

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

UFR DE BIOLOGIE

Thèse de doctorat

Biologie Santé

Présenté par

JONATHAN STAUBER



IMAGERIE MALDI : NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS ET APPLICATIONS CLINIQUES

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

Soutenue le 30 Octobre 2007

Jury :

M. Charles PINEAU

M. Jean Louis DACHEUX

M. Bernard MONSARRAT

M. Michel SALZET

M. Isabelle FOURNIER

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Remerciements

Pour commencer, je souhaite remercier mon directeur de laboratoire et codirecteur de thèse, Michel Salzet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et surtout initié à la recherche, à la construction de projets scientifiques. Merci pour ses conseils et ses recommandations qui m'ont permis de développer un esprit critique et un esprit d'initiative.

Un grand merci également à Isabelle Fournier sans qui le projet d'imagerie MALDI ne serait pas aussi abouti, et qui m'a appris ce qu'est la spectrométrie de masse.

J'adresse mes plus vifs remerciements au Professeur Charles Pineau et Jean Louis Dacheux et Bernard Monsarrat qui ont bien voulu prendre le temps de juger ce travail.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu aboutir sans les profondes collaborations qui se sont développées tout au long de la thèse ; Bruker, Eurogentec et l'équipe de gynécologie de Jeanne de Flandres. Je tiens tout particulièrement à Sonia et Valérie pour leur joie et leur volonté de faire avancer le projet cancer pendant ces deux dernières années. Je souhaite remercier tous ceux qui ont collaboré de prêt ou de loin sur les différents projets : Mohammed et les techniciennes Annie et Christelle pour leur soutien et leurs bons conseils.

Enfin un grand merci à tout le laboratoire et à toute l'équipe d'imagerie avec qui j'ai passé de très bons moments :

Maxence le pilier du groupe, je te souhaite une bonne continuation au sein du laboratoire.

Olivia, Bonne chance pour ta thèse, tu es la prochaine...

A tous les autres je vous souhaite la bienvenue et une très bonne continuation à Julien, Mohammed ...

Et pour terminer, je souhaite remercier tout particulièrement mes parents et Emilie qui m'ont soutenus et permis de réaliser cette thèse en France et aux Etats-Unis.

L'étude du monde qui nous entoure et sa compréhension qui en découle, aussi anciennes soient-elles, sont les conclusions d'observations évolutives de plus en plus fines, sans cesse remises à jour. Cette description n'a pu être possible que par la création et l'utilisation de nouveaux outils technologiques supports de ces observations. Le tout premier de ces outils fut le microscope. L'accès à l'observation de tissus a permis à la biologie de faire une avancée extraordinaire vers l'élément essentiel qui le compose *i.e.* la cellule et son environnement. L'image regardée au travers de l'objectif du microscope est donc devenue support et initiateur des théories qui ont bouleversé la biologie descriptive vers la biologie cellulaire et moléculaire.

Les avancées de la biologie moléculaire se sont également réalisées avec l'évolution des techniques d'imagerie dans les domaines de la génomique, la transcriptomique et plus récemment de la protéomique grâce à l'essor d'un outil essentiel, la spectrométrie de masse. Cette technique a trouvé sa place pour générer des profils protéiques caractéristiques de l'état physiologique de la cellule, de fluides complexes tels que le sang ou les urines. Elle apparaît aujourd'hui comme un outil indissociable de la recherche en biologie et en médecine. Les nouveaux développements tendent à conduire la spectrométrie de masse vers l'imagerie moléculaire pour l'identification de pathologies, pour la distribution de médicament au sein d'un animal, ou pour une utilisation en diagnostique et en pronostique.

Cette technologie récente, demande qu'à être développée, améliorée, standardisée. C'est dans ce cadre que ma thèse intitulée « Imagerie MALDI nouveaux développements et applications cliniques » a été orientée. Les différents résultats ont permis de développer l'imagerie spécifique moléculaire MALDI, l'imagerie moléculaire MALDI de tissus fixés et paraffinés avec des applications à la fois dans le cadre de la maladie de Parkinson et le cancer de l'ovaire. L'évolution en filagramme de cette technologie d'imagerie moléculaire semble devoir se réaliser de paire avec les techniques d'imagerie non invasive pour devenir une nouvelle technologie en clinique.

RESUME

The study of the world and its comprehension, so old are they, are the conclusions of increasingly fine evolutionary observations, unceasingly updated. This description could not be possible that by the creation and the use of new technological tools supports of these

observations. The very first one of these tools was the microscope. The access to the tissue observation made it possible biology to make an extraordinary projection towards the essential element which composes it i.e the cell and its environment. The image looked through the objective of the microscope thus became support and initiating of the theories which upset descriptive biology towards cellular and molecular biology

The recent innovations in molecular biology were realized with the evolution of the imaging techniques in the field of Genomics, Transcriptomics, and recently in Proteomics with an essential tool, the mass spectrometry. This imaging technique create characteristic protein profiles of the cellular states, and appears today as an undissociable tool for research in biology and medicine. The last developments look to emerge the mass spectrometry to a molecular imaging to identify pathologies, to observe the drugs distributions in tissues, or the diseases diagnosis or prognosis.

This unique and recent technology should be developed, improved, and standardized. It's in this point of view that my PhD training named MALDI imaging new developments and clinical applications was defined. The different results obtained during my PhD were permits to create a concept of Specific Imaging Mass Spectrometry, to develop Molecular MALDI Imaging of frozen and FFPE tissues with many applications in the research of specific biomarkers in Parkinson disease and ovarian cancer. The evolution of this unique molecular imaging technique should be in the next years a complementary method of others in vivo imaging technique.

Table des matières générales

Résumé	i
Publications	v
Liste des figures	ix
Listes des tableaux	xv
Abréviations	xii
CHAPITRE 1. INTRODUCTION	1 -
1.1. L'image un outil fondamental de découverte	1 -
1.2. Les sujets abordés lors de cette thèse	4 -
CHAPITRE 2. L'IMAGERIE MEDICALE ET BIOLOGIQUE	7 -
2.1. Généralités	11 -
2.2. L'imagerie morphologique	13 -
2.2.1. L'imagerie optique descriptive	13 -
2.2.2. L'imagerie spectroscopique	14 -
2.2.2.1. Les rayons X	14 -
2.2.2.2. Fonctionnement de la radiographie aux rayons X	14 -
2.2.2.3. Tomodensitométrie ou Scanner	15 -
2.2.2.4. Les limites de l'approche	16 -
2.3. L'imagerie fonctionnelle ou moléculaire	18 -
2.3.1. Imagerie moléculaire spécifique	19 -
2.3.1.1. Imagerie Optique	19 -
2.3.1.2. Imagerie magnétique IRM	23 -
2.3.1.3. Imagerie nucléaire TEP/SPETC	30 -
2.3.2. IMAGERIE MOLECULAIRE NON SPECIFICQUE:	35 -
2.3.2.1. L'imagerie par spectrométrie de masse : principe	35 -
2.3.2.2. L'imagerie MALDI	36 -
2.3.2.3. L'imagerie SIMS	45 -
2.3.2.4. Les autres méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse	47 -
2.3.2.4.1. Techniques utilisant un faisceau laser ou ionique	47 -
2.3.2.4.2. Techniques «laser free»	49 -
2.4. CONCLUSION	54 -
CHAPITRE 3. UN NOUVEAU CONCEPT D'IMAGERIE SPECIFIQUE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	59 -
3.1. Introduction	59 -
3.2. Le concept de Tag-Mass	60 -
3.3. Résultats : Publication	63 -
3.4. Conclusions et perspectives	75 -

CHAPITRE 4. LA QUANTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE -----	79 -
4.1. Introduction-----	79 -
4.2. Nouveaux tests diagnostiques immunoenzymatique couplée a une détection par spectrométrie de masse : ISA-MS et PCR-MS-----	83 -
4.2.1. ISA-MS -----	84 -
4.2.2. PCR-MS -----	88 -
4.3. Résultats -----	91 -
4.4. Conclusions et perspectives-----	99 -
CHAPITRE 5. DEVELOPPEMENT DE L'IMS-----	101 -
5.1. Développement de l'IMS aux tissus congelés-----	101 -
5.1.1. Introduction -----	101 -
5.1.2. L'échantillon-----	101 -
5.1.3. Le cancer de l'ovaire -----	102 -
5.1.4. Résultats -----	139 -
5.1.5. Conclusions et perspectives-----	153 -
5.2. L'analyse des tissus FFPE et la recherche de marqueurs dans la maladie de Parkinson - 157 -	
5.2.1. Développement de l'IMS aux tissus FFPE-----	157 -
5.2.1.1. La digestion-----	158 -
5.2.1.2. Le micro-dépôt par tête piezo-électrique-----	160 -
5.2.1.3. La maladie de Parkinson-----	161 -
5.2.2. Résultats -----	162 -
5.2.3. Conclusions et perspectives-----	188 -
CHAPITRE 6. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES -----	191
ANNEXES 1 ET 2-----	197 -
REFERENCES-----	213 -

PUBLICATIONS

BREVET

Stauber J, Fournier I, Salzet M, Quantification par Tag-Mass spectrométrie de masse, Enveloppe soleau (2007), INPI

PUBLICATIONS

Stauber J, Lemaire R, Franck J, Day R, Fournier I, Salzet M., Journal of Proteome Research 2006 (Envoyé)

Analysis of Proteins in FFPE Rat Brain Tissue Sections from 6-OHDA treated animals by MALDI Mass Spectrometry

J. Stauber, R. Lemaire, S. Ait Menguellet, J-P Lucot, P. Collinet, M-O. Farine, D. Vinatier, R. Day, P. Ducoroy, M. Salzet and I. Fournier, Journal of proteome research, (2007) revision, Biomarker discovery and Validation by profiling and specific imaging by mass spectrometry: Reg alpha fragment is a biomarker of ovary cancer. (Revision)

J. Stauber, R. Lemaire, M. Wisztorski, C. Van Camp, A. Desmons, M. Deschamps, G. Proess, I. Rudlof, A. S. Woods, R. Day , M. Salzet, I. Fournier, Journal of proteome research, (2007), Tag mass: A new large biosensor for Specific molecular Imaging by mass spectrometry

M. Wisztorski, R. Lemaire, J. Stauber, O. Jardin-Mathé, M.Salzet, I. Fournier, Curr. Pharm. Design (2007),
New developments in MALDI Imaging: towards specific imaging

Maxence Wisztorski, Rémi Lemaire, Jonathan Stauber, Sonia Ait Menguélet, Olivia Jardin-Mathé, Michel Salzet et Isabelle Fournier, Medicine Sciences (2006),
MALDI Imaging: a new tool to determine and validate new biomarkers

COMMUNICATIONS ORALES

J.Stauber, R.Lemaire, M. Wistorski, C. Van Camp, G.Proess, M. Deschamps, M. Salzet, I. Fournier
Clinical proteomics congress, December 2006, Grenoble, France
Direct profiling and MALDI Imaging of tissue: New developments and clinical applications

J.Stauber, R.Lemaire, M. Wistorski, C. Van Camp, G.Proess, M. Deschamps, M. Salzet, I. Fournier, Bruker Daltonics workshop, October 2006, Marseille France,
MALDI Imaging: New developments and applications

J.Stauber, R.Lemaire, M. Wistorski, A. Desmons, C. Van Camp, G.Proess, M. Deschamps, M. Salzet, I. Fournier, 25TH French Mass spectrometry society annual meetings, Septembre 2006, Nantes, France

New exploratory fields of transcriptome and proteome by specific imaging by mass spectrometry

I. Fournier, R. Lemaire, M. Wisztorski, J. Stauber, O. Jardin-Mathé, R. Day, M. Salzet, 1st Symposium of Analytical Chemistry and Biology: from molecule to proteome, September 26-29, Montpellier, France, 2005

New developments in MALDI Imaging: To a High Throughput clinical proteomics

J. Stauber, E. Leize, A. Van Dorsselaer, 21ST French Mass spectrometry society annual meetings, September 2004, Strasbourg, France

The Clinprot™ approach coupled to mass spectrometry for biomarkers detection.

Congress activities with lecturer committee

J. Stauber, R. Lemaire, M. Wisztorski, S. Aït Menguellet, V. Marchaudon, J-P. Lucot, P. Collinet, D. Vinatier, P. Ducoroy, I. Fournier, M. Salzet

Proceedings of the 55th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, June3-June 7, 2007,

From Direct Tissue Analysis to Tissue Validation by Mass Spectrometry of Ovary Cancer Biomarkers Hunting

I. Fournier, R. Lemaire, M. Wisztorski, J. Stauber, O. Jardin-Mathé, R. Day, M. Salzet

Proceedings of the 54th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, WA, May 27-June 2, 2006,

New Insights in Sample Preparation for MALDI Imaging and New Developments to Approach MALDI Imaging of the Transcriptome

J. Stauber, I. Fournier, R. Lemaire, M. Wisztorski, O. Jardin-Mathé, R. Day, M. Salzet

Proceedings of the 6th Annual Conference on HUPO, Long Beach, CA, November 2006

New developments in MALDI imaging mass spectrometry for Pathological proteomic studies: Introduction to a novel concept the Specific MALDI Imaging

POSTER COMMUNICATIONS

J. Stauber, R. Lemaire, M. Wisztorski, S. Aït Menguellet, V. Marchaudon, J-P. Lucot, P. Collinet, D. Vinatier, P. Ducoroy, I. Fournier, M. Salzet, Proceedings of the 55th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Indianapolis, June3-June 7, 2007,

From Direct Tissue Analysis to Tissue Validation by Mass Spectrometry of Ovary Cancer Biomarkers Hunting

J. Stauber, R. Lemaire, M. Wisztorski, A. Desmons, C. Van Camp, G. Proess, M. Deschamps, M. Salzet, I. Fournier, HUPO congress, November 2006, Long beach, USA

Specific MALDI Imaging and MALDI Imaging: a powerful tool to proteomics studies

J. Stauber, R. Lemaire, M. Wisztorski, A. Desmons, C. Van Camp, G. Proess, M. Deschamps, M. Salzet, I. Fournier, 25ième Proteomics and Electrophoresis French Society meetings ,

Octobre 2006, Saint Malo, France, New approach of specific Imaging by mass spectrometry

Fournier, R. Lemaire, M. Wisztorski, J. Stauber, O. Jardin-Mathé, R. Day, M. Salzet, 54th Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Seattle, WA, May 27-June 2, 2006, New Insights in Sample Preparation for MALDI Imaging and New Developments to Approach MALDI Imaging of the Transcriptome

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. REPRESENTATION DE L'ENSEMBLE DES METHODES D'IMAGERIE MEDICALE.....	- 7 -
FIGURE 2. REPRESENTATION DE L'ENSEMBLE DES METHODES D'IMAGERIE MEDICALES ET BIOLOGIQUES ACTUELLES. TEM (MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION), FRET (FLUORESCENCE RESONANCE TRANSFERT ENERGY), DOT/OPT (DIFFUSE/TRANSMISSION OPTICAL TOMOGRAPHY), FNIR (FLUORESCENCE NEAR INFRARED) , PET (POSITRON EMISSION TOMOGRAPHY).....	- 9 -
FIGURE 3. REPRESENTATION DES DIFFERENTS TYPES DE TISSUS OU ORGANES OBSERVES EN FONCTION DE LEURS TAILLES.....	- 10 -
FIGURE 4. REPRESENTATION DES DIFFERENTES LONGUEURS D'ONDE, FREQUENCES, ET LES RAYONS CORRESPONDANTS.....	- 11 -
FIGURE 5. SCHEMA REPRESENTANT L'IMAGERIE PAR RAYON X OU SCANNER.....	- 15 -
FIGURE 6. COUPE HORIZONTALE DU THORAX UTILISANT UN FENETRAGE OSSEUX. UNE VERTEBRE EST VISIBLE, AVEC LE CANAL MEDULLAIRE EN SON CENTRE, SUR L'AXE SAGITTAL ARRIERE, LE STERNUM EN AVANT, DES PORTIONS DE COTES LATERALEMENT (CECI EST DU A LEUR INCLINAISON VERS LE BAS.....	- 16 -
FIGURE 7. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'IMAGERIE MOLECULAIRE IN VIVO ET SES CIBLES POTENTIELLES (ADN, ARN, PROTEINES).....	- 18 -
FIGURE 8. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'IMAGERIE TOMOGRAPHIE OPTIQUE DIFFUSE DOT.....	- 20 -
FIGURE 9. COMPLEXATION DES ANTICORPS ET DE DIFFERENTS QUANTUM DOTS. (GAO, CHUNG ET AL. 2007).....	- 21 -
FIGURE 10. IMAGERIE NIR SUIVANT LA METTALLOPROTEASE MMP2. LA SOURIS DE DROITE EST TRAITEE AVEC LE PRONOMASTAT UN INHIBITEUR DE MMP2. LA SOURIS DE GAUCHE EST LE CONTROLE NEGATIF SANS TRAITEMENT. (BREMER, TUNG ET AL. 2001).....	- 22 -
FIGURE 11. EXEMPLE D'IMAGERIE FRET : ANALYSES FRET DE TABAC MONTRANT UNE DIMERISATION DE LA PROTEINE COP1 (I-L) LES DEUX FORMES DE COP1 ETANT IMAGEES DANS LES DEUX PREMIERES LIGNES. (XU, SOUTTO ET AL. 2007).....	- 23 -
FIGURE 12. EXEMPLE D'ANALYSE IRM D'UNE COUPE SAGITTALE D'UNE TETE HUMAINE EN PONDERATION T1 SITUEE AU NIVEAU DU PLAN MEDIAN QUI FAIT DONC APPARAITRE DIFFERENTES STRUCTURES DU NEVRAXE (FACE INTERNE D'UN HEMISPHERE CEREBRAL, CORPS CALLEUX, CERVELET) AINSI QUE D'AUTRES TISSUS (LANGUE.....	- 26 -
FIGURE 13. PRESENTATION DU CONCEPT D'IMAGERIE PAR IRM SPECIFIQUE UTILISANT UN BIOSENSOR MARQUE AU XENON.....	- 27 -
FIGURE 14. IMAGERIE IRM IN VIVO DE L'EXPRESSION VCAM CHEZ LA SOURIS APOE-/-.....	- 28 -

FIGURE 15. IMAGE REPRESENTANT DES POUMONS D'UN RAT A UNE RESOLUTION DE 300 μ M, D'AIR CHARGE EN XENON.	- 28 -
FIGURE 16. SCHEMA DE LA TOMOGRAPHIE PAR EMISSION DE POSITRON	- 30 -
FIGURE 17. FDG OU SUCRE ANALOGUE.....	- 31 -
FIGURE 18. FDG-PET/CT D'UN CARCINOME DU POUMON. A: IMAGE OBTENUE PAR TOMOGRAPHY RAYONS X, B: IMAGE MIXE AVEC L'ANALYSE SCINTIGRAPHIQUE PAR IMAGERIE PETSCAN. L'ACTIVITE METABOLIQUE DU LOBE DROIT MONTRE UNE ZONE TUMORALE. (TORIGIAN, HUANG ET AL. 2007).....	- 32 -
FIGURE 19. IMUNO-SCINTIGRAPHIE DE PATIENT ATTEINT DE CARCINOME DU NEZ, AVEC UN ANTICORPS ANTI-ANGIOGENETIQUE MARQUE AU 123I OBTENUE PAR SPECT/CT. A : IMAGE PAR TOMOGRAPHIE RAYONS X, B : IMAGE OBTENUE PAR SPECT, C : IMAGE OBTENUE PAR SUPERPOSITION DE A ET DE B SPECT/CT	- 34 -
FIGURE 20. : PRINCIPE DE L'ISM EN MODE (A) POINT PAR POINT ET (B) MICROSCOPE IONIQUE. ...	- 36 -
FIGURE 21. : SCHEMA DE PRINCIPE DU MALDI.....	- 37 -
FIGURE 22. : PRINCIPE DU SMALDI D'APRES (SPENGLER AND HUBERT 2002).....	- 43 -
FIGURE 23. A) PRINCIPE D'IONISATION SIMS ET FONCTIONNEMENT EN MODE (B) DYNAMIQUE ET (C) STATIQUE	- 46 -
FIGURE 24. SCHEMA DU SNOM	- 48 -
FIGURE 25. : PRINCIPE DU SMS D'APRES (FEDOROV AND DEGERTEKIN 2006).....	- 49 -
FIGURE 26. PRINCIPE DU DESI.....	- 50 -
FIGURE 27. PRINCIPE DES SOURCES (A) JEDI ET (B) DAPCI	- 50 -
FIGURE 28. PRINCIPE DES SOURCES (A) DART ET (B) ELDI.....	- 51 -
FIGURE 29. : PRESENTATION DE L'ENSEMBLE DES METHODES D'IMAGERIE AVEC LES SENSIBILITES ET LEURS APPLICATIONS	- 54 -
FIGURE 30. MODEL GENERIQUE DE CIBLE-SONDE POUR L'IMAGERIE SPECIFIQUE MOLECULAIRE. LE LIGAND AYANT UNE FORTE SPECIFICITE SE FIXA AU SUBSTRAT, ET CET ENSEMBLE EST LOCALISE PAR L'INTERMEDIAIRE D'UNE PIECE RAPORTEUR. (CHOUDHURY, FUSTER ET AL. 2004).....	- 55 -
FIGURE 32. REPRESENTATION DU NOMBRE DE PUBLICATIONS DES METHODES D'IMAGERIE EN SPECTROMETRIE DE MASSE (BLANC) ET DE L'IMAGERIE MALDI (NOIRE).....	- 57 -
FIGURE 33. PRESENTATION DE LA STRUCTURE CHIMIQUE D'UN ACIDE RIBO NUCLEIQUE	- 59 -
FIGURE 34. PRESENTATION DU CONCEPT DE TAG-MASS, ET DE SON CLIVAGE.....	- 61 -
FIGURE 35. SCHEMA D'UTILISATION DU TAG-MASS EN IMAGERIE SPECIFIQUE MALDI	- 61 -
FIGURE 36. COMPOSITION CHIMIQUE DES DIFFERENTS TAG-MASS SYNTHETISES.....	- 62 -

FIGURE 37 : SPECTRES MALDI DU MODE MULTIPLEXE COMPRENANT 3 SONDAS DIFFERENTES P1, P2, P3.	- 76 -
FIGURE 38. PRESENTATION DES DIFFERENTS TAG-MASS POUVANT ETRE UTILISES	- 77 -
FIGURE 39. LES DIFFERENTS MARQUAGES ISOTOPIQUES POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE QUANTITATIVE	- 79 -
FIGURE 40 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA METHODE DE QUANTIFICATION ELISA. - 80 -	
FIGURE 41 REPRESENTATION D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION PAR COUPLAGE PCR. (ZHANG, CHENG ET AL. 2006).....	- 83 -
FIGURE 42. CONSTRUCTION DE L'ANTICORPS-PHOTOCLIVABLE : A-PC-L-PEPTIDE.....	- 85 -
FIGURE 43. SCHEMA DE L'ISA-MS ET LA PCR-MS	- 86 -
FIGURE 44. FORMULE DEVELOPEE DU MARQUEUR UTILISE POUR L'AMPLIFICATION PCR A PARTIR DES AMORCES CODANT POUR LA PROENKEPHALINE. DONNANT AINSI LA CONCENTRATION DE L'ECHANTILLON TEST.....	- 89 -
FIGURE 45. METHODE DE PCR MS. LA PCR EST REALISEE AVEC UNE SEQUENCE MARQUEE AVEC UN TAG-MASS. UNE GAMME ETALON AVEC DES CONCENTRATIONS CONNUS EST REALISEE AVEC UN ECHANTILLON TEST. UNE COURBE EST TRACEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES ECHANTILLONS TEMOINS ET DU SIGNAL OBTENU AVEC LE SPECTROMETRE DE MASSE, DONNANT AINSI LA CONCENTRATION DE L'ECHANTILLON TEST.	- 89 -
FIGURE 46. SCHEMA DE PRINCIPE D'URACILES MARQUES PERMETTANT LA REALISATION DE RIBOSONDAS	- 90 -
FIGURE 47. METHODE DE PCR-MS. LA TRANSCRIPTION EST REALISEE AVEC UN URACILE MARQUE AVEC UN TAG-MASS. UNE GAMME ETALON AVEC DES CONCENTRATIONS CONNUS EST REALISEE AVEC UN ECHANTILLON TEST. UNE COURBE EST TRACEE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DES ECHANTILLONS TEMOINS ET DU SIGNAL OBTENU AVEC LE SPECTROMETRE DE MASSE, DONNANT AINSI LA CONCENTRATION DE L'ECHANTILLON TEST.....	- 90 -
FIGURE 48. SPECTRES MALDI DU TAG-MASS. EN BLEU, LE SIGNAL OBTENU SANS UTILISATION DE LAMPE UV. EN VERT SIGNAL OBTENU AVEC IRRADIATION 15 MINUTES SOUS LAMPE UV.	- 91 -
FIGURE 49 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DES DIFFERENTES SERIES DE MESURES D'INTENSITE RELATIVE MALDI EN FONCTION DE LA CONCENTRATION D'ANTIGENE. CHAQUE SERIE EST REALISEE AVEC UNE CONCENTRATION D'ANTICORPS SECONDAIRE DIFFERENTE DE LA MOINS DILUEE VERS LA PLUS DILUEE.	- 92 -
FIGURE 50. COURBE DE SENSIBILITE DE L'APPROCHE ISA-MS AVEC L'ENSEMBLE DES INTENSITES DU SIGNAL MALDI EN FONCTION DE LA QUANTITE D'ANTIGENE DEPOSE DANS LE PUIT (MOLE). LA FLECHE REPRESENTE LA LIMITE DE DETECTION DE LA METHODE	- 94 -
FIGURE 51. COURBE REPRESENTANT L'INTENSITE DE DETECTION DES ANTICORPS MARQUES. EN ROSE, LIGNE DE DETECTION PAR ELISA ET EN BLEU PAR SPECTROMETRIE DE MASSE. - 95 -	

FIGURE 52. GEL D'AGAROSE AVEC BET DE FRAGMENTS D'ADN AMPLIFIES PAR PCR A PARTIR D'OLIGOPEPTIDE. PUIITS 1 ET 15 SONT LES MARQUEURS DE POIDS MOLECULAIRE. A) PCRT=52°C B) PCR=54°C, C) T=58°C,.....	- 96 -
FIGURE 53. SPECTRES MALDI EN MODE LINEAIRE POSITIF DES AMORCES CODANT POUR LA PROENKEPHALINE SYNTHETISE AVEC UN MARQUEUR EN POSITION 5' SPECTRE DE L'AMORCE GAUCHE B) SPECTRE DE L'AMORCE DROITE.	- 97 -
FIGURE 54. SPECTRES MALDI EN MODE LINEAIRE POSITIF DES AMORCES CODANT POUR LA PROENKEPHALINE SYNTHETISE AVEC UN MARQUEUR EN POSITION 5' SPECTRE DE L'AMORCE GAUCHE B) SPECTRE DE L'AMORCE DROITE.	- 97 -
FIGURE 55. SPECTRE MALDI EN MODE REFLECTEUR REALISE APRES PURIFICATION SUR LA SONDE PROENKEPHALINE AMPLIFIEE PAR PCR. HAUT) SONDE MARQUEE AMPLIFIEE AVEC U MARQUEE ; BAS) PROENKEPHALINE CLASSIQUE AMPLIFIEE AVEC URACILE NON MODIFIE	- 98 -
FIGURE 56.SPECTRE MALDI ISSU D'UNE ANALYSE DU MEME TISSU OVARIEN. A GAUCHE UNE ANALYSE SANS TRAITEMENT CHLOROFORME. A DROITE UNE ANALYSE AYANT AU PREALABLE LAVE AU CHLOROFORME.....	- 102 -
FIGURE 57.: MISE EN EVIDENCE DU BIOMARQUEUR 9744 M/Z, IDENTIFIE COMME FAISANT PARTIE DE LA PROTEINE REG ALPHA.	- 143 -
FIGURE 58 : DIFFERENTIEL EN ANALYSE DIRECTE : 8 PROFILS PEPTIDIQUES MALINS (EN ROUGE) VS 8 PROFILS PEPTIDIQUES BENINS (EN NOIR).....	- 143 -
FIGURE 59 : NOUVEAUX BIOMARQUEURS CANDIDATS RESPECTIVEMENT DE M/Z : 3441, 4570, 10850.....	- 144 -
FIGURE 60 : DIFFERENTIEL EN ANALYSE DIRECTE : MISE EN EVIDENCE DES BIOMARQUEURS CANDIDATS DE M/Z 3441, 4570, 10850 (PROFILS PEPTIDIQUES MALINS EN ROUGE ET BENINS EN NOIR).	- 145 -
FIGURE 61. DIFFERENTIEL EN ANALYSE MALDI APRES LAVAGE TISSULAIRE : 8 PROFILS PEPTIDIQUES MALINS (EN ROUGE) VS 8 PROFILS PEPTIDIQUES BENINS (EN NOIR).....	- 147 -
FIGURE 62 : DIFFERENTIEL EN ANALYSE MALDI APRES LAVAGE TISSULAIRE : REG ALPHA, 9744 M/Z.....	- 147 -
FIGURE 63 : DIFFERENTIEL EN ANALYSE MALDI APRES LAVAGE TISSULAIRE. BM CANDIDATS DE M/Z 3441, 4570, 10850 (PROFILS PEPTIDIQUES MALINS EN ROUGE ET BENINS EN NOIR)...	- 148 -
FIGURE 64. IMAGE D'UNE COUPE DE TISSU CANCER.....	- 149 -
FIGURE 65. IMAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'ION 9763 M/Z CORRESPONDANT A RAGE ALPHA.....	- 150 -
FIGURE 66. IMAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'ION 3441 M/Z.....	- 150 -
FIGURE 67. IMAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'ION 10850 M/Z.....	- 151 -
FIGURE 68. IMAGE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DE L'ENSEMBLE DES IONS 3441, 4570, 9763, 10850 M/Z.....	- 151 -

FIGURE 69. SPECTRES MALDI ISSU DE LA SEPARATION DES PROTEINES PAR HPLC (PHASE INVERSE C18).	- 152 -
FIGURE 70 REPRESENTATION DE L'INTERACTION DES SEPT SOUS DOMAINES DE REG ALPHA (VIOLET) ET LA STRUCTURE DU PROTEASOME (RECHSTEINER, REALINI ET AL. 2000). -	154 -
FIGURE 71 SPECTRE OBTENU APRES DIGESTION A LA TRYPSINE 50µG/ML DANS DE L'EAU PENDANT UNE HEURE A 37° C.	- 160 -
FIGURE 72 PHOTOGRAPHIE DE GAUCHE EST LE SYSTEME DE DEPOT DE SOLUTION PAR EJECTION DE GOUTTE. LA PHOTOGRAPHIE DE DROITE CORRESPOND A L'AGRANDISSEMENT DU SYSTEME D'EJECTION DE GOUTTE ET DE DEPOT DE 100PL DE SOLUTION.	- 160 -
FIGURE 73 REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ANOMALIES FONCTIONNELLES AU SEIN DES NOYAUX GRIS CENTRAUX AU COURS DE LA MALADIE DE PARKINSON. LA REDUCTION DES PROJECTIONS DOPAMINERGIQUES VERS LE STRIATUM FAVORISE L'ACTIVITE DES PROJECTIONS GABAERGIQUES DIRIGEEES VERS LE PALLIDUM EXTERNE (GPE), AU DETRIMENT DES PROJECTIONS DESTINEES AU PALLIDUM INTERNE (GPI) ET A LA SUBSTANCE NOIRE (SNC ET SNR). IL EN RESULTE UNE LIBERATION DE L'ACTIVITE GLUTAMATERGIQUE DU NOYAU SOUS-THALAMIQUE (NST), DONT LA CONSEQUENCE EST UNE INHIBITION DU THALAMUS.	- 162 -
FIGURE 74. INSTRUMENT MALDI COUPLE A UN SYSTEME DE MOBILITE IONIQUE. CE SYSTEME PERMET UNE SEPARATION DES MOLECULES CHARGEES PAR L'INTERMEDIAIRE D'UN CHAMP ELECTRIQUE UNIFORME OBTENU PAR UN SYSTEME D'ELECTRODES ANNEAUX CONCENTRIQUES. A DROITE, UNE REPRESENTATION DE LA SEPARATION IONIQUE OBTENUE PAR CE SYSTEME.	- 189 -
FIGURE 75 SCHEMA D'ANALYSE PROTEOMIQUE DEVELOPPE PAR HOOD ET COLL.	- 190 -
FIGURE 76. MASQUE COUVRANT LE TISSU AFIN DE DIMINUER LA ZONE IRRADIEE.....	195
FIGURE 77. OBSERVATION DE LA TAILLE DE LA ZONE IRRADIEE EN PRESENCE (B, D) OU EN ABSENCE DU MASQUE (A, C)	195



LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. INSTRUMENTS POUR L'APPLICATION DE MATRICE POUR L'ISM MALDI	40 -
TABLEAU 2. : RECAPITULATIF DES TECHNIQUES D'IONISATION UTILISEES EN SPECTROMETRIE DE MASSE	52 -
TABLEAU 3. LES DIFFERENTES METHODES DE QUANTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE ET LEURS METHODES DE MARQUAGES CORRESPONDANTES	81 -
TABLEAU 4. REPRESENTATION DES DIFFERENTS PUIITS ET DES CONCENTRATIONS D'ANTIGENES CORRESPONDANTES	87 -
TABLEAU 5. REPRESENTATION DES DIFFERENTS PUIITS DE DEPOTS D'ANTICORPS SECONDAIRE TAG-MASS ET LES CONCENTRATIONS CORRESPONDANTES.....	87 -
TABLEAU 6. INTENSITE NORMALISEE OBTENUE A PARTIR DES DIFFERENTES SERIES DE DILUTION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE L'ANTIGENE DEPOSE DANS LE PUIT.	93 -
TABLEAU 7. CLASSIFICATION FIGO ET TNM DU CANCER DE L'OVAIRE.....	105 -
TABLEAU 8. : TYPES ANATOMOPATHOLOGIQUES DE TUMEURS OVARIENNES ETUDIEES.....	139 -
TABLEAU 9. PATIENTES TESTEES : EFFECTIF ET TYPE HISTOLOGIQUE DES TUMEURS. RESULTATS DES ANALYSES	142 -
TABLEAU 10. SPECTRES ISSUS DES DIFFERENTES METHODES DE DIGESTION. LA DIGESTION EST REALISEE AVEC DIFFERENTS TEMPS DE DIGESTION, DE TEMPERATURE, DIFFERENTES SOLUTIONS TAMPON AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE TRYPSINE.	159 -
TABLEAU 11 : RECAPITULATIF DES MOLECULES REPEREES COMME REGULEES EN ANALYSE DIRECTE MALDI SUR TISSUS FIXES ET DIGERES AINSI QUE LEUR IDENTIFICATION REALISEE EN LC-MS/MS.....	188 -



LISTE DES ABREVIATIONS

ACN:	Acétonitrile
ADN/ARN	Acide Désoxybonucléique/ Ribonucléique
AFM:	Microscopie à Force Atomique
ANI:	Aniline
CID:	Collision-Induced dissociation
CT scan	Computed tomography ou Scanner rayon X
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
DOT	Tomographie optique diffuse
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
FNIR	fluorescence proche de l'infrarouge
FRET	Transfert par emission de résonance fluorescente
FT-ICR MS:	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
HCCA:	Acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique
HCl:	Acide Chloridrique
HES	Hématoxilline éosine safran
HF:	Acide Fluorique
HIS	Hybridation <i>in situ</i>
HPLC	chromatographie liquide haute performance
Hz:	Hertz
ICC	Immunohistochimie
ICP-MS:	Inductively coupled plasma mass spectroscopy
IRM	Imagerie par résonance magnétique
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
TEP	Tomographie par émission de positron
TFA:	Acide TrifluoroAcétique
Ti/Au:	Titane /Or
TOF:	Temps de vol
UV:	Ultraviolet

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1. L'image un outil fondamental de découverte

Les Sciences et la découverte scientifique qui en découlent sont le fruit de réflexions et d'observations. A travers l'analyse de l'histoire des Sciences, on remarque que le mélange ingénieux de différents éléments tels que la réflexion initiée par l'homme et les avancées technologiques aboutissant à de nouvelles observations ont permis d'accroître les connaissances scientifiques.

Tout au long de l'Histoire, depuis la Grèce antique jusqu'à aujourd'hui, les observations scientifiques sont à l'initiative des découvertes les plus significatives. De très nombreux exemples jalonnent notre histoire avec Buffon, Linnée, Darwin, ou Watson et Crick qui d'une image aux rayons X d'ADN cristallisé obtenus par R Franklin ont découvert la structure de l'ADN en 1952.

Les hommes ont pour cela développé de tout temps des méthodes descriptives basées sur l'observation, et les technologies associées. Tous les domaines de la Physique, de la chimie, de la biologie ou de la médecine, ont émergé par l'intermédiaire des avancées techniques d'observation. De la première loupe développée en 1664 par Antoine van Leeuwenhoek, aux premiers IRM en 1973 ont permis d'établir de nouveaux dogmes sans cesse remis en question. 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 cessé 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 de celle 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 années 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 (Fenn, Mann et al. 1989) et de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) (Karas and Hillenkamp 1988; Hillenkamp, Karas et al. 1991), 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 rapidement, un outil incontournable, en particulier dans le domaine de la protéomique comme en témoigne les nombreuses recherches menées et publiées (Guerrera and Kleiner 2005; Salzano and Crescenzi 2005; Ackermann, Hale et al. 2006; Domon and Aebersold 2006; Kolker, Higdson et al. 2006; Solassol, Jacot et al. 2006). 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-exprimées 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 faiblement exprimés 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'analyse directe sur coupe et l'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) peuvent pallier à ces problèmes de part la détection de molécules faiblement exprimées tout en gardant leur localisation (Fournier, Day et al. 2003 , Stoeckli, 2001). 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. Cependant en spectrométrie de masse, un certain nombre de contraintes apparaissent. Les grosses protéines de plus de 50 Kda, les chaînes d'oligonucléotides sont difficiles à détecter du fait de leur faible ionisation, et de la faible sensibilité des appareils à l'heure actuelle pour ces composés. L'imagerie spécifique par spectrométrie de masse apparaît en 2006 pour pallier à ces problèmes et permet d'analyser ADN, ARN et protéines liant ainsi l'imagerie transcriptomique et protéomique par spectrométrie de masse (Lemaire, Stauber et al. 2007). Ces nouveaux outils sont alors utilisés dans le cadre de recherche de nouveaux marqueurs dans le cadre de maladie, de diagnostique, et de pronostique clinique. L'imagerie spécifique par spectrométrie de masse (ISSM) devrait permettre de passer la spectrométrie de masse de la recherche académique à des applications cliniques de diagnostique et de pronostique.

1.2. Les sujets abordés lors de cette thèse

Au travers de 6 chapitres, l'ensemble des travaux de thèse portera sur le développement de l'imagerie MALDI et de plusieurs applications mettant ainsi en évidence les avantages et les inconvénients de cette approche innovante.

Dans le **chapitre 2**, l'ensemble des techniques d'imagerie utilisé dans le domaine de la recherche médicale et biologique sera décrit permettant de situer l'imagerie par spectrométrie de masse dans le contexte général de l'imagerie. Pour cela deux parties distinctes seront abordées i.e. premièrement les méthodes d'imagerie optique, nucléaire, spectroscopique, puis deuxièmement l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI et les autres sources d'ionisations.

Dans le **chapitre 3**, nous avons développé un nouveau concept permettant de cibler des molécules spécifiques dans le tissu et de les localiser. Ce concept de Tag-Mass est présenté sous différentes parties en fonction du type de molécule ciblée. Cette méthode d'imagerie spécifique par spectrométrie de masse est alors ouverte à un grand nombre de spectromètres de masse que nous vous présenterons avec diverses applications.

La dernière partie correspond au **chapitre 4** élargira le champ d'application du Tag-Mass à la mise en place d'un outil de quantification par spectrométrie de masse via cette molécule. Une comparaison des outils déjà présents permettra d'évaluer le concept et les avantages qui lui sont propres.

Une partie des développements ont portés sur un verrou technologique *i.e.* l'analyse de tissus fixés dans le formaldéhyde puis paraffinés (FFPE). Ils ont donné lieu à deux applications directes de recherche de biomarqueurs dans la maladie de Parkinson et l'étude du cancer des ovaires. L'ensemble de ces travaux est regroupé dans le **chapitre 5**, qui établit le rôle de ces développements et les avantages qui en découlent, ouvrant l'accès aux banques de tissus conservés dans les hôpitaux aux études protéomiques par spectrométrie de masse et à l'imagerie.

Enfin le **chapitre 6** offre les conclusions et les perspectives vers d'autres développements tels que les masques pour la diminution du diamètre du laser du spectromètre de masse MALDI ainsi que l'utilisation de nouveaux supports pour une analyse sans matrice et surtout de l'analyse combinée des techniques fonctionnelles combinées à l'imagerie par MALDI.

CHAPITRE 2. L'imagerie médicale et biologique

Les différentes approches d'imagerie ont un but communs: identifier, étudier la distribution, la dynamique, les interactions de protéines dans un système biologique particulier. Cependant aucune technique d'imagerie ne permet la retranscription complète de l'état de la cellule. En d'autres termes, chaque méthode d'imagerie a ses propres caractéristiques et par conséquent sont complémentaires les unes des autres. Dans ce sens, chaque type de méthode d'imagerie est choisi en fonction des questions à traiter (**Figure 1**).

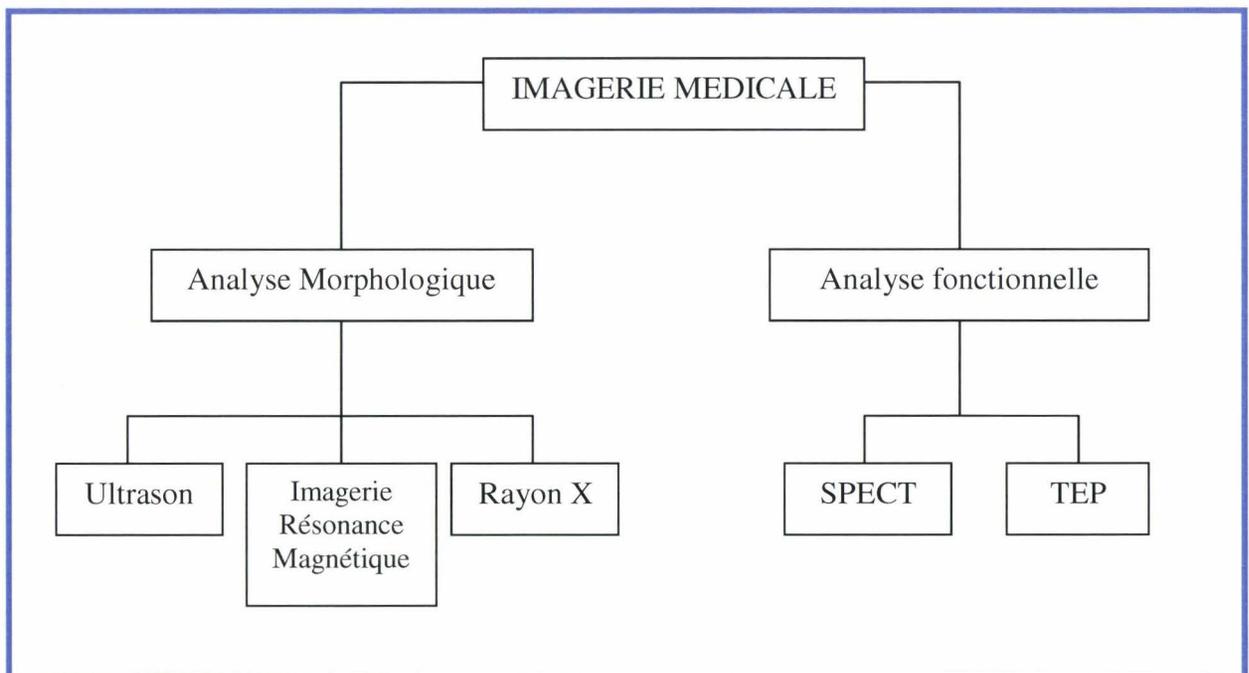


Figure 1. Représentation de l'ensemble des méthodes d'imagerie médicale

Auparavant, il était possible de classer les techniques d'imagerie médicale en fonction du type d'analyse, *i.e* de part sa nature descriptive en analyse morphologique ou fonctionnelle. Ce classement permet de bien visualiser le rôle de toutes ces méthodes d'imagerie dans le cadre de la recherche biologique et médicale. Cependant, leurs développements ont modifié ce classement. Des méthodes comme la TEP (tomographie à émission de positon) ou l'IRM (imagerie par résonance magnétique) ont évolué vers une analyse fonctionnelle et moléculaire. Outre l'observation d'organes, ou de fonctions physiologiques, les méthodes d'imagerie médicale permettent de plus en plus d'observer des molécules (ADN, protéines, lipides, polymères, agents de contraste) au sein des tissus. Ces techniques apparaissent alors aux côtés d'autres méthodes classiques d'imagerie utilisées dans

le cadre de recherche en biologie et en médecine comme l'immunohistologie, l'hybridation *in situ*, ou la microscopie confocale.

Aujourd'hui, l'explosion des nouvelles méthodes d'imagerie nécessite de reclasser l'ensemble de ces outils. Afin de mieux cerner leurs rôles, il a fallu définir les caractéristiques spécifiques de chaque approche en fonction du type d'analyses réalisées eu égard à la nature des ondes irradiant le tissu. Cela implique le type de sources et d'analyseurs employés lors de ces analyses. On parle alors d'imagerie optique, nucléaire ou magnétique. C'est la nature des éléments détectés pendant ces observations qui permet dans un second temps de comparer l'ensemble de ces approches (protéines, lipides, glucides, radio-isotopes). En effet, dans le souci de bien décrire les approches d'imagerie, il est intéressant de les classer de par les résultats obtenus en fonction de la nature de l'observation (morphologique, ou fonctionnelle), mais également en fonction de la nature des éléments détectés avec ou sans agents de contrastes, cibles ou traceurs.

On peut ainsi regrouper l'ensemble des approches d'imagerie utilisé dans le cadre de recherche médicale et biologique (**Figure 2**). On distingue des appareils utilisant différentes technologies avec ou sans retraitement de l'image (imagerie optique, spectroscopique, spectrométrique, et virtuelle) permettant d'obtenir des informations sur les tissus (*in vivo* ou *in vitro*). L'information est globale, tissulaire et on parlera d'imagerie morphologique (TEM ou Microscope Electronique à Transmission), dans le cas contraire on parlera plus précisément d'imagerie fonctionnelle qui permet d'avoir en complément de l'imagerie morphologique, des indications sur le fonctionnement de l'organe ou du tissu avec parfois une quantification possible. Au sein de l'imagerie fonctionnelle, il est maintenant possible d'obtenir des informations encore plus précises sur la nature d'une pathologie par l'intermédiaire d'éléments traceurs ou marqueurs (PET ou IRM). Ils donnent la localisation précise et spécifique d'un ou plusieurs éléments connus. Ces approches d'imagerie indirectes permettent de localiser et de suivre l'évolution des biomarqueurs caractérisés au préalable. C'est dans ce contexte de diagnostique et voir même de pronostique qu'il est désormais intéressant de découvrir des marqueurs spécifiques d'une pathologie afin de pouvoir les suivre par imagerie.

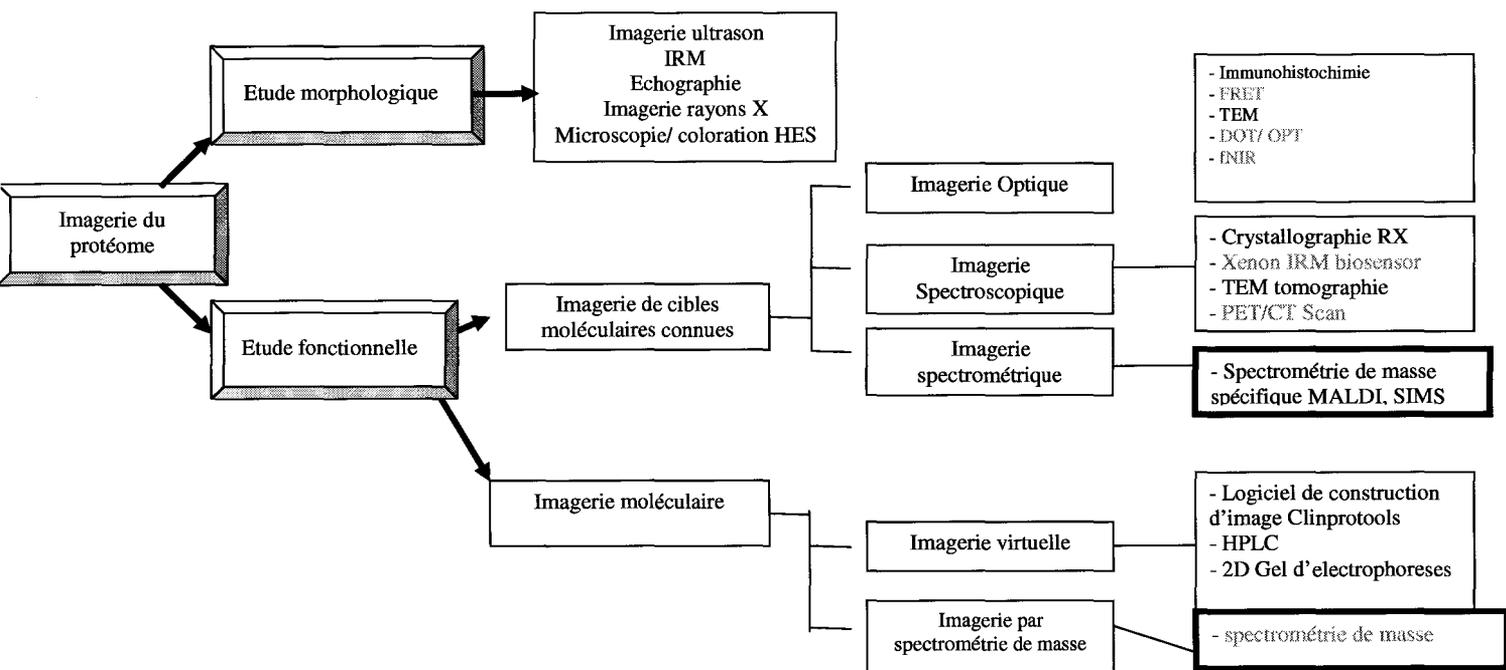


Figure 2. Représentation de l'ensemble des méthodes d'imagerie médicales et biologiques actuelles. TEM (microscopie électronique à transmission), FRET (Fluorescence resonance Transfert Energy), DOT/OPT (Diffuse/Transmission Optical Tomography), fNIR (Fluorescence Near Infrared), PET (positron emission tomography)

A coté de ces approches non invasives, récemment une nouvelle technique dite d'imagerie moléculaire a été développée. Il s'agit de l'imagerie par spectrométrie de masse. Cette nouvelle technologie permet d'établir des profils protéiques ou lipidiques à partir de biopsies. Cette méthode est invasive mais donne un diagnostic moléculaire. La conjonction des deux types de méthodes devrait dans quelques années ouvrir vers un nouveau type d'imagerie médicale.

Nous étudierons dans ce chapitre l'ensemble de ces méthodes avec des exemples afin de définir le contexte dans lequel se place l'imagerie MALDI pour la recherche en Protéomique clinique afin de montrer leurs complémentarités. Les méthodes sont présentées de façon chronologique suivant les évolutions technologiques associées qui ont permis de rendre l'imagerie de plus en plus sensible avec des images de plus en plus résolutive pour atteindre des niveaux subcellulaires (**Figure 3**).

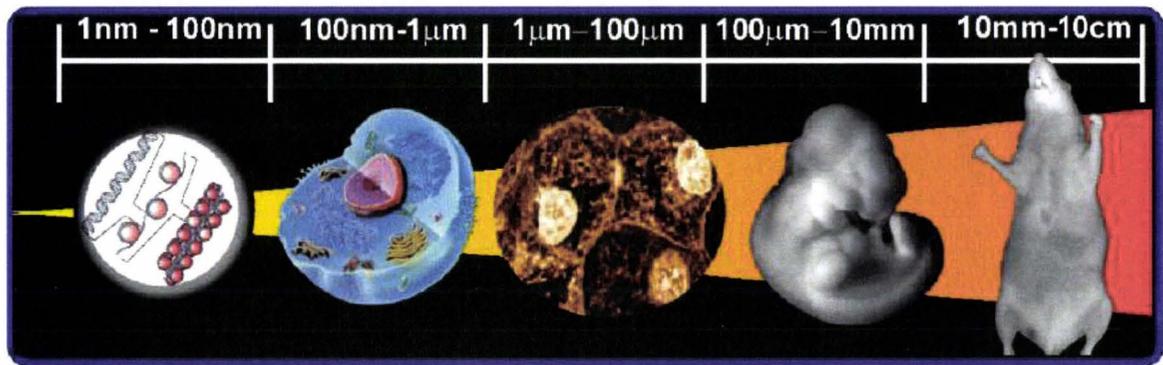


Figure 3. Représentation des différents types de tissus ou organes observés en fonction de leurs tailles

2.1. Généralités

L'imagerie médicale ou biologique au sens large du terme est une représentation graphique de données brutes obtenue par l'intermédiaire d'un moyen de détection. Les moyens de détection sont très nombreux et sont issus des évolutions technologiques dans le domaine de la physique. Les premiers moyens d'imagerie utilisaient simplement la lumière visible et ont donné lieu à l'imagerie optique. D'autres moyens de détection sont ensuite apparus, utilisant tous les types de rayonnements électromagnétiques: Les rayons X, les ultrasons, les rayons gamma, les Tera Hertz, et les radio fréquences (**Figure 4**).

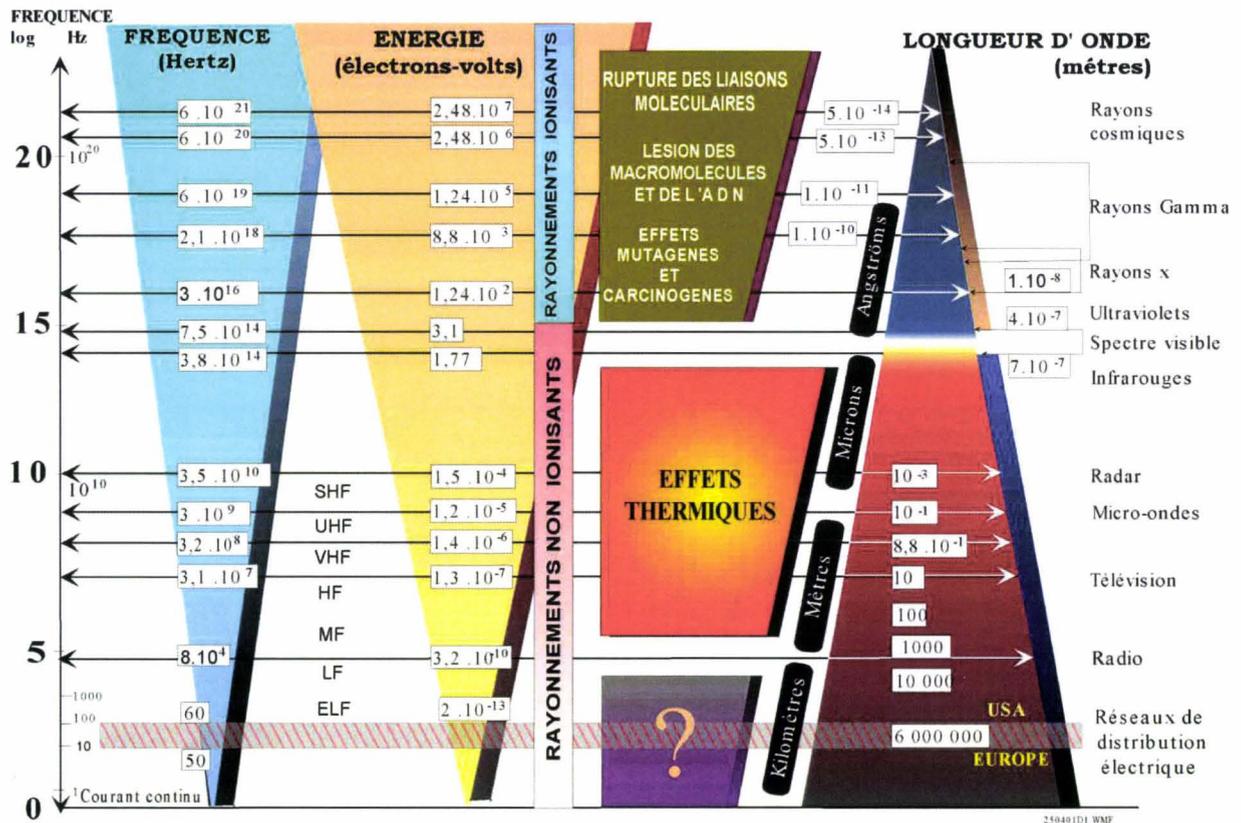


Figure 4. Représentation des différentes longueurs d'onde, fréquences, et les rayons correspondants

On parle alors de méthodes spectroscopiques qui utilisent la lumière à une longueur d'onde précise pour irradier le tissu ou les organes. Différents phénomènes physiques appliqués aux tissus sont issus de ces rayonnements et permettent de visualiser différentes classes de molécules, directement ou indirectement par utilisation de moyens de conversion et de reconstruction informatique des données enregistrées. En fonction de la nature des signaux

émis, les éléments détectés sont différents. Cela permet ainsi d'étudier un large panel de molécules.

Tous les types de rayonnements ont été développés en imagerie, et la plupart ont trouvé des applications en médecine dès lors que des moyens de détection appropriés eussent été disponibles. Au départ, l'imagerie médicale est utilisée essentiellement pour **l'analyse morphologique** : voir un organe, vérifier sa forme, sa taille ou son intégrité, suivre sa croissance. Après les rayons X, d'autres signaux physiques, la résonance magnétique nucléaire et les ultrasons, permettent de visualiser les différents organes du corps humain avec des contrastes et des définitions différentes. Progressivement, la résolution est devenue un point critique, et le diagnostique se limite à l'analyse morphologique. Mais plus récemment, l'imagerie médicale a aussi profité de l'accès aux radio-isotopes et s'intéresse progressivement à **l'analyse fonctionnelle**, c'est-à-dire à la compréhension et au suivi du fonctionnement des organes vitaux. Durant ces vingt dernières années, les développements de l'imagerie médicale ont été foisonnants.

Ils ont profité simultanément :

- Des **progrès décisifs de l'instrumentation** en matière de génération des divers signaux (rayons X et γ , champs électromagnétiques, ultrasons, cyclotrons pour la production d'isotopes radioactifs...) et de leur détection (scanners, gamma-caméras, TEP-scan, voir ci-après...). Les examens deviennent plus précis, gagnent en résolution et leurs durées sont de plus en plus courtes
- Des **apports considérables des logiciels informatiques**. Grâce au numérique, ces derniers permettent d'accéder et d'interpréter des images en 2D ou 3D et, plus récemment, de procéder à des fusions d'images : issues d'une combinaison judicieuse de techniques, elles conduisent à des diagnostics plus pertinents. Mais ces progrès n'auraient pas été possibles sans **l'apport décisif de la chimie** qui a permis de mettre à la disposition des médecins des produits de contraste, des vecteurs, des radio-isotopes et des molécules marquées sous des formes diverses (sels, complexes minéraux et organiques...), de mieux en mieux ciblés et tolérés.

Les spécificités à observer qui caractérisent chaque méthode d'imagerie sont (au delà de l'approche analytique fondamentale) la résolution spatiale, la sensibilité, la rapidité d'analyse, la dangerosité, le coût à plus ou moins long terme, la complexité de mise en place et de maintenance. Ces spécificités font de chaque approche d'imagerie un atout spécifique de

diagnostique, de pronostique, d'observation et d'étude de cas particuliers dans le domaine médicale et biologique.

Cependant depuis peu, il est possible de visualiser des classes de molécules telles que les lipides, l'ADN ou les protéines. On parle alors *d'imagerie moléculaire*, dont l'imagerie MALDI fait partie.

2.2. L'imagerie morphologique

2.2.1. L'imagerie optique descriptive

L'imagerie optique est basée sur la transmission de lumière (photons) qui irradie le tissu. Devenue aujourd'hui incontournable pour le diagnostique, pronostique, ou plus généralement pour la description structurale du tissu, elle est très utilisée par les anatomopathologistes et des biologistes dans le cadre de coloration tissulaire. Les colorations HES (Hematoxilin eosin safran) par exemple sont utilisées pour la mise en évidence des noyaux, du cytoplasme, et des tissus conjonctifs des organes d'animaux étudiés qui permettent alors de décrire et d'identifier le tissu malade par exemple dans le cadre de diagnostique ou de pronostique. (McMANUS JF 1952)

Ces méthodes ont l'avantage d'être rapide et facile car elles nécessitent très peu de préparation, avec un coût très faible, et ont ainsi pu se développer rapidement. De plus, la résolution spatiale (déterminant l'efficacité de séparation de deux éléments distincts) de l'ordre de 100nm permet de visualiser des cellules et les noyaux. Cependant, l'image qui en est extrait n'est que superficiel ou nécessite une coupe de tissu. Cette analyse dite *in vitro* ne peut pas accéder au tissu profond sans être détérioré. Cette approche par exemple à l'hôpital est parfois nécessaire pendant l'acte chirurgical, afin d'aider le pronostique du chirurgien sur la maladie ou de son évolution. (Giardini 1950)

L'arrivée en 1931 (Knoll et Ruska) de l'imagerie microscopique électronique à transmission TEM, permet de visualiser plus en profondeur l'organisation cellulaire. Cette technologie a été abandonnée par les anatomopathologistes du à la complexité d'utilisation, la maintenance et l'impossibilité de haut débit d'analyse requis par les laboratoires hospitaliers. Elle reste néanmoins très utilisée par les laboratoires de recherche fondamentale pour la description précise des cellules et des organites cellulaires.

2.2.2. L'imagerie spectroscopique

Différents types d'examens utilisent les rayons X.

- Radiographie, utilisant des rayons X et parfois l'injection de produit de contraste. Les images obtenues sont des projections des organes et des différents systèmes suivant un plan. Généralement, la radiographie est utilisée pour le système osseux car il s'agit du système le plus visible sur une radiographie du corps.
- Scanner X, tomographie utilisant les rayons X. Les images obtenues sont des coupes millimétriques (ou infra-millimétriques) pouvant être étudiées dans tous les plans de l'espace, ainsi que des images tridimensionnelles.

2.2.2.1. Les rayons X

Le 22 décembre 1895, Röntgen obtient, dans son laboratoire à l'Université de Würzburg, la première image d'une main : celle de son épouse, traversée par des rayons X produits dans un tube de Crookes. (Récompensée dès 1901 par le premier prix Nobel de physique). Son retentissement rapide et universel contraste avec le temps mis pour identifier la nature exacte des rayons utilisés. Cette expérience démontre qu'il est possible de visualiser un squelette, riche en phosphate de Calcium, moyennant l'utilisation de rayonnements invisibles. Ces rayons « X » sont atténués par les milieux riches en électron. Les milieux opaques apparaissent donc en noir sur une plaque photographique. Rapidement, les rayons X permettent d'examiner en détail le crâne ou la cage thoracique d'un patient. Ils facilitent aussi la localisation des éclats d'obus des blessés de la Première Guerre Mondiale. Marie Curie y prend une part active en créant « un service de radiologie auxiliaire du Service de Santé Militaire » et en l'équipant de voitures légères de radiologie. Par la suite, les rayons X sont à l'origine de collaborations fructueuses entre radiologues et chirurgiens. Incontestablement, cette expérience marque le début de l'imagerie médicale et, reconnaissons-le par voie de conséquence, des avancées de la médecine.

2.2.2.2. Fonctionnement de la radiographie aux rayons X

La radiographie est basée sur l'application directe de la loi d'atténuation des rayons x. L'important à savoir et à retenir pour utiliser cette formule assez compliquée est que le coefficient d'atténuation massique dépend du numéro atomique du matériau traversé et de la longueur d'onde des rayons x utilisés. La pénétration des rayons x dépend donc de leurs longueurs d'ondes et du matériau traversé.

Les rayons x de longueur d'onde petite (ou de fréquence élevée) sont appelés « durs » et ceux de longueur d'onde grande (ou fréquence basse) sont appelés « mous ». La relation entre le coefficient d'atténuation et les caractéristiques du matériau traversé explique que les os atténuent plus fortement les rayons x que les tissus mous et apparaissent plus clairs dans les radiographies et qu'une fissure atténue moins les rayons x qu'un objet métallique par exemple et apparaît donc plus sombre et es plus facilement identifiable

2.2.2.3. Tomodensitométrie ou Scanner

La tomodensitométrie, tomographie axiale calculée, ou CT-scan est inventée officiellement par Godfrey Newbold Hounsfield : le patient est soumis au balayage d'un faisceau de rayons X. L'émetteur tourne autour du patient en même temps que les récepteurs chargés de mesurer l'intensité des rayons X après leur passage dans le corps (**Figure 5**).

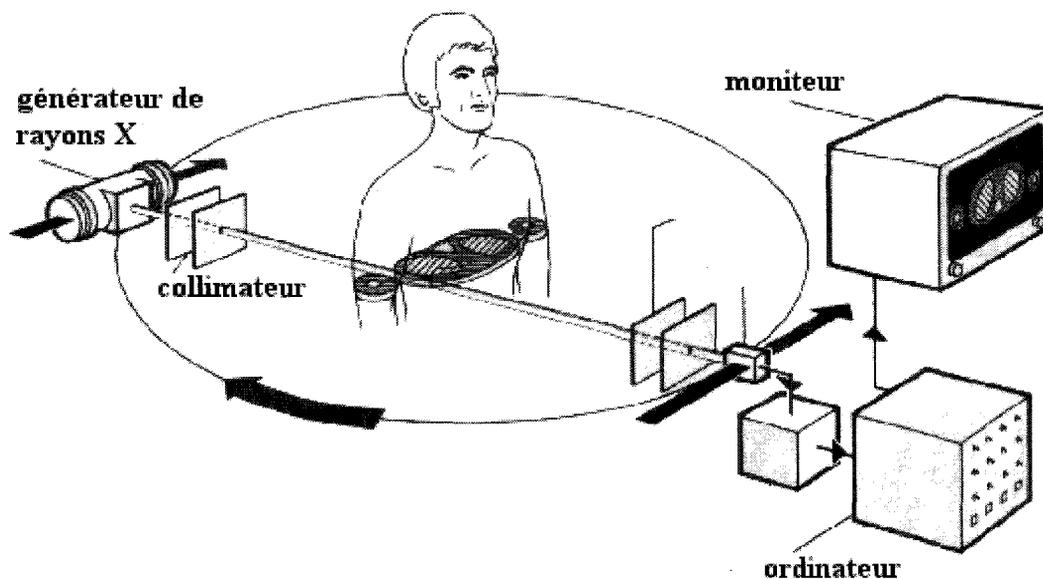


Figure 5. Schéma représentant l'imagerie par rayon X ou scanner

Les données obtenues sont traitées par ordinateur, ce qui permet de recomposer des vues en coupe des organes ou des vues en trois dimensions. On peut faire ressortir certains tissus, en particulier les vaisseaux sanguins, en injectant un produit dit « de contraste » (souvent un complexe de l'iode), c'est-à-dire absorbant bien les rayons X et rendant très visibles les structures vasculaires (qui apparaissent hyperdenses). Comme pour la radiographie, l'exposition à des doses de radiation répétées peut être nocive pour l'organisme, mais le rapport bénéfice - risque lié à l'irradiation penche largement en faveur de la tomodensitométrie, qui en fait un examen de plus en plus largement pratiqué. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), technique non irradiante, est une alternative. Ce dernier offre une meilleure résolution pour les tissus mous alors que la tomographie calculée (CT) est supérieure pour les zones concernant les parties osseuses (**Figure 6**).

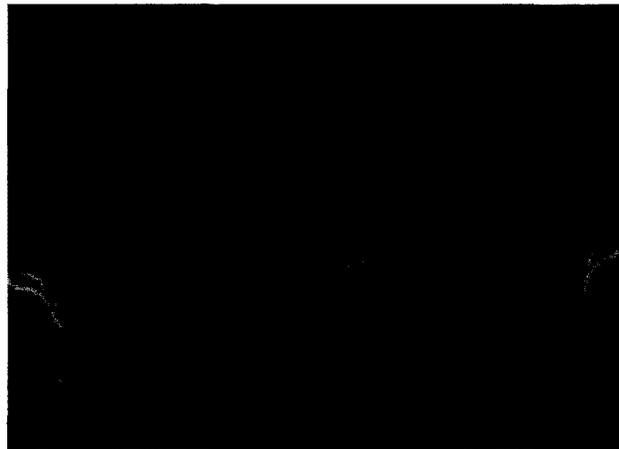


Figure 6. Coupe horizontale du thorax utilisant un fenêtrage osseux. Une vertèbre est visible, avec le canal médullaire en son centre, sur l'axe sagittal arrière, le sternum en avant, des portions de côtes latéralement (ceci est dû à leur inclinaison vers le bas)

2.2.2.4. Les limites de l'approche

La résolution spatiale est de l'ordre du centimètre au millimètre avec l'utilisation du High resolution computer tomography HRCT qui atteint une résolution spatiale inférieure à 0,35 mm et environ 5 μ m pour un micro-CT utilisé pour les petits animaux. Pour ce qui est du temps d'acquisition de gros progrès ont été réalisés. Nous sommes actuellement à la 6^{ème} génération de scanner qui sont passés en 20 ans d'un seul détecteur à 1284 détecteurs ce qui a permis de passer de 5 minutes à 33 millisecondes d'analyse. L'inconvénient du scanner est

bien sûr la dose de rayon qui est emmagasiné par l'individu ce qui limite le nombre d'image pouvant être réalisées même si les derniers appareils sont plus sensibles. Il est nécessaire d'utiliser des agents de contrastes dans certains cas. Les spécifications du produit de contraste idéal sont ainsi faciles à établir. Il doit apporter le contraste, là où il faut, quand il faut, en quantité nécessaire et suffisante, et disparaître le plus rapidement possible. Il doit s'éliminer, de préférence par le rein par filtration glomérulaire, ou par un processus naturel connu. Le produit doit être stable, sans métabolisation et s'éliminer, inchangé.

Malgré cela, le scanner reste principalement une méthode d'imagerie morphologique. Elle ne permet pas de visualiser de molécules ou des processus biologique précis permettant de diagnostiquer. Elle est souvent couplée à l'imagerie pour bien définir les contours structuraux et tissulaires. C'est le cas de l'imagerie PET scan qui lui est couplée.

2.3. L'imagerie fonctionnelle ou moléculaire

L'analyse fonctionnelle vise le suivi d'un ou plusieurs marqueurs spécifiques qui participe au fonctionnement des cellules ciblées. Généralement, elle nécessite le recours à des vecteurs, c'est-à-dire des molécules capables d'intégrer ces cellules pour donner les informations nécessaires. Pour suivre ces vecteurs, il faudra tout simplement les marquer, soit avec un élément émetteur de radiations (radionucléide), soit possédant une fonction répondant spécifiquement à une radiation externe (fluorescence). Dès 1940, et en dépit des effets secondaires potentiellement néfastes de la radioactivité liée à leur utilisation chez l'Homme, la médecine nucléaire est devenue incontournable dans le domaine de l'analyse fonctionnelle. Le vecteur, qui doit être le plus spécifique possible par rapport à l'organe ciblé, joue dès lors un rôle primordial (**Figure 7**)

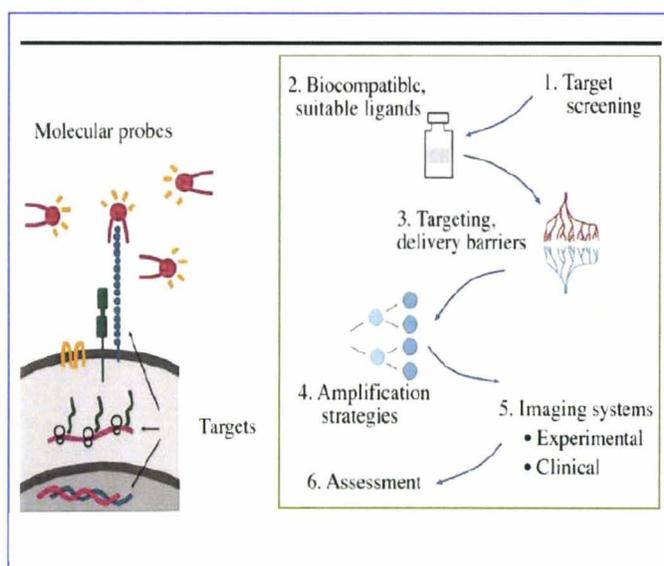


Figure 7. Représentation schématique de l'imagerie moléculaire in vivo et ses cibles potentielles (ADN, ARN, protéines)

Au delà de l'aspect médical de ce concept, il y a une évolution des méthodes pour suivre des molécules d'intérêts qui peuvent être à la fois des radio-traceurs mais aussi des biomarqueurs protéiques, lipidiques, et glucidiques. Il existe un panel très important de molécules identifiables par les méthodes d'imagerie. On peut donc substituer le concept d'imagerie fonctionnelle à l'imagerie moléculaire. Ce concept est divisé en deux groupes en fonction du nombre de molécules détectée en une seule opération. On parle alors d'imagerie spécifique dans le cadre d'un suivi d'une ou de quelques molécules déjà connues au préalable.

(**Figure 3**) Et on parle d'imagerie moléculaire dans le cas où les molécules ne sont connues que par leur nature protéique, glucidique ou lipidique, c'est le cas de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI.

2.3.1. Imagerie moléculaire spécifique

Un certain nombre de méthodes d'imagerie classique morphologique a évolué ces dernières années pour devenir des méthodes d'imagerie fonctionnelle. Leur but est de suivre spécifiquement des molécules impliquées dans des phénomènes cellulaires précis. Des méthodes d'imagerie optique, spectroscopique ou spectrométrique permettent de suivre des molécules d'intérêts par l'intermédiaire de traceurs qui sont injectés *in vivo* ou déposé *in vitro* sur l'échantillon.

2.3.1.1. Imagerie Optique

Pour l'imagerie moléculaire *in vivo* et *in vitro*, les technologies d'imagerie optique telles que DOT (la tomographie optique de diffusion) OPT (transmission) ou NIR fluorescence (near infraréd) ou l'imagerie par fluorescence de protéines ont montré un très fort potentiel dans la mesure dynamique du métabolisme des protéines, et de l'activité enzymatique.

2.3.1.1.1. DOT/ OPT

La tomographie DOT, OPT utilise respectivement la transmission diffuse et la détection de la lumière proche de l'infrarouge ou visible avec deux systèmes source-détecteur adéquats (**Figure 8**). Une première source pulse en quelques picoseconde le signal sur une région précise du tissu et celui-ci est enregistré par un détecteur de comptage de photon. Un second utilise les radios fréquences modulées couplées à un détecteur de phase. (Siegel 1999). La résolution spatiale du DOT est comparable à la grille du couple source-détecteur (Boas, Chen et al. 2004) , alors que la pénétration du signal est déterminée par les caractéristiques de transport de la lumière comme dans toutes les approches optiques (autour de 10 centimètres pour le cerveau humain) (Franceschini, Moesta et al. 1997) (Ntziachristos, Yodh et al. 2000).

La résolution spatiale est quand à elle autour de 5mm chez l'homme, et le millimètre chez le petit animal.

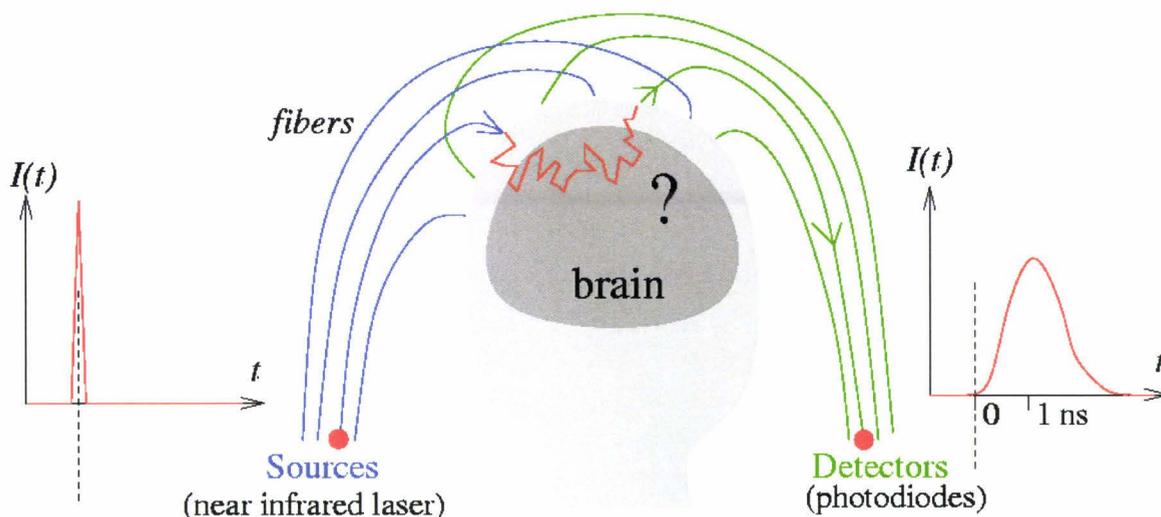


Figure 8. Représentation schématique de l'imagerie tomographie optique diffuse DOT

La résolution temporelle est de quelques secondes et l'acquisition de l'image se fait en quelques minutes. L'avantage du DOT est sa capacité à quantifier l'oxy et desoxy-hémoglobine dans le tissu (Siegel 1999), pouvant donner des informations sur la dynamique du sang, les cytochromes, les lipides, l'eau et le métabolisme du tissu (Pogue 1999), et également mesurer l'activité neuronale (Figure 8).

2.3.1.1.2. L'imagerie Near-infrared fluorescence

L'imagerie fNIR est basée sur l'émission et l'absorption de lumière d'une longueur d'onde comprise entre 700 et 1000nm. L'absorbance excite les molécules fluorescentes du tissu biologique qui fluoresce en émettant à une longueur d'onde plus grande (appelé effet de Stokes. Certains tissus ont un degré d'auto fluorescence qui a comme conséquence de réduire le signal par rapport au bruit de fond (SBR)). L'imagerie fNIR relie l'excitation et la détection de fluorescence provenant d'agents de contraste exogènes qui sont des fluorophores organiques ou inorganique semi-conducteur (quantum dots). Les fluorophores organiques sont de petites tailles inférieures à 1200 Da avec différentes bio-distributions et pharmacocinétiques, éliminés dans la circulation rénale en quelques minutes. Quelques problèmes d'excitation, d'émission, d'hydrophobie, de stabilité, de perte de fluorescence (photobleaching) sont susceptibles de limiter leur sensibilité.. (Frangioni 2003)

Les Quantum dots ont récemment été introduits en fNRI pour résoudre les problèmes des fluorophores organiques. Ils sont composés d'une structure entre 25 et 35 nm qui fluoresce de différentes couleurs selon la taille de la molécule (**Figure 9**) ce qui permet un multiplexage de différentes molécules cibles (Smith, Gao et al. 2004). De plus, ils sont résistants au photo-blanchiment (Chan and Nie 1998). Cependant, son élimination par filtration rénale est difficile. La toxicité *in vivo* n'est pas encore connue et doit être encore démontrée.

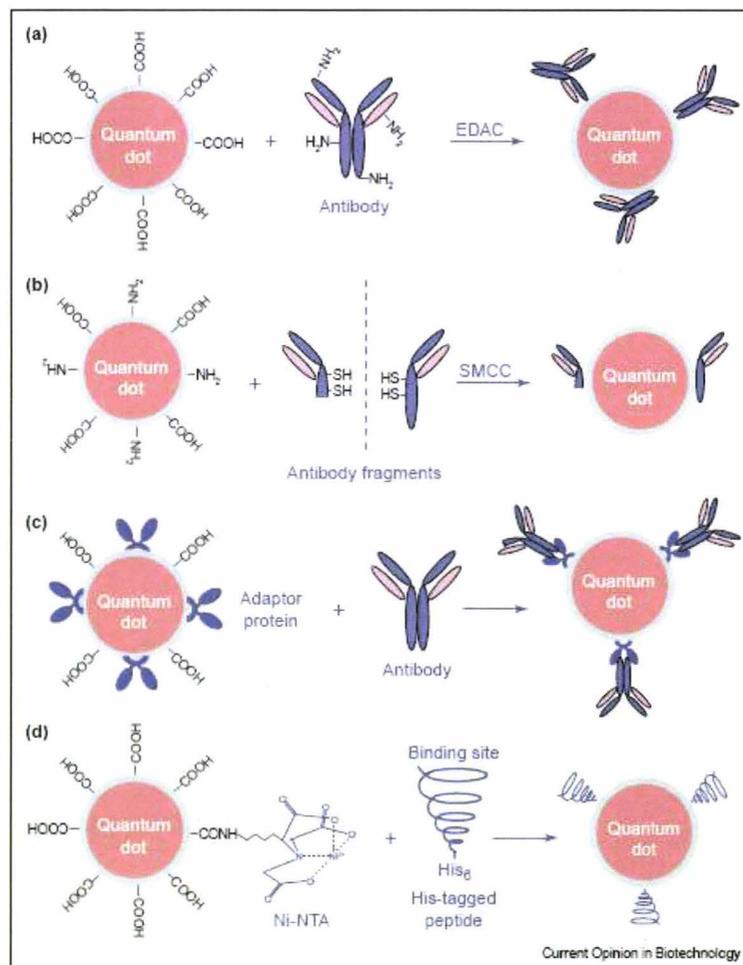


Figure 9. Complexation des anticorps et de différents Quantum Dots. (Gao, Chung et al. 2007)

Les agents de contrastes sont ajoutés aux cibles biologiques spécifiques et sont définis alors comme sondes. Celles-ci sont observées par fNIR avec une bonne spécificité et sensibilité du fait du très faible bruit de fond. (Weissleder, Tung et al. 1999). La sensibilité est de l'ordre de 3 à 200 pM avec une résolution de 60 à 300 nm et un temps d'acquisition de 10 à 30 secondes (Weissleder, Tung et al. 1999). Avec ces paramètres, la fNIR en temps réel, est possible avec un pouvoir de pénétration de l'ordre de 6 à 10 centimètres. (Hayashi, Kimura et

al. 2004). Tous ces éléments font aujourd'hui que l'imagerie fNIR est très utilisée avec des applications très différentes de suivie moléculaire. (**Figure 10**)

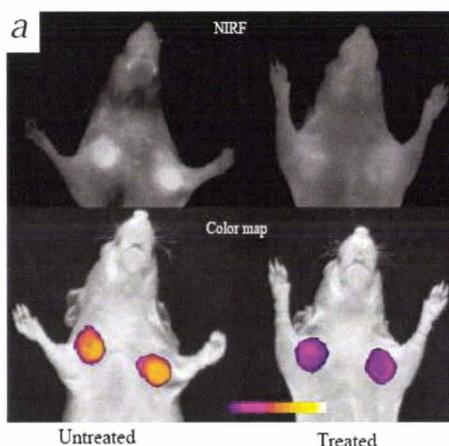


Figure 10. Imagerie NIR suivant la metalloprotease MMP2. La souris de droite est traitée avec le pronomastat un inhibiteur de MMP2. La souris de gauche est le contrôle négatif sans traitement. (Bremer, Tung et al. 2001)

2.3.1.1.3. L'imagerie Green fluorescent protein (GFP).

L'imagerie GFP est basée également sur l'absorption et émission de lumière visible, où l'absorption et l'effet de diffraction sont limités à quelques millimètres. Seule la structure en surface ne peut être imagée (Weissleder 2001)

Les GFP protéines sont natives chez quelques animaux marins, mais peut être également introduit dans une cellule par transfert génétique. Cette GFP transférée (dans une protéine recombinante) agit comme un agent de contraste fluorescent dans le tissu. (Whitaker 2000). Contrairement à l'imagerie NIR fluorescent, l'imagerie GFP n'utilise pas de fluochromes exogènes. La GFP est originaire du poisson *Aequorea victoria* (Prasher, Eckenrode et al. 1992), et possède une absorption entre 489 et 508 nm. La séquence GFP est introduite dans une séquence ADN d'intérêt, donnant ainsi une protéine recombinante incorporant la GFP. D'autres « GFP like » existe étendant la palette de couleur telle que la BFP qui fluoresce dans bleu ou dans le cyan-vert (Matz, Lukyanov et al. 2002). Cela permet de réaliser les imageries sur différentes protéines simultanément, on parle de d'imagerie multiplexe (Zaccolo 2004). Cette technologie a ensuite connu de nouvelles perspectives dans le cadre de la technique de transfert d'énergie résonant par fluorescence (FRET) (Matz, Lukyanov et al. 2002).

Le FRET est basé sur le transfert d'énergie dépendant de la distance entre une paire de fluorophores voisins *i.e.* un accepteur et un donneur, dont les spectres d'émission et d'excitation se superposent (Zaccolo 2004). La technique de FRET cause une diminution de l'intensité et de durée de vie de la fluorescence du donneur et une augmentation de l'accepteur. L'efficacité est dépendante de la distance entre les donneurs et accepteurs de fluorescence. La résolution est comprise entre 2-6 nm, très inférieur à la microscopie optique (200nm). C'est une technique très sensible pour l'étude d'interactions de protéines *in situ* (Figure 11).

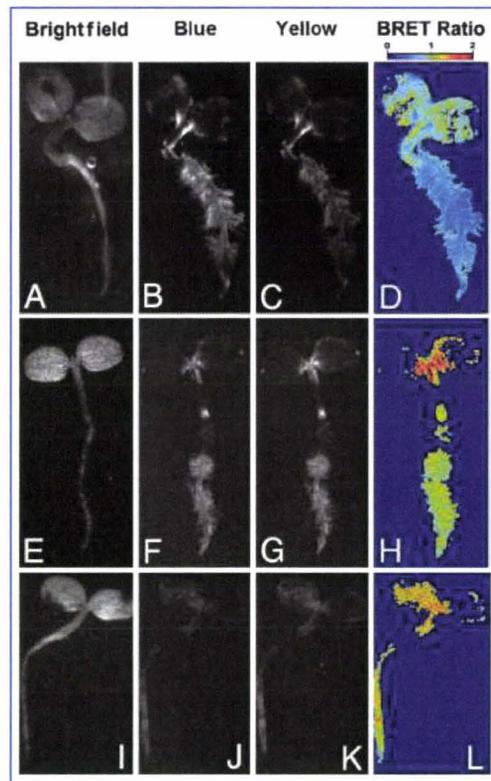


Figure 11. Exemple d'imagerie FRET : Analyses FRET de tabac montrant une dimérisation de la protéine COP1 (I-L) Les deux formes de COP1 étant imagées dans les deux premières lignes. (Xu, Soutto et al. 2007)

2.3.1.2. Imagerie magnétique IRM

2.3.1.2.1. Histoire de l'IRM

Le principe de l'imagerie par résonance magnétique repose sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire (RMN), c'est-à-dire portant sur le couplage entre le moment magnétique du noyau des atomes et le champ magnétique externe, décrit par Felix Bloch et

Edward Mills Purcell en 1946, Prix Nobel de physique en 1952. Au début des années 1970, les nombreux développements qu'a connus la RMN, notamment en spectroscopie, laissent entrevoir de nouvelles applications de cette technique. Ainsi, Raymond Vahan Damadian propose dès 1969 d'utiliser la RMN dans un but médical et appuie sa proposition avec la démonstration que la spectroscopie RMN permet la détection de tumeurs.

En 1973, un progrès important est accompli : s'inspirant des méthodes de reconstruction d'images utilisées en tomographie, Paul Lauterbur réalise pour la première fois une *imagerie* (qu'il baptise *zeugmatographie*) basée sur la RMN en utilisant le principe des « *gradients* » qui permettent de capturer l'image d'une « coupe virtuelle » d'un objet en deux dimensions. Simultanément mais de façon indépendante, Peter Mansfield propose une méthode similaire et introduit en 1977 la technique d'imagerie écho-planaire permettant la capture de nombreuses images en un temps relativement court.

Dans les années qui suivent, la technique évolue rapidement notamment grâce aux progrès réalisés en informatique et en électronique qui permettent de mettre en œuvre des méthodes numériques coûteuses en temps de calcul. Ainsi en 1975, Richard Ernst propose d'utiliser la transformée de Fourier pour analyser le codage en fréquence et en phase du signal IRM.

Les premières images de tissus humains seront produites en 1975 par Mansfield puis en 1977 sera réalisée la première image d'un corps humain vivant par Damadian qui dirigera ensuite la fabrication des premiers appareils commerciaux.

La principale innovation dans le domaine de l'IRM viendra avec la reprise par Seiji Ogawa des travaux de Linus Pauling et Charles Coryell sur le magnétisme de l'hémoglobine. En effet, le signal IRM émis par le sang oxygéné diffère du signal du sang désoxygéné. Cette propriété permet donc à Seiji Ogawa, John Belliveau et Pierre Bandettini de réaliser en 1992 les premières images du cerveau en fonctionnement : en réponse à des stimulations visuelles, ils purent mesurer une augmentation du débit sanguin cérébral dans les aires visuelles du lobe occipital. La mesure de cette réponse hémodynamique est à la base du fonctionnement de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle, un outil central en neurosciences cognitives contemporaines.

Après plusieurs années d'évolution, l'IRM est donc devenue une technique puissante du domaine de l'imagerie médicale, lequel est sans cesse en développement. En reconnaissance de « *leurs découvertes concernant l'imagerie par résonance magnétique* », Peter Mansfield et à Paul Lauterbur furent récompensés par le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2003.

2.3.1.2.2. Ses bases physiques

La technologie utilisée est bien la résonance magnétique nucléaire. Soumis à un champ magnétique d'une intensité qui peut aller jusqu'à plusieurs teslas, les noyaux de certains atomes (ici uniquement celui d'hydrogène, c'est-à-dire un proton), pouvant eux-mêmes être considérés comme de mini aimants, s'alignent dans ce champ. En soumettant ces noyaux à une onde de radiofréquence, de durée très courte et bien spécifique de cet atome, leur spin va pouvoir être modifié. Ils entrent en résonance avec cette onde. Lors de la coupure de cette radiofréquence externe, leur remise en état normal va se traduire par une restitution de cette énergie sous forme d'un signal que l'on pourra capter et mesurer selon deux critères : la relaxation longitudinale avec retour de la polarité initiale, T1, et la relaxation transversale avec dérésonance, T2. L'IRM permet la lecture des images pondérées en T1 et/ou en T2, qui fournissent des contrastes avec des intensités exponentielles (**Figure 12**). On peut, sans inconvénient, trouver l'origine du signal émis et donc le localiser dans l'espace, en ayant modifié légèrement le champ magnétique principal dans sa longueur en gradients localisables. Or l'hydrogène est précisément le constituant majoritaire des tissus humains en termes de nombre d'atomes, car il est l'élément prépondérant de l'eau et des graisses, matières qui constituent près des neuf dixièmes de notre corps. L'IRM permet donc de visualiser en trois dimensions la densité d'eau, de graisses et d'autres matières organiques contenant de l'hydrogène dans notre corps. C'est la densité monoprotonique qui est à la base du signal IRM. Comme cette densité diffère d'un organe à un autre, on pourra sans inconvénient obtenir les contours de ces éléments avec une précision de l'ordre de quelques millimètres. La technique étant encore onéreuse, on préférera utiliser les méthodes classiques de radiologie pour visualiser un bras cassé, mais le résultat est tout aussi probant.

2.3.1.2.3. Les agents de contraste pour IRM

Les produits de contraste les plus utilisés en IRM utilisent les propriétés paramagnétiques de certains atomes. Le paramagnétisme dépend du nombre d'électrons célibataires des couches externes. L'atome qui s'avère être le plus paramagnétique est le gadolinium avec sept électrons célibataires. Il est utilisé sous forme d'un complexe hydrophile afin de lui apporter une pharmacocinétique d'élimination essentiellement rénale. Les produits diffèrent en général par le type de complexe mis en œuvre : ce sont tous des «

gadocycles ». Les examens du foie requièrent parfois des produits qualifiés de « super paramagnétiques ». D'autres produits à base de gadolinium réalisent de véritables cholangiographies, mais ils doivent aussi être engagés dans des complexes lipophiles. Ils se lient alors volontiers aux protéines circulantes et sont éliminés préférentiellement par la bile. Curieusement, ce n'est pas le produit de contraste que l'on voit, mais son effet sur la relaxation des protons proximaux qu'il accélère. Apparemment, le signal en T1 des protons situés à proximité de l'agent paramagnétique semble amplifié. L'analyse fonctionnelle est possible dans certains cas bien précis comme le suivi de l'irrigation du cerveau ou du fonctionnement du cœur au travers de l'analyse en direct des taux d'oxygène contenus dans le sang.

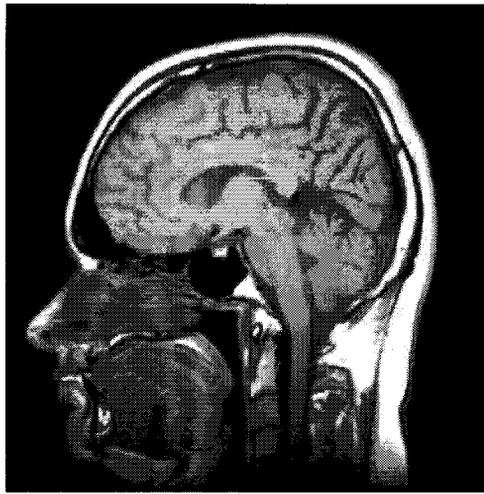


Figure 12. Exemple d'analyse IRM d'une coupe sagittale d'une tête humaine en pondération T1 située au niveau du plan médian qui fait donc apparaître différentes structures du névraxe (face interne d'un hémisphère cérébral, corps calleux, cervelet) ainsi que d'autres tissus (langue

2.3.1.2.4. Applications de l'IRM

Deux exemples d'applications en analyse morphologique:

1. L'angio-IRM est utilisée pour visualiser les artères afin de mettre en évidence des anomalies telles que les sténoses, dissections, fistules, les anévrismes et artérite. Les artères cérébrales, cervicales, rénales, iliaques, pulmonaires et l'aorte sont les artères les mieux étudiées par cette technique. L'angio-IRM fait appel aux séquences en échos de gradient ultra-rapides avec injection de Gadolinium en intraveineuse (**Figure 13**)

2. La Cholangio-IRM ou l'étude des voies biliaires et pancréatiques par l'IRM de manière non invasive est une nouvelle approche des bilans d'imagerie des pathologies hépato-pancréatico-biliaire.

Exemple d'applications en analyse fonctionnelle.

La méthode la plus utilisée en IRM fonctionnelle actuellement est celle basée sur l'aimantation de l'hémoglobine contenue dans les globules rouges du sang. L'hémoglobine se trouve sous deux formes :

Les globules rouges oxygénés par les poumons contiennent de l'oxyhémoglobine (molécule non active en RMN) ;

Les globules rouges désoxygénés par le métabolisme des tissus contiennent de la désoxyhémoglobine (active en RMN car fortement paramagnétique).

2.3.1.2.5. L'IRM spécifique

Reprenant le principe de l'IRM, cette approche permet de suivre dans l'organisme un élément traceur (anticorps, ou un médicament qui cible un organe) par l'intermédiaire d'un élément rapporteur (le xénon ou un élément magnéto-fluorescent, **Figure 14**).

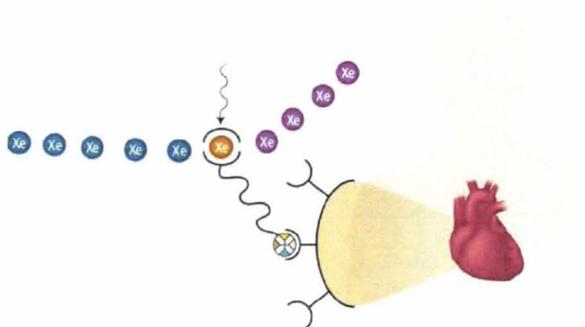


Figure 13. Présentation du concept d'imagerie par IRM spécifique utilisant un biosenseur marqué au xénon.

Le xénon est incorporé par voie de synthèse chimique sur un anticorps avec une partie hydrophile pour augmenter la solubilité du composé qui est administré à un rat. On peut apercevoir par IRM le xénon avec une bonne sensibilité ce qui faisait défaut jusqu'à présent dans les IRM spécifiques atteignant des gammes de sensibilité autour de 1-70 μM détecté dans le muscle ou le cerveau de rat. La résolution peut atteindre 300 μm (**Figure 15**) ce qui

est bien meilleur que pour les autres méthodes d'imagerie spécifique *in vivo* comme le TEP que nous développons dans le prochain chapitre.

Cette nouvelle approche d'IRM spécifique apporte un outil innovant en clinique dans le cadre de recherche de marqueurs pathologiques, sans détériorer le tissu. Les développements à venir vont être nombreux et devront à terme démontrer son utilisation chez l'homme sans contre-indication. En effet, les effets des anticorps injectés peuvent avoir des effets indésirables. Cette méthode doit donc encore faire preuve de son concept chez l'homme, mais ouvre déjà de grandes perspectives pour la localisation de marqueurs d'intérêt sous des formes différentes de diagnostique, de pronostique, et de suivi de traitement médicaux (**Figure 16**).

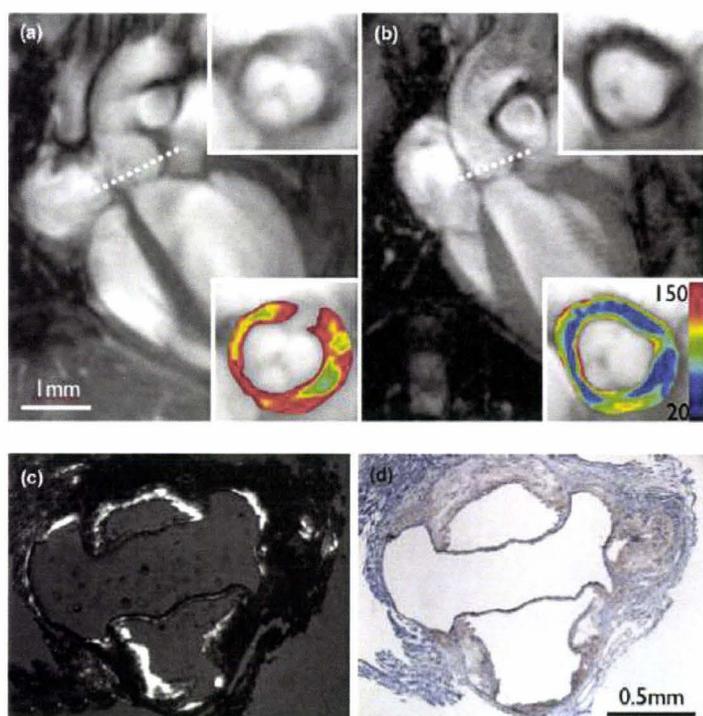


Figure 14. Imagerie IRM *in vivo* de l'expression VCAM chez la souris apoE^{-/-}. Image IRM 9,4 Tesla de la coupe transversale de l'aorte avant (a) et après (b) injection de VCAM magnetofluorescent. L'accumulation de la sonde est endothéliale et la spécificité est confirmée par microscopie fluorescente (c) et immunohistochimie (d). (Nahrendorf, Jaffer et al. 2006)



Figure 15. Image représentant des poumons d'un rat à une résolution de 300µm, d'air chargé en xénon.

2.3.1.2.6. Les limites de l'IRM

La sensibilité de l'IRM est faible (mM) et dépend du volume de l'échantillon et des propriétés du champ de radiofréquences, du temps d'acquisition et du nombre d'acquisition délimité par les temps de relaxation T1 et T2 (Hoult & Richards 1976). En revanche la résolution spatiale est bien meilleure que bon nombre de méthodes d'imagerie (mm) et la résolution temporelle est de quelques millisecondes ce qui permet à une image d'être réalisée en quelques minutes. Pour une image en haute résolution en 3 dimensions le temps augmente rapidement et peut prendre quelques heures. (Schneider, Bamforth et al. 2003). La résolution temporelle est gouvernée par la sensibilité qui peut être augmentée par l'intermédiaire d'agents de contraste. Ces agents de contraste modifient les temps de relaxation T1 et T2, la densité de protons, la polarisation nucléaire ce qui augmente la sensibilité et la spécificité.

De très petites nanoparticules d'oxyde de fer super magnétique (10nm) par exemple sont utilisées pour augmenter la sensibilité tout en ayant une demi-vie de 81 minutes (Weissleder, Elizondo et al. 1990). D'autres particules ayant d'autres propriétés permettent d'augmenter la densité de protons, par transfert de magnétisation (MT; (Wolff and Balaban 1989)), par transfert de saturation d'échange chimique (CEST; (Ward, Aletras et al. 2000)), ou par transfert de saturation d'échange chimique paramagnétique (PARACEST; (Zhang, Merritt et al. 2003)).

Si l'IRM était moins chère et plus développée, elle remplacerait facilement la plupart des techniques décrites ci-dessus. On la réserve pour le moment aux examens pour lesquels le diagnostic paraît plus délicat (muscles, tendons, cerveau, tumeurs) ou pour lesquels cette méthode est bien plus efficace ou unique (neurologie, ophtalmologie, cardiovasculaire, endocrinologie, oncologie...). Mais comme pour les rayons X et les ultrasons, l'IRM ne peut pour le moment être utilisée qu'en tant que modalité de diagnostic limitée à l'imagerie anatomique même si des développements technologiques permettent de mettre en évidence de réelles capacités à suivre des protéines *in vivo*. On peut observer les tissus mous avec des contrastes plus élevés qu'avec la tomodensitométrie ; en revanche elle ne permet pas l'étude des corticales osseuses (tissus « durs ») ni donc la recherche de fractures où seul l'œdème péri-lésionnel pourra être observé.

L'Imagerie par Résonance Magnétique a l'avantage d'apporter une bonne visualisation de la graisse, de l'eau donc de l'œdème et de l'inflammation avec une bonne résolution et un bon contraste. En particulier, l'IRM permet d'imager la fosse sous-tensorielle

de l'encéphale dont l'exploration est difficile en CT-scan (scanner rayons X) à cause d'artéfact de durcissement de faisceaux. Cependant, cette imagerie n'est pas adaptée à l'étude des tissus pauvres en protons comme les tendons et les tissus osseux.

2.3.1.3. Imagerie nucléaire TEP/SPETC

2.3.1.3.1. Principe de la tomographie par émission de positron

En diagnostic nucléaire, la source de rayonnement est localisée dans le patient, le radio-isotope ayant été injecté, et celui-ci irradie donc tout autour de lui. La collecte d'informations peut se faire soit dans un plan, soit simultanément dans plusieurs directions en disposant les détecteurs en couronne autour du patient (**Figure 16**). **Les appareils diffèrent par le type de détecteurs adaptés au type de rayonnement et à leur énergie.** La SPECT (« single photon emission computed tomography ») est une technique d'imagerie qui, comme son nom l'indique, analyse les émissions monophotoniques, alors que la TEP (tomographie par émission de positron) a la particularité de mesurer les deux photons émis simultanément à 180° résultant de la collision entre un positon et un électron. (**Figure 16**) Très récemment, les constructeurs d'outils d'imagerie ont développé des appareils mixtes permettant d'obtenir en un seul passage des images CT/SPECT, voire CT/TEP.

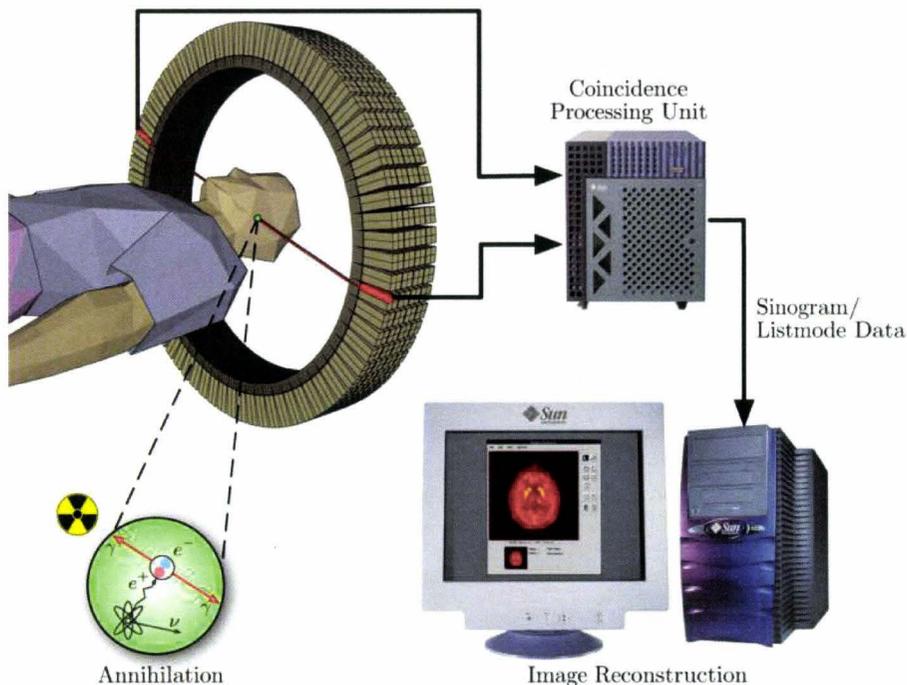


Figure 16. Schéma de la tomographie par émission de positron

2.3.1.3.2. Applications :

Une utilisation courante : le suivi du métabolisme cellulaire

La fixation idéale du radio-isotope au vecteur est bien évidemment la liaison covalente (**Figure 17**). Les isotopes d'atomes entrant dans la composition de molécules organiques sont malheureusement de période trop longue (tritium : 12,34 ans, carbone 14 : 5730 ans), ou trop courte (carbone 11 : 20,4 min, azote 13 : 9,97 min, oxygène 15 : 2,04 in). Le fluor 18 fait exception. Sa demi-vie de 108 min, pourtant relativement courte, se prête néanmoins à la synthèse organique pour peu que l'introduction de cet atome se fasse en dernière étape, que les rendements soient excellents et que la réaction puisse être réalisée en quelques dizaines de minutes. Ces critères sont remplis pour la synthèse du fludéoxyglucose (FDG), molécule de glucose fluorée. Le FDG mime le glucose et intègre les cellules avides de sucre. Du fait de la présence de l'atome de fluor, le premier métabolite ne peut pas être biologiquement modifié, mais ne peut non plus s'échapper de la cellule. Celle-ci s'enrichit donc proportionnellement en fluor.

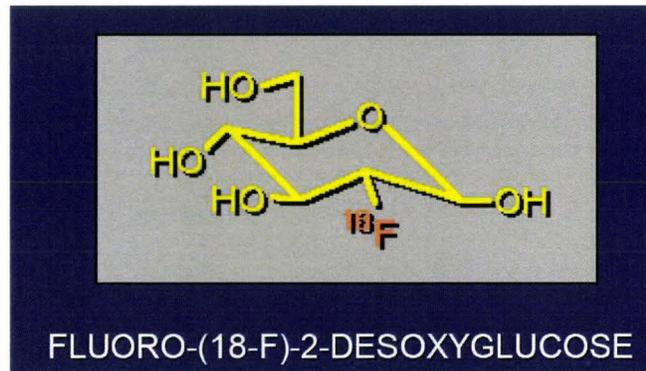


Figure 17. FDG ou sucre analogue

Les cellules neuronales, cardiaques et tumorales sont les plus grandes consommatrices en sucre du fait de leur taux d'activité ou de reproduction supérieur aux autres. Le rayonnement⁺ émis par le fluor transformé en deux rayonnements opposés de 511 keV est enregistré par un détecteur placé en couronne autour du patient. C'est la technique de TEP qui commence à trouver un intérêt croissant. Cette technique récente est essentiellement orientée vers la cancérologie car elle permet de visualiser les tumeurs primaires et toutes les métastases (**Figure 18**). Elle est aussi appelée à rendre de grands services en neurologie et en cardiologie. La production de FDG est cependant soumise à une limitation de taille qui est la disponibilité du fluor. Du fait de sa demi-vie courte, la préparation du FDG ne peut se faire

que sur le site de production du fluor. En d'autres termes, les caméras doivent être localisées à moins de deux heures de distance d'un cyclotron de production de fluor. Plus largement, on peut envisager de transformer n'importe quelle molécule organique en traceur, pour peu que l'on puisse lui greffer facilement et surtout rapidement un atome de fluor.

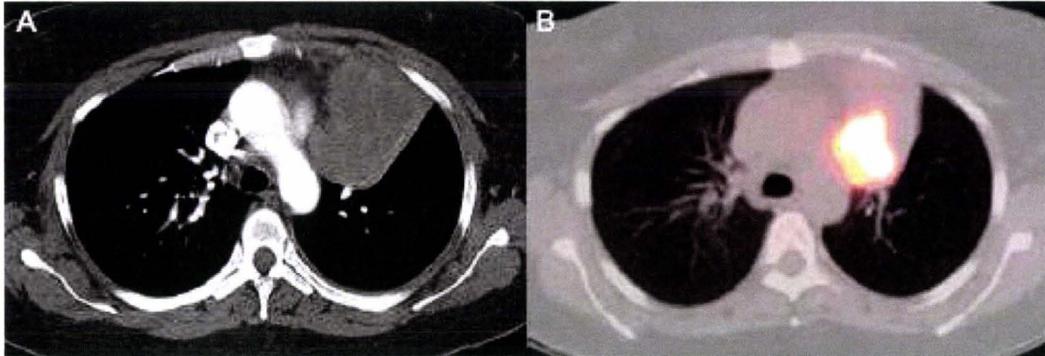


Figure 18. FDG-PET/CT d'un carcinome du poumon. A: Image obtenue par tomographie rayons X, B: image mixée avec l'analyse scintigraphique par imagerie PETscan. L'activité métabolique du lobe droit montre une zone tumorale. (Torigian, Huang et al. 2007)

Des nanoparticules

Les formes les plus simples de vecteurs sont basées sur leurs propriétés physiques plutôt que biologiques. Une suspension d'un colloïde piégeant un radio-isotope de diagnostique (technétium 99m) est injectée en périphérie d'une tumeur. Ces particules vont migrer à l'image des cellules cancéreuses libérées par la tumeur en suivant le tracé du système lymphatique et se laisser piéger dans le ganglion le plus proche (ganglion sentinelle), normalement chargé de détruire les intrus à l'aide des macrophages qu'il contient. Au moyen d'une sonde per-opératoire, on localise facilement ce ganglion sentinelle dans lequel se sont concentrées les particules émettrices, emplacement potentiel de la première métastase. Après excision de la tumeur et du ganglion, une analyse anatomo-pathologique de ce dernier permettra de conclure ou non à une invasion métastatique. En cas de réponse négative, le médecin pourra conclure à une non-prolifération du cancer et éviter une chirurgie lourde de lymphadenectomie c'est-à-dire de l'ablation chirurgicale d'une partie du système lymphatique, en particulier des ganglions lymphoïdes dans lesquels se localisent les métastases ; pour les femmes atteintes d'un cancer du sein, il s'agit généralement de la

suppression du ganglion lymphoïde le long du bras du même côté que le sein portant la tumeur –, et un traitement de chimiothérapie complémentaire. Cet exemple simple basé sur une particule marquée a cependant nécessité le développement d'un support adéquat. Non seulement la **taille des particules** a son importance (nanoparticules), mais également sa **compatibilité avec le corps humain** (allergisant, toxicité) **et avec le radio-isotope**, et celles-ci ont dû être étudiées. Ces particules sont essentiellement formées de colloïdes de sulfure de rhénium ou d'albumine humaine. Le technétium produit sur site est ajouté juste avant l'injection à une préparation lyophilisée de ces particules. Toute une technologie a été mise au point pour permettre une production contrôlée de particules de tailles identiques, stables après lyophilisation et faciles à remettre en suspension lors du marquage. Cette technique est applicable dans la détection de ganglions sentinelles de cancers du sein, mais aussi de mélanomes. D'autres particules de tailles plus importantes (microparticules) marquées à l'erbium 169, au rhénium 186 ou à l'yttrium 90 émetteurs, sont utilisées en suspension pour traiter la polyarthrite rhumatoïde. Le mélange est injecté dans l'interstice articulaire au niveau du liquide synovial dans lequel le radio-isotope détruit les cellules excédentaires (technique d'adiosynoviorthèse). Le choix de l'isotope se fait sur la base de la taille de l'articulation à traiter et le lien est direct avec l'énergie de la radiation : ^{169}Er pour les articulations des doigts, ^{186}Re pour les poignets, coudes, hanches et épaules, ^{90}Y pour les genoux. Ce traitement déjà ancien, mais peu connu, a fait ses preuves. Dans les cas où l'effet positif est constaté dans les jours qui suivent l'injection, il a pu être démontré qu'il perdure plus de deux années.

2.3.1.3.3. Immuno-scintigraphie

L'immuno-scintigraphie est l'équivalent de l'approche de l'anticorps marqué au xénon par imagerie par IRM dans le cas d'imagerie nucléaire par PET scan. Il est possible de fixer un isotope radioactif sur un anticorps qui est alors introduit dans l'animal. Il est alors visualisable par le PET scan. Cette approche correspond à un marquage spécifique de molécule cela permet également comme l'approche de visualiser un ensemble de molécules protéiques ou autres de cette manière. Cette approche est spécifique et demande de façonner l'anticorps pour chaque étude. Dans l'exemple ci dessous, un radioisotope d'iode a été greffé sur un anticorps anti-angiogénique, puis observé par SPECT/CT. (**Figure 19**)

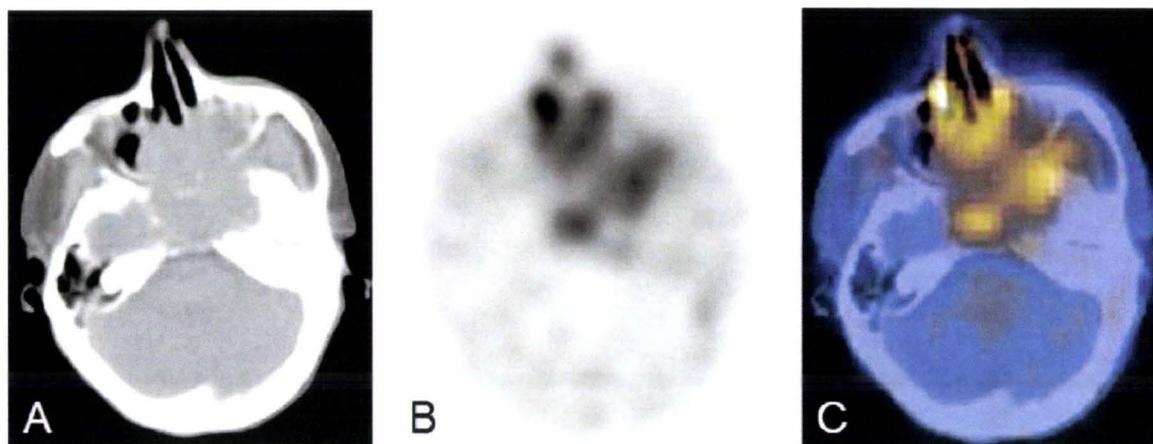


Figure 19. Imuno-scintigraphie de patient atteint de carcinome du nez, avec un anticorps anti-angiogénétique marqué au ^{123}I obtenue par SPECT/CT. A : image par tomographie rayons X, B : Image obtenue par SPECT, C : Image obtenue par superposition de A et de B SPECT/CT (Birchler, Thuerl et al. 2007)

2.3.1.3.4. Limites du PET/SPECT

Les deux approches PET et SPECT sont utilisés pour l'imagerie moléculaire pour leur grande sensibilité et spécificité des agents de contrastes, bonne résolution temporelle (quelques secondes à quelques minutes) et un examen rapide (quelques minutes). Cependant la résolution spatiale est faible dû à la difficulté de déterminer précisément l'origine de l'émission du tissu.

La sensibilité du PET scan est de l'ordre de 10^{-10} – 10^{-12} M (Mandl, Schimmelpfennig et al. 2002). La récente introduction de cristaux de lutetium-oxyorthosilicate (LSO), a permis d'augmenter le signal de détection.

La résolution spatiale dépend de la taille des cristaux injectés, et des propriétés du PET scan (distance du positron avant son annihilation avec un électron qui correspond à la perte du signal) La résolution spatiale est de 5mm chez l'homme et de 2 mm chez le petit animal en utilisant un microPET scan (Chatziioannou, Cherry et al. 1999). Le développement de nouvelles méthodes telles que HIDAC-PET permet d'avoir une résolution de l'ordre du millimètre. (Jeavons 1999)

De la même manière le SPECT est une méthode d'imagerie dépendante de l'agent de contraste qui utilise l'émission de rayon gamma des isotopes (^{133}Xe , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{123}I). Ces

isotopes lourds ont un temps de décroissance plus long (entre une heure et une journée) que ceux du PETscan. De plus, il est possible d'utiliser deux marquages simultanés (Labbe 2003). La sensibilité du SPECT est 10 à 100 fois plus faible que celui du PET (10-10M) et la résolution spatiale est également plus faible. Cependant, Le microSPECT peut être utilisé pour de petits animaux du fait du faible volume d'analyse avec une résolution de quelques millimètres. (MacDonald, Wang et al. 2001) Cette résolution diminue rapidement avec l'augmentation de la distance entre la source et le détecteur.

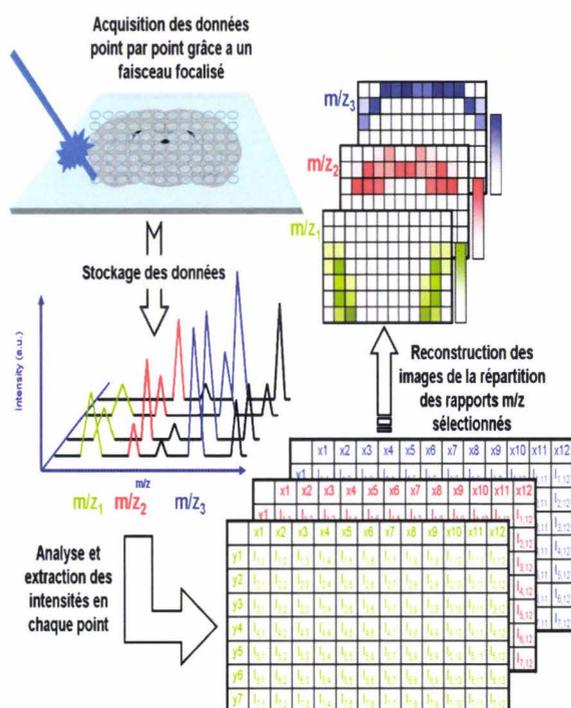
2.3.2. IMAGERIE MOLECULAIRE NON SPECIFICQUE:

2.3.2.1. L'imagerie par spectrométrie de masse : principe

Le principal but de l'imagerie MALDI par spectrométrie de masse (IMS) 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 spectrométrie de masse (SM), l'analyte doit être transféré en phase gazeuse et ionisé, puis les ions séparés sous vide pour être ensuite détectés. Pour cela, l'IMS 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 utilisées en IMS.

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 à 2 dimensions. L'intensité du signal sera représentée par une échelle de couleur permettant de recréer une image de la répartition de l'analyte dans l'échantillon (**Figure 20.a**)

a) Mode point par point



b) Mode microscope ionique

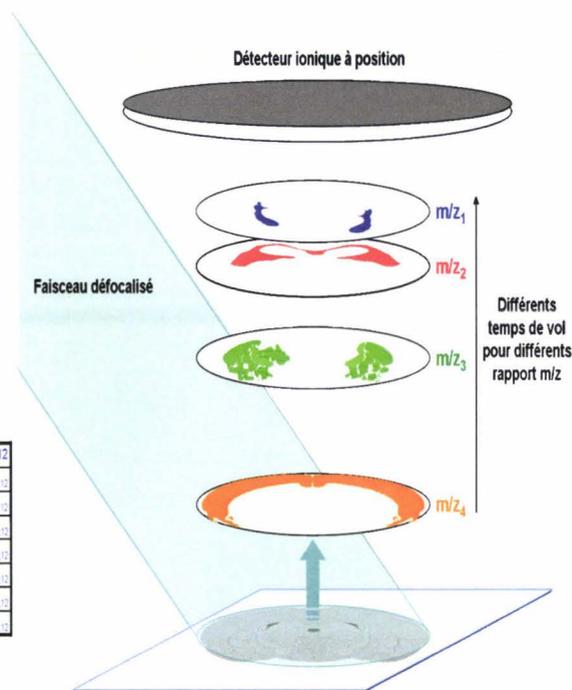


Figure 20. : Principe de l'ISM en mode (a) point par point et (b) microscope ionique.

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 20.b).

2.3.2.2. L'imagerie MALDI

2.3.2.2.1. Le MALDI

Introduites dans la seconde moitié des années 1980 par Hillenkamp et Karas (Karas and Hillenkamp 1988), les sources MALDI ont constitué l'une des révolutions de la spectrométrie de masse. Cette technique découle directement des méthodes de Désorption Laser (LDI) (Posthumus, Kistemaker et al. 1978). 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 (Tanaka, Waki et al. 1988) 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 (Karas, Bachmann et al. 1987) ont observé que l'utilisation d'un composé avec un groupement aromatique permet d'obtenir un signal de meilleure 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.

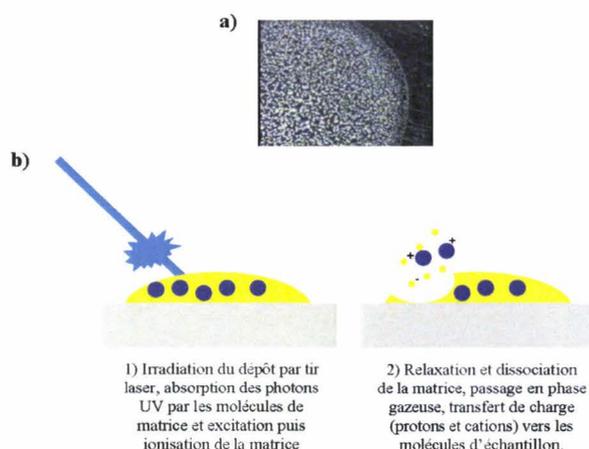


Figure 21. : Schéma de principe du MALDI

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.

Le MALDI repose donc sur l'utilisation d'un composé organique nommée matrice dont la propriété principale est d'absorber à la longueur d'onde du laser utilisé (Hillenkamp and Karas 1990; Hillenkamp, Karas et al. 1991). 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 incorporé l'analyte (**Figure 21**). 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 21**) 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 aux contaminants divers souvent présents dans les échantillons biologiques. Les ions formés sont principalement mono chargés, 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 {TOF, #608} 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.

2.3.2.2.2. 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) (Verbueken, Bruynseels et al. 1985; Verbueken, Van de Vyver et al. 1987; Van Vaeck, Van Espen et al. 1988; Eeckhaoudt, Van Vaeck et al. 1994; Bakker, Van Vaeck et al. 1996; Iancu, Perl et al. 1996; Van Vaeck, Poels et al. 1997). 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 révélée 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* (Jimenez, van Veelen et al. 1994). Par la suite de nombreuses études ont permis l'analyse de tissus d'origine variée ainsi que des études différentielles (Jimenez and Burlingame 1998; Jimenez, Li et al. 1998; Redeker, Toullec et al. 1998; Moroz, Gillette et al. 1999; Li, Garden et al. 2000; Rubakhin, Garden et al. 2000; Fournier, Day et al. 2003; Rubakhin, Greenough et al. 2003).

Dans le cadre de l'imagerie MALDI, les premiers travaux restent à l'initiative du groupe du PR. R. Caprioli (Caprioli, Farmer et al. 1997). 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 (Stoekli, Farmer et al. 1999).

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 microns 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 (Caprioli, Farmer et al. 1997). Pour minimiser la délocalisation des molécules pouvant être entraînée par les solvants, la méthode de micro-dépôt est de plus en plus utilisée (Schwartz, Reyzer et al. 2003). Le tableau 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 (Schwartz, Reyzer et al. 2003). Notre groupe a travaillé sur cette question et a développé de nouvelles matrices adaptées à l'analyse directe et l'IMS MALDI (Lemaire, Tabet et al. 2006). 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 **figure 20**

Tableau 1. Instruments pour l'application de matrice pour l'ISM MALDI

Nom	Constructeur	Méthode de dépôt	Taille de dépôt	Référence
Chemical inkjet printing (CHIP 1000)	Shimadzu Biotech	Piézo-électrique	200 μ m	(Patel, Goodacre et al. 2006)
TMiD	LEAP Technologies	Ejection par Nano-Pompe	200 μ m	(Deininger, Schürenberg et

				al. 2006)
MALDI-spotter Suncollect	SunChrom	Dépôt par un Capillaire	150 μm	(Lemaire, Desmons et al. 2006)
Portrait™ 630 Reagent Multi- Spotter	Labcyte Inc	Ejection acoustique	200 μm	(Aerni, Cornett et al. 2006)
NC	Siliflow	Piézo-électrique	300-600 μm	NC

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.

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. 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'IMS devient un outil de recherche couramment utilisé que ce soit dans le domaine public ou privé. L'avantage de l'IMS 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 sont 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.

2.3.2.2.3. Les méthodes dérivées de l'imagerie MALDI

D'autres techniques 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, **Figure 22**) et l'imagerie Stigmatique 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 (Spengler and Hubert 2002). Cet instrument est un hybride entre la technologie utilisée en LAMMA et le MALDI classique (**Figure 22**). 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

secondary ion mass spectrometry (SIMS), des images d'une grande résolution spatiale sont obtenues mais avec une faible gamme de masse.

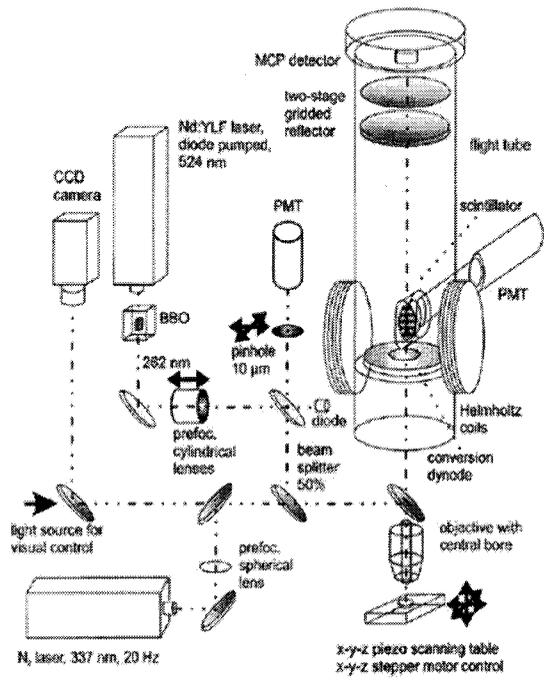


Figure 22. : Principe du SMALDI d'après (Spengler and Hubert 2002)

Parmi les développements instrumentaux de l'imagerie MALDI, un autre concept d'imagerie est proposé par le groupe de R.M. Heeren (Luxembourg, Mize et al. 2004). 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 20). 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.

2.3.2.2.4. Applications

En parallèle à ces développements méthodologiques, différentes applications de l'analyse directe des tissus et de l'IMS 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 (Chaurand, Stoeckli et al. 1999). 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 des 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 (Todd, Schaaff et al. 2001), l'étude d'adénocarcinome de prostate sur des modèles PCA avec différenciation des cellules neuroendocriniennes (Masumori, Thomas et al. 2001), l'analyse de la répartition des peptides β -amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie d'Alzheimer (Stoeckli, Staab et al. 2002), des études sur des tissus d'épididyme de souris et des biopsies de cancer du sein (Chaurand, Schwartz et al. 2002), à l'étude des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson (Pierson, Norris et al. 2004), pour l'application par utilisation conjointe de méthodes de clustering à l'étude de modèles souris présentant des tumeurs du cerveau (Chaurand, Sanders et al. 2004) et de tumeurs primaires du cerveau (Schwartz, Weil et al. 2004).

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 (Troendle 1999; Chaurand, Fouhecourt et al. 2003; Rohner, Staab et al. 2005). Il faut également noter

quelques études récentes sur l'imagerie MALDI de lipides dans les tissus (Rujoi, Estrada et al. 2004; Jackson, Wang et al. 2005; Jackson, Wang et al. 2005).

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 (Stoeckli, Chaurand et al. 2001; Todd, Schaaff et al. 2001; Chaurand and Caprioli 2002; Rubakhin, Greenough et al. 2003; Luxembourg, McDonnell et al. 2005; Rubakhin, Jurchen et al. 2005; Chaurand, Norris et al. 2006; Hummon, Amare et al. 2006).

2.3.2.3. L'imagerie SIMS

2.3.2.3.1. Principe du SIMS

Cette technique repose sur le bombardement de l'échantillon par un faisceau d'ions mono/poly-atomiques ou sous forme de cluster (agrégats) d'ions (**Figure 23**) 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.

2.3.2.3.2. 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 (Castaing and Slodzian 1962).

Le SIMS peut fonctionner suivant différents modes. En mode classique (SIMS dynamique), 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) (Troendle 1999; Van Vaeck, Adriaens et al. 1999), les dommages

généérés à la surface du matériau seront pratiquement restreints à la première couche de matériau permettant une analyse de surface (Belu, Graham et al. 2003). Le SIMS statique est bien adapté à la réalisation d'images (Pacholski and Winograd 1999; Todd, Schaaff et al. 2001). 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 (Colliver, Brummel et al. 1997). 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.

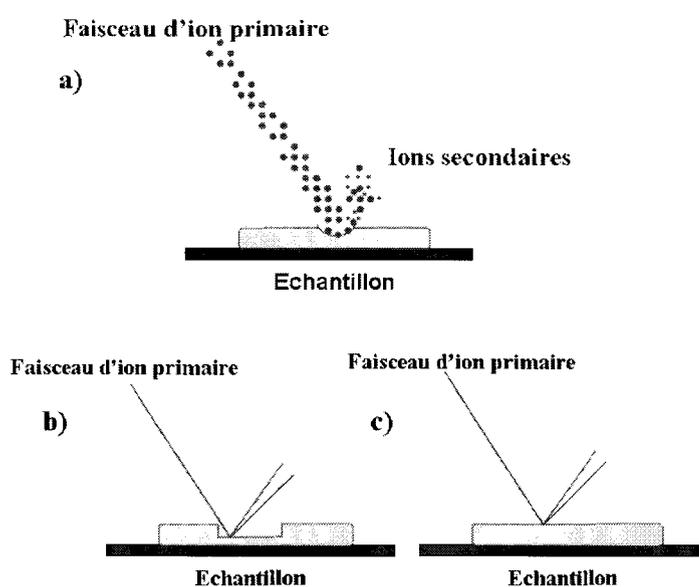


Figure 23. a) Principe d'ionisation SIMS et fonctionnement en mode (b) dynamique et (c) statique

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 (Todd, Schaaff et al. 2001; Touboul, Kollmer et al. 2005). 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) (Szymczak and Wittmaack 2002), l'utilisation de source d'agrégats comme ions primaires incidents (Townes, White et al. 1999; Weibel, Wong et al. 2003; Touboul, Piednoel et al. 2004; Brunelle,

Touboul et al. 2005) ou la réalisation d'un dépôt métallique en surface de l'échantillon (MetA-SIMS : metal-assisted-Secondary Ion Mass Spectrometry)(Delcorte, Bour et al. 2003; Altelaar, Klinkert et al. 2006). 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.

2.3.2.4. Les autres méthodes 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'IMS MALDI a vu le jour. En 10 ans, plus d'une dizaine d'autres techniques utilisant la spectrométrie de masse pour l'imagerie ont été développées. Parmi toutes ces techniques, deux classes peuvent être distinguées :

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

2.3.2.4.1. 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 (May, Wiedmeyer et al. 1999). Cette technique a été améliorée par la suite grâce au couplage avec un laser (Laser Ablation ICP MS (LA-ICP MS)(Kindness, Sekaran et al. 2003). Cette méthode permet d'obtenir la répartition d'ions monoatomiques. Elle peut par exemple être utilisée en parallèle de l'IMS MALDI pour localiser un médicament incluant un composé métallique. L'IMS MALDI va suivre la répartition du médicament dans le tissu tandis que l'approche LA-ICP MS va localiser et quantifier le composé métallique.

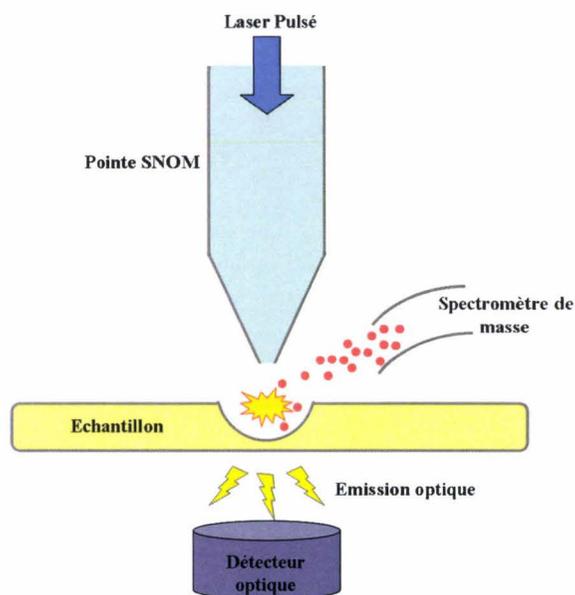


Figure 24. Schéma du SNOM

En 2001, R. Zenobi utilise également l'ablation laser pour scanner des surfaces. Ce procédé, le scanning near-field optical microscopy mass spectrometry (SNOM-MS) (Zenobi and Deckert 2000; Stockle, Setz et al. 2001), utilise une pointe couplée à un laser UV. La pointe permet la réalisation d'images topographiques de la surface de l'échantillon (**Figure 24**). 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, ont été développés respectivement en 2002 et en 2004. Dans les développements plus particuliers de l'IMS MALDI, sont également d'un intérêt tout particulier, les travaux réalisés par A. Woods et collaborateurs (Novikov, Caroff et al. 2004; Tempez, Ugarov et al. 2005). 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'Or dans les tissus par irradiation du tissu avec le faisceau d'ions primaires d'une source Or. 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) (Kruse, Rubakhin et al. 2001) 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 restant à l'heure actuelle particulièrement mal connus.

2.3.2.4.2. 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 (Ford and Van Berkel 2004). 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.

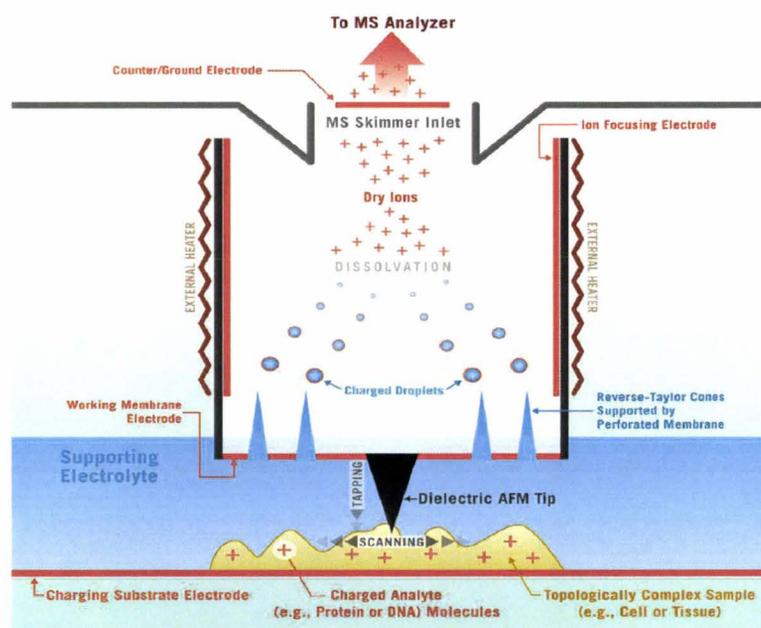


Figure 25. : Principe du SMS d'après (Fedorov and Degertekin 2006)

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 (Fedorov and Degertekin 2006). 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 25).

En 2004, Graham Cooks présente une nouvelle source de production des ions : Desorption ElectroSpray Ionization (**DESI**) (Takats, Wiseman et al. 2004). Dans cette source, un solvant va être propulsé à travers un capillaire sous haute tension vers la surface de l'échantillon (**Figure 26**). Les gouttelettes chargées vont rebondir en emportant des molécules de la surface.

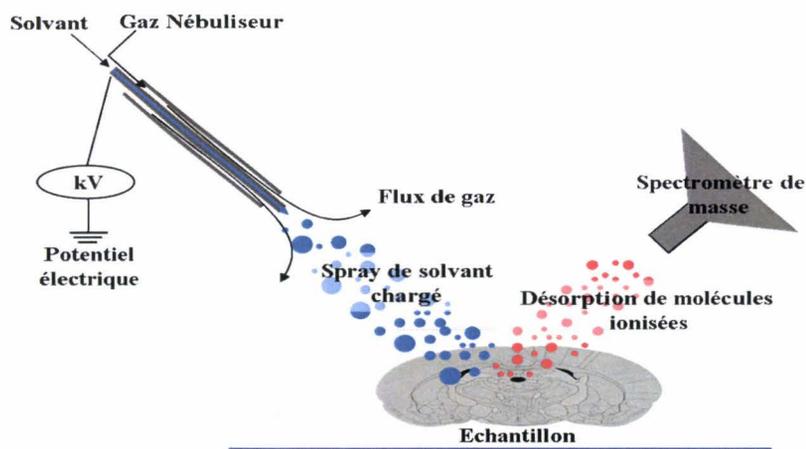


Figure 26. Principe du DESI

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 (Takats, Wiseman et al. 2005). Par la suite, il a été démontré la possibilité de suivre des composés alcaloïdes au sein de tissus végétaux (Talaty, Takats et al. 2005). Grâce à l'automatisation du déplacement du support de l'échantillon, des plaques de chromatographie ont pu être analysées (Van Berkel, Ford et al. 2005). 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 (Wiseman, Puolitaival et al. 2005). Cette technique ouvre la voie à une analyse directe voire une imagerie de surface de tissu *in-vivo* puisqu'elle n'est que peu destructrice et ne nécessite pas de préparation pour l'échantillon. Evolution directe de cette technique, le **JEDI** (Jet Desorption ionization) utilise un jet de solvant à autre pression et permet une analyse en profondeur de l'échantillon (Takats, Katona et al. 2006) (**Figure 27a**).

Figure 27. Principe des sources (a) JEDI et (b) DAPCI

Une autre technique nommée Desorption Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (**DAPCI**) (Takats, Cotte-Rodriguez et al. 2005) 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 27b**). 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**) (Cody, Laramée et al. 2005). Ce procédé utilise un gaz ayant un haut potentiel d'ionisation (généralement de l'hélium) sur lequel un potentiel électrique est appliqué (**Figure 28a**). 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 (Williams, Patel et al. 2006).

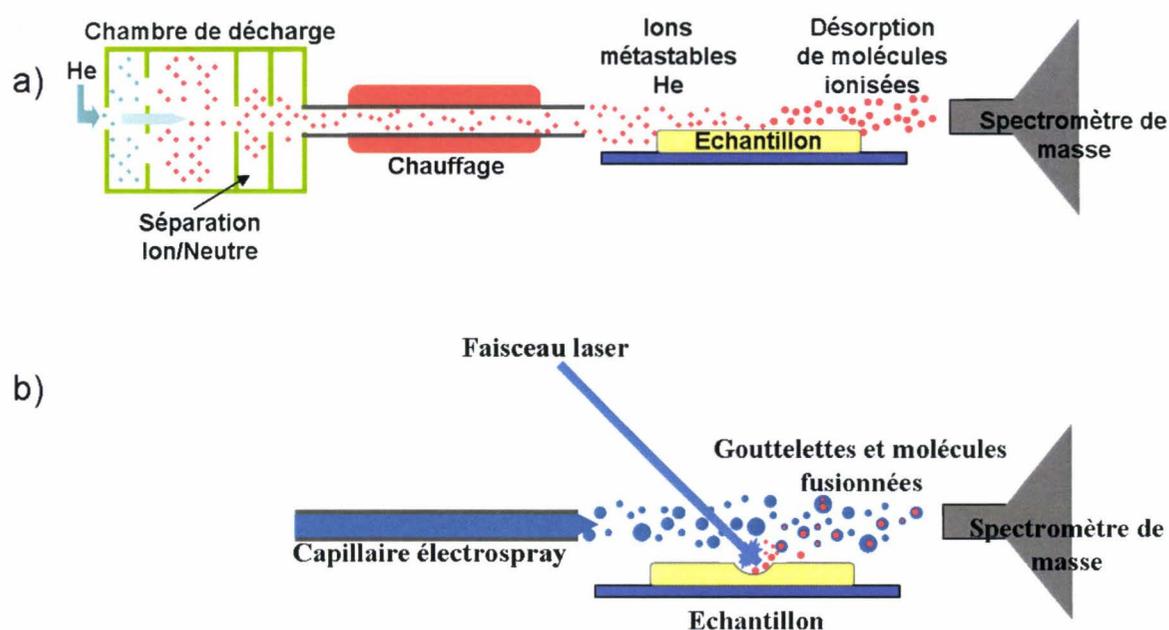


Figure 28. Principe des sources (a) DART et (b) ELDI

Enfin une technique a essayé de coupler l'ESI et la désorption laser: l'électrospray-assisted laser desorption/ionisation (Huang, Hsu et al. 2006). 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 28b**).

L'ensemble de ces techniques en tenant compte de la gamme de masse et de la résolution est présenté dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. : Récapitulatif des techniques d'ionisation utilisées en spectrométrie de masse

Source d'ionisations	Gamme de masse	Résolution spatiale	Référence
SIMS	m/z<2000	De 100nm à 10µm	(Castaing and Slodzian 1962)
IMS MALDI	0-1 000 000	25-200µm	(Caprioli, Farmer et al. 1997)
ICP MS	m/z<500	/	(May, Wiedmeyer et al. 1999)
DIOS	m/z<5000	Cellules isolées	(Kruse, Rubakhin et al. 2001)
SNOM-MS	/	50 nm à 1µm	(Zenobi and Deckert 2000)
SMALDI	m/z<2000	500nm à 10µm	(Spengler and Hubert 2002)
LA-ICP-MS	m/z<1000	40 à 100µm	(Kindness, Sekaran et al. 2003)
Microscope MALDI	5- 100 000	<5 µm	(Luxembourg, Mize et al. 2004)
ESI-MS	m/z<1000	> 300µm	(Ford and Van Berkel 2004)
MILDI	5-10 000	100 µm	(Novikov, Caroff et al. 2004)
DESI	m/z<2000	500µm	(Wiseman, Puolitaival et al. 2005)
JEDI	m/z<5000	1µm	(Takats, Katona et al. 2006)
ELDI	5-100 000	150µm	(Huang, Hsu et

			al. 2006)
SMS	NC	NC	(Fedorov and Degertekin 2006)

2.4. CONCLUSION

L'imagerie est regroupée sous trois classes : les méthodes morphologiques qui vont compléter les méthodes d'imagerie dites fonctionnelles qui sont caractérisées par les méthodes spécifiques (IRM, TEP scan, DOT, fNIR) et les méthodes d'imagerie moléculaire (MS). (Figure 29)

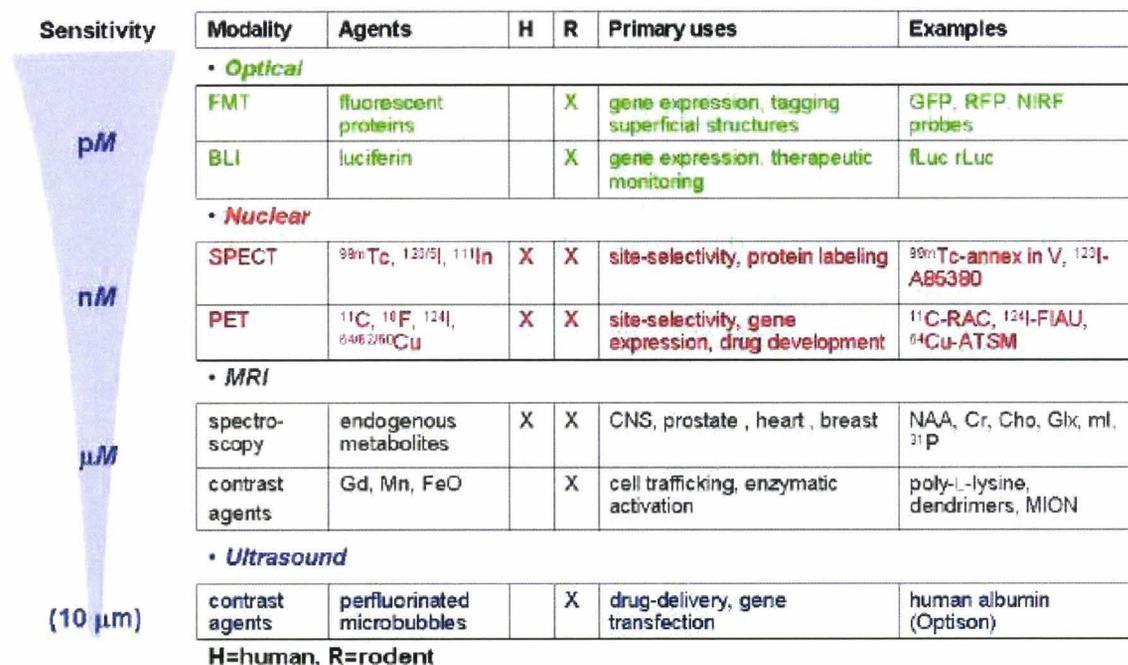
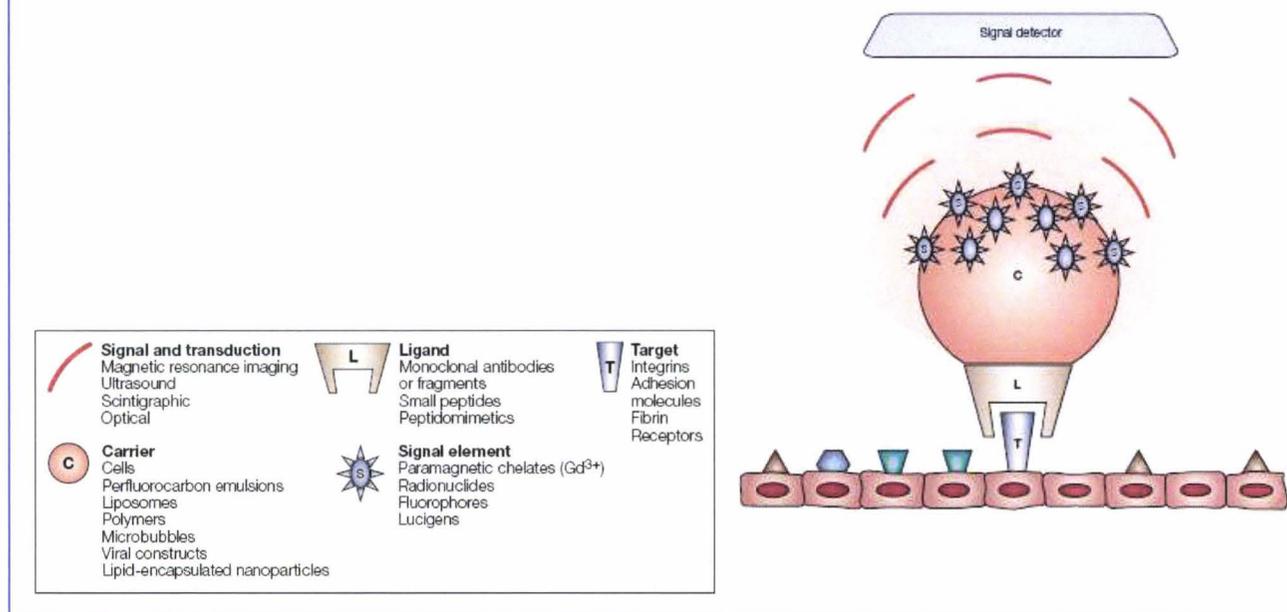


Figure 29. : Présentation de l'ensemble des méthodes d'imagerie avec les sensibilités et leurs applications

Les sondes pour l'imagerie spécifique consistent essentiellement en deux composantes : une sonde ayant une affinité pour une molécule d'intérêt et un moyen sensible de la détecter. La cible peut être un récepteur, un marqueur de surface, une protéine ou enzyme, de l'ADN et ARN. La spécificité est un critère important dans la mise en place du ligand qui peut être radioactif (TEP), fluorescent, un fluorochrome (imagerie optique) ou un agent de contraste (gadolinium, xénon IRM) (Figure 29).

Il est nécessaire d'ajouter un lien entre les parties sonde et traceur pour éviter la perte d'affinité entre le ligand et son substrat, et la diminution de la spécificité si importante de la molécule traceuse. Il est parfois nécessaire d'ajouter des molécules plus ou moins hydrophiles pour faciliter la solubilité. Tout ce procédé demande des connaissances sur la nature de la cible cellulaire, la chimie de synthèse de molécule.

Figure 30. Model générique de cible-sonde pour l'imagerie spécifique moléculaire. Le ligand ayant une forte spécificité se fixe au substrat, et cet ensemble est localisé par l'intermédiaire d'une pièce rapporteur. (Choudhury, Fuster et al. 2004)



Il y a des limites et des inconvénients à l'imagerie moléculaire fonctionnelle spécifique utilisant des sondes ou traceurs. Chaque sonde doit être repensée, et re-synthétisée pour chaque cible cellulaire que ce soit une protéine, un récepteur, ou de l'ADN. Le nombre de cibles est limité et la sensibilité de la méthode d'imagerie choisie peut être insuffisante. Il est de plus difficile de connaître l'effet de l'interaction de la molécule exogène sur l'organisme et sur le phénomène étudié. En effet, il est envisageable que cette molécule joue un rôle (effet d'interaction avec le milieu cellulaire) qui modifie l'objectivité de l'analyse. C'est pourquoi, il est nécessaire de coupler ces méthodes à des méthodes d'imagerie *in vitro* dont l'action de molécules rapporteuses n'a plus d'effet physiologique.

L'imagerie Moléculaire que l'on retrouve avec la spectrométrie de masse est beaucoup plus simple à mettre en place que l'imagerie spécifique fonctionnelle et permet d'atteindre un niveau d'information beaucoup plus élevé, avec une quantité de molécule détectée beaucoup plus grande (facteur 500-1000) (**Figure 31**)

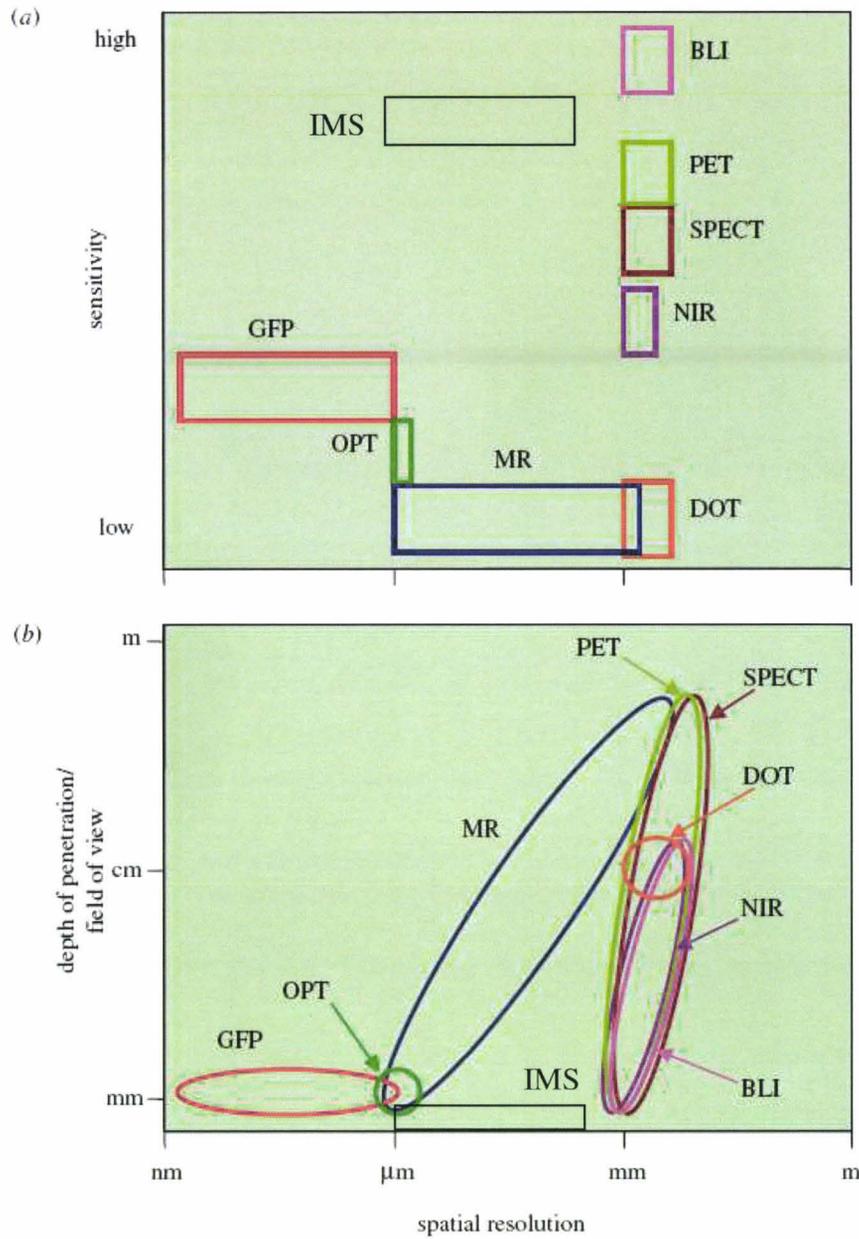


Figure 31 Résolution spatiale des différentes méthodes d'imagerie

Cet avantage permet au spectromètre de masse de devenir un atout important en imagerie moléculaire. Le nombre de publication montre bien cette progression durant les 10 dernières années. (Figure 32)

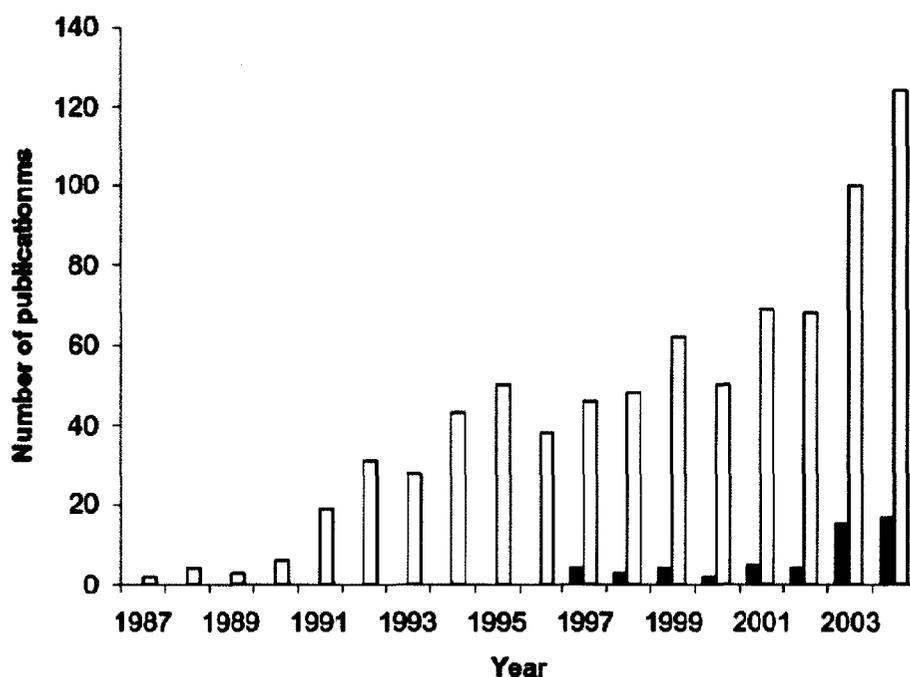


Figure 32. Représentation du nombre de publications des méthodes d'imagerie en spectrométrie de masse (blanc) et de l'imagerie MALDI (noire)

Cependant, l'utilisation de la spectrométrie de masse *in vitro* est un élément important qui montre que c'est une méthode innovante et intéressante qui doit être complétée par d'autres méthodes d'imagerie *in vivo* telle que l'IRM ou le TEP/CT scan. L'imagerie moléculaire est un atout pour la compréhension de processus biologique, d'étude dynamique et de mise en place thérapeutique avec des perspectives moléculaires. Le développement d'outils de traçabilité moléculaire est en plein développement. Toutes les méthodes que nous avons pu étudiées en sont des exemples frappants. Les limites de chaque approche que ce soit la résolution spatiale, la sensibilité, le temps d'acquisition sont déterminants dans le choix de la méthode (**Figure 31**). Il semble judicieux actuellement de bien définir la méthode d'imagerie à utiliser en fonction du sujet mis en place. Le travail de cette thèse a été dans ce contexte de développer l'imagerie MALDI pour de nouvelles utilisations et d'appliquer ces avancées dans la recherche de biomarqueurs dans le cancer des ovaires et la maladie de Parkinson. Nous avons apporté de nouvelles solutions comme la synthèse de traceurs pour l'imagerie spécifique par spectrométrie de masse appelés Tag-mass (**Chapitre 3**) ayant une spécificité et une sensibilité bien supérieure aux méthodes décrites précédemment. Ce traceur peut ainsi être utilisé en imagerie spécifique par spectrométrie de masse ou comme traceurs permettant de quantifier des molécules en solutions (**chapitre 4**).

CHAPITRE 3. Un nouveau concept d'imagerie Spécifique par spectrométrie de masse

3.1. Introduction

Comme précédemment observé l'ensemble des techniques d'imagerie nucléaire, magnétique, spectroscopique ou spectrométrique ont une capacité à mettre en évidence la fonctionnalité d'un organe. L'imagerie par spectrométrie de masse visualise jusqu'alors les molécules protéiques ou lipidiques sans toutefois pouvoir analyser des composés d'acides nucléiques, ou de très grosses protéines telles que les protéines membranaires.

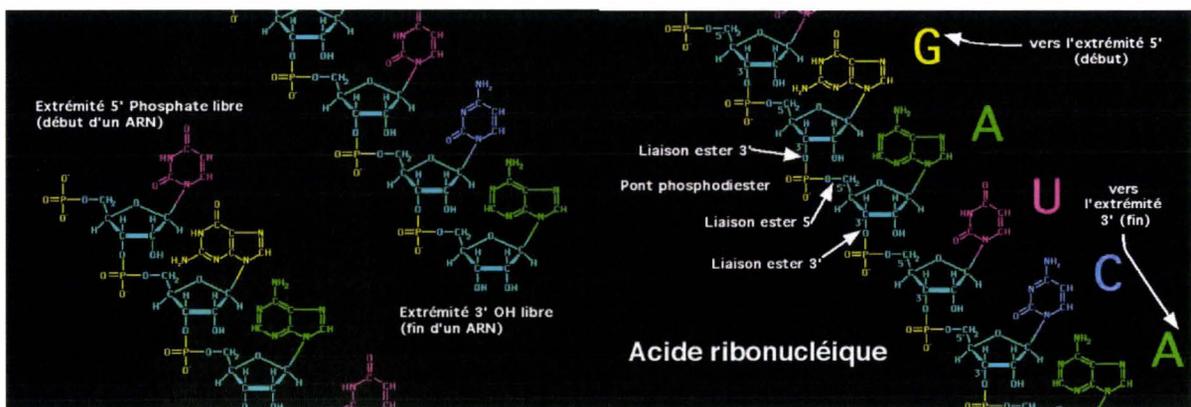


Figure 33. Présentation de la structure chimique d'un Acide Ribo Nucléique

L'étude des oligonucléotides par spectrométrie de masse et notamment par MALDI reste de manière générale assez complexe. Une première difficulté d'analyse est liée aux groupements phosphates présents dans les enchaînements d'oligonucléotides (Figure 33) entraînant des échanges de protons de ces groupements avec les sels présents dans l'environnement (Na^+ et K^+ notamment). Ces échanges génèrent des espèces fortement cationisées, et donc des distributions complexes conduisant à une très forte baisse de la résolution. Une utilisation de co-analytes existe comme le citrate d'ammonium afin de dessaler et de conditionner les molécules pour l'analyse. (Kirpekar, Nordhoff et al. 1994)

La seconde difficulté réside dans la faible stabilité des bases en phase gazeuse à l'intermédiaire de l'appareil ; des études montrent que la protonation de la base conduit à la

formation d'espèces ayant tendance à se fragmenter pendant l'analyse. Par conséquent, la sensibilité et la résolution sont fortement diminuées. Cette instabilité est proportionnelle à la taille de la séquence oligonucléotidique et au nombre de guanosines présents dans la séquence (Banoub, Newton et al. 2005). De manière générale, un oligonucléotide de 13 bases peut être détecté à une quantité de 3 à 5 fmol, alors qu'une quantité de 1 à 30 pmol est nécessaire pour une séquence de 30 paires de bases (Kirpekar, Nordhoff et al. 1998). Même si les études sur les ARNm montrent une meilleure stabilité de ces molécules en phase gazeuse, il est très difficile de détecter une molécule d'ARNm de plus de 40 bases.

Pour palier à ces lacunes, notre travail a été de développer par l'intermédiaire d'une molécule que nous avons appelé Tag-Mass, l'imagerie des ADN, ARN et de grosses protéines plus spécifiquement du transcriptome et du protéome. Cette approche permet alors de cibler spécifiquement ces molécules et d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche et de validation de biomarqueurs par spectrométrie de masse.

3.2. Le concept de Tag-Mass

Le Tag-Mass est une molécule photoclivable à la longueur d'onde du laser contenant deux parties distinctes : le ligand et le rapporteur. La molécule sous certaines conditions se fixe sur un substrat spécifique par l'intermédiaire de son ligand. Il est nécessaire d'avoir pour cette partie une affinité très forte avec le substrat. On utilise alors soit un anticorps soit une sonde complémentaire d'ADN ou d'ARNm. La seconde partie va être libérée par le tir laser lors de l'imagerie MALDI et être ainsi détectée par l'analyseur. Cette seconde pièce peut être une molécule organique ou un peptide connue. L'image sera reconstruite par l'intermédiaire du logiciel d'imagerie en recherchant la masse précise du rapporteur. Cette approche généraliste permet d'utiliser de nombreux Tag-mass pour différents spectromètres de masse, et de nombreuses approches transcriptomique, Protéomique. En effet, il est envisageable d'utiliser des anticorps, des aptamers, des sondes ARN ou ADN comme pièce ligand pour cibler de nombreux marqueurs, et de les combiner avec différentes pièces rapporteuses (Figure 34).

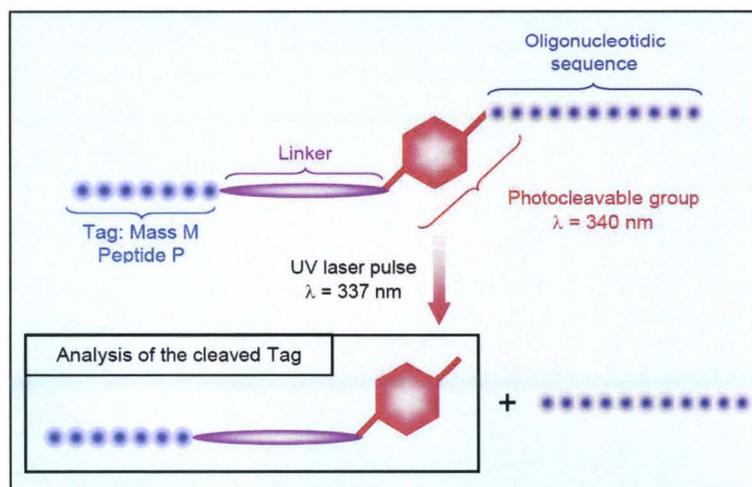


Figure 34. Présentation du concept de Tag-mass, et de son clivage

Ces rapporteurs sont définis en fonction du spectromètre de masse utilisé. Pour le MALDI une matrice permettant la cristallisation est envisageable comme un peptide de petite taille facilement détectable. Dans le cas du SIMS par exemple, il sera plus judicieux d'utiliser le brome facilement détectable.

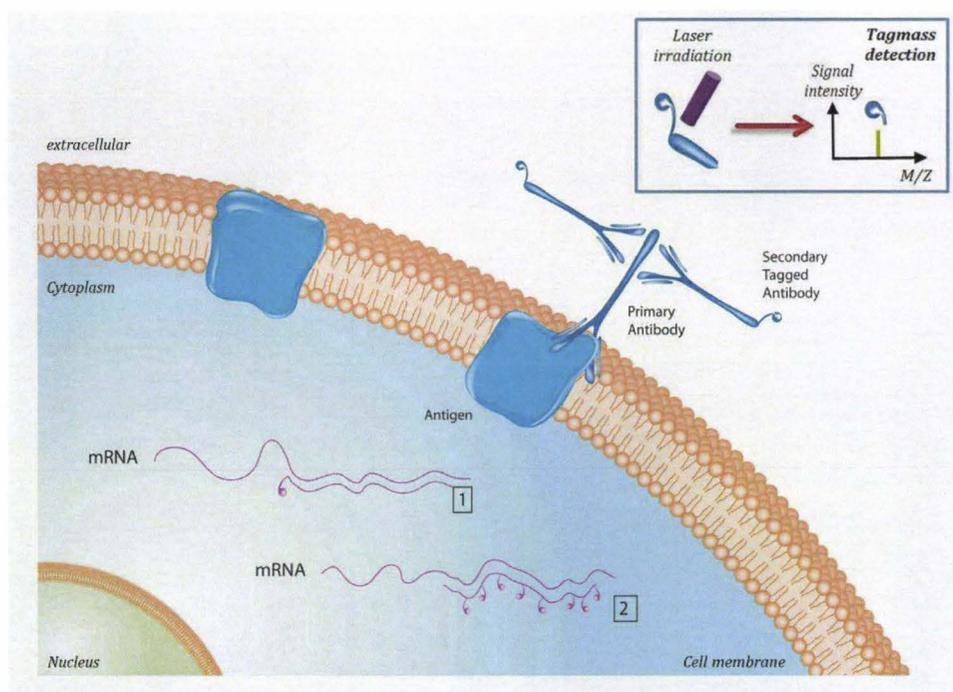
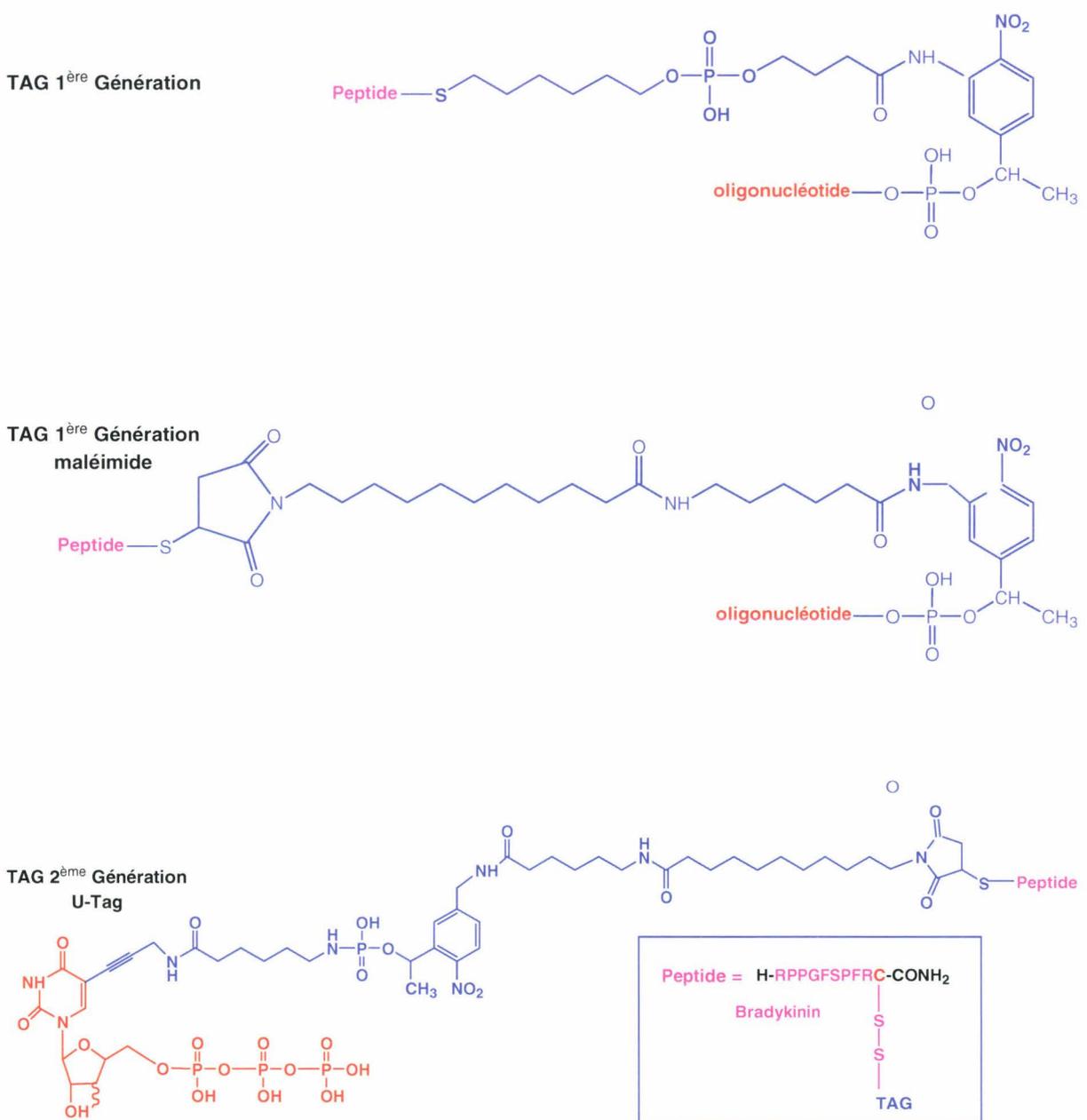


Figure 35. Schéma d'utilisation du Tag-mass en imagerie spécifique MALDI

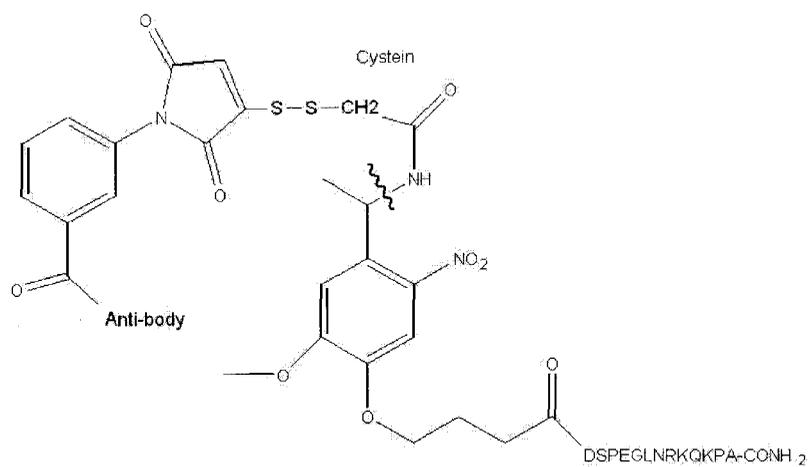
En collaboration avec la société Eurogentec avec qui nous avons développé la synthèse de la molécule, nous avons testé deux types de Tag-mass (Figure 35). Le premier étant un oligonucléotide marqué avec le lien photoclivable et un peptide comme rapporteur. Le second Tag-mass est une molécule d'anticorps sur lequel est fixé le lien photoclivable et

un peptide rapporteur. (**Figure 36**) Le premier se décrit sous trois évolutions afin de gagner en sensibilité. Le second est un anticorps secondaire dirigé contre les protéines de lapin. Le travail a été de mettre en place les protocoles afin de pouvoir utiliser ce Tag-mass dans la validation de biomarqueurs d'intérêts. L'ensemble des essais a été publié et des applications ont eu lieu dans un exemple de validation du biomarqueur REG α dans le cancer de l'ovaire. (**Chapitre 5**)

Figure 36. Composition chimique des différents Tag-mass synthétisés



Anticorps Tag-mass.



3.3. Résultats : Publication

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

R. Lemaire,^{†,#} J. Stauber,^{†,#} M. Wisztorski,[†] C. Van Camp,[†] A. Desmons,[†] M. Deschamps,[‡]
G. Proess,[‡] I. Rudlof,[‡] A. S. Woods,[§] R. Day,^{||} M. Salzet,[†] and I. Fournier^{†,*}

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, MALDI Imaging Team, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Société EUROGENTEC, Eurogentec Biologics Department, LIEGE Science Park, Rue Bois Saint-Jean 14, 4102 Seraing, Belgium, NIDA IRP, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland 21224, and Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec J1H 5N4, Canada

Received January 2, 2007

MALDI tissue imaging of tissues has become a promising technique for tracking biomarkers while determining their location and structural characterization. We have now developed specific targeting probes (oligonucleotides, antibodies), named Tag-Mass. This approach is based on probes modified with a photocleavable linker coupled with a tag cleaved and detected using mass spectrometry. Tag-Mass development is the key for a rapid, sensitive, and accurate approach to correlate levels of expression of different mRNA or proteins in diseases.

Keywords: MALDI • specific tissue imaging • Tag-Mass • photocleavage • multiplex • transcriptome • proteome

Introduction

MALDI imaging is a novel and powerful tool for direct detection and localization of biomolecules.^{1–6} Developments in this field have led to the study and anatomical localization of drugs, lipids, peptides, and proteins in tissue sections.^{3–8} This method eliminates time-consuming and work-intensive steps such as extraction, prepurification, or separation.

Many successful applications of this technique have been undertaken recently. Of particular interest, the application of MALDI imaging to the direct analysis of diseased tissues to hunt for specific biomarkers.^{4,9}

Biological processes include different signaling pathways that involve all different classes of molecules from oligonucleotides, to proteins, peptides, and lipids. In particular, correlation of mRNA with their corresponding protein, or more generally of transcriptome with proteome, is of special interest for better understanding of mechanisms or earlier diagnosis of pathologies. However, some specific classes of biomolecules such as oligonucleotides or sugars are still non or hardly accessible to direct analysis of tissues by MALDI, as are also very hydrophobic proteins, membrane proteins, high mass proteins (>30 kDa), or lower abundance ones.^{2,4–6,9,10} Ideally, oligonucleotides should be directly detected from tissues; however, their large size and low abundance in cells, added to analytical difficulties in mass spectrometry^{11,12} because of phosphates groups that

lead to extensive salt adducts and high instability of species in the gas phase, render this impossible. If direct detection of mRNA in tissues is not possible, one should find a way for developing indirect detection.

We, thus, proposed a new concept for indirect detection of mRNA that can also be used and extended to other biomolecules. This concept relies on the use of a specific probe design to match a specific target with indirect detection of the probe by mass spectrometry. This concept of indirect detection could be called specific MALDI imaging or “Tag-Mass” concept.

The Tag-Mass Concept: From Indirect Detection of Photocleaved Tags to Images of the Tissue Distributions of mRNAs and Proteins. The “Tag-Mass” strategy is based on the indirect detection of a probe *via* a reporter group or “Tag-Mass” indicator added to the probe that is a small molecule of known mass easily detectable by the mean of MALDI mass spectrometry and which is released just before detection step. Here, we designed probes carrying their “Tag-Mass” through a photocleavable linker, chosen to present a specific absorption band in the UV at a wavelength (340 nm) very closed to that of MALDI lasers (i.e., 337–355 nm). Thus, the analysis of the probe-Tag-mass system results in the release of the tag molecule through laser irradiation and classical detection by MALDI (Figure 1A). Tagged photocleavable linkers can be chemically attached to different classes of probes such as DNA, cDNA, single stranded cRNA, or antibody probes. They can then be used in conjunction with classical tissue-specific molecular targeting using either hybridization methods for oligonucleotides with *In Situ* Hybridization¹³ (ISH) or paratope-epitope interaction with immunohistochemistry (IHC) approach for antibody probes.¹⁴

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: isabelle.fournier@univ-lille1.fr

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille.

[#] Authors contributed equally.

[‡] Société EUROGENTEC.

[§] National Institutes of Health.

^{||} Université de Sherbrooke.

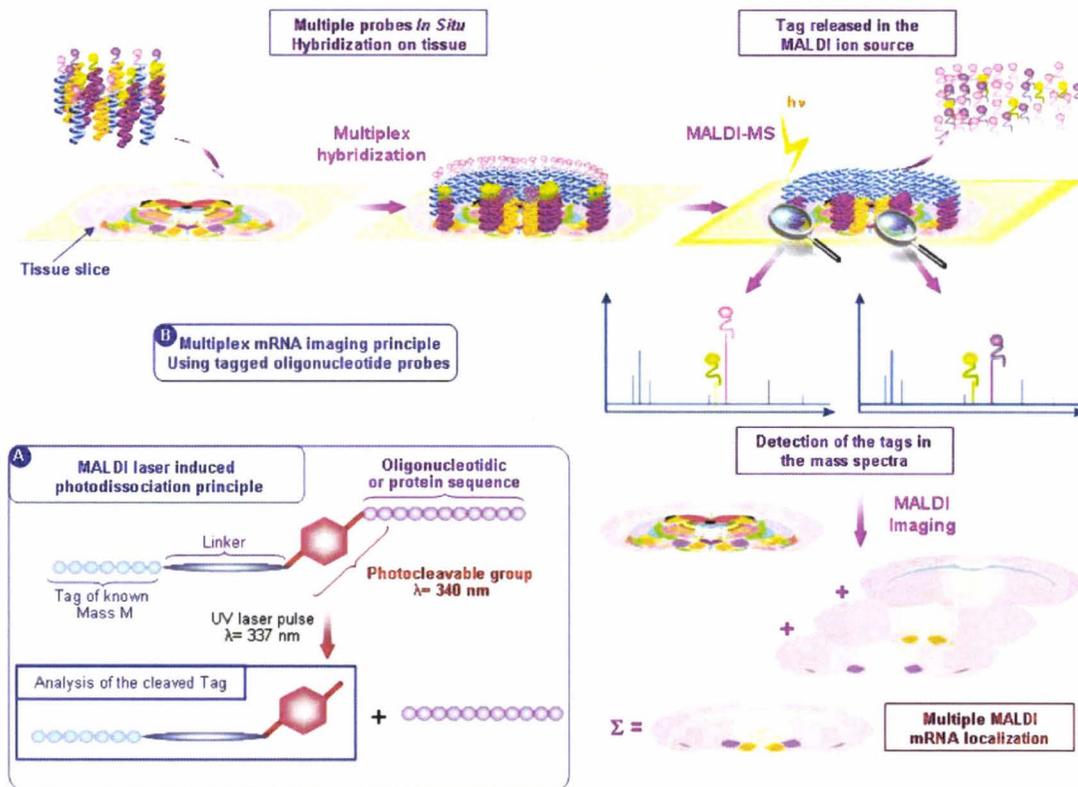


Figure 1. (A) Schematic representation of the concept of MALDI imaging of mRNA using tagged oligonucleotide probes for detection by photocleavage. (B) Scheme of the photocleavable linker/tag system for indirect detection after photodissociation under the MALDI UV laser wavelength.

In MALDI, material ejection is promoted by laser irradiation and restricted to the area where the laser beam impacts the sample surface. The mass spectrum reflects the molecular composition of the tissue in this specific site. In the case of mRNA, if the tagged oligonucleotide probe hybridizes to its complementary mRNA sequences, then laser irradiation will photocleave the linker, inducing tag release and leading to the characteristic signal of the tag in the resulting mass spectrum. At positions where no target mRNA are present, the characteristic signal for the tag will not be observed since no hybridization had occurred. Thus, as in standard MALDI imaging, scanning the tissue section in a point-to-point mode, we can obtain images of mRNAs indirectly by reconstructing the molecular image of the tag molecule on the basis of its mass signal mass data (Figure 1B). The same strategy can be adapted for mapping target proteins using tagged antibodies in combination with IHC experiments. For antibodies, preference was given to use indirect IHC with a primary-secondary antibody system. Indeed, indirect IHC is known to present better performances by decreasing steric obstruction problems and increasing detection level, since secondary antibodies will recognize consensus epitope present in the primary antibody sequence allowing attachment of several secondary antibodies. Moreover, secondary antibodies are easier to produce since they require much less specificity. Thus, by chemically modifying secondary antibodies by adding a photocleavable linker and a tag, image reconstruction on the base of tag signal give the studied protein image.

Here, we report the proof that such a new concept can work, with good sensitivity, both for mRNA and proteins using a peptide as tag molecule.

A specific tagged antibody can be used for indirect 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 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 sections using MALDI MS will allow indirect detection of the protein by monitoring the tag in the mass spectra. As for oligonucleotides, multiple different protein-specific images can be obtained by MALDI in one experiment by using directly tagged primary antibodies with different peptides or secondary antibodies developed in different animal species.

Inherent in this approach to specific molecular imaging of mRNA and proteins are the sensitivity and multiplex possibilities of mass spectrometry. It should be of great interest for transcriptome/proteome co-localization mapping, and will find application when and where co-locating a protein and its corresponding mRNA are important. It should give evidences of the heterogeneity of distribution of localized transcriptional regulation of a specific transcript compared to its corresponding protein level.

Materials 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 were. The amino acids and the 4-[4-[1-(Fmoc-amino)ethyl]-2-methoxy-5-nitrophenoxy]butanoic acid (photocleavable linker) were purchased from Novabiochem; the *N*-methylmorpholine (NMM), the *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCDI), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDAC), and the *N,N'*-diisopropylethylamine (DIPEA) from Aldrich; the trifluoroacetic acid and the 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate/*N*-hydroxybenzotriazole (TBTU) from Biosolve; the goat anti-rabbit IgG and the PD 10 (G 25 resin column) from Sigma; and the 3-maleimidobenzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) from Pierce.

Peptide Tagged Photocleavable Molecules Synthesis. 1. Photocleavable Tagged Oligonucleotide. The peptide is synthesized on Symphony (Protein Technologies, Inc.) and purified on a Delta-Pak C18, 15 μm , 100 \AA column (Waters). The oligonucleotide is synthesized from 3' to 5' on Expedite (Applied BioSystem). The amine function with photocleavable linker is added in the 5' region before cleavage and deprotection. These steps are performed using a 28% NH_4OH solution during 24 h in the dark. The amino oligonucleotide is then purified on a Delta-Pak C18, 15 μm , 300 \AA column (Waters). The amino function of the oligonucleotide is coupled with a heterobifunctional reagent comprising a maleimide function. The maleimido oligonucleotide is solubilized in water and added to a 1.2 equiv of peptide in solution. The mixture is stirred for 16 h. The oligo-peptide conjugate is then purified on a Delta-Pak C18, 15 μm , 300 \AA column (Waters) and characterized using MALDI-MS (see Mass Spectrometry section).

2. Photocleavable Tagged Antibody. Peptides were custom-made by Eurogentec S.A. using solid-phase peptide synthesis (SPPS) on a 0.25 mmol scale using Fmoc (9-fluorenylmethylloxycarbonyl amino-terminus protection) standard synthesis protocols (4 equiv of Fmoc-AA) with double coupling reactions (twice 40 min) using TBTU/NMM which has activator on a Symphony (Rainin Instrument Co., Woburn, MA) synthesizer. The photocleavable linker (4 equiv) was introduced manually using DIPCDI/DIPEA (2 h) as activator. Purifications were performed by RP-HPLC on a Waters (Milford, MA) Delta-Pak C18 [15 μm , 100 \AA , 25 mm \times 100 mm] column using a Waters liquid chromatography system consisting of Model 600 solvent delivery pump, a Rheodine injector, and a automated gradient controller (Solvent A, $\text{H}_2\text{O}/0.125\%$ TFA; Solvent B, $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA, Gradients, 5–15% to 30–60% B in 20 min). Detection was carried out using Model M2487 variable wavelength UV detector connected to the Waters Millennium software control unit. The Quality Control was performed by analytical RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 [5 μm , 100 \AA , 150 mm \times 3.9 mm] column (Solvent A, $\text{H}_2\text{O}/0.125\%$ TFA; Solvent B, $\text{CH}_3\text{CN}/0.1\%$ TFA. Gradient, 100% A to 60% B in 20 min) using a Waters Alliance 2690 Separation Module equipped with a Waters 996 Photodiode Array Detector and a MALDI-TOF MS (see Mass Spectrometry section).

The functionalization with the photolinker-derivatized peptide A was done as follows: a solution of 0.5 mg of MBS in 300 μL of DMF was added to a solution of 4 mg of goat anti-rabbit IgG in 2 mL of PBS and mixed for 30 min. The solution was then desalted on a PD 10 column using 50 mM phosphate

buffer at pH 6. To this desalted activated IgG, a solution of 1 mg of the photocleavable-derivatized peptide in 300 μL of DMF and 1 mL of PBS was added and stirred for 3 h at room temperature. Afterward, the reaction mixture was dialyzed overnight against PBS (membrane cutoff 12–14 000).

3. Synthesis of dUTP-Peptide Conjugates with a Photocleavable Linker. To prepare this triphosphate, an Fmoc-protected CPG resin was required. The succinylate was prepared from GT115A (100 mg). The sample was relatively pure but contained a small amount (by TLC) of a higher running nontritylated compound. Since it was not possible to purify the succinate, the reaction was modified slightly. 1.5 equiv were used since the exact purity of the product was undetermined. The reaction did not go to completion (from TLC this was more than 50%) by comparing the intensity of the components on the TLC by UV (254 nm) and the intensity of the DMT cation upon treatment with HCl fumes. Since the nonsuccinylated product would not react, the resin was functionalized using this mixture. The resin was prepared, but the loading was very low, 5.4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (180 mg).

The resin was detritylated using 2% TCA/DCM washed with DCM until the DMT cation was totally removed. This was then dried (argon), and the resin was soaked in pyr/DMF 1:3 (0.4 mL) for 5 min before a solution of 0.1M Eckstein's reagent in dioxane was added (0.1 mL). The reaction was allowed to stand for 15 min. The resin was then washed (dioxane, MeCN) and dried (argon). The resin was again soaked in a solution of 0.5M bis-(tributylammonium) pyrophosphate in anhydrous DMF and tri-*n*-butylamine for 20 min, and the resin was washed (DMF, MeCN) and dried (argon). The product was oxidized (iodine/water/pyridine/THF for 30 min), washed (MeCN), and dried (argon). The Fmoc protecting group was removed (20% piperidine/DMF, 0.5 mL, 20 min), and the resin was washed thoroughly, (DMF, MeCN) and dried (argon). This was then washed with DCI, a solution of DCI/photolabile amino linker CEP (1:1, 0.5 mL) was added, and the reaction was allowed to stand for 20 min. The solution was removed, and the resin washed (MeCN) and dried (argon). A mixture of cap A/cap B (1:1, 0.5 mL) was added, and the resin was soaked for 5 min before removing the capping reagents and washing and drying the resin as before. The product was oxidized ($\text{I}_2/\text{THF}/\text{pyr}/\text{H}_2\text{O}$, 5 min), and the resin was washed and dried as before. This was cleaved from the resin with cNH_4OH at room temperature for 30 min, then purified by anion exchange HPLC on a Dionex NucleoPac100 HPLC column using the following solvent system: Buffer A, 0.1M 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, 7 min; B, 7.9 min; and C, 10.3 min). All 3 fractions were lyophilized overnight 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 200 μL of water. MS showed that CMM661A pk 1 was definitely not the triphosphate, but it could be either CMM661pk 2 or 3 (very similar MS profiles). (CMM662A was formed from CMM661A pk 2, and CMM663A was formed from CMM661A pk 3.) Both samples were then used in the subsequent reaction. Bicarbonate buffer (10 μL) and the maleimide NHS ester (50 μL) were added to each sample and the reactions agitated overnight. The samples were diluted with milliQ water (500 μL) and filtered. The samples were purified by RP-HPLC, buffer A, 0.1M TEAA; buffer B, MeCN; flow rate 4 mL/min using MeCN50.mth and the coupling of the peptide was carried out on these fractions.

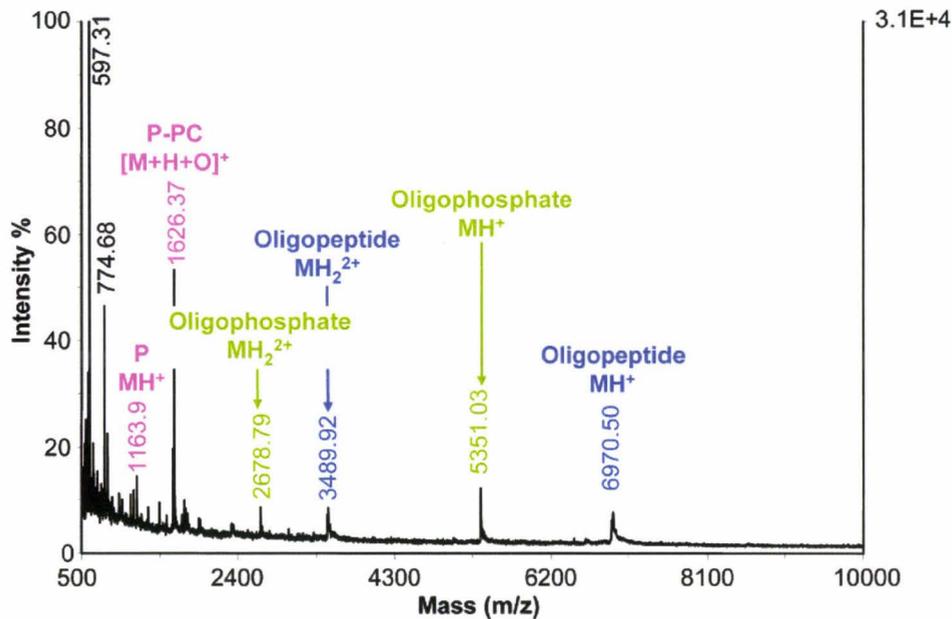


Figure 2. MALDI mass spectrum in the linear positive mode of an oligopeptide including a 20-mer oligonucleotide sequence and the photocleavable linker/peptide system with 3-HPA as matrix.

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 (2 \times 15 min), and then hydrated during 5 min in 3 steps of mixed ethanol/water baths (96°, 70°, 30°). Sections were prepared according to classical ISH protocols. Tissues were incubated in glycine 0.1 M/Tris HCl buffer (pH 7.4), then treated for 15 min with proteinase K for protein digestion (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 1 M/Tris HCl and 0.5 M EDTA, pH 8). After post-fixation with 4% paraformaldehyde (0.1 M Phosphate/5 mM MgCl_2 buffer, pH 7.4) for 15 min, a 10 min bath with triethanolamine (0.1 M, pH 8) was carried out. Sections were washed with 2 \times SSC, then ultrapure water for 5 min. Probes were denaturated at 100 °C for 10 min, and after a 3 step tissue dehydration (30°, 70°, 96°), hybridization was done for 16 h at 55 °C dissolving cDNA probes in hybridization buffer (Dextran sulfate 10%, formamide 50%, 20 \times SSC 20%, 100 \times Denhardt's 10%). Tissues were incubated with Rnase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 37 °C, 30 min), then rinsed 10 min with successive SSC/2-mercaptoethanol (0.07%) solutions (2 \times , 1 \times), and twice 0.5 \times at 55 °C for 30 min. After rinsing slices with 0.1 \times SSC for 5 min at room temperature, one bath of ultrapure water was carried out to remove the excess of polymers. Tissues were kept drying at room temperature before MALDI matrix application.

Tissue Preparation for Immunocytochemistry (ICC). Adult male Wistar rats weighing 250–350 g (animal welfare accreditation by the French ministry of the agriculture No. 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 for 5 min at room temperature, tissues were heated at 80 °C for 20 s to allow for good adherence on slides. Rat brain sections were incubated at room temperature with 500 μL of buffer (0.1 M PBS/1% BSA/1% normal goat serum/0.05% Triton X100) for 30 min. The same buffer was

used to dilute carboxypeptidase D (CPD) antibody (1:400), and incubation was performed overnight at 4 °C. After washing 3 times 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) for 80 min 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 ultrapure water baths. For FITC ICC, slices were prepared using phenylenediamine in glycerol. For photocleavable tagged antibody, tissues were rinsed 3 times for 5 min 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. 1. 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 using the dried-droplet technique.

2. Classical Analysis in Linear Mode. Acquisition parameters were set to acceleration voltage, 20 kV; first grid voltage, 94%; guide-wire voltage, 0.05%; extraction delay time, 200 ns.

Each spectrum was the average of 100 laser shots.

3. 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) with delayed extraction (DE) and a 337 nm pulsed nitrogen laser. For routine analysis, HCCA was used at concentrations of 10 mg/mL in ACN/ H_2O (2:1, v/v, 0.1% TFA), and 3 HPA at 50 mg/mL in H_2O /ammonium citrate (100 mM). For direct tissue analysis and MALDI imaging, HCCA was used at 10 mg/mL in ACN/ H_2O (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 peptide mixture (1.6 μM bradykinin, 1.6 μM substance P, 1.6 μM ACTH 18–39, 3.2 μM ACTH 7–38, 4.8 μM

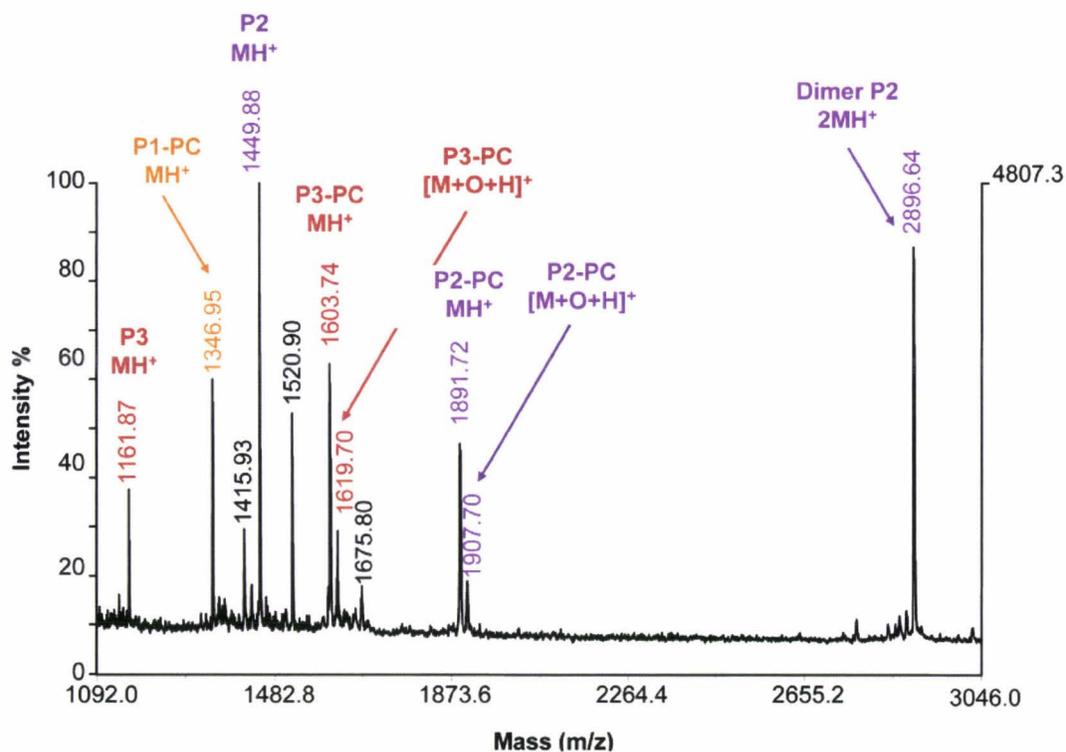


Figure 3. MALDI mass spectrum in the reflectron positive mode of three oligopeptides including three different 20-mer oligonucleotides and the photocleavable linker/peptide system with three different peptides as tags with HCCA as matrix.

bovine insulin, and 4.8 μ M bovine ubiquitin in H_2O). Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD camera (SONY). Each recorded mass spectrum is the result of the average of 100 laser shots on the area of interest. Acquisition parameters were set as follow: acceleration voltage, 25 kV; first grid voltage, 94%; guide-wire voltage, 0.1%; extraction delay time, 200 ns. Images were reconstructed using MALDI Imaging Tools (MIT, M. Stoekli, Novartis, Inc., Switzerland). In total, 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.

Results

Photocleavable Tagged Oligonucleotide Probes: mRNA MALDI Imaging. To evaluate the performances of photodissociation under UV-MALDI, several oligopeptides (20-mers oligonucleotides) presenting a photocleavable moiety were tested. Photodissociation was assumed to induce cleavage directly between the phosphate group and the photoactivable linker¹⁵ (see supplementary data, structure 1, Supporting Information). As shown in Figure 2, photocleavage by laser irradiation is efficient and results in the characteristic signal expected for the tag (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 in MALDI oligonucleotide measurements. At m/z 1163.9, the low-abundance peak was

attributed to a fast cleavage in the gas phase 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 in Figure 3, 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 peptides. For subsequent experiments, bradykinin was selected because it gives the best sensitivity (100 fmol) and ease of detection in all analytical conditions (P3).

To increase sensitivity by suppressing fast fragmentation signals, a new photocleavable linker/tag system was designed replacing the disulfide bridge by a maleimide group for binding the tag peptide to the photocleavable linker (see supplementary data, structure 2, Supporting Information). 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-stranded cDNA oligonucleotide probes. Proenkephalin was chosen as the model target mRNA because previous studies gave low background for this molecule's mRNA distribution in the rat brain.¹⁶ Standard untagged and tagged primers bearing the photocleavable linker/tag system were added to the proenkephalin cDNA sequence. Both types of primers were used for RT-PCR amplification and have given the same results in terms of product and yield of amplification. RT-PCR was used to make a 400 bp double-stranded cDNA oligonucleotide probe (data not shown). The probe was tested in ISH experiments and followed by MALDI analysis of hybridized rat brain tissue sections for tag detection. The mass spectra

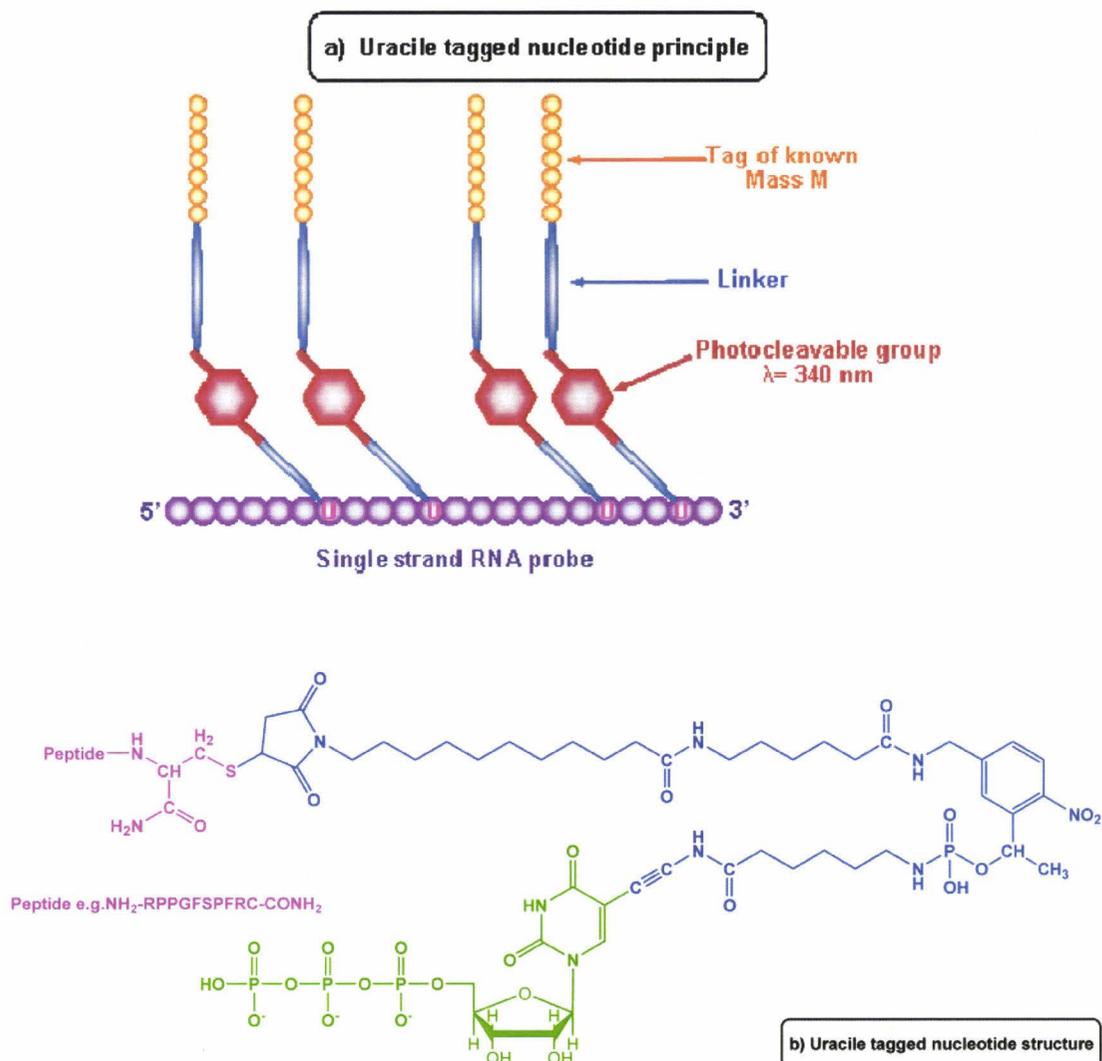


Figure 4. (a) Schematic representation of the incorporation of the tagged uracile nucleotide in a single strand RNA probe and (b) developed structure of the U-tagged nucleotide.

obtained 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 neither found for control tissue sections with the untagged proenkephalin probe nor for the sense control tissue sections. Although signal intensity for the tag was weak, the feasibility of the proposed strategy was unambiguously demonstrated, it was lacking sensitivity. Therefore, the strategy was slightly modified to improve sensitivity, increase specificity, and facilitate usage.

An alternative approach was developed, based on the labeling of a single desoxyribo nucleotide triphosphate (dNTP). For these experiments desoxyribo uracile triphosphate (dUTP) was chosen and chemically modified with the same photocleavable linker/tag system described above (Figure 4b). This new design keeps both the 5' and 3' ends of the nucleotide free, allowing the synthesis of riboprobes containing the modified base by *in vitro* translation. This first step increases the specificity of the method, thus, preventing nonspecific binding to genomic DNA. Moreover, use of a tagged nucleotide leads to the incorporation of one tag for each T nucleotide basis (Figure 4a), increasing sensitivity. Finally, the use of tagged nucleotides

has the very practical consequence that these nucleotides can be incorporated using standard procedures, regardless of the probe being amplified. The dUTP-tagged nucleotides were tested for photocleavage, as shown in Figure 5. Again, the characteristic signal of the tag peptide was observed (m/z 1163.23), with very good S/N ratio and signal intensity, demonstrating that the maleimide group incorporation prevents fast fragmentation. The dUTP-tagged system was used for amplifying the proenkephalin probe by RT-PCR. As expected from the structure (Figure 4b) and previously described for digoxigenin-tagged uracile (dUTP-DIG) systems,¹⁷ nucleotides ratios had to be optimized, with best results obtained for a ratio 1:3 of tagged dUTP and dTPP (desoxyribo thymine triphosphate). ISH was performed with the multiple tagged proenkephalin amplified probes. MALDI analysis of the hybridized rat brain tissue sections was then carried out and compared to the analysis of adjacent tissue sections hybridized with untagged proenkephalin probe amplified in the same conditions but with unmodified uracile. The characteristic signal of the tag peptide was observed in rat brain tissue for the multiply tagged proenkephalin probe (Figure 6b), whereas this signal never appeared when the untagged probe was used (Figure 6a)

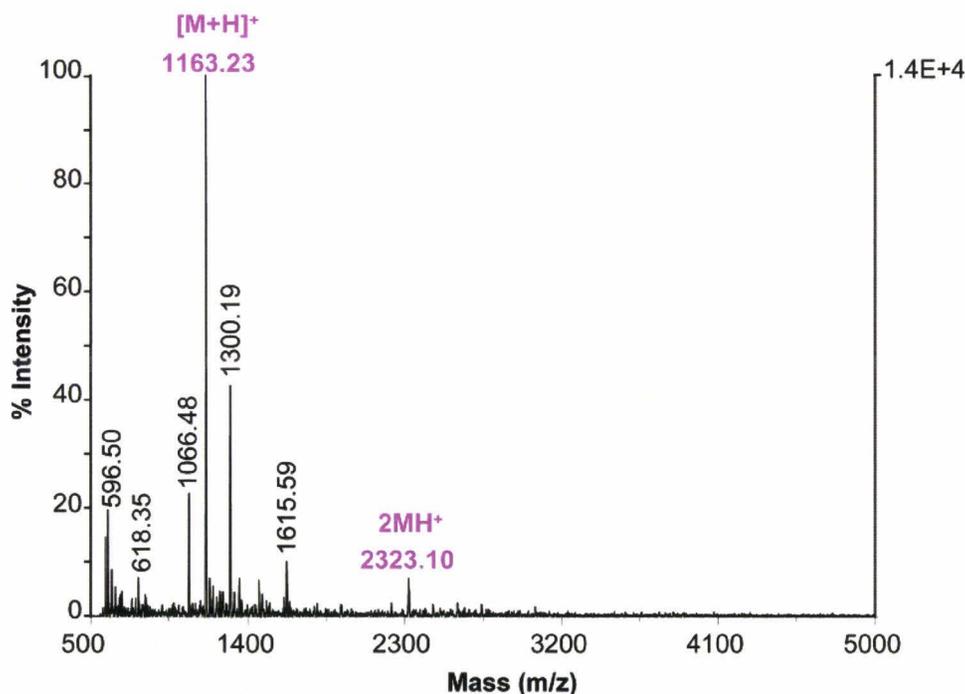


Figure 5. MALDI mass spectrum in the reflectron positive mode of the U-tagged nucleotide in solution with HCCA as matrix.

or the sense probe used. 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 μm steps). On the basis of the characteristic tag signal (Figure 6b), an image of the molecular distribution of proenkephalin mRNA was reconstructed, as presented in Figure 6e. The image fits the tissue morphology well (Figure 6f) and matches the proenkephalin mRNA distribution obtained by ISH with autoradiography¹⁸ or the one obtained in mouse brain with digoxigenin probe¹⁹ (Figure 6c,d). These experiments clearly demonstrate the feasibility of specific mRNA imaging by MALDI mass spectrometry.

Photocleavable Tagged Antibody Probes for Antigen MALDI Imaging. The same concept was applied in obtaining specific images of proteins using tagged secondary antibodies. As previously explained, to gain sensitivity and ease of use, secondary antibodies were tagged on the C-terminal part of their Fc chain (Figure 7). Immunohistochemistry (IHC) experiments were performed with a standard primary antibody directed against the protein of interest, and peroxydase or FITC-tagged secondary antibodies were replaced by our specifically modified antibody for MALDI imaging. The tagged antibody was first tested to evaluate the yield of photocleavage and to assess the presence of expected tag signals. Examination of the mass spectra leads to the observation of two characteristic signals for the tag (m/z 1686.43 and 1703.23). The higher m/z signal corresponds to the P-PC moiety observed with the oligonucleotide probes. The m/z 1686.43 signal corresponds to the same moiety minus one oxygen. Such signals have already been described for photocleavable systems, but no mechanism was proposed.¹⁵ Two unexpected, less abundant signals were also observed and were attributed to some of the maleimide reaction intermediates remaining in the solution

after purification. As for oligonucleotides, photocleavage with antibodies was highly efficient, resulting in the observation of characteristic tag peptide signal. For further experiments, Carboxypeptidase D was chosen as model target protein for several reasons, in particular its presence in some rat brain regions as known from previous studies and the impossibility of its direct detection by MALDI imaging because of its large mass and nature (membrane protein of 180 kDa).²⁰ IHC experiments were carried out in parallel on three adjacent rat brain sections using the same primary antibody and comparing our tagged antibody to the same but peroxydase or FITC-labeled antibody. As shown in Figures 8a, several signals were observed from the direct analysis of the tissue section with the FITC antibody corresponding to peptides present in the tissue section. The mass spectrum obtained in the same region with the tagged antibody also displays these signals (Figure 8b). However, in this case, two more signals corresponding to the expected signals for the tag peptide were also observed. This tissue section was then kept for MALDI imaging scanning of 30 000 spots, in 100 μm steps. On the basis of signal intensity for the characteristic ion at m/z 1686.43, which is the most abundant one, the image was reconstructed, indirectly giving the image of the protein (Figure 8c). As observed in the figure, very good image resolution was obtained. The protein distribution in the section is perfectly correlated to tissue structure, as observed when comparing to a picture of the section before IHC experiments (Figure 8d). The MALDI image was compared to the results obtained for the enzyme-linked secondary antibody using substrates of peroxydase for the revelation by a precipitation reaction. Both substrates DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) and 4-chloronaphtol of peroxydase were investigated, and results obtained with 4-chloronaphtol revelation are presented Figure 8f. Comparison pictures of 4-chloronaphtol or DAB labeling with MALDI images based on the tag detection show that CPD protein is detected in the same area of the brain using both methods,

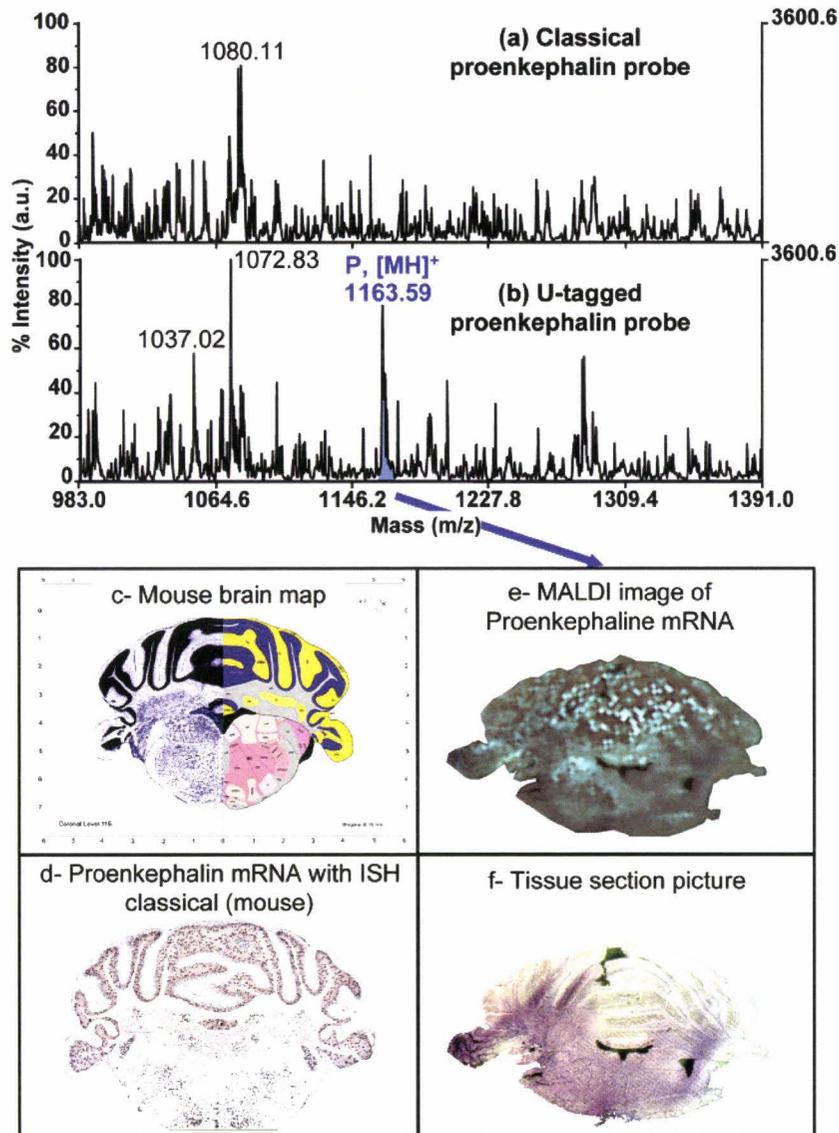


Figure 6. Comparative MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ISH of double strand oligonucleotide cDNA probe corresponding to proenkephalin for classical untagged proenkephalin probe (a) and the U-tagged proenkephalin probe (b). (f) Corresponding reconstructed MALDI image on the basis of the tag signal obtained by scanning the tissue section after ISH experiment (7000 spots separated each of 100 μm) compared (e) to proenkephalin mRNA localization in 8-week old male C57BL/6J mouse brain using digoxigenin ISH technique by the Allen Institute (<http://www.brainatlas.org/aba/>). For this experiment, colorimetric detection of bound probe is generated by the alkaline phosphatase substrates nitroblue tetrazolium (NBT) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) that produce a vivid blue/purple particulate reaction product. Figures (c) presents the map/picture representation of the mouse brain and figure (f) the picture of the rat brain section prior to ISH–MALDI imaging experiment.

thus, validating the methodology. However, in some specific areas, such as the hippocampus, CPD was detected with the tag-mass system, while no signal was detected with the precipitation reaction, indicating that the indirect detection by mass spectrometry is more sensitive than classic techniques. Comparing the MALDI image of CPD with the fluorescence image obtained from the section on which the FITC-linked secondary antibody was used (Figure 8e), MALDI appears to present a good sensitivity. It is worth noting that the MALDI molecular strategy gives a more localized signal compared to fluorescence, which is diffuse and presents a significant amount of background noise due to the natural fluorescence of the tissue. Moreover, at low magnification, signals are found in the

same areas by fluorescence and MALDI imaging. These results demonstrate the validity of the strategy for imaging very specific proteins of interest.

Discussion

MALDI imaging is an emerging technology that allows the localization and direct identification on tissue sections of biomolecules. The ability to co-localize in some specific area of the tissue different classes of molecules (e.g., mRNA, proteins, peptides, lipids, drugs) is the key for apprehending molecular mechanisms in living systems. Nevertheless, certain biomolecules cannot be directly imaged, leading to loss of information. We have proposed, here, a new concept for

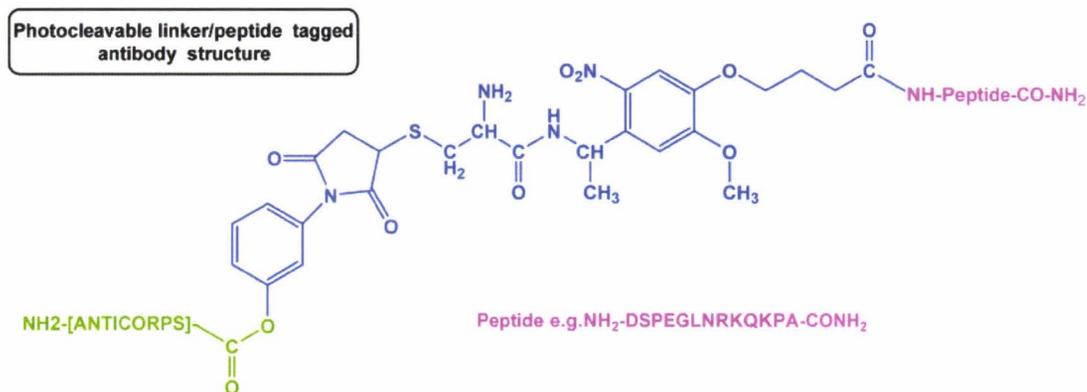


Figure 7. Developed structure of the photocleavable linker/tag system modified secondary anti-rabbit antibody.

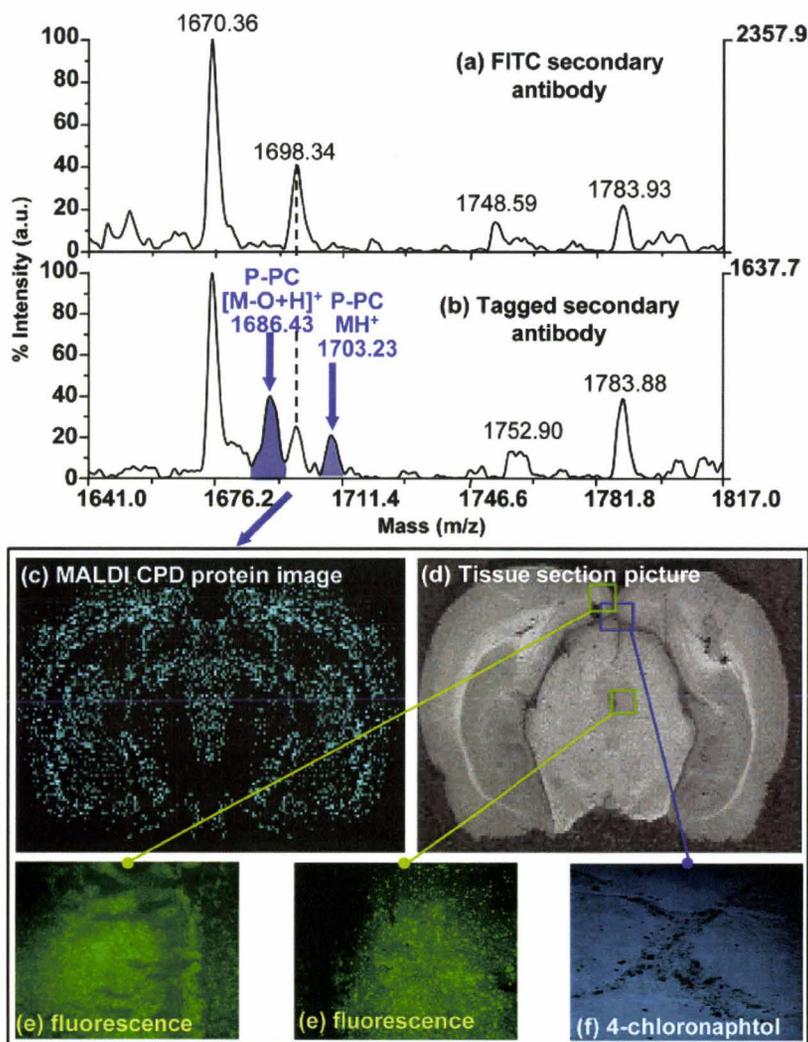


Figure 8. Comparative MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ICC experiment with a primary antibody directed against carboxypeptidase D protein and an anti-rabbit FITC polyclonal secondary antibody (a) or bearing the photocleavable linker/tag system (b). (c) Corresponding MALDI molecular image reconstructed on the tag peptide characteristic ion screening after ICC experiment with the tagged secondary antibody (30 000 spots separated each of $100\ \mu\text{m}$) and (d) rat brain tissue section picture before the ICC experiment. Comparison with pictures of specific region of the adjacent rat brain sections after ICC experiment with FITC labeled secondary antibody and fluorescence detection (e) or peroxidase labeled secondary antibody and revelation with 4-chloronaphtol (f).

allowing their indirect detection, based on tagged photocleavable probes. The strategy was optimized and successfully

applied to mRNA and antigens by using, respectively, tagged photocleavable oligonucleotides and secondary antibodies.

Specific imaging of target biomolecules with photocleavable tagged probes

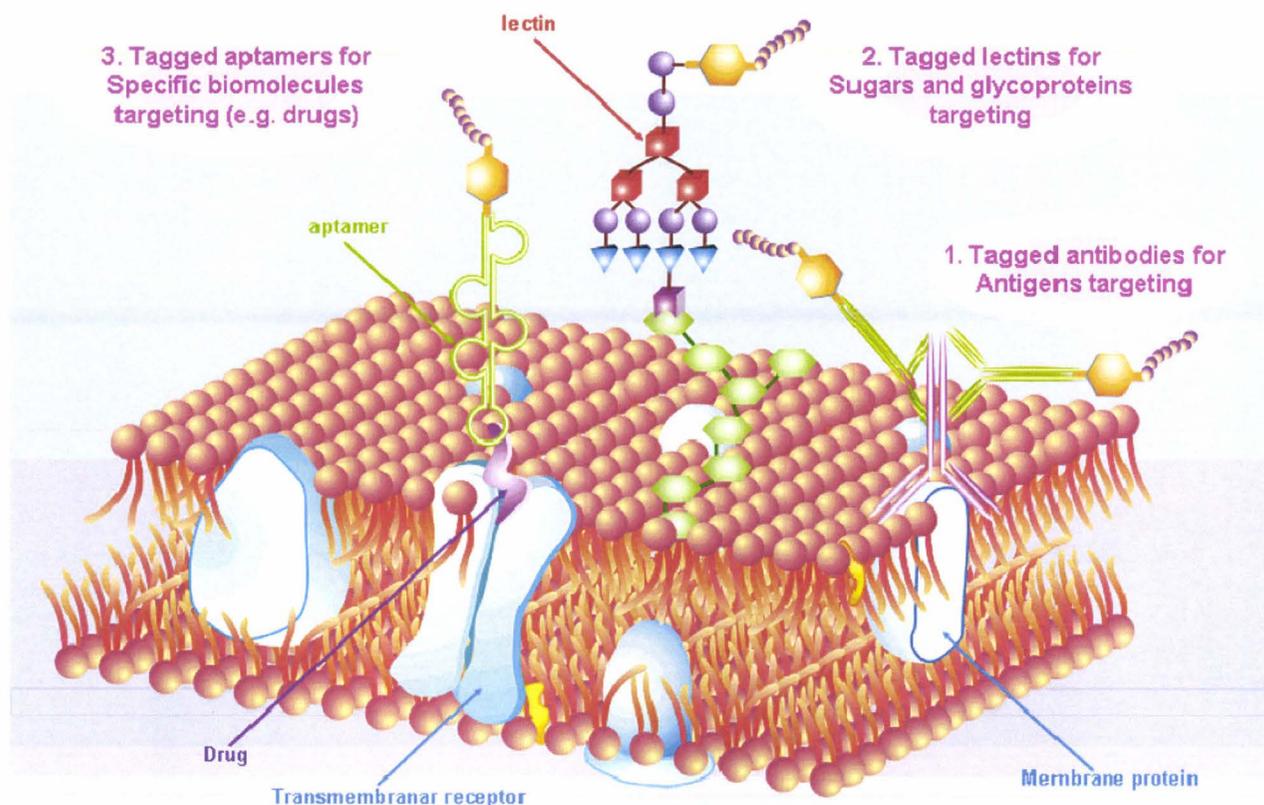


Figure 9. Schematic representation of the concept of specific imaging for different target biomolecules and probes.

Actually, the proof of the proposed concept was demonstrated, but several developments still remain. Actually, MALDI has a quite poor lateral resolution ($\sim 75 \mu\text{m}$ pixels) very far from classical optical microscope ($\ll 1 \mu\text{m}$), but much effort is currently underway to improve the resolution of MALDI images by using more focused laser systems. On the other hand, even if MALDI's first strength is the possibility to detect numerous biomolecules without any background information required, MALDI specific imaging gives access to specific molecules that could never be directly observed. But why use MALDI rather than well-established methods such as radio elements or fluorescence in combination with microscopy? First, MALDI mass spectrometry is a very sensitive method that still could increase its potential by instrumental and fundamental developments. Radioactivity is very sensitive but very difficult to handle and has advantageously been replaced by fluorescence. Fluorescence is extremely sensitive and resolute but has shortcomings such as signal diffusion, high background, cells' autofluorescence or quenching phenomena, and short lifetimes of the signal. In this respect, mass spectrometry can be advantageous. Moreover, one of the great strengths of the "Tag-Mass" system compared to fluorescence will be its multiplex capacities. For fluorescence, only a restricted number of fluorophores are useable, whereas in the present strategy, the number of tags is *a priori* unlimited. The multiplex approach allowing for the simultaneous detection of several mRNA and proteins is currently under investigation. Finally, it has been observed that, in addition to the signal of the tag when analyzing the tissue section, classical signal for peptides and proteins can still be observed. Optimizing the method for

obtaining both classical MALDI signal of tissue section and specific image should give a great strength to MALDI imaging.

Conclusion

We have demonstrated here the application of a new concept for specific imaging of mRNA and proteins, using MALDI mass spectrometry to image target molecules in sectioned tissue. This strategy relies on targeting specific biomolecules with probes that contain a photocleavable linker and a tag moiety that can be photodissociated by MALDI laser irradiation. We have successfully tested this strategy with peptide tags on oligonucleotide and antibody probes. With this method; we were able to image a 180 kDa membrane protein and proenkephalin mRNA. For oligonucleotides, U-tagged nucleotide probes were found to be the best choice for increased sensitivity and flexibility. Mass spectrometric detection was shown to be very sensitive, yielding distributions of the molecules of interest on whole tissue sections with more sensitivity than most of the classical methods using peroxidase as a substrate, and giving images of molecules that could not be observed directly by MALDI imaging. Such a strategy presents a great potential for multiplex approach and is under investigation. Sensitivity is also tested by optimizing the tag and trying other tag families that could give better signal detection by MALDI. Thus, MALDI matrices or compounds absorbing at the laser wavelength and possibly detectable by Laser Desorption Ionization (LDI) will be investigated to acquire images without the need for the matrix. This strategy can also be extended to other types of

probes, including lectins or aptamers, which will also allow for imaging polysaccharides, peptides, proteins, or drugs (Figure 9).

“Tag-Mass” strategy is a new concept that could bring very useful information, especially to obtain, for example, transcriptome/proteome co-localization maps, and could be very interesting in the future for diagnosis of pathologies.

Acknowledgment. Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Éducation Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI Jeunes Chercheurs ACI JC4074 to I.F.), Conseil Régional Nord-Pas de Calais to M.W., and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to R.D. and M.S. Also supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics GmbH and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides. The authors thank Prof. F. Hillenkamp and Prof. E. Macagno for their suggestions.

Supporting Information Available: Protocols for the peptide/photocleavable linker tagged molecules synthesis and structures of the peptide/photocleavable linker tagged molecules. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (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.* **1997**, *69* (23), 4751–60.
- (2) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. Profiling and imaging proteins in tissue sections by MS. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (5), 87A–93A.
- (3) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24* (1–2), 9–14.
- (4) Rubakhin, S. S.; Jurchen, J. C.; Monroe, E. B.; Sweedler, J. V. Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discovery Today* **2005**, *10* (12), 823–37.
- (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.* **2001**, *7* (4), 493–6.
- (6) Caldwell, R. L.; Caprioli, R. M. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol. Cell. Proteomics* **2005**, *4* (4), 394–401.
- (7) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (14), 4523–7.
- (8) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A. Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16* (2), 133–8.
- (9) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoeckli, M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech. Ageing Dev.* **2005**, *126* (1), 177–85.
- (10) Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (3), 809–19.
- (11) Kirpekar, F.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F. Detection of double-stranded DNA by IR- and UV-MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1999**, *71* (13), 2334–9.
- (12) Nordhoff, E.; Kirpekar, F.; Karas, M.; Cramer, R.; Hahner, S.; Hillenkamp, F.; Kristiansen, K.; Roepstroff, P.; Lezius, A. Comparison of IR- and UV-matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22* (13), 2460–5.
- (13) Qian, X.; Lloyd, R. V. Recent developments in signal amplification methods for in situ hybridization. *Diagn. Mol. Pathol.* **2003**, *12* (1), 1–13.
- (14) Rossi, E.; Ubiali, A.; Cadei, M.; Balzarini, P.; Valagussa, E.; Lucini, L.; Alpi, F.; Galletti, A.; Fontana, L.; Tedoldi, C.; Grigolato, P. HER-2/neu in breast cancer: a comparative study between histology, immunohistochemistry, and molecular technique (FISH). *Appl Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2006**, *14* (2), 127–31.
- (15) Olejnik, J.; Ludemann, H. C.; Krzymanska-Olejnik, E.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F.; Rothschild, K. J. Photocleavable peptide-DNA conjugates: synthesis and applications to DNA analysis using MALDI-MS. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27* (23), 4626–31.
- (16) Lansac, G.; Dong, W.; Dubois, C. M.; Benlarbi, N.; Afonso, C.; Fournier, I.; Salzet, M.; Day, R. Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen. *J. Neuroimmunol.* **2006**, *171* (1–2), 57–71.
- (17) Rees, J. L.; Fisher, C. Nonradioactive in situ hybridization with digoxigenin. *Trends Genet.* **1992**, *8* (1), 8.
- (18) 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. U.S.A.* **1986**, *83* (16), 6221–5.
- (19) Allen brain atlas neuroscience gateway Home page, <http://www.brainatlas.org/aba/>.
- (20) 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* **1999**, *89* (4), 1301–17.

PR0700044

3.4. Conclusions et perspectives

L'utilisation de molécules marquées couplées avec un lien photoclivable a été ainsi démontrée pour cibler deux molécules d'intérêt. Une première molécule de proenképhaline présente dans le cerveau de rat. La première sonde utilisée était une séquence complémentaire de la proenképhaline marquée avec un seul rapporteur (peptide) mais la sensibilité n'a pas suffi pour observer le Tag-mass par imagerie MALDI. Il a fallu utiliser une autre sonde Tag-mass Uracile qui est incorporée dans une séquence complémentaire de la séquence de la proenképhaline. L'image peu résolutive autour de 300 μm permet de localiser cette proenképhaline au sein du tissu.

De même, l'approche par Tag-mass anticorps a été démontrée sur la carboxypeptidase protéine membranaire de haut poids moléculaire (180 kDa). Ce type d'information était jusqu'alors inaccessible par spectrométrie de masse, et montre un caractère innovant avec des perspectives d'évolutions intéressantes. L'approche s'appuie sur l'approche de l'HIS (Hybridation *in situ*) et l'ICC (ImmunHistoChimie) deux approches très usitées dans les laboratoires de recherche, tout en apportant un lot d'évolutions intéressantes.

Les révélations colorimétriques DAB ou digoxigénine utilisées dans les approches ICC et HIS ne permettent la détection que d'une molécule unique. Avec l'utilisation de la fluorescence, cette limitation est repoussée à la détection de 2 ou 3 protéines en utilisant des fluorophores différents. L'approche par spectrométrie spécifique permet la détection en multiplexe. C'est une détection de plusieurs molécules d'intérêts en une seule et unique étape. Il est théoriquement possible d'utiliser une infinité de molécules marquées même si en pratique l'encombrement stérique est limité le nombre de molécules ciblées. En conséquence, il est raisonnable de penser que l'imagerie d'une dizaine à une vingtaine de molécules peut être obtenue en une unique étape. Nous avons pu montrer dans la publication la possibilité d'utiliser 3 sondes différentes avec 3 rapporteurs différents, ce qui confirme la possibilité du multiplexage (**Figure 37**). Cependant, nous nous sommes aperçus que dépendamment de la composition du rapporteur, la sensibilité obtenue était différente et il n'est pas impossible qu'il puisse aussi exister un phénomène de suppressions de signal avec un très grand nombre de sondes. Mais, des études sont actuellement en cours pour apprécier ces phénomènes. Quoiqu'il en soit ce nouveau concept d'imagerie présente un grand intérêt pour la vitesse d'analyse et l'étude de colocalisation de plusieurs molécules et d'étude d'interactions protéiques.

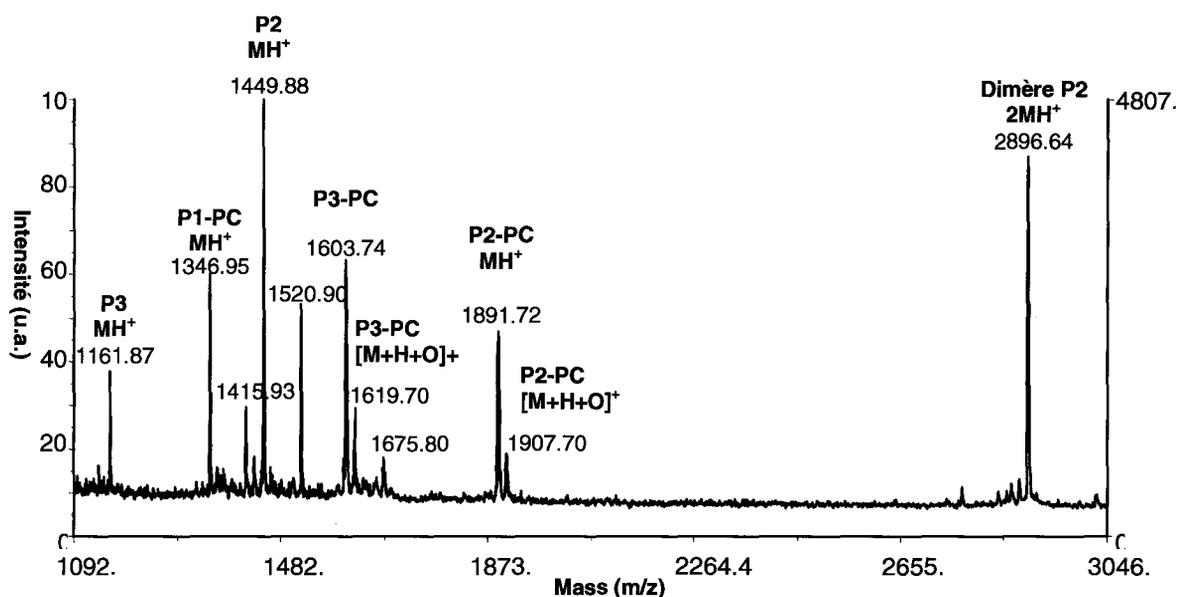


Figure 37 : Spectres MALDI du mode multiplexe comprenant 3 sondes différentes P1, P2, P3.

Un deuxième aspect à prendre en compte, réside dans le caractère semi-quantitatif de l'approche Tag-mass. En effet, si le MALDI est connu pour ses difficultés à réaliser des analyses quantitatives, c'est en grande partie du fait de la variation de l'incorporation des composés dans les cristaux de matrice. Cette incorporation est dépendante de la composition de l'échantillon (présence d'impuretés ou de sels) et surtout de la structure primaire de l'analyte : lipides ou protéines ne réagissent pas de la même manière à l'analyse MALDI. Dans le cas de l'imagerie spécifique, il est envisageable d'utiliser des peptides de même séquence, mais que l'on puisse différencier par un marquage isotopique particulier (C^{13} , O^{18} ...) comme ceux utilisés en quantification classique. Il serait alors possible d'obtenir une localisation et une semi quantification de protéines ou ARNm d'intérêt en une étape unique. De ce fait, les applications en imagerie spécifique sont multiples et ouvre de nouvelles perspectives d'applications à l'imagerie par spectrométrie de masse (Figure 38).

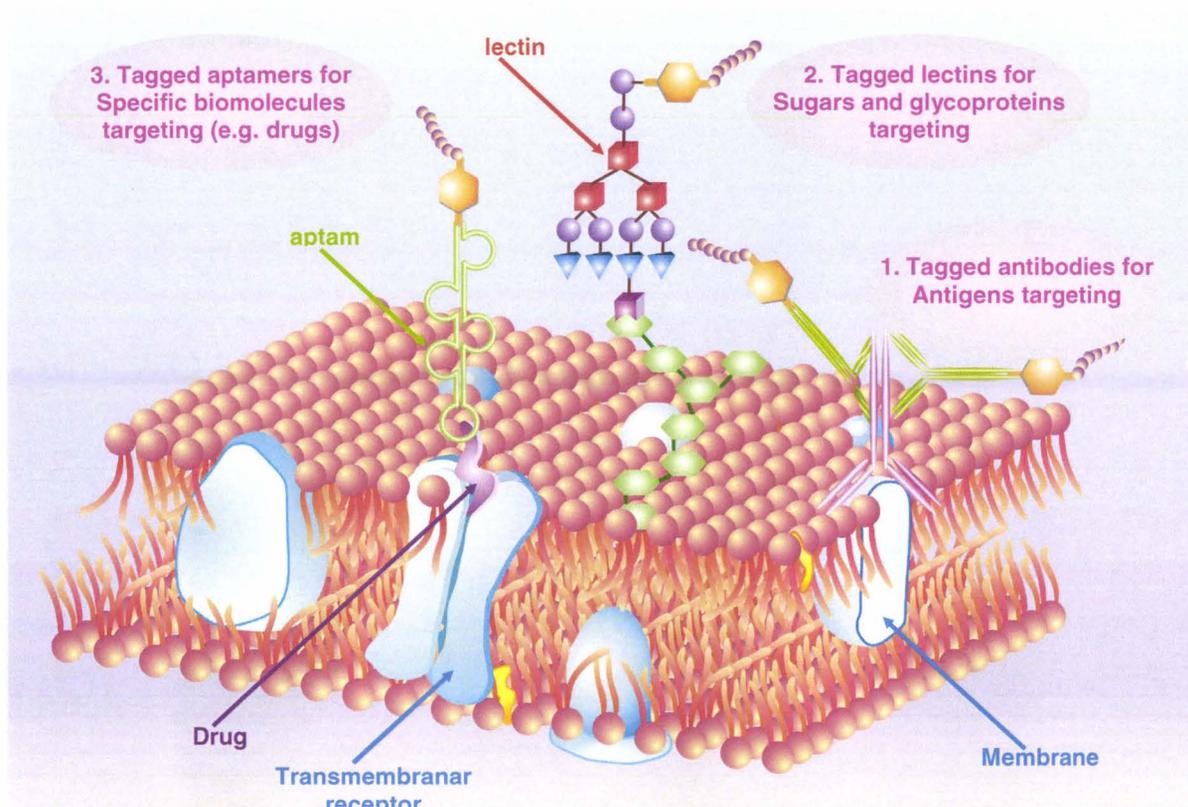


Figure 38. Présentation des différents Tag-mass pouvant être utilisés

La sensibilité par l'approche Tag-mass est à l'heure actuelle plus faible qu'une approche par fluorescence à la vue des images obtenues avec l'anticorps marqué dirigé contre la protéine CPD. Cependant, la sensibilité de l'approche peut atteindre quelques femtomoles en solution; Il y a donc des phénomènes d'extinction sur le tissu. Ces phénomènes sont principalement dus à la présence de sels et de composés diminuant l'effet d'ionisation et de désorption. La sensibilité peut être néanmoins augmentée avec des traitements de coupes par élimination des sels très présents sur la coupe et dans les tampons d'hybridations utilisés. Des développements sont encore nécessaires pour améliorer cette nouvelle technologie au point de vue protocolaire mais également au point de vue de la composition chimique du Tag-mass lui-même. Il est d'ores et déjà possible d'utiliser de nouveaux Tag-mass fonctionnant avec des groupes de lectines qui vont pouvoir fixer spécifiquement les glycoprotéines du tissu. Ces molécules et d'autres en cours de synthèse sont à tester. Des lectines mais aussi des aptamers marqués sont en cours d'élaboration afin de diminuer l'encombrement stérique au niveau du ligand. L'aptamer remplace conceptuellement l'anticorps (Brody, Willis et al. 1999) et permet de cibler un large panel de molécules avec une affinité plus forte que celle de l'anticorps et une structure bien plus petite. Cela permettrait d'une part d'augmenter l'affinité, la spécificité moléculaire, et le nombre de marquage. En effet l'augmentation du nombre de marquage

permet d'augmenter la sensibilité de l'approche. Cette augmentation est limitée par l'encombrement stérique. Il sera alors nécessaire de réaliser des études sur le marquage maximum du Tag-mass.

Les perspectives d'évolution de l'approche sont encourageantes dans le sens où la sensibilité forte de la spectrométrie de masse et la spécificité des approches anticorps, ribosondes ou aptamers semblent être très efficaces. Cependant, un grand nombre de tests sont à réaliser afin de comprendre davantage le fonctionnement et les évolutions structurales qui pourraient être apportées. La sensibilité, la spécificité par exemple, doivent être déterminées précisément. Des premiers tests ont été entamés afin de mieux cerner la sensibilité de l'approche en solution avant de passer dans des conditions réels in situ.

À la vue des bons résultats obtenus lors des tests de sensibilité du Tag-mass en solution, nous avons étendue l'utilisation du Tag-mass pour une utilisation de quantification en solution de type immunologique. Cette approche de quantification par spectrométrie masse appelée MSIA (mass spectrometry immuno Assay) correspond à un ELISA utilisant le Tag-mass comme élément rapporteur.

CHAPITRE 4. La quantification par spectrométrie de masse

4.1. Introduction

Les méthodes de quantification actuelles en spectrométrie de masse sont principalement des méthodes relatives de quantification et non pas absolues. En effet, ces méthodes permettent uniquement de comparer des quantités de lots de protéines différents provenant de plusieurs conditions d'analyses (sans avoir la quantité réelle présente). Ceci met en évidence une augmentation ou une diminution de la concentration en protéines, qui deviennent alors des marqueurs potentiels.

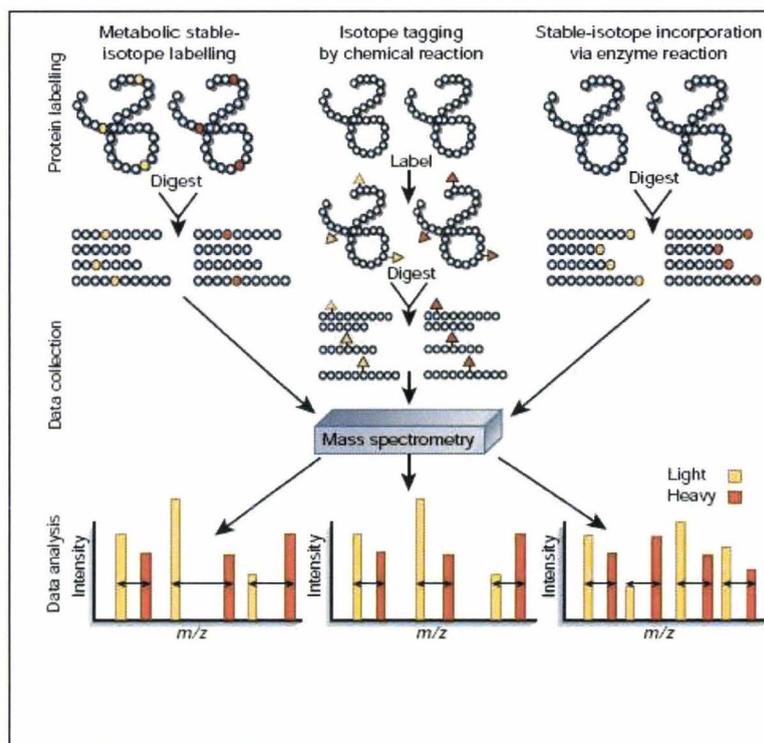


Figure 39. Les différents marquages isotopiques pour la spectrométrie de masse quantitative

Plusieurs stratégies de marquage (**Figure 39**) ont été développées pour faire de la quantification de peptides, c'est-à-dire déterminer leur quantité relative ou absolue dans un état donné. Le marquage isotopique s'est révélé être un outil efficace mais souvent très cher et pas facile à mettre en œuvre. Toutes ces approches sont résumées dans le **Tableau 3**. Aujourd'hui en milieu hospitalier, le test ELISA est toujours le test prévalent pour la quantification de biomarqueurs sériques par exemple. Cette approche utilise un anticorps

marqué par une enzyme (souvent une peroxydase) qui se lie au substrat spécifique en solution. L'anticorps se fixe proportionnellement au nombre de protéines présentes en solution. Le substrat réagissant avec l'enzyme couplé à l'anticorps colore la solution. Le spectroscope UV détermine une absorbance pour la solution à analyser qui est comparée à une gamme étalon. Cette approche permet d'établir la quantité d'anticorps fixée et par conséquent la quantité de protéines présentes. (Figure 40)

ELISA

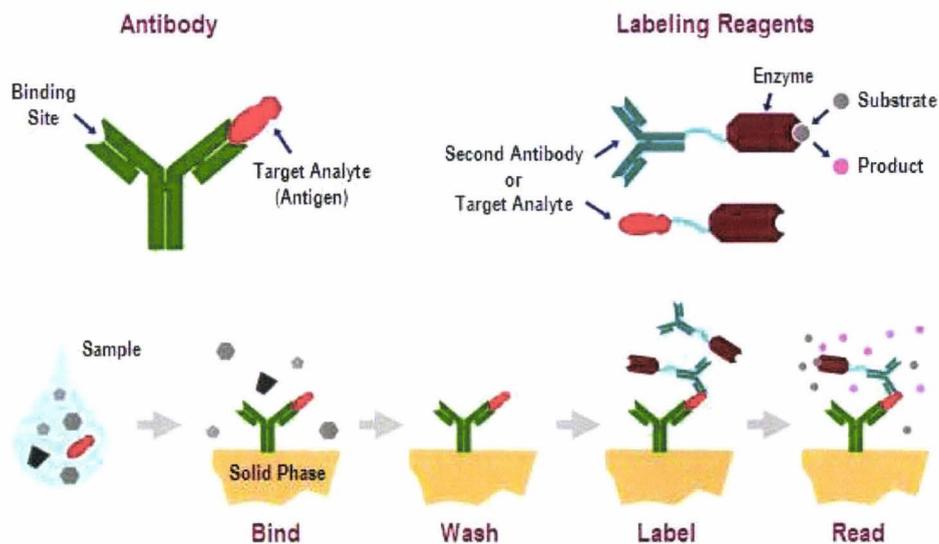


Figure 40 : Représentation schématique de la méthode de quantification ELISA.

La recherche de nouveaux moyens de détections de marqueurs dans les fluides biologiques est devenue très importante ces dix dernières années afin d'augmenter la sensibilité, la reproductibilité et la vitesse d'analyse. La méthode habituellement utilisée pour la détection et la quantification de marqueurs est la méthode ELISA. L'inconvénient majeur de cette méthode est son seuil de sensibilité faible car basé sur une technique d'analyse UV peu sensible. D'autres méthodes correspondant souvent à des évolutions de l'approche ELISA sont régulièrement présentées. De plus, avec l'essor de la spectrométrie de masse, de nouvelles méthodes essayent de combiner ces nouvelles techniques avec la technique d'immunoassay ELISA ou MSIA (Figure 40).

Tableau 3. Les différentes méthodes de quantification par spectrométrie de masse et leurs méthodes de marquages correspondantes

Marquages	Cibles	Stratégies	Avantages	Inconvénients
<i>marquages métaboliques</i>		Enrichissement en ^{15}N et ^{13}C	<i>Ne s'appuie pas seulement sur un AA pour le marquage. Très peu d'erreurs expérimentales.</i>	<i>La différence de masse induite dépend de la séquence en acide aminé. Limité à la culture cellulaire</i>
		SILAC	<i>Relativement peu chères, Analyse précise et assez simple.</i>	<i>Limitées à la culture cellulaire</i>
<i>marquages chimiques</i>	<i>groupements thiols des cystéines</i>	ICAT	<i>Peptides contenant une cystéine sont isolés : échantillons moins complexes, quantification plus accessible.</i>	<i>Les peptides lourds et légers ont des temps de rétention différents en chromatographie : Ionisations différentes causées par la variation du bruit de fond. Fragmentations des tags pendant la collision CID, complique l'interprétation des spectres.</i>
		ALICE	Tous les échantillons biologiques, Incorporation tôt dans le processus, Tag petit donc ne se fragmente pas en CID.	Uniquement pour peptides avec au moins une cystéine.
		NEM/d5-NEM et IAA/ $^{13}\text{C}_6$ -IAA	Élimine l'étape de chromatographie.	2D longue, peu de reproductibilité.
	<i>groupements amines</i>	ITRAQ	<i>Travailler simultanément avec quatre échantillons différents, Augmente l'intensité du signal en MS, Quantification absolue possible.</i>	<i>Cher</i>
		Marquage en N terminal	Succinylation spécifique, Pas de modification d'autres groupes amines, Favorise la formation d'espèces monochargées.	
	<i>C-terminal</i>	Méthanol	Ne nécessitent aucun acide aminé spécifique pour que le marquage ait lieu.	Dérive chaînes latérales des acides aspartique et glutamique.
		$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	Les atomes d'oxygène ne s'échangent	Marquage tard dans la préparation de

			pas avec l'eau en absence de digestion enzymatique, Le séquençage de novo est possible.	l'échantillon, Les peptides soient doivent être suffisamment grands pour être digérés.
	<i>MPTs</i>	PhIAT	Concentration de protéines peu abondantes.	
<i>Quantification absolue</i>		AQUA	Quantification précise et absolue.	Grand investissement, Nécessite de connaître la quantité absolue du peptide AQUA.

Un premier groupe (Nelson, Krone et al. 1995) a mis en évidence en 2001, la faisabilité de l'approche ELISA couplée à la spectrométrie de masse par l'intermédiaire de cônes de pipette greffés avec des anticorps afin de récupérer l'antigène correspondant et de l'analyser par spectrométrie de masse. Depuis, le groupe a développé son approche sur plusieurs applications et déposés un brevet (436518000, USPTO). Un second groupe (530409000 USPTO) a également mis en évidence la faisabilité de détecter des acides nucléiques par spectrométrie de masse en incluant un site photoclivable. Leur but était de fonctionnaliser la biotine (le ligand) et un site photoclivable pour marquer tout support fixé avec la streptavidine (le substrat). Ce groupe a tout d'abord mis en évidence la détection d'ADN et d'ARN par cette méthode (Hahner, Olejnik et al. 1999). D'autres équipes de grandes sociétés pharmaceutiques (Pfizer) viennent de présenter un outil pour la détection de protéines par l'intermédiaire de billes magnétiques greffées d'anticorps (Rumpel 2006 Seattle) permettant la capture et la quantification de l'antigène par spectrométrie de masse. D'autres approches ont également été mises en évidence avec un couplage anticorps et une méthode d'analyse par fluorimétrie (**Figure 41**)(Zhang, Cheng et al. 2006). C'est dans ce contexte de recherche de biomarqueurs très concurrentiel que nous proposons une variante de ces principes en utilisant une molécule photoclivable permettant la détection et la quantification de protéines dans un fluide biologique par l'intermédiaire de la spectrométrie de masse.

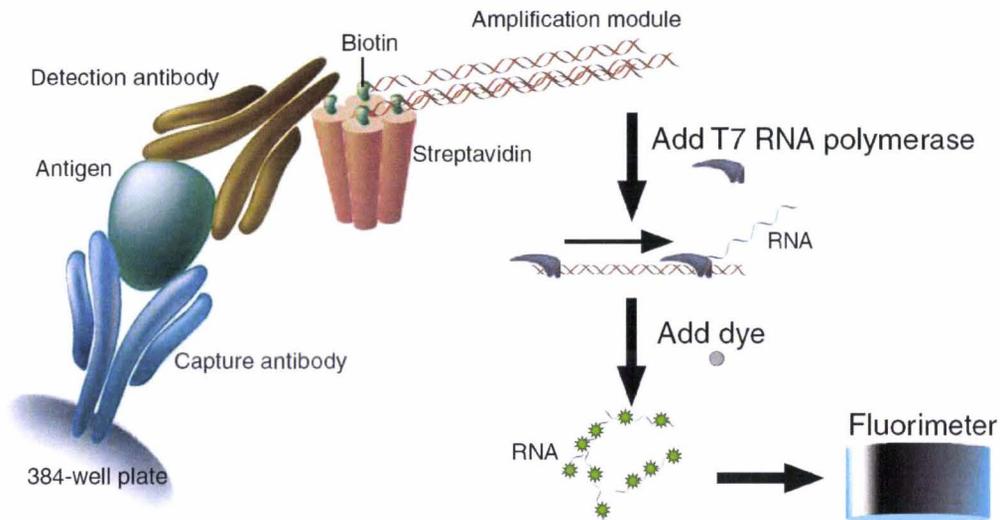


Figure 41 Représentation d'une méthode de quantification par couplage PCR. (Zhang, Cheng et al. 2006)

Déjà utilisé pour l'approche spécifique d'imagerie par spectrométrie de masse comme nous venons de le voir précédemment, le Tag-mass peut être utilisé comme l'élément central de la quantification par spectrométrie de masse.

4.2. Nouveaux tests diagnostiques immunoenzymatique couplée a une détection par spectrométrie de masse : ISA-MS et PCR-MS

Les premières méthodes de quantification absolues sont des méthodes chimiques colorimétriques liées à la réactivité spécifique du substrat présent dans les urines ou le sang (Gaskell 1907). Elles sont aujourd'hui peu utilisées et très spécifiques à certain domaine d'étude. D'autres méthodes plus générales, comme les méthodes d'ELISA (Enzyme linked Immuno-Sorbent Assay) (Engvall and Perlman 1971), Lowry (Stephens, Traul et al. 1975) et Biuret (Fields and Chodosh 1970) sont apparues dans les années 1970. De toutes ces approches, la sensibilité et la reproductibilité semblent les points importants permettant d'augmenter les performances de la quantification des composés d'intérêts. Ces méthodes permettent tout d'abord de détecter des composés de concentrations de composés d'environ 1 mg/mL. L'utilisation d'anticorps plus spécifiques avec des améliorations de méthodes (méthode sandwich Figure 41 (Kato, Hamaguchi et al. 1977)) a permis d'augmenter la sensibilité à environ 0,01 mg/mL d'analyte.

Dans la fin des années 70, le développement d'une nouvelle méthode de chimie analytique, la spectrométrie de masse a permis d'entrevoir d'innovantes découvertes par le biais de la protéomique ou l'étude de l'expression de protéines.

Les méthodes de quantification les plus connues et utilisées en routine sont l'ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) et la PCR (Polymerase Chain reaction). Ces méthodes sont robustes et sensibles. A coté de ces techniques, de nouvelles méthodes de quantification par spectrométrie de masse font leur apparition (Nelson, Krone et al. 1995) dans les années 1995, avec l'utilisation d'anticorps pour capter la molécule d'intérêt et ou dans le cadre des SNP.

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

4.2.1. ISA-MS

Dans le cadre de l'anticorps marqué, l'approche se base sur la technique ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) utilisant un antigène (de concentration connue) ou une biomolécule à quantifier (l'épitope) et un anticorps marqué (à la peroxydase ou au FITC) qui est dirigé contre l'antigène (ou l'épitope) à doser afin qu'il s'hybride par reconnaissance spécifique antigène-anticorps ou aptamers, lectines. La quantification se réalise par corrélation entre la quantité d'anticorps, aptamers, lectines marqués et la quantité d'antigène déposé dans le puits. Une droite étalon réalisée permet par la suite la quantification de la molécule recherchée dans les fluides en rapportant la valeur enregistrée lors de l'analyse sur la droite étalon (intensité relative MALDI en fonction de concentration d'antigène). L'intersection des deux donne la concentration en antigène contenu dans le puits de microtitration. Dans le cas de la base nucléotidique marquée, celle-ci servira pour la réalisation de primer pour de la PCR. L'utilisation de bases portant des marqueurs peptidiques différents permettra la réalisation d'études en multiplexe. Ces études pourront être conduites sur des fluides biologiques (plasma, liquide céphalorachidien, liquide d'ascite) mais aussi à partir de frottis ou de tissus afin de rechercher la présence de pathogènes marqueurs de pathologies et ce très rapidement et avec une très grande sensibilité. Le suivi du traitement par antibiothérapie par exemple ou d'autres drogues sera favorisé par cette technologie. Dans les deux cas, l'analyse est réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI ou ESI. Pour

l'ELISA, la densité optique est en fait la mesure déterminée sur le spectre de masse. En effet, dans notre approche, l'anticorps contient un lien photoclivable associé à un peptide de masse connue. Le marquage est effectué du côté Fc de l'anticorps. Comme dans le cas de l'ELISA, l'anticorps s'hybride à l'antigène vers lequel il est dirigé. Après clivage par UV, le peptide est libéré en solution puis analysé par spectrométrie de masse. La performance de l'analyse MALDI couplée à l'utilisation de matrice ionique spécifique et d'un système de concentration du produit à analyser permet de détecter des concentrations en antigène de l'ordre 10^{-16} moles repoussant ainsi les limites de la quantification par test immuno-enzymatique couramment employé dans le milieu hospitalier et clinique.

L'ISA-MS (Immuno Sorbent Assay-Mass Spectrometry) est une technique qui couple la technique d'ELISA et la spectrométrie de masse. Dans ce contexte, une liaison photoclivable sous UV entre un anticorps et un peptide marqueur est réalisée (**Figure 42**). Le peptide libéré est ensuite analysé par spectrométrie de masse.

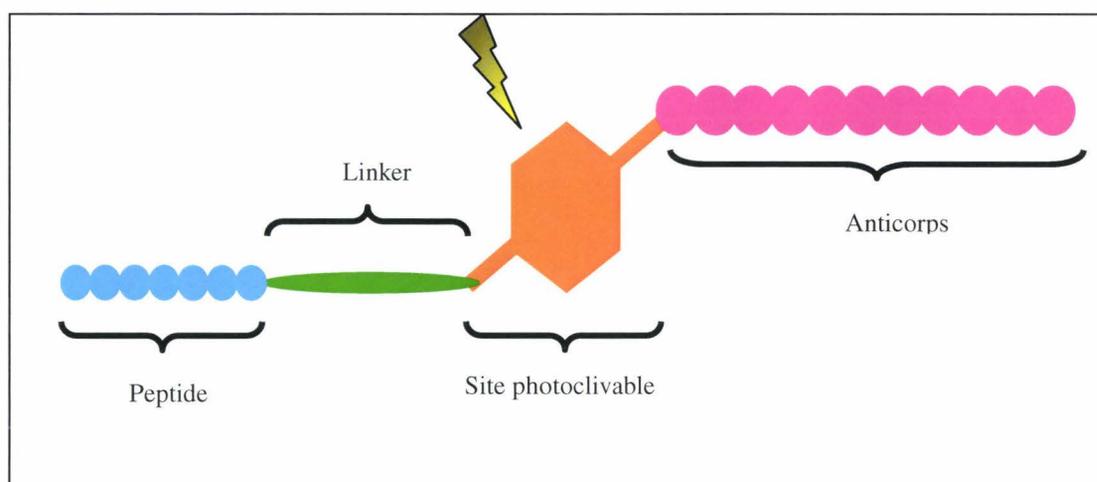


Figure 42. Construction de l'anticorps-photoclivable : A-PC-L-peptide

A est un anticorps (polyclonal ou monoclonal) mais peut également être une molécule d'interaction substrat vis-à-vis de son ligand spécifique (aptamères, biotine-streptavidine, réalisés chez toute espèce animale)

L est la séquence de liaison entre l'anticorps et le site photoclivable.

PC est le site de dissociation par photodissociation par UV.

L est la deuxième séquence de liaison entre le site photoclivable et le peptide.

P est un peptide ou tout autre élément organique ou inorganique analysable par spectrométrie de masse.

Protocole de l' ISA-MS

La technique d'hybridation est comparable à celle de l'analyse par ELISA, où un antigène A est fixé au fond d'un puits (différents types de surfaces de plaques existent offrant des caractéristiques physiques et de fixation différentes). Un anticorps spécifique dirigé contre l'antigène est ajouté, se fixant sur l'antigène. A l'issue de la fixation de cet anticorps marqué, L'ensemble est placé sous UV afin de libérer le peptide issu du photoclivage du lien présent entre le peptide et l'anticorps taggé, permettant ainsi la récupération du peptide et sa quantification par spectrométrie de masse (**Figure 43**).

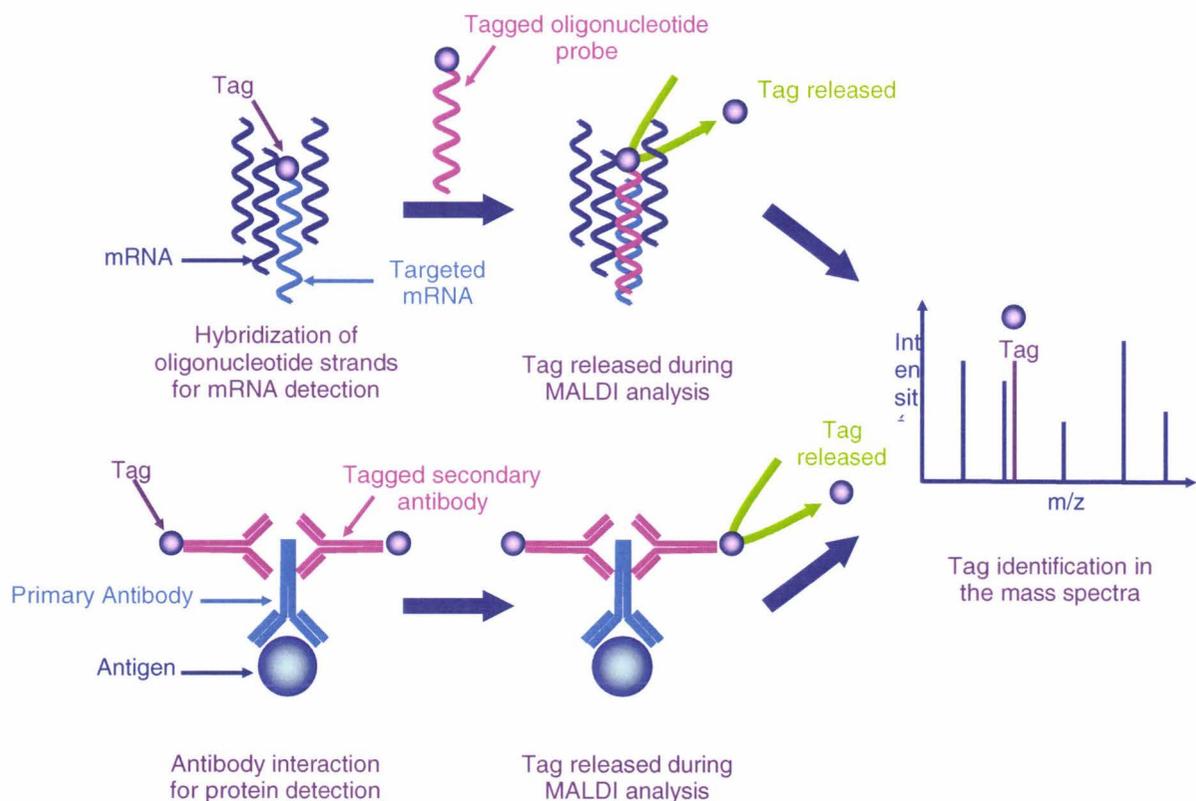


Figure 43. Schéma de l'ISA-MS et la PCR-MS

Les étapes sont les suivantes :

- La première étape consiste à fixer l'antigène pendant 1heure à 37° C dans un incubateur. 50µL de l'échantillon sont déposés en mélange avec 50µL de solution carbonate bicarbonate pH 9,6. L'anticorps est successivement dilué dans les puits adjacents. Plusieurs lignes sont ainsi réalisées à partir d'une solution mère à 5µg/mL.

Tableau 4.

dilué ½	Antigène	1/4	1/8	1/16	1/32
½	Antigène	1/4	1/8	1/16	1/32
½	Antigène	1/4	1/8	1/16	1/32
½	Antigène	1/4	1/8	1/16	1/32

Tableau 4. Représentation des différents puits et des concentrations d'antigènes correspondantes

- La deuxième étape consiste à faire 3 lavages dans une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline 0,1M) afin d'éliminer le surplus d'antigène non fixé au fond du puit
- La troisième étape consiste à saturer les sites non spécifiques par l'intermédiaire d'une solution de lait à 15 % dans du PBS (incubation 1heure à 37° C, sous agitation) et la fixation de l'anticorps primaire (**tableau 5**).
- La quatrième étape est une étape de 3 lavages successifs dans une solution de PBS afin de préparer la fixation de l'anticorps marqué avec la liaison photoclivable associée au peptide rapporteur.
- La cinquième étape consiste à fixer l'anticorps secondaire marqué sur l'antigène. (Incubation à 37° C pendant deux heures, sous agitation).

| Anticorps
secondaire Tag-
mass 1/2 |
|--|--|--|--|--|
| 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 | 1/4 |
| 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 | 1/8 |
| 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 | 1/16 |

Tableau 5. Représentation des différents puits de dépôts d'anticorps secondaire Tag-mass et les concentrations correspondantes.

- La sixième étape consiste à laver 3 fois avec la solution de PBS 0,1M et de l'eau afin d'éliminer l'anticorps marqué en excès et non fixé et de préparer l'analyse en spectrométrie de masse.
- La septième étape consiste à cliver la liaison photoclivable sous une lampe UV (incubation pendant 15 minutes) et ajouter 30µL d'eau pour resuspendre l'ensemble.
- La huitième étape consiste à analyser par MALDI-TOF la solution obtenue : Pour cette analyse l'échantillon est déposé (1µL) sur une cible avec de la matrice HCCA (10mg/mL) qui permet le transfert d'énergie du laser (337nm) à l'échantillon et l'ionisation-désorption de celui-ci. Les spectres obtenus montrent l'ensemble des molécules ionisés en fonction du rapport masse sur la charge (m/z). Ici nous recherchons l'ion caractéristique du peptide rapporteur i.e. la bradykinine avec l'ajout de la cystéine associée à la liaison photoclivable. La masse attendue est de 1164 m/z) L'intensité du pic après normalisation des spectres permet la quantification du peptide rapporteur ainsi corrélé à la quantité d'antigène déposé dans le puit de microtitration.

4.2.2. PCR-MS

Deux types de stratégies peuvent être développées soit l'utilisation d'une sonde oligonucléotique marquée du coté 5' soit d'une base de type Uracile est marquée directement. Les procédés de synthèses sont déjà présentés dans le chapitre précédent et dans le brevet (WO2007/00669)

Cas 1 : Primer marqué en 5'

Amplification d'Oligopeptides Marqués par Technique PCR

La stratégie choisie consiste à synthétiser des amorces PCR portant les marqueurs Tag-mass puis de réaliser l'amplification de la sonde par technique de PCR classique (**Figure 44 et 45**). La première étape de cette étude consiste à tester la compatibilité des oligonucléotides marqués avec la technique PCR et de vérifier la possibilité d'utiliser l'ensemble des sondes dans une même approche. Cette approche est testée avec une séquence correspondant à la protéine Calmodulin Binding Protein (CBP) de souris, protéine redondante chez la souris (la séquence marquée GAC CAG ATC TTG CCG TCT). Différents températures ont été utilisées

dans le but d'optimiser la PCR. Un gel d'agarose avec bromure d'éthidium (BET) a été réalisé afin d'observer la bonne synthèse des sondes ADN marquées.

Figure 44. Formule développée du marqueur utilisé pour l'amplification PCR à partir des amorces codant pour la proenképhaline. donnant ainsi la concentration de l'échantillon test.

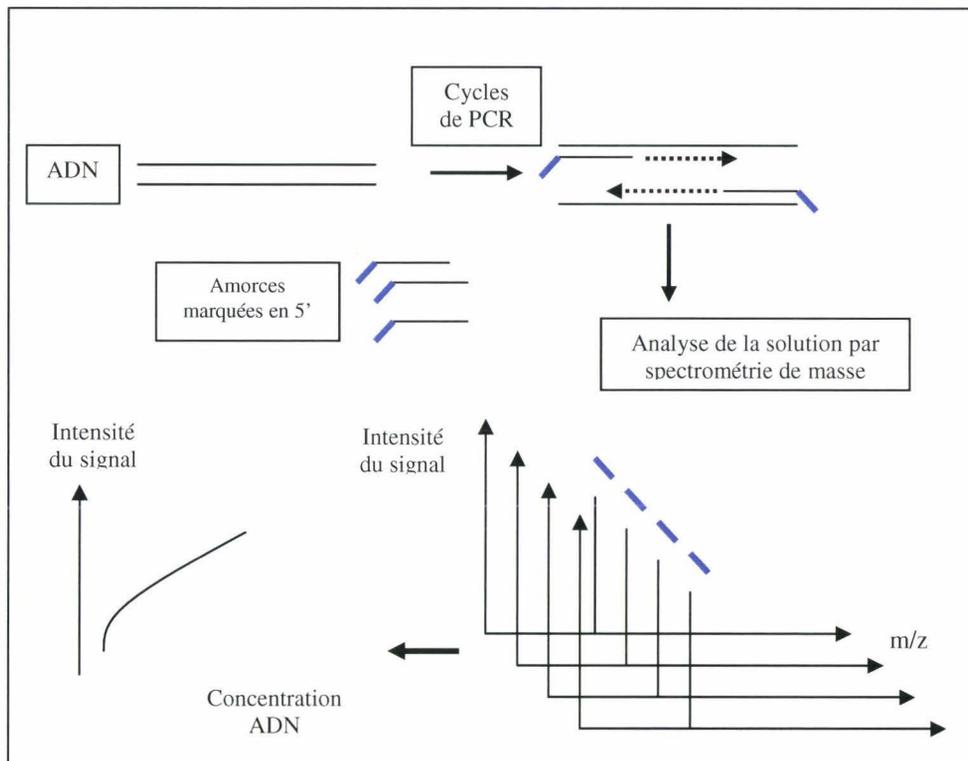
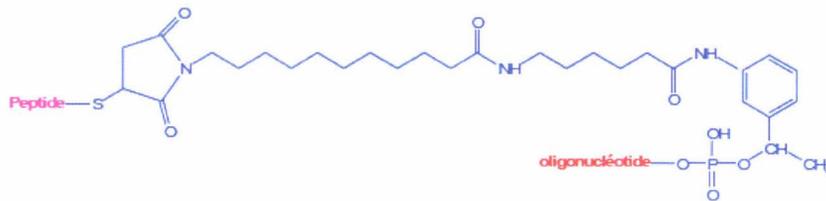
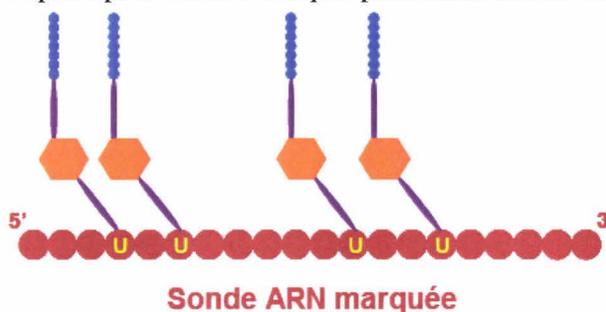


Figure 45. Méthode de PCR MS. La PCR est réalisée avec une séquence marquée avec un Tag-Mass. Une gamme étalon avec des concentrations connus est réalisée avec un échantillon test. Une courbe est tracée en fonction de la concentration des échantillons témoins et du signal obtenu avec le spectromètre de masse, donnant ainsi la concentration de l'échantillon test.

Cas 2 : Uracile Taggé

Pour augmenter la sensibilité un second Tag-mass (**Figure 46**) est utilisée pour la réalisation de la PCR-MS. (Les uraciles modifiés ont été utilisés pour réaliser une sonde de Proenképhaline (400 pb.).

Figure 46. Schéma de principe d'uraciles marqués permettant la réalisation de ribosondes



Cette fois-ci des amorces conventionnelles sont utilisées dans les deux cas. La première ribosonde est amplifiée avec des uraciles et la deuxième avec des uraciles marqués (**Figure 47**). Après transcription et purification, ces deux sondes sont analysées par spectrométrie de masse MALDI et en gel d'agarose avec BET (pour vérifier la taille des transcrits).

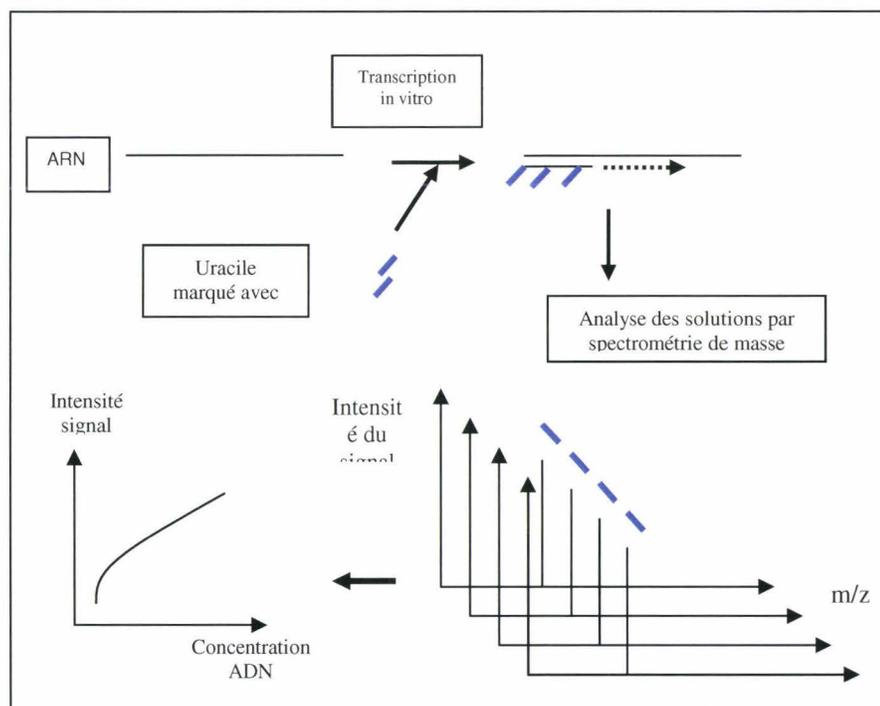


Figure 47. Méthode de PCR-MS. La transcription est réalisée avec un uracile marqué avec un Tag-Mass. Une gamme étalon avec des concentrations connues est réalisée avec un échantillon test. Une courbe est tracée en fonction de la concentration des échantillons témoins et du signal obtenu avec le spectromètre de masse, donnant ainsi la concentration de l'échantillon test

4.3. Résultats

La méthode d'ISA-MS utilise une lampe UV qui irradie les puits d'anticorps marqués. Cette approche nécessite donc d'optimiser le temps d'incubation sous la lampe UV de la plaque contenant les anticorps. Les tests montrent que 15 minutes sont suffisantes pour atteindre le plafond de libération du peptide rapporteur (Figure 49).

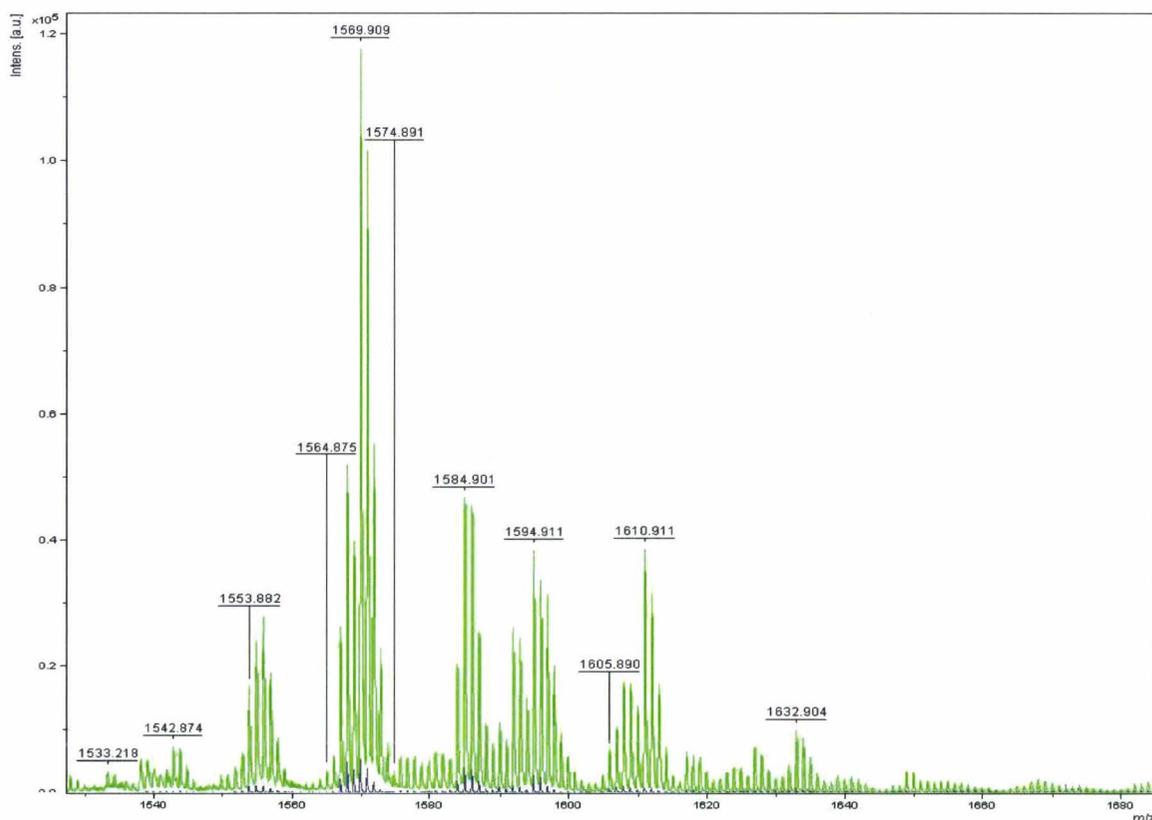


Figure 48. Spectres MALDI du Tag-Mass. En bleu, le signal obtenu sans utilisation de lampe UV. En vert signal obtenu avec irradiation 15 minutes sous lampe UV.

Dans un second temps, différentes gammes de dilution ont été réalisées afin de déterminer la gamme de concentration la plus large ayant la sensibilité la plus forte et un bruit de fond faible. Le bruit de fond correspond au puit n'ayant pas reçu d'anticorps primaire et où seul l'antigène et l'anticorps secondaire sont injectés. On a alors un signal provenant de la fixation non spécifique de l'anticorps secondaire. (Figure 49).

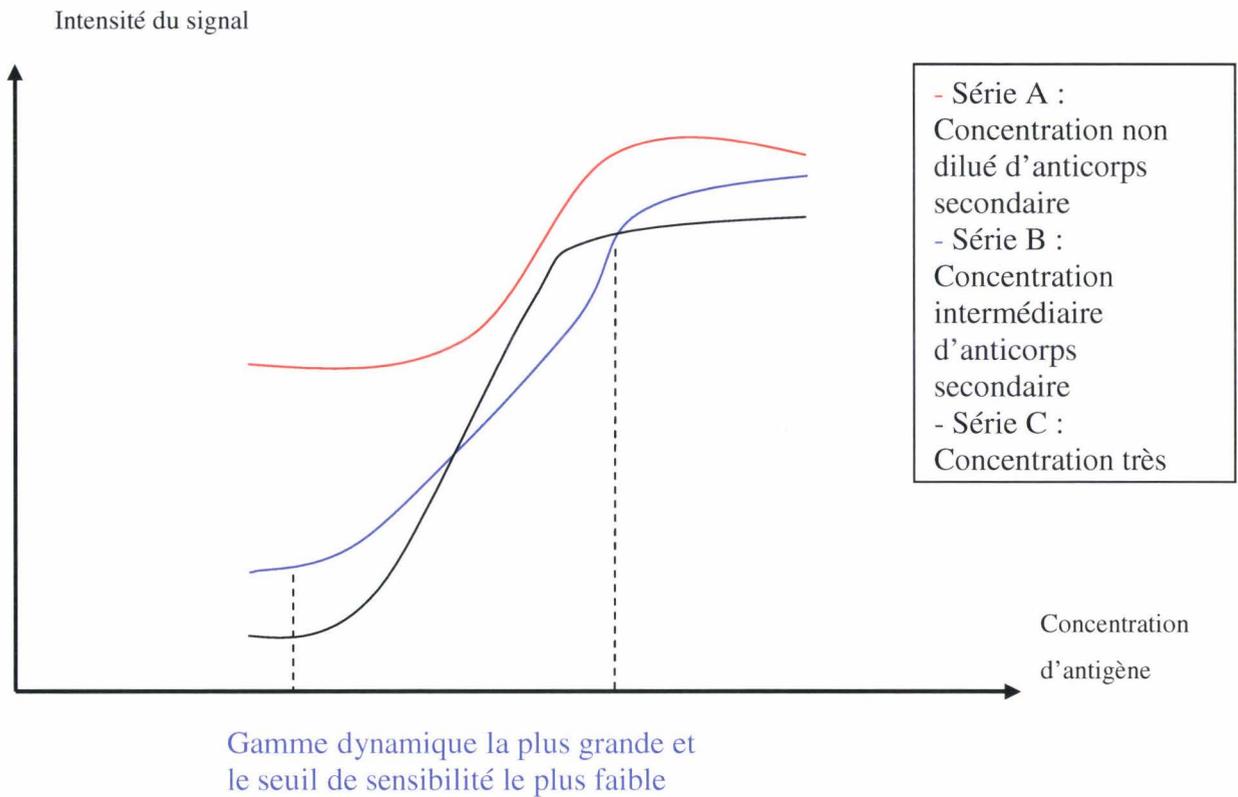


Figure 49 : Représentation graphique des différentes séries de mesures d'intensité relative MALDI en fonction de la concentration d'antigène. Chaque série est réalisée avec une concentration d'anticorps secondaire différente de la moins diluée vers la plus diluée.

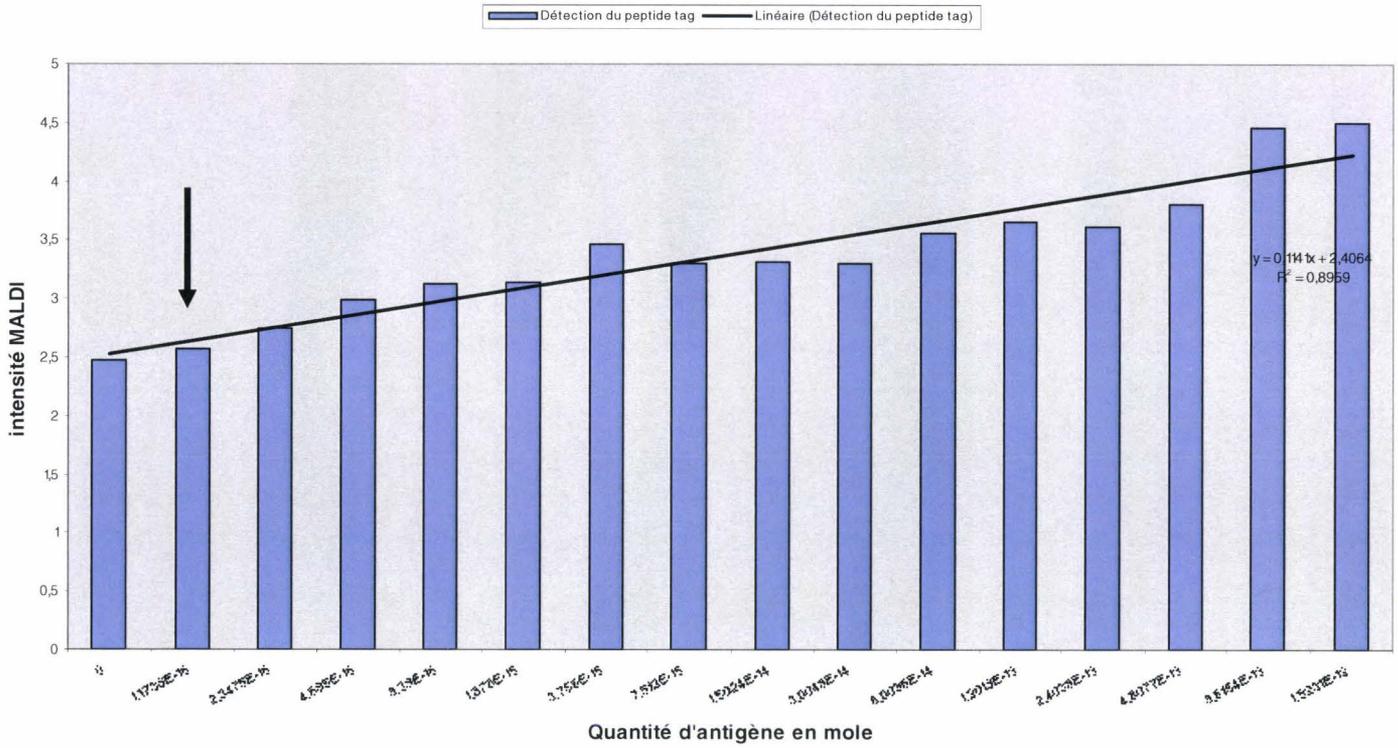
Cette valeur doit être la plus faible possible et détermine le seuil minimum de détection (visible sur la valeur basse la **Figure 49**). L'étude de la variation de la dilution de l'anticorps primaire marqué en fonction de la concentration d'antigène montre que la gamme de lecture est obtenue pour une dilution d'anticorps au 1/16^{ème}. De plus cette gamme de dilution détermine en une seule réaction la sensibilité de l'approche ISA-MS, et la plage d'utilisation de l'anticorps marqué. (Figure 50) Le seuil de détection est atteint dans le puit numéro 16 de la série avec une dilution de 2^{15} soit une dilution de l'antigène de 1/32768. (**Tableau 6**) La quantité d'antigène détecté est de l'ordre de 10^{-11} g d'antigène. La sensibilité alors obtenue par la méthode pour n'importe quelle protéine est de 10pg (inférieur au femtomole), d'une petite protéine de quelques Dalton à de très imposantes protéines de plus de 100 kDa.

Concentration antigène g/mL	quantité d'antigène en g	Intensité normalisée 1/16 D	Intensité normalisée 1/32 E	Intensité normalisée 1/64 F
0	0	300	348	320
3,05176E-10	1,52588E-11	368	320	501
6,10352E-10	3,05176E-11	551	245	1160
1,2207E-09	6,10352E-11	982	733	1338
2,44141E-09	1,2207E-10	1327	1272	4649
4,88281E-09	2,44141E-10	1389	1730	1985
9,76563E-09	4,88281E-10	2910	2850	1737
1,95313E-08	9,76563E-10	2000	2000	1600
3,90625E-08	1,95313E-09	2074	1311	1421
7,8125E-08	3,90625E-09	1978	2446	588
1,5625E-07	7,8125E-09	3684	3433	361
3,125 ^e -07	1,5625E-08	4552	3809	1612
0,000000625	3,125E-08	4095	3650	3192
0,00000125	6,25E-08	6469	6989	8875
0,0000025	0,000000125	29000	19000	5771
0,000005	0,00000025	31000	40000	27000

Tableau 6. Intensité normalisée obtenue à partir des différentes séries de dilution en fonction de la concentration de l'antigène déposé dans le puit.

Dans ces conditions, les résultats de l'étude permettent une détection de quelques femtomoles d'antigènes détectés. (Voir la flèche dans la **Figure 50**) En comparaison, la même approche utilisant les mêmes conditions (concentrations) en ELISA classique, donne une sensibilité 100 fois inférieure (**Figure 51**).

Figure 50. Courbe de sensibilité de l'approche ISA-MS avec l'ensemble des intensités du signal MALDI en fonction de la quantité d'antigène déposé dans le puits (mole). La flèche représente la limite de détection de la méthode



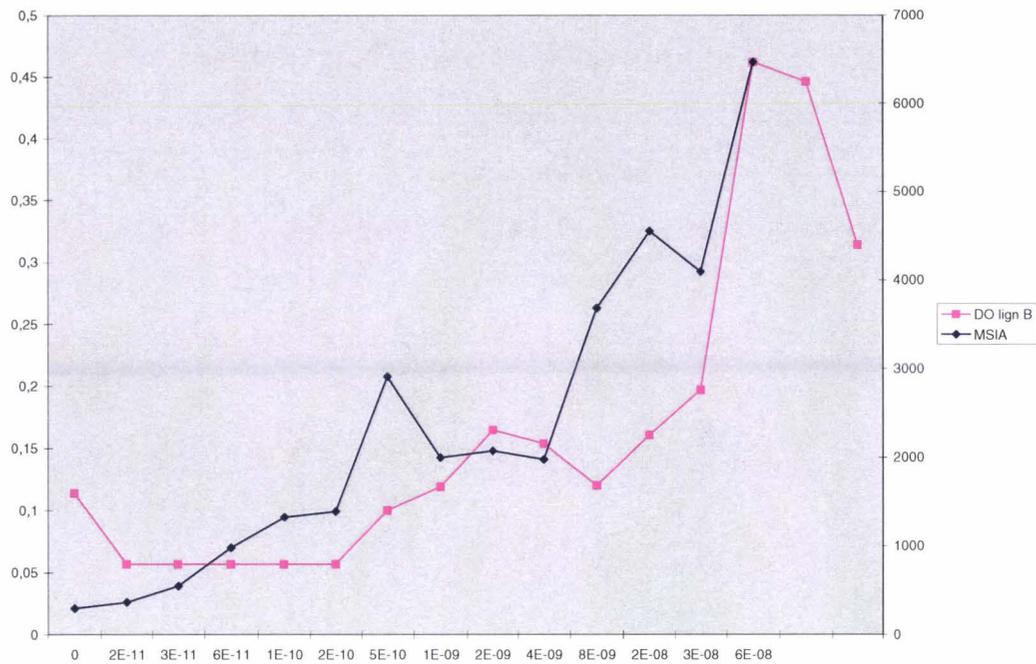


Figure 51. Courbe représentant l'intensité de détection des anticorps marqués. En rose, ligne de détection par ELISA et en bleu par spectrométrie de masse

L'approche PCR-MS

Cas 1 : Primer marqué en 5'

Amplification d'Oligopeptides Marqués par Technique PCR

L'oligopeptide 3 a été utilisé pour réaliser une amplification PCR sachant que l'oligonucléotide correspondait à une partie de la séquence correspondant à la protéine Calmodulin Binding Protein (CBP) de souris, une protéine redondante, et pouvait donc servir d'amorce PCR gauche. Après avoir dessinées deux amorces droites, une courte et une longue pour cette même protéine (GAC CAG ATC TTG CCG TCT), les expériences PCR ont été effectuées. La **Figure 52** présente les résultats obtenus après amplification PCR puis séparation des oligonucléotides sur gel d'agarose avec bromure d'éthidium (BET).

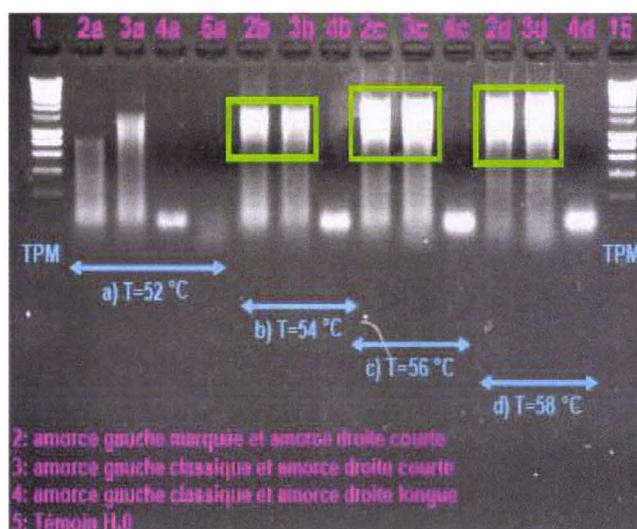


Figure 52. Gel d'agarose avec BET de fragments d'ADN amplifiés par PCR à partir d'oligopeptide. Puits 1 et 15 sont les marqueurs de poids moléculaire. a) PCRT=52°C b) PCR=54°C, c) T=58°C,

Différentes conditions ont été testées. Tout d'abord quatre températures de PCR, puis pour chaque température a été comparée (**Figure 52**) Le gel montre que les amplifications sont faibles à 52°C et beaucoup plus importante pour $T > 52^{\circ}\text{C}$. Les puits 4 (amorce droite longue) conduisent à une amplification de 100 bp attendue pour la séquence codant pour la CBP. Les puits 3 (amorce droite courte) conduisent à deux bandes correspondant à l'amplification de deux séquences, respectivement à 100 bp correspondant à la CBP et une bande à un poids moléculaire autour de 2,5 kb. Cette bande n'était pas attendue mais pourrait correspondre à une amplification de l'ADN génomique de la CBP. On peut également faire l'hypothèse d'une amplification non spécifique. Enfin, il est en particulier importante de comparer les puits 3 et 4 (amorce droite courte et amorce gauche marquée et non marquée), puisqu'il est possible d'observer une amplification identique dans les deux. Ceci démontre que la présence du marqueur ne semble en aucun cas gêner la Taq-polymérase dans son rôle d'élongation et valide la possibilité d'utiliser la technique PCR pour réaliser des sondes oligonucléotidiques portant le marqueur d'intérêt. Sur le même principe une sonde de 400 pb codant pour la proenkephaline a été amplifiée et analysée en MALDI-TOF-MS (**Figure 53 et 54**). Ces résultats confirment la faisabilité du concept.

Figure 53. Spectres MALDI en mode linéaire positif des amorces codant pour la Proenképhaline synthétisé avec un marqueur en position 5' spectre de l'amorce gauche b) spectre de l'amorce droite.

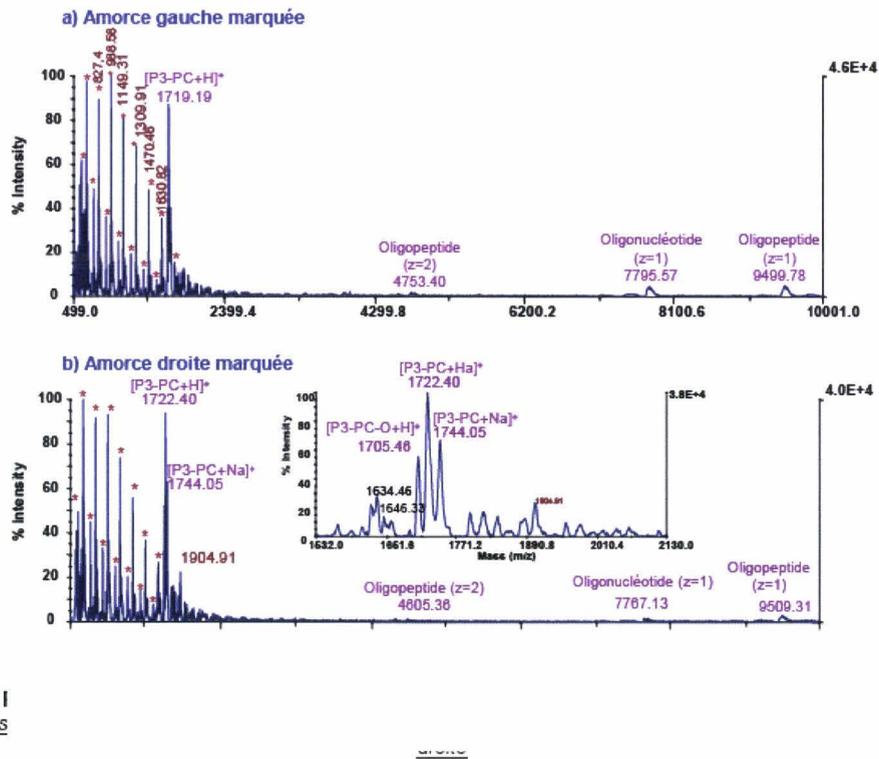
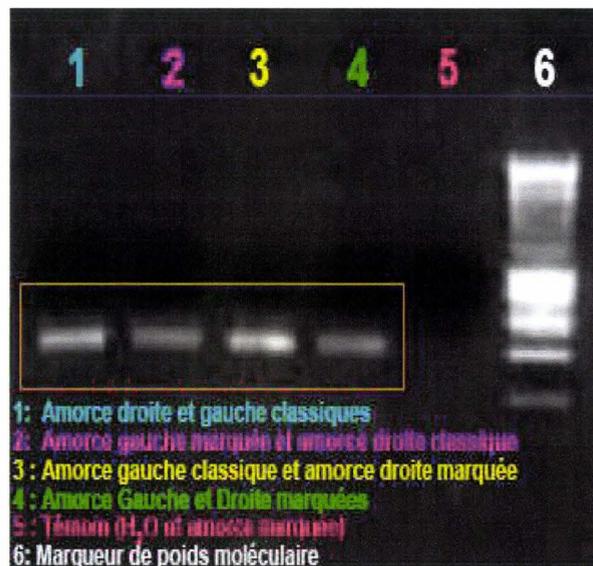


Figure 54. Spectres MALDI en mode linéaire positif des amorces codant pour la Proenképhaline synthétisé avec un marqueur en position 5' spectre de l'amorce gauche b) spectre de l'amorce droite.



Cas 2 : Uracile Taggé (Figure 55)

Les gels d'agarose obtenus permettent d'observer pour les deux cas une bande d'amplification à la même valeur de poids moléculaire et correspondant au poids attendu pour le fragment de proenképhaline étudié. La **Figure 55** présente les spectres MALDI correspondants et obtenus sur la sonde classique (bas) et la sonde modifiée (haut). Les conditions d'analyse sont choisies pour l'analyse des peptides et la sonde totale n'est en aucun cas recherchée dans ces expériences. Il est observable que les deux spectres présentent des ions différents. La sonde modifiée conduit à l'observation d'une série de pics à m/z 1131, 1165, 1203 et 1246 correspondant à priori aux peptides marqueurs portés par la sonde, ions non observés pour la sonde classique. L'ion à m/z 1165 confirme la présence du Tag-mass.

A m/z 1203, le pic étant distant d'environ 38 u, ils pourraient être attribués à un cation potassium lié au milieu de réaction. A m/z 1131, l'ion proviendrait d'une fragmentation de chaîne latérale de la cystéine avant le pont S-S. Même si tous les signaux n'ont pu être encore attribués, ils sont nettement visibles avec un bon rapport S/B sur le spectre correspondant à la sonde modifiée démontrant qu'une sonde marquée par les uraciles modifiés a bien été réalisée.

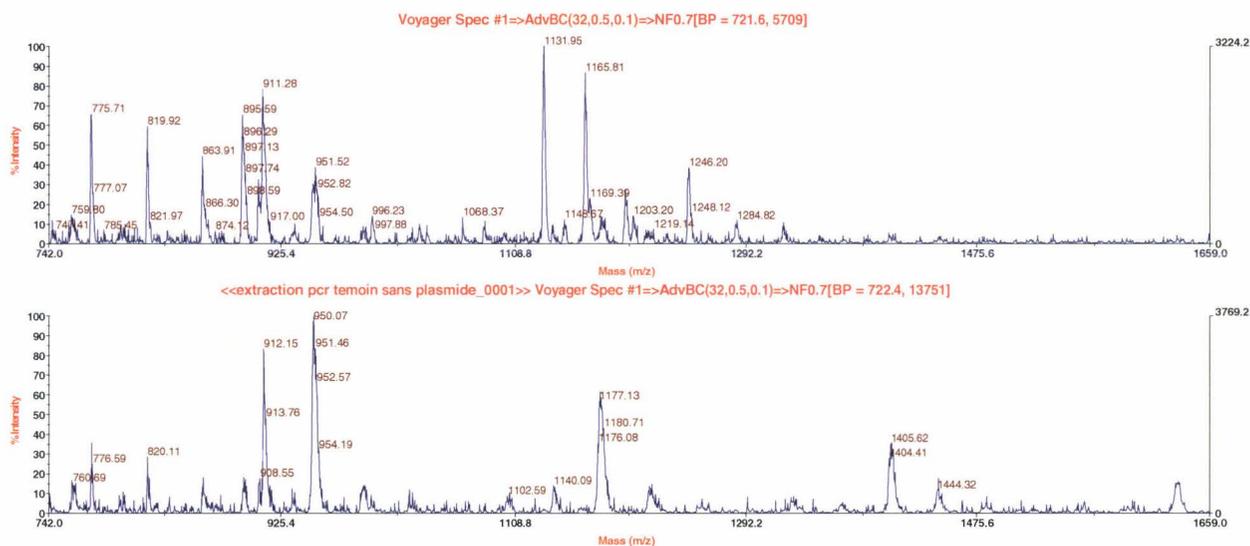


Figure 55. Spectre MALDI en mode réflecteur réalisé après purification sur la sonde proenképhaline amplifiée par PCR. haut) sonde marquée amplifiée avec U marquée ; bas) proenképhaline classique amplifiée avec Uracile non modifié

4.4. Conclusions et perspectives

Nous proposons ici deux méthodes nouvelles de quantification par Tag-mass par spectrométrie de masse avec une très bonne sensibilité (gain d'un facteur 100 par rapport aux méthodes classique d'ELISA) et la réalisation d'analyse de transcrit en multiplexe par PCR-MS. Ces deux nouveaux tests permettent à la fois de détecter des concentrations très faibles d'analytes en un temps très courts (deux heures) avec une sensibilité beaucoup plus faible que celle utilisée actuellement en ELISA dans le milieu clinique et celui de la recherche biologique. Sans avoir atteint ses limites de sensibilité, la méthode montre déjà certains avantages : **La sensibilité** est bonne puisque 100 fois inférieur à la méthode d'ELISA. De plus, elle a l'avantage de pouvoir quantifier un nombre très important de molécules dans une même expérience. Comme expliqué précédemment dans le **chapitre 2**, il est possible d'utiliser entre 20 et 30 sondes différentes et ainsi réunir en unique expérience un marquage simultanée de biomolécules appelé **multiplexe**. Le gain de temps inhérent est important si on considère par exemple 4 ou 5 marqueurs. Aujourd'hui il est reconnu qu'un seul biomarqueur spécifique n'est probablement pas suffisant pour déterminer une pathologie de façon précise. On considère alors que plusieurs marqueurs sont à corrélés et à quantifier dans une même approche pour déceler une éventuelle maladie. Il est donc nécessaire de posséder des outils permettant de les quantifier et de réaliser un diagnostic sûr. L'outil développé de quantification par spectrométrie de masse et Tag-mass répond à ces dispositions avec un gain de temps et une sensibilité qu'aucune approche ne permette aujourd'hui.

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

Cependant, des optimisations rapides sont envisagées avec l'utilisation par exemple de plaque Anchorchips (cible MALDI de surface hydrophobe avec des points de dépôts hydrophiles) qui permettent de gagner généralement un gain de sensibilité d'un facteur 10. De plus, la totalité de l'échantillon n'est pas repris lors du dépôt sur la plaque MALDI. En effet, un microlitre est déposé parmi les 30 μL utilisés pour reprendre l'échantillon après clivage

aux UV. On peut estimer qu'un gain d'un facteur 20 à 30 est envisageable ce qui donnerait un gain d'un facteur 1000 à 2000 par rapport à une approche de type ELISA. Il est bien évident que cette approche peut être développée sur d'autres appareils de spectrométrie de masse puisque le peptide est en solution. Il peut être injecté en electrospray par exemple qui a l'avantage de ne pas utiliser de matrice. L'élimination de ce biais souvent critiqué dans l'approche MALDI permet une meilleure précision dans la quantification.

Cette approche permet d'utiliser toute la sensibilité de la spectrométrie de masse (femtomole) et la spécificité des anticorps ou des aptamers mais aussi des lectines. De plus, avec un mode multiplexe envisageable, il est alors possible de réaliser des quantifications rapides de plusieurs molécules d'ARNm ou des protéines en une étape unique.

CHAPITRE 5. DEVELOPPEMENT DE L'IMS

5.1. Développement de l'IMS aux tissus congelés

5.1.1. Introduction

L'imagerie MALDI développée depuis maintenant 10 ans montre un intérêt croissant pour la chasse aux biomarqueurs dans le cadre de la recherche clinique que ce soit pour l'étude de cancer de la prostate, des gliomes ou du colon (Schwartz, Weil et al. 2004; Xie, Xu et al. 2005; Meistermann, Norris et al. 2006; Schwamborn, Krieg et al. 2007; Shimma, Sugiura et al. 2007). Cependant un certain nombre de paramètres sont encore à optimiser afin d'augmenter résolution et sensibilité. Ces paramètres sont ici discutés dans ce chapitre et reprennent le travail de thèse réalisé au laboratoire avec une application dans le cadre de recherche de biomarqueurs dans le cancer des ovaires. Le travail a donc été d'appliquer tous les éléments d'optimisation de l'imagerie MALDI et de l'analyse directe sur tissu en vue de chercher des biomarqueurs au sein des tissus ovariens et des liquides d'ascite (liquide qui s'accumule dans la cavité du péritoine autour de l'ovaire tumoral).

5.1.2. L'échantillon

L'étude entreprise par R. Lemaire au sein du laboratoire était de développer des méthodes de traitement des coupes de tissus afin d'améliorer la sensibilité des analyses par imagerie MALDI sans perdre en reproductibilité (Lemaire, Tabet et al. 2006). Dans le cadre de la recherche de biomarqueurs dans le cancer de l'ovaire, des expériences ont été reprises afin d'optimiser les paramètres *i.e.* le mode de stockage pour empêcher la dégradation et la bonne reproductibilité des analyses et le traitement afin de mettre le tissu dans les meilleures conditions d'analyse MALDI pour en augmenter la sensibilité.

La collaboration avec l'hôpital Jeanne de Flandre (service du Pr. D. Vinatier) a permis la mise en place d'une procédure en relation avec les blocs opératoires permettant de prélever le tissu et le sang, les étiqueter et les stocker l'échantillon dans de la glace sur les lieux de l'opération dans des conditions reproductible avant d'être stockés au laboratoire à -80°C. Le

prélèvement comprend le tissu ovarien bénin ou malin, le prélèvement du liquide d'ascite ou le lavage péritonéal.

Le traitement des coupes a été réalisé avec l'utilisation de l'éthanol, du xylène, du chloroforme. Les meilleurs résultats ont été enregistrés avec un lavage chloroforme, solvant apolaire (**Figure 56**). Ce lavage est réalisé avec 200 μ L de chloroforme disposé sur lame. Le chloroforme semble désordonner la bicouche lipidique de la membrane et donner accès plus facilement au cytoplasme des cellules. Ce phénomène est dû à l'affinité très forte du chloroforme avec les éléments apolaire que sont les lipides. Ces résultats ont été observés par d'autres équipes en utilisant notre protocole (Altelaar and Heeren 2007) et confirment bien l'utilité de notre approche.

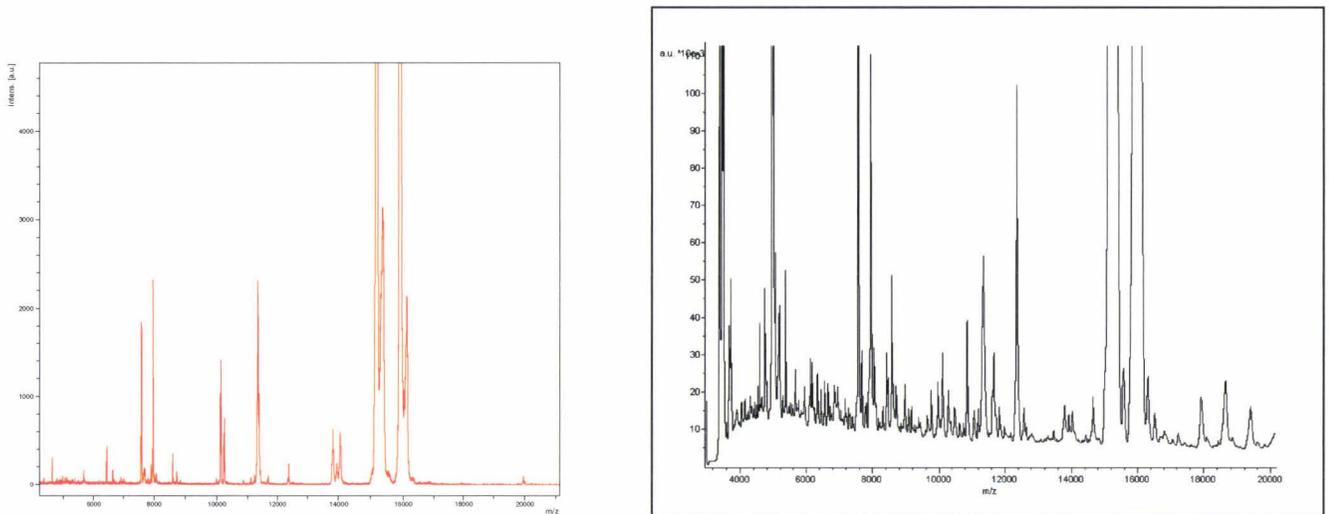


Figure 56. Spectre MALDI issu d'une analyse du même tissu ovarien. A gauche une analyse sans traitement chloroforme. A droite une analyse ayant au préalable lavé au chloroforme.

5.1.3. Le cancer de l'ovaire

Le cancer de l'ovaire concerne une large population définie comme une population à risque: les femmes âgées de plus de 50 ans, celles âgées de plus de 35 ans ayant des antécédents personnels ou familiaux de cancers du sein, du colon, de l'ovaire et celles pour qui une mutation du gène BRCA1 ou BRCA2 est connue. (Sharma and Menon 2006). La plupart des cancers de l'ovaire sont sporadiques, seuls 5 à 10% résultent de facteurs héréditaires. (Breedlove and Busenhardt 2005) Le cancer de l'ovaire est responsable de plus de

décès par an que le cancer du col de l'utérus et celui de l'endomètre réunis. {An, 2006 #224} Il est non seulement la 4^{ème} cause mondiale de mort par cancer mais aussi la première cause de mortalité due à une tumeur maligne gynécologique dans les pays développés.

Il est responsable de 6,1% de l'ensemble des décès par cancer chez la femme.(Bast, Badgwell et al. 2005) Le taux brut annuel de mortalité en France est de 11,6 pour 100 000 et le taux annuel de décès standardisé sur la population mondiale est de 5,4 pour 100 000. L'incidence brute annuelle en France est de 14,9 nouveau cas pour 100 000 femmes et le taux annuel d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 9 pour 100 000. (Bast, Badgwell et al. 2005) Sa prévalence dans la population générale est de 40 cas pour 100 000 femmes âgées de plus de 50 ans. Le dépistage de masse du cancer de l'ovaire est donc indispensable car une détection précoce permettrait une réduction significative de la mortalité. En effet, le taux de survie à 5 ans du cancer de l'ovaire découvert à un stade I se situe entre 90 et 95 % (82% au stade Ic), alors que ce taux chute à 10-15% pour les stades IV (28% pour les stades III). (Boyce and Kohn 2005 ; Williams, Touns et al. 2007) (**Tableau 7**). Il n'existe, à ce jour, aucun moyen de détecter les lésions précancéreuses de l'ovaire. Quant aux stades précoces du cancer de l'ovaire, la détection est basée sur des symptômes physiques malheureusement trop souvent absents, l'examen clinique et le dosage du marqueur tumoral CA 125 seul ou associé à l'échographie transvaginale. Cependant ces moyens ne sont, ni assez sensibles, ni assez spécifiques. (Neesham 2007) (Chan and Selman 2006). Ainsi 70% des diagnostics de cancers de l'ovaire sont posés après leur progression en dehors du pelvis. (Breedlove and Busenhardt 2005) (Ulusoy, Akbayir et al. 2007) (**Tableau 7**)

De nombreux marqueurs du cancer de l'ovaire ont été testés : CA 125, CA 19.9, acide lysophosphatidique lipidique (LPA). Le CA 125 (glycoprotéine de haut poids moléculaire et biomarqueur sanguin) est la molécule la plus étudiée dans le cadre du cancer de l'ovaire : pour le dépistage, comme facteur pronostique, comme aide à la détermination de la malignité ou la bénignité d'une tumeur ovarienne ou encore comme élément prédictif de réponse thérapeutique (Chan and Selman 2006) Le CA 125 est exprimé dans les cancers primitifs épithéliaux ovariens mais également dans les cancers du pancréas, du poumon, du sein et dans de nombreuses situations pathologiques bénignes telles que l'endométriose, le premier trimestre de grossesse, l'artérite, les maladies rénales, les infections génitales, les fibromes, les irritations séreuses et même l'ovulation. Il n'est donc pas assez spécifique avec des taux de faux positifs et de faux négatifs aux stades précoces inacceptables (le CA 125 est augmenté dans seulement 50% des stades I et dans plus de 80 à 90% des stades III et IV). (Rapkiewicz,

Espina et al. 2004 ; Williams, Toups et al. 2007) De plus, sa valeur prédictive positive est seulement de 10% (si utilisé seul comme moyen de dépistage). Ainsi, le CA 125 ne remplit pas les deux conditions essentielles pour un bon test de dépistage : dépister les cancers précocement chez des femmes asymptomatiques et avoir un taux de faux positifs faible. Son utilisation comme seul test de dépistage est donc inadaptée et non recommandée.

Les seuls cas où le dosage du CA 125 présente un intérêt sont (Ulusoy, Akbayir et al. 2007) :

- Les femmes présentant des antécédents familiaux ou personnels de cancer de l’ovaire, du sein, du côlon et celles ayant une prédisposition génétique en rapport avec une mutation des gènes BRCA1 et BRCA2. Il est alors recommandé de réaliser un dosage du CA 125 en association avec l’échographie et l’examen clinique (fréquence restant à déterminer).
- Les patientes ménopausées présentant un kyste ovarien persistant asymptomatique sans critères échographiques de malignité (kyste uniloculaire, anéchogène, de grand axe inférieur à 5 cm, à parois fines, sans cloison ni vascularisation anormale au Doppler). Dans ce cas, la négativité du CA 125 permet d’éviter une chirurgie abusive
- En pré opératoire afin de suivre l’évolution de la maladie durant la prise en charge thérapeutique associé au suivi clinique et radiologique.

Le dépistage sur un mode multimodal (dosage du CA 125 associé à une échographie transvaginale) offre la meilleure spécificité et la meilleure valeur prédictive positive pour la détection des stades précoces mais la valeur prédictive positive (VPP) restant insuffisante (20%) et la fréquence de réalisation de ces examens est encore imprécise. (Lykins, Pavlik et al. 2007) (2007)

On comprend mieux l’urgence à développer un test de dépistage ayant une sensibilité et une spécificité de 100% pour la détection des stades précoces de cancer de l’ovaire afin de diminuer la mortalité et la morbidité de cette maladie. D’autant plus qu’à ces stades une chirurgie +/- associée à une chimiothérapie permet des taux de survie à 5 ans de 90%.

Tableau 7. Classification FIGO et TNM du cancer de l'ovaire.

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

5.1.4. Résultats

L'optimisation de la méthode d'imagerie MALDI sur les tissus congelée a été appliquée pour la détection et l'identification de biomarqueurs peptidique et protéique dans le cancer de l'ovaire. Pour chaque patiente testée, il a été réalisé une coloration HES, une analyse MALDI directement sur coupe tissulaire et des lavages chloroformes sur plusieurs coupes. Pour cela, nous avons donc mis au point un protocole de lavage de coupes tissulaires ovariennes au chloroforme.

La coloration HES permet d'établir la zone cancéreuse, et la pathologie associée. Le protocole de lavage au chloroforme présente **un double avantage** : valider la présence des nouveaux biomarqueurs candidats par une autre méthode que l'analyse directe et obtenir ces biomarqueurs candidats en solution afin de pouvoir en réaliser une identification. Par la suite, nous avons souhaité compléter ce travail par de l'imagerie afin de visualiser la répartition des nouveaux biomarqueurs sur les coupes tissulaires.

L'identification du marqueur prévalant et identifié comme un régulateur du protéasome, a donné lieu à une publication. Depuis d'autres marqueurs ont été identifiés et sont en cours de caractérisation

Publication : Identification de PA 28 marqueur du cancer de l'ovaire :

Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation:
fragment of the 11S proteasome activator complex , Reg alpha fragment, is a
novel ovary cancer biomarker

Remi Lemaire^{1ξ}, Sonia Ait Menguellet^{1,2ξ}, Jonathan Stauber^{1ξ}, Valerie Marchaudon^{1,2}, Jean-Philippe Lucot², Pierre Collinet², Marie-Odile Farine³, Denis Vinatier², Patrick Ducoroy⁴,
Michel Salzet^{1*} and Isabelle Fournier^{1*}

1 : Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE-CNRS 2933, MALDI Imaging Team, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

2 : Clinique de Gynécologie, Hôpital Jeanne De Flandre, CHRU Lille, 59000 Lille

3 : service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital Calmette CHRU, 59037 Lille
Cedex

4 : Plateforme Protéomique, IFR 100-Santé-STIC, 8 Boulevard du Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon, France

^ξ: Equal contribution;

- co-corresponding authors : Michel Salzet (michel.salzet@univ-lille1.fr) or Isabelle Fournier (isabelle.fournier@univ-lille1.fr)

Abstract: MALDI imaging mass spectrometry represents a new analytical tool to directly provide the spatial distribution and relative abundance of proteins in tissue. 25 ovary carcinoma (stages III and IV) and 23 benign ovaries were directly analysed by MALDI-TOF-MS. The biomarker with the major prevalence (80%) has been fully characterized using MALDI-MS and Nano-ESI trypsin peptides profiling. The full identification was performed by nano-ESI-QTOF in MS/MS mode. This marker with an m/z of 9744 corresponded to 84 amino acid residues from the 11S proteasome activator complex, named PA28 or, Reg Alpha. Validation of this marker has been performed using MALDI imaging, classical immunocytochemistry with an antibody raised against the C-terminal part of the protein also by specific MALDI with anti-Reg alpha tagged antibody and by Western blot analyses. The whole of this strategy confirmed the epithelial localization of this fragment with nucleus localization in benign epithelial cells and a cytoplasmic localization in carcinoma cells. This point out that this antibody can now be used for discriminating the border line tumor cases. These studies reflect that direct tissue analysis and specific MALDI imaging strategies open the door of biomarker hunting and validation that can be named pathological proteomic.

INTRODUCTION

Ovarian cancer is now the fourth leading cause of cancer death among women in the Europe and the United States, with more than 22,000 new cases and 16,000 deaths reported each year in the US ¹. Despite advances in therapeutic management during the last decade, ovarian cancer remains the most lethal gynaecological malignancy. Indeed, early stage disease is usually asymptomatic, and ovarian cancer typically presents with advanced disease, where the prognosis is poor. Ovarian cancer is diagnosed at a metastatic stage in more at 80% of cases, and is associated with a 5-year survival of 35% in this population. By contrast, the 5-year survival for patients with early stage of the disease exceeds 90%. Screening ovarian cancer at the early stages is today the only way to significantly decrease mortality, without the need to change therapeutic modalities.

Several strategies for diagnosis have been tested in particular endovaginal ultrasound and tumor biomarkers. However due to their low sensitivity at the early stage of the disease none of these tests have been retained for ovarian cancer screening in the case of high cohort.

Among the biomarkers, CA 125 is the one the most studied. CA125 has a sensitivity of 80% and a specificity of 97% in epithelial cancer (stage III or IV), but the sensitivity is around 30% in stage I and its increase can be linked to several physiological phenomena and also detected in benign situation². CA 125 is really useful in the case of risk populations diagnosis or to follow the illness evolution during the therapeutic treatment. In this context, CA 125 is insufficient as a single biomarker for ovary cancer diagnosis. This opens the door to discover other biomarkers using proteomic strategy ³⁻¹⁶. At this time, two strategies have been undertaken by researchers. In fact, several groups try to identified ovary cancer markers in plasma or serum using SELDI-TOF profiling or chromatography coupled to mass spectrometry^{3, 17-23}. Other groups develop a classical proteomic strategy using comparative 2D-gels and then mass spectrometry ^{15, 24-26}.

Here, we proposed another strategy based on direct tissue analysis, peptide profiling from carcinoma and benign tumor comparison followed by MALDI Imaging. The most prevalent peptide is subjected to a peptide extraction and characterization followed by validation through Western Blot and Immunocytochemistry and specific MALDI Imaging. In this context, we discovered a new biomarker for such a cancer, a fragment of the immunoproteasome P28.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Tissues, ascites and cyst fluids were obtained, with informed consent and institutional review board approval (CCPPRBM Lille: CP 05/83), from patients undergoing any ovarian tumor resection at Hospital Jeanne de Flandre. Total of 48 tissue samples from 25 patients grade III, IV ovarian cancer patients and 23 benign tumors, were analyzed. Patient information was collected, including gender, age, treatment received before and after surgery, extent of surgery, current status (alive, alive with progressive disease, deceased, and cause of death), and survival from the time of original pathologic diagnosis. Samples were collected at the time of surgery, immediately frozen, and stored at -80°C until analysis. Typically, 10–12 μm thick sections are cut using a cryostat and thaw-mounted on a flat electrically conductive sample slices. Histopathologic diagnoses were made by an anatomopathologist, blinded to the original clinical diagnosis, from subsequent H&E-stained sections.

Ascites and cyst fluids were collected in heparin tubes and immediately subjected to an acidic extraction with 1N HCl (V/V).

Peptides tissues extractions

Biopsies were frozen in liquid nitrogen before homogenized and extracted with HCl 1N (w/5v) and let on rocking over night at 4°C. After centrifugation at 12,000 rpm for 30min at 4°C, the pellet was re-extracted once. The two supernatants were combined and loaded on Sep-Pak C18 cartridges (500 µl extract/cartridge; Waters). After washing with 5 ml acidified water (0.05% TFA, Pierce), elution was performed with 5ml 60% acetonitrile in acidified water (0.05% TFA). The 60% eluted fraction was reduced in a vacuum centrifuge (Savant). The 60% eluted fraction was taken up with 100 µl acidified water (0.05% TFA° and fractionated on a C18 Reversed-phase HPLC column (4.6 mm x 25 cm, Interchim) equilibrated with acidified water (0.05 % TFA); Elution was performed with a linear gradient of acetonitrile in acidified water (0.05%) from 0 to 70% at a flow rate of 500µl/min. each fractions were collected manually before evaporated in SpeedVac vacuum and taken up with 50µl of HPLC grade water. Each fraction was analyzed in MALDI-TOF-MS before subjected to a trypsin digestion.

Trypsin digestion

After drying, samples were placed on ice for 30 min in 50 µl of protease solution (sequence grade-modified trypsin, Promega, at 0.02 mg/ml in 25 mM ammonium bicarbonate). Digestion was performed overnight at 37 °C . Peptide extraction was performed twice 15 min with 50% acetonitrile, 1% TFA for further MALDI-MS analysis or with 50% acetonitrile, 1% formic acid for further ESI-MS/MS analysis. Trypsin digests were then lyophilized in a SpeedVac concentrator and resuspended in 5 µl of 0.1% formic acid.

Material

α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH), ammonium bicarbonate, trisma base, xylene, ethanol, Angiotensin II, Des-Arg-

Bradykinin, Substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38 and bovine Insulin were obtained from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Trypsin was from Promega. AspN, LysC enzyme was from Roche. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. from J.T. Baker.

Mass Spectrometry

MALDI-MS

Spectra were acquired on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with delayed extraction (DE) and a 337nm pulsed nitrogen laser. Either HCCA, SA, or 2,4-DNPH were used at concentration's of 10mg/mL, 20 mg/mL and 4mg/mL respectively, in ACN /0.1% TFA:H₂O (2:1, v/v). Matrices were applied onto the tissue using a micropipette (typically 20μL for a whole rat brain slice) and then dried at room temperature. External calibration was performed using a mixed solution of peptides (bradykinin 1.6μM, Substance P 1.6μM, ACTH 18-391.6μM, ACTH 7-383.2μM, bovine Insulin 4.8μM and bovine Ubiquitin 4.8μM in H₂O). Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD camera (SONY). Each spectrum is the average of 200 laser shots of the area of interest. Acquisition parameters were set as follow

-HCCA matrix (mass range 500-10000): acceleration voltage: 25kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.05%, extraction delay time: 200ns.

NanoESI-q-TOF MS analysis

After desalting the trypsin digests on a C18 Zip-Tip (Millipore, Bedford, MA, USA), were loaded into nanoES capillaries (Protana, Odense, Denmark). The capillaries were inserted into an Applied Biosystems Q-STAR Pulsar (Q-TOFMS) using an ion spray source. Doubly charged peptides were selected, fragmented by N₂ collision and analyzed by nanoESI-q-TOF.

Protein identification was performed with MASCOT sequence query search program using SwissProt database filtered for the taxonomy “human”. A tolerance of 2Da for peptide and 0.8Da for MS/MS was set. Only protein sequences with MOWSE score higher than 32 (indicating significant homology or identity) and identified in several samples representing 2 significant MS/MS were considered. Methionine oxydation was defined as variable modification.

MALDI Imaging and Specific MALDI Imaging

Ovaries 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. Before rinsed in chloroform and then analyzed in MALDI ms in the case of MALDI imaging analyses.

For specific MALDI imaging studies, ovaries 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^{27, 28}. The same buffer was used to dilute Reg alpha antibody (1/100), and incubation was performed overnight at 4°C. After 3 times washing in PBS, sections were incubated with anti-Human IgG photocleavable tagged antibody (1/100) overnight at 4°C²⁹.The tissues were then rinsed 3 times during 5 minutes with ultra pure water to remove salts, and sections were kept drying at room temperature before matrix application. Tissues were then, compared using microscopy

Images were obtained in positive linear mode using sinapinic acid (20 mg.ml). 30µL of the mix was applied onto the tissue using a micropipette and dried at room temperature. Acquisition was realized using smartbeam laser, with a repetition rate of 100 Hz. For images reconstruction the FlexImaging v. 2.0 software (Bruker Daltonics, Bremen, DE) was used. For

MALDI imaging, 37699 points covering the whole slice with 300 laser shots per position with masses ranged between 2000-20000 were performed. For specific imaging 2000 points were done with 100 laser shots per position. From each position the software measures an average mass spectrum with its coordinates on the slice.

Immunocytochemistry (ICC)

Immunohistochemistry was performed from paraffin embedded ovarian tissues, using a standard peroxidase-based staining method. Paraffin embedded tissue sections (4 μ m) were dried 12 hours at 60°C, dewaxed with xylene 100% for 5 minutes and rehydrated in brief successive baths of alcohol 100%, alcohol 95% then distilled water. Tissue sections were stored in distilled water for the following steps. Endogenous peroxidase activity was quenched with 10% H₂O₂ in distilled water for 5 minutes. Tissue sections were incubated with the primary anti-PA 28 Alpha C-term antibody (Zymed Laboratories, Invitrogen, ref. 38-2400) at a dilution of 1:50 in TBS for one hour at room temperature. Tissue sections were washed with TBS solution and were incubated successively with the secondary antibody (Biotin-Streptavidine-Peroxidase, Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate) and the chromogen (3,3'-diaminobenzidine) according to the kit manufacturer's instructions (Streptavidin-HRP *Southern Biotechnology and Associates, Inc/USA*). Cellular nucleus were coloured by counterstaining the sections with hematoxylin. The tissue section then were rehydrated and fixed for reading.

Western Blot

Western Blot analysis was carried out from frozen ovarian tissues. Protein samples were obtained by homogenization on ice of 100 μ g of tumor for 3 minutes in 1 ml of extraction buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.02% Sodium azide) supplemented with

protease inhibitors (After sonicated on ice (3 successive steps of 30 seconds), the mixture was placed under agitation at 4°C for 1 hour, followed by centrifugation at 13 000g at 4°C for 30 minutes. The supernatant was removed and stored on ice for the following steps. To achieve protein denaturation before analysis, a 4% SDS buffer was added 1:1 to the supernatant and then the mixture was warmed for 5 minutes at 100°C. For Western Blot analysis, 18µg of proteins (measured out according to Bradford method) were applied onto a 3.9-12% Tris-Glycine SDS-polyacrylamide gel electrophoresis system on a Bio-Rad protean II minigel system. Protein migration was achieved in a Tris-Glycine-SDS buffer (2mM / 129mM / 0.1w/v, pH 8.3) by application of a tension of 80V for 15 minutes followed by 180V for 1 hour. Gels were subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane previously equilibrated 30 minutes in a transfer buffer refrigerated at 10°C. Blots were blocked in 5% milk in PBS for 45 minutes and incubated overnight at 4°C with a rabbit anti-PA 28 alpha C-term antibody (Zymed Laboratories, Invitrogen, ref.38-2400) diluted 1:250. Detection was performed by enhanced chemiluminescence (Amersham) after 1 hour incubation with a peroxidase conjugated secondary antibody (Aventis, Sanofi Pasteur).

Statistical data analysis.

Symbolic discriminant analysis (SDA) was used to analyze the protein profiles. SDA allows determining discriminatory signals and builds functions using these signals that distinguish sample populations based on their classification. Peak lists from MALDI spectra input into the analysis program were clustered according to similarity, using a presence/absence criterion. The Mann-Whitney *U* test and Spearman correlation test were used to test for differences in

the classified staining levels of PA28- α expression between groups for immunocytochemistry. The values of Western blot analysis were estimated by densitometry and compared by ANOVA. Significant differences between groups were determined by Student's *t* test. A *P* value of less than 0.01 was considered to indicate statistical significance. All statistical analyses were performed on a personal computer with the statistical package StatView 5.0 (SAS Institute, Inc., Cary, NC).

RESULTS and DISCUSSION

Mass spectrometric profiling of human ovaries tumors.

A total of 48 tissue samples from (25 carcinoma and 23 benign tumor cell populations) were collected and analyzed by MS. Tissue sections were coated with matrix droplets and were directly analyzed by MALDI MS; serial sections were collected and stained with H&E for histopathology. Over 500 individual mass spectra, representing benign cell populations from benign patients or cancer cell populations from carcinoma ovaries patients, were used for comparative analysis. The spectra were processed and multiple spectra were averaged to generate one peak list per patient or tissue sample. At 100 individual peptide signals in the *m/z* range of 500 to 20,000 were detected (Figure 1a). The presence or absence of biomarkers between cancer and benign tissue as well as in ascite or in cyst fluid was research in this study (Figure 1b). The presence or absence of biomarkers between cancer and benign tissue as well as in ascite or in cyst fluid was research in this study (Figure 1b). In these conditions, we detect a specific at *m/z* of 9744 (Figure 2) with a specific localization determined in MALDI IMS (Figure 3) and a prevalence of 80%

Characterization of the ovary tumor marker.

Peptide extraction with HCl 1N followed by Sep-pack pre-purification and HPLC separation on a C18 reversed-phase column were performed. Each fraction was then analyzed

in MALDI-TOF. A peptide eluted from the column with a retention time of 46 min representing 46% of acetonitrile with m/z of 9763.93 has been detected (Figure 2), This peptide is major in these fractions and two ions of 9763.93 and the discharged ions of 4886.76 have been measured (Figure 2b). These peptides correspond to the marker 8 detected in profiling experiments at m/z of 9744.

It was then subjected to a trypsin digestion before analyzed in MALDI-TOF (Figure 4a) then in nano-ESI-QTOF for peptide mass fingerprint analyses (Figure 4b).

In MALDI, excepted the ions from the trypsin autolysis, several ions have been detected with m/z of 700.68, 787.7, 841.63, 890.57, 970.47, 1032.17, 1349.16, 1500.98, 1528.99, 1790.18, 1833.07, 2104.58, 2210.47 and 2280.02.

Protein bank analyses gave a score identification at 66.7% of Reg-Alpha protein fragment. Reg-apha is a member of the proteasome activator 11S with a 249 amino acid residues protein (28 kDa).. Ions at m/z 536.89, 700.68, 890.57, 970.47, 1158.55 and 1500.98 constitute tryptic fragments attended for this protein (Figure 4b).. The principal m/z ions lead to the same identification for Reg-Alpha fragment (Figure 5). MALDI and ESI data allow getting 59 amino acid residues sequence from the 84 amino acid residues of the fragment (RIEDGNNFGA VQEKVFELMT SLHTKLEGFH TQISKYFSER GDAVTKAAKQ PHVGDYRQLV HELDEAEYRD IRLMVMEIRN AYAV) with a covering percentage of 70% (Figure 5b). From the nano-ESI spectra, some fragments have been validated by MS/MS (CID) (Figure 5a) and confirm the identification. For example, the ion at m/z 501.26 corresponded to ion MH_3^{3+} of the peptide QLVHELDEAEYR corresponding to a fragment of reg- Alpha. Taken together, the biomarker detected corresponds to a fragment (141-225) of the protein Reg Alpha protein (Figure 4b). Sequence alignment of the 84 amino acid residues gave 100% identity with Reg alpha (QO6323: accession Number, PSME1_Human), 63% with

Reg beta (Q9UL46: accession Number, PSME_human) and 46% with Reg gamma (P61289: accession Number, PSME3_Human).

Validation of Reg alpha as a specific ovary carcinoma biomarker.

Western blot analyses were performed on 9 carcinoma (6 adenocarcinoma, 1 endometrioid carcinoma, 2 mucinous carcinoma) as well as 16 benign tumors (1 mucinous cystadenoma, 2 serous cystadenoma, 2 serous cystadenofibroma, 6 endometriotic ovarian cysts, 3 teratoma and 2 fibrothecoma) . The Reg Alpha antibody used was raised against the C-terminal Reg alpha and showed the detection of the complete protein of 28 kDa in 88.8% of the carcinoma (8 strongly/9 cases) and 18.7% (3 slightly positives / 16 cases) in benign tumors (Figure 5c)

Immunocytochemical studies were performed on 11 carcinoma (8 adenocarcinoma, 1 endometrioid carcinoma, 1 mucinous carcinoma and 1 neuroendocrine carcinoma) (Figure 5, pictures 1-8) *versus* 12 benign tumors (1 mucinous cystadenoma, 3 serous cystadenoma, 2 serous cystadenofibroma, 1 follicular ovarian cyst, 2 teratoma and 3 fibrothecoma) (Figure 5, pictures 9-16). In 63.6% of carcinoma, all the epithelial cells are strongly stained with the anti-Reg Alpha instead 16.6% of benign tissues where only epithelial cells are labelled (Figure 6). However, a cytoplasm localization of the Reg Alpha fragment was found in carcinoma (36.3 %) never in benign tissues nor in healthy tissue instead nucleus localization in 76.9% of the benign tissues (Figure 7, pictures 2) *versus* 9% in cancer cells (Figure 7, pictures 1). Moreover, research in other gynaecologic or extra-gynaecologic epithelia revealed no labelling in normal ovaries (Figure 7, picture 3 and 4) and a strong labelling in endocervix carcinoma (Figure 7, picture 7 and 10). A weak labelling with nucleus localization was found in the case of the healthy endometra (Figure 7, picture 8), fallopian tube (Figure 7, picture 9).

In stomach adenocarcinoma (Figure 7, picture 12), the Reg alpha labelling is high in contrast to the benign colon adenoma where the labelling is weak (Figure 7, picture 11).

These results will give a great help for border line cancer diagnosis (Figure 7, pictures 5 and 6)

MALDI IMS using tagged Reg Alpha confirms its specific localization (Figure 8). Other molecules can be detected at the same level (Figure 8, see inset pictures)

Taken together, we applied a mixed profiling and imaging strategy followed by targeted protein identification by protein micro-extraction and top-down tandem mass spectrometry to study of carcinoma and benign ovary's tumors. Such a strategy has recently been used for investigate potential toxicity biomarkers in kidneys of rats that were administered gentamicin³⁰. In our case, 8 specific peptides have specifically been identified in ovary's carcinoma but we focused our attention on the most prevalent one, identified as a fragment of the 11S regulator complex (PA 28). The fragment of 84 amino acid residues is localized at the C-terminal part of the protein.

The 11S regulator complex (syn.: PA28) is another regulatory complex associated with the 20S proteasome consisting of three subunits, alpha, beta, gamma³¹. Binding of 11S regulator complex to 20S proteasome is not depending on ATP hydrolysis and – unlike the 19S regulatory subunit, the 11S regulator complex does not catalyse degradation of large proteins but is responsible for MHC-class I antigen processing³²⁻³⁴; that is greatly improved by interferon gamma induced expression of alpha and beta subunits³⁵. A number of viral protein interactions with these proteasome subunits have been reported that may interfere with host anti-viral defense thereby contributing to mechanisms of cell transformation³⁶. The mechanisms by which it binds to the core particle via its subunits' C-terminal tails and induces α -ring conformational changes to open the 20S gate suggest a similar mechanism for the 19S particle³¹. The 20S proteasome has recently been detected in glioblastoma³⁷ and in different

cancer cell lines³⁵. However, no role in ovary cancer yet been demonstrated for the The 11 S regulator complex. Our data are the first demonstrating the high level of expression of PA28 in carcinoma, especially in epithelial cells. Moreover, the distinct localization (nucleus or cytoplasm) of the C-terminal fragment of PA28 between benign and tumor cells, will offer the possibility of a molecular diagnosis in the cases of border line cancer. The detection at a high level of PA28 fragments in endocol carcinoma and at a low level in no tumor gynaecologic epithelia confirm its credibility as a cancer biomarker. Its presence in stomach adenocarcinoma epithelial cells and its absence in benign epithelial cells can be explained by the fact that PA28 can be expressed in solid tumor and fragments can perhaps be detected in human plasma as cancer indicator. PA28 activator belongs to the antigen processing machinery (APM). Its alteration by cleavage in ovary's carcinoma might be one mechanism to evade immune recognition. Such a hypothesis has already been advanced for the cases of APM chaperones as TAP, LMP2, LMP10 and tapasin in the case of colon carcinoma, small cell lung carcinoma and pancreatic carcinoma cell lines. In fact, IFN- γ treatment of these carcinoma cell lines corrected the TAP, LMP and Tapasin deficiencies and enhanced the PA28 α , LMP7, calnexin and calreticulin expression which was then accompanied with increased levels of MHC class I antigens³⁸.

Taken together, this study demonstrate for the first time a mixed profiling and imaging strategy followed by targeted protein identification by protein micro-extraction, top-down tandem mass spectrometry and validation by specific MALDI imaging as well as immunocytochemistry allow to detect and valid pathological biomarkers.

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), Institut National du Cancer (To I. Fournier & P. Ducoroy), 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.

REFERENCES

1. Edwards, B. K.; Brown, M. L.; Wingo, P. A.; Howe, H. L.; Ward, E.; Ries, L. A.; Schrag, D.; Jamison, P. M.; Jemal, A.; Wu, X. C.; Friedman, C.; Harlan, L.; Warren, J.; Anderson, R. N.; Pickle, L. W., Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2002, featuring population-based trends in cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* **2005**, *97*, (19), 1407-27.
2. Lambaudie, E.; Collinet, P.; Vinatier, D., [Ovarian cancers and CA 125 in 2006]. *Gynecol Obstet Fertil* **2006**, *34*, (3), 254-7.
3. Ahmed, N.; Oliva, K. T.; Barker, G.; Hoffmann, P.; Reeve, S.; Smith, I. A.; Quinn, M. A.; Rice, G. E., Proteomic tracking of serum protein isoforms as screening biomarkers of ovarian cancer. *Proteomics* **2005**, *5*, (17), 4625-36.
4. Ardekani, A. M.; Liotta, L. A.; Petricoin, E. F., 3rd, Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* **2002**, *2*, (4), 312-20.
5. Bandera, C. A.; Ye, B.; Mok, S. C., New technologies for the identification of markers for early detection of ovarian cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol* **2003**, *15*, (1), 51-5.
6. Conrads, T. P.; Veenstra, T. D., The utility of proteomic patterns for the diagnosis of cancer. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* **2004**, *4*, (1), 41-50.
7. Conrads, T. P.; Zhou, M.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L.; Veenstra, T. D., Cancer diagnosis using proteomic patterns. *Expert Rev Mol Diagn* **2003**, *3*, (4), 411-20.
8. Fields, M. M.; Chevlen, E., Ovarian cancer screening: a look at the evidence. *Clin J Oncol Nurs* **2006**, *10*, (1), 77-81.
9. Johann, D. J., Jr.; McGuigan, M. D.; Patel, A. R.; Tomov, S.; Ross, S.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Fishman, D. A.; Whiteley, G. R.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L. A., Clinical proteomics and biomarker discovery. *Ann N Y Acad Sci* **2004**, *1022*, 295-305.
10. Kohn, E. C.; Mills, G. B.; Liotta, L., Promising directions for the diagnosis and management of gynecological cancers. *Int J Gynaecol Obstet* **2003**, *83* Suppl 1, 203-9.

11. Lin, Y. W.; Lin, C. Y.; Lai, H. C.; Chiou, J. Y.; Chang, C. C.; Yu, M. H.; Chu, T. Y., Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **2006**, 16 Suppl 1, 139-46.
12. Liu, Y., Serum proteomic pattern analysis for early cancer detection. *Technol Cancer Res Treat* **2006**, 5, (1), 61-6.
13. Plebani, M., Proteomics: the next revolution in laboratory medicine? *Clin Chim Acta* **2005**, 357, (2), 113-22.
14. Posadas, E. M.; Davidson, B.; Kohn, E. C., Proteomics and ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment: a critical review of the recent literature. *Curr Opin Oncol* **2004**, 16, (5), 478-84.
15. Rapkiewicz, A. V.; Espina, V.; Petricoin, E. F., 3rd; Liotta, L. A., Biomarkers of ovarian tumours. *Eur J Cancer* **2004**, 40, (17), 2604-12.
16. Stevens, E. V.; Liotta, L. A.; Kohn, E. C., Proteomic analysis for early detection of ovarian cancer: a realistic approach? *Int J Gynecol Cancer* **2003**, 13 Suppl 2, 133-9.
17. Ahmed, N.; Barker, G.; Oliva, K. T.; Hoffmann, P.; Riley, C.; Reeve, S.; Smith, A. I.; Kemp, B. E.; Quinn, M. A.; Rice, G. E., Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer* **2004**, 91, (1), 129-40.
18. Bergen, H. R., 3rd; Vasmatazis, G.; Cliby, W. A.; Johnson, K. L.; Oberg, A. L.; Muddiman, D. C., Discovery of ovarian cancer biomarkers in serum using NanoLC electrospray ionization TOF and FT-ICR mass spectrometry. *Dis Markers* **2003**, 19, (4-5), 239-49.
19. Diamandis, E. P., Proteomic patterns in serum and identification of ovarian cancer. *Lancet* **2002**, 360, (9327), 170; author reply 170-1.
20. Engwegen, J. Y.; Gast, M. C.; Schellens, J. H.; Beijnen, J. H., Clinical proteomics: searching for better tumour markers with SELDI-TOF mass spectrometry. *Trends Pharmacol Sci* **2006**, 27, (5), 251-9.
21. Fung, E. T.; Yip, T. T.; Lomas, L.; Wang, Z.; Yip, C.; Meng, X. Y.; Lin, S.; Zhang, F.; Zhang, Z.; Chan, D. W.; Weinberger, S. R., Classification of cancer types by measuring variants of host response proteins using SELDI serum assays. *Int J Cancer* **2005**, 115, (5), 783-9.
22. Petricoin, E. F.; Ardekani, A. M.; Hitt, B. A.; Levine, P. J.; Fusaro, V. A.; Steinberg, S. M.; Mills, G. B.; Simone, C.; Fishman, D. A.; Kohn, E. C.; Liotta, L. A., Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **2002**, 359, (9306), 572-7.

23. Wang, Q.; Li, L.; Li, D. R.; Zhang, W.; Wei, X.; Zhang, J. Q.; Tang, Y., [Identification of serum biomarkers for ovarian cancer using protein chips and time of flight mass spectrometry technology]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* **2006**, 41, (8), 544-8.
24. Rai, A. J.; Zhang, Z.; Rosenzweig, J.; Shih Ie, M.; Pham, T.; Fung, E. T.; Sokoll, L. J.; Chan, D. W., Proteomic approaches to tumor marker discovery. *Arch Pathol Lab Med* **2002**, 126, (12), 1518-26.
25. Xiao, Z.; Prieto, D.; Conrads, T. P.; Veenstra, T. D.; Issaq, H. J., Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol* **2005**, 230, (1-2), 95-106.
26. Zhu, Y.; Wu, R.; Sangha, N.; Yoo, C.; Cho, K. R.; Shedden, K. A.; Katabuchi, H.; Lubman, D. M., Classifications of ovarian cancer tissues by proteomic patterns. *Proteomics* **2006**, 6, (21), 5846-56.
27. Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I., Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* **2006**, 78, (3), 809-19.
28. Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I., MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem* **2006**, 78, (20), 7145-53.
29. Lemaire, R., Stauber, J., Wisztorski, M., Van Camp, C., Desmons, A., Deschamps, M., Proess, G., Rudlof, I., Woods, A. S., Day, R., Salzet, M., Fournier, I., TAG-MASS: SPECIFIC MOLECULAR IMAGING OF TRANSCRIPTOME AND PROTEOME BY MASS SPECTROMETRY BASED ON PHOTOCLEAVABLE TAG
J. Proteome Res. **In press**.
30. Meistermann, H.; Norris, J. L.; Aerni, H. R.; Cornett, D. S.; Friedlein, A.; Erskine, A. R.; Augustin, A.; De Vera Mudry, M. C.; Ruepp, S.; Suter, L.; Langen, H.; Caprioli, R. M.; Ducret, A., Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol Cell Proteomics* **2006**, 5, (10), 1876-86.
31. Yang, Y.; Fruh, K.; Ahn, K.; Peterson, P. A., In vivo assembly of the proteasomal complexes, implications for antigen processing. *J Biol Chem* **1995**, 270, (46), 27687-94.
32. Kloetzel, P. M., The proteasome system: a neglected tool for improvement of novel therapeutic strategies? *Gene Ther* **1998**, 5, (10), 1297-8.
33. Rivett, A. J.; Gardner, R. C., Proteasome inhibitors: from in vitro uses to clinical trials. *J Pept Sci* **2000**, 6, (9), 478-88.
34. Rotem-Yehudar, R.; Groettrup, M.; Soza, A.; Kloetzel, P. M.; Ehrlich, R., LMP-associated proteolytic activities and TAP-dependent peptide transport for class 1 MHC

molecules are suppressed in cell lines transformed by the highly oncogenic adenovirus 12. *J Exp Med* **1996**, 183, (2), 499-514.

35. Kuckelkorn, U.; Ferreira, E. A.; Drung, I.; Liewer, U.; Kloetzel, P. M.; Theobald, M., The effect of the interferon-gamma-inducible processing machinery on the generation of a naturally tumor-associated human cytotoxic T lymphocyte epitope within a wild-type and mutant p53 sequence context. *Eur J Immunol* **2002**, 32, (5), 1368-75.

36. Regad, T.; Chelbi-Alix, M. K., Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene* **2001**, 20, (49), 7274-86.

37. Piccinini, M.; Rinaudo, M. T.; Anselmino, A.; Ramondetti, C.; Buccinna, B.; Fiano, V.; Ghimenti, C.; Schiffer, D., Characterization of the 20S proteasome in human glioblastomas. *Anticancer Res* **2005**, 25, (5), 3203-10.

38. Delp, K.; Momburg, F.; Hilmes, C.; Huber, C.; Seliger, B., Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* **2000**, 25 Suppl 2, S88-95.

Figures Legends

Figure 1:

- a- MALDI mass spectrometry profile of ovary carcinoma vs benign tumor (arrows indicate specific marker, in light blue are the molecule identified in both tissue)
- b- MALDI mass spectrometry profile of ascite fluid from ovary carcinoma vs cyst fluid (arrows indicate specific marker, in light blue are the molecule identified in both tissue)

Figure 2:

- a- MALDI-MS profiles of 3 ovarian carcinoma vs. benign tumor
- b- MALDI-MS profile the oxidized form of the marker identified with the major prevalence at a m/z 9744

Figure 3:

MALDI MS profile, arrows indicate the position of Reg- α and the non ovarian cancer marker. Inset represents, a scan of a biopsy section stained by Hemalin eosin coloration before subjected to a MALDI MS molecular imaging (37669 points with 300 shots by points at a 100 Hz repetition rate). The molecular localization of Reg α fragment in red (specific of epithelial cells), the distribution of two non ovarian cancer markers (green and blue) obtained in MALDI imaging.

Figure 4:

- a- MALDI-MS profile of the trypsin digestion of the peptide at a m/z of 9744 (Inset correspond to the sequence alignment after MASCOT inquiry)
- b- Nano-ESI-Q/TOF profile of the trypsin digestion of the peptide at a m/z of 9744 (Inset correspond to the sequence alignment after MASCOT inquiry)

Figure 5:

- a- Nano-ESI-Q/TOF MS/MS profile of the 501³⁺ ion precursor. The sequence obtained is QLVHELDEAEYR presenting 37% sequence identity with Reg α fragment
- b- Complete sequence alignment of Reg α . Amino acid residues in red are the ones obtained by MALDI and ESI-MS
- c- Western blot analyses with the anti-Ct Reg α of the 16 benign tumors and 9 carcinoma

Figure 6:

Immunocytochemical data obtained after antigen retrieval technique and H&S coloration with the anti-Ct Reg alpha antibody

Pictures 1-8: Epithelial cells labeled with the Ct anti-Reg alpha in ovarian carcinoma

Picture 9: Dermoide cyst

Picture 10: Dermoide Cyst

Picture 11: Ovarian goiter

Picture 12: cystadenofibroma serous

Picture 13: Cystadenoma serous

Picture 14: Cystadenoma serous

Picture 15: Follicular cyst

Picture 16: Fibrothecoma

Figure 7 :

Immunocytochemical data obtained after antigen retrieval technique and H&S coloration with the anti-Ct Reg alpha antibody

Picture 1: Cytoplasm localization of the anti-Ct Reg alpha labeling in ovary carcinoma

Picture 2: Nucleus localization of the anti-Ct Reg alpha labeling in ovary benign tumor

Pictures 3-4: Healthy ovary

Pictures 5-6: Immunolabelling with anti-Ct Reg alpha in epithelial cells in border line carcinoma

Pictures 7 and 10: Strong immunolabelling with anti-Ct Reg alpha in endocol carcinoma

Pictures 8 and 9 : Nucleus mmunolabelling with anti-Ct Reg alpha in heathy endometra and Fallopian tube

Picture 11 and 12: Strong immunolabelling with anti-Ct Reg alpha in colon adenoma or stomach adenocarcinoma

Figure 8

MALDI mass spectrometry spectrum of ovary carcinoma from which the m/z at 1705 of the tag mass from the anti-Reg-Apha Tagged antibody can be detected. Inset pictures represent MALDI IMS using tagged Reg Alpha (2000 points at 100 shots per pint with a repetition rate of 100 Hz) and confirm its specific localization. It can also be seen that other molecules (m/z: 1616, 2531) can be detected at the same level.

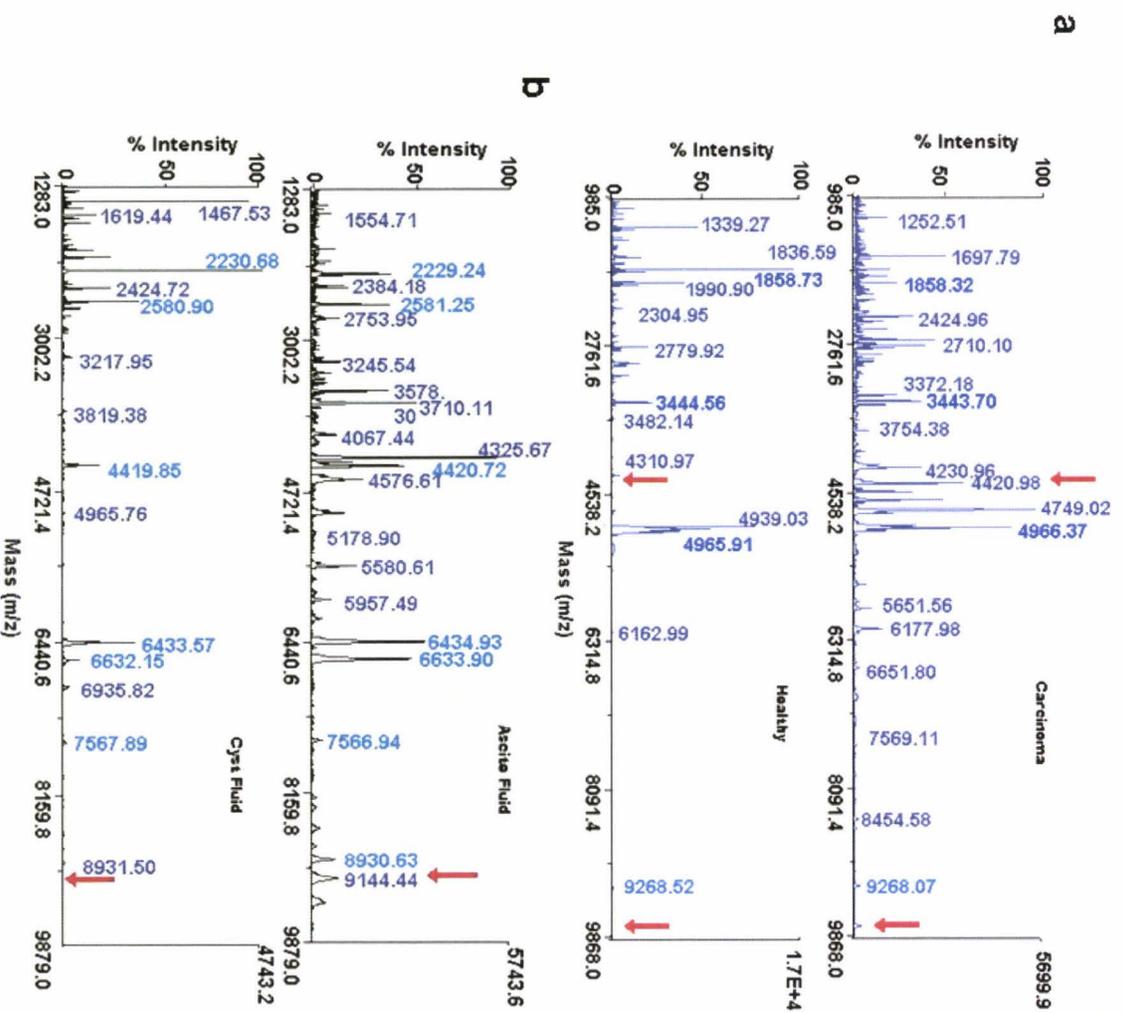


Figure 1

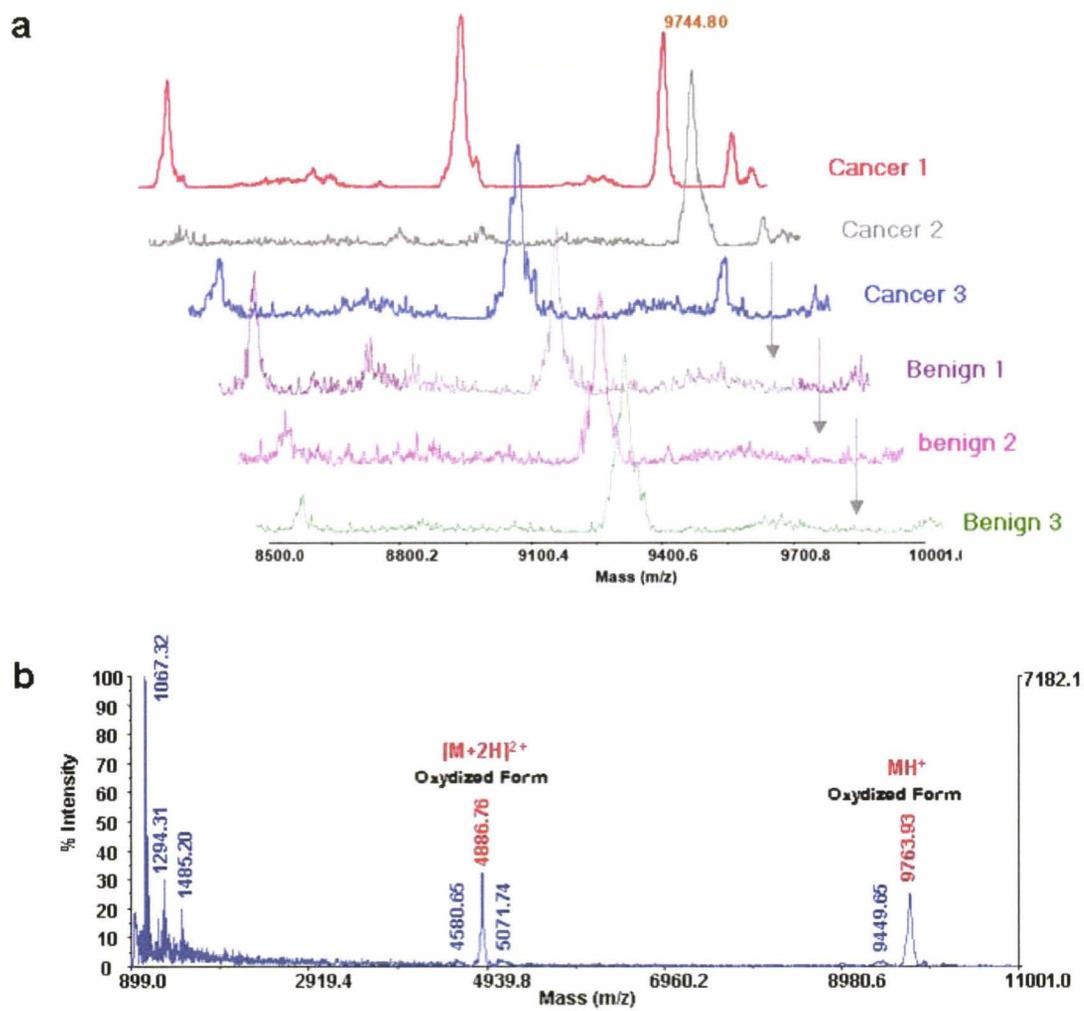


Figure 2

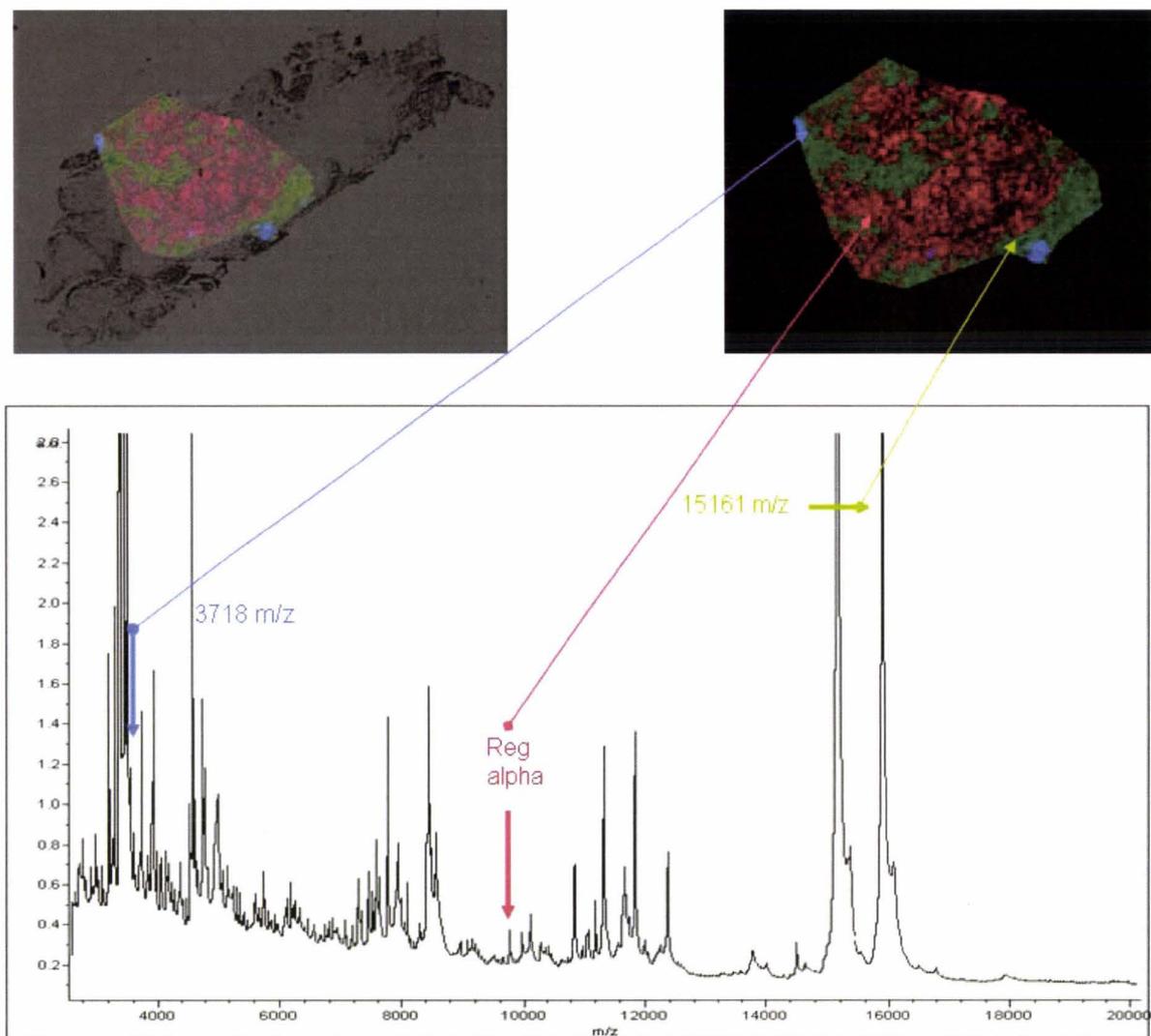
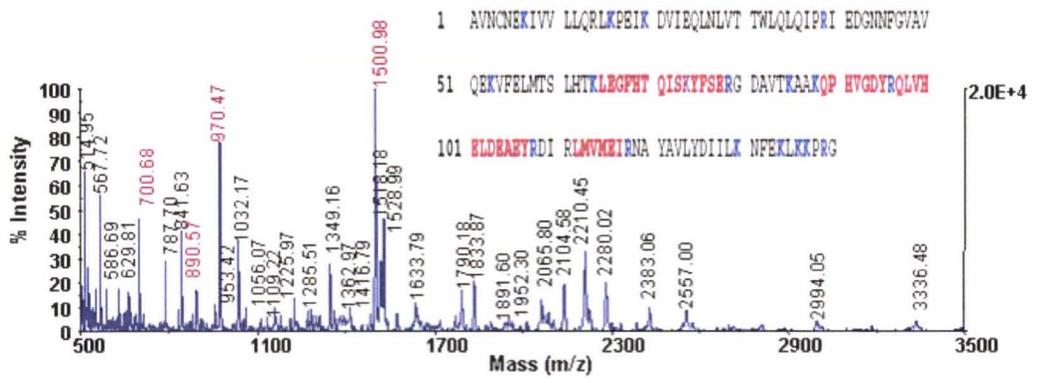


Figure 3

a



b

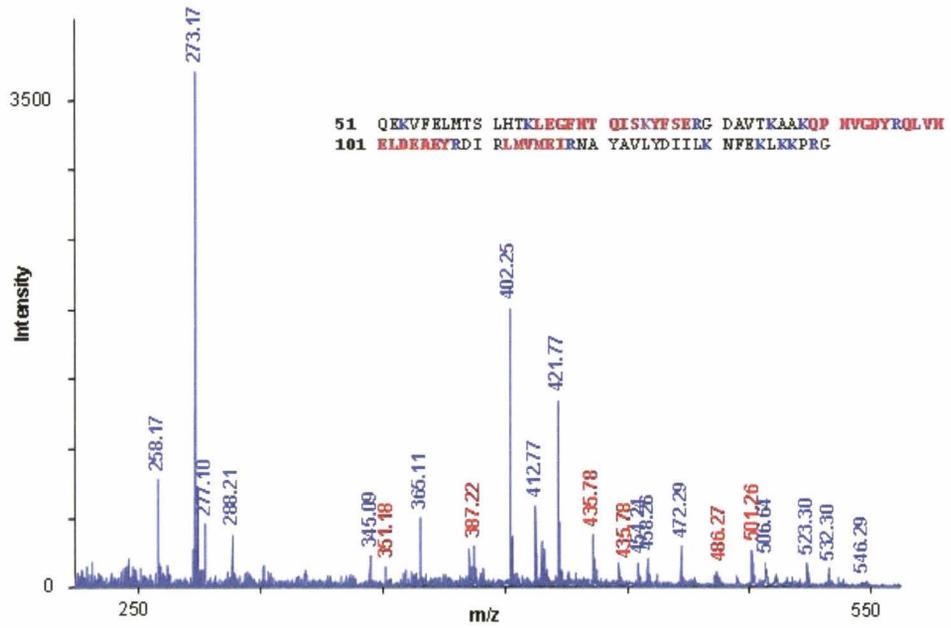


Figure 4

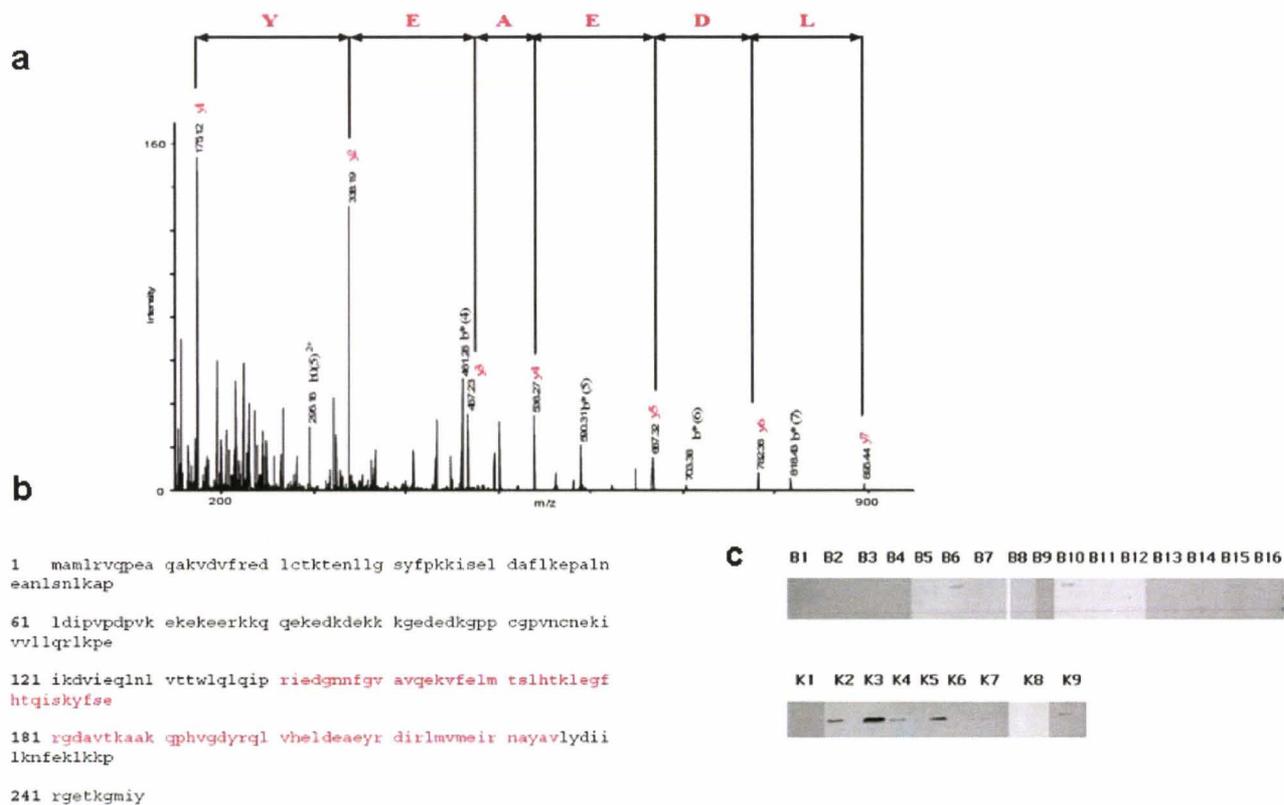


Figure 5

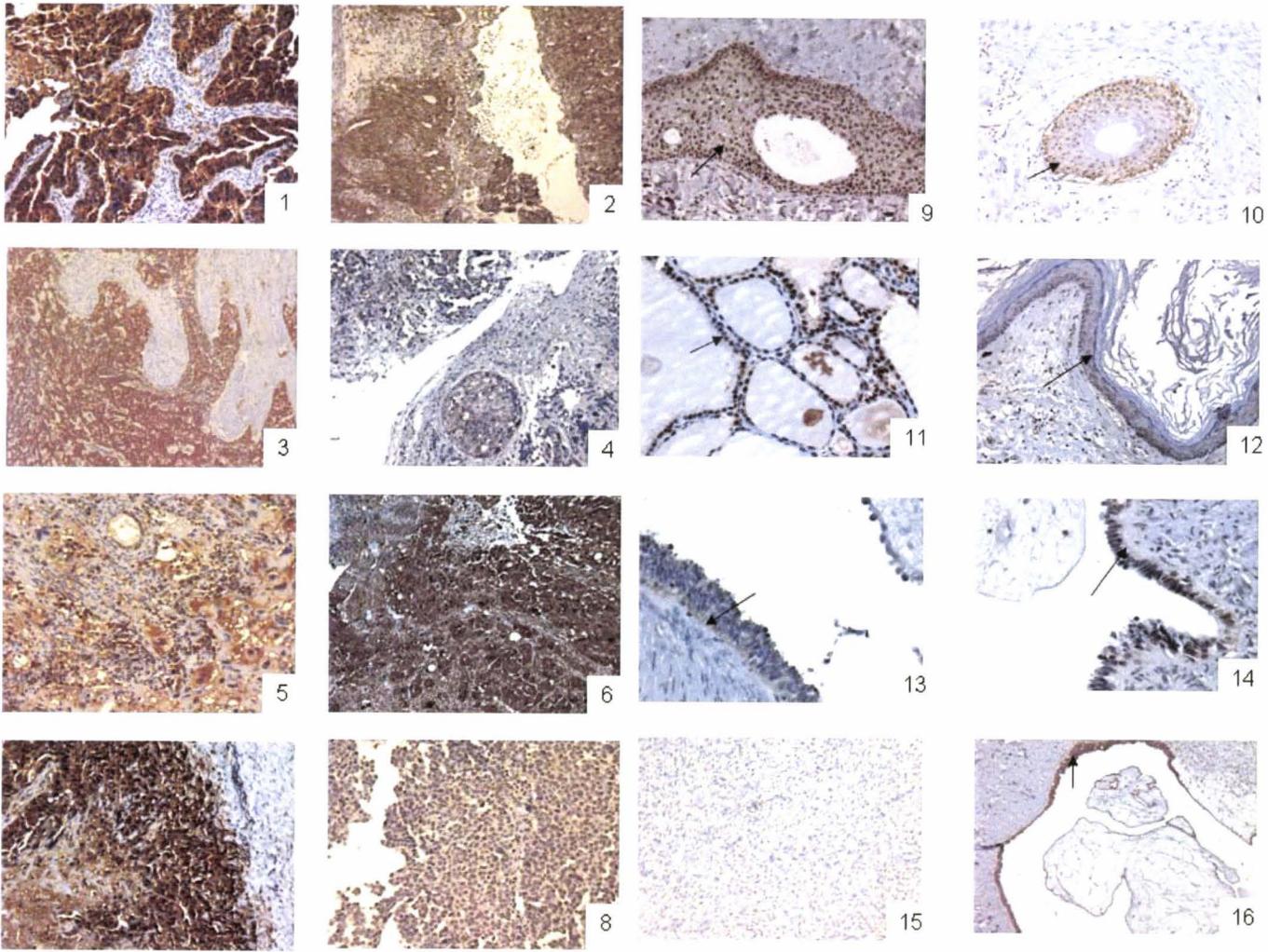


Figure 6

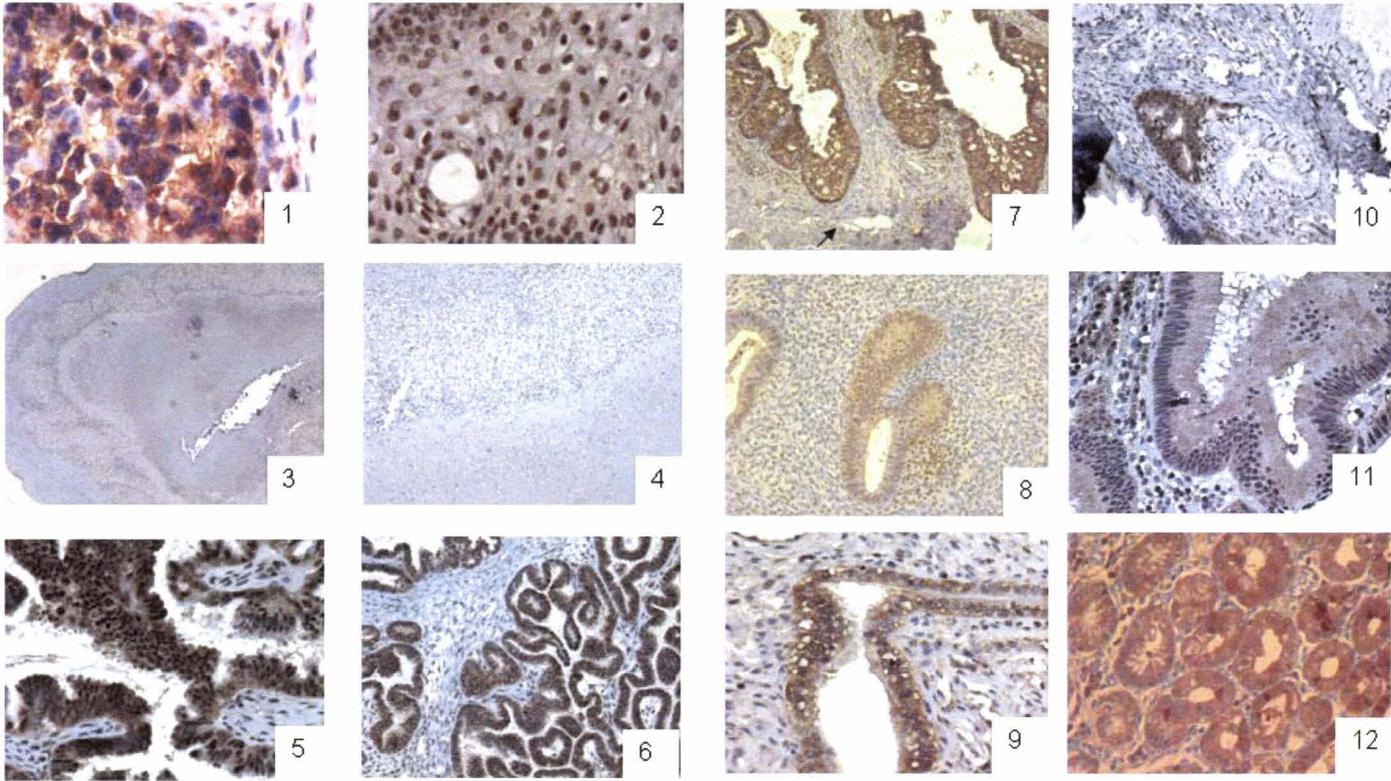


Figure 7

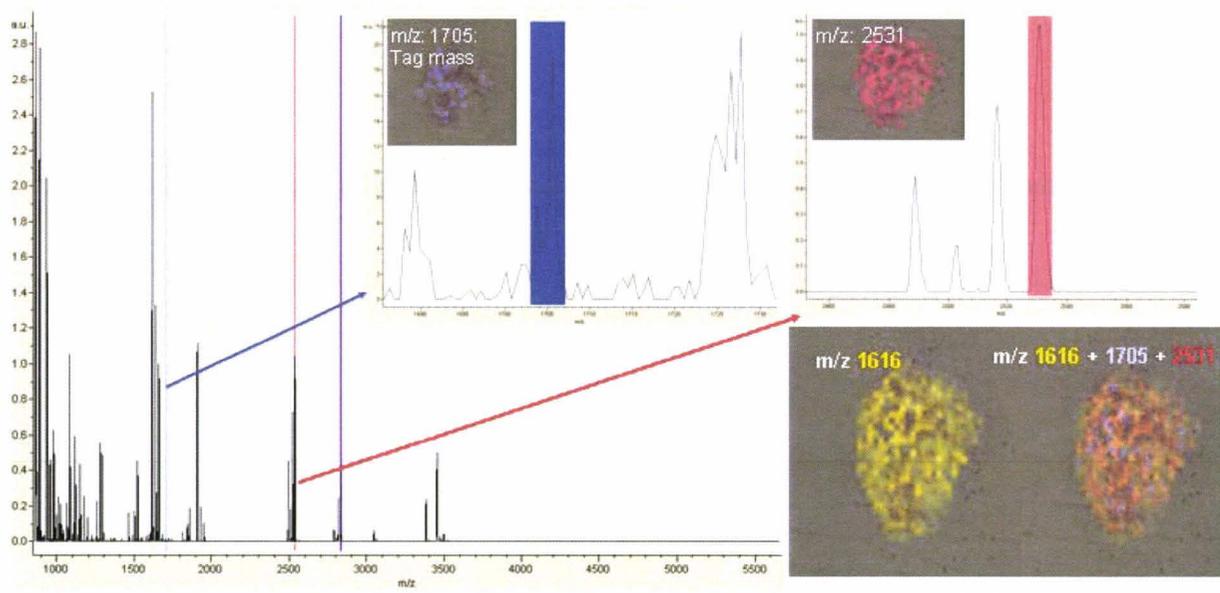


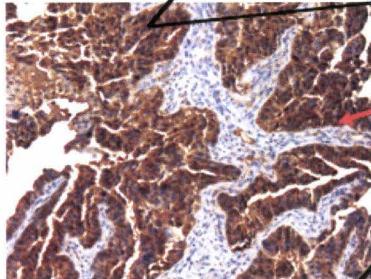
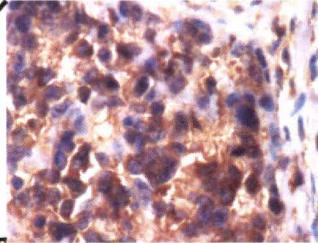
Figure 8

SYNOPSIS

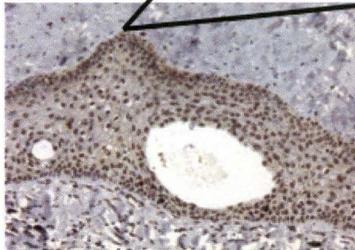
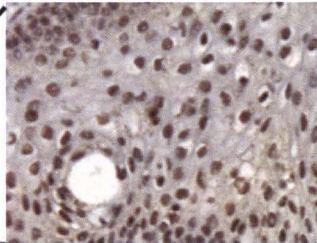
Proteasome 11 S, PA28 subunit alpha fragment, reg alpha fragment is an ovarian cancer biomarker specifically present in epithelial cells.

Anti- Cterm reg alpha localisation by ICC

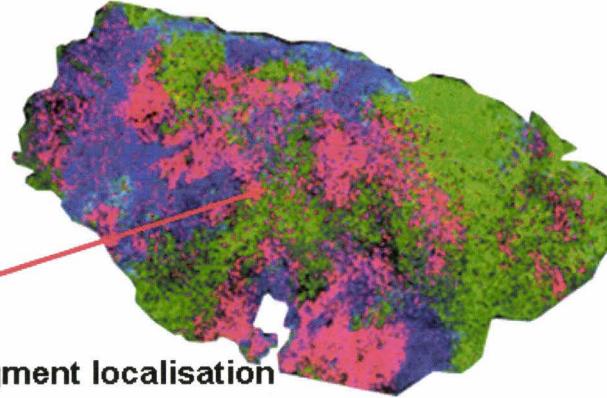
Ovarian Carcinoma



Benign



Reg alpha fragment localisation by MALDI IMS



Proteasome 11S, PA28 subunit Alpha fragment, Reg alpha fragment ovarian cancer biomarker

Détection d'autres marqueurs du cancer de l'ovaire

Ces expérimentations ont concerné **16** patientes au total : **8 cancers** et **8 tumeurs bénignes** (ou ovaire sain). Les différents types anatomopathologiques de tumeurs ovariennes étudiées et le nombre de patientes testées, sont résumés dans le **Tableau 8** ci-dessous. L'ensemble de ces échantillons a été analysé par coloration HES, analyse directe, lavage chloroforme, et imagerie MALDI. Il est important de rappeler que toutes ces analyses ont été réalisées sur des coupes adjacentes. De plus, les liquides d'ascite ont été récupérés et analysés en HPLC sur colonne de phase inverse et spectrométrie de masse, afin de faire le parallèle entre les biomarqueurs éventuels provenant du tissu et de leurs éventuelles dispersions dans les liquides avoisinants.

Tableau 8. : Types anatomopathologiques de tumeurs ovariennes étudiées.

Cancers ovariens (n=8)

Tumeurs ovariennes bénignes (n=8)

Adénocarcinome séreux (n=5)

Kyste ovarien séreux (n=4)

Adénocarcinome mucineux (n=1)

Cystadénofibrome de l'ovaire (n=1)

Adénocarcinome à cellules claires (n=1)

Cystadénome mucineux (n=2)

Ovaire sain (n=1)

Adénocarcinome endométrioïde (n=1)

Résultats des colorations histologiques HES

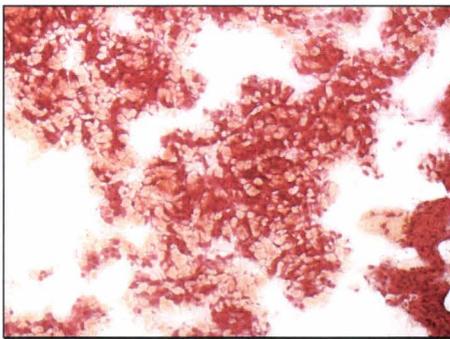
Toutes les pièces opératoires des patientes incluses dans notre étude ont été analysées en totalité par le laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHRU de Lille. Ceci nous a permis de classer ces patientes en 2 catégories de tumeur épithéliales : cancer versus tumeur bénigne.

Cependant, nous ne savions pas si les biopsies ovariennes effectuées au bloc opératoire et qui nous étaient transmises, avait été réalisées en zone tumorale maligne. Dans

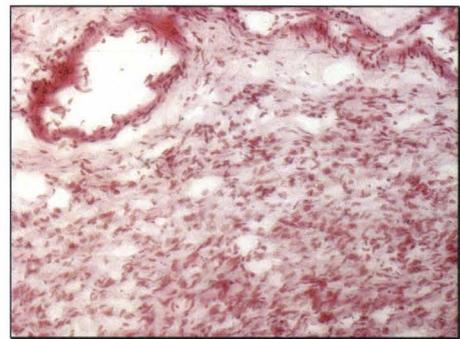
ce contexte, nous avons choisi de réaliser des colorations HES sur coupe de biopsies ovariennes et d'utiliser la coupe directement adjacente (si nous étions en zone tumorale) pour analyse MALDI afin d'assurer la pertinence des résultats obtenus.

La planche 1 résume l'ensemble des résultats histologique pour les coupes colorées en HES et montre que nous étions bien en zone tumorale. Nous avons donc pu réaliser des analyses MALDI (analyse directe ou analyse après lavage Chloroforme sur coupes tissulaires malignes) en utilisant les **coupes directement adjacentes**.

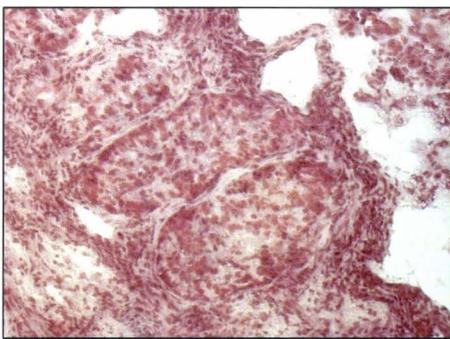
Planche 1 : Résultats obtenus après coloration HES :



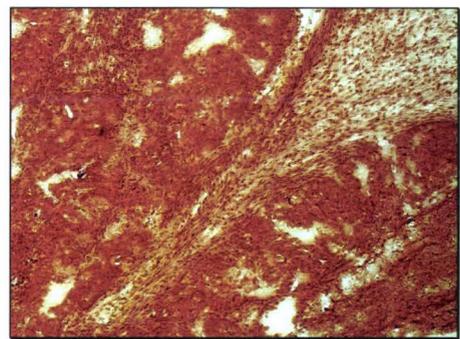
1 : Adénocarcinome ovarien mucineux



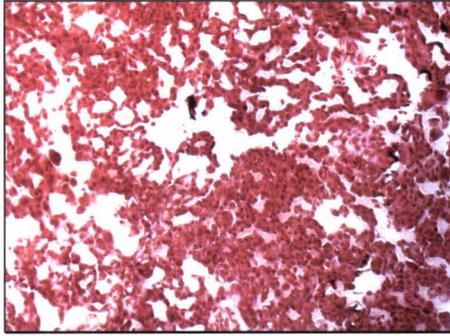
2 : Adénocarcinome ovarien à cellules claires



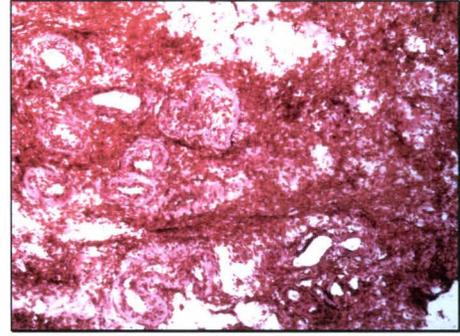
3 : Adénocarcinome ovarien endométrioïde



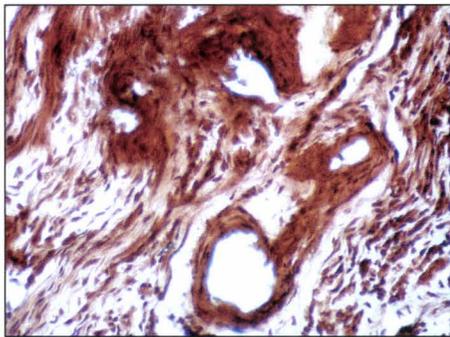
4 : Adénocarcinome ovarien endométrioïde



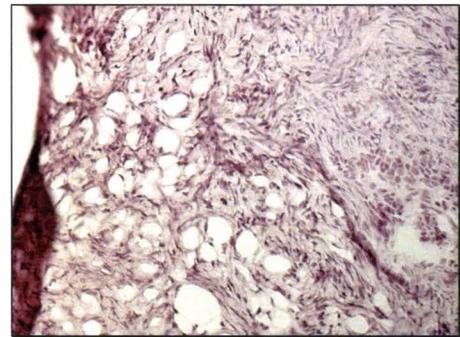
5 : Adénocarcinome ovarien séreux



6 : Kyste ovarien séreux



7 : Cystadénofibrome ovarien



8 : Ovaire sain

Résultats pour les analyses MALDI directement sur coupes tissulaires ovariennes et après lavage au chloroforme.

Résultats des analyses MALDI directement sur coupes tissulaires. (Tableau 9)

Le biomarqueur REG α est retrouvé à nouveau dans l'ensemble des analyses directes MALDI sur le tissu (**Figure 57**). Le différentiel (pics présents dans le cancer versus pics absents dans le bénin) a nettement dégagé 3 nouveaux biomarqueurs candidats : 3441 m/z, 4570 m/z, 10850 m/z. (**Figures 58, 59, 60**). La fréquence de mise en évidence pour les analyses directes était de : 62,5% (n=5/8) pour le 3441, 75% (n=6/8) pour le 4570 et 87,5% (n=7/8) pour le 10850.

A noter : Le Biomarqueur candidat de m/z 3441 a été retrouvé chez 2 patientes bénignes mais sa récurrence dans nos analyses sur le cancer nous l'on fait conserver.

Tableau 9. Patientes testées : Effectif et type histologique des tumeurs. Résultats des analyses

		ANALYSE DIRECTE: SA				LAVAGE: SA			
CANCER	Type histologique	3441	4570	REG alpha	10850	3441	4570	REG alpha	10850
Patiente C1	AdenoK endométrioïde	+	+	+	+	0	0	+	+ / ++
Patiente C2	K cellules claires	++	+++	0	+	0	0	0	+
Patiente C3	AdenoK séreux	+++	0	0	+	+	0	0	+ / ++
Patiente C4	AdenoK mucineux	++	0	0	++	++	0	+	+
Patiente C5	AdenoK séreux	0	+	+++	++++	0	+++	+++	+++
Patiente C6	AdenoK séreux	+	+	0	++	+	++	++	+
Patiente C7	AdenoK séreux	0	+	+++	+++	0	+	+	+++
Patiente C8	AdenoK séreux	0	+	0	0	0	+	++	+++
	POURCENTAGE DE DETECTION	62,5% n=5/8	75% n=6/8	37,5% n=3/8	87,5% n=7/8	37,5% n=3/8	50% n=4/8	75% n=6/8	100% n=8/8
BENIN	Type histologique	3441	4570	REG alpha	10850	3441	4570	REG alpha	10850
Patiente B1	Kyste séreux	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B2	Kyste séreux	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B3	Kyste séreux	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B4	Ovaire sain	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B5	Kyste séreux	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B6	Cystadénofibrome	+	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B7	Cystadénome mucineux	0	0	0	0	0	0	0	0
Patiente B8	Cystadénome mucineux	+	0	0	0	0	0	0	0

MALDI.

Légende : AdenoK = Adénocarcinome, B = Bénin, C = Cancer, SA = acide sinapinique, + / ++ / +++ : intensité des spectres observés.

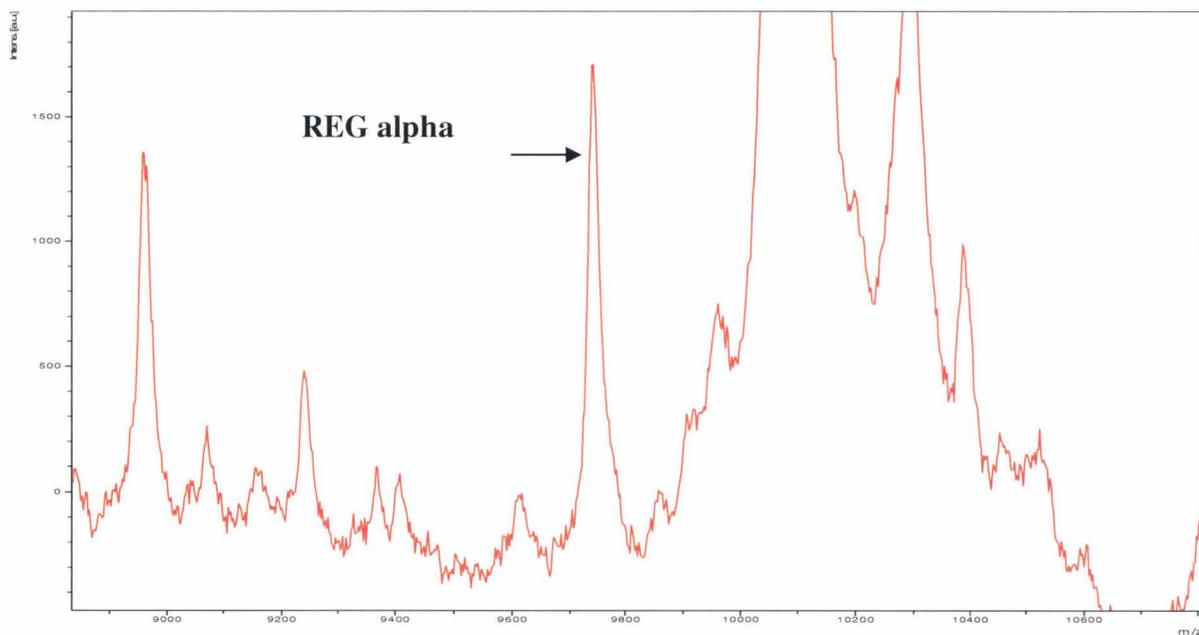


Figure 57.: Mise en évidence du biomarqueur 9744 m/z, identifié comme faisant partie de la protéine REG alpha.

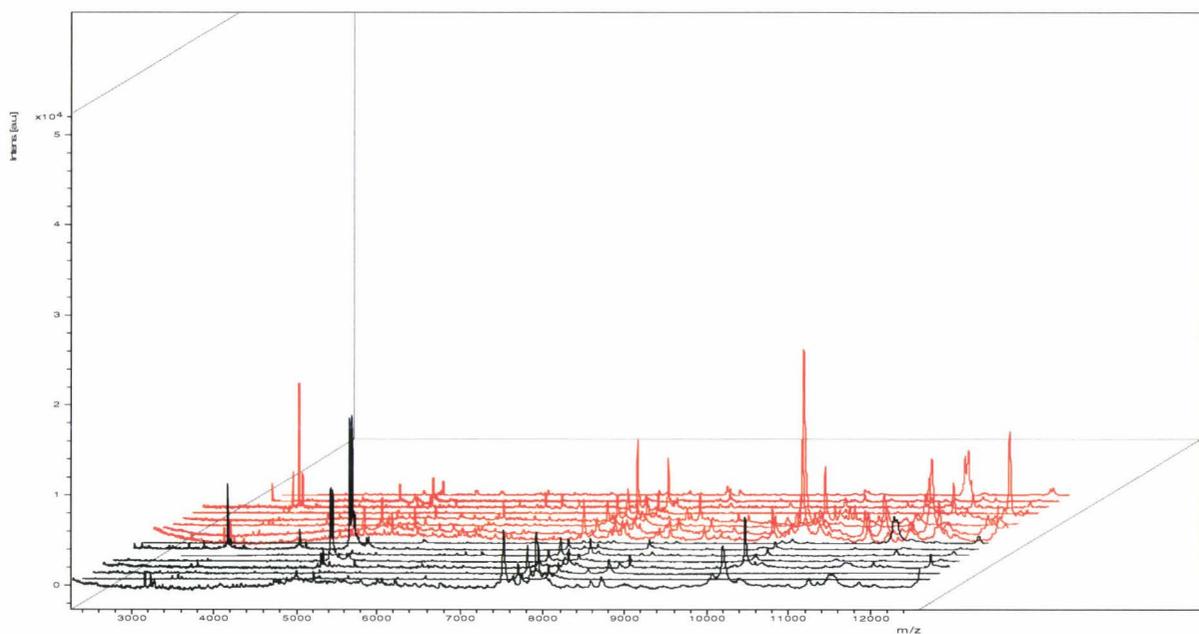


Figure 58 : Différentiel en analyse directe : 8 profils peptidiques malins (en rouge) vs 8 profils peptidiques bénins (en noir)

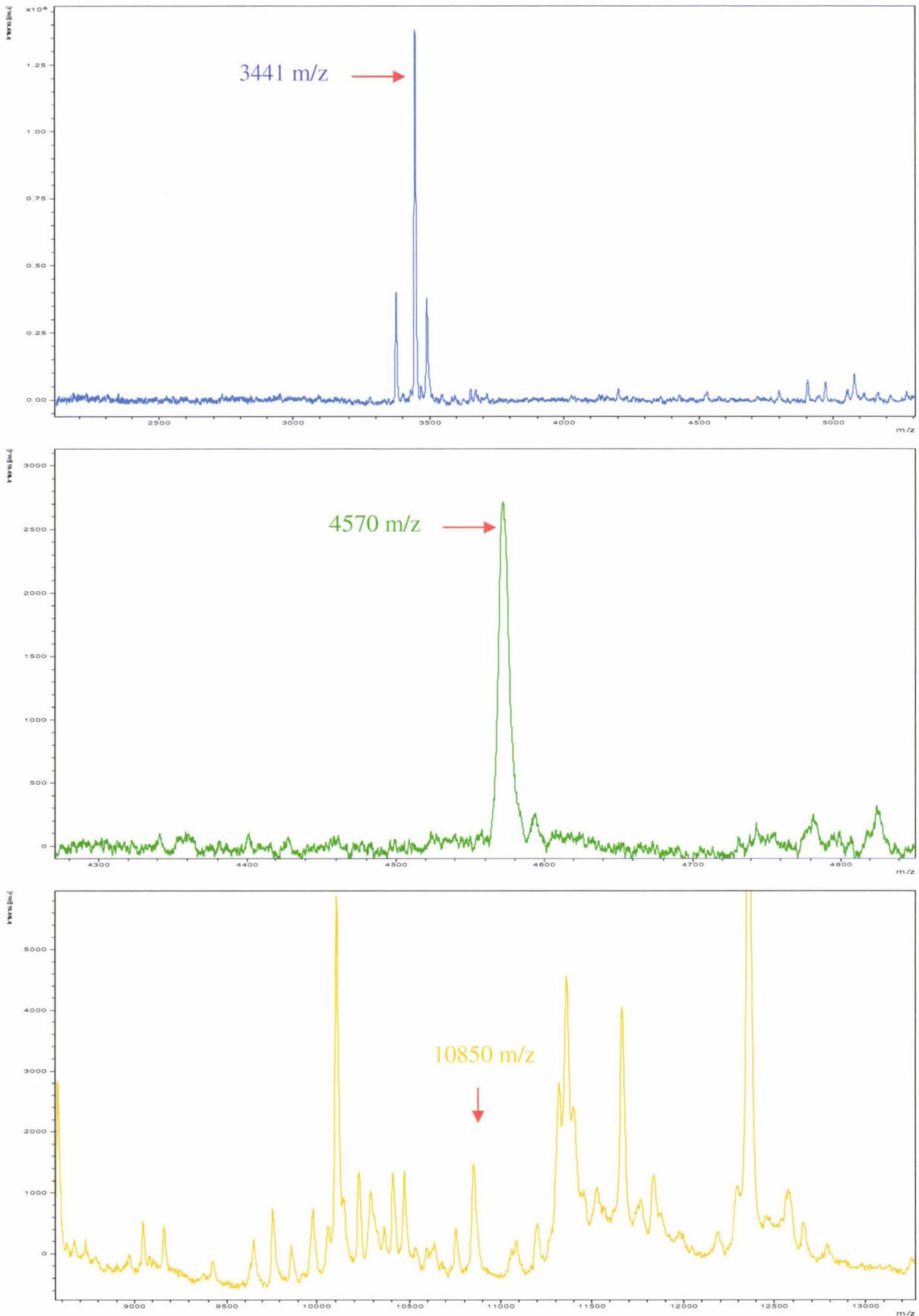
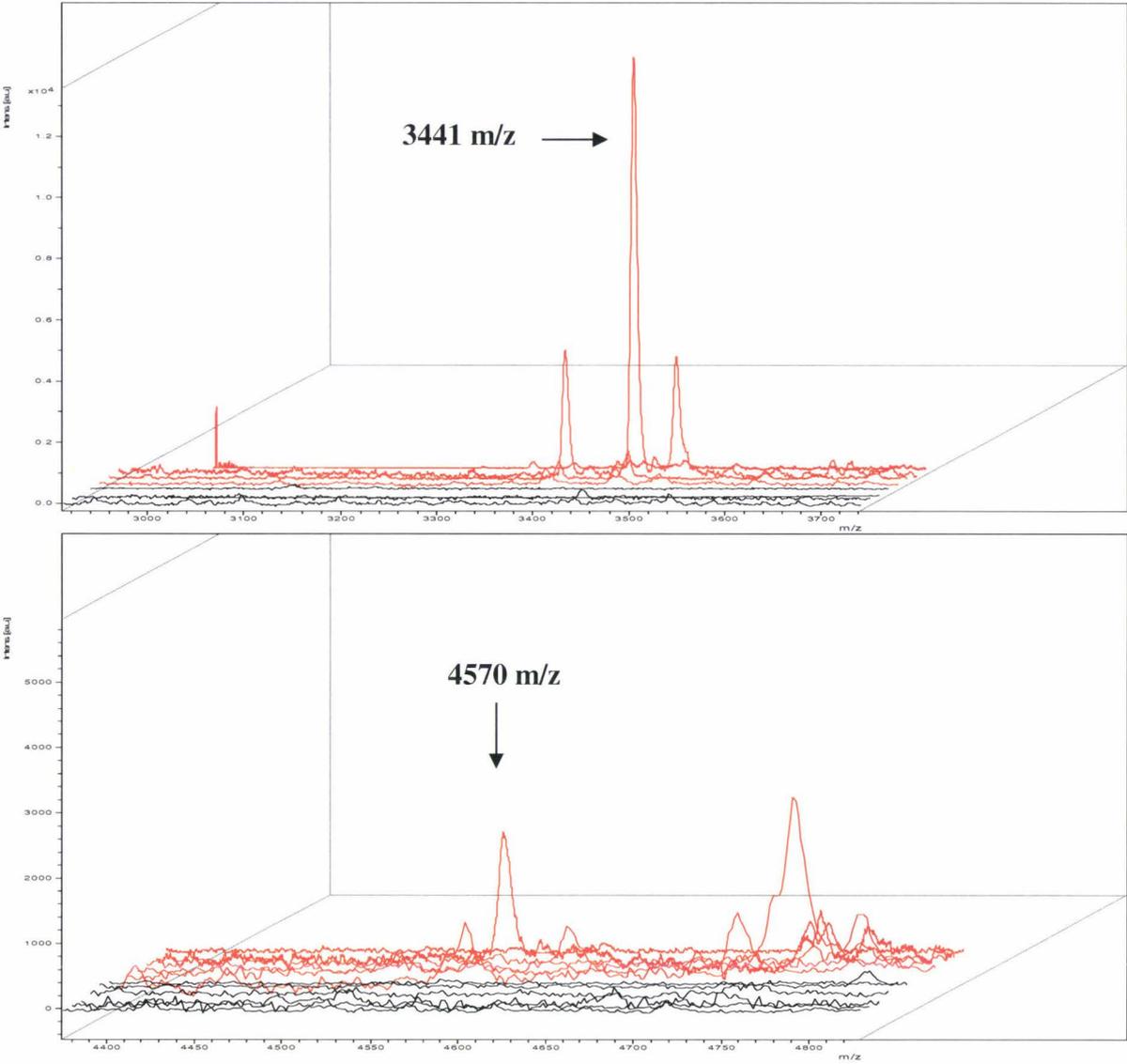
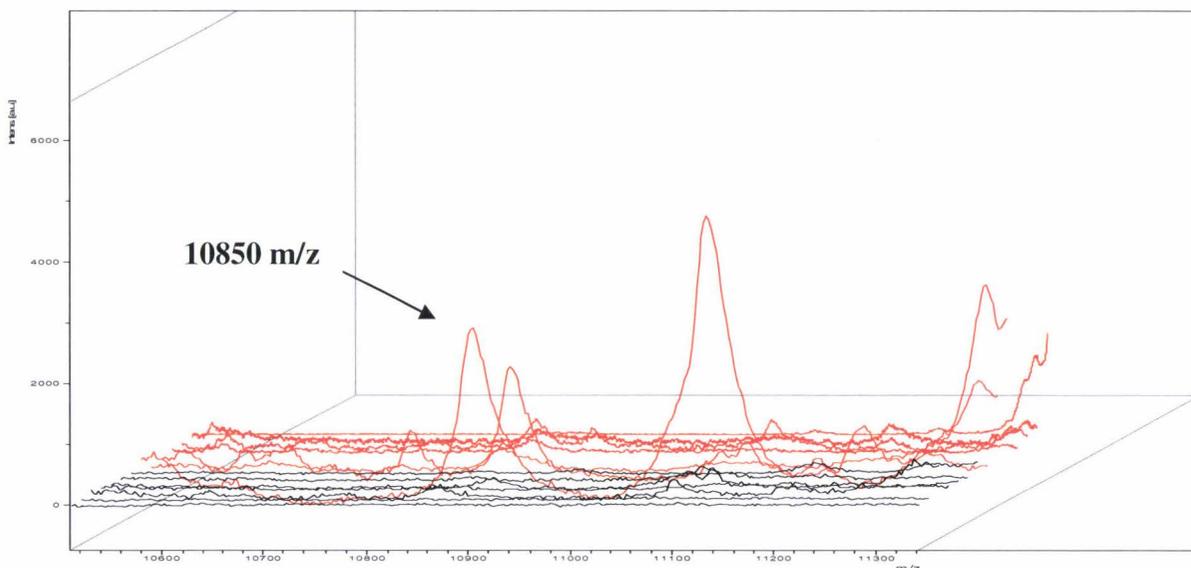


Figure 59 : Nouveaux biomarqueurs candidats respectivement de m/z : 3441, 4570, 10850.

Figure 60 : Différentiel en analyse directe : mise en évidence des biomarqueurs candidats de m/z 3441, 4570, 10850 (profils peptidiques malins en rouge et bénins en noir).





Résultats des analyses MALDI après traitement au Chloroforme et lavage des coupes tissulaires. (Tableau 9) :

Nous avons donc recherché les 3 nouveaux biomarqueurs candidats dans le liquide de lavage après traitement au chloroforme, non seulement pour **confirmer leur présence** mais également pour **essayer les identifier**.

REG alpha assoie sa position en tant que BM potentiel du cancer de l’ovaire car il a pu être détecté dans 75% (n=6/8) des lavages tissulaires. (**Figure 62**). Après lavage tissulaire, les BM se retrouvent assez facilement, ce qui était le but de l’expérience: pouvoir obtenir les BM en solution sans passer par les étapes d’extraction HCl et l’HPLC. La présence des 3 nouveaux BM candidats est confirmée, avec des pourcentages de détection de 37,5% (n=3/8) pour le 3441, 50% (n=4/8) pour le 4570, et 100% (n=8/8) pour le 10850. (**Figures 61et 63**) Aucun des 3 BM candidats n’a été retrouvé dans le liquide de lavage des tumeurs bénignes.

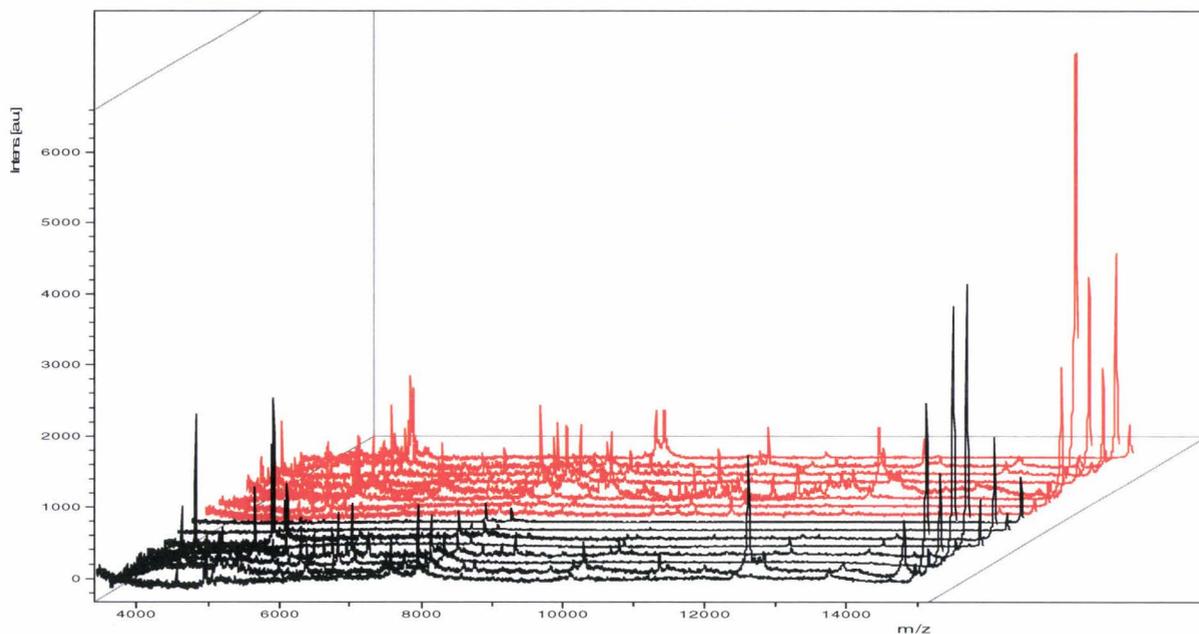


Figure 61. Différentiel en analyse MALDI après lavage tissulaire : 8 profils peptidiques malins (en rouge) vs 8 profils peptidiques bénins (en noir).

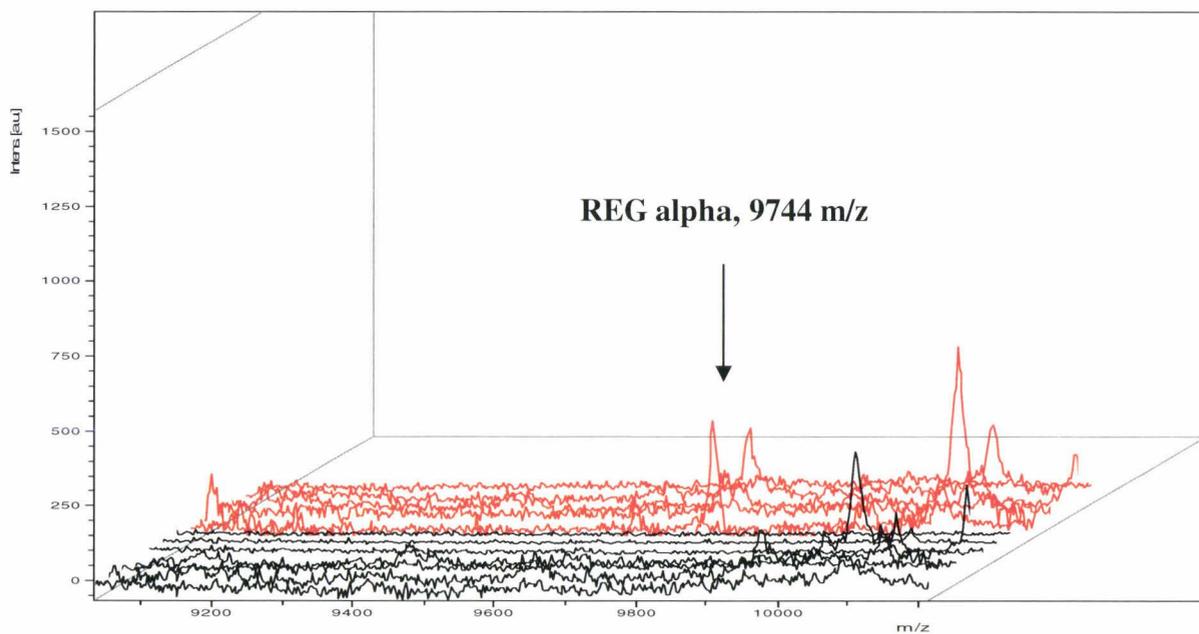


Figure 62 : Différentiel en analyse MALDI après lavage tissulaire : REG alpha, 9744 m/z.

3441 m/z



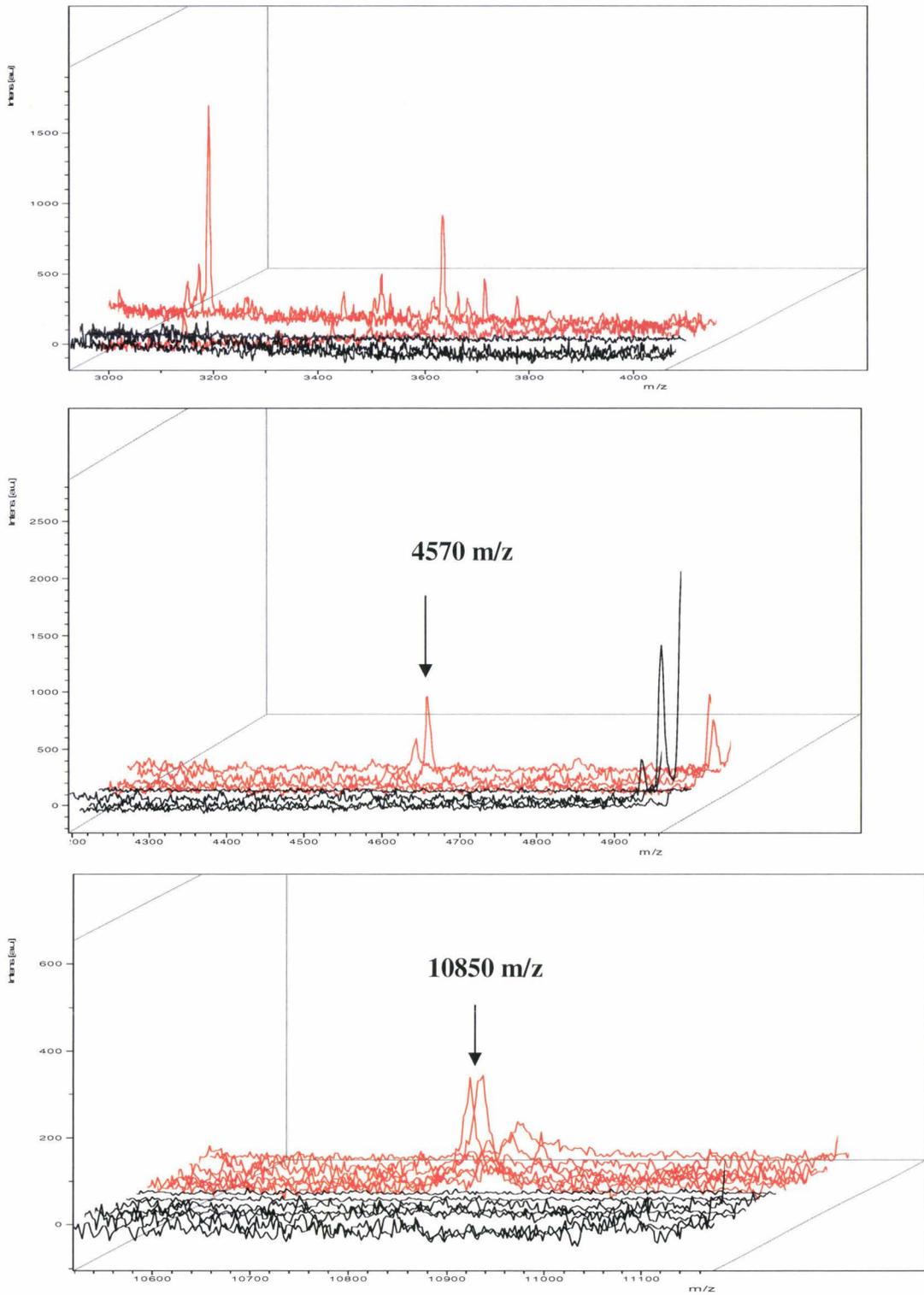


Figure 63 : Différentiel en analyse MALDI après lavage tissulaire. BM candidats de m/z 3441, 4570, 10850 (profils peptidiques malins en rouge et bénins en noir).

Résultats en Imagerie MALDI : Cartographie des BM 3441 / 4570 / 10850 et REG alpha sur une coupe tissulaire.

Les 3 biomarqueurs de m/z 3441-4570-10850, ont une répartition différente au sein du tissu. Chacun des biomarqueurs est localisé en zone tumorale et aucun n'est retrouvé au niveau du tissu conjonctif ovarien. Ces résultats sont très concluants vis à vis de la spécificité de ces marqueurs. L'analyse par imagerie a également permis de localiser le marqueur REG α déjà identifié.

Le peptide de masse 3341m/z est corrélé à une structure particulière du tissu encore inexpliqué. Ce marquage est en périphérie du tissu et semble englober la zone contenant les autres biomarqueurs. Cette zone comprend les ions de masse 10850 et 4570 m/z avec une répartition tissulaire superposable à celle de REG α (**Figure 65**). Les 4 biomarqueurs (3441 m/z, 4570 m/z, 10850 m/z et REG alpha) couvrent l'ensemble du tissu ce qui confirme la spécificité de l'analyse (**Figure 66, 67, 68**). A l'heure actuelle, la caractérisation de ces nouveaux BM est en cours.



Figure 64. Image d'une coupe de tissu cancer

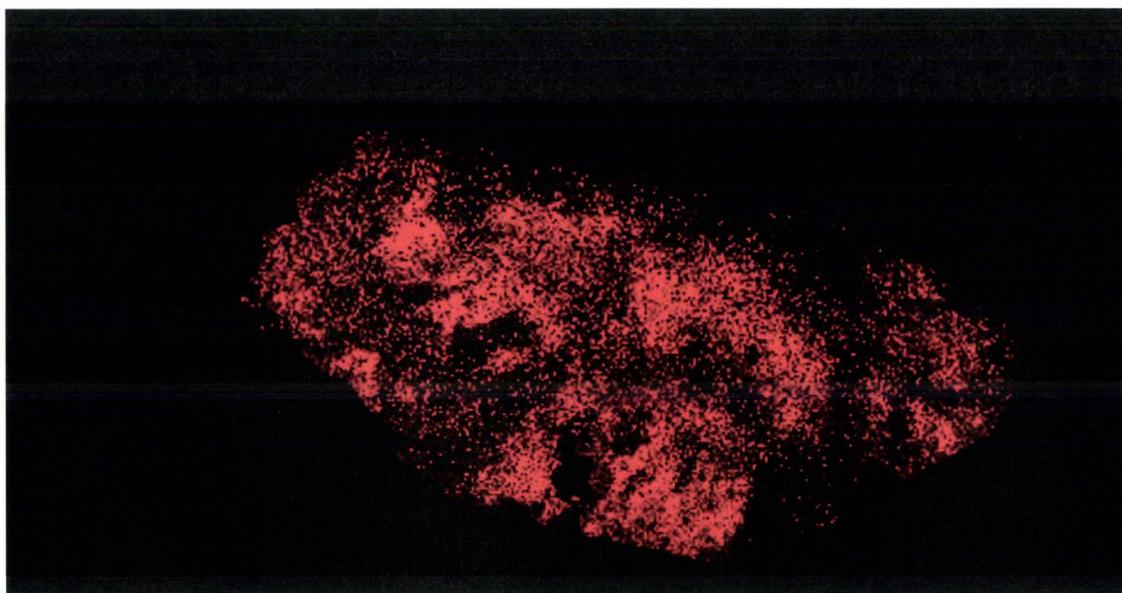


Figure 65. Image par spectrométrie de masse de l'ion 9763 m/z correspondant à Rage alpha



Figure 66. Image par spectrométrie de masse de l'ion 3441 m/z

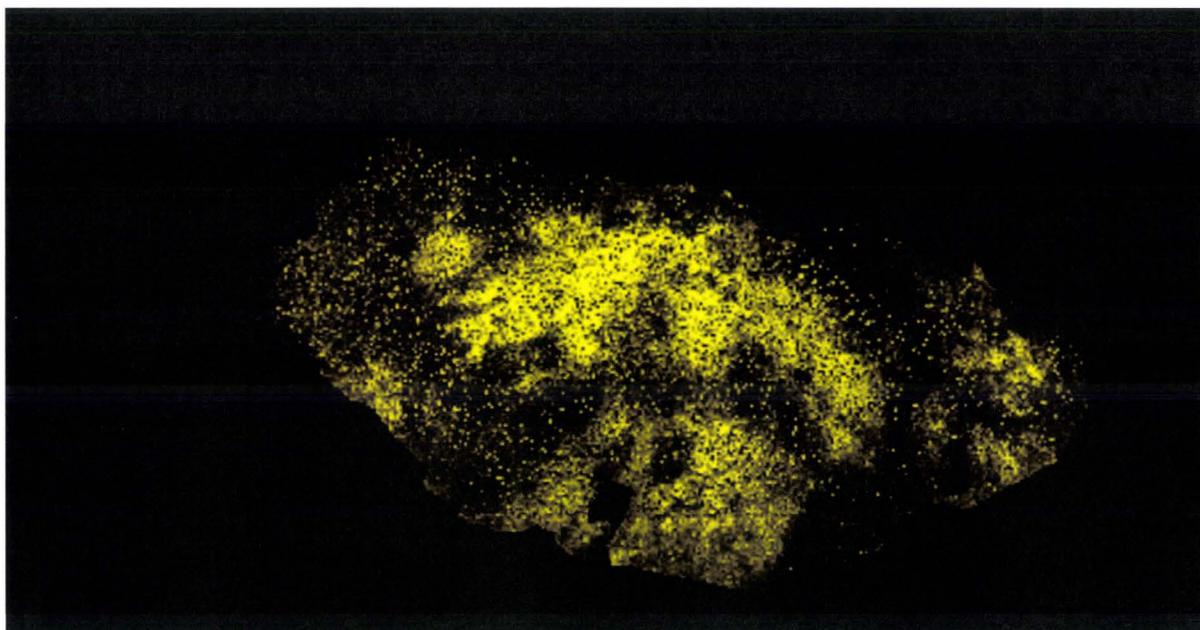


Figure 67. Image par spectrométrie de masse de l'ion 10850 m/z

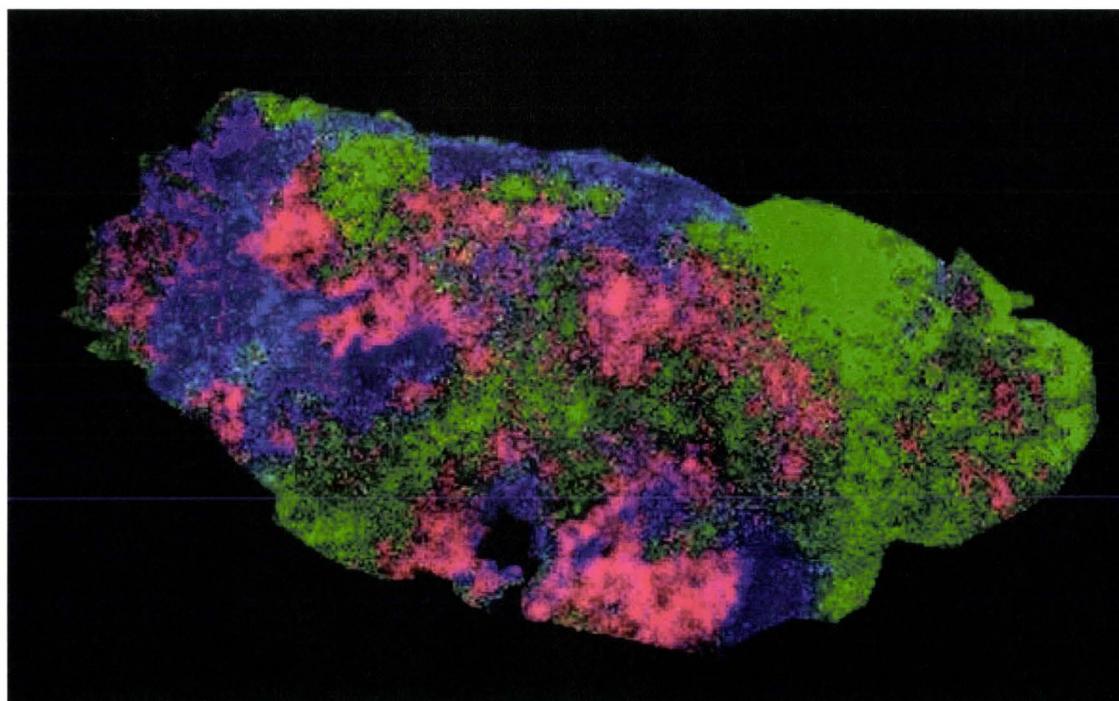


Figure 68. Image par spectrométrie de masse de l'ensemble des ions 3441, 4570, 9763, 10850 m/z

Analyses des liquides d'ascite

L'analyse des liquides d'ascite conforte l'analyse effectuée sur le MALDI ; L'ensemble des marqueurs a été retrouvé dans différentes fractions obtenues après HPLC.

Ces résultats permettent d'envisager une probable libération des différents biomarqueurs putatifs dans les liquides avoisinants.

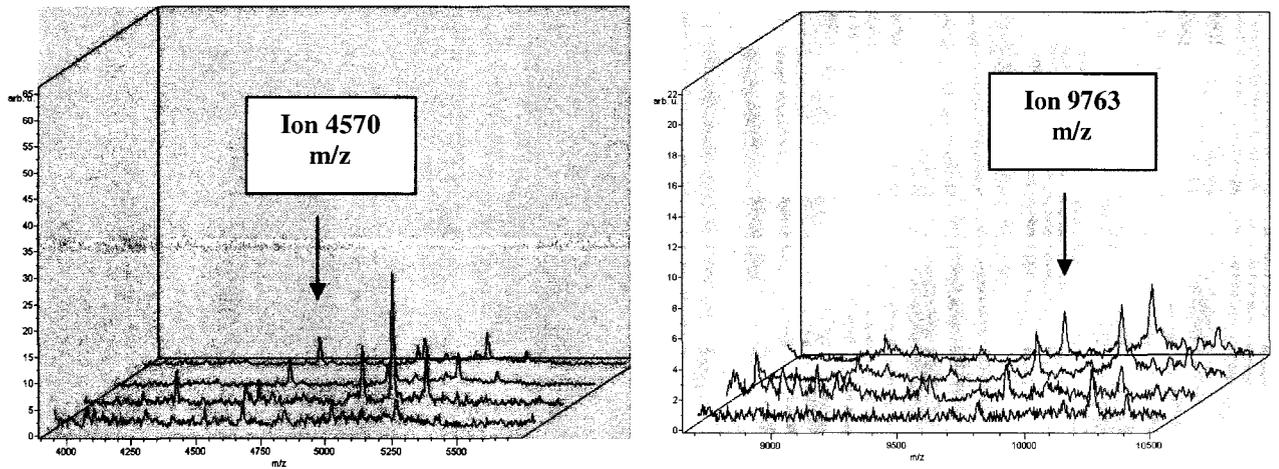


Figure 69. Spectres MALDI issu de la séparation des protéines par HPLC (phase inverse C18).

5.1.5. Conclusions et perspectives

Choix des patientes :

Nous avons fait le choix d'exclure les patientes présentant des tumeurs non épithéliales de l'ovaire. En effet, les comités de relecture scientifique exigent désormais que les analyses en protéomique clinique, pour la recherche de biomarqueurs du cancer de l'ovaire, soient réalisées par type histologique de tumeur. Il semble en effet aberrant de comparer des profils peptidiques entre des tumeurs germinales et des tumeurs épithéliales, par exemple. Ainsi, faire une première sélection en évinçant les tumeurs non épithéliales, nous a paru judicieux.

De plus, éliminer les prélèvements issus de patientes VIH + et/ou HBV + et/ou HCV +, ceux issus des patientes préalablement traitées par chimiothérapie ou encore ceux émanant de patientes ayant d'autres antécédents cancérologiques, permet d'éviter un biais de sélection. Le but étant de limiter un maximum la variabilité interindividuelle des patientes. Pour limiter cette variabilité, certaines équipes REF ont choisi de travailler uniquement sur des cellules cancéreuses issues de cultures cellulaires.

Enfin, du fait de la nature rétrospective de l'étude et du caractère particulier du cancer de l'ovaire (faible fréquence, diagnostic à des stades tardifs), il n'a pas été possible d'effectuer nos analyses sur des stades précoces.

Dans cet objectif, Dans le cadre de la subvention INCA obtenue en cette année, une étude multicentrique avec l'Hôpital de Dijon, et la plateforme de Dijon (Dr. P. Ducoroy) va pouvoir ce mettre en place et permettre d'augmenter les cohortes.

La première étude réalisée à parti d'une trentaine de biopsies issues de patientes atteintes de cancer de l'ovaire de stade III et IV ou de kystes bénins (ou ovaire sain) a mis en évidence 8 biomarqueurs potentiels de cette pathologie. Le marqueur le plus important présent dans près de 80% des tumeurs est un fragment identifié comme appartenant à la protéine REG alpha qui est un activateur du protéasome, ce dernier ayant déjà été décrit comme impliqué dans certains cancers, dans la régulation de l'apoptose ou du cycle cellulaire. A notre connaissance, PA 28 n'avait jamais été décrit comme impliqué dans le cancer de l'ovaire.

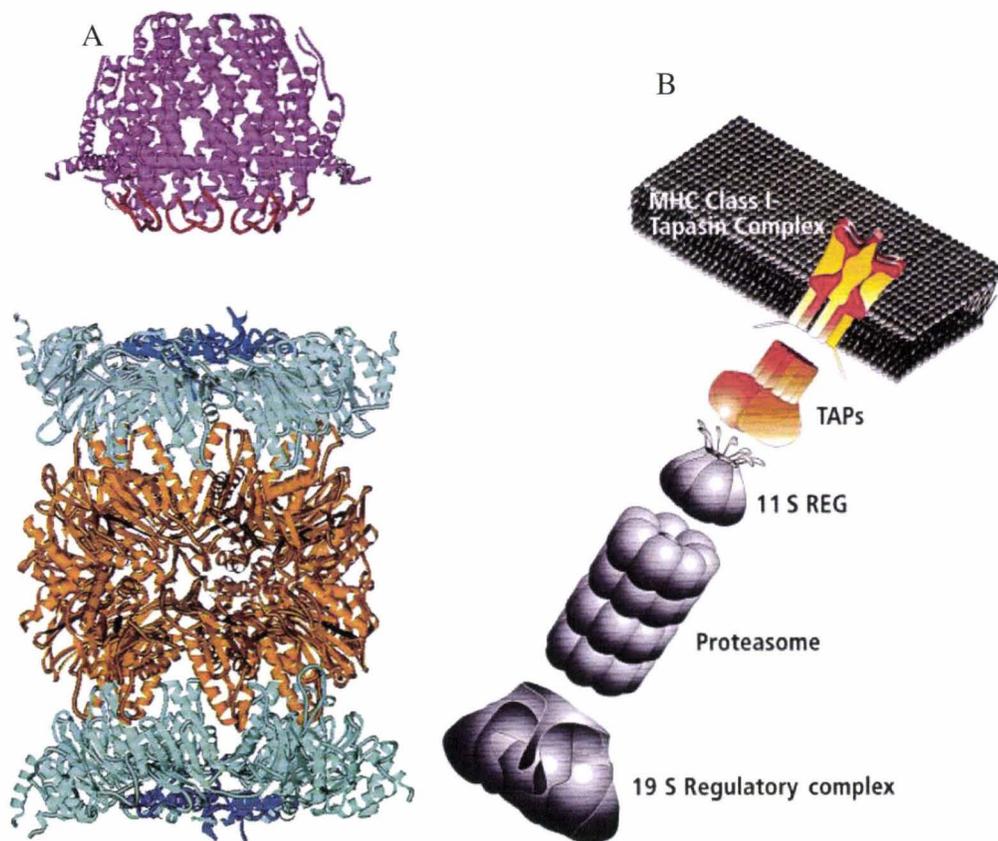


Figure 70 Représentation de l'interaction des sept sous domaines de REG alpha (violet) et la structure du protéasome (Rechsteiner, Realini et al. 2000).

Cette protéine joue le rôle d'activateur du complexe protéasome, complexe de 700 kDa responsable de la dégradation naturelle des protéines intracellulaires chez les eucaryotes. Il régule ainsi la présence de protéines synthétisées à partir du génome. Deux voies de dégradation sont envisageables : Dans un premier système, ATP dépendant, les protéines à dégrader sont marquées par l'ubiquitine et régulées par une protéine PA700 (ou 19S). Dans le deuxième cas, les protéines ne sont pas ubiquitinées, et les complexes activateurs sont les protéines RAG (ou PA28, ou 11S) composées de différentes sous unités (REG α , REG β , REG γ). Le protéasome est responsable de la dégradation de nombreuses protéines incluant les protéines ayant de mauvaises conformations, les protéines virales, les protéines mutées. Ce système est donc en liaison directe avec les molécules du CMH I et les protéines TAP (transporter associated with antigen processing) et participe donc dans l'intégrité de la cellule dans la réponse immunitaire : on parle alors d'immunoprotéasome (Rechsteiner and Hill 2005). L'implication du protéasome dans certains cancers a précédemment été décrite, notamment concernant un défaut dans la machinerie de dégradation utilisant les ubiquitines (Adams 2004).

Il semblerait ainsi que nous avons mis en évidence la dégradation de la protéine REG α lors de processus de cancer de l'ovaire. Lors de ce processus, REG α serait délocalisée et retrouvée dans le cytoplasme, démontrant une nouvelle fois l'implication du protéasome dans le cancer.

La reprise des travaux à partir de l'analyse directe des coupes et des lavages dans les zones privilégiées après coloration HES a permis de confirmer la présence du premier biomarqueur détecté et identifié : le fragment C-terminal de REG α . Cette stratégie nous a permis de détecter et de localiser 3 autres biomarqueurs à l'heure actuelle avec des localisations spécifiques. L'association de l'analyse directe par MALDI, imagerie MALDI et lavage sur coupe a permis de mettre en évidence ces marqueurs avec un taux de spécificité élevé, en moyenne 80%.

Au regard de sa localisation périphérique, le marqueur 3441m/z est très intéressant puisqu'il diffère des autres biomarqueurs. Ce marqueur semble montrer une différenciation tissulaire au sein même du tissu cancéreux validé par coloration HES. Cette information montre tout l'apport de l'imagerie moléculaire permettant de dissocier les tissus cancéreux jusque là impossible par les méthodes de coloration HES. (Ces méthodes de coloration sont utilisées en routine dans le milieu hospitalier).

L'analyse de cette étude s'arrête pour l'instant à REG α et 4 biomarqueurs dont il est nécessaire d'identifier et de valider par des approches immunohistochimiques. Cette étude est d'ores et déjà envisagé afin de prendre la suite des ces résultats.

En parallèle, on peut considérer que environ 20 à 25% des protéines intracellulaires sont sécrétées dans le sang. Le fait d'avoir retrouvé nos biomarqueurs candidats (de m/z 3441, 4570, 9744 et 10850) dans les liquides d'ascite tumoraux peut laisser présager que ces protéines ou ces fragments protéiques, issus de la transformation des cellules en cellules cancéreuses ou issus du microenvironnement tumoral, pourraient entrer dans la circulation générale et être accessibles à la détection en spectrométrie de masse. Cependant, les techniques de spectrométrie de masse ne peuvent détecter que des éléments dont la concentration est $> 1\mu\text{g/mL}$ dans le sérum. Ce serait encore 1000 fois trop élevé par rapport aux concentrations auxquelles on retrouve les biomarqueurs usuels dans le sang. En effet, aucune des études publiées jusqu'ici (sur le cancer du sein, de la prostate ou de l'ovaire) reposant sur les techniques de SM n'ont pu identifier les marqueurs cancéreux utilisés en routine clinique, en tant que molécules distinctes dans le sérum.

D'où la nécessité de recourir à des analyses sur le sang afin de valider définitivement les peptides trouvés comme biomarqueurs du cancer de l'ovaire lors de nos études de

profiling sur tissu. Il est pratiquement sur que les BM retrouvés dans le tissu seront différents suite à des clivages enzymatiques spécifiques (caspases, prohormones convertases) mais le fait de savoir ce que l'on cherche doit pouvoir simplifier le problème.

5.2. L'analyse des tissus FFPE et la recherche de marqueurs dans la maladie de Parkinson

5.2.1. Développement de l'IMS aux tissus FFPE

Introduction

L'analyse directe de tissu par spectrométrie de masse permet d'établir le profil protéique et peptidique du tissu analysé. Elle permet de réaliser des analyses à la fois différentielles, cinétiques et dynamiques (Li, Hoek et al. 1994; Dreisewerd, Kingstomb et al. 1997; Jimenez and Burlingame 1998; Chaurand, Stoeckli et al. 1999; Chaurand and Caprioli 2002; Chaurand, Fouhecourt et al. 2003; Fournier, Day et al. 2003). L'adjonction de méthodes informatiques de retraitement des données permet de réaliser l'imagerie par spectrométrie de masse (Caprioli, Farmer et al. 1997). Les développements sont principalement réalisés sur des tissus congelés (Stoeckli, Chaurand et al. 2001; Stoeckli, Staab et al. 2002; Chaurand, Schwartz et al. 2004; Chaurand, Schwartz et al. 2004; Caldwell and Caprioli 2005; Chaurand, Schwartz et al. 2005; Rohner, Staab et al. 2005; Rubakhin, Jurchen et al. 2005; Chaurand, Cornett et al. 2006; Altelaar, Luxembourg et al. 2007; Altelaar and Heeren 2007). Cependant, l'utilisation de cette technologie en clinique doit passer par l'utilisation directe de tissus fixés et paraffinés qui sont les échantillons les plus utilisés en milieu hospitalier. C'est un véritable verrou technologique et un challenge en protéomique et en imagerie MALDI (Hood, Darfler et al. 2005; Palmer-Toy, Krastins et al. 2005). Ce tissu n'est pas exploitable directement, car la fixation par le paraformaldéhyde crée des ponts méthylène covalent entre les protéines formant un réseau dans le tissu. Ces tissus sont principalement utilisés par les anatomopathologistes pour du diagnostique après coloration HES ou pour la réalisation d'études immunohistochimiques.

Il semblait donc important de pouvoir avoir accès aux informations moléculaires contenues dans ces blocs de tissu nommés FFPE (Formalin Fixed Paraffin Embedded) permettant l'accès aux banques d'échantillon conservés au sein des hôpitaux. L'objectif fut donc de réaliser des traitements sur ces coupes afin d'ouvrir le réseau protéique à l'analyse par spectrométrie de masse. Les deux développements importants ont été la digestion enzymatique sur tissu afin de rompre les protéines liées par les ponts méthylènes, et d'y adjoindre une approche de micro-dépôt afin de ne pas délocaliser les peptides de la coupe lors

de la digestion et du dépôt de matrice. L'utilisation de cette approche sur des cerveaux traités au 6-OHDA (un modèle animal de la maladie de Parkinson) et stockés depuis plus de 10 ans a permis de mettre en évidence la faisabilité de la technique et de démasquer un certain nombre de marqueurs d'intérêt précédemment identifiés par d'autres stratégies et valider comme étant des marqueurs spécifique de la maladie.

5.2.1.1. La digestion

L'étude sur les tissus FFPE, développée par R. Lemaire durant sa thèse (Lemaire, Desmons et al. 2007) a permis de mettre en évidence des stratégies dépendantes du temps de stockage des échantillons. En effet, la fixation provoque la formation de liaisons covalentes méthylène qui s'accroissent au cours du temps. Cela empêche donc après plus de 6 mois de conservation de faire des analyses fiables et reproductibles en MALDI (Lemaire, Desmons et al. 2007). Pour des échantillons plus âgés, Il faut réaliser une la digestion enzymatique permettant de couper les protéines au sein du tissu dans le réseau des ponts méthylènes. La digestion par trypsine est une des possibilités mais tout autre enzyme fonctionne également. Il faut ajuster la concentration et le temps d'incubation. Il est à noter que des expositions successives d'enzymes donne un meilleur rendement de coupure. Les tests utilisant cette méthode sont réalisés sur des tissus frais par comparaison avec des études sur des tissus FFPE afin d'optimiser le rendement de digestion sur les coupes.

Les facteurs déterminant pour cette digestion sont la concentration de l'enzyme déposée par unité de volume, La température (30°C) et le temps de digestion. Cette approche permet de générer des fragments peptidiques dont l'analyse est caractéristique d'une protéine après interrogation de la base de données par MASCOT. C'est pourquoi il est important d'être dans les meilleures conditions de digestion afin d'avoir un maximum de fragments. (**Tableau 10**)

Afin de limiter la délocalisation, uniquement à la zone où sera déposée l'enzyme, deux méthodes de micro-dépôt en utilisant le Chips de Shimadzu ou la vaporisation. Ces deux systèmes ont été testés pour chaque cas de dépôt de matrice et de trypsine. Rapidement, il est convenu que le système de vaporisation ne donne pas de bons rendements de digestion. Il est alors abandonné. Par contre, il reste intéressant pour des analyses rapides non comparatives où la reproductibilité n'est pas le facteur primordial, pour une approche rapide de test.

Les tests ont été ensuite réalisés sur des tissus FFPE. Les meilleures conditions sont regroupées sous le tableau 10, où on peut voir les spectres correspondant aux différentes conditions de digestion. Le temps nécessaire est de 1 heure avec une concentration optimale de 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pour un volume de 150 μL déposé sur un tissu de cerveau de rat (1,15 cm^2). Le tampon initialement utilisé (tampon de bicarbonate d'ammonium) est finalement abandonné car l'analyse des spectres est incompatible avec l'ajout de tampon de digestion.

Facteurs	---	--	+	+++
Matrices	Acide sinapinique		Aniline	HCCA
Concentration Trypsine	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$			50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Tampon de digestion	Tampon bicarbonate 100mM	Tampon bicarbonate 50mM	Tris HCl 50mM	Eau milliQ
Temps de digestion	20 minutes	30 minutes	45 minutes	1 heure
Température	< 20° C	< 20° C	20° C	30-50°C

Tableau 10. Spectres issus des différentes méthodes de digestion. La digestion est réalisée avec différents temps de digestion, de température, différentes solutions tampon avec différentes concentrations de trypsine.

En effet, ce tampon ajoute beaucoup de sels au tissu et empêche la matrice de cristalliser correctement. Cela induit un très faible rendement au niveau de réaction de désorption et d'ionisation. La qualité des spectres en est amoindrie. Il est donc apparu alors judicieux de remplacer cette solution par une solution d'eau pure. Les résultats observés (**Figure 71**) montre que la solution de remplacement permet quand même au tissu d'être digéré. Ceci est principalement dû au fait que le tissu est déjà tamponné.

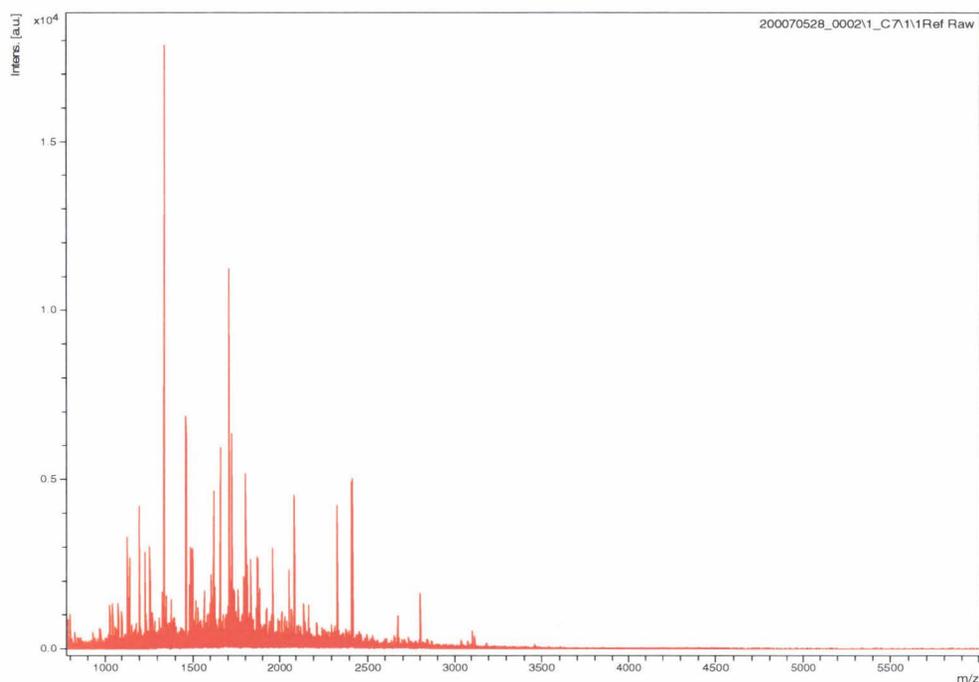


Figure 71 Spectre obtenu après digestion à la trypsine 50 μ g/mL dans de l'eau pendant une heure à 37° C.

5.2.1.2. Le micro-dépôt par tête piezo-électrique

Le micro-dépôt est réalisé par l'intermédiaire d'un éjecteur de goutte qui réalise un dépôt homogène et reproductible d'un volume de 100pL de solution (**Figure 72**). Le contrôle de dépôt se réalise par informatique gérant la quantité de solution, le nombre de dépôt à chaque emplacement, et l'espace entre chaque dépôt.

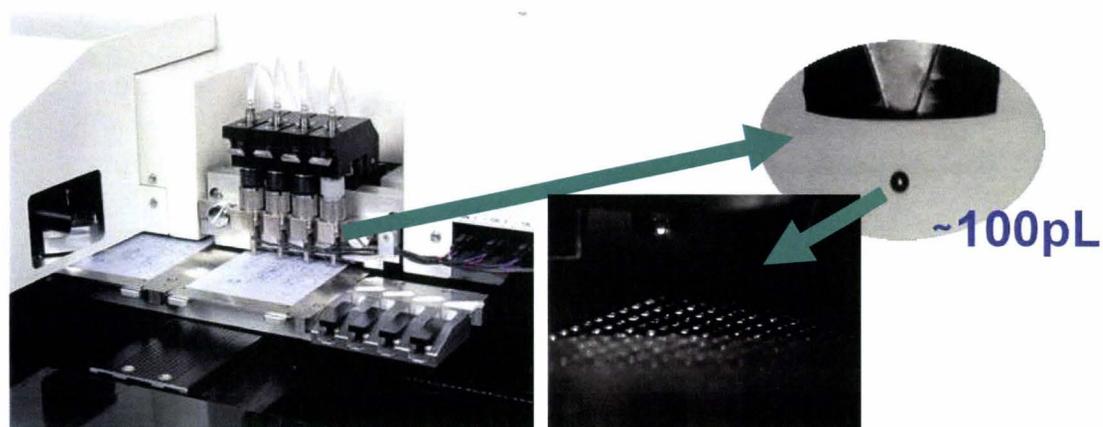


Figure 72 Photographie de gauche est le système de dépôt de solution par éjection de goutte. La photographie de droite correspond à l'agrandissement du système d'éjection de goutte et de dépôt de 100pL de solution.

Ces facteurs sont optimisés afin de permettre une meilleure résolution spatiale, un bon rendement de digestion, et de cristallisation. Dans notre cas d'étude, nous avons besoin de

déposer à la fois la trypsine pour réaliser la digestion de coupe FFPE, et la matrice nécessaire pour l'analyse MALDI. (cf. introduction MALDI).

Ces données étant établies, nous avons pu réaliser des approches protéomiques comparatives sur le tissu de cerveau de rat traité ou non au 6-OHDA conservés depuis plus de 10 ans et de valider dans ce sens la méthodologie. Cette étude est présentée dans la partie résultats, a donné lieu à une publication soumise dans le Journal of Proteome Research. Cette approche permet outre de faire une analyse directe sur le tissu mais aussi par la suite de réaliser des images de la répartition des ions fragments constituant une protéine d'intérêt, ainsi qu'une image globale de l'ensemble des ions.

5.2.1.3. La maladie de Parkinson

Cette maladie est la deuxième plus importante (en nombre de cas observés) parmi les maladies neurodégénérative dans le monde. Elle touche plus d'un million de personnes âgées de plus 65 ans. Les symptômes de cette maladie se traduisent par des signes cliniques sévères de rigidité musculaire, de tremblements, de lenteur gestuelle, et d'instabilité de posture. Les caractéristiques principales sont la dégénérescence des neurones à dopamine de la substance noire, et la présence d'inclusions cytoplasmiques appelés corps de Lewy où s'accumulent certaines protéines dont notamment l'alpha synucléine. (Beal 2003; Shults, Haas et al. 2004; Beal and Lang 2006). Des mutations dans les gènes codant l'alpha synucléine, Parkine, et l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH1) ont été identifiées comme responsables de certaines formes de la maladie. Ces gènes participent à l'activité du système ubiquitine-protéasome, responsable naturel de la dégradation de certaines protéines de l'organisme ((Giasson and Lee 2003). La perte de l'activité de ce système contribue au développement de la maladie au travers de l'accumulation des protéines. (McNaught, Olanow et al. 2001)

Des études protéomiques ont déjà mis en évidence un grand nombre de protéines et de gènes dont le niveau d'expression sont altérés par la maladie. Ces études ont été réalisées soit sur des patients (post-mortem) soit sur des modèles parkinsoniens chez le rat/souris ou la drosophile. (Xun, Sowell et al. 2007) (Xun, Sowell et al. 2007) Les résultats montrent qu'un grand nombre de protéines ont subi des modifications du point de vue de niveau de l'expression *e.g.* la calmoduline, le cytochrome C, et la cytochrome C oxydase. Des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation ont également été retrouvées au niveau du striatum dans la partie déplétée en dopamine. Les protéines suivantes ont montré un

niveau d'expression plus faible comme le neurofilament L and M alors que d'autres marqueurs telles que la peroxyrédoxine II, le complexe mitochondrial III, la chaîne ATP synthase D, la complexine I, la profiline, et la protéine de liaison aux acides gras ont un taux d'expression plus élevé dans la maladie de Parkinson (Pierson, Norris et al. 2004).

Ces résultats indiquent un mécanisme de potentialisation des signaux afférents à la substance noire suite à la dégénération des neurones dopaminergiques. (Basso, Giraudo et al. 2004). Ces modifications disparaissent après un traitement à la L-Dopa. On peut noter l'existence d'un certain nombre de relation entre la maladie de Parkinson et les systèmes de régulation hormonal du striatum, du thalamus et du cortex cérébral (**Figure 73**)

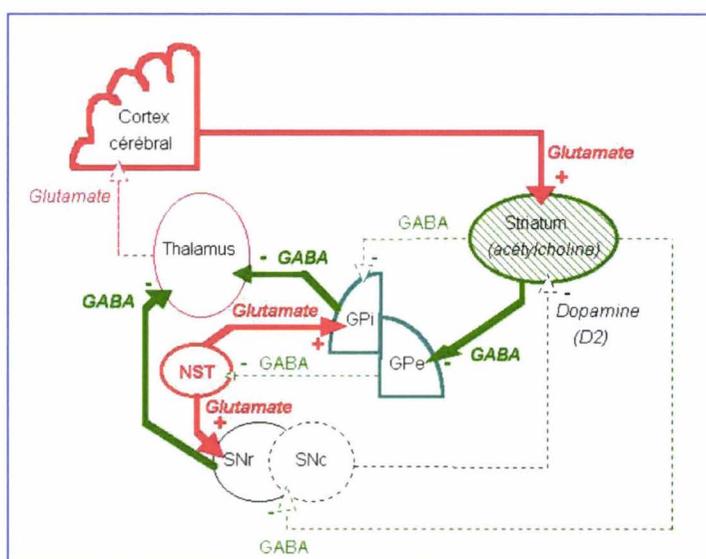


Figure 73 Représentation schématique des anomalies fonctionnelles au sein des noyaux gris centraux au cours de la maladie de Parkinson. La réduction des projections dopaminergiques vers le striatum favorise l'activité des projections gabaergiques dirigées vers le pallidum externe (GPe), au détriment des projections destinées au pallidum interne (GPi) et à la substance noire (SNc et SNr). Il en résulte une libération de l'activité glutamatergique du noyau sous-thalamique (NST), dont la conséquence est une inhibition du thalamus.

L'ensemble de ces données, a permis après avoir réalisé l'étude de faisabilité de notre approche de digestion trypsique sur du tissu FFPE et d'imagerie MALDI, de comparer nos résultats à ceux obtenus précédemment. Le but ici est de vérifier la véracité des résultats pouvant être obtenu suite à l'approche de digestion *in situ* pour l'imagerie MALDI. Ces travaux ont donné lieu à une publication *soumise* dans le Journal of Proteome Research.

5.2.2. Résultats

Notre étude est réalisée sur des rats traités au 6-OHDA (6-hydroxydopamine), un système modèle pour l'étude de la maladie de Parkinson (Perese, Brain Research, 1989). Nous avons utilisé l'approche de digestion et de dépôt enzymatique pour la détection et l'identification de marqueurs liés à la maladie de Parkinson.

Analysis of Proteins in FFPE Rat Brain Tissue Sections from 6-OHDA treated animals by MALDI Imaging Mass Spectrometry

Stauber J^{1ζ}, Lemaire R.^{1ζ}, Franck J.¹, Day R.², Fournier I.^{1*}, Salzet M.^{1*}

1 :Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE-CNRS 2933, MALDI Imaging Team, Cité Scientifique, IFR 147, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

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

Abstract:

A common technique for the long term storage of tissues in hospitals and clinical laboratories is preservation in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks. Such tissues stored for more than five years have not been useful for proteomic studies focused on biomarker discovery. Recently, MS-based proteomic analyses of FFPE showed positive results on blocks stored for less than 2 days. However, most samples are stored for more than one year, and thus our objective was to establish a novel strategy using as a model system 6-hydroxydopamine (6-OHDA) treated rat brain tissues stored in FFPE blocks for more than 9 years. We examined MALDI tissue profiling combining the use of automatic spotting of MALDI matrix with *in situ* tissue enzymatic digestion. On adjacent sections, the identification of compounds is carried by *in situ* tissue digestion followed by nanoLC/MS-MS analysis. The combination of these approaches provides MALDI direct analysis, MALDI/MS imaging as well as the localization of a large number of proteins. This method is validated since the analyses confirmed that ubiquitin, trans-elongation factor 1, hexokinase and the Neurofilament M are down-regulated as previously shown in human or Parkinson animal models. In contrast, peroxidoredoxin 6, F1 ATPase and α -enolase are up-regulated. In addition, we uncovered three novel putative biomarkers, the Trans elongation Factor 1 (eEF1) and the Collapsin response mediator 1 and 2 from protein libraries. The access to archived FFPE tissue using MALDI profiling and imaging opens a whole new area in clinical studies and biomarkers discovery from hospital biopsy libraries.

ζ : Equal contribution

* : co-corresponding author

Introduction

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurological disease after Alzheimer's disease. PD is characterized by a selective degeneration of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* and by cytoplasmic inclusions (Lewy Bodies) where specific proteins are stored like the α -synuclein¹. The clinical symptoms are severe motor dysfunctions, including rigidity, postural imbalance, slowness of movements, and uncontrollable tremor. Mutations in genes encoding α -synuclein, parkin and ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH L1) have been identified in sporadic familial forms of PD². Several proteomic studies using 2D gel analyses in animal models and humans have identified biomarkers implicated in this pathology^{3, 4 5-7}(Table 1). In Parkin knockdown models, pyruvate dehydrogenase; NADH ubiquinone oxyreductase 30 kDa, cytochrome c oxydase, peroxiredoxin 1, 2 and 6, lactoylglutathione lyase, vacuolar protein sorting 29, crystalline chain b and heterogenous nuclear ribonucleoprotein 1 are all down regulated⁴. Similarly, in 6-OHDA animal models⁸, as well as in humans, α -enolase, β -actin, Lasp-1, neurofilament triplet L and M are also down-regulated³⁻⁶. In contrast, human peroxiredoxin 2, complexin I, fatty acid binding protein, L type calcium channel d subunit, mitochondrial complex III and ATP synthase D chain are up-regulated⁵. These results have been confirmed by Strey *et al.*⁷ in SOD1 gene studies, where α -enolase as well as HSP25, HSP27, phosphatidyl inositol transfer protein, apolipoprotein E and ferritin heavy chain are up-regulated. These contradictory studies for peroxiredoxin 2 or profilin show the difficulty to get real biomarker from these classical techniques. Molecular profiling of proteins and peptides can be performed directly on or near the surface of brain tissue sections with high specificity and sensitivity by utilizing matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI MS). This technique was first introduced by Caprioli *et al.*⁹ and adapted in other studies¹⁰. The first tissue profiling studies on 6-OHDA Parkinson model have been performed by Per Andr n group¹¹. From their studies, calmodulin, cytochrome c, cytochrome c oxydase appear to be down-regulated with the exception of ubiquitin¹¹.

In this study, we present data obtained from old stored (9 years) FFPE tissues from rat brains treated with 6-OHDA. We performed MALDI tissue profiling combining automated spotting of MALDI matrix with *in situ* enzymatic digestion. On the adjacent sections identification of compounds present in the sections after extraction of the *in situ* tissue digest is followed by nanoLC/MS-MS analysis. Combination of these approaches allows MALDI

direct analysis, MALDI/MS imaging, as well as the localization of a high number of proteins. We confirmed that hexokinase and the Neurofilament M are down-regulated. By contrast, Collapsin response mediator proteins (1 and 2) (CRMP), peroxidoredoxine 6, F1 ATPase, Ubiquitin and α -enolase were up-regulated. Moreover, we also uncovered that the Trans elongation Factor 1 (eEF1) is down-regulated..

EXPERIMENTAL

Material

α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH), ammonium bicarbonate, trisma base, xylene, ethanol, Angiotensin II, Des-Arg-Bradykinin, Substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38 and bovine Insulin were obtained from Sigma-Aldrich and used without any further purification. Trypsin was from Promega. AspN, LysC enzyme was from Roche. Trifluoroacetic acid (TFA) was purchased from Applied Biosystems. Acetonitrile p.a. and methanol p.a. from J.T. Baker.

Animal Surgery and Treatments.

Wistar male rats (180–200 g) were anesthetized with pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) and infused over 8 min with 6-OHDA (8 mg in 4 ml of 0.05% ascorbic acid in saline) at coordinates A 5 23.8 mm, L 5 1.5 mm, H 5 28.5 mm¹².

Tissue fixation

Rats were sacrificed 4h after the last drug injection. Their brains were removed and fixed for 40 min at 48C in 4%paraformaldehyde. The accuracy of the 6-OHDA lesion was checked by immunocytochemistry with an anti-tyrosine hydroxylase antibody according to¹². These brain tissues blocks were then stocked in box at room temperature 9 years before used in this experimental plan procedure.

Tissue dewaxing

Tissue sections of 10 μ m were applied onto ITO (Indium Teen Oxided) coated conductive glass slides. Paraffin was removed by 2 baths of 5 minutes of xylene and lightly rehydrated with graded ethanol (100°, 96° , 70° and 30°) before drying at room temperature

Trypsin preparation

For direct analysis, 2 μ L of enzyme (trypsin 0,033 μ g/ μ L in 25mM Tris buffer pH 7,4) were added to different spots on the tissue to obtain representative proteins/peptides profiles. The digest is done at room temperature; the tissue is covered to decrease liquid evaporation. Each 10 minutes, enzyme solution is added to the same spots. Digestion is stopped by rinsing the tissue with 80% cold ethanol (-20°C) to remove salts. The sections are allowed to dry at room temperature. 30 μ L of matrix is then applied on the tissue.

For a section of 2cm², after enzymatic digestion, 15 μ L of binding solution was directly applied onto the tissue during 1 minute, then 15 μ L of magnetic bead was added on the slice. Extraction occurred during 10 minutes. During this step, beads and enzymatic result were mixed 3 times using a micropipette directly onto the tissue. Then, digestion solution and beads were deposited in a polypropylene tube and washed 3 times using 500 μ L of H₂O / TFA 0,1%. Peptides were eluted with 30 μ L of ACN/H₂O 0,1% TFA. MALDI/MS analysis can be performed after mixing resulting solution with MALDI matrix (HCCA, 10mg, ACN/H₂O 0,1% TFA (2/1 v/v)) or after solvent evaporation and dissolution in 10 μ L of water. For nano LC-MS/MS identification, peptides were re-dissolved in H₂O/MEOH 0,1% formic acid (9/1 v/v) after elution and evaporation.

Mass Spectrometry

MALDI-MS

Spectra were acquired on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with delayed extraction (DE) and a 337nm pulsed nitrogen laser. Either HCCA, SA, or 2,4-DNPH were used at concentration's of 10mg/mL, 20 mg/mL and 4mg/mL respectively, in ACN /0.1% TFA:H₂O (2:1, v/v). Matrices were applied onto the tissue using a micropipette (typically 20 μ L for a whole rat brain slice) and then dried at room temperature. External calibration was performed using a mixed solution of peptides (bradykinin 1.6 μ M, Substance P 1.6 μ M, ACTH 18-391.6 μ M, ACTH 7-383.2 μ M, bovine Insulin 4.8 μ M and bovine Ubiquitin 4.8 μ M in H₂O). Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD camera (SONY). Each spectrum is the average of 200 laser shots of the area of interest. Acquisition parameters were set as follow

- HCCA matrix (mass range 500-10000): acceleration voltage: 25kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.05%, extraction delay time: 200ns.

- SA matrix (mass range 2000-30000): acceleration voltage: 25kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.2%, extraction delay time: 300ns

- 2,4 DNP reactive (mass range 500-10000): acceleration voltage: 25kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.05%, extraction delay time: 200ns.

MALDI-MS trypsin fingerprint experiments of FFPE tissue sections after *in situ* digestion of the whole tissue section was performed on an Ultraflex II TOF-TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, DE) equipped with LIFT III cell and smart beam laser with a repetition rate up to 200 Hz. For MS/MS experiments parameters were set as follow: laser repetition rate was 100 Hz with 33% attenuation, ion source voltages were respectively 8 kV and 7.3 kV on MALDI sample plate and 1st electrode; LIFT cell was pulse from ground for electrode 1 and 2 to 19 kV and in the last step electrode 3 was decrease to 3.2 kV; reflector end voltage was set to 29.5 kV and mid-grid to 13.85 kV. Trypsin fingerprint protein identification in databanks were performed using the Biotool 3.0 interface (Bruker Daltonics, Bremen, DE) connected to Mascot search engine and interrogating the NCBI, Swissprot and ESTs databanks with Oxidation as Variable modification, Monoisotopic as mass values, a peptide mass tolerance ± 0.1 Da with a peptide charge state of 1+, max missed cleavages of 1 and number of queries of 300.

Trypsin micropotting: spots of enzyme (trypsin at 0,05 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in water) were performed using a high accurate position automatic microspotter (Chips-100, Shimadzu). Thus, the whole tissue section was micro-spotted with enzyme following a regular raster of spots of ~ 200 μm size. The quantity of trypsin was after optimization set to 20 nL by 40 cycles of 500 pL on each spot position in order to cover the surface of tissue. 40 nL of DHB matrix (10mg/mL in Methanol/TFA 0,1%, 1:1, V/V) was then spotted on the same position as for the enzyme using 80 cycles of 500 pL .

MALDI MSI

For MALDI-MSI of 9 years stored fixed and paraffin embedded tissues, imaging was performed on an Ultraflex II TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, DE). After dewaxing, images were obtained in positive linear mode after trypsin digestion and DHB matrix deposition by microspotting (Chips-100, Shimadzu). 20nL of the mix was applied onto the tissue using a micropotting as explained above and dried at room temperature. Acquisition was realized using smartbeam, with a repetition rate of 100 Hz and a spatial resolution of 60x60 μm . For images reconstruction the FlexImaging v. 2 software (Bruker Daltonics, Bremen, DE) was used. For positive mode, 12 919 spots covering the whole slice with 300

laser shots per position were scanned. From each position the software measures an average mass spectrum with its coordinates on the slice.

Nano RPLC MS/MS

Analysis was performed using an ion trap mass spectrometer (LCQ deca XP plus, Thermo electron). 0.5µL of digest was injected with a Switchos Autosampler (Dionex corporation) and separation done on a C18 silica bonded stationary phase (75µm i.d. 150mm long, 3µm 100A pore size Dionex). Samples were washed for 2 minutes at 10µL/min with 100% mobile phase A (95% H₂O, 5% ACN 0.1% formic acid). Peptides were eluted using a linear gradient of 1% mobile phase B (ACN 80%, H₂O 20%, formic acid 0.08%) for 70 minutes at a flow rate of 0.2 µL/min. The LCQ was operated in a data dependent MS/MS mode in which one MS full scan was followed by one MS/MS scan on the most abundant peptide molecular ion. Collision energy was set to 35%. The heated capillary temperature and electrospray voltage were 160°C and 1.5kV respectively.

Protein identification was performed with MASCOT sequence query search program using SwissProt database filtered for the taxonomy "rattus". A tolerance of 2Da for peptide and 0.8Da for MS/MS was set. Only protein sequences with MOWSE score higher than 32 (indicating significant homology or identity) and identified in several samples representing 2 significant MS/MS were considered. Methionine oxydation was defined as variable modification.

Immunocytochemistry (ICC)

Immunohistochemistry was performed from paraffin embedded brain tissues, using a standard peroxydase-based staining method. Paraffin embedded tissue sections (4µm) were dried 12 hours at 60°C, dewaxed with xylene Toluene 100% for 10 minutes and rehydrated in successive baths of alcohol 100%, alcohol 95%, 70%, 30% then TBS 0,1M. Tissue sections were stored in distilled water for the following steps. Endogenous peroxydase activity was quenched with 10% H₂O₂ in distilled water for 5 minutes. Tissue sections were incubated with the primary anti-CRMP2 antibody (Abcam, ab36201) at a dilution of 1:200 in TBS for one hour at 37°C. Tissue sections were washed with TBS solution and were incubated successively with the secondary antibody at a dilution of 1:50 (Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate, Jackson ImmunoResearch, 111-035-045) and the chromogen 2,4 chloronaphtol.

The chromagen is prepared in Ethanol (5mg in 250 μ L) and added to TRIS solution (0,1M, pH=7,4) The tissue section then were rehydrated and fixed for reading.

RESULTS and DISCUSSION

Studies were carried out on brain tissue blocks of five 6-OHDA treated *versus* 5 untreated rats. The FFPE brains had been stored for 9 years before use in the present report. Formalin fixation provokes the formation of protein-nucleic acid and protein-protein cross-linking in the intracellular environment arising from the reactivity of formaldehyde with the side-chains of lysyl, argininy, tyrosyl, aspartyl, histidyl, and seryl residues¹³. The methylene bonds are difficult to break without destroying peptide linkage. To solve this problem, we used endopeptidases directly on tissue sections using an automated spotter then analyzed the slices with MALDI (Figure 1) or on protein extracts from tissue sections analyzed in LC/MS/MS (Figure 2). Under these conditions, identification of peptides and proteins coming from the tissue by LC/MS/MS can be easily performed (Figure 2). Comparison of nanoLC profiles from Parkinson animal models compared to controls reflects the presence of common proteins and also some specific to each condition (Figure 2).

In order to confirm the compounds identified, whole section digestion was carried out. Several of minor protein could be identified by trypsin fingerprint (Table 2). These identified compounds were then correlated with the ones characterized by nanoLC MS/MS from extracts of tissue trypsin digested peptides as presented in Figures 1b, 1c and 2. Considering the subcellular localization of these compounds we can confirm that "MALDI enzyme assisted direct analysis" allows the detection of proteins from different compartment such as cytosol, nuclear envelope and cytoskeleton and not just from the cell surface. Various functional proteins were detected including enzymes or signal transduction molecules or regulators. The technique allows the detection of very high mass compounds directly from the tissue like vimentin, neuomodulin, neurogenesisin. In order to get better results in such a strategy, this type of experiments would have to be performed on FT-MS. Nevertheless, MALDI molecular images of different ions constituting the same protein can be performed and validate the identification (Fig. 3)

Considering, the data obtained by MALDI and ESI; in the case of the animal treated with 6-OHDA, the results obtained (Table 3) are in agreement with those obtained from 6-OHDA rat brain frozen tissue section by Pierson et al.¹¹ (Table 1). 6-OHDA is known to inhibit the mitochondrial transport chain and this, along with the resulting production of reactive oxygen species contributing to neuronal death¹⁴. This agent appears to induce

neuronal death by activating transcription as well as DNA repair enzymes¹⁵. When activated, the signal transcription pathways initiated by PERK and IRE1a induce a characteristic set of genes encoding ER chaperones and nuclear transcription factors that lead to reduction of ER stress or to death¹⁶.

Based on these data, comparison of the proteins present or absent in both conditions revealed the presence of specific proteins which have been identified in the Parkinson model, such as Hexokinase (2-7-1-1), Neurofilament M protein, Peroxidoxin 6, F1 ATPase and α -Enolase (Tables 1 and 3).

Neurofilament M protein has been described as down-regulated^{17,5} and its down regulation is correlated with decreased mRNA during the disease and is dependant upon disease severity¹⁷. Our results using direct analysis of FFPE tissues support these findings.

Due to 6-OHDA treatment provoking oxidative stress, several molecules have been found to be up-regulated under these conditions, such as Peroxydoxin 6, known as an anti-oxidative protein. Similar results were found Strey et al.⁷ using classical proteomic studies. In contrast, peroxydoxin 2 is described as being down-regulated in the parkin knockout model but is upregulated in human Parkinson's disease studies. These data reaffirm the need to consider multiplex biomarkers for pathology. α -enolase was also increased in our study as previously observed elsewhere in the case of Parkinson's or Alzheimer's disease^{3,7}). This molecule is known to be the target of specific oxidation or nitroization³. We also observed upregulation of F1 ATPase as previously demonstrated by Seo et al.¹⁸

The ubiquitin complex was observed to be upregulated in our study on FFPE tissue as shown by Pierson et al.¹¹. It is known that high levels of ubiquitin and ubiquitinated proteins are present in Lewy bodies indicating that protein degradation is impaired in PD². Proteins conjugated with a chain of ubiquitin moieties are targeted to the ubiquitin-proteasome system complex, where they undergo proteolytic degradation. Genetic studies of PD have identified mutations in the genes coding for proteins involved in the ubiquitin-proteasome degradation pathway^{19,20}.

Our observation of an increase in collapsin response mediator proteins (CRMP) is in agreement with previous molecular data (Table 4)²¹. This is validated by immunocytochemistry. As it can be seen, the antibody raised against CRMP2 recognizes at a high level the protein in 6-OHDA treated animals compare to control (Fig. 4). Thus, in PD, the CRMP (intracellular protein mediating Semaphorin3A) and the mitochondrial stress protein HSP60 mRNA encoding these proteins are up-regulated. Antibodies directed against collapsin-1 (Sema3A, that functions in signaling growth cone collapse, chemorepulsion and

neuronal apoptosis during early development of the central nervous system) provided marked and prolonged protection of several neuronal cell types from dopamine-induced apoptosis²¹. It has been hypothesized that these proteins are positive mediators of DA-induced neuronal apoptosis in PD. In PD, nigral neuronal death could be due to excessive oxidative stress generated by auto- and enzymatic oxidation of the endogenous neurotransmitter dopamine (DA), the formation of neuromelanin and the presence of high concentrations of iron. DA toxicity is mediated through its oxidative metabolites, whereas thiol-containing antioxidants provided marked protection against DA toxicity, ascorbic acid accelerated DA-induced death. In Alzheimer's disease, the CRMP-2 is known to be implicated in neurite degeneration, acting on the assembly and polymerization of microtubules²². Accumulation of Sema3A overlaps the appearance of phosphorylated MAP1B and tau in many neurons, suggesting that Sema3A signaling at some level may be coupled to these previously identified cytoskeletal markers of neurodegeneration²³. The hippocampus of patients with AD express phosphorylated MAP1B, collapsin-response mediator protein 2 (CRMP-2), Plexins A1 and A2, and a processed form of Sema3A²³. Thus, we speculate that CRMP factors are good biomarkers for neurodegenerative diseases like PD or AD.

While our methodology is validated by confirming previously discovered molecules implicated in PD, we have also uncovered previously undescribed changes, such as the downregulation of Trans-elongation factor 1 (eEF1) in 6-OHDA samples. Studies on regulatory factors of heat shock factor (HSF-1) modulation and their involvement in the age-associated attenuation have demonstrated an attenuated response to stress which is characteristic of senescence. Heat shock (HS), a significant form of stress, is delayed and reduced in aging organisms. The proteins I-HSF [HSF inhibitor], eEF1 and a large non-coding RNA (HSR) participate in regulation and activation of HSF-1 in early stages of heat shock gene transcription. It is proposed that structural changes in any one or combination of these factors in response to heat shock may contribute to the age-associated attenuation in response to stress²⁴. These results are in agreement with the fact that 6-OHDA treatment provokes a down regulation of the eEF1. Moreover, 6-OHDA provokes an oxidative stress stimulating HSP expression as demonstrated by Strey et al.⁷ and as it is down regulated in these conditions. Finally, eEF1 is present in the dendrites of neurons that exhibit synaptic plasticity and its translation is locally regulated²⁵. In the hippocampus, the dendritic mRNAs is highly expressed in cell bodies and is also concentrated in the zone of termination of commissural/associational afferents in the inner molecular layer, suggesting that mRNA localization is in some way related to the distribution of different types of synapses²⁶. In the

case of the 6-OHDA model, this treatment provokes a decrease of synaptic plasticity and thus a down regulation of eEF1 levels.

In conclusion, using nine year old FFPE tissues, we confirmed that molecules acting in oxidative stress are regulated as already demonstrated in various proteomic studies on human or fresh frozen tissues in 6-OHDA animal model. New biomarkers were found such as eEF1 and CRMP. This confirms the high interest to use this FFPE tissues stored in hospital tissue libraries for biomarkers hunting or validation in the case of clinical studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de L'Education Nationale, de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche (ACI Jeunes Chercheurs ACI JC4074 to I. Fournier), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR to RD). Also supported by a collaboration agreement between Shimadzu and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides. The authors would also like to thank Adeline Page Proteomic Platform of USTL

REFERENCES

1. Beal, M. F.; Hantraye, P., Novel therapies in the search for a cure for Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98, (1), 3-4.
2. Giasson, B. I.; Lee, V. M., Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 2003, 114, (1), 1-8.
3. De Iuliis, A.; Grigoletto, J.; Recchia, A.; Giusti, P.; Arslan, P., A proteomic approach in the study of an animal model of Parkinson's disease. *Clin Chim Acta* 2005, 357, (2), 202-9.
4. Palacino, J. J.; Sagi, D.; Goldberg, M. S.; Krauss, S.; Motz, C.; Wacker, M.; Klose, J.; Shen, J., Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem* 2004, 279, (18), 18614-22.
5. Basso, M.; Giraudo, S.; Corpillo, D.; Bergamasco, B.; Lopiano, L.; Fasano, M., Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 2004, 4, (12), 3943-52.
6. Basso, M.; Giraudo, S.; Lopiano, L.; Bergamasco, B.; Bosticco, E.; Cinquepalmi, A.; Fasano, M., Proteome analysis of mesencephalic tissues: evidence for Parkinson's disease. *Neurol Sci* 2003, 24, (3), 155-6.

7. Strey, C. W.; Spellman, D.; Stieber, A.; Gonatas, J. O.; Wang, X.; Lambris, J. D.; Gonatas, N. K., Dysregulation of stathmin, a microtubule-destabilizing protein, and up-regulation of Hsp25, Hsp27, and the antioxidant peroxiredoxin 6 in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 2004, 165, (5), 1701-18.
8. Ungerstedt, U.; Ljungberg, T.; Steg, G., Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Adv Neurol* 1974, 5, 421-6.
9. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J., Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997, 69, (23), 4751-60.
10. Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M., Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett* 2003, 24, (1-2), 9-14.
11. Pierson, J.; Norris, J. L.; Aerni, H. R.; Svenningsson, P.; Caprioli, R. M.; Andren, P. E., 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), 289-95.
12. Tonnaer, J. A.; Lammers, A. J.; Wieringa, J. H.; Steinbusch, H. W., Immunohistochemical evidence for degeneration of cholinergic neurons in the forebrain of the rat following injection of AF64A-picrylsulfonate into the dorsal hippocampus. *Brain Res* 1986, 370, (1), 200-3.
13. Shi, S. R.; Imam, S. A.; Young, L.; Cote, R. J.; Taylor, C. R., Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 1995, 43, (2), 193-201.
14. Grunblatt, E.; Mandel, S.; Youdim, M. B., Neuroprotective strategies in Parkinson's disease using the models of 6-hydroxydopamine and MPTP. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 899, 262-73.
15. Herceg, Z.; Wang, Z. Q., Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* 2001, 477, (1-2), 97-110.
16. Mori, K., Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000, 101, (5), 451-4.
17. Liu, Q.; Xie, F.; Siedlak, S. L.; Nunomura, A.; Honda, K.; Moreira, P. I.; Zhua, X.; Smith, M. A.; Perry, G., Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci* 2004, 61, (24), 3057-75.

18. Seo, B. B.; Nakamaru-Ogiso, E.; Cruz, P.; Flotte, T. R.; Yagi, T.; Matsuno-Yagi, A., Functional expression of the single subunit NADH dehydrogenase in mitochondria in vivo: a potential therapy for complex I deficiencies. *Hum Gene Ther* 2004, 15, (9), 887-95.
19. Leroy, E.; Boyer, R.; Auburger, G.; Leube, B.; Ulm, G.; Mezey, E.; Harta, G.; Brownstein, M. J.; Jonnalagada, S.; Chernova, T.; Dehejia, A.; Lavedan, C.; Gasser, T.; Steinbach, P. J.; Wilkinson, K. D.; Polymeropoulos, M. H., The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. *Nature* 1998, 395, (6701), 451-2.
20. Leroy, E.; Boyer, R.; Polymeropoulos, M. H., Intron-exon structure of ubiquitin c-terminal hydrolase-L1. *DNA Res* 1998, 5, (6), 397-400.
21. Barzilai, A.; Zilkha-Falb, R.; Daily, D.; Stern, N.; Offen, D.; Ziv, I.; Melamed, E.; Shirvan, A., The molecular mechanism of dopamine-induced apoptosis: identification and characterization of genes that mediate dopamine toxicity. *J Neural Transm Suppl* 2000, (60), 59-76.
22. Gu, Y.; Hamajima, N.; Ihara, Y., Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522. *Biochemistry* 2000, 39, (15), 4267-75.
23. Good, P. F.; Alapat, D.; Hsu, A.; Chu, C.; Perl, D.; Wen, X.; Burstein, D. E.; Kohtz, D. S., A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004, 91, (3), 716-36.
24. Shamovsky, I.; Gershon, D., Novel regulatory factors of HSF-1 activation: facts and perspectives regarding their involvement in the age-associated attenuation of the heat shock response. *Mech Ageing Dev* 2004, 125, (10-11), 767-75.
25. Huang, F.; Chotiner, J. K.; Steward, O., The mRNA for elongation factor 1alpha is localized in dendrites and translated in response to treatments that induce long-term depression. *J Neurosci* 2005, 25, (31), 7199-209.
26. Zhong, J.; Zhang, T.; Bloch, L. M., Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci* 2006, 7, 17.
27. Takubo, H.; Shimoda-Matsubayashi, S.; Mizuno, Y., Serum creatine kinase is elevated in patients with Parkinson's disease: a case controlled study. *Parkinsonism Relat Disord* 2003, 9 Suppl 1, S43-6.
28. Skold, K.; Svensson, M.; Nilsson, A.; Zhang, X.; Nydahl, K.; Caprioli, R. M.; Svenningsson, P.; Andren, P. E., Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse. *J Proteome Res* 2006, 5, (2), 262-9.

29. Pastoris, O.; Dossena, M.; Foppa, P.; Catapano, M.; Ferrari, R.; Dagani, F., Biochemical evaluations in skeletal muscles of primates with MPTP Parkinson-like syndrome. *Pharmacol Res* 1995, 31, (6), 361-9.

30. Poon, H. F.; Frasier, M.; Shreve, N.; Calabrese, V.; Wolozin, B.; Butterfield, D. A., Mitochondrial associated metabolic proteins are selectively oxidized in A30P alpha-synuclein transgenic mice--a model of familial Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2005, 18, (3), 492-8.

FIGURE LEGEND

Figure 1 :

a: Superposition of 6 mass spectra directly obtained by MALDI from FFPE tissues slices of 6-OHDA treated animals and untreated animals in same region after trypsin digestion. Arrows indicate a potential biomarker at m/z 1770.3 (Neurofilament triplet M).

b,c: 3D peptides profiles from m/z comprised between 200-2000 m/z and eluted from the column between 30-33 min from two similar brain region of untreated (b) and 6 OHDA treated (c) animals after trypsin digestion. Arrows indicate the presence of CRMP1 peptide only in 6-OHDA treated animals.

Figure 2: Comparison of 3D peptides profiles from m/z comprised between 700-800 m/z and eluted from the column between 10-60 min from two similar brain region of 6 OHDA treated and untreated animals after trypsin digestion.

Figure 3: - Immunocytochemistry studies on brain slices with anti-CRMP2 of treated (b) and non treated animals (a)

MALDI molecular images reconstructed from the data recorded on the 9 years old FFPE rat brain tissue section after micro-spotted *in situ* trypsin digestion performed on MALDI- TOF/TOF using DHB as matrix. Different ions (d,e) of CRMP2 are localized and cumulated in figure (f)

Table 1: Comparison of the Parkinson Biomarkers identified by different proteomics approaches on different models

Protein	Proteomic Approach	Modification	Model	References
Pyruvate deshydrogenase	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
NADH ubiquinone oxyreductase 24 kDa	2D Gel	Upregulated	Parkin -/-	4
NADH ubiquinone oxyreductase 30 kDa	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Cytochrome c oxydase	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Peroxiredoxin 1	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Peroxiredoxin 2	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Peroxiredoxin 6	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Lactoylglutathione lyase	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Profilin	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Vacuolor protein sorting 29	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
α crystalin chain b	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 1	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
Lasp-1	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	4
α enolase	2D Gel	Upregulated	Parkin -/-	3
β actin	2D Gel	Downregulated	Parkin -/-	3
Calmodulin	MALDI direct analysis	Downregulated	6OHDA	11
Cytochrome C	MALDI direct analysis	Downregulated	6OHDA	11
Cytochrome C oxydase	MALDI direct analysis	Downregulated	6OHDA	11
Ubiquitin	MALDI direct analysis	Upregulated	6OHDA	11
Serum creatine kinase	Blood	Upregulated	Human	27
Neurofilament triplet L	2D Gel	Downregulated	Human	5
Neurofilament triplet M	2D Gel	Downregulated	Human	5
Peroxiredoxin 2	2D Gel	Upregulated	Human	5
Mitochondrial complex III	2D Gel	Upregulated	Human	5
ATP synthase D chain	2D Gel	Upregulated	Human	5
Profilin	2D Gel	Upregulated	Human	5
L type calcium chanel d subunit	2D Gel	Upregulated	Human	5
Fattu acid binding protein	2D Gel	Upregulated	Human	5
PEP19	2D Gel	Upregulated	Human	5
α enolase	MALDI direct analysis	Downregulated	MTP	28
HSP 25	2D Gel	Upregulated	G93 A (gene SOD1)	7
HSP 27	2D Gel	Upregulated	G93 A (gene	7

Phosphatidyl inositol transfer protein a	2D Gel	Upregulated	SOD1) G93 A (gene	7
Apolipoprotein E	2D Gel	Upregulated	SOD1) G93 A (gene	7
Ferritin Heavy Chain	2D Gel	Upregulated	SOD1) G93 A (gene	7

Table 2: Examples of proteins detected by MALDI enzyme assisted direct fingerprint from FFPE rat brain tissue slice

(Peak detection algorithm: Centroid, Signal to Noise threshold :10, relative intensity threshold : 5, Peak with 0.1 m/z, percent height: 80; Type of search : Peptide Mass Fingerprint, Enzyme: Trypsin, Variable modifications : Oxidation (M), Mass values : Monoisotopic, Protein Mass: Unrestricted, Peptide Mass Tolerance : between ± 0.1 Da, Peptide Charge State: 1+, Max Missed Cleavages: 1, Number of queries: 50)

Protein	Matched score	Mass (Da)	Databank	Sequence coverage (%)	Sequence matched peptides in red
Chordin-like protein 1 precursor (Neuralin-1); Neurogen esin-1 Neuromod ulin (Axonal membrane protein GAP-43) dystrophin - associated glycoprotein (43DAG) Vimentin	39	50526	Swissprot	48	1 MEGIKYIASL VFFVFLEAS KTEPVKHSET YCMFQDKKRY VGEKWHYPYLE 51 PYGLVYVCNC ICSENGNVLC SRVRCPTLHC LSPVHIPHLC CPRCPDSLPP 101 MNSKVTSKSC EYNGTTYQHGL ELFLAEGLFQ NRQPNQCSQC SCSEGNVYCC 151 LKTCPKLTCA FVSVDPDSCC RVC RGDGELS WEHSDADIFR QPANREARHS 201 YLRSPYDPPP SRQAGGLPRF AGSRSHRGAV IDSQQASGTI VQIVINNKHK 251 HGQVCVSNKG TYSHGESWHP NLRAPGIVEC VLCTCNVTKQ ECKKIHCNPR 301 YPCKYPQKLD GKCKKVCPEE PPSQNFDSKG SFCGETMPV YEAVLVEDGE 351 TARKVALETE KPPQVEVHVW TIRKGIQHF HIEKISKEMF GGLHHFKLV 401 RTTMNQWKIF AEGEAQLSQM CSSR VCRTEL EDLVQVLYLE RPEKDHC r
	24	23589	Swissprot	47	1 MLCCMRRTKQ VEKNDQKI EQDGVKPEDK AHKAATKIQA SFRGHITRKK 51 LKDEKKGDAP AAEAERKED DAPVADGVEK KEGDGSATTD AAPATSPKAE 101 EPSKAGDAPS EEKKEGDAE PSEKAGSAE TESAATTD NSPSSKAEDG 151 PAKEEPKQAD VPAAVTDAAA TTPAAEDAAK AAQPPTETA E SSQAEEKEA 201 VDEAKPKESA RODEKEDPE ADQEAH
	50	41643	NCBI	47	1 MQPASDSRWR VTGLQSGEPT QTLAHSGFSL EGWRGRGKAW PSQGVSPTPV 51 PERKRLRRA KMAAAAAAA ATEQQSNGP VKKSMREKAV ERRNVNKEHN 101 SNFKAGYIPI DEDRLHKTGL RGRKGNLAIC VIVLLFLLAV INLLIFLVIV 151 AVIRIGPNGC DSLEFHESSL LRFKQVSDMG I IHPLYKSTV GGRNENLVI 201 TGNQPIVFO QGTTKLSVEK NKTSTSDIG MQFPDPRTON ILFSTDYETH 251 EPHLPSGVKS LNVQASTER ITSNATSDLN IKVDGRAIVR GNEGVFIMKG 301 TIEFHMRGDV ELKAENSIIL NQTVMVSPTL LPSSSGDQGS GSGDWRYKLL 351 CMCADGTLFK VQVTSNMG C QVSDNPGCNT H
	54	53569	NCBI	42	1 STRSVSSSY RRMFGSGTS SRPSSNRSYV TISTRYSLG SALRPSTSR 51 LYSSSPGGAY VTRSSAVRLR SSMPGVRLIQ DSVDFSLADA INTEFKNTRT 101 NEKVELQELN DRFANYIDKV RFLEQQNKIL LAELQLKGG GKSRLGDLYE 151 EEMRELRRQV DQLTNDKARV EVERDNLAED IMRLREKLQE EMLQREAEAS 201 TLQSFQDQVD NASLARLDLE RKVESLQEEI AFLKKLHDEE IQELQAQIQE 251 QHVQIDVDVS KPDLTAALRD VRQQYESVAA KNLQEAEEWY KSKFADLSEA 301 ANRNNDALRQ AKQESNEYRR QVQSLTCEVD ALKGTNESLE RQMREMEENF 351 ALEAANYQDT IGRLQDEIQN MKEEMARHLR EYQDLLNVKM ALDIELATYR 401 KLEGEESRI SLPLPNFSSL NLR ETN LES L PLVDTHSKRT LLIKTIVETRD 451 GVINETSQH HDDLE
UI-R-BJ2-bqp-d-02-0-UI.s1 UI-R-BJ2 Rattus norvegicus cDNA clone UI-R-	58	17842	EST	83	1 RSPSRQSW M RMPCHRSKA TTLCAWCSPA ATRTWTLCLE CGPQEISRHR 51 WTLQWPSMTC LWSWTF ILS TRKPPCGSWT CAPLCCPKLR NFCRASMRRM 101 SRLGVPPSS SCSGSYPPSSL TFWQPRPLWV WTSAERRGCI SVDSASSSSR 151 ASVASSRAGR V_AA
	54	16280	EST	78	1 NGTMSPAITS CPSHVKRAQW PVENPQRWSM PEPLGRRKIA MRSA PC GTGS 51 VLRALSSAMC PPSGVSPVGT GKSLESIAQT PTPSTGYRS GA_DPHGGAA

DZ1-cnfg-02-0-UI.s1
 NCI_CGA
 P_DZ1
 Rattus norvegicus cDNA clone
 AGENCO 52 26005 EST 57
 URT_285
 40227
 NIH_MG
 C_249
 Rattus norvegicus cDNA clone

101 PAWPTERSFH NVPRMLSPAA SHADRASHST WCLLVAFCHI RNPLKKEKKK
 151 KK

1 SAEMVDSLQT SPKSQWCAEP R_PEVVFCLS HLEGCIDVVW NSCPLXWTGL
 51 PD_SHMG_SG LHGPSSCWPA GCPSSCSPTS_FARWSVS_TL PPARSCQNGW
 101 LCHVASAGAS PRRTHPAPCP HRGSI¹PVRLG R_MYTEHLSG PSEGADCGF
 151 TQTRRRQPSV PSGSCPSWHR SQ_RCQSDPR PRYSGPQWAQ HVRG_VSSLS
 201 SGTSAPRWG_MVQSQASW_SAAVRPAVEL CSCRGVADGC RTCGWCNPPG
 251 PRS

Table 3 : 6-OHDA biomarkers detected in FFPE tissues by MALDI direct analysis after trypsin digestion and nano LC:IT-MS on analogue zones (a)

Markers	Protein	m/z MALDI direct analysis	m/z identified by ESI	Massot score (%)	Detected on healthy zone ^a (number)	Detected on damaged zone ^a (number)	Known in Parkinson's Disease literature
Downregulated	Trans elongation Factor 1 (eEF1)	1025.5	1025.8	66	3/5	0/5	
	Hexokinase (2-7-1-1)	1399.9	1400.5	76	3/5	0/5	29
	Neurofilament M protein	1770.6	1770.8	57	4/5	0/5	5
Upregulated	Peroxidoxin 6	1499.9	1498.8	65	0/5	4/5	5
	F1 ATPase		2007.3	81	0/5	4/5	18
	α -Enolase	3062.9	3063.6	62	0/5	3/5	30
	Ubc-Ubiquitin	647.4		78	0/5	4/5	11
	CRMP2 CRMP1	1579.1	1579.9 1053.2	70 78	0/5 0/5	4/5 4/5	

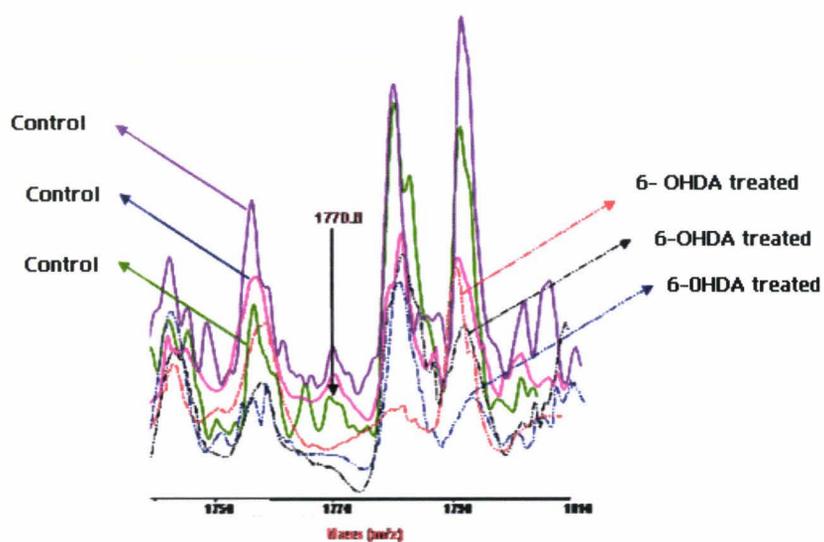
Table 4 : Example of 6-OHDA protein identified after trypsin digestion, nanolc chromatography, MS/MS by ion-trap: The CRMP-2 (Mass: 62239, Score: 235)

Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Peptide
675.3215	674.3142	674.3599	R.ANITSLG.-
508.5903	1015.1661	1014.5458	K.SAAEVIAQAR.K
543.0645	1084.1144	1083.6288	R.GSPLVVISQGK.I
571.0652	1140.1159	1139.6015	R.KFPDFVYK.R
648.0198	1294.0250	1293.6863	R.MVIPGGIDVHTR.F
562.2149	1683.6228	1681.8634	K.IVLEDGTLHVTEGSGR.Y

571.0665	1710.1776	1710.9133	R.YIPRKPFDFVYK.R
863.4823	1724.9500	1724.8039	K.MDENQFVAVTSTNAAK.V
834.0468	2499.1187	2498.1601	K.GTVVYGEPI TASLGTDGSHYWS
		K.N	
896.9715	1791.9284	1791.8275	K.DNFTLIPEGTNGTEER.M
956.3959	1910.7772	1910.0149	R.FQLTDSQIYEVL SVIR.D
959.0453	1916.0761	1914.9574	R.ISVGS DADLVIWDPDSVK.T

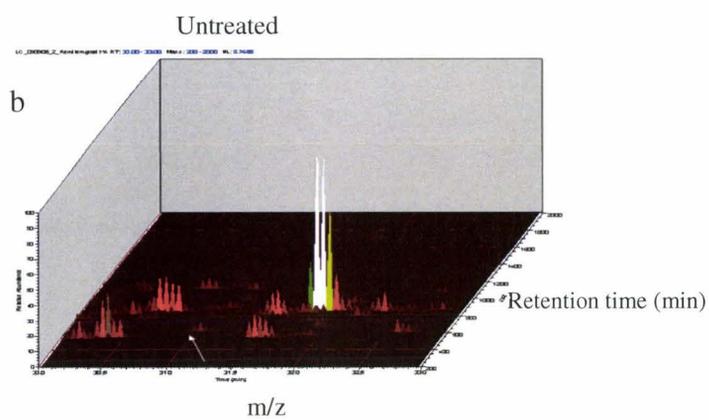
Figure 1

a



6-OHDA

% Intensity



c 6-OHDA treated

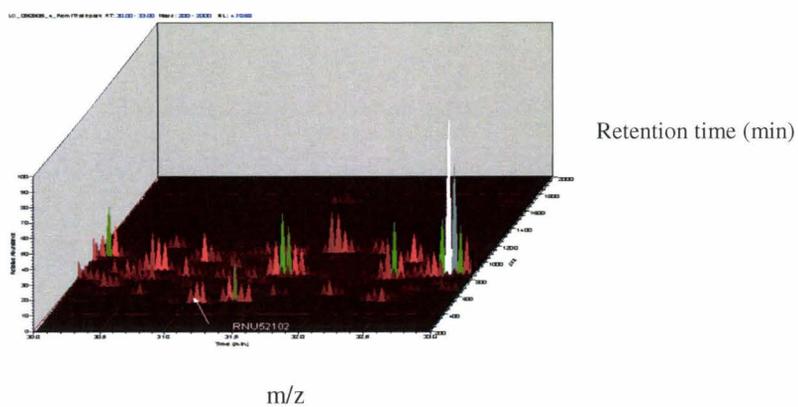


Figure 2 :

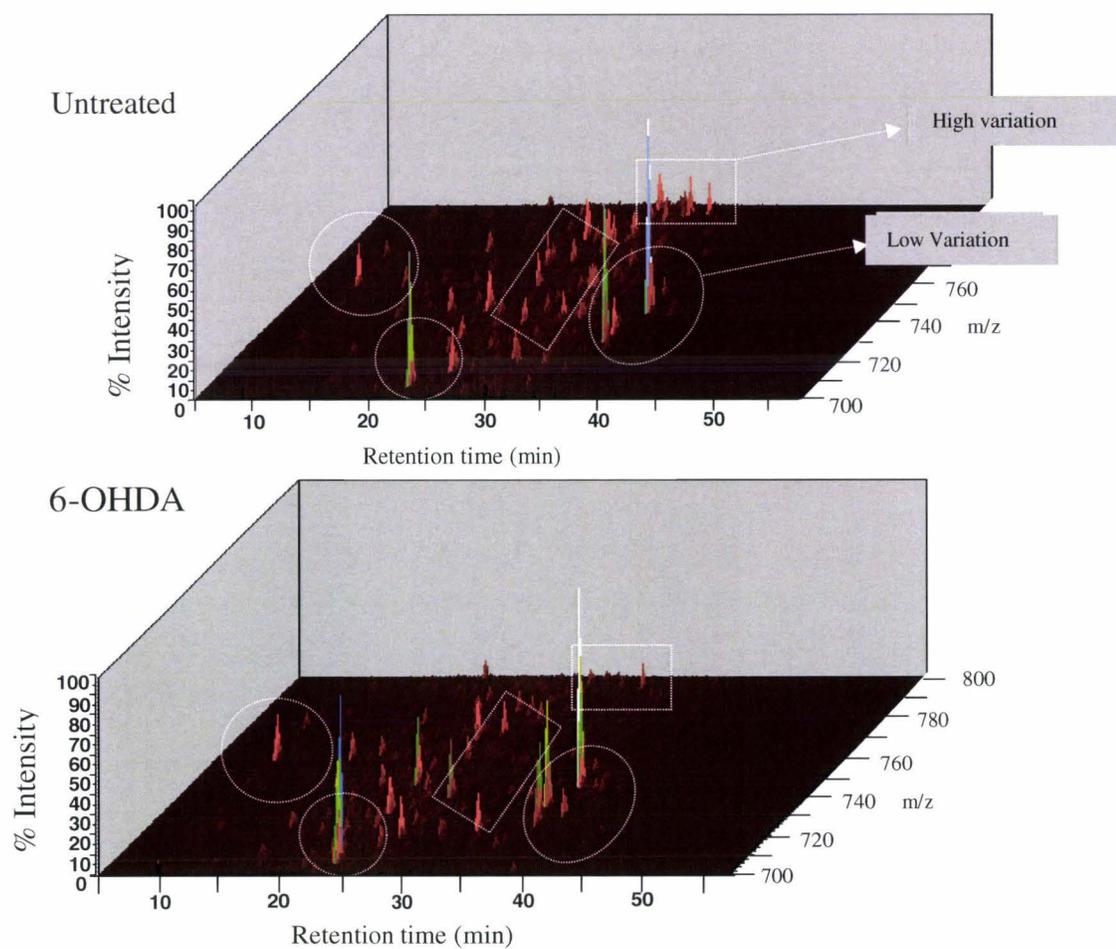
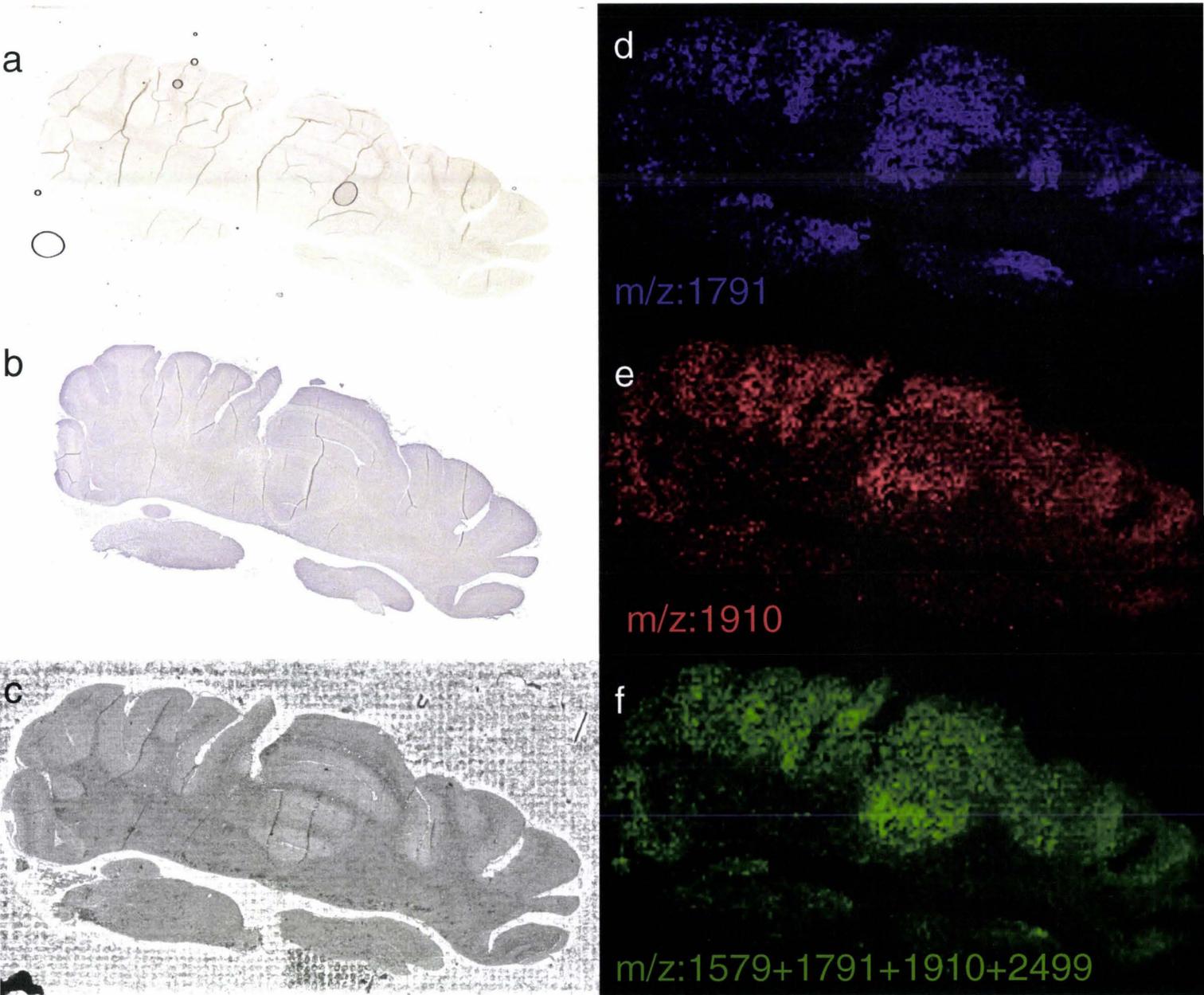


Figure 3



5.2.3. Conclusions et perspectives

Les résultats montrent que nous avons réussi à trouver une solution pour résoudre le verrou technologique de l'utilisation en imagerie MALDI les tissus FFPE. L'imagerie MALDI des tissus FFPE et la recherche de biomarqueurs par profilage sont donc réalisable au même titre que pour les tissus frais. Il est donc envisageable de réaliser des études rétrospectives sur un grand nombre d'échantillons en utilisant les biopsies conservées depuis de nombreuses années dans les bibliothèques des hôpitaux.

Un certain nombre de protéines ont montrés des niveaux de production différentiels dans les cerveaux de rat traité ou non (**Tableau 11**). Remarquons que le rôle de certains de ces marqueurs a déjà été démontré lors d'analyse protéomique et génomique.(Liu, Xie et al. 2004) Ceci permet de valider la méthodologie de l'imagerie MALDI des tissus FFPE. Cependant des développements restent encore à faire.

Tableau 11 : Récapitulatif des molécules repérées comme régulées en analyse directe MALDI sur tissus fixés et digérés ainsi que leur identification réalisée en LC-MS/MS.

Analyse Directe MALDI	Masse identifiée calculée ESI	% var	protéine	score	Détection Nbre de fois		régulation
					Tissu non traité	Tissu traité	
1399,9	1400,5	0,04	Héxokinase	71	3/5	0/5	Diminution
1499,9	1498,8	0,07	Péroxirédoxine	65	0/5	4/5	Augmentation
1770,6	1770,8	0,01	Neurofilament M	57	4/5	0/5	Diminution
3062,9	3063,6	0,02	Alpha émolase	62	0/5	3/5	Augmentation

En effet, il faut pouvoir augmenter la qualité des identifications. L'identification est délicate par la richesse en fragments issus de la digestion à la trypsine. La sélection de l'ion pour l'identification en MS/MS par MALDI-TOF/TOF nécessite un grand pouvoir résolutif et une fenêtre de sélection de l'ion à fragmenter plus précise. Un moyen de lever l'ambiguïté sur l'identification est soit la réalisation de dérivation N-terminale des peptides au sein de la coupe et dès lors de simplifier le spectre ou de réaliser une séparation préalable des familles de composés par mobilité ionique (**Figure 74**) (Jackson, Ugarov et al. 2007). Une autre voie est l'utilisation d'autres enzymes de digestion pour obtenir un profil enzymatique différentiel. (Crockett, Lin et al. 2005)

Ion Mobility-Time-of-Flight

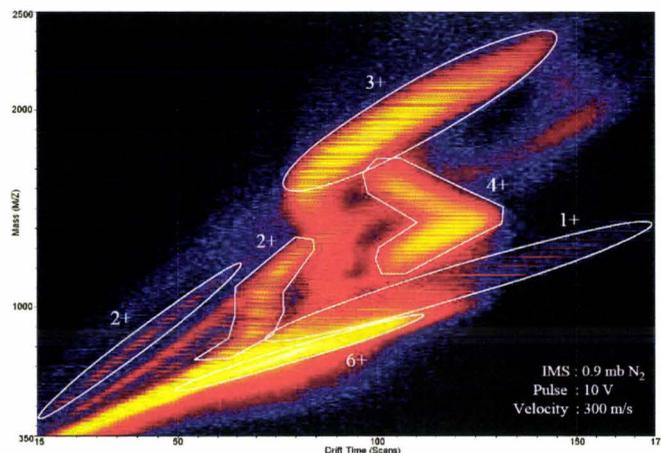
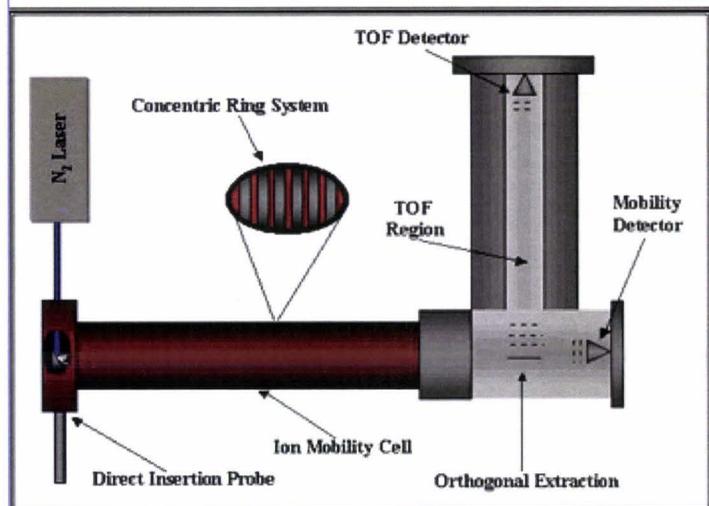


Figure 74. Instrument MALDI couplé à un système de mobilité ionique. Ce système permet une séparation des molécules chargées par l'intermédiaire d'un champ électrique uniforme obtenu par un système d'électrodes anneaux concentriques. A droite, une représentation de la séparation ionique obtenue par ce système.

L'autre point nécessitant des améliorations pour la résolution spatiale et la sensibilité porte sur le micro-dépôt de trypsine, de l'agent de dérivation et la matrice. Le système Chips-100 de Shimadzu ne fonctionne à l'heure actuelle qu'avec le DHB. Les autres matrices cristallisent dans la tête piézo-électrique et des améliorations sont nécessaires pour élargir le panel de matrices utilisable avec ce système. Le système manque encore de robustesse mais permet de travailler spécifiquement sur une zone d'intérêt suite à une coloration HES et d'étudier le patron d'expression des protéines au sein de cette zone. A coté de ce système, Bruker vient de développer un vaporisateur de microgouttelettes de matrice, l'Imageprep. Ce système permet de couvrir de façon uniforme une coupe de matrice et même trypsine (développement en cours en collaboration avec Bruker). Les résultats sont des très bonnes qualités mais à l'inverse ce système ne permet pas de déposer sur la même zone, l'enzyme, l'agent dérivant et la matrice, par contre il est compatible avec toutes les matrices y compris les matrices ioniques de l'unité.

L'analyse Protéomique de tissus frais versus FFPE montre que ce ne sont pas forcément les mêmes protéines qui sont identifiées. Il semble en fait que la formation des ponts méthylènes provoque une dénaturation des protéines du point de vue de leurs structures et une meilleure conservation. Les protéines détectées seraient en fait celles des protéines

rendues accessibles suite à la fixation et ces protéines ne sont pas forcément les mêmes que celles détectées dans les tissus congelés. On peut donc penser que l'analyse Protéomique des tissus FFPE permettra d'avoir accès à d'autres classes de protéines et voir même comme dans notre cas à des protéines considérées comme minoritaires. Des résultats similaires viennent d'être obtenus en Protéomique classique sur des tissus FFPE et confirme tout l'intérêt de cette approche (**Figure 75**) (Hood, Darfler et al. 2005; Hood, Conrads et al. 2006; Hood, Conrads et al. 2006).

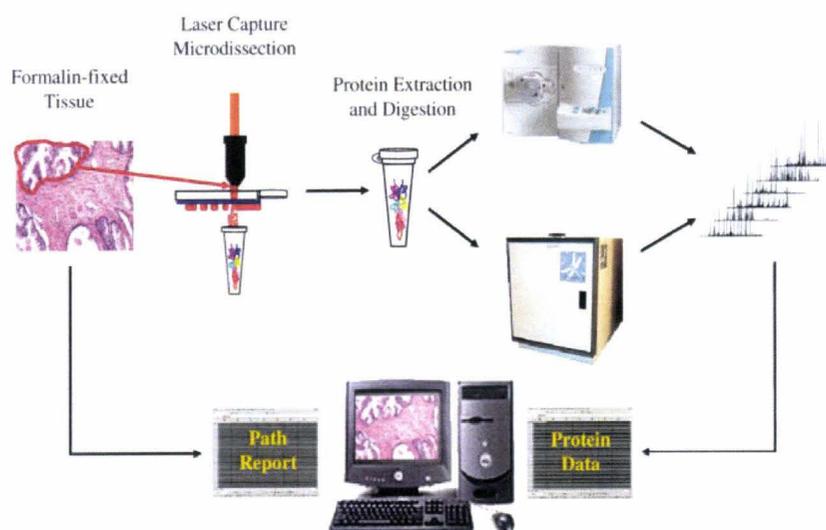


Figure 75 Schéma d'analyse Protéomique développé par Hood et coll.

L'analyse est précédée d'une coloration puis d'un découpage du tissu par microdissection laser. L'échantillon est ensuite digéré et analysé par différentes techniques comparatives SELDI et couplage HPLC- spectrométrie de masse.

L'imagerie MALDI est une méthode d'imagerie nouvelle demandant de nombreux développements comme ceux précédemment obtenus sur les tissus FFPE. L'approche classique d'imagerie MALDI sur les tissus congelés a nécessité également d'autres développements afin de pousser les limites de la méthode aux maximum et d'obtenir des résultats sur les protéines minoritaires, le réel en jeu à l'heure actuelle, bien que l'imagerie donne déjà accès à certaines d'entre-elles.

CHAPITRE 6. Conclusions générales et perspectives

La médecine moléculaire a évolué ces 20 dernières années de la génomique vers la protéomique clinique : Le but étant de caractériser les mécanismes cellulaires impliqués dans les pathologies et les traitements. L'essor de la protéomique clinique apporte de nouveaux challenges, et de nouvelles opportunités qui promettent de transformer les moyens de détecter, traiter et suivre les pathologies. Ceci en suivant l'évolution des variations d'expression protéique, ou de modifications post-traductionnelles. Cette information peut être la cause ou la conséquence de processus pathologiques. En somme, la protéomique clinique joue un rôle crucial dans diverses études : (1) la détection précoce de la maladie dans les fluides biologiques (sang, urines,...), (2) le diagnostic basé sur la signature protéique identifiée de la maladie qui complète l'analyse histopathologique, (3) la sélection individualisée de différentes thérapies afin de cibler l'anomalie d'expression protéique spécifique du patient (on parle alors de pharmaco-protéomique en opposition à la pharmacogénomique), (4) l'évaluation de l'efficacité et la toxicité d'une thérapie, (5) la redirection d'une thérapie en fonction des résultats obtenus après analyse et le suivi des marqueurs protéiques. Toutes ces études ont pu être mise en place par l'essor d'un outil incontournable, la spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est un outil récent devenu incontournable dans la chimie analytique et la biologie pour la détection et l'identification de molécules. Devenu un outil d'imagerie en 1999, un grand nombre de développements ont été nécessaires dans le but d'augmenter la sensibilité et la reproductibilité si contraignantes dans la recherche médicale et biologique. L'imagerie MALDI est aujourd'hui encore peu utilisée, mais reste un outil sur lequel on peut émettre de belles perspectives. En effet, l'imagerie par spectrométrie de masse dont fait partie l'imagerie MALDI est l'unique méthode qui permet de visualiser les biomolécules. Le contexte actuel et très concurrentiel de l'imagerie a été démontré avec de nouveaux outils venant du domaine appliqué de la médecine telle que l'IRM ou les instruments PET Scan. Ces évolutions de ces outils montrent tout l'engouement qui se développe depuis quelques années autour de l'imagerie moléculaire. De toutes ces méthodes, l'imagerie MALDI possède de nombreux avantages telles que la sensibilité (femtomole) et la résolution spatiale (30 μ m) contrairement aux méthodes d'imagerie *in vivo* comme le PET Scan ou l'IRM. Ces approches d'imagerie nucléaire ou magnétique comme expliquées dans le second chapitre sont moins sensibles et difficiles à mettre en place pour une analyse

moléculaire. Cependant, ces méthodes ont de manière générale, l'avantage d'être obtenue *in vivo*. De nouvelles approches d'imagerie PET scan sont activement développées depuis quelques années pour devenir des approches moléculaires.. L'analyse moléculaire de ces approches demande une spécificité qui n'est réalisable qu'au cas par cas par l'intermédiaire de sondes marquées.

L'imagerie MALDI a donc l'avantage de localiser différentes molécules sans devoir développer de spécificité propre. L'ensemble de mes travaux a permis de répondre à un certain nombre de problèmes afin d'améliorer son utilisation dans des applications. L'ensemble de ces travaux a donné lieu à deux revues (annexes 1 et 2) (Wisztorski, Lemaire et al. 2007) (Wisztorski M.). Deux approches nouvelles ont été développées dans le chapitre 3 pour l'analyse protéomique et la détection de biomarqueurs spécifiques de l'état physiologique du tissu.

Une approche de traitements des tissus par l'utilisation de solvants organiques comme le chloroforme a mis en évidence l'existence de marqueurs spécifiques lors de l'étude du cancer des ovaires. L'analyse effectuée sur 48 patients sur les liquides ascites et les biopsies ovariennes, a permis d'établir des profils caractéristiques de la pathologie. Ainsi, Le marqueur REG α , régulateur de la présentation du sois par l'intermédiaire du protéasome, a été démontré comme étant clivé lors du processus de cancérisation au niveau des ovaires. Ces résultats ont été également retrouvés dans les liquides d'ascite ce qui pourrait laisser supposer que ces marqueurs sont libérés dans le système sanguin. De plus, d'autres marqueurs sont en cours d'identification. Ils semblent que ceux ci soient localisés dans deux régions distinctes, une étant en étroite corrélation avec le marqueur précédemment identifié, REG α . Les recherches se prolongent donc afin d'identifier ces marqueurs, comprendre leur rôle dans le processus de cancérogénèse. Il est nécessaire de comprendre l'origine de la dégradation de REG α , et son devenir dans le sang. A long terme, s'il devait devenir un réel marqueur du cancer de l'ovaire, il faudra le combiner avec les autres marqueurs en cours d'identification pour réaliser un test de dépistage diagnostique ou pronostique de l'évolution de la maladie.

Sur le même principe d'utilisation de solvant, une approche de digestion a été réalisée avec succès sur d'autres tissus FFPE. Il a été démontré que l'utilisation de la trypsine dans des conditions optimisées permet de digérer le tissu FFPE et de détecter des molécules d'intérêt dans le cas de l'étude de souris traitées au 6-OHDA, un modèle Parkinson chez la souris. Rappelons que l'étude des tissus FFPE par une approche d'imagerie par MALDI était jusqu'alors impossible sans traitement. Cette étude a mis en évidence la présence de 4 marqueurs caractéristiques dand le modèle simulant la maladie de Parkinson, déjà publié par

d'autres approches de protéomique classique. Les résultats obtenus valident totalement l'approche qui ouvre ainsi la voie de l'étude protéomique rétrospective des tissus FFPE à l'imagerie moléculaire MALDI. Les perspectives de l'approche semblent donc intéressantes même s'il semble nécessaire de parfaire l'approche avec le couplage d'une méthode rapide de séparation en amont de l'analyse par spectrométrie de masse. Cette séparation aura un rôle sur la simplification du spectre et ainsi améliorer les interrogations en banque de données. Le but étant alors d'augmenter la précision de l'analyse et le score d'identification des protéines. Dans ce sens un couplage imagerie MALDI, digestion enzymatique du tissu et mobilité ionique semble être adéquat pour ce type d'analyse.

Même si l'imagerie MALDI a l'avantage de ne pas demander de spécificité propre pour l'analyse moléculaire du tissu, un certain nombre de molécules comme les oligonucléotides ou les protéines de hauts poids moléculaires sont difficilement détectables. Un nouveau concept de Tag-mass a été développé dans ce sens afin de permettre l'analyse par spectrométrie de masse des molécules d'oligonucléotides, et des protéines de hauts poids moléculaires. Ces molécules jusque là difficile à détecter du fait de leurs tailles ou de leurs caractéristiques physico-chimique, ont pu être détecté et localisé. Le développement et les applications correspondantes ont donné lieu à une publication et à un brevet. Le concept a été appliqué pour la localisation de deux molécules ARNm de proenképhaline et la protéine CPD (Carboxy-Peptidase D). Ces deux molécules sont habituellement difficilement identifiables par spectrométrie de masse de manière classique. Le Tag-mass cible de manière spécifique les molécules d'intérêts sur le tissu avec de forte spécificité ; Cette affinité forte provient de la forte interaction entre le ligand choisi et son substrat. Dans cette optique, de nouveaux Tag-mass sont en cours de synthèse comme les aptamers afin de diminuer l'encombrement stérique, d'augmenter le nombre de marquage, et la sensibilité de l'approche tout en augmentant l'affinité spécifique entre le ligand et le substrat. L'approche spécifique peut alors se décliner sous différentes formes en fonction des modifications subites sur le Tag-mass pour localiser différentes molécules ADN, ARNm, protéines, drogues, et cela afin de corréler dans un même outil une approche transcriptomique, génomique et protéomique. Il peut aussi être utilisé sur différents appareils de spectrométrie de masse. LE SIMS par exemple, possède une meilleure résolution spatiale et temporelle (quelques microns) que celle du MALDI. Nous développons actuellement l'approche du Tag-mass pour ce type d'appareil qui pourrait devenir un outil intéressant de l'imagerie spécifique. L'avantage par rapport aux autres méthodes d'imagerie fluorescence ou autre et son utilisation multiplexe, où la localisation simultanée d'un très grand nombre de molécules de différentes sortes. Il est effectivement

possible de concevoir des protocoles d'imagerie spécifique combinant à la fois une localisation d'une drogue, d'une glycoprotéine, d'un ARNm en une seule et unique étape. L'analyse spécifique par le concept de Tag-mass a ouvert également de nouveaux horizons pour la localisation et la détection de molécules nouvelles par spectrométrie de masse.

Les tests de sensibilité, et de spécificité de l'approche d'imagerie reste encore à démontrer sur le tissu. Cependant, les tests obtenus en milieu liquide ont été au delà de nos espérances avec une sensibilité cent fois plus importante que des approches routinière d'ELISA. Ces approches d'ISA-MS et PCR-MS ont données lieu à un troisième brevet en cours de validation. Reprenant la fonctionnalité du Tag-mass pour la détection et la quantification de molécules par spectrométrie de masse, l'ISA-MS et la PCR-MS quantifie rapidement de nombreuses molécules en une étape unique d'analyse. Une fois de plus, le caractère universel du Tag-mass permet de l'utiliser dans de nombreux cas, pour la quantification d'oligonucléotides, de protéines, de drogues, et cela dans différents appareils de spectrométrie de masse. L'imagerie nécessite cependant des modifications afin d'augmenter sa résolution spatiale pour atteindre un niveau sub-cellulaire.

L'amélioration de la résolution spatiale :

Trois stratégies ont été employées pour améliorer la résolution spatiale afin d'obtenir des informations cellulaires ou sub-cellulaires. Basé tout d'abord sur le travail de B. Spengler, le spectromètre de masse MALDI time-of-flight a été équipé d'une source laser coaxiale capable d'irradier de petite zone de $60 \mu\text{m}^2$ ($7\mu\text{m}$ de diamètre). Les signaux ioniques générés par cette approche haute résolution a pu être observés dans une gamme de masse inférieur à 27 000 m/z. (Chaurand, Schriver et al. 2007). D'autres voies de développements ont été également développées par l'équipe de Sweedler qui consiste dans l'ablation de la matrice cristalline recouvrant l'échantillon et le déplacement du laser d'une distance inférieur au diamètre du laser, faisant en sorte que les tirs se recoupent. La résolution spatiale optimisée est obtenue aux alentours de $25 \mu\text{m}$ par cette technique (Jurchen, Rubakhin et al. 2005). La dernière méthode développée est une technique élaborée au laboratoire. Elle consiste à disposer un masque de silicone (**Figure 76**) ayant un diamètre d'ouverture petit sur le tissu à analyser par le spectromètre de masse MALDI. La taille du masque est inférieure au diamètre du laser et permet de diminuer l'aire de la zone irradiée (**Figure 77**).

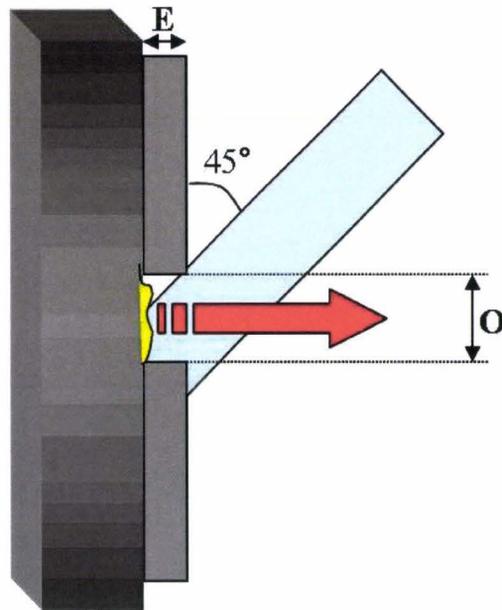


Figure 76. Masque couvrant le tissu afin de diminuer la zone irradiée

La taille obtenue est inférieure à $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, sans perte de signal (Wisztorski, Lemaire et al. 2007) (Figure 77). De plus de nouveaux masques de taille $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ sont en construction. La résolution au niveau cellulaire peut être alors atteinte avec des instruments d'IMS possédant ces modifications.

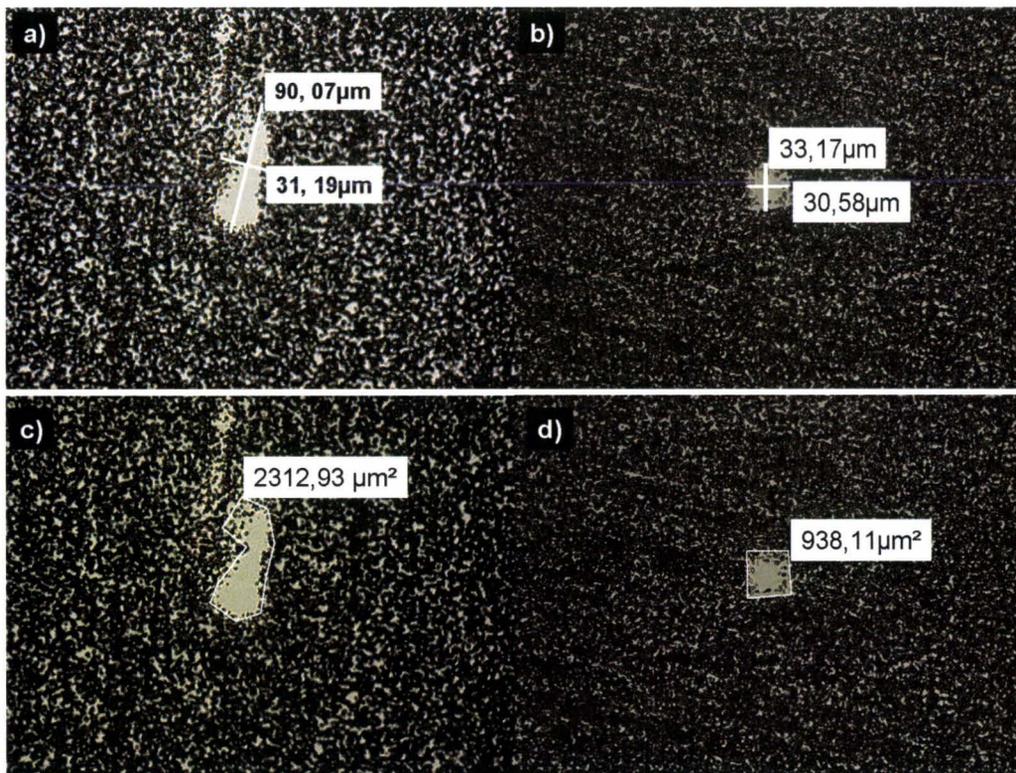
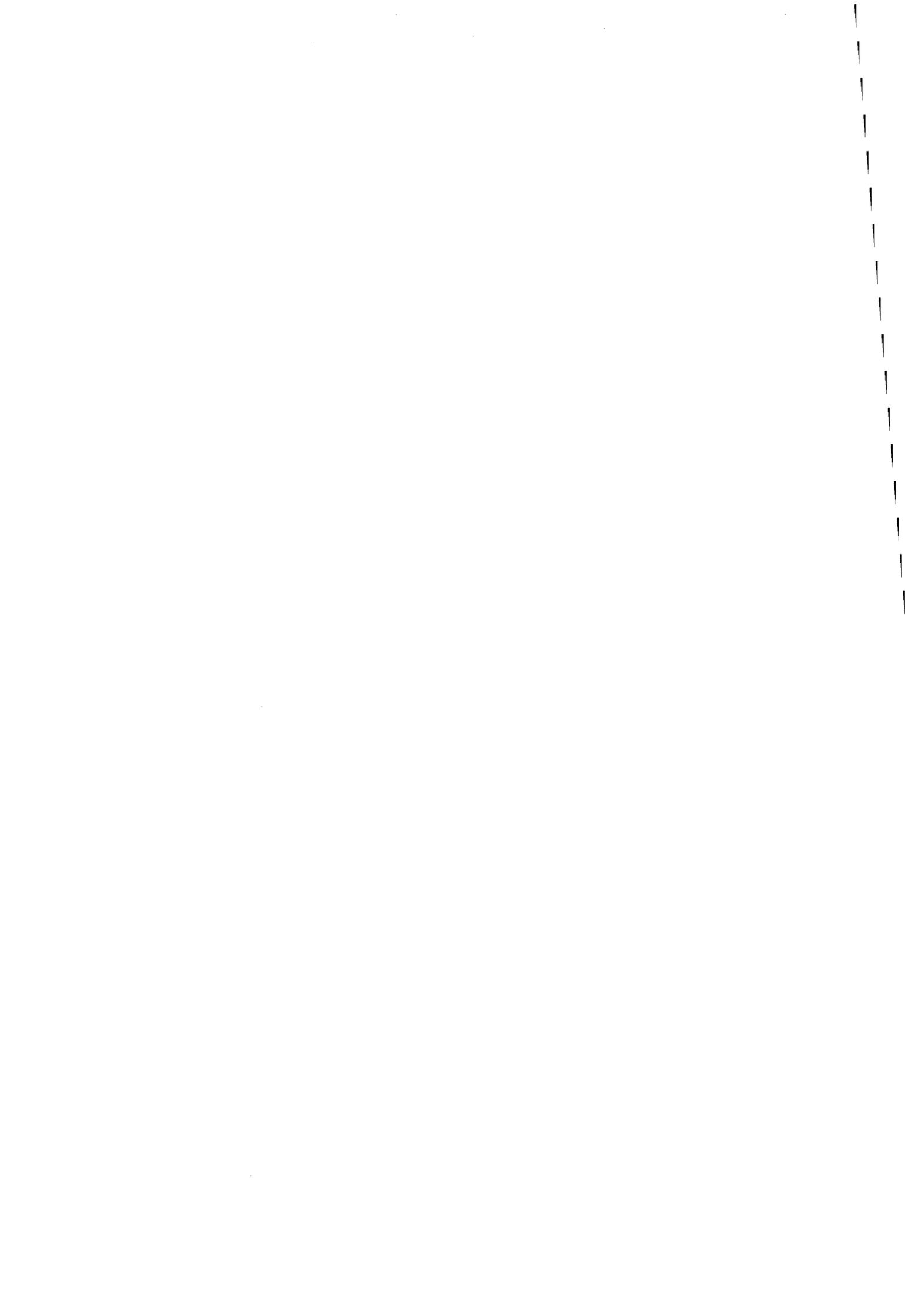


Figure 77. Observation de la taille de la zone irradiée en présence (b, d) ou en absence du masque (a, c)

PERSPECTIVES ET FUTURS DEVELOPPEMENTS

Le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI est une technique des plus prometteuses pour l'imagerie moléculaire et la Protéomique clinique. (Maddalo, Petrucci et al. 2005). Au vue des développements des approches d'imagerie nucléaires et magnétiques qui se rapprochent des fonctionnalités de l'approche IMS, la Protéomique clinique a besoin semble-t-il d'outils moléculaires sûrs, fiables, utilisables en routine pour le diagnostique, le pronostique médicale. Les différentes caractéristiques qui différentient les méthodes spectrométriques et spectroscopiques sont d'une part leur mode d'analyse soit *in vitro* (IMS) soit *in vivo* (IRM et le PET Scan) et d'autre part la qualité de l'analyse soit moléculaire (IMS) soit spécifique (IRM et PET scan). Ces spécificités techniques sont complémentaires et n'ont pas la même utilité: D'une part l'analyse moléculaire par spectrométrie de masse semble être un atout pour l'analyse rapide pour la détection et l'identification de marqueurs de tissu pathologique. Son utilisation est complète et semble être tournée vers la caractérisation, l'identification de biomarqueurs en vue de mettre en place des méthodes diagnostiques. L'imagerie IRM ou Pet Scan sont des méthodes ayant l'avantage de ne pas nécessiter d'intervention chirurgicale et permet la détection à distance des marqueurs. Cette approche demande cependant de mettre en place des protocoles au cas par cas (du fait de sa spécificité moléculaire). Cette approche est donc tournée vers des applications de diagnostique en routine où les marqueurs ont été identifiés au préalable par d'autres approches. En effet, L'imagerie IRM ou Pet scan ne peut établir de carte protéique, et par conséquent ne peut caractériser des biomarqueurs.

Comme le montre les derniers développements la complémentarité entre les techniques non invasives et les données moléculaires de l'imagerie MALDI est bénéfique pour la compréhension et l'établissement d'un diagnostique/pronostique complet. L'introduction de nouvelles techniques *in vivo* i.e. comme la technique de Désorption/ionisation electrospray (DESI) offre la possibilité de réaliser des diagnostics à partir de coelioscopie. Par exemple, la recherche de la signatures spécifiques humaines des papillomavirus pour des cancers épithéliaux peut être utilisé pour des diagnostics précoces de cancers épithéliaux. Un exemple de couplage d'imagerie par spectrométrie de masse DESI et IRM a été pour des expériences de biodisponibilité de drogues dans le tissu. {Chen, 2006 #232; Pan, 2007 #234; Wiseman, 2006 #233}.





ANNEXES 1 ET 2

New Developments in MALDI Imaging for Pathology Proteomic Studies

Maxence Wisztorski¹, Remi Lemaire¹, Jonathan Stauber¹, Sonia Ait Menguelet¹, Olivia Jardin Mathé¹, Robert Day², Michel Salzet¹, Isabelle Fournier^{1,*}

¹Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, équipe Imagerie MALDI, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq and ²Département de Pharmacologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada

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. Direct MALDI analysis of 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 using imaging software, it is now possible to produce *multiplex* imaging maps of selected biomolecules within tissue sections. Thus, direct MALDI spectral data obtained from tissue sections can be converted 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. Critical improvements to increase image resolution are presented in this manuscript e.g. solvent treatment, new solid ionic matrices, gold sputtering, nickel support or laser focalization. One of the most important developments is the ability to carry out either direct MALDI analysis or MALDI imaging on paraffin tissue sections, thus opening the path to an archival "gold-mine" of existing pathology samples to proteomic analysis. These developments provide new avenues for biomarker hunting and diagnostic follow-up in the clinical setting. Further developments in MALDI-imaging of specific targets provide an added dimension, as validated disease-marker-gene RNA transcripts can be analyzed along with their translation by targeting their specific protein products or metabolites. Disease/health states will thus be closely molecularly monitored at protein and nucleic acids levels, with a single technique. Taken together, MALDI imaging will become a key tool for pathology proteomic studies.

INTRODUCTION

In the era of proteomics and high throughput studies, need for new technologies presenting higher sensitivity, versatility and specificity are sought. Classic proteomics is now a widely used strategy for obtaining wide ranging protein information from tissues as demonstrated by growing literature in that field. In general, proteomic studies require homogenization of a sample as well as long, tedious and consuming extraction, purification and separation steps before characterization, resulting in the loss of the anatomical data. Over these past ten years, improvements of mass spectrometry instruments together with growing importance of this method for compound identification in the field of biology had lead to the development of direct analysis of tissue samples by the means of mass spectrometry. Mass spectrometry has become an analysis tool allowing identification of compounds directly from tissues without any extraction or separation, but adds one dimension to the analysis with some localization on tissue samples. Thus, in a single experiment, molecular information on hundreds proteins can be retrieved. By incorporating automation of this method and data processing, molecular images can be obtained from tissue sections. A major advantage of this method, rely on the sensitivity of mass spectrometry instruments revealing hundred compound molecular images after one data set acquisition. MALDI ion sources are 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 cellular level. MALDI imaging was first introduced by Caprioli and collaborators [1-3] (Fig. 1). Few studies have involved the still recent developments in MALDI imaging. Of note are the studies of Pr B. Spengler (Giessen, Germany) with the development of a new microprobe MALDI mass spectrometer combining the 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]. This group has also developed MALDI imaging instruments with atmospheric pressure MALDI (AP-MALDI). Other important developments have been established by Pr. R.M.A. Heeren (FOHM institute, Netherlands) introducing the 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]. Interesting applications on aging diseases have also been reported by M. Stoeckli and coll. (Novartis Pharma, Switzerland) [7]. MALDI imaging of lipids [8-11] is also under current development in the group of Pr. A. Woods. Neuroproteomics is well developed by the group of J. Sweedler [12-15] and our group has focused on developing tissue preparation methods as well as probe specific MALDI-imaging [16-18].

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 ROUTINE HISTO-PROTEOMICS IN PATHOLOGY

Histo-proteomics MALDI technology can be developed for drug biodistribution studies, biomarker discovery or for molecular mechanism discovery. At the present time, MALDI imaging can provide new avenues for clinical proteomic studies with the goal of characterizing cellular circuitry and to understand the impact of disease and therapy on cellular networks though analysis of tissue pathology samples. In fact more than just new clinical proteomic tool, MALDI-imaging has the potential to become a major method in the way tissue samples are investigated in pathology. MALDI-imaging histo-proteomics is the application of proteomic technologies and bioinformatic tools to clinical material though tumor analysis. 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

*Address correspondence to this author at the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, FRE CNRS 2933, équipe Imagerie MALDI, Cité Scientifique, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59650 Villeneuve d'Ascq; E-mail: isabelle.fournier@univ-lille1.fr

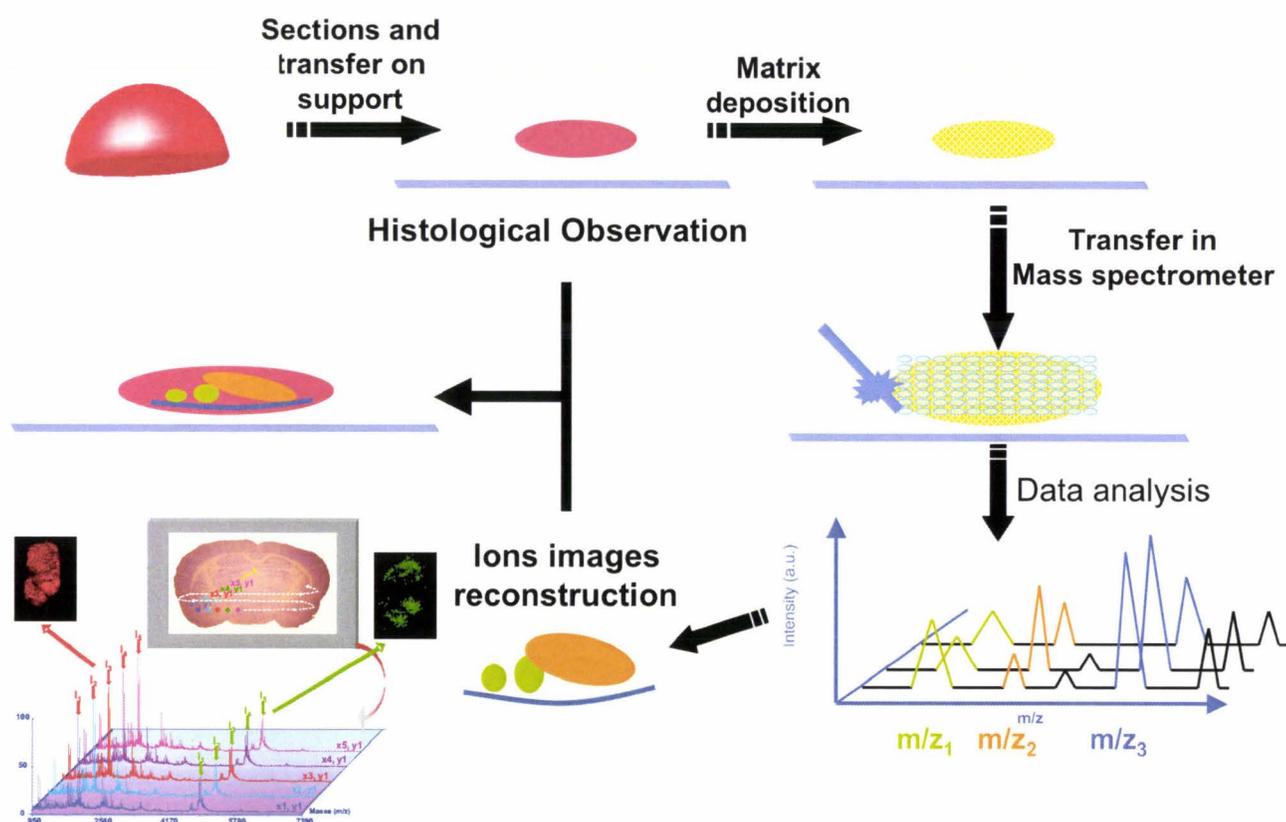


Fig. (1). Representative scheme of MALDI imaging technology.

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 μm , 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.

than focusing on genetic alterations that may lead to a particular disease, it is emerging that changes in multiple protein expression patterns are the most accurate way to identify diseases in their early stages and to determine the most effective course of treatment. Indeed, genome sequences do not provide information of 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, MALDI-based histo-proteomics provides powerful simultaneous detection of hundreds or even thousands of proteins in a single assay directly from the tissue. The effectiveness of such a proteomics approach in pathology 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 review, 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

Our recent technological advancements in MALDI-imaging allow the identification of novel markers and *in situ* characterization from fresh sections/biopsy embedded in paraffin, including archived material.

As shown in the (Fig. 1), tissue sections from fresh organ or biopsy are laid out on the MALDI target. Sections are first covered with a specific matrix depending on the nature of the bio-molecule under study [19]. For peptides, very intense signals are obtained with ionic matrices [20]. Sections are laid out on conductive glass (i.e., Nickel or ITO, (Fig. 2a), treated with organic solvent to remove lipids [21] (Fig. 2b), covered with a solid ionic matrix [20], overlaid with gold in order to remove charges effects [22] and are then introduced in the MALDI-TOF for analysis (Fig. 2c). Next, the MALDI laser is used to scan each point of the designated 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) [20, 23, 24]. Analysis is obtained within 2-6 hours and images are reconstructed using imaging software (Fig. 1). We recently made a important advances 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 in positive or nega-

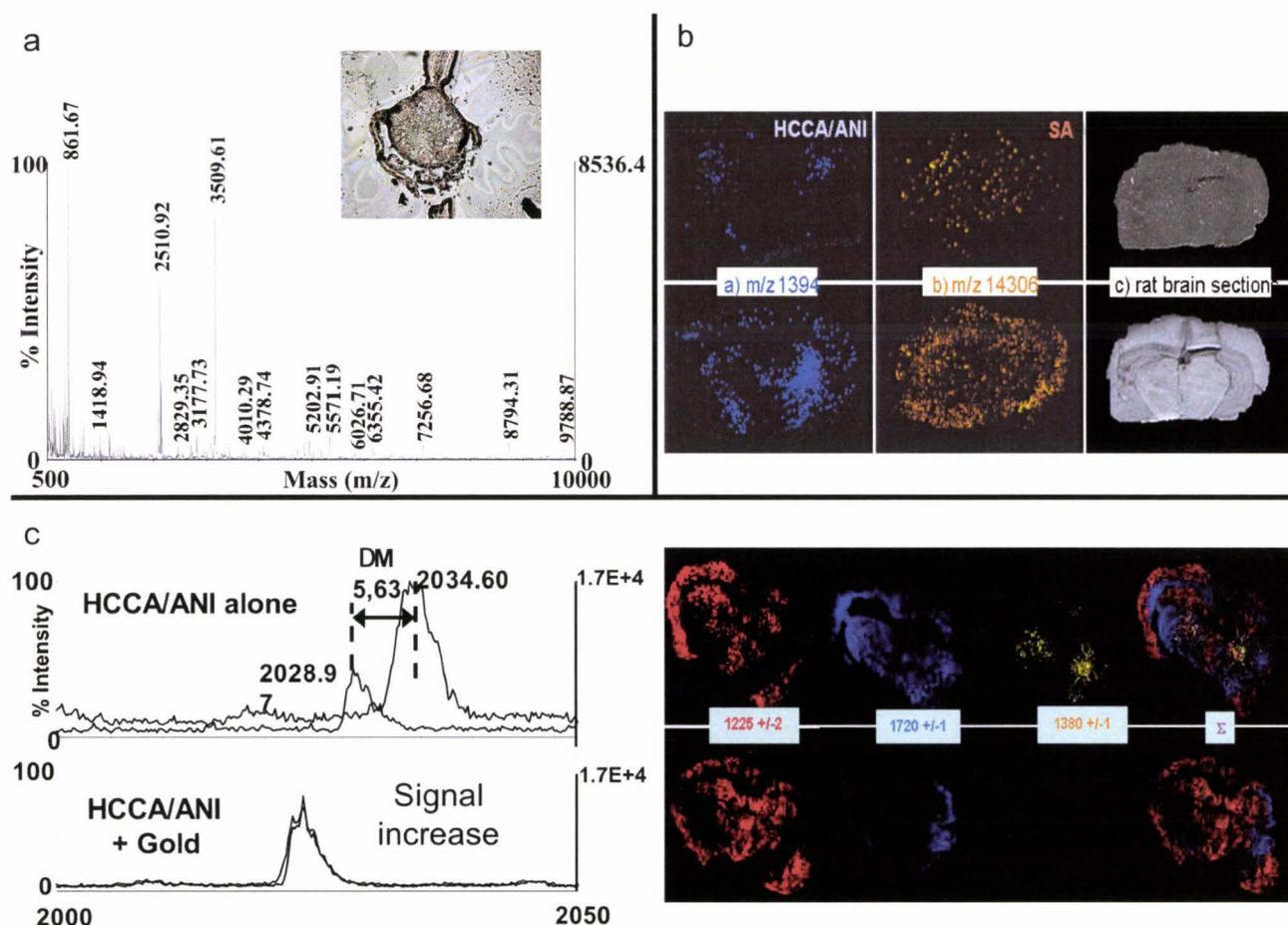


Fig. (2). Scheme of the MALDI imaging new developments.

a- Mass spectra of leech ganglia extract on Nickel Glasses for tissue application on conductive and transparent supports (inset represent a leech ganglia section on nickel Glass).

b- Solvents washing for removing lipids according to [21].

c- Gold sputtering of the slices for removing charge effects. Comparison was performed with HCCA/ANI matrix in present or absence of gold (Left panel). All spectra are obtained in a laser energy close to the minimal value for ions production and are obtained in a laser energy close to the minimal value for ions production. 15 shots are realized with an increasing of 15% of the laser fluence (no acquisition) and immediately after a spectrum is recorded in the same conditions of laser energy. Right panel represents MALDI-IMS using MALDI TOF/TOF in reflector mode at 50 Hz repetition rate with ionic matrix HCCA/ANI. The image have been reconstructed with FlexImaging software and represent the superposition of the repartition of $m/z = 1225$ (blue), $m/z = 1720$ (red) and $m/z = 1380$ (yellow).

tive modes [20]. One such matrix, namely ANI (aniline/HCCA) is highly stable under vacuum and has high resistance to repetitive laser shots (Fig. 3).

The use of archived material in paraffin blocks from hospital pathology departments thus represents a major source of catalogued existing information. However, the major hurdle to analyse such samples is the cross-linking due to formalin fixation and embedded in paraffin (FFPE tissue). Two approaches have been established depending on the age of the tissue blocks. In the case of tissues stored less than 6 months, an active matrix, namely 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) is used. DNPH neutralizes formalin excess and allows analysis of embedded tissues such as those from paraffin sections (Fig. 4a) [25]. In the case of tissue blocks stored more than 6 months, micro-digestion with trypsin must be performed. On adjacent sections, one is used for protein characterization and the other for a raster image using a microspotter for spotting the trypsin (200 μm) then the matrices at the same level. The section used for the protein characterization is treated with trypsin after paraffin removal and rehydration. The digest is then injected

in nanoLC trap for peptide characterization. The ions of the protein shown to change between normal or pathology are then examined on the adjacent slices in order to obtain an image of its localization. All ions deriving from the same protein after digestion can then be localized and the same cellular localization is obtained validating the methodology (Fig. 4b) [16, 25].

These developments in the histo-proteomics of MALDI-imaging for 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 has the potential applications for drug development. In this context MALDI-imaging can be used to analyze drug 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 versatility and power of MALDI-imaging, we briefly present preliminary data on a well established animal model of Parkinson's disease, where mice are treated with 6 hydroxydopamine (6-OHDA). In

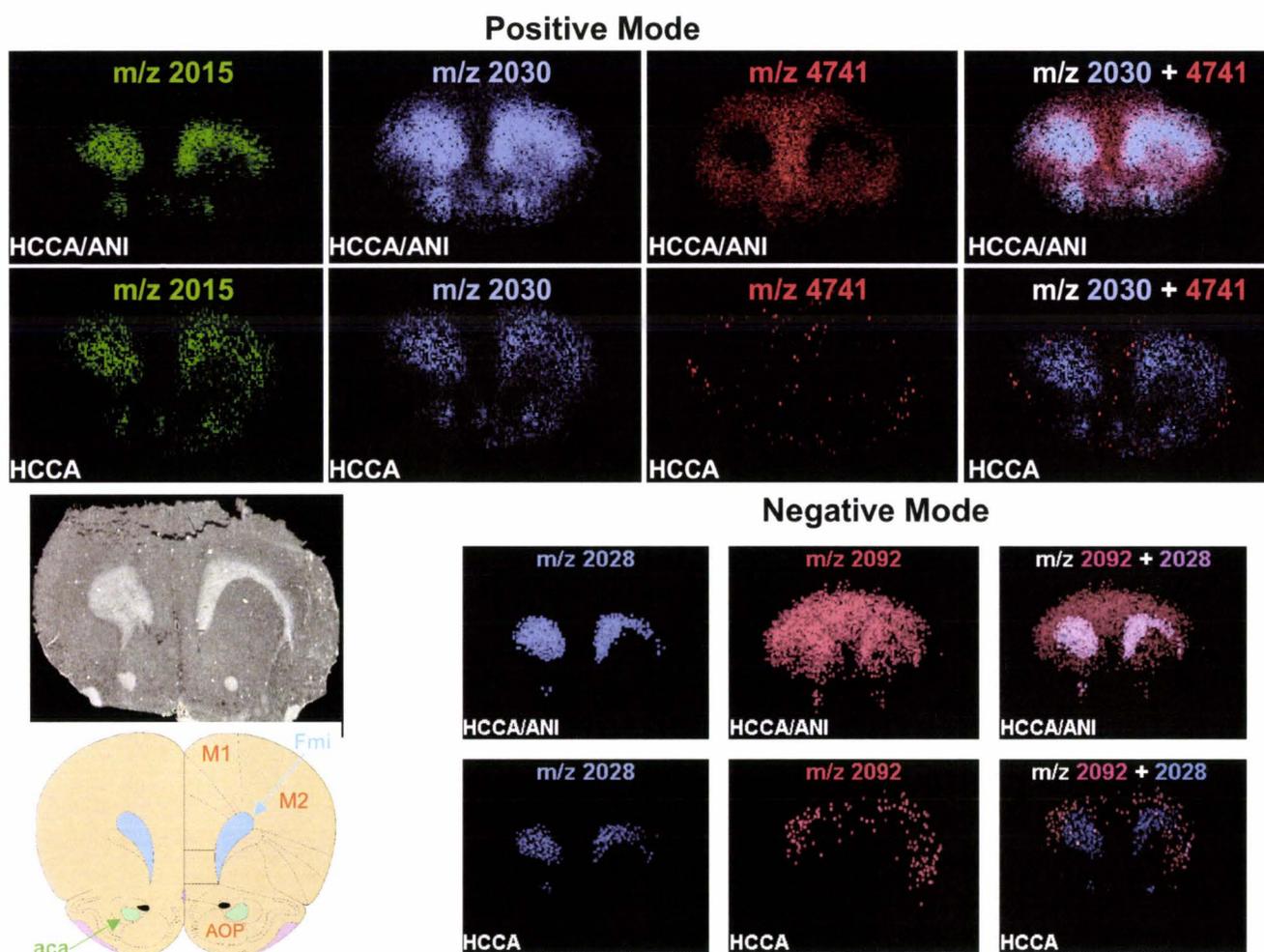


Fig. (3). MALDI-IMS using MALDI TOF-TOF in reflector mode at 50-Hz repetition rate with ionic matrixes CHCA/ANI and CHCA in positive (a) and negative modes (b). MALDI imaging can be compared with rat brain anatomy (c). For CHCA/ANI and CHCA, acquisitions in both polarities were performed on the same rat brain cut. Images have been reconstructed with the same parameters for ionic matrix and CHCA using FlexImaging software and represent the repartition of a m/z in the tissue slice. Images with two colors correspond to the superposition of two m/z images (aforceps minor of corpus callosum, banterior commissure, and c,dmorton cortex) With permission from analytical chemistry [20].

neurodegenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's 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 6-OHDA treatment. Direct MALDI analysis on FFPE brain tissue sections (stored for 9 years) 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 great potential in future histo-proteomics to discover new biomarkers from archived tissues from hospital library.

SPECIFIC MALDI IMAGING

In order to add a dimension of specificity to MALDI-imaging, we have developed designed probes directed against specific targets. This strategy has been developed for various biomolecules, from mRNA and peptides/proteins [26]. In order to specifically amplify signals, we have developed the concept of "Tag-Mass". Tag-Mass is a novel method that uses labeled probes for specific

identification in MALDI-imaging. As shown in (Fig. 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 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 established a proof-of-principal, as we can detect hybridized mRNAs on tissue sections. We then 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 (Fig. 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 (Fig. 6). The development of "Universal Tags" for direct *in situ* tissue analysis by MALDI-TOF mass spectrometry is a signifi-

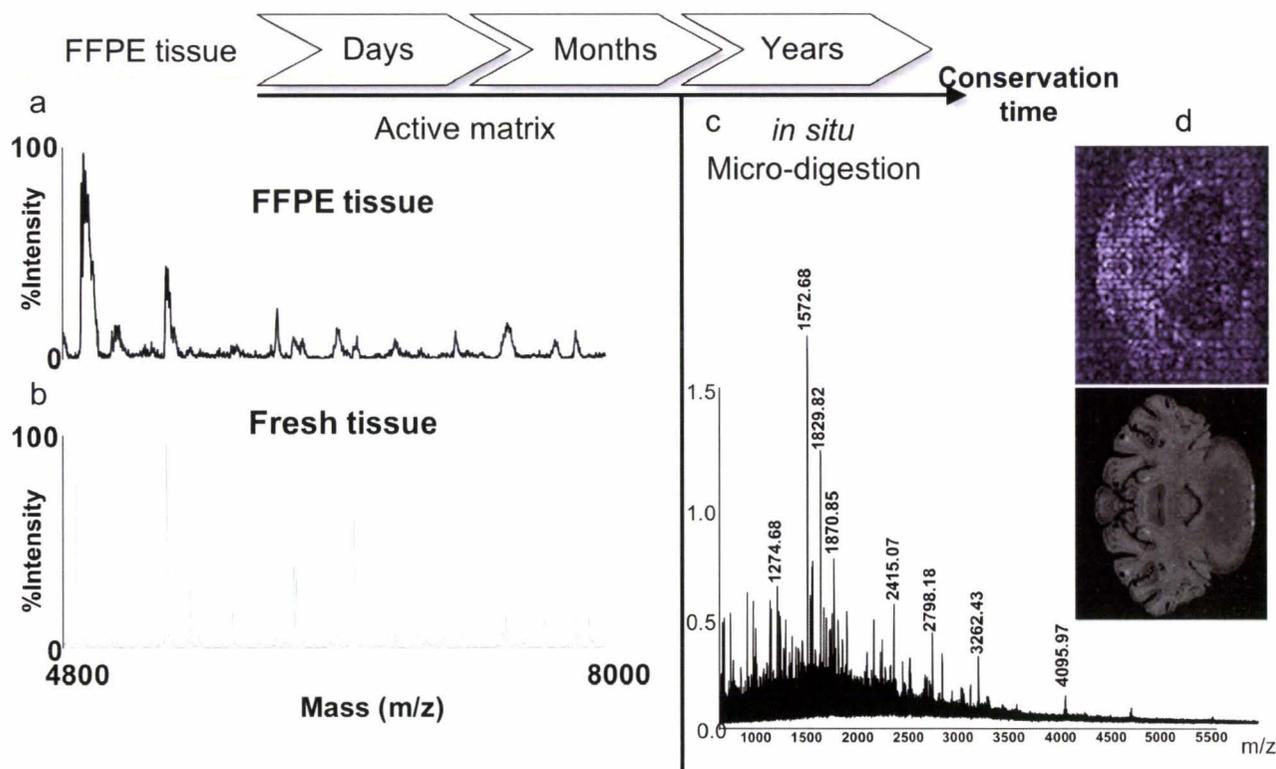


Fig. (4). Strategies used for FFPE tissue (a) stored less than 6 months, (b) stored more than 6 months.

a: Compared MALDI mass spectra in the linear positive mode of the direct analysis of a <1year old FFPE and fresh frozen rat brain tissues recorded in the same region With sinapinic acid as matrix.

b: MALDI mass spectrum in the linear positive mode of the direct analysis of a <1year old FFPE tissue using 2,4-DNPH as matrix. Zooming compared this spectrum to the one recorded in the same conditions and in the same region of the rat brain of a fresh frozen tissue.

c: MALDI mass spectrum in the linear positive mode of the direct analysis of a 2 years old FFPE tissue section after *in situ* trypsin digestion of the whole tissue section (15 min).

d: MALDI molecular images reconstructed from the data recorded on the 2 years old FFPE rat brain tissue section after micro-spotted *in situ* trypsin digestion followed by extraction and performed on MALDI-TOF-TOF/TOF using HCCA as matrix and compared to rat brain picture and morphology.

Table 1.

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

cant achievement toward specific molecular diagnosis. Thus we 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 on various positions of the sample and to obtain from each position a spectrum representing ionic species present in that position. 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 allows us to construct an expression map of any compound of known m/z ratio in the analyzed sample. UV lasers used in MALDI imaging, and especially commercialized N₂ lasers emitting at 337 nm, have a laser beam

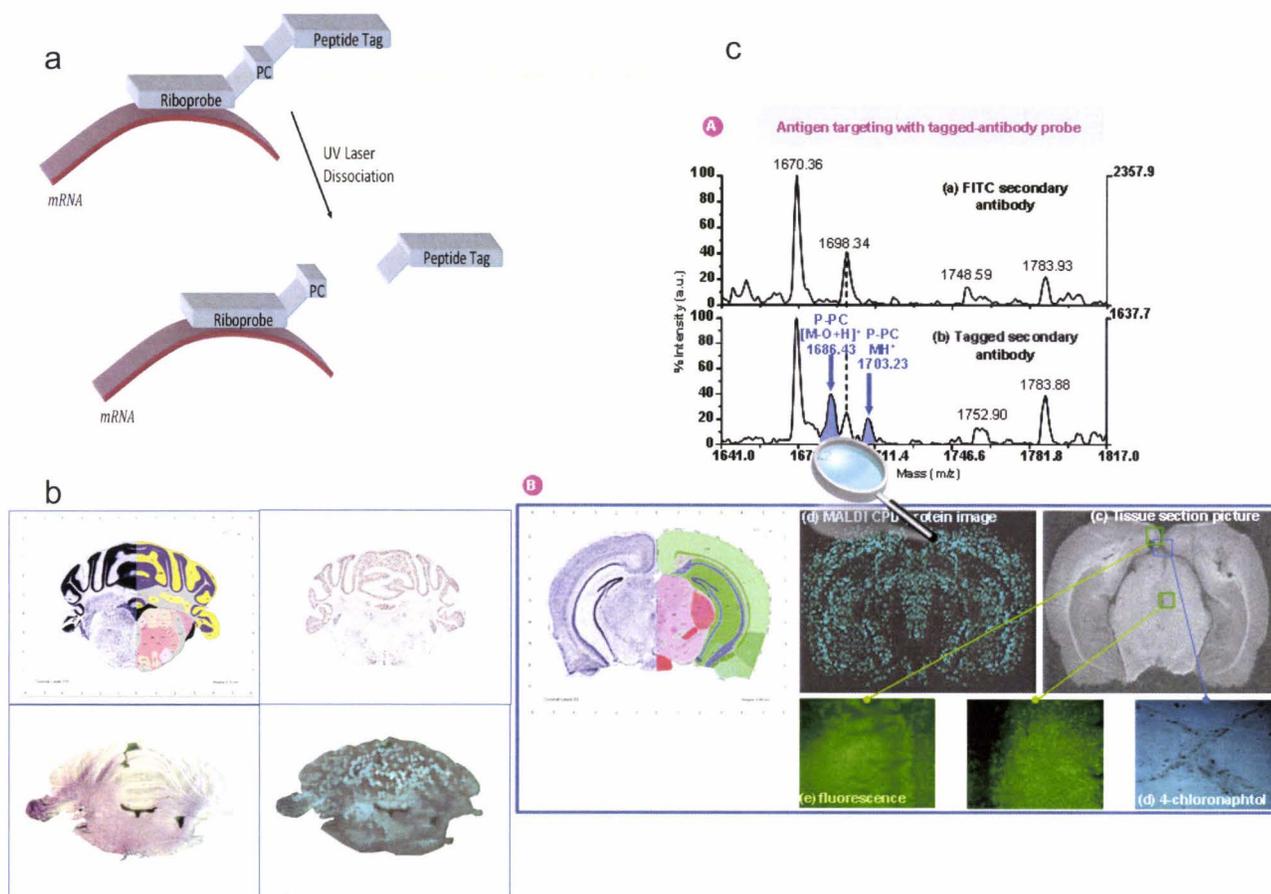


Fig. (5). Scheme of the tag-mass probe concept (a). MALDI molecular image reconstructed from data recorded with a proenkephalin tagged probe compared to mouse brain morphology and digoxigenin in situ hybridization data of mouse proenkephalin gene repartition (b) Molecular image of the carboxypeptidase D, a membranar protein of 180 kDa detected with a tagged antibody and compared to the same experiments with fluorescein and chloronaphthol revelation (c) [26].

section area generally ranging between $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ and $200 \times 200 \mu\text{m}^2$ 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 $75 \times 75 \mu\text{m}$), which corresponds to the irradiation of several cells in the tissue sample. Ideally, the image definition of a tissue sample should be of the order of a cell diameter ($10\text{--}20 \mu\text{m}$ for small cells). In fact, the decrease by a factor 10 ($10 \mu\text{m}$ steps) will increase imaging resolution.

Two types of solutions have been proposed to increase image resolution. The first, 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 [27]. For tissue sections, matrix spots of $180\text{--}200 \mu\text{m}$ 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 [27].

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 position, conductive masks have been developed to decrease the area irradiated by the laser beam for MALDI analysis in order to get a more precise localiza-

tion of the biomarkers in the tissue. Moreover, improving the beam focusing will get a homogeneous energy profile laser beam (flat top laser) (Fig. 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 in pathology proteomics.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) to R. Day, Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT, ACI, INCA, ANR PCV 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 Anélices.

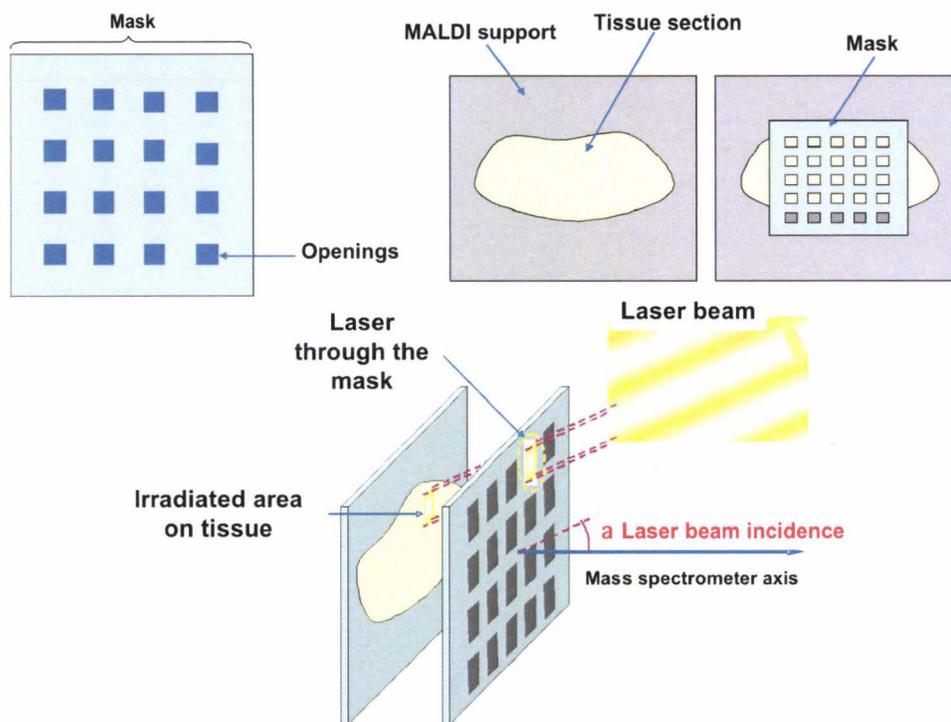


Fig. (6). Scheme of laser beam reduction through masks. Reduction is now $30 \times 30 \mu\text{m}$ (Wisztorski M., 2006 #80/)

REFERENCES

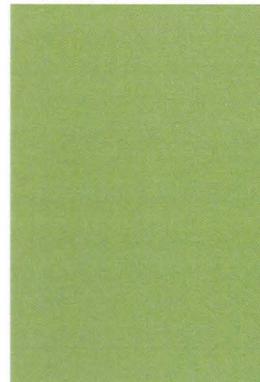
- [1] Chaurand P, Cornett DS, Caprioli RM. Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2006; 17(4): 431-6.
- [2] Chaurand P, Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: principles and potentials. *Toxicol Pathol* 2005; 33(1): 92-101.
- [3] Chaurand P, Schwartz SA, Caprioli RM. 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): 676-81.
- [4] Spengler B, Hubert M. 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): 735-48.
- [5] Heeren RM. Proteome imaging: a closer look at life's organization. *Proteomics* 2005; 5(17): 4316-26.
- [6] Luxembourg SL, Mize TH, McDonnell LA, Heeren RM. High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface. *Anal Chem* 2004; 76(18): 5339-44.
- [7] Stoeckli M, Farmer TB, Caprioli RM. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999; 10(1): 67-71.
- [8] Jackson SN, Wang HY, Woods AS. In situ structural characterization of phosphatidylcholines in brain tissue using MALDI-MS/MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005; 16(12): 2052-6.
- [9] Jackson SN, Wang HY, Woods AS. Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS. *Anal Chem* 2005; 77(14): 4523-7.
- [10] Woods AS, Jackson SN. Brain tissue lipidomics: direct probing using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Aaps J* 2006; 8(2): E391-5.
- [11] Woods AS, Ugarov M, Jackson SN, Egan T, Wang HY, Murray KK, *et al.* IR-MALDI-LDI combined with ion mobility orthogonal time-of-flight mass spectrometry. *J Proteome Res* 2006; 5(6): 1484-7.
- [12] Amare A, Hummon AB, Southey BR, Zimmerman TA, Rodriguez-Zas SL, Sweedler JV. Bridging neuropeptidomics and genomics with bioinformatics: Prediction of mammalian neuropeptide prohormone processing. *J Proteome Res* 2006; 5(5): 1162-7.
- [13] Hummon AB, Amare A, Sweedler JV. Discovering new invertebrate neuropeptides using mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006; 25(1): 77-98.
- [14] Jurchen JC, Rubakhin SS, Sweedler JV. MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005; 16(10): 1654-9.
- [15] Rubakhin SS, Jurchen JC, Monroe EB, Sweedler JV. Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery. *Drug Discov Today* 2005; 10(12): 823-37.
- [16] Lemaire R, Desmons A, Ducroy P, Tabet J.C, 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.
- [17] Fournier I, Lemaire R, Wisztorski M, Stauber J, Jardin-Mathé O, Van Camp C, *et al.* 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.
- [18] Lemaire R, Ducoroy P, Wisztorski M, Hendra JB, Tabet JC, Salzet M, *et al.* Exploring Direct Analysis Using Ionic Matrices. Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9; 2005; 2005.
- [19] Fournier I, Day R, Salzet M. Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol Lett*. 2003; 24(1-2): 9-14.
- [20] Lemaire R, Tabet JC, Ducoroy P, Hendra JB, Salzet M, Fournier I. Solid ionic matrices for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem*. 2006; 78(3): 809-19.
- [21] Lemaire R, Wisztorski M, Desmons A, Tabet JC, Day R, Salzet M, *et al.* MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments. *Anal Chem*. 2006; 78(20): 7145-53.
- [22] Wisztorski M, Brunet 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.
- [23] Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem.* 1997; 69(23): 4751-60.
- [24] Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001; 7(4): 493-6.
- [25] Lemaire R, Desmons A, Day R, Fournier I, Salzet M. Analysis of Peptides and Proteins in Formalin Fixed and Paraffin Embedded Rat Brain Tissue Sections by MALDI Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2007; 6(4):1295-30
- [26] Lemaire R, Stauber J, Wisztorski M, Van Camp C, Desmons A, Deschamps M, Proess G, Rudolf I, Woods AS, Day R., Salzet M, Fournier I. Tag-mass: Specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag. *J Proteome Res.* 2007; 6(6):2057-2067
- [27] Aerni HR, Cornett DS, Caprioli R.M. In situ proteomics in artificially created tissue microwells. Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, San Antonio, Texas, June 5-9; 2005; 2005.

> À 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'exploitation des ressources présentes dans les tumorothèques semble ainsi enfin levé. 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 (RMN) 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. <

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

Maxence Wisztorski, Rémi Lemaire,
Jonathan Stauber, Sonia Ait Menguellet,
Olivia Jardin-Mathé, Robert Day, Michel Salzet,
Isabelle Fournier



M. Wisztorski, R. Lemaire,
J. Stauber, S. Ait Menguellet,
O. Jardin-Mathé, M. Salzet,
I. Fournier : Laboratoire
de Neuro-immunologie
des Annelides, FRE CNRS 2933,
équipe Imagerie MALDI,
Bâtiment SN3, Cité Scientifique,
Université des Sciences
et Technologies de Lille,
59650 Villeneuve d'Ascq, France.
isabelle.fournier@univ-lille1.fr

R. Day : Département
de Pharmacologie,
Faculté de médecine,
Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec,
J1H 5N4, Canada.

Les récents développements réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse et plus particulièrement sur le plan instrumental font actuellement de cette technique un outil analytique 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]. Grâce aux connaissances croissantes sur les génomes, la combinaison des méthodes de biochimie classique et de la spectrométrie de masse a déjà permis l'identification de nombreuses protéines [3]. Néanmoins de telles méthodes conduisent principalement à l'identification de nouvelles protéines sans obtenir d'informations sur leur localisation ou encore de suivre l'évolution du profil d'expression de l'ensemble des peptides/protéines au sein d'un tissu 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. À 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 est parfaitement adaptée 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 de hautes masses moléculaires sous leur forme intacte. Son principe de fonctionnement nécessite la formation d'un réseau cristallin de matrice dans lequel sont diluées les molécules biologiques à analyser. Ainsi, cette méthode permet l'introduction d'analytes 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'utilisation 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. Elle peut aussi s'appliquer aux lipides, aux protéines et à des métabolites 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.

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 Richard Caprioli [7] pour que le *profiling* de tissu par spectrométrie de masse voit 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 [12, 13]. Une caractérisation complète des mécanismes de maturation de cette hormone au niveau d'un 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

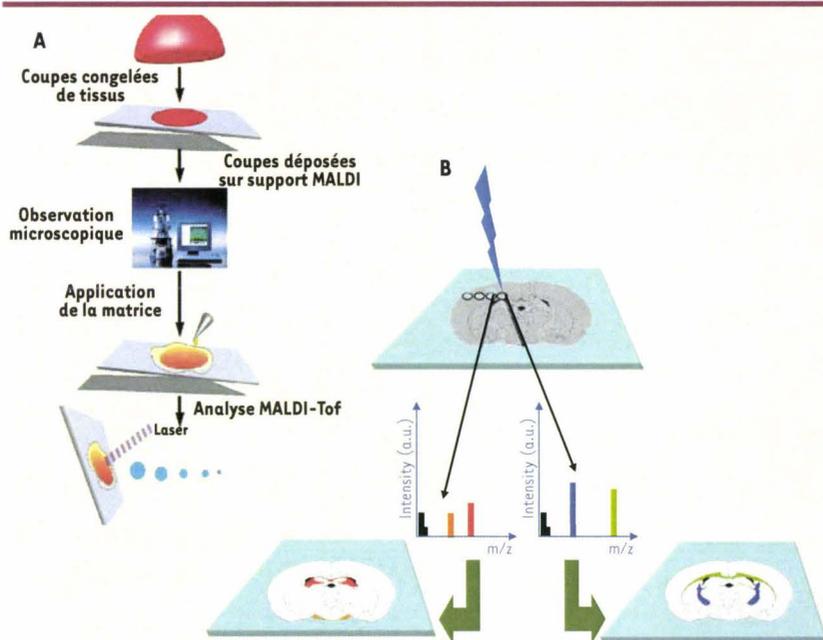


Figure 1. Principe de l'imagerie MALDI-TOF. A. Une coupe congelée est déposée sur un support. Une analyse microscopique est effectuée. La coupe est recouverte de matrice avant d'être analysée en MALDI-TOF. B. Le laser va balayer la surface de la coupe et un logiciel informatique va permettre de reconstituer 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.

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.

Supports conducteurs transparents

La comparaison des données histologiques, obtenues par l'observation des coupes après coloration en microscopie optique et des images moléculaires, obtenues par spectrométrie de masse, montre 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 indispensable en MALDI 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 empêchant éventuellement par la suite des analyses structurales par MS/MS. La caractérisation structurale des peptides au sein de la coupe par des études de la fragmentation de ceux-ci directement à partir des tissus est possible suite à l'arrivée d'instruments de type MALDI-TOF/TOF.

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, c'est-à-dire son mode et son temps de conservation. En effet, les tissus peuvent être, dès leur prélèvement, congelés puis coupés et ensuite analysés. À 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 intra- et inter-pro-

téines. 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.

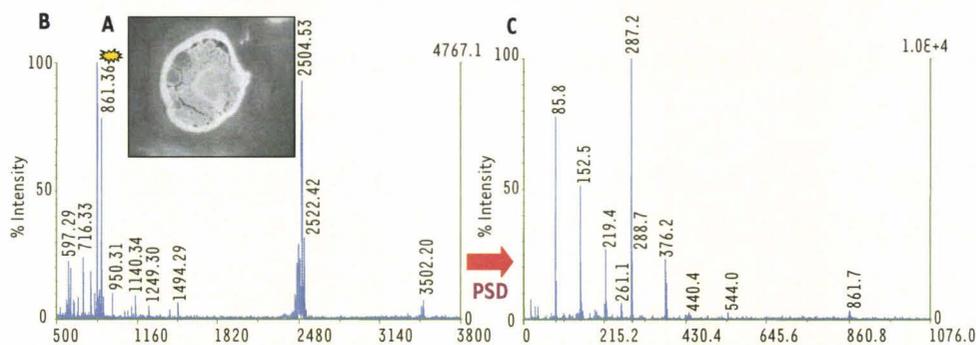
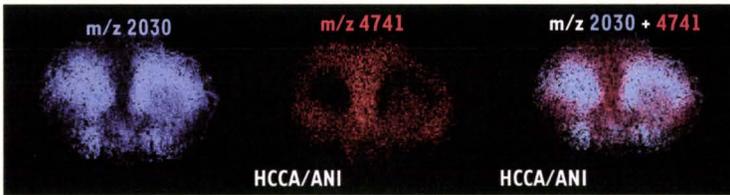


Figure 2. Supports transparents et conducteurs. A. Image par microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue déposée sur une lame conductrice recouverte de nickel. B. Analyse directe de la coupe en mode réflecteur. C. Mode PSD de l'ion m/z 861.7



Figure 3. 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.

A Mode positif



B Mode négatif

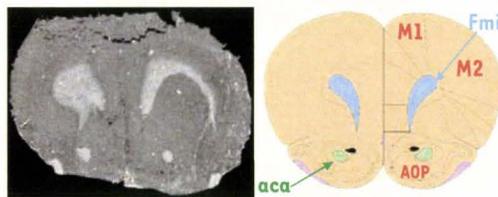


Figure 4. Images moléculaires reconstruites de la répartition de différents ions au sein de la coupe de cerveau de rat obtenue par balayage de 10000 points à 50 Hz et 200 tirs par position pour la matrice ionique HCCA/ANI. A. Première acquisition en mode positif. B. Seconde acquisition en mode négatif (avec la permission de *Analytical Chemistry*).

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 (200 Hz), 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).

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 cristallins 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 microdépôts, dépôt piezo, voire dépôt par éjection acoustique de microgouttes [29]. Ces microdépôts de

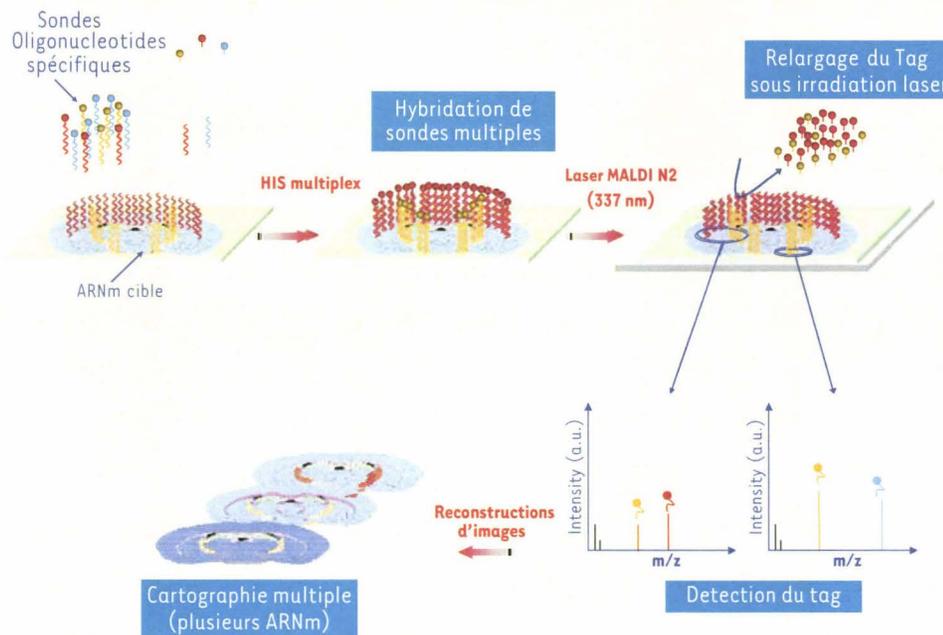


Figure 5. Principe de détection de plusieurs ARNm sur une coupe de tissu en utilisant des sondes marquées à l'aide d'UTP-lié par une liaison photoclivable par le laser UV et un rapporteur peptidique.

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 bidimensionnelles. 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]. L'imagerie par MALDI-IR permettrait de combiner les potentialités de l'imagerie MALDI et les récents développements dans l'utilisation des lasers IR [31, 32]. En effet en MALDI-IR, les mécanismes conduisant à l'obtention

d'ions en phase gazeuse reposent sur de l'excitation vibrationnelle, principalement 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 pallier les limitations de la technologie MALDI-UV, l'un des développements les plus prometteurs est ce que l'on appelle l'imagerie spécifique (Figure 6). Sous cette appellation se cache l'utilisation de sondes (anticorps, ribosondes, aptamères, 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. Ce concept appelé *Tag-mass* permet également d'étudier la répartition et l'expression au sein d'un tissu de biomarqueurs après les avoir identifiés. 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).

Conclusions

La comparaison des résultats provenant de l'imagerie par spectrométrie de masse avec ceux obtenus par des méthodes biologiques classiques telles que l'immunocytochimie confirme 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. ♦

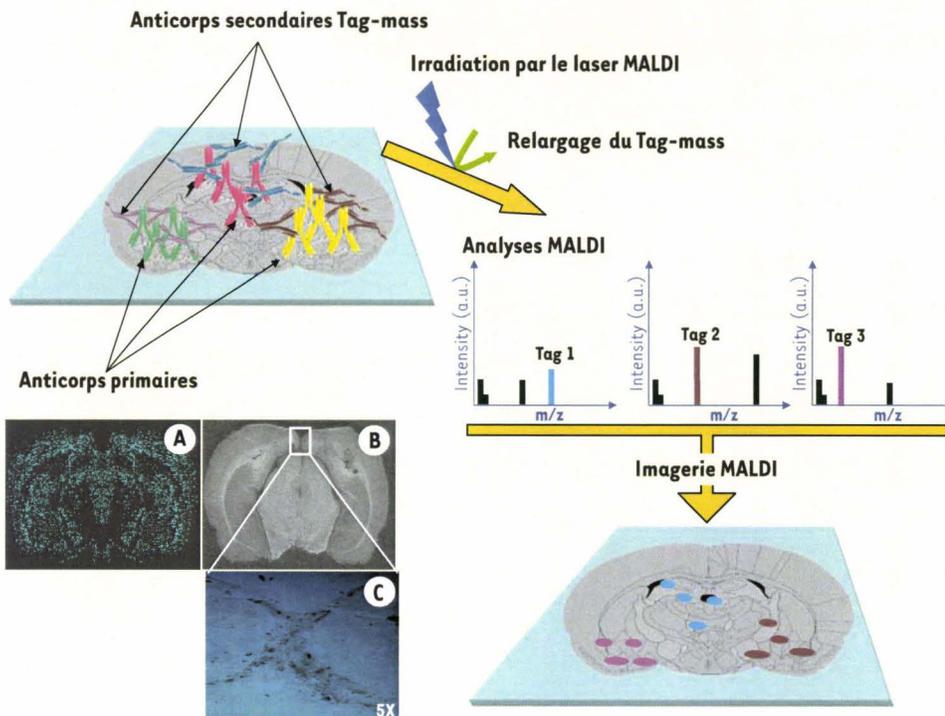


Figure 6. Principe de l'imagerie spécifique en utilisant des anticorps taggés (liés à une liaison photoclivable par le laser du MALDI et comportant un peptide rapporteur). A. Répartition moléculaire de la carboxypeptidase D (protéine membranaire de 160 kDa) détectée par le concept du *Tag-mass*. B. Scanner de la coupe adjacente. C. Immunodétection avec un anticorps marqué à la peroxydase et immunorévélaté par du chloronaphtol.

SUMMARY

MALDI imaging:

a new technology to discover and validate new biomarkers

Within the growing field of proteomics, mass spectrometry is now established as a powerful tool for peptide and protein identification and discovery from purified samples. A new era is now beginning, with the development of MALDI imaging, maintaining the sensitivity and efficacy of both discovery and identification while additionally preserving the anatomical integrity of biomolecules like peptides, proteins, oligonucleotides and lipids within tissues. Crucial developments for sample preparations have made leaps and bounds, as it is now possible to work with frozen conserved biopsies (-80°C) of more than 6 months or even conserved after paraformaldehyde fixation and paraffin embedding. The latter development has opened the door to archived tissues in hospital libraries and biomarkers hunting from tissues derived from these libraries are now a key objective. The relationship between MALDI imaging and immunocytochemistry used by the pathologist is important. The development of specific MALDI imaging using probes with a tag (peptide or organic) called «Tag-Mass» adds a whole new perspective. It is possible henceforth to localize a protein with its specific mRNA and more specifically, with its signalling pathway on the same sections or within 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 (NMR) that leads the development of imaging technologies called MRI in hospital which is intensively used for pathology diagnostics. ♦

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 M. D. Maréchal (Eurogentec, Belgique), M. W. Amoyal (Société Disruptive Technology Inc, France) et M. G. Rubel (Bruker Daltonic, France) pour leur soutien et leur coopération dans ce projet.

RÉFÉRENCES

1. Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization MS: a progress report. *Biochem Soc Trans* 1996 ; 24 : 897-900.
2. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 2001 ; 101 : 269-95.
3. Kuster B, Mortensen P, Andersen JS, Mann M. Mass spectrometry allows direct identification of proteins in large genomes. *Proteomics* 2001 ; 1 : 641-50.
4. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 1999 ; 71 : 5263-70.
5. Van Veelen PA, Jimenez CR, Li KW, et al. Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* 1993 ; 28 : 1542-6.
6. Garden RW, Moroz LL, Moroz TP, 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 : 1126-30.
7. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997 ; 69 : 4751-60.
8. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics* 2005 ; 4 : 394-401.
9. Fournier I, Day R, Salzet M. Direct analysis of neuropeptides by *in situ* MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *NeuroEndocrinol Lett* 2003 ; 24 : 9-14.
10. Kruse R, Sweedler JV. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003 ; 14 : 752-9.
11. Sweedler JV, Li L, Floyd P, Gilly W. Mass spectrometric survey of peptides in cephalopods with an emphasis on the FMRamide-related peptides. *J Exp Biol* 2000 ; 203 : 3565-73.
12. Garden RW, Shippy SA, Li L, et al. Proteolytic processing of the *Aplysia* egg-laying hormone prohormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 3972-7.
13. Li L, Garden RW, Floyd PD, et al. Egg-laying hormone peptides in the *Aplysiidae* family. *J Exp Biol* 1999 ; 202 : 2961-73.
14. Reyzer ML, Caprioli RM. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. *J Proteome Res* 2005 ; 4 : 1138-42.
15. Reyzer ML, Hsieh Y, Ng K, et al. Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003 ; 38 : 1081-92.
16. Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom* 2003 ; 38 : 699-708.
17. Meistermann H, Norris JL, Aerni HR, et al. Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol Cell Proteomics* 2006 ; 5 : 1876-86.
18. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001 ; 7 : 493-6.
19. Stoeckli M, Farmer TB, Caprioli RM. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999 ; 10 : 67-71.
20. Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, et al. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2004 ; 76 : 1145-55.
21. Wisztorski M, Dreiserwer BL, Hillenkamp K, et al. 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 54th ASMS conference on Mass Spectrometry, May 30-June 2, 2006, Seattle, Washington.
22. Chaurand P, Cornett DS, Caprioli RM. Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2006 ; 17 : 431-6.
23. Lemaire R, Tabet WM, Day JC, et al. Organic treatments: a way for improving signal sensitivity for profiling on tissue. *Anal Chem* 2007 (sous presse).
24. Aerni HR, Caprioli RM. *In situ* proteomics in artificially created tissue microwells. Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, June 5-9, 2005. San Antonio, Texas: ASMS, 2005.
25. Rohner TC, Staab D, Stoeckli M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev* 2005 ; 126 : 177-85.
26. Lemaire R, Wisztorski DP, Hendra M, et al. Exploring direct analysis using ionic matrices. In: Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, June 5-9, 2005. San Antonio, Texas: ASMS, 2005.
27. Lemaire RDA, Ducroy P, Tabet JC, et al. Direct analysis and MALDI imaging on formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE): application to Parkinson disease. Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry, May 30-June 2, 2006. Seattle, Washington: ASMS, 2006.
28. Lemaire R, Tabet JC, Ducroy P, et al. Solid ionic matrices for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 2006 ; 78 : 809-19.
29. Aerni HR, Cornett DS, Caprioli RM. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal Chem* 2006 ; 78 : 827-34.
30. Creelius AC, Cornett DS, Caprioli RM, et al. Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005 ; 16 : 1093-9.
31. Berkenkamp S, Karas M, Hillenkamp F. Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7003-7.
32. Kraft P, Alimpiev S, Dratz E, Sunner J. 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 : 912-24.
33. Fournier I, Wisztorski LR, Stauber M, et al. New insight in sample preparation for MALDI imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome. Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry May 30-June 2, 2006. Seattle, Washington: ASMS, 2006.

TIRÉS À PART

I. Fournier

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2007). "An experiment in earlier detection of ovarian cancer." *Lancet* **369**(9579): 2051.
- Ackermann, B. L., J. E. Hale, et al. (2006). "The role of mass spectrometry in biomarker discovery and measurement." *Curr Drug Metab* **7**(5): 525-39.
- Adams, J. (2004). "The proteasome: a suitable antineoplastic target." *Nat Rev Cancer* **4**(5): 349-60.
- Aerni, H. R., D. S. Cornett, et al. (2006). "Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation." *Anal Chem* **78**(3): 827-34.
- Altelaar, A. F., I. Klinkert, et al. (2006). "Gold-enhanced biomolecular surface imaging of cells and tissue by SIMS and MALDI mass spectrometry." *Anal Chem* **78**(3): 734-42.
- Altelaar, A. F., S. L. Luxembourg, et al. (2007). "Imaging mass spectrometry at cellular length scales." *Nat Protoc* **2**(5): 1185-96.
- Altelaar, M. A. F. T., I.M.; McDonnell, L.A.; Verhaert, P.D.E.M.; De Lange, R.P.J.; Adanc, R.A.H.; Moid, W.J. and R. M. A. P. S. R. Heeren (2007). "High-resolution MALDI imaging mass spectrometry allows localization of peptide distributions at cellular length scales in pituitary tissue sections." *Int J Mass Spectrom* **260**: 203-211.
- Bakker, A., L. Van Vaeck, et al. (1996). "Applications of laser microprobe mass spectrometry in biology and medicine." *Scanning Microsc* **10**(3): 753-72; discussion 772-5.
- Banoub, J. H., R. P. Newton, et al. (2005). "Recent developments in mass spectrometry for the characterization of nucleosides, nucleotides, oligonucleotides, and nucleic acids." *Chem Rev* **105**(5): 1869-915.
- Basso, M., S. Giraud, et al. (2004). "Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease." *PROTEOMICS* **4**(12): 3943-52.
- Bast, R. C., Jr., D. Badgwell, et al. (2005). "New tumor markers: CA125 and beyond." *Int J Gynecol Cancer* **15 Suppl 3**: 274-81.
- Beal, F. and A. Lang (2006). "The proteasomal inhibition model of Parkinson's disease: "Boon or bust"?" *Ann Neurol* **60**(2): 158-61.
- Beal, M. F. (2003). "Mitochondria, oxidative damage, and inflammation in Parkinson's disease." *Ann N Y Acad Sci* **991**: 120-31.
- Belu, A. M., D. J. Graham, et al. (2003). "Time-of-flight secondary ion mass spectrometry: techniques and applications for the characterization of biomaterial surfaces." *Biomaterials* **24**(21): 3635-53.
- Birchler, M. T., C. Thuerl, et al. (2007). "Immunoscintigraphy of patients with head and neck carcinomas, with an anti-angiogenetic antibody fragment." *Otolaryngol Head Neck Surg* **136**(4): 543-8.
- Boas, D. A., K. Chen, et al. (2004). "Improving the diffuse optical imaging spatial resolution of the cerebral hemodynamic response to brain activation in humans." *Opt Lett* **29**(13): 1506-8.
- Boyce, E. A. and E. C. Kohn (2005). "Ovarian cancer in the proteomics era: diagnosis, prognosis, and therapeutics targets." *Int J Gynecol Cancer* **15 Suppl 3**: 266-73.
- Breedlove, G. and C. Busenhart (2005). "Screening and detection of ovarian cancer." *J Midwifery Womens Health* **50**(1): 51-4.
- Bremer, C., C. H. Tung, et al. (2001). "In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition." *Nat Med* **7**(6): 743-8.
- Brody, E. N., M. C. Willis, et al. (1999). "The use of aptamers in large arrays for molecular diagnostics." *Mol Diagn* **4**(4): 381-8.

- Brunelle, A., D. Touboul, et al. (2005). "Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources." J Mass Spectrom **40**(8): 985-99.
- Caldwell, R. L. and R. M. Caprioli (2005). "Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications." Mol Cell Proteomics **4**(4): 394-401.
- Caprioli, R. M., T. B. Farmer, et al. (1997). "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS." Anal Chem **69**(23): 4751-60.
- Cassidy, P. J. and G. K. Radda (2005). "Molecular imaging perspectives." J R Soc Interface **2**(3): 133-44.
- Castaing, R. and G. Slodzian (1962). J Microsc **1**: 395-410.
- Chan, K. K. and T. J. Selman (2006). "Testing for ovarian cancer." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **20**(6): 977-83.
- Chan, W. C. and S. Nie (1998). "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection." Science **281**(5385): 2016-8.
- Chatziioannou, A. F., S. R. Cherry, et al. (1999). "Performance evaluation of microPET: a high-resolution lutetium oxyorthosilicate PET scanner for animal imaging." J Nucl Med **40**(7): 1164-75.
- Chaurand, P. and R. M. Caprioli (2002). "Direct profiling and imaging of peptides and proteins from mammalian cells and tissue sections by mass spectrometry." Electrophoresis **23**(18): 3125-35.
- Chaurand, P., D. S. Cornett, et al. (2006). "Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry." Curr Opin Biotechnol **17**(4): 431-6.
- Chaurand, P., S. Fouchecourt, et al. (2003). "Profiling and imaging proteins in the mouse epididymis by imaging mass spectrometry." PROTEOMICS **3**(11): 2221-39.
- Chaurand, P., J. L. Norris, et al. (2006). "New developments in profiling and imaging of proteins from tissue sections by MALDI mass spectrometry." J Proteome Res **5**(11): 2889-900.
- Chaurand, P., M. E. Sanders, et al. (2004). "Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections." Am J Pathol **165**(4): 1057-68.
- Chaurand, P., K. E. Schriver, et al. (2007). "Instrument design and characterization for high resolution MALDI-MS imaging of tissue sections." J Mass Spectrom **42**(4): 476-89.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, et al. (2004). "Integrating histology and imaging mass spectrometry." Anal Chem **76**(4): 1145-55.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, et al. (2002). "Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections." Curr Opin Chem Biol **6**(5): 676-81.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, et al. (2004). "Profiling and imaging proteins in tissue sections by MS." Anal Chem **76**(5): 87A-93A.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz, et al. (2005). "Imaging mass spectrometry: principles and potentials." Toxicol Pathol **33**(1): 92-101.
- Chaurand, P., M. Stoeckli, et al. (1999). "Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry." Anal Chem **71**(23): 5263-70.
- Choudhury, R. P., V. Fuster, et al. (2004). "Molecular, cellular and functional imaging of atherothrombosis." Nat Rev Drug Discov **3**(11): 913-25.
- Cody, R. B., J. A. Laramee, et al. (2005). "Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient Conditions." Anal Chem **77**(8): 2297-302.
- Colliver, T. L., C. L. Brummel, et al. (1997). "Atomic and molecular imaging at the single-cell level with TOF-SIMS." Anal Chem **69**(13): 2225-31.

- Crockett, D. K., Z. Lin, et al. (2005). "Identification of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded cells by LC-MS/MS." Lab Invest **85**(11): 1405-15.
- Deininger, S. O., M. Schürenberg, et al. (2006). ABRF, Long Beach, California.
- Delcorte, A., J. Bour, et al. (2003). "Sample metallization for performance improvement in desorption/ionization of kilodalton molecules: quantitative evaluation, imaging secondary ion MS, and laser ablation." Anal Chem **75**(24): 6875-85.
- Domon, B. and R. Aebersold (2006). "Mass spectrometry and protein analysis." Science **312**(5771): 212-7.
- Dreisewerd, K., R. Kingstonb, et al. (1997). "Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of nervous tissues to identify peptides involved in male copulatory behavior in *Lymnaea stagnalis*." Int. J. Mass Spectrom. **169**: 291-299.
- Eeckhaoudt, S., L. Van Vaeck, et al. (1994). "Laser microprobe mass spectrometry in biology and biomedicine." Scanning Microsc Suppl **8**: 335-58.
- Engvall, E. and P. Perlman (1971). "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G." Immunochemistry **8**(9): 871-4.
- Fedorov, A. G. and F. L. Degertekin (2006). "Scanning mass spectrometry probe for biochemical imaging." IEEE Electronics Letters **42**(14): 793-794.
- Fenn, J. B., M. Mann, et al. (1989). "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules." Science **246**(4926): 64-71.
- Fields, J. P. and S. Chodosh (1970). "Quantitation of sputum protein by use of the biuret reaction." Clin Chem **16**(9): 773-5.
- Ford, M. J. and G. J. Van Berkel (2004). "An improved thin-layer chromatography/mass spectrometry coupling using a surface sampling probe electrospray ion trap system." Rapid Commun Mass Spectrom **18**(12): 1303-9.
- Fournier, I., R. Day, et al. (2003). "Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain." Neuro Endocrinol Lett **24**(1-2): 9-14.
- Franceschini, M. A., K. T. Moesta, et al. (1997). "Frequency-domain techniques enhance optical mammography: initial clinical results." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6468-73.
- Frangioni, J. V. (2003). "In vivo near-infrared fluorescence imaging." Curr Opin Chem Biol **7**(5): 626-34.
- Gao, X., L. W. Chung, et al. (2007). "Quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging." Methods Mol Biol **374**: 135-46.
- Gaskell, J. F. (1907). "A method of quantitative estimation of cystin in urine." J Physiol **36**(2-3): 142-8.
- Giardini (1950). "Cervical cancer cytodiagnosis by means of smear with hematoxylin-eosin stain." Prensa Med Argent.
- Giasson, B. I. and V. M. Y. Lee (2003). "Are Ubiquitination Pathways Central to Parkinson's Disease?" Cell **114**(1): 1-8.
- Guerrera, I. C. and O. Kleiner (2005). "Application of mass spectrometry in proteomics." Biosci Rep **25**(1-2): 71-93.
- Hahner, S., J. Olejnik, et al. (1999). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of DNA using photocleavable biotin." Biomol Eng **16**(1-4): 127-33.
- Hayashi, H., N. Kimura, et al. (2004). "A seed for Alzheimer amyloid in the brain." J Neurosci **24**(20): 4894-902.
- Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." Methods Enzymol **193**: 280-95.
- Hillenkamp, F., M. Karas, et al. (1991). "Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers." Anal Chem **63**(24): 1193A-1203A.

- Hood, B. L., T. P. Conrads, et al. (2006). "Mass spectrometric analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue: unlocking the proteome within." PROTEOMICS **6**(14): 4106-14.
- Hood, B. L., T. P. Conrads, et al. (2006). "Unravelling the proteome of formalin-fixed paraffin-embedded tissue." Brief Funct Genomic Proteomic **5**(2): 169-75.
- Hood, B. L., M. M. Darfler, et al. (2005). "Proteomic analysis of formalin-fixed prostate cancer tissue." Mol Cell Proteomics **4**(11): 1741-53.
- Huang, M. Z., H. J. Hsu, et al. (2006). "Direct protein detection from biological media through electrospray-assisted laser desorption ionization/mass spectrometry." J Proteome Res **5**(5): 1107-16.
- Hummon, A. B., A. Amare, et al. (2006). "Discovering new invertebrate neuropeptides using mass spectrometry." Mass Spectrom Rev **25**(1): 77-98.
- Iancu, T. C., D. P. Perl, et al. (1996). "The application of laser microprobe mass analysis to the study of biological material." Biomaterials **9**(1): 57-65.
- Jackson, S. N., M. Ugarov, et al. (2007). "MALDI-ion mobility-TOFMS imaging of lipids in rat brain tissue." J Mass Spectrom **42**(8): 1093-8.
- Jackson, S. N., H. Y. Wang, et al. (2005). "Direct profiling of lipid distribution in brain tissue using MALDI-TOFMS." Anal Chem **77**(14): 4523-7.
- Jackson, S. N., H. Y. Wang, et al. (2005). "Direct tissue analysis of phospholipids in rat brain using MALDI-TOFMS and MALDI-ion mobility-TOFMS." J Am Soc Mass Spectrom **16**(2): 133-8.
- Jeavons, A. P., Chandler, R. A. & Dettmar, C. A. R. (1999). "A 3D HIDAC-PET camera with sub-millimetre resolution for imaging small animals. ." IEEE Trans. Nucl. Sci. **46**: 468-473.
- Jimenez, C. R. and A. L. Burlingame (1998). "Ultramicroanalysis of peptide profiles in biological samples using MALDI mass spectrometry." Exp Nephrol **6**(5): 421-8.
- Jimenez, C. R., K. W. Li, et al. (1998). "Direct mass spectrometric peptide profiling and sequencing of single neurons reveals differential peptide patterns in a small neuronal network." Biochemistry **37**(7): 2070-6.
- Jimenez, C. R., P. A. van Veelen, et al. (1994). "Neuropeptide expression and processing as revealed by direct matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of single neurons." J Neurochem **62**(1): 404-7.
- Jurchen, J. C., S. S. Rubakhin, et al. (2005). "MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam." J Am Soc Mass Spectrom **16**(10): 1654-9.
- Karas, M., D. Bachmann, et al. (1987). "Matrix-Assisted Laser Desorption of Non-Volatile Compounds." Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes **78**: 53-68.
- Karas, M. and F. Hillenkamp (1988). "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons." Anal Chem **60**(20): 2299-301.
- Kato, K., Y. Hamaguchi, et al. (1977). "Use of rabbit antibody IgG bound onto plain and aminoalkylsilyl glass surface for the enzyme-linked sandwich immunoassay." J Biochem (Tokyo) **82**(1): 261-6.
- Kindness, A., C. N. Sekaran, et al. (2003). "Two-dimensional mapping of copper and zinc in liver sections by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry." Clin Chem **49**(11): 1916-23.
- Kirpekar, F., E. Nordhoff, et al. (1994). "Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of enzymatically synthesized RNA up to 150 kDa." Nucleic Acids Res **22**(19): 3866-70.
- Kirpekar, F., E. Nordhoff, et al. (1998). "DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry." Nucleic Acids Res **26**(11): 2554-9.

- Kolker, E., R. Higdon, et al. (2006). "Protein identification and expression analysis using mass spectrometry." Trends Microbiol **14**(5): 229-35.
- Kruse, R. A., S. S. Rubakhin, et al. (2001). "Direct assay of Aplysia tissues and cells with laser desorption/ionization mass spectrometry on porous silicon." J Mass Spectrom **36**(12): 1317-22.
- Labbe, J. P. (2003). "SPECT/CT emerges from the shadow of PET/CT." Biophotonics Int. **50-57**.
- Lemaire, R., A. Desmons, et al. (2006). Direct analysis and MALDI imaging on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues : Application to Parkinson disease. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington.
- Lemaire, R., A. Desmons, et al. (2007). "Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections." J Proteome Res **6**(4): 1295-305.
- Lemaire, R., J. Stauber, et al. (2007). "Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag." J Proteome Res **6**(6): 2057-67.
- Lemaire, R., J. C. Tabet, et al. (2006). "Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging." Anal Chem **78**(3): 809-19.
- Li, K. W., R. M. Hoek, et al. (1994). "Direct peptide profiling by mass spectrometry of single identified neurons reveals complex neuropeptide-processing pattern." J Biol Chem **269**(48): 30288-92.
- Li, L., R. W. Garden, et al. (2000). "Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling." Trends Biotechnol **18**(4): 151-60.
- Liu, Q., F. Xie, et al. (2004). "Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases." Cell Mol Life Sci **61**(24): 3057-75.
- Luxembourg, S. L., L. A. McDonnell, et al. (2005). "Infrared mass spectrometric imaging below the diffraction limit." J Proteome Res **4**(3): 671-3.
- Luxembourg, S. L., T. H. Mize, et al. (2004). "High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface." Anal Chem **76**(18): 5339-44.
- Lykins, E. L., E. L. Pavlik, et al. (2007). "Validity of self-reports of return for routine repeat screening in an ovarian cancer screening program." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **16**(3): 490-3.
- MacDonald, L. R., Patt, B. E., Iwanczyk, J. S., Tsui, B. M. W., Y. Wang, Frey, E. C., Wessell, D. E., Acton, P. D. &, et al. (2001). "Pinhole SPECT of mice using the LumaGEM gamma camera. ." IEEE Trans. Nucl. Sci. **48**,: 830-836.
- Maddalo, G., F. Petrucci, et al. (2005). "Analytical assessment of MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry on thin histological samples. An insight in proteome investigation." Clin Chim Acta **357**(2): 210-8.
- Mandl, S., C. Schimmelpfennig, et al. (2002). "Understanding immune cell trafficking patterns via in vivo bioluminescence imaging." J Cell Biochem Suppl **39**: 239-48.
- Masumori, N., T. Z. Thomas, et al. (2001). "A probasin-large T antigen transgenic mouse line develops prostate adenocarcinoma and neuroendocrine carcinoma with metastatic potential." Cancer Res **61**(5): 2239-49.
- Matz, M. V., K. A. Lukyanov, et al. (2002). "Family of the green fluorescent protein: journey to the end of the rainbow." Bioessays **24**(10): 953-9.
- May, T. W., R. H. Wiedmeyer, et al. (1999). "A Lead Isotope Distribution Study in Swine Tissue Using ICP-MS." Atom. Spectrosc. **20**(6): 199-211.
- McMANUS JF, M. R. (1952). "Sulfuric acid hematoxylin stain for basement membranes." Lab Invest. **1**(2):208-9.

- McNaught, K. S., C. W. Olanow, et al. (2001). "Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease." Nat Rev Neurosci **2**(8): 589-94.
- Meistermann, H., J. L. Norris, et al. (2006). "Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat." Mol Cell Proteomics **5**(10): 1876-86.
- Moroz, L. L., R. Gillette, et al. (1999). "Single-cell analyses of nitrergic neurons in simple nervous systems." J Exp Biol **202**(Pt 4): 333-41.
- Nahrendorf, M., F. A. Jaffer, et al. (2006). "Noninvasive vascular cell adhesion molecule-1 imaging identifies inflammatory activation of cells in atherosclerosis." Circulation **114**(14): 1504-11.
- Neesham, D. (2007). "Ovarian cancer screening." Aust Fam Physician **36**(3): 126-8.
- Nelson, R. W., J. R. Krone, et al. (1995). "Mass spectrometric immunoassay." Anal Chem **67**(7): 1153-8.
- Novikov, A., M. Caroff, et al. (2004). "Matrix-implanted laser desorption/ionization mass spectrometry." Anal Chem **76**(24): 7288-93.
- Ntziachristos, V., A. G. Yodh, et al. (2000). "Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2767-72.
- Pacholski, M. L. and N. Winograd (1999). "Imaging with mass spectrometry." Chem Rev **99**(10): 2977-3006.
- Palmer-Toy, D. E., B. Krastins, et al. (2005). "Efficient method for the proteomic analysis of fixed and embedded tissues." J Proteome Res **4**(6): 2404-11.
- Patel, S., R. Goodacre, et al. (2006). Characterising oral cancer tissue using MALDI MS with chemical printing. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry, Seattle, Washington.
- Pierson, J., J. L. Norris, et al. (2004). "Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry." J Proteome Res **3**(2): 289-95.
- Pogue, B. W. (1999). "Focus issue: biomedical diffuse optical tomography. ." Opt. Express **4**, 230.
- Posthumus, M. A., P. G. Kistemaker, et al. (1978). "Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules." Anal Chem **50**(7): 985-991.
- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, et al. (1992). "Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein." Gene **111**(2): 229-33.
- Rapkiewicz, A. V., V. Espina, et al. (2004). "Biomarkers of ovarian tumours." Eur J Cancer **40**(17): 2604-12.
- Rechsteiner, M. and C. P. Hill (2005). "Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors." Trends Cell Biol **15**(1): 27-33.
- Rechsteiner, M., C. Realini, et al. (2000). "The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation." Biochem J **345 Pt 1**: 1-15.
- Redeker, V., J. Y. Toullec, et al. (1998). "Combination of peptide profiling by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and immunodetection on single glands or cells." Anal Chem **70**(9): 1805-11.
- Rohner, T. C., D. Staab, et al. (2005). "MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections." Mech Ageing Dev **126**(1): 177-85.
- Rubakhin, S. S., R. W. Garden, et al. (2000). "Measuring the peptides in individual organelles with mass spectrometry." Nat Biotechnol **18**(2): 172-5.
- Rubakhin, S. S., W. T. Greenough, et al. (2003). "Spatial profiling with MALDI MS: distribution of neuropeptides within single neurons." Anal Chem **75**(20): 5374-80.

- Rubakhin, S. S., J. C. Jurchen, et al. (2005). "Imaging mass spectrometry: fundamentals and applications to drug discovery." Drug Discov Today **10**(12): 823-37.
- Rujoi, M., R. Estrada, et al. (2004). "In situ MALDI-TOF MS regional analysis of neutral phospholipids in lens tissue." Anal Chem **76**(6): 1657-63.
- Rumpel, L., Scott, Neubert, Pfizer Global Research & Development, (2006 Seattle). "ASMS June 2006, Seattle."
- Salzano, A. M. and M. Crescenzi (2005). "Mass spectrometry for protein identification and the study of post translational modifications." Ann Ist Super Sanita **41**(4): 443-50.
- Schneider, J. E., S. D. Bamforth, et al. (2003). "High-resolution, high-throughput magnetic resonance imaging of mouse embryonic paragraph sign anatomy using a fast gradient-echo sequence." MAGMA **16**(1): 43-51.
- Schwamborn, K., R. C. Krieg, et al. (2007). "Identifying prostate carcinoma by MALDI-Imaging." Int J Mol Med **20**(2): 155-9.
- Schwartz, S. A., M. L. Reyzer, et al. (2003). "Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation." J Mass Spectrom **38**(7): 699-708.
- Schwartz, S. A., R. J. Weil, et al. (2004). "Protein profiling in brain tumors using mass spectrometry: feasibility of a new technique for the analysis of protein expression." Clin Cancer Res **10**(3): 981-7.
- Sharma, A. and U. Menon (2006). "Screening for gynaecological cancers." Eur J Surg Oncol **32**(8): 818-24.
- Shimma, S., Y. Sugiura, et al. (2007). "MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **855**(1): 98-103.
- Shults, C. W., R. Haas, et al. (2004). "Measuring the effects of therapy in Parkinson disease." Jama **291**(20): 2430-1; author reply 2431.
- Siegel, A. M., Marota, J. J. A. & Boas, D. A. (1999). "Design and evaluation of a continuous-wave diffuse optical tomography system." Opt. Express **4**: 287-298.
- Skold, K., M. Svensson, et al. (2006). "Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse." J Proteome Res **5**(2): 262-9.
- Smith, A. M., X. Gao, et al. (2004). "Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging." Photochem Photobiol **80**(3): 377-85.
- Solassol, J., W. Jacot, et al. (2006). "Clinical proteomics and mass spectrometry profiling for cancer detection." Expert Rev Proteomics **3**(3): 311-20.
- Spengler, B. and M. Hubert (2002). "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 **13**(6): 735-48.
- Stephens, R., K. Traul, et al. (1975). "Improved recognition and quantitation technique for oncornaviruses." J Clin Microbiol **1**(2): 225-33.
- Stockle, R., P. Setz, et al. (2001). "Nanoscale atmospheric pressure laser ablation-mass spectrometry." Anal Chem **73**(7): 1399-402.
- Stoeckli, M., P. Chaurand, et al. (2001). "Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues." Nat Med **7**(4): 493-6.
- Stoeckli, M., T. B. Farmer, et al. (1999). "Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument." J Am Soc Mass Spectrom **10**(1): 67-71.
- Stoeckli, M., D. Staab, et al. (2002). "Molecular imaging of amyloid beta peptides in mouse brain sections using mass spectrometry." Anal Biochem **311**(1): 33-9.

- Szymczak, W. and K. Wittmaack (2002). "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 **16**(21): 2025-33.
- Takats, Z., I. Cotte-Rodriguez, et al. (2005). "Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry." Chem Commun (Camb)(15): 1950-2.
- Takats, Z., M. Katona, et al. (2006). Jet Desorption Ionization - A new ionization method for tissue analysis. 54th ASMS Conference on Mass Spectrometry Seattle, Washington.
- Takats, Z., J. M. Wiseman, et al. (2005). "Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology." J Mass Spectrom **40**(10): 1261-75.
- Takats, Z., J. M. Wiseman, et al. (2004). "Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization." Science **306**(5695): 471-3.
- Talaty, N., Z. Takats, et al. (2005). "Rapid in situ detection of alkaloids in plant tissue under ambient conditions using desorption electrospray ionization." Analyst **130**(12): 1624-33.
- Tanaka, K., H. Waki, et al. (1988). "Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry." Rapid Commun. Mass Spectrom. **2**: 151-153.
- Tempez, A., M. Ugarov, et al. (2005). "Matrix implanted laser desorption ionization (MILDI) combined with ion mobility-mass spectrometry for bio-surface analysis." J Proteome Res **4**(2): 540-5.
- Todd, P. J., T. G. Schaaff, et al. (2001). "Organic ion imaging of biological tissue with secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization." J Mass Spectrom **36**(4): 355-69.
- Torigian, D. A., S. S. Huang, et al. (2007). "Functional imaging of cancer with emphasis on molecular techniques." CA Cancer J Clin **57**(4): 206-24.
- Touboul, D., F. Kollmer, et al. (2005). "Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source." J Am Soc Mass Spectrom **16**(10): 1608-18.
- Touboul, D., H. Piednoel, et al. (2004). "Changes of phospholipid composition within the dystrophic muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging." Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng) **10**(5): 657-64.
- Townes, J. A., A. K. White, et al. (1999). "Mechanism for Increased Yield with SF₅⁺ Projectiles in Organic SIMS: The Substrate Effect." J. Phys. Chem. **103**: 4587.
- Troendle, F. J. R., C. D.; Yost, R. A. (1999). "Detection of pharmaceutical compounds in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization and laser desorption/chemical ionization tandem mass spectrometry with a quadrupole ion trap." Journal of the American Society for Mass Spectrometry **10**(12): 1315-1321.
- Ulusoy, S., O. Akbayir, et al. (2007). "The risk of malignancy index in discrimination of adnexal masses." Int J Gynaecol Obstet **96**(3): 186-91.
- Van Berkel, G. J., M. J. Ford, et al. (2005). "Thin-layer chromatography and mass spectrometry coupled using desorption electrospray ionization." Anal Chem **77**(5): 1207-15.
- Van Vaeck, L., A. Adriaens, et al. (1999). Mass Spectrom. Rev. **18**(1-47).
- Van Vaeck, L., K. Poels, et al. (1997). "Laser microprobe mass spectrometry: principle and applications in biology and medicine." Cell Biol Int **21**(10): 635-48.

- Van Vaeck, L., P. Van Espen, et al. (1988). "In-depth limitation of the Lamma 500 for the in situ localization of organic compounds in biological embedded tissue samples." Bioméd Environ Mass Spectrom **16**(1-12): 113-9.
- Verbueken, A. H., F. J. Bruynseels, et al. (1985). "Laser microprobe mass analysis: a review of applications in the life sciences." Bioméd Mass Spectrom **12**(9): 438-63.
- Verbueken, A. H., F. Van de Vyver, et al. (1987). "Applications of laser microprobe mass analysis in medicine." Crit Rev Clin Lab Sci **24**(4): 263-85.
- Ward, K. M., A. H. Aletras, et al. (2000). "A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST)." J Magn Reson **143**(1): 79-87.
- Weibel, D., S. Wong, et al. (2003). "A C60 primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics." Anal Chem **75**(7): 1754-64.
- Weissleder, R. (2001). "A clearer vision for in vivo imaging." Nat Biotechnol **19**(4): 316-7.
- Weissleder, R., G. Elizondo, et al. (1990). "Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging." Radiology **175**(2): 489-93.
- Weissleder, R., C. H. Tung, et al. (1999). "In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes." Nat Biotechnol **17**(4): 375-8.
- Whitaker, M. (2000). "Fluorescent tags of protein function in living cells." Bioessays **22**(2): 180-7.
- Williams, J. P., V. J. Patel, et al. (2006). "The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin." Rapid Commun Mass Spectrom **20**(9): 1447-56.
- Williams, T. I., K. L. Toups, et al. (2007). "Epithelial ovarian cancer: disease etiology, treatment, detection, and investigational gene, metabolite, and protein biomarkers." J Proteome Res **6**(8): 2936-62.
- Wiseman, J. M., S. M. Puolitaival, et al. (2005). "Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization." Angew Chem Int Ed Engl **44**(43): 7094-7.
- Wisztorski, M., R. Lemaire, et al. (2007). "[MALDI imaging: a new technology to discover and validate new biomarkers]." Med Sci (Paris) **23 Spec No 1**: 31-6.
- Wisztorski M., L. R., Stauber J., Salzert M., Fournier I. "New developments in MALDI imaging for Pathological proteomic studies." Current Pharmaceutical Design.
- Wolff, S. D. and R. S. Balaban (1989). "Magnetization transfer contrast (MTC) and tissue water proton relaxation in vivo." Magn Reson Med **10**(1): 135-44.
- Xie, L., B. J. Xu, et al. (2005). "Genomic and proteomic analysis of mammary tumors arising in transgenic mice." J Proteome Res **4**(6): 2088-98.
- Xu, X., M. Soutto, et al. (2007). "Imaging protein interactions with bioluminescence resonance energy transfer (BRET) in plant and mammalian cells and tissues." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10264-9.
- Xun, Z., R. A. Sowell, et al. (2007). "Protein Expression in a Drosophila Model of Parkinson's Disease." J. Proteome Res. **6**(1): 348-357.
- Zaccolo, M. (2004). "Use of chimeric fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer to monitor cellular responses." Circ Res **94**(7): 866-73.
- Zenobi, R. and V. V. Deckert (2000). "Scanning Near-Field Optical Microscopy and Spectroscopy as a Tool for Chemical Analysis." Angew Chem Int Ed Engl **39**(10): 1746-1756.
- Zhang, H., X. Cheng, et al. (2006). "A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum." Nat Med **12**(4): 473-7.

Zhang, S., M. Merritt, et al. (2003). "PARACEST agents: modulating MRI contrast via water proton exchange." Acc Chem Res **36**(10): 783-90.

