

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

Thèse de doctorat

Biologie Santé

Présenté par

MAXENCE WISZTORSKI



DEVELOPPEMENTS EN IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET APPLICATIONS AUX MODELES INVERTEBRES

Thèse codirigée par le Pr. Michel SALZET et le Dr. Isabelle FOURNIER

Soutenue le 12 Octobre 2006

Jury :

M. Gérard BOLBACH

Rapporteur

M. Alain BRUNELLE

Rapporteur

M. Edwin DE PAUW

Examineur

M. Michel MATHIEU

Examineur

M. Bernhard SPENGLER

Examineur

M. Ron HEEREN

Examineur

Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur Michel Salzet qui m'a permis de réaliser une thèse dans son laboratoire ainsi que pour ses conseils éclairés et ses idées, au premier abord parfois « farfelues » mais qui se sont toujours révélées excellentes. Je souhaite associer à ses remerciements Madame le Docteur Isabelle Fournier qui m'a fait l'honneur d'encadrer cette thèse. Je lui témoigne ma profonde gratitude pour sa disponibilité et les connaissances qu'elle m'a transmises. Je les remercie tout deux pour leur soutien et la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de ces années de travail.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Monsieur le Docteur Gérard Bolbach et Monsieur le Docteur Alain Brunelle pour avoir accepté de juger ce travail.

J'adresse à Monsieur le Professeur Ron M.A. Heeren et Monsieur le Professeur Bernhard Spengler, ma reconnaissance pour l'honneur qu'ils me font en participant à ce jury et en venant de si loin.

Je remercie également Monsieur le Professeur Michel Mathieu, Monsieur le Professeur Edwin De Pauw pour l'attention qu'ils ont portés à cette étude en acceptant de faire partie de ce jury.

Je voudrais bien sûr remercier l'ensemble des permanents du laboratoire pour leur sympathie et leur disponibilité lorsque j'ai eu besoin de leur aide. J'adresse en particulier mes plus vifs remerciements à Annie Desmons pour ses conseils et les connaissances qu'elle m'a apportées.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tout ceux qui ont collaboré très activement à ces travaux : Vincent Thomy de l'IEMN pour la réalisation des masques et des supports conducteurs transparents, Loïc Brunet du CCMIC pour la métallisation des échantillons à l'or et Anne-Marie Blanchenet du CCME pour les dépôts de carbone et de chrome, Alain Brunelle et Delphine Debois de l'ICSN pour la réalisation des images en SIMS, Klaus Dreisewerd de l'institut de physique et biophysique médical de Münster pour son aide sur SIMION et la réalisation d'analyse en IR-MALDI.

Je remercie très vivement la région Nord-Pas-de-Calais et Génome Québec pour avoir financé cette thèse.

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

Enfin je dois saluer l'immense disponibilité de mes parents et de mes amis les plus chers. Une mention particulière pour Rodrigue, pour son soutien moral et les corrections qu'il a pu apporter à ce mémoire Ainsi qu'à Sabrina, la femme qui partage ma vie, pour son aide, son indulgence et pour sa présence quotidienne à mes côtés.

A l'heure de la protéomique, la spectrométrie de masse s'est révélée un outil puissant pour la recherche et l'identification des biomolécules à partir d'échantillons purifiés. Une nouvelle ère s'ouvre, avec l'imagerie MALDI, permettant en plus la localisation de biomolécules telles que les peptides, les protéines ou les lipides au sein des tissus. Des développements cruciaux restent encore à réaliser pour améliorer les performances de cette technologie. Dans ce contexte, nous nous sommes tout d'abord intéressés à la mise au point de nouveaux protocoles adaptés à l'analyse directe et l'imagerie par spectrométrie de masse de petits organismes en particulier la sangsue *Hirudo medicinalis*. Ce modèle est particulièrement intéressant du point de vue des phénomènes de régénération nerveuse et nous avons débuté des études sur les lipides pouvant y être impliqués. Le deuxième point abordé est l'étude des apports de la métallisation pour la spectrométrie de masse. Tout d'abord un dépôt métallique sur des lames histologiques permet à la fois une corrélation des informations morphologiques obtenues en microscopie optique avec les images moléculaires d'IMS. La métallisation de l'échantillon quand à elle, a permis de supprimer les décalages de pics vers les plus hauts rapports m/z , d'obtenir des spectres MALDI de meilleures qualités et grâce à une reproductibilité plus importante entre 2 spectres, de produire des images MALDI de plus grandes qualités. Enfin, une partie des développements a été dédiée à la possibilité d'améliorer la résolution de l'image grâce à l'utilisation d'un système permettant de diminuer la zone accessible au laser.

At the proteomics' time, the mass spectrometry appears to be a powerful tool to find and identify peptides and proteins from purified sample. A new era is now beginning, with the MALDI imaging, allowing both research, identification while conserving the localization of biomolecules like peptides, proteins and lipids in tissues. Crucial developments at the level of the sample preparations are in progress to improve the performances of this technology. In this context, we were interested first of all in the settling of new protocols adapted to direct analysis and Imaging mass spectrometry of small organisms in particular the leech *Hirudo medicinalis*. This model is particularly interesting for the study of nervous regeneration and we performed studies on lipids which can be implied in this physiological process. The second point is the study of the contributions of metal coating for mass spectrometry. First of all a metal evaporated on histological glass allows at the same time a correlation of the morphological information with the molecular images of IMS. The coating of the sample,

allowed preventing the mass shifts towards the highest m/z , to obtain best MALDI spectrum and according to a more important reproducibility between 2 spectra, to produce MALDI images with better qualities. Finally, a last part of the developments was dedicated to the possibility of improving the image resolution by using a system allowing decreasing the irradiated area by the laser.

Table des Matières Générale

Publications	vii
Liste des Figures	xi
Liste des Tableaux	xv
Liste des Abréviations	xvii
Chapitre 1	1
1.1 Les défis pour une nouvelle technique d'imagerie de biomolécules.	1
1.2 Sujets abordés dans cette Thèse.	3
Chapitre 2	7
2.1 L'imagerie par spectrométrie de masse : principe	7
2.2 L'imagerie MALDI.....	9
2.2.1 Le MALDI	9
2.2.2 L'imagerie MALDI.....	11
2.2.3 Les méthodes dérivées de l'imagerie MALDI.....	14
2.2.4 Applications	15
2.3 L'imagerie SIMS	17
2.3.1 Le SIMS	17
2.3.2 L'imagerie SIMS	17
2.4 Les autres types d'imagerie par spectrométrie de masse	19
2.4.1 Techniques utilisant un faisceau laser ou ionique.....	19
2.4.2 Techniques « laser free »	20
Chapitre 3	25
3.1 Spectromètres de masse utilisés.....	25
3.1.1 MALDI-TOF Voyager-DE STR.....	25
3.1.2 L'Ultraflex TOF-TOF	26
3.1.3 Le Tof SIMS	26
3.1.4 L'ESI Q-TOF	26
3.2 Préparation des solutions et des tissus	26
3.2.1 Solution de standards	26
3.2.2 Coupes de cerveau de rats:.....	27
3.2.3 Préparation des matrices :	27
3.2.4 Préparation de l'échantillon pour analyse MALDI.....	27
3.3 De l'analyse directe par spectrométrie de masse à l'imagerie des petits organismes... ..	27
3.3.1 Analyse directe de chaînes nerveuses de sangsue.....	27
3.3.2 Etudes préliminaires des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue	28
3.4 Apport de la métallisation pour l'ISM MALDI.....	30
3.4.1 Dépôt par évaporation.....	31
3.4.2 Dépôt par Pulvérisation cathodique :	32
3.5 Procédés de fabrication des masques	32
Chapitre 4	37
4.1 Introduction.....	37
4.2 Le système nerveux d' <i>Hirudo medicinalis</i>	39
4.3 Analyses directes par spectrométrie de masse des peptides du système nerveux de sangsue	40
4.3.1 Analyses directes du système nerveux dans une sangsue entière	41
4.3.2 Préparation des chaînes nerveuses isolées	43
4.3.3 Recherche d'un substituant pour l'OCT	43
4.3.4 Protocole de rinçage des coupes	45

4.3.5 Extraction sur coupes	48
4.4 Etudes préliminaires des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue	52
4.4.1 Analyse des chaînes en cours de régénération par imagerie par TOF-SIMS.....	53
4.4.2 Caractérisation des lipides par spectrométrie de masse	56
4.4.3 Etude différentielle par spectrométrie de masse des profils de lipides impliqués dans la régénération	58
4.5 Conclusion	60
Chapitre 5	63
5.1 Introduction.....	63
5.2 Métallisation des supports.....	64
5.3 Métallisation des échantillons.....	71
5.3.1 Introduction.....	71
5.3.2 Effets de l'accumulation de charges en surface d'une coupe de tissu	71
5.3.3 Suppression de l'effet de charge grâce à un dépôt de métal.	73
5.3.4 Effets du dépôt métallique sur la qualité spectrale.	77
5.3.5 Métallisation et ISM MALDI	79
5.3.6 L'apport de la métallisation dans les processus de désorption/ionisation	80
5.4 Conclusion	84
Chapitre 6	87
6.1 Introduction.....	87
6.2 Présentation des systèmes de masques	90
6.3 Les masques à ouvertures droites.	91
6.3.1 Analyses de dépôts de standards à travers des masques	91
6.3.2 Analyses de coupes de tissu.....	93
6.3.3 Augmentation de l'intensité et utilisation de caches.....	95
6.3.4 Relation entre l'épaisseur du masque et zone irradiée.....	96
6.4 Masques à ouvertures en « V ».....	98
6.5 Conclusions et perspectives	101
Chapitre 7	107
Références	115
Annexes	123

Publications

Brevets:

- ▶ Fournier I., Dechamps M., Lemaire R., Wisztorski M., Tabet J.C., Salzet M., **Développement d'un Kit d'hybridation et de détection des ARNm par spectrométrie de masse MALDI/TOF : Oligopeptide, Tag-Mass** *Enveloppe Soleau* (2004), N° 195205 040504 (INPI)
- ▶ Wisztorski M., Thomy V., Fournier I., Salzet M. **Développement de masques conducteurs en vue de l'optimisation de l'imagerie par spectrométrie de masse** *Enveloppe Soleau* (2005), N°237719 (INPI)
- ▶ Wisztorski M., Thomy V., Fournier I., Salzet M. **Développement de masques conducteurs en vue de l'optimisation de l'imagerie par spectrométrie de masse** Déclaration d'invention CNRS n° DI 00047-03 (2005), *US Provisional Patent*

Publications:

- ▶ Lemaire R., Wisztorski M., Desmons A., Tabet J.C., Day R., Salzet M., Fournier I. (2006) **MALDI MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity using Organic Solvents**, *Anal. Chem.*, sous presse
- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Stauber J., Salzet M., Fournier I. (2006) **New developments in MALDI imaging for Pathological proteomic studies**, *Current Pharm. Design*, accepté
- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Stauber J., Ait Menguelet S., Jardin-Mathé O., Salzet M., Fournier I. (2006) **Imagerie MALDI : Une nouvelle technologie pour découvrir et valider de nouveaux biomarqueurs**, *Médecine Sciences*, soumis
- ▶ Lemaire R., Stauber J., Wisztorski M., Van Camp C., Desmons A., Deschamps M., Proess G., Rudlof I., Woods A. S., Day R., Salzet M., Fournier I. (2006) **Tag-Mass: Specific Molecular Imaging of Transcriptome and Proteome by Mass Spectrometry Based on Photocleavable Tag**, Soumis
- ▶ Wisztorski M., Brunet L., Lemaire R., Salzet M., Fournier I. (2006) **Metal Coating: How to Solve Surface Charging Effects in MALDI-MS imaging**, à soumettre
- ▶ Wisztorski M., Thomy V., Salzet M., Fournier I. (2006) **MALDI Mask, An Easy Tool for Laser Reduction for MALDI Imaging MS**, à soumettre
- ▶ Dreisewerd K., Lemaire R., Salzet M., Wisztorski M., Berkenkamp S., Fournier I. (2006) **Molecular Profiling of Native and Matrix-Coated Tissue Slices from Rat Brain by Infrared and Ultraviolet Laser Desorption/Ionization Orthogonal-Time-of-Flight Mass Spectrometry**, à soumettre

Communications Orales :

- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Jardin-Mathé O., Courcelle C., Salzet M., Fournier I. (2005) **Développement de nouveaux outils et protocoles pour l'Imagerie par Spectrométrie de masse compatibles avec l'étude de petits organismes**. Xèmes Rencontres du Club Jeunes de la Société Française de Spectrométrie de Masse, 4 au 8 avril, Angers, France.

- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Jardin-Mathé O., Courcelle C., Salzet M., Fournier I. (2005) **L'Imagerie par Spectrométrie de masse MALDI-TOF: Innovations et Perspectives**. Réunion des acteurs de la protéomique en Région Nord, Pas-de-Calais, 1er Juin, Godewaersvelde, France.
- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Jardin-Mathé O., Courcelle C., Thomy V., Hendra J.B., Ducoroy P., Salzet M., Fournier I. (2005) **Vers une imagerie par spectrométrie de masse clinique à haut débit**. Journée Innovations en Protéomique, 1eres rencontres du MASTER Protéomique de Lille, 18 Novembre, Villeneuve d'Ascq, France.
- ▶ Fournier I., Lemaire R., Ducoroy P., Wisztorski M., Courcelle C., Jardin-Mathé O., Vinatier D., Tabet JC., Salzet M. (2005) **Nouveaux développements pour l'imagerie MALDI : vers l'imagerie clinique à haut débit**. Proceedings of 1st Symposium of Analytical Chemistry and Biology: From molecule to proteome, September 26 -29, Montpellier, France.
- ▶ Wisztorski M., Salzet M., Fournier I.(2006) **Apport de la Métallisation des Echantillons pour l'Imagerie par Spectrométrie de Masse MALDI-TOF**. XIème Rencontres du Club Jeunes de la Société Française de Spectrométrie de Masse, 24 au 28 avril, Carcans-Maubuisson, France.
- ▶ Wisztorski M., Brunet L., Lemaire R., Stauber J., Jardin-Mathé O., Dreisewerd K., Hillenkamp F., Berkenkamp S., Salzet M., Fournier I. (2006) **Effets de la métallisation en imagerie par spectrométrie de masse UV-MALDI-aTOF et analyse directe de tissu en UV/IR-MALDI-oTOF**, 23èmes Journées Françaises de Spectrométrie de Masse 11 – 14 Septembre 2006, Cité des Congrès, Nantes
- ▶ Dreisewerd K., Lemaire R., Wisztorski M., Berkenkamp S., Hillenkamp F., Salzet M., Fournier I.(2006), **Molecular Profiling of Matrix-coated and Native Tissue Sections by UV- and IR-MALDI-o-TOF-MS**, 17th International Mass Spectrometry Conference, Prague, Aug 27 – Sep 1, Prague/Czech Republic.
- ▶ Dreisewerd K., Müthing J., Fournier I., Distler U., Rohlfing A., Souady J., Kruppe S., Soltwisch J., Kollas O., Lemaire R., Wisztorski M., Salzet M., Peter-Katalinić J., Hillenkamp F., Berkenkamp S. (2006) **Features of IR-MALDI-o-TOF Mass Spectrometry for Interfacing with Thin Layer Chromatography and for Direct Analysis of Thin Tissue Sections** Desorption 2006 September 3-7, Athens, Greece

Posters:

- ▶ Wisztorski M., Lemaire R., Jardin-Mathé O., Salzet M., Fournier I. (2004) **Imaging Mass Spectrometry, An Emerging Technology: Developments And Application To Leech *Hirudo Medicinalis***. Proceedings of 1st International Meeting on Evolution, Development and Neurobiology of the Leech, September 29 to October 3, Villeneuve d'Ascq, France.
- ▶ Wisztorski M., Jardin-Mathé O., Thomy V., Lemaire R., Ducoroy P., Hendra J.B., Courcelle C., Salzet M., Fournier I. (2005) **L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF: innovations et perspectives**. Proceedings of 1st Symposium of Analytical Chemistry and Biology: From molecule to proteome, September 26 -29, Montpellier, France.
- ▶ Lemaire R., Ducoroy P., Wisztorski M., Hendra J.B., Courcelle C., Jardin-Mathé O., Tabet JC., Salzet M., Fournier I. (2005) **Développement de nouvelles matrices compatibles avec l'analyse directe et l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI/TOF et MALDI/TOF-TOF : les matrices ioniques**. Proceedings of 1st Symposium of Analytical Chemistry and Biology: From molecule to proteome, September 26 -29, Montpellier, France.

- ▶ Wisztorski M., Jardin-Mathé O., Thomy V., Lemaire R., Ducoroy P., Hendra J.B., Courcelle C., Salzet M., Fournier I. (2005) **L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF**. Journée André Verbert, 28 Septembre, Lille, France.
- ▶ Wisztorski M.; Dreisewerd K.; Hillenkamp F.; Berkenkamp S.; Salzet M.; Fournier I. (2006) **Effects of metal coating for UV-MALDI-a-TOF Mass Spectrometry Imaging (MALDI MSI) and direct tissue analysis in UV/IR-MALDI-o-TOF mass spectrometry** 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry May 28-June 1, 2006 Seattle
- ▶ Arafah K.; Wisztorski M.; Debois D.; Lemaire R.; Brunelle A.; Laprevote O.; Fournier I.; Salzet M. (2006) **Lipidomics in leech brain regeneration by cluster TOF-SIMS Imaging** 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry May 28-June 1, 2006 Seattle
- ▶ Fournier I.; Lemaire R.; Wisztorski M.; Stauber J.; Jardin-Mathe O.; Day R.; Salzet M. (2006) **New insights in sample preparation for MALDI Imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome** 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry May 28-June 1, 2006 Seattle, WA
- ▶ Salhi B., Coffinier Y., Verplanck N., Wisztorski M., Piret G., Thomy V., Fournier I., Salzet M., Camart JC., and Boukherroub R. (2006), **Nanostructured Surface as EWOOD Counter Electrode for Matrix-Free Mass Spectrometry Analysis**, Trends in Nanotechnology, 04-08 September, 2006 Grenoble (France)
- ▶ Verplanck N., Coffinier Y., Wisztorski M., Piret G., Delhaye C., Thomy V., Fournier I., Camart JC., Tabourier P., Boukherroub R. (2006) **Nanostructured Surface as EWOOD Counter Electrode for Matrix-Free Mass Spectrometry Analysis** 10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2006) November 5 - 9, Tokyo

Liste des Figures

Figure 2. 1 : Principe de l'ISM en mode (a) point par point et (b) microscope ionique.	8
Figure 2.2 : Schéma de principe du MALDI	9
Figure 2.3 : Principe du SMALDI d'après [40].....	15
Figure 2.4 : a) Principe d'ionisation SIMS et fonctionnement en mode (b) dynamique et (c) statique	18
Figure 2.5 : Schéma du SNOM.....	19
Figure 2.6 : Principe du SMS d'après [84].....	21
Figure 2.7 : Principe du DESI.....	21
Figure 2.8 : Principe des sources (a) JEDI et (b) DAPCI	22
Figure 2.9 : Principe des sources (a) DART et (b) ELDI	23
Figure 3. 1: Stratégie d'analyse de la régénération nerveuse in vivo	29
Figure 3.2 : Schéma de principe de la métallisation par évaporation.	31
Figure 3.3 : Processus de fabrication des masques à ouvertures droites	33
Figure 3.4 : Processus de fabrication des masques en V.....	34
Figure 4.1 : <i>Hirudo medicinalis</i> et sa classification phylogénétique	39
Figure 4.2 : a) coupe transversale d' <i>Hirudo medicinalis</i> , b) schéma d'ensemble de son système nerveux [R.T. Sawyer, Neurobiology of the Leech (1981)]et c) d'un ganglion (face ventrale)[R.T. Sawyer, Neurobiology of the Leech (1981)].....	40
Figure 4.3 : Spectre de masse avec contamination du polymère de l'OCT.	41
Figure 4.4 : Comparaison des 2 techniques de congélation de sangsue entière.	42
Figure 4.5 : Spectres de masse d'une coupe de ganglion de sangsue (a) non rincé ou (b) rincé à l'eau	46
Figure 4.6 : Spectres de masse d'une coupe de ganglion de sangsue (a) rincé à l'eau ou (b) rincé à l'éthanol.....	47
Figure 4.7 : Spectre de masse d'une coupe de ganglion de sangsue a) rincé à l'éthanol et b) spectre PSD de l'ion m/z 861,7.....	47
Figure 4.8 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'ACN 60% sur une coupe de ganglion de sangsue	48
Figure 4.9 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'ACN 60% avec 10% de TFA sur une coupe de ganglion de sangsue.....	48

Figure 4.10 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'HCCA sur une coupe de ganglion de sangsue	49
Figure 4.11 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'HCl 1N sur une coupe de ganglion de sangsue	50
Figure 4.12 : Spectres de masse obtenu après une micro-extraction à l'ACN 80% sur une coupe de cerveau de rat de a) 20µm ou b) 40µm d'épaisseur.....	50
Figure 4.13 : a) images de la répartition de l'acide oléique, de l'acide stéarique et d'un triglycéride et b) images composites de la répartition des trois molécules au cours de la régénération.	55
Figure 4.14 : Caractérisation et localisation de trois lipides par ESI-Q-TOF et TOF-SIMS, pour les ions à a) m/z 789, b) m/z 456 et c) m/z 412	57
Figure 5.1 : Observation sous microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue sur un lame Ni 10 (x10)	65
Figure 5.2 : Analyse d'un dépôt d'une solution de calibrant sur (a) un support classique, (b) une lame ITO, (c) une lame recouverte de 10nm de nickel, (d) un film plastique ITO et (e) une lame Ti/Au.	66
Figure 5.3 : Analyse d'un dépôt d'une solution de calibrant sur (a) support classique ou sur une lame recouverte de (b) 5 nm, (c) 10nm et (d) 15 nm de nickel.....	66
Figure 5.4 : Analyse d'un dépôt d'une solution de Substance P sur (1) plaque ou sur lame (2) Ni 5, (3) Ni 10 et (4) Ni 15 à des concentrations de (a) 10µM, (b) 1 µM, (c) 0,1 µM et (d) 10 nM.....	68
Figure 5.5 : Analyse directe d'une coupe de cerveau de rat déposé sur a) un support MALDI classique, b) une lame Ni 5, c) une lame Ni 10 et d) une lame Ni 15.....	69
Figure 5.6 : Comparaison de la sensibilité entre lame Ni 10 (rouge) et lame ITO (bleu) pour des concentrations de 4µM, 1µM, 0,4µM, 0,1µM, 4nM, 1nM, 0,4nM (respectivement a), b), c), d), e), f) et g)).....	69
Figure 5.7 : Image MALDI en mode linéaire réflecteur de la répartition des ions m/z= 1756 (bleu) et m/z= 1860 (rouge) dans une coupe de cerveau de rat déposée sur une lame Ni 10 (résolution 200µm).....	70
Figure 5.8 : Spectres de masse d'analyses directes de coupe de cerveau de rat avec HCCA (a et b) ou HCCA/ANI (d et e) avant (a et d) et après (b et e) une augmentation de 10% de l'énergie laser. (c et f) superposition et agrandissement de la gamme de masse comprise en 2010 et 2050.	72
Figure 5.9 : Principe du dépôt d'or.	74

Figure 5.10 : Δm mesurés en fonction de différentes masses après une augmentation de 20% (a et c) ou 30% (b et d) en présence (ronds blancs) ou en absence (ronds noirs) d'or. La moyenne et la déviation standard de 5 expériences sont représentées..	74
Figure 5.11 : Δm moyen mesuré en fonction de différentes masses après une augmentation de 20% (a et c) ou 30% (b et d) en présence de chrome (ronds blancs), de carbone (ronds noirs), ou d'or (triangle inversés noir).....	76
Figure 5.12 : Images MALDI de la répartition des ions m/z 1125 (rouge), 1720 (bleu) et 1380 (jaune) sur une coupe de cerveau de rat recouverte d'HCCA/ANI avec dépôt d'or. Images des mêmes ions sur la coupe sériée suivante sans dépôt d'or (b) et en modifiant les paramètres de reconstruction (c et d).	79
Figure 5.13 : Spectres de masses obtenus avec une énergie laser de 1600 sans (a) ou avec dépôt de carbone (b) et (c) avec une énergie laser de 2000 et un dépôt de carbone.	82
Figure 6.1 : Focalisation du faisceau laser par (a) le principe du télescope Galiléen ou (b) par fibre optique. c) Profile énergétique obtenue par couplage avec fibre optique. d) Signaux observés en fonction du diamètre du faisceau laser d'après [171].	88
Figure 6.2 : Principe des masques (a) et application sur une coupe du tissu (b)	90
Figure 6.3 : Principe d'irradiation à travers le masque.....	91
Figure 6.4 : Observation en microscopie électronique à balayage des masques de 100 μm d'épaisseur avec des ouvertures de (a) 100 μm et (b et c) 50 μm d'épaisseur. ..	92
Figure 6.5 : Spectres de masse d'un mélange de standards avec la matrice HCCA à travers des ouvertures de (a) 500 μm , (b) 240 μm , (c) 100 μm et (d) 50 μm	92
Figure 6.6 : Spectres de masse d'une coupe de cerveau de rat recouverte de matrice HCCA en mode linéaire (a) avant, et après apposition d'un masque avec des ouvertures de (b) 240 μm et (c) 500 μm	94
Figure 6.7 : Spectre de masse d'une coupe de cerveau de rat recouvert d'HCCA/ANI en mode réflecteur à travers un masque d'ouverture 100 μm	94
Figure 6.8 : Simulation par SIMION de la trajectoire des ions en présence d'un masque de 240 μm d'ouverture et 65 μm d'épaisseur.....	95
Figure 6.9 : Influence de l'épaisseur du masque sur la taille de la zone irradiée.	96
Figure 6.10 : (a) Mise en évidence de l'existence d'une zone d'ombre non atteinte par le faisceau laser et (b) calcul de la taille de la zone irradiée en fonction de l'épaisseur du cache et de l'angle d'incidence du faisceau laser.	97
Figure 6.11 : a) masque à ouverture oblique et (b) masque à ouverture en V	98

Figure 6. 12 : (a) Représentation des ouvertures en V en vue transversale. (b et c) Image en microscopie électronique à balayage d'un masque de 103 μm d'ouverture interne et 119 μm d'épaisseur.	99
Figure 6.13 : représentation de la zone d'ombre existant avec les masques à ouvertures en « V » avec des flancs de 55° de pente.....	99
Figure 6.14 : Spectres de masse obtenus à partir d'une analyse directe de cerveau de rat recouverte d'HCCA/ANI en mode linéaire (a) sans masque ou à travers un masque (b) de 100 μm et (c) 185 μm d'ouverture interne.	100
Figure 6.15 : observation de la taille de la zone irradiée en présence ou en absence du masque.	101
Figure 6.16 : méthode d'automatisation de l'utilisation du masque.....	103
Figure 7.1 : Spectres MALDI en mode réflecteur d'une solution de (a) siRNA sans FITC et (b) de siRNA couplé au FITC.....	112

Liste des Tableaux

Tableau 2.1: Instruments pour l'application de matrice pour l'ISM MALDI	12
Tableau 2.2: Spectromètres de masse à source MALDI servant en ISM	14
Tableau 2.3 : Récapitulatif des techniques d'ionisation utilisées en ISM.	23
Tableau 3.1 : Paramètres d'acquisition en MALDI-TOF	25
Tableau 4.1 : Comparaison en fonction du temps de régénération des ions présents (bleu) ou absents (rouge) des spectres de masse obtenus par a) MALDI-TOF et b) ESI-Q-TOF.	59
Tableau 5.1 : Résistance des différents supports.	65
Tableau 5.2 : comparaison de l'intensité du signal obtenu entre matrice et matrice/or.....	78
Tableau 5.3 : augmentation du nombre de composés détectés	78
Tableau 5.4 : Potentiel d'ionisation des différents métaux.....	82
Tableau 6.1 : Méthodes de diminution de la zone analysée par du faisceau laser.....	87
Tableau 6.2 : Corrélacion entre l'épaisseur du masque E, l'angle d'incidence du laser θ et la largeur L pour des ouvertures de $100\mu\text{m}$	98
Tableau 6.3: Valeur V_{min} (μm) pour laquelle le faisceau laser de diamètre d et d'angle d'incidence θ n'irradie qu'une seule ouverture.....	102

Liste des Abréviations

ACN:	Acétonitrile
AFM:	Microscopie à Force Atomique
ANI:	Aniline
CID:	Collision-Induced dissociation
DAPCI:	Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation
DART:	Direct Analysis in Real Time
DESI:	Desorption ElectroSpray Ionization
DHB:	Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque
DIOS:	Desorption/Ionization mass spectrometry On porous Silicon
ELDI:	Electrospray-assisted Laser Desorption/Ionisation
ESI-MS:	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
ESI-IMS:	Electrospray Ionization Imaging Mass Spectrometry
FAB:	Fast Atom Bombardement
FITC:	Fluorescein IsoThioCyanate
FT-ICR MS:	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
HCCA:	Acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique
HCl:	Acide Chloridrique
HF:	Acide Fluorique
Hz:	Hertz
ICP-MS:	Inductively coupled plasma mass spectroscopy
ISM:	Imagerie par Spectrométrie de masse (de l'anglais IMS)
IT:	Trappe à ions
ITO:	Idium-Tin Oxyde
JEDI:	Jet Desorption Ionization
LA-ICPMS:	Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy
LAMMA:	Laser Activated Microprobe Mass Spectrometry
LDI:	Laser Desorption Ionization
LMMS:	Laser Microprobe Mass Spectrometry
m/z:	Rapport Masse sur Charge
MALDI:	Matric Assisted Laser Desorption Ionization
ME-SIMS:	Matrix Enhanced Secondary Ion mass spectrometry
MetA-SIMS:	Metal Assisted Secondary Ion Mass Spectrometry
MILDI:	Matrix Implanted Laser Desorption Ionization
MS/MS:	Spectrométrie de Masse en Tandem
Ni:	Nickel
OCT:	Optimal Cutting Temperature Polymers
PEG:	PolyEthylèneGlycol
PSD:	Post Source Decay
SIMS:	Secondary Ion Mass Spectrometry
SMALDI:	Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
SMS:	Scanning Mass Spectrometry
TFA:	Acide TrifluoroAcétique
Ti/Au:	Titane /Or
TOF:	Temps de vol
UV:	Ultraviolet

Introduction

1.1 Les défis pour une nouvelle technique d'imagerie de biomolécules.

Des premières peintures rupestres jusqu'aux images peuplant les journaux télévisés ou papier en passant par les parchemins égyptiens, l'image a toujours été un support de l'information. Tout naturellement ce support a largement été utilisé en sciences, en médecine et en biologie. Au Moyen-âge, les premières planches anatomiques font leur apparition, mais rapidement les observations macroscopiques ne suffisent plus. Pour pallier à cela et aller plus loin dans l'observation de l'infiniment petit, Antoine van Leeuwenhoek développe en 1664 un procédé d'observation utilisant un système de lentille qui permet de grossir l'image et d'avoir accès aux petits détails.

Les techniques d'imagerie du vivant ont depuis accompagné le scientifique dans la plupart de ses investigations. De la microscopie optique à la microscopie électronique, les techniques d'imagerie n'ont cessées d'évoluer, poussant toujours plus loin les limites de l'observation. Certaines permettent la visualisation d'organes entiers (IRM) ou fournissent des données topographiques de surfaces jusqu'à une échelle atomique (microscopie à force atomique, électronique...). D'autres se sont élargies jusqu'à permettre de suivre des molécules au sein des tissus. Cependant, pour permettre cela, la plupart requiert une présélection des molécules avec des marqueurs fluorescents ou des anticorps, ce qui implique de connaître à l'avance la molécule d'intérêt à suivre. Mais bien que riches en information, ces approches peuvent manquer de sensibilité et de spécificité. La technique d'imagerie idéale doit simultanément détecter et identifier de multiples composés connus et inconnus présents dans les tissus biologiques avec une résolution spatiale approchant de la taille d'une cellule et doit tenir compte du fait que les composés d'intérêt varient grandement en taille, en propriété physicochimique, en concentration ou en structure.

Parallèlement à cela la spectrométrie de masse a connu aux fils des ans de nombreux développements. Les progrès technologiques et l'apparition progressive des nouveaux analyseurs et de nouvelles sources de production d'ions, ont nettement contribué à cet essor. Issue des recherches en physique, la spectrométrie de masse s'est progressivement orientée, dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle, vers la chimie au travers de l'analyse des composés organiques. Dès les années 1970, cet instrument devient une technique phare pour l'analyse

des biomolécules. L'apparition de nouvelles sources de production d'ions dans les années 1985, les sources électrospray [1] et de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (**MALDI**) [2, 3], a définitivement ouvert cette méthode d'analyse à la biologie. Ces sources permettent la production d'ions en phase gazeuse à partir de composés polaires et pour des masses pouvant atteindre jusqu'à 1 000 000u. Ces deux modes de production des ions sont particulièrement bien adaptés pour l'analyse et l'étude de différentes familles de molécules biologiques et notamment les peptides et les protéines sous leur forme intacte. Les améliorations de la spectrométrie de masse dans le domaine de l'analyse structurale (études des fragmentations) par MS/MS en font un élément important pour la caractérisation de ces composés et accroissent sa potentialité.

La spectrométrie de masse est devenue, à l'heure actuelle, un outil incontournable, en particulier dans le domaine de la protéomique comme en témoigne les nombreuses recherches menées et publiées [4-9]. De nombreuses protéines provenant de différents organismes, voire de différents organes ou cellules dans des états physiologiques distincts, ont ainsi pu être caractérisées. De plus, plusieurs études différentielles ont permis de mettre en évidence les protéines sous ou sur-modulées entre différents états physiologiques. Toutefois, cette stratégie présente un inconvénient majeur puisqu'elle nécessite l'homogénéisation de l'échantillon avant extraction puis séparation et caractérisation par spectrométrie de masse. Toutes ces étapes peuvent occasionner la perte irrémédiable de composés et aboutissent souvent à la mise en évidence de protéines majeures telle que les protéines du cytosquelette ou du métabolisme. De plus, ces techniques entraînent la perte d'informations concernant la localisation de celles-ci au sein du tissu d'origine.

L'imagerie par spectrométrie de masse (**ISM**) peut pallier à ces problèmes. Elle peut également répondre à beaucoup des exigences, listées précédemment, concernant la technique d'imagerie idéale. En effet la spécificité chimique dépend d'un seul paramètre universel qui est la composition atomique de la molécule : **sa masse**. Cette technique ne nécessite donc pas de marquage préalable. De plus elle est capable d'enregistrer simultanément la localisation spatiale de plusieurs centaines de composés dans un échantillon complexe tel qu'une coupe de tissu.

1.2 Sujets abordés dans cette Thèse.

Dans ce mémoire nous exposerons divers améliorations développées pour l'imagerie MALDI.

Dans le **chapitre 2**, le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse sera décrit et nous ferons le point sur différentes sources d'ionisations pouvant être utilisées.

Le **chapitre 3** regroupe les méthodologies utilisées, avec des descriptions et les conditions d'utilisations des spectromètres de masses ainsi que les modes opératoires utilisés pour mener à bien les développements proposés.

Une partie des développements ont portés sur l'application de l'analyse directe par MALDI et l'ISM sur le modèle d'étude du laboratoire, la sangsue *Hirudo medicinalis* et sont regroupés dans le **chapitre 4**. Ce dernier regroupe les principales mises aux points développées pour l'analyse de petits échantillons biologique i.e. la recherche de nouveaux milieux d'enrobage pour la réalisation de coupes congelées, les protocoles de rinçages des coupes en vue d'éliminer les polymères constitutif du milieu classique, l'extraction directe sur coupe et les études préliminaires concernant les lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue par ISM SIMS.

Dans le **chapitre 5**, nous avons étudié les possibilités qu'offre le dépôt d'un métal pour l'ISM MALDI. Grâce à la métallisation de lames de verre, couramment utilisées dans les services hospitaliers, de nouveaux supports conducteurs transparents ont pu être développés. Ces supports, tout en offrant une transparence nécessaire pour une observation par microscopie optique, permettent grâce à leur conductivité, des analyses par spectrométrie de masse ainsi que la réalisation d'images moléculaires par ISM MALDI. La seconde partie des travaux a permis de mettre en évidence les effets que des charges peuvent avoir en s'accumulant en surface de l'échantillon, mais également de montrer qu'un simple dépôt métallique sur sa surface pouvait éliminer ces effets. De plus l'ajout d'un métal en surface a montré des effets bénéfiques pour l'analyse comme une augmentation d'intensité du signal par exemple.

Le **chapitre 6** décrit le développement d'un nouveau procédé pour réduire la taille de la zone irradiée par le laser. Ce système de masque (ou cache) permet de diminuer grandement l'aire de la zone irradiée et certaines configurations améliorent même la qualité des spectres obtenus.

Enfin le **chapitre 7** offre les conclusions et les perspectives vers d'autres développements tels que l'ISM spécifique par l'utilisation d'un rapporteur de la présence de

molécules difficilement analysable ainsi que l'utilisation de nouveaux supports pour une analyse sans matrice.

De l'imagerie par spectrométrie de masse à l'imagerie MALDI

2.1 L'imagerie par spectrométrie de masse : principe

Le principal but de l'ISM est d'utiliser le pouvoir analytique de la spectrométrie de masse pour créer des images moléculaires représentant la distribution de toutes les biomolécules connues ou inconnues contenues dans un échantillon. Pour les analyses par SM, l'analyte doit être transféré en phase gazeuse et ionisé, puis les ions séparés sous vide et détectés. Pour cela, l'ISM diffère des autres méthodes d'imagerie considérées comme non destructrices mais ne donnant pas d'informations moléculaires. Il existe plusieurs modes d'acquisition d'images utilisés en ISM.

Dans une première approche, la surface de l'échantillon sera scannée par un faisceau (laser ou ionique), typiquement de quelques centaines à quelques microns, en déplaçant d'une distance définie par avance l'échantillon sous le faisceau ou le faisceau par lui même. Dans cette méthode, aussi appelée imagerie point par point, un spectre de masse est enregistré et stocké pour chaque point d'analyse effectué. Des logiciels spécialement développés permettent de sélectionner le signal d'une molécule à partir du tableau de spectre de masse et de récupérer l'intensité du signal pour chaque point dans un tableau 2 dimensions (**Figure 2. 1a**). L'intensité du signal sera représentée par une échelle de couleur permettant de recréer une image de la répartition de l'analyte dans l'échantillon.

Dans le cas du mode « microscope ionique » (*e.g.* mode caméra), les images moléculaires sont créées de manière similaire à l'imagerie optique. Dans ce cas, la position relative, par rapport au plan de la surface de l'échantillon, des ions formés est conservée par l'utilisation d'optiques ioniques particulières ((**Figure 2. 1b**))

Chacune de ces deux approches d'ISM produit différents types de données et sera décrite plus en détails dans les paragraphes suivants.

2.2 L'imagerie MALDI

2.2.1 Le MALDI

Introduites dans la seconde moitié des années 1980 par Hillenkamp et Karas [3], les sources MALDI ont constitué l'une des révolutions de la spectrométrie de masse. Cette technique découle directement des méthodes de Désorption Laser (**LDI**) [10]. En LDI, des impulsions laser sont utilisées pour produire des ions à partir d'échantillons solides. Malgré tout cette technique ne permet d'obtenir des spectres de masse que de composés de faible masse (<1000 u) et dépend des propriétés physiques spécifiques du composé (spectres de photoabsorption, volatilité, polarité, etc.).

Deux groupes, l'un en Allemagne, l'autre au Japon, se sont attaqués à la recherche d'une matrice comme médiateur pour les expériences de désorption/ionisation laser. Tanaka et collaborateurs [11] ont développé une méthode utilisant une poudre de métal en suspension dans du glycérol bombardé par des photons laser UV. Cette matrice a permis d'obtenir des spectres de masse pour des molécules variées avec une bonne sensibilité et un bon rapport signal/bruit. De leur côté Hillenkamp et Karas [12] ont observé que l'utilisation d'un composé avec un groupement aromatique permet d'obtenir un signal de meilleur qualité. La matrice permet un transfert d'énergie efficace par absorption des photons laser tout en préservant l'analyte. La sensibilité de la méthode utilisant une matrice organique est 500 à 1000 fois supérieure à celle utilisant le glycérol, et produit un signal de meilleure qualité. Pour ces raisons, la méthode employant une matrice solide présentée par Hillenkamp et Karas a rapidement éclipsée celle de Tanaka et constitue à l'heure actuelle celle couramment utilisée.

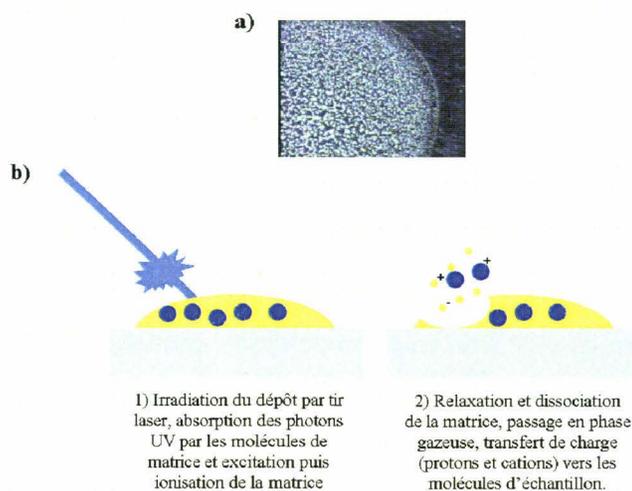


Figure 2.2 : Schéma de principe du MALDI

Le MALDI repose donc sur l'utilisation d'un composé organique nommé matrice dont la propriété principale est d'absorber à la longueur d'onde du laser utilisé [2, 13, 14]. La grande majorité des lasers utilisés en MALDI sont des lasers émettant dans l'UV. La matrice et l'échantillon sont mélangés en solution, la

matrice étant ajoutée en large excès par rapport à l'analyte. Ainsi, le dépôt d'une faible quantité de ce mélange conduit, après évaporation du solvant, à la formation d'une solution

solide constituée de micro cristaux de matrice formant un réseau cristallin dans lequel est, à priori, incorporé l'analyte (**Figure 2.2a**). Lors de l'irradiation de ce dépôt par le faisceau laser, les photons émis sont absorbés par les molécules de matrice, et induisent des transitions électroniques vers des états excités. Ainsi, lors de la relaxation de l'énergie au sein du solide, l'une des voies de relaxation conduira à l'éjection de matière sous forme d'un plasma qui va s'étendre rapidement en phase gazeuse sous vide. Le processus de désorption/ionisation conduit à l'obtention d'ions en phase gazeuse (**Figure 2.2b**) mais il faut cependant noter qu'une grande partie des molécules éjectées reste neutre. Parmi les ions formés, seront retrouvés des ions d'analyte mais également pour une grande partie, des ions de matrice. Les espèces ionisées sont principalement formées par transfert de protons et sont majoritairement sous la forme de molécules protonées $[M+H]^+$ même si une petite partie des espèces se retrouvera sous la forme d'espèces cationisées par des sels *i.e.* des ions cationisés par le sodium ($[M+Na]^+$) ou par le potassium ($[M+K]^+$) et cela d'autant plus que l'analyte présente une affinité pour ces cations.

Le processus de désorption/ionisation en MALDI conduit à la formation d'ions en phase gazeuse possédant des énergies internes suffisamment faibles pour que ces derniers soient, dans la grande majorité des cas, stables sur la durée de l'analyse. Ainsi, le MALDI est une méthode de production d'ions dite douce. Cette caractéristique permet l'analyse de nombreuses familles de molécules sous leur forme intacte et jusqu'à des hauts poids moléculaires comme les protéines. Il est donc bien adapté à l'analyse des différentes biomolécules composant les cellules tels que les peptides, les protéines, les sucres et les lipides et dans une certaine mesure les oligonucléotides. De plus, par rapport à l'electrospray il présente le net avantage d'être beaucoup plus tolérant aux sels et contaminants divers souvent présents dans les échantillons biologiques. Les ions formés sont principalement monochargés, même si des ions multichargés sont observables pour des masses $m/z > 4000$, ce qui simplifie grandement l'analyse des données. Les sources MALDI sont souvent associées à des analyseurs Temps-de-vol [15] de part la facilité de couplage. Les analyseurs TOF sont basés sur la séparation dans un champ électrique puis sur la mesure du temps d'arrivée des ions au détecteur. Ils sont très sensibles avec une grande transmission des ions, possèdent des cycles d'analyses rapides et présentent une gamme de masse théoriquement illimitée. Les instruments MALDI-TOF sont très performants et notamment dans le cadre d'applications pour des analyses protéomiques. Avec les progrès technologiques, sont apparus ces dernières années d'autres couplages avec le MALDI et notamment avec des analyseurs présentant de

hautes performances et une grande rapidité pour les études structurales (MS/MS). A titre d'exemples peuvent être cités les couplages avec des trappes ioniques (MALDI-IT), avec des instruments de Résonance d'Ion Cyclotronique à transformé de Fourier (FT-ICR) ou encore les instruments hybrides quadripôles (Q) et TOF (MALDI-Q-TOF). La grande diversité des instruments disponibles avec les sources MALDI augmente très nettement le champ d'investigation de cette technologie même si les instruments de type MALDI-TOF restent les instruments phares pour les couplages avec ces sources.

2.2.2 L'imagerie MALDI

Les sources de désorption laser ont été utilisées comme outil d'analyse de tissus au travers des techniques LMMS (Laser Microprobe Mass Spectrometry) et LAMMA (Laser Activated Microprobe Mass Spectrometry) [16-22]. Ces techniques présentent de grandes performances pour l'analyse d'éléments atomiques ou de composés de faible masse.

La facilité d'introduction d'échantillons solides dans la source MALDI a conduit dès le début des années 1990, à différentes analyses directes sur des tissus (organes ou organelles) de vertébrés ou d'invertébrés. L'analyse directe par MALDI s'est également révélé un outil très efficace pour l'analyse sur cellule unique. Dans ce cadre, les premiers travaux sur cellules uniques utilisant la spectrométrie de masse de type MALDI ont été effectués en 1993 par l'équipe du Pr. van der Greef et ont porté sur l'analyse de neurones de *Lymnaea stagnalis* [23]. Par la suite de nombreuses études ont permis l'analyse de tissus d'origine variée ainsi que des études différentielles [24-31].

Dans le cadre de l'imagerie MALDI, les premiers travaux restent à l'initiative du groupe du Pr. R. Caprioli [32]. Depuis les premières études en 1997, l'imagerie a constamment progressé, notamment au travers du développement de programmes informatiques spécifiques permettant l'acquisition automatique et la réalisation d'images [33].

D'un point de vue pratique, la méthodologie repose en grande partie sur la préparation de l'échantillon. Une coupe de tissu de 5 à 20 μm d'épaisseur est transférée sur un support compatible avec les sources MALDI utilisées. Dans une grande majorité des cas, ce support doit être conducteur pour ne pas altérer les champs électriques en source. Idéalement, le porte échantillon pourra être remplacé par un support de verre recouvert d'un matériau conducteur transparent permettant ainsi des observations en microscopie optique avant l'analyse moléculaire. La seconde étape est critique : il s'agit du choix de la matrice et de son application sur la coupe. Dans le cas d'une analyse directe de tissus, des spots discrets de matrice pourront être réalisés soit par l'intermédiaire d'une micropipette soit par l'utilisation

d'un appareil de micro-dépôt de matrice. Dans le cadre de la réalisation d'une image entière d'une coupe de tissu, celle-ci doit entièrement être recouverte de matrice. Pour cela, plusieurs techniques peuvent être employées. La coupe peut être recouverte par dépôt classique à l'aide d'une micropipette ou par l'utilisation de technique de vaporisation comme le spray pneumatique ou l'electrospray [32]. Pour minimiser la délocalisation des molécules pouvant être entraînée par les solvants, la méthode de micro-dépôt est de plus en plus utilisée [34]. Le **Tableau 2.1** regroupe un panel non exhaustif des solutions commercialisées pour l'imagerie MALDI. Le choix de la matrice est également important afin d'optimiser l'analyse des composés en terme de nombre de molécules détectées, de la résolution des pics, de l'intensité du signal et de la gamme de masse accessible [34]. Notre groupe a travaillé sur cette question et a développé de nouvelles matrices adaptés à l'analyse directe et l'ISM MALDI [35]. Après dépôt de la matrice, le porte échantillon sera introduit dans le spectromètre et l'image réalisée suivant le mode point par point décrit dans la **partie 2.1**.

Nom	Constructeur	Méthode de dépôt	Taille de dépôt	Référence
Chemical inkjet printing (CHIP 1000)	Shimadzu Biotech	Piézo-électrique	200 μm	[36]
TMiD	LEAP Technologies	Ejection par Nano-Pompe	200 μm	[37]
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Dépôt par un Capillaire	150 μm	[38]
Portrait™ 630 Reagent Multi-Spotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	200 μm	[39]
NC	Siliflow	Piézo-électrique	300-600 μm	NC

Tableau 2.1: Instruments pour l'application de matrice pour l'ISM MALDI

Deux parties importantes se distinguent dans la réalisation d'images, l'acquisition des données et leur traitement. Du point de vue de l'acquisition, un facteur limitant reste le temps d'analyse. Ce temps est tributaire de la fréquence de répétition des tirs laser, de la rapidité de déplacement du support pendant l'analyse et du temps d'acquisition de l'électronique. Pour les lasers, l'utilisation de lasers pouvant atteindre de grandes fréquences de répétition est particulièrement souhaitable. Par exemple, à quelques Hz l'acquisition peut durer plus d'une journée alors qu'à 200 Hz le temps d'acquisition sera réduit à quelques heures. Ce point permet également de prévenir toute dégradation de l'échantillon (évaporation de la matrice progressive sous vide par exemple) pouvant intervenir avec une durée d'analyse trop importante. En revanche, d'un point de vue plus fondamental l'influence de l'utilisation d'une grande fréquence de répétition des tirs est encore mal connue, et peut soulever certaines

questions comme l'effet sur le processus de désorption/ionisation ou encore la possibilité que l'émission laser rencontre la plume en expansion du tir précédent non encore sortie des zones d'accélération. Pour la vitesse de déplacement de l'échantillon, il existe sur le marché des systèmes permettant des déplacements très rapides avec une grande précision. De la même façon les progrès dans le domaine de l'électronique permettent d'améliorer sans cesse la capacité des instruments. La reproductibilité du déplacement est également un paramètre important pour la qualité des images. L'aire analysée en chaque point est également primordiale. Le nombre de points pouvant être faits, va définir la résolution spatiale de l'image reconstruite. La distance entre 2 points sera, dans la plupart des cas, au minimum égale au diamètre du faisceau laser. Différentes méthodes peuvent être envisagées pour réduire l'aire analysée et seront plus largement développées dans la **partie 6.1**.

Du point de vue de la reconstruction de l'image, un grand nombre de paramètres vont affecter le rendu de l'image. Par exemple les traitements des spectres doivent-ils être effectués ou non avant extraction des données (lissage, retrait de bruit, filtrage du bruit,...) et dans quelle mesure ces traitements affecteront-ils la qualité des images ? La question de savoir si l'intensité ou l'aire d'un pic décrit le mieux la réalité peut aussi se poser. De la même manière, sachant que plusieurs ions distincts peuvent correspondre à un même composé (MH^+ , MNa^+ , MK^+ , MH_2^{2+} , $[M+m]^+$,...) l'image de chaque ion doit-elle être reconstruite distinctement ou l'intensité des différents ions correspondant à ce même composé doit-elle être prise en compte simultanément ? Des critères de sélection peuvent être aussi ajoutés : utiliser un seuil d'intensité minimum au-dessous duquel le signal sera considéré comme nul ou un seuil d'intensité maximum au-delà duquel il sera estimé que les valeurs du signal sont automatiquement attribuées à 100%. L'utilisation d'échelles multi chromatiques peut également jouer sur le rendu visuel de l'image ainsi que la superposition avec des images de microscopie classique. Un travail de recherche important reste à faire sur les développements de logiciels adaptés à ce type d'imagerie.

L'ISM devient un outil de recherche couramment utilisé que ce soit dans le domaine public ou privé mais est également courtisé par de nombreux prestataires de services et par une part de plus en plus importante de constructeurs. Le **Tableau 2.2** regroupe une partie des instruments pouvant être utilisés pour l'ISM MALDI.

L'avantage de l'ISM réside dans le nombre de composés analysables en une seule étape d'acquisition même si cette dernière reste assez longue. En effet grâce à une seule acquisition sur un tissu, plusieurs centaines d'ions pourront être observés. Sur cette base (en supprimant les informations redondantes, *i.e.* différents ions d'un même composé) de

nombreuses images moléculaires pourront être reconstruites pour un même tissu. De plus l'imagerie MALDI, tout comme les autres techniques de spectrométrie de masse, ne nécessite aucune connaissance préalable de la nature de l'échantillon et aucune caractérisation avant l'analyse de ce dernier.

Constructeur	Instrument	Logiciel	Résolution	Gamme de masse
Applied Biosystems				
	Voyager-DE™ STR	MMSIT Biomap	100 µm	m/z 5-100 000
	QSTAR XL Hybrid LC/MS/MS system avec source oMALDI	oMALDI Server 4.0 MALDI Mass Spectrometry Imaging (MMI)	100 µm	m/z 5-40 000
	4700 MALDI TOF/TOF	4700 Img Biomap	50 µm	m/z 5-75 000
	4800 MALDI TOF/TOF	4800 Img Biomap	50 µm	m/z 5-75 000
Bruker Daltonics				
	MALDI Molecular Imager™	Fleximaging	10 µm	m/z 5-100 000
Shimadzu				
	AXIMA QIT	NC	100 µm	m/z 50-10 000
Thermo Electron				
	Finnigan LTQ XL avec source vMALDI	NC	150 µm	m/z < 4 000
Waters				
	MALDI Q-ToF Premier™	NC	NC	m/z 5-50 000
	MALDI Micro MX™	Biomap	NC	m/z 5-75 000

Tableau 2.2: Spectromètres de masse à source MALDI servant en ISM

2.2.3 Les méthodes dérivées de l'imagerie MALDI.

D'autres technique d'imagerie ont été développées prenant appuie sur l'imagerie MALDI. Il s'agit de l'imagerie SMALDI (Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) et l'imagerie Stigmatic MALDI.

Parmi les paramètres limitant la résolution des images les facteurs instrumentaux sont particulièrement importants, nous avons vu que la taille du faisceau laser incident était un facteur prépondérant. A ce titre, le groupe de B. Spengler a développé un concept instrumental particulier : le SMALDI [40]. Cet instrument est un hybride entre la technologie utilisée en LAMMA et le MALDI classique (**Figure 2.3**). Sur cet appareil, le laser peut-être focalisé en dessous d'un micromètre permettant une nette augmentation de la résolution spatiale jusqu'à un niveau subcellulaire. Tout comme en SIMS, des images d'une grande résolution spatiale sont obtenues. Ce concept instrumental est particulièrement prometteur et nous pouvons espérer des applications rapides sur des tissus.

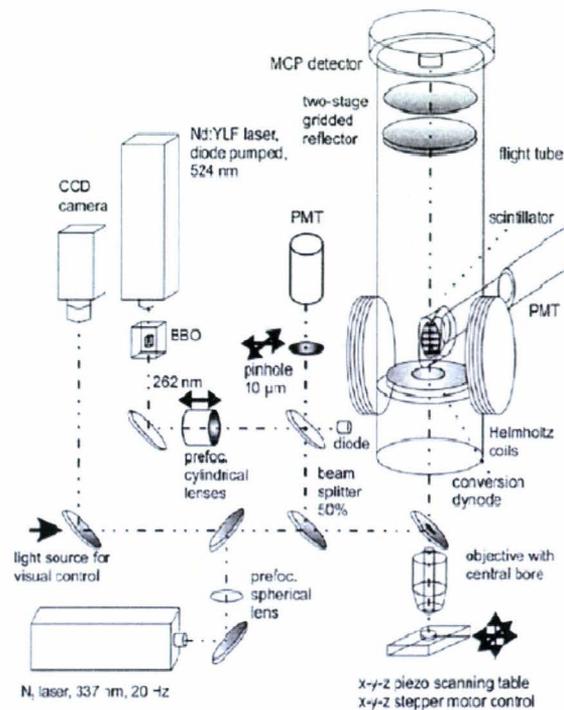


Figure 2.3 : Principe du SMALDI d'après [40]

Parmi les développements instrumentaux de l'imagerie MALDI, un autre concept d'imagerie est proposé par le groupe de R.M. Heeren [41]. Pour compenser les problèmes liés à la focalisation du faisceau laser incident et les temps d'analyse longs en imagerie MALDI classique, ce groupe a développé une imagerie MALDI en mode microscope (**Figure 2. 1b**). Le laser est défocalisé permettant l'analyse de grandes quantités d'ions et l'image est réalisée par utilisation d'un détecteur de position. Le point d'impact de l'ion sur le détecteur est retenu comme une donnée spatiale liée à la position de départ de l'ion qui sera conservée tout au long de son trajet. Ces instruments présentent une configuration particulière avec des systèmes de guidance des ions bien particuliers et des détecteurs de position de haute performance permettant de relier la position d'arrivée à la position de départ. Les tests effectués sur des grilles recouvertes de différents composés démontrent la fonctionnalité de l'instrument et la résolution qui peut être alors obtenue avec une vitesse d'acquisition remarquable. Cette technologie présente également un avenir très prometteur pour l'imagerie MALDI.

2.2.4 Applications

En parallèle à ces développements méthodologiques, différentes applications de l'analyse directe des tissus et de l'imagerie MALDI ont été réalisées, démontrant l'intérêt de cette technologie pour les études biologiques et en particulier pour l'application à différentes

pathologies. Il est possible de citer notamment l'analyse de tissus pituitaires de xénope pour l'étude de la maturation des POMC [42]. De nombreuses études différentielles entre tissus cancéreux et tissus sains ont été menées et montrent l'utilité de la méthode dans la recherche de biomarqueurs en protéomique clinique. Dans ce cas, l'analyse directe des tissus permet de mettre en évidence les protéines différentiellement représentées entre les deux types de tissus. L'imagerie de ces molécules permet de localiser ces molécules et de discriminer par exemple à différents stades de cancer ou de différencier les régions saines des régions tumorales. Par la suite, le marqueur pourra être caractérisé par des méthodes plus classiques de protéomique, apportant de nouveaux éléments importants pour la compréhension des mécanismes de cancérisation et l'amélioration du diagnostic de ces pathologies. Les applications sont nombreuses et comprennent l'étude du cancer du colon sur des modèles souris développant la pathologie [43], l'étude d'adénocarcinome de prostate sur des modèles PCA avec différenciation des cellules neuroendocriniennes [44], l'analyse de la répartition des peptides β -amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie d'Alzheimer [45], des études sur des tissus d'épididyme de souris et des biopsies de cancer du sein [46], à l'étude des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson [47], pour l'application par utilisation conjointe de méthodes de clustering à l'étude de modèles souris présentant des tumeurs du cerveau [48] et de tumeurs primaires du cerveau [49].

Quelques auteurs s'intéressent plus spécifiquement à l'imagerie d'autres classes de composés comme par exemple les composés pharmaceutiques ou les lipides. Dans le cas de composés pharmaceutiques, l'imagerie MALDI est un outil source d'importantes informations puisqu'elle permet de savoir si le principe actif se retrouve bien dans les tissus ciblés et quelles sont leurs voies de métabolisation. L'étude de composés pharmaceutiques met en exergue les problèmes liés, pour de petites molécules à l'interférence des ions du composé avec d'autres ions parasites (e.g. ions de matrice) d'où l'intérêt dans ce cadre d'utiliser d'autres types d'instruments permettant des études en mode MS/MS [50-52]. Il faut également noter quelques études récentes sur l'imagerie MALDI de lipides dans les tissus [53-55].

Enfin, plusieurs revues traitant de l'imagerie MALDI et de l'analyse directe de tissus ont été publiées, abordant les différentes stratégies proposées et les difficultés rencontrées dans cette technologie [24, 56-62].

2.3 L'imagerie SIMS

2.3.1 Le SIMS

Cette technique repose sur le bombardement de l'échantillon par un faisceau d'ions mono/poly-atomique ou sous forme de cluster (agrégats) d'ions (**Figure 2.4a**) ayant une énergie de l'ordre du KeV ou du MeV. Différents types de sources d'ions primaires peuvent être utilisés. Les plus classiques sont des sources de types LMI (Liquid Metal Ion) produisant un faisceau d'ions primaires Ga^+ ou In^+ avec une énergie cinétique jusqu'à 25 keV et un faisceau primaire pouvant être focalisé jusqu'à $\sim 1\mu\text{m}$. Les sources d'ions primaires Cs^+ (sources d'ions solides) sont également utilisées, avec un faisceau accéléré à 10 keV et une focalisation jusqu'à $\sim 2\text{-}3\mu\text{m}$. Une large variété d'autres types d'ions ou de clusters d'ions peut être utilisée comme les clusters Au^{n+} ou Bi_n^{m+} . L'irradiation de la surface par ces ions primaires conduit à l'émission de particules secondaires de différents types parmi lesquels des ions (positifs ou négatifs) qui seront analysés par l'analyseur.

2.3.2 L'imagerie SIMS

La possibilité de visualiser la distribution des macromolécules par spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) directement à partir d'échantillons organiques a été démontrée au début des années 60[63].

Le SIMS peut fonctionner suivant différents modes. En mode classique (SIMS dynamique) (**Figure 2.4b**), la densité d'ions reçus par la surface, conduit à une érosion rapide permettant une analyse en profondeur du matériau. En diminuant la densité d'ions projetés sur la surface (mode SIMS statique) (**Figure 2.4c**) [51, 64], les dommages générés à la surface du matériau seront pratiquement restreints à la première couche de matériau permettant une analyse de surface [65]. Le SIMS statique est bien adapté à la réalisation d'images [58, 66]. De plus, dans ce mode des masses plus élevées de composés organiques peuvent être détectées. L'avantage du SIMS provient de la possibilité de focaliser le faisceau primaire incident jusqu'à un diamètre de quelques microns, rendant possible la réalisation d'images à un niveau sub-cellulaire [67]. Lors de la réalisation d'images, si la zone à balayer est petite, le faisceau incident se déplace à la surface de l'échantillon en utilisant des jeux de lentilles d'extraction. Pour des surfaces plus grandes (e.g. coupe entière de cerveau de rat) c'est le support de l'échantillon qui se déplace sous le faisceau.

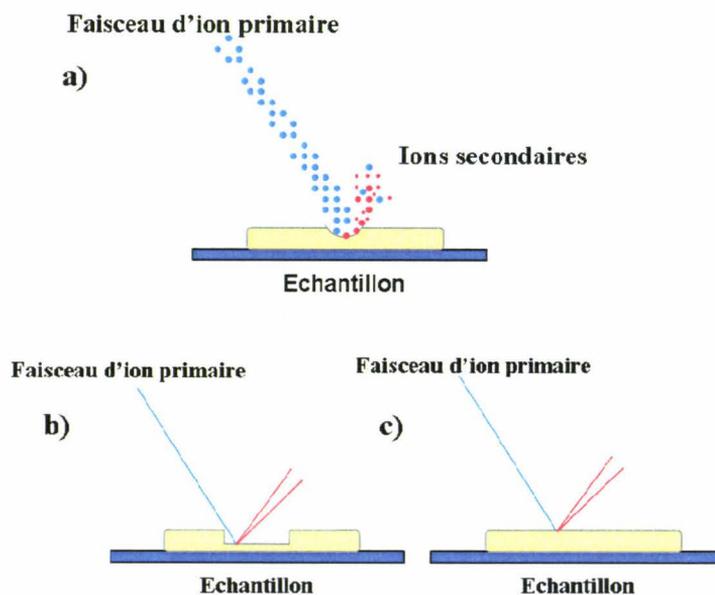


Figure 2.4 : a) Principe d'ionisation SIMS et fonctionnement en mode (b) dynamique et (c) statique

En revanche, la gamme de masse accessible avec cette technique est très restreinte et limitée à des composés de masse $M < 1000$ u. Elle permet facilement l'étude d'éléments monoatomiques, comme par exemple Na^+ et K^+ , qui sont particulièrement abondants dans les organismes ou encore de certains composés de faible masse comme la famille des lipides [58, 68]. Depuis plusieurs années, des développements sont réalisés dans le but de rendre analysable des composés de plus haute masse tels que les peptides. Il faut en particulier noter les développements de SIMS avec une matrice (ME-SIMS : Matrix Enhanced-Secondary Ion Mass Spectrometry) [69], l'utilisation de source d'agrégats comme ions primaires incidents [70-73] ou la réalisation d'un dépôt métallique en surface de l'échantillon (MetA-SIMS : metal-assisted-Secondary Ion Mass Spectrometry)[74, 75]. Ces développements permettent d'augmenter le nombre et la masse des composés analysables en SIMS. Le SIMS est donc devenu une méthode d'imagerie moléculaire particulièrement performante et en particulier pour l'analyse de composés de faible masse (e.g. lipides) avec une grande résolution spatiale.

2.4 Les autres types d'imagerie par spectrométrie de masse

Comme vu précédemment, le SIMS a été la première technique de spectrométrie de masse utilisée pour reconstituer des images. C'est seulement 30 ans plus tard, que l'ISM MALDI a vu le jour. En 10 ans, plus d'une dizaine autres techniques utilisant la spectrométrie de masse pour l'imagerie ont été développées (**Tableau 2.3**). Parmi toutes ces techniques, deux classes peuvent être distinguées :

- Les techniques utilisant un faisceau laser.
- Les techniques dont la désorption des molécules ne dépend pas d'un laser.

2.4.1 Techniques utilisant un faisceau laser ou ionique

Tout d'abord, en 1999, le groupe de Castell a démontré la possibilité d'utiliser l'ICP MS pour faire des images de la répartition de métaux dans des tissus [76]. Cette technique a été améliorée par la suite grâce au couplage avec un laser (Laser Ablation ICP MS (**LA-ICP MS**)) [77]. Cette méthode permet d'obtenir la répartition d'ions monoatomiques. Elle peut par exemple être utilisée en parallèle de l'ISM MALDI pour localiser un médicament incluant un composé métallique. L'ISM MALDI va suivre la répartition du médicament dans le tissu

tandis que l'approche LA-ICP MS va localiser et quantifier le composé métallique.

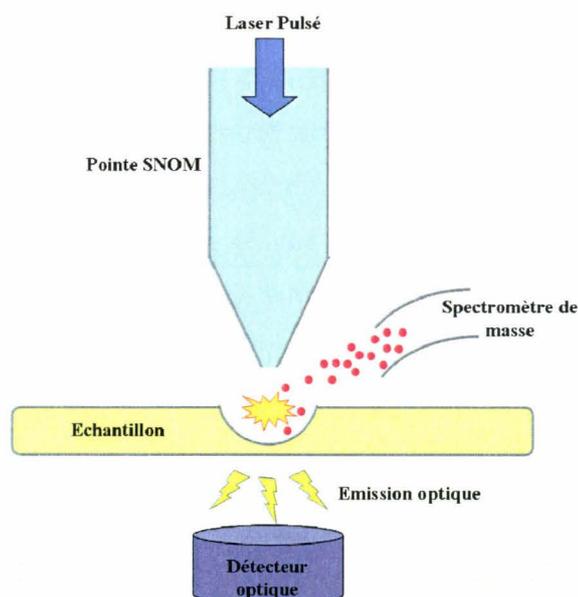


Figure 2.5 : Schéma du SNOM

En 2001, R. Zenobi utilise également l'ablation laser pour scanner des surfaces. Ce procédé, le scanning near-fields optical microscopy mass spectrometry (**SNOM-MS**) [78, 79], utilise une pointe couplée à un laser UV. La pointe permet la réalisation d'images topographiques de la surface de l'échantillon (**Figure 2.5**). Le laser, lui, va être actionné en certains points pour ablater une partie de la surface. La plume contenant les molécules issues de l'ablation sera collectée par un capillaire puis transférée et ionisée vers une trappe ionique après ionisation. Cette technique est pour l'instant employée pour l'analyse de surface inorganique et donne des images d'une résolution latérale pouvant atteindre 200 nm.

Le **SMALDI** et le Stigmatic MALDI ou **microscope MALDI**, (dont les procédés sont exposés dans la partie 2.2.3) ont été développés respectivement en 2002 et en 2004.

Dans les développements plus particuliers de l'ISM MALDI, sont également d'un intérêt tout particulier, les travaux réalisés par A. Woods et collaborateurs [80, 81]. Dans leurs études les auteurs proposent une méthode qui permet l'analyse directe de tissus sans addition d'une solution de matrice. La technique proposée ou **MILDI** (Matrix Implanted Laser Desorption Ionization) consiste à implanter des ions d'Au dans les tissus par irradiation du tissu avec le faisceau d'ions primaires d'une source Au. L'or implanté par cette voie n'entraîne pas de délocalisation des composés. Cette méthode permet d'obtenir des ions pour des protéines à partir de tissus. Dans le même esprit, la desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon (**DIOS**) [82] permet l'analyse directe de cellule isolée directement sans matrice. Les cellules peuvent directement être cultivées sur un support qui sous une irradiation par un laser UV entraînera une désorption/ionisation des molécules. Cependant, à l'heure actuelle pour ces deux techniques, les rendements d'ions restent assez faibles tout comme le nombre et le type de composés analysables les mécanismes mis en jeu dans ces techniques restent à l'heure actuelle particulièrement mal connus.

2.4.2 Techniques « laser free »

A partir de 2004, de nouvelles techniques n'utilisant pas de laser sont développées. Ces techniques présentent l'avantage de pouvoir analyser des tissus sans préparation. Tout d'abord Ford et ses collaborateurs ont mis au point le surface sampling probe/electrospray ou **ESI-IMS** [83]. Cette méthode utilise un système de 2 capillaires imbriqués. Le premier va mouiller la surface avec des solvants qui vont extraire les analytes tandis que le second va aspirer le mélange. Au bout de ce capillaire une pointe ESI permet une ionisation des molécules et leur analyse par spectrométrie de masse.

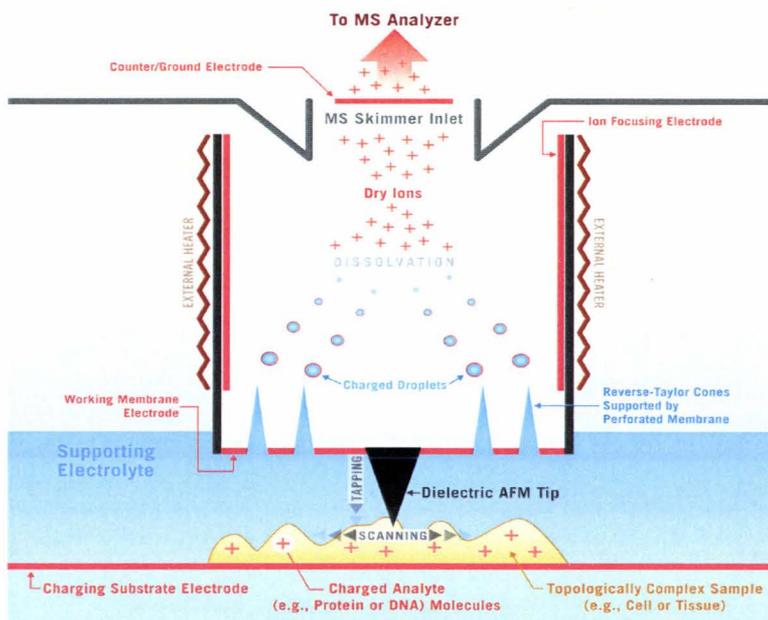
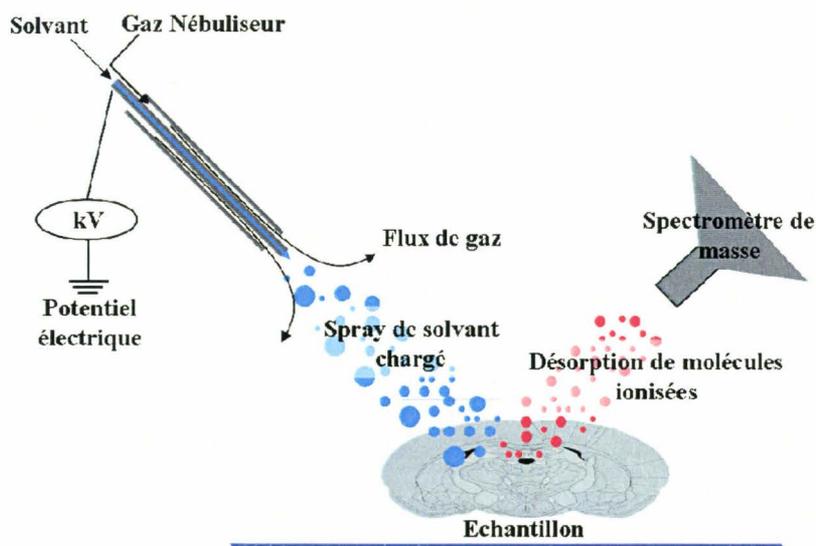


Figure 2.6 : Principe du SMS d'après [84]

S'inspirant de cette méthode, le Georgia Institute of Technology a annoncé à la fin du mois de Juillet 2006 le développement du Scanning Mass Spectrometry (SMS) probe [84]. Ce procédé permet d'étudier les molécules libérées par les cellules en réponse à des stimuli. Ce système peut être couplé à un microscope de force atomique (Atomic Force Microscope AFM) pour suivre les changements topologiques des tissus ou cellules durant l'expérience (Figure 2.6).

En 2004, Graham Cooks présente une nouvelle source de production des ions : Desorption ElectroSpray Ionization (DESI) [85]. Dans cette source, un solvant va être propulsé à travers un capillaire sous haute tension vers la surface de l'échantillon (Figure



2.7). Les gouttelettes chargées vont rebondir en emportant des molécules de la surface.

Figure 2.7 : Principe du DESI

Cette technique a dans un premier temps été employée pour étudier de nombreuses classes de composés présents sous forme de trace, incluant des médicaments, des explosifs mais aussi

des peptides, des protéines, des nucléotides et bien d'autres [86]. Par la suite, il a été démontré la possibilité de suivre des composés alcaloïdes au sein de tissus végétaux [87]. Grâce à l'automatisation du déplacement du support de l'échantillon, des plaques de chromatographie ont pu être analysées [88]. Il a également été démontré la possibilité de détecter directement des lipides à partir de tissus prélevés du pancréas de souris, du cerveau de rat ou dans du tissu cancéreux [89]. Cette technique ouvre la voie à une analyse directe voire une imagerie de surface de tissu in-vivo puisqu'elle n'est que peu destructrice et ne nécessite pas de préparation pour l'échantillon. Evolution directe de cette technique, le **JEDI** (Jet Desorption ionization) utilise un jet de solvant à haute pression et permet une analyse en profondeur de l'échantillon [90] (**Figure 2.8a**).

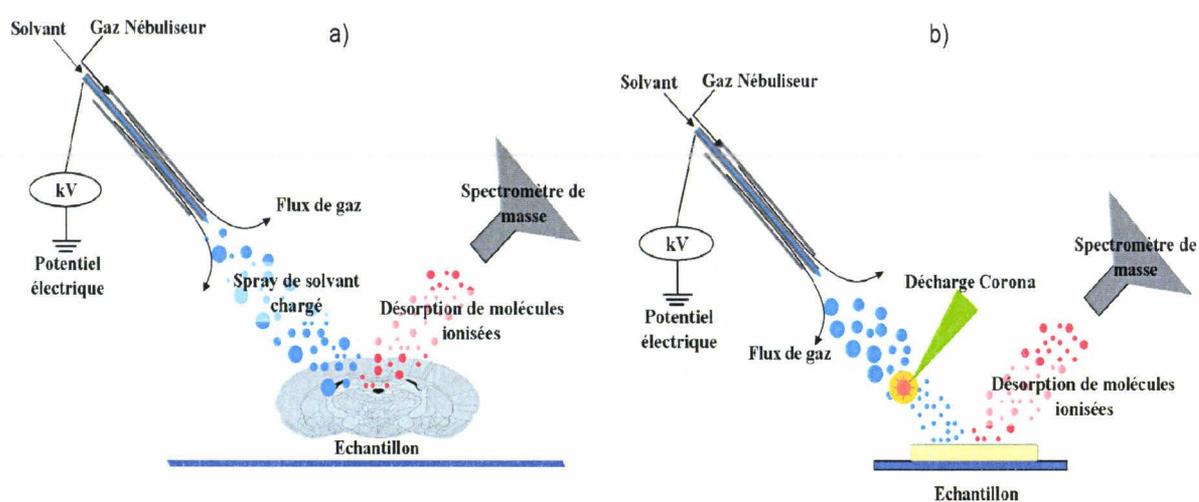


Figure 2.8 : Principe des sources (a) JEDI et (b) DAPCI

Une autre technique nommée Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (**DAPCI**) [91] peut fonctionner dans le cas où le DESI ne donne pas de résultat. Le DAPCI utilise des ions projetés en phase gazeuse générés, sous pression atmosphérique par une décharge corona dans des vapeurs de toluène ou autre composé (**Figure 2.8b**). Certains composés donnent des intensités ioniques insuffisantes en DESI alors qu'ils fournissent une sensibilité accrue en DAPCI.

Une dernière méthode s'inspire de ces mécanismes de désorption. Il s'agit du Direct Analysis in Real Time (**DART**) [92]. Ce procédé utilise un gaz ayant un haut potentiel d'ionisation (généralement de l'hélium) sur lequel un potentiel électrique est appliqué (**Figure 2.9a**). Un plasma va alors être formé, constitué d'atomes excités et d'ions. En percutant la surface, une désorption d'ions de faibles masses moléculaires va avoir lieu. Une étude comparant le DESI, le DART et le DAPCI a récemment été publiée [93].

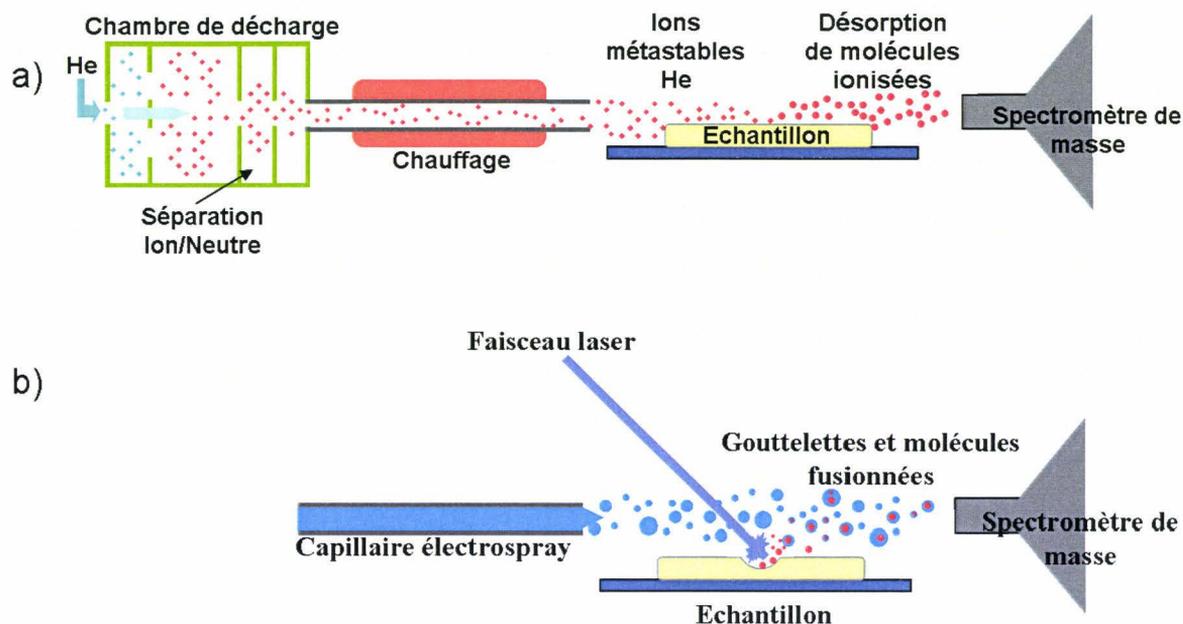


Figure 2.9 : Principe des sources (a) DART et (b) ELDI

Enfin une technique a essayé de coupler l'ESI et la desorption laser: l'electrospray-assisted laser desorption/ionisation [94] [94]-[95]. Un laser va entraîner l'ablation de matériel sur la surface de l'échantillon qui va rentrer en contact et fusionner avec les gouttelettes chargées, qui seront analysées par un spectromètre de masse (**Figure 2.9b**).

Source d'ionisations	Gamme de masse	Résolution spatiale	référence
SIMS	$m/z < 2000$	De 100nm à 10 μ m	[63]
IMS MALDI	0-1 000 000	25-200 μ m	[32]
ICP MS	$m/z < 500$	/	[76]
DIOS	$m/z < 5000$	Cellules isolées	[82]
SNOM-MS	/	50 nm à 1 μ m	[79]
SMALDI	$m/z < 2000$	500nm à 10 μ m	[40]
LA-ICP-MS	$m/z < 1000$	40 à 100 μ m	[77]
Microscope MALDI	5- 100 000	<5 μ m	[41]
ESI-MS	$m/z < 1000$	> 300 μ m	[83]
MILDI	5-10 000	100 μ m	[80]
DESI	$m/z < 2000$	500 μ m	[89]
JEDI	$m/z < 5000$	1 μ m	[90]
ELDI	5-100 000	150 μ m	[95]
SMS	NC	NC	[84]

Tableau 2.3 : Récapitulatif des techniques d'ionisation utilisées en ISM.

Partie Expérimentale

3.1 Spectromètres de masse utilisés

3.1.1 MALDI-TOF Voyager-DE STR

L'un des instruments MALDI-TOF-MS utilisé dans le cadre de ce travail est un appareil commercial, le Voyager-DE STR (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA). Cet instrument est équipé d'un système d'extraction retardée et fonctionne en mode linéaire ou réflecteur. La longueur de vol est de 2,0m en mode linéaire et de 3,0m en mode réflecteur. Les ions sont obtenus par irradiation grâce à un laser azote émettant dans l'UV à une longueur d'onde de 337nm, avec une durée de pulse de 3 ns et une fréquence de répétition de 3 Hz. Après un délai de l'ordre d'une centaine de nanosecondes, les ions sont accélérés vers le tube de vol par une tension de 20 kV (25 kV pour les analyses sur tissus) appliquée sur le porte échantillon. Les ions passent une première grille sur laquelle est appliqué un faible pourcentage de la tension totale. Ils passent ensuite par une seconde grille à l'entrée du tube de vol. La zone libre de champs possède un guide d'ions ainsi que des plaques déflectrices permettant la sélection des ions. En mode linéaire les ions sont directement transférés vers le détecteur, alors qu'en mode réflecteur ils passent à travers un miroir électrostatique avant d'arriver sur le détecteur. Le détecteur est de type galette de micro-canaux et permet la conversion du signal ionique en signal électrique. Ce signal sera transmis et enregistré par un enregistreur Tektronix TD5540C (Beaverton, Oregon, USA) disposant d'une bande passante de 500 Hz et un oscilloscope 2 GS/s. Tout ce processus est contrôlé par un ordinateur pentium II fonctionnant sous Windows NT.

Le **Tableau 3.1** regroupe les principaux paramètres utilisés lors des analyses.

Type d'analyse	Mode	Voltage d'accélération	Voltage sur la première grille	Voltage sur le guide d'ions	Délais d'extraction
Analyse classique	Linéaire	20 kV	94 %	0,05 %	100 ns
	Réflecteur	20 kV	74 %	0,01 %	100 ns
	PSD	25 kV	72 %	/	100 ns
Analyse directe sur tissus	Linéaire	25 kV	94%	0,05 %	200 ns
	Réflecteur	25 kV	75 %	0,01 %	150 ns

Tableau 3.1 : Paramètres d'acquisition en MALDI-TOF

3.1.2 L'Ultraflex TOF-TOF

Les images MALDI sont réalisés sur un Ultraflex II Lift-TOF (Bruker Daltonics, breme, DE) en mode linéaire ou réflecteur, utilisant un laser azote pulsé, émettant dans l'UV à une longueur d'onde de 337nm avec une fréquence de répétition de 50 Hz. Pour la reconstruction d'image, le logiciel flexImaging v1.0.6.0 est utilisé. En moyenne, 100 accumulations sont réalisées pour enregistrer un spectre.

3.1.3 Le Tof SIMS

Les images sont réalisées sur un instrument TOF-SIMS IV (Ion-Tof GmbH, Münster, Allemagne) avec une source d'ion primaire de cluster de Bismuth. L'énergie cinétique du faisceau primaire est de 25 keV, avec un angle d'incidence de 45°. Les ions secondaires sont accélérés avec une énergie cinétique de 2 keV et post-accélérés à 10keV avant d'atteindre le détecteur. En mode réflecteur, la résolution en masse est d'environ 10^4 à m/z 500. La calibration interne est initialement réalisée avec des ions de basses masses et redéfinie par la suite avec des ions de masses plus élevés. Toutes les images sont réalisées avec une dose d'ions primaires inférieure aux limites statiques (10^{13} ions.cm⁻²).

3.1.4 L'ESI Q-TOF

L'instrument utilisé pour les expériences est un nano-ESI-QTOF (QStar, Sciex). La source nano-ESI est combinée avec un analyseur hybride quadripôle/temps-de-vol, permettant d'obtenir un instrument avec une grande sensibilité tout en se servant du quadripôle pour les études structurales en mode MS/MS (sélection des ions).

3.2 Préparation des solutions et des tissus

3.2.1 Solution de standards

La solution de standards est composée d'un mélange de neuropeptides : l'angiotensine II (1,6µM), la substance P (1,6 µM), l'ACTH 18-39(1,6 µM), l'ACTH 7-38 (3,2 µM), l'insuline bovine (4,8µM) et l'ubiquitine bovine (4,8 µM) dans H2O/0,1% TFA.

Les tests de sensibilités ont été réalisés à partir de solution de Substance P à des concentrations de 10µM, 1µM, 0,1µM et 10nM, obtenues par dilutions successives d'une solution stock à 50µM. Dans certains cas, une solution de PepMix (bruker Daltonic) à été diluée pour obtenir des solutions à 4µM, 1µM, 0,4µM, 0,1µM, 4nM, 1nM, 0,4nM.

3.2.2 Coupes de cerveau de rats:

Des males adultes Wistar, pesant 250-350g (accréditation du ministère de m'agriculture N° 04860) ont été utilisé durant cette thèse et maintenu sous conditions standards. Les animaux sont sacrifiés par décapitation et immédiatement disséqués pour isoler le cerveau. Les cerveaux sont immédiatement congelés par immersion lentes dans l'azote liquide pour éviter l'éclatement des cellules. Ils sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation pour éviter les dégradations causées par la température et l'oxydation [96].

Des coupes de 12 µm d'épaisseur sont réalisées avec un cryostat Reichert- Jung 2800 Frigocut (Reichert-Jung, Nussloch, Allemagne) à une température de -18°C. Les coupes sont ensuite transférées sur le support servant à l'analyse.

3.2.3 Préparation des matrices :

Pour la matrice ionique HCCA/ANI, un équivalent de la base (ANI) est ajouté à 10 mg/ml d'HCCA en solution dans ACN/ H₂O (2:1, v/v; 0,1% TFA). Le mélange est vortexé et soniqué pendant 10 minutes avant application sur le tissu.

Pour l'HCCA une solution classique de 10 mg/ml ACN/H₂O (2 :1, v/v, 0,1% TFA/H₂O).

3.2.4 Préparation de l'échantillon pour analyse MALDI.

Pour les expériences d'analyses directes et d'imagerie sur coupe, 20µl d'une solution de matrice est appliqué sur la coupe en utilisant une micropipette. L'échantillon est alors séché à température ambiante.

Pour les analyses classiques, 1 µl de la solution d'échantillon et 1µl de la solution de matrice sont mélangés sur le support MALDI conformément à la procédure de préparation en goutte sèche

3.3 De l'analyse directe par spectrométrie de masse à l'imagerie des petits organismes.

3.3.1 Analyse directe de chaines nerveuses de sangsue

Préparation de la chaîne nerveuse de la sangsue :

Pour cette étude, il convient de retirer la chaîne nerveuse du sinus veineux qui l'entoure. Les sangsues sont anesthésiées dans une solution contenant 10 % d'éthanol. Elles sont ensuite épinglées sur la face ventrale et la chaîne nerveuse est isolée. La dissection est effectuée dans une solution saline (solution de Ringer) afin de conserver des conditions

physiologiques. Le sinus ventral est alors ouvert à partir d'une des extrémités et tous les connectifs partant des ganglions sont coupés en prenant soin de garder la chaîne intacte. La chaîne est ensuite rincée dans une solution de rouge neutre pour qu'elle soit plus facile à repérer lors de la coupe puis dans une solution de DHB (10 mg/ml H₂O/ACN 4:1, v/v). La chaîne est alors enrobée dans une solution d'OCT (Optimal Cutting Temperature polymere).

Recherche des substituants :

Différents composés ont été testés. Des solutions de gélatine dans l'eau ont été utilisées à des concentrations de 5 %, 10 %, 15 %, 17,5 % ou 20 %. Des solutions d'agar à 2 %, 4 % et 5 % et d'agarose à 2 % ont été testées

Rinçage des coupes :

Pour les protocoles de rinçages, les coupes sont immergées dans la solution de rinçage et faiblement agitée ou la solution est dispensée à la surface de l'échantillon grâce à une pipette pasteur.

Extraction sur coupe :

Pour les tests sur les extractions sur coupes, un microlitre de la solution d'extraction est déposé sur la coupe et laissé pendant 30s avant d'être repris et déposé sur le support MALDI mélangé avec la solution de matrice (sauf dans le cas où la matrice sert de solution d'extraction.).

Ont été testées des solutions de d'acétonitrile (ACN) à une concentration de 80 % dans l'eau, 60 % dans l'eau ou dans l'eau avec 10% de TFA, d'HCCA à 10 mg/ml H₂O/ACN (2:3, v/v ; 0,1 % TFA) et d'HCl 1N.

3.3.2 Etudes préliminaires des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue

Afin d'étudier les lipides impliqués dans la régénération nerveuse, des sangsues ont été endormies puis sectionnées au niveau de leur chaîne nerveuse. Une étude cinétique a ensuite été réalisée en sacrifiant les sangsues à des temps différents après les lésions (« témoin » t₀, t 30min, t1H30, t3H, t6H, t18H, t24H, t48H et t7jrs). Comme pour l'étude *in vitro*, cinq sangsues ont été utilisées pour chacun des temps. Différentes techniques de spectrométrie de masse ont permis d'établir un profil des lipides au cours des différents temps de régénération (**Figure 3. 1**)

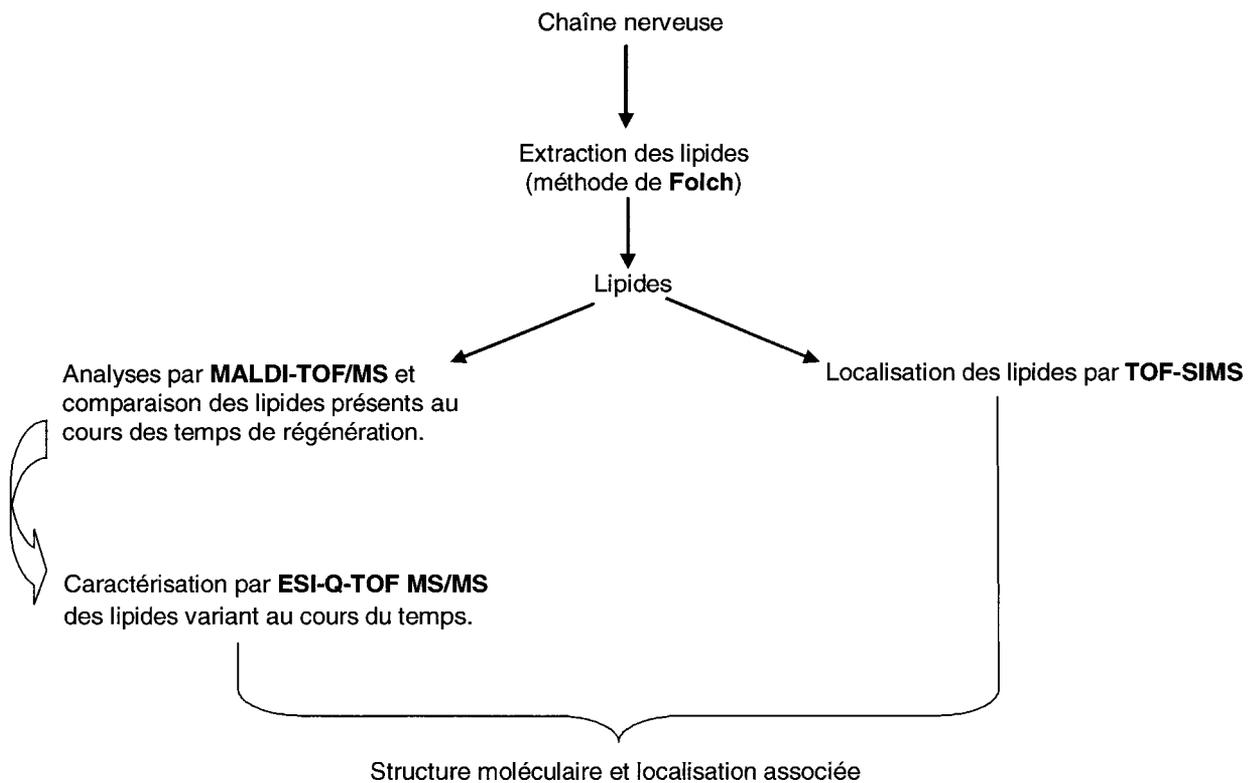


Figure 3. 1: Stratégie d'analyse de la régénération nerveuse in vivo

Extraction des lipides contenus dans les chaînes nerveuses :

L'extraction des lipides contenus dans les chaînes nerveuses a été réalisée suivant la méthode de Folch adaptée à notre modèle d'étude. Des chocs thermiques (cinq bains successifs et rapides tantôt dans l'azote liquide à -196°C , tantôt dans l'eau à 37°C), accompagnés d'un broyage manuel des chaînes ont été réalisés. Un volume d'1 mL de mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; vol/vol) a ensuite été ajouté au broyat avant d'effectuer à nouveau cinq cycles de chocs thermiques séparés par des homogénéisations au vortex.

Après sonication (3 cycles de 20 secondes dans la glace), la préparation ainsi obtenue est placée sous agitation pendant 2H et à 4°C , suivi d'une étape de centrifugation (30 minutes à 5000 rpm et 4°C). 200 μL d'une solution de NaCl 0.9% sont alors ajoutés à la préparation. Une homogénéisation au vortex et une nouvelle centrifugation (10 minutes à 2000rpm et 4°C) ont permis d'obtenir deux phases distinctes.

La phase supérieure (phase méthanolique) contient les petits lipides polaires et les gangliosides solubles dans le méthanol, alors que la phase inférieure (phase méthanol/chloroforme) correspond aux lipides totaux, de nature hydrophobe et solubles dans le chloroforme. Les fragments cellulaires et les protéines de nature hydrophile se situent à l'interface de ces deux phases.

Les phases supérieure et inférieure sont collectées séparément, et la phase supérieure, à nouveau lavée avec 1mL de chloroforme/méthanol (2/1 ; vol/vol). La nouvelle phase inférieure obtenue a été ajoutée à la précédente et l'ensemble a été séché par centrifugation sous vide pendant toute une nuit. Après évaporation totale du chloroforme, les lipides ont été repris dans 500µL du mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; vol/vol).

Détection et caractérisation biochimique des lipides par spectrométrie de masse :

Les lipides isolés des chaînes nerveuses selon la méthode de Folch ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS et ESI-Q-TOF MS/MS.

Dans le cas des lipides, la matrice acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) a été plus particulièrement retenue pour les analyses. Les solutions de matrice sont préparées à 50 mg/mL dans un mélange méthanol/eau (1 :1, v/v). Les échantillons sont préparés en déposant 1µL d'analyte sur une plaque conductrice en inox suivi par le dépôt d'1µL de matrice. Après évaporation du solvant, la plaque est introduite dans la source.

L'ensemble des échantillons étudiés ont été préparés et analysés dans les mêmes conditions afin de réaliser une comparaison des lipides présents à chaque temps de régénération

Imagerie Tof- SIMS :

Des chaînes nerveuses sont blessées et laissées en régénération pendant 6h ou 24h. Des coupes de 12 µm de chaînes nerveuses de sangsue entourées de leur sinus ventraux sont déposées sur un support métallique adapté à l'imagerie Tof-SIMS.

3.4 Apport de la métallisation pour l'ISM MALDI

La métallisation se réalise par évaporation pour la métallisation des supports ou par pulvérisation dans le cadre du dépôt sur échantillon. Le dépôt par évaporation est un dépôt anisotrope (évaporation du métal dans la direction verticale) alors que le dépôt par pulvérisation est un dépôt plutôt isotrope (éjection d'atomes d'une cible).

La métallisation des supports a été réalisée en partenariat avec le groupe Microsystèmes, Microfluidique, Microthermique du Pr. J.C. Camart (collaboration avec V. Thomy) de l'Institut d'Electronique et de Microélectronique et de Nanotechnologie de Lille (IEMN).

La métallisation des échantillons par dépôt d'or a été réalisée en partenariat avec le Centre Commun de Mesures « Imagerie Cellulaire » (CCMIC) de l'Université des Sciences et

Technologies de Lille (USTL) sous la responsabilité scientifique du Dr. M. Bertout (collaboration avec L. Brunet). Les Dépôts de carbone et de chrome ont été effectués sur des appareils du Centre Commun de Microscopie Electronique de l'USTL (CCME) (collaboration avec A. Blanchenet.)

3.4.1 Dépôt par évaporation

Il s'agit de l'évaporation d'un métal chauffé de façon à exposer le substrat au flux de vapeurs métalliques. Cette technique consiste à provoquer l'évaporation d'un métal dans le vide en le chauffant jusqu'à sa température d'ébullition. Les atomes métalliques se propagent alors en ligne droite et se fixent sur la surface froide de l'objet à traiter.

Plusieurs méthodes permettent de réchauffer le métal à évaporer :

- le creuset : récipient contenant le métal et réchauffé par une résistance électrique. Le substrat à traiter est placé au-dessus de ce creuset.
- le canon à électrons : un échantillon du métal à évaporer est soumis à un intense faisceau d'électrons qui le réchauffe jusqu'à l'évaporation. Le substrat à traiter est également placé au-dessus.
- le filament de tungstène : déposition de quelques cavaliers constitués de métal à évaporer sur de robustes filaments en tungstène. Ceux-ci sont chauffés par un puissant courant électrique qui les traverse. Quand la température de fusion des cavaliers est atteinte, le métal "mouille" le filament et se répand sur sa surface avant de s'évaporer. Le tungstène est choisi pour constituer ces filaments, car ce corps a une haute température de fusion.

Dans le cas des bâtis utilisés à l'IEMN, un canon à électrons est utilisé (**Figure 3.2**). Il s'agit de bâtis d'évaporation par canons à électrons 6 creusets. Ces bâtis sont équipés de canons (source Commonwealth et Iontech 3 cm) qui permettent, sous pression partielle d'argon et à très faible énergie, un 'prénettoyage' des substrats avant dépôt.

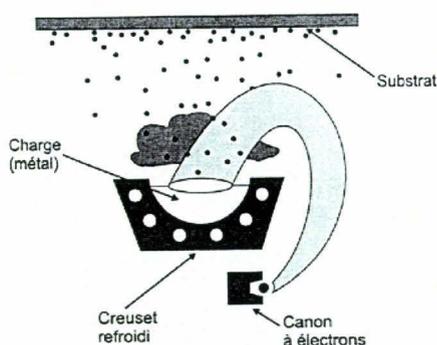


Figure 3.2 : Schéma de principe de la métallisation par évaporation.

3.4.2 Dépôt par Pulvérisation cathodique :

Le principe du dépôt par pulvérisation cathodique est le suivant. Un gaz, souvent de l'argon, est introduit dans l'enceinte. Une cible du matériau que l'on veut déposer est reliée à un potentiel négatif (cathode), tandis que le substrat est lui porte a un potentiel positif. Une décharge permet de créer un plasma entre les électrodes. Les ions d'argon vont venir bombarder la cible, et en extraire ainsi le matériau à déposer sur le substrat.

Les dépôts de chrome ont été effectués en mode magnétron. Les magnétrons sont des aimants places a proximité des cibles, de façon a donner aux ions une trajectoire hélicoïdale, ce qui augmente leur taux de collision, et réduit donc leur libre parcours moyen. Une meilleure efficacité en terme de bombardement ionique de la cible est ainsi obtenue, ce qui peut permettre par exemple d'abaisser la pression de travail.

3.5 Procédés de fabrication des masques

La fabrication du prototype des masques, contenant des micro-ouvertures à flanc droit, est basée sur les principes classiques des micro-technologies. Des « wafers » de Silicium sont amincis par attaque humide afin d'obtenir une épaisseur de 100 μ m. Après un nettoyage du substrat de type "pyrana" ($H_2SO_4 + H_2O_2$), une première couche de résine photosensible (SU-8, Microchem) est déposée (10 μ m de SU-8 2010) (**Figure 3.3a**). L'ensemble est ensuite exposé aux UV au travers d'un masque en verre recouvert de chrome dans lequel des ouvertures fixes sont définies (**Figure 3.3b**). Puis la couche de SU-8 est enlevée en utilisant une solution de développement (**Figure 3.3c**). Les zones de Silicium qui n'ont pas été protégée par la couche photosensible sont attaquées en ICP (Inductively Coupled Plasma) par procédé Bosch [Brevet Laermer & Schilp, DE4241045 US 55010893, Licence de la société SMS] (**Figure 3.3d**). Le prototype est ensuite nettoyé de nouveau par "pyrana". Des damiers de 1mm de coté et contenant des ouvertures de 10 à 100 μ m de côté, sont ainsi obtenus

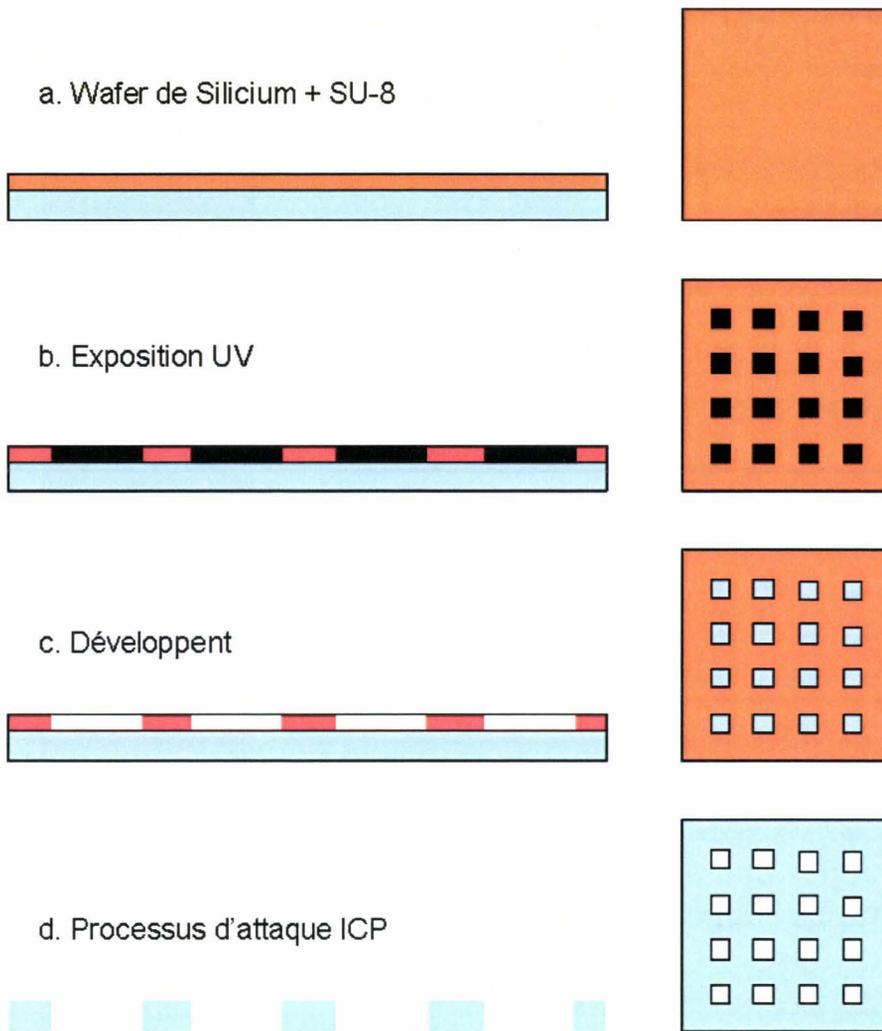


Figure 3.3 : Processus de fabrication des masques à ouvertures droites

Dans le cadre des masques à ouverture en V, des wafer de silicium de $380\mu\text{m}$ d'épaisseur sont utilisés. Ils subissent une attaque HF (1%) pour enlever l'oxyde natif. Ensuite un dépôt de Nitrure (Si_3N_4) double face est réalisée : la première face pour venir définir les motifs circulaires du masque via la couche de résine (voir plus loin), la seconde pour protéger la face arrière lors de l'attaque plasma du Si (**Figure 3.4 a**). Une résine AZ 5214 est déposée (vit 3000, acc. 1000, tps 7s). L'ensemble est recuit à 120° pendant 60s. Une Insolation à travers le masque contenant des cercles de 200 et $400\mu\text{m}$ de diamètre est réalisée (**Figure 3.4 b**) avant d'être recuit à 120° pendant 60s. Une insolation pleine plaque (sans masque) est réalisée pendant 60s car la résine est réversible (elle passe de positive à négative). La révélation se fait au MIF pur pendant 20s suivit d'un rinçage à l'eau (**Figure 3.4 c**). Le nitrure est gravé par ICP (**Figure 3.4 d**). Une attaque piranha est effectuée pour enlever la résine suivit d'une attaque humide au TMAH pour diminuer l'épaisseur de l'ensemble (**Figure 3.4**

e). Enfin le Si_3N_4 est gravé (**Figure 3.4 f**) par ICP et le masque est aminci par gravure ICP pour obtenir l'épaisseur désirée (**Figure 3.4 g**).

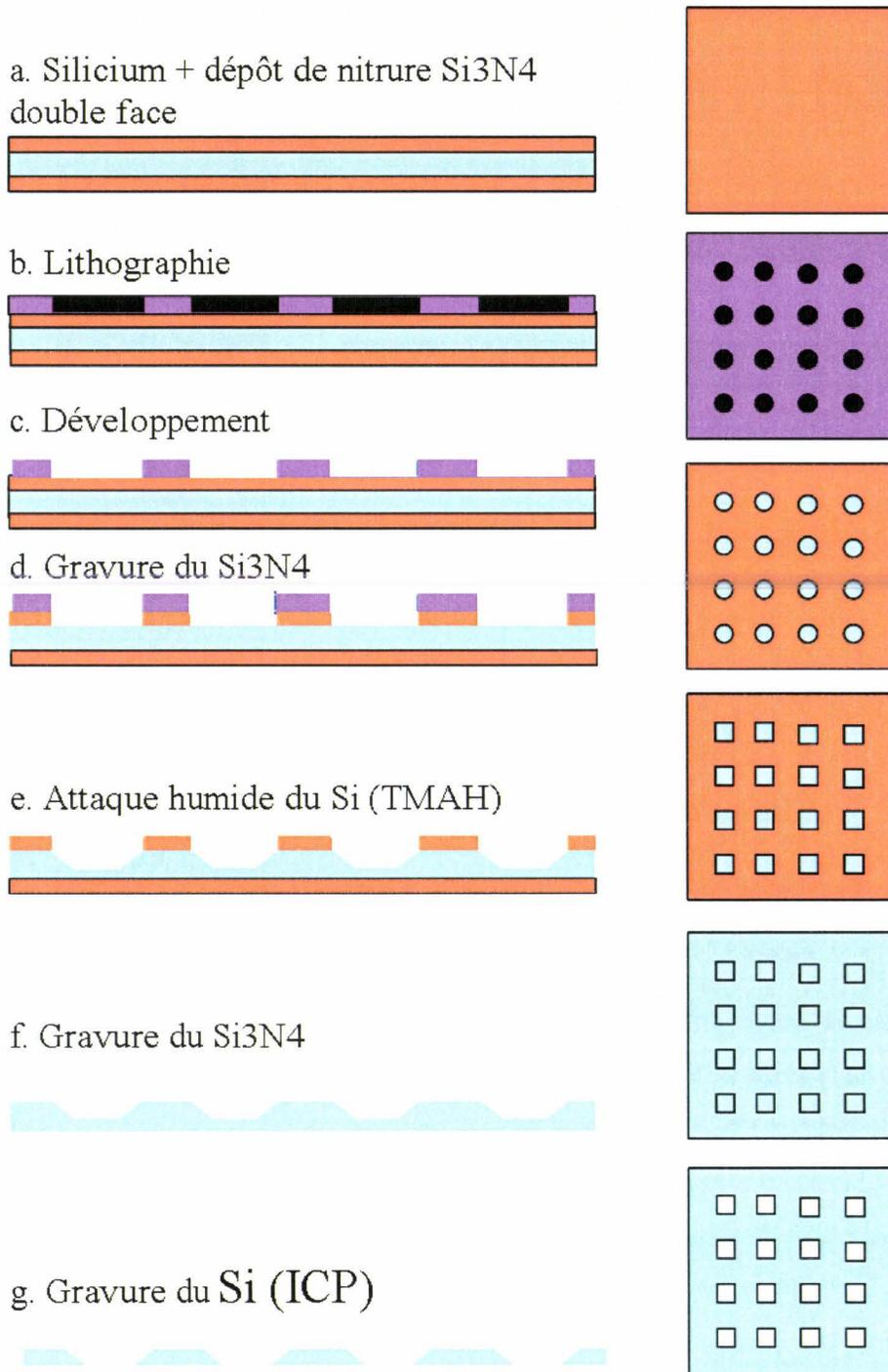


Figure 3.4 : Processus de fabrication des masques en V

De l'analyse directe par spectrométrie de masse à l'imagerie des petits organismes.

4.1 Introduction

La sangsue médicinale fait partie des représentants les mieux étudiés de l'embranchement des Annélides. Ce modèle a été étudié de façon intensive pour les analyses cellulaires des fonctions du système nerveux, allant des études du comportement à l'étude de la fonction des canaux ioniques et des connections synaptiques [97, 98]. Le choix de ce modèle repose en partie sur la simplicité de son système nerveux. Le segmental ganglion est constitué de 400 neurones [99], la plupart parfaitement caractérisés morphologiquement et embryologiquement [100]. Ces neurones présentent le rare avantage d'être facilement accessibles et surtout ils possèdent contrairement aux cellules nerveuses de mammifères la capacité de se régénérer suite à une blessure (Shen, 2002 #142; Burrell, 2003, Blackshaw et al.).

L'embryon de sangsue est un excellent modèle pour l'étude, au niveau moléculaire et cellulaire, des mécanismes de développement neuronal du fait de la taille importante des neurones et de leur position inchangée au cours du développement du système nerveux. De nombreuses données ont de ce fait été cumulées en ce qui concerne les processus d'arborisation et les connections synaptiques des neurones de ganglion de sangsue [101-103]. Les embryons de sangsue présentant un temps de développement relativement lent (30 jours) il est possible de réaliser des expériences de délétion ce qui a permis l'étude de certaines interactions cellule-cellule au cours du développement [101, 104-107, 108, 109].

Des approches en biologie moléculaire ont également été utilisées sur les neurones de sangsue identifiés. Des banques soustractives d'ADNc réalisées à partir de cellules de *Retzius* régénératives ont révélé un important enrichissement en transcrits impliqués dans les changements plastiques neuronaux [110, 111]. Des analyses par RT-PCR de neurones isolés ont récemment été utilisées pour caractériser l'expression de canaux sodiques spécifiques [97]. D'autres séries d'expériences ont démontré l'implication de gènes de la famille Hox dans le développement du système nerveux de la sangsue [15, 112, 113]. L'expression de ces gènes est corrélée avec les changements dans l'arborisation et les propriétés électriques des différents neurones d'*Hirudo medicinalis* [114]. Par ailleurs, par une approche en RNAi, le rôle dans le développement de certains gènes de sangsue a pu être appréhendé au niveau

d'une cellule unique grâce à des injections intracellulaires directement effectuées dans des neurones identifiés et au niveau de l'embryon entier grâce à un système plus général d'injection [115]. Finalement, l'expression de gènes ectopiques dans les cellules embryonnaires a récemment été rendue possible par l'utilisation du promoteur du gène de l'actine de sangsue. De nombreuses expériences réalisées *in vivo* et *in vitro* ont démontré qu'à l'inverse des neurones mammaliens, les neurones de sangsue possédaient la faculté suite à une lésion de régénérer des synapses et surtout de restaurer leur fonction [116]. Des données récentes montrent que les cellules de la microglie ainsi que les composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine, joueraient un rôle important dans la croissance axonale et la formation des synapses lors de cette régénération [117, 118]. Les lésions du système nerveux provoqueraient également une augmentation de monoxyde d'azote (NO) et une accumulation de cellules microgliales phagocytaires sur le site de lésion [119, 120]. Ces expériences suggèrent que la production de NO pourrait servir de signal pour freiner la migration des cellules microgliales qui, de ce fait, s'accumuleraient au niveau de la blessure [120]. En fait, l'augmentation de NO pourrait être liée à une activation, suite à la lésion, d'une NO synthase présente au sein du système nerveux et serait liée à l'activation de la voie de synthèse des lipides pouvant conduire aux cannabinoïdes [121, 122] où d'autres lipides neuroprotecteurs de la famille des omegas. De manière intéressante, une activation du système cannabinoïde pourrait intervenir sur la migration des cellules microgliales de sangsue lors d'une infection du système nerveux ou d'une lésion.

Le système nerveux de sangsue est un système qui semble être idéal pour effectuer l'analyse des caractéristiques spatio-temporelles du développement neuronal et de la régénération nerveuse chez l'adulte.

Dans ce contexte, pour étudier les molécules mises en jeu dans ces processus, l'analyse directe par spectrométrie de masse semble être une des techniques à développer à côté des techniques de peptidomiques et de lipidomiques. Comme précédemment décrit dans la partie 2.2.2 les premiers travaux sur l'analyse directe de tissus ont été réalisés sur des mollusques (*Lymnaea stagnalis*) et datent de 1994 [123]. Par la suite, il faut citer différentes études sur les nerfs, les cellules neuroendocrines puis sur des neurones uniques (neurones géants) de Lymnée et d'escargot [29, 30, 124]. Des études similaires ont également été conduites chez l'aplysie et l'écrevisse [26, 27]. Plus récemment des études ont été menées sur des vésicules à noyau dense à partir de l'aplysie [25]. Sur ces cellules ont été en particulier étudiées les peptides bioactifs et la maturation de certaines hormones pour conduire à la libération de ces peptides. Certains de ces travaux permettent de remonter à la voie de

maturation des hormones comme dans le cas de l'hormone procHH (hyperglycémiant) pour l'écrevisse [28] ou de l'hormone de ponte (Egg Laying Hormone) pour l'aplysie.

L'analyse se fait classiquement par transfert de la cellule, des cellules ou du tissu sur le support métallique. Différents paramètres peuvent influencer sur la pertinence des l'analyses, comme le milieu physiologique très riche en sels pouvant rendre ces analyses difficiles. Des études réalisées par le groupe de Sweedler [24] montrent l'influence du milieu qui peut être substitué au milieu physiologique sur la qualité des analyses, et par exemple l'utilité de certaines fixations ou de stabilisateurs comme le glycérol. Dans d'autres études sur cellules uniques la puissance de la méthode est démontrée au travers de la caractérisation *in situ* de certains peptides en utilisant les capacité d'élucidation structurale de la spectrométrie de masse soit par des études en mode PSD sur instrument de type MALDI-TOF [125] soit par des études en mode MS/MS CID sur des analyseurs magnétiques [29]. Pour toutes ces raisons, nous avons développé cette technologie sur le système nerveux de notre modèle, la sangsue.

4.2 Le système nerveux d'*Hirudo medicinalis*

La sangsue *Hirudo medicinalis* (**Figure 4.1**), est un invertébré hermaphrodite vivant en eau douce. Il s'agit d'un ectoparasite hémaphage des vertébrés (poissons, reptiles et mammifères). Le système nerveux central d'*Hirudo medicinalis* est constitué de 21 ganglions réunis par des connectifs inter-ganglionnaires, un ganglion cérébroïde et un ganglion caudal, tout deux formés de la fusion de plusieurs ganglions (**Figure 4.2**). Cette chaîne innerve l'ensemble des 32 métamères ainsi que le prostomium de la sangsue. Chaque ganglion contient 400 neurones exception faite des ganglions 5 et 6, « les ganglions sexuels », qui en possèdent environ 700 dont 300 ganglions surnuméraires.

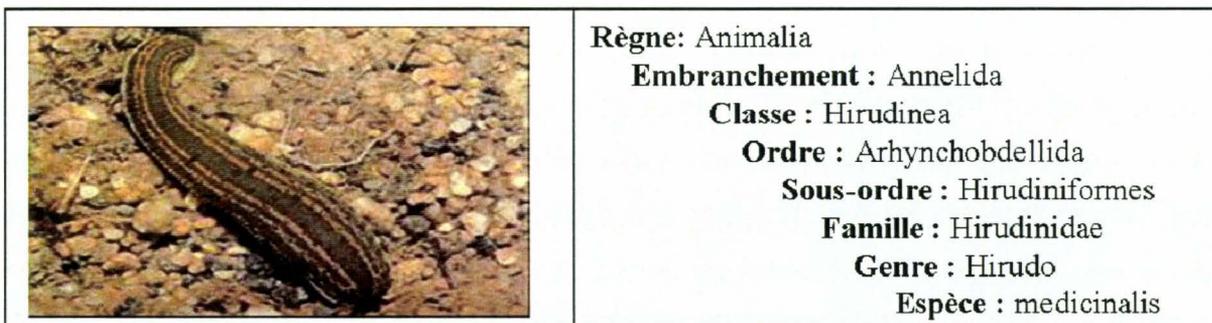


Figure 4.1 : *Hirudo medicinalis* et sa classification phylogénétique

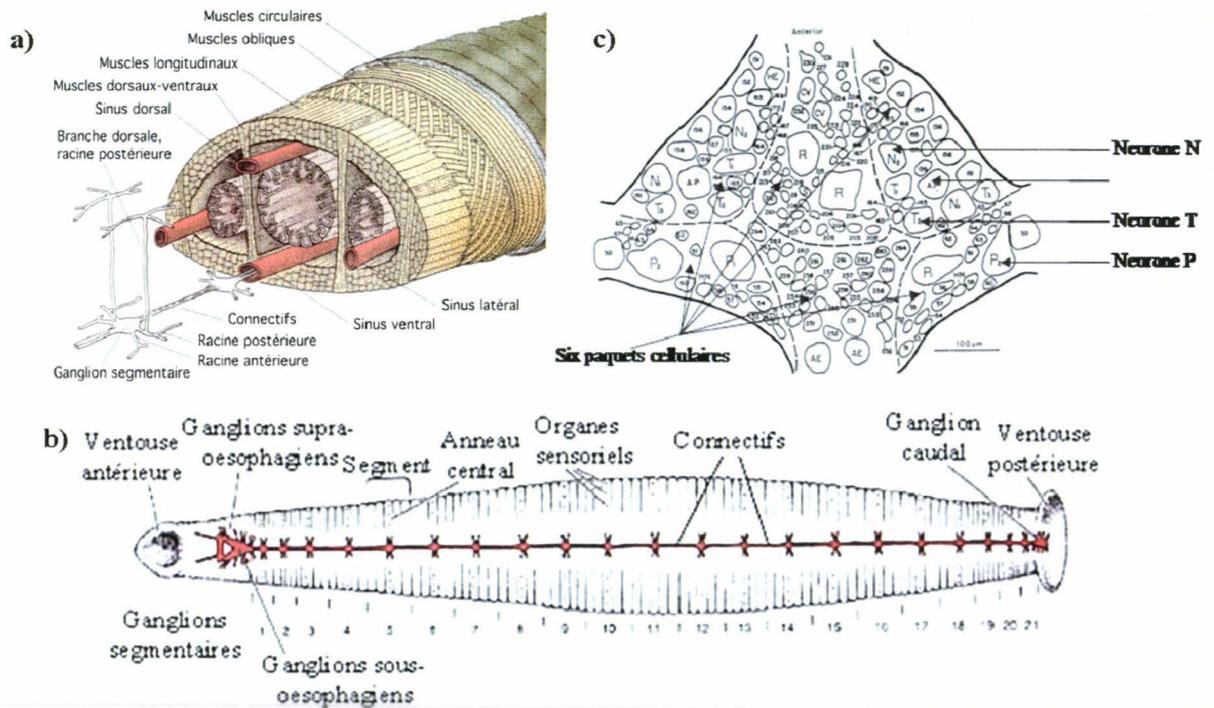


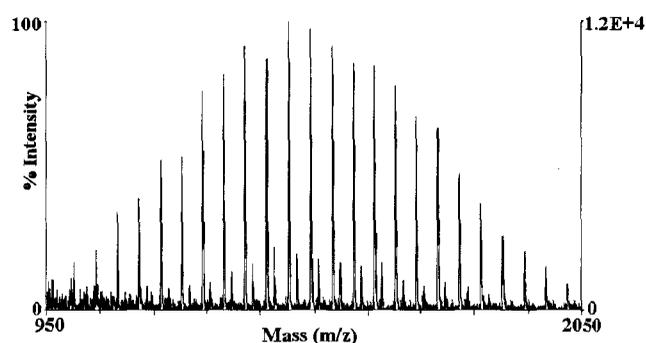
Figure 4.2 : a) coupe transversale d'*Hirudo medicinalis*, b) schéma d'ensemble de son système nerveux [R.T. Sawyer, *Neurobiology of the Leech* (1981)] et c) d'un ganglion (face ventrale) [R.T. Sawyer, *Neurobiology of the Leech* (1981)]

Chaque ganglion contient six paquets cellulaires contenant plusieurs types de neurones. Il existe des neurones N, P et T (respectivement nociceptive, pression et touch) ainsi que des motoneurones commandant la mobilité de l'animal (**Figure 4.2c**). Le centre des ganglions forme le neuropile, constitué par les prolongements axonaux des neurones. La chaîne nerveuse est également riche en cellules microgliales dont l'action est encore mal connue chez la sangsue mais qui semblent jouer le rôle de cellules immunitaires et participer à la régénération nerveuse.

4.3 Analyses directes par spectrométrie de masse des peptides du système nerveux de sangsue

Une des grandes difficultés de ce type d'analyses réside dans la taille et la composition de l'échantillon à analyser, ici la chaîne nerveuse. Pour réaliser des analyses directes par spectrométrie de masse, il faut que l'échantillon présente le moins d'artéfacts possible tels que des déformations ou des déchirements. Ainsi pour éviter de tels problèmes ainsi que pour palier aux difficultés de maniement du tissu, le plus souvent la pièce est enrobée dans une solution qui une fois durcie permettra de garder la structure du tissu durant la coupe. Ce milieu sert également pour orienter la pièce histologique avant la réalisation des sections.

Les milieux d'enrobage les plus utilisés appartiennent à la classe des OCT (Optimal Cutting Temperature polymere). Ils sont constitués d'un polymère liquide à température ambiante, qui va durcir à froid permettant de stabiliser le tissu. Pour des pièces de tailles importantes (5 x 5 mm²) l'échantillon est suffisamment grand pour ne pas subir de déformations ni se déchirer lors de la coupe et du transfert vers le support MALDI. L'OCT sera utilisé dans ce cas comme un adhésif, la partie coupée n'entrant pas en contact avec le polymère. Pour des pièces de plus petites dimensions telles que la chaîne nerveuse de sangsue, le recourt à un milieu d'enrobage est obligatoire. Cependant, les polymères constituant l'OCT sont aisément analysables en MALDI. Il gêne alors l'analyse par l'apparition de pics caractéristiques de la distribution de polymères dont un de type PEG



particulièrement prépondérant dans la gamme de masse de m/z 1000 à m/z 2000 (Figure 4.3) [34].

Figure 4.3 : Spectre de masse avec contamination du polymère de l'OCT.

Pour éviter ce problème une autre solution a été choisie dans un premier temps pour étudier le système nerveux de sangsue. Il s'agit de couper la sangsue dans son entier et d'analyser les coupes où la chaîne nerveuse est présente.

4.3.1 Analyses directes du système nerveux dans une sangsue entière

Deux techniques différentes ont été testées :

- Un morceau de sangsue est placé dans de l'OCT et congelé à -80°C durant une nuit.
- Un bâton de verre est placé au travers de la sangsue. L'ensemble est congelé à -80°C durant une nuit. Un bloc peut ensuite être découpé dans cette sangsue puis le bloc collé grâce à du tissu tek sur le porte-objet du cryostat.

Dans les deux cas, des coupes de $20\mu\text{m}$ d'épaisseur sont ensuite réalisées au cryostat. Au niveau histologique, en utilisant la première méthode, les structures sont bien conservées, le bloc est facile à couper et le système nerveux est bien visible. Mais le bloc est entièrement enduit d'OCT, ce qui provoque l'apparition d'une distribution de pics correspondant au polymère dans les spectres de masse pour une gamme de masse où ils se superposent à des pics d'intérêts (**Figure 4.4a**). Lors de l'analyse les tirs laser sont focalisés sur le système nerveux dans son ensemble, une meilleure précision de localisation ne pouvant être obtenue

car les sous structures du système sont difficilement reconnaissables après le dépôt de matrice. En utilisant la deuxième technique, les coupes obtenues ne sont pas en contact avec l'OCT, mais les structures sont légèrement déformées à cause du bâton de verre, et le bloc est plus difficile à couper.

La technique de préparation consistant à enrober un morceau de sangsue dans l'OCT donne de meilleurs résultats avec un nombre supérieur d'ions détectés et une intensité accrue (**Figure 4.4a**), même si le massif de pics de polymère est présent. Les mêmes pics sont présents dans les deux techniques pour des rapports m/z allant de 2000 à 6000. Dans la seconde technique (**Figure 4.4b**) peu de pics sont présent au-delà de m/z 6000 alors qu'ils sont nombreux pour la première technique. Des pics correspondant au polymère sont également présents avec la seconde technique alors que l'OCT n'est pas en contact avec la lame. Il semble donc qu'il y ait eu une contamination des expériences précédentes. Par la suite, la lame a donc été nettoyée entre chaque bloc différent de tissu.

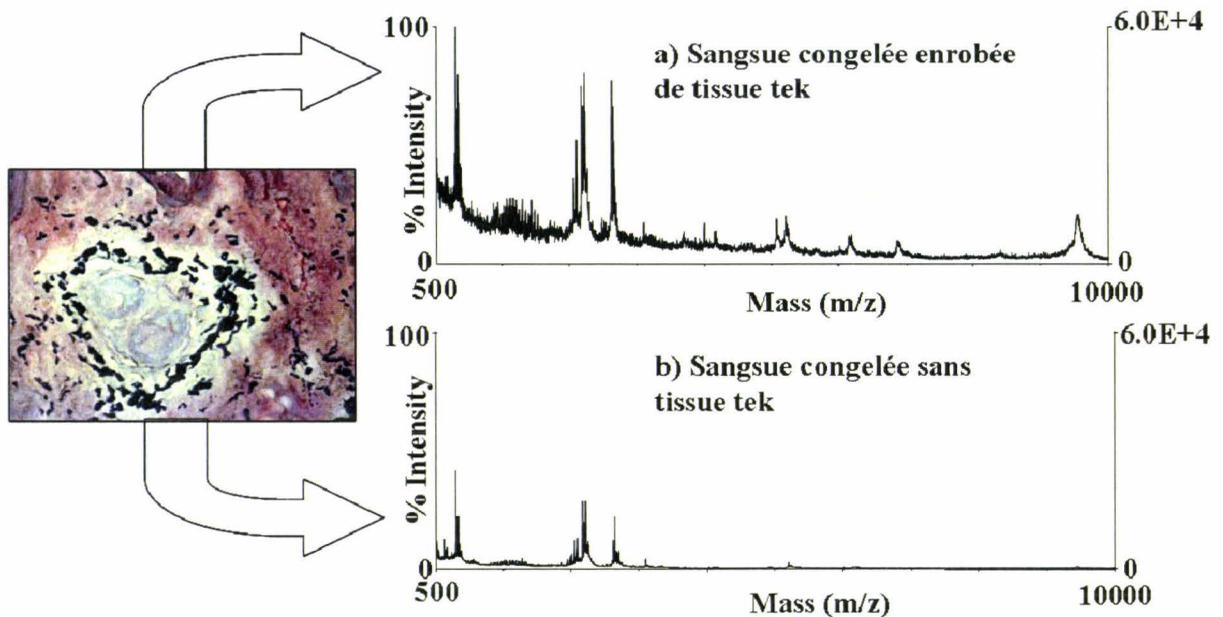


Figure 4.4 : Comparaison des 2 techniques de congélation de sangsue entière.

Cette méthode, même si elle fonctionne, présente l'inconvénient principal de devoir travailler sur une coupe de sangsue entière alors que seul le système nerveux présente un réel intérêt pour nos études. Hors lors de la réalisation de coupe transversale dans l'animal il est très rare de passer dans un ganglion. Le plus souvent, seules des coupes de connectifs reliant les ganglions entre eux sont obtenues. De plus, la présence d'autres tissus et de sang (dont se nourrit la sangsue), pourrait apporter des contaminations. La réalisation de coupes longitudinales de l'animal a été testée mais aucunes coupes contenant la chaîne nerveuse n'a pu être obtenues. Le meilleur moyen d'étudier le système nerveux est donc de travailler à

partir d'une chaîne nerveuse isolée. La sangsue est disséquée comme décrit dans la **partie**

3.3.1 Cette méthode est rapide et garde la chaîne intacte.

4.3.2 Préparation des chaînes nerveuses isolées

La chaîne nerveuse de sangsue est un organe extrêmement petit et élastique. Les ganglions ne faisant pas plus d'une centaine de microns, il est difficile d'obtenir plus d'une dizaine de coupes consécutives dans un même ganglion. Il faut par conséquent être très précis et éviter au maximum les déchets de coupes. Pour réaliser des coupes d'une bonne qualité préservant la morphologie, l'enrobage de la chaîne est indispensable.

Pour l'inclure, il faut en premier lieu réaliser un bloc d'OCT avec une face la plus plane possible. Puis, la chaîne est délicatement posée sur la face plane et l'ensemble est disposé dans l'enceinte du cryostat. Au bout de quelques minutes, une couche d'OCT est appliquée sur la chaîne. Après solidification de l'ensemble, le bloc est monté et les coupes réalisées. Si la face où la chaîne a été disposée est suffisamment plane, il sera alors possible d'obtenir plusieurs ganglions sur une seule coupe et de réaliser leur analyse directe par MALDI.

La solution de Ringer, utilisée lors de la dissection pour préserver les conditions physiologiques et maintenir les tissus en bon état, est riche en sels ce qui présente des inconvénients pour l'analyse par spectrométrie de masse et conduit à une qualité spectral diminuée. Une méthode pour retirer cet excédent de sel a été mise au point [126]. Il est possible de rincer la chaîne nerveuse avec de la matrice. Le rinçage avec la matrice 2,5-DHB puis le dépôt d'HCCA est la méthode qui donne les meilleurs résultats. Les spectres obtenus dans ces conditions présentent une intensité du signal plus forte et un meilleur rapport signal sur bruit. De plus le bruit chimique du spectre s'en trouve diminué (données non présentées).

Le principal paramètre pour obtenir des coupes fraîches bien conservées morphologiquement est la qualité de la congélation de l'échantillon. Jusqu'ici le type de congélation utilisé est une congélation lente. Le tissu est mis à -80°C durant au maximum une nuit. Ce type de congélation présente l'inconvénient de former des cristaux de glace qui vont faire exploser les cellules. La congélation rapide, consistant à laisser le tissu congeler dans des vapeurs d'azote liquide, permet une très bonne conservation de l'intégrité des tissus de la chaîne nerveuse. De ce fait elle a été utilisée dans la suite des expériences réalisées.

4.3.3 Recherche d'un substituant pour l'OCT

Après avoir éliminés les problèmes de sels et de congélation de l'échantillon, reste toujours la question du polymère d'enrobage. Les coupes obtenues sont toujours entourées de

l'OCT lors du dépôt de matrice. Il existe donc un fort risque de délocalisation du polymère sur la coupe de chaîne nerveuse. De plus, la matrice a tendance à cristalliser dans l'OCT autour de la chaîne sans recouvrir cette dernière. La répartition de la matrice n'est pas uniforme et certaines parties de la coupe ont l'air dépourvu de cristaux. Ceci est confirmé par l'analyse MALDI puisque aucun signal ionique n'est obtenu dans ces zones. Nous avons essayé de découper le tissu tek tout autour de la chaîne mais il est difficile de ne pas déchirer la coupe en réalisant cette opération. De plus, l'analyse révèle toujours l'existence d'une contamination par le polymère.

Des recherches ont été menées pour tester des substances pouvant se substituer à l'OCT. Le substituant doit répondre aux critères suivants :

- être un liquide visqueux à température ambiante pour permettre de disposer la pièce histologique de manière à réaliser des coupes dans le plan de coupe souhaité,
 - se solidifier pour des températures inférieures à 0°C,
- permettre de réaliser des coupes de faibles épaisseurs en évitant les déchirures et les déformations.

Le premier substituant testé est la gélatine à différentes concentrations. A partir d'une concentration de 5% de gélatine, le liquide est suffisamment visqueux pour pouvoir inclure la pièce à couper. Mais une concentration de 20% est nécessaire pour pouvoir réaliser des coupes. En effet en dessous de cette concentration le bloc est constitué de gros cristaux de glace qui rendent difficile la réalisation de coupes inférieures à 40µm d'épaisseur. Les coupes obtenues avec 20% de gélatine sont de qualités légèrement moindres que celle réalisées avec l'OCT, mais restent analysables. Après dépôt de matrices sur la surface de la coupe, aucun spectre n'a pu être obtenu. L'examen de la coupe après le dépôt, montre peu de cristaux de matrice, répartis de manière extrêmement inhomogène.

Des coupes incluses dans un bloc d'agar ont également été réalisées avec des concentrations en agar variant de 2 à 5%. Dans ce cas, les blocs obtenus après congélation sont constitués de cristaux de glace. Pour des concentrations plus élevées, les solutions ne sont liquides qu'à des températures supérieures à 50°C. Ces températures ne permettent pas l'inclusion des tissus sans entraîner de possibles dégradations. L'agar a également été testé en enrobage double [127]. Dans ce cas, la chaîne est positionnée et orientée dans une solution à 4% d'agar. Une fois le gel formé, le bloc d'agar est entouré avec un OCT classique. La distance entre la chaîne et l'OCT devrait permettre de diminuer l'apparition de pics parasites dans les spectres de masse. Mais les coupes obtenues par cette méthode se déchirent très facilement.

Des tests ont également été réalisés avec des solutions d'agarose. La chaîne a été incluse dans une solution à 2% d'agarose puis congelé. Cette technique permet de réaliser des coupes de bonne qualité. Mais une fois encore l'analyse directe en MALDI révèle un signal quasi inexistant, là encore à cause d'une cristallisation difficile de la matrice.

Peu de composés ont permis d'avoir des coupes de qualités comparables aux coupes réalisées avec les OCT et il n'a jamais été possible d'obtenir de signaux en spectrométrie de masse. Une autre solution a donc été envisagée pour prévenir l'apparition de pics de polymères dans les spectres MALDI issus de l'analyse directe de tissu enrobée d'OCT.

4.3.4 Protocole de rinçage des coupes

L'OCT est normalement soluble dans l'eau. Des tests de rinçage à l'eau des coupes ont donc été réalisés soit en pipetant-repipetant de l'eau sur la coupe, soit en plongeant directement le support avec les coupes dans l'eau durant 1 minute et en agitant très légèrement. Le fait de pipeter directement sur la coupe, produit des mouvements de liquide pouvant entraîner des délocalisations. Le fait de plonger la plaque dans l'eau peut aboutir à une dilution des molécules. Mais la chaîne de sangsue étant un petit organe, il est très difficile de se rendre compte si une délocalisation s'est produite.

La comparaison des spectres obtenus par analyse directe de ganglions avec et sans rinçage à l'eau montre une nette différence (**Figure 4.5**). La distribution de pics, correspondant au polymère, n'est pas présente après un rinçage de la coupe alors qu'une distribution de forte intensité est observée sans rinçage. De plus, ce spectre présente un massif de pics vers m/z 2500 qui n'était pas observable avant. En revanche, pour les spectres de coupes rincées, peu de pics sont observés de manière générale et aucun pic n'est présent au-delà de m/z 3000. Ceci laisse à penser qu'une dilution et une perte des peptides s'est produite lors de l'étape de rinçage dans l'eau. Un second solvant de rinçage a donc été testé. Les coupes ont été rincées à l'éthanol. L'éthanol est connu pour être un fixateur, et donc pourrait éviter une dispersion trop importante ou une dilution des protéines. Nous avons tout d'abord essayé de plonger le support avec les coupes dans un bain d'éthanol durant 3 minutes, puis dans un bain d'eau durant 1 minute.

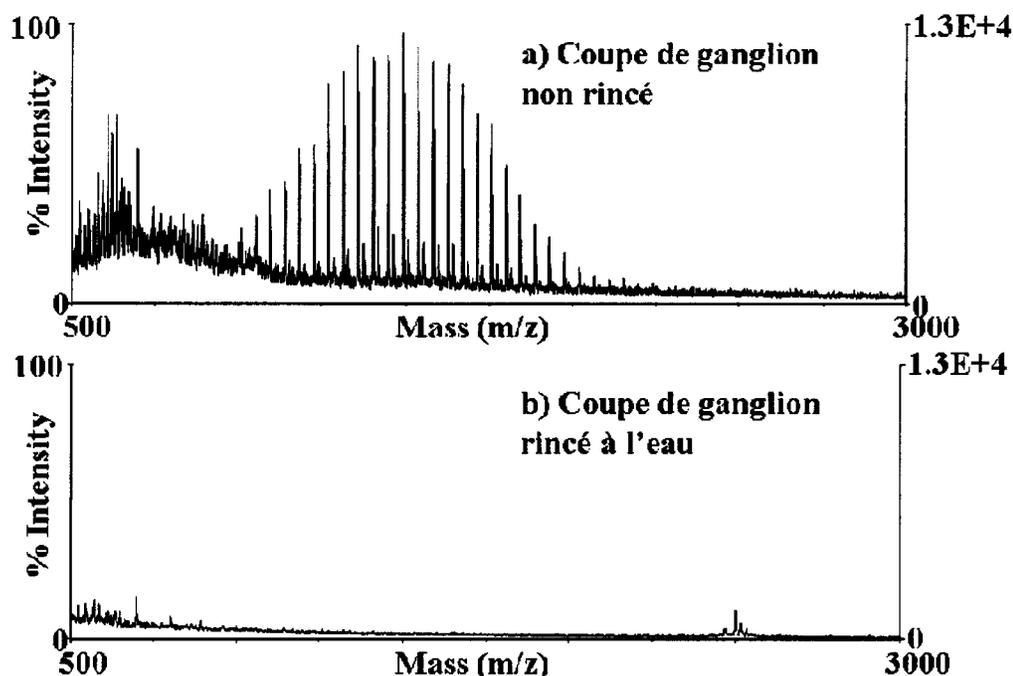


Figure 4.5 : Spectres de masse d'une coupe de ganglion de sangsue (a) non rincé ou (b) rincé à l'eau

La **Figure 4.6** présente les spectres obtenus par analyse directe de coupes de système nerveux de sangsue l'une rincée à l'eau et l'autre à l'éthanol. Le rinçage à l'éthanol conduit à l'obtention de spectres de masse présentant plus de pics que lors d'un rinçage à l'eau. Les pics présents sur les deux spectres ont une plus grande intensité avec le rinçage à l'éthanol. Enfin un nombre de pics plus important est observé au dessus de m/z 5000 avec un rinçage à l'alcool. Suivant ce protocole, une analyse directe d'une coupe de ganglion a permis d'obtenir un spectre de masse de bonne qualité en mode linéaire mais aussi de réaliser un spectre PSD de l'ion m/z 861,7 (**Figure 4.7**). Par la suite, des travaux du groupe de R. Caprioli ont également montré qu'un rinçage à l'éthanol 70% [34] suivit ou non d'un second bain avec une solution éthanol/acide acétique/H₂O (90/9/1 v:v) [62] permet d'éliminer un certain nombre de sels et diminue l'excès d'hémoglobine à la surface de l'échantillon.

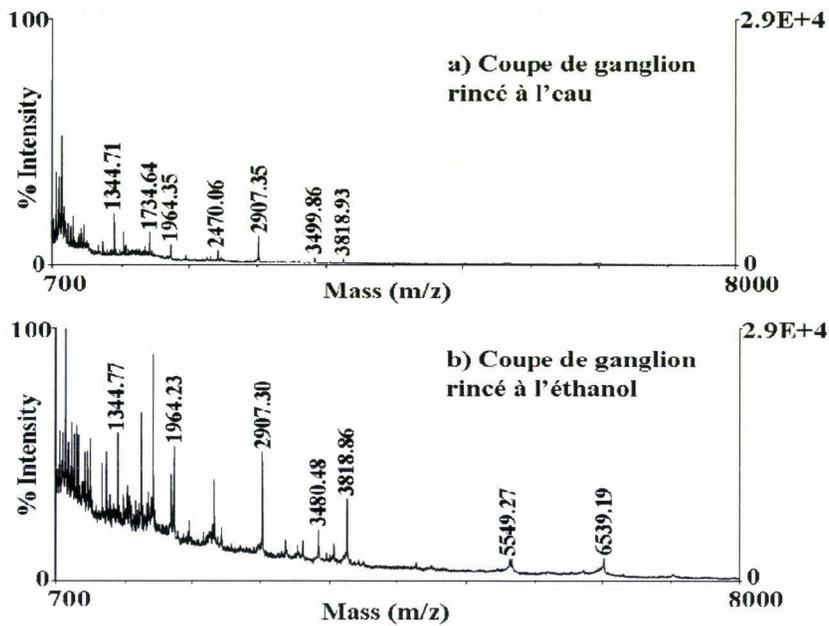


Figure 4.6 : Spectres de masse d'une coupe de ganglion de sangsue (a) rincé à l'eau ou (b) rincé à l'éthanol

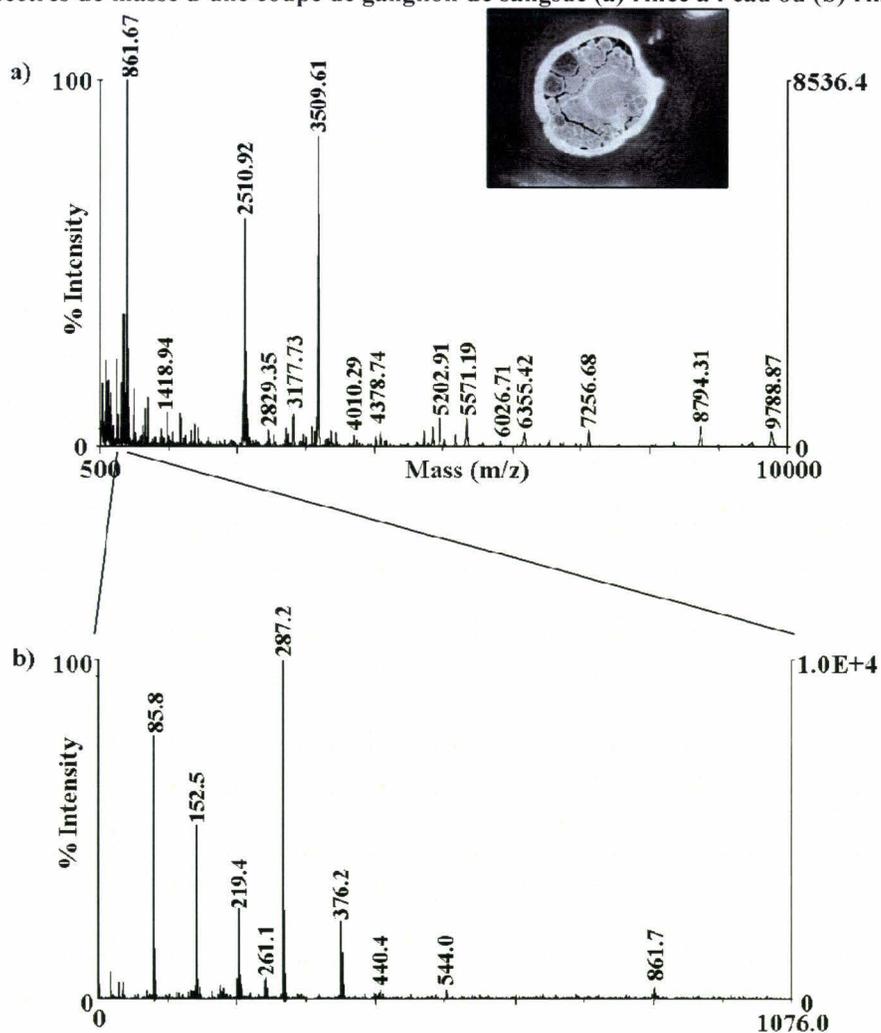


Figure 4.7 : Spectre de masse d'une coupe de ganglion de sangsue a) rincé à l'éthanol et b) spectre PSD de l'ion m/z 861,7

4.3.5 Extraction sur coupes

En plus des expériences d'analyse directe sur coupes de chaîne nerveuse de sangsue, la possibilité de faire des micro-extractions liquides de peptides directement sur la coupe a été explorée. Cette méthode, en plus de fournir un profil peptidique précis du tissu, permet de réaliser une étude plus classique d'un échantillon complexe basée sur une extraction, une séparation et une caractérisation par spectrométrie de masse. En effet en analyse directe, il est difficile d'identifier sur la coupe les molécules étudiées sauf après dérivation N-terminale et digestion trypsique (travaux en cours). Le séquençage sur coupe est à l'heure actuelle encore rare. Pour tester la micro-extraction sur coupe, un certain volume de solvant est déposé sur le ganglion de sangsue pendant un temps donné, puis repris et déposé sur une plaque MALDI et mélangé avec la matrice.

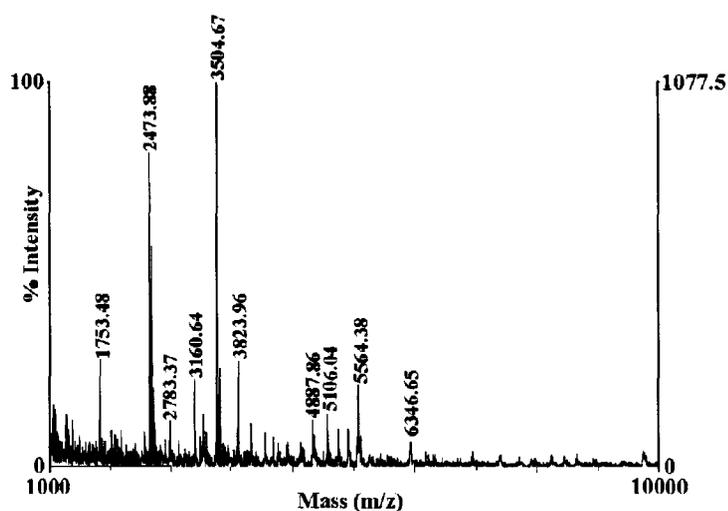
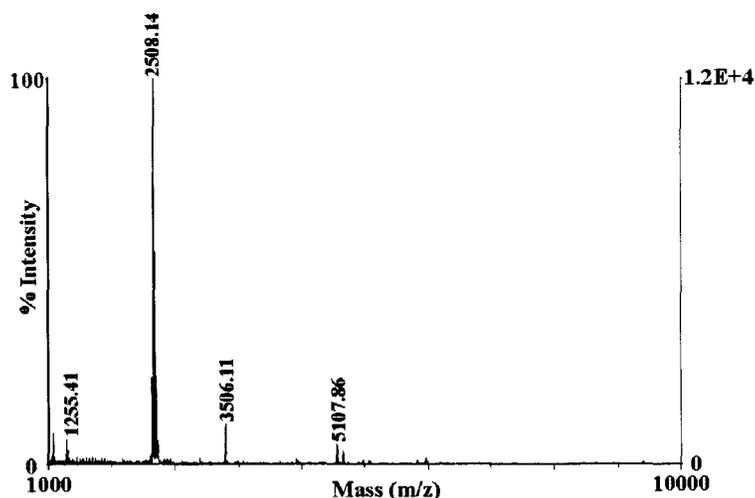


Figure 4.8 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'ACN 60% sur une coupe de ganglion de sangsue

Pour débiter les tests, l'acétonitrile (ACN) a été utilisé. L'ACN est connu pour être un solvant particulièrement efficace et couramment utilisé pour la séparation des peptides. La **Figure 4.8** représente un spectre obtenu par dépôt d'1µL d'une solution d'ACN 60% sur une coupe de ganglion de sangsue de 10µm d'épaisseur. Après 30s, le solvant est repris puis déposé sur une plaque et mélangé avec un microlitre de matrice. Un certain nombre de pics peuvent être détectés mais l'intensité du signal est assez faible.

Figure 4.9 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'ACN 60% avec 10% de TFA sur une coupe de ganglion de sangsue

Si la composition du solvant est modifiée en ajoutant 10% de TFA, le spectre présente des pics de plus forte intensité mais



avec une population de molécules détectées réduite (**Figure 4.9**). Le dépôt et la reprise d'une matrice MALDI comme solution solvant ont également été réalisés. En effet, lors de la réalisation d'études par spectrométrie de masse sur tissu, la matrice doit permettre une extraction verticale des molécules du tissu qui vont co-cristalliser avec elle en surface. Avec une solution d'HCCA, les spectres ont une gamme de masse plus étendue que précédemment avec des rapports m/z plus élevés (**Figure 4.10**). A partir de ces observations, des tests ont été réalisés avec d'autres matrices comme **DHB**, **SA** mais les spectres obtenus sont de mauvaises qualités (données non représentées).

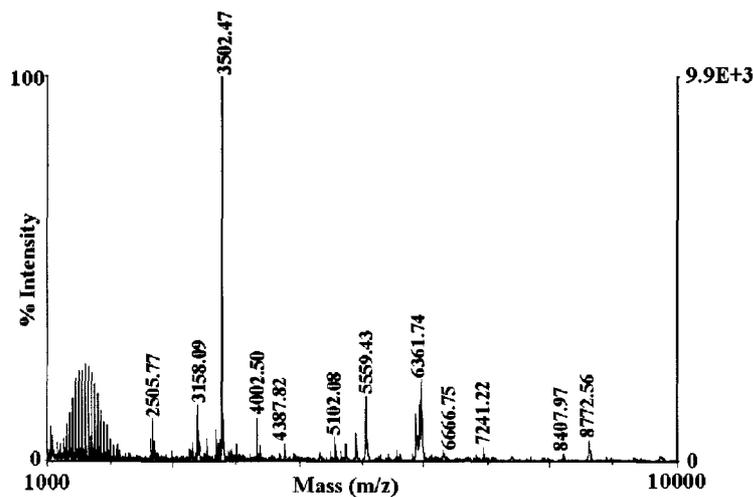


Figure 4.10 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l'HCCA sur une coupe de ganglion de sangsue

Lors d'études sur les chaînes nerveuses de sangsue, l'extraction par l'acide chlorhydrique (HCL) a été utilisée avec succès [128]. Une micro-extraction sur coupe avec un microlitre d'HCl 1N n'a pas donné de spectre interprétable directement en MALDI. Par contre l'analyse d'un pool de 10 μ l obtenu après 15 dépôts sur 15 coupes successives du même ganglion a été analysé en Q-Tof. Le spectre obtenu présente beaucoup de bruit de fond (**Figure 4.11**), mais certains pics ont pu être sélectionnés pour réaliser un séquençage par spectrométrie de masse tandem (MS/MS). Mais les séquences n'ont pas pu être résolues à cause de la faible intensité des pics obtenus et du manque de données disponibles en banques de données pour ce modèle.

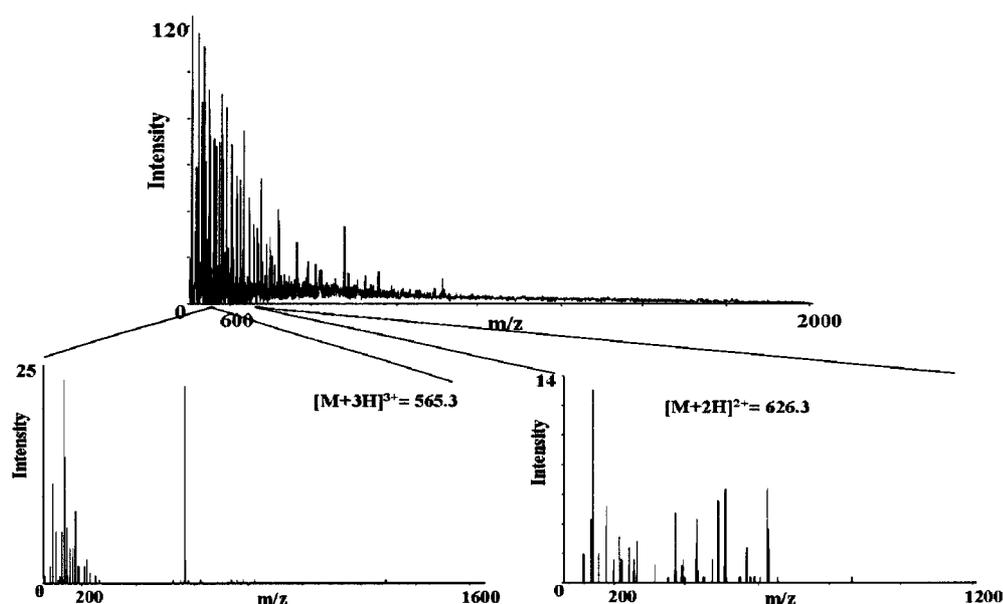


Figure 4.11 : Spectre de masse obtenu après une micro-extraction à l’HCl 1N sur une coupe de ganglion de sangsue

Enfin des travaux ont porté sur des coupes de cerveaux de rats pour étudier l’influence de l’épaisseur de la coupe sur la qualité de l’extraction. Les résultats obtenus avec une micro-extraction d’ACN 80% sur des coupes de 20µm ou 40µm (respectivement **Figure 4.12a** et **Figure 4.12b**) montrent qu’une épaisseur plus importante permet d’obtenir des spectres de meilleures qualités avec plus de signaux au dessus du rapport m/z 5000.

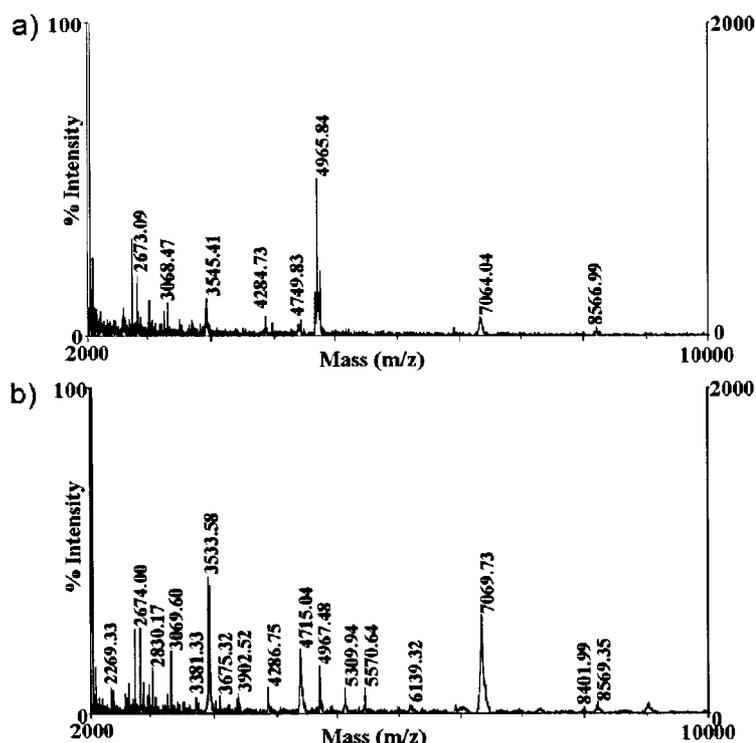


Figure 4.12 : Spectres de masse obtenu après une micro-extraction à l’ACN 80% sur une coupe de cerveau de rat de a) 20µm ou b) 40µm d’épaisseur

L'ensemble de ces résultats montre qu'il est possible de réaliser des micro-extractions localisées à partir de coupes congelées. Suivant les solvants utilisés, les molécules extraites vont varier, ce qui peut permettre d'orienter les études vers des classes de molécules d'intérêts en choisissant le solvant adapté. Cette technique doit être utilisée en complément de l'analyse directe de tissu. Le solvant sera alors déposé dans la zone d'intérêt sera soumis à des techniques séparatives puis d'analyse par spectrométrie de masse avec ou sans digestion préalable. Cette stratégie a d'ailleurs très récemment été utilisée par le groupe de A.Ducret [129] pour étudier les biomarqueurs de toxicité due à la prise de gentamicine. Enfin, la chaîne nerveuse de sangsue étant un organe particulièrement riche en lipides, et les lipides pouvant gêner à l'analyse des peptides/protéines à partir des tissus des rinçages des coupes par des solvants permettant l'extraction de cette classe de composés (e.g. chloroforme, acétone, toluène,...) sont également envisagés.

4.4 Etudes préliminaires des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue

Les travaux réalisés dans le contexte de la régénération du nerf sciatique chez le rat ou des études portant sur les anévrismes laissent envisager la présence de quelques classes de lipides dans les mécanismes de régénération (Davidson, 2006 #235). Dans ce contexte, nous nous sommes tournés sur cette thématique chez notre modèle doué de régénération.

Les lipides sont des molécules répartis en plusieurs classes biochimiques qui assurent de multiples fonctions biologiques. Il existe deux grandes catégories de lipides à l'origine de ces fonctions. D'une part, les lipides exprimés de manières constitutives dans les cellules et d'autre part, les lipides à expression induite.

Les lipides qui sont constamment exprimés dans les cellules sont les lipides membranaires, les lipides énergétiques ou encore, ceux qui participent aux mécanismes de reconnaissance intercellulaire. Les lipides à expression induite sont des molécules capables de diffuser et d'agir à distance de leur lieu de synthèse (cas des hormones dérivées du cholestérol, des vitamines A, K et E ainsi que des neuromédiateurs lipidiques).

Les neuromédiateurs lipidiques qui nous intéressent ici sont ceux dont la synthèse est provoquée par des stimuli (physique et/ou chimique) nocicepteurs voir neurotoxiques ; ces lipides vont ainsi lutter contre les mécanismes de destruction des cellules nerveuses. Parmi eux se distinguent chez les vertébrés, les acides gras des séries $\omega 3$, $\omega 6$, $\omega 9$ (et leurs dérivés), les phospholipides et les lipides portant des sucres (sulfatides et gangliosides).

Un acide gras incontournable de la série $\omega 9$ est l'acide docosahéxaénoïque (acide gras à 22 atomes de carbones et 6 doubles liaisons C22:6). Cet acide gras est la cible d'une lipoxygénase, une enzyme cérébrale et libère alors des lipides à effet neuroprotecteur anti-inflammatoire appelés neuroprotectines et resolvines [130, 131]. Dans la série $\omega 6$, l'acide arachidonique (C20:4) est produit par toutes les cellules sous l'action d'enzymes (lipases) [132]. Il est le précurseur de nombreux dérivés neuroprotecteurs tels que l'anandamide et le 2-arachydonoyl glycérol, synthétisés dans le cerveau et ayant des propriétés analgésiques et anti-inflammatoires [94]. Le lipide majeur de la série $\omega 9$ est l'acide oléique (C18 :1). Celui-ci protège également le système nerveux en limitant l'inflammation suite à sa stimulation excessive (exitotoxicité) [94]. Les sulfatides et les gangliosides constituent une autre classe de lipides préservant le système nerveux central. Des études ont démontrées qu'une diminution de leur taux cérébral est directement associée à l'apparition de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer [133].

Chez la sangsue, à l'heure actuelle, seuls les cannabinoïdes et leurs dérivés (anandamide, 2-arachidonoyl-glycerol, N-arachidonylphosphatidyl-ethanolamine, N-palmitoylethanolamine, N-linolenoylethanolamine) ainsi que l'enzyme de dégradation la Fatty Acid Hydrolase et les récepteurs (CB1 et CB2) ont été retrouvés au sein du système nerveux [121, 122, 134, 135, 136, 137]. Le rôle de ces molécules dans la régénération nerveuse est suspecté au regard des récents résultats obtenus chez l'homme [138]. Il est donc fort probable que notre modèle d'étude *Hirudo medicinalis* utilise ces dérivés lipidiques afin de régénérer sa chaîne nerveuse après lésion. En effet des études précédentes ont montré que l'injection de lipolysaccharides à des sangsues au niveau périphérique provoque la formation d'anandamide 24H à 48H après injection suggérant un rôle dans les mécanismes de modulation de la réponse inflammatoire chez ce modèle [139]. La sangsue semble donc un modèle d'étude approprié pour entreprendre la recherche de biomarqueurs lipidiques associés à la régénération nerveuse.

Grâce à différentes approches de spectrométrie de masse, nous avons cherché à détecter et caractériser les lipides dont l'expression varie au cours de la régénération nerveuse. Le but principal est de mettre en évidence des phénomènes d'« apparition » ou de « disparition » des lipides associés à un tel phénomène.

- L'imagerie par analyse directe en TOF-SIMS sur des chaînes nerveuses

Cette technique nous a permis d'avoir un aperçu global du contenu en lipides dans trois chaînes nerveuses en suivant une étude cinétique de la régénération (témoin au temps t0 et les temps t6H et t24H après lésions des chaînes).

- Etudes des lipides issus des chaînes nerveuses par ESI-Q-TOF/MSMS et MALDI-TOF/MS.

4.4.1 Analyse des chaînes en cours de régénération par imagerie par TOF-SIMS

L'imagerie TOF-SIMS a permis de détecter un grand nombre de lipides. Des comparaisons ont été réalisées sur des images de la répartition de lipides au sein du ganglion de la chaîne nerveuse, positionné avant la zone de lésion. Des images ont été obtenues pour ce ganglion après différents temps de régénération (t0, t6h, t24h) La **Figure 4.13** présente la répartition de certains lipides dont la localisation varie au cours de la régénération. Ces lipides sont l'acide oléique, l'acide stéarique et un triglycéride, autant d'acteurs moléculaires connus pour leurs effets neuro-protecteurs du système nerveux central des vertébrés [132].

A l'état basal, l'acide oléique et l'acide stéarique ne présentent pas la même localisation. Six heures après la lésion (t6h), ces acides gras sont faiblement détectés au sein des paquets cellulaires. Après 24H de régénération (t24h), l'acide stéarique est essentiellement présent dans les neurones et les connectifs inter-ganglionnaires, alors que l'acide oléique s'accumule dans les paquets cellulaires et peu dans les connectifs.

Le triglycéride est légèrement présent dans le ganglion témoin. Il apparaît après 6h de régénération au niveau de certaines cellules proches du connectif qui relie le ganglion au ganglion antérieur à la zone de coupure. Il se localise exclusivement dans les cellules du paquet après 24h de régénération.

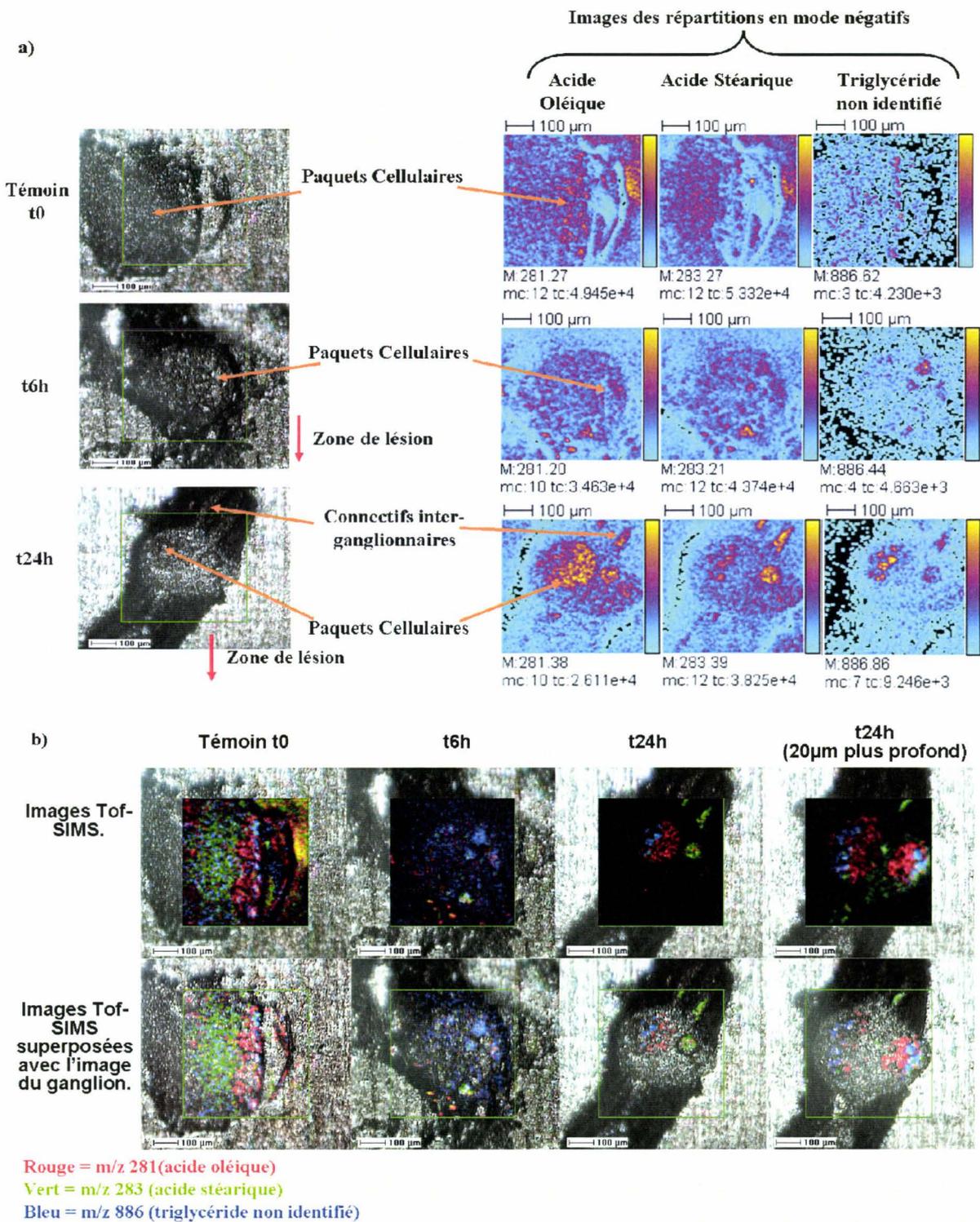


Figure 4.13 : a) images de la répartition de l'acide oléique, de l'acide stéarique et d'un triglycéride et b) images composites de la répartition des trois molécules au cours de la régénération.

Cette étude a permis de montrer la possibilité de détecter des lipides au sein des ganglions de sangsue mais aussi d'observer des variations dans la composition lipidique des cellules au cours des processus de régénération.

Des optimisations restent encore à accomplir. En effet il n'est pas possible de déterminer si les plans de coupes sont exactement les mêmes entre chaque ganglion. Pour éviter ce problème il est prévu d'effectuer des analyses TOF-SIMS de toutes les coupes issues de chaque ganglion. Cette méthode pourra également permettre de réaliser des reconstructions 3D de la répartition d'une molécule au sein du ganglion.

4.4.2 Caractérisation des lipides par spectrométrie de masse

Le TOF-SIMS, tel que, ne permet d'obtenir que des informations sur la masse moléculaire des composés analysés. Depuis peu une méthode « PSD-like » a été mise au point et donne la possibilité d'obtenir quelques informations structurales [140]. Cette technique reste pour l'heure difficile à mettre en place. Pour obtenir plus d'informations et identifier les lipides observés, il convient de revenir à des techniques d'analyses classiques de lipidomique.

Les premières expériences ont été réalisées sur des chaînes nerveuses entourées de leur sinus ventral. Le sinus ventral de la sangsue est un tissu parenchymateux susceptible de contenir des cellules et des molécules jouant un rôle dans les mécanismes de régénération. Après extraction suivant le protocole de Folch [141], le passage en ESI-Q-TOF/MSMS a permis d'obtenir des données structurales de certains lipides contenus dans les chaînes avec leur sinus. La répartition de ces lipides a également été réalisée par imagerie TOF-SIMS. La **Figure 4.14** illustre les résultats obtenus pour trois d'entre eux.

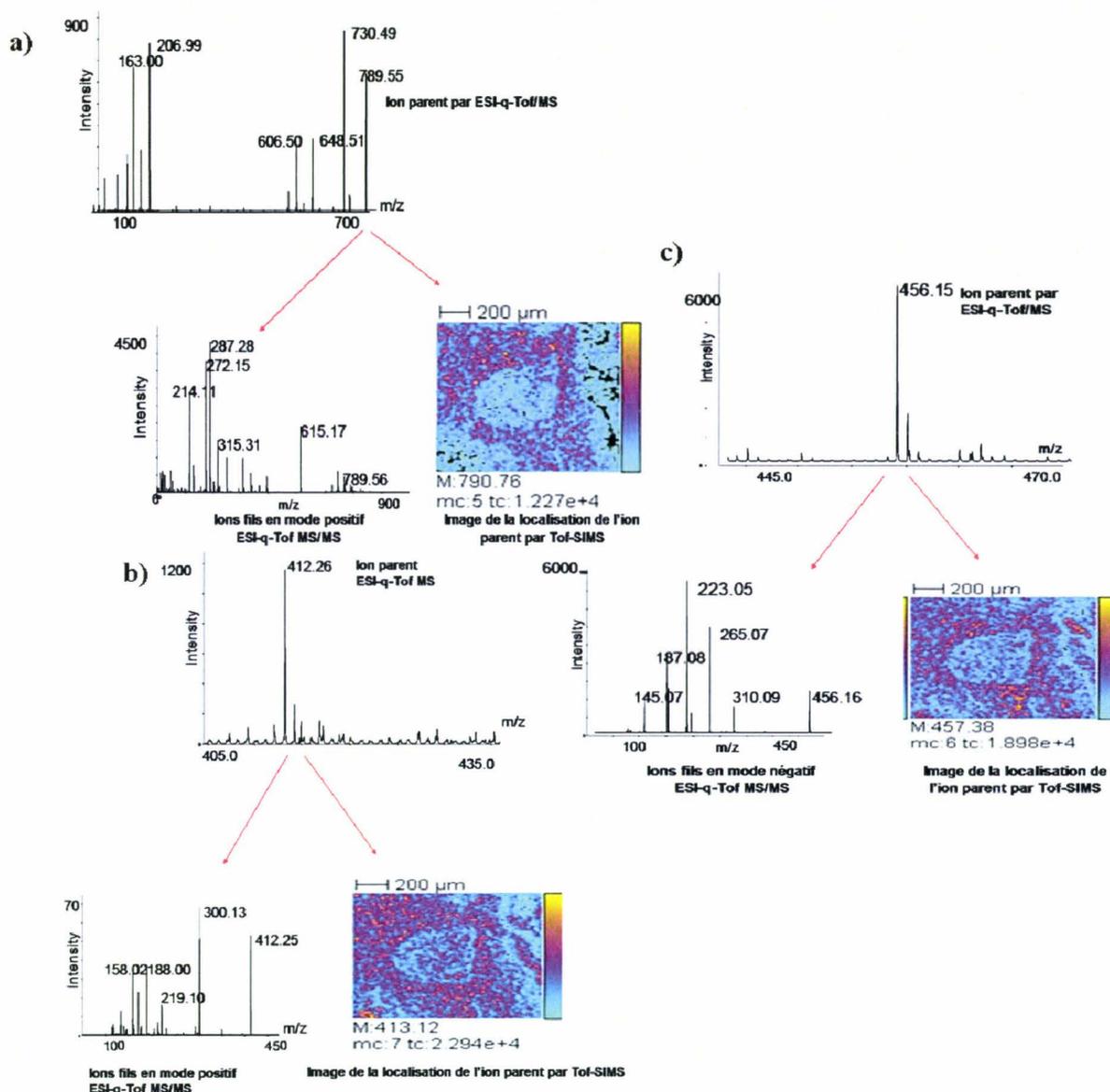


Figure 4.14 : Caractérisation et localisation de trois lipides par ESI-Q-TOF et TOF-SIMS, pour les ions à a) m/z 789, b) m/z 456 et c) m/z 412

Les lipides de rapport m/z 412.96, 456.15 et 789.56 illustrent quelques uns des lipides qui ont offert la meilleure sensibilité de détection après analyse par ESI-QTOF MS. Afin de les caractériser, nous les avons fragmentés. Les spectres obtenus par MS/MS pour chacun de ces lipides ont permis d'identifier les classes auxquelles ils appartiennent. A partir de ces données, leurs localisations par imagerie TOF-SIMS ont été reconstruites. Ces images ont montré qu'ils sont en grande majorité localisés dans le sinus ventral. La présence abondante de lipides dans le sinus nerveux pourrait entraîner une dilution du signal des lipides contenus dans les ganglions. Pour étudier les mécanismes de régénération nerveuse, les études suivantes seront réalisées sur des chaînes débarrassées de ce sinus.

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

Les lipides contenus dans la fraction méthanolique ont été analysés en MALDI-TOF/MS ainsi qu'en ESI-QTOF/MS (**tableau 4.1**). Les lipides dont la présence variait au cours du temps ont été répertoriés et présentés sous forme d'un tableau. La couleur bleue indique la présence des lipides tandis que la couleur rouge désigne leur absence.

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

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

- Une gamme de lipides présents en début de régénération nerveuse: il s'agit principalement des lipides de masse inférieure ou égale à 600 u disparaissant environ 1H30 à 3H après la lésion.
- Une gamme de lipides présents en phase tardive de régénération: il s'agit des lipides de très haute masse (>1000 u) et dont la présence débute 6H après la lésion.
- Une gamme qui présente une distribution éparpillée dans le temps et en masses (606, 725, 782, 958 u).
- Les lipides de masses 616 et 625 u ont été détectés uniquement aux temps 6H et 3H de régénération

4.4 Etudes préliminaires des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue

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

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

Tableau 4.1 : Comparaison en fonction du temps de régénération des ions présents (bleu) ou absents (rouge) des spectres de masse obtenus par a) MALDI-TOF et b) ESI-Q-TOF.

4.5 Conclusion

En théorie l'ISM MALDI est une technique simple et facilement transposable d'un organisme modèle à un autre. En pratique, il en va autrement. Les protocoles se doivent d'être adaptés à chaque tissu. Pour la sangsue la majeure partie du travail a consisté à adapter les protocoles existants à la taille du système nerveux (500 μm de diamètre pour un ganglion).

Plusieurs étapes sont nécessaires pour préparer ce type de tissu. Nous avons tout d'abord montré que l'analyse de chaînes nerveuses isolées est préférable à une analyse de coupe de sangsue entière. De nombreux composés ont également été testés pour se substituer à la solution de polymère classiquement utilisée pour réaliser des coupes congelées. Mais aucun de ces composés n'a permis d'obtenir des coupes de qualités suffisantes. C'est pourquoi, la suite des travaux a été de rechercher un protocole de rinçage permettant l'élimination des polymères de l'OCT sans perte d'informations. Un rinçage à l'éthanol des coupes après cryosection a permis d'obtenir des spectres ne présentant pas la distribution caractéristique d'un polyéthylenglycol (PEG) lié à la présence du polymère tout en offrant un grand nombre de signaux sur une gamme de masse étendue. Enfin une série d'expériences a montré la possibilité de réaliser des micro-extractions de peptides /protéines à partir de coupe de tissus. En parallèle de ces travaux, la réalisation des EST du système nerveux de la sangsue et leur annotation offre désormais la possibilité de caractériser ces peptides.

Enfin une étude a porté sur l'implication des lipides au cours de la régénération nerveuse chez *Hirudo medicinalis*. L'imagerie TOF-SIMS nous a permis dans un premier temps de voir que la présence du sinus ventral pouvait entraîner une perte d'information de part sa richesse en lipides. Ces lipides risquent de masquer ceux qui apparaissent au cours de la régénération dans les ganglions de la chaîne. Les images ont également permis d'observer une accumulation de trois lipides dans les ganglions et les connectifs au cours du temps. Ces lipides sont les deux acides gras (l'acide stéarique et l'acide oléique) ainsi qu'un triglycéride. Une accumulation de ces acides gras pourrait être associée à la régénération nerveuse. en accord avec les publications faisant état du rôle neuro-protecteur de l'acide oléique[142].

L'analyse des lipides après extraction, permet de mettre en évidence des variations au cours du temps de régénération. Certains lipides semblent disparaître et d'autres apparaîtraient. Ces résultats préliminaires sont particulièrement encourageants. Les lipides montrant une variation au cours du temps vont être caractérisés en réalisant des études en mode MS/MS et par la suite des images de la répartition de ces composés..

Ces résultats préliminaires montrent une complémentarité des différentes approches utilisées. Après caractérisation des différents lipides dans les études *in vivo*, ceux-ci pourront être isolés et utilisés dans le cadre d'études *in vitro* afin d'évaluer leur effet sur les processus de régénération de la chaîne nerveuse d'*Hirudo medicinalis*. L'activité de ces molécules pourra par la suite être testée sur des modèles cellulaires et animaux afin de déterminer le potentiel thérapeutique de ceux-ci dans le cadre des maladies neurodégénératives.

Apport de la métallisation pour l'ISM MALDI

5.1 Introduction

Les études de profilage tissulaire demande traditionnellement beaucoup de temps et de travail pour réussir à identifier les régions d'intérêts. De plus les observations histologiques après colorations en présence ou non de marqueurs, dépendent d'un outil faillible : l'œil humain. En plus des artefacts potentiellement créés par la manipulation et la préparation de l'échantillon, l'œil peut introduire d'autres biais comme la reconnaissance des couleurs ou la distinction entre deux teintes. L'ISM MALDI peut apporter une aide en ajoutant une dimension moléculaire à ces analyses se traduisant par une multitude d'images de la répartition de peptides et protéines par l'analyse d'une seule coupe sans utilisation de marqueurs. Mais une localisation précise des molécules ne peut se faire que grâce à une superposition avec une image optique de la coupe. Hors les supports couramment utilisés en ISM MALDI sont opaques et ne permettent pas l'utilisation de la microscopie optique pour obtenir des informations histologiques. L'observation histologique est réalisée sur une coupe adjacente à celle utilisée pour l'imagerie moléculaire [31, 143]. Mais entre deux coupes, les structures peuvent varier. La possibilité d'utiliser des supports transparents pour l'analyse MALDI a donc été expérimentée [144, 145]. L'utilisation de supports transparents, en plus de permettre l'analyse microscopique, peut servir à la sélection et l'étude par spectrométrie de masse de groupe de cellules, en utilisant la microdissection laser [146, 147]. Il faut également que l'ISM MALDI s'adapte aux outils utilisés dans les laboratoires de biologie et d'anatomie pathologique plus particulièrement. De plus l'utilisation de lame transparente peut permettre l'acquisition d'image optique de toutes les lames successives et la reconstruction en 3D du tissu étudié en incorporant les données moléculaire obtenus en ISM [148]. Les lames transparentes peuvent également servir lors d'utilisation de MALDI à géométrie en transmission [149] Les lames utilisées couramment en histologie ne sont pas, réellement appropriées pour l'analyse ISM MALDI. En effet, sauf pour quelques configurations, le support MALDI doit être conducteur pour pouvoir permettre la réalisation d'images moléculaires. Ce point est particulièrement important car l'utilisation de surfaces non conductrices ou isolantes peut amener des perturbations du champ électrique d'accélération entraînant des décalages des temps de vol mesurés pour tous les ions du spectre [144]. En effet le support doit permettre l'accélération des ions mais également la dissipation des

charges qui peuvent s'accumuler en surface de l'échantillon [150]. D'où l'utilité d'utiliser des lames transparentes et conductrices. Malgré tout, l'utilisation de ces supports ne va pas permettre de régler tous les problèmes liés à l'accumulation de charge lors d'analyse directe de tissus ou d'ISM. En effet en spectrométrie de masse ces problèmes sont limités aux sources d'ions utilisant un faisceau primaire (FAB, SIMS, PDMS, MALDI,...) mais restent minimales en conditions classiques d'analyse où les mélanges solution de matrice/solution d'échantillon forment un film poly-cristallin très fin et de faible surface déposé sur un support conducteur permettant la dissipation de ces charges. Mais l'accumulation de charges à la surface des échantillons est un problème souvent rencontré en microscopie électronique à balayage (MEB) lorsque l'échantillon d'intérêt est peu conducteur voire isolant. Cela se traduit par une distorsion des images obtenues. Ces effets sont d'autant plus marqués que la taille et l'épaisseur de l'échantillon sont importants et que la conductivité est faible. Des accumulations de charges peuvent être également observées dans des conditions particulières d'analyse comme l'analyse par MALDI de monocristaux de matrice dopés par des protéines [151, 152]

En analyse directe, la coupe, d'une surface de quelques cm², possède une épaisseur variant entre 15 et 20µm. Cette surface et cette épaisseur peuvent être trop importantes pour que les charges soit acheminées jusqu'au support et dissipées grâce au support conducteur sans négliger également les inhomogénéités de champ électriques qu'entraînera la présence de l'échantillon. L'ensemble matrice/coupe va alors former un système isolant. Ainsi lors d'analyse directe de tissus, le tir laser va conduire à une accumulation de charges à la surface du tissu qui ne peuvent s'évacuer entraînant une altération du rapport m/z observé dans l'analyseur. C'est pourquoi nous avons étudié dans une seconde partie, la possibilité de rendre conducteur les coupes en recouvrant leur surface d'un métal, ainsi que les effets de cette métallisation pour l'ISM MALDI.

5.2 Métallisation des supports

Dans le cadre d'une volonté de pouvoir se placer dans les mêmes conditions que les anatomo-pathologistes, il est nécessaire de pouvoir déposer les coupes réalisées sur un support transparent. La lame de verre semble le meilleur support néanmoins il est nécessaire de la recouvrir d'un matériau conducteur pour une utilisation en spectrométrie de masse. Des lames recouvertes d'un film d'oxyde d'indium-étain (ITO) sont à l'heure actuelle utilisée par

le groupe du Pr. R. Caprioli [144]. Cependant, la recherche de nouveaux métaux conducteurs améliorant la sensibilité ont été recherchés.

Notre choix s'est porté sur des lames recouvertes de couche de Nickel d'épaisseur 5nm, 10nm et 15nm (respectivement Lames Ni 5, Ni 10, Ni 15) étant donné que ce métal possède une bonne conductivité, une très bonne adhérence sur le verre et s'oxyde très lentement. Ces lames ont été comparées soit à des lames recouvertes d'un film d'oxyde d'indium-étain (ITO), soit à des films plastiques de 100 μ m d'épaisseur recouverts d'un film d'oxyde d'indium-étain (ITO), soit des lames recouvertes d'une couche de 2nm de titane suivit de 5nm d'or (Lames Ti/Au).

Comme nous l'avons vu précédemment le facteur important en MALDI est la conductivité. Le premier facteur testé a donc été la résistance de ces supports (**Tableau 5.1**).

Type du support	Résistance en ohm
Lame Ni 15	40
Lame Ti/Au	80
Lame Ni 10	100
Lame ITO	150
Plastique ITO	300
Lame Ni 5	400

Tableau 5.1 : Résistance des différents supports.



Figure 5.1 : Observation sous microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue sur un lame Ni 10 (x10)

Le plastique ITO et la lame Ni 5 qui a la plus petite épaisseur de nickel présentent tous les deux les résistances les plus élevées. Au niveau de la transparence des supports, les moins transparents sont les lames recouvertes de nickel tandis que les autres supports présentent des transparences équivalentes aux lames utilisées en histologie (**Figure 5.1**).

Pour évaluer l'efficacité de ces supports pour l'analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF, des dépôts de standards ont été préparés et déposés sur chaque support. Il est noté que lors de la réalisation des dépôts sur les lames Ni, la solution contenant les standards forme des spots de diamètres inférieurs et sèche plus rapidement que sur le support classique et les autres supports transparents. Cette propriété peut permettre, lors d'un dépôt de matrice

sur tissus par méthode classique (i.e. par micropipette) d'éviter l'étalement de la matrice en dehors du tissu.

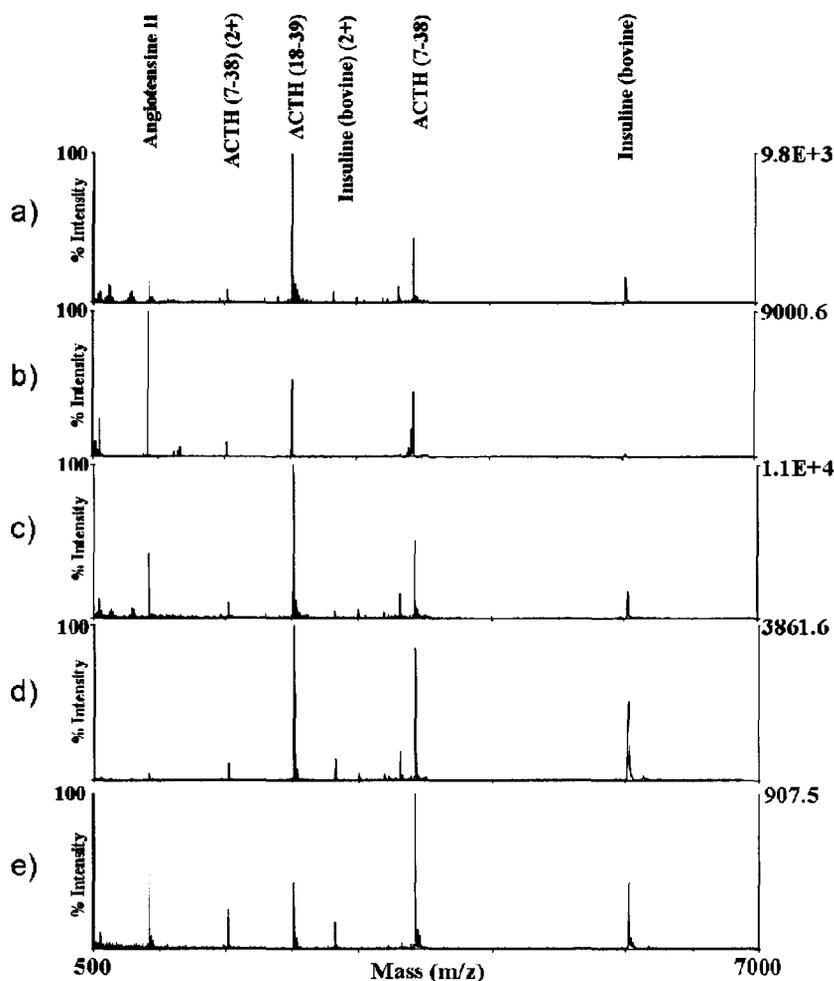


Figure 5.2 : Analyse d'un dépôt d'une solution de calibrant sur (a) un support classique, (b) une lame ITO, (c) une lame recouverte de 10nm de nickel, (d) un film plastique ITO et (e) une lame Ti/Au.

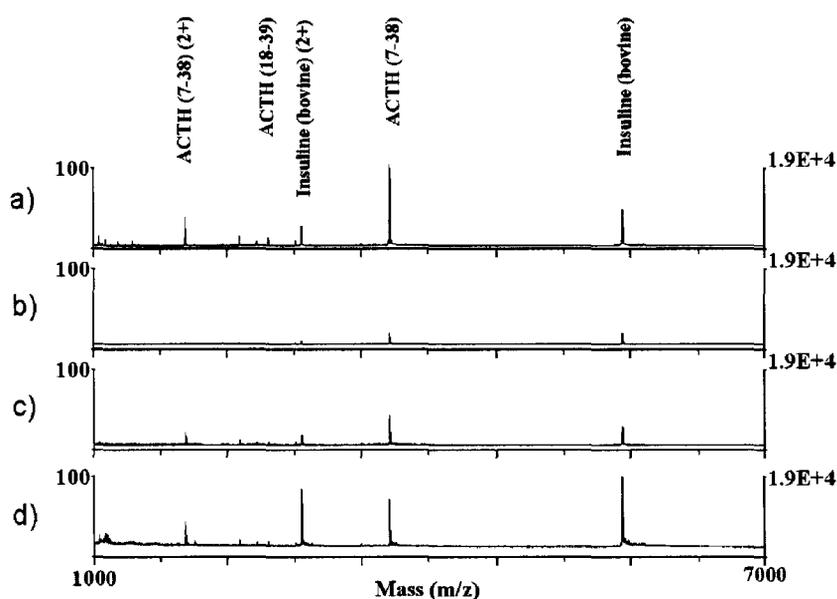


Figure 5.3 : Analyse d'un dépôt d'une solution de calibrant sur (a) support classique ou sur une lame recouverte de (b) 5 nm, (c) 10nm et (d) 15 nm de nickel

La qualité du signal MALDI-TOF obtenue en mode linéaire positif avec une énergie laser optimisée, a été comparée entre les différents supports. Les analyses réalisées sur différents standards sont regroupées dans la **Figure 5.2**. Au niveau de la résolution, les supports plastique ITO et lame Ti/Au donne des différences significatives par rapport aux autres supports avec des spectres moins résolus. Pour les lames Ni 10 et ITO, la résolution des pics obtenus est semblable à celle des signaux obtenus avec le support classique. Pour ces supports transparents, la résolution isotopique de l'angiotensine II est d'environ 3000. Pour les fragments d'ACTH et l'insuline bovine, une résolution aux alentours de 1000 est observable.

En ce qui concerne la qualité des spectres obtenus, le plastique ITO donne des signaux de faible intensité tout comme la lame Ti/Au qui présentait pourtant une des résistances électrique les plus faibles. La lame ITO semble fournir des signaux d'intensités plus importantes pour les basses masses. Enfin la lame Ni 10 fournit le spectre de meilleure qualité avec des intensités élevées pour l'ensemble des molécules présentes dans la solution. La lame Ni 10 fournit l'ensemble des qualités requises pour servir de support en ISM MALDI à savoir une transparence correcte, une résistance faible et une très bonne qualité de spectres. D'autres tests ont donc été menés sur ce support pour évaluer notamment l'influence de différentes épaisseurs de nickel et la réponse de ce support lors d'une analyse directe de tissu et d'ISM MALDI.

Les lames recouvertes de trois épaisseurs différentes de nickel ont également été testées avec la solution de standards utilisés lors des tests précédents (**Figure 5.3**). Aucuns pics d'adduits peptide/métal ou de cluster métallique ne sont observables. En ce qui concerne les spectres obtenus, la lame Ni 5, qui est la lame ayant la résistance la plus élevée, donne les résultats les moins bons (**Figure 5.3b**). La lame Ni 15 recouverte de la plus grande épaisseur de nickel (**Figure 5.3d**), fournit des signaux comparables voir supérieurs à ceux obtenus avec la lame Ni 10 ou le support MALDI classique (respectivement **Figure 5.3c** et **Figure 5.3a**). Ces analyses montrent qu'une épaisseur plus importante de métal sur la lame, permet d'obtenir les spectres de meilleures qualités.

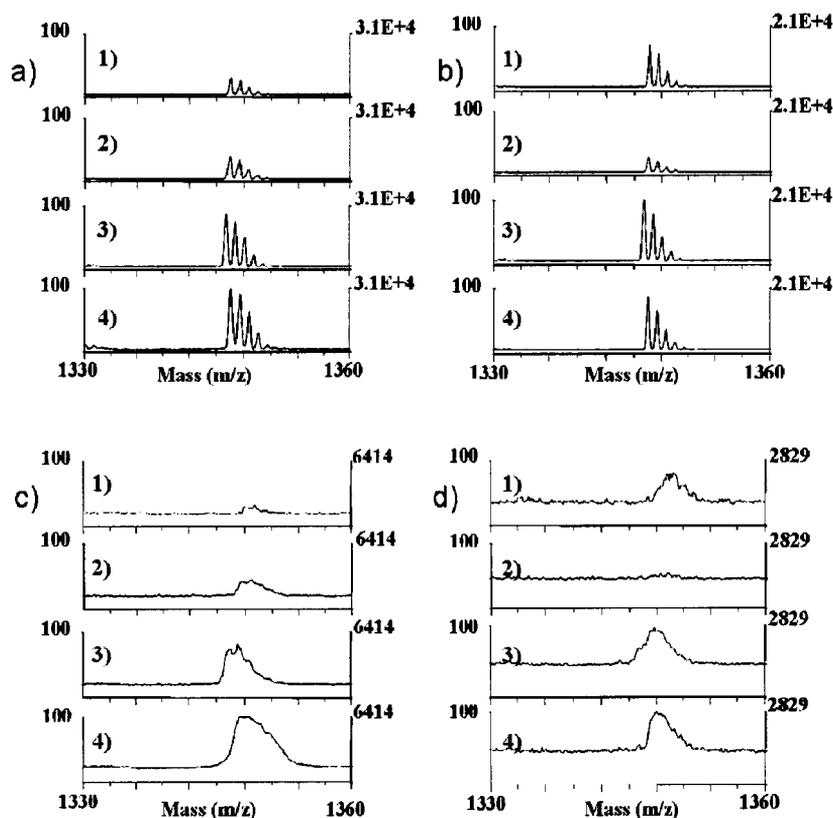


Figure 5.4 : Analyse d'un dépôt d'une solution de Substance P sur (1) plaque ou sur lame (2) Ni 5, (3) Ni 10 et (4) Ni 15 à des concentrations de (a) 10 μ M, (b) 1 μ M, (c) 0,1 μ M et (d) 10 nM.

Pour vérifier ces observations, un test de sensibilité a été réalisé grâce à des dépôts d'une solution de Substance P à différentes concentrations. Les résultats sont présentés sur la **Figure 5.4**. Pour les deux premières concentrations (**Figure 5.4a**

et Figure 5.4b) les spectres ont été acquis en mode réflecteur. Ils confirment que la résolution isotopique atteinte par la lame Ni 5 est inférieure à celle obtenue par les 3 autres (3000 contre 4200). Les deux dernières concentrations ont été analysées en mode linéaire. La lame Ni 5 ne permet pas d'atteindre de faibles concentrations ($< 0,1\mu$ M) tandis que les lames Ni 10 et Ni 15 offre une sensibilité équivalente à celle du support MALDI classique. Il est également à noter que la lame Ni 15 fournit le plus souvent des signaux plus intenses que le support classique.

Suite aux expériences réalisées sur les solutions de standards, la possibilité de réaliser des analyses directes sur coupes de tissu a été testée. La **Figure 5.5** rassemble les spectres issus d'une analyse directe d'une coupe de tissu déposée sur les différents supports. Les profils présentent une gamme de masse allant de 500 à 10 000 sur des coupes de cerveau de rat de 12 μ m. La matrice HCCA est déposée à des coordonnées similaires sur chaque coupe au niveau du *caudate putamen*. Aucune différence majeure n'est observée entre les spectres obtenus sur le support classique et ceux des lames Ni 10 et Ni 15. De plus un nombre plus important de signaux en haute masse sont obtenus sur le spectre de la coupe déposée sur la lame Ni 15. Seuls les spectres réalisés sur la lame Ni 5 présentent des signaux peu intenses.

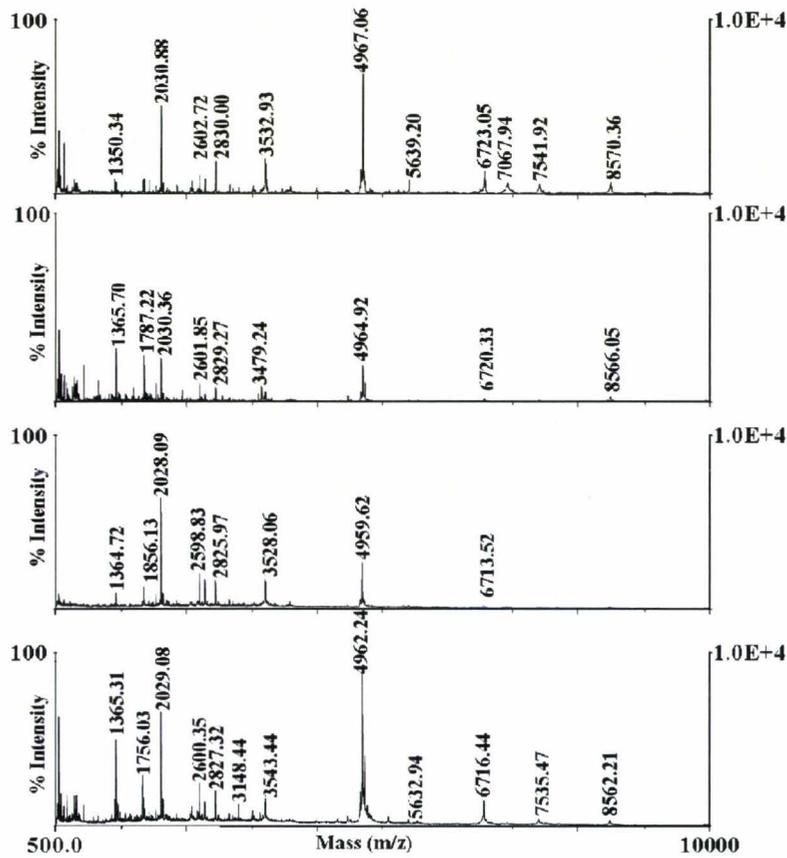


Figure 5.5 : Analyse directe d'une coupe de cerveau de rat déposé sur a) un support MALDI classique, b) une lame Ni 5, c) une lame Ni 10 et d) une lame Ni 15.

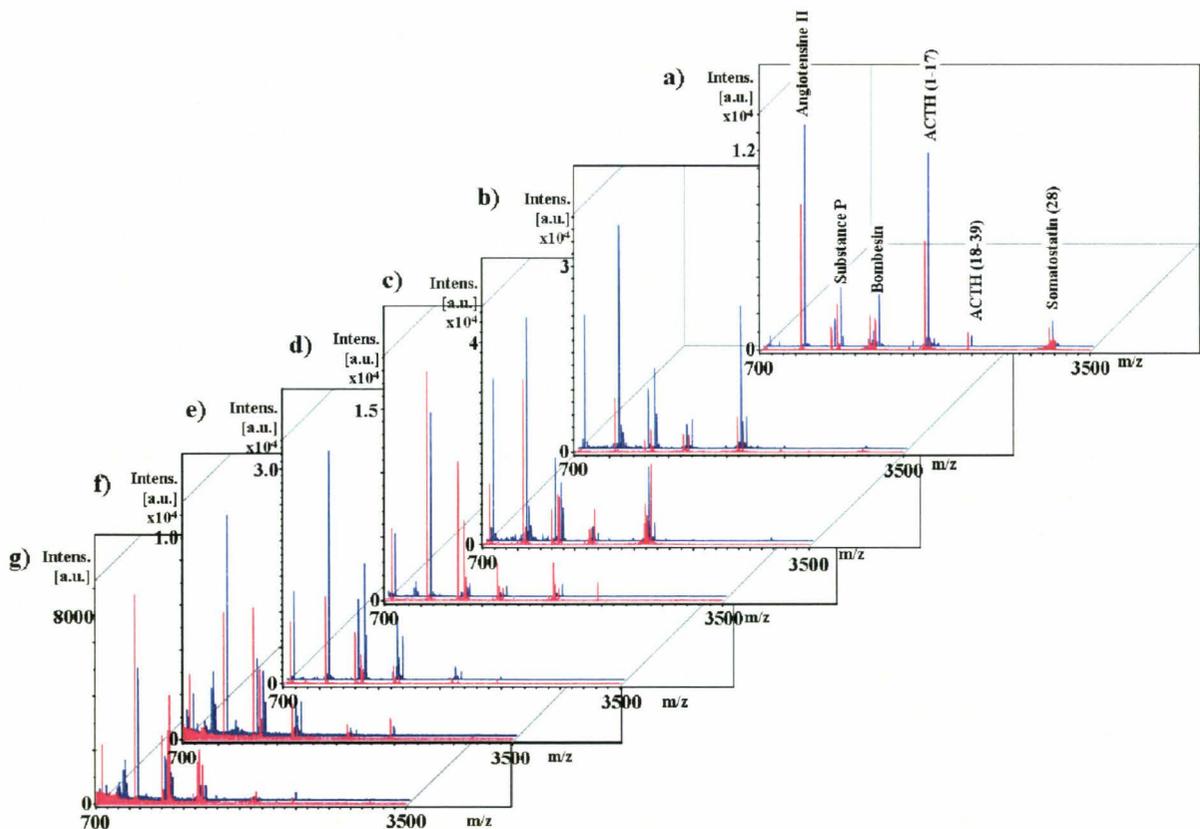
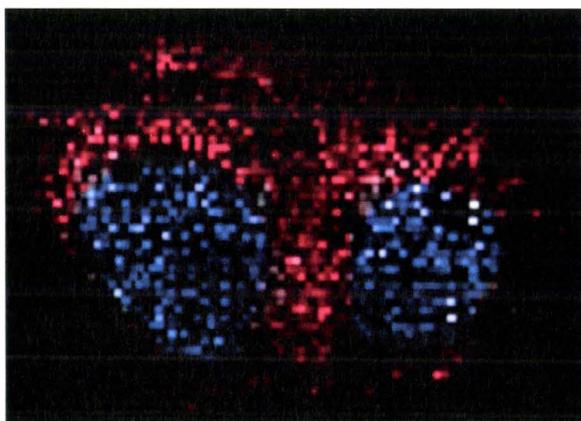


Figure 5.6 : Comparaison de la sensibilité entre lame Ni 10 (rouge) et lame ITO (bleu) pour des concentrations de 4 μM , 1 μM , 0,4 μM , 0,1 μM , 4 nM, 1 nM, 0,4 nM (respectivement a), b), c), d), e), f) et g))

Au niveau des observations histologiques, la lame Ni 5 a la plus grande transparence et logiquement la lame Ni 15 est la plus opaque et la plus réfléchissante. Cela peut produire certains artefacts lors de l'observation microscopique surtout pour de forts grossissements où la lumière transmise est faible. La lame Ni 10, présentant des caractéristiques équivalentes lors de l'analyse par spectrométrie de masse, tout en ayant une transparence n'affectant pas l'observation microscopique, a été retenue comme support pour la suite des expériences.

Les tests suivants ont porté sur la comparaison entre la sensibilité des lames ITO couramment utilisées en ISM MALDI [144] et les lames Ni 10 lors d'analyses sur des appareils de type LIFT-TOF. Les deux supports donnent des spectres de caractéristiques équivalentes (**Figure 5.6**) et ont permis d'analyser des solutions jusqu'à 4 fmol/ μ l sans atteindre la limite de détection. Au niveau de la résolution isotopique, elle est semblable entre les 2 supports pour des concentrations supérieures à 100 fmol/ μ l (environ 10 000) en dessous de cette concentration, les spectres obtenus sur la lame Ni 10 ont des résolutions isotopiques supérieures (environ 9000) à celles des spectres sur lame ITO (environ 7000).

Les acquisitions d'images peuvent prendre un temps variant de quelques heures à quelques jours pour les instruments dotés de laser à faible fréquence de répétition. Ces temps d'analyses longs peuvent perturber la stabilité électrique du support. Pour évaluer ce paramètre, une image d'une coupe de cerveau de rat de 12 μ m d'épaisseur recouverte d'HCCA a été réalisée sur une lame Ni 10. Les acquisitions ont été obtenues avec des fréquences de répétition laser de 50 Hz en mode linéaire réflecteur. L'image obtenue (**Figure 5.7**) est de



qualité comparable à celles réalisées sur des lames ITO. Aucune dégradation du signal n'est à signaler entre le début et la fin des acquisitions.

Figure 5.7: Image MALDI en mode linéaire réflecteur de la répartition des ions $m/z= 1756$ (bleu) et $m/z= 1860$ (rouge) dans une coupe de cerveau de rat déposée sur une lame Ni 10 (résolution 200 μ m)

Tous ces tests ont permis de montrer que les lames avec un revêtement de 10 nm d'épaisseur de nickel ont des qualités équivalentes au support MALDI classique. De plus leur transparence permet une analyse histologique en microscopie optique. Ces lames sont également comparables voire supérieures en certains points aux lames ITO et peuvent être de bonnes alternatives à ces lames lors d'expériences d'ISM MALDI.

5.3 Métallisation des échantillons

5.3.1 Introduction

Comme nous avons pu le voir, la conductivité du support est un point important pour réaliser des analyses de bonnes qualités. Mais, l'échantillon par lui-même peut également entraîner une perturbation des conditions analytiques [150]. Ceci est particulièrement important dans le cas d'un échantillon de grande dimension comme une coupe de tissu, d'épaisseur non négligeable et présentant une matrice complexe et isolante. Ainsi, comme il peut être observé expérimentalement lors de l'analyse directe de coupes de tissus en MALDI, les pics présentent des variations de m/z . Plus précisément, si un même point de la coupe de tissu est irradié par le laser, un décalage progressif des pics, avec le nombre de tirs, est observé vers les hauts rapports m/z . Dans l'ensemble, cet effet semble différer selon la matrice utilisée et s'accroît lorsque l'énergie laser ou la fréquence de répétition des tirs laser est augmentée [153]. Cet effet de déplacement des pics vers les grandes valeurs de m/z , lié à la nature de l'échantillon, pourrait provenir d'un problème d'accumulation de charges à la surface au cours de l'irradiation laser, accumulation induite par la non possibilité de dissipation des charges dans le matériau isolant. Ce phénomène dit « Effet de charge » va créer des variations dans le champ électrique dans la première région d'extraction et induire une augmentation du temps de vol progressivement avec la variation de potentiel. Ces « effets de charge » ont également été observés par d'autres auteurs dans différentes conditions d'analyses [154-157]. Ils sont malheureusement peu décrits et ne sont pas réellement explicités par des calculs. Bien que cette hypothèse soit séduisante, il est néanmoins possible de s'interroger sur la réelle possibilité d'accumuler suffisamment de charges à la surface du matériau compte tenu du nombre de charges mises en jeu dans le processus de désorption/ionisation. Ce phénomène pourrait peut être s'expliquer dans ce cas par des problèmes de capacité lié à la présence de l'échantillon non conducteur avec un effet de type condensateur. Dans tous les cas ces effets sont liés à la nature de l'échantillon et sont exclusivement observés sur des instruments MALDI-TOF de configuration axiale comme il a pu être constaté lors d'expériences réalisés sur un MALDI-oTOF où l'extraction est orthogonale et découplée de l'étape de séparation des ions.

5.3.2 Effets de l'accumulation de charges en surface d'une coupe de tissu

Comme nous venons de le voir, le phénomène d'effet de charge se traduit sur les spectres par un décalage progressif des pics vers les hauts rapports m/z au fur et à mesure de l'analyse. Ce phénomène conduit à un élargissement progressifs des pics lors de la moyenne

des spectres et donc à une perte de résolution mais peut aussi entraîner une perte de la précision des mesures, des chevauchements de pics pour des ions de m/z proches, ainsi que des difficultés éventuelles pour les études structurales pour la sélection de l'ion parent.

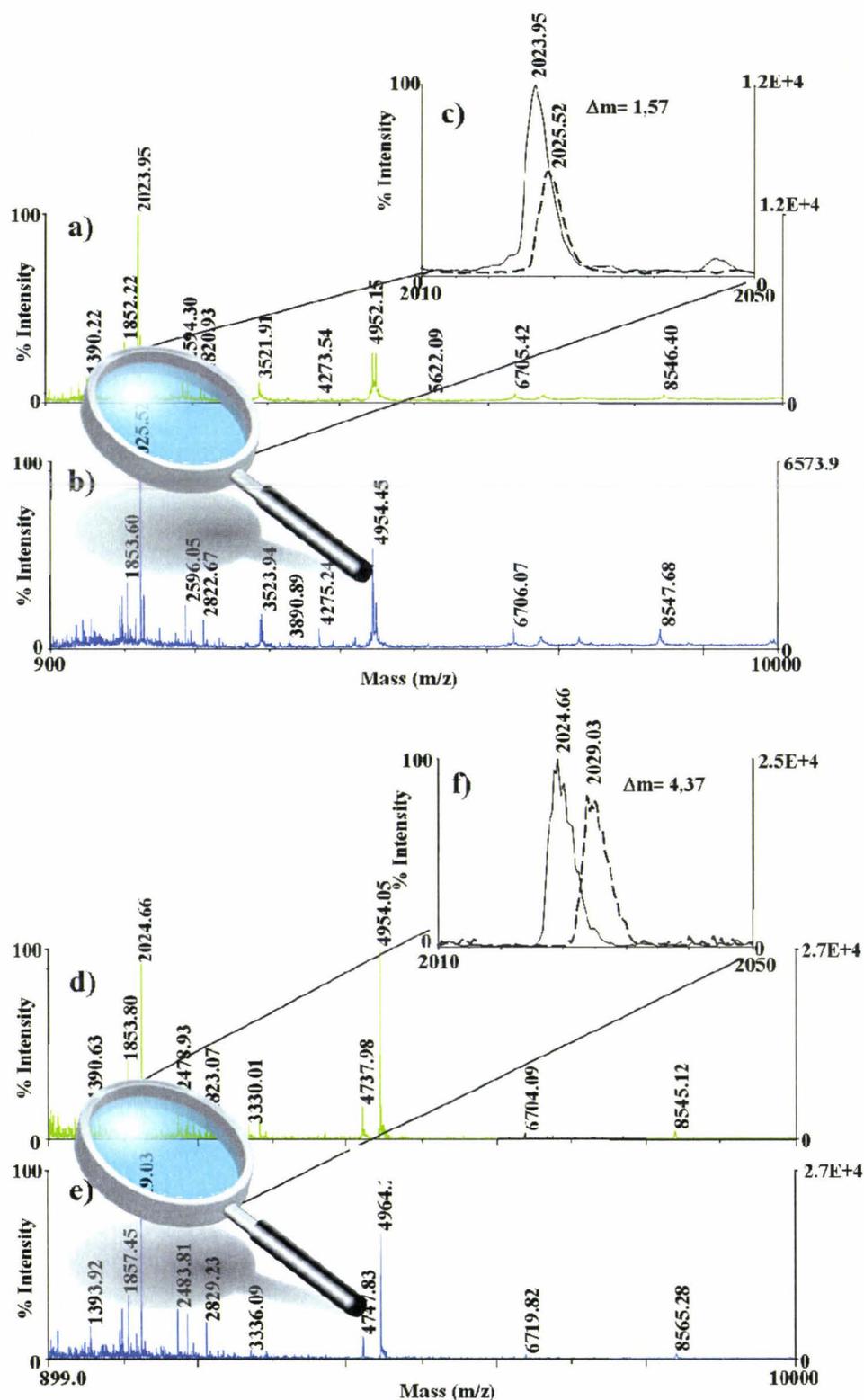


Figure 5.8 : Spectres de masse d'analyses directes de coupe de cerveau de rat avec HCCA (a et b) ou HCCA/ANI (d et e) avant (a et d) et après (b et e) une augmentation de 10% de l'énergie laser. (c et f) superposition et agrandissement de la gamme de masse comprise en 2010 et 2050.

Afin d'étudier ce phénomène plus en détail, nous l'avons amplifié en réalisant des tirs à plus forte énergie laser. Pour cela nous avons effectué, sur une coordonnée précise d'une coupe, 100 tirs avec une énergie laser proche du seuil de production des ions, dans le cas d'analyse sur tissus, avant d'enregistrer un spectre. Sur ce même point, 10-15 tirs avec une énergie laser plus importante sont alors réalisés avant de revenir à l'énergie seuil et d'enregistrer une nouvelle accumulation de 100 tirs. Cette expérience a été réalisée 5 fois sur différentes positions de la coupe. La **Figure 5.8** présente la comparaison entre les spectres obtenus avant et après l'augmentation d'énergie sur la même position de la coupe pour deux matrices différentes. Dans tous les cas, les spectres de masses enregistrés après l'augmentation de l'énergie (**Figure 5.8b et e**) se sont décalés vers des rapports m/z plus élevés comparés aux signaux obtenus en condition normale (**Figure 5.8a et d**). Par exemple pour l'ion m/z 2023 (**Figure 5.8c et f**) le décalage de masse (Δm) est $\Delta m=1,57$ avec l'HCCA comme matrice et de $\Delta m=4,37$ avec HCCA/ANI. Les deux spectres ont été enregistrés dans les mêmes conditions, la seule différence étant la légère augmentation de l'énergie avant l'acquisition du second spectre. Cette augmentation d'énergie serait à l'origine de l'accumulation de charges positives à la surface de l'échantillon. Le temps entre l'augmentation de la fluence laser et la seconde acquisition, n'est pas suffisant pour permettre à l'ensemble tissu/matrice d'évacuer ces charges. Cet effet paraît dépendant de la matrice utilisée et il semble que plus le rapport m/z est grand plus le décalage de masse est important.

5.3.3 Suppression de l'effet de charge grâce à un dépôt de métal.

En microscopie à balayage, les effets de charge peuvent être supprimés par un dépôt d'une fine couche de métal, le plus classiquement un film d'or, sur l'échantillon (de 1 à 10 nm) permettant une évacuation des charges du faisceau incident primaire sans modifier sa topologie. Dans le cas de l'analyse MALDI, le dépôt d'une couche métallique devrait permettre de réduire ces effets, si toute fois sa présence ne consititue pas une difficulté pour les phénomènes de désorption/ionisation.

Ainsi, nous avons choisi de déposer à la surface de nos échantillons après application de la solution de matrice, une couche d'or grâce à un dépôt par plasma (**Figure 5.9**). Les mêmes expériences que précédemment, en réalisant quelques tirs à haute énergie laser puis en enregistrant le spectre à énergie proche du seuil de production des ions en présence d'or. Les variations dans les rapports m/z ont été mesurées et comparées aux valeurs obtenues pour les échantillons non métallisés.

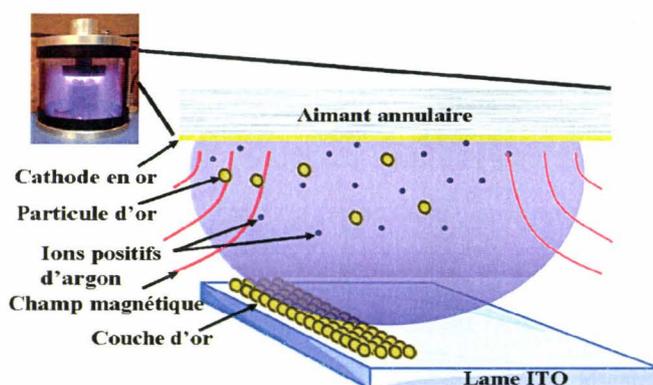


Figure 5.9 : Principe du dépôt d'or.

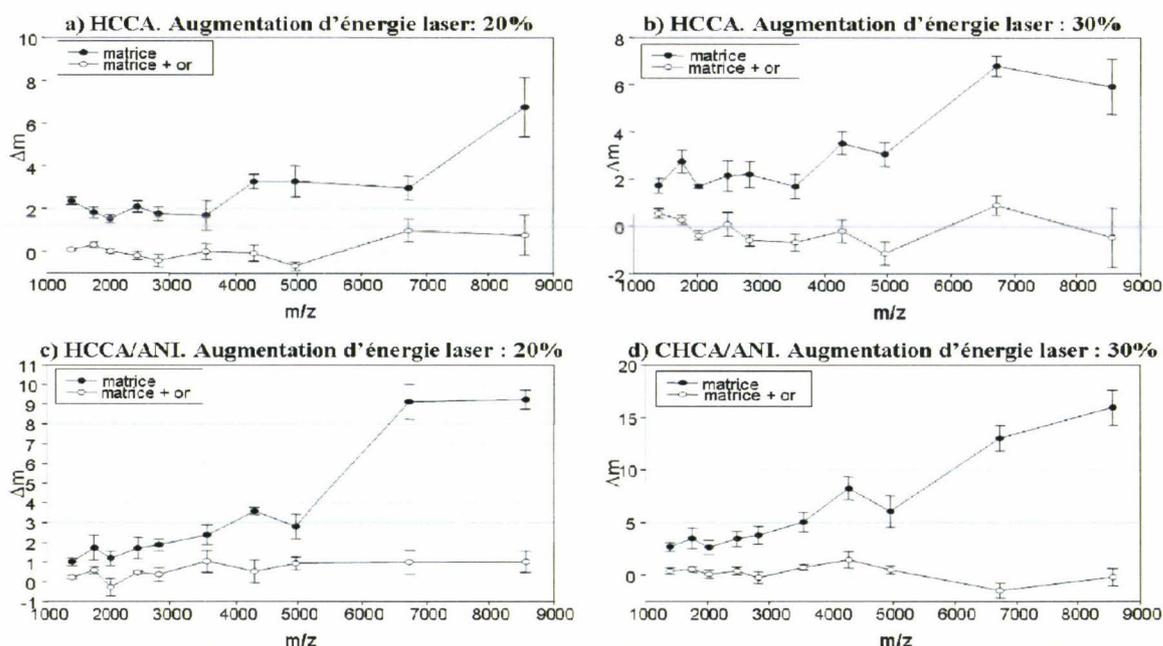


Figure 5.10 : Δm mesurés en fonction de différentes masses après une augmentation de 20% (a et c) ou 30% (b et d) en présence (ronds blancs) ou en absence (ronds noirs) d'or. La moyenne et la déviation standard de 5 expériences sont représentées.

Dans la **Figure 5.10**, les décalages Δm en m/z ont été calculés comme précédemment sur des tissus recouverts ou non de 7nm d'or, pour différentes matrices et après une augmentation de l'intensité laser de 20% ou 30%. N'ayant pas à notre disposition de « sputter coater » avec une microbalance dotée d'un cristal de quartz, l'épaisseur d'or est obtenue en modifiant le courant et le temps d'exposition suivant des abaques.

Les résultats pour la coupe sans métal montrent que lors d'une augmentation de l'énergie laser de 20% avant le début de l'acquisition, le décalage des signaux est d'environ 2,1 u. pour HCCA et 1,7 pour HCCA/ANI pour un rapport $m/z= 2483$. Pour $m/z= 4286$, le Δm approche 3,3 ou 3,6 respectivement pour HCCA et HCCA/ANI. Comme suspecté précédemment, ces résultats montrent que les décalages en masse sont plus importants pour

des rapports m/z élevés. Ils diffèrent faiblement suivant les matrices utilisées pour les rapports m/z inférieurs à 5000. Pour des gammes de masse supérieures, le Δm est plus importante pour la matrice HCCA/ANI que pour HCCA. Par exemple un décalage de 6,7 est observé pour l'ion à m/z 8572 avec HCCA alors qu'avec HCCA/ANI cet écart est de 9,23 pour ce même ion. Avec une élévation de 30% de l'énergie laser, les effets de l'accumulation de charge sont plus spectaculaires et la différence entre les matrices est plus marquée. En effet pour un signal à 2483, le Δm est de 2,14 pour HCCA et de 3,47 pour HCCA/ANI. Ce décalage est de 3,5 pour HCCA et de 8,25 pour HCCA/ANI pour un rapport m/z de 4686. Il devient même supérieur à 10 pour des rapports m/z plus élevés. Les décalages sont d'autant plus importants que le m/z est élevé, ce qui est logiquement attendu de part les équations du temps-de-vol, même en considérant un modèle très simplifié, si le potentiel de surface se modifie un tant soit peu au cours des expériences. Il serait intéressant de calculer plus précisément, les variations de potentiels pouvant induire se déplacement en utilisant une équation moins simplifiée et plus réaliste pour décrire l'extraction des ions dans le temps de vol.

Ces observations montrent que le décalage de masse en utilisant HCCA comme matrice est pratiquement identique que ce soit après une augmentation de 20% ou 30%. Pour la matrice ionique HCCA/ANI, il est plus important quand 10 tirs sont réalisés avant le début de l'acquisition avec une énergie laser supérieure de 30% à l'énergie seuil. Ces variations entre les matrices utilisées peuvent s'expliquer de par leurs propriétés physico-chimiques différentes et en particulier la résistivité ϵ du composé, donné qui n'est malheureusement pas disponible pour la matrice ionique. Sachant que la matrice ionique présente des cristaux de taille bien supérieure à ceux présentés par HCCA, ce paramètre contribue probablement en partie à expliquer les plus grands décalages observés

Les mêmes expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions sur des coupes de tissu recouvertes d'un fin film d'or. Dans ce cas, pour une augmentation de 20% ou 30% de l'intensité laser, le décalage des masses est inférieur à une unité. Pour m/z 4286, avec HCCA le Δm est de -0,1 après une augmentation de 20% et de -0,16 après 30%. De plus en utilisant HCCA/ANI comme matrice, le Δm est de 0,51 ou de 1,46 respectivement après une augmentation de 20% et 30%. Précédemment nous avons vu que le décalage était plus important pour les plus hauts rapports m/z . En présence d'or, il est pratiquement le même quelque soit la gamme de masse. Si l'on reprend l'exemple de l'ion à m/z 8572, le décalage est inférieur à 1 indépendamment de la matrice et de l'augmentation de l'énergie utilisée. Il est intéressant de noter que pour la matrice HCCA des décalages négatifs sont observés pour

les plus faibles rapports de m/z , laissant supposer qu'en sus des effets conducteurs l'or semble également influencer d'autres paramètres liés au processus de désorption/ionisation.

Ces résultats montrent clairement l'impact d'une variation du potentiel en surface de l'échantillon, et les effets dramatiques qui peuvent survenir lors de l'analyse directe d'échantillons biologiques et en particulier pour l'analyse des composés de plus haut m/z . Les décalages de masse sont plus prononcés lors d'un apport plus important d'énergie. Suivant la matrice utilisée, les variations de potentiel sont plus ou moins importantes. Ces expériences mettent en évidence que la métallisation de l'échantillon permet de supprimer efficacement ces effets en assurant une bonne conductivité. De plus, une faible variation entre deux spectres est observée.

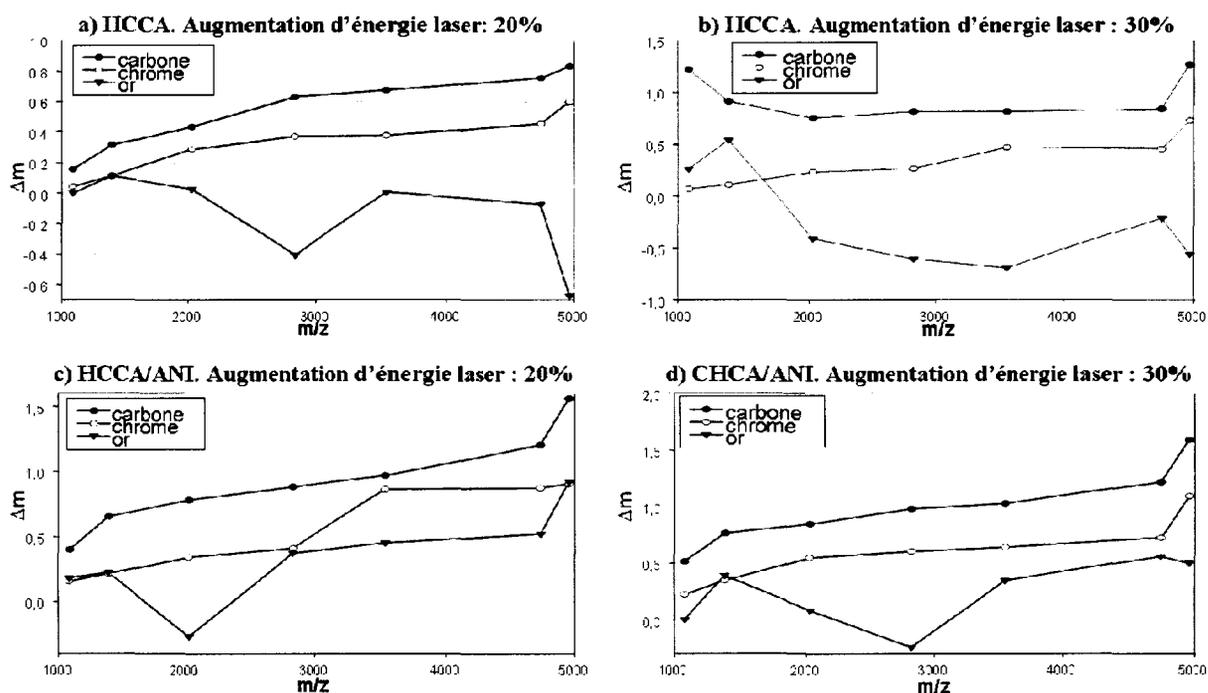


Figure 5.11 : Δm moyen mesuré en fonction de différentes masses après une augmentation de 20% (a et c) ou 30% (b et d) en présence de chrome (ronds blancs), de carbone (ronds noirs), ou d'or (triangles inversés noirs).

Afin de mieux comprendre les effets liés à la métallisation d'autres métaux ont été testés et notamment le chrome et le carbone. Les mêmes études ont donc été entreprises après métallisation avec ces composés de coupes et de préparations standards. La Figure 5.11 regroupe sous forme de graphe les décalages de masse, obtenus en présence d'autres métaux tels que le chrome ou le carbone et comparés à ceux mesurés après un dépôt d'or. Des résultats similaires à ceux précédemment exposés sont obtenus. Pour tous les métaux testés, la Δm est inférieure à 2 et ce quelque soit la gamme de masse, l'énergie laser ou la matrice

utilisée. Il faut également observer que le carbone donne des décalages de masse généralement plus importants que le chrome qui présente lui-même des augmentations de masse plus importantes que l'or. Ces résultats sont à mettre en corrélation avec une des propriétés de ces différents métaux. En effet le carbone possède une conductivité électrique de 61.10^3 S/m alors que celle du chrome est de $7,74.10^6$ S/m. Enfin l'or est le métal le plus conducteur testé avec $45.2.10^6$ S/m. Ainsi, logiquement, plus grande sera la conductivité et plus efficace sera la suppression des effets de décalage en m/z. Ces résultats suggèrent qu'il est possible d'utiliser d'autres métaux ayant une conductivité plus importante comme le cuivre ou l'argent qui possède la plus grande conductivité.

5.3.4 Effets du dépôt métallique sur la qualité spectrale.

Durant les analyses nous avons pu observer que la qualité des spectres est meilleure avec une matrice recouverte par un métal. Les spectres présentent une diminution de la ligne de base, une augmentation du rapport signal/bruit et de l'intensité du signal. La comparaison de cette intensité obtenue avec matrice seule et celle enregistrée avec une matrice recouverte d'or est montrée dans le **Tableau 5.2**. Les intensités des différents ions les plus abondants observés à partir de la coupe dont la matrice n'est pas recouverte de métal sont comparées à celles des mêmes signaux en présence d'or aux mêmes coordonnées sur la coupe sériée suivante. Cette expérience a été répétée 5 fois sur plusieurs coupes dans un souci de reproductibilité.

Une augmentation du signal est mesurée en présence d'or indépendamment de la matrice utilisée. Avec HCCA comme matrice, les intensités des signaux sont augmentées d'un facteur 2 environ. Par exemple pour la molécule à m/z 1781, celle-ci est de 1185 pour HCCA et 3920 pour HCCA recouvert d'or. Il a déjà été montré que l'utilisation de la matrice ionique HCCA/ANI contribuait à une augmentation du signal [35]. Cependant cette augmentation est supérieure dans le cas d'une analyse en présence d'or. Un accroissement d'en moyenne 1,25 est observé. Les mêmes résultats sont observables pour les tissus recouverts de carbone et de chrome (données non présentées). Enfin, en présence de ces métaux, les spectres présentent un nombre plus important de signaux (**Tableau 5.3**). Il est à noter que cette augmentation n'est pas due à la formation de clusters métal/métal ou peptide/métal, de tels signaux n'étant pas observés dans les spectres. De même aucun signal correspondant à des molécules dichargées n'est relevé.

m/z	HCCA intensity (a.u)	HCCA gold intensity (a.u)	<i>I(HCCA gold)/I(HCCA)</i>	ANI intenisty (a.u)	ANI gold intensity (a.u)	<i>I(ANI gold)/I(ANI)</i>
1390.3	2962	4281	<i>1,45</i>	7321	7683	<i>1,05</i>
1751.5	2789	5498	<i>1,97</i>	6079	7645	<i>1,26</i>
1781.2	1185	3940	<i>3,33</i>	12004	13446	<i>1,12</i>
1852.2	1579	4103	<i>2,60</i>	16207	17974	<i>1,11</i>
2023.9	5016	13222	<i>2,64</i>	22311	27102	<i>1,21</i>
2261.4	429	1427	<i>3,33</i>	6841	5632	<i>0,82</i>
2476.7	651	974	<i>1,50</i>	6762	10745	<i>1,59</i>
2594.1	1463	3552	<i>2,43</i>	8168	9737	<i>1,19</i>
2665.2	688	1661	<i>2,41</i>	3454	4086	<i>1,18</i>
2820.6	1297	3246	<i>2,50</i>	6185	7356	<i>1,19</i>
3014.1	285	676	<i>2,38</i>	1275	1463	<i>1,15</i>
3535.8	689	1803	<i>2,62</i>	2563	2584	<i>1,01</i>
3550.2	352	797	<i>2,27</i>	1148	1398	<i>1,22</i>
4272.4	677	786	<i>1,16</i>	1452	2378	<i>1,64</i>
4951.7	8632	7472	<i>0,87</i>	23983	30849	<i>1,29</i>
4972.5	1002	1572	<i>1,57</i>	3119	3688	<i>1,18</i>
4989.3	2820	2990	<i>1,06</i>	3586	4394	<i>1,23</i>
6702.7	678	1094	<i>1,61</i>	1513	3098	<i>2,05</i>
8545.7	745	833	<i>1,12</i>	2229	3275	<i>1,47</i>

Tableau 5.2 : Comparaison de l'intensité du signal obtenu entre matrice et matrice/or

	HCCA	HCCA/ANI
Or	18%	42%
Carbone	13%	25%
Chrome	22%	13%

Tableau 5.3 : Augmentation du nombre de composés détectés

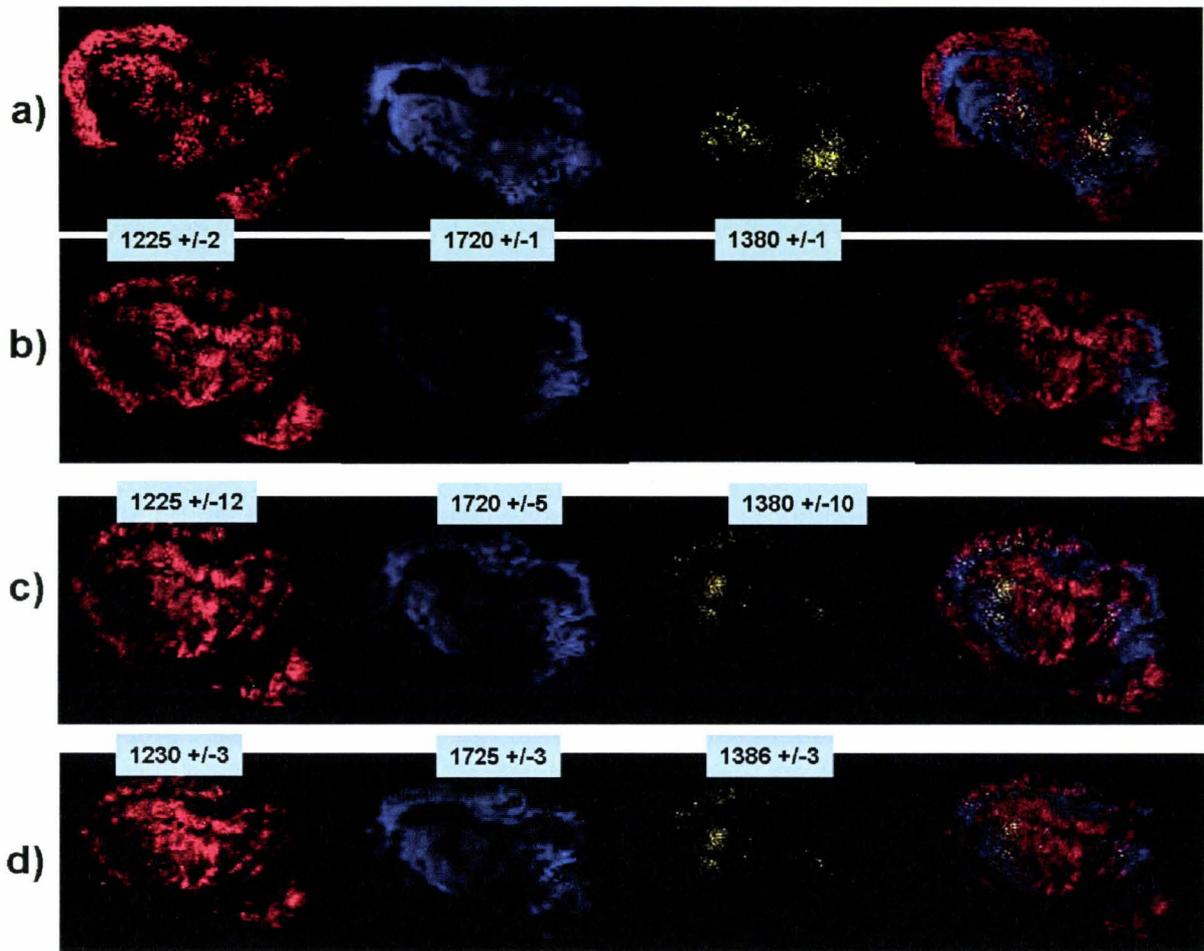


Figure 5.12 : Images MALDI de la répartition des ions m/z 1125 (rouge), 1720 (bleu) et 1380 (jaune) sur une coupe de cerveau de rat recouverte d'HCCA/ANI avec dépôt d'or. Images des mêmes ions sur la coupe sériée suivante sans dépôt d'or (b) et en modifiant les paramètres de reconstruction (c et d).

5.3.5 Métallisation et ISM MALDI

Les observations réalisées précédemment peuvent permettre d'obtenir des images de meilleure qualité grâce à une meilleure reproductibilité point par point, une plus grande intensité de signal ainsi qu'une suppression des décalages de pics. La **Figure 5.12** présente une comparaison entre une image de coupe de cerveau obtenue en présence de métal (**Figure 5.12a**) et des images de la coupe suivante sans dépôt métallique.

Ces images démontrent clairement qu'il existe un décalage des masses vers les rapports m/z plus élevé. En effet, une reconstruction réalisée avec un faible intervalle d'erreur donne des images différentes entre la coupe avec or et la coupe sans. Pour obtenir une image de qualité comparable en absence d'or, il faut augmenter la fenêtre d'erreur pour la masse sélectionnée (**Figure 5.12c**). L'augmentation de cette erreur est gênante car elle peut entraîner la prise en compte d'un autre signal que celui dont on veut reconstruire la répartition. La **Figure 5.12d** montre qu'il est possible d'obtenir une image similaire à celle obtenue en

présence du métal si on recentre la masse d'intérêt vers une valeur plus importante. Cette expérience démontre que l'effet de charge existe bien même lorsque l'énergie du laser n'est pas augmentée artificiellement. L'analyse durant plusieurs heures, les variations du potentiel en surface seront visibles, entraînant un décalage des masses. Il en résulte une précision moindre pour la reconstruction générant une disparition de signaux présents mais dont la masse est décalée.

5.3.6 L'apport de la métallisation dans les processus de désorption/ionisation

Nous avons montré que la procédure de métallisation, permet une suppression des décalages de masse mais génère également une augmentation de l'intensité du signal et du nombre de composés détectés, réduit la variation pour un même rapport m/z entre deux spectres et permet une sélection de haute précision pour reconstruire des images moléculaires. Ces expériences soulèvent différentes questions et en particulier au niveau des mécanismes fondamentaux de désorption/ionisation et le rôle des métaux dans ces processus afin d'expliquer l'augmentation d'intensité.

Il faut noter que la métallisation a déjà été utilisée dans d'autres techniques et notamment en SIMS, avec des résultats relativement similaires à ceux obtenus en MALDI en particulier du point de vue de l'augmentation de l'intensité du signal et du nombre de composés détectés. En effet, un traitement similaire par métallisation a été adopté en Metal-assisted SIMS (**MetA-SIMS**) avec des métallisations à l'argent [158, 159] ou à l'or [74, 75, 160, 161]. Dans ce cas le dépôt de métal réduit les charges en surfaces et augmente de façon significative la production d'ions secondaires. Dans notre cas, la couche d'or pourrait perturber l'absorption de l'énergie par la matrice et modifier les processus de désorption/ionisation sachant que, même pour les couches d'or déposées les plus minces, cette dernière représente plusieurs couches d'éléments. Cette hypothèse a été encouragée par de récents travaux [80, 81] décrivant la possibilité d'analyser des coupes sans matrice, juste en implantant des atomes d'or dans le tissu avec un canon SIMS. Les expériences montrent que l'implantation d'atomes Au dans les premières couches de l'échantillon permet d'obtenir des ions pour des peptides et protéines directement à partir des tissus sans ajout de matrice. De plus des expériences de désorption laser ont été réalisées en utilisant un fin film d'or [162] ou d'argent [163] pour étudier les biomolécules. Il faut d'ailleurs signaler que nous avons réalisés des expériences supplémentaires par curiosité. La première a consisté à recouvrir le tissu d'or sans ajouter de matrice. Dans le second cas, l'or a été déposé sur le tissu puis la matrice par-dessus. Pour les coupes avec dépôt d'or seul, aucun signal n'a pu être observé

pour les peptides/protéines. Ce qui démontre que l'or pour conduire à une désorption/ionisation efficace comme en MILDI doit être réellement implanté à l'intérieur du tissu. En revanche, lorsque l'or est déposé avant la matrice, des spectres peuvent être obtenus mais les signaux sont moins intenses et nombreux que dans le cas où l'or est déposé en dernier.

Les travaux d'Altelaar et col.[74] ont également montré, récemment, que des images de haute résolution de tissus biologiques pouvaient être obtenues en TOF-SIMS à partir d'une coupe recouverte d'or. Ils ont également montré la possibilité de réaliser des analyses de tissus avec un dépôt d'or ainsi que la réalisation d'images en MALDI "stigmatic imaging". Dans ce cas l'addition d'or permet la détection d'un ion correspondant à la vasopressine alors que cet ion n'était pas détecté sans métallisation. Enfin de récents travaux ont démontré que le dépôt d'or améliore de façon significative les analyses MALDI, aussi bien en ISM MALDI [164] qu'en analyse classique [165].

Bien que la métallisation ait déjà été utilisée, peu d'explications et de modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène, et ce en SIMS aussi bien qu'en MALDI. Cependant, les mécanismes de désorption et de production des ions sont encore mal connus et en particulier en MALDI avec de nombreux modèles proposés. Différentes hypothèses peuvent toutefois être avancées. Il est possible de se questionner quant au fait que l'augmentation de signal soit réellement liée à une augmentation dans le nombre d'ions formés et/ou moins d'ions reneutralisés. Ou encore de savoir s'il s'agit plutôt d'une meilleure collecte des ions formés au travers d'une éjection présentant une dispersion radiale plus faible. Pour essayer d'approcher un peu mieux ces mécanismes, des études préliminaires ont été entreprises pour estimer la vitesse initiale d'éjection des ions. L'estimation des vitesses est réalisée sur des dépôts standards dans les mêmes conditions, les uns étant recouverts d'or et les autres non. Les vitesses initiales sont obtenues suivant la méthode dite "d'extraction retardée" [166] en étudiant l'évolution du temps de vol en fonction du temps de retard à l'extraction. Comme précédemment publié, les évolutions du temps de vol en fonction du temps de retard sont linéaires et la pente de la droite permet de remonter à une estimation de la vitesse initiale. Sur cette base, les premiers résultats obtenus conduisent à obtenir une vitesse initiale en moyenne deux fois plus faible dans le cas des échantillons métallisés à l'or, et ce pour les différents peptides standards utilisés avec la matrice HCCA. La vitesse initiale étant calculée de 300 m/s pour le dépôt non recouvert d'or et de seulement environ 150 m/s pour le dépôt métallisé. Ces résultats sembleraient cohérents avec les valeurs de décalage en m/z négatifs observés pour les plus faibles masses avec HCCA dans le cas de l'or. En effet, si la vitesse initiale diminue

le temps de vol diminuera. Ainsi, si cet effet s'ajoute à l'effet lié à la conductivité de l'élément métallisant ceci pourrait expliquer les résultats observés. Néanmoins, des études plus systématiques de la mesure de la vitesse initiale devront être entreprises, pour la matrice ionique ainsi qu'avec les autres métaux utilisés. Il reste cependant difficile de conclure, tel quel, sur le rôle d'une plus faible vitesse initiale et dans quelle mesure elle pourrait affecter le nombre d'ions observés.

Il est également important de noter que la quantité limite d'énergie délivrée par laser pour obtenir des ions n'est pas la même pour les analyses avec matrice seule comparées à celles avec matrice recouverte de métal. Toutes les expériences ont été réalisées avec une énergie seuil de production des ions. Lors d'un dépôt d'or ou de chrome, cette énergie est légèrement supérieure à celle nécessaire sans métal. Nous avons observé qu'en présence de chrome, elle est de 5% inférieure à celle nécessaire en présence d'or. Pour le carbone elle est différente. La **Figure 5.13** montre les spectres enregistrés avec différentes fluences laser sur un dépôt de standards. Lorsque le spectre avec une couche de carbone est réalisé dans les mêmes conditions d'énergie laser qu'en présence d'or, aucun signal n'est détecté (**Figure 5.13b**). Des pics commencent à apparaître en augmentant l'énergie de 15% et un spectre de bonne qualité est obtenu avec 20% supplémentaire par rapport à l'énergie seuil en analyse classique (**Figure 5.13c**). Ces résultats sont indépendants de la matrice utilisée et ont été répétés plusieurs fois à différentes localisations et sur différentes coupes de tissu.

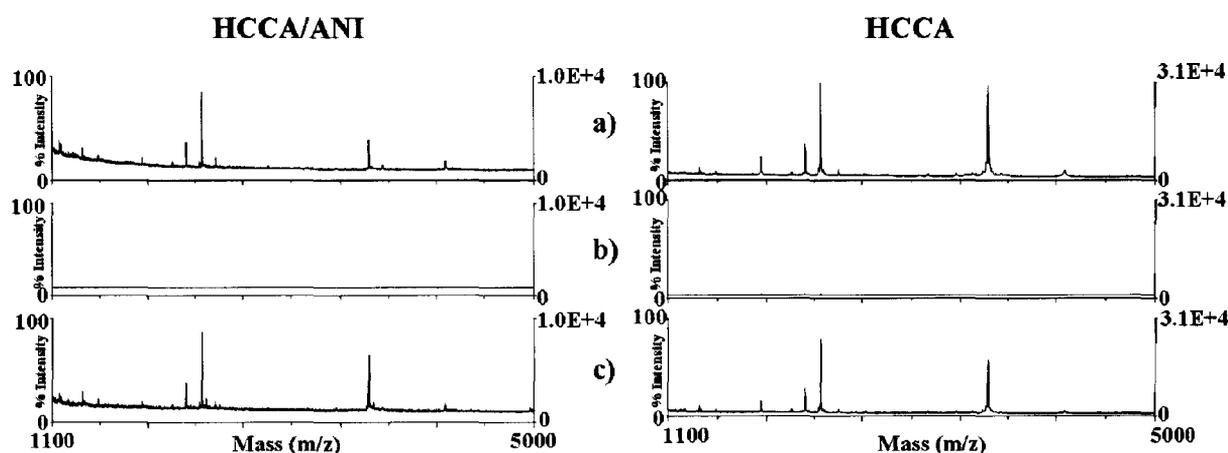


Figure 5.13 : Spectres de masses obtenus avec une énergie laser de 1600 sans (a) ou avec dépôt de carbone (b) et (c) avec une énergie laser de 2000 et un dépôt de carbone.

	Carbone	Or	Chrome
1 ^{er}	1086.5	890.1	652.9
2 ^{ème}	2352.6	1980	1590.6
3 ^{ème}	4620.5	/	2987

Tableau 5.4 : Potentiel d'ionisation des différents métaux.

Aux regards de ces observations, beaucoup de questions sont soulevées concernant les processus de désorption/ionisation. En effet, pour les mécanismes de production d'ion en phase gazeuse, beaucoup d'hypothèses sont basées sur l'absorption par les cristaux de matrices de photons émis par le faisceau laser [167-169]. Dans notre cas les cristaux de matrice sont recouvert d'une fine couche métallique et donc devraient avoir plus de mal à absorber directement l'énergie du laser. Cela laisserait supposer que le processus d'éjection est lié à une onde de choc ou que le métal absorbe l'énergie du faisceau laser et la restitue aux cristaux de matrice. Une chose, en faveur de ce dernier point sont les résultats précédents comparés au potentiel d'ionisation des différents métaux (**Tableau 5.4 : Potentiel d'ionisation des différents métaux.**) Les énergies laser seuils nécessaires à la production des ions sont en corrélation avec les potentiels d'ionisation. Le potentiel ou énergie d'ionisation d'une molécule est l'énergie nécessaire pour lui arracher un électron. Le chrome possède le potentiel le plus bas tandis que le carbone à celui qui demande le plus d'énergie or l'énergie seuil est la plus faible dans le cas du chrome et la plus élevée dans le cas du carbone. Il est possible d'ajouter à cela l'effet photoélectrique exposé par Einstein [170]. Dans les années 1830, Bequerel découvre que lorsqu'une lumière éclaire certains métaux des électrons sont éjectés de ce métal. Empruntant le concept théorique de « quanta » décrit par Plank, Einstein montre que cette propriété de l'effet photoélectrique est due aux composants de la lumière : les photons. C'est à partir de ce procédé que fonctionnent les cellules solaires modernes.

A l'heure actuelle aucune preuve ne confirme ou n'infirme telle ou telle hypothèse, les questions soulevées à propos des mécanismes de désorption/ionisation en présence de métal mis en jeu restent donc ouvertes.

Comme nous le voyons, beaucoup de questions restent donc ouvertes concernant les différentes observations issues de la présence d'un métal lors de l'analyse d'un tissu.

5.4 Conclusion

En conclusion, il est possible de rendre conducteur des lames transparentes couramment utilisées en histologie grâce à un revêtement métallique. Ces lames, en plus d'offrir la possibilité d'une observation en microscopie optique, permettent de réaliser des images de la répartition de molécules d'intérêts par ISM MALDI. De plus ces lames présentent une bonne sensibilité et une qualité spectrale légèrement améliorée par rapport aux lames ITO.

La réalisation d'un dépôt de métal après addition de matrice permet d'éviter les phénomènes de déplacement des pics vers les hauts rapports m/z au cours des tirs laser. De plus, les expériences montrent une nette augmentation de la qualité des spectres ce qui participe à l'obtention de meilleures images moléculaires. La métallisation de l'échantillon comme du support constitue donc un développement important pour l'imagerie MALDI. En revanche, l'explication de ces observations reste délicate. Différentes expériences restent encore à réaliser. Des études en mode négatif seraient également informatives. Il serait aussi intéressant de réaliser des études en PSD ou MS/MS pour déterminer si les ions formés à partir des dépôts métallisés sont plus stables ou moins stables que ceux obtenus dans les conditions classiques et ce afin de mieux appréhender les mécanismes impliqués.

Imagerie MALDI et résolution spatiale

6.1 Introduction

Le paramètre de première importance pour la qualité des images réside dans le nombre de points maximum qui sera réalisé sur l'échantillon. Le processus de désorption/ionisation étant promu en MALDI par l'irradiation de l'échantillon par le faisceau laser, l'analyse se trouve donc restreinte à la surface irradiée par le faisceau laser. Or, pour que les résultats soient significatifs, il faut que les surfaces analysées soient juxtaposées et ne se recouvrent pas. En conditions habituelles, le pas minimum entre deux points ne pourra être inférieur au diamètre d'intersection du faisceau laser avec la surface. Celui ci peut légèrement varier suivant l'angle d'incidence du faisceau. Ainsi, le paramètre affectant le plus la résolution des images est le diamètre du faisceau laser. Les lasers émettant dans l'UV et notamment les lasers N₂ émettant à 337nm commercialisés avec un système de focalisation classique possèdent généralement un diamètre entre 75x75µm² et 200x200µm² avec un profil en énergie relativement inhomogène. Dans ce contexte, la distance minimum entre deux points de l'image devra être aux meilleurs des cas de 75µm et la définition de l'image de 75µm. Sachant que le diamètre de petites cellules est d'environ 10µm, cette résolution correspond à l'irradiation de plusieurs cellules dans le tissu. Afin d'augmenter le nombre de points par image, plusieurs méthodes (**Tableau 6. 1**) ont été envisagées afin de diminuer l'aire balayée par le faisceau sur le tissu.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Références
Focalisation par fibre optique	Focalisation précise avec profil énergétique de type « Flap-top »	Demande d'intervenir sur le trajet optique à l'intérieur de l'appareil	[171]
Focalisation par le principe du télescope galiléen	Focalisation précise	Difficile de mettre en place le banc optique.	[171]
Utilisation d'un obturateur	Bonne focalisation	Limite de focalisation à une cinquantaine de micron	[32]
Micro-dépôt de matrice par électrospray	Possibilité d'avoir des dépôts d'une centaine de micron	Réglage de l'électrospray difficile.	[34]
Micro dépôt de matrice par éjection acoustique	Possibilité d'avoir des dépôts de quelques centaines de microns	Demande d'investir dans un automate de dépôt par éjection acoustique	[39]
Superposition avec ablation complète de la matrice	Pas de modification matérielle.	Augmente le temps d'analyse. Demande de modifier le logiciel de reconstruction d'image	[172]

Tableau 6. 1 : Méthodes de diminution de la zone analysée par du faisceau laser

Les méthodes les plus classiques consistent à refocaliser au maximum le faisceau laser lui-même. Ceci peut-être réalisé soit par utilisation de lentilles optiques adaptées sur le principe du télescope galiléen (**Figure 6.1a**) [171], soit par utilisation de fibres optiques (**Figure 6.1b**) [171, 173]. Dans les deux cas, il est possible de focaliser le faisceau laser jusqu'à un diamètre d'environ 10 μm , les fibres optiques permettant en outre d'obtenir un profil d'énergie plat ("flat top").

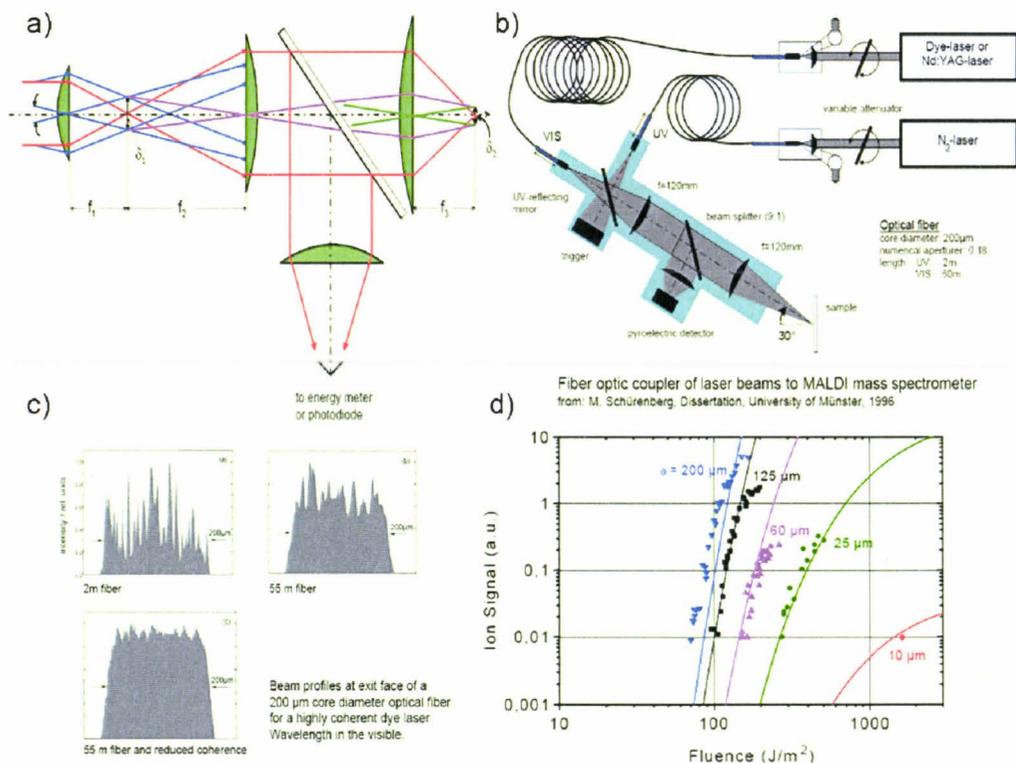


Figure 6.1 : Focalisation du faisceau laser par (a) le principe du télescope Galiléen ou (b) par fibre optique. c) Profil énergétique obtenue par couplage avec fibre optique. d) Signaux observés en fonction du diamètre du faisceau laser d'après [171].

Au niveau des modifications instrumentales permettant de réduire la distance entre 2 point, il faut également citer de nouveau le SMALDI [40] et le Stigmatic MALDI [41] déjà exposé dans la partie 2.2.3. Dans le premier cas, la résolution spatiale est de l'ordre ou inférieure au micron tandis que le second permet d'obtenir des résolutions de quelques microns, la limite dans ce cas étant la distance entre les micro-canaux du photomultiplicateur servant à la détection.

Il est également possible d'ajouter un diaphragme sur le trajet du faisceau laser [32], mais si ce système est le plus simple à mettre en place, il conduit à une perte d'énergie délivrée par le laser non négligeable et nécessite le remplacement du laser N_2 par un laser de puissance supérieure de type laser phase solide.

De nouveaux lasers font également leur apparition, dotés d'un système de focalisation réglable automatique. C'est le cas du laser solide à diode de Bruker Daltonics équipant les instruments de la série flex. Ce laser peut atteindre une focalisation d'une dizaine de micromètre environ.

Alternativement, une autre méthode développée pour diminuer le diamètre de la zone analysée consiste à réaliser des dépôts de matrice d'un diamètre défini avec un pas reproductible. Ainsi, même si le faisceau laser irradie une aire relativement importante, seule la zone où la matrice a été déposée conduira à l'obtention d'ions en phase gazeuse [34, 39]. Cette méthode donne actuellement de bons résultats mais reste limitée soit par la précision des automates de micro-fluidiques, soit par le volume de solution déposé qui ne permet pas à l'heure actuelle d'obtenir des dépôts inférieurs à 100 μm de diamètre. De plus, le dépôt par automate est très long (quelques heures pour une coupe de cerveau de rat entière). Le problème soulevé par l'utilisation de cette technique réside dans les processus fondamentaux de désorption/ionisation conduisant à l'obtention des ions. Ainsi, si l'éjection de matière est promue par l'onde de choc du faisceau incident et non seulement par les propriétés d'absorption des molécules de matrice, alors la matière éjectée proviendra en réalité de l'intégralité de la zone irradiée par le faisceau laser et non seulement de la zone recouverte de matrice comme attendu. Dans ce cas, la validité de la méthode reste encore à démontrer.

Dernièrement le groupe de J. Sweedler a proposé une technique permettant, à partir d'un laser commerciale d'un diamètre irrégulier de fournir une image d'une résolution de 25 μm [172]. Elle est basée sur la superposition partielle des points avec une ablation totale de la matrice en chaque point. Cette méthode a l'avantage d'être applicable quelque soit le diamètre du faisceau laser, mais demande une modification logiciel et demande un temps d'acquisition plus important, augmentant d'autant plus le risque d'effets de charge (voir partie 5.3).

Comme nous l'avons vue, la focalisation du faisceau laser, hormis sa difficulté de mise en œuvre et d'implantation sur un spectromètre de masse commercial, semble atteindre sa limite aux alentours d'un diamètre d'environ 25-30 μm . En effet, des travaux fondamentaux [173] en MALDI ont permis de démontrer une très forte diminution de la quantité d'ions produits en phase gazeuse en dessous d'un certain diamètre du faisceau laser. Passé cette valeur, le faisceau peut être encore diminué mais le nombre d'ions détectés diminue drastiquement (**Figure 6.1d**).

6.2 Présentation des systèmes de masques

Face à ces difficultés, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode alternative pour diminuer les dimensions de l'aire analysée. Nous nous proposons d'utiliser un système ne nécessitant pas de modification instrumentale majeure et pouvant être adapté à l'ensemble des spectromètres MALDI commerciaux développés. Ce système repose sur l'utilisation de caches (ou "masques") présentant des ouvertures espacées régulièrement et de dimension bien définie (**Figure 6.2a**). Le masque peut être, dans un premier temps, appliqué directement en contact avec la coupe de tissu de manière à éviter au maximum la perte des ions formés (**Figure 6.2b**). L'épaisseur du cache sera réduite au minimum, avec comme limite la fragilité du matériau le constituant. Il convient que celui-ci soit opaque ou tout au moins qu'il ne laisse pas passer les radiations UV. Ainsi, lorsque le laser vient irradier dans la zone présentant une ouverture, seule la partie évidée sera touchée réduisant l'aire irradiée sur le tissu à la dimension de l'ouverture (**Figure 6.3**). En théorie, ceci devrait éviter la diminution de la quantité d'ions produits puisque le profil en énergie du faisceau laser n'a pas été modifié.

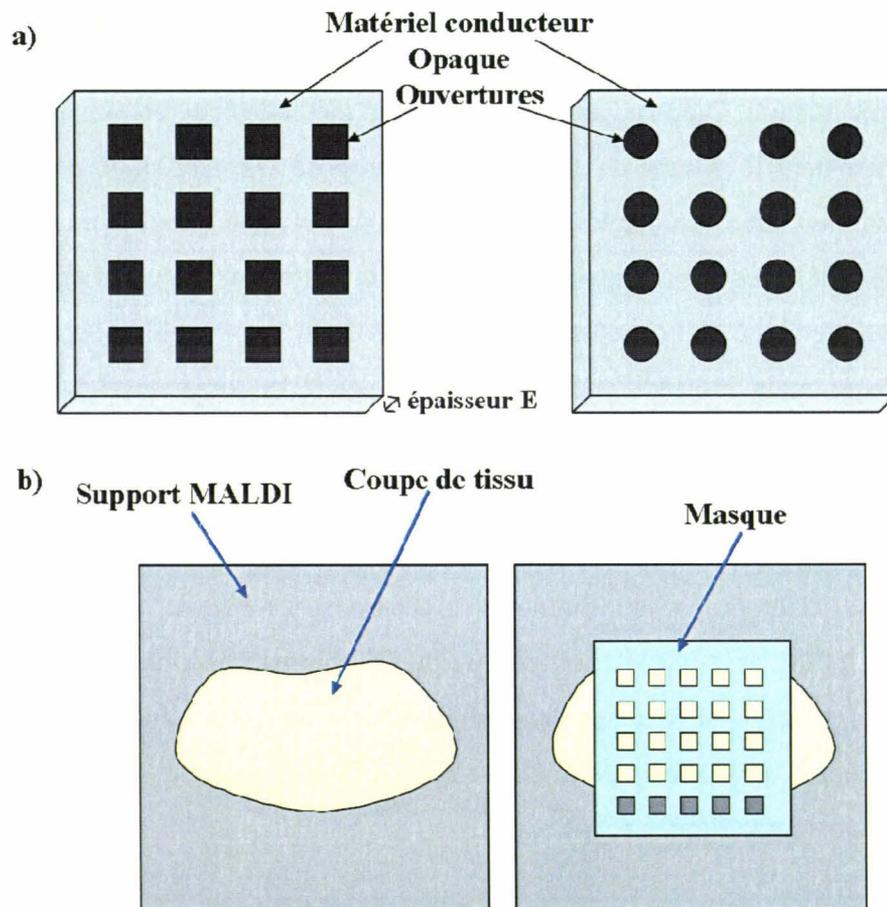


Figure 6.2 : Principe des masques (a) et application sur une coupe du tissu (b)

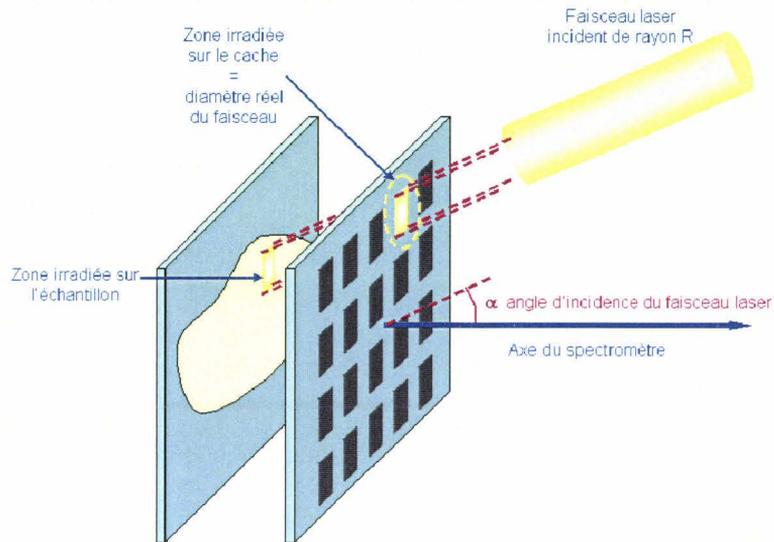


Figure 6.3 : Principe d'irradiation à travers le masque.

La fabrication de ces masques nécessite l'utilisation de techniques d'électroniques et de microfluidiques, ils ont donc été réalisés en collaboration avec le groupe du Pr. J.C. Camart (collaboration avec V. Thomy) de l'Institut d'Electronique et de Microélectronique et de Nanotechnologie de Lille (IEMN). Les supports utilisés dans cette étude sont des "wafers" de silicium, matériau répondant aux critères de sélection et dont les procédés d'usinage sont bien maîtrisés même s'ils présentent une certaine fragilité.

6.3 Les masques à ouvertures droites.

6.3.1 Analyses de dépôts de standards à travers des masques

Les masques ont tout d'abord été testés sur un mélange de peptides. Des caches de $65\mu\text{m}$ d'épaisseur avec des ouvertures de $500\mu\text{m}$ et $240\mu\text{m}$ ainsi que des caches de $100\mu\text{m}$ d'épaisseur avec des ouvertures de $100\mu\text{m}$ (Figure 6.4a) ou $50\mu\text{m}$ (Figure 6.4b) ont été utilisés.

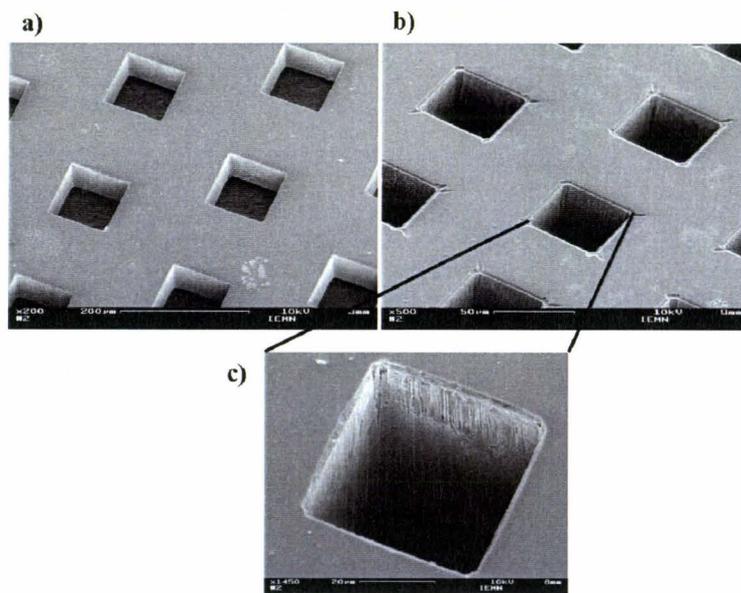


Figure 6.4 : Observation en microscopie électronique à balayage des masques de 100 μm d'épaisseur avec des ouvertures de (a) 100 μm et (b et c) 50 μm d'épaisseur.

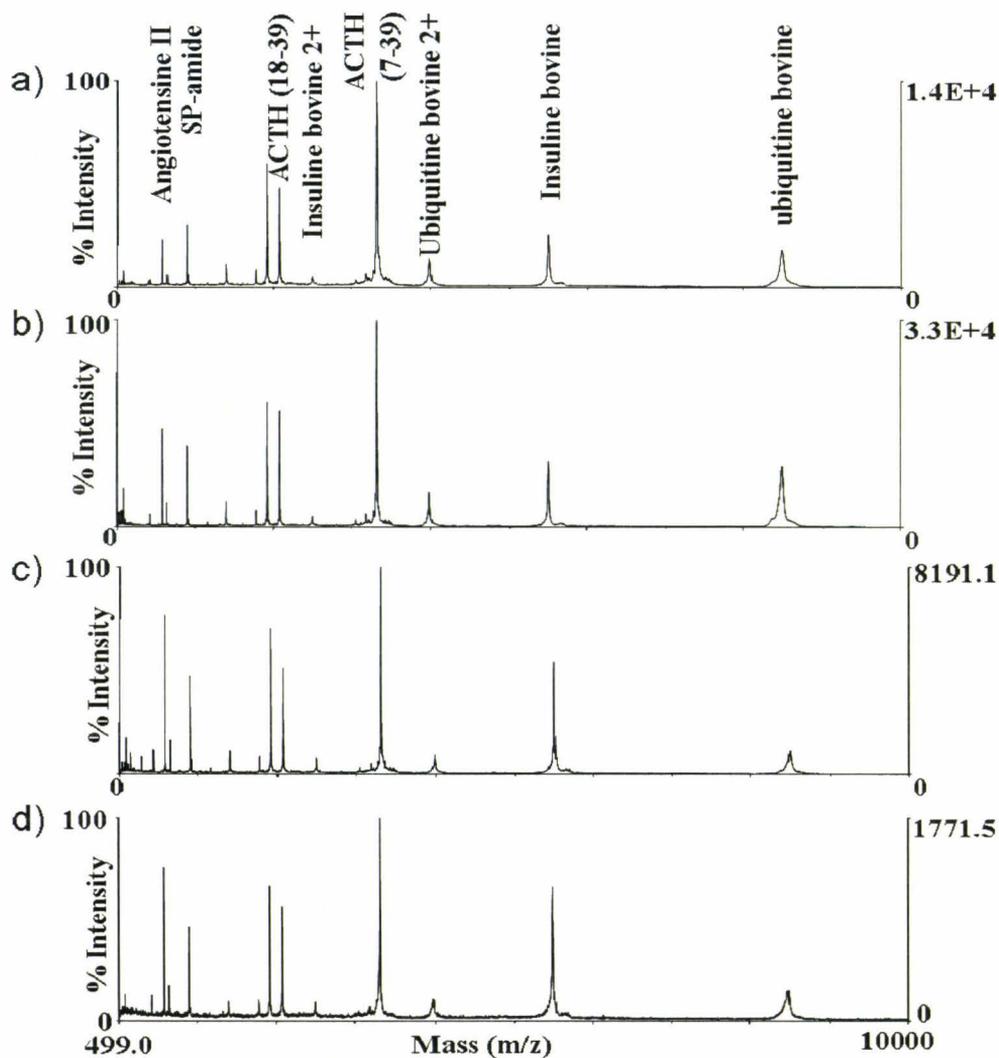


Figure 6.5 : Spectres de masse d'un mélange de standards avec la matrice HCCA à travers des ouvertures de (a) 500μm, (b) 240μm, (c) 100μm et (d) 50μm.

Les spectres obtenus montrent que l'ajout du masque ne perturbe que suffisamment faiblement le processus de désorption/ionisation et les rendements d'ions extraits pour ne pas entraîner l'observation de variations majeures sur les spectres et ce pour les 2 épaisseurs testées. Les résultats sont différents suivant la taille de l'ouverture. Le cache avec une ouverture de 50µm (**Figure 6.5d**) montre l'intensité de signal la plus faible comparé aux trois autres tailles testées. Une intensité équivalente est observée pour les caches de 100µm et 500µm d'ouverture (respectivement **Figure 6.5c et a**). Une augmentation du signal a été observée pour le cache avec ouvertures de 240 µm (**Figure 6.5b**). Une analyse détaillée des spectres montre une augmentation de la détection des ions de plus hautes masses *i.e.* pour les ions à m/z 4271 (Ubiquitine bovine MH_2^{2+}), à m/z 5716 (Insuline bovine MH^+) et à m/z 8568 (Ubiquitine bovine MH^+) pour le cache avec ouvertures de 240µm et à m/z 5716 (Insuline bovine MH^+) pour les caches d'ouverture 100µm et 50µm. Le cache avec des ouvertures de 240µm et épaisseur de 100µm a donné les meilleurs résultats en intensité de signal et nombre d'ions détectés.

6.3.2 Analyses de coupes de tissu

Ces résultats ont été confirmés dans le cadre de l'analyse directe de tissus. Les spectres ont été enregistrés aux mêmes coordonnées de la coupe avant et après apposition de masques (**Figure 6.6**). L'analyse, effectuée au travers des masques appliqués sur des coupes de cerveau de rat, montre une nette augmentation de l'intensité générale du signal sur les spectres obtenus avec les caches d'ouvertures 240µm (2.7×10^4 u.a.) (**Figure 6.6b**) comparativement aux spectres obtenus par analyse classique sans cache (1.2×10^4 u.a.) (**Figure 6.6a**). De plus, comme précédemment observée sur les standards, l'intensité des signaux de $m/z > 3000$ est plus importante lorsque l'analyse est réalisée avec des caches (240 et 500µm) avec même une apparition de signaux au dessus d'un rapport m/z de 5000.

Les caches ont également été utilisés sur un instrument de type MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics) et les résultats obtenus sont venus confirmés les résultats précédemment obtenus sur le MALDI-TOF classique (**Figure 6.7**).

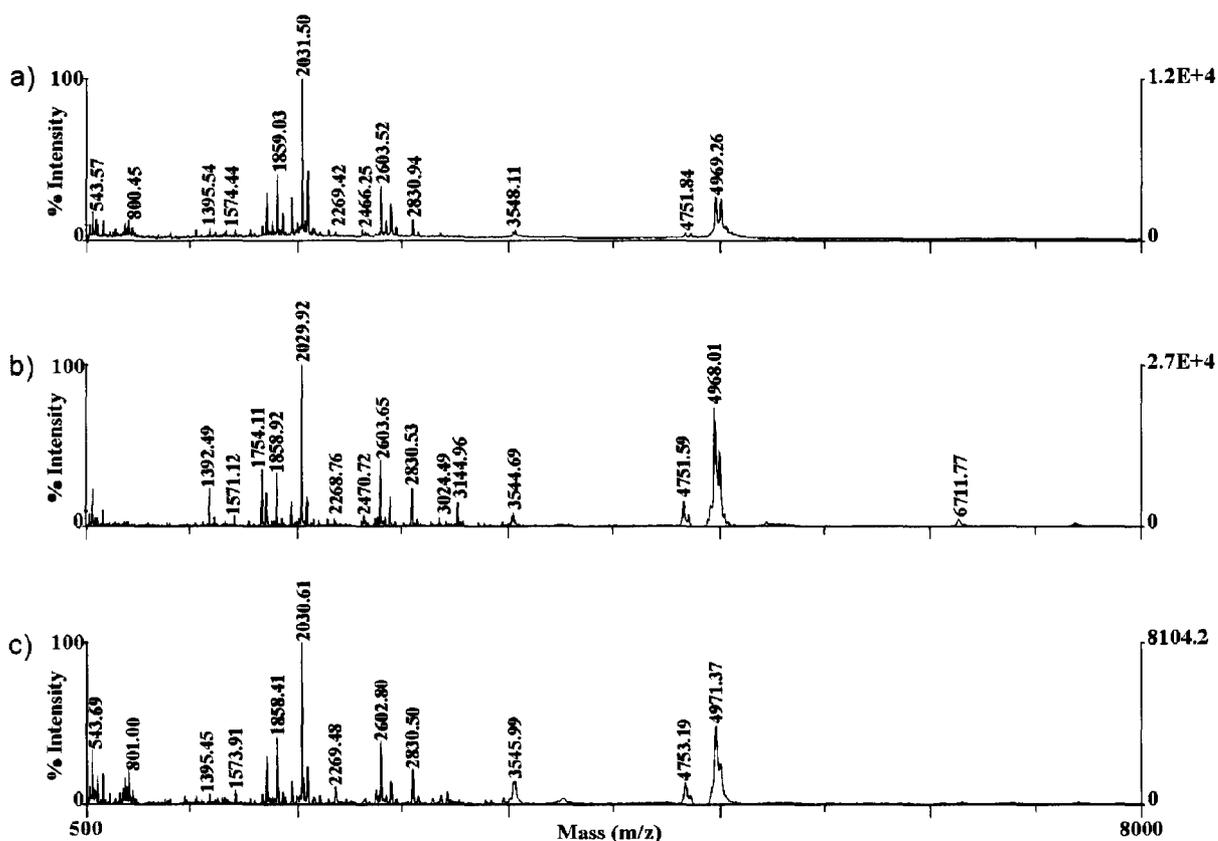


Figure 6.6 : Spectres de masse d'une coupe de cerveau de rat recouverte de matrice HCCA en mode linéaire (a) avant, et après apposition d'un masque avec des ouvertures de (b) 240µm et (c) 500µm.

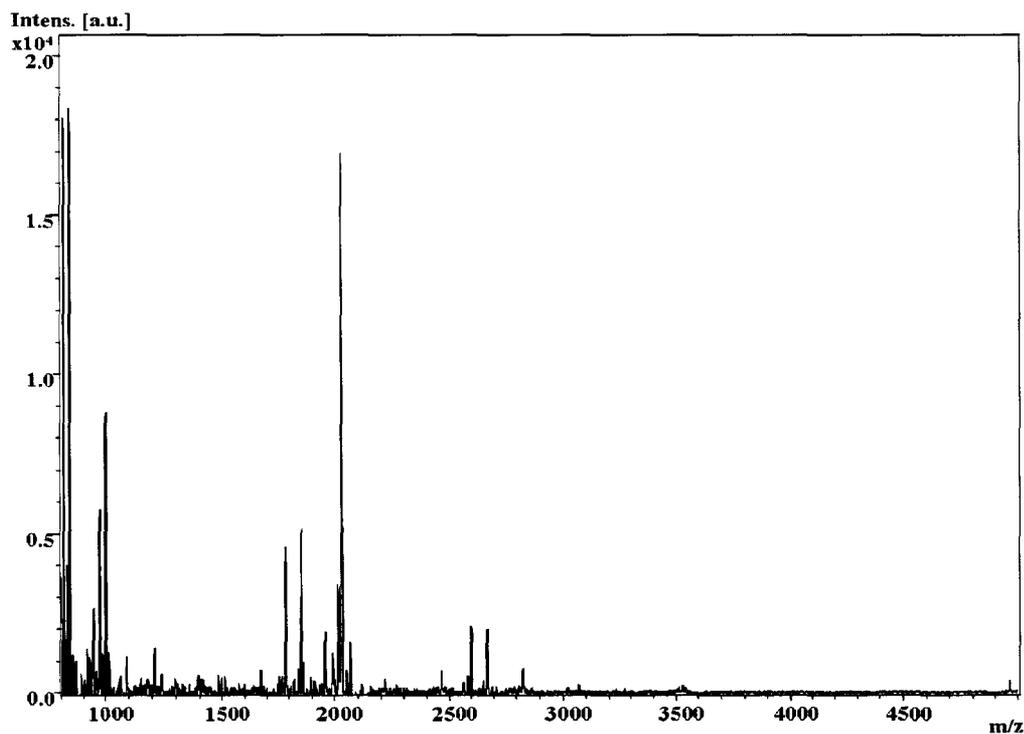


Figure 6.7 : Spectre de masse d'une coupe de cerveau de rat recouvert d'HCCA/ANI en mode réflecteur à travers un masque d'ouverture 100 µm

6.3.3 Augmentation de l'intensité et utilisation de caches

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'origine de ce phénomène observé avec les caches d'ouvertures $240\mu\text{m}$. L'hypothèse la plus vraisemblable résiderait dans une plus grande quantité d'ions collectée, liée à la modification du champ électrique régnant dans la 1^{ère} zone d'accélération de la source par ajout des caches. En effet, l'application d'un support conducteur ou semi-conducteur possédant des ouvertures conduit nécessairement à une modification des lignes de champ à proximité du cache. Afin d'étudier cette hypothèse, des premières simulations des lignes de champ électrique ainsi que de la trajectoire des ions ont été entreprises à l'aide du logiciel SIMION v6 (**Figure 6.8**). En simulant une simple ouverture de dimension $240\mu\text{m}$ pratiquée entre deux électrodes d'épaisseur de $65\mu\text{m}$ sur lesquels est appliqué un potentiel de 20 kV (valeur classique sur les instruments MALDI-TOF) et en délimitant la zone d'accélération par une électrode plane, la simulation obtenue montre une nette courbure des lignes de champ électrique au niveau de l'ouverture. Par contre, les lignes de champ sont planes dans le reste de la zone comme attendu habituellement dans le cas d'un champ électrique obtenu par différence de potentiel entre deux électrodes planes. La simulation de la trajectoire des ions dans notre configuration montre que le faisceau d'ions est refocalisé par un tel champ électrique.

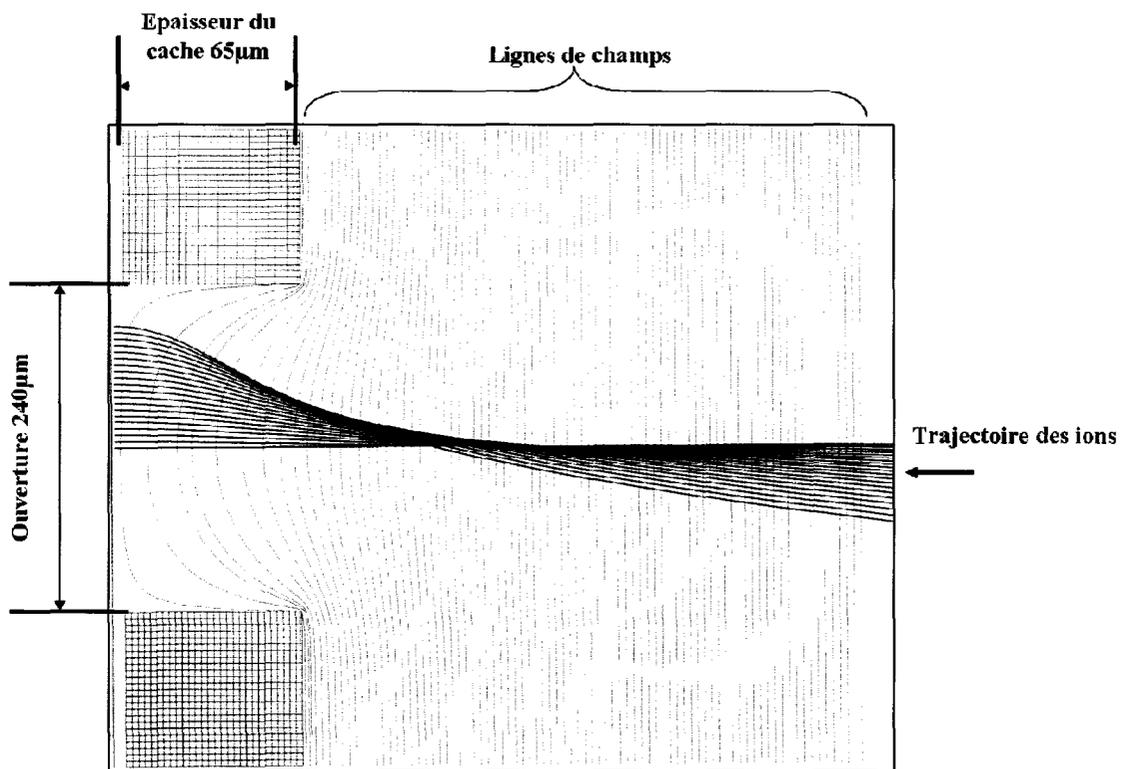


Figure 6.8 : Simulation par SIMION de la trajectoire des ions en présence d'un masque de $240\mu\text{m}$ d'ouverture et $65\mu\text{m}$ d'épaisseur.

Une meilleure focalisation des ions pourrait être à l'origine de l'augmentation de sensibilité ($\times 2$) observée. La présence du masque pourrait également permettre un confinement de la plume d'expansion formée par la désorption, favorisant ainsi le transfert de charge et donc l'ionisation des molécules. Tout ceci viendrait s'ajouter aux différents événements accompagnant le phénomène de désorption/ionisation et expliquer peut-être l'augmentation particulièrement nette d'intensité sur les ions de plus haut m/z . Il serait intéressant de poursuivre de manière plus approfondie de telles simulations, et en particulier, afin de pouvoir sélectionner des configurations de caches particulièrement intéressantes au niveau des rendements d'ions extraits.

6.3.4 Relation entre l'épaisseur du masque et zone irradiée

Durant nos tests, il a été impossible d'obtenir du signal pour des masques avec des ouvertures de taille inférieure à $50\mu\text{m}$. Le problème ne provient pas de la taille de l'ouverture mais de l'épaisseur. En effet, à cause de l'angle d'incidence du faisceau laser, si l'épaisseur du cache est trop importante rapport à la taille de l'ouverture, le laser ne pourra pas atteindre l'échantillon (**Figure 6.9**).

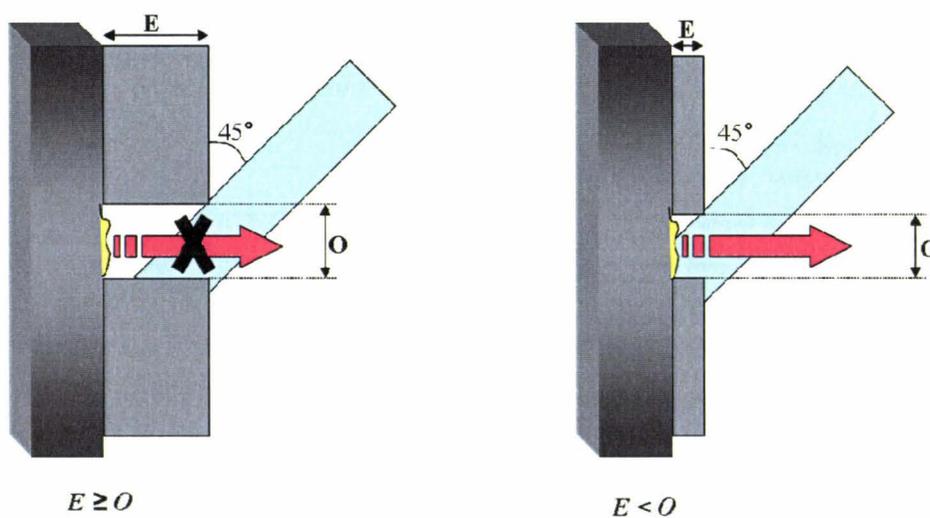


Figure 6.9 : Influence de l'épaisseur du masque sur la taille de la zone irradiée.

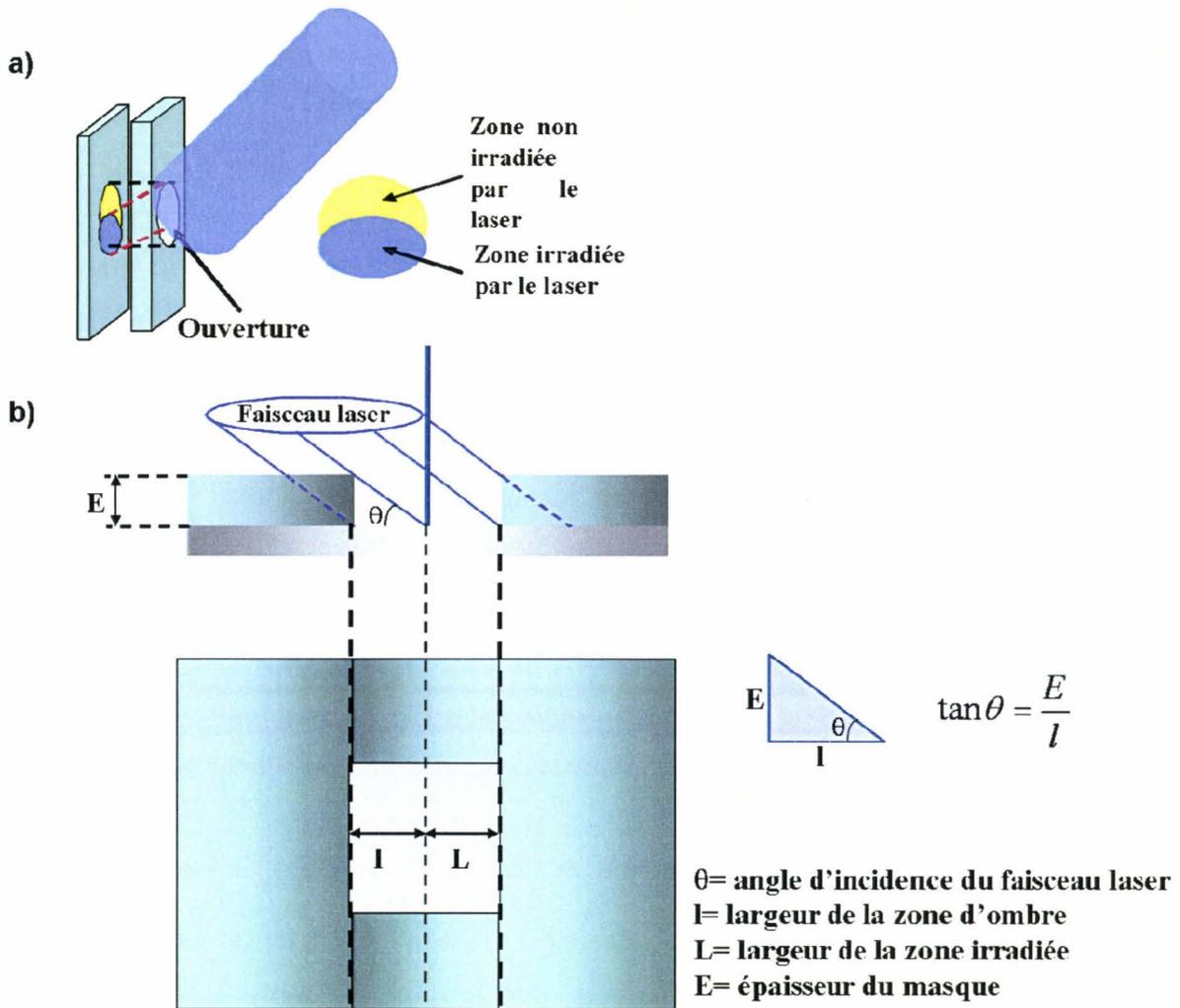


Figure 6.10 : (a) Mise en évidence de l'existence d'une zone d'ombre non atteinte par le faisceau laser et (b) calcul de la taille de la zone irradiée en fonction de l'épaisseur du cache et de l'angle d'incidence du faisceau laser.

Selon les modèles de spectromètres utilisés, l'angle d'incidence du faisceau laser peut varier. Il est de 45° sur le MALDI-TOF Voyager DE-STR de la société Applied Biosystems et en revanche de 30° sur le MALDI-TOF/TOF commercialisé par la société Bruker Daltonics. L'angle d'incidence du faisceau génère une zone d'ombre sur l'échantillon (**Figure 6.10a**). Ainsi, la zone réellement irradiée par le faisceau sera inférieure à la taille de l'ouverture. La zone d'ombre est d'autant plus importante que le support sera épais et l'ouverture pratiquée petite. Cette zone d'ombre peut être aisément calculée si, l'épaisseur des caches, la taille de l'ouverture et l'angle d'incidence du faisceau laser, sont connus avec précision (**Figure 6.10b**) L'angle d'incidence du laser θ , l'épaisseur du support et la largeur l de la zone d'ombre sont liés par la formule $\tan \theta = \frac{E}{l}$. Si L représente la largeur de la zone irradiée, l'aire d'ombre est égale à $l \times (L+l)$, alors que l'aire irradiée est égale à $L \times (L+l)$.

Angle d'incidence du laser θ	Largeur L de la zone irradiée par le laser (μm)	
	Épaisseur du masque $E=65 \mu\text{m}$	Épaisseur du masque $E=100 \mu\text{m}$
60°	67	46
50°	45	17
45°	35	0
40°	13	0

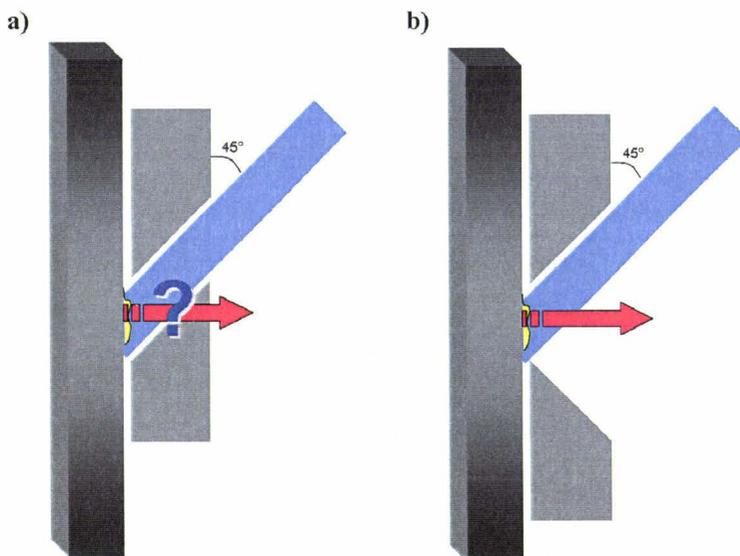
Tableau 6. 2 : Corrélation entre l'épaisseur du masque E, l'angle d'incidence du laser θ et la largeur L pour des ouvertures de 100 μm

Pour rappel, la **Figure 6.7** présente un spectre obtenu sur une coupe de cerveau à travers un cache d'ouverture 100 μm et d'épaisseur 100 μm . L'angle d'incidence de l'appareil utilisé était de 50°, il a été possible d'observer un signal d'intensité habituel sur une coupe de cerveau de rat, alors que l'aire irradiée n'est plus que de 17 \times 100 μm^2 . Ces résultats confirment la potentialité d'utiliser des caches pour diminuer la taille de la zone analysée et sa possibilité d'adaptation sur différents types d'instruments.

Pour éviter les phénomènes de zone d'ombre et permettre de définir plus précisément les zones irradiées, des caches avec des configurations différentes ont été fabriqués.

6.4 Masques à ouvertures en « V »

De part l'équation présenté en partie 6.3.5, il est possible de montrer que la zone irradiée correspondra à l'ouverture du cache si l'angle de cette ouverture est égal à l'angle



d'incidence du laser. Dans un premier temps nous avons pensé réaliser des caches avec des ouvertures obliques (**Figure 6.11a**) mais cette configuration générerait grandement les processus de désorption ionisation.

Figure 6.11 : a) masque à ouverture oblique et (b) masque à ouverture en V

C'est pourquoi des caches avec des ouvertures en « V » ont été développés (**Figure 6.11b**). En utilisant un processus de fabrication par attaque humide du silicium, des ouvertures carrées avec des flancs possédant un angle de 55° sont obtenues. En connaissant la taille de l'ouverture externe (T) et l'épaisseur (E) du support il est possible de calculer la taille de l'ouverture interne (D)

(Figure 6.12a). L'angle des flancs étant de 55°, il existe encore dans ce cas une zone d'ombre. Elle est facilement calculable en connaissant l'angle du laser θ et l'angle de l'ouverture α (55° dans le cas de l'attaque humide du silicium) (Figure 6.13).

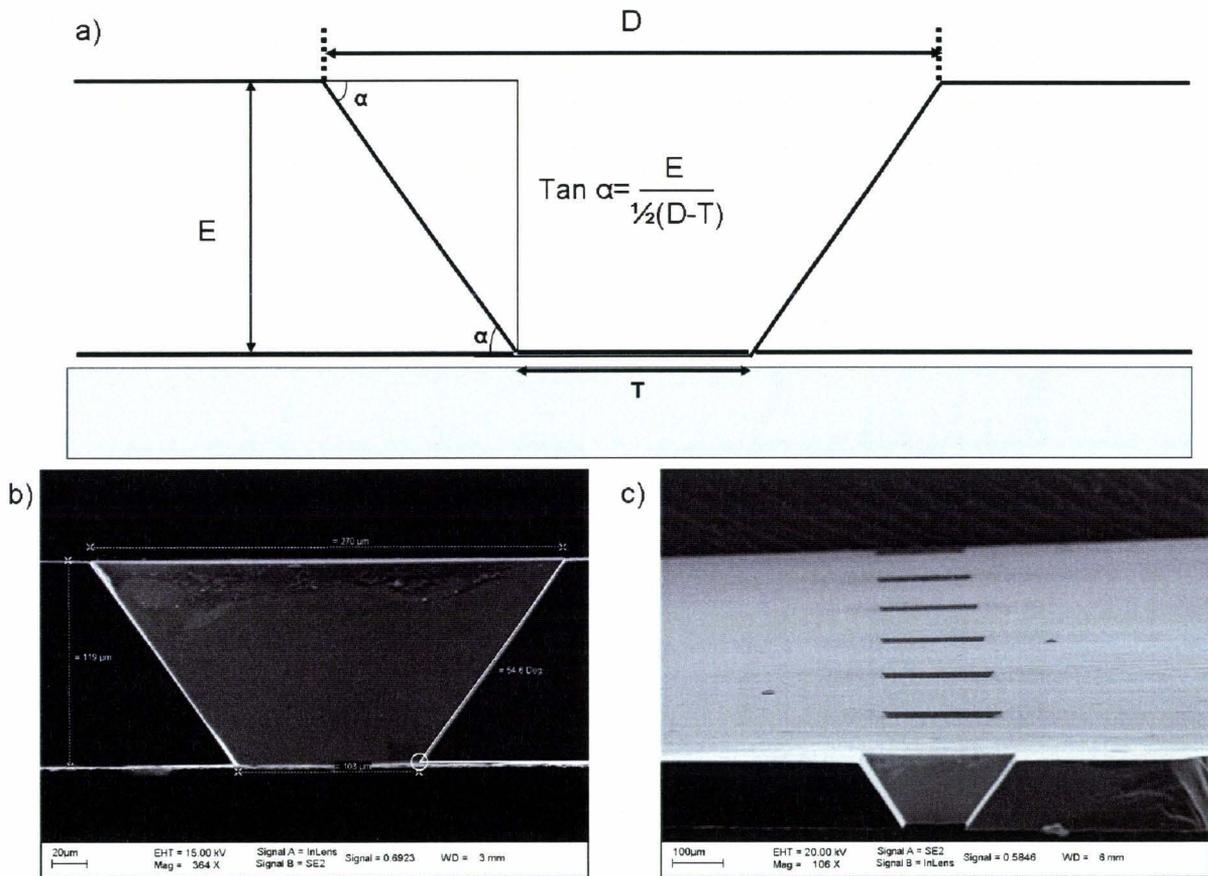


Figure 6.12 : (a) Représentation des ouvertures en V en vue transversale. (b et c) Image en microscopie électronique à balayage d'un masque de 103 μm d'ouverture interne et 119 μm d'épaisseur.

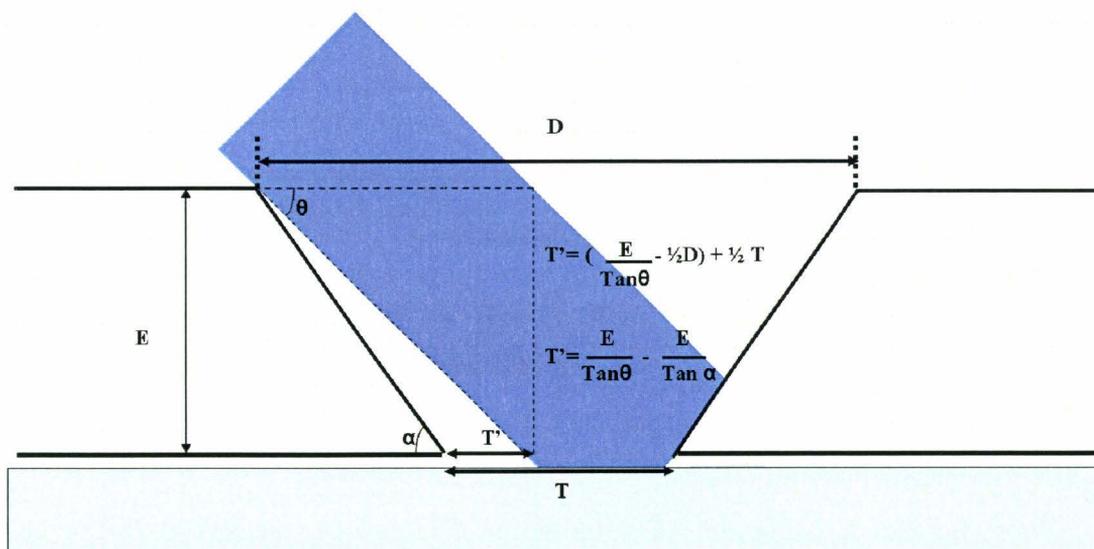


Figure 6.13 : Représentation de la zone d'ombre existant avec les masques à ouvertures en « V » avec des flancs de 55° de pente.



Les **Figure 6.12b** et **Figure 6.12c** montrent des images en microscopie électronique d'un cache avec ouverture en V. Par calcul ce masque permet l'analyse d'une zone d'une aire de $67 \times 103 \mu\text{m}^2$. Un spectre obtenu après apposition de ce masque sur une coupe de tissus est visible dans la **Figure 6.14b**. Cette figure regroupe également un spectre du même point sans masque (**Figure 6.14a**) ou avec un masque de $185 \mu\text{m}$ d'ouverture interne et $180 \mu\text{m}$ d'épaisseur soit une aire analysable de $131 \times 185 \mu\text{m}^2$ (**Figure 6.14c**).

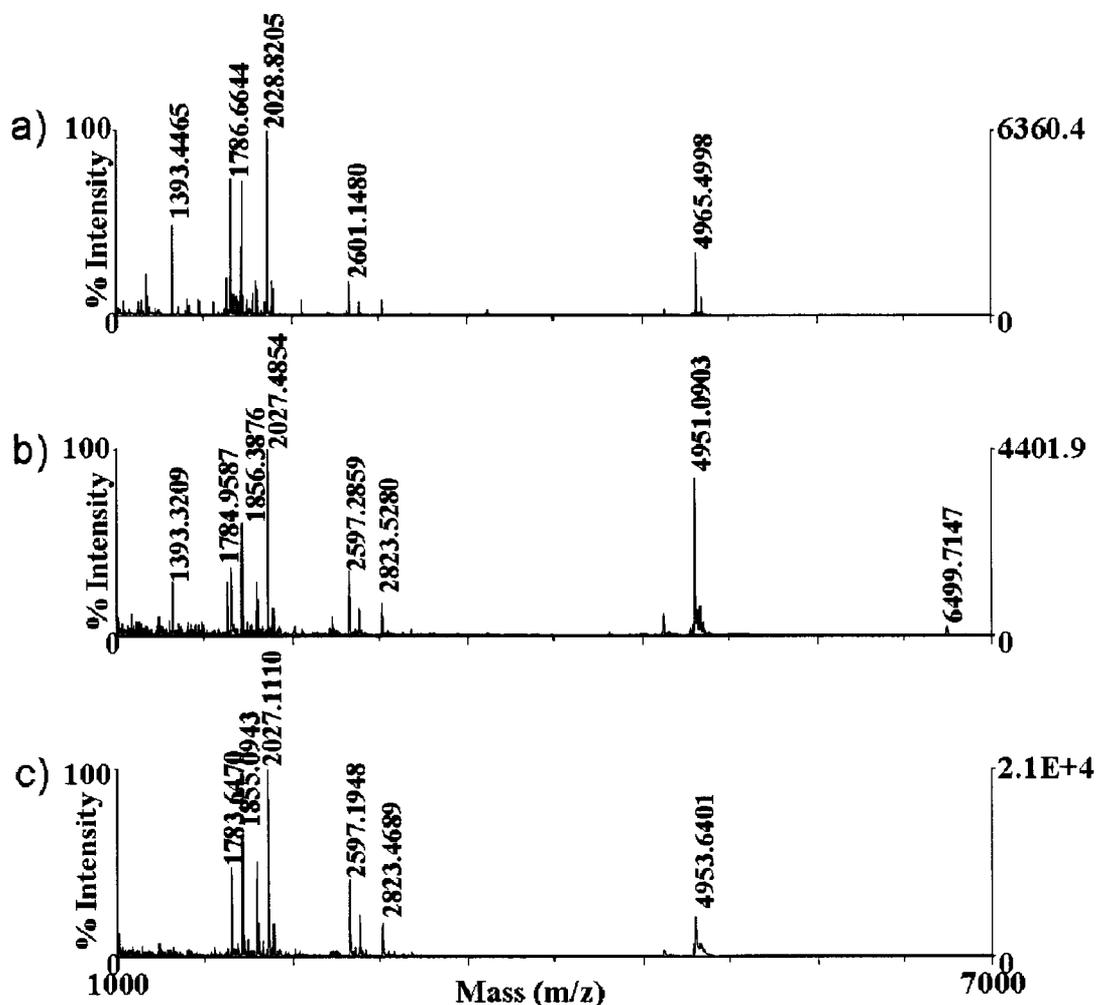


Figure 6.14 : Spectres de masse obtenus à partir d'une analyse directe de cerveau de rat recouverte d'HCCA/ANI en mode linéaire (a) sans masque ou à travers un masque (b) de $100 \mu\text{m}$ et (c) $185 \mu\text{m}$ d'ouverture interne.

Ces résultats montrent que cette configuration ne gêne pas le processus de désorption/ionisation. Néanmoins les signaux obtenus avec le cache de $103 \mu\text{m}$ d'ouverture interne sont d'une intensité moins importante que pour les masques à ouverture droite alors que l'aire irradiée est plus importante.

Pour chercher la cause de cette diminution d'intensité, nous avons réalisé un dépôt d'une solution d'HCCA à saturation dans l'acétone en vue d'obtenir une couche mince de matrice. Ensuite, 3000 tirs avec une énergie laser proche de celle de production des ions ont

été réalisée, et ce, dans le but de mesurer la taille de notre faisceau laser (**Figure 6.15a**). La même expérience a été réalisée à travers le masque de $103\mu\text{m}$ d'ouverture interne (**Figure 6.15b**).

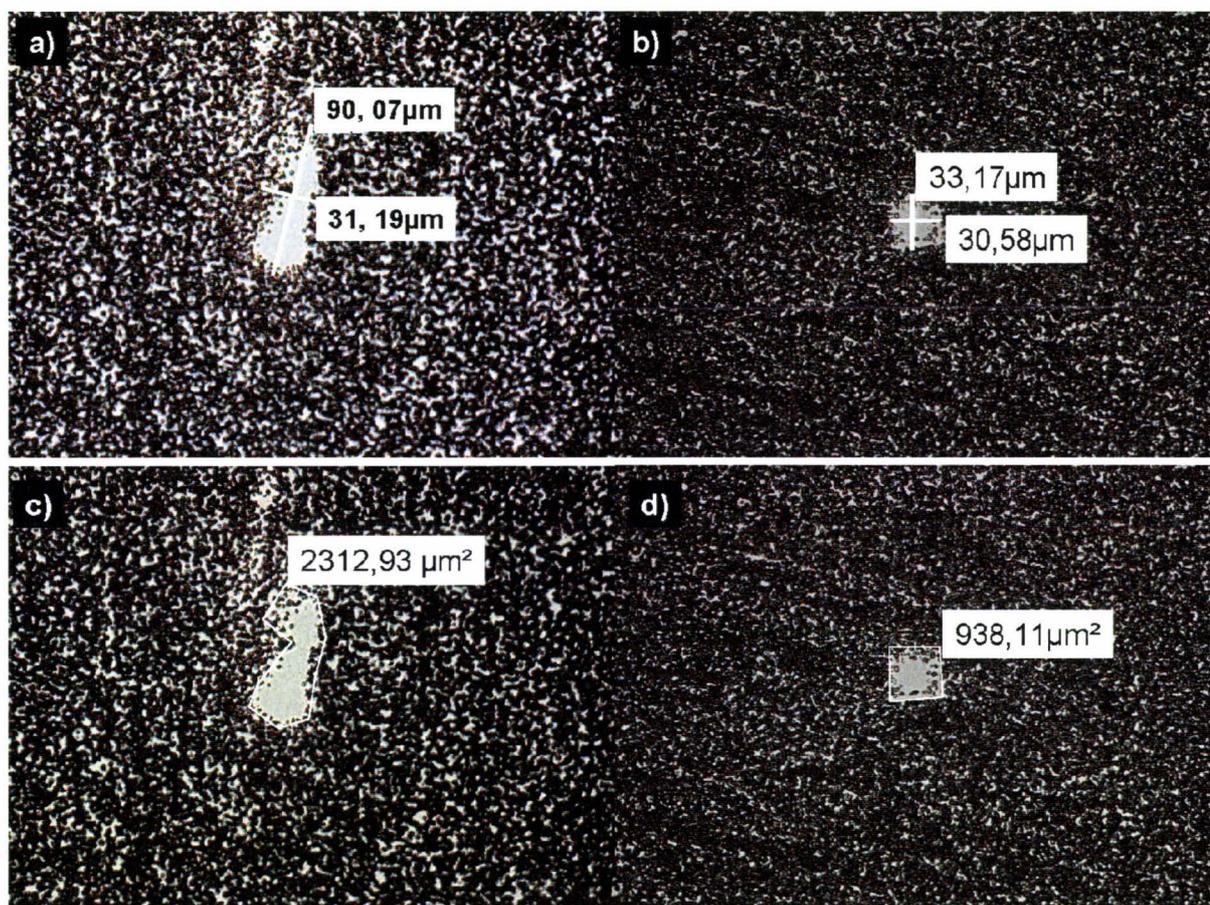


Figure 6.15 : Observation de la taille de la zone irradiée en présence ou en absence du masque.

Ces observations nous ont appris que l'aire de la zone irradiée, en plaçant le laser au centre de l'ouverture externe, est inférieure à celle calculée. En effet le laser ne fait que $30\mu\text{m}$ de large et en positionnant le repère symbolisant le laser au centre de l'ouverture il est possible qu'une partie seulement de ce faisceau irradie la surface de l'échantillon. L'aire irradiée n'est plus que de $30 \times 30\mu\text{m}^2$ ce qui est de 2,5 fois inférieure à la zone irradiée normalement par notre laser et pratiquement 10 fois inférieure à la taille de la zone analysable par les laser commerciaux conventionnels.

6.5 Conclusions et perspectives

La taille de la zone irradiée par le faisceau laser est actuellement un point limitant pour l'analyse directe et l'ISM MALDI. En effet, une petite zone irradiée, permet l'analyse à

l'échelle de quelques cellules. Afin de diminuer les dimensions de cette zone, nous avons développé des caches présentant des orifices de dimension définie.

Les études réalisées démontrent qu'il est possible d'utiliser ces masques pour diminuer la taille de la zone irradiée sans diminution de l'intensité des ions observés. Il est possible, à l'heure actuelle, d'analyser des zones de dimensions jusqu'à environ $30 \times 30 \mu\text{m}^2$ (soit $900 \mu\text{m}^2$). Ce qui permet déjà d'obtenir une résolution supérieure aux limites imposées par le diamètre du faisceau laser (à l'heure actuelle environ $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, soit $2500 \mu\text{m}^2$). De plus, pour certains caches (et en particulier ceux avec une ouverture droite de $240 \mu\text{m}$) une nette augmentation de l'intensité du signal a été observée, notamment pour les hauts rapports m/z.

Une explication possible de ce phénomène résiderait dans une meilleure focalisation des ions liée à une modification des lignes de champ électrique de part la présence du cache. Au niveau de leur utilisation en ISM MALDI, l'un des paramètres à prendre en compte est la distance entre les ouvertures. En effet, elles doivent être suffisamment espacées pour éviter que le laser n'irradie deux de ces ouvertures en même temps. Cet espacement est calculable et est égal au rapport du diamètre du faisceau (d) sur le sinus de l'angle d'incidence du laser (θ).

Le **Tableau 6. 3** regroupe quelques distances calculées suivant la formule $\frac{d}{\sin \theta}$.

d \ θ	30°	40°	45°	50°	60°	70°	80°	90°
75 μm	150	117	106	98	87	80	76	75
100 μm	200	156	141	131	115	106	102	100
125 μm	250	194	177	163	144	133	127	125
150 μm	300	233	212	196	173	160	152	150
175 μm	350	272	247	228	202	186	178	175
200 μm	400	311	283	261	231	213	203	200

Tableau 6. 3: Valeur V_{\min} (μm) pour laquelle le faisceau laser de diamètre d et d'angle d'incidence θ n'irradie qu'une seule ouverture.

L'utilisation des masques permet l'étude plus précise d'une zone plus petite en chaque point, mais les points analysés sont nécessairement séparés par une certaine distance. Cependant, ce fait peut être facilement corrigé en utilisant les masques suivant la méthode décrite dans la **Figure 6.16**. Dans ce cas, l'échantillon est mobile et le masque est fixe ou inversement et il faudra autant de cycle que nécessaire pour analyser l'ensemble de la coupe.

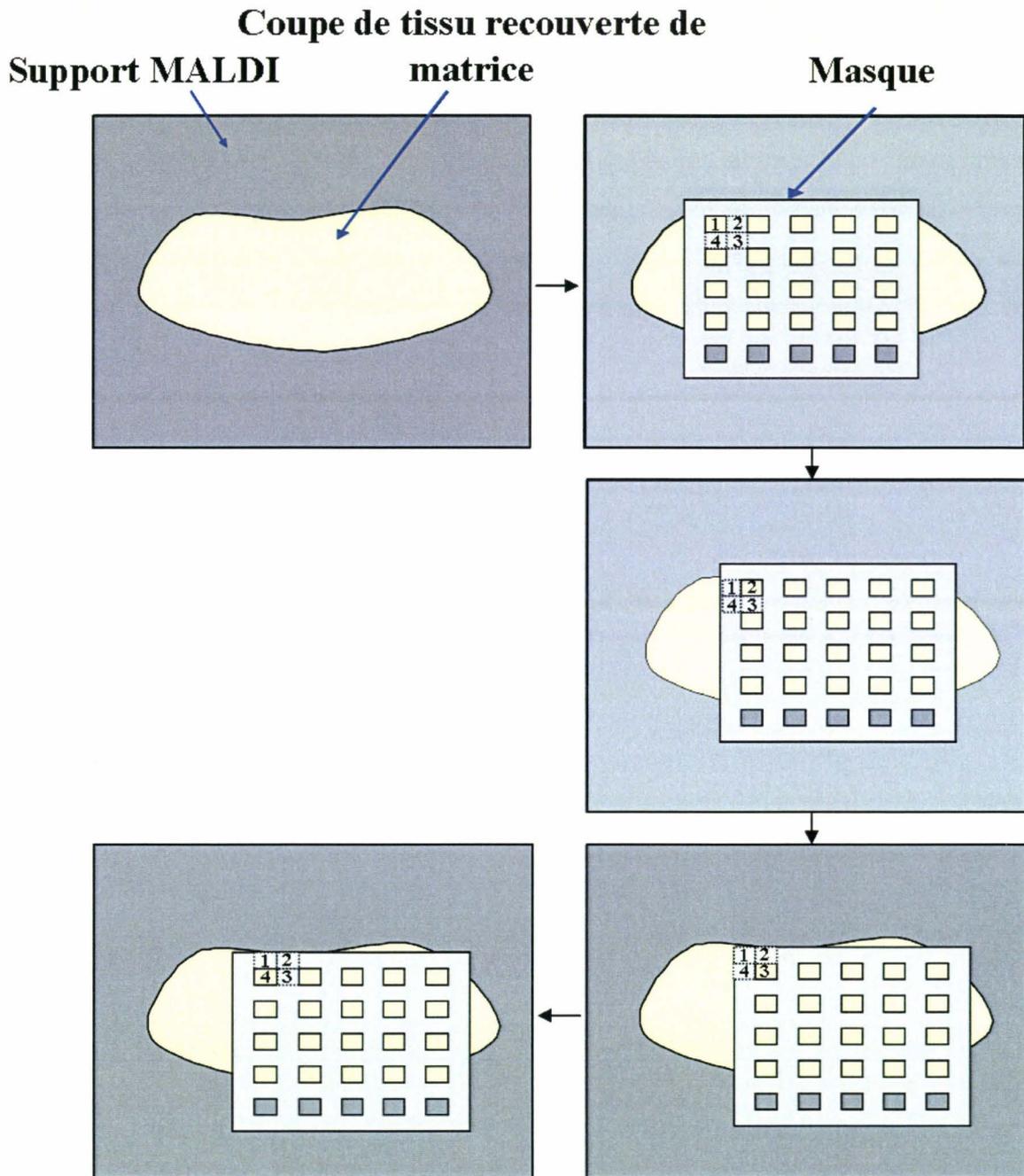


Figure 6.16 : Méthode d'automatisation de l'utilisation du masque.

D'autres développements sont également en cours de réalisation et comprennent :

- Le dépôt de matériaux conducteurs (Or, Nickel,...) sur le cache afin d'optimiser le transfert des ions et la dissipation des charges s'accumulant à la surface de l'échantillon.
- La réalisation de masques sur supports souples types polymère plastique, PDMS par exemple [174] pour lesquels les ouvertures sont obtenues par moulage. La métallisation du support permet ensuite le transfert des ions.

- Utilisation d'autres techniques de micro usinage de métaux tel que l'inox par laser, électrochimie,...

L'avantage de l'utilisation des caches est sa facile adaptation sur tout types d'instruments notamment commerciaux, puisqu'elle ne nécessite aucune modification matérielle ou investissement dans du matériel annexe. Tous ces résultats montrent que grâce à l'utilisation du cache il est possible d'obtenir facilement des analyses moléculaires d'une résolution avoisinant la taille d'une cellule sur des appareils commerciaux.

Conclusion

L'analyse directe de tissus par spectrométrie de masse avec sources MALDI et l'imagerie MALDI constituent à l'heure actuelle des technologies prometteuses. Les différentes études réalisées par les différents groupes s'intéressant à ces développements montrent leurs potentialités et les nombreuses applications qui peuvent en découler dans le domaine de la biologie et en particulier pour l'étude de certaines pathologies.

Néanmoins, de nombreux développements restent à réaliser pour permettre à ces technologies de devenir des outils de routine dans le domaine de la clinique et du médical. C'est sur certains de ces nouveaux développements que les travaux exposés dans ce mémoire ont portés. Les développements réalisés concernent plusieurs aspects différents de la technologie.

Les aspects de la préparation de l'échantillon en vue d'analyse directe de tissu issu de petits organismes ont été particulièrement étudiés. Après avoir éprouvés différents protocoles de préparation du tissus nerveux, nous nous sommes attelés à travailler sur des chaines isolées. Ces chaines, pour être coupées, doivent impérativement être enrobé dans une solution permettant le maintient de l'intégrité morphologique du tissus. Des recherches ont étaient entreprises pour pouvoir s'affranchir du milieu employé habituellement dont l'utilisation s'accompagne de l'apparition de pics parasites dans le spectre. Elles n'ont pas abouti pour mais se poursuivent.

Pour palier à ce problème, différents rinçages des coupes ont été étudiés dans le but d'éliminer le polymère constituant le milieu d'enrobage. Il a été montré qu'un rinçage à l'éthanol suivi d'une immersion dans un bain d'eau permettait de réduire les pics parasites sans nuire à la qualité du spectre obtenu. Par extension à ces travaux, une étude a porté sur l'influence des rinçages par d'autres solvants sur l'analyse de coupe de tissu. (**Annexe I**). Ces travaux ont portés sur des rinçages de coupes par des solvants organiques utilisés traditionnellement pour l'extraction des lipides à savoir le chloroforme, le xylène, l'acétone, l'hexane ou encore le toluène. Les résultats ont montré que ces rinçages permettent une amélioration de la détection des peptides/protéines de la coupe en les rendant plus accessible grâce à une élimination partielle des lipides constitutifs des membranes. Ces études ont également permis d'obtenir une amélioration très nette des résultats pour des tissus d'archives congelés depuis plus de six mois. De plus au cours de celles-ci, des lipides ont pu être

directement extraits des tissus et analysés. Ce résultat conforte la possibilité de micro-extraction directe sur coupe que nous avons explorée. A cette occasion, différents solvants d'extraction peptidique ont été testés et il s'est avéré que la matrice HCCA permet une extraction efficace des peptides et ce sur une large gamme de masse. Ce basant sur ce protocole, des études plus poussées sur la possibilité d'obtenir des profils peptidiques différenciés sur des coupes de chaînes nerveuses de sangsues en cours de régénération seront prochainement lancées.

De même, des études sur l'implication des lipides au cours de la réparation du tissu nerveux de la sangsue sont en cours. Dans ce mémoire sont reportés les résultats préliminaires de cette étude. Ils ont permis de montrer la complémentarité des approches d'imagerie TOF-SIMS et extraction en permettant notamment de définir certains paramètres de la préparation de l'échantillon à savoir le sinus ventral entourant la chaîne, dont la présence peut diluer le signal de certains lipides d'intérêts. De nouvelles études sont en cours pour confirmer les résultats déjà obtenus et pousser plus avant la recherche de marqueur lipidique potentiel de la régénération. A terme, après isolement et caractérisation de ces lipides, ils feront l'objet de tests biologiques menés pour définir leur rôle à la fois sur des cultures de chaînes isolées et sur des chaînes *in-vivo*. Le potentiel de ces molécules dans le cadre de maladies neuro-dégénératives sera par la suite étudié dans le cadre de modèles cellulaires et animaux.

De Plus, en collaboration avec le Pr. A. Woods (NIDA, Blatimore) et le Pr. N. Baumann (Hôpital Salpêtrière), des études sur les maladies neurodégénératives sont en cours. Nous avons déjà pu mettre en évidence dans le cas de la maladie de Parkinson sur des blocs de tissus conservés à la paraffine de plus de 9 ans, de nouveaux marqueurs potentiels tel que la Collapsin response mediator protein (CRMP), le trans elongation factor 1 et l'ubiquitin complex à côté de marqueurs déjà identifiés e.g. l'Hexokinase (2-7-1-1), le Neurofilament M protein, le Peroxidoxin 6, la F1 ATPase et l' α -Enolase. L'expression positive de CRMP et négative de l'eEF1 pourraient représenter de nouveaux marqueurs. La surexpression de CRMP pourrait impliquer dans la dégénérescence des neurites en agissant sur l'assemblage et la polymérisation des microtubules. Pour l'eEF1 sa régulation négative serait liée à la surexpression des HSP. Ces facteurs sont présents chez la sangsue. Le gène de l'eEF1 est surexprimé dans le cadre de la neurogénèse (Baker, 2006 #234), tandis que le CRMP agirait sur la polarité axonale lors des mécanismes de régénération nerveuse ou de neurogénèse. Ces travaux sont en cours et feront l'objet d'études plus approfondies.

En parallèle des études sur les processus de conservation des échantillons sont en cours qu'ils soient frais, congelés, fixés puis paraffinés ou formolés (collaboration avec le Pr

J. Hauw (Hôpital Salpêtrière)). Celles-ci seront réalisées à partir d'échantillons issus de la banque de cerveaux Charcot.

Dans cette même optique, notre groupe poursuit actuellement une collaboration avec le groupe de Klaus Dreisewerd sur l'analyse de tissu par IR-MALDI. Les travaux réalisés dans ce domaine montrent l'intérêt de ce type de sources pour l'analyse de certains composés. L'irradiation de l'échantillon par un laser infrarouge présente le net avantage d'impliquer une excitation vibrationnelle des molécules qui permet l'utilisation comme matrice de composés plus compatibles avec les conditions biologiques. En particulier, l'utilisation en IR du glycérol comme matrice pourrait avoir des applications intéressantes par la faible délocalisation des composés qu'entraînerait a priori l'utilisation d'une telle matrice. Il n'est pas non plus exclu d'envisager de se servir de cristaux de glace comme matrice en vaporisant par exemple la coupe de tissu d'eau avant de la soumettre à une congélation permettant ainsi d'éviter la délocalisation et de rester proche des conditions physiologiques. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la comparaison entre l'utilisation d'un appareil avec une configuration orthogonale- TOF et une source à pression intermédiaire (1 mbar) équipé d'un laser IR et d'un laser UV et notre MALDI-TOF axial cela dans le cadre de l'analyse directe d'une coupe de cerveau de rat. L'utilisation d'un appareil avec un temps de vol orthogonal permet notamment l'utilisation de lame classique non conductrice. L'emploi d'un laser IR et grâce à sa très grande précision en masse (10 ppm) et son pouvoir résolutif important (10000) l'utilisation d'un instrument o-TOF permet l'identification putative de lipides et la différenciation des variations dans les résidus d'acide gras, directement à partir de leur masse moléculaire. De plus l'application d'une solution d'acétate de potassium sur la coupe permet de faciliter l'interprétation des résultats en mode positif, en supprimant les ions d'adduits sodium. L'utilisation du laser UV avec la configuration MALDI-O-TOF permet d'obtenir des profils de peptides et de petites protéines à partir de coupes recouvertes de matrices. Des protéines de plus hauts poids moléculaires peuvent également être partiellement démasquées par des digestions trypsique [175].

Une grande partie des travaux se sont portés sur l'influence de la présence d'un métal que ce soit pour rendre conducteur un support isolant ou l'échantillon lui-même. Tout d'abord la métallisation de support a permis de mettre au point des lames conductrices transparentes permettant un accès à la fois à l'information histologique et à l'information moléculaire. L'efficacité de lames recouvertes d'une fine couche de 10 nm de nickel a été prouvée. Elles offrent une conductivité suffisante pour ne pas influencer négativement sur l'analyse par

spectrométrie de masse et une bonne transparence, nécessaire pour l'analyse en microscopie optique.

La métallisation de l'échantillon permet de réduire de façon considérable le décalage de masse entraîné par l'accumulation de charge en surface du tissu. Elle conduit également à une augmentation de l'intensité des signaux et du nombre de composés détectés. Outre l'amélioration de la qualité spectrale, elle offre une meilleure reproductibilité intra expériences, ce qui est un atout majeur dans la réalisation d'images moléculaires de qualités. Les observations réalisées ont également soulevées beaucoup de questions, et un travail aussi important devra être mené pour leur trouver une réponse.

Au niveau de la diminution de la taille de la zone irradiée, nous avons développé un système simple à mettre en place et ce sur tout type de machine. L'application de masques sur les coupes de tissus permet d'atteindre des dimensions de zone analysée faible sans conduire à une perte des rendements de production des ions. L'utilisation de certaines configurations permet également d'augmenter significativement le signal obtenue. Une nouvelle génération de masques, en cours de développement, fabriqué en moulant un support plastique flexible permettra de fournir à façon des masques de dimension précise avec des formes d'ouvertures variées.

Pour se libérer de l'utilisation de la matrice des travaux ont été entrepris sur le développement de support DIOS (Desorption/ionization on porous silicon) avec des surfaces fonctionnalisées ou encore l'utilisation de nano-fils de silicium. Le but de ces développements est l'élaboration de système intégré de micro-fluidique. Ces systèmes intégreront le déplacement d'échantillon vers une zone constituée de nano-fils de silicium fonctionnalisés permettant une analyse sans ajout de matrice. Ils seront couplés à des réservoirs de culture pour l'étude des substances libérées par des cellules sous l'effet de certains composés [176] (**Annexe II**).

J'ai également participé à l'élaboration d'un nouveau logiciel pour l'acquisition et la reconstruction d'image (travail de thèse d'O. Jardin-Mathé). La caractéristique de ce logiciel est qu'il permet le paramétrage de l'acquisition d'image et sa reconstruction de façon indépendante de l'instrument utilisée. Il est donc universel et n'est pas lié à un type particulier de fichiers. Au niveau de la reconstruction d'image, différentes possibilités seront données pour la sélection des signaux à considérer suivant l'intensité ou l'aire du pic mais également la prise en compte de signaux correspondant à des adduits. A terme il permettra une meilleure corrélation entre les images histologiques et moléculaires avec des possibilités de reconstruction non plus planes mais en 3 dimensions.

Enfin, dans l'optique de réaliser des études plus fondamentales en biologie ou pour la recherche d'un diagnostic plus précoce de pathologies, le développement de l'imagerie spécifique a été entrepris par notre groupe [177]. Cette forme d'ISM, utilise un système breveté [178] appelé « Tag-Mass », constitué d'une sonde (anticorps, ARN, ribosonde...) couplée par un lien photoactivable à un composé (peptides, polymère, matrice) qui sera libéré lors de l'irradiation par un laser. L'analyse se fera alors par la reconstruction de la répartition de cette étiquette et donnera donc la localisation de la cible de la sonde. Ce type d'imagerie a été utilisée avec succès pour la localisation d'une protéine membranaire de 180 kDa, la carboxypeptidase D (CPD), à l'aide d'une immunocytochimie réalisée avec un anticorps anti-CPD couplé à un peptide par un lien photoclivable. La localisation d'ARNm est également possible comme il a pu être montré par la détection de l'ARNm de la pro-enképhaline après hybridation in situ d'une sonde dirigée contre cet ARNm constituée de base uracile modifiée incluant un tag. Certains de mes travaux actuels portent sur l'ISM spécifique en explorant la possibilité de suivre la bio-distribution d'un ARN interférence (siRNA) marquée par une molécule de FITC. Les premières observations réalisées ont permis de montrer la possibilité d'obtenir des pics spécifiques de la présence de siRNA marqués en spectrométrie de masse MALDI (**Figure 7.1**). La suite de ce travail sera de réaliser des images de la distribution de ces sondes pour vérifier l'interaction avec leur cible dans un but thérapeutique. D'autres voies pour l'ISM spécifique sont explorées avec notamment le développement de marqueur spécifique à d'autre source d'ionisation comme le SIMS. Ce travail réalisé en partenariat avec le groupe d'O. Laprevote (collaboration avec A. Brunelle) a pour but de tester des « Tag-Mass » fournissant une réponse en SIMS. Ces « Tag-MASS » pourraient lever les limitations en gamme de masse de cette source d'ionisation en permettant l'analyse de façon indirecte de protéines et d'obtenir grâce à la haute résolution des images réalisées des localisations au niveau cellulaire voire subcellulaire.

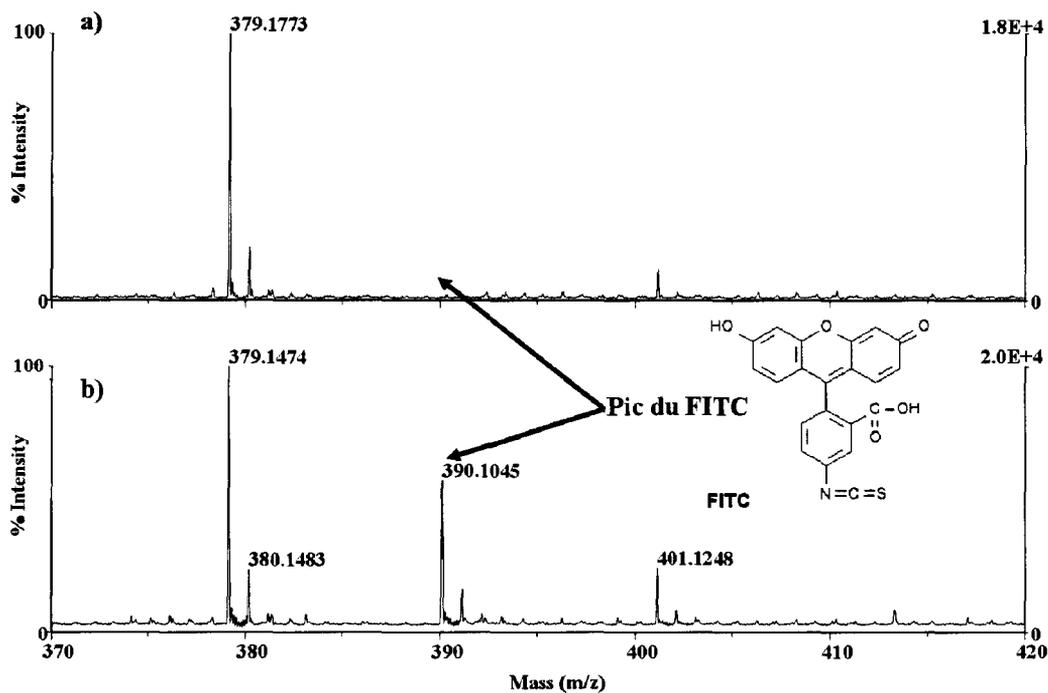


Figure 7.1 : Spectres MALDI en mode réflecteur d'une solution de (a) siRNA sans FITC et (b) de siRNA couplé au FITC.

En quelques années l'ISM est devenu un outil incontournable. Le nombre de laboratoire y ayant recouru pour la localisation de molécules et la recherche de biomarqueur a été multiplié par dix. Les développements actuels et les nombreuses perspectives qui en découlent permettent à cette technique de donner un élan nouveau à l'utilisation de la spectrométrie de masse appliquée à la biologie comparable à ce qu'a connu la RMN pour donner naissance à l'IRM.



Références

1. Fenn, J.B., et al., *Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules*. Science, 1989. **246**(4926): p. 64-71.
2. Hillenkamp, F., et al., *Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers*. Anal Chem, 1991. **63**(24): p. 1193A-1203A.
3. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. **60**(20): p. 2299-301.
4. Ackermann, B.L., J.E. Hale, and K.L. Duffin, *The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement*. Curr Drug Metab, 2006. **7**(5): p. 525-39.
5. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass spectrometry and protein analysis*. Science, 2006. **312**(5771): p. 212-7.
6. Guerrero, I.C. and O. Kleiner, *Application of mass spectrometry in proteomics*. Biosci Rep, 2005. **25**(1-2): p. 71-93.
7. Kolker, E., R. Higdon, and J.M. Hogan, *Protein identification and expression analysis using mass spectrometry*. Trends Microbiol, 2006. **14**(5): p. 229-35.
8. Salzano, A.M. and M. Crescenzi, *Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications*. Ann Ist Super Sanita, 2005. **41**(4): p. 443-50.
9. Solassol, J., et al., *Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection*. Expert Rev Proteomics, 2006. **3**(3): p. 311-20.
10. Posthumus, M.A., et al., *Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules*. Anal Chem, 1978. **50**(7): p. 985-991.
11. Tanaka, K., et al., *Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun. Mass Spectrom., 1988. **2**: p. 151-153.
12. Karas, M., et al., *Matrix-Assisted Laser Desorption of Non-Volatile Compounds*. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 1987. **78**: p. 53-68.
13. Hillenkamp, F. and M. Karas, *Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization*. Methods Enzymol, 1990. **193**: p. 280-95.
14. Karas, M., et al., *Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization Mass Spectrometry*. Anal. Chim. Acta, 1990. **241**: p. 175-185.
15. Wang, W.Z., et al., *Hirudo medicinalis: a platform for investigating genes in neural repair*. Cell Mol Neurobiol, 2005. **25**(2): p. 427-40.
16. Van Vaeck, L., et al., *Laser microprobe mass spectrometry: principle and applications in biology and medicine*. Cell Biol Int, 1997. **21**(10): p. 635-48.
17. Iancu, T.C., et al., *The application of laser microprobe mass analysis to the study of biological material*. Biometals, 1996. **9**(1): p. 57-65.
18. Bakker, A., L. Van Vaeck, and W. Jacob, *Applications of laser microprobe mass spectrometry in biology and medicine*. Scanning Microsc, 1996. **10**(3): p. 753-72; discussion 772-5.
19. Eeckhaoudt, S., et al., *Laser microprobe mass spectrometry in biology and biomedicine*. Scanning Microsc Suppl, 1994. **8**: p. 335-58.
20. Van Vaeck, L., et al., *In-depth limitation of the Lamma 500 for the in situ localization of organic compounds in biological embedded tissue samples*. Biomed Environ Mass Spectrom, 1988. **16**(1-12): p. 113-9.
21. Verbueken, A.H., et al., *Applications of laser microprobe mass analysis in medicine*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1987. **24**(4): p. 263-85.
22. Verbueken, A.H., F.J. Bruynseels, and R.E. Van Grieken, *Laser microprobe mass analysis: a review of applications in the life sciences*. Biomed Mass Spectrom, 1985. **12**(9): p. 438-63.
23. Jimenez, C.R., et al., *Neuropeptide expression and processing as revealed by direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of single neurons*. J Neurochem, 1994. **62**(1): p. 404-7.
24. Rubakhin, S.S., W.T. Greenough, and J.V. Sweedler, *Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons*. Anal Chem, 2003. **75**(20): p. 5374-80.
25. Rubakhin, S.S., et al., *Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(2): p. 172-5.
26. Li, L., R.W. Garden, and J.V. Sweedler, *Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling*. Trends Biotechnol, 2000. **18**(4): p. 151-60.
27. Moroz, L.L., R. Gillette, and J.V. Sweedler, *Single-cell analyses of nitrenergic neurons in simple nervous systems*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 4): p. 333-41.

28. Redeker, V., et al., *Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells*. *Anal Chem*, 1998. **70**(9): p. 1805-11.
29. Jimenez, C.R., et al., *Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of single neurons reveals differential peptide patterns in a small neuronal network*. *Biochemistry*, 1998. **37**(7): p. 2070-6.
30. Jimenez, C.R. and A.L. Burlingame, *Ultramicroanalysis of peptide profiles in biological samples using MALDI mass spectrometry*. *Exp Nephrol*, 1998. **6**(5): p. 421-8.
31. Fournier, I., R. Day, and M. Salzet, *Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain*. *Neuro Endocrinol Lett*, 2003. **24**(1-2): p. 9-14.
32. Caprioli, R.M., T.B. Farmer, and J. Gile, *Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS*. *Anal Chem*, 1997. **69**(23): p. 4751-60.
33. Stoeckli, M., T.B. Farmer, and R.M. Caprioli, *Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1999. **10**(1): p. 67-71.
34. Schwartz, S.A., M.L. Reyzer, and R.M. Caprioli, *Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation*. *J Mass Spectrom*, 2003. **38**(7): p. 699-708.
35. Lemaire, R., et al., *Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging*. *Anal Chem*, 2006. **78**(3): p. 809-19.
36. Patel, S., et al. *Characterising oral cancer tissue using MALDI MS with chemical printing*. in *54th ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2006. Seattle, Washington.
37. Deininger, S.O., et al. in *ABRF*. 2006. Long Beach, California.
38. Lemaire, R., et al. *Direct analysis and MALDI imaging on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues : Application to Parkinson disease*. in *54th ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2006. Seattle, Washington.
39. Aerni, H.R., D.S. Cornett, and R.M. Caprioli, *Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation*. *Anal Chem*, 2006. **78**(3): p. 827-34.
40. Spengler, B. and M. Hubert, *Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2002. **13**(6): p. 735-48.
41. Luxembourg, S.L., et al., *High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface*. *Anal Chem*, 2004. **76**(18): p. 5339-44.
42. Chaurand, P., M. Stoeckli, and R.M. Caprioli, *Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry*. *Anal Chem*, 1999. **71**(23): p. 5263-70.
43. Chaurand, P., et al., *Profiling proteins from azoxymethane-induced colon tumors at the molecular level by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Proteomics*, 2001. **1**(10): p. 1320-6.
44. Masumori, N., et al., *A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential*. *Cancer Res*, 2001. **61**(5): p. 2239-49.
45. Stoeckli, M., et al., *Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry*. *Anal Biochem*, 2002. **311**(1): p. 33-9.
46. Chaurand, P. and R.M. Caprioli, *Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(18): p. 3125-35.
47. Pierson, J., et al., *Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2004. **3**(2): p. 289-95.
48. Chaurand, P., S.A. Schwartz, and R.M. Caprioli, *Assessing protein patterns in disease using imaging mass spectrometry*. *J Proteome Res*, 2004. **3**(2): p. 245-52.
49. Schwartz, S.A., et al., *Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(3): p. 981-7.
50. Rohner, T.C., D. Staab, and M. Stoeckli, *MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections*. *Mech Ageing Dev*, 2005. **126**(1): p. 177-85.
51. Troendle, F.J., C.D. Reddick, and R.A. Yost, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 1999. **10**: p. 1315-1321.
52. Reyzer, M.L., et al., *Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 2003. **38**(10): p. 1081-92.
53. Jackson, S.N., H.Y. Wang, and A.S. Woods, *Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS*. *Anal Chem*, 2005. **77**(14): p. 4523-7.
54. Jackson, S.N., et al., *Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(2): p. 133-8.

55. Rujoi, M., R. Estrada, and M.C. Yappert, *In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue*. *Anal Chem*, 2004. **76**(6): p. 1657-63.
56. Chaurand, P., S.A. Schwartz, and R.M. Caprioli, *Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections*. *Curr Opin Chem Biol*, 2002. **6**(5): p. 676-81.
57. Stoeckli, M., et al., *Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues*. *Nat Med*, 2001. **7**(4): p. 493-6.
58. Todd, P.J., et al., *Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization*. *J Mass Spectrom*, 2001. **36**(4): p. 355-69.
59. Hummon, A.B., A. Amare, and J.V. Sweedler, *Discovering new invertebrate neuropeptides using mass spectrometry*. *Mass Spectrom Rev*, 2006. **25**(1): p. 77-98.
60. Rubakhin, S.S., et al., *Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery*. *Drug Discov Today*, 2005. **10**(12): p. 823-37.
61. Heeren, R.M., *Proteome imaging: a closer look at life's organization*. *Proteomics*, 2005. **5**(17): p. 4316-26.
62. Chaurand, P., D.S. Cornett, and R.M. Caprioli, *Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry*. *Curr Opin Biotechnol*, 2006.
63. Castaing, R. and G. Slodzian, *J Microsc*, 1962. **1**: p. 395-410.
64. Van Vaecck, L., A. Adriaens, and R. Gijbels, *Mass Spectrom. Rev.*, 1999. **18**(1-47).
65. Belu, A.M., D.J. Graham, and D.G. Castner, *Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces*. *Biomaterials*, 2003. **24**(21): p. 3635-53.
66. Pacholski, M.L. and N. Winograd, *Imaging with mass spectrometry*. *Chem Rev*, 1999. **99**(10): p. 2977-3006.
67. Colliver, T.L., et al., *Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS*. *Anal Chem*, 1997. **69**(13): p. 2225-31.
68. Touboul, D., et al., *Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy*. *J Lipid Res*, 2005. **46**(7): p. 1388-95.
69. Szymczak, W. and K. Wittmaack, *Effect of water treatment on analyte and matrix ion yields in matrix-assisted time-of-flight secondary ion mass spectrometry: the case of insulin in and on hydroxycinnamic acid*. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002. **16**(21): p. 2025-33.
70. Touboul, D., et al., *Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment*. *Anal Chem*, 2004. **76**(6): p. 1550-9.
71. Touboul, D., et al., *Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source*. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005. **16**(10): p. 1608-18.
72. Townes, J.A., et al., *Mechanism for Increased Yield with SF₅⁺ Projectiles in Organic SIMS: The Substrate Effect*. *J. Phys. Chem.*, 1999. **103**: p. 4587.
73. Weibel, D., et al., *A C60 primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics*. *Anal Chem*, 2003. **75**(7): p. 1754-64.
74. Altelaar, A.F., et al., *Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2006. **78**(3): p. 734-42.
75. Delcorte, A., et al., *Sample metallization for performance improvement in desorption/ionization of kilodalton molecules: quantitative evaluation, imaging secondary ion MS, and laser ablation*. *Anal Chem*, 2003. **75**(24): p. 6875-85.
76. May, T.W., et al., *A Lead Isotope Distribution Study in Swine Tissue Using ICP-MS*. *Atom. Spectrosc.*, 1999. **20**(6): p. 199-211.
77. Kindness, A., C.N. Sekaran, and J. Feldmann, *Two-dimensional mapping of copper and zinc in liver sections by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry*. *Clin Chem*, 2003. **49**(11): p. 1916-23.
78. Stockle, R., et al., *Nanoscale atmospheric pressure laser ablation-mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2001. **73**(7): p. 1399-402.
79. Zenobi, R. and V.V. Deckert, *Scanning Near-Field Optical Microscopy and Spectroscopy as a Tool for Chemical Analysis*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2000. **39**(10): p. 1746-1756.
80. Novikov, A., et al., *Matrix-implanted laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Anal Chem*, 2004. **76**(24): p. 7288-93.
81. Tempez, A., et al., *Matrix implanted laser desorption ionization (MILDI) combined with ion mobility-mass spectrometry for bio-surface analysis*. *J Proteome Res*, 2005. **4**(2): p. 540-5.
82. Kruse, R.A., et al., *Direct assay of Aplysia tissues and cells with laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon*. *J Mass Spectrom*, 2001. **36**(12): p. 1317-22.

83. Ford, M.J. and G.J. Van Berkel, *An improved thin-layer chromatography/mass spectrometry coupling using a surface sampling probe electrospray ion trap system*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2004. **18**(12): p. 1303-9.
84. Fedorov, A.G. and F.L. Degertekin, *Scanning mass spectrometry probe for biochemical imaging*. IEEE Electronics Letters, 2006. **42**(14): p. 793-794.
85. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-3.
86. Takats, Z., J.M. Wiseman, and R.G. Cooks, *Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology*. J Mass Spectrom, 2005. **40**(10): p. 1261-75.
87. Talaty, N., Z. Takats, and R.G. Cooks, *Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization*. Analyst, 2005. **130**(12): p. 1624-33.
88. Van Berkel, G.J., M.J. Ford, and M.A. Deibel, *Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization*. Anal Chem, 2005. **77**(5): p. 1207-15.
89. Wiseman, J.M., et al., *Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(43): p. 7094-7.
90. Takats, Z., et al. *Jet Desorption Ionization - A new ionization method for tissue analysis*. in *54th ASMS Conference on Mass Spectrometry* 2006. Seattle, Washington.
91. Takats, Z., et al., *Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry*. Chem Commun (Camb), 2005(15): p. 1950-2.
92. Cody, R.B., J.A. Laramee, and H.D. Durst, *Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient Conditions*. Anal Chem, 2005. **77**(8): p. 2297-302.
93. Williams, J.P., et al., *The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(9): p. 1447-56.
94. Veldhuis, W.B., et al., *Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases*. J Neurosci, 2003. **23**(10): p. 4127-33.
95. Huang, M.Z., et al., *Direct protein detection from biological media through electrospray-assisted laser desorption ionization/mass spectrometry*. J Proteome Res, 2006. **5**(5): p. 1107-16.
96. Franzen, B., et al., *Dihydropyrimidinase related protein-2 as a biomarker for temperature and time dependent post mortem changes in the mouse brain proteome*. Proteomics, 2003. **3**(10): p. 1920-9.
97. Blackshaw, S.E., et al., *Single-cell analysis reveals cell-specific patterns of expression of a family of putative voltage-gated sodium channel genes in the leech*. J Neurobiol, 2003. **55**(3): p. 355-71.
98. Emes, R.D., et al., *HmCRIP, a cysteine-rich intestinal protein, is expressed by an identified regenerating nerve cell*. FEBS Lett, 2003. **533**(1-3): p. 124-8.
99. Macagno, E.R., *Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia*. J Comp Neurol, 1980. **190**(2): p. 283-302.
100. Lefebvre, C. and M. Salzet, *Annelid neuroimmune system*. Curr Pharm Des, 2003. **9**(2): p. 149-58.
101. Johnson, L.A., et al., *Disruption of peripheral target contact influences the development of identified central dendritic branches in a leech motor neuron in vivo*. J Neurobiol, 2000. **43**(4): p. 365-78.
102. Baker, M.W., S.J. Rauth, and E.R. Macagno, *Possible role of the receptor protein tyrosine phosphatase HmLAR2 in interbranch repulsion in a leech embryonic cell*. J Neurobiol, 2000. **45**(1): p. 47-60.
103. Wang, H. and E.R. Macagno, *The establishment of peripheral sensory arbors in the leech: in vivo time-lapse studies reveal a highly dynamic process*. J Neurosci, 1997. **17**(7): p. 2408-19.
104. Baptista, C.A., T.R. Gershon, and E.R. Macagno, *Peripheral organs control central neurogenesis in the leech*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 855-8.
105. Blair, S.S., M.Q. Martindale, and M. Shankland, *Interactions between adjacent ganglia bring about the bilaterally alternating differentiation of RAS and CAS neurons in the leech nerve cord*. J Neurosci, 1990. **10**(10): p. 3183-93.
106. Gan, W.B. and E.R. Macagno, *Developing neurons use a putative pioneer's peripheral arbor to establish their terminal fields*. J Neurosci, 1995. **15**(5 Pt 1): p. 3254-62.
107. Becker, T.S., et al., *Identified central neurons convey a mitogenic signal from a peripheral target to the CNS*. Development, 1996. **122**(8): p. 2331-7.
108. Jellies, J., K.M. Johansen, and J. Johansen, *Ectopic CNS projections guide peripheral neuron axons along novel pathways in leech embryos*. Dev Biol, 2000. **218**(2): p. 137-45.
109. Duan, Y., et al., *Repair and regeneration of functional synaptic connections: cellular and molecular interactions in the leech*. Cell Mol Neurobiol, 2005. **25**(2): p. 441-50.
110. Korneev, S., et al., *cDNA libraries from identified neurons*. Proc Biol Sci, 1996. **263**(1366): p. 57-62.

111. Korneev, S., et al., *A subtractive cDNA library from an identified regenerating neuron is enriched in sequences up-regulated during nerve regeneration*. *Invert Neurosci*, 1997. **3**(2-3): p. 185-92.
112. Wong, V.Y., et al., *The leech homeobox gene *Lox4* may determine segmental differentiation of identified neurons*. *J Neurosci*, 1995. **15**(8): p. 5551-9.
113. Aisemberg, G.O., T.R. Gershon, and E.R. Macagno, *New electrical properties of neurons induced by a homeoprotein*. *J Neurobiol*, 1997. **33**(1): p. 11-7.
114. Baker, M.W. and E.R. Macagno, *RNAi of the receptor tyrosine phosphatase *HmLAR2* in a single cell of an intact leech embryo leads to growth-cone collapse*. *Curr Biol*, 2000. **10**(17): p. 1071-4.
115. Biswas, S.C., et al., *Association of *LAR*-like receptor protein tyrosine phosphatases with an enabled homolog in *Hirudo medicinalis**. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **21**(4): p. 657-70.
116. von Bernhardi, R. and K.J. Muller, *Repair of the central nervous system: lessons from lesions in leeches*. *J Neurobiol*, 1995. **27**(3): p. 353-66.
117. Luebke, A.E., I.M. Dickerson, and K.J. Muller, *In situ hybridization reveals transient laminin B-chain expression by individual glial and muscle cells in embryonic leech central nervous system*. *J Neurobiol*, 1995. **27**(1): p. 1-14.
118. Blackshaw, S.E., et al., *Promotion of regeneration and axon growth following injury in an invertebrate nervous system by the use of three-dimensional collagen gels*. *Proc Biol Sci*, 1997. **264**(1382): p. 657-61.
119. Chen, A., et al., *Nitric oxide influences injury-induced microglial migration and accumulation in the leech CNS*. *J Neurosci*, 2000. **20**(3): p. 1036-43.
120. Kumar, S.M., et al., *Nerve injury induces a rapid efflux of nitric oxide (NO) detected with a novel NO microsensor*. *J Neurosci*, 2001. **21**(1): p. 215-20.
121. Stefano, G.B., B. Salzet, and M. Salzet, *Identification and characterization of the leech CNS cannabinoid receptor: coupling to nitric oxide release*. *Brain Res*, 1997. **753**(2): p. 219-24.
122. Matias, I., et al., *Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis**. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001. **87**(2): p. 145-59.
123. Li, K.W., et al., *Structural identification, neuronal synthesis, and role in male copulation of myomodulin-A of *Lymnaea*: a study involving direct peptide profiling of nervous tissue by mass spectrometry*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1994. **25**(3-4): p. 355-8.
124. Dreisewerd, K., et al., *Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in *Lymnaea stagnalis**. *Int. J. Mass Spectrom.*, 1997. **169**: p. 291-299.
125. Li, L., et al., *In situ sequencing of peptides from biological tissues and single cells using MALDI-PSD/CID analysis*. *Anal Chem*, 1999. **71**(24): p. 5451-8.
126. Garden, R.W., et al., *Excess salt removal with matrix rinsing: direct peptide profiling of neurons from marine invertebrates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. *J Mass Spectrom*, 1996. **31**(10): p. 1126-30.
127. Blewitt, E.S., T. Pogmore, and I.C. Talbot, *Double embedding in agar/paraffin wax as an aid to orientation of mucosal biopsies*. *J Clin Pathol*, 1982. **35**(3): p. 365.
128. Vergote, D., et al., *Proteome modifications of the medicinal leech nervous system under bacterial challenge*. *Proteomics*, 2006.
129. Meistermann, H., et al., *Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: Transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat*. *Mol Cell Proteomics*, 2006.
130. Bazan, N.G., *Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress*. *Brain Pathol*, 2005. **15**(2): p. 159-66.
131. Lukiw, W.J., et al., *A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(10): p. 2774-83.
132. Di Marzo, V. and I. Matias, *Endocannabinoid control of food intake and energy balance*. *Nat Neurosci*, 2005. **8**(5): p. 585-9.
133. Hayashi, H., et al., *A seed for Alzheimer amyloid in the brain*. *J Neurosci*, 2004. **24**(20): p. 4894-902.
134. Stefano, G.B., et al., *Morphine- and anandamide-stimulated nitric oxide production inhibits presynaptic dopamine release*. *Brain Res*, 1997. **763**(1): p. 63-8.
135. Stefano, G.B., et al., *Anandamide amidase inhibition enhances anandamide-stimulated nitric oxide release in invertebrate neural tissues*. *Brain Res*, 1998. **793**(1-2): p. 341-5.
136. Salzet, M., et al., *Comparative biology of the endocannabinoid system possible role in the immune response*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(16): p. 4917-27.
137. Salzet, M. and G.B. Stefano, *The endocannabinoid system in invertebrates*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002. **66**(2-3): p. 353-61.
138. Eljaschewitsch, E., et al., *The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of *MKP-1* in microglial cells*. *Neuron*, 2006. **49**(1): p. 67-79.

139. Salzet, M., *Invertebrate molecular neuroimmune processes*. Brain Res Brain Res Rev, 2000. **34**(1-2): p. 69-79.
140. Touboul, D., A. Brunelle, and O. Laprevote, *Structural analysis of secondary ions by post-source decay in time-of-flight secondary ion mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2006. **20**(4): p. 703-9.
141. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*. J Biol Chem, 1957. **226**(1): p. 497-509.
142. Ogawa, M., et al., *Effect of oleic acid on mitochondrial oxidative phosphorylation in rat brain slices*. Biochem Int., 1988 **4**: p. 773-82.
143. Yanagisawa, K., et al., *Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer*. Lancet, 2003. **362**(9382): p. 433-9.
144. Chaurand, P., et al., *Integrating histology and imaging mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(4): p. 1145-55.
145. Shimma, S., et al. *Applications of conductive film as a sample support material for direct tissue mass spectrometry*. in *54th ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2006. Seattle, Washington.
146. Xu, B.J., et al., *Direct analysis of laser capture microdissected cells by MALDI mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2002. **13**(11): p. 1292-7.
147. Palmer-Toy, D.E., et al., *Direct acquisition of matrix-assisted laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectra from laser capture microdissected tissues*. Clin Chem, 2000. **46**(9): p. 1513-6.
148. Crecelius, A.C., et al., *Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(7): p. 1093-9.
149. Galicia, M.C., A. Vertes, and J.H. Callahan, *Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization in transmission geometry*. Anal Chem, 2002. **74**(8): p. 1891-5.
150. Knochenmuss, R., *Photoionization pathways and free electrons in UV-MALDI*. Anal Chem, 2004. **76**(11): p. 3179-84.
151. Fournier, I., J.C. Tabet, and G. Bolbach, *Irradiation effects in MALDI and surface modifications Part I: Sinapinic acid monocrystals*. Int. J. Mass Spectrom., 2002. **219**(3): p. 515-523.
152. Fournier, I., et al., *Hysteresis effects observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals*. Int. J. Mass Spectrom. and Ion processes, 1997. **169-170**: p. 19-29.
153. McComb, M.E., et al., *Use of a non-porous polyurethane membrane as a sample support for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides and proteins*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1997. **11**(15): p. 1716-22.
154. Guittard, J., X.L. Hronowski, and C.E. Costello, *Direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of glycosphingolipids on thin layer chromatographic plates and transfer membranes*. Rapid Commun Mass Spectrom, 1999. **13**(18): p. 1838-49.
155. Ogorzalek Loo, R.R., et al., *Sensitivity and mass accuracy for proteins analyzed directly from polyacrylamide gels: implications for proteome mapping*. Electrophoresis, 1997. **18**(3-4): p. 382-90.
156. Ogorzalek Loo, R.R., et al., *Mass Spectrometry of Proteins Directly from Polyacrylamide Gels*. Anal. Chem., 1996. **68**(11): p. 1910-1917.
157. Zaluzec, E.J., et al., *Direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometric analysis of proteins immobilized on nylon-based membranes*. J Am Soc Mass Spectrom, 1994. **5**(4): p. 230-237.
158. Nygren, H., B.R. Johansson, and P. Malmberg, *Bioimaging TOF-SIMS of tissues by gold ion bombardment of a silver-coated thin section*. Microsc Res Tech, 2004. **65**(6): p. 282-6.
159. Nygren, H. and P. Malmberg, *Silver deposition on freeze-dried cells allows subcellular localization of cholesterol with imaging TOF-SIMS*. J Microsc, 2004. **215**(Pt 2): p. 156-61.
160. Adriaensen, L., F. Vangaever, and R. Gijbels, *Metal-assisted secondary ion mass spectrometry: influence of Ag and Au deposition on molecular ion yields*. Anal Chem, 2004. **76**(22): p. 6777-85.
161. Delcorte, A., N. Medard, and P. Bertrand, *Organic secondary ion mass spectrometry: sensitivity enhancement by gold deposition*. Anal Chem, 2002. **74**(19): p. 4955-68.
162. Wahl, M.C., et al., *Thin gold film-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of biomolecules*. Anal. Chem., 1993. **65**(24): p. 3669-3676.
163. Lai, E.P.C., S. Owega, and R. Kulczycki, *Time-of-flight mass spectrometry of bioorganic molecules by laser ablation of silver thin film substrates and particles*. J. Mass Spectrometry, 1998. **33**(6): p. 554-564.
164. Stoeckli, M., et al. *MALDI MSI of Compounds and Metabolites in Whole-body Tissue Sections* in *53th ASMS Conference on Mass Spectrometry*. 2005. San Antonio, Texas.
165. Scherl, A., et al., *Gold coating of non-conductive membranes before matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometric analysis prevents charging effect*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005. **19**(5): p. 605-10.

166. Juhasz, P., M.L. Vestal, and S.A. Martin, *On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra*. J Am Soc Mass Spectrom, 1997. **8**(3): p. 209-217.
167. Dreisewerd, K., *The desorption process in MALDI*. Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 395-426.
168. Karas, M. and R. Kruger, *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*. Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 427-40.
169. Knochenmuss, R. and R. Zenobi, *MALDI ionization: the role of in-plume processes*. Chem Rev, 2003. **103**(2): p. 441-52.
170. Einstein, A., *Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt*. Ann. d. Phys., 1905. **17**: p. 132-148.
171. Hillenkamp, F. and K. Dreisewerd. in *49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. 2001. Chicago (IL).
172. Jurchen, J.C., S.S. Rubakhin, and J.V. Sweedler, *MALDI-MS Imaging of Features Smaller than the Size of the Laser Beam*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(10): p. 1654-1659.
173. Dreisewerd, K., et al., *Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile*. Int. J. Mass Spectrom. and Ion processes, 1995. **141**(2): p. 127-148.
174. Anderson, J.R., et al., *Fabrication of topologically complex three-dimensional microfluidic systems in PDMS by rapid prototyping*. Anal Chem, 2000. **72**(14): p. 3158-64.
175. Dreisewerd, K., et al., *Molecular Profiling of Native and Matrix-Coated Tissue Slices from Rat Brain by Infrared and Ultraviolet Laser Desorption/Ionization Orthogonal-Time-of-Flight Mass Spectrometry*. à soumettre, 2006.
176. Verplanck, N., et al. *Nanostructured Surface as EWOD Counter Electrode for Matrix-Free Mass Spectrometry Analysis*. in *10th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2006)*. 2006. Tokyo.
177. Lemaire, R., et al., *Tag-Mass: Specific Molecular Imaging of Transcriptome and Proteome by Mass Spectrometry Based on Photocleavable Tag*. Soumis, 2006.
178. Fournier, I., et al., *Use of ionic matrix and Tagmass for MS analysis of tissues*. 2005.

Annexe I: MALDI-MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity Using Organic Treatments

Annexe II: Nanostructured Surface as Ewood Counter Electrode for Matrix-Free Mass Spectrometry Analysis

Annexe III: New developments in MALDI imaging for Pathological proteomic studies

Annexe IV: Imagerie MALDI : Une nouvelle technologie pour découvrir et valider de nouveaux biomarqueurs

Annexe V: Tag-Mass: Specific Molecular Imaging of Transcriptome and Proteome by Mass Spectrometry Based on Photocleavable Tag

MALDI-MS Direct Tissue Analysis of Proteins: Improving Signal Sensitivity Using Organic Treatments

R. Lemaire,^{†,‡} M. Wisztorski,[†] A. Desmons,[†] J. C. Tabet,[‡] R. Day,[§] M. Salzet,[†] and I. Fournier^{*,†}

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annelides, FRE CNRS 2933, Bât SN3, 1^{er} étage, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Synthèse, Structure et Fonction de Molécules Bioactives, UMR-CNRS 7613, Boîte 45, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France, and Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

Direct tissue analysis using MALDI-MS allows the generation of profiles while maintaining the integrity of the tissue, displaying cellular localizations and avoiding tedious extraction and purification steps. However, lower spectral quality can result from direct tissue analysis due to variations in section thickness, the nature of the tissue, and the limited access to peptides/proteins due to high lipid content. To improve signal sensitivity, we have developed a tissue-washing procedure using organic solvents traditionally used for lipid extraction, i.e., CHCl₃, hexane, toluene, acetone, and xylene. The increased detection for peptides/proteins (m/z 5000–30 000) is close to 40% with chloroform or xylene, and 25% with hexane, while also improving sample reproducibility for each solvent used in the present study. This strategy improved matrix cocrystallization with tissue peptides/proteins and more importantly with cytoplasmic proteins without delocalization. The extracted lipids were characterized by nanoESI-QqTOF/MS/MS using the precursor ion mode, lithium adducts, or both and were identified as phospholipids including phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, and lysophosphatidylinositol, confirming membrane lipid extraction from the tissues.

Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI)^{1,2} is now an extensively used and hard to circumvent technique for biomolecular analysis of peptides/proteins, glycoproteins, sugars, lipids, and even oligonucleotides. It is a revolutionary technology for proteomic studies when combined with traditional separation techniques such as gel electrophoresis or liquid chromatography. However, such strategies lead to loss of the localization of the biomolecules inside the tissue. Using direct analysis of tissues and by extension molecular imaging by mass spectrometry, this

difficulty can be overcome.³⁴ Since, its introduction by Caprioli and collaborators, MALDI direct analysis and imaging of peptides/proteins were successfully used for the analyses of different tissues and different applications.^{4–8} More recently, MALDI imaging has been extended to lipid and drug analyses.^{9–15} Several fundamental developments have also contributed to improvements in MALDI imaging performance in instrumentation, sample preparation, and informatics treatment. Several applications have already been established for this technology for drug biodistribution studies,^{13,16} biomarker discovery, or understanding molecular mechanisms.^{4,6,17,18} The application of MALDI imaging is a promising technique for pathologies such as cancers or diseases related to aging or metabolic disorders.

Increasing the representation and the reproducibility of analysis is difficult since tissues are highly complex matrixes including a wide range of biomolecules such as peptides/proteins, oligonucleotides, sugars, and lipids present in various quantities. In

- (3) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9–14.
- (4) Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3125–3135.
- (5) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751–4760.
- (6) Chaurand, P.; Sanders, M. E.; Jensen, R. A.; Caprioli, R. M. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1057–1068.
- (7) Crecelius, A. C.; Williams, B.; Cornett, D. S.; Dawant, B. M.; Bodenheimer, R. E.; Lepage, M.; Niermann, K. J.; Caprioli, R. M., Nashville TN, 2004.
- (8) Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493–496.
- (9) Touboul, D.; Piednoel, H.; Voisin, V.; De La Porte, S.; Brunelle, A.; Halgand, F.; Laprevote, O. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Engl.)* **2004**, *10*, 657–664.
- (10) Tempez, A.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A.; Novikov, A.; Della-Negra, S.; Lebeyec, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Smentkowski, V. S.; Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 540–545.
- (11) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Toxicol. Pathol.* **2005**, *33*, 92–101.
- (12) Hsieh, Y.; Casale, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 965–972.
- (13) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 1081–1092.
- (14) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoeckli, M. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126*, 177–185.
- (15) Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; McEuen, J.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6682–6686.
- (16) Bunch, J.; Clench, M. R.; Richards, D. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3051–3060.
- (17) Caldwell, R. L.; Caprioli, R. M. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4*, 394–401.
- (18) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2004**, *3*, 245–252.

* Corresponding author. E-mail: isabelle.fournier@univ-lille-1.fr.

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille.

[‡] Université Pierre et Marie Curie.

[§] Université de Sherbrooke.

(1) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193A–1203A.

(2) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299–2301.

61 this regard, tissue sections are more complex samples to analyze
62 than separated or purified ones. For example, it is observed that
63 analytical quality, especially for peptides/proteins, is excellent for
64 freshly dissected tissue samples but that signal intensity decreases
65 drastically with the length of time of conservation. Signal decrease
66 is due to a low signal-to-noise ratio and poor reproducibility. After
67 one-year storage, even at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, it is difficult to obtain good
68 peptide/protein spectra for tissues. This phenomenon of tissue
69 aging must be pointed out when experiments in direct profiling
70 or MALDI imaging are undertaken. In fact, it is not always possible
71 to analyze freshly prepared samples especially when working in
72 the clinical field, where samples are difficult to collect and are
73 stored in centralized tissue repositories. It is therefore of even
74 greater importance to find tissue treatments that can ensure a
75 good signal for peptides/proteins from such samples by MALDI.
76 In a previous publication, the addition of an ethanol washing step
77 was introduced to reduce salts and hemoglobin contaminants on
78 the tissue surface.¹⁹ To make further improvements, compatible
79 with protein profiling, we tested washing tissues with organic
80 solvents traditionally used for lipids extraction, e.g., chloroform,^{20,21}
81 hexane,²² or xylene. This strategy resulted in marked improve-
82 ments of matrix access to peptides and proteins in the tissue
83 sections and more particularly to the ones located in the cytoplasm
84 without any delocalization of the proteins.

85 EXPERIMENTAL SECTION

86 **Materials.** α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic
87 acid (SA), angiotensin II, Des-Arg-bradykinin, substance P, ACTH
88 18–39, ACTH 7–38, and bovine insulin were obtained from Sigma-
89 Aldrich and used without any further purification. Trifluoroacetic
90 acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile
91 p.a. and methanol p.a. from J. T. Baker.

92 **Tissue Preparation.** Adult male Wistar rats weighing 250–
93 350 g (animal welfare accreditation by the French ministry of the
94 agriculture No. 04860) maintained under standard care were used.
95 Animals were sacrificed by decapitation and immediately dissected
96 to remove the brain. Frozen sections of $15\text{ }\mu\text{m}$ were performed
97 on a cryostat and immediately transferred onto the MALDI
98 stainless steel plate. The matrix solution was applied to several
99 sections after 10 min of drying at room temperature. The rest
100 were kept for organic solvent treatments prior to matrix deposition
101 and MALDI analysis.

102 **Tissue Treatment.** Tissue sections were quickly rinsed using
103 different organic solvent. Typically, the rinsing was performed with
104 a glass syringe, using twice $200\text{ }\mu\text{L}$ of solvent/ cm^2 of tissue. During
105 the operation, the MALDI plate was inclined to drain excess
106 solvent and remove impurities or compounds extracted by the
107 treatment. After complete drying, matrix was applied onto the
108 tissue and dried at room temperature before MALDI analysis.

109 **Mass Spectrometry. (a) MALDI-MS Direct Analysis.**
110 MALDI-TOF mass spectra were performed on a Voyager-DE STR
111 mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) with
112 delayed extraction (DE) and a 337-nm pulsed nitrogen laser. Either

HCCA or SA was used at concentrations of 10 and 20 mg/mL, 113
114 respectively, in acetonitrile (ACN)/0.1% TFA– H_2O (2:1, v/v). Both
115 matrixes were applied onto the tissue using a micropipet (typically
116 $20\text{ }\mu\text{L}$ for a whole rat brain slice) and then dried at room
117 temperature. For compounds with $m/z < 10\,000$, HCCA matrix was
118 used and external calibration was performed using a mixed
119 solution of peptides (bradykinin $1.6\text{ }\mu\text{M}$, substance P $1.6\text{ }\mu\text{M}$,
120 ACTH 18–39 $1.6\text{ }\mu\text{M}$, ACTH 7–38 $1.6\text{ }\mu\text{M}$, bovine insulin $4.8\text{ }\mu\text{M}$,
121 and bovine ubiquitin $4.8\text{ }\mu\text{M}$ in H_2O). For higher masses, SA was
122 preferred as matrix and hemoglobin chain α (major) and hemo-
123 globin chain β (major) peaks were used as internal calibrants.⁵
124 Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD
125 camera (Sony). Each recorded mass spectrum is resulting from
126 the average of 200 laser shots on the area of interest. Acquisition
127 parameters were set as follow: HCCA matrix (mass range 1000–
128 10000): acceleration voltage 25 kV, first grid voltage 94%, guide-
129 wire voltage 0.05%, and extraction delay time 200 ns. SA matrix
130 (mass range 2000–30000): acceleration voltage 25 kV, first grid
131 voltage 94%, guide-wire voltage 0.2%, and extraction delay time
132 300 ns.

133 **(b) MALDI Imaging Experiments.** For MALDI-IMS, imaging
134 was performed on an Ultraflex LIFT-TOF/TOF (Bruker Daltonics,
135 Bremen, DE) using the ionic matrix HCCA/ANI for peptides
136 (below 5000 Da) in positive reflector mode¹⁵ and sinapinic acid
137 (20 mg in ACN/TFA 0.1% in H_2O (1:1, v/v)) for compounds over
138 5000 Da in positive linear mode. For a better crystallization on
139 the tissue, the ionic matrix was prepared by increasing the volume
140 of base (1.5 equiv) added in HCCA (10 mg) dissolved in a volume
141 of 1 mL of ACN/0.1% TFA– H_2O (2:1, v/v).

142 Acquisition was realized using a 337-nm, pulsed nitrogen laser,
143 with a repetition rate of 50 Hz. For images reconstruction the
144 FlexImaging v. 1.0.6.0 software (Bruker Daltonics) was used. For
145 positive mode, 12 000 points covering the whole slice with 100
146 laser shots per position were scanned. From each position, the
147 software measures an average mass spectrum with its coordinates
148 on the slice. Images were reconstructed using the same param-
149 eters for treated and nontreated sections.

150 **(c) Nano ESI-QqTOF/MS and MS/MS Experiments.**
151 Analyses were performed on a QSTAR pulsar quadrupole time-
152 of-flight mass spectrometer (MDS Sciex) equipped with a nano-
153 electrospray ion source (Proxeon Biosystems). Spectra were
154 acquired in both the positive and negative modes after dissolving
155 compounds in $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CHCl}_3$ (9:1, v/v). Collision energy was set
156 at 45 eV for collisional activation. Precursor ion scan experiments
157 were performed in both the positive and negative mode (5 scans
158 at 800 ms), with 0.5 amu increments, at unit resolution for the
159 Q1 quadrupole. Acquisitions were done with Analyst QS software
160 and treated with the same software or “ m/z ” (Genomic Solutions
161 Inc.). For lithium adduct ions, samples were spiked using a 2 mM
162 LiCl solution.

163 **Immunohistochemistry.** Immunohistochemistry experiments
164 were performed according to classical protocols. Briefly, tissues
165 were placed in 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min and
166 then incubated at room temperature with $500\text{ }\mu\text{L}$ of a second buffer
167 (0.1 M PBS/1% BSA/1% normal goat serum/0.05% Triton X 100)
168 for 30 min. The same buffer was used to dilute the oxytocin
169 peptide antibody (1/200), and incubation was performed for 80
170 min at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. After 3 times washing in PBS, sections were

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

(20) Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.

(21) Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.

(22) Ferraz, T. P.; Fiuza, M. C.; Dos Santos, M. L.; Pontes De Carvalho, L.; Soares, N. M. *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004**, *58*, 187–193.

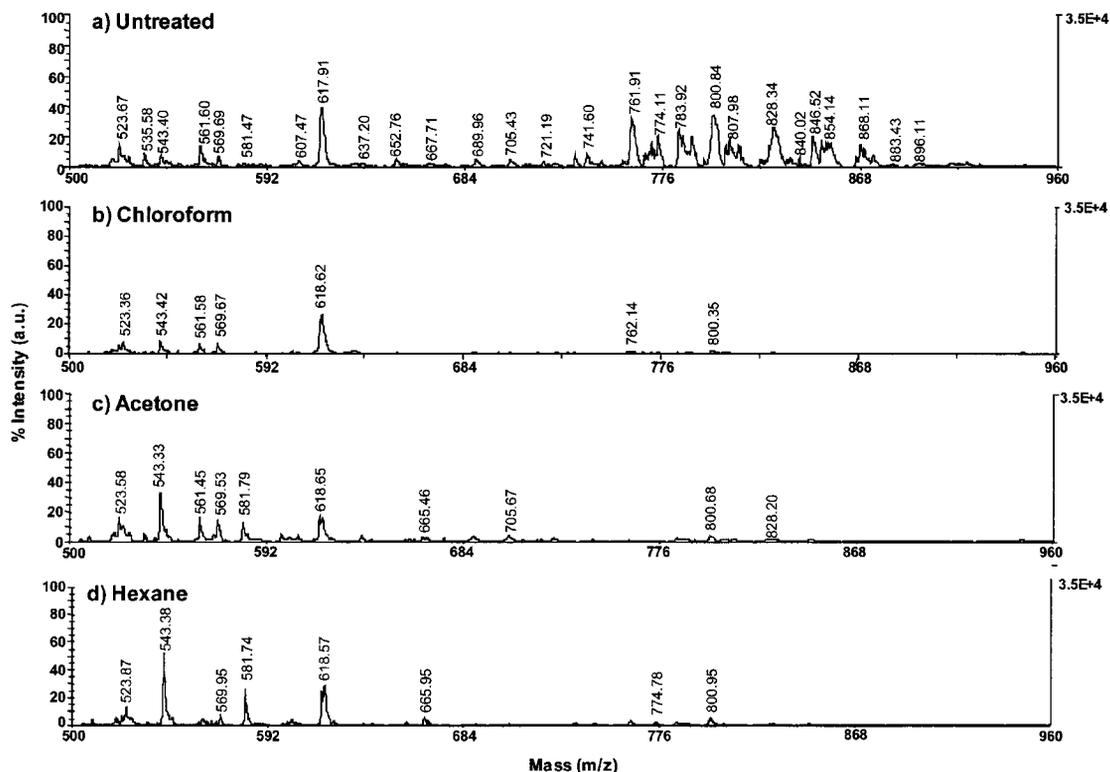


Figure 1. Low mass range region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive mode with HCCA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at -80°C .

incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat; Jackson Immunoresearch Inc. Europe Ltd.) during 80 min at 30°C . After another 3 washing steps, the sections were incubated in 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) with 0.05% H_2O_2 for detection. The DAB reacts with the peroxidase group of the secondary antibody, leading to a brown precipitate. Tissues were then compared using microscopy after additional washing in phosphate buffer and ultrapure water.

The procedure and the characterization of the antioxytocin used were according to the one from Salzet et al.²³

RESULTS AND DISCUSSION

The following organic solvents, chloroform, hexane, acetone, toluene, and xylene, were tested on rat brain tissue sections. Tissues were stored (-80°C storage) for periods ranging from freshly dissected to one-year storage, from which signals for peptides/proteins were very weak when compared to freshly dissected slices. The main difficulty with these experiments was linked to variations between animals and in the chemical composition of the different areas of the brain. Thus, care was taken to analyze the same area of each section on adjacent sections. To obtain a statistical analysis, experiments were repeated at least 5 times for each parameter. The first set of experiments was performed using HCCA as the matrix. In general, for long storage after treatment, the analyses revealed a signal increase in peptides/proteins as compared to untreated samples for all solvents.

A more detailed inspection of the mass spectra clearly shows a major signal decrease in the mass range 500–1000 for all solvents (Figure 1). This effect is particularly visible in chloroform-treated tissue. Signal loss in this region could be attributed to reduction of lipids by chloroform extraction, which is in good agreement with the chemistry of lipid extraction^{24–26} and lipid direct analysis.^{27,28} It must be noted that partial lipid removal simplifies the MALDI mass spectra in the low-mass range, thus allowing the identification of low-mass peptides that were masked by the high abundance of lipid peaks. As shown in Figure 1, the peak profiles are slightly different depending on the solvent use, which suggests specific extraction of certain classes of lipids depending on the treatment.

To study the increase of signal intensity in the mass ranges corresponding to proteins, experiments were repeated with SA as a matrix. This experimental set confirmed the increase in peak intensities for the mass range 5000–30 000 with chloroform and xylene showing a particularly clear effect (Figure 2) in comparison to untreated tissues. Table 1 summarizes the averaged results for all experiments. From the mass spectra (Figure 2), increased intensity is clearly observed after solvent treatment of the tissue. Table 1 also shows an increase in the number of detected compounds. On average, 26 more compounds were detected after

(23) Salzet, M.; Watzet, C.; Slomianny, M. C. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **1993**, *104*, 75–81.

(24) Hsu, F. F.; Turk, J. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 892–899.

(25) Hsu, F. F.; Turk, J. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 986–999.

(26) Hsu, F. F.; Turk, J. J. *Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 352–363.

(27) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4523–4527.

(28) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 2052–2056.

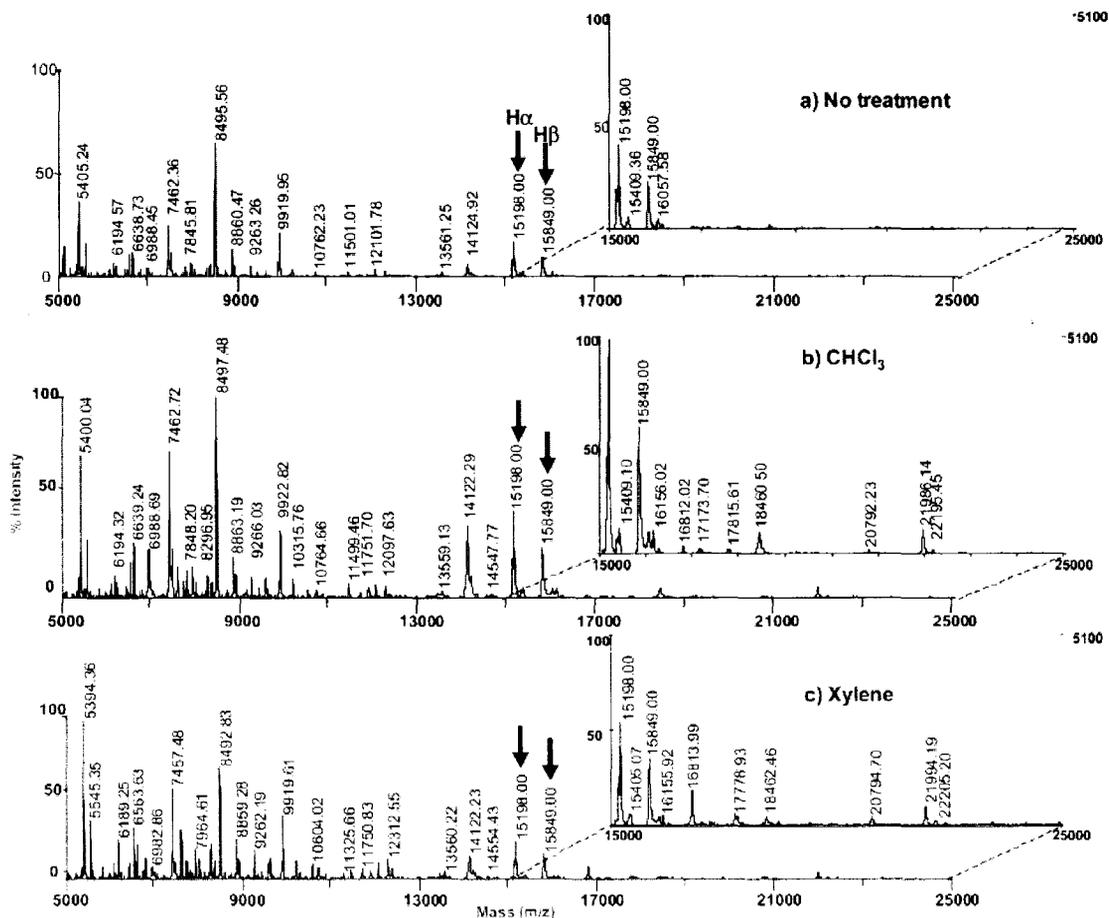


Figure 2. $m/z > 5000$ region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive ion mode with SA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. (a) Untreated sample, after tissue treatment with (b) chloroform and (c) xylene (the arrows indicate the peaks corresponding to hemoglobin α chain (major) or H α and hemoglobin β chain (major) or H β used as internal calibrants).

Table 1. Average Number of Detected Compounds, Standard Deviation, and Calculated Increase Detection for Peptides/Proteins of $m/z > 5000$ Determined from the Mass Spectra Recorded on Untreated Rat Brain Sections versus Organic Solvent Treated Ones

treatment	n^a	no. of detected compds	standard deviation (%)	increase in detection (%)
chloroform	10	81	22	34
hexane	5	75	28	25
toluene	5	68	22	13
xylene	5	86	13	44
acetone	5	64	29	7
untreated	10	60	34	0

^a Number of experiments.

220 treatment with xylene and 21 more with chloroform, for an
 221 increase in detection of peptides/proteins of 44 and 34%, respec-
 222 tively. A decrease in standard deviations and an improvement in
 223 reproducibility were registered after treatment of the tissue for
 224 all solvents tested. The same trend was observed when treating
 225 freshly dissected tissues. However, the effect was less significant
 226 for these tissues and was more dependent on the rat brain region

227 probed; i.e., it presumably depended on the lipid versus peptide/
 228 protein composition of the region. Hence, increase in protein
 229 detection is directly related to lipid decrease, presumably due to
 230 lipid extraction, giving easier access to intracellular proteins by
 231 breaching the cell membrane. To optimize protein analyses,
 232 detected peak numbers and intensities were studied as a function
 233 of the solvent volume used for the rinsing step. Volumes of 50–
 234 500 μL were tested. Treatment times were not considered as a
 235 variable due to the high volatility of some solvents. Under our
 236 experimental conditions, we did not observe major differences with
 237 increased volumes. A solvent volume of 200 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ appeared to
 238 be sufficient for optimal results. On the other hand, the washing
 239 procedure has to be repeated twice to get optimal reproducibility.
 240 Rinsing of the sample was preferred to dipping in bath of solvent
 241 to avoid loss of tissue, through detachment from the support. Since
 242 ethanol tissue treatment was previously described by Schwartz
 243 et al.¹⁹ to remove salts, we therefore compared ethanol treatment
 244 to chloroform and xylene treatments (Figure 3). Our data show
 245 that signal intensity, signal-to-noise ratio, and number of peaks
 246 were always higher using either xylene or chloroform.

247 Considering each of the solvent properties, we conclude that
 248 improved detection and reproducibility is related to the decreased
 249 lipid levels in the tissue sections. However, since low-abundance

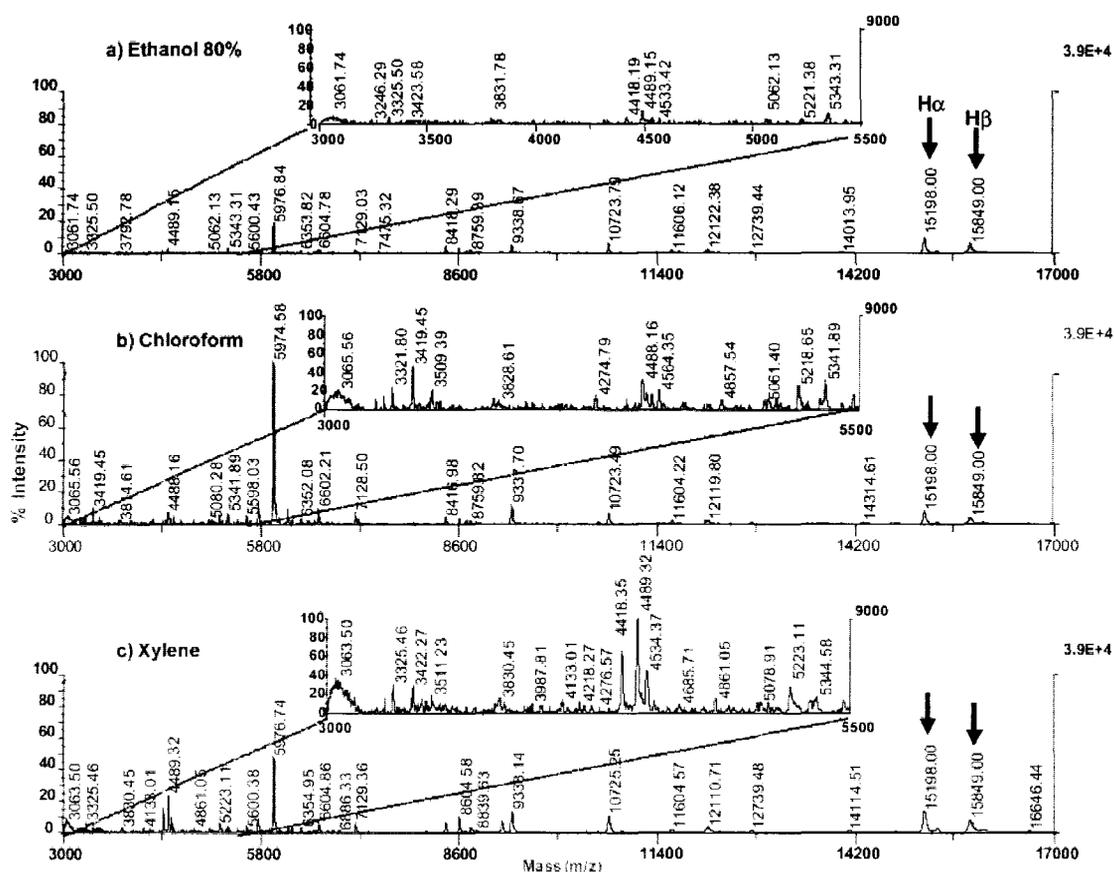


Figure 3. $m/z > 3000$ region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive ion mode with SA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at -80°C , after tissue treatment with (a) 80% ethanol, (b) chloroform, and (c) xylene (the arrows indicate the peaks corresponding to hemoglobin α chain (major) or H α and hemoglobin β chain (major) or H β used as internal calibrants).

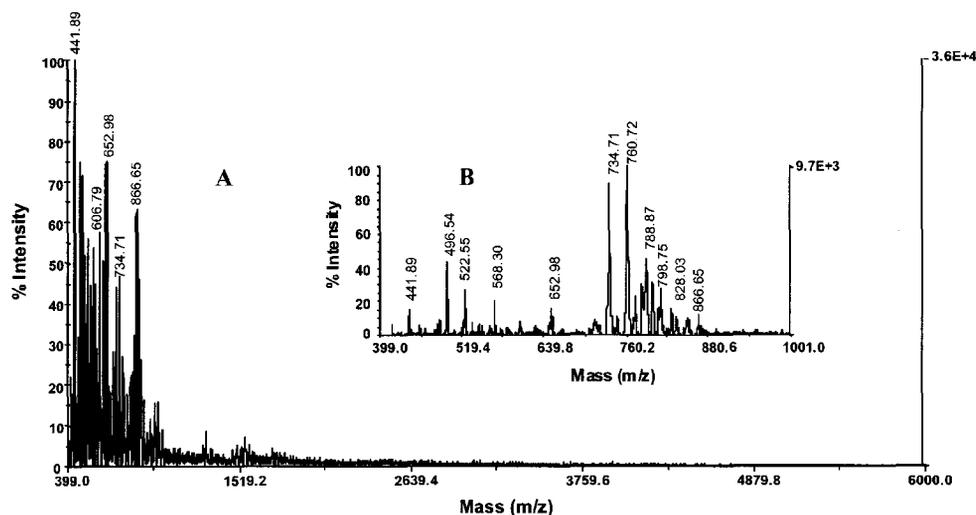


Figure 4. MALDI-TOF mass spectra using HCCA as matrix in the linear positive mode of the chloroform rinsing solution collected after tissue treatment. (A) 400–6000 and (B) 400–1000 m/z .

peaks corresponding to lipids remain observable on the mass spectra (Figure 1), washing did not allow the total removal of lipids. We conclude that increased detection is most likely due to the opening of the lipidic bilayer and that the solvent acts more as a “peeling” agent. This effect would permit a better cocrystal-

lization of peptides/proteins contained in the cytoplasm within the MALDI matrix crystals.

To evaluate the validity of this hypothesis, washing solutions were analyzed after tissue treatment. Five rinsing solutions of each solvent were collected after the tissue treatment. The solutions

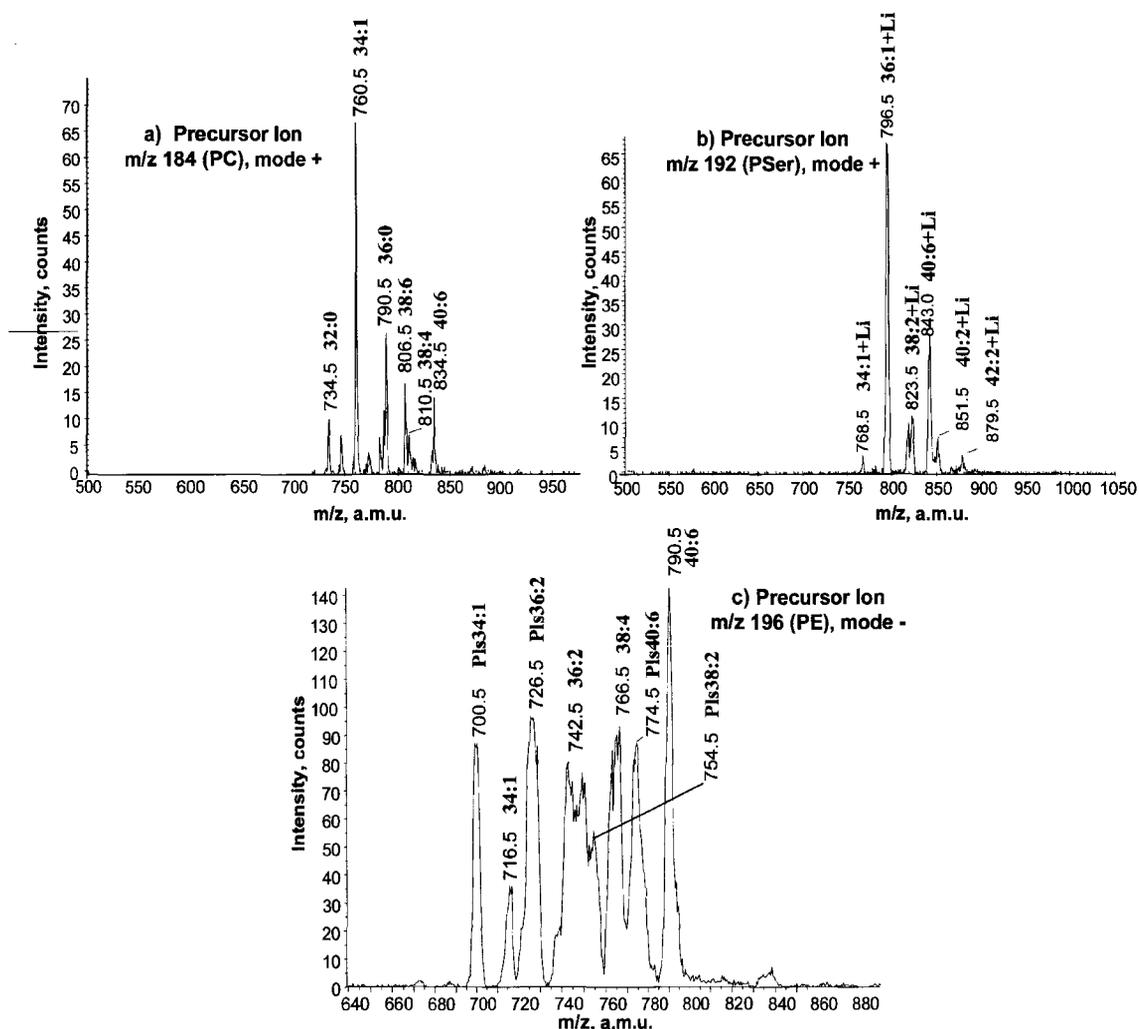


Figure 5. CID precursor ion spectra using nanoESI-QqTOF by analyzing the extracts collected after tissue treatment with chloroform for (a) m/z 184 (phosphatidylcholine) in positive mode, (b) m/z 192 (phosphatidylserine) with lithium adducts in positive mode, and (c) m/z 196 (phosphatidylethanolamine or plasmonylethanolamine) in negative mode.

260 were evaporated under a N_2 stream, dissolved in chloroform/
 261 methanol, and then analyzed by MALDI-TOF and nanoESI-
 262 QqTOF. MALDI-TOF analyses were performed with both HCCA
 263 and SA matrixes. In none of the cases, did we observe peptide/
 264 protein peaks that would usually be seen in the tissue section as
 265 shown in Figure 4A for chloroform with HCCA as matrix. On the
 266 other hand, the presence of lipids was confirmed for all solvents.
 267 Also shown in Figure 4B for chloroform with HCCA, lipids peaks
 268 are observed in the 400–1000 mass range and signals around m/z
 269 800 are characteristic of phospholipids. The large number of lipids
 270 detected in one extract suggests the presence of a different class
 271 of lipids. A more detailed characterization of these lipids present
 272 in the chloroform extract was undertaken on a nanoESI-QqTOF
 273 by studying their CID spectra. As previously described,^{29–31}
 274 differentiation in lipid forms can be achieved on the basis of
 275 characteristic product ions. Phosphatidylinositol (PI) and liso-
 276 phosphatidylinositol (LPI) present a specific fragment ion at m/z

277 241, plasmylethanolamine (PlsEtn) and phosphatidylethanol-
 278 amine (PtdEtn) at m/z 196, and phosphatidylcholine (PC) at m/z
 279 184. By performing precursor ion scan mode analysis, each form
 280 of lipids can be assigned. In the case of the phosphatidylserine
 281 family (PSer), only neutral loss allows the identification of these
 282 compounds. As neutral loss mode is not available on a QTOF
 283 instrument, lithium salts were used to form lithium adducts and
 284 obtain a characteristic fragment at m/z 192 as described by Ekroos
 285 et al.³² Figure 5 presents the CID ion precursor spectra obtained
 286 for precursor ions corresponding to PC, PlsEtn, PtdEtn, and PSer
 287 families. For each type of lipid, several compounds are identified.
 288 PlsEtn can be distinguished from PtdEtn on the base of the
 289 molecular mass and the absence of detection of the second acyl
 290 group in MS/MS mass spectra (Figure 6a) as described in the
 291 work of Brouwers et al.³³ The position of the fatty acyl group on
 292 the glycerol backbone chain was elucidated according to the works

(29) Han, X.; Gross, R. W. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 367–412.

(30) Murphy, R. C.; Fiedler, J.; Hevko, J. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 479–526.

(31) Pulfer, M.; Murphy, R. C. *Mass Spectrom. Rev.* **2003**, *22*, 332–364.

(32) Ekroos, K.; Chernushevich, I. V.; Simons, K.; Shevchenko, A. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 941–949.

(33) Brouwers, J. F.; Vernooij, E. A.; Tielens, A. G.; van Golde, L. M. *J. Lipid Res.* **1999**, *40*, 164–169.

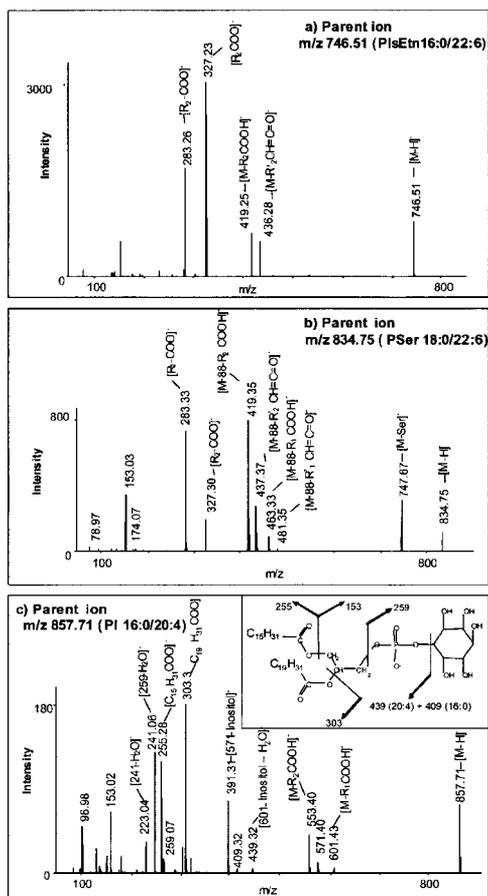


Figure 6. CID product ion spectra obtained on a nanoESI-QqTOF by analyzing the extracts collected after tissue treatment with chloroform.

Table 2. Assignment of Several Phospholipids Using Positive or Negative Precursor Ion Scanning and Product Ion Mode Experiments on NanoESI-QqTOF by Analysis of Chloroform Rinsing Extracts of Rat Brain Tissue Sections

<i>m/z</i>	polarity	identified lipid ^a	precursor ion
569.5	-	16:1-LPI	<i>m/z</i> 241 characteristic product ion of [M - H] ⁻ PI and LPI families
571.5	-	16:0-LPI	
599.5	-	18:0-LPI	
619.5	-	20:4-LPI	
655.5	-	22:0-PI	<i>m/z</i> 196 characteristic product ion of [M - H] ⁻ PIsEtN and PtdEtn families
857.5	-	16:0/20:4-PI	
885.5	-	18:0/20:4-PI	
909.5	-	40:6-PI	
700.7	-	34:1-PIsEtN	
716.5	-	34:1-PtdEtn	
726.5	-	36:2-PIsEtN	
742.5	-	36:2-PtdEtn	
746.5	-	16:0/22:6-PIsEtN	
750.5	-	38:4-PIsEtN	
754.5	-	38:2-PIsEtN	<i>m/z</i> 184 characteristic product ion of [M + H] ⁺ PC
766.5	-	18:0/20:4-PtdEtn	
774.5	-	40:6-PIsEtN	
790.5	-	18:0/22:6-PtdEtn	
734.5	+	16:0/16:0-PC	
760.5	+	16:0/18:1-PC	
790.5	+	36:0-PC	
806.5	+	38:6-PC	
810.5	+	38:4-PC	
814.5	+	38:2-PC	
834.5	+	18:0/22:6-PC	<i>m/z</i> 192 characteristic product ion of [M + Li] ⁺ P Ser ^r
768.5	+	34:1-P Ser	
796.5	+	36:1-P Ser	
823.5	+	38:2-P Ser	
843.0	+	18:0/22:6-P Ser	
851.5	+	40:2-P Ser	
879.5	+	42:2-P Ser	

^a Lipid abbreviations given in text.

of Hsu and Turk²⁴⁻²⁶ by performing CID parent ion scan as presented in example for P Ser 18:0/22:6 (Figure 6b) and PI 16:0/20:4 (Figure 6c). Most abundant identified lipids are summarized by class in Table 2. Several sulfatides were also detected but in lower abundance (data not shown). For the other solvents including xylene, the same lipids were identified. As expected, the abundant detection of phospholipids confirms that treatments specifically remove lipids from tissue surface, especially membrane lipids. Moreover, PtdEtn and P ser are known to be present in high concentration in the inner monolayer of plasma membranes, while PC is dominant in the outer monolayer.²⁹ But, more specific lipids such as PIsEtN known to be very abundant in neuronal cells³¹ were also detected.

Finally, analyses of the wash solutions from treated tissue show that no peptides/proteins are extracted from the tissue. On the contrary, many phospholipids are present, from both the outer and inner cellular membranes, confirming the hypothesis that lipid bilayer opening by the solvent facilitates matrix access to intracellular peptides/proteins for cocrystallization. Tissue treatment with solvents such as chloroform is advantageous when compared to other strategies¹⁹ based on the reduction of salts using ethanol or other types of alcohols. Indeed, using this approach, in our experience, results in extraction of hydrophilic peptides/proteins and explains the reduction of hemoglobin signal,¹⁹ whereas such

a phenomenon is not observed with xylene/chloroform treatments as demonstrated by the washing solutions' analysis. Peptide or protein removal by solvent treatments must really be considered to prevent the potential loss of information during direct analysis of tissue.

Considering these results, increased detection limits of peptide/proteins can be obtained for tissue profiling in MALDI-MS without extraction of peptides/proteins. However, this does not mean that peptides/proteins do not migrate from their original location under the solvent treatment effect or that the tissue keeps its integrity. Knowing that solvents such as chloroform or acetone induced precipitation of proteins,³⁴ migration of proteins at the tissue surface by solvent dragging effects was examined. Indeed, direct tissue analysis of specific area and MALDI imaging of tissue sections fully require localization and tissue structure preservation. To confirm the latter, we used an approach based on tissue observations using optical microscopy, direct analysis of tissues, and immunohistochemistry experiments. Microscopic examination of the tissue, after treatment and solvent evaporation, shows that the tissue section has turned white. However, no change in the tissue structure was observed, demonstrating that microscope observations remain valid after tissue treatment (data not shown). To check delocalization, we studied peptide/protein signals in

(34) Jiang, L.; He, L.; Fountoulakis, M. *J. Chromatogr., A* 2004, 1023, 317-320.

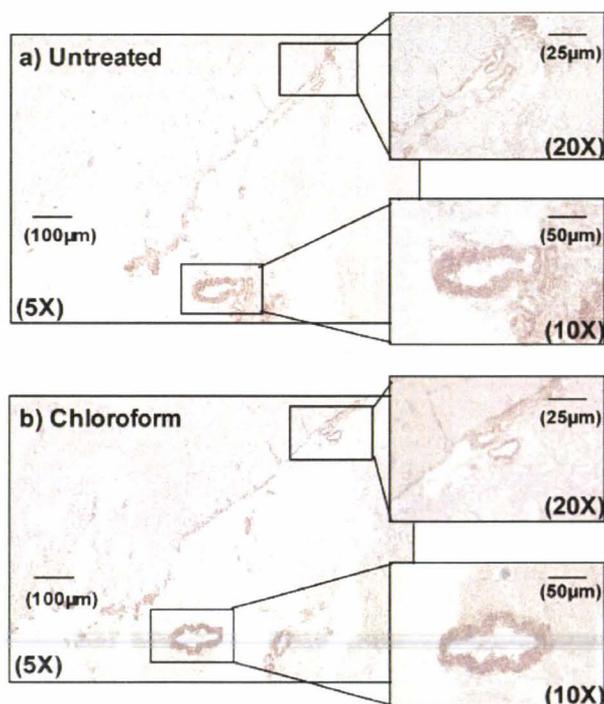


Figure 7. Immunohistochemistry staining for antibody directed against oxytocin of two adjacent rat brain sections (a) untreated and (b) rinsed with chloroform.

340 specific locations of treated and nontreated tissue of rat brain,
 341 known to contain specific peptides/proteins. Spectra of treated
 342 samples do not show major differences compared to nontreated
 343 ones showing no delocalization of compounds. However, immuno-
 344 histochemical validation is a more powerful strategy for compara-
 345 tive analysis. For immunohistochemistry experiments, two adja-
 346 cent rat brain sections were used, one section being treated with
 347 solvent and the other remaining untreated. The direct analysis of
 348 a section has confirmed the presence of the oxytocin peptide (M_w
 349 = 1010.2 amu) and protein precursor (M_w = 12 822.95 amu) in
 350 the tissue sections. Rabbit antibody against oxytocin was used
 351 on both sections. As shown in Figure 7 for treatment with

352 chloroform, antibody labeling of the two sections is similar,
 353 demonstrating the same localization of the peptides and its
 354 precursor in the treated (Figure 7b) and nontreated (Figure 7a)
 355 sections. Similar results were obtained using xylene. Thus,
 356 treatment of the tissue sections does not generate any delocali-
 357 zation of peptides/proteins and can be used for MALDI imaging.

358 To study this matrix accessibility phenomenon using organic
 359 solvents, MALDI-MS imaging experiments were performed on
 360 tissues before and after treatment of adjacent rat brain sections.
 361 In this way, the potential of MALDI imaging following organic
 362 solvent improvement without delocalization can be examined.
 363 Particular attention was given to older tissue sections in these
 364 experiments (at least 6 months conservation). As seen on the
 365 images obtained after scanning (Figure 8c), it is very difficult to
 366 recognize rat brain structures in these conserved tissues sections
 367 without treatment. Following treatment with chloroform, the
 368 sections turn white and brain structures appear more clearly. For
 369 these experiments, either HCCA/ANI or SA were used as matrix
 370 depending on the mass range of interest. HCCA/ANI was used
 371 to explore the low-mass range corresponding to peptides (m/z
 372 < 10 000) whereas SA was used for proteins with m/z > 10 000.
 373 For identified lipids, as expected, delocalization is observed with
 374 a decrease in the ion signal intensity. For peptides such as m/z
 375 1394 (Figure 8a) analyzed with HCCA/ANI, the effect of the tissue
 376 treatment is clear. Few ion signals with no correlated localization
 377 are observed from untreated tissues, while significant increase of
 378 signal is seen on the reconstructed images of chloroform-treated
 379 tissues, with localization much more in relation with the structures
 380 of the region. Figure 8b presents the images reconstructed from
 381 the data collected after acquisition from two adjacent rat brains
 382 sections: the first one untreated and the second one washed with
 383 chloroform and with sinapinic acid as matrix. Considering the
 384 higher mass protein, here m/z 14 306, a remarkable increase in
 385 signal intensity is observed between untreated and chloroform-
 386 treated samples. MALDI images of long conserved samples
 387 untreated and treated demonstrate clearly the effect of solvent
 388 treatment on the signal increase and localization correlation
 389 improvement of peptides/proteins with no observed delocalization.

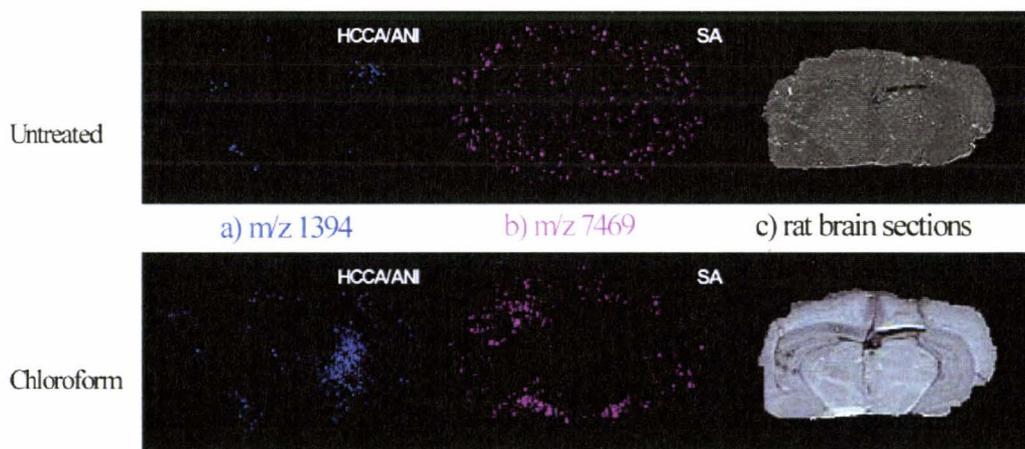


Figure 8. MALDI-LIFT-TOFTOF molecular images reconstructed from the data obtained by scanning two adjacent rat brain sections untreated (upper panel) and chloroform treated (lower panel) (a) for m/z 1394 with HCCA/ANI as matrix and (b) for m/z 14306 with SA as matrix compared to (c) pictures of the sections before matrix deposition for MALDI analysis.

CONCLUSION

Treatments with organic solvents such as chloroform, acetone, hexane, toluene, or xylene are an effective and rapid method for signal enhancement in MALDI direct tissue profiling. Solvent treatment effects provide impressive results for archived tissues which prior to these treatments did not allow proper detection. These studies demonstrate that solvent treatments remove, at least partially, lipids from the tissue surface. Among all the tested solvents, chloroform and xylene have proven to lead to the higher increase in signal intensity and number of detected peptides/proteins. Compared to previous studies with ethanol, chloroform/xylene solvent, rinsing is more specific for lipid removal and does not generate any delocalization or extraction of most soluble peptides/proteins as tested by immunohistochemistry experiments. However, this treatment does not reduce salt adducts as alcohol treatments. Application of this protocol is suitable for direct analysis profiling on tissues as well as for MALDI imaging applications. Moreover, the results suggest that it is possible to detect, after organic rinsing treatments, compounds that were masked by lipids in the tissue, like peptides/proteins present in the cytoplasm. As lipids from the outer and the inner membranes are identified from the washing extracts, we can assume that treatment opens lipid bilayers, increasing peptide/protein access for the MALDI matrix. Mostly, solvent and in particular chloroform or acetone will open the membrane layers inducing precipitation of the proteins at the surface of the tissue, resulting in cocrystallization between the matrix and the proteins. This aspect is

confirmed by the white color of the tissue, suggesting precipitation. For old tissues, a layer is present at the surface of the tissue section, probably due to the degradation of lipids and possibly oxidation due to the presence of air. Treatment with chloroform or xylene probably removes this layer and partially nondegraded lipids. Such treatments are a fast and efficient method for working on tissue stored for a long time in tissue banks and open the opportunity to work with old samples stored in hospital libraries from patients with pathologies.

ACKNOWLEDGMENT

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI Jeunes Chercheurs ACI JC4074 to I.F.), le Conseil Régional Nord-Pas de Calais to M. Wisztorski, and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to R.D.). Also supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics GmbH and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides. The authors acknowledge the Proteomic Plateforme of Lille, IFR 118, and thank Dr. A. S. Woods for her critical reading.

Received for review March 28, 2006. Accepted June 16, 2006.

AC060565Z

NANOSTRUCTURED SURFACE AS EWOD COUNTER ELECTRODE FOR MATRIX-FREE MASS SPECTROMETRY ANALYSIS

N. Verplanck¹, Y. Coffinier^{1,2}, M. Wisztorski³, G. Piret^{1,2}, C. Delhay³, V. Thomy¹,
I. Fournier³, JC. Camart¹, P. Tabourier¹ and R. Boukherroub^{1,2}

¹IEMN - UMR CNRS 8520, Cité scientifique, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France

²IRI, Cité scientifique, 59652 Villeneuve d'Ascq cedex, France

³Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Cité scientifique, 59652
Villeneuve d'Ascq, France

(vincent.thomy@iemn.univ-lille1.fr)

Abstract

This paper reports on the preparation of a superhydrophobic nanostructured surface consisting of chemically modified silicon nanowires for the realisation of EWOD counter electrode and matrix-free mass spectrometry analysis. The main advantages associated with such a substrate are: (i) flow resistance of droplets considerably reduced, (ii) simple realisation of hydrophilic and functionalized pads in the superhydrophobic surface allowing analytes trapping and enhancement of the liquid/surface interaction, (iii) subsequent analysis by matrix-free desorption/ionization MS-DIOS on these pads.

Keywords: EWOD, Superhydrophobic surfaces, Silicon nanowires, DIOS-MS

1. Introduction

Current digital microfluidic systems are often based on the electrowetting on dielectric (EWOD) effect which allows droplet handling basic operation [1]. So far, the best EWOD results obtained for MALDI analysis concern a set up consisting of two parallel plates, a base and a cover preventing from evaporation, between which microdroplets of biological liquid are sandwiched [2]. Classically, the base is made of an electrode array coated with a bilayer composed of a dielectric and an amorphous fluoropolymer plane layer. The cover, working as a counter electrode, is made of a conductive substrate (i.e. silicon) coated with the same amorphous fluoropolymer layer.

This paper reports on the preparation of a superhydrophobic nanostructured surface consisting of chemically modified silicon nanowires (SiNWs) for the realisation of EWOD counter electrode and matrix-free mass spectrometry analysis. The main advantages associated with such a substrate are: (i) flow resistance of droplets considerably reduced, (ii) simple realisation of hydrophilic and functionalized pads in the superhydrophobic surface allowing analytes trapping and enhancement of the liquid/surface interaction, (iii) subsequent analysis by matrix-free desorption/ionization MS-DIOS on these pads.

2. Theory

The silicon nanowires used in the present study were prepared by the so-called vapor-liquid-solid (VLS) mechanism [3-6]. The fundamental process is based on metal catalyst directed chemical vapor deposition of silicon. In this technique, the diameter of the nanowires is determined by the diameter of the catalyst particles and therefore, the method provides an efficient means to obtain uniform-sized nanowires (Figure 1).

First, a thin film (4 nm thick) of gold was evaporated on a silicon (Si) substrate. Gold nanoparticles with a high size distribution were obtained due to metal dewetting on the surface. Exposure of the gold-coated Si surface to silane gas (SiH_4) at a pressure of 100 mT at 540°C for 60 min (Q: 40 sccm) led to silicon nanowires growth. The obtained nanowires are terminated by gold seeds according to the VLS growth mechanism. They display a mean diameter comparable to the diameter of the initial gold nanoparticles catalyst and are several microns long as evidenced by SEM image (Figure 2).

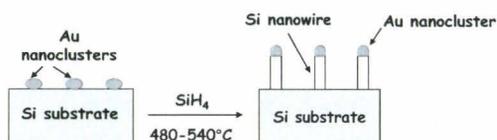


Figure 1. Silicon nanowires growth using VLS technique

Wettability of a solid surface is a characteristic property of materials and is controlled by both surface roughness and surface chemical composition. To reach superhydrophobicity, a combination of surface roughness and low surface energy is required [7]. In the present work, superhydrophobic SiNWs surfaces (contact angle $\sim 150^\circ$) were prepared by the combination of surface roughness and chemical modification with octadecyltrichlorosilane [8]. The surface roughness can be controlled by the SiNWs density. The as-grown SiNWs display a roughness of several hundreds nanometers as estimated by AFM imaging.

3. Experimental

The bottom plates were fabricated by using standard microfabrication techniques. The bottom glass plate consists of an array of independently addressable control electrodes (1 mm^2) patterned in a 10 nm thin nickel layer, which is further coated with a SU-8 layer ($2 \mu\text{m}$) as a dielectric (Figure 3). A hydrophobic layer of Teflon AF 1600 (20 nm) is then deposited (contact angle = 115°). Silicon nanowires are synthesized on silicon substrate (counter electrode) using the well-known Vapor-Liquid-Solid (VLS) technique (Presented in 2. Theory - Figure 1 and 2) [5]. The formation of a superhydrophobic layer on the silicon nanowires surface was achieved by chemical derivatization with octadecyltrichlorosilane (OTS) (contact angle = 149°) while the DIOS pads are prepared by a simple exposure of the octadecyl-terminated silicon nanowires surface to UV-ozone through a physical mask containing $20 \times 50 \mu\text{m}^2$ apertures. Thus, we can locally control the wetting properties of a macroscopic hydrophobic surface.

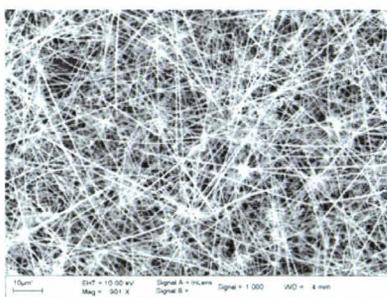


Figure 2: SEM view of SiNWs

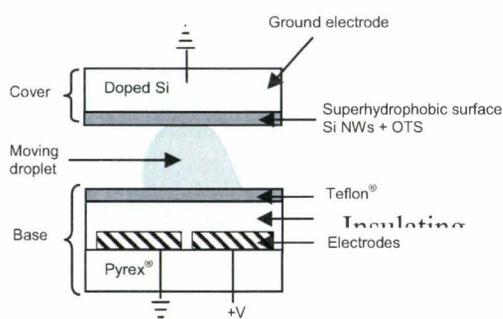


Figure 3: Set up of the EWOD platform

4. Results and discussion

The gap between two plates is 300 μm so that a 1 μL droplet of biological liquid (Substance P amide, 5.10 $\cdot 10^{-5}$ Mol.L $^{-1}$) can be moved under 68 V while 100 V were required to displace the same droplet with a classical cover (silicon wafer coated with Teflon).

Finally, mass spectrometry analysis of the targets in the hydrophilic DIOS pads is carried out using MALDI TOF-TOF with no organic matrix. It has been shown that silicon nanowires can successfully be used as a substrate for MS analysis without any organic matrix [9] (Figure 2).

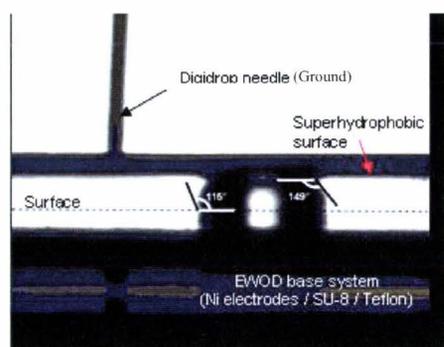


Figure 1: Droplet sandwiched between two plates system (base coated with Teflon, cover with NW / OTS)

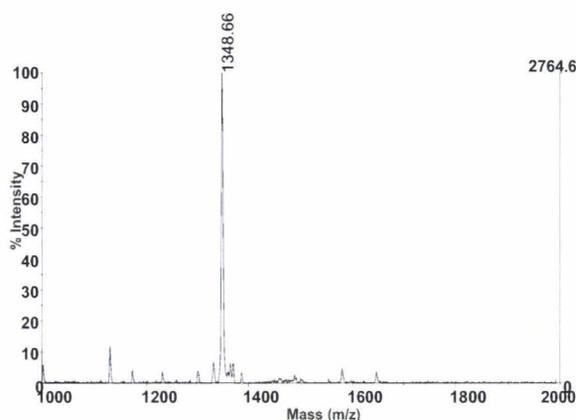


Figure 2: Mass spectrum of Substance P amide on VLS hydrophilic pad

5. Conclusions

EWOD and MALDI is often combined to allow sample displacement and analysis on the same chip. MALDI requires the use of a matrix which complicates the microsystem. We have shown that we can use superhydrophobic nanostructured counter electrode for EWOD displacement and as DIOS target. Moreover, the applied voltage dramatically decrease.

Acknowledgements

The Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Nord-Pas-de Calais region are gratefully acknowledged for financial support.

References

- [1] S.K. Cho, H. Moon and C.J. Kim, *J. Microelectromech. Syst.* **12**, 70 (2003)
- [2] A.R. Wheeler, H. Moon, C.A. Bird, R.R. O. Loo, C.J. Kim, J.A. Loo, R. L. Garrell, *Anal. Chem.* **77**, 534 (2005)
- [3] R. S. Wagner, W. C. Ellis, *Appl. Phys. Lett.* **4**, 889 (1964).
- [4] Y. Cui, X. Duan, J. Hu, C. M. Lieber, *J. Phys. Chem. B* **104**, 5213 (2000).
- [5] B. Salhi, B. Grandidier and R. Boukherroub, *J. Electroceram.* **16** (2006) 15-21
- [6] B. Salhi, B. Gelloz, N. Koshida, G. Patriarche, R. Boukherroub, *Phys. Stat. Sol. (C)* (accepted)
- [7] N. A. Patankar, *Langmuir* **20**, 8209 (2004)
- [8] R. Boukherroub et al. (to be published)
- [9] E. P. Go, J. V. Apon, G. Luo, A. Saghatelian, R. H. Daniels, V. Sahi, R. Dubrow, B. F. Cravatt, A. Vertes and G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **77**, 1641 (2005)

New developments in MALDI imaging for Pathological proteomic studies

Maxence Wisztorski, Remi Lemaire, Jonathan Stauber, Michel Salzet, Isabelle Fournier*

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, équipe Imagerie MALDI, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq

Abstract

With new emerging mass spectrometry technologies, it can now demonstrate that *direct tissue analysis* is feasible using matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) sources. A major advantage of direct MALDI analysis is to avoid time-consuming extraction, purification or separation steps, which have the potential for producing artifacts. Therefore, direct MALDI analysis in tissue sections enables the acquisition of cellular expression profiles while maintaining the *cellular and molecular integrity*. With automation and the ability to reconstruct complex spectral data with imaging software, it is now possible to produce *multiplex* imaging maps of selected bio-molecules within tissue sections. Thus, direct MALDI analysis obtained from tissue sections is convertible into imaging maps, a method now known as **MALDI-imaging**. MALDI-imaging combines the power of mass spectrometry, namely exquisite sensitivity and unequivocal structural information, within an intact and unaltered morphological context. However several novel developments in tissue preparation are necessary and are presented in this manuscript e.g. solvent treatment, new solid ionic matrices, gold sputtering, nickel support or laser focalization for increasing the image resolution. Furthermore, we have also developed the expertise to carry out this powerful technique on paraffin tissue sections opens up an archival “gold-mine” of existing pathology samples to proteomic analysis. All these new development will open the door to tissue study for biomarkers hunting, diagnostic treatment following. The introduction of the specific imaging will give another dimension by targeting specific disease-marker-gene RNA transcripts, following their expression within tissues and then confirming their translation by targeting their specific protein products or metabolites. Disease/health states will thus be closely molecularly monitored. Taken together, MALDI imaging will become a key tool for Pathological proteomic studies.

* corresponding author

Introduction

In the era of proteomic and high throughput, need for new technologies presenting higher sensitivity, versatility and specificity are sought. Classical proteomic is now a widely used strategy for obtaining information on proteins from organs or tissues as demonstrated by the numerous literatures in that field. Although, proteomic studies require homogenization of the sample as well as long, tedious and sample consuming extraction, purification and separation steps before characterization with loss of the initial location of the protein inside the tissue. Over these past ten years, improvements of mass spectrometry instruments together with growing importance of this method for compounds identification in the field of biology had lead to the development of direct analysis of tissue samples by the mean of mass spectrometry. Thus, mass spectrometry become an analysis tool allowing identification of compounds directly from tissues without any extraction or separation and adding one dimension to analysis with localization inside tissue samples. Thus, in one single experiments molecular information on hundreds proteins can be retrieved. By automation of this method and data processing, molecular images of compounds can be obtained from tissue slices. A big advantage of this method, rely on the sensitivity of mass spectrometry instruments giving access to hundred compounds molecular images after one set acquisition. MALDI ion sources are very well suited for this application since it gives access to very different biomolecules families ranging from peptides, proteins to oligonucleotides, sugars or lipids with a spatial resolution at the cells level. MALDI imaging was first introduced by Caprioli and collaborators [1] [2] [3] (Figure 1). Only few other groups are actually involved in the developments or applications of MALDI imaging. Some of these groups are present in Europe. We must mention the work of the group of Pr B. Spengler (Giessen, Germany) with the development of a new microprobe MALDI mass spectrometer combining Laser Microprobe Mass Spectrometer concept with a more refocused laser beam to increase images spatial resolution (SMALDI ou Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization) [4]. They also developed MALDI imaging instruments with atmospheric pressure MALDI (AP-MALDI). Some other developments are also studied by Pr. R.M.A. Heeren (FOHM institute, Netherlands) with a specific concept of imaging using an instrument in the microscope mode with a position detector allowing image reconstruction on the base of ion arrival position [5] [6]. Very interesting applications on aging diseases have also been reported by M. Stoeckli and coll. (Novartis Pharma, Switzeland) [7]. MALDI imaging of lipids [8-11] is also currently in development with especial work of the group of Pr. A. Woods. Neuroproteomic is well developed by the group of J. Sweedler [12-15] and our group develops tissue preparation and specific imaging [16] [17] [18] [19].

MALDI-imaging combines the power of mass spectrometry, namely exquisite sensitivity and unequivocal structural information, within an intact and unaltered morphological context. Furthermore, our unprecedented ability to carry out this powerful technique on paraffin tissue sections opens up an archival “gold-mine” of existing pathology samples to proteomic analysis.

New developments for a routine Pathological proteomic use

In this context, such a technology can be developed for drug biodistribution studies, biomarker discovery or for understanding molecular mechanism. At the present time, MALDI imaging will open the door to clinical proteomic which goal is to characterize cellular circuitry and to understand the impact of disease and therapy on

cellular networks through pathological tissue analysis. In fact more than a clinical proteomic tool, MALDI imaging is more a pathological proteomic investigation way. Pathological proteomics is the application of proteomic technologies and bioinformatic tools to clinical material through tumor analysis or fluid next to the tumor. The translational nature of this technology provides unique challenges and yet unimagined opportunities that promise to transform the way disease is detected, treated, and managed. Rather than focusing on genetic alterations that may lead to a particular disease, it is emerging that changes in protein expression patterns are the most accurate way to identify diseases in their early stages and to determine the most effective courses of treatment. Indeed, genome sequences fail to provide certainty for post-translational modification events such as glycosylation, phosphorylation, acylation or partial proteolysis. One of the most common objectives in proteomics is the study of protein expression patterns (e.g., protein profiling) associated with diseases. In contrast to existing diagnostic assays, which examine protein biomarkers one at a time, pathological proteomics is based on the simultaneous detection of hundreds or even thousands of proteins in a single assay directly from the tissue or the fluid close to the tissue. The effectiveness of pathological proteomics hinges on two technological components: rapid, multiplex protein detection assays and data analysis systems to assimilate vast amounts of protein expression data from healthy and diseased individuals into clinically relevant data sets. In the present initiative, we envisage the application of state-of-the-art peptide/protein profiling directly on tissues to study of multi-factorial diseases and to develop new methods based on nanotechnologies for high-throughput proteome characterization. Based on accumulated knowledge, we conclude that whatever the disease's molecular origin (e.g., inherited/acquired abnormalities of intracellular control or of bi-directional communication networks exerting homeostatic control), the corresponding affected tissues are characterized by abnormal patterns of protein/peptide expression and/or secretion.

Tissue preparation

As previously mentioned, the development of rapid and reliable diagnostics for the screening of human tissues (e.g., biopsies or smears) can be achieved through modern proteomics. The major technological advancements that we have done for MALDI-imaging allow the further identification of novel markers and *in situ* characterization from fresh sections/biopsy embedded in paraffin (e.g., including archived material).

As shown in the **Figure 1**, tissue sections from fresh organ or biopsy are laid out on the MALDI target. Sections first covered with a specific matrix depend to the nature of the biomolecule under study [20]. For peptides, very intense signals are obtained with ionic matrices [21]. Sections were laid on conductive glasses (like Nickel or ITO, **Figure 2a**), treated with organic solvent to remove lipids [19] (**Figure 2b**), covered with a solid ionic matrix [21] (**Figure 2c**) then by gold in order to remove charges effects [22] and are then introduced in the MALDI-TOF for analysis (**Figure 2d**). Next, MALDI laser is used to scan each point of the surface area and the mass spectra representative of the biomolecules present in each point are analyzed. Automated analysis of the complete tissue is obtained by performing mass spectra every 50-200 μm , providing representative information of selected ions (each ion is a specific bio-molecule) [21, 23, 24]. Analysis is obtained within 2-6 hours and images are reconstructed using imaging software (**Figure 1**). We recently made a crucial advancement with the development of specific new matrices, called ionic matrices, for high repetition laser (200 Hz). These ionic matrices advantageously prevent peptide delocalization after deposition, permit better coverage as well as low level ablation and the possibility to work on

positive or negative modes [21]. One such matrix, namely ANI (aniline/HCCA) presents a high stability under vacuum and big resistance to high repetitive laser shots (**Figure 3**).

The use of archived material in paraffin blocks from hospital pathology departments thus represents a “gold mine” of existing information. In this case the major hurdle is cross-linking due to formalin fixation and embedded in paraffin (FFPE tissue). In this case, two developments depending the old of the tissue have been performed. In the case of tissue, stored less than 6 months, an active matrices, namely 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) is used. In fact, DNPH neutralizes formalin excess and allows the analysis of embedded tissues such as those from paraffin sections (**Figure 4a**). In the case of tissue stored more than 6 months, micro-digestion with trypsin must be performed. In fact, on adjacent slices one is used for protein characterization and the other one for a raster image using a microspotter for spotting the trypsin (200 μm) then the matrices at the level. The slices used for the protein characterization was treated with trypsin after paraffin removal and rehydration. The digest is then injected in nanoLC trap for peptide characterization. The ions of the protein discovered to change between a normal or pathology are then research on the adjacent slices in order to perform an image of their localization. All ions deriving from the same protein after digestion can then be localized and the same cellular localization is obtained validating the methodology (**Figure 4b**) [17].

This major achievement opens up a vast array of novel clinical proteomic applications directly from tissue biopsy samples preserved in paraffin blocks and stored in hospital pathology libraries. The application of MALDI-imaging to such archived materials could lead to the creation of a national disease marker database, and allow the elaboration of early diagnostics for various pathologies as well as a follow up in disease progression. MALDI-imaging could also have applications in the pharmacology for drug development. Such techniques can be used to help in the design new drugs, through the ability to analyze metabolic pathways directly in tissues (e.g., through in situ multiplex analysis of metabolites), providing important information in order to understand secondary effects and unexpected feedback loops. In order to provide specific examples of the power of MALDI-imaging, we briefly present herein below preliminary data on an animal model of Parkinson’s disease, mice treated with the 6 hydroxydopamine (6OHDA). In neurodegenerative diseases such as Parkinson’s and Alzheimer diseases, post-mortem tissues are used to identify disease markers. A well-studied animal model of Parkinson’s disease is the rat model subjected to 6OH-dopamine treatment. Direct MALDI analysis on FFPE brain tissue sections (9 years old stored) from treated and control rats were carried out with an enzymatic digestion followed by a tandem mass spectrometry (MS-MS) analyses and then subjecting the entire fragmentation spectra to the Mascot™ interface software (Matrix Science Ltd). A total of eight markers were considered noteworthy, either down- or up-regulated, five of which have previously been described in Parkinson’s disease literature (**see Table 1**). This demonstrates the feasibility of this technique and its high potency in future for pathological proteomic to discover new biomarkers from old stored tissue from hospital library.

Specific MALDI Imaging

In order to add a dimension of specificity to imaging by mass spectrometry, we have developed specific imaging using designed probes directed against specific targets with mass spectrometry detection. This new strategy has been developed for different biomolecules classes with a specific highlight, to mRNA and peptides/proteins. In order to specifically amplify signals of bio-molecules, we have developed the concept of “Tag-Mass”. Tag-Mass is a novel method that uses labeled probes for specific identification in

mass spectrometry. As shown in **Figure 5a** the concept is schematized with an oligonucleotide sequence (or probe) that hybridizes mRNA in a tissue section as is done in standard *in situ* hybridization techniques. An oligonucleotide probe sequence is attached to a photo-cleavable group linked up to a “Tag” marker which is an amino acid sequence of defined mass. This “Tag” marker can be modified to generate “Tags” of different known masses. Following hybridization of the Tag-Mass probe to the tissue section, MALDI analysis is performed as previously described, however, the pulse laser will cleave the photo-cleavable group to yield a Tag of a defined mass. The signals obtained for specific bio-molecules in Tag-Mass will be much higher and will yield unique signatures. Our results with a first generation of Tag-Mass probes have demonstrated the proof-of-principal, as we have detected hybridized mRNAs on tissue sections. Based on this proof-of-concept, we developed a second generation Tag-Mass, with a modified uracil base that bears the photo-cleavable linker, allowing us to perform multiplex *in situ* hybridization using MALDI technology (**Figure 5b**). Our results also establish the concept that a photo-cleavable linker can be used in other application with antibodies, lectin or aptamers for use in Tagged-specific MALDI-imaging (**Figure 6**). The development of “Universal Tags” for direct *in situ* tissue analysis by MALDI-TOF mass spectrometry is a significant achievement toward specific molecular diagnosis. Thus we can anticipate targeting specific disease-marker-gene RNA transcripts, following their expression within tissues and then confirming their translation by targeting their specific protein products or metabolites. Disease/health states will thus be closely molecularly monitored.

Improving Image quality

The desorption/ionization process is mediated in MALDI analysis by the irradiation of the sample by the laser beam, for a fixed sample, the analyzed region is limited to the area irradiated by the laser beam. It is then possible to perform analyses in various points of the sample and to obtain in each point a spectrum representing ionic species present in this point. Thus, by shifting the laser beam of a regular pitch defined by the user, the whole sample may be scanned, and a database comprising all spectra and their coordinates may be generated, which then allows to construct the expression map of any compound of known m/z ratio in the analyzed sample. UV lasers used in MALDI imaging, and especially commercialized N_2 lasers emitting at 337 nm, have a laser beam section area generally ranging between $75 \times 75 \mu m^2$ and $200 \times 200 \mu m^2$ with a classical focalization system. For tissue imaging, the minimum distance between two points will have to be superior to the laser beam diameter, resulting in an image definition of at most the laser beam diameter (thus at best $75 \times 75 \mu m$), which corresponds to the irradiation of several cells in the tissue sample. Ideally, the image definition of a tissue sample should be or the order of a cell diameter ($10\text{-}20 \mu m$ for small cells). In fact, the decrease by a factor 10 ($10 \mu m$ steps) will increase imaging resolution.

Two types of solution have been developed to increase the image resolution. The first one done by Caprioli team is based on the different methods for matrix deposition to obtain more homogeneous microcrystalline layers and reduce peptide dispersion in the tissues (peptide dilution and delocalisation). An acoustic reagent multispotter has been developed to provide improved reproducibility for depositing matrix onto a sample surface [25]. For tissue sections, matrix spots of $180\text{-}200 \mu m$ in diameter were obtained and a procedure is described for generating coordinate files readable by a mass spectrometer to permit automated profile acquisition. Mass spectral quality and reproducibility was found to be better than that obtained with manual pipet spotting [25].

The second solution developed by our group, implies a smaller diameter of the laser beam in order to get a diameter of the beam close to single cell dimensions. For this point, conductive masks have been developed to decrease the area irradiated by the laser beam for MALDI analysis in order to get a more precise localization of the biomarkers in the tissue. Moreover, improving the beam focusing will get a homogeneous energy profile laser beam (flat top laser) [26] (**Figure 7**).

Conclusion

The future impact of MALDI-imaging can be likened to the formidable advancements made several years ago in the field of nuclear magnetic resonance (NMR) or in the development of the polymerase chain reaction (PCR). NMR has led to the development of magnetic resonance imaging (MRI) in the clinical setting for the diagnosis of various pathologies, while PCR revolutionized molecular biology and clinical diagnosis. Likewise, we foresee that MALDI-imaging will have an enormous impact in the clinical setting for the diagnosis and research leading to treatments as called Pathological proteomic.

Acknowledgements

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT, ACI jeunes Chercheurs to I. Fournier), Région Nord-Pas de Calais (to M. Wisztorski), by the Société Française de Spectrométrie de Masse (to R.Lemaire and M. Wisztorski) and by the Société Française d'Electrophorèse et de Protéomique (to J.Stauber and M. Wisztorski). Also, supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides.

References

- [1] Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Curr Opin Biotechnol*, **2006**.
- [2] Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Curr Opin Chem Biol*, **2002**, *6*, 676-81.
- [3] Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Toxicol Pathol*, **2005**, *33*, 92-101.
- [4] Spengler, B.; Hubert, M. *J Am Soc Mass Spectrom*, **2002**, *13*, 735-48.
- [5] Luxembourg, S. L.; Mize, T. H.; McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Anal Chem*, **2004**, *76*, 5339-44.
- [6] Heeren, R. M. *Proteomics*, **2005**, *5*, 4316-26.
- [7] Stoeckli, M.; Farmer, T. B.; Caprioli, R. M. *J Am Soc Mass Spectrom*, **1999**, *10*, 67-71.
- [8] Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J Am Soc Mass Spectrom*, **2005**, *16*, 2052-6.
- [9] Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *Anal Chem*, **2005**, *77*, 4523-7.
- [10] Woods, A. S.; Jackson, S. N. *Appl Phys Lett*, **2006**, *88*, E391-5.
- [11] Woods, A. S.; Ugarov, M.; Jackson, S. N.; Egan, T.; Wang, H. Y.; Murray, K. K.; Schultz, J. A. *J Proteome Res*, **2006**, *5*, 1484-7.
- [12] Amare, A.; Hummon, A. B.; Southey, B. R.; Zimmerman, T. A.; Rodriguez-Zas, S. L.; Sweedler, J. V. *J Proteome Res*, **2006**, *5*, 1162-7.
- [13] Hummon, A. B.; Amare, A.; Sweedler, J. V. *Mass Spectrom Rev*, **2006**, *25*, 77-98.
- [14] Jurchen, J. C.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *J Am Soc Mass Spectrom*, **2005**, *16*, 1654-9.
- [15] Rubakhin, S. S.; Jurchen, J. C.; Monroe, E. B.; Sweedler, J. V. *Drug Discov Today*, **2005**, *10*, 823-37.
- [16] Fournier I, L. R., Wisztorski M, Stauber J, Jardin-Mathè O, Van Camp C, Deschamps M, Proess G, Day R, Salzet M. *Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006*.
- [17] Lemaire R, D. A., Ducroy P, Tabet JC, Salzet M, Fournier I. *Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006*.
- [18] Lemaire R, D. P., Wisztorski M, Hendra JB, Tabet JC, Salzet M, Fournier I. In *Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9, 2005*.
- [19] Lemaire R, W. M., Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I. *Anal Chem*, **2006**, in press.
- [20] Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuro Endocrinol Lett*, **2003**, *24*, 9-14.
- [21] Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem*, **2006**, *78*, 809-19.
- [22] Wisztorski M, B. L., Dreiserwer K, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Salzet M, Fournier I. *Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006*.
- [23] Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal Chem*, **1997**, *69*, 4751-60.
- [24] Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat Med*, **2001**, *7*, 493-6.
- [25] Aerni HR, C. D., Caprioli RM. In *Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9, 2005*.
- [26] Wisztorski M., T. V., Salzet M., Fournier I., **2006**, *US PCT*.

Figure Legends

Figure 1 : Representative scheme of MALDI imaging technology

Tissue sections from fresh organ or biopsy are laid out on the MALDI target. Sections first covered with a specific matrix depend to the nature of the bio-molecule under study. For peptides/proteins, very intense signals are obtained with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA) as a matrix. Sections are covered with α -CHCA (or another matrix) and are then introduced in the MALDI-TOF for analysis. Next, MALDI laser is used to scan each point of the surface area and the mass spectra representative of the peptides/proteins or lipids present in each point are analyzed. Automated analysis of the complete tissue is obtained by performing mass spectra every 10-50 μ m, providing representative information of selected ions (each ion is a specific bio-molecule). Analysis is obtained within 2-6 hours and images are reconstructed using Flex-imaging software

Figure 2 : Scheme of the MALDI imaging new developments

- a- ITO or Nickel Glasses for tissue application on conductive and transparent supports
- b-Solvents whashing for removing lipids
- c- Ionic matrices covering
- d- Gold sputtering of the slices for removing charge effects

Figure 3: Comparative effects of ANI and HCCA after three complete scanning in positive, negative in positive modes.

Figure 4 : Strategies used for FFPE tissue (a) stored less than 6 months, (b) stored more than 6 months

Figure 5 : Scheme of the tag-mass probe (a) first generation, (b) second generation

Figure 6 : Scheme of laser beam reduction through masks

Table 1

Markers	m/z	Mascot score (%)	Known in Parkinson's Disease literature
Downregulated	Ubc-Ubiquitin	78	?
	Trans elongation Factor 1 (eEF1)	66	?
	Hexokinase (2-7-1-1)	76	<i>Pastosis et al. Pharm. Res. 1995 31, 361-369</i>
Upregulated	Neurofilament M protein	57	<i>Basso et al. Proteomics 2004 12, 3943-3952</i>
	Peroxidoxin 6	65	<i>Basso et al. Proteomics 2004 12, 3943-3952</i>
	Collapsin response Mediateur Protein	70	?
	F1 ATPase	81	<i>Seo et al. Human Gen Ther. 2004 15, 887-895</i>
	Enolase alpha	62	<i>Poon et al. Neurobiol Des. 2005 18, 492-498</i>

Imagerie MALDI : Une nouvelle technologie pour découvrir et valider de nouveaux biomarqueurs

Maxence Wisztorski, Rémi Lemaire , Jonathan Stauber , , Sonia Ait Menguelet, Olivia Jardin-Mathé, Michel Salzet et Isabelle Fournier*

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, équipe Imagerie MALDI, Bâtiment SN3, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq

Résumé

A l'heure de la protéomique, la spectrométrie de masse s'est révélée un outil puissant pour la recherche et l'identification des protéines et des peptides à partir d'échantillons purifiés. Une nouvelle ère s'ouvre, avec l'imagerie MALDI, permettant à la fois la recherche, l'identification et maintenant la localisation de biomolécules telles que les peptides, les protéines ou les lipides au sein des tissus. Des développements cruciaux au niveau de la préparation des échantillons permettent l'analyse de tissus ou biopsies conservées congelées (-80°C) depuis plus de 6 mois ou conservés après fixation au paraformaldéhyde et inclus en paraffine. Le verrou technologique permettant l'accès aux tumorothèques est enfin circonscrit et la chasse aux biomarqueurs au sein de ces banques, objectif déterminant, est devenue possible. Le rapprochement des techniques d'imagerie MALDI de celles utilisées en routine par les anatomopathologistes (colorations ou utilisation d'anticorps) est également un objectif important. Le développement de l'imagerie spécifique grâce à l'utilisation de sondes appelées « Tag-Mass » ouvre des perspectives potentielles pour cette technologie. En effet, il est dorénavant possible de localiser une protéine et son ARNm de façon spécifique ainsi que les voies de signalisation sur une même coupe ou l'expression du phénotype pathologique à partir d'une biopsie. Le développement de ce type de technologie rappelle les travaux similaires effectués il y a plusieurs années en Résonance Magnétique Nucléaire et qui ont conduit au développement des techniques d'imagerie dites IRM dont l'implantation en milieu médical est considérable pour le diagnostic de certaines pathologies.

* pour la correspondance

Abstract

At the proteomics' time, the mass spectrometry appears to be a powerful tool to find and identify peptides and proteins from purified sample. A new era is now starting, with the MALDI imaging, allowing both research, identification while conserving the localization of biomolecules like peptides, proteins, oligonucleotides and lipids in tissues. Crucial developments at the level of the sample preparations are in progress, in view of tissue analysis or frozen conserved biopsies (-80°C) since more than 6 months or conserved after paraformaldehyde fixation and paraffin embedded. The technical problem allowing the access to hospital libraries is now off and the biomarkers hunting from tissues derived from these libraries is now an objective key. The relationship between MALDI imaging and immunocytochemistry used by pathologist is important. The development of specific MALDI imaging using probes with a tag (peptide or organic) called "Tag-Mass" open the field of new perspectives. In fact, it is possible henceforth to localize a protein with its specific mRNA and particularly the signalisation pathway on the same slices or a pathology expression phenotype from a biopsy. Development of such a technology is similar to the one that occurred several years ago for Nuclear Magnetic Resonance that leads the development of imaging technologies called MRI in hospital which is intensively used for pathologies diagnostic.

Introduction

Les récents développements réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse et particulièrement sur le plan instrumental font actuellement de cette technique un outil de choix pour l'application aux recherches biologiques [1]. Les nombreux efforts menés ces dernières années pour développer l'étude du protéome ont démontré le rôle incontournable de cette technologie [2]. La combinaison des méthodes de biochimie classique à la spectrométrie de masse a déjà permis l'identification de nombreuses protéines aux travers d'études protéomiques associées aux connaissances croissantes des génomes [3]. Néanmoins de telles méthodes conduisent principalement à l'identification de nouvelles protéines et ne permettent pas d'obtenir d'informations sur la localisation de l'expression ou encore de suivre l'évolution du profil d'expression de l'ensemble des peptides/protéines au sein de tissus ou de groupes cellulaires voire même de cellule unique.

Les nouvelles technologies émergentes, permettent à l'heure actuelle de développer des méthodes alternatives pouvant répondre à ces questions. A ce titre, le développement d'analyse directe sur tissus ou sur cellules par Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time of flight (MALDI-TOF) est extrêmement prometteur [4]. En effet, de telles analyses permettent, tout en s'affranchissant des lourdes étapes d'extraction, purifications et séparation, d'obtenir directement les profils d'expression cellulaires sans perdre la localisation des composés au sein du tissu. Une telle stratégie d'étude s'adapte parfaitement à la spectrométrie de masse au travers de l'utilisation de sources MALDI. Le MALDI utilise une méthode d'ionisation parfaitement adaptée à l'étude des composés biologiques puisqu'elle permet l'analyse de composés polaires et de hautes masses moléculaires sous leur forme intacte, malgré leur fragilité thermique. Son principe de fonctionnement nécessite la formation d'un réseau cristallin qui sera par la suite soumis à des tirs laser. Ainsi, cette méthode permet l'introduction de matériaux sous leur forme solide et ne nécessite pas de disposer de composés en solution pour obtenir des ions en phase gazeuse. Elle est donc adaptable à l'introduction de matériel biologique, comme par exemple des cellules isolées ou des coupes de tissu. Les images sont obtenues par ionisation de l'échantillon grâce à un faisceau laser qui parcourt toute la coupe (**Figure 1**). Après acquisition des données, un logiciel permet de sélectionner des gammes de masse correspondant à des molécules d'intérêt et de reconstruire des images de localisation. Chaque point correspondra à 1 pixel de l'image et la distance entre chaque point définira la résolution latérale de l'image.

Cette technique ne se limite pas seulement à la localisation des peptides, mais peut aussi s'appliquer aux lipides, protéines et permet à partir d'une seule coupe l'obtention des

informations de localisation de ces différents composés. Dans ces conditions, il est possible d'analyser sur un même tissu les différentes zones le constituant de manière hautement spécifique.

I. De l'analyse directe de tissu par spectrométrie de masse vers l'Imagerie MALDI

Depuis longtemps évoquée, la faisabilité de l'analyse directe de tissus biologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été démontrée pour la première fois en 1993 par l'équipe du Pr. van der Greef grâce à des travaux sur des neurones de *Lymnaea stagnalis* [5]. Il a fallu attendre 1996 et la reprise de ces travaux par le groupe de Jonathan Sweedler [6] puis les développements de l'équipe de RM Caprioli [7] pour que le profiling de tissu par spectrométrie de masse voie le jour. Les études menées par ce dernier groupe ont permis de montrer la faisabilité de la méthode pour suivre les profils d'expression des peptides/protéines directement au sein de tissus sans traitement préalable [8]. Les résultats obtenus par d'autres équipes ont porté sur la cartographie, la distribution spatiale ou la modulation, suite à des traitements, de la libération de neuropeptides dans le système nerveux de différents modèles d'études [9-11]. Sur des modèles invertébrés (*Aplysia californica* et *Lymnaea stagnalis*), des analyses directes ont été réalisées sur les cellules exprimant les gènes de l'hormone de ponte de ces deux modèles [12, 13]. Une caractérisation complète des mécanismes de maturation de cette hormone au niveau d'un seul neurone a pu être réalisée. Du point de vue clinique, cette technique de « peptides profiling » est en plein essor [4, 14-17]

Le développement récent de logiciels informatiques spécifiques a montré la possibilité de suivre l'expression d'un peptide/protéine au sein du tissu et d'obtenir ainsi des cartographies de l'expression de la molécule. L'imagerie par spectrométrie de masse consiste en une automatisation de l'analyse directe [7, 18, 19]. Tout comme pour l'analyse directe, le faisceau laser va irradier l'échantillon en un endroit, ce qui va définir un « spot » et un spectre de masse sera enregistré. Le plateau du support de l'échantillon va ensuite se déplacer d'une distance définie par avance, puis un nouveau spectre sera enregistré à l'endroit du nouveau spot. Le support va ainsi se déplacer à intervalles réguliers jusqu'à « scanner » toute la zone d'analyse préalablement choisie. Une fois toute la zone analysée, un logiciel va reconstruire une image de la répartition d'un rapport masse sur charge choisi (**Figure 1**). Trois éléments sont décisifs dans cette technique : 1) la préparation de l'échantillon, 2) la matrice et 3) son mode de dépôt.

Développement

L'utilisation de l'imagerie MALDI au niveau clinique oblige les groupes à développer de nouveaux protocoles, de nouveaux supports ainsi que de nouvelles matrices compatibles avec les colorations histologiques et les procédures mises en œuvre par les pathologistes.

1. Supports conducteurs transparents

La comparaison des données histologiques, obtenues par l'observation des coupes après coloration en microscopie optique, aux images moléculaires, obtenues par spectrométrie de masse, montrent une très bonne corrélation et une compatibilité presque totale [20], une fois résolus les problèmes liés aux supports d'analyse. En effet, il est difficile de localiser beaucoup d'éléments tissulaires par microscopie optique quand les coupes sont montées sur un support opaque. C'est pourquoi il est devenu impératif que les tissus soient montés sur des supports transparents et conducteurs tels que des lames ITO, Nickel ou des lames classiques recouvertes d'or [21](figure 2). Effectivement la propriété conductrice des lames est très importante pour l'utilisation d'analyseurs temps de vol, car des différences de tension sur la surface de l'échantillon peuvent induire des variations dans la mesure des temps de vol des ions présents dans le spectromètre de masse, empêchant par la suite d'avoir accès aux analyses structurales par MS/MS. Cette caractérisation structurale des peptides au sein de la coupe par des études de la fragmentation des peptides directement à partir des tissus est un verrou technologique qui pourra être levé suite à l'arrivée d'instruments de type MALDI-TOF/TOF.

2. Préparation de l'échantillon et digestion trypsique.

Un des points critiques de l'imagerie, comme toutes les techniques biochimiques, est la conservation de l'échantillon, *i.e.* son mode et son temps de conservation. En effet, les tissus peuvent être, dès leur prélèvement, congelés puis coupés et ensuite analysés. A l'heure actuelle, la plupart des travaux utilisent cette procédure [22].

Dans le cas de coupes congelées ayant été conservées plus de 6 mois, des traitements par des solvants organiques peuvent être réalisés pour éliminer la couche de lipides qui saturent la coupe [23] et ainsi obtenir un meilleur signal. De plus la possibilité de faire de la digestion trypsique *in situ* sur coupes fraîches [24] par le biais ou non d'un transfert sur membrane [25] devra permettre l'accès à l'information moléculaire. Cependant, la plupart des échantillons

conservés par les pathologistes au sein des hôpitaux sont des tissus fixés au formaldéhyde puis inclus dans la paraffine. Le formaldéhyde forme au cours du temps des ponts méthylènes. Pour résoudre ce problème, des stratégies alliant l'emploi de matrice active [26] et la microdigestion à la trypsine déposée par microspotteur, ont été développées [27] (**Figure 3**). Ces stratégies sont couplées à la caractérisation par ESI-Trap des protéines issues d'une coupe de tissu adjacente ayant subi un déparaffinage puis une digestion enzymatique [27]. Le développement de ce type d'études et l'amélioration de cette méthode permettront directement, à partir des tissus prélevés, de déterminer les peptides exprimés dans une zone bien définie du tissu puis de les identifier en obtenant leur séquence en acides aminés.

3. La matrice

Un autre développement consiste en la mise au point de nouvelles matrices mieux adaptées aux contraintes de l'imagerie [26]. Pour réaliser une image moléculaire, les matrices doivent entraîner une délocalisation réduite des composés, et donc une cristallisation rapide et homogène sur le tissu [26]. De plus, la quantité de matériel présent sur la coupe est limitée, donc les nouvelles matrices doivent permettre une augmentation de la sensibilité du signal et supporter des fréquences de tir laser élevées (200Hz), ainsi que le vide poussé de la source, durant le temps nécessaire à la réalisation d'une image. Les matrices ioniques répondent parfaitement à l'ensemble de ces critères [28](figure 4).

4. Le dépôt de matrice

Le dépôt de matrice est un point important pour l'Imagerie MALDI. En effet la matrice doit extraire les analytes du tissu de façon verticale et des cristaux doivent être formés pour éviter la délocalisation des molécules. Plusieurs approches ont été testées, comme recouvrir toute la surface de la coupe avec de la matrice par application à la micropipette, déposer la matrice par spray pneumatique [16] ou par electrospray [7]. Ces méthodes peuvent s'avérer difficiles à mettre en place et à optimiser. Actuellement différents groupes de recherche s'orientent vers un dépôt de matrice localisé. Des microgouttes de matrices vont être déposées et espacées d'un pas régulier. Ces microgouttes sont obtenues par dépôts manuels ou automatiquement par des systèmes robotiques de micro dépôts, dépôt piezo, voire dépôt par éjection acoustique de microgouttes [29]. Ces micros dépôts de matrices vont permettre à la fois de limiter la délocalisation d'analytes mais aussi de réduire artificiellement la taille de la zone d'éjection de matière due à l'irradiation par le laser.

Tous ces développements en imagerie MALDI permettent la reconstruction de cartes en 2D. Si on étudie toute une série de coupes d'un organe, grâce à un procédé informatique [30], il est alors possible de reconstruire non plus une image en 2D mais en 3D. En corrélant ces résultats aux images de ces coupes obtenues en histologie, il est désormais possible de voyager à l'intérieur de l'organe et de faire une localisation précise d'une molécule dans celui-ci.

Perspectives

Les études réalisées jusqu'ici utilisent la technologie de MALDI-UV. Des travaux sont en cours pour développer l'imagerie MALDI infrarouge [21]. En effet, les potentialités de l'imagerie MALDI, combinées aux récents développements dans le domaine de l'analyse MALDI avec des lasers IR permettent d'envisager le transfert de technologie déjà acquise à l'imagerie par MALDI-IR[31, 32]. Les potentialités de ce mode sont importantes puisque les mécanismes mis en jeu dans les processus conduisant à l'obtention, à partir d'un dépôt solide, d'ions en phase gazeuse reposent non pas, comme pour les lasers UV, sur des transitions électroniques, mais sur de l'excitation vibrationnelle, et principalement sur les vibrations des liaisons O-H et N-H. Ainsi, de nombreux composés sont potentiellement de bonnes matrices, comme par exemple l'eau. Ce mode autorise donc l'utilisation de matrices liquides ou solides se rapprochant des conditions physiologiques. De plus, de part la nature des processus physicochimiques mis en jeu en IR, cette méthode a permis d'obtenir des résultats prometteurs dans le cadre de l'analyse d'oligonucléotides et d'ADN.

Pour palier à ce manque en MALDI-UV, l'un des développements les plus prometteurs est ce que l'on appelle l'imagerie spécifique. Sous cette appellation se cache l'utilisation de sondes (anticorps, ribosondes, aptamers, lectines) marqués à l'aide d'un lien photoclivable et d'un peptide rapporteur [33]. Ce lien photoclivable est clivé à la longueur d'onde du laser du MALDI. L'utilisation de ces sondes spécifiques permet de réaliser des images en multiplexes d'ARNm spécifiques, d'associer la répartition d'un ligand avec son récepteur, ou d'un précurseur avec ses enzymes de maturation. Le concept du « Tag-mass » permet également d'étudier, après avoir identifié des biomarqueurs, la répartition et l'expression de ceux-ci au sein d'un tissu. La corrélation de leur expression avec celle de facteurs de transcription conduit à la localisation au sein du tissu des cellules saines, des cellules exprimant le phénotype tumeur ou de celles en cours de changement de phénotype (**Figure 5**).

Conclusion

La comparaison des résultats provenant de l'imagerie par spectrométrie de masse avec ceux obtenus par des méthodes biologiques classiques telles que l'immunocytochimie confirment la fiabilité de la méthode puisque les images d'expressions obtenues sont très semblables. Ainsi, l'imagerie par spectrométrie de masse pourra par sa haute spécificité, sa rapidité et sa sensibilité être un nouvel outil d'investigation pour l'analyse et l'étude des biomolécules.

Le couplage de l'analyse du transcriptome et du peptidome directement sur des coupes de tissu ou au niveau d'une cellule unique est le prochain développement de l'analyse MALDI.

Remerciements

Les auteurs remercient pour leur soutien financier le CNRS, le Ministère de la Recherche (ACI, I. Fournier), la région Nord-Pas de Calais (M. Wisztorski). Ils remercient également Mr. D. Maréchal (Eurogentec, Belgique), Mr W. Amoyal (Société Disruptive Technology Inc, France) et Mr G. Rubel (Bruker Daltonic, France) pour leur soutien et leur coopération dans ce projet.

Bibliographie

1. Karas, M., *Matrix-assisted laser desorption ionization MS: a progress report*. Biochem Soc Trans, 1996. **24**(3): p. 897-900.
2. Aebersold, R. and D.R. Goodlett, *Mass spectrometry in proteomics*. Chem Rev, 2001. **101**(2): p. 269-95.
3. Kuster, B., et al., *Mass spectrometry allows direct identification of proteins in large genomes*. Proteomics, 2001. **1**(5): p. 641-50.
4. Chaurand, P., M. Stoeckli, and R.M. Caprioli, *Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry*. Anal Chem, 1999. **71**(23): p. 5263-70.
5. P. A. van Veelen, C.R.J., K. W. Li, W. C. Wildering, W. P. M. Geraerts, U. R. Tjaden, J. van der Greef, *Direct Peptide profiling of Single Neurons by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry*. Organic Mass Spectrometry, 1993. **28**(12): p. 1542-1546.
6. Garden, R.W., et al., *Excess salt removal with matrix rinsing: direct peptide profiling of neurons from marine invertebrates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 1996. **31**(10): p. 1126-30.
7. Caprioli, R.M., T.B. Farmer, and J. Gile, *Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS*. Anal Chem, 1997. **69**(23): p. 4751-60.
8. Caldwell, R.L. and R.M. Caprioli, *Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications*. Mol Cell Proteomics, 2005. **4**(4): p. 394-401.

9. Fournier, I., R. Day, and M. Salzet, *Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain*. Neuro Endocrinol Lett, 2003. **24**(1-2): p. 9-14.
10. Kruse, R. and J.V. Sweedler, *Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS*. J Am Soc Mass Spectrom, 2003. **14**(7): p. 752-9.
11. Sweedler, J.V., et al., *Mass spectrometric survey of peptides in cephalopods with an emphasis on the FMRFamide-related peptides*. J Exp Biol, 2000. **203**(Pt 23): p. 3565-73.
12. Garden, R.W., et al., *Proteolytic processing of the Aplysia egg-laying hormone prohormone*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(7): p. 3972-7.
13. Li, L., et al., *Egg-laying hormone peptides in the aplysiidae family*. J Exp Biol, 1999. **202**(Pt 21): p. 2961-73.
14. Reyzer, M.L. and R.M. Caprioli, *MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery*. J Proteome Res, 2005. **4**(4): p. 1138-42.
15. Reyzer, M.L., et al., *Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(10): p. 1081-92.
16. Schwartz, S.A., M.L. Reyzer, and R.M. Caprioli, *Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation*. J Mass Spectrom, 2003. **38**(7): p. 699-708.
17. Meistermann, H., et al., *Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: Transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat*. Mol Cell Proteomics, 2006.
18. Stoeckli, M., et al., *Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 493-6.
19. Stoeckli, M., T.B. Farmer, and R.M. Caprioli, *Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument*. J Am Soc Mass Spectrom, 1999. **10**(1): p. 67-71.
20. Chaurand, P., et al., *Integrating histology and imaging mass spectrometry*. Anal Chem, 2004. **76**(4): p. 1145-55.
21. Wisztorski M, B.L., Dreiserwer K, Hillenkamp F, Berkenkamp S, Salzet M, Fournier I, *Effect of metals coating for YV MALDI-a-TOF mass spectrometry imaging (MALDI MSI) and direct tissue analysis in UV/IR MALDI-o-TOF mass spectrometry*. Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006.
22. Chaurand, P., D.S. Cornett, and R.M. Caprioli, *Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry*. Curr Opin Biotechnol, 2006.
23. Lemaire R, W.M., Tabet JC, Day R, Salzet M, Fournier I, *Organic treatments : a way for improving signal sensitivity for profiling on tissue* Anal Chem, 2006: p. in press.
24. Aerni HR, C.D., Caprioli RM. *In situ proteomics in artificially created tissue microwells*. in Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9. 2005.
25. Rohner, T.C., D. Staab, and M. Stoeckli, *MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections*. Mech Ageing Dev, 2005. **126**(1): p. 177-85.
26. Lemaire R, D.P., Wisztorski M, Hendra JB, Tabet JC, Salzet M, Fournier I. *Exploring Direct Analysis Using Ionic Matrices*. in Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9. 2005.
27. Lemaire R, D.A., Ducroy P, Tabet JC, Salzet M, Fournier I, *Direct analysis and MALDI imaging on formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE): Application to*

- Parkinson disease*. Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006.
28. Lemaire, R., et al., *Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging*. Anal Chem, 2006. **78**(3): p. 809-19.
 29. Aerni, H.R., D.S. Cornett, and R.M. Caprioli, *Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation*. Anal Chem, 2006. **78**(3): p. 827-34.
 30. Crecelius, A.C., et al., *Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 2005. **16**(7): p. 1093-9.
 31. Berkenkamp, S., M. Karas, and F. Hillenkamp, *Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(14): p. 7003-7.
 32. Kraft, P., et al., *Infrared, surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry on frozen aqueous solutions of proteins and peptides using suspensions of organic solids*. J Am Soc Mass Spectrom, 1998. **9**(9): p. 912-24.
 33. Fournier I, L.R., Wisztorski M, Stauber J, Jardin-Mathè O, Van Camp C, Deschamps M, Proess G, Day R, Salzert M, *New insight in sample preparation for MALDI imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome*. Proceedings of 54rd ASMS conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington, May 30-June 2, 2006.

Légendes des figures

Figure 1 : Principe de l'imagerie MALDI-TOF.

- a) Une coupe congelée est déposée sur un support. Une analyse microscopique est effectuée. La coupe est recouverte de matrice avant d'être analysée en MALDI-TOF.
- b) Le laser va balayer la surface de la coupe et un logiciel informatique va permettre de reconstituer une image bidimensionnelle de la répartition des molécules. Une superposition entre la carte de répartition des molécules et l'observation microscopique peut être réalisée pour obtenir une localisation précise de la molécule dans le tissu.

Figure 2 : a) Image par microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue déposée sur une lame conductrice recouverte de nickel. b) Analyse directe de la coupe en mode réflecteur. c) Mode PSD de l'ion m/z 861.7

Figure 3 : Schémas des étapes permettant l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF de tissus fixés et paraffinés dépendantes du temps de stockage de l'échantillon

Figure 4 : Images moléculaires reconstruites de la répartition de différents ions au sein de la coupe de cerveau de rat obtenue par balayage de 10000 points à 50 Hz et 200 tirs par position pour la matrice ionique HCCA/ANI a) 1ère acquisition en mode positif et b) seconde acquisition en mode négatif (avec la permission de Analytical Chemistry)

Figure 5 : Principe de détection de plusieurs ARNm sur une coupe de tissu en utilisant des sondes marquées à l'aide d'UTP-lié par une liaison photoclivable par le laser UV et un rapporteur peptidique.

Figure 6 : Principe de l'imagerie spécifique en utilisant des anticorps taggés (lies à une liaison photoclivable par le laser du MALDI et comportant un peptide rapporteur). a) répartition moléculaire de la carboxypeptidase D (protéine membranaire de 160 kDa) détectée par le concept du Tag-mass, b) scanner de la coupe adjacente c) immunodétection avec un anticorps marqué à la peroxydase et immunorévéle par du chloronaphtol.

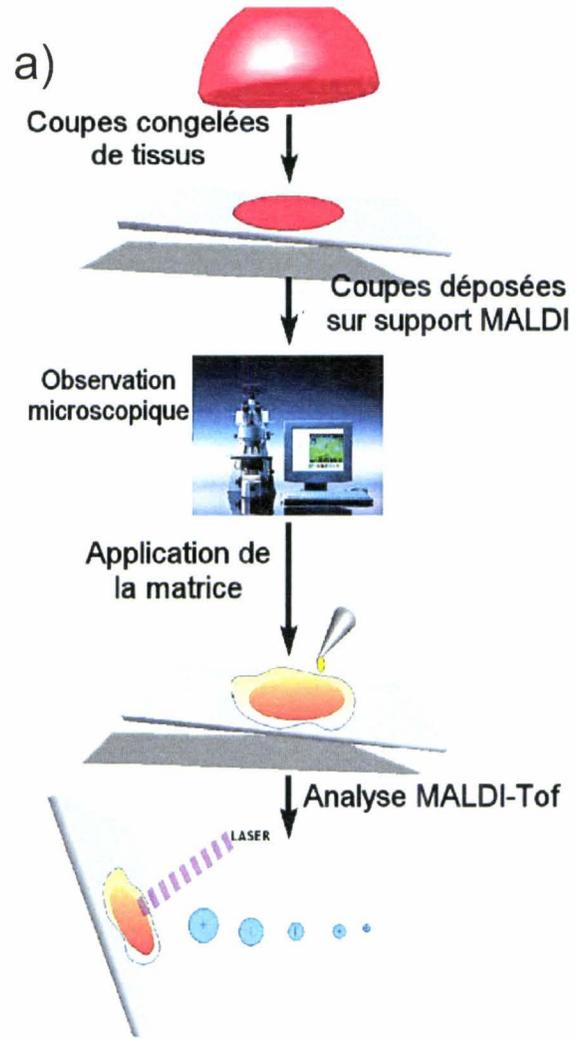
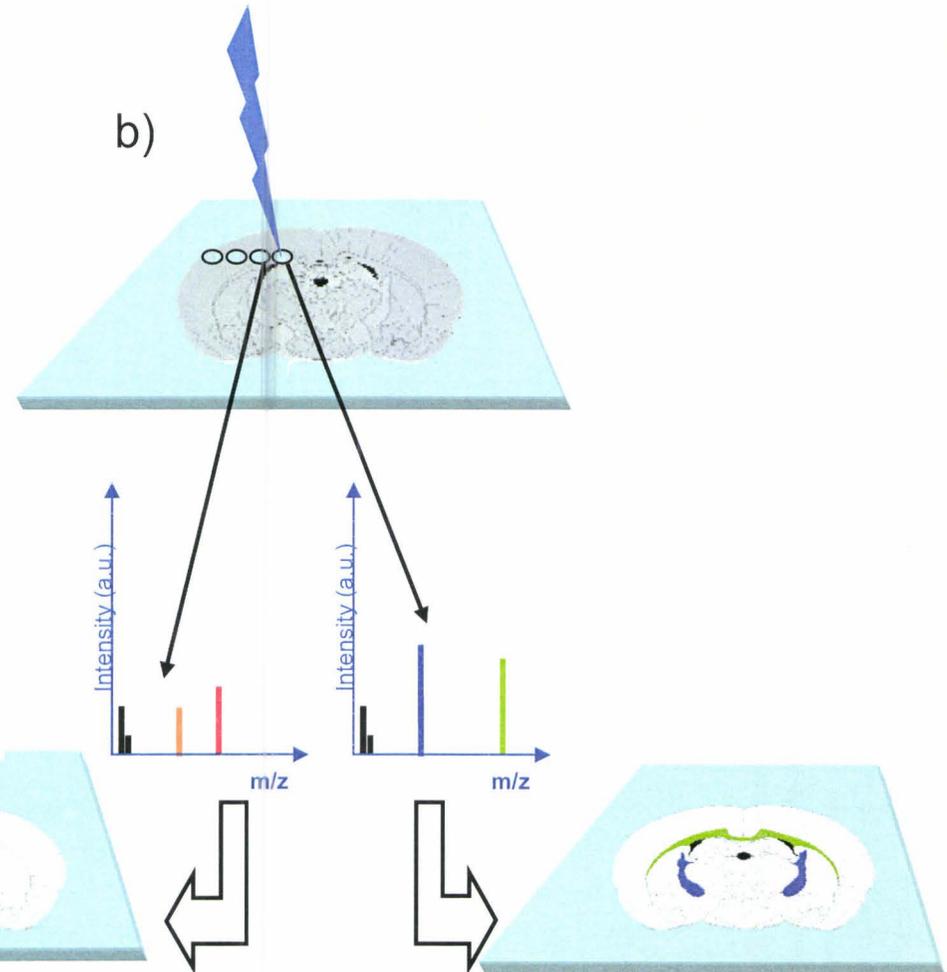


Figure 1



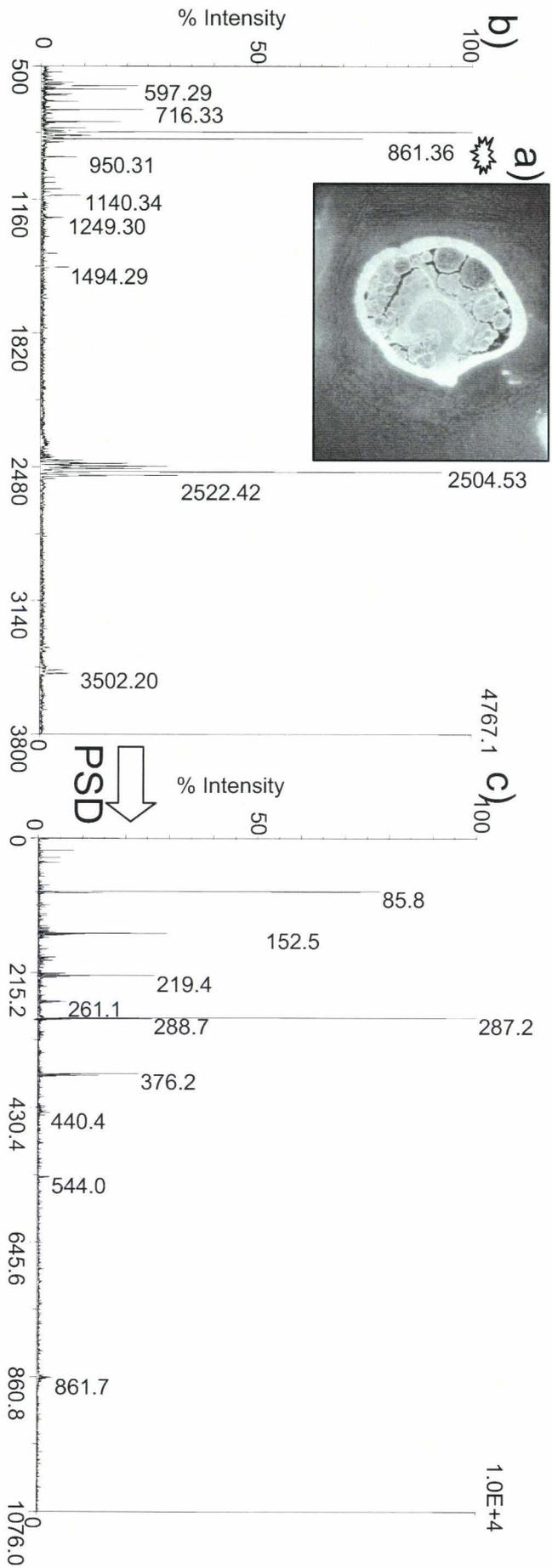


Figure 2:

Figure 3:

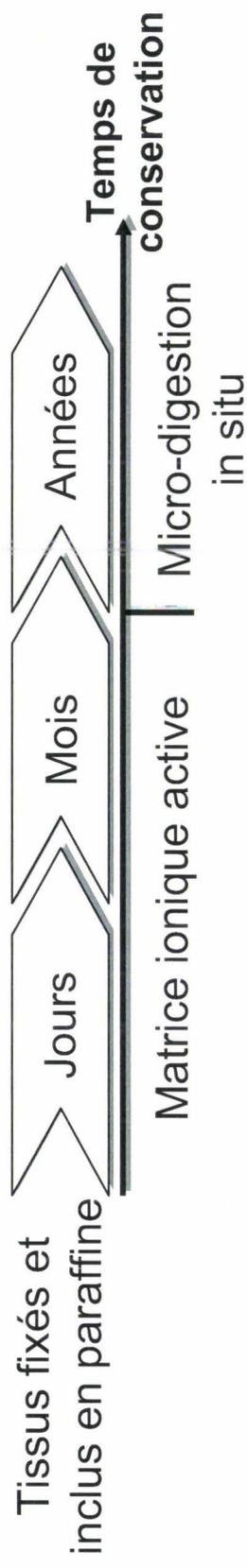


Figure 4

a) Mode positif



b) Mode négatif

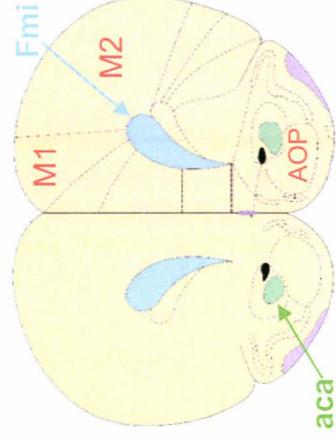
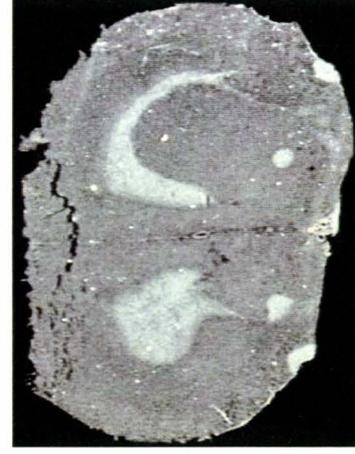
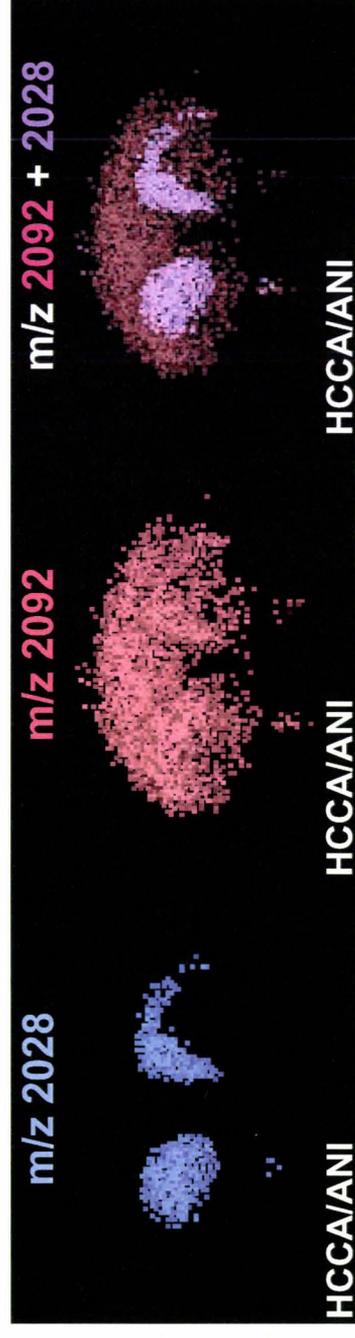


Figure 5:

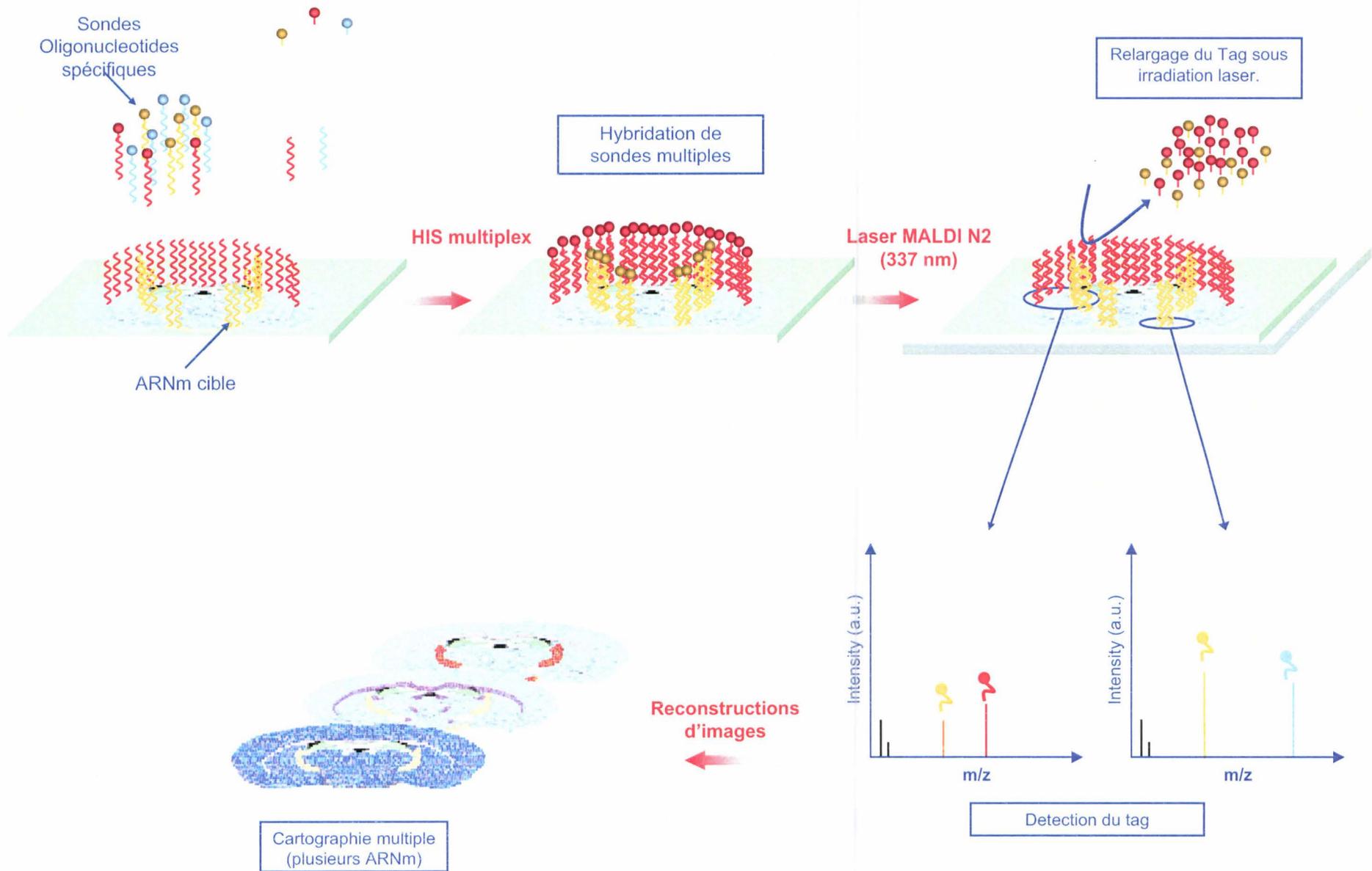
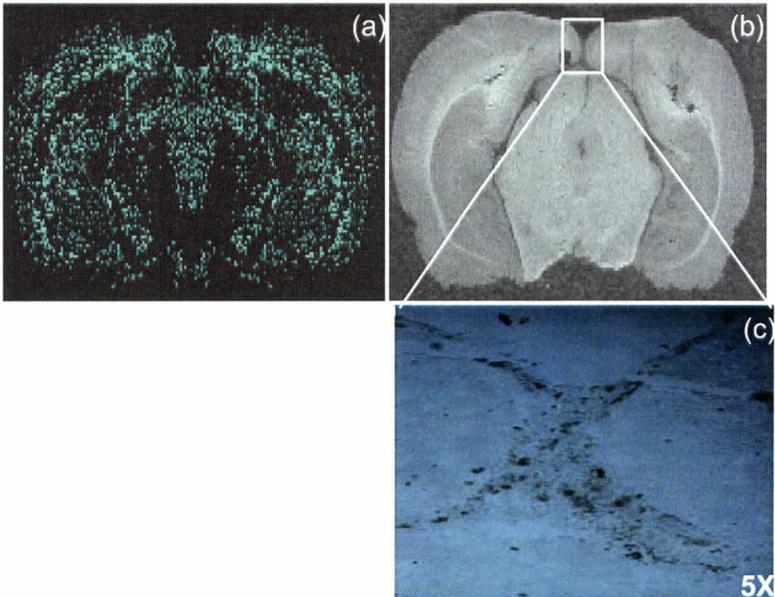
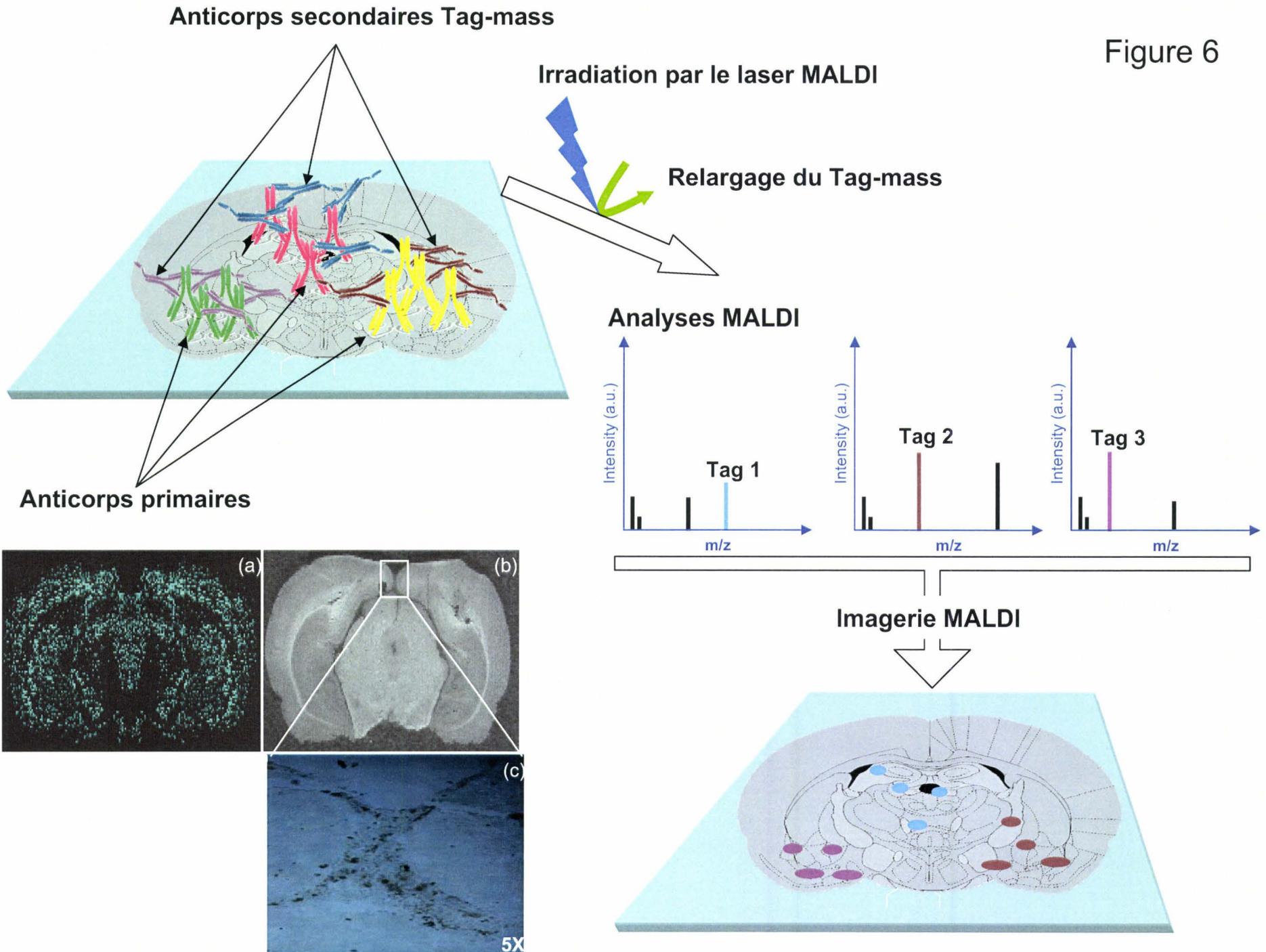


Figure 6



TAG-MAS: SPECIFIC MOLECULAR IMAGING OF TRANSCRIPTOME AND PROTEOME
BY MASS SPECTROMETRY BASED ON PHOTOCLEAVABLE TAG

R. Lemaire^{1*}, J. Stauber^{1*}, M. Wisztorski¹, C. Van Camp¹, A. Desmons¹, M. Deschamps², G.
Proess², I. Rudlof², A. S. Woods³, R. Day⁴, M. Salzet¹, I. Fournier^{1@}

¹Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, MALDI Imaging Team,
Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

²Société EUROGENTEC, Eurogentec Biologics Department, LIEGE Science Park, Rue Bois Saint-
Jean 14, 4102 Seraing, Belgium

³NIDA IRP, NIH, Baltimore, Maryland 21224, USA

⁴Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke,
Québec, J1H 5N4, Canada

*Equal contribution

@ Corresponding author

ABSTRACT -

MALDI Imaging of tissue has become a promising technique for tracking biomarkers while giving their localization and structural characterization. We have succeeded in creating a concept of specific targeting probes (oligonucleotides, antibodies). This approach is based on probes modified with a photocleavable linker coupled to a tag cleaved and detected by Mass Spectrometry. The use of multiplex analyses is the key to this rapid, highly sensitive and accurate approach for correlating levels of expression of different mRNA or proteins in diseases. This opens the door to pathological proteomic studies involving tissue microarray for diagnostic and patient treatment monitoring.

INTRODUCTION

MALDI Imaging is a novel and powerful tool for direct detection and localization of biomolecules¹⁻⁵. Developments in this field have led to the study and anatomical localization of drugs, lipids, peptides and proteins in tissue sections. This method eliminates time consuming and work intensive steps such as extraction, pre-purification or separation^{1-3,5}. Many applications of this technique have recently been successfully undertaken. Especially MALDI imaging and direct tissue analysis can be applied to diseased tissues to directly hunt for biomarkers^{4,6}. However the analysis of nucleotide sequences is difficult and presents a real challenge for mass spectrometry. Moreover, as classical MALDI analysis, MALDI Imaging of protein has a restricted mass range, where low abundance proteins such as membrane or high molecular weight proteins are not detected^{2,4-6}.

To overcome these problems, we proposed and developed a new concept of specific MALDI Imaging called "Tag-Mass". This strategy is based on the indirect MALDI imaging of mRNA or proteins using a probe labeled with a photocleavable linker which is cleaved by the MALDI UV laser releasing a tag molecule. The Tag is a known molecule with a characteristic mass efficiently detectable by MALDI-MS, thus allowing for molecular images to be obtained. By combining this concept to *In Situ* hybridation or immunocytochemistry methods, we are able to map in addition to the classic molecular images, specific transcriptomic and peptidomic/proteomic maps. Molecular distribution and correlation of transcriptome and proteome expressions leads to important advances in the field of medical research for earlier diagnosis correlating the presence of genes with their concomitant protein expression. Toward these results, we show the feasibility of the specific MALDI Imaging approach which opens the way to a new application field of diagnostic mass spectrometry through characterization of biomolecules contained in cells that start to change their phenotype during disease development.

The Tag-mass concept: from indirect detection of photocleaved tag
to image of mRNA and proteins

Direct analysis of tissues does not allow the generation of signal from oligonucleotides due to their large size and low abundance at the cellular level in addition to analytical difficulties in mass spectrometry^{7,8}. Similar challenges are encountered for high mass (> 30 kDa), membrane and low abundant proteins when probing tissue by MALDI-MS^{2,4,5}. To solve these problems and to access the full proteome and transcriptome for MALDI imaging, we advance a new concept for the specific imaging of these molecules. The approach is based on the indirect detection of mRNA and proteins *via* a “Tag-mass”. The “Tag-mass” is composed of a molecule of known mass⁹, easily detected by MALDI and coupled to a probe *via* a linker that is cleaved and liberated during analysis. In MALDI, laser irradiation is an efficient way to release tags by using a UV photocleavable linker (Figure 1A). The approach can be extended to MALDI imaging by using specific probes that will target either mRNA or proteins. Many probes incorporating a photocleavable linker and a tag can be designed (DNA, cDNA or simple strand cRNA, antibodies) to perform hybridization methods like *in Situ* Hybridization (ISH) for oligonucleotides probes or ImmunoCytoChemistry (ICC) for antibodies probe to specifically target mRNA or proteins. Photocleavable tagged oligonucleotides probes can be used in combination with ISH for hybridizing the probe to its mRNA target. In MALDI, material ejection is promoted by laser irradiation and restricted to the cross section area between the laser beam and the sample surface. The mass spectrum reflects the molecular composition of the tissue in this specific site. If the tagged probe hybridizes to its complementary mRNA sequence then the laser irradiation will photocleave the linker, inducing tag release, leading to a characteristic signal of known mass. At positions where no target mRNA are present, the characteristic signal for the tag will not be observed. Thus, as in classical MALDI imaging, scanning the tissue section, images of mRNA can be obtained indirectly by reconstructing the molecular image of the tag molecule on the basis of its mass signal mass data. This approach brings mass spectrometry’s sensitivity and the possibility of multiple imaging at once using multiple tags (Figure 1B).

The same strategy can be adapted for mapping target proteins using tagged antibodies in combination with ICC experiments. A specific tagged antibody can be used for direct experiments. However, in our opinion, addition of the linker and tag on a secondary antibody recognizing the C-terminus of a primary antibody is easier to use and allows for signal amplification. Thus, as for ICC experiments, a primary antibody will specifically bind its target antigen. The tagged secondary antibody will then specifically recognize the first one. Then, as for mRNA, the scanning of the tissue section by MALDI MS will allow to indirectly get the protein molecular images, by

monitoring the tag in the mass spectra. As for oligonucleotides, multiple different proteins specific images can be obtained by MALDI in one experiment by using tagged secondary antibodies developed in different animal species.

Specific molecular imaging of mRNA and proteins brings the mass spectrometry sensitivity and multiplex possibilities. This should be of great interest for transcriptome/proteome co-localization mapping and will find applications for co-locating a protein and its corresponding mRNA.

Photocleavable tagged oligonucleotide probes: mRNA MALDI imaging

As first step⁹, performance of photocleavage dissociation by MALDI UV laser was evaluated for oligonucleotides. A photocleavable linker was bound to the 5' oligonucleotide end and peptides were chosen as tags and photodissociation was assumed to induce cleavage directly between the phosphate group and the photoactivable linker (Figure 2A). As shown Figure 2B, photocleavage by laser irradiation is efficient and results in the expected tag characteristic signal (m/z 1626.37 noted P-PC). However, the MALDI mass spectrum clearly shows that 100% photocleavage yield is not achieved since signals corresponding to the whole intact structure are still observed (m/z 6970.50 for MH^+ ion and 3489.92 for MH_2^{2+} ion). Signals at m/z 5351.03 and 2678.79 correspond respectively to the MH^+ and MH_2^{2+} of the oligophosphate after photocleavage. Peak broadening from salt adducts and metastable fragmentations decreases mass accuracy, a common occurrence of MALDI oligonucleotides measurements. At m/z 1163.9, the low abundance peak was attributed to a fast cleavage of the linker disulfide bridge liberating the peptide. To study the possibility of using photocleavage under multiplex analysis conditions, a mixture of three oligopeptides corresponding to three different 20 mers oligonucleotides and three different peptides was investigated. As presented Figure 2C, expected characteristic signals of the photodissociation (P-PC) were observed as proved by the presence of peaks at m/z 1346.95, 1603.74 and 1891.72. As expected from previous data fast fragmentation ions were also observed (m/z 1161.87, 1449.88) and were especially intense for one of the peptide. For subsequent experiments, bradykinin which gives the best sensitivity (100 fmoles) and ease of detection in all analytical conditions was selected (P3). To increase sensitivity by suppressing fast fragmentation signals a new photocleavable linker/tag system was designed replacing the disulfide bridge by a maleimid group for bounding the tag peptide to the photocleavable linker (Figure 3A). Studies performed on this structure clearly demonstrate the suppression of fast fragmentation signal and increase of the expected signal for photocleavage. This photocleavable linker/tag system was used to construct double strand cDNA oligonucleotidic probes. Proenkephalin was chosen as model target mRNA because of previous studies giving a good background on this molecules mRNA repartition in the rat brain^{10,11}. Classic

untagged and tagged primers bearing the photocleavable linker/tag system were designed on the proenkephalin cDNA sequence. Both types of primers were used for RT-PCR amplification and have given the same results in term of product and yield of amplification. RT-PCR was used to make a 400 bp double strand cDNA oligonucleotidic probe. The probe was tested for ISH experiments followed by MALDI direct analysis of the hybridized rat brain tissue section for tag detection. Obtained mass spectra, clearly demonstrated the possibility of detecting the characteristic ion signal for the tag in some specific region of the section hybridized with the tagged probes. This signal was never found for the tissue sections where the classic untagged proenkephalin probes were used. However, signal intensity for the tag was weak and somewhat lacking in sensitivity, although the feasibility of the proposed strategy was unambiguously demonstrated. So to improve sensitivity increase specificity and facilitate usage, the strategy was slightly modified.

An alternative approach dUTP-TAG was developed, based on labeling with the same photocleavable linker/tag system of an uracile base on the pyrimidic moiety. This new design keeps both the 5' and 3' ends of the nucleotide free, allowing the synthesis of riboprobes by *in vitro* translation. This first step increases the specificity of the method, thus preventing non specific binding to genomic DNA. Moreover, use of tagged nucleotide basis lead to the incorporation of one tag for each T nucleotide required by the amplification process according to the base sequence (Figure 3B). This second aspect increases sensitivity. Finally, the use of tagged nucleotides has a very practical aspect, since these nucleotides can be an all purpose procedure *i.e.* regardless of the probe amplified. U-tagged nucleotides were tested for photocleavage as shown in Figure 3C. Again characteristic signal of the tag peptide was observed (m/z 1163.23) with a very good S/N ratio and signal intensity, demonstrating that the maleimid group incorporation presvents fast fragmentation. The dU-tagged system was used for amplifying the proenkephalin probe by RT-PCR. As expected from the structure (Figure 4A) and previously described for dUTP-DIG systems¹² (Ree et al., 1992) dNTP ratios had to be optimized and best results were obtained with dU-TAG and dTPP in a ratio of 1:3. ISH was performed with the multiple tagged proenkephalin amplified probes. Direct MALDI analysis of the hybridized rat brain tissue section was then carried out and compared to the analysis of the adjacent tissue section after ISH with the same untagged proenkephalin probe amplified in the same conditions with unmodified dNTP (Figure 5A). For the multiple tagged proenkephalin probe in specific regions, the characteristic signal of the tag peptide was observed as shown on the mass spectrum, whereas this signal never appears in any of the region of the rat brain for the classic probe. As expected, mass spectra reveal a clear increase in detection of the ion corresponding to the tag peptide. MALDI imaging was subsequently performed on this tissue section by scanning the tissue and recording corresponding mass spectra (7000 spots, 100 μ m steps). Based on the characteristic tag signal, a molecular image was reconstructed as presented in

Figure 5B. Thus, the obtained image gives the molecular image of proenkephalin mRNA. As observed, the image fits the tissue morphology well and matches with proenkephalin mRNA distribution obtained by ISH with autoradiography¹³. These experiments strongly support the concept that specific mRNA imaging by MALDI mass spectrometry is feasible.

Photocleavable tagged antibody probes for antigen MALDI imaging

The same concept was applied for performing specific images of proteins using tagged secondary antibody. As previously explained, in order to gain sensibility and ease of use secondary antibodies were tagged on the C-terminal part of their Fc chain (Figure 4B). Immunocytochemistry (ICC) experiments were performed with a classical primary antibody directed against the protein of interest and habitual peroxidase or FITC tagged secondary antibody was replaced by our specifically modified antibody for MALDI imaging. Tagged antibody was firstly tested for evaluating yield of photocleavage and checking out the presence of expected tag signals. Mass spectra lead to the observation of two characteristic signals for the tag (m/z 1686.43 and 1703.23). Higher m/z signal correspond to the P-PC moiety observed with the oligonucleotide probes. The m/z 1686.43 signal corresponds to same moiety, minus one oxygen molecule. Such signals have already been described from photocleavable system but no mechanism was proposed. Two unexpected less abundant signals were also observed and were attributed to some of the maleimide intermediates of reaction remaining in the solution even after purification. As for oligonucleotides, photocleavage with antibodies was highly efficient conducting to the observation of characteristic signals. For imaging experiments after ICC, Carboxypeptidase D (CPD) protein was chosen as the target protein for different reasons and in particular its specific presence in some rat brain regions as known from previous studies and its impossibility of direct detection by MALDI imaging because of its mass and nature (membrane protein of 180 kDa)¹⁴. ICC experiment was carried out in parallel on two adjacent rat brain sections using the same primary antibody and comparing our tagged antibody to the same FITC labeled antibody. As shown Figure 5C, several signals were observed from the direct analysis of the tissue section with the FITC antibody corresponding to peptides present in the tissue section. Mass spectrum obtained in the same region with the tagged antibody also presents these signals, however, in this case two more signal that correspond to the expected signals for the tag peptide are also observed. This tissue section was then kept for MALDI imaging scanning on 30 000 spots, 100 μ m steps. On the base of signal intensity for the characteristic ion at m/z 1686.43 which is the most abundant one, the image was reconstructed giving indirectly the image of the protein (Figure 5D). As observed in the figure very good image resolution was obtained. It is remarkable that protein distribution in the section is perfectly correlated to tissue structure as observed when comparing to a picture of the section before ICC experiments. In

parallel, on adjacent sections same experiments were performed with anti rabbit antibody coupled to a peroxidase enzyme for specific reaction with colorimetric detection using either DAB or 4-chloronaphthol. Comparison of pictures with T-chloronaphthol or DAB labelling to MALDI image based on the tag detection show that CPD protein is detected in the same brain area using both methods, thus validating the methodology. Even, in some specific area such as hippocampus protein was detected with the tag-mass system while no signal was detected with the colorimetric reaction, meaning that the indirect detection by mass spectrometry is much sensitive than classical revelations. Comparing the MALDI image of CPD to the fluorescence one obtained on the section on which FITC antibody was used; it is observed that MALDI was even quite as sensitive as fluorescence. It is noted that the MALDI molecular strategy gives a more localized signal as compared to fluorescence that diffuses and present a certain amount of background noise due to the natural fluorescence of the tissue. Moreover, at a low magnification, signals are found in the same areas by fluorescence and MALDI imaging. However, by the present time MALDI imaging does not allow for sub-cellular localization such as what can be achieved by fluorescence. Moreover, no quenching as well as auto fluorescence problems can be observed with tagged-antibodies.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

We demonstrate, here, a new concept for specific imaging of mRNA and proteins with MALDI mass spectrometry. This technique is a specific approach to image a targeted molecule in a tissue. The strategy relies on the addition of a probe molecule, which specifically targets a biomolecule with a photocleavable linker bearing a tag moiety released by MALDI laser irradiation through photodissociation and thus easily analyzable. We have successfully tested this strategy with peptide tags for oligonucleotide and antibody probes. Thus with this method a 180 kDa membrane protein and proenkephalin mRNA were imaged. For oligonucleotides, U-TAGGED nucleotide was found to be the best alternative for increased sensitivity and flexibility. Mass spectrometric detection was shown to be very sensitive giving repartition of the molecule on the whole tissue section and even more sensitive than most of the classical method using peroxidase as substrate, and to give highly resolved images of molecules that could not be observed directly by MALDI imaging.

However, sensibility of the method can still be increased multiplex experiments with several different tags will be explored. Images' resolution as also to be improved and is currently under development. This concept is also to be extended to other probes including lectins or aptamers that will allow for imaging polysaccharides, peptides, proteins or drugs respectively (Figure 6). It is also obvious that different families of tags that will give better signal detection by MALDI should be developed. Thus, MALDI matrices or compounds absorbing at the laser wavelength and possibly

detectable by Laser Desorption Ionization (LDI) will be looked for in order to acquire images without the need for matrix. Finally, photocleavage is a very elegant strategy but linker that will dissociate by prompt fragmentation during desorption/ionization process could be a good alternative. Linker dissociation by fragmentation could perhaps lead to a higher tag release rate. Moreover, using such linkers could extend the concept from UV to IR MALDI or even to SIMS mass spectrometry for specifically designed linkers and tags depending on the ion production method used. SIMS applications could also be very attractive, as SIMS imaging allows subcellular probing (classically 1 μm resolution), however in the current state SIMS is limited to monoatomic elements or small organic compounds such as lipids. Finally, Tag-mass could open a great opportunity for mass spectrometry to image all biomolecules present in tissues, with a very high sensitivity and without being restricted by low abundance or size. In addition, specific imaging could be used for relative quantification of target molecules. Using similar tags that differ from each others by isotopic composition (e.g. deuteriated molecules) and presenting the same behavior when analyzed MALDI, thus opening the way for quantification by MALDI imaging. Finally, the concept could also be transferred to microarrays for more quantitative and specific detection.

Such strategy gives the opportunity to obtain transcriptome/proteome co-localization maps bringing very interesting information on biological processes as for example for diagnosis screening the transcript before the synthesis of the corresponding protein. Extending MALDI specific imaging to aptamer probes for example will also allow for example to co-localized a drug and its assumed receptor target.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI Jeunes Chercheurs ACI JC4074 to I. Fournier), Conseil Régional Nord-Pas de Calais to M. Wisztorski. Also supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics GmbH and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides.

BIBLIOGRAPHY

1. CAPRIOLI, R.M., FARMER, T.B. & GILE, J. MOLECULAR IMAGING OF BIOLOGICAL SAMPLES: LOCALIZATION OF PEPTIDES AND PROTEINS USING MALDI-TOF MS. *ANAL CHEM* **69**, 4751-60 (1997).
2. CHAURAND, P., SCHWARTZ, S.A. & CAPRIOLI, R.M. PROFILING AND IMAGING PROTEINS IN TISSUE SECTIONS BY MS. *ANAL CHEM* **76**, 87A-93A (2004).
3. FOURNIER, I., DAY, R. & SALZET, M. DIRECT ANALYSIS OF NEUROPEPTIDES BY IN SITU MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY IN THE RAT BRAIN. *NEURO ENDOCRINOL LETT* **24**, 9-14 (2003).
4. RUBAKHIN, S.S., JURCHEN, J.C., MONROE, E.B. & SWEEDLER, J.V. IMAGING MASS SPECTROMETRY: FUNDAMENTALS AND APPLICATIONS TO DRUG DISCOVERY. *DRUG DISCOV TODAY* **10**, 823-37 (2005).
5. STOECKLI, M., CHAURAND, P., HALLAHAN, D.E. & CAPRIOLI, R.M. IMAGING MASS SPECTROMETRY: A NEW TECHNOLOGY FOR THE ANALYSIS OF PROTEIN EXPRESSION IN MAMMALIAN TISSUES. *NAT MED* **7**, 493-6 (2001).
6. ROHNER, T.C., STAAB, D. & STOECKLI, M. MALDI MASS SPECTROMETRIC IMAGING OF BIOLOGICAL TISSUE SECTIONS. *MECH AGEING DEV* **126**, 177-85 (2005).
7. KIRPEKAR, F., BERKENKAMP, S. & HILLENKAMP, F. DETECTION OF DOUBLE-STRANDED DNA BY IR- AND UV-MALDI MASS SPECTROMETRY. *ANAL CHEM* **71**, 2334-9 (1999).
8. NORDHOFF, E. ET AL. COMPARISON OF IR- AND UV-MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES. *NUCLEIC ACIDS RES* **22**, 2460-5 (1994).
9. OLEJNIK, J. ET AL. PHOTOCLEAVABLE PEPTIDE-DNA CONJUGATES: SYNTHESIS AND APPLICATIONS TO DNA ANALYSIS USING MALDI-MS. *NUCLEIC ACIDS RES* **27**, 4626-31 (1999).
10. SALZET, M. NEUROIMMUNOLOGY OF OPIOIDS FROM INVERTEBRATES TO HUMAN. *NEURO ENDOCRINOL LETT* **22**, 467-74 (2001).
11. SALZET, M., VIEAU, D. & DAY, R. CROSSTALK BETWEEN NERVOUS AND IMMUNE SYSTEMS THROUGH THE ANIMAL KINGDOM: FOCUS ON OPIOIDS. *TRENDS NEUROSCI* **23**, 550-5 (2000).
12. REES, J.L. & FISHER, C. NONRADIOACTIVE IN SITU HYBRIDIZATION WITH DIGOXIGENIN. *TRENDS GENET* **8**, 8 (1992).
13. SHIVERS, B.D., HARLAN, R.E., ROMANO, G.J., HOWELLS, R.D. & PFAFF, D.W. CELLULAR LOCALIZATION OF PROENKEPHALIN mRNA IN RAT BRAIN: GENE EXPRESSION IN THE CAUDATE-PUTAMEN AND CEREBELLAR CORTEX. *PROC NATL ACAD SCI USA* **83**, 6221-5 (1986).
14. DONG, W., FRICKER, L.D. & DAY, R. CARBOXYPEPTIDASE D IS A POTENTIAL CANDIDATE TO CARRY OUT REDUNDANT PROCESSING FUNCTIONS OF CARBOXYPEPTIDASE E BASED ON COMPARATIVE DISTRIBUTION STUDIES IN THE RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *NEUROSCIENCE* **89**, 1301-17 (1999).

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1:

- A. Schematic representation of the concept of MALDI imaging of mRNA using tagged oligonucleotide probes for detection by photocleavage.
- B. Scheme of the photocleavable linker/tag system for indirect detection after photodissociation under the MALDI UV laser wavelength.

FIGURE 2:

- A. Developed structure of the oligonucleotide tagged by the photocleavable linker/tag/system intact and after photodissociation under the MALDI laser.
- B. MALDI mass spectrum in the linear positive mode of an oligopeptide including a 20 mer oligonucleotide sequence and the photocleavable tag/system with 3-HPA as matrix.
- C. MALDI mass spectrum in the reflectron positive mode of three oligopeptides including three different 20 mer oligonucleotides and the photocleavable linker/tag system with three different peptides as tags with HCCA as matrix.

FIGURE 3:

- A. Developed structure of the oligonucleotide tagged by the photocleavable linker/tag system with a maleimide group for bounding to the tag peptide structure.
- B. Scheme of the incorporation of the tagged U nucleotide in a single strand RNA probe.
- C. MALDI mass spectrum in the reflectron positive mode of the U-tagged nucleotide in solution with HCCA as matrix.

FIGURE 4:

- A. Developed structure of the U-tagged nucleotide
- B. Developed structure of the photocleavable linker/tag system modified secondary antibody

FIGURE 5:

- A. Compared MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ISH of double strand oligonucleotide cDNA

probe corresponding to proenkephalin for classical untagged proenkephalin probe and the U-tagged proenkephalin probe.

B. Rat brain tissue section picture before ISH experiments and MALDI image reconstructed by scanning the tissue section after ISH experiment with the U-tagged proenkephalin probe (7000 spots separated each of 100 μm).

C. Compared MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ICC experiment with a primary antibody directed against carboxypeptidase D protein and a rabbit FITC polyclonal secondary antibody labeled with a FITC or bearing the photocleavable linker/tag system

D. Rat brain tissue section picture before the ICC experiment and corresponding MALDI molecular image reconstructed on the tag peptide characteristic ion screening after ICC experiment with the tagged secondary antibody (30000 spots separated each of 100 μm). and comparison to pictures of specific region of the adjacent rat brain sections after ICC experiment with FITC or peroxydase secondary antibody.

FIGURE 6:

Schematic representation of the concept of the specific imaging for different target biomolecules and probes.

ADDITIONAL MATERIALS

MATERIAL MATERIAL AND METHODS

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), 3-hydroxypicolinic acid (3-HPA), Angiotensin II, Des-Arg-Bradykinin, Substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38 and bovine Insulin were obtained from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. were from J.T. Baker.

For Tag synthesis, solvents (DMF, dichloromethane) purchased from Biosolve were of the peptide synthesis grade and used as they are. The amino acids, the 4-[4-[1-(Fmoc-amino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butanoic acid (photoclivable linker) were purchased from Novabiochem, the N-methylmorpholine (NMM), the N,N'-Diisopropylcarbodiimide (DIPCD), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), the N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA), from Aldrich, the trifluoroacetic acid, the 2-(1H-Benzotriazole 1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate/N-Hydroxybenzotriazole (TBTU) from Biosolve, the goat anti-rabbit IgG, the PD 10 (G 25 resin column) from Sigma and the 3-Maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester (MBS) from Pierce.

Tag synthesis

Photocleavable tagged oligonucleotide

The peptide is synthesized on Symphony (Protein Technologies Inc.) and purified on a Delta-Pak C18 15 μ m 100A column (Waters). The oligonucleotide is synthesized from 3' to 5' on Expedite (Applied BioSystem). The amine function with photocleavable linker is added in 5' before cleavage and deprotection. These steps are performed using a NH₄OH 28% solution during 24 hours in the dark. The amino oligonucleotide is then purified on a Delta-Pak C18 15 μ m 300A column (Waters). The amino function of the oligonucleotide is coupled to a heterobifunctional reagent comprising a maleimide function. The maleimido oligonucleotide is solubilized in water and added to a 1.2 equivalent of peptide in solution. The mixture is let under stirring for 16 hours. The oligo-peptide conjugate is then purified on a Delta-Pak C18 15 μ m 300A column (Waters) and characterized by MALDI-MS (see Mass Spectrometry section).

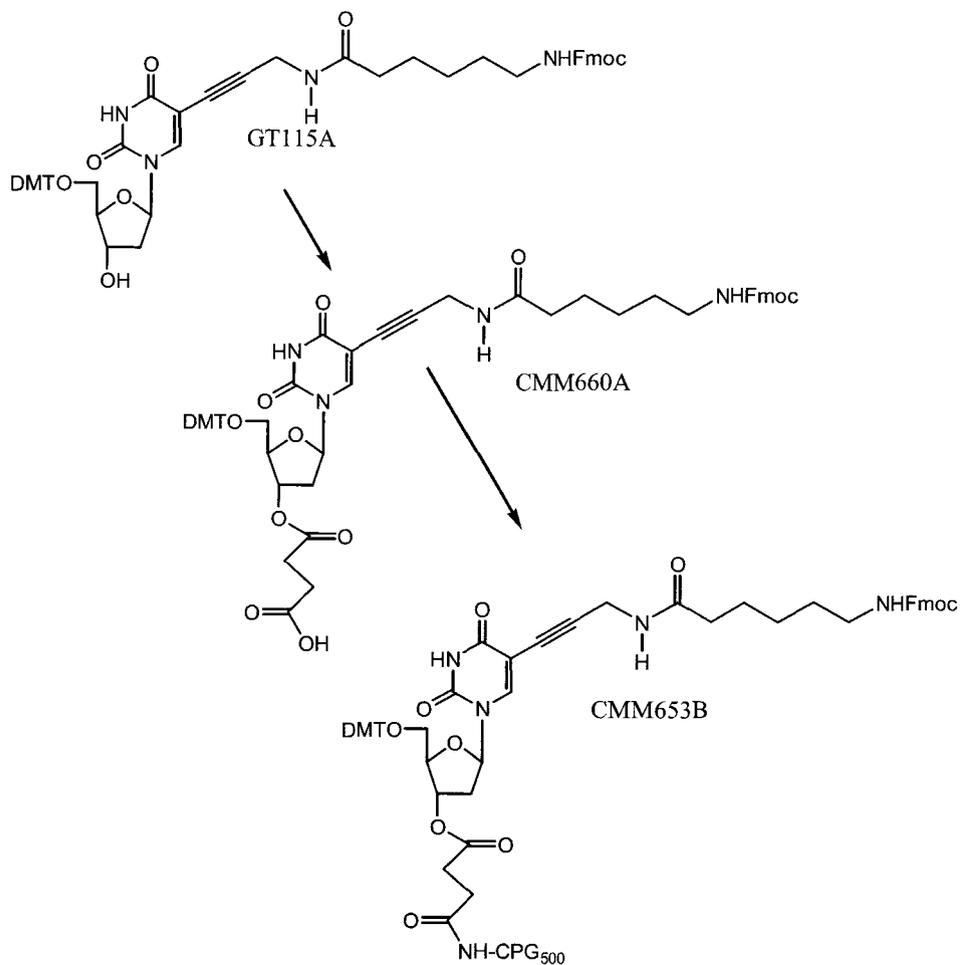
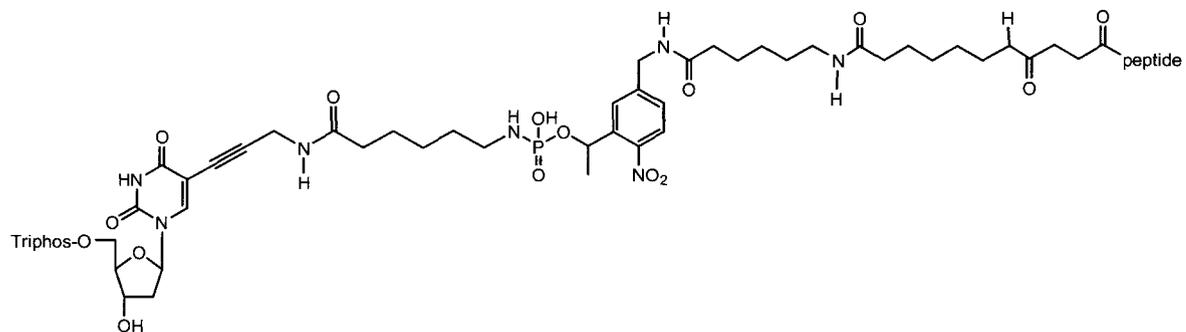
Photocleavable tagged antibody

Peptides were custom made by Eurogentec S.A. using solid phase peptide synthesis (SPPS) on a 0.25 millimole (mmole) scale using Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-terminus protection) standard synthesis protocols 4 equivalent of Fmoc-AA) with double coupling reactions (twice 40minutes) using TBTU/NMM has activator on a Symphony (Rainin Instrument Co,

Woburn, MA, USA) synthesizer. The photocleavable linker (4 equivalents) was introduced manually using DIPCDI/DIPEA (2 hours) as activator. Purifications were performed by RP-HPLC on a Waters (Milford, MA, USA) Delta-Pak C18 [15 μ m-100A-25x100mm] column using a Waters liquid chromatography system consisting of Model 600 solvent delivery pump, a Rheodine injector and a automated gradient controller (Solvent A: H₂O-0.125% TFA; Solvent B: CH₃CN-0.1% TFA, Gradients: 5-15% to 30-60% B in 20minutes). Detection was carried out using Model M2487 variable wavelength UV detector connected to the Waters Millennium software control unit. The Quality Control was performed by analytical RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 [5 μ m-100A-150x3.9mm] column (Solvent A: H₂O-0.125% TFA; Solvent B: CH₃CN-0.1% TFA. Gradient: 100% A to 60% B in 20minutes) using a Waters Alliance 2690 Separation Module equipped with a Waters 996 Photodiode Array Detector and by MALDI-TOF MS (see mass spectrometry section).

The Functionalisation with the photolinker derivatised peptide A was done as follow: a solution of 0.5mg of MBS in 300 μ l of DMF is added to a solution of 4mg of goat anti-rabbit IgG in 2ml of PBS and mixed for 30min. The solution is then desalted on a PD 10 column using 50mM phosphate buffer at pH =6. To this desalted activated IgG, a solution of 1mg of the photocleavable derivatised peptide in 300 μ l of DMF and 1ml of PBS is added and stirred for 3h at room temperature. Afterwards, the reaction mixture is dialysed overnight against PBS (membrane cut-off 12-14 000).

Synthesis of a dUTP-peptide conjugates with a photocleavable linker



In order to prepare this triphosphate a Fmoc protected CPG resin was required. The succinylate was prepared from GT115A (100mg). The sample was relatively pure but contained a small amount (by TLC) of a higher running non-tritylated compound (originates from the Sonogashira reaction and does not interfere with subsequent reactions and was not visible in the NMR spectra of the sample). Since it was not possible to purify the succinate, the reaction was modified slightly. It is normal to add 2 equivalents of succinic anhydride to the reaction to get quantitative yield but if this is not removed completely the amino residues of the cpg resin can become blocked during functionalisation. Therefore, 1.5 equivalents were used since the exact purity of the product is undetermined. The reaction did not go to completion (from TLC this was more than 50% by comparing the intensity of the components on the TLC by UV(254nm) and the intensity of the DMT cation on treatment with HCl fumes. Since the non-succinylated product will not react, the resin was functionalised using this mixture. The resin was prepared but the loading is very low, $5.4\mu\text{molg}^{-1}$ (180mg).

The resin was detritylated using 2% TCA/DCM washed with DCM and the process repeated until no orange colour due to the DMT cation was observed. This was then dried (suction under argon) and the resin soaked in pyr/DMF 1:3 (0.4ml) for 5 minutes before a solution of 0.1M Eckstein's reagent in dioxane was added (0.1ml). The reaction was allowed to stand for 15 minutes after which time the resin was washed (dioxane, MeCN) and dried (suction under argon). The resin was then soaked in a solution on 0.5M *bis*-(tributylammonium) pyrophosphate in anhydrous DMF and tri-*n*-butylamine for 20 minutes and the resin washed (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). The product was oxidised (iodine/water/pyridine/THF for 30 minutes), washed (MeCN) dried (suction under argon). The Fmoc protecting group was removed (20% piperidine/DMF, 0.5ml, 20mins) and the resin washed thoroughly, (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). This was then washed with DCI and a solution of DCI/photolabile amino linker CEP (1:1, 0.5ml) was added and the reaction allowed standing for 20 minutes. The solution was removed and the resin washed (MeCN) and dried (suction under argon). A mixture of cap A/cap B (1:1, 0.5ml) was added and the resin soaked for 5 minutes before removing the capping reagents and washing and drying the resin

as before. The product was oxidised ($I_2/THF/pyr/H_2O$, 5mins) and the resin washed and dried as before. This was cleaved from the resin with cNH_4OH at room temperature for 30 mins, then purified by anion exchange HPLC on a Dionex NucleoPac100 HPLC column using the following solvent system Buffer A: 0.1M NH_4Cl with 10% acetonitrile; Buffer B: 1M NH_4Cl with 10% acetonitrile; flow rate 2.5 mL/min. using 6Triphos.mth. This gave 3 fractions (A:-7mins, B:-7.9mins and C:-10.3mins). All 3 fractions were lyophilized over night before being desalted by reverse phase HPLC Buffer A: Water; Buffer B: acetonitrile; flow rate 4 mL/min. The 3 fractions were again lyophilized overnight before being suspended in 200ul of water. M.S. showed that CMM661A pk 1 was definitely not the triphosphate but it could be either CMM661pk 2 or 3 (very similar M.S. profiles). (CMM662A was formed from CMM661A pk 2 and CMM663A was formed from CMM661A pk 3). Both samples were then used in the subsequent reaction. Bicarbonate buffer (10ul) and the maleimide NHS ester (50ul) were added to each sample and the reactions agitated overnight. The samples were diluted with milliQ water (500ul) and filtered. The samples were purified by RP-HPLC, buffer A: 0.1M TEAA, buffer B: MeCN, flow rate 4mL/min. using MeCN50.mth and the coupling of the peptide was carried out on these fractions.

Tissue preparation for *in situ* hybridization (ISH)

Formalin Fixed Paraffin Embedded tissues (FFPE) sections of 10 μm were transferred onto a conductive ITO-glass. Sections were stored at 30°C overnight for good adherence. Tissues were then dewaxed using xylene (2x15 minutes), and then hydrated during 5 minutes in 3 steps mixed ethanol/water baths (96°, 70°, 30°). Sections were prepared according to classical ISH protocols. Tissues were incubated in glycine 0,1M/Tris HCl buffer (pH7.4), then treated during 15 minutes with proteinase K for protein digestion (1 $\mu g/\mu L$ in 1M/Tris HCl, 0.5M EDTA pH 8). After post-fixation with 4% paraformaldehyde (0.1M Phosphate/5mM $MgCl_2$ buffer pH 7.4) during 15 minutes, bath of 10 minutes with triethanolamine (0.1M pH 8) were realized. Sections were washed with SSC 2X then ultrapure water during 5 minutes. Probes were denaturated at 100°C during 10 minutes, and after a 3 steps tissue dehydration (30°, 70°; 96°), hybridization was done during 16H at 55°C dissolving cDNA probes in hybridization buffer (Dextran sulfate 10%, formamide 50%, SSC 20X 20%, Denhardt's 100 X 10%). Tissues were incubated with Rnase (10 $\mu g/mL$, 37°C 30 minutes) then rinsed 10 minutes with successive SSC/2mercaptoethanol (0.07%) solutions (2X, 1X) and twice 0.5X at 55°C during 30 minutes. After rinsing slices with SSC 0.1X during 5 minutes at room temperature, one bath of ultrapure water was realized to remove excess of polymers. Tissues were kept drying at room temperature before MALDI matrix application.

Tissue preparation for immunocytochemistry (ICC)

Adult male Wistar rats weighing 250-350 g (animal welfare accreditation by the French ministry of the agriculture N° 04860) maintained under standard care were used. Animals were sacrificed by decapitation and immediately dissected to remove the brain. Frozen sections of 10 μm were performed on a cryostat and immediately transferred onto a conductive Indium-Tin Oxide (ITO) glass (Bruker Daltonics, Wissenbourg, France).

After drying sections during 5 minutes at room temperature, tissues were heated at 80°C during 20 seconds for good adherence on slides. Rat brain sections were incubated at room temperature with 500 μL buffer (0.1M PBS / 1% BSA / 1% normal goat serum / 0.05% triton X100) for 30 minutes. The same buffer was used to dilute carboxypeptidase D (CPD) antibody (1/400), and incubation was performed overnight at 4°C. After 3 times washing in PBS, sections were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat; Jackson Immunoresearch Inc. Europe LTD) or FITC-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat; Jackson Immunoresearch Inc. Europe LTD) or using photocleavable tagged antibody (1/100) during 80 minutes at room temperature. After another 3 washing steps in PBS buffer, the sections for peroxidase ICC were incubated in chloronaphthol with 0.05% H_2O_2 for detection. Reaction was stopped with several PBS and ultrapurewater baths. For FITC ICC, slices were prepared using phenylenediamine in glycerol. For photocleavable tagged antibody, tissues were rinsed 3 times during 5 minutes with ultrapure water to remove salts, and sections were kept drying at room temperature before matrix application. Tissues were then, compared using microscopy

Mass Spectrometry

Sample preparation for MALDI/MS analysis.

For classical analysis 1 μL of sample solution and 1 μL of matrix solution were mixed on the MALDI plate according to the procedure of the dried-droplet preparation.

Classical analysis in linear Mode.

Acquisition parameters were set to: acceleration voltage: 20 kV; 1st grid voltage: 94%; guide-wire voltage: 0.05% ; extraction delay time: 200 ns.

Each recorded mass spectrum is resulting from the average of 100 laser shots.

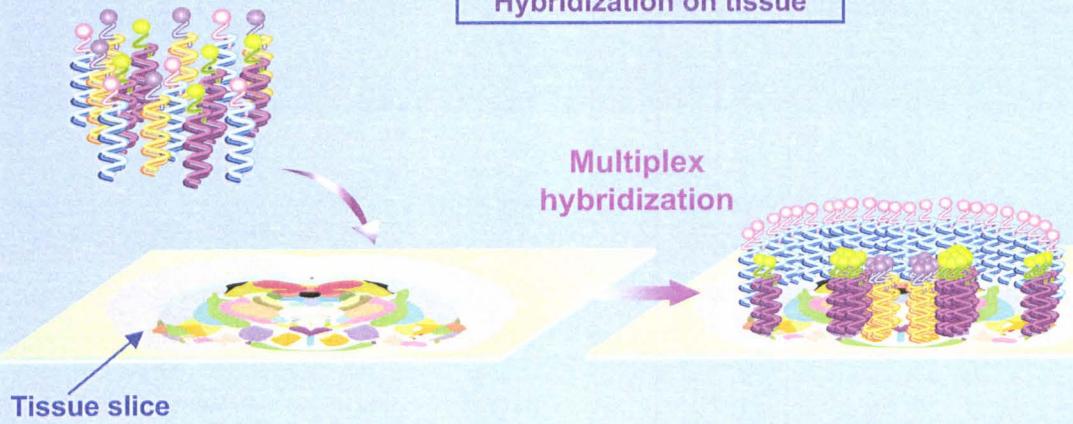
MALDI-MS Direct Analysis and MALDI imaging

MALDI-TOF mass spectra and imaging were performed on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with delayed extraction (DE) and a 337 nm pulsed nitrogen laser. For classical analysis, HCCA was used at concentration's of 10 mg/mL in ACN / H_2O (2:1, v/v, 0.1% TFA) and 3HPA at 50mg/mL in H_2O /ammonium citrate

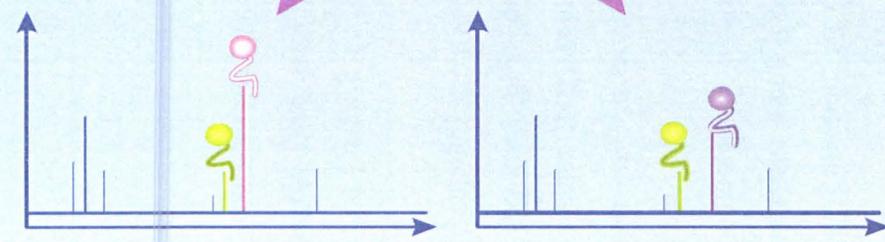
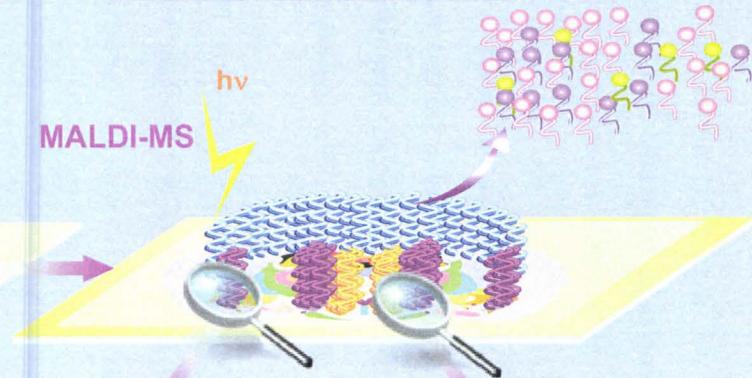
(100mM). For direct tissue analysis and MALDI imaging, HCCA was used at 10 mg/mL in ACN /H₂O (2:1, v/v). Matrix was applied onto the tissue using a micropipette (typically 20 µL for a whole rat brain slice) and then dried at room temperature. External calibration was performed using a mixed solution of peptides (1.6 µM bradykinin, 1.6 µM Substance P, 1.6 µM ACTH 18-39, 3.2 µM ACTH 7-38, 4.8 µM bovine Insulin and 4.8 µM bovine Ubiquitin in H₂O). Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD camera (SONY). Each recorded mass spectrum is resulting from the average of 100 laser shots on the area of interest. Acquisition parameters were set as follow: acceleration voltage: 25 kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.1%, extraction delay time: 200 ns.

Images were reconstructed using MALDI Imaging Tools (MIT, M. Stoeckli, Novartis Inc., Switzerland). 30 000 points covering the whole slice with 100 laser shots per position were scanned. From each position the software measures an average mass spectrum with its coordinates on the slice.

Multiple probes *In Situ*
Hybridization on tissue

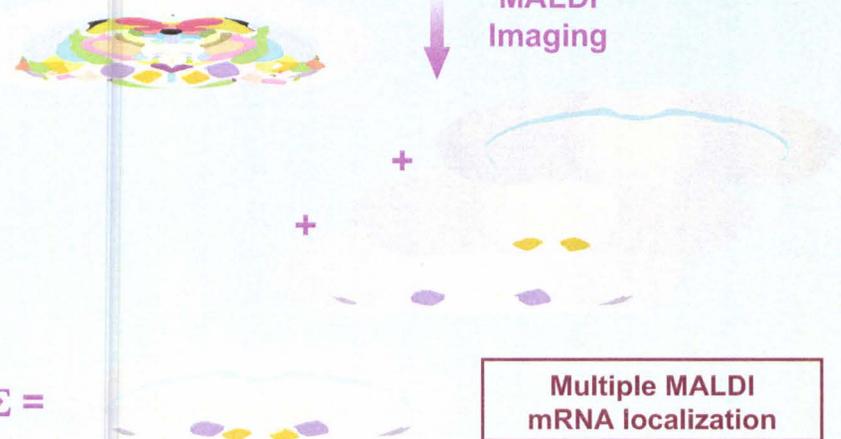


Tag released in the
MALDI ion source



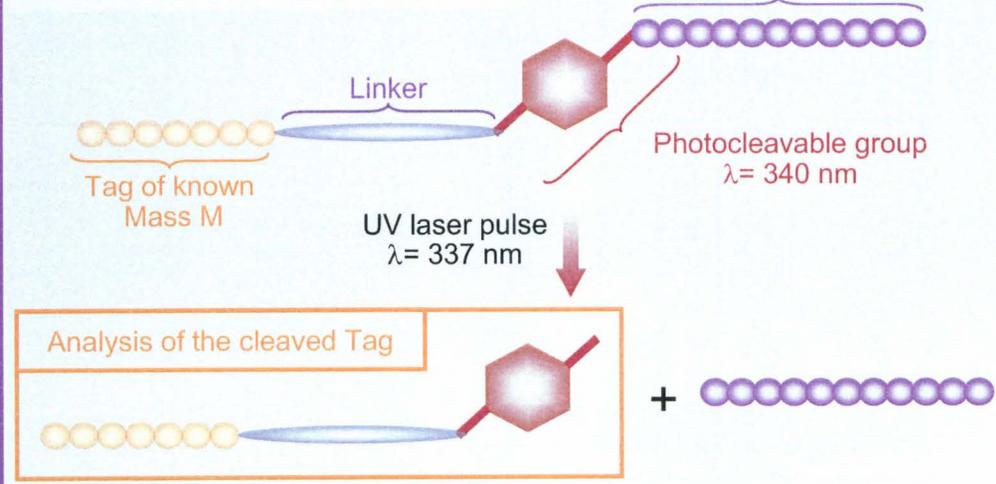
Detection of the tags in the
mass spectra

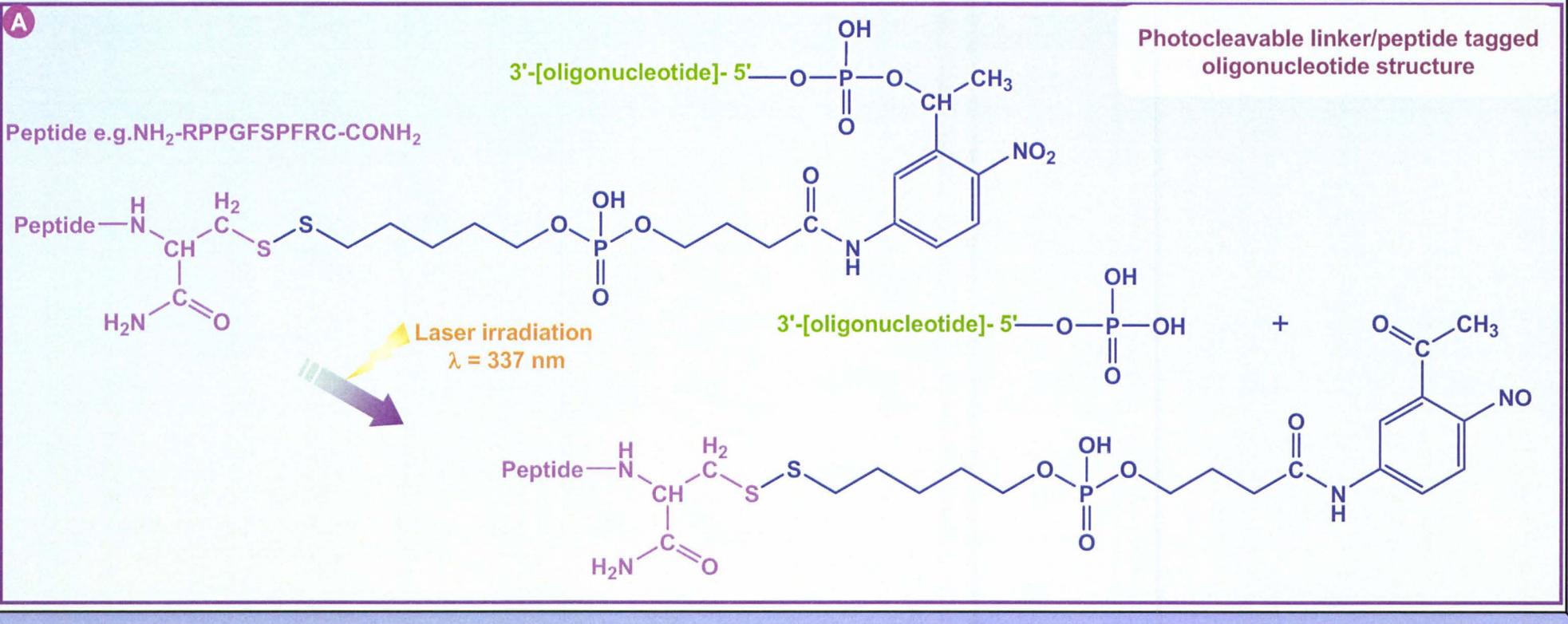
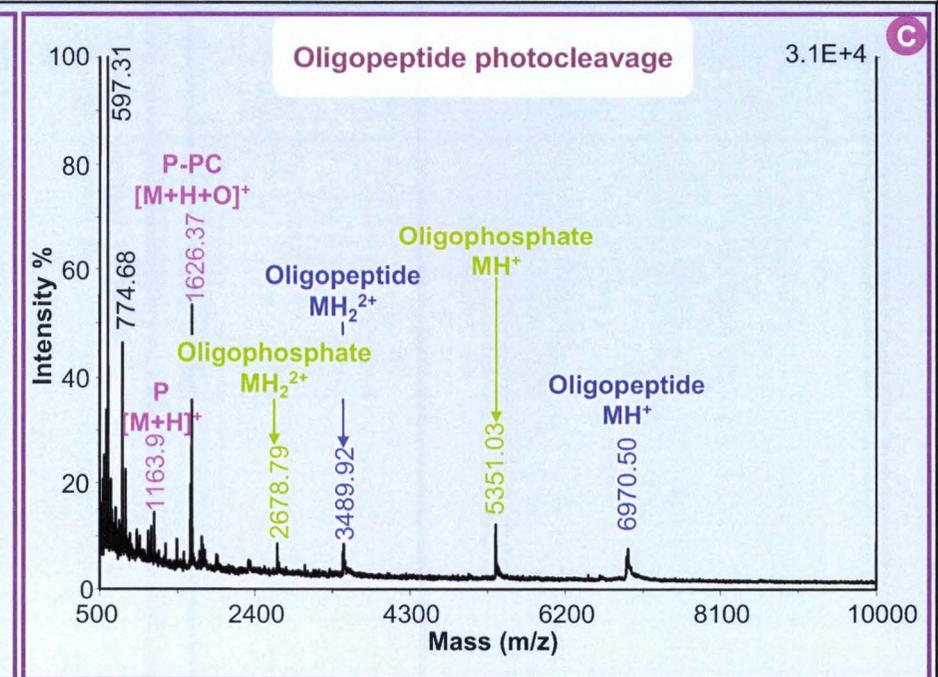
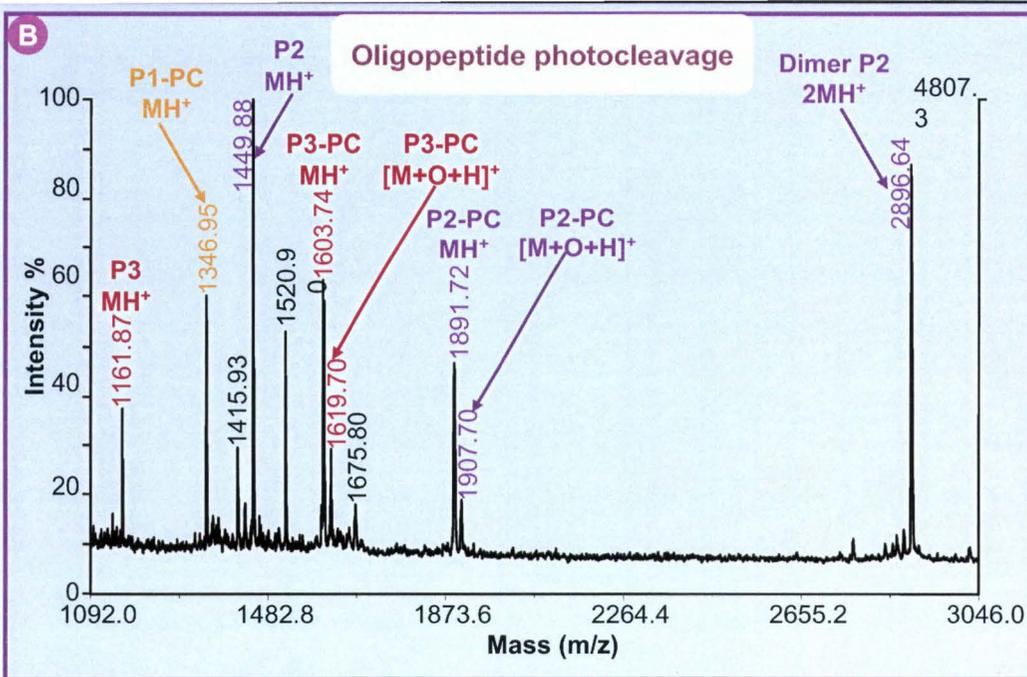
MALDI
Imaging



B Multiplex mRNA imaging principle
Using tagged oligonucleotide probes

A MALDI laser induced
photodissociation principle

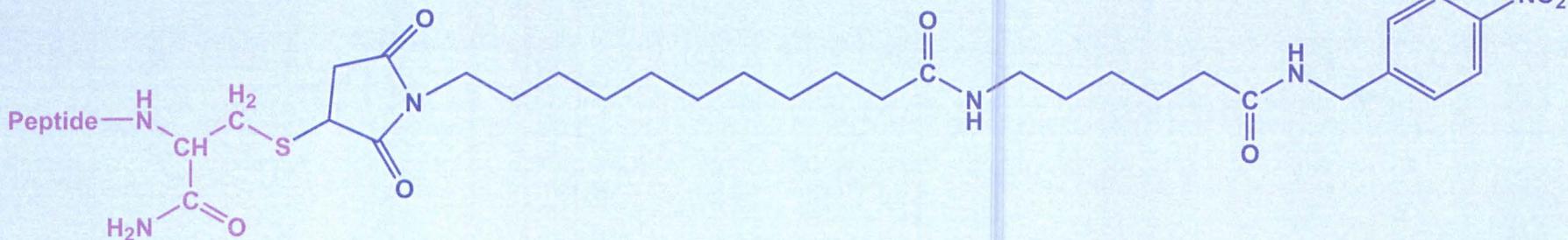




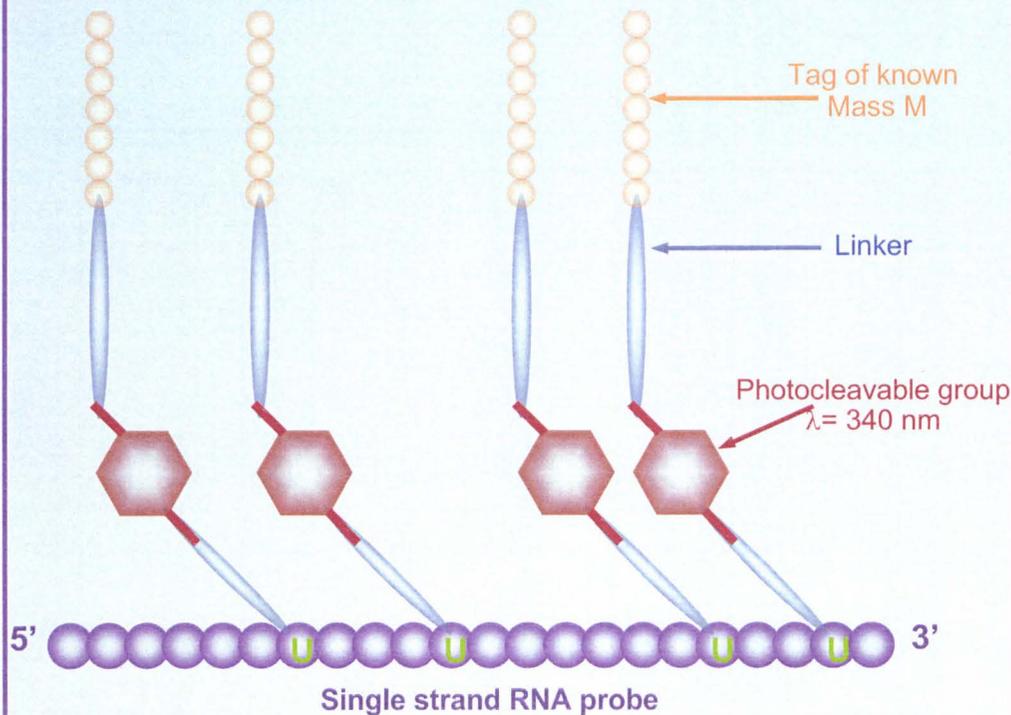
A

Photocleavable linker/peptide tagged oligonucleotide structure with a maleimide

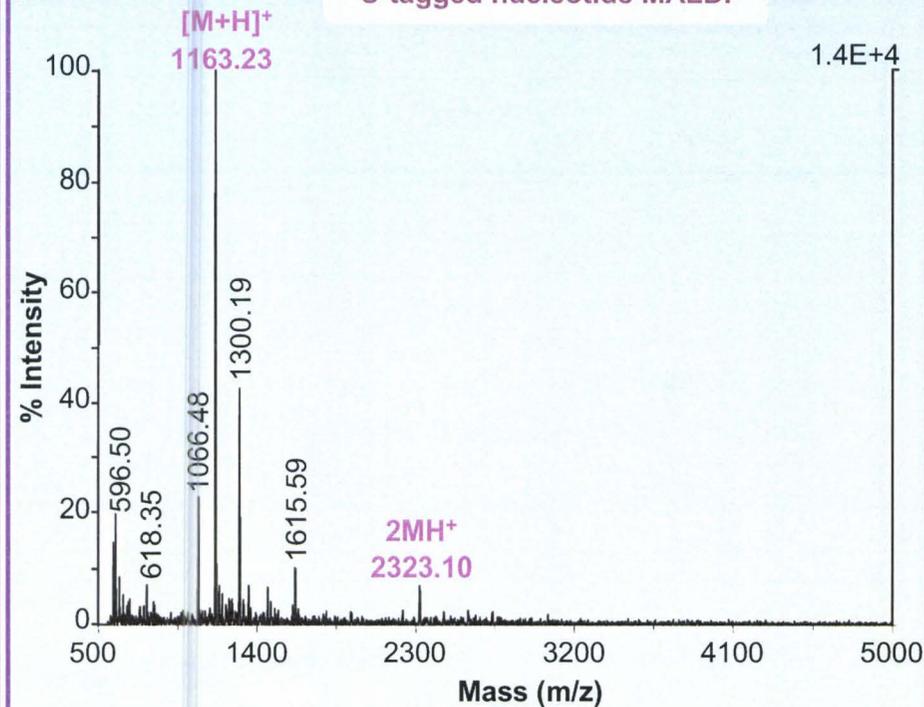
Peptide e.g. $\text{NH}_2\text{-RPPGFSPFRC-CONH}_2$

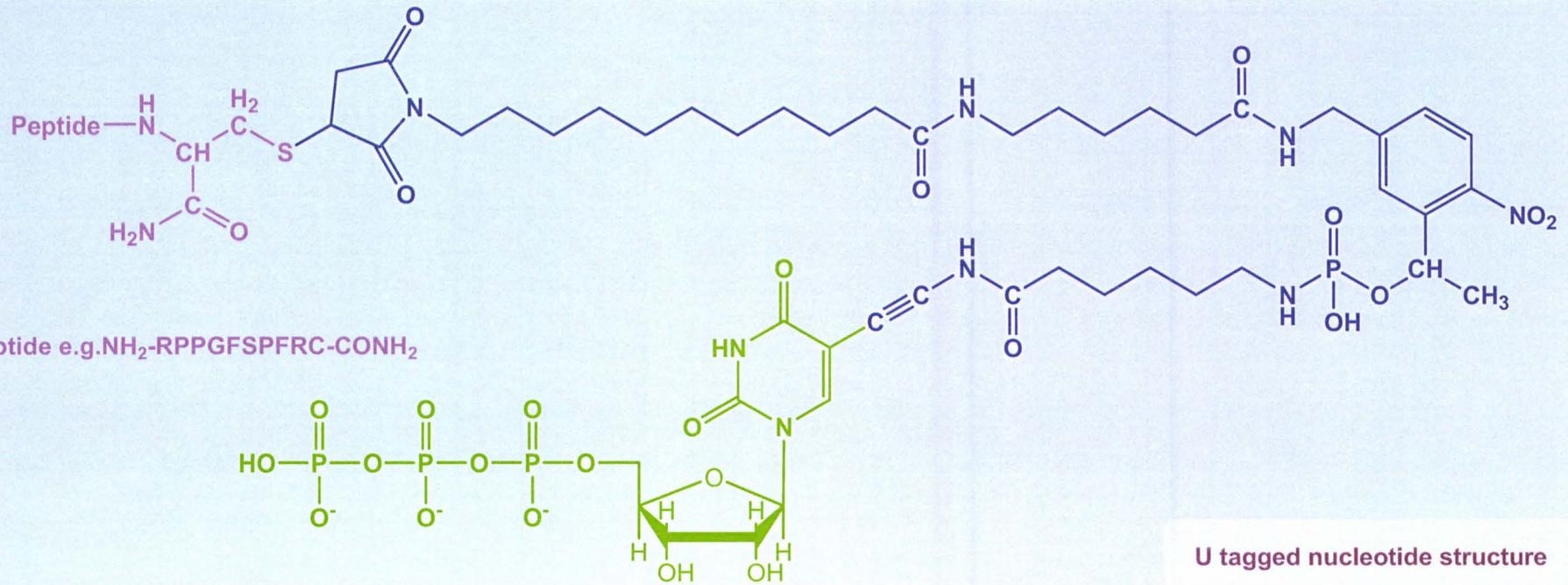
**B**

U-tagged nucleotide structure

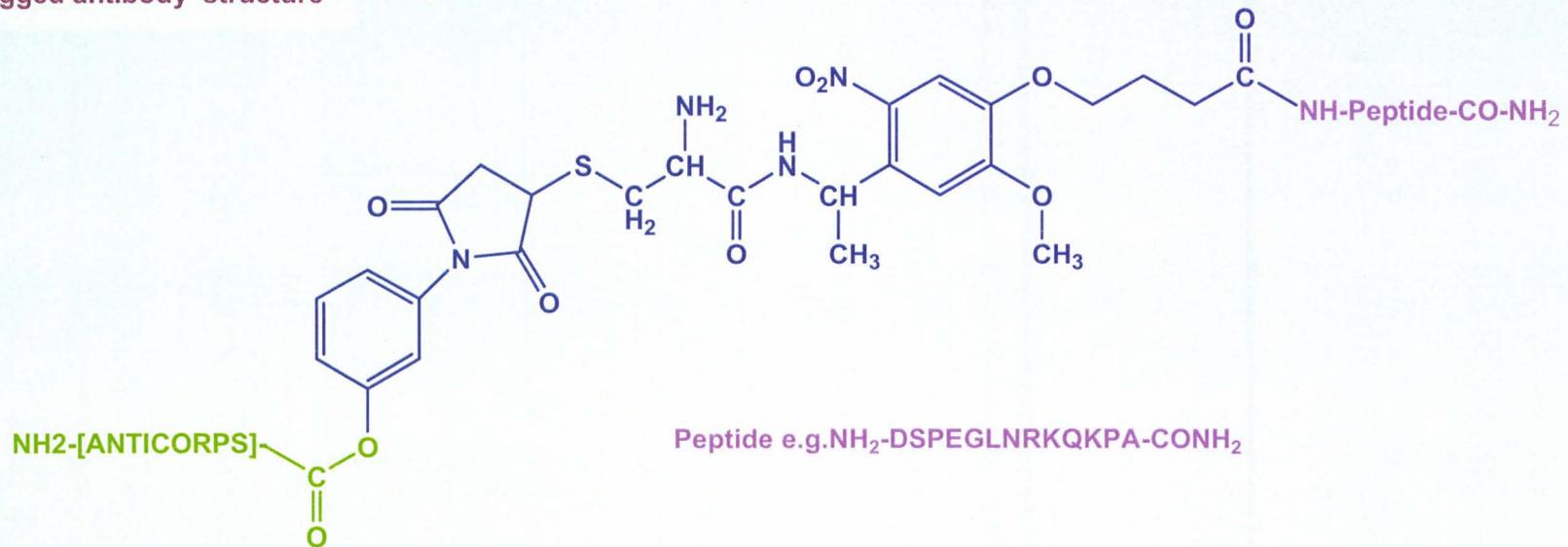
**C**

U-tagged nucleotide MALDI

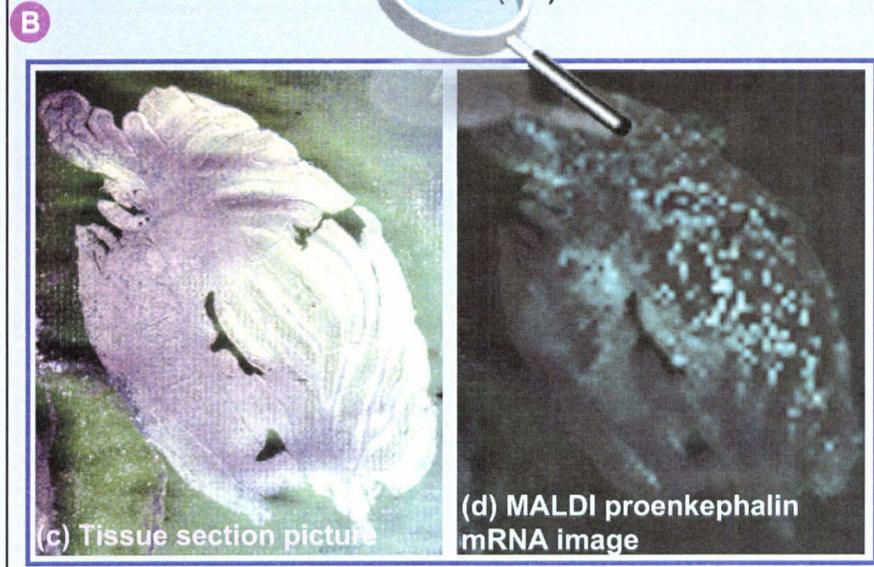
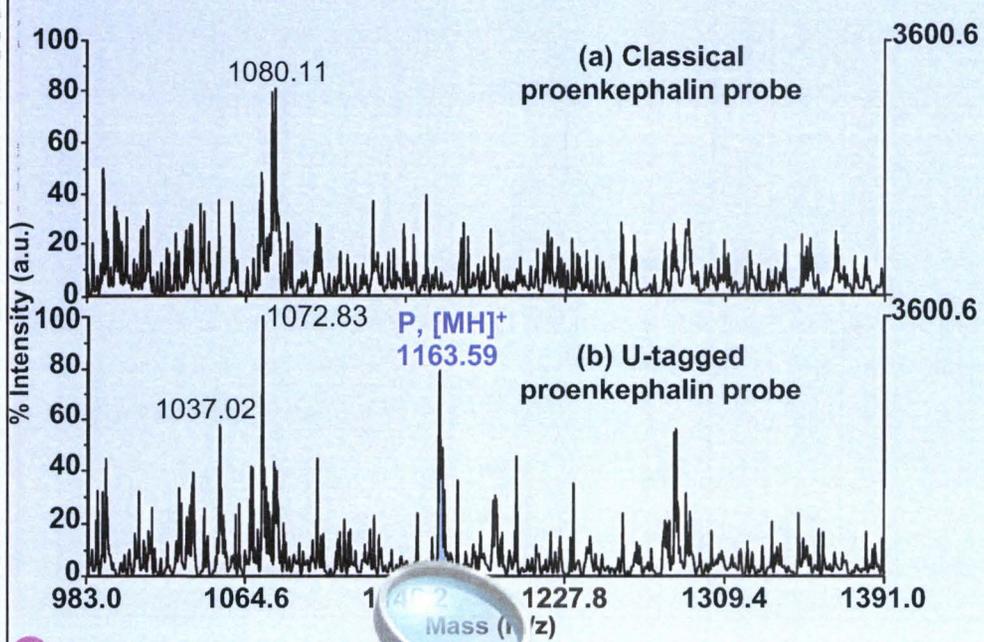


A**B**

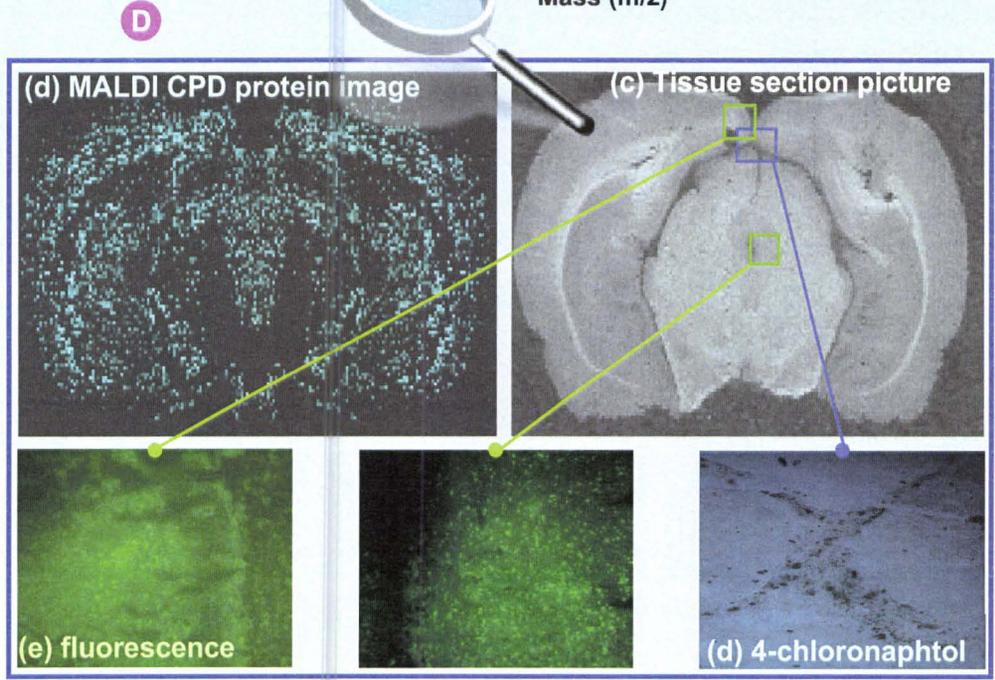
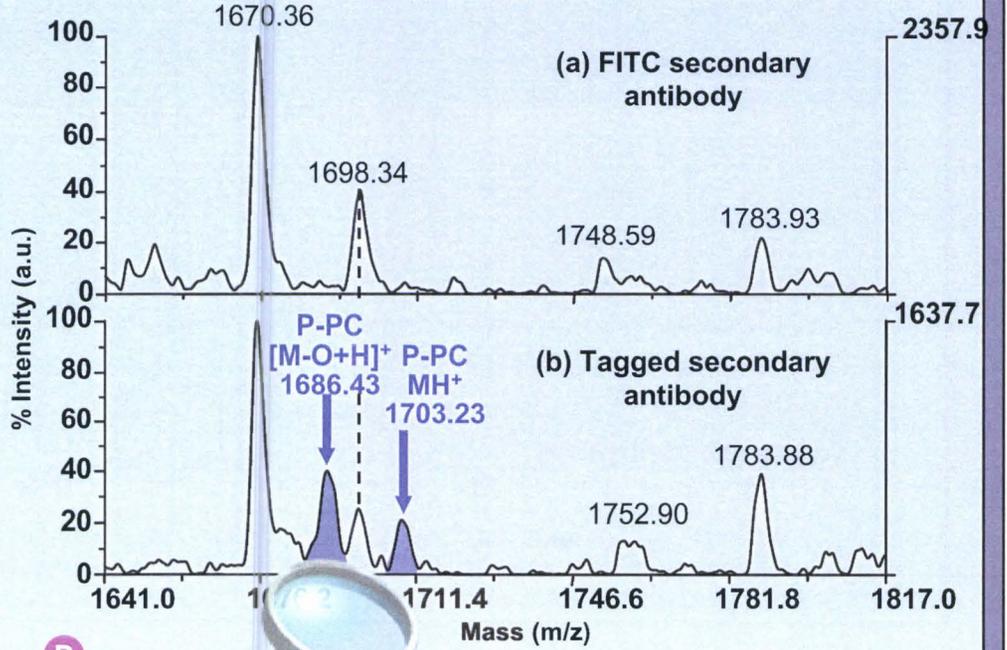
Tagged antibody structure



A mRNA targeting with tagged-oligonucleotide probe



C Antigen targeting with tagged-antibody probe



Specific imaging of target biomolecules with photocleavable tagged probes

3. Tagged aptamers for Specific biomolecules targeting (e.g. drugs)

2. Tagged lectins for Sugars and glycoproteins targeting

1. Tagged antibodies for Antigens targeting

