicité. Dans la littérature, la matrice aprotique 4-hydroxycinnamique méthyl ester (HCCE) a montré son efficacité pour réduire cette discrimination¹⁹³.

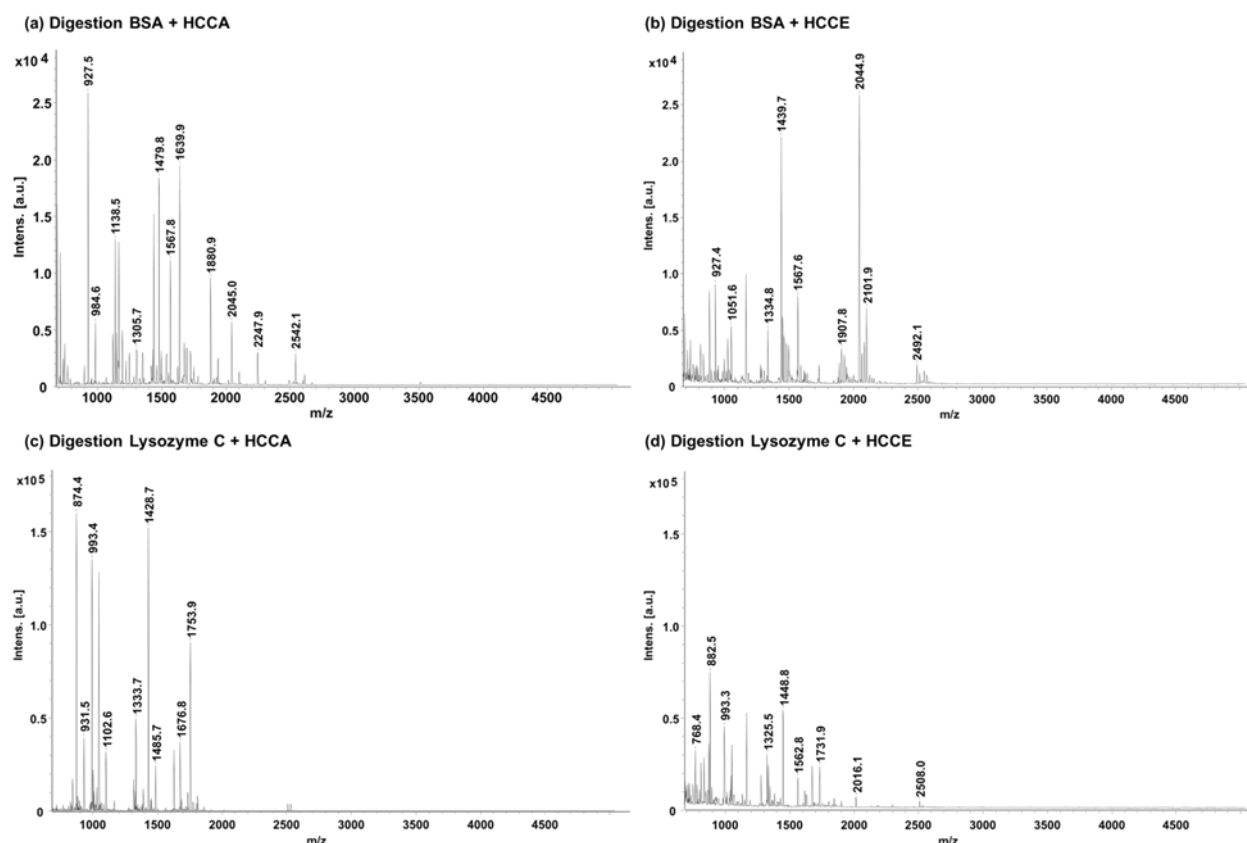


Figure 66. Spectres MALDI enregistrés en mode réflecteur positif d'un digestat de la protéine BSA avec la matrice (a) HCCA et (b) HCCE, d'un digestat de la protéine Lysozyme C avec la matrice (c) HCCA et (d) HCCE.

Dans un premier temps, une comparaison de l'efficacité de la matrice cristalline HCCA, couramment employée pour l'analyse des peptides, avec la matrice HCCE a été réalisée pour l'étude de deux digestats de protéine : l'albumine de sérum bovin (BSA) et le lysozyme C (**Figure 66**). Pour les deux digestats analysés avec la matrice HCCE, il est possible de constater une diminution du signal pour les pics détectés avec l'HCCA. Cependant, d'autres pics ont pu être mis en évidence avec la matrice HCCE.

Cette matrice cristalline a donc ensuite été utilisée pour la détection des peptides moins basiques sur coupe après digestion. La synthèse d'une matrice ionique à base d'HCCE a donc été effectuée. Pour cela, un mélange équimolaire d'HCCE et d'aniline a été préparé. L'HCCE/ANI s'est révélée être une matrice ionique solide après dépôt à l'aide d'une micropipette sur des coupes de cerveau de rat. Une comparaison des propriétés des matrices cristallines (*e.g.* HCCA et HCCE) et des matrices ioniques solides (*e.g.* HCCA/ANI et HCCE/ANI) a été effectuée. Ces matrices ont donc été déposées à l'aide d'une micropipette sur des coupes de cerveau de rat après réalisation d'une digestion trypsique.

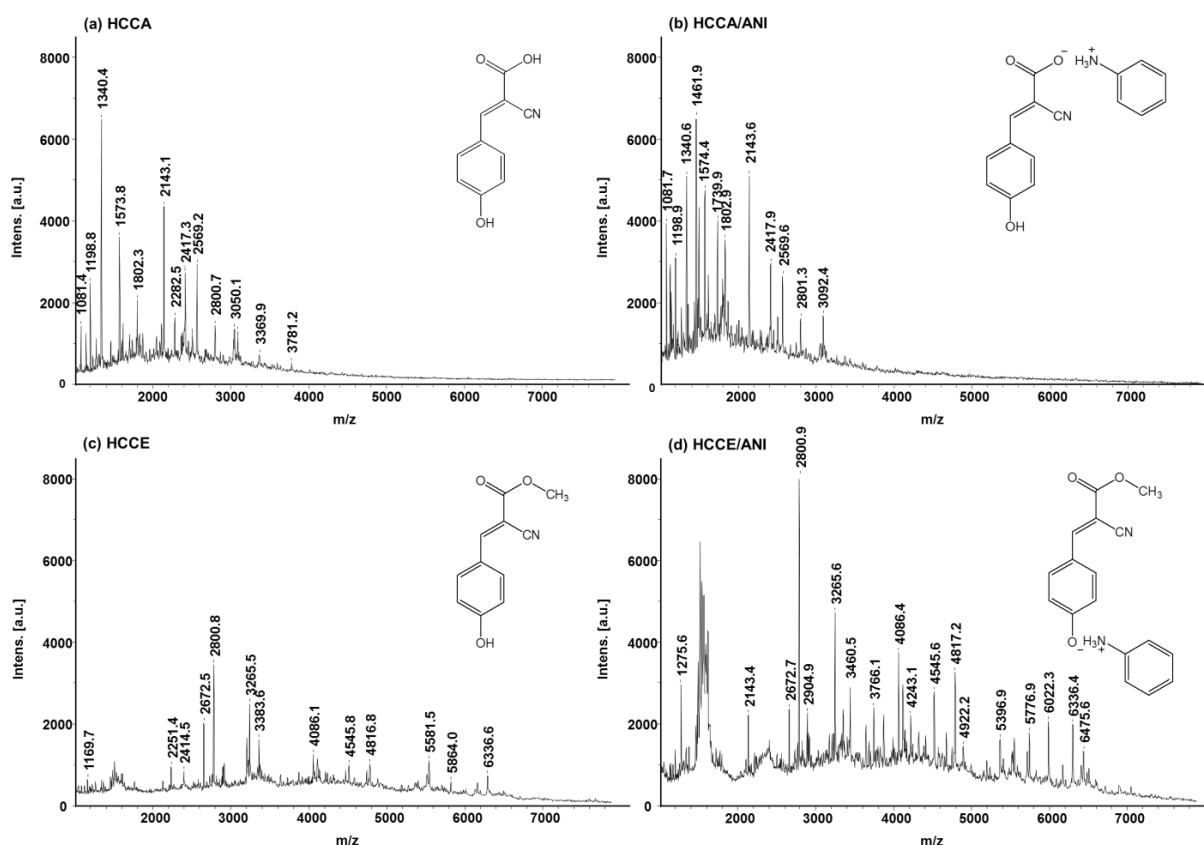


Figure 67. Spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif après digestion trypsique et dépôt de la matrice (a) HCCA, (b) HCCA/ANI, (c) HCCE et (d) HCCE/ANI à l'aide d'une micropipette sur des coupes de cerveau de rat.

Les spectres obtenus pour les matrices HCCA et HCCA/ANI présentent de nombreux pics avec une bonne intensité sur la gamme de masse m/z 1000-3000, comme observé précédemment après la digestion enzymatique et la micro-nébulisation de matrice (**Figures 67a et b**). L'HCCE permet la détection d'ions sur une gamme de masse plus étendue, allant de 1000 à 8000 (**Figure 67c**). Cette matrice semble entraîner une diminution générale de l'intensité du signal ce qui contribue à favoriser des espèces qui n'étaient pas ou très faiblement détectées avec l'HCCA et l'HCCA/ANI. La matrice ionique solide basée sur l'HCCE permet également la détection des mêmes ions. Cependant, l'intensité des pics est deux fois supérieure à celle obtenue avec l'HCCE (**Figure 67d**).

Aux vues de ces résultats, la matrice HCCE/ANI a été micro-nébulisée sur une coupe de cerveau de rat après réalisation d'une digestion trypsique afin d'évaluer sa compatibilité avec les expériences d'imagerie MALDI. L'examen de l'image optique a révélé une cristallisation peu homogène de la matrice HCCE/ANI avec la formation d'agrégats de cristaux (**Figure 68b**). Une analyse directe de la coupe a tout d'abord été effectuée en mode réflecteur positif.

Le spectre moyen résultant présente de nombreux pics avec une intensité satisfaisante (**Figure 68a**). La reconstruction des images MALDI, à une résolution de 100 μm , a permis de mettre en évidence la distribution complémentaire de quatre ions (**Figure 68c**). Cependant, la qualité des images moléculaires obtenues est assez faible et présentent un bruit de fond important. La différence observée entre les résultats obtenus après le dépôt d'HCCE/ANI par micropipette et par micro-nébulisation pourrait provenir d'une différence d'incorporation des analytes dans les cristaux de matrice. En effet, le dépôt de matrice par micro-nébulisation, en réduisant la quantité de solvant par rapport au dépôt par micropipette, entraîne une cristallisation très rapide de la matrice HCCE/ANI ce qui ne permet pas une bonne co-cristallisation. Cette hypothèse semble être confirmée par l'aspect des cristaux de matrice.

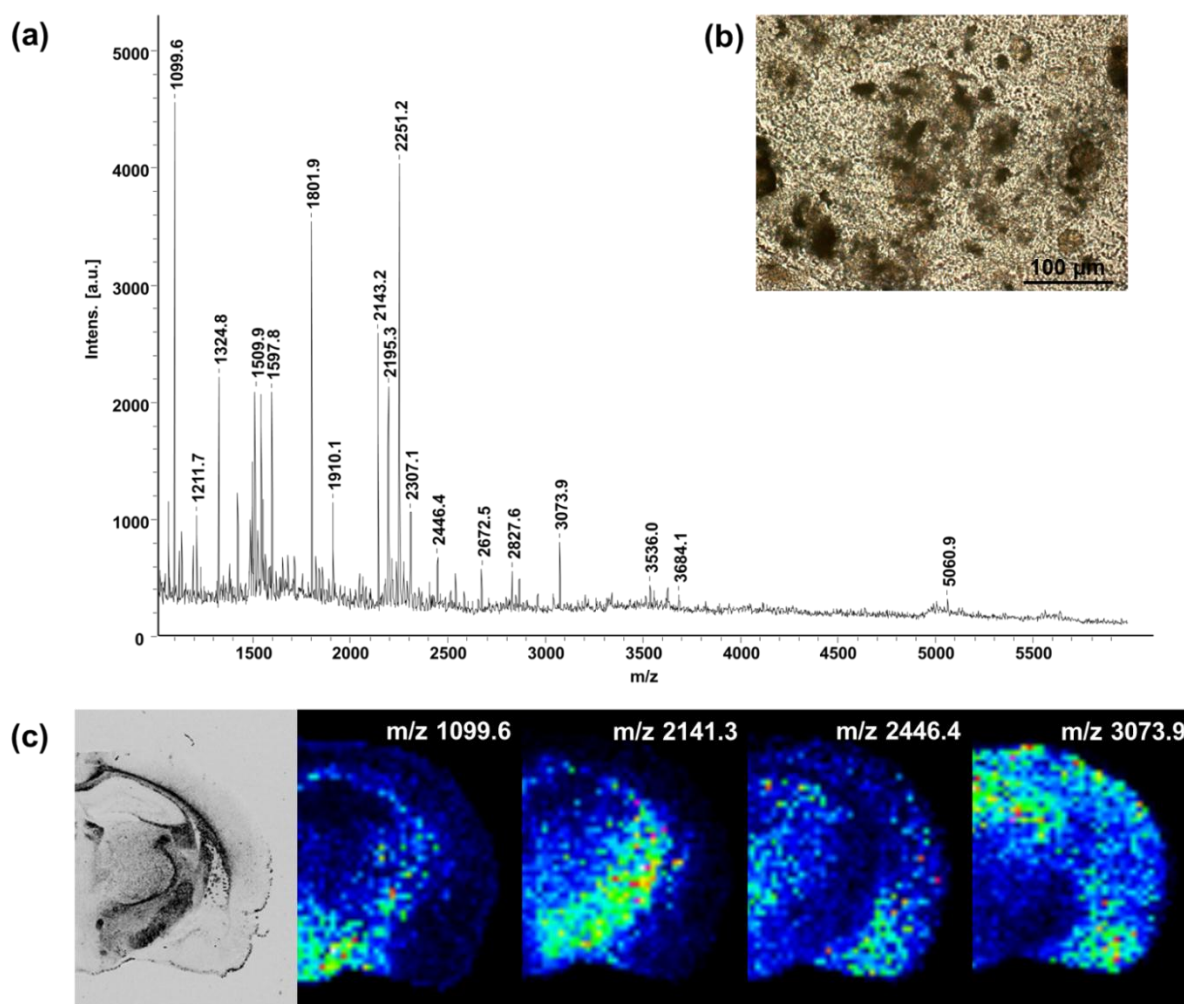


Figure 68. (a) Spectre de masse MALDI enregistré en mode réflecteur positif sur une coupe de cerveau de rat après micro-nébulisation de la trypsine et de la matrice HCCE/ANI sur une coupe de cerveau de rat. (b) Image optique de la cristallisation de l'HCCE/ANI après micro-nébulisation. (c) Images MALDI reconstruite pour quatre ions présentant des répartitions différentes au sein d'une coupe de cerveau de rat.

Les caractéristiques de la matrice HCCE/ANI en font une matrice intéressante pour la détection sur coupes des peptides issus de la digestion trypsique, moins basiques et donc faiblement observés avec les matrices préparées à partir d'HCCA. Cependant, pour l'imagerie des peptides de digestion, des développements restent à faire concernant le dépôt de ces matrices avec les systèmes automatisés. Une solution envisageable pour optimiser le dépôt de l'HCCE/ANI sur coupe serait de recourir à la technique de recristallisation de la matrice^{106, 194}.

2.2.3. Les SIMs et l'analyse des saponines (glycosides triterpène)

Les holothuries également nommées concombres de mer appartiennent à la famille des Holothuriidés (**Figure 69a**). Plusieurs d'entre elles, dont *Holothuria forskali*, possèdent un dispositif de défense mécanique élaboré contre leurs prédateurs. En effet, lorsqu'elles sont inquiétées, elles sont capables d'émettre, par l'orifice cloacal, de longs filaments collants appelés les tubes de Cuvier qui immobilisent l'ennemi (**Figure 69b**)^{195, 196}.

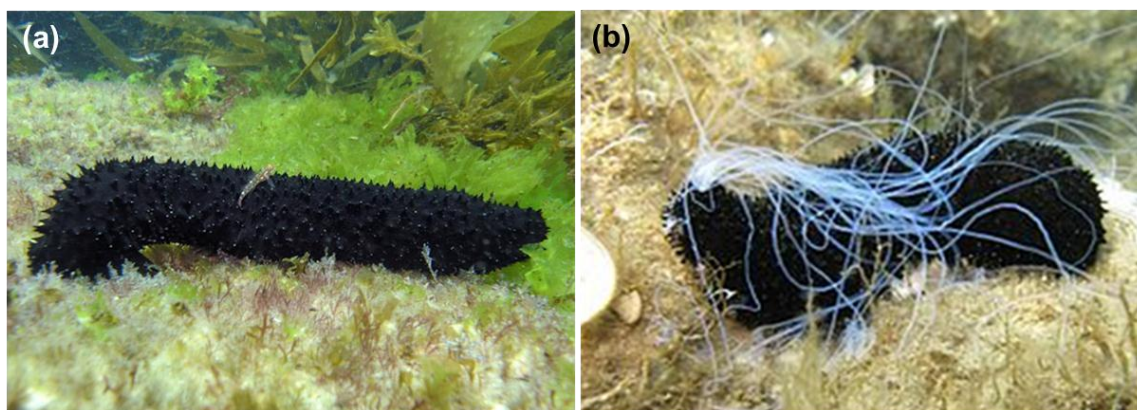


Figure 69. Photographies d'un concombre de mer *Holothuria forskali* (a) à l'âge adulte (b) projetant ses tubes de Cuvier.

Un mécanisme système défensif chimique, les saponines, existe chez toutes les espèces de concombre de mer¹⁹⁵. Ces composés ont été retrouvés au niveau des viscères, de la peau et des tubes de Cuvier¹⁹⁷. Les saponines sont des métabolites secondaires avec une structure de glycoside triterpène connus pour leur action piscicide.

La technique de lectinohistochimie visant à mettre en évidence la distribution des saponines dans les tubes de Cuvier d'*H. forskali* n'ayant pas permis d'obtenir des résultats

concluants, une étude par imagerie MALDI a été réalisée. Des coupes ont, tout d'abord, été préparées à partir d'un paquet formé d'une douzaine de tubes de Cuvier congelé. Sans lavage préalable des coupes afin d'éviter la délocalisation ou la perte des saponines, la matrice ionique solide HCCA/ANI a été micro-déposée. Un spectre de masse moyen a alors été enregistré en parcourant la totalité du tissu, sur la gamme de masse m/z 1100-1500 (**Figure 70a**).

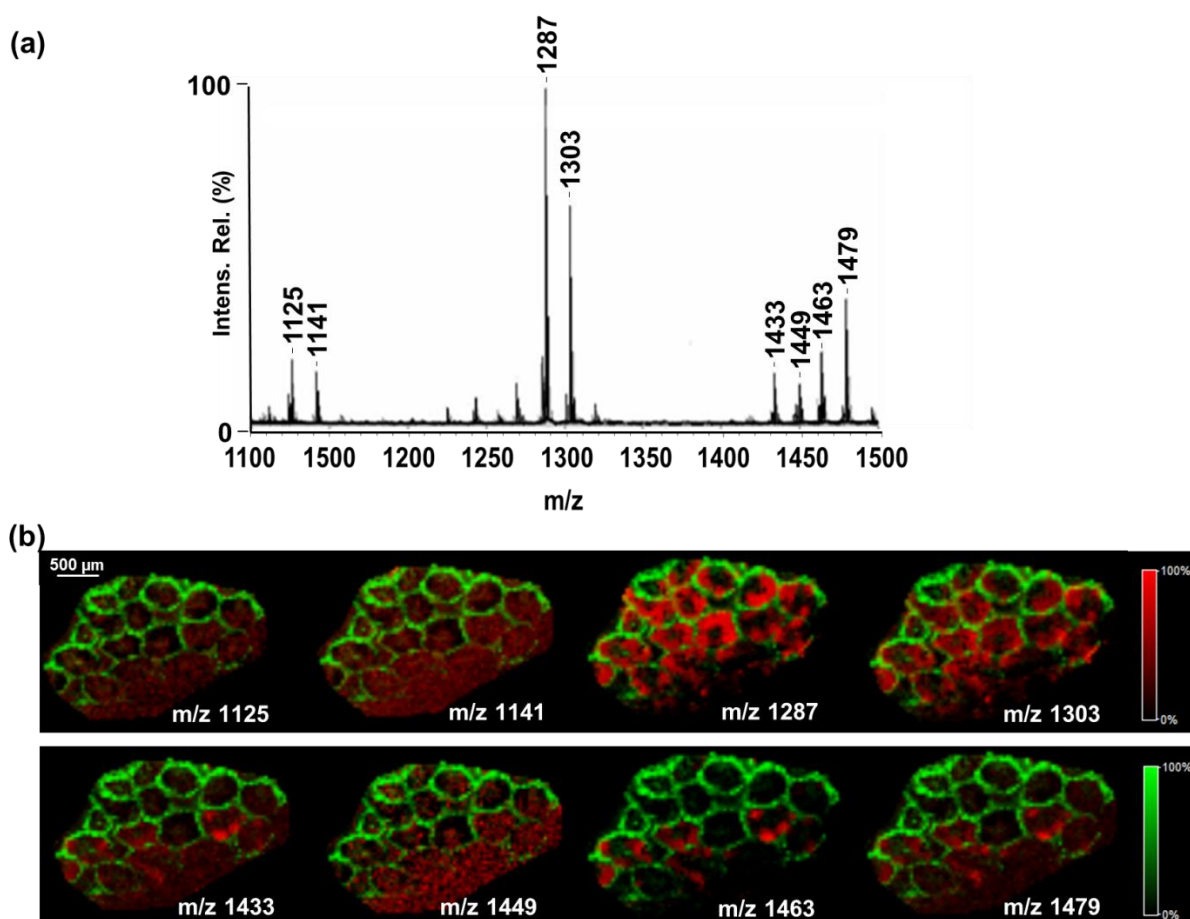


Figure 70. Spectre de masse moyen MALDI enregistré par analyse directe d'une coupe de tubes de Cuvier d'*H. forskali*. (b) Images moléculaires MALDI obtenues pour les différents glycosides triterpène (rouge) détectés dans les tubes de Cuvier. La sélection de l'ion m/z 843 (en vert) a été utilisée pour la contre-coloration.

Les résultats de la comparaison entre les m/z mesurés sur le spectre de masse et les m/z des saponines connues laissent penser que les pics majoritairement détectés correspondaient à des glycosides triterpène (**Tableau 8**). Une caractérisation de ces composés par une analyse en mode MS/MS a permis de confirmer l'identification de ces ions.

La taille d'un tube de Cuvier étant petite (*e.g.* 500 μm de diamètre), la résolution spatiale a été fixée à 60 μm afin de localiser le plus finement possible les saponines. Les

images obtenues pour 16 saponines (une mesure m/z correspond à deux saponines isomériques) sont présentées **Figure 70b**. L'ion mesuré à m/z 843 a été choisi pour sa localisation particulière dans le mésothélium ce qui permet de délimiter le contour des tubes de Cuvier. Les ions m/z 1125 et m/z 1141 sont faiblement détectés et ne présentent pas de localisation particulière. Ce résultat est en corrélation avec l'observation d'un signal peu intense sur le spectre moyen enregistré en analyse directe (**Figure 70a**). Les ions m/z 1287 et 1303 sont fortement concentrés au niveau du tissu conjonctif. Le groupe de saponines sur la gamme de masse m/z 1400-1500 possède une distribution plus nette, sur les bords extérieurs au niveau de quelques tubes, hormis la saponine mesurée à m/z 1449 qui présente un signal plus diffus. En outre, il est important de noter que les saponines à m/z 1125, m/z 1141, m/z 1433, m/z 1463 et m/z 1479 sont très clairement séparées des saponines à m/z 1287 et m/z 1303 puisqu'elles sont respectivement localisées dans les tubes près de l'épiderme ou de la cavité cœlomique de l'animal. Les saponines de la gamme de masse m/z 1100-1200 et 1400-1500 pourraient donc être spécifiquement exprimées dans les tubes prêts à être expulsés. En effet, parmi les 200 à 600 tubes présents chez l'animal, seuls 10 à 20 sont éjectés à chaque fois¹⁹⁸. Une autre explication à cette différence est qu'il pourrait s'agir d'un mélange de tubes fonctionnels ou en cours de régénération, puisque pour maintenir un mécanisme défensif toujours prêt, *H. forskali* est capable de régénérer ses tubes de Cuvier¹⁹⁹. Cependant, lors du prélèvement des tubes de Cuvier, aucune distinction n'a pu être effectuée entre les tubes complets et les tubes en cours de régénération.

[M+Na] ⁺	Identification	Formule Moléculaire
1125	Holothurinoside C Holothurinoside C ₁	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃
1141	Desholothurin A Desholothurin A ₁	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄
1287	Holothurinoside E Holothurinoside E ₁	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈
1303	Holothurinoside A Holothurinoside A ₁	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉
1433	Holothurinoside F Holothurinoside F ₁	C ₆₆ H ₁₀₆ O ₃₂
1449	Holothurinoside G Holothurinoside G ₁	C ₆₆ H ₁₀₆ O ₃₃
1463	Holothurinoside H Holothurinoside H ₁	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₃
1479	Holothurinoside I Holothurinoside I ₁	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄

Tableau 8. Liste complète des saponines détectées par analyse directe par spectrométrie de masse MALDI des coupes de tubes de Cuvier d'*H. forskali*.

Ainsi, cette étude montre la possibilité d'allier les matrices ioniques solides à l'imagerie MALDI pour la recherche, dans les tissus, de composés alléochimiques tels que les saponines. Les résultats ont permis d'apporter une meilleure compréhension du rôle fonctionnel et écologique de ces molécules naturelles produites par les invertébrés marins.

2.2.4 Les SIMs pour l'analyse des protéines solubles

En analyse classique MALDI, différentes matrices sont couramment employées pour l'étude des protéines, telles que la 2,5-DHB, l'HCCA ou l'acide sinapinique (SA). Cependant, la matrice SA s'est révélée être la plus adaptée pour la détection des protéines solubles sur tissu. De plus, l'analyse directe des protéines sur une coupe nécessite un volume de solution déposé suffisant pour permettre une extraction et une incorporation dans les cristaux de matrice satisfaisantes. En imagerie MALDI, un dépôt localisé de la matrice est requis pour conserver les informations sur la localisation des molécules. En outre, ces dernières années, un point d'honneur a été mis sur l'obtention d'images à haute résolution spatiale. Pour toutes ces raisons, la micro-nébulisation de la matrice semble être un bon compromis entre efficacité d'extraction et dépôt homogène de fins cristaux.

Des études ont démontré l'intérêt de procéder à des étapes de traitement chimique de la coupe, comme le lavage chloroforme qui permet d'améliorer la détection des peptides par

élimination d'un grand nombre de composés assez hydrophobes tels que certains lipides très abondants⁸³. Bien que les lavages acétone⁸³ et alcool⁸² ne soient pas recommandés pour l'analyse des peptides car ils entraînent l'élimination des petits composés (e.g. lipides et peptides polaires), ils s'avèrent être intéressants dans le cadre de l'analyse des protéines qui sont moins labiles. Une combinaison de ces trois lavages⁸⁴ a donc été appliquée sur les coupes avant le dépôt de la matrice 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.

Afin d'évaluer les performances de la matrice SA (**Figure 71a**) pour la détection des protéines en imagerie MALDI, cette matrice a été déposée sur une coupe de cerveau de rat par nébulisation, après les trois lavages successifs. L'image optique de la cristallisation met en évidence de fins cristaux répartis de façon homogène sur le tissu (**Figure 71b**). 3000 accumulations ont été effectuées sur l'ensemble de la coupe, en mode linéaire positif, sur la gamme de masse m/z 3000-30000. Le spectre moyen enregistré est présenté **Figure 71c**. Peu de pics sont observés et le rapport signal/bruit de ces ions est faible (**Tableau 9**).

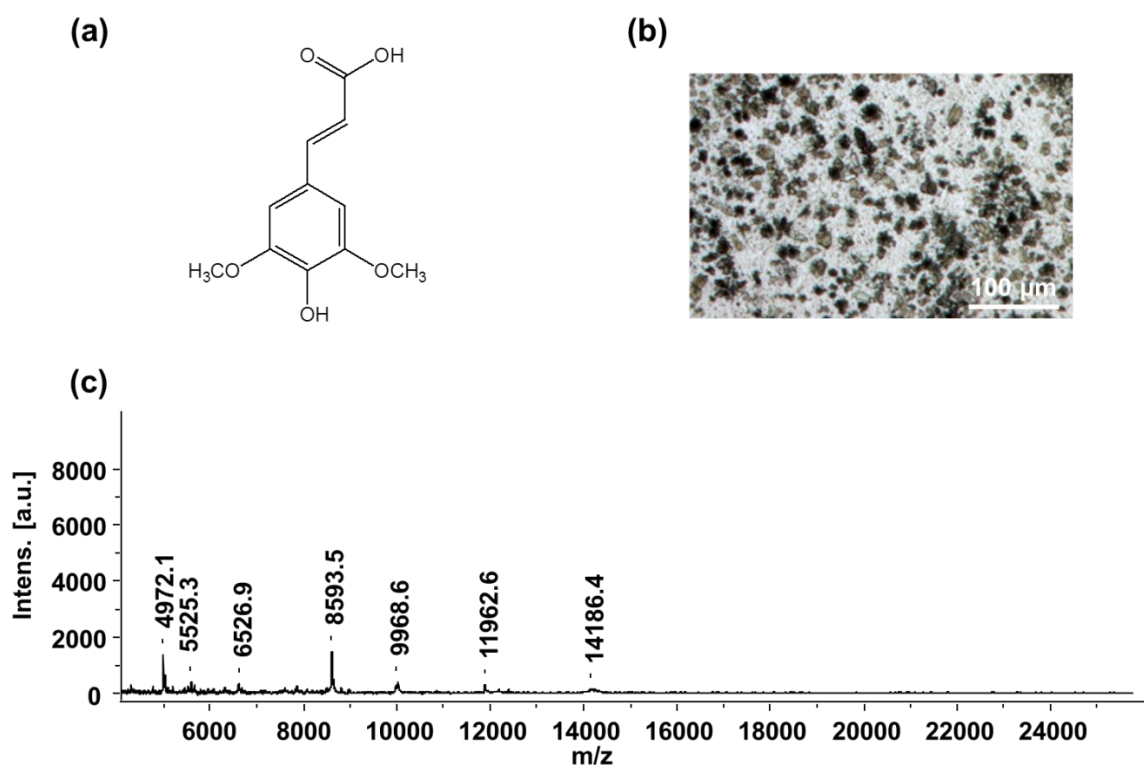


Figure 71. (a) Formule semi-développée de la matrice SA. (b) Image optique de la cristallisation de la matrice SA sur une coupe de cerveau de rat lavée à l'acétone, à l'EtOH et au chloroforme. (c) Spectre de masse MALDI enregistré en mode linéaire positif sur une coupe de cerveau de rat lavée à l'acétone, à l'EtOH puis au chloroforme après le dépôt de la matrice SA.

Compte tenu de l'intérêt des matrices ioniques solides, du point de vue analytique et de la cristallisation, ces matrices ont été étudiées pour l'analyse des protéines. Franck et coll. ont développés des SIMs pour l'analyse des protéines, les matrices SA/ANI et SA/3-AP (**Figures 72a et b**)⁹². Ces SIMs combinées aux micro-dépôts se sont révélées être plus performantes que la matrice cristalline SA, notamment en termes de cristallisation et de sensibilité, et donc adaptées à l'imagerie MALDI. C'est pourquoi, le dépôt des matrices SA/ANI et SA/3-AP par la nébulisation a été testée sur coupe. Les premières expériences ont porté sur l'étude de la qualité de la cristallisation. Les cristaux obtenus après micro-nébulisation des matrices SA/ANI (**Figure 72c**) et de SA/3-AP (**Figure 72d**) sont fins et la cristallisation est homogène sur la totalité de la coupe.

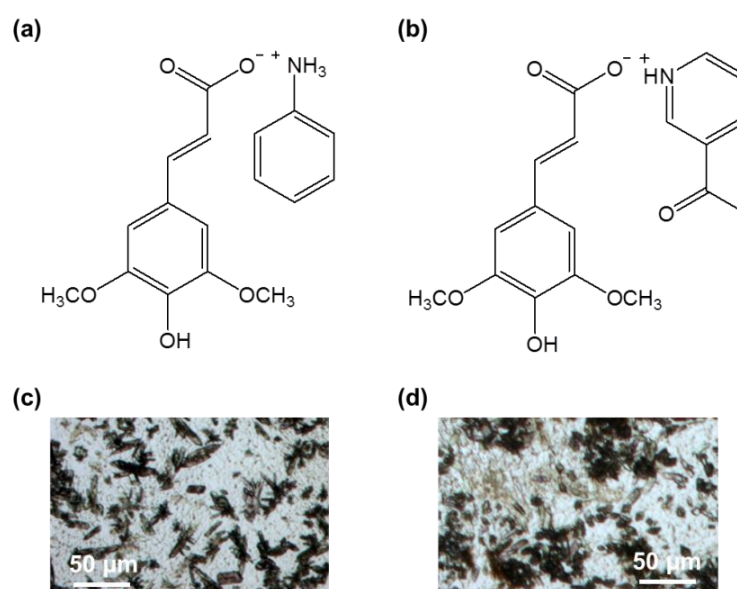


Figure 72. Formules semi-développées de la matrice (a) SA/ANI et (b) SA/3-AP. Images optiques de la cristallisation de la matrice (c) SA/ANI et (d) SA/3-AP sur des coupes de cerveau de rat lavées à l'acétone, à l'EtOH et au chloroforme.

En ce qui concerne l'analyse des coupes avec la SA/ANI, les spectres montrent des pics de plus forte intensité, d'un meilleur rapport signal sur bruit et couvrant une plus grande gamme de masse puisque des protéines au-delà de m/z 15000 sont détectées. L'application de la matrice SA/3-AP a également conduit à une cristallisation homogène. L'intensité des signaux obtenue après dépôt de la matrice SA/3-AP est très nettement supérieure à celle de la SA. De plus, la matrice SA/3-AP est favorable à la détection des protéines ayant un m/z compris entre 10000 et 25000 (**Figure 73**).

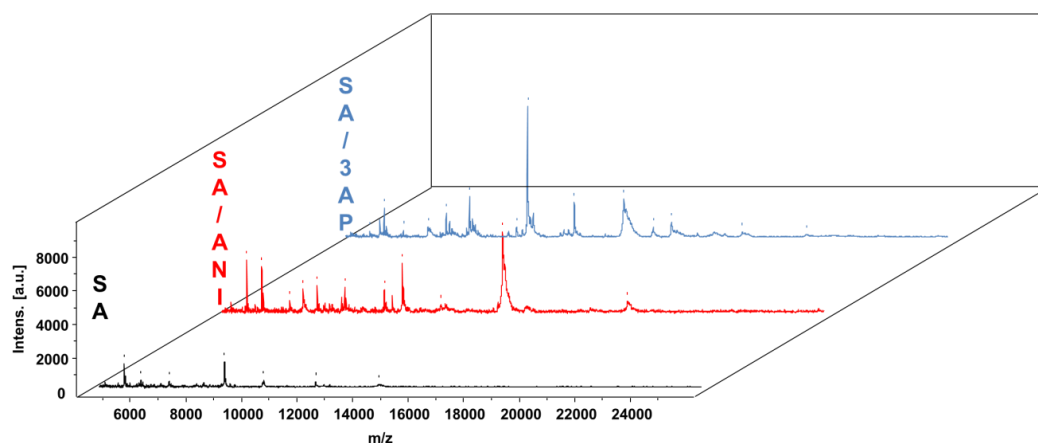


Figure 73. Comparaison des spectres de masse MALDI enregistrés en mode linéaire positif sur des coupes de cerveau de rat lavées à l'acétone, à l'EtOH puis au chloroforme après le dépôt des matrices SA, SA/ANI et SA/3-AP.

Le **Tableau 9** présente quelques pics détectés avec les trois matrices. Leur intensité et leur rapport signal sur bruit sont également indiqués. Sur l'ensemble des spectres, l'intensité des pics est 5 à 10 fois plus élevée avec la SA/ANI et la SA/3-AP par rapport à la SA. Quant au rapport signal sur bruit, il est en moyenne 5 fois plus important avec les matrices ioniques.

	SA	SA/ANI	SA/3-AP
m/z 4972.1	Intens: 1499.6 S/N: 244.5	Intens: 3018.5 S/N: 882.0	Intens: 436.8 S/N: 37.5
m/z 5472.5	Intens: nd S/N: nd	Intens: 25.4 S/N: 1.6	Intens: 1853.2 S/N: 516.3
m/z 5525.4	Intens: 312.2 S/N: 19.9	Intens: 2336.0 S/N: 572.6	Intens: 766.4 S/N: 76.4
m/z 6527.0	Intens: 343.3 S/N: 35.7	Intens: 843.1 S/N: 89.5	Intens: nd S/N: nd
m/z 6600.8	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1239.6 S/N: 387.2	Intens: nd S/N: nd
m/z 7504.9	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1545.5 S/N: 498.9	Intens: nd S/N: nd
m/z 7705.1	Intens: nd S/N: nd	Intens: 722.3 S/N: 71.2	Intens: 1265.9 S/N: 386.1
m/z 8509.9	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1493.4 S/N: 421.6	Intens: 422.3 S/N: 31.3
m/z 8543.5	Intens: nd S/N: nd	Intens: 863.9 S/N: 61.7	Intens: 2598.5 S/N: 221.7
m/z 8593.5	Intens: 1689.2 S/N: 502.4	Intens: 508.7 S/N: 22.5	Intens: 1207.2 S/N: 19.8
m/z 9935.1	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1382.8 S/N: 69.7	Intens: 432.6 S/N: 18.5
m/z 10234.0	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1116.5 S/N: 200.6	Intens: 602.3 S/N: 56.6
m/z 10576.2	Intens: nd S/N: nd	Intens: 2987.2 S/N: 637.1	Intens: 7513.2 S/N: 1062.0
m/z 12312.9	Intens: 61.5 S/N: 5.4	Intens: 54.7 S/N: 1.1	Intens: 1937.7 S/N: 651.3
m/z 14186.7	Intens: 55.4 S/N: 2.2	Intens: 4986.3 S/N: 919.6	Intens: 2547.2 S/N: 536.7
m/z 15155.1	Intens: nd S/N: nd	Intens: 534.2 S/N: 10.1	Intens: 877.2 S/N: 186.7
m/z 15808.9	Intens: nd S/N: nd	Intens: nd S/N: nd	Intens: 1125.6 S/N: 27.7
m/z 18354.7	Intens: nd S/N: nd	Intens: nd S/N: nd	Intens: 555.4 S/N: 40.3
m/z 20669.5	Intens: nd S/N: nd	Intens: nd S/N: nd	Intens: 370.6 S/N: 21.1

Tableau 9. Comparaison des résultats, en termes d'intensité et de rapport signal sur bruit, obtenus lors de l'analyse en mode linéaire positif des protéines sur une coupe de cerveau de rat après dépôt des matrices SA, SA/ANI et SA/3-AP.

Un enregistrement de spectres, 5 heures après l'introduction de coupes couvertes de SA/ANI ou de SA/3-AP dans la source MALDI, a été entrepris. Alors que le spectre pour la matrice SA/ANI acquis après 5 heures passées sous vide est similaire à celui obtenu après l'introduction de l'échantillon dans la source, cette même analyse pour la SA/3-AP met en

évidence une diminution considérable de l'intensité des ions détectés sur le premier spectre. Une dégradation du fin dépôt de matrice SA/3-AP lors d'une exposition prolongée sous vide pourrait expliquer cette perte de signal. Pour cette raison, il n'est possible de recourir au dépôt par micro-nébulisation de la matrice SA/3-AP pour l'imagerie MALDI que lors d'expériences de courte durée, comme suggéré pour la matrice HCCA/3-AP.

En se basant sur les performances supérieures présentées par la SA/ANI, cette matrice ionique a ensuite servi à couvrir une coupe de cerveau de rat traitée par les trois lavages successifs pour la réalisation d'images MALDI. Les images à une résolution spatiale de 100 μm sont présentées **Figure 74**.

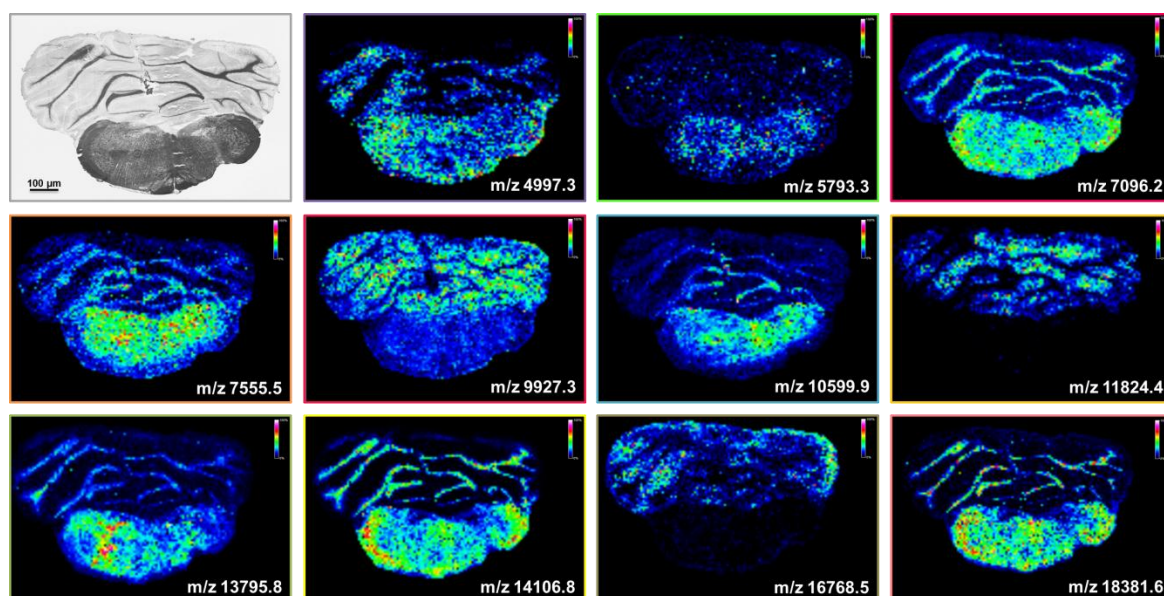


Figure 74. Images moléculaires MALDI obtenues à partir une coupe de cerveau de rat, avec une résolution spatiale de 100 μm , en mode linéaire positif, sur la gamme de masse m/z 3000-20000.

La qualité des images reconstruites avec la matrice SA/ANI peut s'expliquer par les propriétés des matrices ioniques. En effet, le dépôt de matrice est un facteur limitant en imagerie MALDI. Or, la cinétique lente de la réaction de cristallisation des SIMs peut traduire une meilleure incorporation des molécules dans les cristaux de matrice et donc une amélioration de la qualité spectrale.

Cependant, bien qu'il soit possible d'améliorer les performances de l'imagerie MALDI pour l'analyse des différentes familles de molécules, l'une des limites rencontrées reste la difficulté d'établir la distribution des protéines de plus de 20 kDa. En effet, l'analyse de tissus

conduit généralement à l'observation de signaux peu intenses dans la gamme de masse de m/z 20000-30000. Or de nombreuses molécules d'intérêt biologique, telles que les protéines membranaires, ont des masses supérieures. C'est pourquoi, des protocoles ont été mis au point afin de détecter sur tissu des protéines au-delà de 30kDa⁸⁴. Une combinaison des procédures pour la détection des molécules de hautes masses avec la nébulisation des matrices ioniques solides pourraient permettre de réaliser des images à haute résolution spatiale et ainsi de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs spécifiques des pathologies à l'échelle d'un groupe de cellules.

2.3. Conclusion

La préparation des échantillons est une étape cruciale pour la réalisation des expériences en imagerie MALDI, et cela, quelle que soit la famille de molécules analysées. Le choix de la matrice ainsi que sa méthode de dépôt influencent considérablement la qualité des images. En effet, il est essentiel de jouer avec ces deux paramètres pour, d'une part, minimiser la délocalisation des petits composés et, d'autre part, favoriser l'extraction, notamment des peptides et des protéines. Le micro-dépôt dépose un faible volume de solution de matrice permet de limiter la délocalisation des petites molécules à la taille du dépôt. Les LIMs combinées à ce système, basé sur l'utilisation de têtes piézoélectriques, se sont avérées très efficaces pour la détection des lipides et des médicaments. La micro-nébulisation crée, quant à elle, de fines gouttelettes de solution de matrice à la surface du tissu et conduit ainsi à la formation de cristaux de petite taille répartis de façon homogène. L'intérêt majeur de cette méthode de dépôt est la possibilité d'augmenter la résolution spatiale des images MALDI. Sur le système automatisé utilisé, la phase d'incubation, qui intervient après chaque étape de nébulisation, permet d'améliorer la co-cristallisation. Les SIMs, grâce à leurs propriétés physico-chimiques, dont une cinétique de cristallisation lente, favorisent également l'incorporation des protéines et des peptides dans le réseau cristallin. Les signaux plus nombreux et plus intenses observés pour les peptides et les protéines lors de l'application des matrices ioniques pourraient donc s'expliquer par cette cinétique de cristallisation.

Ces développements apportent de réelles avancées pour la détection de biomolécules d'intérêt notamment dans le cadre d'études portant sur la compréhension des mécanismes biologiques, tels que la régénération nerveuse, ou sur les pathologies, comme les atteintes neurologiques. L'utilisation de la bioinformatique au cours de ces recherches permet de

mettre plus efficacement en évidence les contenus moléculaires spécifiques des régions morphologiques d'intérêt.

En s'appuyant sur ces développements, mes travaux ont ensuite porté sur l'application biologique et clinique dans le cadre d'études en Neurosciences. En effet, les premières expériences de profilage peptidique par MALDI ont été menées sur les systèmes nerveux d'invertébrés avec, en premier lieu, les modèles mollusques tels que le gastéropode *Lymnaea stagnalis*, et plus tard, les céphalopodes²⁰⁰⁻²⁰⁵. La stratégie expérimentale dans ces études était la comparaison des spectres de masse de peptides obtenus à partir de différentes parties du système nerveux, par exemple les neurones soma versus les neurones terminaux de la zone neurohémale. En plus des peptides généralement identifiés par les approches conventionnelles de biologie moléculaire, cette approche a abouti à la détection de nouveaux peptides.

Une telle stratégie, alliant empreintes peptidiques de neurones isolés par MALDI, clonage moléculaire, chimie des peptides et spectrométrie de masse par ionisation ESI, a été généralisée pour étudier la maturation des préprohormones exprimées dans des neurones identifiés. Chez *L. stagnalis*, des expériences ont été menées sur les cellules neuroendocrines (LYCs) ou les cellules caudodorsales (CDCHs). Les LYCs sont connues pour exprimer un précurseur nommé pré-proLYCP (LYCPs). La prédiction de la transformation de LYCP en trois peptides, LYCP I, II et III, par clivage au niveau de sites dibasiques flanquant les domaines peptidiques sur le précurseur, a été confirmée par spectrométrie de masse. Cependant, l'analyse MALDI des LYCs seules a révélé des peptides variants provenant de LYCP I et II. Les variants étaient beaucoup plus abondants que les peptides intacts, ce qui indique que LYCP I et II servent d'intermédiaires dans la séquence peptidique²⁰². Par ailleurs, le MALDI a permis la détection de nouveaux peptides co-localisés avec les LYCPs. Les cellules CDCH de *L. stagnalis* sont connues pour initier et coordonner l'ovulation, la production de masse d'œufs et les comportements associés à travers la production d'un ensemble complexe de peptides qui sont dérivés de la cellule CDCH. Le profil peptidique de la commissure obtenu par MALDI a démontré la présence de tous les peptides séquencés et a, en outre, permis de mettre en évidence deux autres peptides dérivés de pro-CDCH-1, la β 1 et la β 3-CDCH-1²⁰³.

Récemment, Sweedler et ses collègues, en étudiant le génome de l'abeille *Apis mellifera*, ont montré que sur 200 neuropeptides prédits, 100 avaient pu être confirmés par spectrométrie de masse. Par ailleurs, cette étude a ouvert la porte aux études moléculaires avec l'identification de 36 gènes, dont 33 avaient déjà été signalés^{206, 207}.

La combinaison de l'utilisation du ToF-SIMS et du MALDI-TOF a permis d'obtenir des cartes d'ions moléculaires avec une résolution spatiale élevée pour le cholestérol et le neuropeptide APGWamide^{11, 162}. Le peptide APGWamide est majoritairement localisé dans l'amas de neurones qui régulent les comportements masculins de copulation chez *Lymnaea stagnalis*, ce qui est conforme à son activité biologique²⁰⁸.

De toute évidence, le profilage MALDI des peptides donne accès à la représentation la plus complète de peptides dans des domaines spécifiques et à des analyses différentielles sur plusieurs zones distinctes par imagerie en donnant une carte représentative de toutes les biomolécules présentes en même temps.

Mes travaux ont porté, quant à eux, sur la régénération nerveuse et la neurogénèse chez la sangsue médicinale.

3. Etude de la neurogénèse et de la régénération nerveuse chez la sangsue

3.1. Introduction

A la différence des mammifères, la sangsue *Hirudo medicinalis* présente la particularité de régénérer son système nerveux central (SNC) ²⁰⁹ et de recouvrer toutes ses fonctions physiologiques après une lésion. Pour cela, la mise en place de différents processus conduisant à la protection, la réparation et la régénération du SNC est essentielle. Il est possible que les mécanismes intervenant au cours de la régénération neuronale (*i.e.* croissance axonale, guidance axonale et reformation synaptique) soient liés à la réexpression de facteurs embryonnaires impliqués dans la croissance et la maturation du SNC. Or, il est important de noter que cette expression et/ou répression de facteurs critiques est spécifique aux hirudinées. Par conséquent, l'identification et la caractérisation de ces molécules pourraient permettre de comprendre la perte de la capacité de régénération du SNC chez les mammifères ou d'aider à restaurer cette fonctionnalité dans un but thérapeutique dans les cas de lésions pathologiques ou accidentelles du SNC ²¹⁰.

Des études préliminaires portant sur les modifications de l'expression des gènes au cours de la régénération neuronale chez la sangsue ont été menées. La première approche basée sur l'utilisation de banques soustractives d'ADNc réalisées à partir de cellules nerveuses régénératives a révélé un important enrichissement en transcrits impliqués dans les changements plastiques neuronaux ²¹¹⁻²¹⁴. Parmi les séquences sur-régulées, des gènes de sangsue homologues aux gènes de mammifères ont été retrouvés 24 heures après une lésion au niveau du SNC. Ces gènes codent, par exemple, pour des protéines du cytosquelette (*i.e.* actine, tubuline), pour la thioredoxine, pour l'ATP synthase ou la synapsine spécifique des neurones. Par contre, d'autres gènes d'intérêt n'avaient pas d'homologues dans les génomes des vertébrés ²¹⁵. Ces gènes spécifiques des invertébrés pourraient donc se révéler intéressants pour expliquer la perte de la capacité de régénération chez les vertébrés. Pour étudier le rôle clé de ces gènes dans la régénération nerveuse, une approche en ARNi a été entreprise au niveau d'une cellule unique grâce à des injections intracellulaires ²¹⁶. La faisabilité d'une telle étude a ainsi été démontrée chez la sangsue. Par conséquent, cette procédure pourrait être étendue pour examiner l'évolution temporelle de l'expression des gènes à la suite d'une blessure et pourrait ainsi fournir des informations utiles sur les programmes génétiques activés en cas de réparation du SNC.

Les études du transcriptome sont certes importantes, mais elles ne donnent pas d'informations sur les modifications au niveau des protéines. De récentes analyses protéomiques de chaînes nerveuses de sangsue lésées, mises en présence de toxines bactériennes, ont confirmé l'implication des molécules précédemment retrouvées dans les études transcriptomiques²¹⁷. Des informations complémentaires pourraient être obtenues sur la modulation du protéome à la fois au niveau spatial et temporel grâce à la technique d'imagerie par spectrométrie de masse. Des travaux portant sur la localisation des peptides et des protéines au sein du système nerveux des invertébrés ont déjà été réalisés par MALDI-MSI. Ainsi, la distribution des neuropeptides dans les tissus nerveux du mollusque *Aplysia californica* révélée par imagerie MALDI a été confirmée par les analyses d'immunohistochimie²¹⁸. De même, des images MALDI ont pu être reconstruites pour plusieurs familles de peptides (i.e. tachynine, allostatine, FLRFamide ou neuropeptides F) sur des coupes de cerveau de criquet adulte *Schistocerca gregaria*¹³³. Le SNC de la sangsue semble être un modèle idéal pour obtenir les caractéristiques spatiotemporelles du développement neuronal et de la régénération nerveuse chez l'adulte. En effet, son accessibilité facile, la taille importante des neurones, la position inchangée au cours du développement du SNC sont des caractéristiques adaptées aux expériences d'imagerie MALDI. Les changements moléculaires liés à un traumatisme mécanique au niveau de la chaîne nerveuse seront donc explorés sur le SNC isolé de sangsue par imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Une étude parallèle sera menée afin d'évaluer si les molécules identifiées précédemment jouent également un rôle au cours du développement embryonnaire.

3.2. Présentation du modèle

3.2.1. La sangsue *Hirudo medicinalis*

La sangsue *Hirudo medicinalis* est l'un des représentants les mieux étudiés de l'embranchement des annélides (**Figure 75**). *H. medicinalis* est un ver annelé vivant principalement dans les eaux stagnantes de type marais et étangs ou ses déplacements se font par la nage à l'aide de mouvements ondulatoires. Elle est munie de deux ventouses, l'une abrite la bouche et les 3 mâchoires, l'autre est indispensable à la fixation et également à la locomotion sur la terre. Les sangsues se nourrissent du sang des vertébrés (i.e. mammifères, reptiles, poissons ou amphibiens) et peuvent supporter de longues périodes de jeûne. Lors de

la morsure, la sangsue prélève du sang pour son repas et injecte de nombreuses substances aux différentes propriétés (*e.g.* Hirudine). Son appareil respiratoire n'est pas différencié et la respiration se fait donc directement au travers de l'épiderme. Son appareil circulatoire est constitué de 4 vaisseaux sanguins dont un vaisseau ventral accolé à la chaîne nerveuse. Concernant sa reproduction, cet animal est hermaphrodite. La ponte de petits cocons pouvant contenir jusqu'à une trentaine de petites sangsues a lieu, généralement un mois après la fécondation, hors de l'eau.



Figure 75. Photographie d'une sangsue *Hirudo medicinalis* et sa classification phylogénétique.

3.2.2. Le système nerveux central d'*Hirudo medicinalis*

Les nombreuses études portant sur le système nerveux de la sangsue médicinale ont permis sa caractérisation très précise. Le système nerveux est segmenté et est constitué d'une chaîne de 21 ganglions reliés par des connectifs inter-ganglionnaires, un ganglion cérébroïde et un ganglion caudal, tous deux formés de la fusion de plusieurs ganglions (**Figure 76a**). Cette chaîne nerveuse innerve l'ensemble des 32 métamères de la sangsue. Chaque ganglion contient environ 400 neurones ²¹⁹, hormis les ganglions 5 et 6 associés au système reproducteur, qui en comportent environ 700 dont 300 surnuméraires. Le ganglion se divise en 6 paquets de cellules, les follicules, séparés par des septas et renferme les neurones sensoriels N (Nociception), P (Pression) et T (Toucher) ainsi que les motoneurones qui commandent la mobilité de l'animal (**Figure 76b**). Chaque follicule est enveloppé par une cellule gliale, appelée cellule gliale des paquets. Le neuropile retrouvé au centre des ganglions regroupe les prolongements axonaux des neurones, ainsi que deux cellules gliales géantes. De nombreuses cellules microgliales sont disséminées au sein du neuropile et du neuvrilème. L'architecture neuronale des ganglions segmentaires est extrêmement bien conservée d'un ganglion à l'autre.

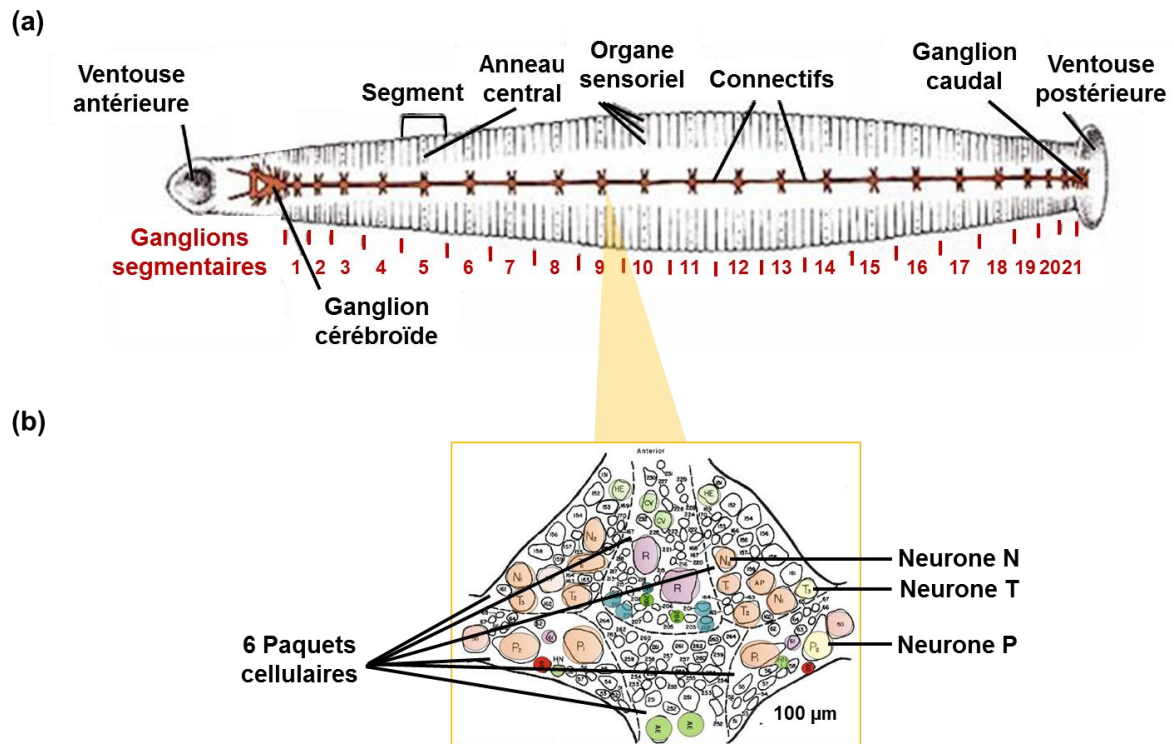


Figure 76. (a) Anatomie du système nerveux de la sangsue médicinale. (b) Schéma d'un ganglion et répartition des différents neurones ²²⁰.

Le SNC possède, en outre, la capacité remarquable de pouvoir se régénérer suite à une lésion et notamment à une coupure des connectifs inter-ganglionnaires. Lors de la section d'un connectif, les mouvements de natation de l'animal sont perturbés. Après quatre semaines, la nage de l'animal redevient normale, prouvant que la régénération n'est pas uniquement structurale mais également fonctionnelle ²²¹.

3.3. Préparation des coupes de chaîne nerveuse

3.3.1. Coupes longitudinales de chaînes nerveuses isolées

Tout d'abord, la chaîne nerveuse a été isolée. Pour cela, les sangsues adultes ont été anesthésiées dans une solution contenant 10% d'éthanol puis épinglées sur la face dorsale (**Figure 77a**). La dissection a été réalisée dans une solution saline afin de conserver des conditions physiologiques. Le sinus ventral a ensuite été ouvert à partir d'une des extrémités puis tous les connectifs segmentaires (**Figure 77b**) partant des ganglions ont été coupés afin de libérer la chaîne nerveuse.

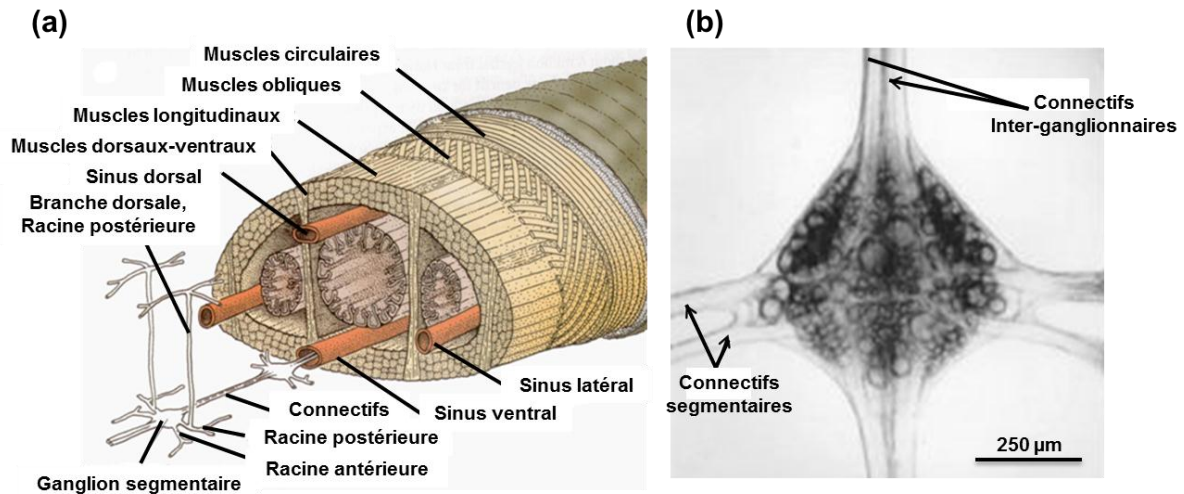


Figure 77. (a) Coupe transversale d'*Hirudo medicinalis*. (b) Photographie d'un ganglion avec les connectifs inter-ganglionnaires et segmentaires.

La chaîne nerveuse de sangsue étant un petit organe élastique, la première difficulté a été de manipuler et de réaliser des coupes de ce tissu. La première stratégie employée dans ce cas de figure est d'enrober le tissu dans une solution qui, une fois durcie, permet de conserver la structure du tissu durant l'étape de la coupe. Comme expliqué dans le chapitre 1.1.2.2.2, l'OCT peut être utilisé en petite quantité afin de fixer l'organe sur le support, mais est déconseillé en tant que milieu d'enrobage au risque d'entraîner l'apparition de pics artéfactuels sur la gamme de masse m/z 1000-2000⁷⁷ qui masquent les pics d'intérêt.

La gélatine, un milieu d'enrobage de substitution, a donc été testée à différentes concentrations. Ainsi, une technique d'enrobage double a été choisie. La gélatine 40% a été utilisée afin de former un bloc suffisamment dur pour servir de support sur lequel positionner et orienter la chaîne nerveuse entière à plat. La gélatine 40% n'a cependant pas permis de réaliser l'inclusion car après la réalisation des coupes, il était difficile de faire la distinction entre la chaîne nerveuse et le milieu d'enrobage. La chaîne nerveuse fixée sur le bloc de gélatine 40% a donc été recouverte de gélatine 10% afin de maintenir le tissu durant la réalisation des coupes⁸⁰. De plus, à cette concentration, la gélatine est transparente et permet de faire ressortir les contours de la pièce histologique (**Figure 78a**).

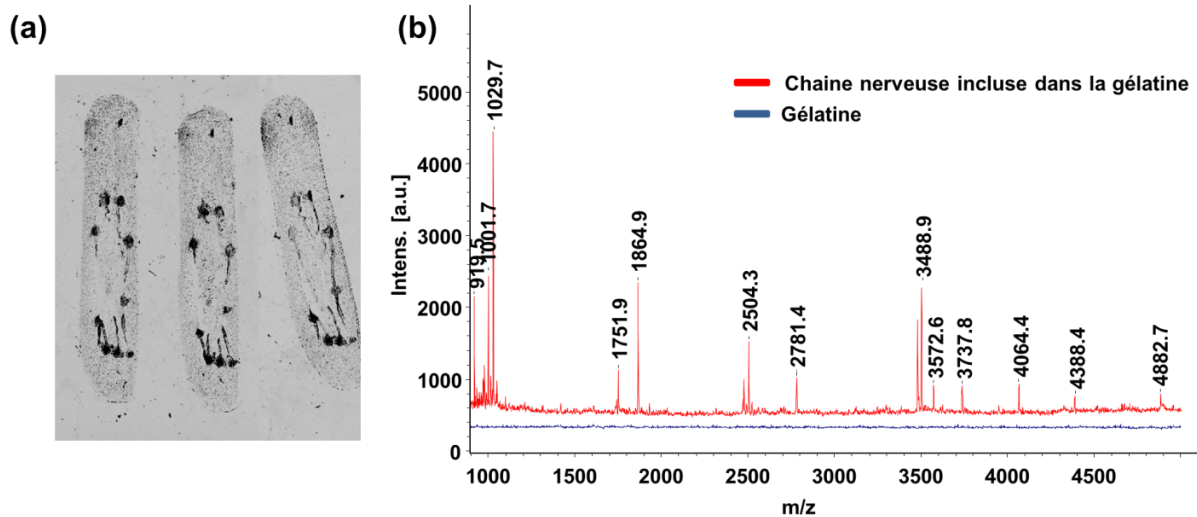


Figure 78. (a) Image optique des coupes longitudinales de chaîne nerveuse de sangsue *Hirudo medicinalis*. (b) Spectres de masse MALDI enregistrés en mode réflecteur positif pour l'analyse directe de la gélatine et de la chaîne nerveuse.

Dans un premier temps, pour l'analyse directe des peptides sur les coupes longitudinales de chaîne nerveuse de sangsue, la matrice a été déposée à l'aide d'une micropipette. Cependant, la matrice a eu tendance à diffuser dans la gélatine et donc aucune cristallisation de matrice n'a eu lieu sur la coupe de chaîne nerveuse. Cette observation a été confirmée par l'analyse en spectrométrie de masse MALDI puisqu'aucun signal n'a été obtenu pour la chaîne nerveuse.

Pour cette raison, une électronebulisation de la matrice HCCA/ANI a été entreprise pour recouvrir les coupes longitudinales enrobées dans la gélatine. Ainsi, les cristaux de matrices couvrent le tissu et le milieu d'enrobage uniformément. L'analyse directe, en mode réflecteur positif, de la gélatine et de la chaîne nerveuse, sur la gamme de masse m/z 1000-5000, a permis de mettre en évidence l'absence de signal lié à la gélatine et la présence de peptides dans la chaîne nerveuse (**Figure 78b**). Cependant, le rapport signal sur bruit obtenu est faible. L'imagerie MALDI a permis d'observer les distributions différentes de nombreux peptides au sein d'un ganglion (**Figure 79**).

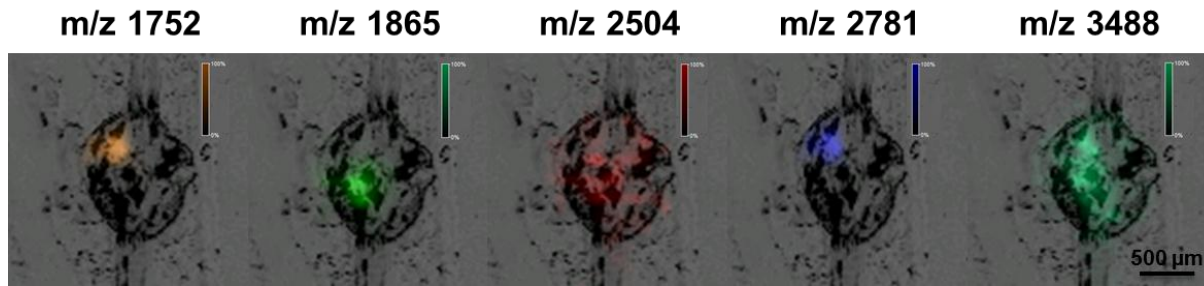


Figure 79. Images moléculaires MALDI enregistrées à partir d'un ganglion de chaîne nerveuse de sangsue pour différents peptides répartis sur la gamme de masse m/z 1000 – 5000.

On constate que les ions m/z 1752 et m/z 2781 sont localisés dans le même paquet cellulaire alors que l'ion m/z 1865 est détecté dans le paquet cellulaire inférieur. Les ions m/z 2504 et m/z 3488 présentent, quant à eux, une répartition plus diffuse dans le ganglion.

Bien que cette méthode d'enrobage ait permis de mettre en évidence des peptides, la mise en place reste difficile. L'inclusion du tissu dans la gélatine 10% nécessite qu'elle soit visqueuse. Il faut donc ajuster la température afin de pouvoir enrober facilement la chaîne nerveuse sans entraîner de dégradations liées à une température trop importante. De plus, même si la surface sur laquelle a été disposée la chaîne nerveuse est plane, lors de l'ajout de la gélatine 10%, la chaîne nerveuse peut se soulever et dans ces conditions, il devient difficile d'obtenir plusieurs ganglions sur une seule coupe.

3.3.2. Coupes transversales d'animal entier

La méthode alternative pour obtenir des coupes de ganglions de chaîne nerveuse de sangsue, sans isoler et inclure celle-ci, est de réaliser des coupes transversales d'animal entier et d'analyser uniquement les coupes où le ganglion est observé. Des sangsues adultes ont été anesthésiées dans une solution contenant 10% d'éthanol, épinglées sur un support et congelées à -80°C durant une heure. Le corps de la sangsue est ensuite coupé en plusieurs blocs de 1 à 2 cm qui sont collés sur le porte-objet du cryostat à l'aide d'OCT afin de réaliser des coupes de 10 μm d'épaisseur. Avec cette technique, les coupes sont facilement réalisables. De plus, lorsque la coupe passe au niveau d'un ganglion, le système nerveux est aisément repérable. On constate également que les structures sont bien conservées, d'un point de vue histologique (**Figure 80**).

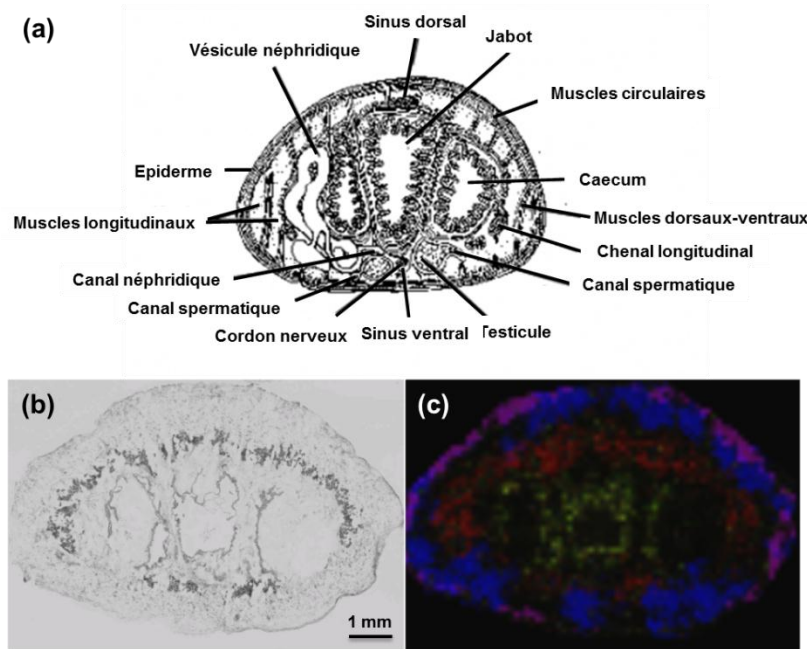


Figure 80. (a) Schéma annoté d'une coupe transversale de sangsue adulte. (b) Image optique d'une coupe transversale de sangsue adulte. (c) Image moléculaire MALDI composite reconstruite pour une coupe transversale de sangsue adulte.

La matrice SA/ANI a été déposée par micro-nébulisation sur les coupes transversales d'animal adulte. Les images MALDI réalisées sur la totalité de la coupe ont permis de mettre en évidence la distribution des peptides dans les différents tissus de la sangsue (**Figure 80c**). L'ion mesuré à m/z 900 (rouge) est distribué au niveau des muscles dorsaux-ventraux alors que l'ion mesuré à m/z 2584 (bleu) est localisé au niveau des muscles longitudinaux. Au niveau des parois du caecum, on retrouve l'ion m/z 4625 (jaune). Le peptide m/z 3017 (violet) est quant à lui détecté dans les muscles circulaires.

Une analyse directe MALDI a été réalisée au niveau du ganglion. Le spectre enregistré en mode linéaire positif est présenté **Figure 81**. De nombreux pics ont pu être observés sur la gamme de masse m/z 2500-10000.

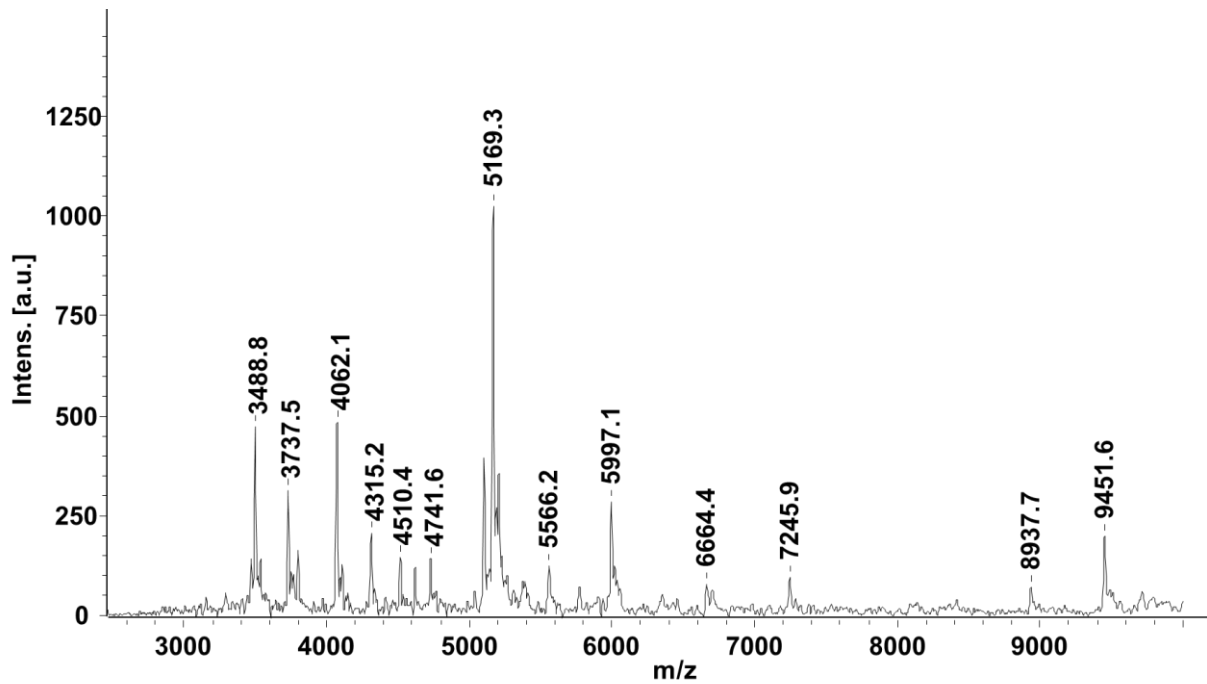


Figure 81. Spectre de masse MALDI enregistré sur la gamme de masse m/z 2500-10000 au niveau d'un ganglion sur une coupe transversale de sangsue adulte.

En sachant qu'un ganglion mesure environ 500 μm , théoriquement il est possible d'obtenir une cinquantaine de coupes sériées de 10 μm pour un même ganglion. Cependant, pour les expériences suivantes, seules neuf coupes réparties sur tout le ganglion selon l'axe antéro-postérieur, ont été placées sur une lame ITO. La petite taille des connectifs inter-ganglionnaires rend impossible la réalisation d'images MALDI. C'est pourquoi, les coupes passant au niveau des connectifs inter-ganglionnaires n'ont pas été retenues. De plus, puisque le réel intérêt de l'étude porte sur le système nerveux et les tissus environnants, l'analyse a donc été limitée, par la suite à cette région.

3.4. Etude du peptidome

3.4.1. Etude du peptidome au cours de la régénération nerveuse

Afin de cartographier les peptides impliqués dans le processus de régénération neuronale chez la sangsue adulte, des expériences d'imagerie MALDI ont été effectuées sur des coupes transversales au niveau du ganglion 9. Ce ganglion a été choisi car, comme énoncé dans le chapitre 3.2.2, l'architecture neuronale est conservée d'un ganglion à l'autre. De plus ce ganglion, n'est pas considéré comme un « ganglion sexuel ».

Les chaînes nerveuses d'animaux adultes ont été lésées au niveau des connectifs inter-ganglionnaires proches de la partie antérieure du ganglion 9 (**Figure 82a**). Après 6 heures de régénération nerveuse, neuf coupes transversales de 10 µm ont été réalisées sur le ganglion 9, comme expliqué dans le chapitre précédent (**Figure 82b**).

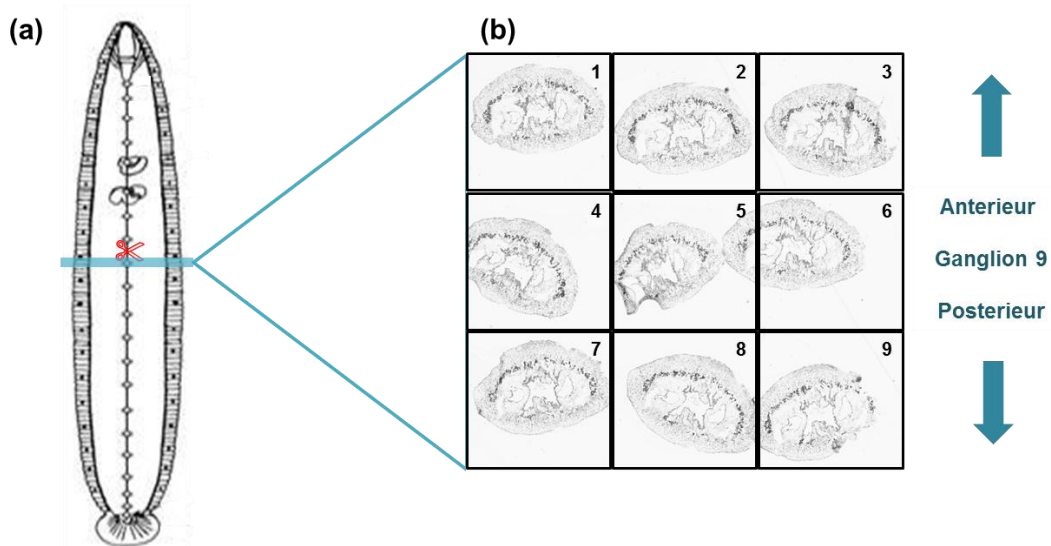


Figure 82. (a) Schéma de la chaîne nerveuse de la sangsue médicinale lésée au niveau des connectifs inter-ganglionnaires proches de la partie antérieure du ganglion 9. (b) Coupes transversales de 10 µm de la sangsue *H. medicinalis* réparties sur la totalité du ganglion 9.

Une zone d'intérêt a été délimitée autour du sinus ventral pour l'analyse par imagerie MALDI. Les spectres enregistrés sur la gamme de masse m/z 1000-30000 ont été normalisés. Le nombre de spectres obtenus est conséquent. C'est pourquoi, pour faciliter la comparaison et l'interprétation des données, une représentation en deux dimensions des spectres a été utilisée (**Figure 83**). Les valeurs de m/z sont indiquées le long de l'abscisse. Chaque spectre est représenté par une ligne horizontale et l'ensemble des spectres d'une coupe sont regroupés et symbolisés par une accolade. Le nombre variable de positions analysées pour chaque coupe implique que la taille des bandes correspondantes diffère. L'intensité des pics se traduit par une échelle de couleurs.

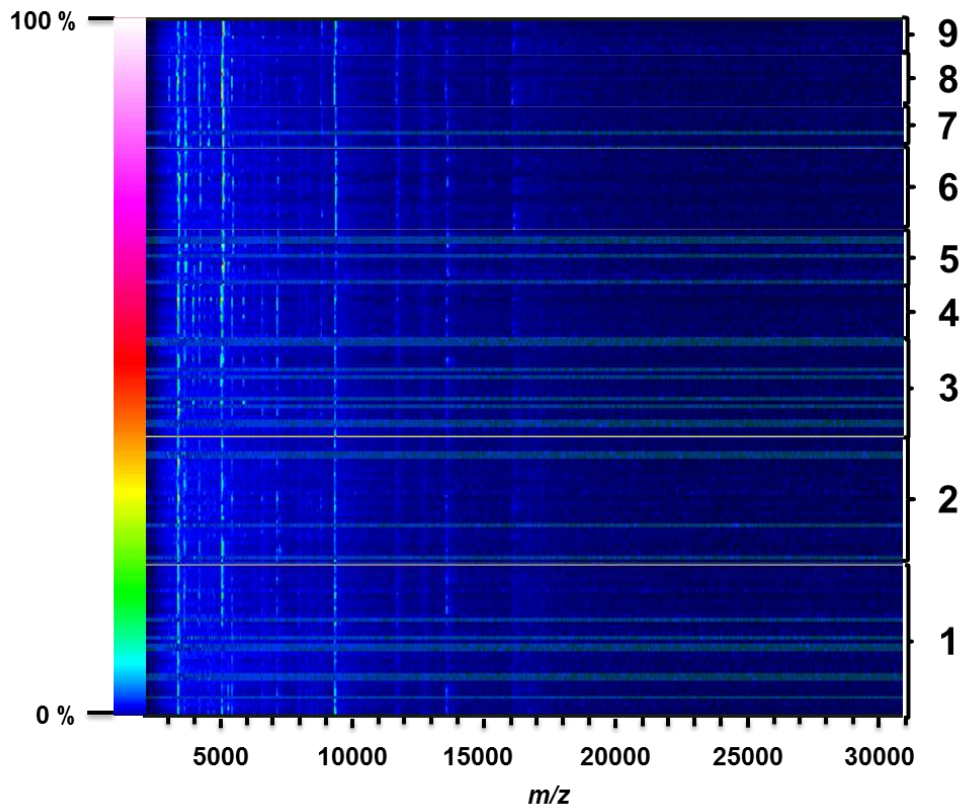


Figure 83. Représentation en deux dimensions de tous les spectres enregistrés dans les régions analysées sur les neuf coupes du ganglion 9.

Les spectres obtenus pour chacune des 9 coupes de ganglion ont ensuite été soumis à une analyse en composante principale (PCA) suivie d'une hiérarchisation des spectres en clusters. Les résultats de cette analyse statistique sont représentés sous forme d'un dendrogramme (**Figure 84a**). Cette classification des spectres met en évidence deux régions distinctes : la partie antérieure du ganglion représentée par les branches rouges et oranges et la partie éloignée de la lésion, plus postérieure, correspondant aux branches bleues et vertes (**Figure 84b**). Les résultats suggèrent qu'il existe des différences significatives en termes de nature et de nombre de peptides détectés. Cela pourrait s'expliquer par une production des peptides par les neurones qui résident près de la lésion ou par un transport des facteurs d'intérêt vers la région endommagée de la chaîne nerveuse.

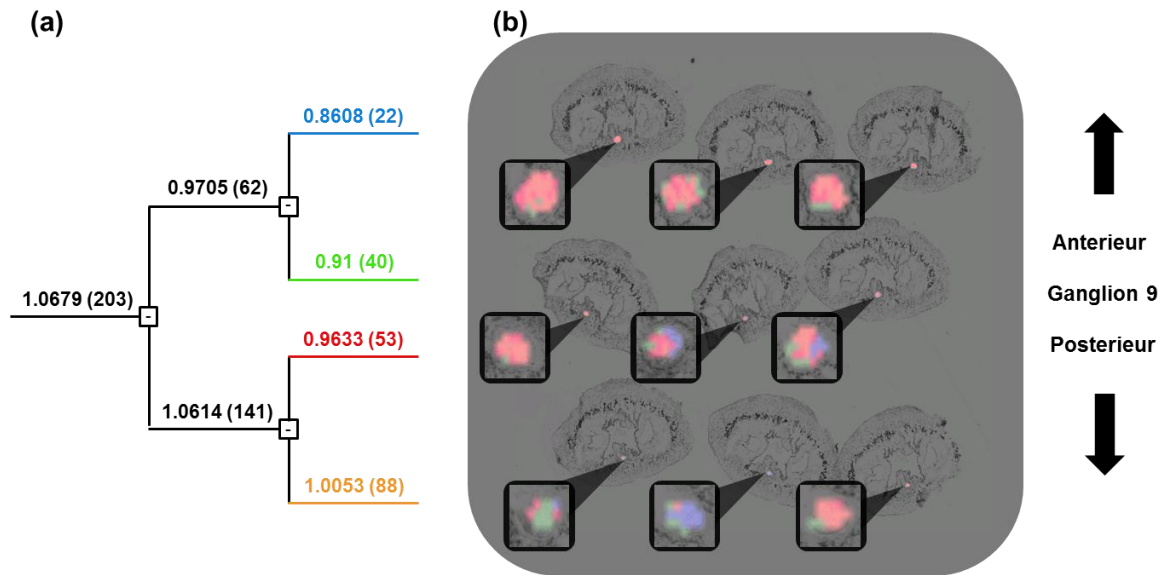


Figure 84. (a) Dendrogramme obtenu à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour les 9 coupes du ganglion 9. (b) Images reconstruites par superposition des branches sélectionnées du dendrogramme avec les images optiques des 9 coupes transversales de sangsue adulte au cours de la régénération.

Une étude plus approfondie a été menée afin de déterminer les peptides différemment distribués entre la partie antérieure et postérieure du ganglion et de vérifier si ces modifications de répartition sont liées à la régénération neuronale. Ainsi, une comparaison des images MALDI du ganglion 9 chez des animaux contrôle et en cours de régénération nerveuse a été effectuée. Trois catégories de peptides ont été mises en évidence. La première catégorie correspond aux peptides retrouvés à la fois dans le ganglion contrôle et dans le ganglion 6 heures après l'initiation de la régénération. Parmi ces peptides dits « constitutifs » les peptides mesurés à m/z 5566 ou à m/z 7246 (**Figure 85a**) sont retrouvés. D'autres peptides (*e.g.* m/z 5415 et m/z 6018) sont mis en évidence sur toutes les coupes du ganglion contrôle alors que dans le ganglion appartenant à la chaîne nerveuse lésée, ces peptides sont détectés uniquement dans la partie antérieure, près de la lésion (**Figure 85b**). Enfin, des peptides, tels que ceux mesurés à m/z 2475 et m/z 3501, sont uniquement retrouvés dans le ganglion au cours de la régénération nerveuse (**Figure 85c**). D'après ces observations, il semblerait donc que certains facteurs soient recrutés ou produits près du site de lésion pour intervenir dans les processus enclenchés dans la régénération nerveuse (**Tableau 10**).

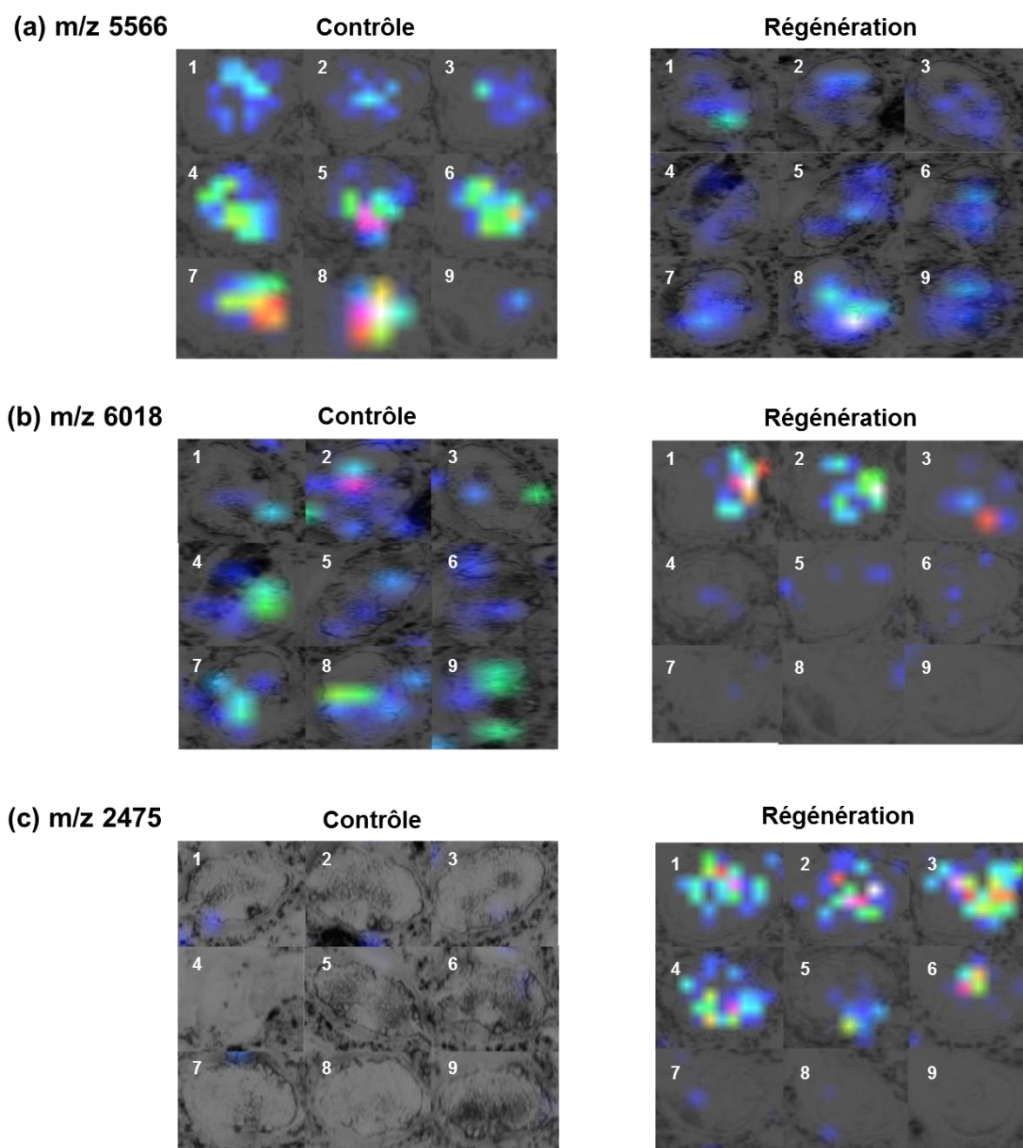


Figure 85. Distribution selon l'axe antéropostérieur (coupes numérotées de 1 à 9) des peptides (a) m/z 5566, (b) m/z 6018 et (c) m/z 2475 au sein du ganglion 9 de chaîne nerveuse contrôle et lésée.

Coupes m/z	20 µm		10 µm		20 µm		10 µm		20 µm		10 µm		20 µm		10 µm		20 µm	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9									
2475																		
3300																		
3501																		
3561																		
4074																		
4115																		
4520																		
4733																		
5105																		
5415																		
5566																		
5997																		
6018																		
6694																		
7246																		
7249																		
7305																		
11752																		
13684																		
16221																		
16417																		

Tableau 10. Distribution de quelques peptides du SNC de la sangsue en fonction de la position de la lésion. (Rouge : Peptides « constitutifs », Bleu : Peptides recrutés près du site de lésion au cours de la régénération, Vert : Peptides retrouvés uniquement au cours de la régénération).

La chaîne nerveuse étant entourée par un sinus veineux ventral, il est important de savoir si les facteurs détectés au niveau du site lésé pourraient dériver des cellules sanguines plutôt que du système nerveux lui-même. Dans ce contexte, une expérience d'imagerie MALDI associée à une analyse statistique, combinant PCA et classification hiérarchique, ont été entreprises sur une région incluant le ganglion 9 et le sinus ventral. Le dendrogramme a permis de distinguer deux classes de spectres avec des profils distincts. La branche rouge présente les spectres associés aux cellules du système nerveux alors que la branche verte correspond aux spectres acquis dans le sinus veineux.

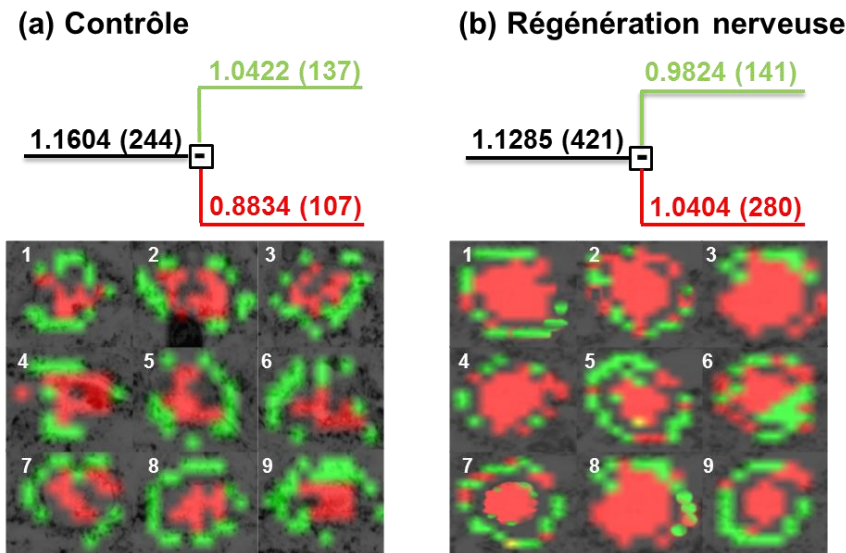


Figure 86. Dendrogrammes obtenus à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour les 9 coupes transversales réalisées au niveau du ganglion 9 et images correspondantes pour la sangsue adulte (a) contrôle et (b) au cours de la régénération.

Au cours de la régénération nerveuse, les distributions des deux profils peptidiques, notamment dans les coupes 5 et 6 du ganglion 9, suggèrent que les cellules du sinus veineux participent également, par migration vers le ganglion, au processus de régénération (**Figure 86b**). Cette hypothèse semble être confirmée par l'observation de deux profils peptidiques distincts, mis en évidence soit dans le sinus ventral, soit dans le ganglion, dans toutes les coupes de la sangsue contrôle (**Figure 86a**). Ces résultats corroborent l'idée que plusieurs classes de cellules puissent participer au processus de régénération, y compris les neurones, la microglie et les cellules sanguines. En effet, à chaque étape de la régénération nerveuse, différentes classes de molécules pourraient être impliquées grâce à la communication entre ces cellules. En effet, des études récentes ont montré que, les cellules sanguines telles que les hémocytes étaient en mesure de produire des facteurs neurotrophiques (*e.g. Hm-lumbricine, Hm-theromyzine et Hm-theromacine*)^{222, 223}. La somme de ces observations plaide en faveur d'un rôle important des cellules sanguines dans la régénération neuronale en corrélation avec les cellules microgliales résidentes et les neurones²²⁴⁻²²⁶.

3.4.2. Etude du peptidome au cours de la neurogénèse

Chez la sangsue adulte, la capacité à réparer la chaîne nerveuse après une lésion pourrait s'expliquer par la présence continue et/ou la réexpression de facteurs embryonnaires utilisés dans la croissance et la maturation neuronale. En effet, au cours de la neurogénèse et de la

synaptogénèse, chez les vertébrés et les invertébrés, les neurones établissent un réseau complexe de connexions nerveuses en faisant appel à de nombreuses familles de molécules. Des expériences d'imagerie MALDI ont été réalisées sur des embryons de sangsue âgés de 12 jours afin d'établir une comparaison des molécules impliquées dans la neurogénèse avec celles mises en évidence dans le processus de régénération neuronale.

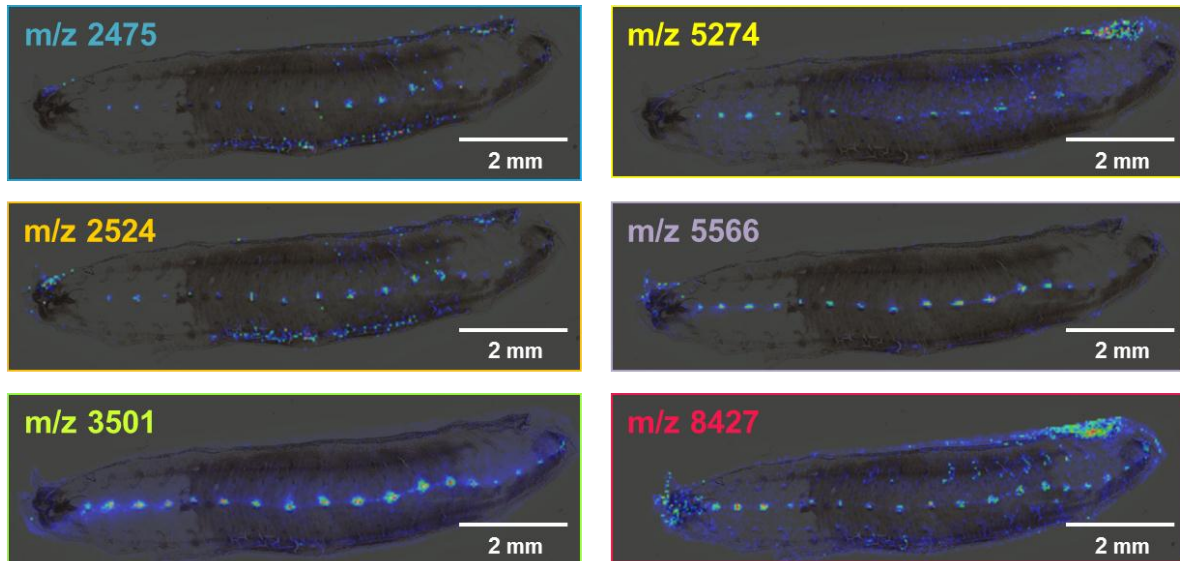


Figure 87. Distribution de peptides au sein du SNC chez l'embryon de sangsue au stade J12.

Certains peptides, tels que ceux mesurés à m/z 2524 ou à m/z 8427, ont été mis en évidence au niveau de la chaîne nerveuse uniquement chez l'embryon. Il semble donc qu'ils soient spécifiques du processus de neurogénèse. En revanche, le peptide m/z 5566 est un peptide constitutif puisqu'il est retrouvé au niveau du système nerveux central de la sangsue lors de son développement et à l'âge adulte dans des conditions physiologiques et au cours de la régénération neuronale (**Figures 85a et 87**). Enfin, les peptides m/z 2475 et m/z 3501 spécifiquement détectés au niveau des ganglions segmentaires situés près de la lésion chez la sangsue adulte, ont été détectés dans le SNC au cours de la neurogénèse (**Figures 85c et 87**). Ces résultats laissent penser que le recouvrement total des fonctions physiologiques à la suite de la régénération du système nerveux chez la sangsue adulte fait appel à des mécanismes déjà mis en jeu lors de la neurogénèse.

De nouveaux outils statistiques ont permis de traiter plus aisément le nombre important de données générées par les expériences d'imagerie MALDI et d'extraire plus facilement les

informations d'intérêt pour notre recherche^{115, 116}. Pour cela, la première méthode d'analyse statistique a consisté à définir la région d'intérêt (ROI), la chaîne nerveuse, en se basant sur les caractéristiques morphologiques puis à mettre en évidence, grâce au logiciel, uniquement les m/z spécifiques de cette ROI (**Figure 88a**). La deuxième approche a permis, quant à elle, de rechercher à partir d'un spectre de référence, des régions identiques en termes de contenu moléculaire, sans connaissance morphologique préalable, puis d'indiquer les molécules caractéristiques de ces régions (**Figure 88b**). Ainsi, lors de l'utilisation de ces outils statistiques, la distribution des peptides précédemment détectés au niveau du SNC de l'embryon de sangsue a été confirmée et de nouveaux peptides spécifiquement localisés au niveau des ganglions segmentaires ont pu être repérés.

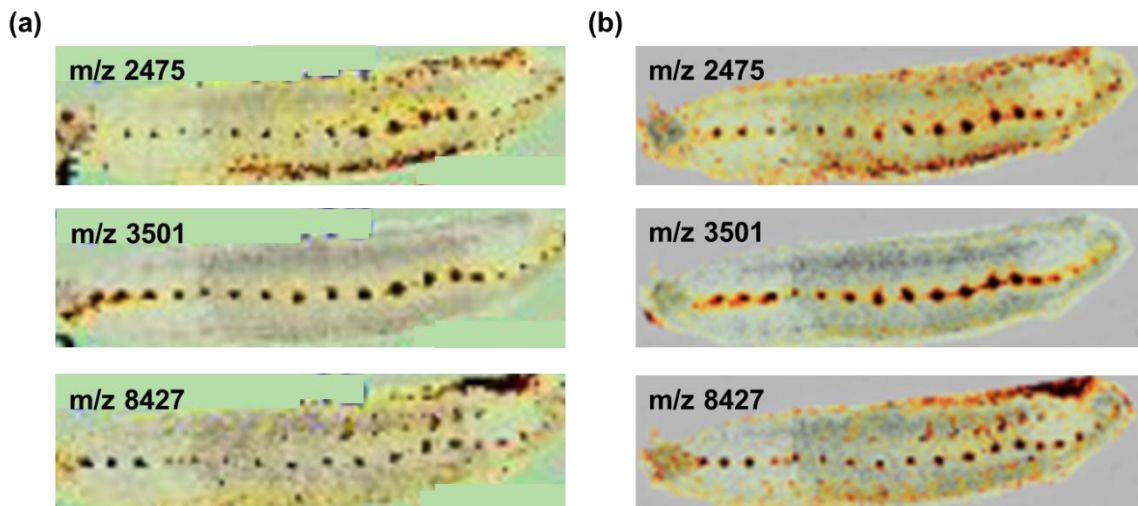


Figure 88. (a) Exemples de peptides mis en évidence par le test statistique *rho* dans le système nerveux central de l'embryon de sangsue, défini préalablement comme ROI. (b) Peptides spécifiques de régions présentant les mêmes profils moléculaires, les ganglions segmentaires, chez l'embryon de sangsue.

Une identification de ces peptides d'intérêt a été envisagée. Pour cela, une extraction a été réalisée sur 39 embryons de sangsue. L'extrait a été séparé par chromatographie liquide en phase inverse (RP nanoLC) puis soumis à une analyse MS par ESI-QTOF. Les pics correspondant aux m/z d'intérêt, tels que le peptide mesuré à m/z 2475, ont été sélectionnés (**Figure 89a**). L'analyse en mode MS/MS combinée à l'interrogation des banques de données d'EST de sangsue ont permis de séquencer le peptide m/z 2475. L'interrogation des banques de données NCBI a montré que ce peptide n'était pas connu. Les fortes similarités du peptide m/z 2475 avec les protéines de la classe des filaments intermédiaires ont conduit à nommer ce

peptide *HmIF4*, dont la séquence N-terminale est GTRTMERSVVRTSSQYASGGPMPN (Figure 89b). Ce peptide pourrait jouer un rôle dans la guidance axonale. Une expérience d'hybridation *in situ* réalisée avec la sonde créée à partir de la séquence retrouvée par l'analyse en MS/MS a permis de valider la distribution du peptide m/z 2475 dans la chaîne nerveuse de l'embryon de sangsue (Figure 89c).

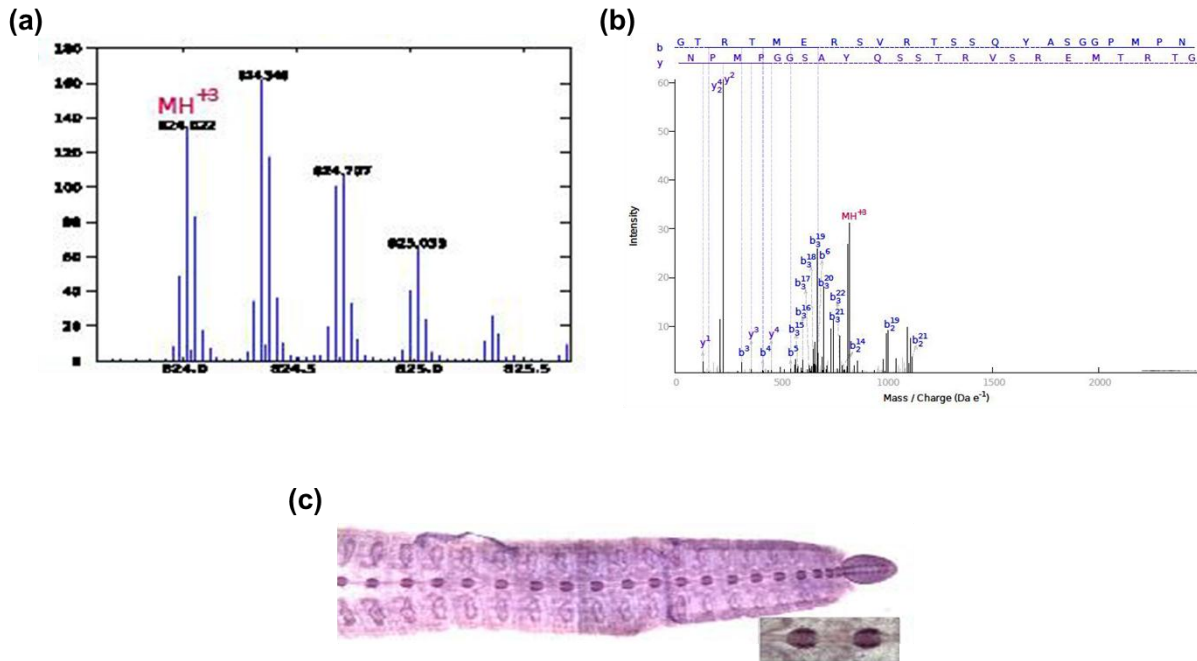


Figure 89. (a) Spectre de masse ESI-QTOF de l'ion m/z 2475. (b) Spectre de masse MS/MS annoté de l'ion m/z 2475. (c) HIS réalisée sur une coupe d'embryon de sangsue au stade J12 avec la sonde *HmIF4*.

3.5. Conclusion

L'imagerie MALDI est une technique permettant d'accéder à un grand nombre de molécules grâce à une approche non ciblée, tout en établissant leur distribution dans une coupe de tissu, c'est-à-dire en donnant accès à la dynamique de ces molécules au sein d'un organe. C'est pourquoi, l'imagerie MALDI a été employée afin d'identifier les peptides impliqués dans le processus de régénération neuronale chez la sangsue adulte. En effet, bien que certains peptides sont impliqués dans la maintenance générale du tissu, d'autres peptides, tels que les facteurs neurotrophiques, jouent un rôle clé dans le rétablissement du réseau de connections nerveuses^{224, 226-228}.

Dans la gamme de masse restreinte des peptides, les spectres de masse enregistrés en chaque position contiennent des centaines de pics qui pourraient se révéler intéressants. Le critère de sélection des pics méritant une analyse plus approfondie est la présence d'une différence significative dans l'expression du peptide entre les SNC contrôle et régénérant. Afin d'analyser la quantité considérable de données produites par l'expérience MALDI et faciliter la mise en évidence des peptides d'intérêt, l'ensemble des données a été soumis à une analyse en composante principale suivie de la classification hiérarchique des spectres.

Ainsi, en combinant imagerie MALDI et analyse statistique sur des ganglions contrôle et en cours de régénération, une modification des profils peptidiques a pu être mise en évidence. Dans le cas d'une blessure au niveau des connectifs, une accumulation de peptides dans le ganglion à proximité du site endommagé semble survenir. Ces peptides pourraient donc être requis pour la mise en place du processus de réparation.

Une étude étendue au sinus veineux a laissé entrevoir une modification de la classification des spectres pour le ganglion du SNC en cours de régénération. Cette observation évoque une possible migration de certains peptides des cellules sanguines vers le SNC qui pourraient être engagés dans le mécanisme de régénération neuronale. Ces résultats suggèrent que ce processus complexe fait intervenir différents types cellulaires.

La comparaison des profils moléculaires obtenus pour les ganglions chez la sangsue adulte après une lésion et chez l'embryon de sangsue âgé de 12 jours a confirmé la réexpression de facteurs embryonnaires lors de la réparation de la lésion neuronale, tel que le peptide mesuré à m/z 2475 et récemment identifié comme un nouveau membre de la famille des filaments intermédiaires, *HmIF4*. Ce constat valide l'hypothèse d'une reprise des programmes mis en place lors de la neurogénèse pour initier la régénération neuronale chez la sangsue adulte.

La comparaison des réponses à une blessure au niveau du SNC chez la sangsue médicinale et chez les mammifères pourrait être exploitée pour comprendre les raisons de la capacité limitée de régénération neuronale et également pour contribuer au renforcement artificiel de cette aptitude chez les mammifères.

4. Etude d'une neuropathie: l'épilepsie

4.1. Introduction

Le cerveau, l'organe le plus complexe du corps humain, est comparable à un vaste réseau de communication. La rupture d'une de ses branches peut entraîner des anomalies du fonctionnement et des troubles mentaux. De nos jours, en France, 500000 cas d'épilepsie sont recensés et la schizophrénie touche 1% de la population. A ces troubles, il faut ajouter les maladies neurodégénératives (MND) telles que la maladie d'Alzheimer et de Parkinson dont 900000 et 120000 personnes sont atteintes, ce qui représente environ 7 % des personnes âgées de plus 60 ans. A l'heure actuelle, aux vues de l'impact que ces troubles neurologiques ont sur notre société, la recherche de traitements efficaces constitue un réel défi. Cependant, avant de développer de nouvelles thérapies, une meilleure compréhension des processus impliqués dans la dégénérescence nerveuse est une nécessaire. C'est pourquoi, la caractérisation des protéomes de cerveaux sains et atteints de pathologie cérébrale a été l'un des cinq engagements pris par HUPO (Human Proteome Organization)^{229,230}.

Parmi les maladies neurologiques, l'épilepsie est la plus fréquente. L'épilepsie se caractérise par une hyperactivité cérébrale et peut survenir à tout âge. Cependant, chez les personnes âgées, l'augmentation des accidents vasculaires cérébraux ou cas de MND accroît le risque d'apparition de crise d'épilepsie. Bien qu'il existe de nombreux types d'épilepsie, l'épilepsie du lobe temporal (TLE) est probablement, chez l'Homme la plus courante et la plus souvent étudiée. Malgré une richesse de données descriptives obtenues à partir de l'historique de la maladie des patients, de l'enregistrement électroencéphalographique, des techniques d'imagerie et des études histologiques, le processus épileptogène reste mal compris. La TLE résulte de la mort de cellules neuronales, de la perte de neurone, de la neurogénèse ou de la modification de la propagation des circuits neuronaux²³¹. Or, il est peu probable qu'un facteur unique ou qu'un mécanisme unique puisse être à l'origine des nombreux changements liés à cette neuropathie.

D'un point de vue moléculaire, la compréhension des systèmes biologiques nécessite une énorme quantité d'informations provenant des sciences en "omiques ». L'imagerie MALDI, de par sa capacité à étudier une large gamme de molécules, semble être adaptée à l'établissement des profils moléculaires dans l'étude de l'épilepsie. Les informations obtenues permettront de cibler les mécanismes impliqués dans la TLE afin d'effectuer un diagnostic

précoce ou de générer des thérapies appropriées pour la réparation des traumatismes et la récupération fonctionnelle de l'hippocampe.

4.2. Présentation du modèle d'étude

4.2.1. Présentation de l'épilepsie du lobe temporal (TLE)

L'épilepsie est un désordre neurologique chronique caractérisé par des crises récurrentes. Elle est l'expression d'un fonctionnement anormal, aigu et transitoire de l'activité électrique d'une zone cérébrale et est définie cliniquement par la survenue d'au minimum deux crises ²³². Différentes régions du cerveau peuvent être en cause, dépendamment du type de syndrome épileptique. Les travaux effectués au cours de cette thèse se sont concentrés sur l'épilepsie du lobe temporal qui implique une région bien particulière du cerveau, l'hippocampe ²³³⁻²³⁵. La TLE est la forme la plus fréquente de la maladie (40%) et difficile à traiter. Dans la majorité des cas, la TLE est réfractaire à un traitement médicamenteux et il est alors possible de recourir à la chirurgie ²³⁶. Les traitements chirurgicaux permettent d'abolir 80 à 90% des crises chez les patients atteints de TLE. La sclérose de l'hippocampe liée la TLE peut être due à une blessure cérébrale, une tumeur, une méningite, une encéphalite, une crise durant l'enfance ²³⁷⁻²⁴⁵. La TLE est souvent associée à une sclérose de l'hippocampe caractérisée par une perte des neurones pyramidaux et une gliose dans les régions 1 et 3 de la corne d'Ammon.

4.2.2. Présentation de l'hippocampe

L'hippocampe appartient au système limbique. Il s'agit d'une structure paire, présente de manière symétrique dans chaque hémisphère du cerveau, au niveau du lobe temporal médian (**Figure 90**). L'hippocampe peut être divisé en deux grandes sous parties, l'hippocampe ventral et l'hippocampe dorsal, plus particulièrement affecté par la TLE.

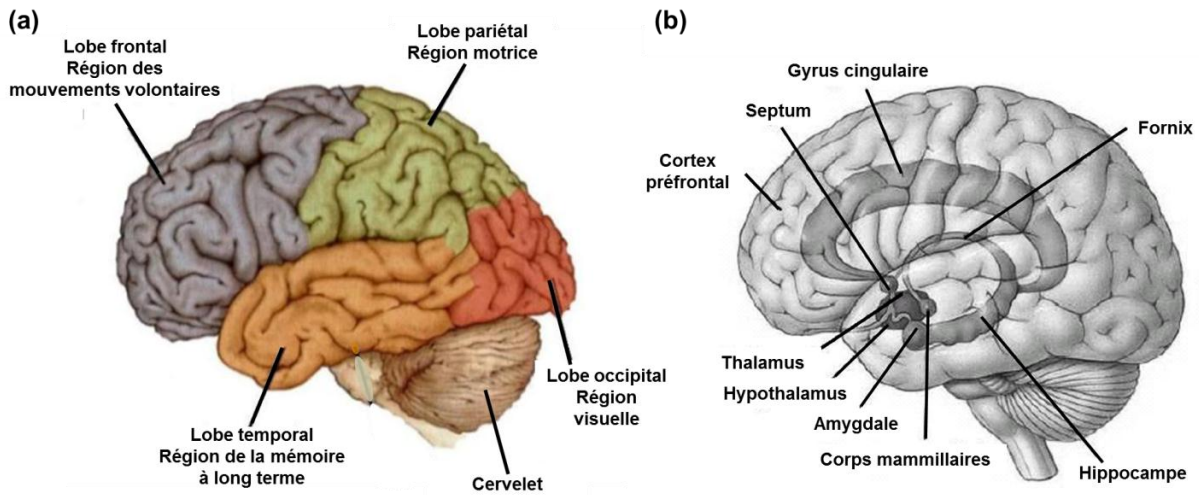


Figure 90. Représentations schématiques (a) des divisions de l'encéphale et (b) du système limbique.

Chez les mammifères, l'hippocampe dorsal est constitué de trois structures distinctes : La corne d'Ammon, le subiculum et le gyrus denté. Cette formation hippocampique apparaît comme une structure courbée (**Figure 91a**).

La corne d'Ammon est subdivisée en quatre aires appelées champs ammoniques (CA1, CA2, CA3 et CA4). Le CA1 constitue la région supérieure tandis que CA2, CA3 et CA4 forment la région inférieure. Différentes strates composent ces champs. La couche pyramidale, très dense, contient les somas des cellules pyramidales glutamatergiques, dont l'axone quitte la structure hippocampique pour rejoindre le subiculum. Les dendrites apicales de ces cellules passent dans la couche *stratum radiatum* avant de s'étendre dans une couche moléculaire du gyrus denté (*stratum moleculare*) où sont localisés des interneurons cholinergiques²⁴⁶. Les dendrites basales se projettent dans la couche *stratum oriens*. L'extrémité de la corne d'Ammon, constituée des CA3 et CA4, s'enfonce dans le gyrus denté. Le gyrus denté, également appelé *Fascia dentata*, est interposé entre la région parahippocampique et la fimbria. Cette structure est constituée de trois couches, une couche de cellules granulaires glutamatergiques dont les corps cellulaires séparent une couche interne, le hile ou la couche polymorphe, et une couche externe, la couche moléculaire. Les axones des cellules granulaires, nommées fibres moussues, convergent vers le hile, alors que les dendrites, rayonnant dans la couche moléculaire, reçoivent les afférences du septum et du cortex entorhinal^{247, 248} (**Figures 91b et c**).

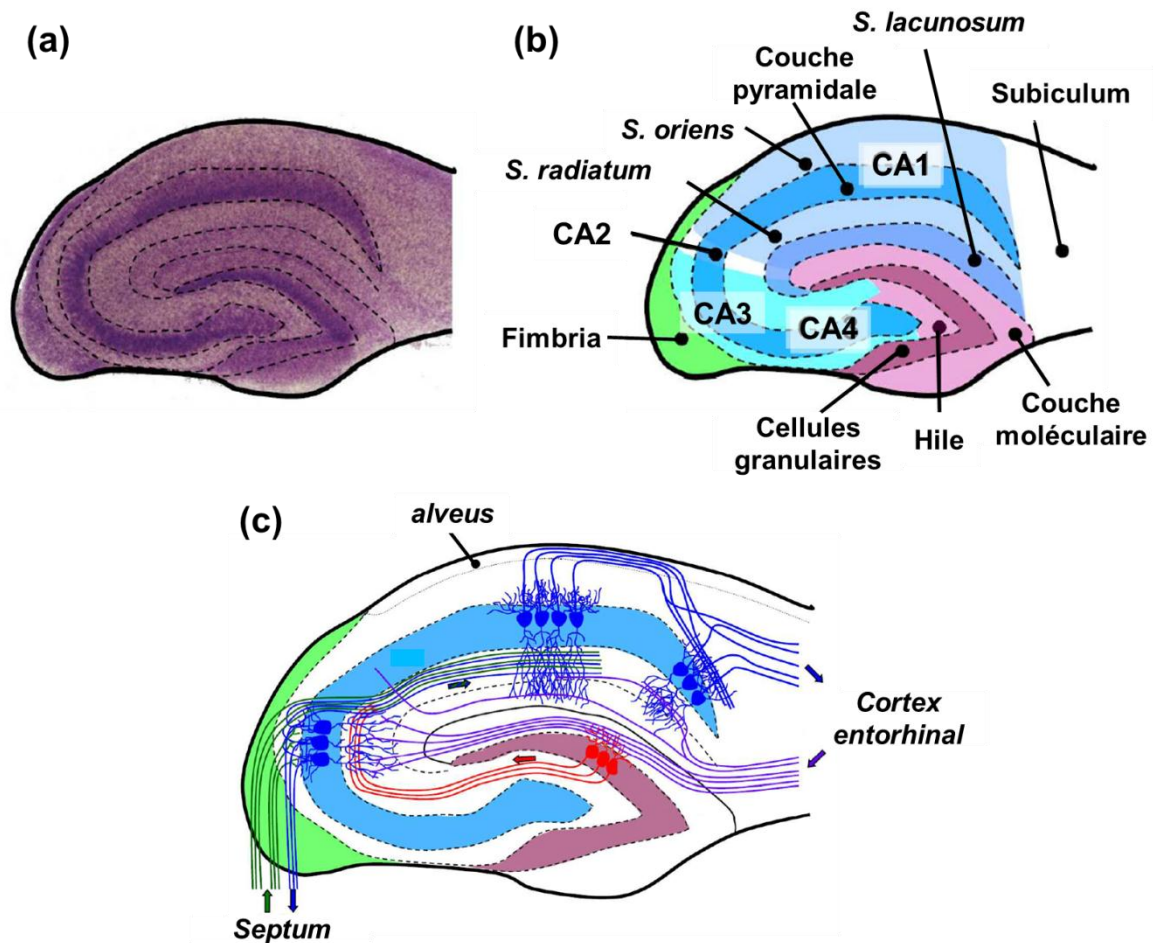


Figure 91. (a) Coloration d'une coupe coronale d'hippocampe au violet de crésyl. (b) Représentation schématique des différentes couches de l'hippocampe dorsal : Les champs ammoniques (CA) (bleu), le gyrus denté (violet) et la fimbria (vert). (c) Représentation schématique des principales connexions ipsilatérales et internes à l'hippocampe ²⁴⁹.

L'hippocampe a un rôle central dans la consolidation de la mémoire épisodique et dans la navigation spatiale. Une lésion de cette structure peut donc entraîner des problèmes d'amnésie et de désorientation (*e.g.* Alzheimer). Ce processus de mémorisation nécessite un circuit neuronal associant les zones du cortex cérébral, passant par le cortex entorhinal (région parahippocampique), continuant à travers le subiculum et revenant aux régions corticales via le cortex entorhinal. Dans l'hippocampe, les neurones assurant la transmission de l'information au sein de ce circuit trisynaptique sont les cellules granulaires du gyrus denté et les cellules pyramidales des régions CA1 et CA3. En effet, les axones du cortex entorhinal représentent la voie d'entrée de l'information dans l'hippocampe puisqu'ils sont en contact avec les cellules granulaires du gyrus denté. Les fibres moussues sont envoyées massivement vers les cellules pyramidales du CA3. Les axones des cellules pyramidales du CA3 se projettent ensuite vers les cellules pyramidales du CA1. Les axones de ces dernières repartent

ensuite vers le subiculum et le cortex entorhinal afin de stocker définitivement l'information au niveau du cortex cérébral. Des modifications dans l'efficacité de ce circuit neuronal sont nécessaires pour la formation de l'apprentissage déclaratif et spatial dans l'hippocampe.

L'hippocampe présente une activité de neurogénèse chez l'individu adulte ^{250, 251}. Cette production de nouveaux neurones fonctionnels a lieu au niveau de la zone sous granulaire du gyrus denté. Ces neurones sont destinés à rester dans le gyrus denté. Dans la zone sous granulaire du gyrus denté, les progéniteurs neuronaux peuvent proliférer et se différencier en neuroblastes. Les neuroblastes migrent ensuite vers la couche granulaire et se différencient en neurones granulaires qui étendent leurs dendrites et leur axone dans le réseau préexistant. Nombre d'entre eux ne persistent pas jusqu'à maturation et sont éliminés afin de conserver un nombre de neurones constant. L'épilepsie pourrait être liée à une altération de la neurogénèse adulte ²⁵².

4.3. Etude histologique

Chez l'Homme, la réorganisation du réseau neuronal serait à l'origine des crises liées à la TLE ²⁵³. D'une part, les hippocampes de patients atteints de TLE, présentent une perte neuronale principalement dans les régions hilaire et granulaire du gyrus denté et les zones CA3 et CA4 alors que la région CA2 est relativement épargnée par cette perte de neurones. D'autre part, le nombre d'axones de cellules pyramidales dans le CA1 est augmenté dans l'épilepsie du lobe temporal humaine ^{254, 255}. Les axones de ces cellules aberrantes se projettent dans la couche pyramidale et la *stratum radiatum* de la région CA1. De même, les crises répétées d'épilepsie entraînent la pousse de fibres moussues dans le gyrus denté et donc la présence plus importante de synapse dans la couche moléculaire ²⁵⁶. Cette réorganisation du réseau neuronal peut contribuer à une hyperexcitabilité via une excitation accrue.

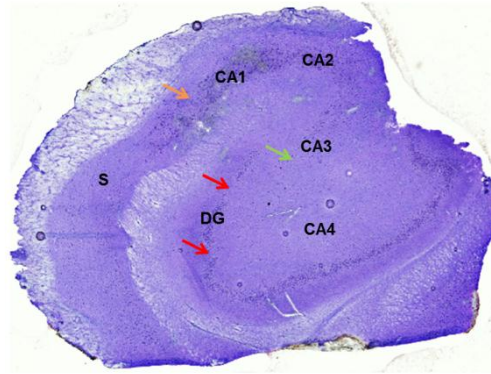


Figure 92. Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique colorée au bleu de toluidine : Corne d'Ammon (CA), Gyrus denté (DG) et Subiculum (S).

Une observation histologique des hippocampes de patients épileptiques a été réalisée. Pour cela, une coloration au bleu de toluidine a été effectuée sur les coupes d'hippocampes. La **Figure 92** présente les différentes structures retrouvées dans l'hippocampe. On peut observer une perte neuronale importante dans les champs CA4 et CA3 (flèche verte) ainsi qu'au niveau du subiculum. Cette perte massive de neurones dans le subiculum rend difficile la délimitation de cette structure. Une perte localisée de neurones est mise en évidence dans la région CA1 (flèche orange) et dans la couche granulaire du gyrus denté (flèches rouges). La distinction entre le CA4 et la couche hilare est difficilement réalisable à cause de la perte presque totale de neurones dans le champ CA4.

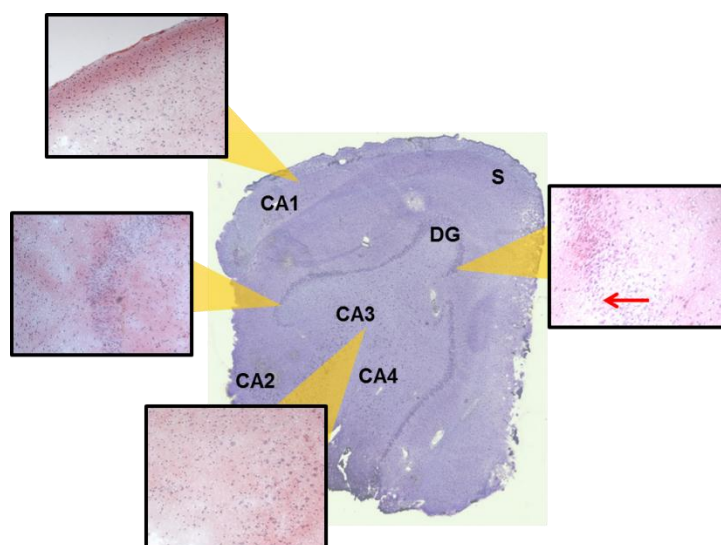


Figure 93. Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique colorée au bleu de toluidine : Corne d'Ammon (CA), Gyrus denté (DG) et Subiculum (S) et images microscopiques de 4 régions d'intérêt obtenues à partir d'une coupe sériée après coloration HES.

La réalisation de colorations au bleu de toluidine et HES sur des coupes sériées d'un hippocampe de patient épileptique a permis de mettre en évidence la perte neuronale dans le gyrus denté. En effet, l'agrandissement de cette région d'intérêt sur la coupe avec la coloration HES a montré l'absence de cellules granulaires sur une partie de cette structure (flèche rouge). Les agrandissements dans les régions CA1 et CA3 ont également permis de distinguer la présence de cellules pyramidales.

Des changements de l'organisation du réseau neuronal ont pu être mis en évidence sur les coupes d'hippocampes de patients épileptiques grâce à une simple coloration. Une étude au niveau moléculaire a donc été menée par la suite pour corrélérer les modifications histologiques et moléculaires.

4.4. Etude du peptidome

Des études récentes ont mis en évidence, au niveau de l'hippocampe, une altération de l'expression de certains peptides chez les patients épileptiques ²⁵⁷ tels que l'hormone thyroïdienne (TRH) et la neurokinine B ayant une action proconvulsive et le neuropeptide Y (NPY) ²⁵⁸, la galanine ou encore la dynorphine à l'action anticonvulsive ²⁵⁹. De plus, les études en transcriptomique ont révélé une augmentation prononcée d'ARNm de la prodynorphine dans le gyrus denté de patients atteints de TLE ²⁶⁰.

C'est pourquoi, dans un premier temps, une analyse du profil peptidique des hippocampes de patients atteints d'épilepsie a donc été envisagée. Pour cela, après dépôt de la matrice HCCA/ANI par micro-nébulisation, des spectres MALDI ont été enregistrés, en mode positif, en balayant l'ensemble de la coupe (**Figures 94a et b**).

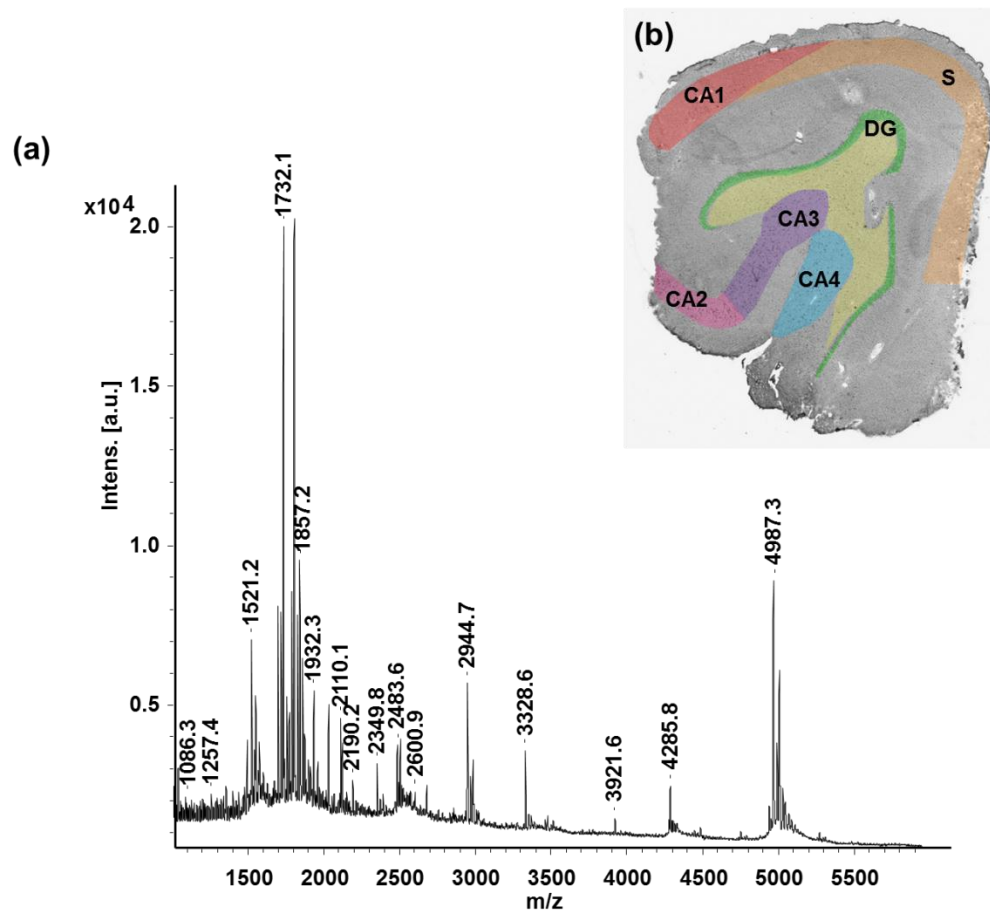


Figure 94. (a) Spectre de masse MALDI moyen enregistré à partir (b) d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique.

De nombreux peptides ont été détectés sur la gamme de masse m/z 1000-5000. Cependant, les peptides très faiblement présents dans l'hippocampe ou très localisés ne peuvent pas être mis en évidence sur le spectre moyen issu de l'acquisition de spectres dans les différentes régions de la coupe.

De plus, les différentes études menées ont démontré que le gyrus denté a un rôle important dans l'équilibre excitateur/inhibiteur du système limbique. Les cellules granulaires glutamatergiques sont des neurones excitateurs situés à l'entrée de l'hippocampe et jouent ainsi le rôle d'intermédiaires entre le cortex entorhinal et les cellules pyramidales des champs CA1 et CA3. Le gyrus denté est donc idéalement situé pour agir comme une porte régulant les influx nerveux entrant dans l'hippocampe²⁶¹. En effet, alors que de nombreux mécanismes existent dans le cerveau pour la régulation entre l'excitation et l'inhibition du signal nerveux, l'habileté du gyrus denté à contrôler l'excitation est très prononcée et robuste. Les perturbations de cette fonction de filtre ont des effets disproportionnés sur la balance

excitation/inhibition sur le système limbique. Pour cette raison, une grande partie des études portant sur la TLE s'est focalisée sur le gyrus denté ²⁶².

Ces observations ont conduit à réaliser des images moléculaires MALDI sur la région limitée au gyrus denté comprenant la couche moléculaire, la couche polymorphe et la couche granulaire. Afin de mettre en évidence le peptidome dans de fines structures, notamment la couche granulaire, la résolution spatiale choisie pour réaliser cette expérience d'imagerie MALDI était de 30 μm (**Figure 95a**).

Le peptide mesuré à m/z 1066.5 (**Figure 95b**) est localisé dans la couche hilare (S.mu) où sont positionnées les fibres moussues alors que le peptide m/z 2110.1 (**Figure 95d**) est retrouvé dans la couche moléculaire. Les distributions des ions m/z 2067.2 et m/z 2944.7 sont complémentaires puisqu'ils sont, respectivement, mis en évidence au niveau des cellules granulaires et dans les couches hilare et moléculaire (**Figures 95c et e**). L'ion m/z 3328.6 est, quant à lui, spécifiquement détecté dans un groupe de cellules de la couche hilare du gyrus denté (**Figure 95g**). D'autres peptides, dont quelques exemples sont présentés dans le **Tableau 11**, ont montré une localisation particulière dans le gyrus denté.

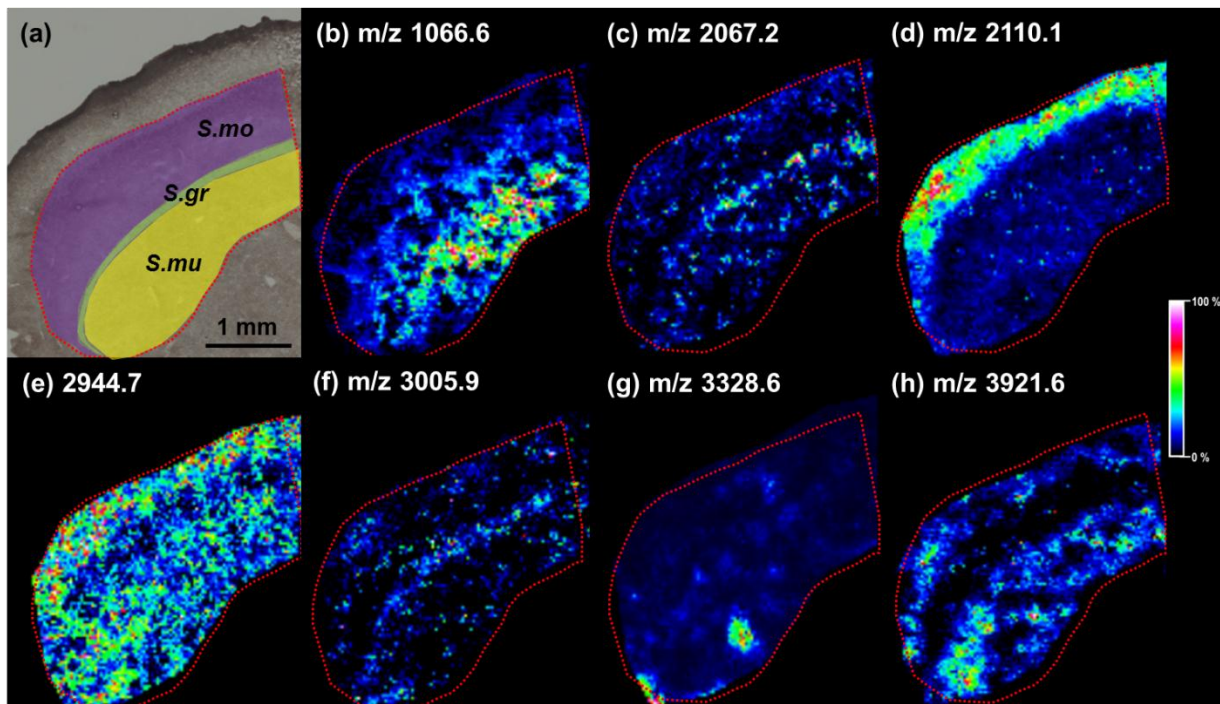


Figure 95. Distribution des peptides dans les différentes couches du gyrus denté de patients épileptiques : Couche hilare (S.mu), couche granulaire (S.gr) et couche moléculaire (S.mo).

Couches m/z	Stratum moleculare	Stratum granulare	Stratum multiforme
1066.5			
1210.4			
1230.5			
1256.5			
1356.5			
1637.5			
2030.1			
2067.2			
2110.1			
2944.7			
3005.9			
3155.1			
3328.6			
3476.4			
3921.6			
4938.6			

Tableau 11. Distribution de quelques peptides au sein du gyrus denté de patients épileptiques (Violet : Peptides détectés, Blanc : Peptides non détectés).

L'étape suivante a consisté à identifier les peptides présents dans l'hippocampe. L'identification des peptides a été réalisée soit par interrogation d'une banque de données de peptides²⁶³ ou soit par MS/MS. Ainsi, la comparaison des valeurs de m/z avec les données de la banque Swepep suggère que le peptide mesuré à m/z 3155.1 localisé dans la couche granulaire du gyrus denté pourrait être la galanine. De même, le peptide mesuré à m/z 1210.4 présentant la même distribution pourrait correspondre à la neurokinine B.

La validation de l'identification des peptides passe par une analyse en mode MS/MS. Afin de pouvoir isoler les ions qui sont détectés dans des zones restreintes de la coupe, l'analyse MS/MS des peptides a directement été réalisée sur le tissu aux positions qui leur sont associées.

L'analyse en mode MS/MS de l'ion m/z 1101.4 (**Figures 96a et b**) a permis d'obtenir la séquence partielle TAHYGSL. L'interrogation de la banque de données Swepep a révélé que ce peptide n'était pas connu. Une recherche par similarité de séquence a ensuite été effectuée par alignement de la séquence sur la banque de données de protéines NCBI. Ce peptide a ainsi été identifié comme un fragment de la protéine myelin basic protein (MBP isoforme g) (**Figure 96c**). Afin de confirmer ce résultat, le spectre a été annoté à l'aide du logiciel Sequence Editor (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) qui permet d'attribuer les ions de séquence sur le spectre MS/MS à partir de la séquence trouvée par interrogation de la banque de données. On constate que les ions les plus intenses correspondent aux ions y et b, ce qui

confirme la séquence et l'identification de ce fragment (**Figure 96d**). De précédents articles ont montré un phénomène de démyélinisation des fibres nerveuses au niveau de l'hippocampe chez les animaux modèles de l'épilepsie^{264, 265}. Le fragment m/z 1101.4 de la protéine MBP pourrait donc être issu de la dégradation des gaines de myéline de ces neurones. Cette hypothèse est étayée par l'observation histologique qui a mis en évidence une perte massive de neurones dans certaines régions de l'hippocampe. Pour valider ces résultats, une comparaison pourrait être envisagée entre les hippocampes de patients sains et épileptiques. Néanmoins, signalons que la MBP est un substrat de l'Endothelin Converting Enzyme-1 (ECE-1) qui est elle-même connue pour jouer un rôle important dans la pathologie. En effet, le traitement d'inhibiteur de l'ECE-1 semble être une voie thérapeutique prometteuse pour cette pathologie.

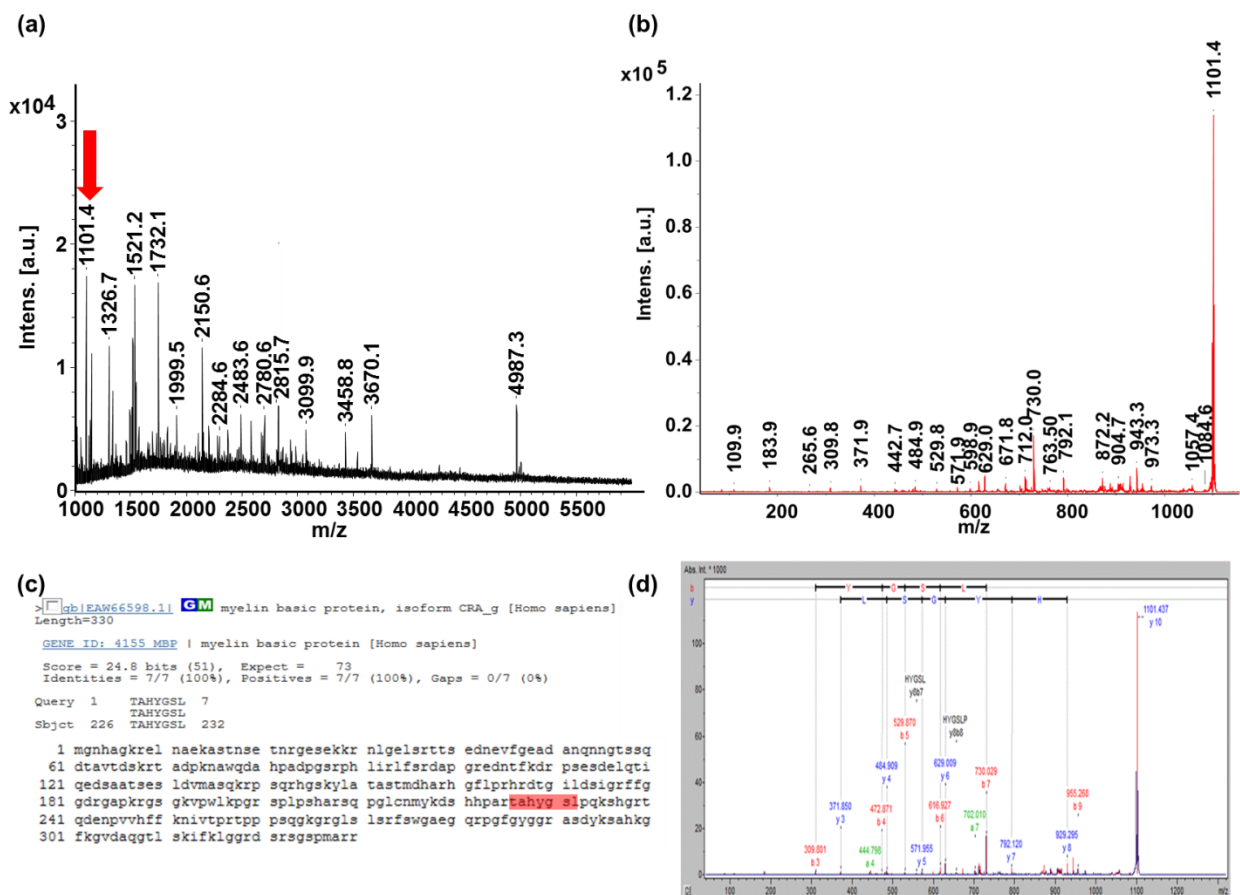


Figure 96. (a) Spectre de masse MALDI enregistré dans la région du subiculum. (b) Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1101.4. (c) Résultat de l'interrogation de la banque de protéines NCBI. (d) Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1101.4 annoté avec la séquence trouvée par interrogation des banques de données NCBI.

En outre, le spectre MS/MS de l'ion m/z 1101.4 fait apparaître l'ion fragment m/z 183.9, ce qui laisse présager la présence d'un groupement phosphocholine (**Figure 96b**). Cette observation suggère que deux espèces présentant une masse très proche et indiscernable avec le pouvoir résolutif de l'appareil ont été sélectionnées puis fragmentées. L'image MALDI de la répartition de l'ion m/z 1101.4 dans le gyrus denté semble confirmer cette explication (**Figure 97**). En effet, la région hilare dans laquelle cet ion est localisé n'est constituée que de fibres moussues non myélinisées. Le résultat de l'image MALDI qui, à première vue, paraît donc aberrant pourrait s'expliquer par la sélection d'un lipide très proche en masse. L'utilisation d'un appareil présentant un pouvoir résolutif élevé, type Orbitrap, pourrait permettre de différencier ces deux espèces et d'obtenir ainsi la distribution réelle de de fragment de myéline mesuré à m/z 1101.4.

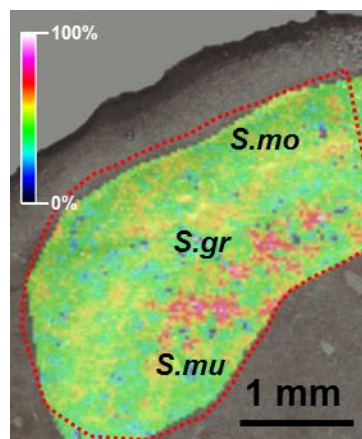


Figure 97. Répartition de l'ion m/z 1101.4 dans le gyrus denté.

L'identification des peptides par séquençage *de novo* reste difficile, d'autant plus sur coupe, car la quantité d'espèces extraites à partir du tissu est faible et la région d'acquisition est restreinte. L'identification des autres peptides mis en évidence sur les coupes d'hippocampes est en cours.

4.5. Etude du protéome

Des modifications dans l'expression des protéines ont été illustrées dans de nombreuses neuropathies telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, d'Huntington ou encore de Creutzfeldt-Jacob²⁶⁶. Les études protéomiques sur des biopsies de cerveau de patients atteints de ces maladies ont permis d'obtenir des informations sur des cibles thérapeutiques d'intérêt²⁶⁷⁻²⁶⁹. Dans l'épilepsie du lobe temporal, de précédentes études ont mis en évidence des expressions aberrantes des protéines du cytosquelette, des protéines chaperonnes et de la MAP Kinase Kinase 1²⁷⁰.

Comme présenté dans le paragraphe 2.2.4, la matrice ionique solide (SIM) SA/ANI est une matrice adaptée à l'imagerie des protéines solubles. Combinée à la micro-nébulisation, cette matrice permet d'obtenir des images avec une bonne résolution spatiale. La matrice SA/ANI a donc été appliquée, par micro-nébulisation, sur des coupes d'hippocampes humains épileptiques. Grâce à la cristallisation fine et homogène obtenue après la nébulisation de la matrice SA/ANI, la reconstruction des images a été réalisée avec une résolution spatiale de 100 μm , permettant ainsi de visualiser correctement la distribution des ions au sein des structures fines du tissu.

Les spectres enregistrés sur la gamme de masse m/z 2000-30000 présentent de nombreux pics intenses avec un bon rapport signal sur bruit. Les images moléculaires de quelques protéines solubles sont présentées **Figure 98**. Ainsi, la protéine mesurée à m/z 5501.8 est retrouvée au niveau du gyrus denté, tout comme la protéine mesurée à m/z 16802.7. Les ions mesurés à m/z 18215.2 et m/z 18220.3 sont, quant à eux, détectés au niveau du subiculum et de l'*alveus*. Dans la *stratum oriens*, il est possible d'observer la présence de la protéine mesurée à m/z 7088.9.

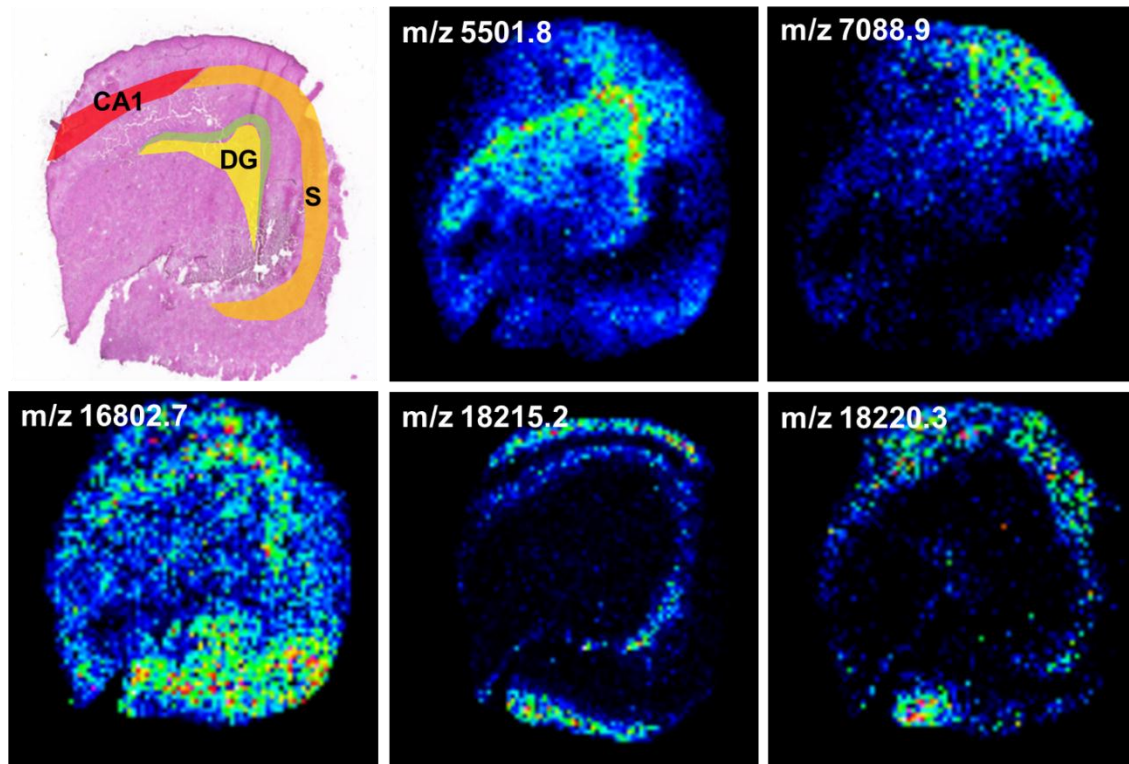


Figure 98. Image optique colorée par HES et annotée d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique et distributions des protéines au sein du tissu.

Cependant, l'objectif de cette étude était de mettre en évidence la localisation des protéines des hippocampes de patients épileptiques, tout en les identifiant. La première stratégie envisageable, le Top-Down, consiste à détecter les protéines intactes par MS sur coupe et à les caractériser par fragmentation dans le spectromètre de masse. Cependant, les méthodes d'activation de type ECD^{271, 272} ou ETD, permettant la fragmentation des protéines intactes, ne sont pas compatibles avec les sources MALDI car le nombre d'états de charge est généralement très faible même pour des espèces de très haut poids moléculaire. La seule approche en MALDI permettant la fragmentation des protéines intactes est l'In Source Decay (ISD)²⁷³. L'ISD pourrait s'apparenter à une dégradation d'Edman en phase gazeuse. Cependant, celle-ci n'est réellement efficace que si les protéines sont purifiées. Toutefois, une telle approche a été réalisée pour l'identification des protéines sur coupe, mais seuls les fragments des ions ISD de deux protéines très majoritaires ont pu être détectés^{72, 274}. La seconde stratégie permettant la localisation et l'identification simultanées sur coupe est le Bottom-Up^{74, 92, 275}. Dans ce cas, les protéines sont détectées en se basant sur les fragments de digestion. Le seul inconvénient de cette stratégie est de ne pas pouvoir obtenir le PMF de chaque protéine. Leur identification passe donc par des étapes de MS/MS sur coupe des fragments de digestion.

La deuxième stratégie a donc été appliquée pour l'étude des protéines des hippocampes de patients épileptiques. Pour cela, une micro-nébulisation de la trypsine puis de la matrice HCCA/ANI a été effectuée.

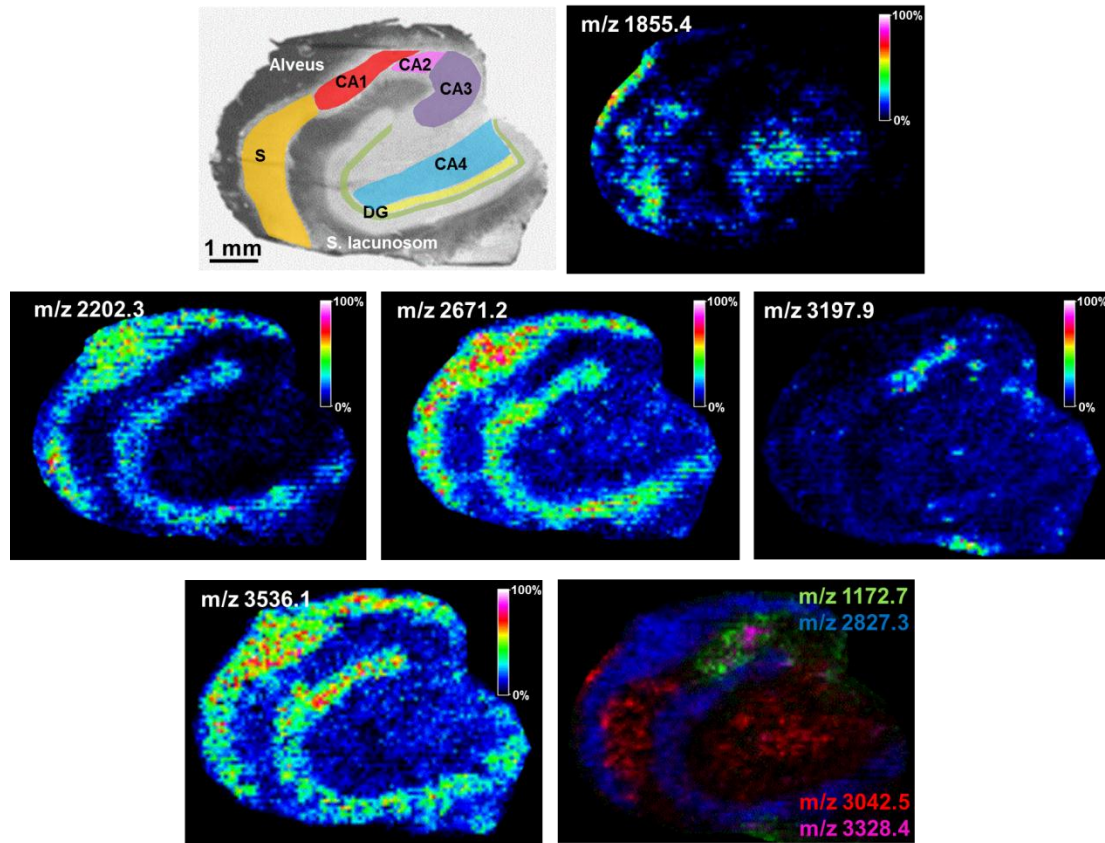


Figure 99. Images moléculaires de différents fragments de digestion trypsique obtenues à partir d'une coupe d'hippocampe de patient atteint d'épilepsie.

Sur les spectres obtenus, de nombreux ions ont été détectés et localisés dans des régions très spécifiques (**Figure 99**). Parmi les exemples présentés, l'ion m/z 3042.5 est retrouvé au niveau du subiculum et des champs ammoniens CA3 et CA4. L'ion m/z 3197.9 est spécifique du champ ammonien CA1 alors que l'ion m/z 3328.4 est distribué au niveau du CA2. La distribution de l'ion m/z 1172.7 s'étend sur 3 champs ammoniens (CA1, 2 et 3). Plusieurs peptides de digestion ont été retrouvés au niveau de l'*alveus* et de la *stratum lacunosum*, tels que les ions mesurés à m/z 2202.3 et m/z 3536.1. Or, une grande partie des ions mis en évidence dans ces deux régions s'est révélée correspondre à des fragments de digestion de la myéline (**Figure 100**). Cette observation peut être expliquée par le fait que ces régions

comprennent les faisceaux de fibres myélinisées qui relient les différentes aires de la formation hippocampique.

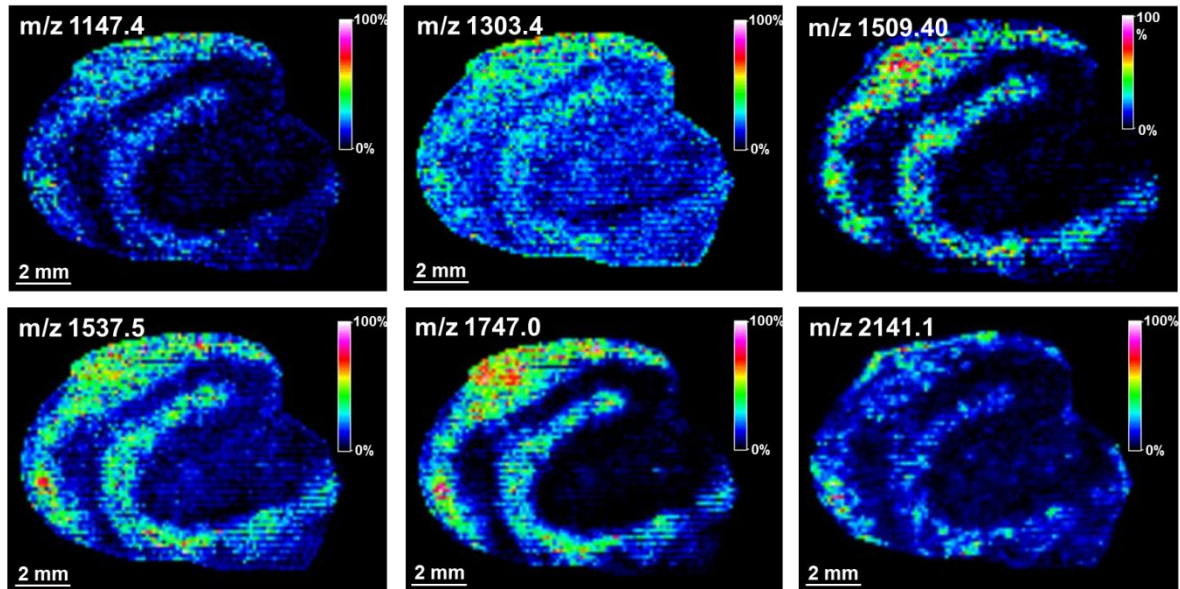


Figure 100. Images moléculaires de différents ions obtenus après digestion enzymatique de la myéline.

Les peptides de digestion ont ensuite été analysés en mode MS/MS directement sur coupe afin d'identifier les protéines après interrogation des banques de données (**Figure 101**). Les pics les plus intenses ont permis d'identifier des protéines majoritaires, telles que la tubuline et l'actine et certaines spécifiques de l'hippocampe comme la Golli-MBP (**Tableau 12**). En effet, le promoteur Golli est connu pour être exprimé dans les oligodendrocytes et certains neurones du système nerveux central, notamment au niveau des cellules granulaires du cervelet et de l'hippocampe, des cellules du système olfactif, et au début du développement au niveau des neurones du néostriatum^{276, 277}. De façon intéressante, les données montrent un clivage C-terminal de la protéine Golli-MBP. Cette observation est en accord avec l'action enzymatique des Matrix Metalloprotéases (MMP). En effet, le nombre important de fragments issus de la digestion trypsique de la partie C-terminale de la protéine Golli-MBP pourrait être expliqué par la libération de la partie C-terminale de la protéine Golli-MBP par l'enzyme MMP. Ainsi, l'action des MMP rendrait plus accessible la partie C-terminale de la protéine MBP à la trypsine.

Dans la sclérose en plaque (SEP), ces enzymes sont connues pour participer à la démyélinisation par clivages du côté C-terminal. Les isoformes de la protéine MBP classique sont principalement exprimées dans les oligodendrocytes du SNC^{278, 279}. Dans la SEP, les MMP pourraient être responsables de l'afflux de cellules inflammatoires mononuclées dans le SNC, contribuer ainsi à la destruction de la myéline et affecter l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique.

Récemment, l'implication de la MMP-9 a été mise en évidence dans l'épilepsie²⁸⁰. Les crises épileptiques pourraient être le résultat de la création de circuits neuronaux aberrants, suite à l'action de la MMP-9. En effet, la MMP-9 dissout la matrice extracellulaire qui est essentielle pour la plasticité synaptique. Chez la souris, deux types de plasticité synaptique seraient touchés par l'action de la MMP-9. Premièrement, l'action de la MMP-9 sur les épines courtes qui dépassent des dendrites fanées des terminaisons des neurones pyramidaux pourrait ouvrir un espace pour de nouvelles synapses. Deuxièmement, la MMP-9 interviendrait au niveau des excroissances des fibres moussues qui forment des liens avec d'autres neurones. Des travaux récents indiquent que la MMP-9 contribuerait aux crises d'épilepsie provoquées par la reconstruction de la matrice extracellulaire afin que les neurones puissent former de nouvelles connexions²⁸⁰⁻²⁸⁴. Nos travaux confirment ces résultats et mettent en avant une localisation des fragments de la Golli-MBP au niveau des neurones pyramidaux du CA1 comme démontré par les travaux de l'équipe de Jaworski D.²⁸⁵.

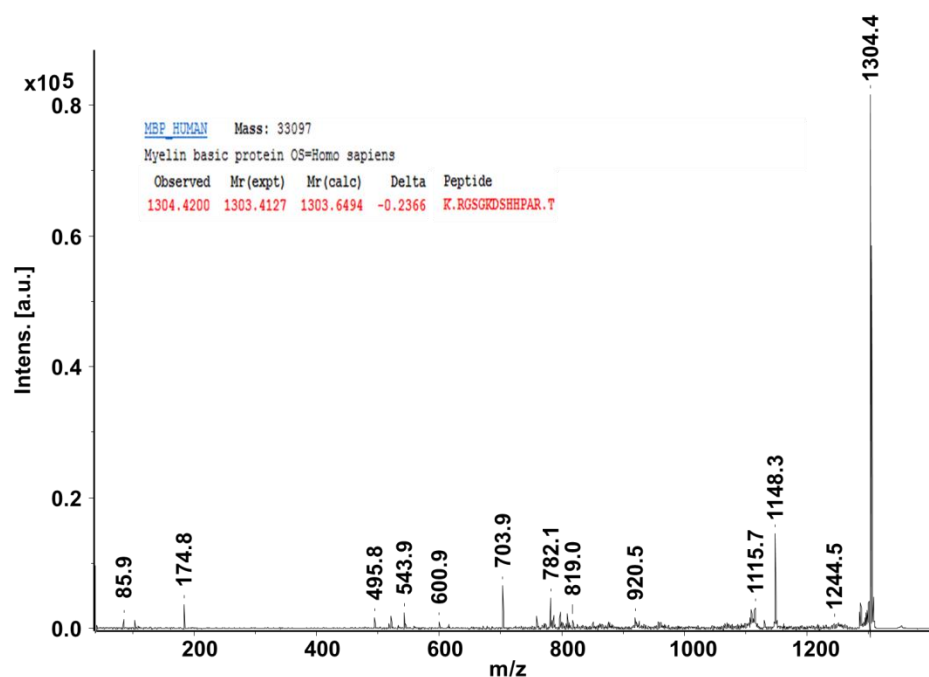


Figure 101. Spectre de masse MS/MS de l'ion m/z 1304.4.

m/z	Identification	Sequence
1147.4 1303.4 1362.5 1459.4 1509.7 1537.5 1747.0 2141.1	Golli-Myelin Basic Protein 1	1 mgnhagkrel naekastnse tnrgeseckr nlgelsrtts ednevfgead anqnnngtssq 61 dtavtdskrt adpknawqda hpadpgsrph lirlfsrdap gredntfkdr psedelqti 121 qedsaates ldvmasqkrp sqrhgskyla tastmdharh gflprhrtg ildsigrffg 181 gdrgapkrqs gkdshhpart ahygslpqks hgrtqdenpv vhfknivtp rtpppsqqgk 241 rglslrfsfw gaegqrpqfg yggrasdyks ahkgfkgvda qgtlskifkl ggrdsrsgsp 301 marr
1170.6	Actine $\alpha 2$	1 mceedstal vcdngsglck agfagddapr avfpsivgrp rhqgvvmgmg qkdsyvgdea 61 qskrgiltk ypiehgiitn wdmekiwhh sfynelrvap eehptltea plnpkanrek 121 mtqimfetfn vpamyvaiqa vlslyasgrt tgvildsgdg vthnvp iyeg yalphaimrl 181 dlagrdltdy lmkiltergy sfvttaerei vrdikekcy valdfenema taassslek 241 syelpdgqvi tignerfrcp etlfqpsfig mesagihett ynsimkcdid irkdlyannv 301 lsggttmypg iadrmqkeit alapstmkik iiapperkys vwiggasilas lstfqmwis 361 kqeydeagps ivhrkcf
1123.6 2683.9	Tubuline $\alpha 1A/ \alpha 4A$	1 mrecisihvg qagvqiagnac welyclehgi qpdgqmpsdk tiggddsfm tffsetgagk 61 hvpravfvdI eptvidevrt gtyrqlfhpe qlitgkeda nnyarghyti gkeiidlvld 121 rirkladqct glqgflvfhs fgggtgsgft sllmerlsvd ygkksklefs iypapqvsta 181 vvepynsilt thtlehsdc afmvdneaiy dicrnl die rptynlrl igqivssita 241 slrfdgalnv dltefqtnlv pyprihfpla tyapvisaek ayheqlsvae itnacfeapan 301 qmvkcdprhg kymaccllyr gdvvpkdvna aiatiktkt iqfvdwcpptg fkvginypqp 361 tvvpqgdllak vqravcmlsn ttaiaeawar ldhkfdlmya krafvhwyyv egmeegefs 421 aredmaalek dyeevgvdsv egegeeege y

Tableau 12. Liste des peptides de digestion détectés sur coupe obtenus pour les protéines majoritaires (représentés en rouge sur les séquences protéiques).

Pour les autres ions non répertoriés dans le **Tableau 12**, leur analyse MS/MS sur la coupe, dans un premier cas, n'a pas abouti à l'identification de la protéine correspondante bien qu'ils soient intenses, et dans le second cas, n'a pas permis d'obtenir un spectre MS/MS satisfaisant à cause de leur faible intensité.

Une hypothèse pouvant expliquer qu'une identification de la protéine n'a pas été possible bien que ses pics de digestion soient intenses, est la présence d'une espèce isobare ou très proche en masse qui ne pourrait pas être résolue avec le pouvoir résolutif offert par le MALDI-TOF. Les travaux de l'équipe de R Heeren ont prouvé qu'il était possible d'utiliser la mobilité ionique pour séparer des ions très proches en masse et ont permis d'identifier la tubuline et l'ubiquitine²⁸⁶. De plus, dans le chapitre 4.4, il a été démontré que deux espèces pouvaient être sélectionnées simultanément lors de l'analyse MS/MS. Pour confirmer cette hypothèse la même coupe d'hippocampe a été analysée en MALDI-TOF et en MALDI-Orbitrap (**Figure 102**).

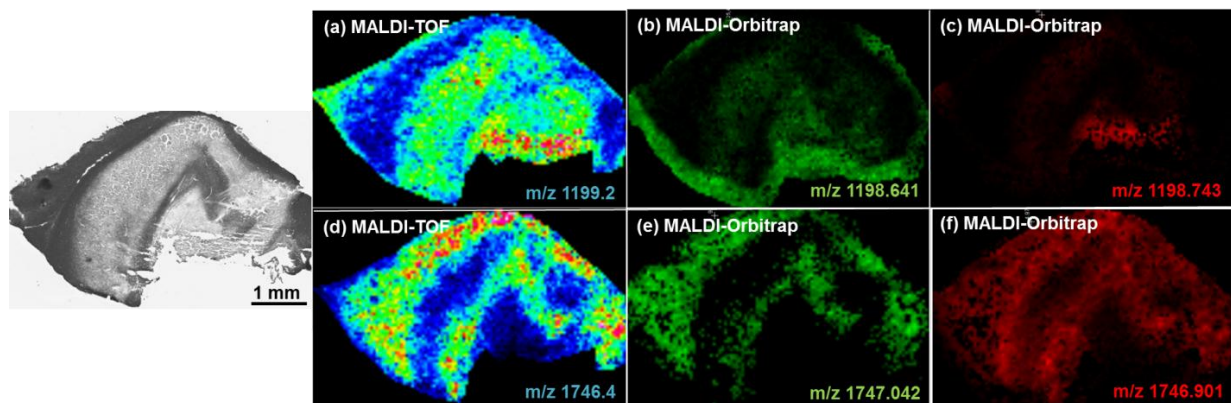


Figure 102. Images moléculaires d'ions très proches en masse obtenues par imagerie (a,d) MALDI-TOF et (b, c, e, f) MALDI-Orbitrap.

L'Orbitrap, grâce à son pouvoir résolutif, a permis de différencier des ions très proches en masse tels que les ions m/z 1198.641 et 1198.743 ou les ions m/z 1746.901 et m/z 1747.042, qui n'étaient pas résolus avec le MALDI-TOF. De plus, l'Orbitrap a permis de détecter ces espèces avec une grande précision de masse (< 2 ppm), ce qui n'a pas été possible avec le MALDI-TOF dû, entre autre, à la variation de l'épaisseur de la coupe et/ou à la distribution en vitesse initiale. En effet, tous ces biais sont négligeables dans le cas du MALDI-Orbitrap car les m/z sont mesurés en fonction de leur fréquence axiale dans l'Orbitrap et non pas en fonction de leur temps de vol comme dans le cas d'un TOF.

Néanmoins, dans le cas d'une analyse MS/MS avec l'Orbitrap, la sélection de l'ion précurseur est effectuée dans la trappe linéaire dont la précision d'isolation est de 2 à 3 unités de masse. Par conséquent, les deux espèces présentant des masses très proches ont été sélectionnées simultanément et seul le peptide qui a donné les ions fragments les plus intenses a permis d'identifier la protéine correspondante. Le MALDI-Orbitrap s'est révélé être un outil de choix pour l'imagerie des peptides en MS, mais n'a pas donné plus d'informations en mode MS/MS que le MALDI-TOF.

L'un des objectifs de cette étude étant l'identification des protéines, une stratégie qui consiste à extraire les protéines provenant de coupes de tissu et à les séparer par la technique SDS-PAGE a été envisagée. Les protéines ont été extraites à partir d'une dizaine de coupes d'hippocampe à l'aide d'une solution de HFIP puis reprises dans une solution de PBS. L'extrait protéique a ensuite été séparé selon le poids moléculaire par migration dans un gel de polyacrylamide à 12% en condition dénaturante. Une coloration du gel au bleu de Coomassie a ensuite été effectuée (**Figure 103**).

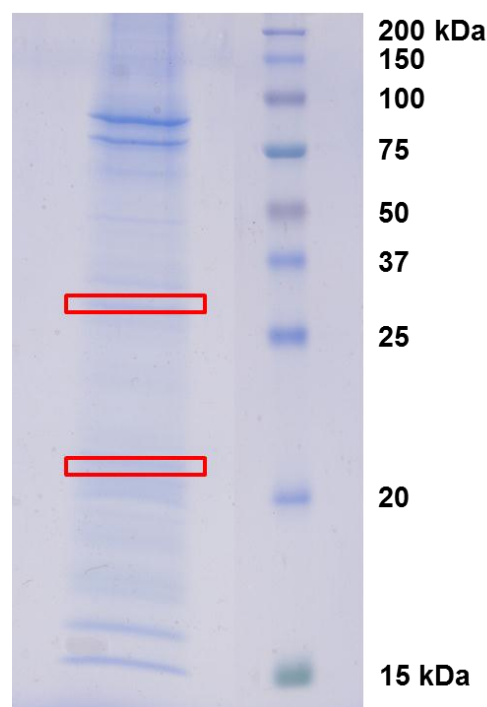


Figure 103. Gel de polyacrylamide 12% obtenu pour un extrait protéique d'hippocampe de patients atteints d'épilepsie.

Sur le gel, il a alors été possible d'observer un grand nombre de protéines réparties entre 15 et 200 kDa. Une excision des bandes a alors été réalisée aléatoirement pour couvrir l'ensemble de la gamme de masse. En effet, à l'heure actuelle, nous ne disposons d'aucun hippocampe sain pour effectuer une étude comparative. Après excision, chaque bande a été digérée par la trypsine.

Les PMF ainsi obtenus pour chaque bande ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le PMF d'une bande située entre 25 et 37 kDa (**Figure 103**) est présenté **Figure 104a**. L'interrogation de la banque de données SwissProt a permis d'identifier la protéine chaperonne 14-3-3 avec une couverture de séquence de 40% (**Figure 104b**).

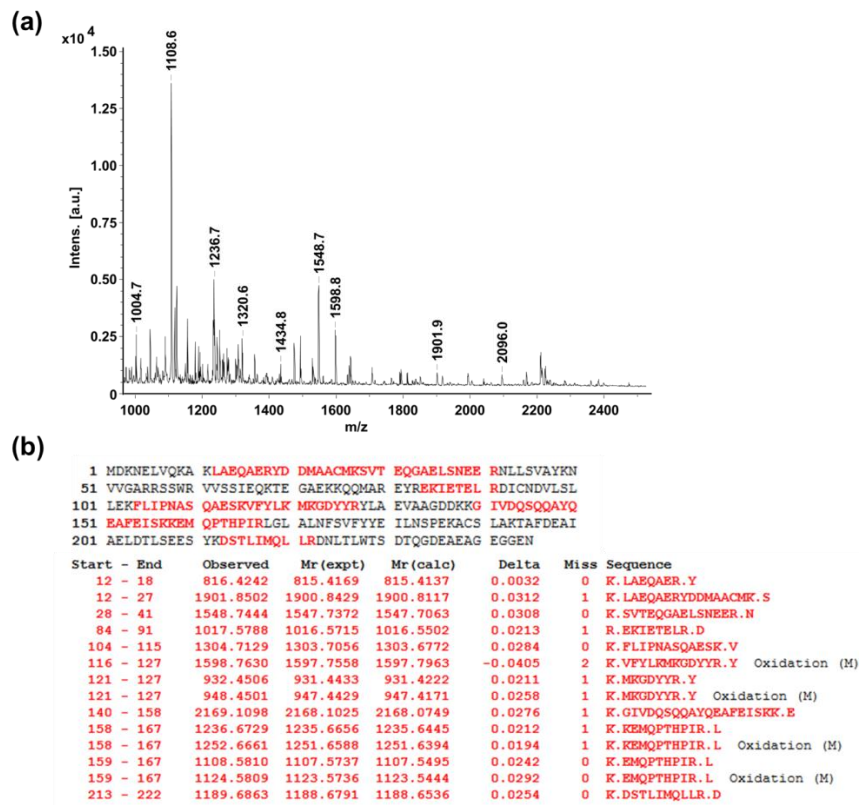


Figure 104. (a) Spectre de masse MALDI-TOF enregistré après digestion trypsique de la bande située entre 25 et 37 kDa. (b) Séquence de la protéine chaperonne 14-3-3 et fragments de digestion issus de cette protéine et détectés dans le PMF.

Afin de confirmer l'identité de la protéine, plusieurs fragments issus de la digestion trypsique ont été soumis à une analyse en mode MS/MS. Le fragment mesuré à m/z 1548.74 a été séquencé (**Figure 105b**) et a permis d'identifier la protéine chaperonne 14-3-3 delta/zeta, ce qui valide le résultat trouvé précédemment (**Figure 105a**).

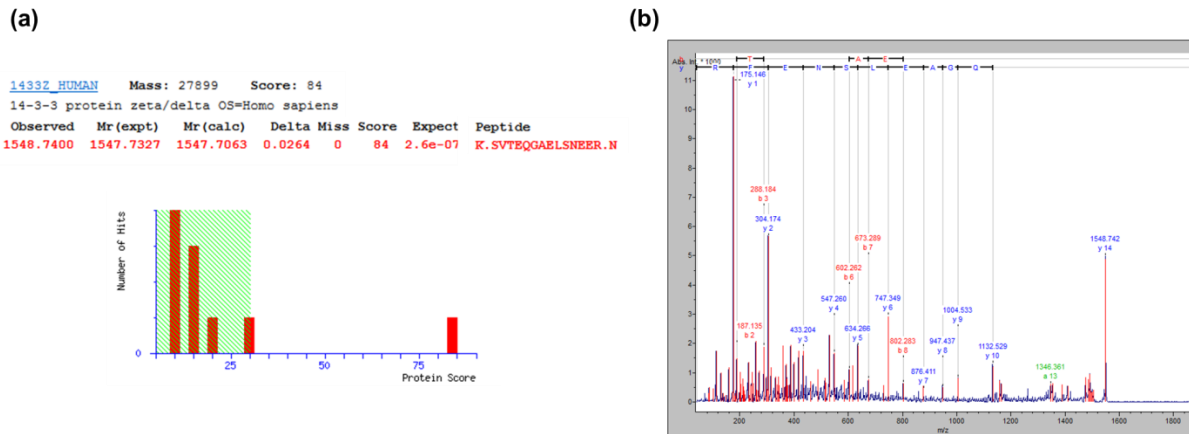


Figure 105. (a) Résultat obtenu après interrogation en banque de données (b) Spectre MS/MS annoté de l'ion m/z 1548.7.

De la même manière, une autre bande, située entre 20 et 25 kDa a été excisée puis soumise à une digestion trypsique (**Figure 103**). Le PMF obtenu est présenté **Figure 106a**. L'interrogation de la banque de données Swissprot a permis d'identifier cette protéine comme étant la phosphatidylethanolamine binding protein-1 (PEBP-1) avec une couverture de séquence de 83%. (**Figure 106b**).

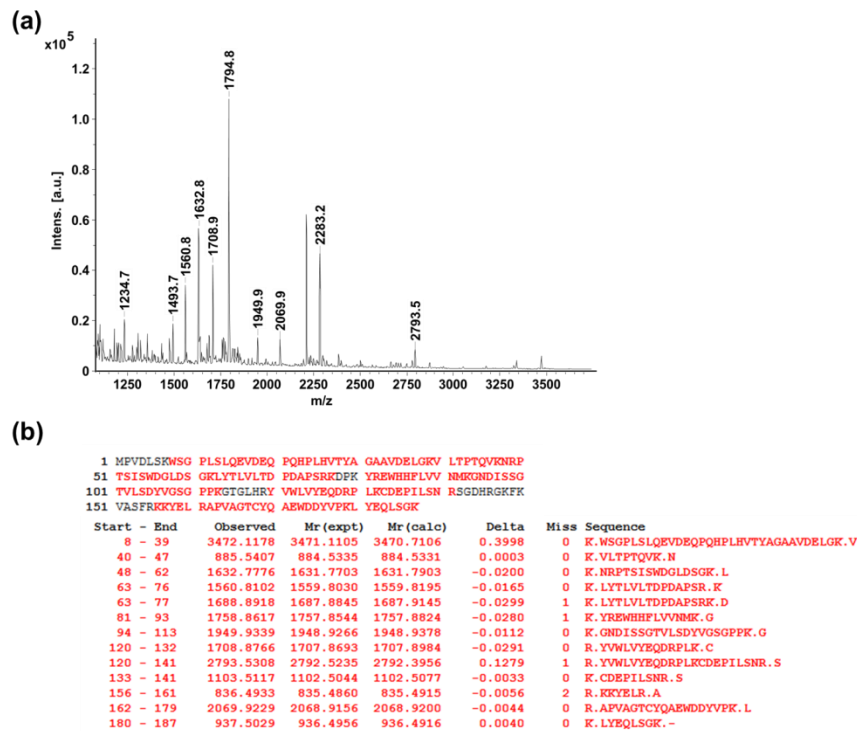


Figure 106. (a) Spectre de masse MALDI-TOF enregistré après digestion trypsique de la bande située entre 20 et 25 kDa. (b) Séquence de la protéine phosphatidylethanolamine-binding protein-1 et fragments de digestion issus de cette protéine et détectés dans le PMF.

La confirmation de l'identification de cette protéine a été obtenue après analyse MS/MS des fragments de digestion tryptique de la protéine. Ainsi, l'ion m/z 1632.7 a été séquencé (**Figure 107b**) et a permis de valider qu'il s'agissait bien de la protéine PEBP-1 (**Figure 107a**).

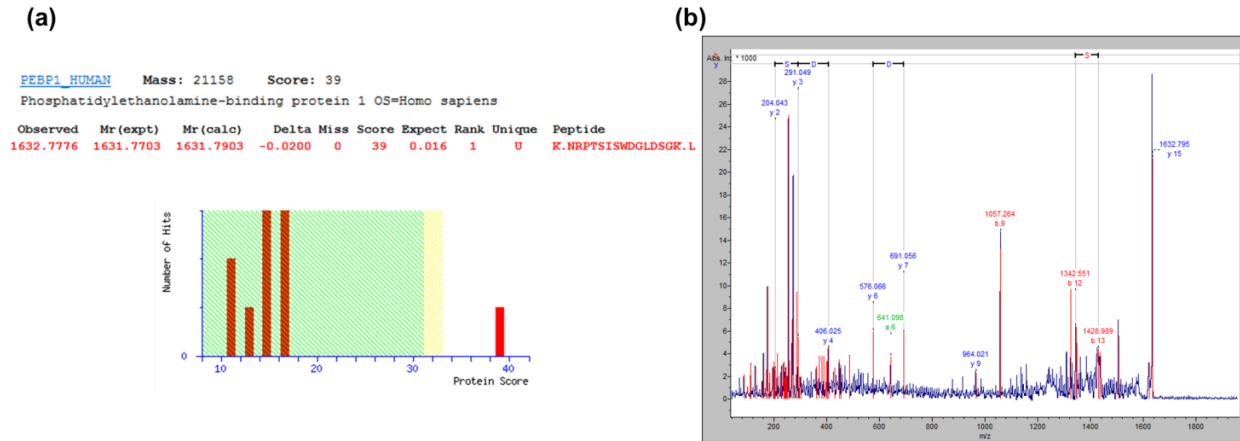


Figure 107. (a) Résultat obtenu après interrogation en banque de données (b) Spectre MS/MS annoté de l'ion m/z 1632.7.

Les fragments tryptiques de la protéine PEBP-1 ont été recherchés sur les coupes digérées d'hippocampes de patients épileptiques. Cette recherche s'est basée sur la comparaison des m/z puisque l'intensité des ions ne permettait pas de faire directement l'analyse MS/MS sur la coupe.

Trois peptides de digestion de la protéine PEBP-1 ont pu être détectés (**Figure 108**). Ces trois ions mesurés à m/z 1688.9, 1708.9 et 3472.1 présentent la même distribution. En effet, ils sont tous localisés au niveau du champ ammonien CA1. Alors que les images moléculaires obtenues pour les ions m/z 1688.9 et m/z 3472.1 mettent aisément en évidence la répartition des fragments, l'image MALDI reconstruite pour l'ion m/z 1708.9 présente une qualité moindre. La faible intensité de l'ion m/z 1708.9 peut expliquer le bruit observé sur l'image, mais permet néanmoins de constater que majoritairement l'espèce est détectée au niveau du CA1.

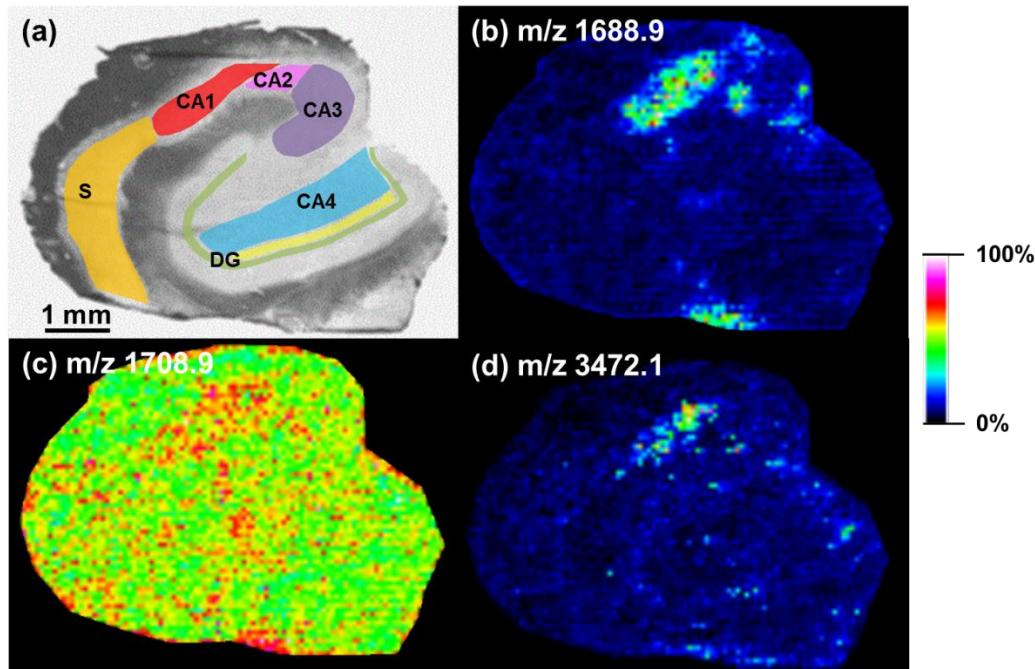


Figure 108. Distribution de trois fragments de digestion issus de la protéine PEBP-1 dans une coupe d'hippocampe de patient épileptique.

Les fragments de la protéine chaperonne 14-3-3 n'ont pas pu être détectés sur ces mêmes coupes de tissu. Plusieurs suppositions peuvent être avancées afin d'expliquer ce résultat. La première explication pourrait être la non accessibilité de cette protéine à l'enzyme. Le second argument pourrait être une très faible efficacité de digestion de cette protéine liée à la stratégie de micro-nébulisation. Enfin, un phénomène de suppression d'ions lié à l'environnement sur la coupe pourrait intervenir. L'association de toutes ces raisons pourrait également expliquer l'absence des fragments issus de la digestion de la protéine chaperonne 14-3-3 dans les spectres de masse MALDI. Pour cette étude, quelle que soit l'explication, la limite de la stratégie Bottom-Up sur coupe est clairement établie. C'est pourquoi, il a été nécessaire pour aller plus loin de passer par des étapes d'extraction et de séparation des protéines.

Une étude transcriptomique réalisée sur des biopsies d'hippocampes humains a mis en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm de PEBP-1 au niveau du CA1 mais pas au niveau du CA3 et du gyrus denté. La protéine PEBP-1 étant connue pour stimuler l'activité enzymatique de la choline acetyltransférase des neurones cholinergiques, sa faible expression dans le CA1 des patients atteints de la maladie d'Alzheimer peut expliquer la dérégulation des neurones cholinergiques et donc contribuer à l'initiation de ce processus pathologique²⁸⁷.

De même, la protéine chaperonne 14-3-3 est impliquée dans les voies moléculaires activant la mort neuronale suite à une crise épileptique. En effet, il a été démontré que la régulation de l'interaction de la protéine chaperonne 14-3-3 avec les protéines de la famille Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques pouvait être liée à l'apparition de lésions neuronales à la suite d'une crise épileptique²⁸⁸. La dissociation de la protéine chaperonne 14-3-3 de Bad (Bcl-2 associated death protein), un facteur pro-apoptotique, à la suite de la déphosphorylation de Bad²⁸⁹, conduit à la fixation de Bad sur Bcl-XL, ce qui conduit à l'activation du processus de mort neuronale²⁹⁰.

Les protéines présentées précédemment et mises en évidence soit par une approche d'extraction et de séparation des protéines soit par imagerie MALDI pourraient se révéler être d'intérêt. Des études de protéomique classique sur des patients atteints de schizophrénie ont permis de mettre en évidence un ensemble de protéines dont l'expression est modulée²⁹¹. Parmi celles-ci, les quatre protéines identifiées dans notre étude sont retrouvées, *i.e.* 14-3-3 delta/zeta, PEBP-1, MBP, isoformes de la tubuline. Des études récentes mettent en évidence des liens étroits entre l'épilepsie et la schizophrénie. Des études cliniques ont montré une prévalence de la psychose chez les patients épileptiques et une forte relation entre la schizophrénie et l'épilepsie, suggérant une susceptibilité partagée entre ces deux pathologies en raison de facteurs génétiques, neurobiologiques ou environnementaux²⁹².

4.6. Etude du lipidome

Les neurotransmetteurs excitateurs sont intimement liés au métabolisme des lipides. En effet, suite à la stimulation des récepteurs, de nombreux mécanismes sont enclenchés tels que l'influx de calcium à travers la terminaison nerveuse, l'activation des phospholipases A2, C et D qui entraîne la dégradation des glycérophospholipides membranaires et la génération de seconds messagers (*e.g.* acide arachidonique, eicasanoïde, acide lysophosphatidique, diacylglycérol) impliqués dans les fonctions neuronales. Cependant, une stimulation excessive de ces voies de signalisation peut causer des dommages cérébraux²⁹³. Les changements délétères dans l'homéostasie lipidique et dans la signalisation peuvent être un facteur clé dans l'apparition et la progression des pathologies du système nerveux. Néanmoins, les lipides peuvent également conférer une neuroprotection.

L'implication des lipides dans les neuropathies a pu être mise en évidence. Une étude portant sur la quantification et la localisation par immunocytochimie des principaux

gangliosides a révélé des modifications entre les tissus d'hippocampes humains sains et épileptiques. La diminution globale des gangliosides observée dans les hippocampes de patients épileptiques a été attribuée à la perte des cellules pyramidales dans le CA1 et le CA3. Concernant la nature des gangliosides, une augmentation du rapport GD3/GD1 a été constatée. Les GD3 ont, de plus, été retrouvés au niveau de la *stratum radiatum* du CA1 et de la couche sous granulaire du gyrus denté. L'augmentation des GD3 dans les régions sclérosées de l'hippocampe laisse penser qu'elle peut être liée à la présence de cellules gliales réactives accumulées à la suite d'un premier traumatisme. En outre, l'affinité élevée des GD3 pour le calcium suggère que l'accumulation localisée des GD3 pourrait induire une augmentation du calcium extracellulaire et altérer le fonctionnement normal des neurones ²⁹⁴.

Au contraire, les lipides peuvent avoir un rôle protecteur. Par exemple, chez les patients épileptiques et les animaux modèles de la TLE, les cannabinoïdes se sont révélés être des molécules anticonvulsives. Lors d'études électrophysiologiques portant sur l'effet des cannabinoïdes au niveau de l'hippocampe, les enregistrements ont montré que les agonistes tels que l'anandamide (AEA) et le 2-arachydonoylglycerol (2-AG) via le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1R) réduisaient l'excitation récurrente chez la souris épileptique ²⁹⁵. De même, l'inhibition de la phospholipase A2 et la cyclooxygénase-2, après une crise épileptique induite par le kainate ²⁹⁶, un analogue du glutamate, a permis de prévenir les dommages neuronaux ^{297, 298}.

Des analyses de lipides par spectrométrie de masse MALDI ont déjà été entreprises afin de comprendre les mécanismes impliqués dans l'épilepsie ^{299, 300}. Afin d'établir la distribution des lipides associée à l'épilepsie du lobe temporal, des expériences d'imagerie MALDI ont été réalisées sur des hippocampes de patients atteints d'épilepsie.

Comme présenté dans le paragraphe 2.2.1, le micro-dépôt des matrices ioniques liquides (LIM) présente un réel intérêt pour l'imagerie des lipides. C'est pourquoi, la matrice 2,5-DHB/ANI a été appliquée, par micro-dépôt, sur des coupes d'hippocampes humains épileptiques. Comme attendu, le micro-dépôt de la 2,5-DHB/ANI a permis d'obtenir des spots homogènes. De plus, la petite surface de tissu à recouvrir ainsi que la faible quantité de matrice nécessaire pour obtenir un signal correct ont permis de réduire considérablement le temps de dépôt. Les spectres enregistrés sur la gamme de masse m/z 200-1500 présentent de nombreux pics intenses avec un bon rapport signal sur bruit. L'acquisition des images a été effectuée avec une résolution spatiale de 200 μm , qui correspond à l'espacement entre les micro-dépôts de matrices. Les images reconstruites sont présentées **Figure 109**.

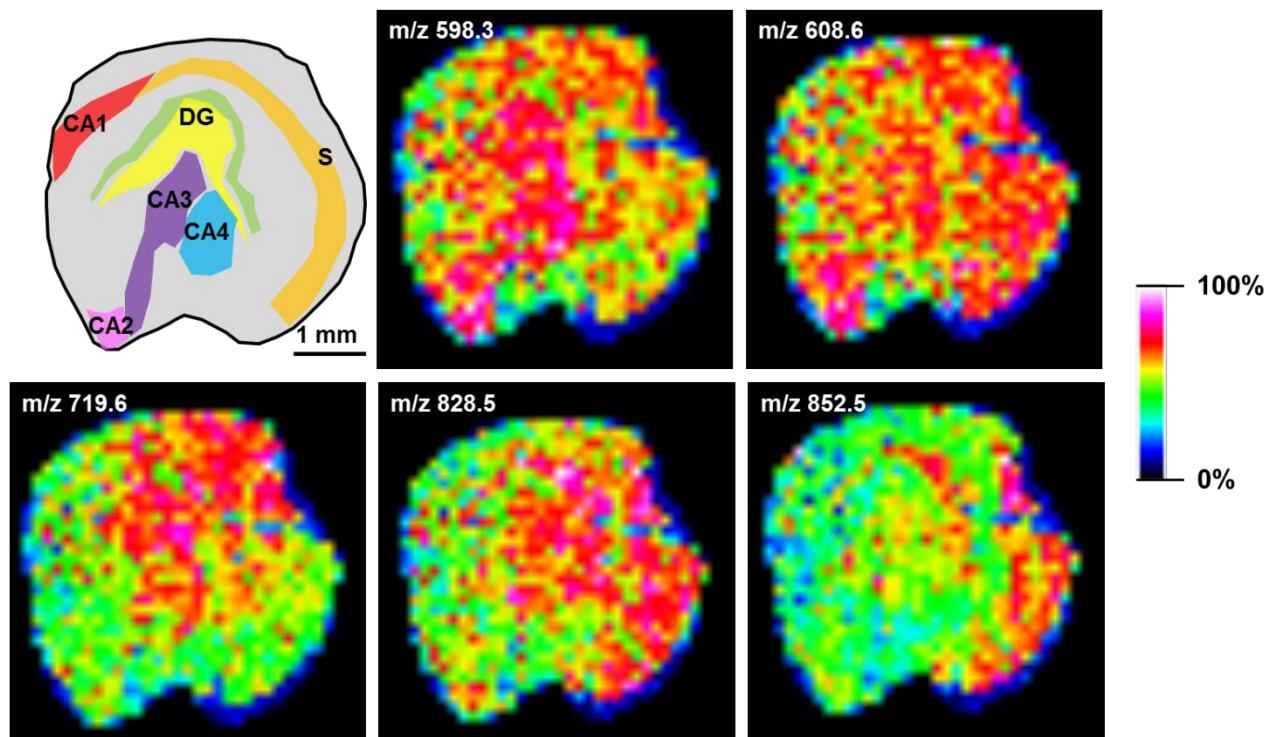


Figure 109. Exemples de distributions de lipides au sein des structures d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique.

Pour une coupe de petite taille telle que celle de l'hippocampe humain, soit environ 5 x 5 mm, la distance de 200 μm entre les spots de matrice est trop importante pour pouvoir distinguer les structures de l'hippocampe. En effet, alors que pour l'image MALDI de l'ion m/z 598.3 il est possible d'observer une distribution au niveau du gyrus denté et des CA2, CA3 et CA4, les autres images moléculaires ne permettent pas de d'établir la localisation précise des ions.

Aux vues de ces résultats, il a été nécessaire de recourir à une autre méthode de dépôt de la matrice afin de réaliser des images moléculaires de plus haute résolution spatiale (50-80 μm). Plusieurs stratégies permettent le dépôt de la matrice pour l'analyse des lipides, telles que la sublimation ou la micro-nébulisation. Ne disposant pas du matériel nécessaire pour faire les dépôts par sublimation, la micro-nébulisation de la 2,5-DHB a été envisagée. En effet, les LIMs n'étant pas compatibles avec la technique de micro-nébulisation, la matrice 2,5-DHB a été choisie. Cependant, la micro-nébulisation de cette matrice pour l'étude de petits composés reste difficile puisqu'un temps de spray trop long peut entraîner la délocalisation des lipides alors qu'un séchage trop important conduit à une cristallisation hétérogène.

Un appareil permettant le dépôt très homogène de la matrice avec un volume de solvant minimal a donc été requis pour effectuer l'étude des lipides sur les coupes d'hippocampes humains. Le sprayer d'une source electrospray (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) a donc été utilisé pour déposer la matrice 2,5-DHB (**Figure 110**). Pour cela, le spray de la matrice est généré par l'arrivée d'un flux d'azote.



Figure 110. Sprayer d'une source electrospray utilisé pour réaliser les dépôts de matrice sur les coupes d'hippocampes humains.

Le dépôt de la matrice 2,5-DHB grâce au sprayer décrit précédemment a permis d'obtenir une couverture homogène de la coupe d'hippocampe humain après moins d'une quinzaine de minutes. Ainsi, la résolution choisie pour effectuer les expériences d'imagerie sur cette coupe de tissu a été fixée à 80 μm .

Les images obtenues ont permis, cette fois, de mettre en évidence la distribution des lipides au sein des champs ammoniens, du subiculum et du gyrus denté (**Figure 111**). Ainsi, les ions mesurés à m/z 702.5 et 753.5 sont spécifiquement retrouvés au niveau du CA2, du CA4 et dans la couche hilare du gyrus denté. Les ions mesurés à m/z 747.6, m/z 772.5 et m/z 806.5 sont localisés au niveau du gyrus denté, de la partie supérieure du CA3. L'ion mesuré à m/z 864.6 est, quant à lui, spécifiquement détecté au niveau du subiculum.

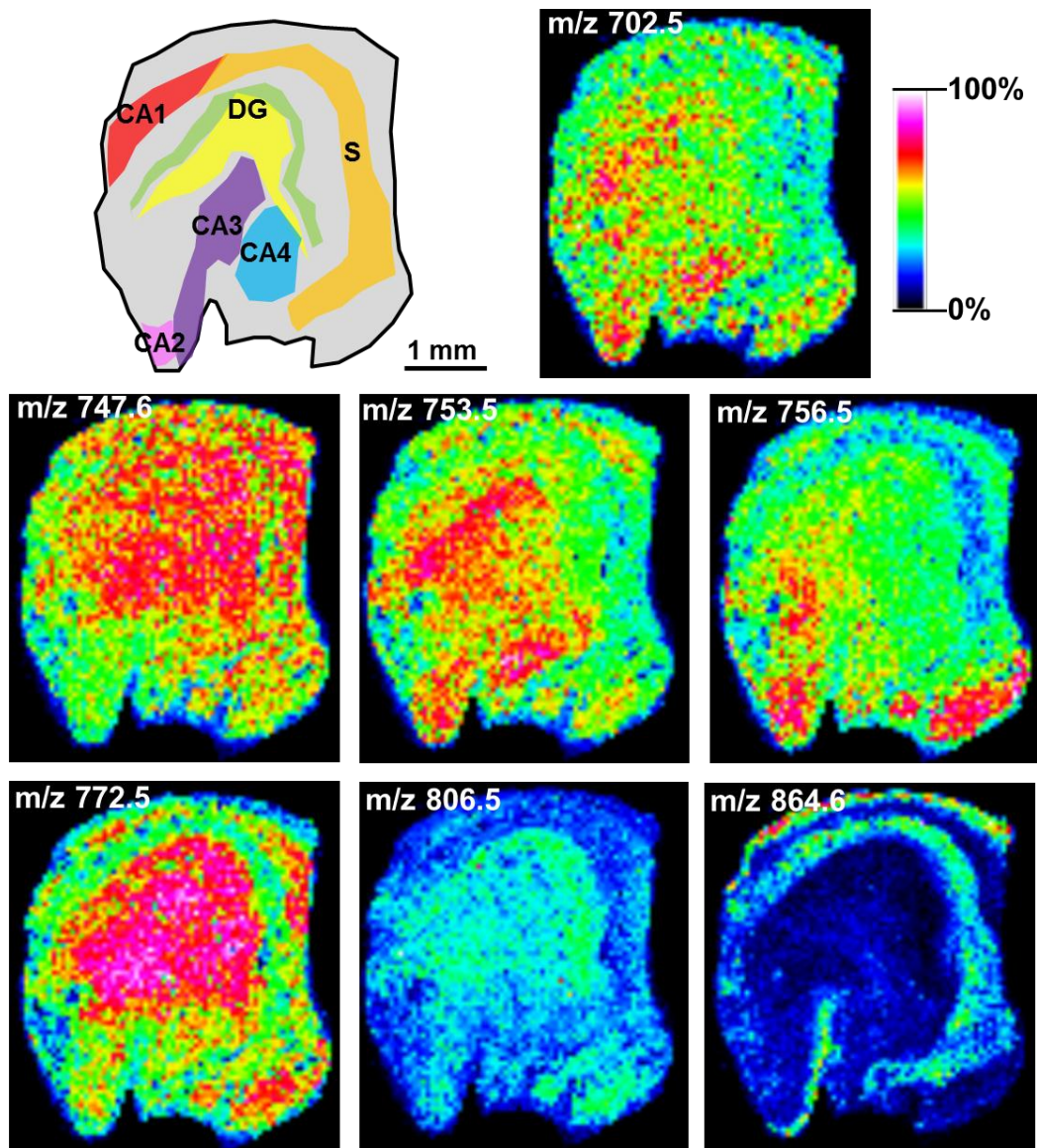


Figure 111. Images moléculaires de lipides obtenues sur une coupe d'hippocampe de patient épileptique à une résolution spatiale de 80 μm .

Afin de mettre en évidence les profils lipidiques spécifiques à chaque région, une hiérarchisation des spectres en fonction de leur similarité a été effectuée. Pour cela, une expérience d'imagerie MALDI a dû être réalisée avec une résolution spatiale de 200 μm sur une coupe d'hippocampe ayant subi la préparation précédemment décrite. En effet, le nombre de spectres pouvant être traités par le logiciel d'analyse statistique utilisé est limité. Les résultats de cette analyse statistique sont représentés sous forme d'un dendrogramme (**Figure 112c**). Cette classification des spectres a permis de mettre en évidence quatre régions distinctes : les champs ammoniens CA1 et CA2 représentés par la branche orange, le champ ammonien CA4 correspondant à la branche verte, le subiculum associé à la branche rouge et

enfin le gyrus denté et le champ ammonien CA3 liés à la branche bleue du dendrogramme (**Figure 112b**). La détermination de ces quatre régions a été réalisée par comparaison avec les structures mises en évidence sur l'image optique de l'hippocampe coloré par HES après le retrait de la matrice 2,5-DHB (**Figure 112a**). Ces résultats suggèrent qu'il existe des différences significatives en termes de nature et de nombre de lipides détectés pour chacun de ces groupes.

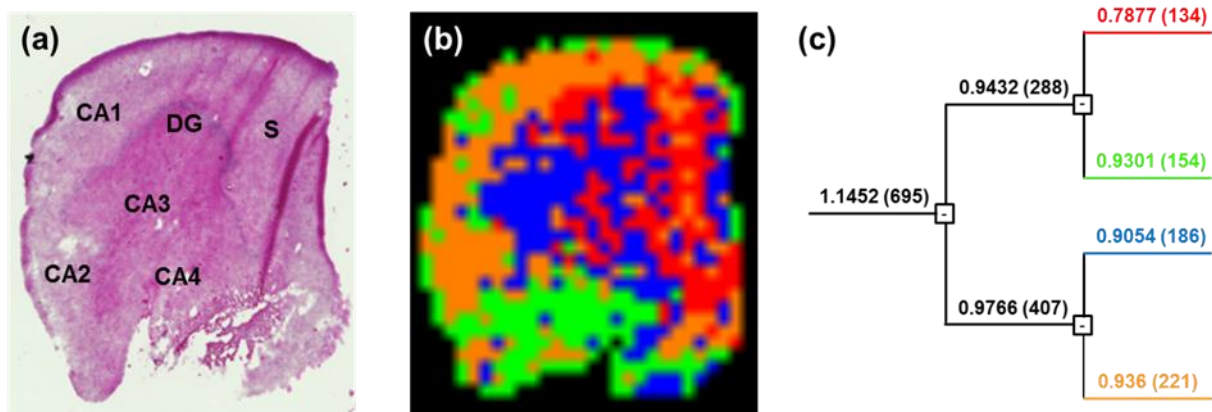


Figure 112. (a) Image optique annotée d'une coupe d'hippocampe humain après coloration HES. (b) Image reconstruite à partir des résultats de la classification hiérarchique. (c) Dendrogramme obtenu à partir de la classification hiérarchique des spectres enregistrés pour la coupe d'hippocampe de patient atteint d'épilepsie.

La combinaison des résultats obtenus par coloration HES et par classification des spectres a permis d'obtenir des informations sur les structures tissulaires et sur les profils moléculaires. Ainsi, des lipides, présentant une localisation spécifique et un potentiel intérêt pour la compréhension des processus biologiques impliqués dans l'épilepsie, ont pu être mis en évidence.

Cependant, le traitement manuel pic par pic étant fastidieux aux vues du nombre de m/z, une analyse en composante principale (PCA) a permis de mettre en évidence les lipides et leur localisation. Deux stratégies sont alors envisageables. La première option consiste à créer deux régions d'intérêt (ROI) puis de comparer ces ROI entre elles. La seconde méthode a pour but de réaliser la comparaison des m/z sur l'ensemble de la coupe. Dans cette étude, la seconde stratégie a été employée. Ainsi, de nombreux lipides ont été détectés. Quelques exemples sont reportés dans le **Tableau 13** avec leurs localisations au sein de l'hippocampe.

L'identification de ces lipides a été effectuée par comparaison des m/z avec les banques de données des lipides.

m/z	Identification	Localisation					
		CA1	CA2	CA3	CA4	DG	S
598.3	PI {18:1}		X	X	X	X	
626.3	PI {20:1}	X	X				
702.5	PG {31:3}				X	X	
706.5	PC {30:0}				X		
719.6	PC {31:0}			X		X	X
741.5	PC {33:3}						X
747.6	PC {33:0}			X		X	X
753.5	PC {34:4}				X	X	
756.5	PG {35:4}		X	X			
769.6	PC {35:3}					X	X
772.5	PG {36:3}			X		X	X
806.5	PI {32:2}		X	X		X	
820.5	PI {33:2}			X		X	
848.6	PI {35:2}	X					X
864.6	PI {36:1}	X					X
868.4	PI {37:6}			X		X	
876.6	PI {37:2}	X					X

Tableau 13. Liste des lipides mis en évidence dans les différentes structures d'une coupe d'hippocampe de patient épileptique (X : lipides détectés).

Cette étude a permis de mettre en évidence des nombreux lipides susceptibles de jouer un rôle clé dans les processus de mort ou de protection neuronale dans le cas de l'épilepsie. Cependant, seule une comparaison avec les résultats obtenus à partir d'hippocampes humains sains pourrait permettre de confirmer la réelle implication de ces lipides dans les différents mécanismes biologiques.

4.7. Conclusion

La compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans la TLE est une étape cruciale pour pouvoir établir un diagnostic précoce ou pour mettre au point des stratégies thérapeutiques adaptées à la réparation des lésions et à la récupération des fonctions de l'hippocampe. Or, la connaissance des voies de signalisation activées lors des différents processus conduisant à la pathologie requiert d'étudier un panel de molécules le plus large possible notamment en termes de nombre et de nature.

L'utilisation de l'imagerie MALDI permet d'obtenir la distribution de centaines de molécules. Dans le domaine de la recherche biologique, l'imagerie MALDI a montré son intérêt dans les études portant sur des biomolécules de nature très différente, allant du lipide à la protéine. Cependant, la classe des molécules analysées est conditionnée par la préparation de la coupe. En se basant sur les développements réalisés précédemment, l'imagerie MALDI a donc été employée afin d'établir des profils moléculaires de l'hippocampe dans le cas d'une pathologie : l'épilepsie.

Les biomolécules mises en évidence dans les hippocampes de patients épileptiques au cours de cette étude semblent confirmer les différents processus intervenant dans l'évolution de la pathologie telle que la perte neuronale, la neurogénèse aberrante et la dérégulation de la transmission des signaux.

Dans un premier temps, un fragment de l'isoforme g de la protéine MBP a été identifié. En s'appuyant sur les phénomènes connus dans la littérature, l'explication avancée pour expliquer ce résultat est la démyélinisation des fibres nerveuses de l'hippocampe. La perte neuronale massive mise en évidence dans certaines régions de l'hippocampe, lors de l'observation histologique de coupes colorées, a permis d'étayer cette hypothèse. En outre, la protéine MBP est connue pour être un substrat de l'Endothlin Converting Enzyme 1, une enzyme jouant un rôle important dans l'épilepsie.

L'imagerie MALDI combinée à l'analyse protéomique classique a permis d'identifier quatre protéines d'intérêt, la protéine chaperonne 14-3-3 delta/zeta, la protéine PEBP-1, la protéine Golli-MBP, et les isoformes de la tubuline. La présence de la protéine chaperonne 14-3-3 suggère un phénomène de mort neuronale puisque la régulation de son interaction avec les protéines de la famille Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques est liée à l'apparition de lésions neuronales à la suite d'une crise d'épilepsie. La protéine PEPB-1, pour sa part, est impliquée dans la stimulation de la choline acetyltransférase des neurones cholinergiques et pourrait contribuer à la dérégulation de ces neurones au niveau du CA1 dans le cas de l'épilepsie. La Golli-MBP a, quant à elle, donné des indications sur l'action des enzymes MMP-9, qui jouent un rôle majeur dans le processus de démyélinisation et qui pourraient conduire à une neurogénèse aberrante.

Tous ces résultats ont été obtenus sur des hippocampes de patients atteints d'épilepsie. La confirmation des hypothèses avancées sur la base de ces observations passera donc par la

comparaison avec les données enregistrées pour des hippocampes humains sains. L'étude des échantillons sur une plus large cohorte permettra également de valider ces résultats.

Les informations acquises lors de cette étude pourront être utiles pour la mise au point de traitement contre cette neuropathie. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs tels que ceux de l'enzyme ECE-1 ou MMP-9 semblent prometteurs pour traiter cette pathologie.

5. Conclusion générale et Perspectives

Depuis son introduction, l'imagerie MALDI est devenue un outil de choix pour la détection et la localisation des molécules aussi bien endogènes (*i.e.* lipides, peptides, et protéines) qu'exogènes (*i.e.* les médicaments). Comme en témoignent les nombreuses applications, la maturité acquise par l'imagerie MALDI, ces dernières années, lui a permis de devenir une technologie puissante pour les études dans le domaine biologique, notamment dans le cadre de la recherche de biomarqueurs. Associée aux nouveaux outils statistiques, telle que l'analyse multivariée, l'imagerie MALDI est aujourd'hui une technique idéale pour la mise en évidence de la modulation des molécules au cours d'un processus biologique.

Ainsi, mes travaux de recherche ont porté, dans un premier temps, sur les développements liés à la préparation de l'échantillon. Bien que cette technologie ait largement évolué ces dix dernières années, des développements restent néanmoins à effectuer. Par la suite, forte de mes développements, je me suis focalisée sur l'étude de la dynamique des biomolécules impliquées dans les processus de régénération et de dégénérescence du SNC, à la fois chez un modèle invertébré et chez l'humain, pour répondre à la question suivante : Peut-il y avoir des processus communs entre ces des phénomènes physiopathologiques. J'ai donc appréhendé cette question par le truchement de l'imagerie moléculaire qui me permettait une analyse spatio-temporelle de ces processus physiologiques, *i.e.* la régénération et la dégénérescence du SNC.

La première partie de ma thèse a consisté à optimiser les matrices et leurs modes de dépôt en fonction des molécules à analyser. Ainsi, pour l'étude des lipides et des médicaments, les matrices ont été appliquées par micro-dépôt automatisé à l'aide un système piézoélectrique qui permet de délivrer de fines gouttelettes d'une centaine de picolitre. Le faible volume de solution de matrice déposé a permis de limiter la délocalisation de petites molécules à la taille du spot. Les matrices ioniques liquides combinées à ce mode de dépôt ont permis la détection efficace des lipides et des médicaments. La micro-nébulisation qui crée de fines gouttelettes de solution a été employée pour l'analyse des peptides et des protéines. Ainsi, l'obtention d'une cristallisation fine et homogène de matrice a permis d'augmenter la résolution spatiale des images moléculaires. L'utilisation d'un système automatisé associé aux matrices ioniques solides présentant une cinétique de cristallisation lente a permis d'améliorer l'incorporation des peptides et des protéines dans le réseau cristallin de matrice.

Par la suite, en se basant sur les stratégies de préparation des tissus développées précédemment, l'imagerie MALDI a été employée afin d'identifier les peptides impliqués dans le processus de régénération du SNC chez la sangsue médicinale. Afin de traiter les nombreuses données générées durant cette étude et de mettre en évidence les peptides d'intérêt, il a été nécessaire de recourir à l'utilisation d'outils statistiques tels que la PCA et la classification hiérarchique des spectres. La comparaison des profils peptidiques d'un ganglion contrôle et d'un ganglion situé à proximité d'un site de lésion quelques heures après l'initiation de la régénération nerveuse a ainsi permis de mettre en évidence un phénomène de recrutement des peptides au niveau de la structure endommagée, avec une chronologie dans la libération des peptides dépendante de la nature des cellules qui les produisent. Il semble, en effet, que les molécules de la réponse innée soient libérées en réponse au trauma avec un double rôle, *i.e.* un rôle dans l'initiation de l'inflammation et un rôle de facteur messenger dans la communication permettant aux cellules microgliales de migrer vers le site de lésion. Ces deux rôles retrouvés au niveau du SNC sont également observés au niveau périphérique, ce qui laisse à penser que ces molécules dites immunitaires sont les initiatrices de la régénération nerveuse. Comme nous le verrons dans l'étude de l'épilepsie, celles-ci deviennent également les initiatrices de dégénérescences nerveuses en conduisant à une production exacerbée de Golli-MBP qui induit une régénération nerveuse anarchique et donc pathologique suite à l'activation des oligodendrocytes. Ceci montre bien l'importance de la nature et du temps d'intervention de ces premières molécules libérées. La seconde vague de molécules libérées va, quant à elle, former la matrice moléculaire permettant par la suite la guidance axonale et la reconnexion des neurites. La réactivation de facteurs embryonnaires impliqués dans la neurogénèse, telles que les protéines LOX, confirme que la régénération nerveuse récapitule les processus liés au développement nerveux chez l'individu qu'il soit invertébré ou mammifère. En effet, la comparaison du profil moléculaire des ganglions segmentaires au cours de la régénération avec celui du SNC de l'embryon au stage E12 a confirmé qu'une réexpression des facteurs embryonnaires intervenait lors de la réparation neuronale. Dans cette étude, l'imagerie MALDI combinée à des techniques de protéomique classiques a donc permis de mettre en évidence, à la fois, un nouveau membre de la famille des filaments intermédiaires ayant un rôle dans la guidance axonale lors de la neurogénèse et de la régénération nerveuse, et, un phénomène de coordination temporelle des facteurs produits par les cellules présentes autour du trauma pour permettre une régénération nerveuse fonctionnelle.

Dans le cadre de mes travaux portant sur la recherche de biomolécules impliquées dans l'épilepsie du lobe temporal chez l'Homme par imagerie MALDI, j'ai pu confirmer ces

notions de réexpression d'éléments embryonnaires et de coordination spatio-temporelle des facteurs libérés. En effet, les résultats plaident en faveur de l'implication de nombreuses voies de signalisation pour la mise en place de différents processus tels que la perte neuronale, la neurogénèse, aberrante ainsi que la dérégulation de l'information nerveuse intervenant chez les patients atteints d'épilepsie. La combinaison des résultats obtenus par extraction et séparation des protéines et par imagerie MALDI ont permis d'identifier et de localiser cinq protéines potentiellement intéressantes, *i.e.* 14-3-3 delta/zeta, PEBP-1, Golli-MBP, isoforme g de la MBP, isoformes de la tubuline, pour la compréhension des mécanismes conduisant à l'épilepsie. La localisation, au niveau du CA1 et du CA3, des phénomènes de régénération nerveuse, mise en évidence par la présence des protéines Golli-MBP et PEBP-1 en réponse à une démyélinisation, et d'apoptose suite à la présence d'un fragment de MBP de type g et de la protéine 14-3-3, suppose l'activation d'enzymes de type zinc et matrix metalloprotéase (*e.g.* ECE-1 et MMP-9) qui sont produites via les macrophages infiltrants liés à une inflammation. Il semble donc que les conséquences de cette pathologie sont héritées d'une inflammation exacerbée au niveau de zones spécifiques de l'hippocampe, qui en réponse conduirait à une régénération nerveuse anarchique qui pourrait être la cause des crises épileptiques. Cette étude, bien qu'elle soit encore préliminaire et devant être confirmée par des études plus poussées, semble également montrer que la pathologie est liée à un défaut de contrôle de la réponse dite immunitaire conduisant à des réponses neuronales où des facteurs embryonnaires sont produits de façon incontrôlée et menant ainsi à la pathologie. La confirmation des hypothèses avancées sur la base de ces observations passera également par la comparaison avec les données enregistrées pour des hippocampes humains sains. L'étude des échantillons sur une plus large cohorte permettra également de valider ces résultats.

En conclusion, l'imagerie MALDI requiert encore de nombreux développements, aussi bien pour la détection des composés que pour leur identification *in situ*. En effet, si l'imagerie permet de mettre en évidence des marqueurs liés à un phénotype particulier dans un certain contexte physiologique, leur identification directement sur coupe permettrait à cette technique de faire un grand pas en avant. A ce jour, il a clairement été démontré qu'une stratégie de type « Bottom-Up » directement sur coupe offrait la possibilité de pouvoir localiser et identifier des protéines sur la base des fragments de digestion générés par l'utilisation d'une enzyme telle que la trypsine. Cependant, lors de l'étude de coupes de cerveau, la grande partie des protéines identifiées par cette stratégie reste des protéines très majoritaires telles que la tubuline, l'actine et la myéline. De nombreuses hypothèses peuvent être avancées quant aux limites de cette méthode. La première serait l'accessibilité des enzymes aux sites de clivage

des protéines. En effet, les enzymes telles que la trypsine sont généralement déposées de façon homogène sur l'ensemble de la coupe à l'aide d'un nébuliseur ou d'un microspotter. Les volumes ainsi déposés sont généralement très faibles et par conséquent l'activité de l'enzyme est très limitée dans le temps. De plus, l'utilisation de tampon de type NH_4HCO_3 ne permet pas une très grande solubilisation des protéines et plus particulièrement des protéines membranaires. Généralement les protéines sont extraites à l'aide d'agents chaotropes (e.g urée) et de détergents (e.g. SDS) mais l'utilisation combinée de ces réactifs n'est pas compatible avec la MS et plus particulièrement avec l'imagerie MALDI. En effet, l'urée entraîne, d'une part, la formation quasi immédiate de cristaux sur la coupe de tissu et d'autre part, avec l'association des détergents, l'enzyme est tout de suite dénaturée, ce qui inhibe totalement son action. Il n'est alors possible d'utiliser que des tampons phosphate ou bicarbonate, ce qui limite l'action de l'enzyme aux protéines dites solubles. De plus, les protéines les plus abondantes sont statistiquement les plus digérées et par conséquent les pics majoritaires observés sur les spectres de masse proviennent de celles-ci. Il est donc important de pouvoir observer et localiser des fragments de digestion provenant de protéines beaucoup plus minoritaires. L'idée la plus intéressante reposerait sur la technique de digestion ménagée. Cette stratégie permet généralement d'obtenir des informations structurales sur les protéines puisque les fragments obtenus en premier correspondent aux parties les plus accessibles de la protéine alors que les fragments les plus difficiles d'accès sont digérés en dernier. Sur ce principe, il est possible d'imaginer que, lors d'une digestion enzymatique *in situ*, les protéines les plus majoritaires seront clivées rapidement alors que les protéines les moins abondantes ne seront que très peu digérées. La stratégie consisterait alors à réaliser plusieurs expériences consécutives de digestion dans la même région d'intérêt en analysant chaque spectre de masse résultant, avant de « laver » la coupe afin de retirer la matrice et les peptides qui ont été générés. Cette méthode qui pourrait porter le nom de « digest n » permettrait d'identifier et de localiser de nouvelles protéines qui ne sont habituellement pas détectées avec la stratégie classique qui s'apparenterait, dans ce cas de figure, à l'expérience « digest = 1 ». Néanmoins, quelque soit la stratégie « Bottom-Up » employée, il est très difficile de corréler les informations obtenues par analyse directe des protéines intactes par imagerie MALDI avec les fragments de digestion obtenus par la digestion enzymatique *in situ*, même si celle-ci est réalisée dans la même région d'une coupe de tissu consécutive. Il serait très intéressant de pouvoir identifier une protéine par la sélection d'ion précurseur. En d'autres termes, cette stratégie reposerait, dans un premier temps, sur la détection et la localisation d'une protéine

et, dans un second temps, sur son identification après l'avoir sélectionnée dans le spectromètre de masse pour la fragmenter.

Cette stratégie de type « Top-Down » constitue un véritable défi pour l'imagerie MALDI puisque la difficulté réside dans la possibilité de pouvoir générer des états de charge élevés comme il est possible d'observer dans le cas d'une source ESI. De plus, cette méthode limite le type d'instruments utilisables pour ces expériences en termes de m/z accessibles et de modes d'activation (*e.g.* ETD, ECD) ^{271, 272}. A ce jour, les mécanismes fondamentaux impliqués dans les processus de désorption/ionisation en MALDI sont encore mal compris et il est toujours difficile de produire des ions présentant des états de charge élevés. Afin de contourner cette limite, il serait intéressant de développer des sources de production d'ions compatibles avec la désorption laser et permettant l'obtention d'espèces multichargées en phase gazeuse. Ainsi, il serait possible de sélectionner un ion précurseur et de le fragmenter pour remonter à la structure primaire de la protéine correspondante. Dans ce contexte, de nouvelles sources ont été développées telles que les sources MALDESI et ELDI ^{301, 302} qui reposent sur une première étape de désorption ou de désorption/ionisation par un laser suivie d'une étape d'entraînement des ions par des gouttelettes chargées en mode ESI. Récemment, l'équipe de Trimpin S. ³⁰³ a développé une source, connue à ce jour sous le nom de Laserspray, qui, dans certaines conditions expérimentales, conduit à la détection d'ions présentant des états de charge très élevés à partir d'une source type MALDI et similaires à ceux obtenus en ESI. Ces sources hybrides pourraient alors être appliquées à l'analyse directe sur coupe ou à la MSI. Les protéines détectées et localisées seraient alors analysées par MS/MS après activation par ECD ou ETD.

Une autre approche a été proposée par l'équipe de De Pauw E. Celle-ci repose sur la fragmentation en source des protéines et est connue sous le nom d'ISD (In Source Decay) ³⁰⁴. Cette décomposition en source fait intervenir le transfert d'un proton radicalaire de la matrice vers la protéine qui se fragmente avant la redistribution de l'énergie vibrationnelle. Ce mode d'activation étant non ergodique, il est, en théorie, illimité en masse. Par conséquent, il est possible de fragmenter des protéines de haut poids moléculaire en source et d'obtenir des ions fragments de type c et z. Une telle approche a donc été utilisée dans le cas d'expérience d'imagerie MALDI ²⁷⁴. Cependant, il semble que seules une ou deux des protéines les plus majoritaires de chaque pixel puissent être identifiées.

A ce jour, que ce soit la stratégie « Top-Down » ou « Bottom-Up », les protéines détectées sont généralement inférieures à 30 kDa, et ce malgré le développement des

traitements d'échantillons et des nouvelles matrices ioniques adaptés à l'étude des protéines. Il est très important pour la recherche de marqueurs pathologiques de pouvoir franchir cette limite. Certaines stratégies ont vu le jour⁸⁴ mais restent très difficiles à mettre en œuvre pour des expériences d'imagerie MALDI. Au cours de ma thèse, il a été démontré que l'extraction des protéines intactes à partir du tissu suivie d'une séparation par SDS-PAGE permettait à la fois de détecter des protéines de très haut poids moléculaire et de les identifier. Une approche quasi similaire a été réalisée par Römpp et ses collaborateurs³⁰⁵. L'ensemble des protéines d'un tissu entier a été extrait avant le fractionnement par ultracentrifugation suivi d'une digestion enzymatique et d'une analyse par LC-MS/MS. Cette approche est peut-être la plus intéressante pour la détection et l'identification des protéines mais aucune information de localisation ne peut être obtenue. Il est donc primordial de pouvoir extraire efficacement les protéines tout en conservant une information de localisation. Par conséquent, l'utilisation d'une microjonction liquide sur le tissu permettrait alors d'extraire n'importe quel type de biomolécules (*i.e.* lipides, peptides, protéines) dans une région spécifique du tissu définie au préalable après coloration HES et/ou établissement de l'histologie moléculaire. Les composés ainsi en solution pourront ensuite être séparés par des approches off-gel incluant la chromatographie liquide ou les techniques classiques de protéomique en gel 1D ou 2D. De plus, l'utilisation d'un instrument présentant un pouvoir résolutif élevé ainsi qu'une très grande précision de masse, tel que l'Orbitrap, conduira à l'identification beaucoup plus fine des espèces. Ainsi, une telle approche pourrait être appliquée pour poursuivre la recherche de facteurs ayant un rôle majeur dans les processus de régénération et de dégénérescence nerveuse afin de mieux comprendre ces mécanismes.

6. Matériel et Méthodes

6.1. Réactifs

L'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB), l'acide sinapinique (SA), l'acide trifluoroacétique (TFA), l'éthanol (EtOH), l'isopentane, la 3-acétylpyridine (3-AP), l'aniline (ANI), la benzylamine, (Benz), le N,N-dimethylaniline (DANI), le N,N-diéthylaniline (DEANI), la pyridine (Pyr), la triéthylamine (TEA), la 1,1,3,3-tetraméthylguanidine (TMG), l'octyl β -D glucopyranoside (OGP), le dithiothréitol (DTT), l'iodoacétamide (IAA), l'albumine du sérum bovin (BSA) et le lysozyme ont été achetés chez Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). L'acétone, l'acétonitrile (AcN), le chloroforme, l'eau (H₂O) et le méthanol (MeOH) ont été achetés chez Biosolve Dieuze, France). Le 4-hydroxycinnamique méthyl ester (HCCE) a été fourni par Bruker Daltonics (Bremen, Allemagne). L'enzyme trypsine a été obtenue chez Promega (Charbonnières-les-Bains, France).

6.2. Préparation des solutions et des coupes d'organes

6.2.1. Solutions

6.2.1.1. Solutions d'étalonnage

L'étalonnage de l'analyseur TOF sur la gamme de masse m/z 1000-3500 a été effectué à l'aide d'une solution *Peptide Calibration Standard* (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) composée de 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).

L'étalonnage de l'analyseur TOF pour l'analyse des lipides est réalisé avec la solution *Peptide Calibration Standard* en ajoutant les pics de la matrice.

Les spectres des protéines sont étalonnés avec la solution *Protein Calibration Standard I* (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) préparée à partir de 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).

6.2.1.2. Digestats de BSA et Lysozyme

50 µl de solution de lysozyme ou de BSA (10^{-5} M) ont été prélevés. Une réduction des ponts disulfures de ces protéines a été réalisée en ajoutant 20 µl de solution de DTT (50mM) et en incubant pendant 15 minutes à 55°C. L'alkylation des cystéines a été effectuée avec 20 µl d'une solution d'IAA (50mM). Cette solution a ensuite été incubée à température ambiante et à l'obscurité pendant 15 minutes. La digestion trypsique a été réalisée avec l'ajout de 10 µl de trypsine (20 µg/ml) suivi d'une incubation à 37°C pendant toute la nuit. Le dessalage des digestats a ensuite été effectué à l'aide d'un ZipTip C18.

6.2.2. Les coupes de tissus

6.2.2.1. Coupes de cerveaux et de reins de rat

Des mâles adultes Wistar, pesant 250-350g (accréditation du ministère de l'agriculture N° 04860) ont été maintenus sous conditions standards. Les animaux sont sacrifiés par asphyxie au CO₂ et immédiatement disséqués pour isoler le cerveau et les reins. Ces organes sont immédiatement congelés par immersion lente dans une solution d'isopentane refroidie à l'azote liquide pour éviter l'éclatement des cellules. Ils ont ensuite été 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 ont été réalisées avec un cryostat Leica CM1510S (Leica Microsystems, Nanterre, France) à une température de -20°C. Les coupes ont ensuite été transférées sur des lames ITO (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) qui sont des lames histologiques recouvertes d'une couche conductrice.

6.2.2.2. Coupes d'hippocampes de patients humains

Les hippocampes ont été prélevés sur des patients atteints d'épilepsie du lobe temporal avec leur consentement éclairé. Le prélèvement des biopsies a été effectué en suivant les recommandations de la commission d'examen de l'hôpital universitaire de Séoul (H-0507-509-153). Les hippocampes ont immédiatement été congelés par immersion lente dans une solution d'isopentane refroidie à l'azote liquide puis ont été conservés à -80°C jusqu'à réalisation des coupes. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un cryostat à une température de -20°C et déposées sur des lames ITO. L'analyse histologique des tissus

hippocampiques a été réalisée par un anatomopathologiste à partir de coupes colorées par la technique HES.

6.2.2.3. Coupes de tubes de Cuvier de concombres de mer

Des concombres de mer *H. forskali* ont été collectés lors de plongées sous-marines entre 10 et 30 m de profondeur à la station biologique de Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales, France). Ces animaux ont été maintenus dans un aquarium (13uC, 33% de salinité). Les concombres de mer ont été sacrifiés afin de collecter les tubes de Cuvier. Ces tubes de Cuvier ont immédiatement été congelés par immersion lente dans une solution d'isopentane refroidie à l'azote liquide puis ont été conservés à -80°C jusqu'à réalisation des coupes. Des coupes de 12 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un cryostat à une température de -20°C et déposées sur des lames ITO.

6.2.2.4. Coupes transversales de chaînes nerveuses de sangsue

Les sangsues adultes *H. medicinalis* ont été achetées chez Ricarimpex (Eysines, France). A leur arrivée, les animaux ont été maintenus dans un aquarium sans nourriture jusqu'à dissection. Pour réaliser la lésion sur la chaîne nerveuse, les sangsues ont été épinglées et ouvertes sur une petite zone en suivant la ligne médiane ventrale afin d'accéder à la chaîne nerveuse et de couper partiellement les connectifs interganglionnaires. Après la mise en place de la régénération nerveuse, 6 heures, les animaux ont été anesthésiés dans une solution contenant 10% d'éthanol, épinglés sur un support et congelés à -80°C durant une heure. Le corps des sangsues a ensuite été coupé en plusieurs blocs de 1 à 2 cm. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées à partir de ces blocs au niveau du ganglion 9.

6.2.2.5. Embryons de sangsue

Les embryons utilisés au cours de cette thèse sont des embryons au stade E12. Le stade E0 correspond au jour de la ponte du cocon et le stade E30 correspond au jour de l'éclosion et de la sortie de jeunes animaux. Après extraction du cocon, les embryons de sangsue ont été maintenus dans un aquarium (0.5 g/l Instant Ocean, Aquarium System) à 22°C. Les embryons ont été ouverts le long de la ligne médio-dorsale, épinglés, rincés pendant 2 minutes dans le méthanol puis placés sur une lame ITO et séchés sur une plaque chauffante.

6.3. Préparation des tissus

6.3.1. Traitements des coupes

Les coupes ont été transférées dans un dessiccateur pendant 10 minutes afin d'enlever l'eau résiduelle. Pour l'analyse des peptides, les coupes ont été soumises à un bain de chloroforme pendant 30 secondes. Pour l'analyse des protéines, les coupes ont subi des bains successifs de 30 secondes chacun, d'acétone froid, de chloroforme puis d'éthanol 70% froid et d'éthanol 95% froid. L'analyse des lipides ne nécessitait pas de traitement des coupes au préalable.

6.3.2. Digestion enzymatique *in situ*

Une solution contenant 50 µg/ml de trypsine a été préparée dans un tampon NH_4HCO_3 50 mM (pH=8). La digestion enzymatique a été réalisée à l'aide de l'ImagePrep (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). La méthode employée comprend 15 phases incluant un spray d'1 seconde 30, une incubation de 4 minutes et un séchage de 3 minutes.

6.3.3. Préparation des matrices

Pour l'analyse des lipides, la solution de matrice 2,5-DHB a été préparée à 20 mg/ml. Les matrices ioniques liquides ont été synthétisées par l'ajout d'1,2 équivalent d'ANI, de DANI, de DEANI, de 3-AP ou de Pyr à une solution de 2,5-DHB à 20 mg/ml. Ces matrices ont toutes été solubilisées dans un mélange EtOH/TFA 0.1% (7:3, v/v).

Pour l'analyse des médicaments et de leurs métabolites, les matrices ioniques liquides ont été synthétisées par l'ajout d'1 équivalent de TEA, de DEANI, de TMG, ou de Benz à une solution d'HCCA à 10 mg/ml. Toutes ces matrices ont été solubilisées dans un mélange EtOH/TFA 0.1% (7:3, v/v).

Pour l'analyse des peptides, les solutions d'HCCA et d'HCCE ont été préparées à 10 mg/ml alors que la solution de 2,5-DHB a été préparée à 30 mg/ml. Les matrices ioniques solides ont été synthétisées par l'ajout d'1,5 équivalent d'ANI, de DANI ou de 3-AP à une solution d'HCCA à 10 mg/ml. Toutes ces matrices ont été solubilisées dans un mélange AcN/TFA 0,1% (6:4, v/v).

Pour l'analyse des protéines, la solution de SA a été préparée à 10 mg/ml. Les matrices ioniques solides ont été synthétisées par l'ajout d'1 équivalent d'ANI ou de 3-AP à une solution de SA à 10 mg/ml. Toutes ces matrices ont été solubilisées dans un mélange AcN/TFA 0,1% (6:4, v/v).

6.3.4. Dépôts des matrices

6.3.4.1. Les lipides

Les dépôts automatiques des matrices ioniques liquides ont été réalisés à l'aide du Chemical Inkjet Printer (CHIP-1000, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japon), un microspotter permettant de délivrer des gouttelettes d'une centaine de picolitres. 20 nl de la solution de matrice 2,5-DHB et 7.5 nl de solution de 2,5-DHB/ANI, 2,5-DHB/DANI, 2,5-DHB/DEANI, 2,5-DHB/3AP et 2,5-DHP/Pyr ont été déposés sur chaque spot espacé de 150 à 250 µm centre à centre, dépendamment des expériences. A chaque passage, 5 gouttelettes de 100 pl ont été déposées sur chaque spot.

6.3.4.2. Les médicaments et leurs métabolites

Les dépôts automatiques des matrices ioniques liquides ont été réalisés à l'aide du Chemical Inkjet Printer (CHIP-1000, Shimadzu Biotech, Kyoto, Japon). 7.5 nl de la solution de matrice HCCA/DEANI, HCCA/TEA, HCCA/Benz et HCCA/Pyr ont été déposés sur chaque spot espacé de 150 à 250 µm centre à centre, dépendamment des expériences. A chaque passage, 5 gouttelettes de 100 pl ont été déposées sur chaque spot.

6.3.4.3. Les peptides et les protéines

Les dépôts ont été réalisés par micro-nébulisation à l'aide de l'ImagePrep (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). Les méthodes de dépôt des matrices fournies avec l'appareil ont tout d'abord été testées. Puis, des méthodes adaptées au dépôt des SIMs ont ensuite été développées au laboratoire (**Tableau 14**). Ces méthodes s'articulent autour de 5 phases et chacune d'elle comprend des étapes de nébulisation, d'incubation et de séchage.

Méthodes Phases	Méthode du constructeur (2,5-DHB)	Méthode du constructeur (HCCA)	Méthode développée au laboratoire (SIM)
1	S 8-30 sprays (0.2V) 1.5 sec I 10 sec D 50 sec	S 5-20 sprays (0.65V) 2.5 sec I 10 sec D 90 sec	S 5 sprays 1 sec I 10 sec D 120 sec
2	S 1 spray 0.01 sec I 0 sec D 30 sec	S 2-10 sprays (0.1V) 2 sec I 30 sec D 60 sec	S 4-12 sprays (0.2V) 1.25 sec I 30 sec D 120 sec
3	S 4-40 sprays (0.09V) 0.03 V I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 20% (+/-40%) Complete drying 4 sprays Safe drying 20 sec	S 4-12 sprays (0.2V) 1 sec I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 20% (+/-40%) Complete drying 2 sprays Safe drying 20 sec	S 10 sprays 1.50 sec I 20 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 25% (+/-40%) Complete drying 2 sprays Safe drying 10 sec
4	S 18 sprays (0.09V) 0.1 V I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 20% (+/-40%) Complete drying 6 sprays Safe drying 20 sec	S 3-30 sprays (0.3V) 1 sec I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 30% (+/-40%) Complete drying 3 sprays Safe drying 40 sec	S 3-30 sprays (0.3V) 1.5 sec I 20 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 25% (+/-40%) Complete drying 3 sprays Safe drying 20 sec
5	S 48 sprays (0.09V) 0.15 V I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 20% (+/-40%) Complete drying 12 sprays Safe drying 40 sec	S 4-64 sprays (0.6V) 1 sec I 30 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 40% (+/-40%) Complete drying 4 sprays Safe drying 40 sec	S 32 sprays 2 sec I 20 sec (+/- 30 sec) D Residual wetness 25% (+/-40%) Complete drying 4 sprays Safe drying 20 sec
Temps de dépôt	120 minutes	120 minutes	90 minutes

Tableau 14. Méthodes utilisées pour l'électronébulisation des matrices sur les coupes de tissu.

6.4. Analyses MALDI

6.4.1. Analyses des lipides et les médicaments

Les images ont été 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 (Nd :YAG, 355 nm) pouvant atteindre une fréquence de 200 Hz et contrôlé par le logiciel FlexControl 3.0 (Build 184). Sur chaque spot, 500 spectres ont été accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz et les images ont été reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1 (Build 15) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne).

6.4.2. Analyses des peptides

Les spectres ont été enregistrés en mode réflecteur ou linéaire positif avec l'Ultraflex II sur une gamme de masse allant de m/z 1000 à 5000. En chaque position, 500 spectres ont été accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz et les images ont été reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

Les images à plus haute résolution spatiale ont été effectuées avec l'Autoflex Speed équipé d'un laser Smartbeam II ayant une fréquence de répétition de 1kHz.

6.4.3. Analyses des protéines

Les spectres ont été enregistrés en mode linéaire positif avec l'Ultraflex II sur une gamme de masse allant de m/z 3000 à m/z 35000. En chaque position 500 spectres ont été accumulés avec une fréquence laser de 200 Hz et les images ont été reconstruites avec le logiciel FlexImaging 2.1.

6.4.4. Identification des protéines

L'identification des protéines a été effectuée par analyse MS/MS directement sur les coupes de tissu avec l'UltraFlex II équipé d'une cellule LIFT III. A partir des coupes digérées, 10000 spectres sont enregistrés incluant 2000 spectres pour l'ion parent.

6.5. Traitements des données

Les spectres enregistrés ont ensuite été retraités avec le logiciel FlexAnalysis 3.0 (Build 96) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne). L'identification des protéines a été réalisée avec

le logiciel Biotoools 3.2 (Build 22) (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) connecté à Mascot 2.2.0.3 et en interrogeant la base de données SwissProt avec oxydation des méthionines comme modification variable et carbamidomethylation sur les cystéines comme modification fixe. La taxonomie sélectionnée était *Homo sapiens*. La trypsine a ensuite été sélectionnée en tant qu'enzyme et deux clivages manqués ont été autorisés. Les tolérances en masse ont été fixées respectivement à 0.5 Da et 0.8 Da pour l'ion parent et les ions fragments.

6.6. Colorations histologiques

6.6.1. Coloration HES

Les coupes de tissus, après un bref passage sur une plaque chauffante, ont été plongées dans un bain d'hématoxyline pendant 3 minutes. Un rinçage à l'eau du robinet a été effectué pendant 2 minutes. Deux bains ont été ensuite réalisés dans une solution d'EtOH 95%/H₂O/HCl. Des bains successifs dans l'eau bidistillée puis dans une solution NH₄OH 35% ont été effectués. Les coupes ont été rincées pendant 5 minutes sous l'eau du robinet. Après une déshydratation dans un bain d'EtOH 80%, les coupes ont été colorées à l'éosine (10 secondes) puis rincées à l'EtOH 95% et 100%. Une coloration au safran a été réalisée pendant 6 minutes, suivie de bains d'EtOH 100% et de xylène.

6.6.2. Coloration au Bleu de toluidine

Les coupes de tissus ont été recouvertes d'une solution aqueuse à 0,1% de Bleu de toluidine. Après 1 minute, un rinçage rapide à l'eau a été effectué. La lame a été ensuite plongée 1 minute dans l'alcool absolu.

6.7. Imagerie optique

Un microscope optique Axioskop (Zeiss, West Germany) muni d'une caméra (Leica Image Manager 1000) a permis d'observer et de photographier la cristallisation des matrices déposées à l'ImagePrep et au CHIP-1000 sur les coupes ainsi que les structures tissulaires après réalisation de colorations HES, à l'objectif x5 et x10. Des mesures de la taille des cristaux ou de la taille des spots ont également pu être faites.

Les images optiques de coupes entières utilisées pour la comparaison avec les images moléculaires ont été obtenues par le scanner Super Cool Scan 2000 (Nikon).

Références bibliographiques

- (1) Wilkins, M. R.; Pasquali, C.; Appel, R. D.; Ou, K.; Golaz, O.; Sanchez, J. C.; Yan, J. X.; Gooley, A. A.; Hughes, G.; Humphery-Smith, I.; Williams, K. L.; Hochstrasser, D. F. *Biotechnology (N Y)* **1996**, *14*, 61-65.
- (2) Souza-Moreira, L.; Campos-Salinas, J.; Caro, M.; Gonzalez-Rey, E. *Neuroendocrinology* **2011**.
- (3) Copenhaver, P. F.; Taghert, P. H. *Dev Biol* **1989**, *131*, 70-84.
- (4) Fisher, R.; Boylan, M. *Dev Neurosci* **2011**, *33*, 75-84.
- (5) Malavolta, L.; Cabral, F. R. *Neuropeptides* **2011**.
- (6) Pierson, J.; Norris, J. L.; Aerni, H. R.; Svenningsson, P.; Caprioli, R. M.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2004**, *3*, 289-295.
- (7) Schwartz, S. A.; Weil, R. J.; Johnson, M. D.; Toms, S. A.; Caprioli, R. M. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 981-987.
- (8) Friedman, D. B.; Hill, S.; Keller, J. W.; Merchant, N. B.; Levy, S. E.; Coffey, R. J.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2004**, *4*, 793-811.
- (9) Kaufmann, R.; Spengler, B.; Lutzenkirchen, F. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1993**, *7*, 902-910.
- (10) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal Chem* **1997**, *69*, 4751-4760.
- (11) Altelaar, A. F.; Luxembourg, S. L.; McDonnell, L. A.; Piersma, S. R.; Heeren, R. M. *Nat Protoc* **2007**, *2*, 1185-1196.
- (12) Amstalden van Hove, E. R.; Blackwell, T. R.; Klinkert, I.; Eijkel, G. B.; Heeren, R. M.; Glunde, K. *Cancer Res* **2010**, *70*, 9012-9021.
- (13) Amstalden van Hove, E. R.; Smith, D. F.; Fornai, L.; Glunde, K.; Heeren, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2011**, *22*, 1885-1890.
- (14) Chughtai, K.; Heeren, R. M. *Chem Rev* **2010**, *110*, 3237-3277.
- (15) Jungmann, J. H.; MacAleese, L.; Buijs, R.; Giskes, F.; de Snaijer, A.; Visser, J.; Visschers, J.; Vrakking, M. J.; Heeren, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 2023-2030.
- (16) Jungmann, J. H.; Macaleese, L.; Visser, J.; Vrakking, M. J.; Heeren, R. M. *Anal Chem* **2011**, *83*, 7888-7894.
- (17) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Mass Spectrom Rev* **2007**, *26*, 606-643.
- (18) Schwamborn, K.; Caprioli, R. M. *Mol Oncol* **2010**, *4*, 529-538.
- (19) Schwamborn, K.; Caprioli, R. M. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 639-646.
- (20) Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 3-19.
- (21) Seeley, E. H.; Caprioli, R. M. *Trends Biotechnol* **2011**, *29*, 136-143.
- (22) Franck, J.; Arafah, K.; Elayed, M.; Bonnel, D.; Vergara, D.; Jacquet, A.; Vinatier, D.; Wisztorski, M.; Day, R.; Fournier, I.; Salzert, M. *Mol Cell Proteomics* **2009**, *8*, 2023-2033.

- (23) McDonnell, L. A.; Corthals, G. L.; Willems, S. M.; van Remoortere, A.; van Zeijl, R. J.; Deelder, A. M. *J Proteomics* **2010**, *73*, 1921-1944.
- (24) Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Jirak, P.; Ott, G.; Knuchel, R.; Rosenwald, A.; Wellmann, A. *J Cancer Res Clin Oncol* **2010**, *136*, 1651-1655.
- (25) Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Uhlig, S.; Ikenberg, H.; Wellmann, A. *Int J Mol Med* **2011**, *27*, 417-421.
- (26) Wisztorski, M.; Lemaire, R.; Stauber, J.; Ait Menguellet, S.; Jardin-Mathe, O.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Med Sci (Paris)* **2007**, *23 Spec No 1*, 31-36.
- (27) Luxembourg, S. L.; Mize, T. H.; McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Anal Chem* **2004**, *76*, 5339-5344.
- (28) Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int J mass spectrom ion Proc* **1987**, *78*, 53-68.
- (29) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal Chem* **1988**, *60*, 2299-2301.
- (30) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1988**, *2*, 151-153.
- (31) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal Chem* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- (32) Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Int J Mass Spectrom Ion Proc* **1991**, *111*, 89-102.
- (33) Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun Mass Spectrom* **1989**, *3*, 432-435.
- (34) Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Methods Enzymol* **1996**, *270*, 519-551.
- (35) Papac, D. I.; Wong, A.; Jones, A. J. *Anal Chem* **1996**, *68*, 3215-3223.
- (36) Pieles, U.; Zurcher, W.; Schar, M.; Moser, H. E. *Nucleic Acids Res* **1993**, *21*, 3191-3196.
- (37) Asara, J. M.; Allison, J. *Anal Chem* **1999**, *71*, 2866-2870.
- (38) Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17*, 553-560.
- (39) Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2006**, *78*, 809-819.
- (40) Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. *Anal Chem* **2004**, *76*, 2938-2950.
- (41) Zabet-Moghaddam, M.; Kruger, R.; Heinzle, E.; Tholey, A. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 1494-1505.
- (42) Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E.; Lasaosa, M.; Tholey, A. *Anal Bioanal Chem* **2006**, *384*, 215-224.
- (43) Li, Y. L.; Gross, M. L.; Hsu, F. F. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 679-682.
- (44) Tholey, A.; Zabet-Moghaddam, M.; Heinzle, E. *Anal Chem* **2006**, *78*, 291-297.
- (45) Taban, I. M.; Altelaar, A. F.; van der Burgt, Y. E.; McDonnell, L. A.; Heeren, R. M.; Fuchser, J.; Baykut, G. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 145-151.
- (46) Miki, A.; Katagi, M.; Kamata, T.; Zaitso, K.; Tatsuno, M.; Nakanishi, T.; Tsuchihashi, H.; Takubo, T.; Suzuki, K. *J Mass Spectrom* **2011**, *46*, 411-416.

- (47) Landgraf, R. R.; Prieto Conaway, M. C.; Garrett, T. J.; Stacpoole, P. W.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2009**, *81*, 8488-8495.
- (48) Verhaert, P. D.; Pinkse, M. W.; Strupat, K.; Conaway, M. C. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 433-449.
- (49) 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.
- (50) Woods, A. S.; Jackson, S. N. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 99-111.
- (51) Hopfgartner, G.; Varesio, E.; Stoeckli, M. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 733-736.
- (52) Landgraf, R. R.; Garrett, T. J.; Calcutt, N. A.; Stacpoole, P. W.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8170-8175.
- (53) Hsieh, Y.; Casale, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 965-972.
- (54) 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.
- (55) Zaima, N.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Setou, M. *J Oleo Sci* **2009**, *58*, 415-419.
- (56) MSI Imaging website. Overview of Commercial Instruments. Available: <http://www.maldi-msi.org>. Accessed 2011 Jul.
- (57) Wisztorski, M.; Franck, J.; Salzet, M.; Fournier, I. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 303-322.
- (58) Goodwin, R. J.; Dungworth, J. C.; Cobb, S. R.; Pitt, A. R. *Proteomics* **2008**, *8*, 3801-3808.
- (59) 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.
- (60) Fox, C. H.; Johnson, F. B.; Whiting, J.; Roller, P. P. *J Histochem Cytochem* **1985**, *33*, 845-853.
- (61) French, D.; Edsall, J. T. *Adv. Protein Chem* **1945**, *2*, 277-335.
- (62) 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.
- (63) Mange, A.; Chaurand, P.; Perrochia, H.; Roger, P.; Caprioli, R. M.; Solassol, J. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 5619-5628.
- (64) Foster, C. S.; Gosden, C. M.; Ke, Y. Q. *Nat Clin Pract Urol* **2006**, *3*, 268-278.
- (65) McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. *Biochemistry* **1977**, *16*, 3276-3293.
- (66) Shi, S. R.; Key, M. E.; Kalra, K. L. *J Histochem Cytochem* **1991**, *39*, 741-748.
- (67) Stirling, J. W.; Graff, P. S. *J Histochem Cytochem* **1995**, *43*, 115-123.
- (68) Podkletnova, I.; Alho, H. *J Histochem Cytochem* **1993**, *41*, 51-56.
- (69) Saito, N.; Konishi, K.; Takeda, H.; Kato, M.; Sugiyama, T.; Asaka, M. *J Histochem Cytochem* **2003**, *51*, 989-994.

- (70) Shi, S. R.; Imam, S. A.; Young, L.; Cote, R. J.; Taylor, C. R. *J Histochem Cytochem* **1995**, *43*, 193-201.
- (71) D'Amico, F.; Skarmoutsou, E.; Stivala, F. *J Immunol Methods* **2009**, *341*, 1-18.
- (72) Bonnel, D.; Longuespee, R.; Franck, J.; Roudbaraki, M.; Gosset, P.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *401*, 149-165.
- (73) Gustafsson, J. O.; Oehler, M. K.; McColl, S. R.; Hoffmann, P. *J Proteome Res* **2010**, *9*, 4315-4328.
- (74) Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 1295-1305.
- (75) Goodwin, R. J.; Lang, A. M.; Allingham, H.; Boren, M.; Pitt, A. R. *Proteomics* **2010**, *10*, 1751-1761.
- (76) Svensson, M.; Boren, M.; Skold, K.; Falth, M.; Sjogren, B.; Andersson, M.; Svenningsson, P.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 974-981.
- (77) Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2003**, *38*, 699-708.
- (78) Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 6448-6456.
- (79) Chen, R.; Hui, L.; Sturm, R. M.; Li, L. *J Am Soc Mass Spectrom* **2009**, *20*, 1068-1077.
- (80) DeKeyser, S. S.; Kutz-Naber, K. K.; Schmidt, J. J.; Barrett-Wilt, G. A.; Li, L. *J Proteome Res* **2007**, *6*, 1782-1791.
- (81) Strohmalm, M.; Strohmalm, J.; Kaftan, F.; Krasny, L.; Volny, M.; Novak, P.; Ulbrich, K.; Havlicek, V. *Anal Chem* **2011**, *83*, 5458-5462.
- (82) Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1069-1077.
- (83) Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2006**, *78*, 7145-7153.
- (84) Franck, J.; Longuespee, R.; Wisztorski, M.; Van Remoortere, A.; Van Zeijl, R.; Deelder, A.; Salzet, M.; McDonnell, L.; Fournier, I. *Med Sci Monit* **2010**, *16*, BR293-299.
- (85) Enomoto, H.; Sugiura, Y.; Setou, M.; Zaima, N. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400*, 1913-1921.
- (86) Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Post, J.; Woods, A. S. *Int J Mass Spectrom* **2008**, *278*, 143-149.
- (87) Andersson, M.; Groseclose, M. R.; Deutch, A. Y.; Caprioli, R. M. *Nat Methods* **2008**, *5*, 101-108.
- (88) Pol, J.; Vidova, V.; Hyotylainen, T.; Volny, M.; Novak, P.; Strohmalm, M.; Kostianen, R.; Havlicek, V.; Wiedmer, S. K.; Holopainen, J. M. *PLoS One* **2011**, *6*, e19441.
- (89) Ronci, M.; Sharma, S.; Chataway, T.; Burdon, K. P.; Martin, S.; Craig, J. E.; Voelcker, N. H. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 3522-3529.
- (90) Hardesty, W. M.; Kelley, M. C.; Mi, D.; Low, R. L.; Caprioli, R. M. *J Proteomics* **2011**, *74*, 1002-1014.
- (91) Cole, L. M.; Djidja, M. C.; Bluff, J.; Claude, E.; Carolan, V. A.; Paley, M.; Tozer, G. M.; Clench, M. R. *Methods* **2011**, *54*, 442-453.

- (92) Franck, J.; Arafah, K.; Barnes, A.; Wisztorski, M.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2009**, *81*, 8193-8202.
- (93) El Ayed, M.; Bonnel, D.; Longuespee, R.; Castelier, C.; Franck, J.; Vergara, D.; Desmons, A.; Tasiemski, A.; Kenani, A.; Vinatier, D.; Day, R.; Fournier, I.; Salzet, M. *Med Sci Monit* **2010**, *16*, BR233-245.
- (94) Aerni, H. R.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 827-834.
- (95) Baluya, D. L.; Garrett, T. J.; Yost, R. A. *Anal Chem* **2007**, *79*, 6862-6867.
- (96) Patel, S. A.; Barnes, A.; Loftus, N.; Martin, R.; Sloan, P.; Thakker, N.; Goodacre, R. *Analyst* **2009**, *134*, 301-307.
- (97) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2003**, *38*, 1081-1092.
- (98) Jardin-Mathe, O.; Bonnel, D.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M. *J Proteomics* **2008**, *71*, 332-345.
- (99) Lagarrigue, M.; Becker, M.; Lavigne, R.; Deininger, S. O.; Walch, A.; Aubry, F.; Suckau, D.; Pineau, C. *Mol Cell Proteomics* **2011**, *10*, M110 005991.
- (100) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 1646-1652.
- (101) Puolitaival, S. M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 882-886.
- (102) Yamada, Y.; Hidefumi, K.; Shion, H.; Oshikata, M.; Haramaki, Y. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2011**, *25*, 1600-1608.
- (103) Moskovets, E.; Preisler, J.; Chen, H. S.; Rejtar, T.; Andreev, V.; Karger, B. L. *Anal Chem* **2006**, *78*, 912-919.
- (104) Trim, P. J.; Djidja, M. C.; Atkinson, S. J.; Oakes, K.; Cole, L. M.; Anderson, D. M.; Hart, P. J.; Francese, S.; Clench, M. R. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3409-3419.
- (105) Spengler, B.; Hubert, M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2002**, *13*, 735-748.
- (106) Bouschen, W.; Schulz, O.; Eikel, D.; Spengler, B. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**, *24*, 355-364.
- (107) Koestler, M.; Kirsch, D.; Hester, A.; Leisner, A.; Guenther, S.; Spengler, B. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2008**, *22*, 3275-3285.
- (108) Rompp, A.; Guenther, S.; Takats, Z.; Spengler, B. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *401*, 65-73.
- (109) Jurchen, J. C.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 1654-1659.
- (110) Tucker, K. R.; Serebryanny, L. A.; Zimmerman, T. A.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Chem Sci* **2011**, *2*, 785-795.
- (111) Zimmerman, T. A.; Monroe, E. B.; Sweedler, J. V. *Proteomics* **2008**, *8*, 3809-3815.
- (112) MSI Imaging website. Software. Available: <http://www.maldi-msi.org>. Accessed 2011 Jul.
- (113) 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.

- (114) Deininger, S. O.; Ebert, M. P.; Futterer, A.; Gerhard, M.; Rocken, C. *J Proteome Res* **2008**, *7*, 5230-5236.
- (115) Bruand, J.; Alexandrov, T.; Sistla, S.; Wisztorski, M.; Meriaux, C.; Becker, M.; Salzet, M.; Fournier, I.; Macagno, E.; Bafna, V. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 4734-4743.
- (116) Bruand, J.; Sistla, S.; Meriaux, C.; Dorrestein, P. C.; Gaasterland, T.; Ghassemian, M.; Wisztorski, M.; Fournier, I.; Salzet, M.; Macagno, E.; Bafna, V. *J Proteome Res* **2011**, *10*, 1915-1928.
- (117) Hanselmann, M.; Kirchner, M.; Renard, B. Y.; Amstalden, E. R.; Glunde, K.; Heeren, R. M.; Hamprecht, F. A. *Anal Chem* **2008**, *80*, 9649-9658.
- (118) Srinivasan, A.; Galban, C. J.; Johnson, T. D.; Chenevert, T. L.; Ross, B. D.; Mukherji, S. K. *AJNR Am J Neuroradiol* **2010**, *31*, 736-740.
- (119) Diaz, M. E.; Ayala, G.; Leon, T.; Zoncu, R.; Toomre, D. *J Comput Biol* **2008**, *15*, 1221-1236.
- (120) Wood, B. R.; Bambery, K. R.; Evans, C. J.; Quinn, M. A.; McNaughton, D. *BMC Med Imaging* **2006**, *6*, 12.
- (121) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1145-1155.
- (122) Deutskens, F.; Yang, J.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2011**, *46*, 568-571.
- (123) Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Reska, M.; Jakse, G.; Knuechel, R.; Wellmann, A. *Int J Mol Med* **2007**, *20*, 155-159.
- (124) Ilastik. Available: <http://hci.iwr.uni-heidelberg.de/MIP/Software/ilastik.php>. Accessed 2011 Jul.
- (125) Jones, E. A.; van Remoortere, A.; van Zeijl, R. J.; Hogendoorn, P. C.; Bovee, J. V.; Deelder, A. M.; McDonnell, L. A. *PLoS One* **2011**, *6*, e24913.
- (126) Chen, R.; Jiang, X.; Conaway, M. C.; Mohtashemi, I.; Hui, L.; Viner, R.; Li, L. *J Proteome Res* **2010**, *9*, 818-832.
- (127) Lagarrigue, M.; Becker, M.; Lavigne, R.; Deininger, S. O.; Walch, A.; Aubry, F.; Suckau, D.; Pineau, C. *Mol Cell Proteomics* **2010**, *10*, M110 005991.
- (128) Monroe, E. B.; Annangudi, S. P.; Hatcher, N. G.; Gutstein, H. B.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Proteomics* **2008**, *8*, 3746-3754.
- (129) Han, E. C.; Lee, Y. S.; Liao, W. S.; Liu, Y. C.; Liao, H. Y.; Jeng, L. B. *Clin Chim Acta* **2010**, *412*, 230-239.
- (130) Morita, Y.; Ikegami, K.; Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Zaima, N.; Tanaka, H.; Uehara, T.; Setoguchi, T.; Sakaguchi, T.; Igarashi, H.; Sugimura, H.; Setou, M.; Konno, H. *Cancer Sci* **2010**, *101*, 267-273.
- (131) Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Sanders, M. E.; Caprioli, R. M. *J Proteome Res* **2010**, *9*, 2182-2190.
- (132) Hanrieder, J.; Wicher, G.; Bergquist, J.; Andersson, M.; Fex-Svenningsen, A. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *401*, 135-147.
- (133) Herbert, Z.; Rauser, S.; Williams, L.; Kapan, N.; Guntner, M.; Walch, A.; Boyan, G. *J Morphol* **2010**, *271*, 1509-1526.
- (134) Chen, R.; Li, L. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397*, 3185-3193.

- (135) Mathur, B. N.; Caprioli, R. M.; Deutch, A. Y. *Cereb Cortex* **2009**, *19*, 2372-2379.
- (136) Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat Med* **2001**, *7*, 493-496.
- (137) Stoeckli, M.; Knochenmuss, R.; McCombie, G.; Mueller, D.; Rohner, T.; Staab, D.; Wiederhold, K. H. *Methods Enzymol* **2006**, *412*, 94-106.
- (138) Pierson, J.; Svenningsson, P.; Caprioli, R. M.; Andren, P. E. *J Proteome Res* **2005**, *4*, 223-226.
- (139) 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.
- (140) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoeckli, M. *Mech Ageing Dev* **2005**, *126*, 177-185.
- (141) Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A.; Gardiner, J.; Seebach, D. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 1921-1924.
- (142) Shimma, S.; Sugiura, Y.; Hayasaka, T.; Hoshikawa, Y.; Noda, T.; Setou, M. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *855*, 98-103.
- (143) Snel, M. F.; Fuller, M. *Anal Chem* **2010**, *82*, 3664-3670.
- (144) Whitehead, S. N.; Chan, K. H.; Gangaraju, S.; Slinn, J.; Li, J.; Hou, S. T. *PLoS One* **2011**, *6*, e20808.
- (145) Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R. C.; Nishijima, M.; Raetz, C. R.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M. J.; Dennis, E. A. *J Lipid Res* **2009**, *50 Suppl*, S9-14.
- (146) Chen, Y.; Liu, Y.; Allegood, J.; Wang, E.; Cachon-Gonzalez, B.; Cox, T. M.; Merrill, A. H., Jr.; Sullards, M. C. *Methods Mol Biol* **2010**, *656*, 131-146.
- (147) Chan, K.; Lanthier, P.; Liu, X.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D.; Li, J. *Anal Chim Acta* **2009**, *639*, 57-61.
- (148) Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cvacka, J.; Svatos, A. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 220-231.
- (149) Matsumoto, J.; Sugiura, Y.; Yuki, D.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Kunii, Y.; Wada, A.; Yang, Q.; Nishiura, K.; Akatsu, H.; Hori, A.; Hashizume, Y.; Yamamoto, T.; Ikemoto, K.; Setou, M.; Niwa, S. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *400*, 1933-1943.
- (150) Solon, E. G.; Schweitzer, A.; Stoeckli, M.; Prideaux, B. *Aaps J* **2010**, *12*, 11-26.
- (151) Bonnel, D.; Legouffe, R.; Willand, N.; Baulard, A.; Hamm, G.; Deprez, B.; Stauber, J. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1399-1406.
- (152) Atkinson, S. J.; Loadman, P. M.; Sutton, C.; Patterson, L. H.; Clench, M. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 1271-1276.
- (153) Goodwin, R. J.; Macintyre, L.; Watson, D. G.; Scullion, S. P.; Pitt, A. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**, *24*, 1682-1686.
- (154) Marko-Varga, G.; Fehniger, T. E.; Rezeli, M.; Dome, B.; Laurell, T.; Vegvari, A. *J Proteomics* **2011**, *74*, 982-992.
- (155) Prideaux, B.; Dartois, V.; Staab, D.; Weiner, D. M.; Goh, A.; Via, L. E.; Barry, C. E., 3rd; Stoeckli, M. *Anal Chem* **2011**, *83*, 2112-2118.

- (156) Reyzer, M. L.; Caldwell, R. L.; Dugger, T. C.; Forbes, J. T.; Ritter, C. A.; Guix, M.; Arteaga, C. L.; Caprioli, R. M. *Cancer Res* **2004**, *64*, 9093-9100.
- (157) Sugiura, Y.; Setou, M. *J Neuroimmune Pharmacol* **2010**, *5*, 31-43.
- (158) Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B.; Laprevote, O. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1550-1559.
- (159) Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J. C. *Anal Chem* **2003**, *75*, 1754-1764.
- (160) Benabdellah, F.; Seyer, A.; Quinton, L.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprevote, O. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *396*, 151-162.
- (161) Wu, K. J.; Odom, R. W. *Anal Chem* **1996**, *68*, 873-882.
- (162) Altelaar, A. F.; van Minnen, J.; Jimenez, C. R.; Heeren, R. M.; Piersma, S. R. *Anal Chem* **2005**, *77*, 735-741.
- (163) Luxembourg, S. L.; McDonnell, L. A.; Duursma, M. C.; Guo, X.; Heeren, R. M. *Anal Chem* **2003**, *75*, 2333-2341.
- (164) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M.; de Lange, R. P.; Fletcher, I. W. *J Am Soc Mass Spectrom* **2006**, *17*, 1195-1202.
- (165) Magnusson, Y. K.; Friberg, P.; Sjoval, P.; Malm, J.; Chen, Y. *Obesity (Silver Spring)* **2008**, *16*, 2745-2753.
- (166) Mas, S.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Aragoncillo, P.; Egido, J.; Laprevote, O.; Vivanco, F. *Analyst* **2007**, *132*, 24-26.
- (167) Debois, D.; Bralet, M. P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprevote, O. *Anal Chem* **2009**, *81*, 2823-2831.
- (168) Tahallah, N.; Brunelle, A.; De La Porte, S.; Laprevote, O. *J Lipid Res* **2008**, *49*, 438-454.
- (169) Touboul, D.; Brunelle, A.; Halgand, F.; De La Porte, S.; Laprevote, O. *J Lipid Res* **2005**, *46*, 1388-1395.
- (170) Brulet, M.; Seyer, A.; Edelman, A.; Brunelle, A.; Fritsch, J.; Ollero, M.; Laprevote, O. *J Lipid Res* **2010**, *51*, 3034-3045.
- (171) Seyer, A.; Einhorn, J.; Brunelle, A.; Laprevote, O. *Anal Chem* **2010**, *82*, 2326-2333.
- (172) Petkovic, M.; Schiller, J.; Muller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Arnhold, J. *Anal Biochem* **2001**, *289*, 202-216.
- (173) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *Anal Chem* **2005**, *77*, 4523-4527.
- (174) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2005**, *16*, 2052-2056.
- (175) Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2009**, *877*, 2822-2829.
- (176) Woods, A. S.; Jackson, S. N. *Aaps J* **2006**, *8*, E391-395.
- (177) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 17-26.
- (178) Estrada, R.; Yappert, M. C. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 1531-1540.
- (179) Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Zemski Berry, K. A. *Biochim Biophys Acta* **2011**.

- (180) Snovida, S. I.; Chen, V. C.; Perreault, H. *Anal Chem* **2006**, *78*, 8561-8568.
- (181) Snovida, S. I.; Perreault, H. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 3711-3715.
- (182) Tholey, A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 1761-1768.
- (183) Palmblad, M.; Cramer, R. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18*, 693-697.
- (184) 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.
- (185) Dreisewerd, K.; Lemaire, R.; Pohlentz, G.; Salzet, M.; Wisztorski, M.; Berkenkamp, S.; Fournier, I. *Anal Chem* **2007**, *79*, 2463-2471.
- (186) Towers, M. W.; McKendrick, J. E.; Cramer, R. *J Proteome Res* **2010**, *9*, 1931-1940.
- (187) Fehniger, T.; Vegvari, A.; Rezeli, M.; Prikk, K.; Ross, P.; Dahlback, M.; Edula, G.; Sepper, R.; Marko-Varga, G. *Anal Chem* **2011**.
- (188) Chay, S. H.; Herman, J. L. *Arzneimittelforschung* **1998**, *48*, 446-454.
- (189) Garrett, T. J.; Prieto Conaway, M. C.; Viatcheslav, K.; Huy, B.; Izgarian, N.; Stafford, G.; Yost, R. A. *Int J Mass Spectrom* **2007**, *260*, 166-176.
- (190) Lewis, D. F.; Ioannides, C.; Parke, D. V. *Environ Health Perspect* **1998**, *106*, 633-641.
- (191) Brancia, F. L.; Oliver, S. G.; Gaskell, S. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, *14*, 2070-2073.
- (192) Warwood, S.; Mohammed, S.; Cristea, I. M.; Evans, C.; Whetton, A. D.; Gaskell, S. J. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 3245-3256.
- (193) Lascoux, D.; Paramelle, D.; Subra, G.; Heymann, M.; Geourjon, C.; Martinez, J.; Forest, E. *Angew Chem Int Ed Engl* **2007**, *46*, 5594-5597.
- (194) Yang, J.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2011**, *83*, 5728-5734.
- (195) Bakus, G. *Mar Biol* **1968**, *2*.
- (196) Bingham, B.; Braithwaite, L. *J Exp Mar Biol Ecol* **1986**, *98*.
- (197) Kobayashi, M.; Hori, M.; Kan, K.; Yasuzawa, T.; Matsui, M. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **1991**, *39*.
- (198) Vandenspiegel, D.; Jangoux, M. *Mar Biol* **1987**, *96*, 263-275.
- (199) VandenSpiegel, D.; Jangoux, M.; Flammang, P. *Biol Bull* **2000**, *198*, 34-49.
- (200) 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.
- (201) 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.
- (202) 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.; et al. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 30288-30292.
- (203) Li, K. W.; Jimenez, C. R.; Van Veelen, P. A.; Geraerts, W. P. *Endocrinology* **1994**, *134*, 1812-1819.
- (204) Li, L.; Garden, R. W.; Sweedler, J. V. *Trends Biotechnol* **2000**, *18*, 151-160.

- (205) Li, L.; Romanova, E. V.; Rubakhin, S. S.; Alexeeva, V.; Weiss, K. R.; Vilim, F. S.; Sweedler, J. V. *Anal Chem* **2000**, *72*, 3867-3874.
- (206) Hummon, A. B.; Amare, A.; Sweedler, J. V. *Mass Spectrom Rev* **2006**, *25*, 77-98.
- (207) Hummon, A. B.; Richmond, T. A.; Verleyen, P.; Baggerman, G.; Huybrechts, J.; Ewing, M. A.; Vierstraete, E.; Rodriguez-Zas, S. L.; Schoofs, L.; Robinson, G. E.; Sweedler, J. V. *Science* **2006**, *314*, 647-649.
- (208) de Lange, R. P.; de Boer, P. A.; ter Maat, A.; Tensen, C. P.; van Minnen, J. *J Comp Neurol* **1998**, *395*, 440-449.
- (209) Nicholls, J. G.; Hernandez, U. G. *Q J Exp Physiol* **1989**, *74*, 965-973.
- (210) Salzet, M.; Macagno, E. **2009**, 156-185.
- (211) Blackshaw, S. E.; Babington, E. J.; Emes, R. D.; Malek, J.; Wang, W. Z. *J Anat* **2004**, *204*, 13-24.
- (212) Emes, R. D.; Wang, W. Z.; Lanary, K.; Blackshaw, S. E. *FEBS Lett* **2003**, *533*, 124-128.
- (213) Korneev, S.; Fedorov, A.; Collins, R.; Blackshaw, S. E.; Davies, J. A. *Invert Neurosci* **1997**, *3*, 185-192.
- (214) Wang, W. Z.; Emes, R. D.; Christoffers, K.; Verrall, J.; Blackshaw, S. E. *Cell Mol Neurobiol* **2005**, *25*, 427-440.
- (215) Vergote, D.; Sautiere, P. E.; Vandenbulcke, F.; Vieau, D.; Mitta, G.; Macagno, E. R.; Salzet, M. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 43828-43837.
- (216) Baker, M. W.; Macagno, E. R. *Curr Biol* **2000**, *10*, 1071-1074.
- (217) Vergote, D.; Macagno, E. R.; Salzet, M.; Sautiere, P. E. *Proteomics* **2006**, *6*, 4817-4825.
- (218) Zimmerman, T. A.; Rubakhin, S. S.; Romanova, E. V.; Tucker, K. R.; Sweedler, J. V. *Anal Chem* **2009**, *81*, 9402-9409.
- (219) Macagno, E. R. *J Comp Neurol* **1980**, *190*, 283-302.
- (220) Sawyer, R. **1981**.
- (221) Muller, K. J.; Carbonetto, S. *J Comp Neurol* **1979**, *185*, 485-516.
- (222) Tasiemski, A.; Salzet, M. *Adv Exp Med Biol* **2010**, *708*, 80-104.
- (223) Tasiemski, A.; Vandenbulcke, F.; Mitta, G.; Lemoine, J.; Lefebvre, C.; Sautiere, P. E.; Salzet, M. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 30973-30982.
- (224) Croq, F.; Vizioli, J.; Tuzova, M.; Tahtouh, M.; Sautiere, P. E.; Van Camp, C.; Salzet, M.; Cruikshank, W. W.; Pestel, J.; Lefebvre, C. *Glia* **2010**, *58*, 1649-1662.
- (225) Tahtouh, M.; Croq, F.; Lefebvre, C.; Pestel, J. *Eur Cytokine Netw* **2009**, *20*, 95-100.
- (226) Tahtouh, M.; Croq, F.; Vizioli, J.; Sautiere, P. E.; Van Camp, C.; Salzet, M.; Daha, M. R.; Pestel, J.; Lefebvre, C. *Mol Immunol* **2009**, *46*, 523-531.
- (227) Schikorski, D.; Cuvillier-Hot, V.; Boidin-Wichlacz, C.; Slomianny, C.; Salzet, M.; Tasiemski, A. *J Immunol* **2009**, *183*, 7119-7128.
- (228) Schikorski, D.; Cuvillier-Hot, V.; Leippe, M.; Boidin-Wichlacz, C.; Slomianny, C.; Macagno, E.; Salzet, M.; Tasiemski, A. *J Immunol* **2008**, *181*, 1083-1095.

- (229) Hamacher, M.; Meyer, H. E. *Expert Rev Proteomics* **2005**, *2*, 1-3.
- (230) Hanash, S. *Mol Cell Proteomics* **2004**, *3*, 298-301.
- (231) Jacobs, M. P.; Leblanc, G. G.; Brooks-Kayal, A.; Jensen, F. E.; Lowenstein, D. H.; Noebels, J. L.; Spencer, D. D.; Swann, J. W. *Epilepsy Behav* **2009**, *14*, 438-445.
- (232) Fisher, R. S.; van Emde Boas, W.; Blume, W.; Elger, C.; Genton, P.; Lee, P.; Engel, J., Jr. *Epilepsia* **2005**, *46*, 470-472.
- (233) Engel, J., Jr.; Wilson, C.; Bragin, A. *Epilepsia* **2003**, *44 Suppl 12*, 60-71.
- (234) French, J. A.; Williamson, P. D.; Thadani, V. M.; Darcey, T. M.; Mattson, R. H.; Spencer, S. S.; Spencer, D. D. *Ann Neurol* **1993**, *34*, 774-780.
- (235) Williamson, P. D.; French, J. A.; Thadani, V. M.; Kim, J. H.; Novelly, R. A.; Spencer, S. S.; Spencer, D. D.; Mattson, R. H. *Ann Neurol* **1993**, *34*, 781-787.
- (236) Benbadis, S. R.; Kotagal, P.; Klem, G. H. *Neurology* **1996**, *46*, 45-48.
- (237) Cendes, F. *Curr Opin Neurol* **2004**, *17*, 161-164.
- (238) Engel, J., Jr. *Epilepsy Res* **1996**, *26*, 141-150.
- (239) Engel, J., Jr.; Babb, T. L.; Crandall, P. H. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* **1989**, *46*, 3-8.
- (240) Fisher, P. D.; Sperber, E. F.; Moshe, S. L. *Brain Dev* **1998**, *20*, 563-573.
- (241) Lewis, D. V. *Epilepsia* **2005**, *46 Suppl 7*, 39-44.
- (242) Mathern, G. W.; Babb, T. L.; Pretorius, J. K.; Melendez, M.; Levesque, M. F. *Epilepsy Res* **1995**, *21*, 133-147.
- (243) Mathern, G. W.; Leite, J. P.; Pretorius, J. K.; Quinn, B.; Peacock, W. J.; Babb, T. L. *Epilepsy Res Suppl* **1996**, *12*, 33-43.
- (244) Mathern, G. W.; Pretorius, J. K.; Babb, T. L. *J Neurosurg* **1995**, *82*, 220-227.
- (245) Wieser, H. G. *Epilepsia* **2004**, *45*, 695-714.
- (246) Frotscher, M. *Neurosci Lett* **1988**, *87*, 18-22.
- (247) Amaral, D. G.; Witter, M. P. *Neuroscience* **1989**, *31*, 571-591.
- (248) Daitz, H. M.; Powell, T. P. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **1954**, *17*, 75-82.
- (249) Muller, C. Thèse Université Strasbourg **2009**.
- (250) Eriksson, P. S.; Perfilieva, E.; Bjork-Eriksson, T.; Alborn, A. M.; Nordborg, C.; Peterson, D. A.; Gage, F. H. *Nat Med* **1998**, *4*, 1313-1317.
- (251) Reynolds, B. A.; Weiss, S. *Science* **1992**, *255*, 1707-1710.
- (252) Siebzehnrubl, F. A.; Blumcke, I. *Epilepsia* **2008**, *49 Suppl 5*, 55-65.
- (253) de Lanerolle, N. C.; Kim, J. H.; Robbins, R. J.; Spencer, D. D. *Brain Res* **1989**, *495*, 387-395.
- (254) Lehmann, T. N.; Gabriel, S.; Kovacs, R.; Eilers, A.; Kivi, A.; Schulze, K.; Lanksch, W. R.; Meencke, H. J.; Heinemann, U. *Epilepsia* **2000**, *41 Suppl 6*, S190-194.
- (255) Magloczky, Z. *Epilepsy Res* **2010**, *89*, 52-59.
- (256) Sutula, T. P.; Dudek, F. E. *Prog Brain Res* **2007**, *163*, 541-563.
- (257) Sperk, G.; Drexel, M.; Pirker, S. *Epilepsia* **2009**, *50 Suppl 12*, 29-31.

- (258) Vezzani, A.; Sperk, G.; Colmers, W. F. *Trends Neurosci* **1999**, *22*, 25-30.
- (259) Mazarati, A.; Wasterlain, C. G. *Neurosci Lett* **2002**, *331*, 123-127.
- (260) Pirker, S.; Gasser, E.; Czech, T.; Baumgartner, C.; Schuh, E.; Feucht, M.; Novak, K.; Zimprich, F.; Sperk, G. *Hippocampus* **2009**, *19*, 1051-1054.
- (261) Hsu, D. *Prog Brain Res* **2007**, *163*, 601-613.
- (262) Dudek, F. E.; Sutula, T. P. *Prog Brain Res* **2007**, *163*, 755-773.
- (263) Swepep. Search. Available: <http://www.swepep.org>. Accessed 2011 Jul.
- (264) Chen, J.; Wang, X.; Zhou, S.; Wang, R.; Zhang, Y.; Li, C.; Zhou, D. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **1996**, *27*, 236-239.
- (265) You, Y.; Bai, H.; Wang, C.; Chen, L. W.; Liu, B.; Zhang, H.; Gao, G. D. *Brain Res* **2011**, *1381*, 208-216.
- (266) McNaught, K. S. *Int Rev Neurobiol* **2004**, *62*, 95-119.
- (267) Kim, S. I.; Voshol, H.; van Oostrum, J.; Hastings, T. G.; Cascio, M.; Glucksman, M. J. *Neurochem Res* **2004**, *29*, 1317-1331.
- (268) Morrison, R. S.; Kinoshita, Y.; Johnson, M. D.; Uo, T.; Ho, J. T.; McBee, J. K.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D. *Mol Cell Proteomics* **2002**, *1*, 553-560.
- (269) Schmidt, O.; Schulenburg, T.; Meyer, H. E.; Marcus, K.; Hamacher, M. *Expert Rev Proteomics* **2005**, *2*, 901-913.
- (270) Yang, J. W.; Czech, T.; Felizardo, M.; Baumgartner, C.; Lubec, G. *Amino Acids* **2006**, *30*, 477-493.
- (271) Zubarev, R.; Kellher, N.; McLafferty, F. *J Am Chem Soc* **1998**, *120*, 3265-3266.
- (272) 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.
- (273) Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal Chem* **1995**, *67*, 3990-3999.
- (274) Debois, D.; Bertrand, V.; Quinton, L.; De Pauw-Gillet, M. C.; De Pauw, E. *Anal Chem* **2010**, *82*, 4036-4045.
- (275) Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J Mass Spectrom* **2007**, *42*, 254-262.
- (276) Landry, C. F.; Ellison, J. A.; Pribyl, T. M.; Campagnoni, C.; Kampf, K.; Campagnoni, A. T. *J Neurosci* **1996**, *16*, 2452-2462.
- (277) Pribyl, T. M.; Campagnoni, C. W.; Kampf, K.; Ellison, J. A.; Landry, C. F.; Kashima, T.; McMahan, J.; Campagnoni, A. T. *J Comp Neurol* **1996**, *374*, 342-353.
- (278) Shiryaev, S. A.; Remacle, A. G.; Savinov, A. Y.; Chernov, A. V.; Cieplak, P.; Radichev, I. A.; Williams, R.; Shiryaeva, T. N.; Gawlik, K.; Postnova, T. I.; Ratnikov, B. I.; Eroshkin, A. M.; Motamedchaboki, K.; Smith, J. W.; Strongin, A. Y. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 30615-30626.
- (279) Shiryaev, S. A.; Savinov, A. Y.; Cieplak, P.; Ratnikov, B. I.; Motamedchaboki, K.; Smith, J. W.; Strongin, A. Y. *PLoS One* **2009**, *4*, e4952.
- (280) Wilczynski, G. M.; Konopacki, F. A.; Wilczek, E.; Lasiecka, Z.; Gorlewicz, A.; Michaluk, P.; Wawrzyniak, M.; Malinowska, M.; Okulski, P.; Kolodziej, L. R.; Konopka, W.; Duniec, K.; Mioduszevska, B.; Nikolaev, E.; Walczak, A.; Owczarek,

- D.; Gorecki, D. C.; Zuschratter, W.; Ottersen, O. P.; Kaczmarek, L. *J Cell Biol* **2008**, *180*, 1021-1035.
- (281) Kim, G. W.; Kim, H. J.; Cho, K. J.; Kim, H. W.; Cho, Y. J.; Lee, B. I. *Neurobiol Dis* **2009**, *36*, 169-180.
- (282) Szklarczyk, A.; Lapinska, J.; Rylski, M.; McKay, R. D.; Kaczmarek, L. *J Neurosci* **2002**, *22*, 920-930.
- (283) Takacs, E.; Nyilas, R.; Szepesi, Z.; Baracska, P.; Karlsen, B.; Rosvold, T.; Bjorkum, A. A.; Czurko, A.; Kovacs, Z.; Kekesi, A. K.; Juhasz, G. *Neurochem Int* **2010**, *56*, 799-809.
- (284) Yin, P.; Yang, L.; Zhou, H. Y.; Sun, R. P. *Med Hypotheses* **2011**, *76*, 184-186.
- (285) Rivera, S.; Khrestchatsky, M.; Kaczmarek, L.; Rosenberg, G. A.; Jaworski, D. M. *J Neurosci* **2010**, *30*, 15337-15357.
- (286) Stauber, J.; MacAleese, L.; Franck, J.; Claude, E.; Snel, M.; Kaletas, B. K.; Wiel, I. M.; Wisztorski, M.; Fournier, I.; Heeren, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom* **2010**, *21*, 338-347.
- (287) Maki, M.; Matsukawa, N.; Yuasa, H.; Otsuka, Y.; Yamamoto, T.; Akatsu, H.; Okamoto, T.; Ueda, R.; Ojika, K. *J Neuropathol Exp Neurol* **2002**, *61*, 176-185.
- (288) Schindler, C. K.; Shinoda, S.; Simon, R. P.; Henshall, D. C. *Neurosci Lett* **2004**, *356*, 163-166.
- (289) Li, T. F.; Lu, C. Z.; Xia, Z. L.; Niu, J. Z.; Yang, M. F.; Luo, Y. M.; Hong, Z. *Sheng Li Xue Bao* **2005**, *57*, 310-318.
- (290) Henshall, D. C.; Araki, T.; Schindler, C. K.; Lan, J. Q.; Tiekoter, K. L.; Taki, W.; Simon, R. P. *J Neurosci* **2002**, *22*, 8458-8465.
- (291) Martins-De-Souza, D.; Dias-Neto, E.; Schmitt, A.; Falkai, P.; Gormanns, P.; Maccarrone, G.; Turck, C. W.; Gattaz, W. F. *World J Biol Psychiatry* **2010**, *11*, 110-120.
- (292) Chang, Y. T.; Chen, P. C.; Tsai, I. J.; Sung, F. C.; Chin, Z. N.; Kuo, H. T.; Tsai, C. H.; Chou, I. C. *Epilepsia* **2011**.
- (293) Farooqui, A. A.; Horrocks, L. A.; Farooqui, T. *Chem Phys Lipids* **2000**, *106*, 1-29.
- (294) Yu, R. K.; Holley, J. A.; Macala, L. J.; Spencer, D. D. *Yale J Biol Med* **1987**, *60*, 107-117.
- (295) Bhaskaran, M. D.; Smith, B. N. *PLoS One* **2010**, *5*, e10683.
- (296) Ben-Ari, Y.; Cossart, R. *Trends Neurosci* **2000**, *23*, 580-587.
- (297) Farooqui, A. A.; Ong, W. Y.; Horrocks, L. A. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **2004**, *4*, 85-96.
- (298) Lu, X. R.; Ong, W. Y.; Halliwell, B.; Horrocks, L. A.; Farooqui, A. A. *Free Radic Biol Med* **2001**, *30*, 1263-1273.
- (299) Kliman, M.; Vijayakrishnan, N.; Wang, L.; Tapp, J. T.; Broadie, K.; McLean, J. A. *Mol Biosyst* **2010**, *6*, 958-966.
- (300) Ma, X.; Liu, G.; Wang, S.; Chen, Z.; Lai, M.; Liu, Z.; Yang, J. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2007**, *859*, 170-177.

- (301) Huang, M. Z.; Hsu, H. J.; Lee, J. Y.; Jeng, J.; Shiea, J. *J Proteome Res* **2006**, *5*, 1107-1116.
- (302) Sampson, J. S.; Hawkrige, A. M.; Muddiman, D. C. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19*, 1527-1534.
- (303) Inutan, E. D.; Richards, A. L.; Wager-Miller, J.; Mackie, K.; McEwen, C. N.; Trimpin, S. *Mol Cell Proteomics* **2010**, *10*, M110 000760.
- (304) Demeure, K.; Quinton, L.; Gabelica, V.; De Pauw, E. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8678-8685.
- (305) Schober, Y.; Schramm, T.; Spengler, B.; Rompp, A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2011**, *25*, 2475-2483.

Imagerie du système nerveux central par spectrométrie de masse MALDI

Ces dernières années, l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI s'est révélée être un outil puissant pour la recherche de biomarqueurs puisqu'elle permet d'effectuer l'analyse d'un large panel de composés endogènes et exogènes dans des coupes de tissu. Des développements restent néanmoins à faire pour l'amélioration de la détection des molécules. La préparation de l'échantillon, incluant les traitements chimiques et le dépôt de la matrice, est dépendante de la nature du tissu et des molécules d'intérêt. Celle-ci influence la qualité des spectres et des images. D'autre part, les outils bioinformatiques tels que les analyses multi variées apportent des informations sur la répartition des marqueurs au sein du tissu en fonction des phénotypes cellulaires. Ces étapes sont donc cruciales pour les applications de l'imagerie dans le domaine de la biologie. Dans ce contexte, au cours de ma thèse, je me suis tout d'abord axé sur les développements méthodologiques tels que la création de nouvelles matrices adaptées à l'imagerie MALDI, *i.e.* les matrices ioniques liquides. Forte de ces développements, grâce à cette technologie, j'ai étudié, dans une optique de dynamique, les acteurs moléculaires de la régénération neuronale chez un modèle invertébré, la sangsue médicinale, après une lésion de la chaîne nerveuse. Ensuite, mes études ont porté sur la recherche de biomolécules à partir de biopsies d'hippocampe de patients épileptiques. Mes travaux ont révélés l'existence de protéines associées à une distribution particulière correspondant à des couches des neurones anormalement présents dans l'hippocampe des patients épileptiques. L'ensemble de mes travaux a mis en évidence que cette nouvelle technologie d'imagerie moléculaire a atteint un niveau de maturité suffisant pour réaliser des études biologiques et cliniques en complément des techniques d'imagerie *in vivo* ou cytologique.

Imaging of central nervous system by MALDI mass spectrometry

In recent years, MALDI mass spectrometric imaging has proved to be a powerful tool for biomarker tracking, because it allows the analysis of a wide range of endogenous and exogenous compounds in tissue sections. Developments are still to be done to improve the detection of molecules. The sample preparation, including chemical treatment and deposition of the matrix, is dependent on the nature of the tissue and molecules of interest. It influences the quality of spectra and images. In addition, the bioinformatics tools such as multivariate analysis provide informations on the distribution of markers within the tissue based on cellular phenotypes. These steps are crucial for imaging applications in the field of biology. In this context, during my thesis, I first focused on methodological developments, such as the creation of new matrices suitable for MALDI imaging, *i.e.* liquid ionic matrices. Then, using this technology in dynamic, I studied molecular actors of nerve regeneration in an invertebrate model, the medicinal leech, after lesion of the nerve cord. Finally, my studies focused on research of biomolecules from hippocampus of epileptic patients. My work has revealed the existence of proteins associated with a particular distribution corresponding to layers of neurons abnormally present in the hippocampus of epileptic patients. All my work has shown that this new molecular imaging technology has now reached the maturity sufficient to achieve biological and clinical studies in addition to *in vivo* or cytological imaging techniques.

Mots-Clés: Protéomique, Spectrométrie de Masse, Imagerie MALDI, Matrices ioniques, Système nerveux central, Sangsue, Hippocampe, Neurogénèse, Régénération nerveuse, Neuropathies.

Laboratoire de Spectrométrie de Masse Biologique, Fondamentale et Appliquée
Equipe Imagerie MALDI
UPRES EA 4550, IFR 147, Bâtiment SN3
Université de Lille 1
59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France