



HAL
open science

Nouveaux développements pour l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Applications aux problèmes biologiques et à la recherche de biomarqueurs dans le cancer de l'ovaire.

R. Lemaire

► **To cite this version:**

R. Lemaire. Nouveaux développements pour l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Applications aux problèmes biologiques et à la recherche de biomarqueurs dans le cancer de l'ovaire.. Sciences pharmaceutiques. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I; Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT : . tel-00167303

HAL Id: tel-00167303

<https://theses.hal.science/tel-00167303>

Submitted on 18 Aug 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité : Systèmes bio-organiques / Spectrochimie

Présentée par

M. Rémi LEMAIRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Paris 6

**Nouveaux développements pour l'imagerie par
spectrométrie de masse MALDI.
Applications aux problèmes biologiques et à la recherche de
biomarqueurs dans le cancer de l'ovaire.**

Thèse dirigée par :

TABET Jean-Claude / SALZET Michel / FOURNIER Isabelle

Soutenue le 29 septembre 2006

Devant le jury composé de :

M. Edwin De Pauw	Rapporteur
M. Olivier Laprévotte	Rapporteur
M. Mickael Karas	Examineur
M. Jean Delettre	Examineur
M. Andréas Tholey	Membre invité
M. Michel Salzet	Membre invité
M. Jean-Claude Tabet	Directeur de thèse
Mme Isabelle Fournier	Directeur de thèse

Remerciements

Le travail de ce mémoire a été réalisé sous la direction d'Isabelle Fournier, des Professeurs Michel Salzet et Jean-Claude Tabet. Je leur exprime mes plus sincères remerciements pour leur enthousiasme, pour le temps qu'ils ont consacré à mes recherches et pour les bons moments que j'ai passés à leurs cotés.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le Professeur Edwin De Pauw et Monsieur le Directeur Olivier Laprèvote pour avoir accepté si gentiment d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens à remercier Messieurs Mickael Karas, Jean Delettre et Andreas Tholey qui me font également l'honneur de juger mon travail.

Ces recherches et réflexions sont aussi le fruit de nombreuses collaborations scientifiques, et je souhaite, à ce titre, remercier les Docteurs Lucot, Collinet et Vinatier de l'hôpital Jeanne de Flandre (Lille) pour leur implication dans le projet sur le cancer de l'ovaire, le Docteur Klaus Dreisewerd de l'université de Francfort (Allemagne) dans le cadre du sujet sur le TOF orthogonal, le Docteur Robert Day de l'Université de Sherbrooke (Canada) pour ces conseils dans plusieurs projets, les membres de la société Eurogentec avec M Deschamps, G Proess et I Rudlof (Belgique) sans qui le projet Tag-Mass ne serait probablement pas aussi abouti, le Docteur Amina Woods (USA) pour ces précieux conseils et sa gentillesse et enfin les membres de la société Bruker Daltonics France (Pierre Olivier Schmidt, Marc Angotti et Yann Hebert) pour leur soutien dans ces projets.

Mes remerciements vont aussi à tout le personnel du laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides de l'Université de Lille (Jacopo, Françoise, Christophe, Pierre Eric, Virginie, Annie, Christelle, Mathilde, Céline, David, Aurélie, Joel et Dominique), et de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Université Pierre et Marie Curie (Françoise Quétier, Françoise Fournier, Carlos Afonso, et tous les étudiants du laboratoire) pour leur aide et leur accueil, leur gentillesse et pour l'atmosphère cordiale dans laquelle j'ai travaillé.

Une pensée va aussi à Nadia Benlarbi, Olivia Jardin Mathé, Maxence Wisztorski, et Johnathan Stauber, membres de l'équipe d'imagerie avec qui j'ai partagé cette aventure...

Je remercie enfin Laurence Garnier, Franziska Reeder, Maryline Gasthuys et Dominique Jullien pour leur soutien ainsi que toute l'équipe L'Oreal de Chevilly Larue pour leur accueil.

A Natalia, pour son courage, pour ce qu'elle m'a apporté et m'apporte encore...
A mes parents et ma famille pour leur soutien inébranlable tout au long de mon parcours.
Mes vieux potes (Francis, Yohnasse, Fil, VR, JB, Mat, Greg, Val, Tarik, Vince, JP, Nico, Fabien, Fred, Olivier, et leurs compagnes !) sans oublier Elisabeth et Carlos, Frédo et Flo, Raynald et Florence pour leur présence pendant toutes ces années...
Ce travail est là aussi grâce à eux.

Résumé

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI est une technique jeune dotée d'un très fort potentiel ; elle est capable de nous donner la localisation de près d'une centaine de composés sur un tissu en une seule analyse.

Appliquée dans le domaine de la protéomique ou du biomédical, cette dernière a déjà permis de repérer de nombreux biomarqueurs régulés dans des cas de cancers ou dans de nombreuses autres pathologies. D'autres applications comme l'étude de médicaments ou de lipides ont également été décrites avec succès en utilisant l'imagerie ou le « profiling » c'est-à-dire l'acquisition directement sur le tissu par le spectromètre de masse MALDI

Cependant comme toute echnologie récente, il est nécessaire de repousser ses limites pour tenter d'améliorer certains points et de valoriser cette stratégie.

Le but de mon travail a été de développer de nouveaux systèmes pour l'imagerie MALDI, notamment en ce qui concerne le choix de la matrice à utiliser, ou le traitement de l'échantillon en vue d'améliorer la qualité de l'acquisition. La possibilité d'analyser des tissus fixés et paraffinés conservés dans les bibliothèques des anatomopathologistes a également été étudiée, permettant d'augmenter considérablement le nombre d'échantillons analysables.

De plus, afin d'étendre le type de molécule pouvant être localisé en imagerie MALDI, nous avons développé un nouveau concept appelé Tagmass, nous permettant de réaliser des images d'acides nucléiques ou de protéines de très hautes masses moléculaires. Ce type de localisation restait inaccessible par cette technique jusqu'à présent.

Enfin, dans le cadre de l'étude du cancer de l'ovaire, nous avons utilisé l'imagerie et le profiling sur tissu afin de rechercher des biomarqueurs potentiels de cette maladie. Ce type d'information peut s'avérer crucial pour un éventuel dépistage précoce ou pour une meilleure compréhension des processus de la maladie.

Sommaire

CHAPITRE I : L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	16
1. LES SOURCES DE DESORPTION LASER, LES SOURCES MALDI ET L'IMAGERIE MALDI	16
2. L'IMAGERIE SIMS	32
3. LA SOURCE DESI.....	40
CHAPITRE II : NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS EN IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI	49
1. DEVELOPPEMENTS DE NOUVELLES MATRICES POUR L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI.....	51
• <i>Les matrices et l'analyse directe de tissus</i>	<i>51</i>
• <i>Des liquides ioniques aux matrices ioniques.....</i>	<i>52</i>
<i>PUBLICATION N°1.....</i>	<i>55</i>
• <i>Matrices ioniques en conditions préséchées.....</i>	<i>68</i>
2. ANALYSE DE TISSUS ET TRAITEMENTS DES COUPES	80
<i>PUBLICATION N°2.....</i>	<i>84</i>
3. ANALYSE DIRECTE ET IMAGERIE DE TISSUS FIXES ET PARAFFINES	97
<i>PUBLICATION N°3.....</i>	<i>98</i>
• <i>Dérivations sur tissus.....</i>	<i>115</i>
• <i>Etude sur des cerveaux de rats lésés au 6-OHDA (maladie de Parkinson) :.....</i>	<i>121</i>
4. L'IMAGERIE SPECIFIQUE PAR DETECTION INDIRECTE : LE CONCEPT TAG-MASS.....	128
<i>PUBLICATION N°4.....</i>	<i>132</i>
CHAPITRE III : APPLICATIONS AUX PROBLEMES BIOLOGIQUES : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PEPTIDIQUES DU CANCER DE L'OVAIRE	164
1. LE CANCER DE L'OVAIRE	164
2. ANALYSES D'ECHANTILLONS TUMORAUX	167
• <i>Identification d'un biomarqueur potentiel du cancer de l'ovaire : le peptide m/z 9744.....</i>	<i>175</i>
3. ETUDE DE LA PROTEINE REG α PAR APPROCHE IMMUNOLOGIQUE.	179
4. CONCLUSION	186
PARTIE EXPERIMENTALE	194
TRAVAUX COMPLEMENTAIRES	202
BIBLIOGRAPHIE.....	248
ANNEXES.....	258

Nomenclature, abréviations, définitions et acronymes

2A4M5NP : 2-amino-4-methyl-5-nitropyridine
3AQ : 3-aminoquinoline
3-APY : 3-acetylpyridine
3HPA : hydroxypicolinic acid
6-OHDA : 6 hydroxydopamine
ACN : acetonitrile
AD : analyse directe (sur tissu)
ADN : acide desoxyribonucléique
ANI : aniline
ARNm : acide ribonucleique (messenger)
CID : Collision Induced Dissociation
DAB : diaminobenzidine
DANI : N,N-dimethylaniline
DBU : 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7ene
DHB : dihydroxybenzoic acid
DIENI : N,N-diethylaniline
DNPH : dinitrophenylhydrazine
ESI : electrospray
FFPE : formalin fixed paraffin embedded tissue
HCCA : a cyano hydroxycinnamic acid
HIS : *in situ* hybridization
HPLC : high performance liquid chromatography
IHC ou ICC : immunohistochemistry
IMS : imaging mass spectrometry
IR : infrarouge
LAMMA : laser microprobe mass analysis
LC : liquid chromatography
LC/MS : liquid chromatography / mass spectrometry
LD : laser desorption
LPI : lisophosphatidylinositol
m/z : rapport masse sur charge
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
MEOH : methanol
MS/MS tandem mass spectrometry
PA : phenylenediamine
PAF : paraformaldehyde
PC : phosphatidylcholine
PI : phosphatidylinositol
PIP : piperidine
PlsEtn : plasmenylethanolamine
PNA : p-nitroaniline
PSD : post source decay
PtdEtn ou PE : phosphatidylethanolamine
PY : pyridine
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
SA : sinapinic acid
SIMS : secondary ion mass spectrometry
TFA : trifluoro acetic acid
TOF : temps de vol
TRIS-HCl : Chlorhydrate de tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV : ultra violet

INTRODUCTION

Au 2^e siècle après JC, des philosophes se sont posé de nombreuses questions concernant la réalité des choses. Qu'existe-t'il réellement ? De quoi sommes-nous sûrs ? Que peut-on voir avec certitude alors que nos yeux ne nous reflètent peut-être pas la réalité ? Pour ces philosophes, tout pouvait être improbable à partir du moment où les arguments avancés étaient pertinents : le scepticisme était né. Ce courant philosophique, responsable de bien des excès, n'a heureusement pas été le dogme incontournable des scientifiques qui l'ont suivi, et notamment en ce qui concerne la vue et l'observation. Nous en retiendrons cependant que tout peut être possible si les arguments sont viables.

Ainsi, depuis des siècles, l'homme débordant de curiosité s'est intéressé à l'étude des phénomènes qui l'entourent, faisant confiance à l'un des ses cinq sens : la vue.

De grands scientifiques ont découvert, et ce uniquement par l'observation, des phénomènes ou des résultats qui sont toujours valables à l'heure actuelle.

Pour n'en citer que quelques uns, Lavoisier découvrit au 18^{ème} siècle qu'un gaz léger, appelé plus tard hydrogène, se dégageait dans l'air lorsque de l'eau était jetée sur un fer chauffé au rouge. Un exemple plus marquant revient à Mendeleïev, qui réalisa la classification périodique des éléments uniquement par l'observation de réactions entre des composés.

Et qu'en est-il de la première étude de planètes à l'aide d'une lunette modifiée par Galilée ? Cette lunette était au départ un petit microscope destiné à voir « le plus petit », et il fut détourné avec succès pour visualiser ce qui est « le plus grand ».

Cette anecdote rappelle que l'observation des phénomènes est réalisable lorsque le scientifique possède les bons outils, et que certaines découvertes ne peuvent être faites que dans ces conditions.

De nos jours, la simple observation à l'œil nu ne suffit généralement plus, et la nécessité de développer de nouvelles techniques d'observations est primordiale. Ainsi, une part importante de la recherche est destinée au développement de nouvelles techniques permettant l'étude de molécules, de réactions, voire d'organes entiers. Dans le domaine médical, des techniques telles que l'échographie ou le scanner sont régulièrement utilisées pour du diagnostic ou de la prévention.

Une troisième technique appelée IRM (prix Nobel de médecine attribué à Paul C Lauterbur et Peter Mansfield en 2003), basée sur la théorie de la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), permet également ce type d'approche (Figure 1).

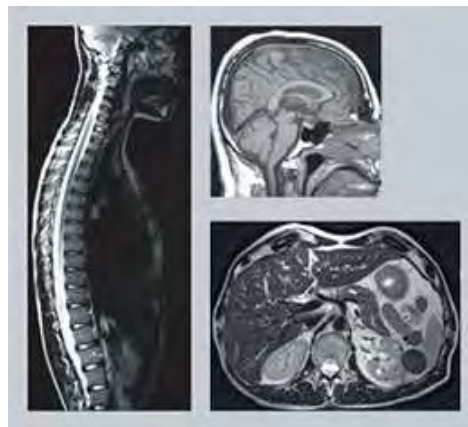


Figure 1 : Exemple d'imagerie médicale utilisée de nos jours : l'IRM.

La RMN s'est vue attribuer en 2002 le prix Nobel de chimie en même temps que deux autres techniques analytiques du domaine de la spectrométrie de masse : l'électrospray (ESI) et la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) qui nous intéressera tout particulièrement par la suite. Ce prix Nobel est aussi la récompense pour de nombreux développements réalisés en spectrométrie de masse depuis de nombreuses années. Les progrès technologiques visibles notamment par la miniaturisation, la création de nouveaux analyseurs et de nouvelles sources de production d'ions ont amené ce domaine à de plus en plus de performance, élargissant ainsi son champ d'application. Ainsi, de l'impact électronique principalement utilisé pour des molécules organiques, L'ESI et le MALDI ont définitivement ouvert l'analyse aux molécules polaires et aux biomolécules telles que : lipides, sucres, acides nucléiques, peptides et protéines, reliant ainsi la spectrométrie de masse au domaine biologique.

Depuis quelques années, cette collaboration a pris une nouvelle ampleur avec l'explosion des études protéomiques, donnant lieu à de nombreuses études et même des congrès spécialisés dans ce domaine. Ces recherches représentent un domaine vaste de l'analyse avec l'étude comparative entre deux états physiologiques d'organes ou de cellules, l'identification de composés par MS/MS, la caractérisation des protéines (étude des protéines et de leur(s) ligand(s), phosphorylations/déphosphorylations)... Ces travaux, notamment appliqués à l'étude sur les cancers, sont devenus grâce à leurs complémentarités avec d'autres techniques déjà existantes de génomiques ou de transcriptomiques, des outils particulièrement puissants pour une approche globale de l'étude de l'altération du génome (Table 1).

Platform	What we can learn	What is detected	Tolls used for analysis
Genome	The hereditary components to cancer, as well as genome alterations in somatic cells that lead to cancer	Chromosome structural changes; gene copy-number changes; gene rearrangements; mutations/polymorphisms; methylation changes	DNA sequencing; cytogenetics; CGH; array CGH; SNP analysis; RLGS
Transcriptome	Changes in gene expression that are associated with cancer	Changes in RNA abundance; alterations in alternative splicing	Differential-display analysis; SAGE; DNA microarray analysis; PCR- and non-PCR-based gene-expression assays
Proteome	How proteins are modified or how their levels change in tumours	Protein levels; post-translational modifications; localization; protein-protein interactions; enzymatic activity	Sample enrichment strategies (fractionation, protein tagging); separation-based profiling (2D gels, MS, LC, LC-MS); non-separation-based strategies (protein microarrays, direct MS analysis); protein-detection strategies (immunohistochemistry, immunofluorescence)

2D, two dimensional; CGH, comparative genomic hybridization; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; PCR, polymerase chain reaction; RLGS, restriction landmark genome scanning; SAGE, serial analysis of gene expression; SNP, single nucleotide polymorphism.

Table 1 : Stratégies de « profiling » utilisables pour la recherche d’altération du génome (Hanash, *Nature Reviews*, 2004)

Certaines techniques telles que « immunohistochimie » et « immunofluorescence » sont connues pour l’observation et l’étude des protéines. Ces techniques biochimiques puissantes, permettent la visualisation de la répartition d’une protéine au sein d’un tissu, démontrant ainsi leurs utilités depuis de très nombreuses années. Cependant, ces techniques ont cependant plusieurs inconvénients ; dans les deux cas, elles requièrent une bonne connaissance au préalable de la molécule à analyser afin d’obtenir des anticorps spécifiques de cet antigène. Cette étude est parfois longue, car l’obtention de la protéine est parfois délicate et fastidieuse, nécessitant des étapes d’extraction et de purification bien adaptées avec des rendements suffisants pour sa caractérisation complète.

Dans le cas de l’immunohistochimie classique, la détection de la protéine est basée sur la formation d’un polymère de haute masse moléculaire, insoluble dans l’eau, formé à partir de réactifs tels que diaminobenzidine (DAB) ou chloronaphtol. Une fois la polymérisation radicalaire réalisée, le polymère est visible au microscope par un marquage brun sur le tissu (Figure 2).

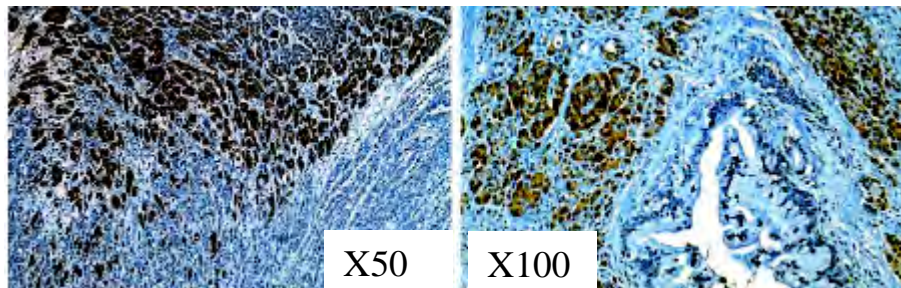


Figure 2. Détection de la protéineHIP/PAP1 dans des tissus pancréatiques par immunohistochimie (révélation au DAB) (D'après Rosty et al, *Cancer Research*, **2002**).

Pour la détection par fluorescence, beaucoup plus sensible que le DAB, un des points cruciaux est d'éliminer la fluorescence spontanée de certains composés. Ainsi, la colocalisation de plusieurs protéines est impossible par la détection au DAB et délicate par fluorescence nécessitant l'émission à plusieurs longueurs d'onde. Cette dernière reste surtout limitée par le nombre de fluorophore existant. Cependant, elle reste une technique très sensible puisqu'elle permet la détection de peptides/protéines au niveau subcellulaire à des concentrations de l'ordre de l'atomole. Le double marquage est une information cruciale pour l'étude du protéome et des interactions protéines/protéines ; les liaisons récepteur/ligands, les cascades enzymatiques, les localisations pro-protéines/peptides qui représentent des processus biologiques qu'il est important d'observer, d'étudier et de visualiser pour répondre à d'éventuelles pathologies, troubles et dérèglements.

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

La complexité de l'échantillon doit également être prise en compte : les composés peuvent être différents du point de vue de leur composition chimique, de leur taille (de quelques dizaines de daltons à plusieurs centaines de milliers) et bien sûr de leur structure. De plus, une variabilité peut également exister au sein d'un type de molécule ; c'est le cas des peptides et des protéines qui peuvent subir des modifications post-traductionnelles, des changements de conformations ou des hydrolyses enzymatiques (maturation de peptides).

Même si cette technique révolutionnaire n'existe pas encore, l'imagerie par spectrométrie de masse est capable de satisfaire un grand nombre de ces critères. Curieusement, l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) pour l'étude de protéines ou de

tout autre composé d'intérêt biologique peut alors se rapprocher de l'IRM dans l'observation des organes ou de tissus, hormis le fait que cette technique est invasive et fournit des informations moléculaires non accessibles par l'IRM.

Cette technique est basée sur la détection de la masse moléculaire des composés et celle-ci ne dépend que de la composition atomique de la molécule. Ainsi, l'IMS et l'analyse directe sur coupes permet de repérer simultanément des centaines de composés connus ou inconnus en une seule analyse, ces derniers pouvant être identifiés dans un premier temps par la comparaison de la masse détectée et d'une masse de référence.

Une expérience d'imagerie se déroule généralement de la manière suivante (Figure 3) : l'organe, la cellule ou le groupe de cellules sont prélevés, et des coupes de 10-20 μ m sont réalisées à l'aide d'un cryostat ou d'un microtome. Ces coupes sont déposées sur un support compatible avec l'analyse (plaque conductrice) puis la coupe peut ensuite être analysée par spectrométrie de masse. Dans certains cas, un composé doit être rajouté juste avant l'analyse pour réussir l'acquisition (MALDI).

L'analyse en imagerie est basée sur la possibilité de réaliser un profil ou « profiling » point par point des composés contenus dans le tissu. Cela implique l'utilisation d'un logiciel ou d'une combinaison de logiciels, permettant de réaliser de manière automatique le déplacement de l'échantillon, l'acquisition des spectres, et la sauvegarde des données. Ainsi, ces logiciels doivent être capables d'enregistrer les coordonnées (x ; y) de chaque acquisition sur la coupe, puis de reconstruire l'image obtenue. Cela sous-entend évidemment que la position relative des ions est conservée durant l'analyse.

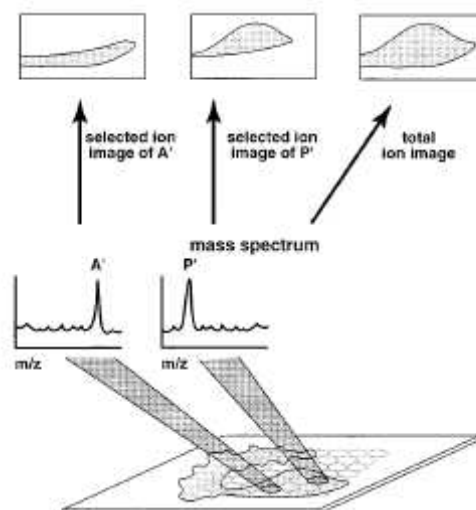


Figure 3. Représentation du concept d'imagerie par spectrométrie de masse pour 2 composés A' et P' détectés sur une coupe de tissu. (Caprioli et al, *Anal. Chem.* **1997**)

Cette technologie repose néanmoins sur plusieurs contraintes ; elle nécessite de travailler sur un échantillon complexe et qui de plus est solide, tout en conservant une zone d'analyse bien définie. Les composés contenus dans le tissu doivent être transférés en phase gazeuse, ionisés, (source), puis séparés avec un analyseur (piège, quadripôle (Q), temps de vol (TOF), FTMS...), avant leur détection par un détecteur approprié. Cela implique, qu'à l'inverse d'autres techniques comme l'IRM, les composés sont extraits de la surface à analyser.

De plus, ce transfert des analytes solides en phase gazeuse ne peut être réalisé que par quelques sources utilisées en spectrométrie de masse.

La première possibilité utilise des sources d'irradiation laser ou des ions de hautes énergies pour désorber les analytes de la surface du tissu. Il s'agit des sources de Désorption Laser (LD), des sources SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) ou des sources MALDI.

La deuxième approche repose sur la technique d'ionisation par électrospray, dans laquelle l'analyte est introduit en phase gazeuse et où le composé est ionisé durant l'évaporation d'un aérosol de solvant hautement chargé (contenant les composés à analyser). Il s'agit des sources DESI (DESorption Ionization by electrospray) récemment introduites par G. Cooks, et dont les premières publications en « profiling » sur tissus appellent un avenir prometteur pour l'imagerie (Cooks et al, *Science*, **2006**).

Il est évident qu'un grand nombre de composés majoritaires est détecté par ces techniques ; néanmoins, dans le cas par exemple des protéines, la proportion de ces dernières est plus faible en pourcentage relatif, comparée aux techniques de protéomiques classiques qui extraient une quantité très importante de protéines à partir des tissus. Un des points importants pour cette technique sera donc de s'affranchir de ces protéines majoritaires afin d'atteindre le « sous protéome » responsable des activités biologiques.

L'imagerie par spectrométrie de masse est encore jeune et de nombreux développements technologiques sont encore à réaliser ; l'élément clé reste la préparation de l'échantillon variable en fonction de la conservation du tissu (plusieurs jours ou années), de sa nature (fixé, congelé) ou de la molécule à détecter (ARN, protéines, peptides, lipides...)

Ainsi, le champ d'application de cette technologie est important (Figure 4) et s'ouvre de plus en plus sur les domaines cliniques et pharmacologiques en parallèle d'analyses en lipidomique, protéomique classique, ou protéomique fonctionnelle. On peut penser que cette technologie formera peut être un jour la protéomique pathologique.

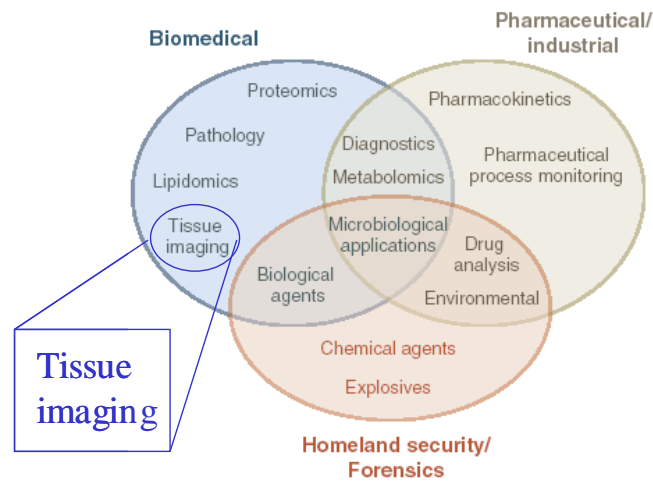


Figure 4 : Champ d'applications possible de l'IMS et le profiling sur tissus (D'après Cooks et al, *Science*, **2006**).

L'objectif de ma thèse porte sur l'amélioration de la technique d'imagerie MALDI. Les différents points qui seront abordés se situent dans la préparation de l'échantillon, (traitement des tissus, matrices MALDI, détection de nouveaux composés sur coupe...) tout en se basant sur des applications biologiques à vocation clinique que sont le cancer de l'ovaire et la maladie de Parkinson.

Chapitre I

L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

CHAPITRE I : L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

1. Les sources de désorption laser, les sources MALDI et l'imagerie MALDI

Les sources de désorption laser ont été un outil d'imagerie particulièrement important au travers d'appareils tels que le LAMMA (LAsEr Microprobe mass Analysis) utilisé pendant près d'une trentaine d'années. Cette technique qui utilise un laser IR CO₂ a même permis d'obtenir des images moléculaires de composés biologiques provenant de tissus. Le processus de désorption cause cependant de nombreuses fragmentations et cette approche s'avère donc limitée en terme de gamme de masse (environ 300 Da). Cette technique reste extrêmement utile pour l'étude des compositions élémentaires telles que les transitions de métaux dans les tissus tout en ayant une bonne sensibilité. La résolution spatiale de cette technique peut s'approcher de 500nm lorsque le laser est particulièrement bien focalisé.

Plusieurs études biomédicales ont été réalisées avec succès par désorption laser (LDI). On y trouve par exemple l'imagerie d'aluminium et de fer chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Good, et coll ; *Ann, Neurol*, **1992**), ou l'étude de la réponse bactérienne à certaines drogues en suivant les cations intracellulaires de cellules uniques (Seydel et coll, *Biomed. Environ. Mass Spectrom*, **1988**).

Par cette limitation de gamme de masse pour la technique LDI et le besoin de plus en plus insistant d'analyser des bio-molécules de grande taille, plusieurs équipes se sont intéressées à développer des sources plus performantes.

Introduite dans la deuxième moitié des années 80 par Karas/Hillenkamp, la source MALDI est devenue l'une des stratégies les plus puissantes pour l'ionisation désorption de composés biologiques sous leur forme intacte.

Cette technique vient en continuité du LDI où l'on irradie cette fois-ci, un échantillon solide avec un laser. L'analyte est mélangé à une solution de petites molécules organiques appelées matrice, possédant une forte absorption à la longueur d'onde du laser (généralement un laser azote émettant dans l'UV à 337 nm). Le mélange de la matrice à forte proportion par rapport à l'analyte, permet d'obtenir après évaporation du solvant des cristaux de matrice où sont inclus en partie les analytes. L'irradiation des cristaux par le faisceau laser conduit à l'absorption des photons par les molécules de matrice, conduisant à l'excitation électronique de celles-ci. La relaxation de l'énergie au sein du solide conduit à une éjection de matière (désorption des molécules de matrice) entraînant avec elles les molécules d'analytes (Figure I.1.1). Cette

éjection produit un jet moléculaire gazeux appelé plumeau, principalement constitué de molécules neutres, et dans une moindre mesure des ions qui peuvent être analysés.

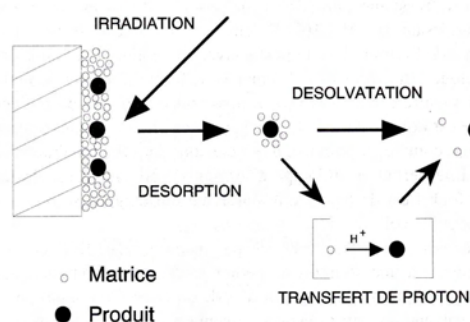


Figure I.1.1 : Principe de l'ionisation MALDI (De Hoffman et al, Dunod, 1999).

Même si le processus de formation des ions n'est encore pas bien connu, il semblerait que les molécules d'analytes soient ionisées en phase gazeuse par transfert intramoléculaire d'un proton ou d'un cation depuis la matrice au sein des agrégats produits.

La matrice est ainsi l'élément primordial de ce système ; suivant le type de matrice utilisé, différentes classes de molécules peuvent être analysées avec des résolutions, des seuils de sensibilités et des fragmentations différents. (Tableau I.1.1)

Matrice	Structure	Utilisation	Références
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA)		Protéines, peptides	Beavis <i>et al.</i> , 1992
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)		Protéines, peptides, oligosaccharides	Strupat <i>et al.</i> , 1991
Acide 3,5-diméthoxybenzoïque ou acide sinapinique (SA)		Protéines, polymères	Beavis et Chait, 1989
6-aza-2-thiothymine (ATT)		Oligonucléotides, protéines	Lecchi <i>et al.</i> , 1995
Acide 3-hydroxypicolinique (HPA)		Oligonucléotides, glycoprotéines	Wu <i>et al.</i> , 1993 Karas <i>et al.</i> , 1995

Tableau I.1.1 : Matrices les plus utilisées pour l'analyse de biomolécules en MALDI.

De nombreuses autres matrices ont été découvertes et sont utilisables en MALDI suivant l'analyte considéré ; de nombreux développements et publications sont toujours en cours dans ces domaines afin d'augmenter les performances en terme de résolution, intensité du signal, ou contaminants.

Parmi ceux-ci, nous pouvons citer par exemple les matrices basiques et notamment la 2-amino-5-nitropyridine testée par Fitzgerald et al (*Anal. Chem.* **1993**) pour la détection de protéines et d'oligonucléotides ou de composés pouvant être sensibles à l'acidité des matrices conventionnelles, la 3,4 diaminobenzophenone (DABP), moins sensible à la présence de contaminants tels que urée ou guanidine (Xu et al, *Anal. Chem.* **2006**) ou encore le système « sol-gel » (Lin et al, *Anal. Chem* **2002**) qui est un polymère formé à partir de la matrice DHB elle-même, et qui permet de diminuer les limites de détection tout en obtenant un dépôt plus homogène (Figure I.1.2).

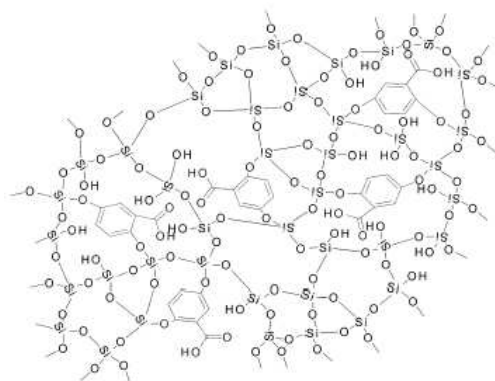


Figure I.1.2 : Exemple d'une structure « sol-gel » formée par polycondensation entre le DHB et le TEOS. (Lin et al, *Anal. Chem* **2002**).

Des matrices dites « ioniques » issues de la famille des « liquides ioniques » peuvent elles aussi améliorer les signaux en terme d'intensité et de sensibilité ; elles sont généralement formées à partir de la réaction entre une matrice MALDI acide et une base organique (Armstrong et al, *Anal. Chem* **2001**).

Dans certains cas, les résultats des analyses MALDI du fait des caractéristiques de l'échantillon, peuvent aussi être améliorés grâce à l'utilisation d'un deuxième analyte rajouté avant l'étape de cristallisation. Pour l'analyse des acides nucléiques, ce « Co-analyte » s'avère être primordial du fait d'une part, de la fragilité en phase gazeuse des acide nucléiques qui fragmentent facilement, et d'autre part de la présence de nombreux sels résiduels accrochés aux terminaisons phosphate réduisant considérablement la résolution. Dans ce cas, le citrate

de diammonium ou l'acétate d'ammonium, permettent de stabiliser la structure des oligonucléotides grâce au citrate (diminution des fragmentations) alors que les ions ammoniums, en prenant la place des sels résiduels, permettent d'améliorer sensiblement la résolution en diminuant les adduits Na^+ et K^+ . (Nordhoff et al, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**). Avec une autre matrice, l'ATT, l'utilisation de spermine comme co-analyte stabilise les acides nucléiques en s'intercalant dans le complexe, permettant ainsi une amélioration des signaux (Asara et al, *Anal. Chem* **1999**).

Parfois, un deuxième co-analyte est lui-même rajouté à un mélange matrice/co-analyte 1 ; c'est le cas avec la matrice 3HPA, où l'ajout d'acide pyrazine carboxylique (PCA) dans un mélange 3HPA/ diammonium citrate permet d'améliorer encore la résolution et le rapport signal/bruit (Zhou et al, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**). L'ajout de fucose ou de fructose comme second co-analyte peut réduire l'excès d'énergie transmis par le laser aux acides nucléiques et améliorer ainsi la résolution. (Shahgholi et al, *Nucleic Acids Research*, **2001**, Distler et al, *Anal. Chem* **1999**).

Enfin, des mélanges de matrices peuvent être également envisagés ; l'une est la réalisation du super DHB (s-DHB) (Karas et al, *Org. Mass Spectrom.* **1993**) mélange de matrice DHB et d'acide 2-hydroxy-5-methoxy-benzoïque permettant l'analyse de protéines de haute masse. Des mélanges DHB et HCCA ont également été décrits pour augmenter le nombre de signaux détectés et l'identification de protéines après digestion à la trypsine (Laugesen et al, *J Am Soc Mass Spectrom.* **2003**).

Ces quelques exemples illustrent parfaitement le rôle de la préparation d'échantillon dans cette technique analytique. Dans les bonnes conditions, le MALDI est particulièrement bien adapté à l'analyse de nombreuses biomolécules, de plus les ions formés sont principalement mono-chargés ce qui facilite grandement l'interprétation des spectres. Le MALDI est moins sensible à la présence de sels et contaminants que l'ESI, ce qui fait de lui un instrument très utile pour des études d'échantillons très riches en sel comme les tissus biologiques.

Dans le cas de l'analyse directe de tissus congelés, l'acquisition en MALDI peut être résumée de la façon suivante (Figure I.1.3) :

- ✓ l'organe d'intérêt est d'abord prélevé (Etape 1) et des coupes congelées de quelques microns (5 à 20 μm) sont réalisées à l'aide d'un cryostat (Etape 2).
- ✓ Celles-ci sont déposées sur un support conducteur (plaque d'analyse MALDI, support conducteur transparent i.e. ITO). (Etape 3)

- ✓ La matrice est ensuite déposée sur la coupe et après cristallisation (Etape 4), l'échantillon peut être introduit dans le spectromètre de masse (Etape 5) et l'acquisition réalisée manuellement en différents points pour obtenir un profil des zones d'intérêt de la coupe par analyse directe (« profiling ») (Etape 6).
- ✓ Une expérience d'imagerie peut aussi être réalisée en mode automatique en utilisant un ou des logiciels adéquats pour l'acquisition point par point des spectres et la reconstruction d'images.

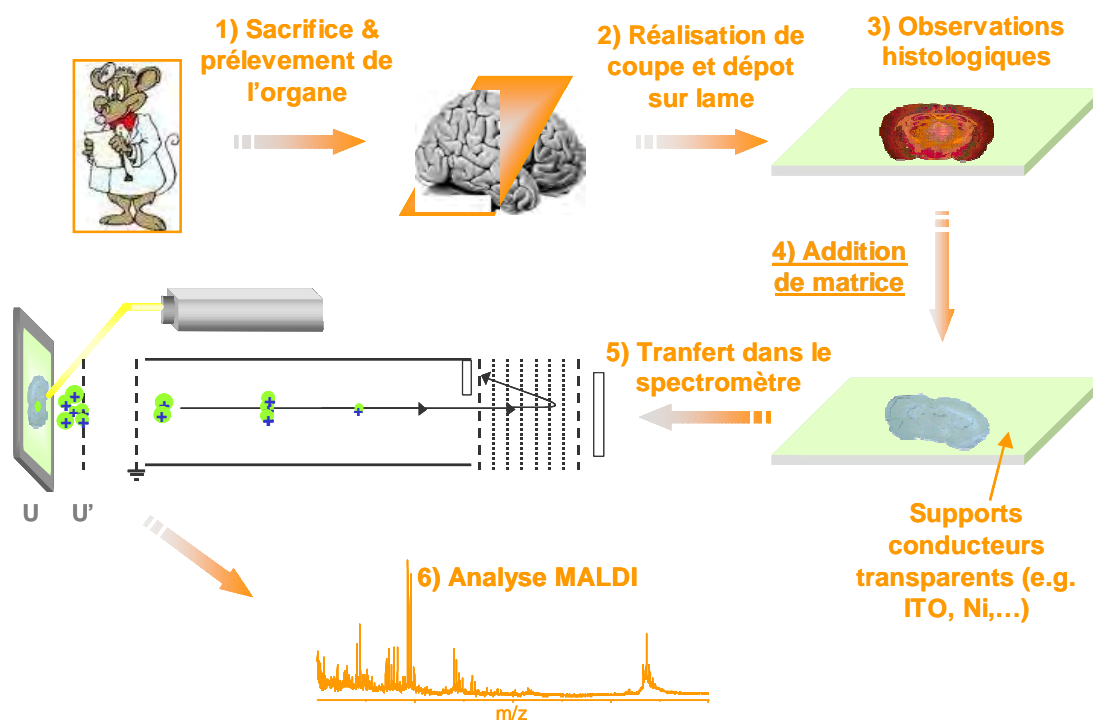


Figure I.1.3 : Déroulement typique d'une expérience d'analyse directe sur tissus par spectrométrie de masse MALDI.

Dans ces différentes étapes, plusieurs difficultés peuvent cependant subvenir.

- ✓ Tout d'abord, dans le cas où l'analyse n'est pas réalisée le jour même, la biopsie doit évidemment être conservée de manière à ne pas altérer la qualité du tissu (-80°C), en évitant toute fluctuation trop importante de température (Etape 1).
- ✓ De même, l'échantillon doit être manipulé avec précaution, de manière à ne pas le contaminer avec un composé risquant d'altérer la qualité de l'analyse. C'est le cas notamment lors de l'étape de réalisation des coupes au cryostat (étape 2) ; on y utilise généralement une colle pour fixer la biopsie en place au moment de la découpe par la lame.

Cette colle appelée OCT ou « tissue teck » est généralement composée de polyéthylène-glycol (PEG) facilement analysable en MALDI, et qui provoque une perte des signaux provenant de la coupe (Figure I.1.4). Dans certains cas, cette suppression peut affecter près de 50% des signaux, et il est donc nécessaire que la section à analyser ne rentre pas en contact avec du PEG (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

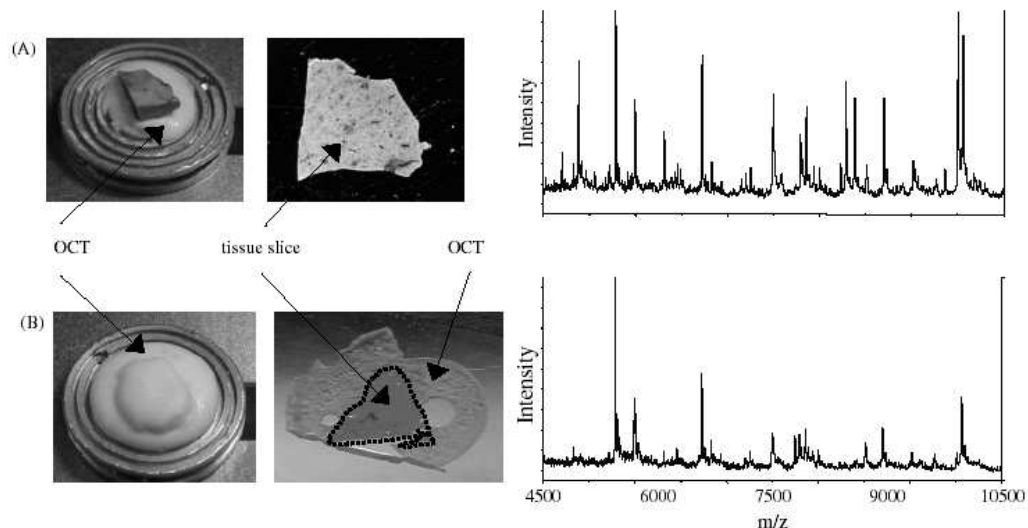


Figure I.1.4 : Effet de la colle OCT sur des signaux obtenus lors d'une analyse directe d'une coupe de foie ; (A) procédure optimale où la colle OCT ne rentre pas en contact avec la coupe qui sera analysée et (B) procédure où la colle enveloppe entièrement la biopsie. (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

✓ Une fois la coupe réalisée, celle-ci est transférée sur un support qui doit être conducteur afin de maintenir un champ électrique homogène autour de la section lors de l'acquisition MALDI. L'utilisation de supports transparents conducteurs tels que des lames de verre recouvertes d'ITO, permet d'une part de ne pas modifier les propriétés du champ électrique et d'autre part, de visualiser au microscope préalablement à l'analyse MALDI, les zones d'intérêt à étudier (étape 3). Cette observation peut être réalisée à l'aide de coloration histologique (bleu de méthylène, rouge neutre, bleu de bromophénol, eosine-safran...), ces dernières restant compatibles avec l'analyse MALDI sur tissus. (Chaurand et al, *Anal. Chem* **2004**).

Le rinçage des coupes par de l'éthanol 70% peut améliorer la détection des signaux notamment en diminuant la concentration en sels contenus dans le tissu. Les résultats ne sont cependant pas toujours reproductibles et dépendent de la matrice employée. Cette étape est à utiliser avec précaution, car les protéines et peptides solubles dans l'éthanol sont probablement extraits lors de ce rinçage. (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

✓ Une des dernières étapes est, bien entendu, l'application de la matrice (étape 4). Plusieurs paramètres rentrent en compte dans ce domaine, comme le choix de la matrice, les solvants utilisés pour préparer cette dernière et le mode d'application sur tissu.

La cristallisation de la matrice sur toute la coupe est une étape importante pour obtenir le meilleur signal et le plus représentatif possible, que ce soit en imagerie ou en « profiling » ; à cause des aspérités et des variations de propriétés physico-chimiques à la surface de la section, les matrices peuvent cependant cristalliser à l'extérieur de la coupe ou ne couvrir qu'une toute petite partie de celle-ci. Ainsi, pour trois matrices classiquement utilisées en MALDI, (HCCA, SA, DHB) seules deux peuvent être utilisées sur tissu, la cristallisation du DHB étant trop délicate lorsqu'il est appliqué simplement à l'aide d'une micropipette (Figure I.1.5).

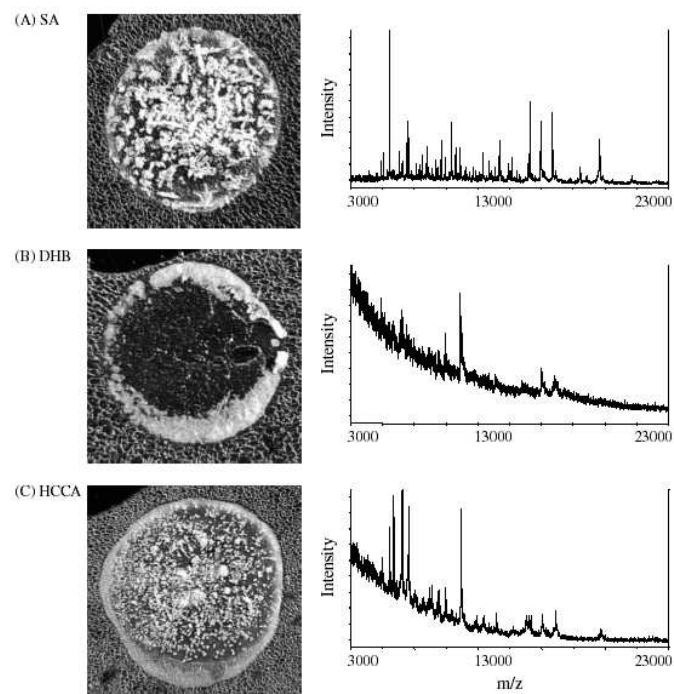


Figure I.1.5 : Cristallisation des trois matrices SA, DHB et HCCA sur une coupe de tissu et les spectres leur correspondant ; les matrices ont été préparées à 20mg/mL dans une solution d'ACN/0,1% TFA dans H₂O et appliquées à l'aide d'une micropipette. (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

Les meilleurs résultats pour l'analyse de protéines ont été obtenus en utilisant de l'acide sinapinique à 20 mg/mL ; l'augmentation de la concentration à 30mg/mL peut améliorer la détection, mais la couverture est moins homogène. Le solvant utilisé peut être de l'acétonitrile ou de l'éthanol avec des résultats généralement semblables ; l'acétonitrile semble cependant donner des résultats légèrement supérieurs pour certains types de tissus. L'utilisation de TFA jusqu'à 2% augmente la détection des composés de la coupe. Pour la

détection des peptides, HCCA peut être utilisé sur tissus tels que c'est le cas dans les analyses classique MALDI (10mg/mL dans ACN/0,1% TFA dans H₂O) (Fournier et al, *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**). Le DHB quant à lui semble difficile à utiliser pour les peptides et protéines sur tissus, dû à une déformation de la ligne de base et à une cristallisation inhomogène (Figure I.1.5 (B)). L'utilisation du DHB peut être cependant facilitée par le dépôt de la matrice à l'aide d'un électrospray ou un « sprayer » permettant de réduire la taille des cristaux et de recouvrir ainsi toute la section de la coupe de manière homogène (Caprioli et coll, *Anal Chem* **1997**). Cette matrice permet par exemple d'obtenir de bons résultats pour l'analyse de lipides sur coupe (Garrett et coll, *Anal Chem* **2006**).

Le « sprayer » ou l'électrospray peuvent cependant être utilisés avec n'importe quelle matrice pour augmenter la couverture sur tissu ou pour obtenir un dépôt très homogène ; ils sont généralement utilisés pour des expériences d'imagerie (Figure I.1.6), alors que le dépôt point par point à l'aide d'une micropipette ou d'un « spotter » automatique est plus utilisé pour le « profiling ». L'énorme intérêt de ces techniques est de limiter au maximum la délocalisation des composés du tissu lors de l'application de la matrice et surtout du solvant utilisé pour cette dernière. Pour le dépôt point par point, la délocalisation est ainsi limitée à la taille des spots de matrice (agrandissement figure I.1.6) ; pour le spray, une partie du solvant est déjà évaporé au moment de l'arrivée de la matrice sur la section limitant le phénomène.

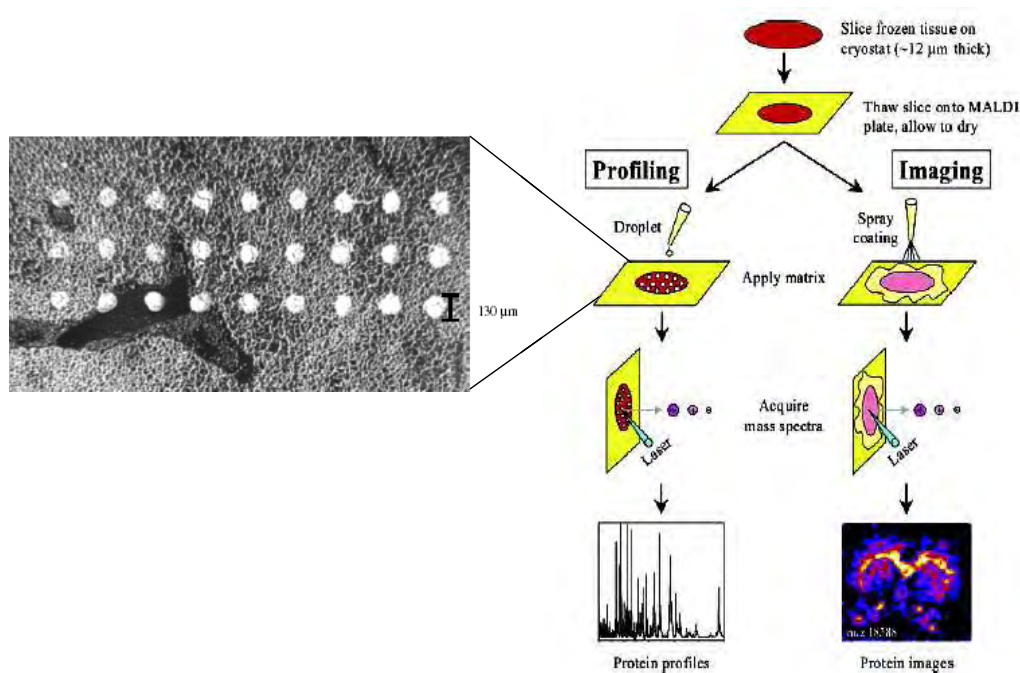


Figure I.1.6 : Schéma général pour réaliser des expériences de « profiling » ou d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. (D'après Reyzer et al, *Journal of Proteome Research*, **2005** et Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

Plus récemment, l'utilisation de « spotters » ayant une grande précision et capables de déposer rapidement de petits dépôts de matrice (<200 µm de diamètre), ont également permis de réaliser des expériences d'imagerie MALDI (Aerni, et al, *Anal Chem* **2006**), tirant profit du fait que la délocalisation des composés est limitée à la taille du dépôt et peut donc être évaluée. Cette technique permet d'obtenir plus facilement et de manière plus reproductible des signaux de la coupe par rapport à l'utilisation du spray ; l'évaporation du solvant et donc la formation de cristaux avant l'arrivée de la solution de matrice sur le tissu oblige à réaliser de nombreux cycles de couverture et séchage entre les applications de manière à ce qu'un maximum de composés puissent être introduits dans les cristaux de matrice. (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

Une des possibilités pour éliminer ce phénomène de délocalisation peut être aussi de remplacer la matrice MALDI par des ions Au implantés dans le tissu à l'aide d'un faisceau primaire SIMS. (Nokinov et coll, *Anal. Chem* **2004**, Tempez et coll, *J. proteome Res.* **2005**). Cette technique appelée MILDI (Matrix Implanted, Laser, Desorption Ionization) permet de détecter des protéines provenant des tissus, mais cette approche est pour le moment limitée par les rendements d'ions et le nombre de composés détectés qui restent relativement faibles par rapport à une analyse en présence de matrice.

- ✓ Après cristallisation de cette dernière, la coupe peut être transférée dans le spectromètre de masse où se trouve la source MALDI (étape 5).
- ✓ Une fois que les composés se trouvent en phase gazeuse et ionisés, ils sont séparés dans un analyseur avant d'être détectés. (étape 6)

Plusieurs types d'analyseurs peuvent être utilisés avec cette source ; historiquement, les plus utilisés sont les temps de vol (TOF). Avec les progrès technologiques, sont apparus ces dernières années des couplages avec des analyseurs présentant de hautes performances et de plus grandes capacités pour les études structurales (MS/MS). A titre d'exemple, peuvent être cités les couplages avec des pièges ioniques et des pièges linéaires (LTQ), avec des instruments de Résonance Cyclotronique d'ions à transformée de Fourier, (FT-ICR) ou encore les instruments hybrides quadripôles (Q) et TOF (MALDI-Q/TOF), ainsi que les MALDI-TOF/TOF.

Des analyses pourront être réalisées en différents points de l'échantillon, avec la possibilité de « moyennner » toutes les positions en un spectre, notamment lors de l'acquisition sur une petite cellule ou un organite, ou alors d'enregistrer un spectre de masse pour une position spécifique

avec un tissu de taille plus importante (« profiling »). La réalisation d'images en MALDI passe par le développement d'outils automatisés d'acquisition, ainsi que des outils puissants de traitement des données et de reconstruction d'images. L'image est réalisée à partir du balayage de l'échantillon dans son entier, grâce au déplacement de manière régulière du porte échantillon. Le pas de déplacement est directement en rapport avec la taille du faisceau laser (voir plus bas). En chaque point, une moyenne de spectres sera enregistrée dans des conditions d'acquisition définies par l'utilisateur sans déplacement de la coupe. Si un point de référence est fixé sur le porte échantillon, alors les spectres peuvent être enregistrés avec les coordonnées d'enregistrement par rapport à ce point de référence. Par la suite, pour un ion particulier, la mesure de son intensité permettra au travers d'un logiciel de reconstruction d'images d'obtenir la répartition de la molécule par rapport aux coordonnées d'enregistrement. (Figure I.1.7)

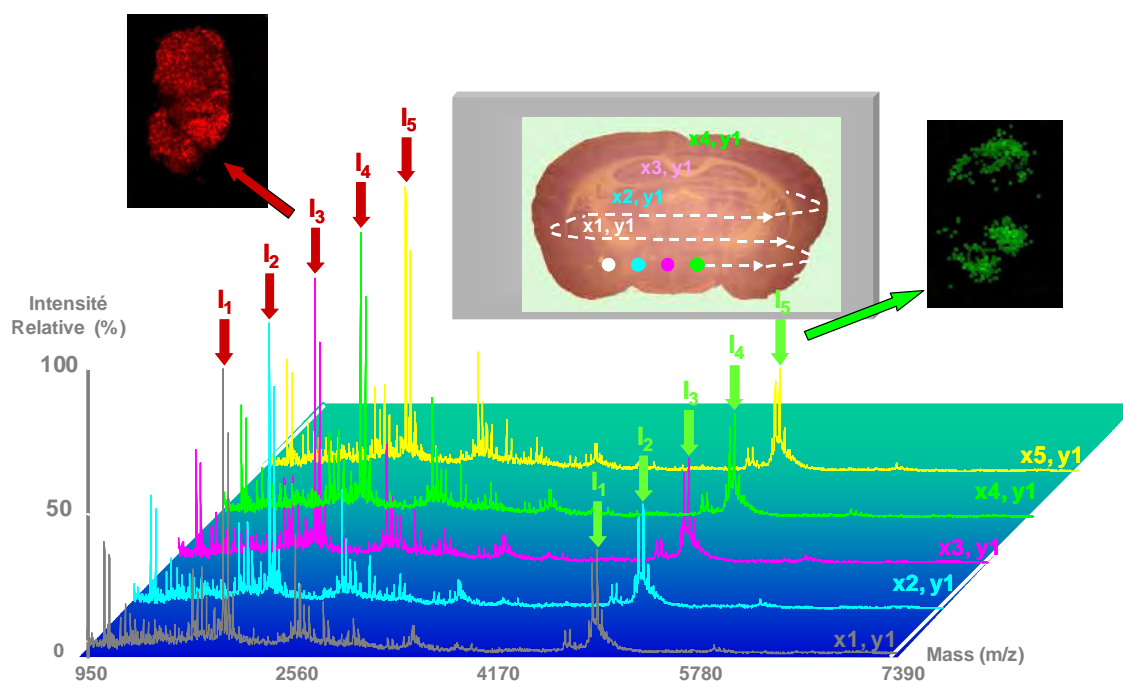


Figure I.1.7 : Représentation schématique du principe de réalisation des images à partir d'ions moléculaires détectés au sein d'un tissu par spectrométrie de masse

Plusieurs logiciels sont à présent disponibles pour réaliser ces expériences : le logiciel MALDI Imaging Tools (MIT) développé par Markus Stoeckli, qui est capable de réaliser l'acquisition automatique et de reconstruire les images par la suite. Il est également possible de réaliser uniquement l'acquisition avec ce logiciel et de reconstruire les localisations avec un autre programme appelé Biomap (Novartis). Suivant le même principe, le logiciel

Fleximaging de la société Bruker Daltonics permet de réaliser l'enregistrement des spectres et la reconstruction des images.

Concernant l'acquisition, un des facteurs limitant en MALDI reste le temps d'analyse ; ce dernier est directement en rapport avec le nombre de spectres enregistrés par position, la vitesse de déplacement de l'échantillon, la vitesse d'acquisition électronique et surtout avec la fréquence de répétition de tirs du laser. La plupart des MALDI est équipé de laser de fréquence 3Hz, nécessitant donc environ 2 jours pour réaliser une image de 10000 points à 50 tirs par positions sur une coupe congelée. Cette durée, qui peut devenir rapidement trop importante pour des coupes imposantes, peut conduire à une dégradation de l'échantillon et notamment à l'évaporation de la matrice sous le vide poussé de la source. Avec des lasers de fréquence 100Hz, l'analyse ne durera que 5 heures mais il est nécessaire de s'assurer que l'ablation de la matrice n'est pas trop importante à ces hautes fréquences de tirs.

La surface analysée, c'est-à-dire la taille du faisceau laser en chaque point, est évidemment primordiale pour la qualité des images. En toute logique, le pas minimum de déplacement sera égal au diamètre du faisceau laser. En SIMS, le faisceau primaire permet de réaliser des images avec une résolution latérale de quelques microns ; en MALDI, la plupart des résolutions obtenues sont entre 50 et 150 μ m environ. Cette résolution est également en rapport avec la taille des cristaux de matrice ou la taille des spots sur la coupe.

Certains lasers récemment apparus, tels que le « SMARTBEAM » de chez Bruker Daltonics, ont la possibilité d'être focalisés à des diamètres inférieurs à 50 μ m, tout en opérant à des fréquences allant jusqu'à 200Hz (Holle et coll, *J. Mass Spectrom.* **2006**).

Différentes méthodes peuvent de plus être envisagées pour réduire la taille du faisceau laser et notamment des systèmes de focalisation du faisceau. Dans ce domaine, le groupe de B. Spengler a développé un concept instrumental particulier, le SMALDI (Scanning, Microprobe, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), instrument hybride entre le LAMMA et le MALDI classique, où le laser peut être focalisé jusqu'à 1 μ m. Cet instrument n'a pour l'instant été utilisé que pour des dépôts de peptides connus sur plaque MALDI et pour la répartition des ions Na⁺ et K⁺ dans des tissus végétaux (Spengler et coll, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **2002**), mais ce système pourrait bien avoir un avenir très prometteur.

Une autre stratégie consiste, au contraire, à défocaliser le laser de manière à analyser de nombreuses régions en un seul tir. La localisation est obtenue grâce à un détecteur de position. (Luxembourg et coll, *Anal. Chem* **2004**). Des études similaires ont également été menées en utilisant une source infra rouge (IR-MALDI) démontrant la possibilité d'utiliser ce type de laser (Luxembourg et coll, *J. proteome Res.* **2005**) pour l'analyse directe et l'imagerie

MALDI. De ce fait, des matrices compatibles avec l'IR et parfaitement adaptées aux tissus biologiques comme le glycérol ou la glace peuvent s'avérer être des outils remarquables dans ce domaine.

Comme décrit précédemment, l'avantage de l'imagerie et de l'analyse directe sur tissu réside dans le nombre de composés analysables en une seule acquisition, sans aucune connaissance préalable de l'analyte, et sans étape d'extraction et de purification fastidieuse.

Avec une source MALDI, l'imagerie de peptides, de protéines, et de nombreuses biomolécules peut être ainsi réalisée. Par conséquent, de nombreuses applications peuvent être recensées en imagerie MALDI ou en analyse directe de tissu ou de cellule.

Les premières applications d'analyse directe MALDI sur coupe datent de 1994 (Li et coll, *J. Biol. Chem.* **1994**). Par la suite, différentes études sur des nerfs, des cellules endocriniennes d'invertébrés, (Dreisewerd, et coll, *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**), et de vertébrés (Xénope et rat) ont été réalisées (Jimenez et coll, *Exp. Nephrol.* **1998**). Des analyses directes de neurones uniques chez la Lymnée ont également été décrites par l'équipe de Sweedler (Moroz et coll, *J. Exp. Biol.* **1999**). Plus récemment, des études de cette même équipe sur des vésicules à noyau dense chez l'aplysie ont permis d'étudier la maturation d'hormones conduisant à la libération de peptides bioactifs (Rubakhin, S.S. ; *Nat. Biotechnol.* **2000**).

Différents paramètres doivent cependant être pris en compte lors de la préparation de l'échantillon, car les résultats obtenus peuvent être modifiés, notamment lors de la présence importante de sels provenant du milieu physiologique. (Rubakhin, S.S, *Anal. Chem* **2003**).

Dans d'autres études sur cellules uniques, certains peptides ont pu être caractérisés par des études Post Source Decay (PSD) (Li et coll, *Anal Chem* **1999**) ou des études CID sur des analyseurs magnétiques (Jimenez et coll, *Biochemistry*, **1998**).

Dans le cas de l'imagerie MALDI, les premiers travaux ont été réalisés par l'équipe de Caprioli en 1997 (Caprioli, et Coll, *Anal Chem* **1997**) et suivis de très nombreuses applications, comme par exemple, des images moléculaires de cerveau de souris, de gliomes humains, (Stoeckli, et coll, *Nat. Med.* **2001**) de la tige pituitaire chez le rat, ou de l'épididyme chez la souris (Chaurand, et coll, *Proteomics*, 2003).

Dans ces études, plus de 400 protéines peuvent être détectées en imagerie MALDI dans la gamme de masse allant de 2 kDa jusqu'à 100 kDa. Cette possibilité de « screening à haut débit » de plusieurs molécules en peu d'analyses, s'intercale parfaitement dans la recherche de nouveaux biomarqueurs de pathologies souvent réalisée lors des études protéomiques (Hanash, *Nature Reviews*, **2004**).

Différentes maladies ont ainsi été étudiées avec une partie importante concernant les cancers (Stoeckli, et coll, *Nat. Med.* **2001**) : cancer du colon, (Chaurand et coll, *Proteomics.* **2001**), adénocarcinomes de la prostate, (Masumori et coll, *CancerRes.* **2001**), tumeurs du cerveau (Schwartz et coll, *Clin. CancerRes.* **2004**). Il est possible par cette technique de déterminer un « profil signature » de la pathologie (Caprioli, *CancerRes.* **2005**), celui-ci pouvant être utilisé pour le suivi des thérapies, l'évaluation de l'avancée de la maladie et surtout dans le diagnostic précoce qui manque cruellement dans la plupart des pathologies cancéreuses. Dans le cas de tissus provenant de gliomes, l'équipe de Caprioli est parvenue à identifier ce type de signature protéique (Figure I.1.8), permettant même de corréler le taux de survie des patients avec le profil protéique détecté en analyse directe MALDI (Schwartz et coll, *CancerRes.* **2005**).

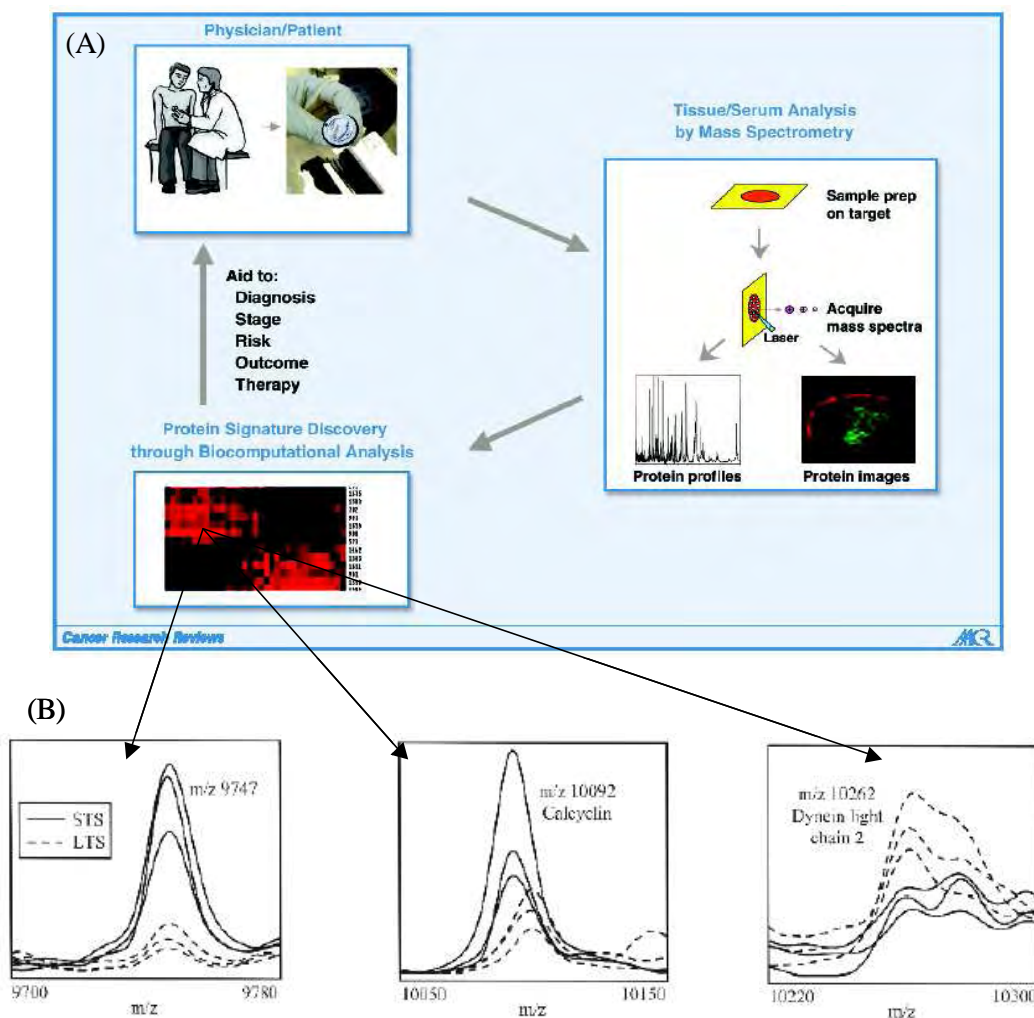


Figure I.1.8 : Découverte de signatures protéiques à partir de biopsies issues de patients et analysées par spectrométrie de masse MALDI sur tissu (A) et variation des signaux observés pour trois protéines (B), la calcyclin (m/z 10092), la Dynein light chain 2 (m/z 10262) et une protéine de masse m/z 9747, dans le cas de tumeurs du cerveau entre des patients STS (Short-Term Survival : survie < 15 mois) et LTS (Long-Term Survival : survie > 90 mois). (D'après Schwartz et coll, *CancerRes.* **2005**, et Caprioli, *CancerRes.* **2005**).

D'autres pathologies que les cancers ont également été étudiées par imagerie/profilage MALDI des protéines et peptides ; c'est le cas de la maladie d'Alzheimer (Stoeckli, et coll, *Anal. Biochem*, **2002**), de la maladie de Parkinson (lésion au 6-OHDA) (Pierson et coll, *J. proteome Res.* **2004** et **2005**) ou après lésion au MPTP, (Sköld, et coll, *J. proteome Res.* **2006**), également dans le cas d'administration de drogue telle que la gentamicine (nephrotoxicité) (Meistermann, et coll, MCP). Quelques exemples de localisations de ces protéines sont résumés figure I.1.9.

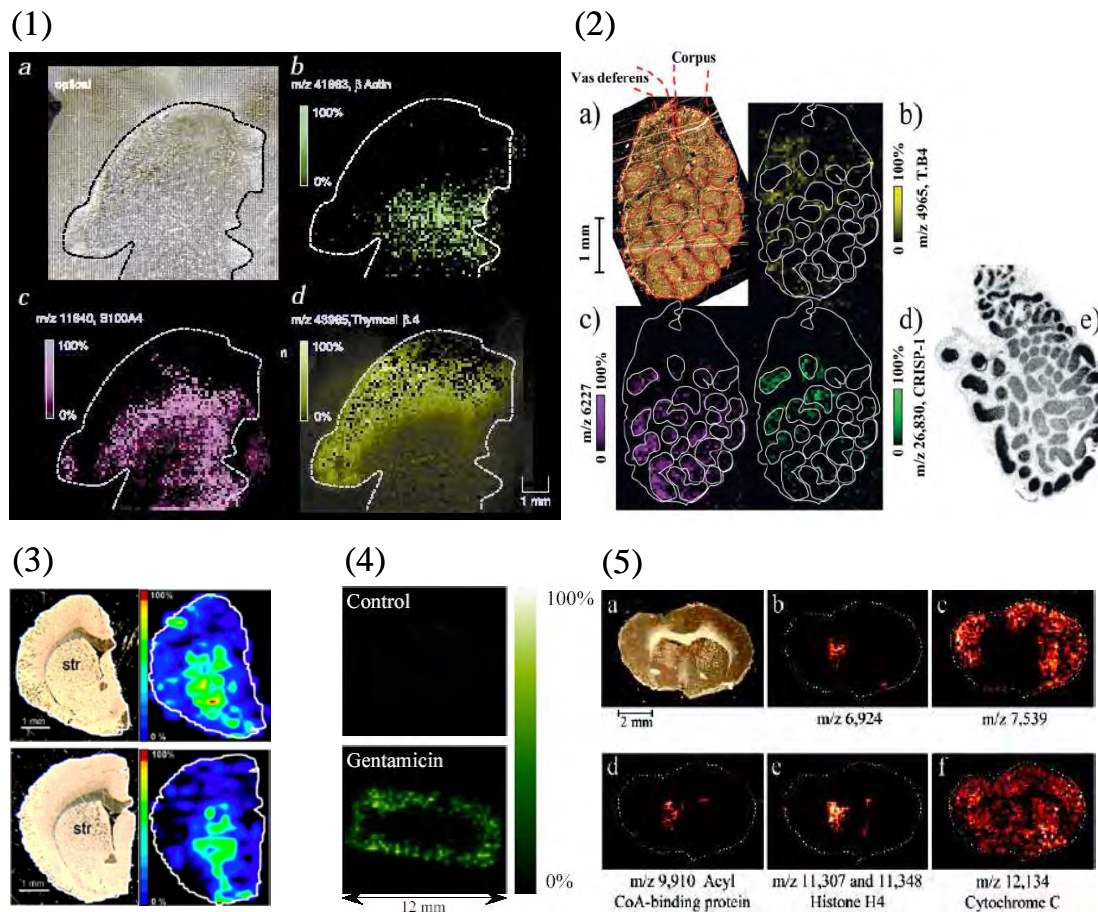


Figure I.1.9 : Expériences d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI : (1) 3 protéines d'un glioblastome humain (β actin en vert, S100A4 en violet, et thymosine β 4 en jaune), ayant une forte concentration dans la zone proliférative de la tumeur (D'après Stoeckli, et coll, *Nat. Med.* **2001**), (2) imagerie moléculaire de 3 protéines dont la thymosine β 4 en jaune, et la CRISP-1 en vert détectées dans l'épididyme de souris ; la figure (e) représente la localisation de CRISP-1 par technique d'immunohistochimie classique, où la répartition obtenue est équivalente à celle reconstruite en imagerie MALDI (d'après Chaurand et coll, *Proteomics.* **2003**). (3) Protéine PEP 19 dans du cerveau de rat sain (en haut) et dans un rat atteint de la maladie de Parkinson (en bas). (D'après Sköld et coll, *J. proteome Res.* **2006**). (4) Imagerie de la transthyrétine dans le rein de rat stimulé à la gentamicine (réponse à une toxine) (d'après Meistermann, et coll, *Moll. Cell Proteomics*, **2006**). (5) Localisation de plusieurs protéines dans une tumeur de souris (d'après Reyzer et coll, *J. proteome Res.* **2005**).

Afin de corrélérer l'image du composé et son activité biologique, l'identification du produit détecté sur le tissu est une étape incontournable de cette technique. L'imagerie MALDI en mode MS/MS sur une surface entière, permettant d'obtenir des informations de séquences sur des peptides ou des petites protéines du tissu n'a pas encore été décrite. L'identification des protéines et peptides, est effectuée par la comparaison des masses détectées et des masses théoriques. Une extraction du tissu réalisée en parallèle, suivi par les techniques classiques de protéomique (digestion trypsique et identification par LC-MS/MS) permettent de confirmer ou de réaliser cette identification. Lors de l'étude de biomarqueurs, cette identification est elle-même appuyée par une validation utilisant les techniques biochimiques classiques, telles que immunohistochimie (IHC) ou hybridation *in situ* (HIS) pour l'ARNm.

Les cellules peuvent aussi être extraites du tissu, en utilisant la technique de microdissection laser (Xu et coll, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**) : il est possible de sélectionner un même type de cellule afin de réaliser des études plus poussées et notamment de caractériser, avec les instruments de protéomique classiques, les composés à cibler. Une autre approche consiste à utiliser des surfaces présentant des propriétés particulières, afin de fixer les composés de la coupe vers un support. Par exemple, des membranes ayant des propriétés hydrophobes (C18) ont été utilisées avec succès pour réaliser des empreintes peptidique/protéique. La matrice est appliquée directement sur la membrane, et l'acquisition MALDI réalisée sur cette dernière. Les composés étant fortement retenus sur la membrane, des séries de lavage pour éliminer les sels résiduels peuvent être réalisés. (Caprioli, et Coll, *Anal Chem* **1997**). Par la suite, avec l'utilisation de membrane en PVDF ayant également des propriétés hydrophobes, il a été possible de réaliser des digestions trypsiques et des expériences PSD pour l'identification des protéines (Chaurand et coll, *Anal Chem* **1999**). Une version plus élaborée de la fixation de composés sur des membranes a également été décrite avec la technique du « scanner » moléculaire (Rohner et coll, *Mech. Ageing. Dev.* **2005**) ; il s'agit de digérer la surface du tissu par des enzymes fixées sur une membrane semi-perméable. Les peptides issus de la digestion sont ensuite transférés et identifiés par « fingerprint » en MALDI. Dans cette approche, les peptides transférés conservent leur localisation et il est alors possible de réaliser les images des peptides issus de la digestion.

L'imagerie MALDI peut également être utilisée pour étudier la répartition des drogues ou de composés de faible masse dans des tissus ou des cellules ; cette analyse est simple, rapide et demande comme pour le cas des peptides ou des protéines peu de préparation d'échantillon comparé à une analyse classique utilisant une extraction. Cependant, l'addition

de matrice produit de nombreux ions pouvant interférer avec les signaux de la drogue elle-même, et les signaux obtenus en mode réflecteur sont souvent faibles. Lorsque ce n'est pas le cas, la technique peut être employée avec succès, comme dans l'étude sur la peau de la ketoconazole contenue dans des shampoings (Bunch et coll, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**). Si la quantité de drogue est assez importante, des expériences en mode MS/MS sur tissus peuvent être réalisées afin de confirmer la présence de la molécule d'intérêt comme il a été le cas pour l'analyse de chlorisondamine ou de cocaïne dans du cerveau de rat (Wang et coll, *Anal Chem* **2005**). A partir de la MS/MS il est également possible de réaliser des images à partir d'un ion fragment majoritaire. Ainsi, pour l'étude de deux anti-tumoraux détectés dans des biopsies (Reyzer et coll, *J. Mass Spectrom.* **2003**) ou de la clozapine dans le cerveau de rat (Hsieh, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**), des images sur un ion fragment majoritaire ont permis de réaliser sans ambiguïté une carte de la répartition de ces drogues dans le tissu. L'analyse MALDI en mode MS/MS prend alors tout son sens par rapport à l'analyse SIMS où l'étude structurale est plus délicate.

Pour les lipides, la problématique est globalement la même que pour les drogues ; plusieurs expériences de détection sur tissu ont été effectuées par différentes équipes sur le cerveau de rat (Jackson et coll, *Anal Chem* **2005**) et sur des yeux de bovins (Rujoi et coll, *Anal Chem* **2004**). Dans certains cas, l'ajout de lithium et l'utilisation de matrice particulière comme la 2,6dihydroxyacétophénone (DHA) permettent d'améliorer les signaux ou les fragments obtenus en MS/MS dans le cadre d'analyse de phospholipides et de sphingomyeline (Jackson et coll, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2005**).

Appliquée à la dystrophie musculaire de Duchenne, l'imagerie MALDI des lipides a permis d'observer par exemple, des modifications dans la composition des phospholipides chez la souris (Touboul et coll, *Eur. J. Mass Spectrom.*, **2004**).

Ainsi, l'imagerie MALDI est capable de nous donner la localisation simultanée de nombreuses protéines, drogues ou même lipides contenus dans un tissu. Des études de profiling MALDI permettent la recherche de nouvelles molécules régulées et notamment des protéines modifiées entre 2 états physiologiques. Etant donné la taille du faisceau de l'analyse, l'imagerie MALDI est réalisée au niveau d'une cellule.

A l'inverse, une seconde technique d'imagerie, le SIMS, permet de réaliser des images à un niveau sub-cellulaire ouvrant l'accès à un autre type d'information.

2. L'imagerie SIMS

Le Secondary Ion Mass Spectrometry ou SIMS est une technique de spectrométrie de masse ancienne puisque les premières recherches de Thomson datent de 1900 (Honig, *Int. J. Mass Spectrom. Ion process.* **1985**).

Il faut attendre les années 1960 pour voir apparaître les premiers résultats d'imagerie SIMS par Castaing.

En SIMS, les ions de l'analyte (ou ions secondaires) sont désorbés à l'aide d'un bombardement de la surface par un faisceau d'ions primaire (Figure I.2.1). Ce faisceau ne peut fonctionner que dans un vide poussé ($<10^{-6}$ torr) et est généralement composé d'ions monoatomiques, polyatomiques ou de clusters d'ions ayant une haute énergie (keV).

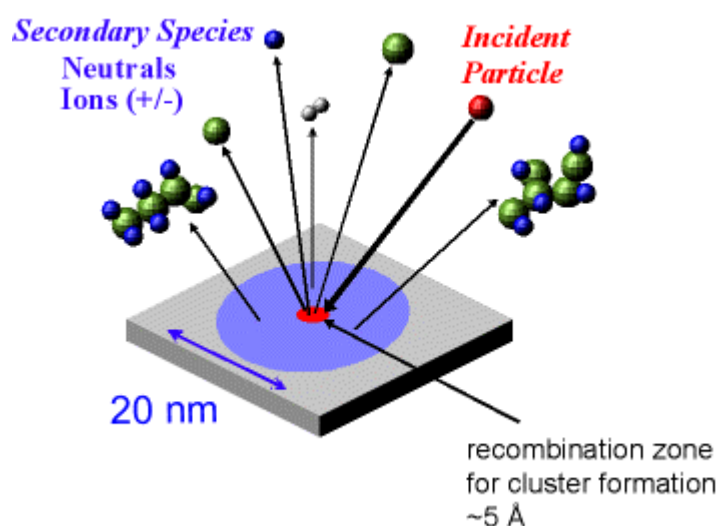


Figure I.2.1 : Principe de la spectrométrie de masse SIMS, où un faisceau incident primaire vient frapper la zone à analyser provoquant l'émission de particules secondaires (d'après Walker et al, *données internet*)

Différents modes d'analyses sont possibles en SIMS ; le mode dynamique est un mode où la densité d'ions du faisceau primaire est importante, et où une érosion rapide et profonde de la surface est observée. Les ions détectés sont principalement des ions monoatomiques ou des petits agrégats de molécules ayant une grande énergie interne. Le mode statique, où la densité d'ions est plus faible, n'endommage que les premières couches de l'analyte ou du tissu et permet de détecter des composés de plus hautes masses, voire des molécules entières. Ce mode est le plus adapté pour la réalisation d'images. (Pacholski et al, *Chem Rev*, **1999**), (Todd et al, *J. Mass Spectrom*, **2001**).

Les ions secondaires obtenus peuvent être neutres (99,9%), de charges positives ou négatives (0,1%); différents analyseurs peuvent être utilisés avec ce type de source (quadripôle, secteurs magnétiques) et notamment le temps de vol, qui permettent une bonne transmission des ions et une bonne résolution des signaux (Chait, *Int. J. Mass spectrom. Ion phy*, **1981**).

Une large variété d'ions peut être utilisée comme source en analyse SIMS tels que Ar^+ , Xe^+ , Ga^+ , In^+ , Cs^+ , Au^+ , CO_2^+ ou C_{60}^+ .

On distingue les sources d'ions solides comme pour le Cs^+ , d'énergie supérieure à 10 keV et de diamètre de faisceau d'ions 2-3 μm , et des sources LMI (Liquid Metal Ion) tels que Ga^+ ou In^+ . Pour ces dernières, les plus populaires, du métal liquide (comme le gallium, liquide à température ambiante) circule entre un petit réservoir et la pointe d'une aiguille qui est soumise à un haut champ électrique, provoquant l'extraction des ions primaires (Figure I.2.2). Dans le cas du gallium, l'énergie cinétique des ions Ga^+ est de l'ordre de 20 à 60 keV (Pacholski et al, *Chem Rev*, **1999**), et la taille du faisceau est à moins de 1 μm de diamètre (pouvant approcher les 100 nm dans certains cas) (Todd et al, *J. Mass Spectrom*, **2001**).

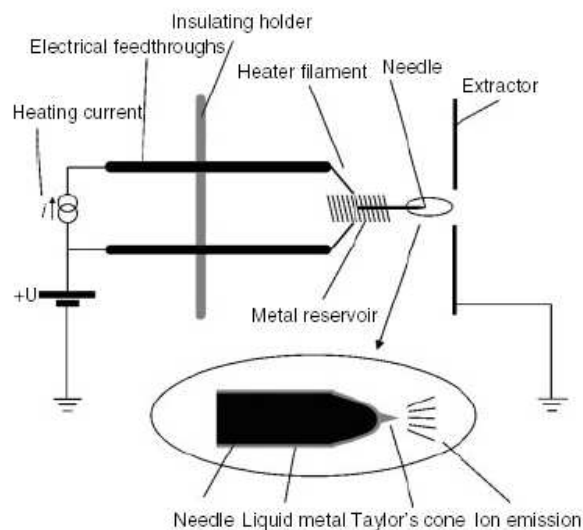


Figure I.2.2 : Représentation schématique d'une source LMI (Brunelle et al. *J. Mass Spectrom*, **2005**).

Pour les métaux qui ne sont pas liquides à température ambiante, ils sont mélangés à d'autres composés afin de diminuer la température de fusion jusqu'à quelques centaines de degrés (de 1064°C pour l'or pur, jusqu'à 356°C pour un mélange or/germanium) et chauffés par un filament pour devenir liquide dans la source.

Même si ces sources LMI au Ga^+ ou In^+ permettent de réaliser des analyses avec une excellente résolution latérale, le taux de désorption des analytes n'est pas très efficace,

limitant alors la gamme de masse et la taille des composés détectés (généralement un fragment de la choline de m/z 184 sur tissus). (Brunelle et al. *J. Mass Spectrom.*, **2005**)

Néanmoins, du fait de l'excellente résolution du faisceau primaire (moins d' $1\mu\text{m}$ généralement), et sachant que la taille d'une cellule varie entre $10\mu\text{m}$ et $50\mu\text{m}$, des images de très grande qualité à un niveau sub-cellulaire peuvent être réalisées et permettent d'étudier des phénomènes biologiques sur tissus. (Colliver et al, *Anal. Chem.* **1997**)

Des expériences d'imagerie sur une coupe de cerveau de rat néonatal comparé à un cerveau âgé de 20 jours, permettent par exemple de suivre la formation des connections nerveuses et donc leur développement (Figure I.2.3).

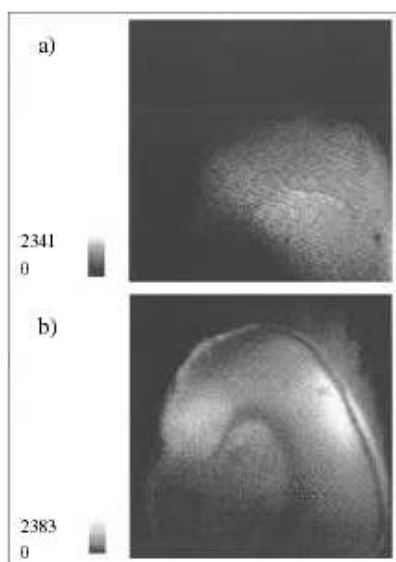


Figure I.2.3 : Images SIMS d'un fragment de phosphatidylcholine (m/z 184) réalisées sur une coupe de cerveau de rat néonatal (a) et sur une coupe de cerveau de rat âgé de 20 jours (b). (Todd et al, *J. Mass Spectrom.*, **2001**).

De nombreux développements en SIMS et imagerie SIMS concernent l'augmentation de l'efficacité de désorption des composés afin d'augmenter la gamme de masse analysable et détecter ainsi des composés de plus haute masse.

Pour augmenter la désorption et l'ionisation, une des stratégies consiste à limiter l'impact du faisceau primaire sur le tissu ou l'analyte pour limiter la fragmentation des molécules. Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible d'analyser des composés de très haute masse (>1000000 Da) en MALDI en utilisant un petit composé aromatique (la matrice) lors de la préparation de l'échantillon (cf partie MALDI) ; cette matrice joue un rôle dans la réduction des fragmentations lors de l'analyse MALDI. (Zenobi et al, *Mass Spectrom. Rev.*, **1998**)

La combinaison de cette propriété de la matrice MALDI et de la technique SIMS, le Matrix-Enhanced SIMS ou ME-SIMS a permis la détection de molécules en solution jusqu'à environ 10kDa (Wu et al, *Anal. Chem.* **1996**). Le groupe de Piersma et Heeren (Mc Donnel et al, *J. Mass Spectrom.* **2005**) a développé avec succès cette technique pour l'imagerie sur tissus, en déposant sur la coupe un composé qui cristallise, l'acide 2,5 dihydroxybenzoïque, normalement utilisé comme matrice en analyse classique MALDI. De fins cristaux de matrices sont formés de manière homogène à la surface du tissu en vaporisant par électrospray le mélange matrice/solvant. (Schwartz et al, *J. Mass Spectrom.* **2003**, cf partie MALDI)

L'application de cette technique à un petit modèle biologique (*Lymnaea stagnalis*) a permis la détection de différents peptides directement dans le système nerveux de cet animal (Maarten Altelaar, et al, *Anal. Chem.* **2005**). L' α caudorsal cell peptide (m/z 1169), le peptide δ (m/z 1566), le carboxyl terminal peptide ou CTP (m/z 2590), peptides issus de la maturation de l'hormone CDCH jouant un rôle dans la conception des œufs de la *Lymnaea*, ont ainsi pu être repérés avec une source SIMS In^+ . Des expériences d'imagerie ont permis d'observer la localisation du peptide δ et du CTP, ainsi que d'un peptide de masse plus modeste, l'APGWamide (m/z 430) au sein du système nerveux (Figure I.2.4). La répartition de ce dernier observée en ME-SIMS correspond à la localisation précédemment décrite lors d'études en immunohistochimie classique chez ce même animal.

La résolution spatiale du ME-SIMS avec une source In^+ semble être autour de 3 μm , ce qui représente une diminution d'un facteur 3 par rapport à l'analyse sans matrice (1 μm environ). Cette résolution reste donc suffisante pour l'étude à un niveau sub-cellulaire.

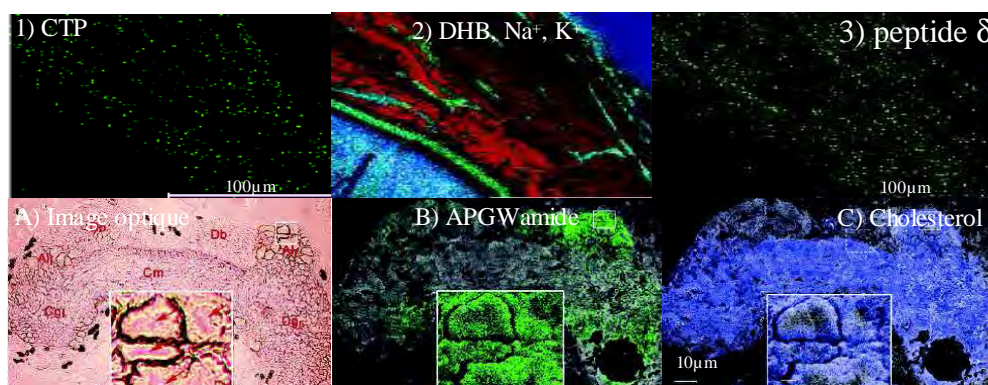


Figure I.2.4 : Imagerie moléculaire ME-SIMS du peptide CTP de m/z 2590 (1) et du peptide δ m/z 1566 (3), par rapport à la localisation du DHB (2) de m/z 154 en rouge, du Na^+ en bleu et du K^+ en vert. Dans le cas des images du cholestérol (C) et du peptide APGWamide (B), les images moléculaires peuvent être corrélées avec l'image optique obtenue au microscope (A).

(D'après Maarten Altelaar, et al, *Anal. Chem.* **2005**)

Si le ME-SIMS possède une gamme de masse plus étendue, les spectres obtenus avec ce type de stratégie sont malheureusement dominés par les ions issus de la matrice elle-même ; ces derniers co-localisent avec des ions issus du tissu tels que des phospholipides, compromettant la localisation d'un certain nombre de composés.

Par ailleurs, la détection de petits peptides décrite précédemment n'est pas toujours observée avec succès probablement dû à un problème de sensibilité ; c'est le cas notamment lors de l'analyse d'un cerveau de rat par la même équipe où aucun peptide n'a été repéré par ME-SIMS alors que ces derniers étaient présents lors d'une analyse directe sur tissu du type MALDI. (Maarten Altelaar, et al, *Anal. Chem.* **2006**).

D'autres familles de composés ont également été testées de cette manière pour améliorer l'ionisation des composés en SIMS ; c'est le cas des métaux, (Metal-Assisted SIMS ou MetA-SIMS) destinés par exemple à produire des ions secondaires cationisés à l'argent (Nygren et al, *FEBS Lett*, **2004**), ou à l'or (Delcorte et al, *Anal. Chem.* **2002**).

Cette stratégie a été appliquée avec succès pour l'analyse de cellules de neuroblastomes (Maarten Altelaar, et al, *Anal. Chem.* **2006**), notamment pour la localisation de lipides et de cholestérol après dépôt d'une fine couche d'or. Par cette technique, l'intensité des signaux a été grandement améliorée et la gamme de masse étendue environ jusqu'à m/z 1200 ; la résolution latérale calculée s'approche de 1,5 μ m, ce qui représente une amélioration d'un facteur 2 par rapport à la technique ME-SIMS. Les phénomènes expliquant cette augmentation d'intensité en présence de dépôt métallique sont encore à l'étude.

Les spectres obtenus par cette technique sont cependant riches en clusters d'or chargés (ou en cluster du métal utilisé) ce qui complique l'interprétation des signaux. Dans le cas de l'argent, le signal majoritaire sur tissu est celui du cholestérol cationisé avec le métal, et la répartition d'autres composés est alors difficile à obtenir.

Enfin, la technique MetA-SIMS ne permet de réaliser que des analyses en mode positif (Brunelle et al. *J. Mass Spectrom*, **2005**) privant l'opérateur d'un grand nombre d'informations et de répartitions de composés biologiques, notamment des classes de lipides bien détectables en mode négatif (phosphatidylinositols (PI), phosphatidylserines (PSer) etc.) (Pulfer, M et al, *Mass Spectrom Rev* **2003**).

Une autre possibilité pour améliorer la désorption en SIMS est d'utiliser des clusters d'ions comme source primaire ; ce phénomène avait déjà été observé il y a une trentaine d'années par Andersen et Bay, (Brunelle et al. *J. Mass Spectrom*, **2005**) qui donnera lieu par la suite à de nombreux développements (Winograd, *Anal. Chem.* **2005**).

L'utilisation de clusters d'ions et donc de complexes poly-atomique permet de bombarder une petite surface simultanément avec plusieurs atomes et d'augmenter ainsi

fortement l'émission des ions secondaires comme c'est le cas pour la phénylalanine en solution (Figure I.2.5).

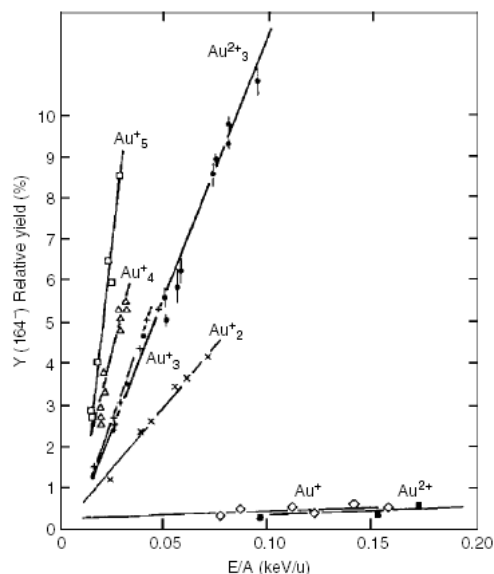


Figure I.2.5 : Rendement d'émission des ions secondaires de la phénylalanine en mode négatif (m/z 164) en fonction de la vitesse par unité de masse de différents clusters Au_n^+ ($n=1$ à 5) (Brunelle et al. *J. Mass Spectrom.*, **2005**).

En 2004, l'équipe de Laprévotte utilisa des clusters d'or délivrés à partir d'une source LMI pour augmenter les signaux en imagerie SIMS et réaliser la localisation de lipides et phospholipides (jusqu'à 900 Da environ) du cerveau de souris, tout en conservant une résolution latérale inférieure à $1\mu m$ (Touboul et al, *Anal. Chem.* **2004**). Des clusters d'ions Au_3^+ , qui représentent un bon compromis entre amélioration du signal, l'abondance des ions primaires, durée du pulse et résolution latérale, ont été privilégiés aux clusters plus importants où les temps d'acquisition en imagerie auraient été trop longs à cause d'une intensité des ions primaires plus faible. D'autres équipes ont également utilisé ces clusters pour l'étude de PI et de sulfatides dans le cerveau de souris (Sjovall et al, *Anal. Chem.* **2004**).

Afin d'augmenter la vitesse d'acquisition des images, des clusters de bismuth Bi_3^+ peuvent être utilisés à la place des clusters d'or (Touboul et al, *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**). Les clusters de bismuth sont plus facilement émis de la source LMI (potentiels d'ionisations plus faibles du bismuth), et l'intensité du courant primaire est alors supérieure. Les acquisitions en imagerie SIMS peuvent alors être plus rapides, tout en donnant des images de qualité comparable aux images obtenues avec des clusters d' Au_3^+ (Figure I.2.6).

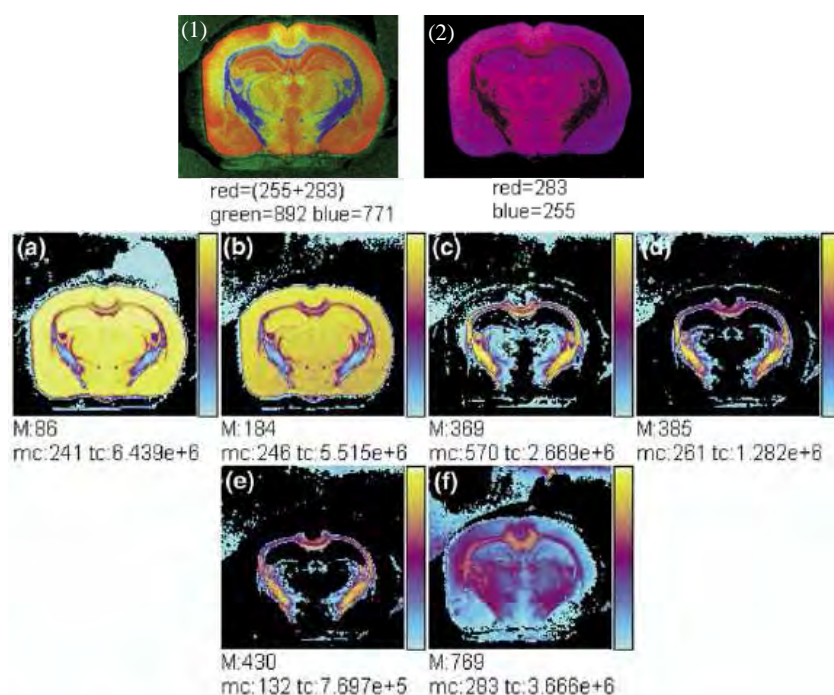


Figure I.2.6 : Localisation de plusieurs lipides sur une coupe de cerveau de rat, obtenues par imagerie SIMS utilisant des clusters Bi_3^+ en mode négatif (1-2) et en mode positif (a-f). (D'après Touboul et al, *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**).

En utilisant ces clusters, la répartition de plusieurs classes de lipides et de composés de masse inférieure à 1200 Da peut être aisément et finement réalisée. Par exemple, dans des coupes de muscles de souris atteintes de la dystrophie musculaire de Duchenne, l'analyse d'acides gras, de triglycérides, de tocophérols, de coenzyme Q9 et de cholestérol a permis de différencier des zones de stress oxydatif, de dégénérescence ou de régénération en fonction du composé considéré (Touboul et al, *J. Lipid. Res.* ; **2005**). D'autres applications ont été réalisées sur le cheveu ou sur la peau pour étudier ce type de molécule.

Les futurs développements en imagerie SIMS peuvent être nombreux ; tout récemment, il a été découvert que le ME-SIMS, le MetA-SIMS et les ions poly-atomiques peuvent cumuler leurs effets. Ainsi, l'utilisation de Bi_3^{2+} sur une section de tissu recouverte d'or permet d'obtenir des signaux lipidiques environ 2 fois plus intenses que l'utilisation des clusters seuls (McDonnell et al, *J Am Soc Mass Spectrom.* **2006**). Cette préparation semble cependant applicable aux composés de masse inférieure à 1200 Da, recouvrant donc surtout la gamme des lipides. Il est toutefois possible que des surfaces autres que l'or puissent encore améliorer le signal.

D'autres clusters d'ions pourront bien sûr être étudiés plus en détail, tels que ceux à base de Au_{400}^+ ou ceux à base de fullerene ; les premiers résultats obtenus en imagerie sur ce dernier semblent prometteurs (Ostrowski et al, *Anal. Chem.* 2005) puisque le signal de lipides est augmenté d'un facteur 1000 par rapport à une source classique Ga^+ . Des images de composés tels que cholestérol m/z 369, ou sulfatide (m/z 264) ont également été réalisées avec ce type de source.

La technique SIMS manque de méthode de caractérisation par MS/MS ; récemment, un « PSD-like » a été décrit pour l'imagerie SIMS permettant d'obtenir quelques informations sur des composés de faible masse provenant du tissu, et de réaliser une image à partir des ions fragments obtenus (Touboul et al, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006). Les futures applications dans ce domaine sont de réaliser de la MS/MS avec une cellule de collision afin d'augmenter le nombre et l'intensité des ions fragments.

L'imagerie SIMS s'avère donc être, de par sa résolution latérale, son acquisition rapide et la gamme de masse analysable (notamment lors de l'utilisation de clusters d'ions) un outil remarquable pour l'imagerie de lipides et de composés jusqu'à une masse d'environ 1200 Da. L'analyse de peptides par cette technique est pour le moment difficile (technique ME-SIMS) et l'analyse de protéines irréalisable, nécessitant l'utilisation de nouveaux outils pour combler cette lacune.

Néanmoins, SIMS ou MALDI sont deux techniques utilisées sous vide poussé et ne permettent pas l'étude de composés *in vivo*. Cette possibilité est récemment apparue avec une nouvelle méthode d'imagerie par spectrométrie de masse appelée DESI basée sur les principes de l'ESI.

3. La source DESI

C'est au milieu des années 1980, que Fenn réalisa la première étude électrospray de molécules de haute masse. Il fallut attendre 2004 pour voir apparaître la première étude en deux dimensions de l'ESI (Ford et al, *Rapid Commun Mass Spectrom*, **2004**).

En ESI, un aérosol (ou spray) de gouttes de solvant hautement chargées (où les composés à analyser sont dissouts) est formé à pression atmosphérique dans un champ électrique. La taille des gouttes se réduit progressivement par combinaison des phénomènes d'évaporation du solvant et d'explosions coulombiennes, jusqu'à l'obtention d'aggrégats chargés qui seront introduits en phase gazeuse. Le champ électrique est réalisé grâce à un potentiel électrique de 1 à 4kV et appliqué entre une aiguille (en métal ou un capillaire en verre conducteur) et l'entrée du spectromètre de masse. Les gouttelettes de solvant sont émises à partir de l'aiguille en formant un cône de Taylor.

En DESI, un spray fin de gouttelettes chargées vient frapper une région à analyser (tissus, peau, vêtements, drogues...) se trouvant à pression atmosphérique. Ces gouttelettes vont extraire de la surface de petits composés ou des biomolécules de haute masse, et ces derniers vont être ionisés et emmenés jusqu'au spectromètre de masse où ils arriveront sous forme désolvatés (Figure I.3.1).

Tout comme l'électrospray, le DESI est une méthode douce, où les ions secondaires ont peu d'énergie interne, causant peu de fragmentations et permettant donc de détecter des molécules intactes. Grâce au mécanisme de désolvatation identique pour ces 2 techniques, les spectres obtenus en ESI et DESI sont similaires. Pour les peptides, protéines ou tout autre composé de masse importante, les ions formés sont multichargés (protonés ou déprotonés) ou/et détectés sous forme d'adduits (Na^+ , K^+ ...).

Même si la MS/MS réalisée avec l'aide d'un gaz de collision sur des ions multichargés (notamment les deux fois chargés) est particulièrement efficace et utilisée fréquemment pour l'identification et la caractérisation de composés avec cette technique, l'ESI reste une technique d'ionisation douce avec peu de fragmentation des analytes en sortie de source (sauf lors de l'application d'un potentiel plus important sur le cône de désolvatation).

Ainsi, le DESI peut être considéré comme une version du SIMS à pression atmosphérique, où les clusters d'eau sont considérés comme des faisceaux d'ions primaires (cf partie SIMS).

Les avantages du DESI sont multiples : aucune préparation d'échantillon, grande sensibilité, technique applicable sur des produits complexes...

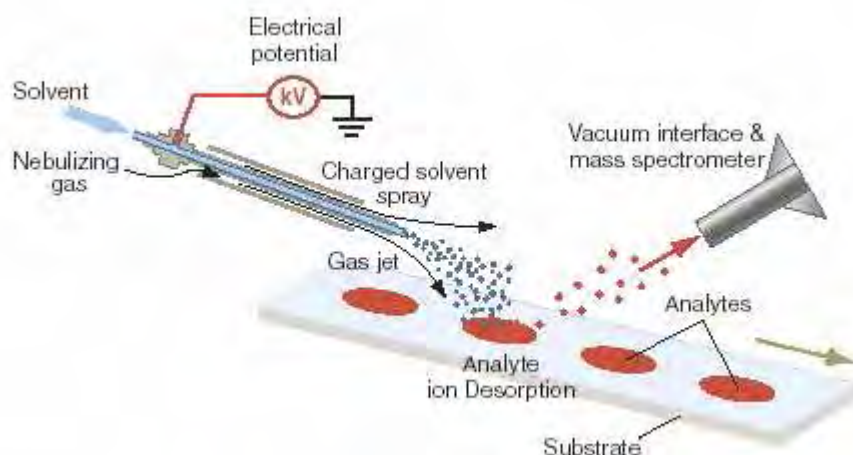


Figure I.3.1 Analyse haut débit d'échantillon brut se trouvant à l'air libre par DESI (D'après (Cooks et al, *Science*, 2006).

Les ions détectés en DESI dépendent de plusieurs paramètres : la nature de l'échantillon, le solvant utilisé (polarité, pH, concentration et nature du sel), et le substrat ou le support sur lequel est déposé l'analyte (Wiseman et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005). Celui-ci peut être très variable : plastique, métal, papier etc...

En fonction de la substance à détecter, l'inclinaison du spray, la tension pour réaliser ce dernier, ou la distance entre l'analyte et l'aiguille peuvent varier ; par exemple, une tension de 5kV, une distance de 5mm et un angle de 40° seront idéales pour la détection de petites molécules. L'angle sera plus important et la distance raccourcie pour la détection de protéines (Takats et al. *J. Mass. Spectrom.* 2005). Ces conditions sont directement en rapport avec le phénomène de d'ablation des composés de la surface solide par les gouttelettes chargées.

Comme en ESI avec un analyseur adéquat (triple quadripôle, trappe ionique, Q/TOF, FTMS...) tous ces composés peuvent être analysés en mode MS puis en mode MS/MS ; un exemple est illustré figure I.3.2, où l'ion de masse m/z 214 détecté dans un échantillon d'urine (sans préparation préalable, juste en déposant un échantillon et en le laissant sécher) est sélectionné, puis identifié après analyse des spectres MS/MS.

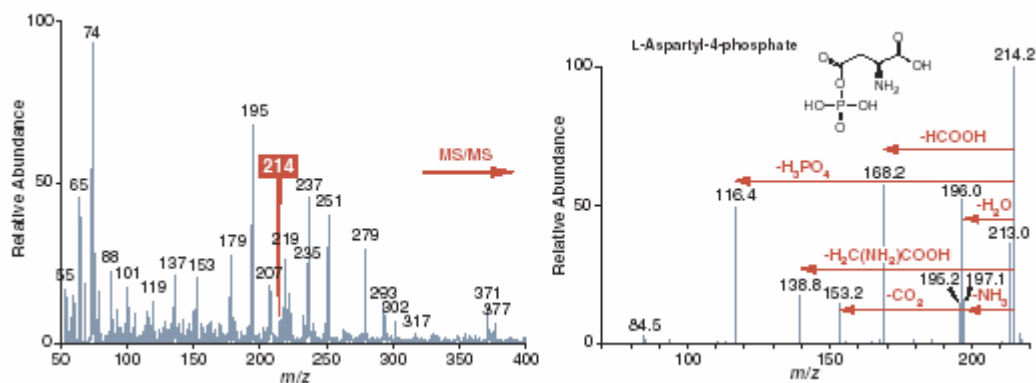


Figure I.3.2. Détection par DESI et identification par MS/MS de la L-Aspartyl-4-phosphate à d'un dépôt sur papier de 2 μ L d'urine sprayé avec un mélange 1 : 1 méthanol/eau (1% acide acétique) (D'après Cooks et al, *Science*, **2006**).

Un large panel de molécules peut être analysé, incluant les composés volatils ou semi-volatils, (pesticides, hydrocarbures aromatiques...) des composés peu polaires de petites tailles (terpènes, lipides...), des composés polaires de petites tailles (acides aminés, drogues) des protéines (avec un spectre similaire à un spectre d'ESI en solution), et même certains ions inorganiques comme les perchlorates.

L'industrie pharmaceutique fut une des premières à utiliser cette technique, avec notamment pour de l'analyse haut débit et le contrôle de médicaments en tablettes tel que la Vicodin dans le cadre de l'étude de contrefaçon (Rodriguez-Cruz ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**), ou de l'étude de pilules d'ecstasy (Leuthold et Al, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**). Dans ce domaine, des appareils hybrides tels que le DESI-IMSQTOF utilisant la technologie de « l'ion mobility » pour une plus grande sélectivité, et un QTOF pour l'accès à la MS/MS avec une bonne résolution ont été développés pour la détection rapide (environ 2 minutes) des composés contenus dans des comprimés, des patches à la nicotine, ou des crèmes (Weston, *Anal.chem.*, **2005**).

Pour l'armée ou la sécurité des aéroports, des classes d'explosifs avec une sensibilité proche de la femtomole (Cotte-Rodriguez, *Anal.chem.*, **2005**) ont également été analysées avec succès sur ce type de source.

Des approches plus quantitatives ont également été étudiées, mais elles sont plus délicates à mettre en œuvre (impossibilité d'utiliser un standard interne dans un échantillon solide) ; cela nécessite d'augmenter le nombre d'analyses pour obtenir un résultat plus « statistique ». Les résultats restent cependant intéressants avec un RSD autour de 20% (Cooks et al, *Science*, **2006**).

Ainsi, les champs d'application du DESI s'avèrent particulièrement étendus, allant de la sécurité, à l'industrie pharmaceutique en passant par le biomédical.

Le champ d'application qui nous intéresse le plus est bien évidemment celui concernant l'analyse de tissus. Etant donné que l'analyse peut être réalisée à pression atmosphérique et sans préparation d'échantillon, le DESI permet d'étudier l'échantillon *in vivo* « en temps réel ». Des analyses directes en DESI ont été réalisées sur plusieurs catégories de tissus, permettant la détection de nombreux lipides du type phospholipides ; dans le pancréas de souris, des phospholipides ont été massivement détectés sous forme d'espèces cationisées au potassium ; l'identification a été confirmée par des expériences en MS/MS sur le tissu à l'aide d'un piège ionique. Dans le cas du cerveau de rat, des lipides équivalents ont été aisément détectés (Wiseman et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**).

Ces analyses de lipides sur tissus en DESI peuvent être réalisées, tout comme en ESI, en mode positif ou négatif, permettant la détection de lipides de différentes classes suivant la polarité : phosphatidylinositols et phosphatidylserines en mode négatif, et phosphatidylcholines et sphingomyeline en mode positif. Les profils de lipides détectés en DESI sont similaires à ceux d'un extrait lipidique du même tissu analysé en ESI, hormis la présence d'un plus grand nombre d'espèces cationisées dans le cas du DESI, probablement dû au K^+ endogène de la coupe (Puolitaival, et al. *Poster ASMS* **2005**).

Des analyses de sections de foie humain cancéreux, ont déjà permis de repérer des modifications touchant la distribution de certaines classes de lipides (phosphatidylcholines et sphingomyeline notamment), en comparant des tissus tumoraux et des parties saines (Figure I.3.4). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents de Glunde et coll (*Cancer Research* 2004) constatant une augmentation des classes de phosphatidylcholines dans des tissus cancéreux.

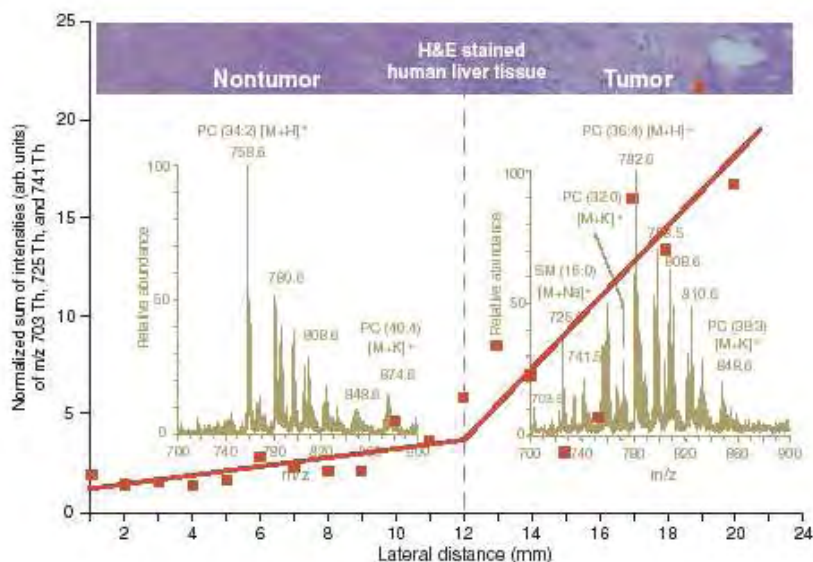


Figure I.3.4 : « Profiling » lipidique réalisé en DESI (mode positif) sur des coupes de foie humain cancéreux (adénocarcinome) sans aucun traitement préalable du tissu. La courbe rouge représente la distribution de la sphingomyeline (16:0) sous forme protonée, sous forme adduit Na^+ et adduit K^+ (m/z 703, m/z 725, m/z 741) suivant la position du spray dans la tumeur (spray 1 :1 méthanol/eau + hydroxyde d'ammonium 0,1%, (Wiseman et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005** et D'après Cooks et al, *Science*, **2006**).

Pour l'instant, la majeure partie des résultats publiés sur tissus ou cellules en « profiling » par DESI concerne la détection de lipides. Wiseman et coll lors de l'analyse d'une coupe de coeur de poulet sont néanmoins parvenus à détecter de petits peptides et des constituants provenant de l'hémoglobine ; l'analyse de peptides et de protéines serait donc viable par ce type d'approche, même si rien ne nous indique pour l'instant qu'une étude différentielle en protéomique puisse être réalisée.

Pour le moment, aucune image moléculaire n'a encore été réalisée avec cette technique, toutefois, cette possibilité d'analyse *in vivo*, c'est-à-dire de tissus encore vivants ou des cellules encore viables, remplissant toujours leur mission biologique, ouvre des potentialités et des applications pour le DESI qui sont impressionnantes.

En premier lieu, les analyses sont réalisées dans les véritables conditions physiologiques, sans traitement de l'échantillon, ni conditions d'analyses radicales pour le système biologique. Il n'y a aucun risque de modification des composés du tissu (oxydation, dégradation des produits...)

Ainsi, il est peut être possible d'analyser le même échantillon avant et après un traitement chimique, biologique ou pharmaceutique : pourquoi ne pas suivre en direct les effets d'un médicament anti-cancéreux sur des cellules, étudier le vieillissement de ces dernières et la

mise en place des processus d'apoptose, détecter les mécanismes des réactions immunitaires face à un organisme étranger, le rejet ou le maintien des greffes ?

Pour réaliser cette approche, il faut évidemment considérer que le nombre de cellules non détruites après l'acquisition, reste suffisant pour une nouvelle analyse. L'observation d'une section de tissu après analyse DESI montre que l'échantillon est gravement endommagé, quelle que soit la partie du tissu analysée (la partie tumorale pouvant être plus fragile par la présence de la tumeur). (Figure I.3.5).

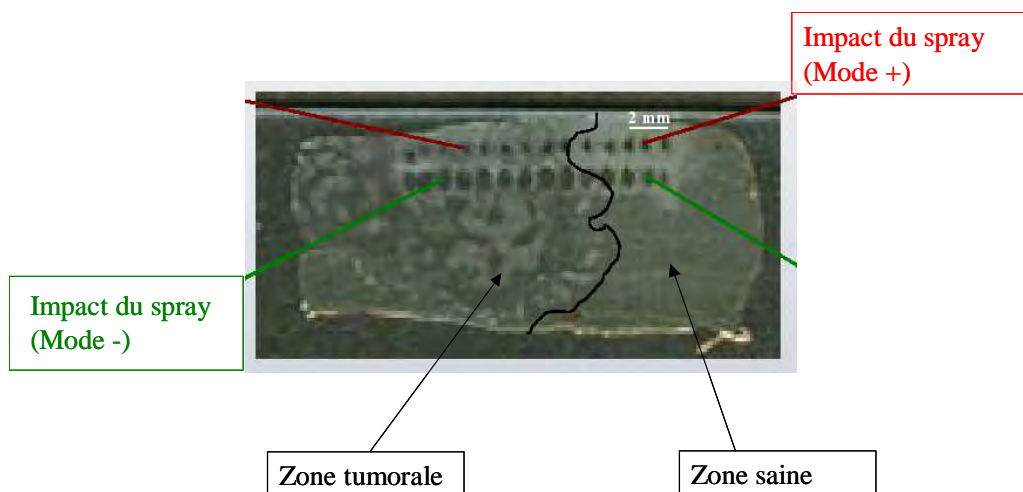


Figure I.3.5 : Observation des impacts du DESI sur une coupe de foie cancéreux, suivant la polarité (+ ou -) et la zone analysée (tumorale ou saine) (d'après Puolitaival, et al. *Poster ASMS 2005*).

La destruction du tissu est évidemment due à l'impact du spray sur la section nécessaire pour obtenir le phénomène de désorption. Ce phénomène est renforcé par la résolution latérale importante du spray variant de 500 μm à 1 mm. Cette résolution est évidemment un paramètre critique pour la qualité des images et de l'analyse lors de l'étude de profils au niveau cellulaire. Cette résolution trop importante est donc, pour le moment, un des facteurs limitant cette technique d'imagerie ; il existe néanmoins d'autres points qu'il reste à développer.

Les futures recherches sont en partie axées sur la diminution de la taille du spray, en réduisant par exemple, la taille de l'aiguille (Puolitaival, et al. *Poster ASMS 2005*). D'autres recherches sont axées sur l'étude de l'ionisation de différentes familles de composés (classes de lipides, acides nucléiques, peptides...), mais aussi sur la reproductibilité de l'analyse, sachant que de nombreux paramètres rentrent en compte pour réussir l'acquisition (angle du spray, débit, solvant etc.)

Ainsi, pour l'analyse directe sur tissus, sachant que les conditions de spray pour désorber en des protéines en DESI ne sont pas les mêmes que pour détecter des composés de plus petite

taille, sera-t-il possible d'obtenir en une seule acquisition et avec les mêmes paramètres, des protéines de taille intéressante et des lipides ou des peptides plus petits qui co-localisent ? Quelle sera la gamme de masse dynamique analysable par cette technique sur le tissu ?

De la même manière, les techniques MALDI et SIMS bénéficient dès le départ d'un système intégré permettant le déplacement très précis de l'échantillon en x et y ; à l'heure actuelle, la plupart des travaux publiés sur le DESI sont réalisés en utilisant une source électrospray classique, et celle-ci ne dispose pas d'un plateau x ; y permettant le déplacement de la coupe en automatique pour l'acquisition des images. Ce point d'automatisation nécessite d'importants développements « machine » qui sont pour l'instant en cours d'essais dans différents laboratoires (Puolitaival, et al. *Poster ASMS 2005*).

Le DESI sur tissus s'avère donc être une technique extrêmement prometteuse. Sans aucun traitement de l'échantillon et donc en analyse *in vivo*, des classes de lipides, parfois même impliquées dans des proliférations tumorales, ont pu être détectées et identifiées. Ces résultats ouvrent des possibilités remarquables pour l'imagerie et l'observation de composés au sein d'une coupe, avec la possibilité d'étudier des processus biologiques en temps réel.

Pour que cela devienne possible, de nombreux développements doivent être réalisés ; la taille du spray, la reproductibilité et les conditions de l'analyse, la gamme de masse dynamique et surtout l'automatisation de la technique pour l'imagerie, restent encore à faire.

Des sources DESI modifiées avec un spray plus fin (JEDI) commencent cependant à faire leur apparition, preuve que ces nouveaux développements sont en cours de réalisation.

Ainsi, il existe différentes techniques d'imagerie par spectrométrie de masse qui peuvent être choisies suivant plusieurs paramètres : le niveau cellulaire ou subcellulaire requis pour l'étude est un premier critère de choix, car si l'imagerie MALDI peut être appliquée tout comme le DESI et le SIMS, au « profiling » de drogues ou de lipides sur tissus (avec notamment l'accès aux images en mode MS/MS), la résolution latérale du MALDI reste 20 à 50 fois plus faible que celle obtenue lors d'analyse SIMS. L'imagerie MALDI apparaît donc comme complémentaire, car celle-ci est parfaitement adaptée à la détection et à l'imagerie de peptides et de protéines sur tissus contrairement aux deux autres techniques décrites ici.

De ce fait, Il est possible en MALDI d'effectuer des études protéomiques *in situ* de pathologies pour la découverte de biomarqueurs, tout en s'affranchissant des techniques d'extraction, de purification et de séparation de l'échantillon classiquement utilisées en protéomique. C'est typiquement ce genre d'application que nous rencontrons dans le cadre

d'étude sur le cancer de l'ovaire. L'ensemble des techniques avec différentes applications en fonction des caractéristiques des appareils sont réunies tableau I.3.1.

Substance(s) investigated	Sample (sample preparation method)	Lateral (depth) resolution *	Mass range observed as m/z (detection limits)	MS imaging method (laser or primary ion source)	Imaging time
Cholesterol, sulfatides, phosphatidylinositols and phosphatidylcholines	Mouse brain sections (freeze-drying)	~1 µm	800	Static TOF-SIMS (Au ₃ ⁺)	
Phospholipids, cholesterol and diglycerides	Mouse brain slices and mouse muscular cells grown onto plastic slips (drying)	427 nm	900	Static TOF-SIMS (Au ₁ ⁺ , Au ₃ ⁺)	1 h 30 min for 64 mm ² area
Phosphatidylcholines and 2-aminoethylphosphonolipid	The protozoan <i>Tetrahymena thermophila</i> (freeze-fracturing)	250 nm	184	Static TOF-SIMS	
Extract of the caffeine-containing plant <i>Ilex vomitoria</i>	C18 thin-layer chromatography plates	77µm	800 (5 ng)	Ion-trap ESI-MS	
Peptides and proteins	Serial mouse liver and human brain glioma sections of 5-12 µm (snap-freezing, cryostat cutting and thaw-mounting; matrix deposition by discrete droplets or spray-coating)	50 µm	35,000	TOF-MALDI-MS (337 nm)	-2 h for 80 x 96 pixel image
Proteins	Mouse brain and human glioblastoma xenograft sections (freezing, coating with a solution of matrix)	~25 µm	80,000	TOF-MALDI-MS (337 nm)	42 min for 1000 spot array
⁴⁰ Ca ²⁺ , ²⁴ Mg ²⁺ , ³⁹ K ⁺ , ²³ Na ⁺ , ⁸¹ Br ⁻ and ²⁶ CN ⁻	Primary fibroblast cells, leukemia progenitor cells and individual chromosomes (cells were cryofixed, cryofractured and dried)	Later ~50nm, depth ~20 nm	81 parts per million	Magnetic sector 3D-SIMS (Ga ⁺)	
¹² C, ²³ Na, ²⁴ Mg, ³⁹ K, ⁴⁰ Ca, ¹⁵² Gd, ¹⁵⁴ Gd, ¹⁵⁵ Gd, ¹⁵⁶ Gd, ¹⁵⁷ Gd, ¹⁵⁸ Gd, ¹⁶⁰ Gd and ²⁶ (¹² C ¹⁴ N)	LLC-PK1 kidney cells, T98G human glioblastoma cells (freeze-fracturing and freeze-drying)	500 nm	160	CAMECA IMS-3f SIMS (O ₂ ⁺)	0.4 s for 250 µm ₂ image
Substance P and β-cyclodextrin	Peptide standards (dried droplet preparation and picospotted samples)	0.6 µm	1384 (800 zmol for β-cyclodextrin)	SMALDI (262 nm and 337 nm)	3-50 min for 100 µm ² area
Antitumor drug SCH226374 and compound A	Mouse tumor sections, rat brain sections of 12µm (freezing, desiccating and drying on MALDI sample plate, spotting or coating with MALDI matrix)	~200 µm		Hybrid quadrupole TOF analyzer MALDI-QqTOF MS (337 nm N)	3.5 h for ~17 x 14 mm image

* Maximal lateral resolution presented was measured or estimated.

Abbreviation: SMALDI, scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization.

Tableau I.3.1 : Récapitulatif des techniques d'imagerie utilisables en fonction du type de composés analysé, de la résolution, de la gamme de masse analysable, et du temps d'acquisition. (D'après Rubakhin et coll, *Drug Discov Today*, **2005**)

Chapitre II

NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS

EN IMAGERIE

PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI

CHAPITRE II : NOUVEAUX DEVELOPPEMENTS EN IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI

OBJECTIFS ET ORGANISATION DU MEMOIRE

L'imagerie MALDI est une méthode en plein essor dont les nombreuses applications démontrent la pertinence dans les domaines de la pharmacologie, de la protéomique clinique et de la médecine.

Cette technologie déjà performante est cependant encore jeune, démontrant l'utilité de travailler sur de nouveaux développements pour sans cesse repousser ses limites.

Le but de ce travail est double : aider au développement de cette technologie prometteuse et bien sûr, utiliser cette technique pour des applications médicales ou biologiques.

Une des premières limites de l'imagerie MALDI concerne le choix de la matrice ; comme décrit précédemment dans la partie bibliographique, il existe de très nombreuses matrices et protocoles utilisables en MALDI, en fonction des propriétés physico-chimiques de l'analyte.

En imagerie MALDI et « profiling », seulement deux matrices (HCCA et SA) peuvent être facilement utilisées du fait des problèmes de cristallisation sur le tissu, et des faibles rendements ioniques parfois obtenus dans des conditions extrêmes. Une troisième matrice, le DHB, ne peut être utilisé que dans certaines conditions avec des résultats parfois variables, du fait du système de dépôt par ESI qu'elle requiert. Il devient donc important d'élargir le nombre de matrices utilisables dans ce domaine, afin d'augmenter le nombre d'analyses réalisables : accès plus facile au mode réflecteur, à toutes les polarités etc. (*Publication n°1*)

De la même manière, très peu de préparations d'échantillons ont été déterminées jusqu'à présent concernant le traitement du tissu ; les quelques exemples décrits dans le cadre de l'analyse d'acides nucléiques en solution démontrent l'intérêt de ces protocoles.

Un des rares traitements de coupe utilise l'éthanol comme solvant de rinçage. Les résultats sont cependant parfois variables et surtout aucune information n'est fournie lorsque l'analyse est réalisée sur des tissus longuement stockés où les signaux ont pu être perdus. (*Publication n°2*)

Tous ces travaux effectués en imagerie concernant notamment la recherche de biomarqueurs pour la protéomique clinique, ont été réalisés sur des tissus frais et congelés qui

sont parfois difficiles à conserver et à obtenir auprès des hôpitaux. De ce fait, aucune étude rétrospective sur 10, 20 ou 30 ans ne peut être réalisée en imagerie MALDI à cause d'un manque d'échantillons. Une solution consisterait à étudier la possibilité de travailler sur des tissus fixés et paraffinés, tels que ceux utilisés dans les bibliothèques des anatomopathologistes. Dans ces banques résident de très nombreuses biopsies issues de pathologies diverses qui sont classées et répertoriées par ces mêmes médecins depuis des années. L'analyse de ce type de tissu ouvrirait la voie de l'imagerie MALDI pour des études rétrospectives sur une multitude d'échantillons, pour la recherche ou l'étude de biomarqueurs (*Publication n°3*).

Aujourd'hui, l'analyse MALDI est plutôt dédiée à l'analyse de peptides et de protéines pour une gamme de masses allant jusqu'à 35 kDa environ, aucune information concernant les protéines de plus haute masses (100 kDa et plus), ou les oligonucléotides n'est pour le moment accessible par cette technique. L'imagerie permettant de réaliser en une seule analyse la localisation de plusieurs composés, serait-il possible d'envisager une multi détection pour ces molécules ? Ce point est important, car il permettrait de réaliser des cartes de co-localisation ARN/protéines, ADN/protéines, peptides/protéines de haute masse moléculaire, permettant d'approfondir ou de comprendre les processus biologiques qui y sont corrélés (*Publication n°4*).

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI a démontré son intérêt grâce aux nombreuses applications qui ont été réalisées. La majeure partie de celles-ci concerne la recherche de biomarqueurs dans des cancers tels que celui du cerveau, de la prostate ou du colon. Il est bien sûr important de pouvoir utiliser cette technique pour d'autres types de cancers ou de pathologies.

Parmi celles-ci, le cancer de l'ovaire est la troisième cause de mortalité tous cancers réunis. Pour cette maladie, il est nécessaire de développer des outils de diagnostic précoce et de découvrir de nouvelles molécules cibles, afin de développer des traitements plus efficaces. (*Travaux 5*)

1. Développements de nouvelles matrices pour l'imagerie par spectrométrie de masse Maldi

- **Les matrices et l'analyse directe de tissus**

La matrice en MALDI joue un rôle fondamental sur les processus de désorption/ionisation. De même, la qualité des images en imagerie MALDI est directement en rapport avec la qualité des spectres obtenus en analyse directe sur coupe.

Le tissu est un matériel biologique très complexe où les composés peuvent évidemment être présents à des concentrations très variées. Ce phénomène est accentué par la découpe du tissu en fines coupes de quelques microns, ce qui peut accentuer l'exposition du contenu des cellules avant l'analyse. A cela se rajoute la présence de sels qui peut également jouer sur la cristallisation. Il en résulte que les matrices ne fournissent pas les mêmes résultats lorsqu'elles sont utilisées en solution et sur tissus ; ainsi, le DHB particulièrement utilisé en MALDI classique pour l'analyse de peptides, protéines ou oligonucléotides, ne permet pas d'obtenir de bons rapports signal/bruit pour ces derniers lorsque il est appliqué sur la biopsie.

Le travail sur coupe apporte également des contraintes supplémentaires quant à la matrice à utiliser ; comme nous l'avons vu précédemment, l'homogénéité du dépôt est un paramètre indispensable pour ce type d'étude, obligeant dans certains cas (notamment pour le DHB dans l'étude des lipides) à recourir à des systèmes de dépôts particuliers qui sont parfois longs.

Par conséquent, les propriétés requises pour une nouvelle matrice utilisable en imagerie seraient :

- 1) une bonne qualité spectrale en terme de résolution, sensibilité, intensité du signal, rapport S/N...
- 2) une bonne cristallisation, notamment un bon pouvoir couvrant de manière à analyser un maximum de régions en un minimum de temps, ainsi qu'une homogénéité de cristallisation,
- 3) une grande stabilité du dépôt pendant l'analyse, (stabilité sous vide, résistance aux tirs lasers)

Une étude bibliographique des matrices utilisables en MALDI classique, nous montre l'énorme choix qui s'offre à nous pour cette recherche ; cependant, un critère décisif reste la cristallisation qui doit être homogène sur l'ensemble de la surface.

Pour cet aspect, l'imagerie se rapproche des critères indispensables à la réalisation d'analyses semi-quantitatives par MALDI. Dans ce domaine, des publications utilisent de nouvelles matrices appelées « matrices ioniques » basées sur la technologie des « liquides ioniques » utilisés en chimie organique.

- **Des liquides ioniques aux matrices ioniques...**

Les liquides ioniques sont des sels organiques de formule générale $[A^-, B^+]$, qui peuvent être formés par exemple à partir d'une réaction acide/base en milieu organique. Ces composés ont des propriétés très intéressantes et sont notamment capables de dissoudre la plupart des molécules organiques et inorganiques, tout en étant stables sous vide ou à haute température.

Utilisés depuis le début du 20^e siècle en chimie organique comme solvants, ils ont été longtemps appelés « solvants verts » du fait de leur étonnante capacité à être recyclés après les réactions (Welton, *Chem. Rev.* **1999**). De cette manière, les solvants plus toxiques tels que DMF, DMSO, THF, ont pu être remplacés par ces produits ioniques, qui pour leur part, ne sont pas ou peu toxiques pour l'homme. Ainsi, de nombreuses réactions de chimie organique classique ont pu être réalisées dans ces milieux, avec une réutilisation de ces composés jusqu'à 5 ou 6 fois sans modification des rendements de la réaction. D'autres expériences avec des catalyseurs, ou des réactions plus complexes de polymérisation ont également été décrites avec succès. Certaines réactions réalisées en électrochimie et en électrosynthèse organique démontrent que ces composés peuvent également conduire le courant électrique (Barhdadi et coll, *Chem. Commun.* **2003**).

Globalement, chaque couple $[A^-, B^+]$ peut présenter des propriétés physico-chimiques particulières telles que point d'ébullition, conductivité électrique, état physique (liquide ou solide) etc., ce qui signifie qu'un grand nombre de solvants aux propriétés différentes peut être produit.

Plus récemment, Armstrong et coll (*Anal. Chem.* **2001**), ont démontré la possibilité de coupler les propriétés des liquides ioniques avec celles des matrices MALDI créant des « matrices ioniques » et exploitant ainsi cette diversité.

Les matrices étant pour la plupart acides, de très nombreux produits ont pu être synthétisés en modifiant les couples matrice/base organique. Des matrices ioniques solides, liquides, et de couleurs multiples ont pu être ainsi décrites. Les études réalisées sur des peptides, protéines et polymères (PEG) ont démontré que les performances de ces matrices étaient parfois

supérieures à celles des matrices classiques, notamment en ce qui concerne la sensibilité, l'intensité des signaux obtenus et l'uniformité de la cristallisation, qui apparaissent comme 10X supérieure pour certaines matrices ioniques (N°29) par rapport à HCCA (Figure II.1.1). La diversité des propriétés physico-chimiques observées dans les liquides ioniques semble, de plus, conservée si l'on regarde le type de cristallisation de chaque matrice ionique, par rapport à la matrice de départ (Figure II.1.1 (2)) ; cela signifie qu'un grand nombre de matrices aux propriétés variables suivant la base et la matrice utilisées peuvent être synthétisées.

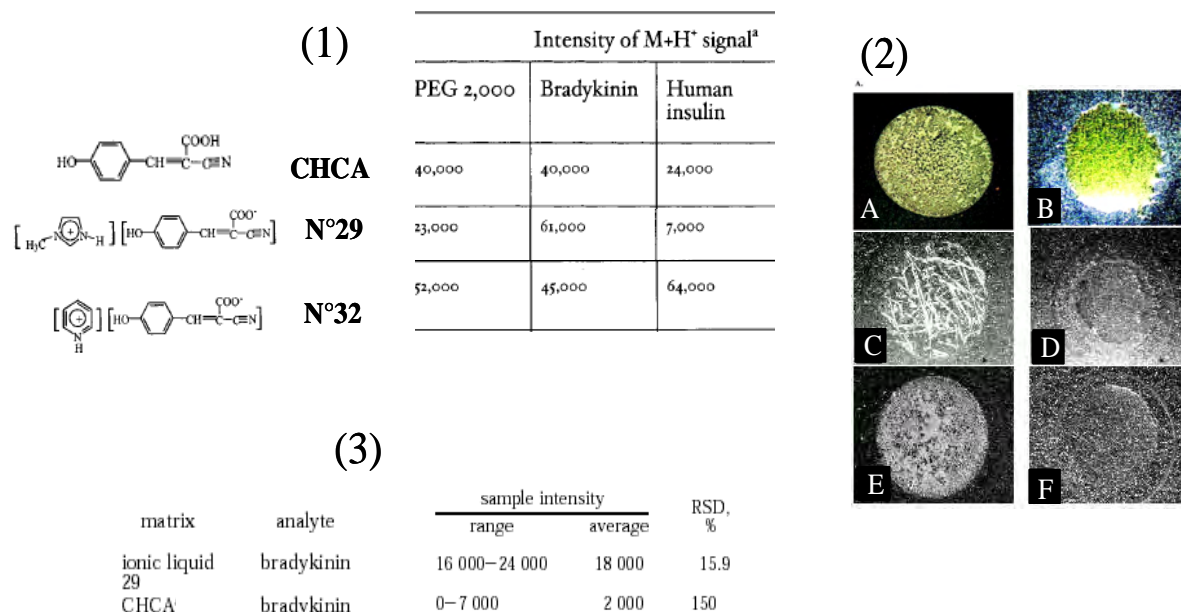


Figure II.1.1 : (1) Augmentation du signal observée lors de l'utilisation des matrices ioniques HCCA/1-méthyl-imidazole (N°29) et HCCA/pyridine (N°32) synthétisées à partir d'HCCA. (D'après Armstrong et coll, *Anal.Chem.* **2001**)

(2) Exemples de cristallisation de matrices ioniques liquides et solides : HCCA (A), HCCA/1-méthyl-imidazole ou N°29 (B), DHB (C), DHB/pyridine (D), SA (E), SA/ N, N-N, N-diméthyléthylènediamine (D'après Armstrong et coll, *Anal.Chem.* **2001** et Tholey et coll, *Anal. Bioanal Chem* **2006**).

(3) Analyse de l'uniformité de la distribution de la bradykinine en fonction de la matrice utilisée soit la matrice ionique N°29, soit HCCA. (D'après Armstrong et coll, *Anal.Chem.* **2001**).

Cette cristallisation a été le point de départ d'analyses semi-quantitatives par MALDI, pour des sucres (Mank et coll, *Anal.Chem.* **2004**), des amorces d'acides nucléiques et des peptides parfois même sans standard interne, (Li et coll, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **2004**, Tholey et coll, *Anal.Chem.* **2006**) ou des acides aminés, (Moghaddam et coll, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**).

Même si la plupart des matrices utilisées dans ces travaux sont à l'état liquide, l'équipe de Gross démontre que les études quantitatives sont parfois meilleures avec des matrices

ioniques solides où les cristaux sont très homogènes (Li et coll, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2004**).

Pour la quantification d'acides aminés ou de l'analyse de médicaments, (Santos et coll, *Anal.Chem.* **2004**), il existe toujours le risque d'une interférence entre les signaux de matrice et l'ion du composé à détecter, comme nous l'avons souligné lors de l'analyse directe de médicaments dans les tissus par MALDI. Cependant, les matrices ioniques produisent généralement moins d'ions de matrices que sa cousine avant conversion, ce qui facilite la détection des petits composés.

Une propriété supplémentaire qui pourrait nous intéresser pour une application en imagerie MALDI est le comportement sous vide poussé de ces composés ; dans une étude réalisée sur le 3HPA sous forme classique et sous forme matrice ionique, (Figure II.1.2) cette dernière semble avoir été moins dégradée après 48 heures passées dans le spectromètre de masse (Carda-Broch et coll, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**). Cette caractéristique peut s'avérer fort intéressante si l'on considère qu'une acquisition d'imagerie MALDI peut parfois durer jusqu'à quelques jours.

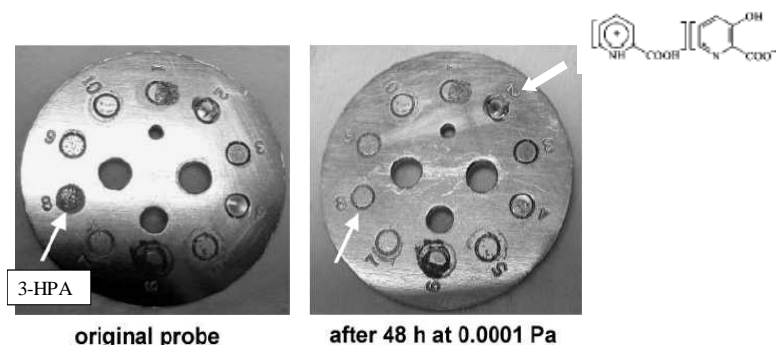


Figure II.1.2 : Comportement des matrices ioniques de type 3-HPA (spot 2, 5 et 6) par rapport au 3-HPA classique (spot 8) lors d'une exposition de 48H sous vide poussé (d'après Carda-Broch et coll, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003**).

Enfin, plusieurs applications utilisant ces matrices ont été recensées notamment concernant l'étude de carbohydrates, de phospholipides, de digests protéique ou de phosphopeptides, démontrant le vaste champ d'application de ces matrices (Tholey et coll, *Anal. Bioanal Chem* **2006**)

Cette grande variété de classes de molécules analysables et cette augmentation de l'intensité du signal pour celles-ci, cette stabilité plus importante de la matrice sous vide, les pics de matrice plus limités et cette homogénéité de la cristallisation font des matrices ioniques une classe de molécules à tester sur tissus pour d'éventuelles applications en imagerie MALDI.

Solid Ionic Matrixes for Direct Tissue Analysis and MALDI Imaging

R. Lemaire,^{1,†} J. C. Tabet,[‡] P. Ducoroy,[§] J. B. Hendra,[§] M. Salzet,[†] and I. Fournier^{*†}

Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Equipe imagerie MALDI, UMR-CNRS 8017, Bâtiment SN3, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France, Synthèse, Structure et Fonction de Molécules Bioactives, UMR-CNRS 7613, Boîte 45, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France, and Plateforme Protéomique, IFR 100, 8 Boulevard du Maréchal de Lattre de Tassigny, 21000 Dijon, France

Direct analysis of tissue by MALDI-MS allows the acquisition of its biomolecular profile while maintaining the integrity of the tissue, giving cellular localization, and avoiding tedious extraction and purification steps. However, direct tissue analysis generally leads to some extent to a lowered spectral quality due to variation in thickness, freezing tissue date, and nature of the tissue. We present here new technical developments for the direct tissue analysis of peptides with ionic liquid made of matrix mixtures (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)/2-amino-4-methyl-5-nitropyridine and α -cyano-4-hydroxycinnamic acid/*N,N*-dimethylaniline (CHCA/DANI)). The properties of these direct tissue analysis matrixes, especially CHCA/aniline when compared to CHCA, 2,5-dihydroxybenzoic acid, and sinapinic acid, are as follows: (1) better spectral quality in terms of resolution, sensitivity, intensity, noise, number of compounds detected, and contaminant tolerance, (2) better crystallization on tissues, i.e., coverage capacity, homogeneity of crystallization, homogeneity of crystal sizes, and time of crystallization, (3) better analysis duration in term of vacuum stability, (4) better resistance to laser irradiation especially for high-frequency lasers, (5) better ionic yield in negative mode, and (6) enough fragmentation yield to use the PSD mode on sections to get structural information. Applied to MALDI imaging on a MALDI LIFT-TOF with a 50-Hz laser frequency, these ionic matrixes have allowed the realization of a new type of image in both polarities and reflector mode using the same tissue section. These results give a new outlook on peptide tissue profiling by MS, characterization of compounds from tissue slices, and MALDI-MS high-quality imaging.

Since its introduction in the mid 1980s,¹⁻³ matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry has become

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

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille.

[‡] Université Pierre et Marie Curie.

[§] Plateforme Protéomique.

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

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

(3) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, 2, 151-153.

a powerful tool in the field of biological research and is used for the detection, identification, and characterization of peptides and proteins from complex mixtures. More recently, MALDI imaging was initiated by the Caprioli group⁴⁻⁶ and is now developed by several laboratories.⁷⁻¹¹ These developments were applied to several biological questions demonstrating the potential of MALDI in the medical field. In fact, direct analysis by MALDI is now used for pharmaceutical or proteomics questions to detect drugs¹²⁻¹⁴ for biomarkers discovery, or diagnosing pathology such as colon cancer,¹⁵ prostate adenocarcinomas,¹⁶ neuroendocrine carcinomas,¹⁶ and brain tumors.¹⁷

However, direct analysis of crude samples by mass spectrometry requires maximum resolution, sensitivity, and dynamic mass range since tissues are very complex systems presenting a wide range of molecules interacting together, some of which are expressed in very low concentration in comparison to some others or presenting very close *m/z* ratio. To obtain optimal performances, such a technique still requires new developments either in instrumentation (e.g., new detectors,¹⁸ higher repetition rate lasers, ion microscope images,¹⁰ and SMALDI technique for high-resolution imaging) or in sample preparation. Thus, one alternative is to develop new MALDI matrixes since a matrix is fundamental

(4) Caprioli, R. M.; Farmer, T. E.; Gile, J. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4751-4760.

(5) Stoekli, M.; Farmer, T. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* 2001, 7, 493-496.

(6) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* 2004, 76, 87A-93A.

(7) Spengler, B.; Hubert, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002, 13, 735-748.

(8) Li, L.; Garden, R. W.; Sreedler, J. V. *Trends Biotechnol.* 2000, 18, 151-160.

(9) Rubakhin, S. S.; Jurchen, J. C.; Monroe, E. B.; Sreedler, J. V. *Drug Discovery Today* 2005, 10 (12).

(10) Luxembourg, S. L.; Mile, T. H.; McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Anal. Chem.* 2004, 76, 5329-5344.

(11) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* 2003, 24, 9-14.

(12) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* 2003, 38, 1081-1092.

(13) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoekli, M. *Med. Aging Dev.* 2005, 126, 177-185.

(14) Bunch, J.; Clench, M. R.; Richards, D. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 3051-3060.

(15) Chaurand, P.; DuGue, B. E.; Pearsall, R. S.; Threadgill, D. W.; Caprioli, R. M. *Proteomics* 2001, 1, 1320-1326.

(16) Masumori, N.; Thomas, T. Z.; Chaurand, P.; Case, T.; Paul, M.; Kasper, S.; Caprioli, R. M.; Tsukamoto, T.; Shapell, S. B.; Matusik, R. J. *Cancer Res.* 2001, 61, 2239-2249.

(17) Schwartz, S. A.; Weil, R. J.; Johnson, M. D.; Toms, S. A.; Caprioli, R. M. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 961-967.

(18) Chaurand, P.; Hayn, G.; Matter, U.; Caprioli, R. M., Poster presented at the 52nd ASMS Conference, Nashville, TN, 2004.

for the desorption/ionization process, thus contributing to spectral quality, i.e., peak resolution, sensitivity, intensity, and noise. Actually, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid¹⁹ (CHCA), 2,5-dihydroxybenzoic acid²⁰ (2,5-DHB), and sinapinic acid²¹ (SA) are the three matrixes commonly used for the analysis of peptides/proteins. For direct analysis of tissues, matrix choice is even more restrictive since homogeneity of crystallization becomes a crucial parameter in such conditions. In this respect, CHCA and SA are good candidates for direct analysis whereas 2,5-DHB crystallization is too heterogeneous for such applications except if a special spotting systems is used. Nevertheless, direct tissue analysis generally leads to some extent to a lowered spectral quality due probably to the tissue, e.g., thickness, freezing date, or type of tissue. Thus, development of new matrixes for tissue analysis is therefore a necessity for addressing such problems.

The properties of a new matrix for MALDI imaging as compared to CHCA, SA, or 2,5-DHB must be (1) better spectral quality in term of resolution, sensitivity, intensity, noise, number of compounds detected, and tolerance for contaminants, (2) better crystallization on tissues, i.e., covering capacity, homogeneity of crystallization, homogeneity of crystal sizes, and time of crystallization, (3) better analysis duration in term of vacuum stability, and (4) better resistance to laser irradiation especially for high-frequency lasers.

As previously described by Armstrong et al.,²² coupling ionic liquids to MALDI matrixes could generate better matrixes. In fact, ionic liquids are increasingly used particularly in organic synthesis²³ and present lots of different interesting properties such as solvent recycling, low vapor pressure, or electrical conductivity.²⁴ Ionic liquids can be obtained from an acid/base reaction leading to liquids presenting the general formula [A⁺, B⁻]. Classical MALDI matrixes being acidic, acid/base reactions were already tested and could be performed using different bases to synthesize salt complexes with different MALDI ionic matrixes (2,5-DHB, CHCA, sinapinic acid, and 3-HPA²⁵).

In the present study, we report that, in many cases, the solid ionic matrixes' performance is equal or higher than their classical analogues. Particularly, a significant signal and sensitivity improvement were observed for aniline and dimethylaniline derivatives. Considering the properties of some liquid ionic matrixes as previously described by Mank and co-workers,²⁶ and in particular shot-to-shot reproducibility, softer desorption properties, increase of signal/noise ratio, broader applicability, and high stability under vacuum conditions, we were interested in using solid ionic matrixes for peptide analysis directly from tissue samples. Experiments on rat brain sections demonstrate the use of such solid ionic matrixes for direct analysis of tissues especially looking in terms of shot-to-shot reproducibility, higher stability under vacuum,

crystallization homogeneity, signal intensity in both positive and negative modes, sensitivity, and performances in PSD mode. Used to perform molecular imaging, solid ionic matrixes have also shown interesting properties compared to classical matrixes with very low ablation rate and especially for high laser repetition rates (>20 Hz) allowing several scans of the same tissue section without any loss in signal intensity.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. CHCA, aniline (ANI), *N,N*-dimethylaniline (DANI), *N,N*-diethylaniline (DIENI), triethylamine (Et₃NH), 2-amino-4-methyl-5-nitropyridine (2A4M5NP), 3-aminoquinoline (3AQ), pyridine (PY), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), piperidine (PIP), angiotensin 2, 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 and acetonitrile p.a. and methanol p.a. from J. T. Baker.

Sample Solutions. (a) **Calibration Mixture.** External calibration was performed using a solution of standard neuropeptides 1.6 μ M bradykinin, 1.6 μ M substance P, 1.6 μ M ACTH 18–39, 3.2 μ M ACTH 7–38, 4.8 μ M bovine insulin, and 4.8 μ M bovine ubiquitin in 0.1% TFA/H₂O. External calibration was performed on sample deposited on the sample holder. Thus, with the variations of tissue slices thickness (ranging from 15 to 20 μ m), differences of calibration were noticed when comparing mass spectra from different tissue slices.

(b) **Sensitivity Tests.** Substance P at 2.5 μ M in 0.1% TFA/H₂O was diluted 9 times in water in order to get concentrations ranging from 1 pmol/ μ L to 125 amol/ μ L.

(c) **Intensity Tests.** For positive mode analysis, substance P was used at 0.8 μ M. ACTH 18–39 was used at 3.2 μ M for negative mode.

Preparation of Ionic Matrixes. All solid ionic matrixes (CHCA/DANI, CHCA/2A4M5NP, CHCA/3AQ) and liquid ionic matrixes (CHCA/DIENI, CHCA/DBU, CHCA/Et₃NH, CHCA/PIP) can be produced using classical protocols used for ionic liquids synthesis.^{22,23} The 50-mg samples of CHCA, SA, or other MALDI matrix were dissolved in 20 mL of methanol. An equimolar amount of base was added. The solution was mixed for 1 h, and the solvent evaporated in a vacuum evaporator for 45 min ($T = 50$ °C, $P = 40$ mbar). The resulting compound was placed in a desiccator for 30 min to eliminate residual solvent and stored at -20 °C. Just before use, the ionic matrixes were prepared by dissolving 10 mg of compound in 1 mL of acetonitrile/water (2:1, v/v, 0.1% TFA).

Both solid ionic matrixes used in this study, CHCA/ANI and CHCA/PY, can also be prepared just before use, following a faster protocol: 1 equiv of base (4.8 μ L for CHCA/ANI and 4.29 μ L for CHCA/PY) was added to a solution of 10 mg/mL CHCA (1 mL) in acetonitrile/water (2:1, v/v, 0.01% TFA). The mixture was then vortexed and sonicated for 10 min before application to the tissue.

For classical CHCA and SA, 10 and 20 mg of the matrix were dissolved respectively in 1 mL of acetonitrile/water (2:1, v/v, 0.1% TFA/H₂O).

Tissue Preparation. Adult male Wistar rats weighing 250–350 g (animal use accreditation by the French ministry of the agriculture No. 04860) were used in the study and maintained under standard care. Animals were sacrificed by decapitation and

(19) Beavis, R. C.; Chaudhary, T.; Chait, B. T. *Org. Mass Spectrom.* 1991, 27, 156–158.

(20) Stropat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* 1991, 111, 89–102.

(21) Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989, 12.

(22) Armstrong, D. W.; Zhang, L. K.; He, L.; Gross, M. L. *Anal. Chem.* 2001, 73, 2679–2686.

(23) Welton, T. *Chem. Rev.* 1999, 22, 2071–2083.

(24) Barhdadi, R.; Courtinard, C.; Nedelec, J. Y.; Troupel, M. *Chem. Commun.* 2003, 12, 1434–1435.

(25) Carda-Broch, S.; Berthold, A.; Armstrong, D. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 553–560.

(26) Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. *Anal. Chem.* 2004, 10, 2939–2950.

Table 1. Signal Evolution in Positive and Negative Modes Using CHCA/2A4M5NP or CHCA/DANI versus CHCA

matrix	mode	analyte	# ^a	signal ^b intensity range	average ^b intensity	rsd ^c (%)
CHCA/2A4M5NP	+	SP	10	14000–29000	21000.0	20.0
CHCA	+	SP	10	1830–14500	5038.5	63.0
CHCA/2A4M5NP	+	apoMb	5	1851–14500	2011.0	7.0
CHCA	+	apoMb	5	670–1528	1084.0	31.6
CHCA/2A4M5NP	–	ACTH 18–39	10	2208–8564	4380.5	50.0
CHCA	–	ACTH 18–39	10	1116–7226	1982.5	65.5
CHCA/DANI	–	ACTH 18–39	5	5529–18000	10218.0	48.0

^a #, number of experiments (sample/matrix preparation and analyses) using new preparations each time. ^b Signal intensity values are given for $[M + H]^+$ or $[M - H]^-$ ions in counts number (a.u.). ^c Rsd, relative standard deviation.

immediately dissected to remove the brain. Frozen sections of 15 or 20 μm were obtained in a cryostat and transferred onto the MALDI stainless steel plate.

Sample Preparation for MALDI/MS Analysis. For direct analysis, 20 μL of matrix solution was applied onto the frozen section using a micropipet. The sample was then allowed to dry at room temperature.

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

MALDI-MS Analysis. MALDI-TOF mass spectra were acquired on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA) using delayed extraction and a pulsed nitrogen laser at 337 nm.

(a) **Classical Analysis in Linear Mode.** Acquisition parameters were set as follows: acceleration voltage, 20 kV; first grid voltage, 94%; guide wire voltage, 0.05%; extraction delay time, 200 ns.

(b) **Direct Analysis in Linear Mode.** Acquisition parameters were as follows: acceleration voltage, 25 kV, first grid voltage, 94%; guide wire voltage, 0.05%; extraction delay time, 200 ns.

(c) **Direct Analysis in Reflector Mode.** The following parameters were used: acceleration voltage, 25 kV; first grid voltage, 75%; guide wire voltage, 0.05%; extraction delay time, 200 ns. Each recorded mass spectrum results from the average of 400 laser shots on the area of interest, considering four or five different localizations depending on the size of the cut. Slices were visualized in the mass spectrometer with a color CCD camera (SONY).

(d) **PSD Mode.** The following parameters were used: acceleration voltage, 25 kV; first grid voltage, 72%; extraction delay time, 200 ns. The ion precursors were selected using the timed ion gate (12 mm) of the instrument. Acquisition of the product ions was usually done at 1.0, 0.98, 0.85, 0.75, 0.60, 0.41, 0.27, 0.19, 0.12, 0.067, and 0.05 mirror ratios, and the resulting individual spectra (each an average of 200 shots) were stitched to produce a composite product ion spectrum. In the case of in situ direct analysis, only the three first windows (1.0, 0.98, 0.85) were used.

MALDI Imaging. For MALDI-IMS, imaging was performed on the Ultraflex LIFT-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, DE) in reflector positive and negative modes, using a 337-nm pulsed nitrogen laser and with a repetition rate of 50 Hz. For image reconstruction, the FlexImaging v. 1.0.6.0 software (Bruker Daltonics) was used. For positive mode, 10 000 points covering the whole slice with 100 laser shots per position were scanned, and for negative mode, 8000 points with 100 shots were performed.

From each position, the software records an average mass spectrum with its coordinates on the slice. Images were reconstructed using the same parameters for CHCA and for ionic matrix.

RESULTS AND DISCUSSION

Several ionic matrixes were synthesized and first tested on standard compounds. Three of these matrixes (solid) were further studied regarding their properties and are presented below. In particular, two new solid ionic matrixes, CHCA/2A4M5NP and CHCA/DANI, were compared with the previously described CHCA/ANI.²²

Studies with Standards. CHCA/DANI was obtained from a reaction between CHCA and the base *N,N*-dimethylaniline. On the other hand, CHCA/2A4M5NP was synthesized by acid/base reaction between two classical matrixes, CHCA and a basic matrix, 2A4M5NP.²⁷ Both matrixes were evaluated for the production of MS ion signal in positive and negative modes by recording 400 laser shots moving slowly around over the whole spot of a mixture of substance P (500 fmol/ μL) or ACTH 18–39 (1 pmol/ μL).

(a) **Evaluation of Spectral Quality in Positive Mode.** The first step was to compare the energy threshold for ion production of substance P and ACTH 18–39, respectively, with CHCA/DANI, CHCA/2A4M5NP, and CHCA/ANI matrixes. In all cases, variations were always less than 3% between CHCA and these solid ionic matrixes. Furthermore, in all our intensity studies, the laser energy was set 20% higher than the energy threshold for peptide ions production in order to obtain high enough signal. In the positive mode, a significant signal increase was observed using CHCA/2A4M5NP ionic matrix (Table 1). The signal was 3.5-fold higher with the ionic matrix in the case of substance P than with CHCA. For apomyoglobin, the signal was also higher by a factor of 1.8 with the solid ionic matrix, demonstrating the usefulness of this matrix for both peptide and protein analysis. However, we must note that the apomyoglobin signal is wide, resulting in low resolution. This can probably be attributed to matrix adducts as observed for 2A4M5NP in its nonionic form.²⁷ For CHCA/ANI and CHCA/DANI on substance P, results were in the same order as for CHCA/2A4M5NP (data not shown) and for CHCA/ANI comparable to what was previously obtained by Armstrong et al.²² for bradykinin.

(b) **Evaluation of Spectral Quality in Negative Mode.** Negative mode could be advantageous for direct analysis of tissue, especially for detection of compounds such as phosphorylated

(27) Fitzgerald, M. C.; Parr, G. R.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* 1993, 65, 3204–3211.

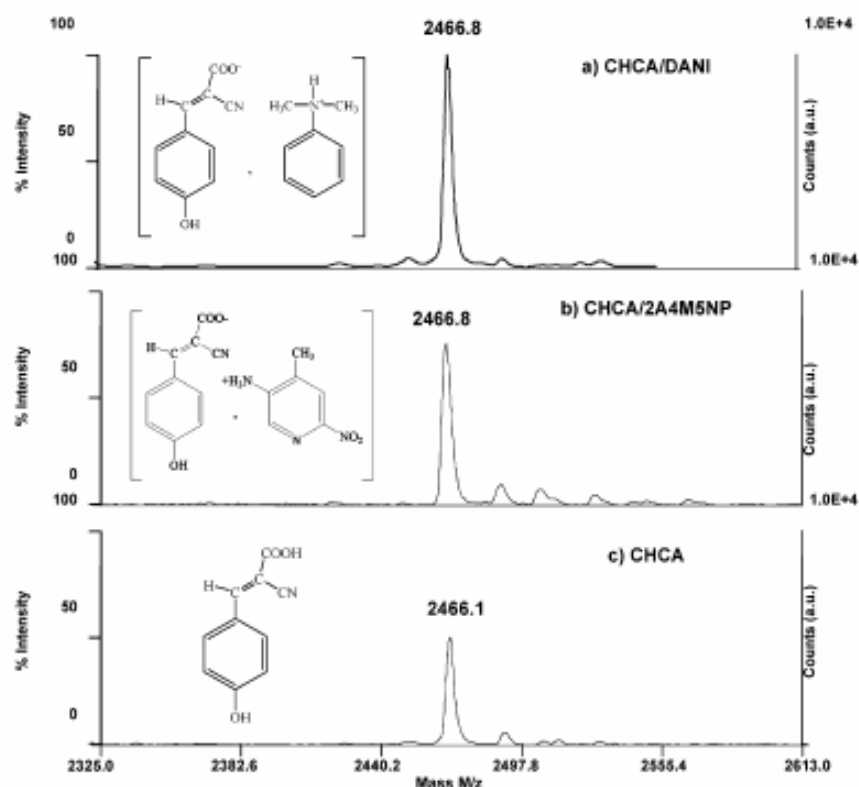


Figure 1. Typical MALDI mass spectrum obtained for ACTH 18–39 (1 pmol) in the linear negative ion mode using CHCA/DANI (a), CHCA/2A4M5NP (b), and CHCA (c) as matrix. Ionic matrix formula is enclosed to each mass spectrum.

peptides,²⁸ lipids,^{29,30} or phospholipids³¹ that may show extensive adduct signals in positive mode. It can also be used to obtain complementary structural information using PSD.³² Reduction of salt signals lead to a resolution increase and easier interpretation of data. Generally, negative ion mode is not extensively used in MALDI because ion production yields with conventional matrices give low counts of negative ions. Here, we have tested the ionic matrixes in order to find out whether they may give better ion yields in this mode than conventional matrixes. Ionic matrixes have been previously tested for low molecular weight compounds²⁸ (amino acid), but no studies on peptides/proteins have yet been done. In negative mode, the best signals were recorded for the three solid ionic matrixes CHCA/ANI, CHCA/DANI, and CHCA/2A4M5NP (Table 1). A 2-fold increase in signal was observed as presented for ACTH 18–39 with solid ionic matrixes (Figure 1a and b) in comparison with CHCA (Figure 1c). In the case of CHCA/2A4M5NP, this increase could be attributed to the 2A4M5NP group of the ionic matrix. The basic properties of this group could help in the ionization step (deprotonation of the

analyte) by enhancing proton transfer from the analyte to the matrix. In this respect, for classical matrix deprotonation of the analyte would be more difficult since the matrix only shows acidic properties. Ionic matrixes are salts that display the characteristics of both acidic and basic groups, as was observed in previous organic studies.²⁸ Looking to these results, CHCA/DANI and especially CHCA/ANI have proved to be the best matrixes in term of signal intensity enhancement in both the positive and negative modes.

(c) Sensitivity Tests. To detect biomolecules in tissue, matrixes must be very sensitive due to the low amount of material contained in a tissue section of 15 μm (for each species of peptide) and the low accessibility of molecules embedded in cells or tissue. This can be particularly critical when tissue is analyzed for discovering potential biomarkers.

Sensitivity of CHCA/2A4M5NP and CHCA/DANI was tested using substance P and ACTH 18–39 peptides at different concentrations in both negative and positive modes. Best results were obtained using CHCA/DANI. The limit of detection was found to be 250 amol in the positive mode and 100 fmol in the negative mode. These values have to be compared to CHCA for which the minimum amount detectable has been found in our experimental conditions to be respectively 1 and 250 fmol. Although, CHCA/2A4M5NP with 150 fmol has shown better sensitivity than CHCA in the negative mode, it appeared to be 100 times less sensitive than CHCA in positive mode. CHCA/ANI was found to be more sensitive than CHCA on substance P in the positive mode as previously observed by Armstrong et

- (28) Asara, M.; Allison, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 35–44.
 (29) Schiller, J.; Sob, R.; Arnhold, J.; Fuchs, R.; Lebig, J.; Muller, M.; Petkovic, M.; Spatkeholz, H.; Zschörnig O.; Arnold, K. *Prog. Lipid Res.* 2004, 43, 449–488.
 (30) Al Saad, K. A.; Zabravskov, V.; Siems, W. F.; Knowles, N. R.; Hannan, R. M.; Hille, H. H., Jr. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003, 17, 87–96.
 (31) Estrada, R.; Yappert, M. C.; *J. Mass Spectrom.* 2004, 39, 412–422.
 (32) Clipston, N. L.; Jai-Nhuktan, J.; Cassidy, C. J. *Int. J. Mass Spectrom.* 2003, 222, 363–381.
 (33) Moghaddam, M. Z.; Heinze, E.; Tholey, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 141–148.

D Analytical Chemistry

Table 2. Evaluation of Several Ionic Matrixes, in Terms of Crystallization on the Tissue Slice and Intensity of Signal (Both Linear and Reflector Modes) Considering Positive Voltages^a

matrix	form	crystallization on tissue ^b	signals ^b	
			linear	reflector
CHCA/ANF	solid	++++	+++++	+++++
CHCA/DANI ^d	solid	++	+++	+++
CHCA/DIEANI ^c	liquid	+	-	-
CHCA/2A4M5NP ^d	solid	+++++	++	-
CHCA/DBU ^d	liquid	+	-	-
CHCA/PY ^c	solid	+	-	-
CHCA/ET ₃ NH ^c	liquid	+	-	-
CHCA/PIF ^d	liquid	+	-	-
CHCA/2AQ ^c	solid	+	-	-
CHCA	solid	+++	+++	++

^a Photographs of the matrix crystals of CHCA/ANI (a), CHCA/2A4M5NP (b), and CHCA/DANI (c) in comparison with conventional CHCA (d). ^b +++++, best results; +, worst results; and -, no signal recorded. ^c Adapted from Armstrong et al.²² ^d New ionic matrixes.

al.²² for bradykinin. In the negative mode, sensitivity was the same as for CHCA/DANI (100 fmol).

Direct Analysis of Tissue in Positive Mode Using Ionic Matrixes. Based on previous studies using standards, several ionic matrixes were chosen for direct analysis, either for their properties in term of ion signal intensity, sensitivity, or their ability to crystallize. According to these criteria "aniline derivatives" are of great interest for their high sensitivity. On the other hand, pyridine derivatives gave high increase of ion signal in a wide mass range. Finally, some other matrixes such as liquid matrixes with Et₃N or diethylaniline or some solid ionic matrixes^{33,34} result in more homogeneous crystallization than classical preparation. Several types of ionic matrixes were tested in order to find those with the best crystallization, sensitivity, and signal intensity potentials when applied to tissues.

(a) Study of Crystallization on Tissue. To compare crystallization pattern, matrixes were simply applied on the whole tissue surface using a micropipet without using a sprayer or any other techniques for improving crystallization. Two matrixes, CHCA/ANI (Table 2a) and CHCA/2A4M5NP (Table 2b), have given a very thin crystal layer covering the entire tissue. Very small and homogeneously distributed crystals were observed in the case of CHCA/2A4M5NP. For classical matrixes, spotting generally gives irregular crystals covering only 50% of the tissue.³⁵ It must also be noted that ionic matrixes have a high vacuum stability,³⁵ making them very suitable for direct tissue analysis or MALDI imaging since experiments are longer than for classical MALDI. For CHCA/DANI (Table 2c), crystallization leads to the formation of big red/orange crystals covering most of the area of the tissue. Coverage can be improved by increasing the concentration of the matrix (10 mg in 500 μ L of acetonitrile/0.1% TFA in water 2:1,

v/v.). However, the size of crystals decreases the homogeneity of the coverage in comparison with classical CHCA (Table 2d). For other ionic matrixes, crystallization is generally at the rim of the slice (CHCA/PY) or crystals grow in packets covering only some parts of the cut (CHCA/DIEANI, CHCA/ET₃NH). This lack of homogeneity in coverage can complicate the analysis and makes these matrixes not very suitable for direct analysis.

Thus, CHCA/2A4M5NP and CHCA/ANI have shown to be the best suited ionic matrixes for direct analysis of tissue in term of crystallization. These matrixes were then studied in term of signal intensity. Data are summarized Table 2.

(b) Direct Analysis in Linear and Reflector Mode (Positive Mode). For comparison of intensity, one spot of an ionic matrix and one spot of CHCA were applied very close together on the same slice. This experiment was repeated over 5 times on several slices in order to check out the reproducibility.

In linear mode, the best signals were obtained using the ionic matrix CHCA/ANI at the same laser energy above the threshold for ion production. For this matrix on rat brain sections, peptides present a better signal intensity using the solid ionic matrix than CHCA (Table 3). This increase is especially obvious for peptides at m/z 2507.8 and 4289.1. Comparing the number of peptides detected with both matrixes, all peptides observed with CHCA are retrieved with CHCA/ANI with at least the same intensity. However, a few peptides are only detected with the solid ionic matrix, e.g., m/z 3076.4 and 3459.7 (Table 3). This demonstrates the advantage of solid ionic matrixes for proteomic analysis. For CHCA/DANI, good signal intensity was observed too, and for peptides at m/z ~1800, CHCA/DANI was better than CHCA. For higher masses, signal was equivalent to the signal intensity observed with CHCA. In the same way, CHCA/2A4M5NP and CHCA/PY give less response than CHCA (data not shown).

In the case of liquid ionic matrixes CHCA/DIENI and CHCA/ET₃NH, no good signal was recorded from direct analysis. This

(34) Li, Y. L.; Gross, M. L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15, 1833–1837.
 (35) Schwartz, S. A.; Rejzner, M. L.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* 2003, 38, 699–708.

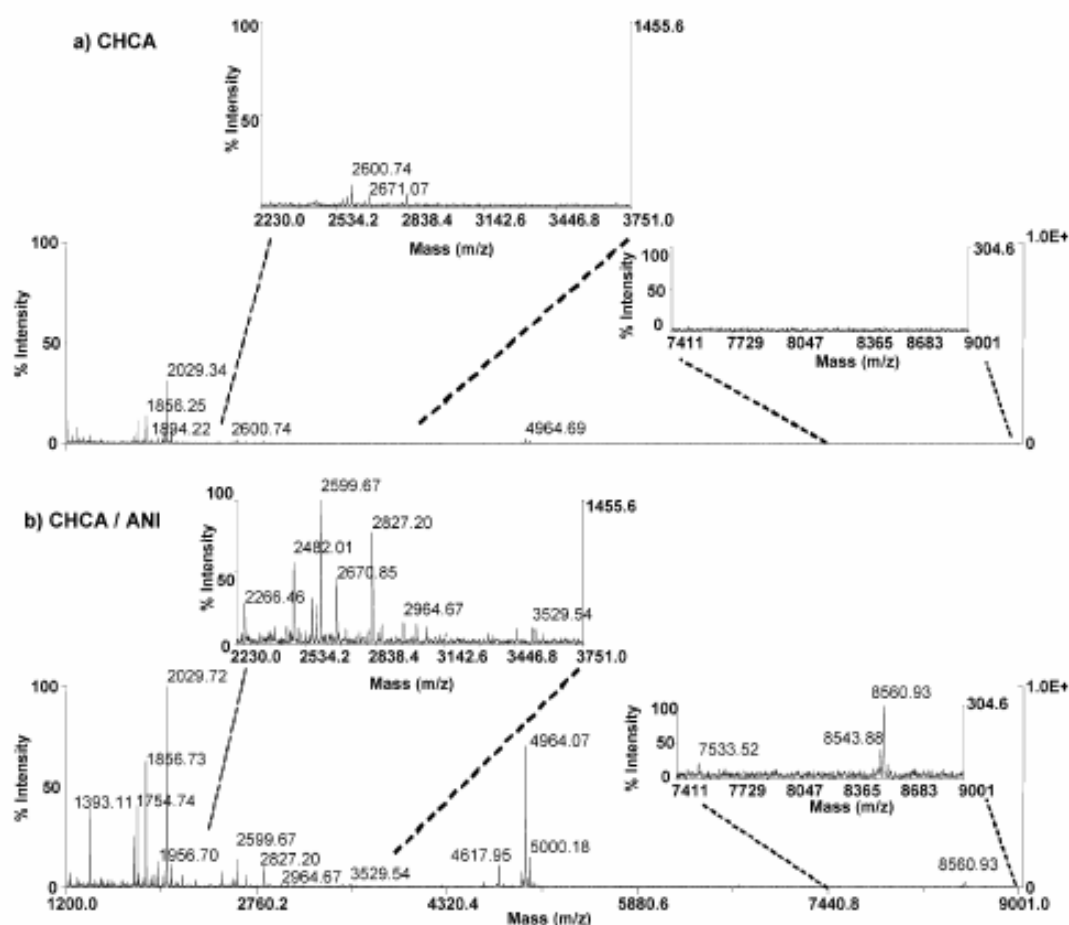


Figure 2. MALDI mass spectra recorded during direct analysis of a rat brain section in reflector positive mode using (a) CHCA and (b) CHCA/ANI for mass range 1200–9000.

was attributed to the important laser fluence required for desorption/ionization of molecules using these matrixes. This phenomenon is observed in addition to the increase of fluence generally required for all experiments when working with tissue slices. However, this result could also be explained by assuming a poor incorporation of the molecules embedded in the tissue into the matrix crystals or some critical parameters obstructing the desorption process. The different acquisition parameters of the instrument were modified (grid voltage, laser fluence, or delay time), but no interesting spectra were recorded.

In the reflector mode, the increase of signal using CHCA/ANI (Figure 2b) and CHCA/DANI compared to CHCA (Figure 2a) was confirmed. Increase of intensity for the two ionic matrixes is easily observed in the mass spectra. In all cases, CHCA/ANI has always shown higher signal intensity than CHCA. (Figure 2) Moreover, ions in the mass range m/z 2230–3750 and especially at m/z 8600 are observed whereas nearly no ions are detected above m/z 5000 for CHCA. A similar trend in signal increase was observed using CHCA/DANI but to a less extent than for the aniline derivative (data not shown).

Thus, ionic matrixes as CHCA/ANI result in better accuracy and sensitivity on tissue in the reflector mode for an extensive mass range (m/z 1000–10 000) in comparison with CHCA.

F Analytical Chemistry

We also compared mass spectra recorded with SA to those obtained with CHCA/ANI ionic matrix for direct analysis. SA was tested due to its common use as matrix for direct tissue analysis.³⁵ As expected, better signals were detected using the ionic matrix for mass range below m/z 5000.

Other ionic matrixes formed between sinapinic acid and aniline, *N,N*-dimethylaniline, or *N,N*-diethylaniline base were also synthesized and tested. However, the results obtained were generally equivalent to the classic SA matrix (data not shown).

(c) *In Situ* Direct PSD. The signal increase for CHCA/DANI and CHCA/ANI was used in conjunction with PSD to study peptide fragmentations directly from tissue sections. In spite of the known fact that ionic matrixes produce less fragmentation³⁴ than CHCA, the signal increase should be sufficient to overcome this deficiency. However, PSD directly from tissues is always problematic, leading to very few fragment ions even for small peptides. CHCA is known to be the matrix of choice for fragmentation by PSD. Even when using CHCA, scarce fragmentations have been observed when directly probing tissue. When PSD was performed with the ionic matrixes, a higher fragmentation yield was observed in tissue with CHCA/ANI (Figure 3). Some mirror ratio windows (below 0.75) have given nearly no fragment ions. This *in situ* PSD was repeated several times on different slices from the same brain,

Table 3. Typical Variation of Signal Intensity between CHCA/ANI and CHCA for Direct Analysis on Rat Brain Slice in the Mass Range m/z 1000–10 000 for 16 Peptides

m/z		probable assignment ^a	sequence	intensity ^b		increase factor ANI/CHCA
obsd	calcd			matrix CHCA	matrix ANI	
1087.4	1087.4	Arg vasopressin	CYFQNCPRG	283	325	1.1
1513.9	1514.7	melanotropin γ	YVMGHFRWDRF	328	654	2.0
1641.0	1639.7	somatostatin	AGCKNFFWKFTSC	284	644	2.3
1690.2	1689.9	neurotensin	QLYENKPRRPYL	139	674	4.8
1789.1		unknown		1610	4190	2.6
1844.0	1845.8	C-terminal flanking peptide	ALNSVAYERSAMQNYE	143	425	3.0
1859.1		unknown			5896	3.0
2271.3	2273.1	prolactin releasing peptide PrPR2	TPDINPAWYTGIRPVGRF	411	848	2.1
2351.1	2351.16	CLIP (1-21)	PVKVFNVAENESAEAPLEF	100	283	2.8
2506.2	2507.8	unknown		182	3417	18.8
3076.4		unknown			220	
3459.7	3461.6	C-flanking peptide of NPY	SSPETLISDLLMRESTENAP- RTRLEDPSMW		168	
4289.1		unknown		131	1816	13.9
4970.1		unknown		7187	57000	7.9
6221.4		unknown		103	1125	10.9
6176.6		unknown			130	

^a Assignments based on molecular weight measurements.^{4,11} ^b Analysis were performed at the same laser intensity (considering energy threshold for ion production)

from different brains, and for different peptide ion precursors. Reproducible fragmentation was observed for each parent ion using the same acquisition parameters. Different delay time, accelerating voltage, or laser intensity were studied in order to optimize the fragmentation. However, no total PSD was obtained. PSD fragmentation can be obtained from precursor ion masses of up to m/z 2000 (e.g., m/z 1785). For CHCA/DANI, little fragmentation was observed for molecules in the low-mass range ($< m/z$ 1000). For higher masses, no significant fragmentation was observed probably due to the weak intensity of the parent ion (data not shown).

To understand the poor fragmentation rate observed in tissue, we checked out the hypothesis that it could be due to the presence of salts. Salt adducts are known to be very stable in the gas phase and consequently lead to poor fragmentation rates. If some of the compounds observed are cationized ions, they will not result in any fragmentation. In this respect, if negative mode analyses are performed, this will remove any ambiguity as to the nature of the ions since in classical conditions mainly $[M - H]^-$ ions are observed. However, considering, for example, m/z 1785 peptide, presenting very few fragmentations in PSD in positive mode, we have performed the same analysis in negative mode, where the peptide peak is observed at m/z 1783 and corresponds to the $[M - H]^-$ ion. The mass shift is of only two mass units as compared to the positive mode, demonstrating that the ions are in their protonated $[M + H]^+$ form in the positive mode. Thus, difficulties of fragmentation in positive mode on tissue sections cannot be attributed to adduct ions and must probably come from more

complex factors. Low fragmentation rates could suggest that ions formed from tissue slices would have less internal energy.

(d) Direct Analysis in Negative Mode. The different solid ionic matrixes were tested in the negative mode for direct tissue analysis. Three ionic matrixes, CHCA/DANI, CHCA2/ Δ M5NP, and CHCA/ANI, have given particularly good results in negative mode. A significant increased improvement was observed with these matrixes in comparison to CHCA, confirming the results previously obtained with standards. CHCA/DANI and especially CHCA/ANI were the matrixes giving the highest increase in intensity and the best sensitivity. This phenomenon is illustrated in Figure 4 by comparing CHCA/ANI (Figure 4a) to CHCA (Figure 4b).

We also compared direct analysis in negative and positive modes on one spot by switching only the voltage polarity as presented for CHCA/DANI in Figure 5. Due to the lower sensitivity in negative mode, less intense signal was observed in this mode. Nevertheless, some compounds, e.g., m/z 959 or 995, can be detected with a higher intensity. Moreover, adduct suppression in the negative mode gives easier readability of the mass spectra. For the mass range below m/z ~1200, resolution is greatly improved (e.g., m/z 787 or 811, see insets) probably due to lipids' numerous adducts in positive mode.

MALDI Imaging of Rat Brain Tissue Sections. Generally, for direct analysis of peptides/proteins in tissue sections, only lasers with conventional repetition rate frequencies ranging from 2 to 20 Hz are used. The number of positions to scan to perform MALDI imaging leads to very long acquisition time, e.g., ~92 h

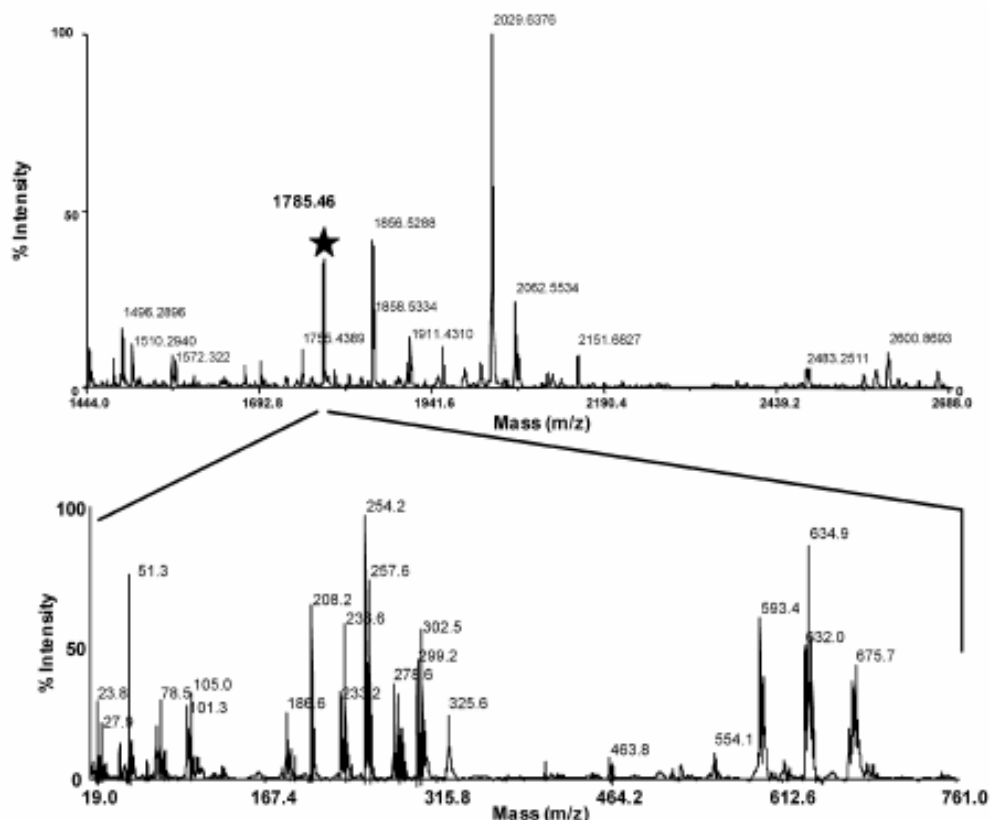


Figure 3. MALDI positive reflectron mass spectrum of a rat brain section using CHCA/ANI and the resulting PSD spectrum for the parent ion at m/z 1785 (collision gas, xenon).

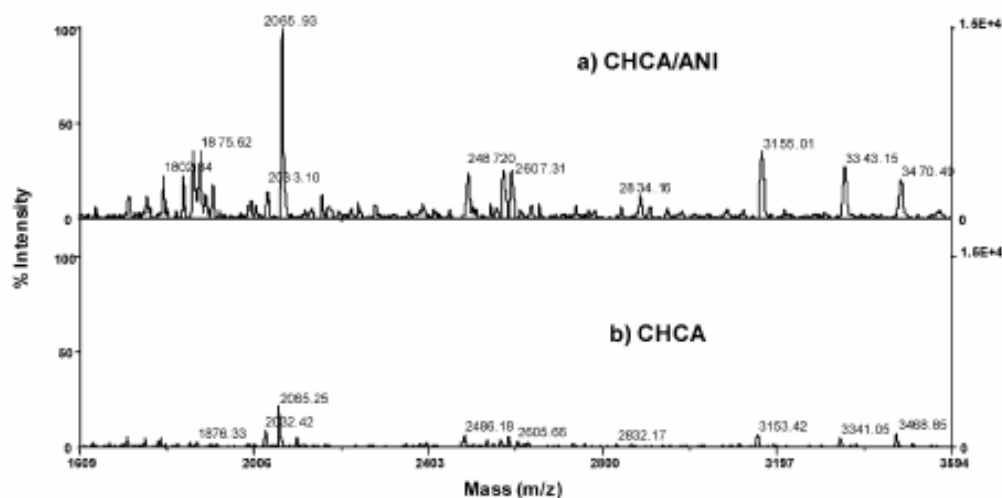


Figure 4. Direct analysis on a rat brain section in linear negative mode for (a) CHCA/ANI and (b) CHCA.

to scan 10 000 spots averaging 100 shots per position and only ~6 h for the same experiments with a 50-Hz repetition rate laser. The improvements in laser technology give access to 200-Hz repetition rate lasers. However, at such rates, conventional MALDI matrixes such as SA or CHCA are much less suitable for analysis resulting in abundant material removal during the ejection process. Consequently, after several hours of acquisition, intensity is much lower and some signals are not observed any more, leading in

loss of resolution of the resulting images. In contrast, ionic matrixes are more resistant under the same conditions. Direct analysis of rat brain tissue sections using CHCA/ANI shows that there is very little material ejection and the morphology of the matrix crystals has not changed after the scan (no damages observed). The size of the matrix crystals could give a first explanation of these results. CHCA/ANI (Table 2a) presents quite large crystals compared to CHCA (Table 2d). In more fundamental

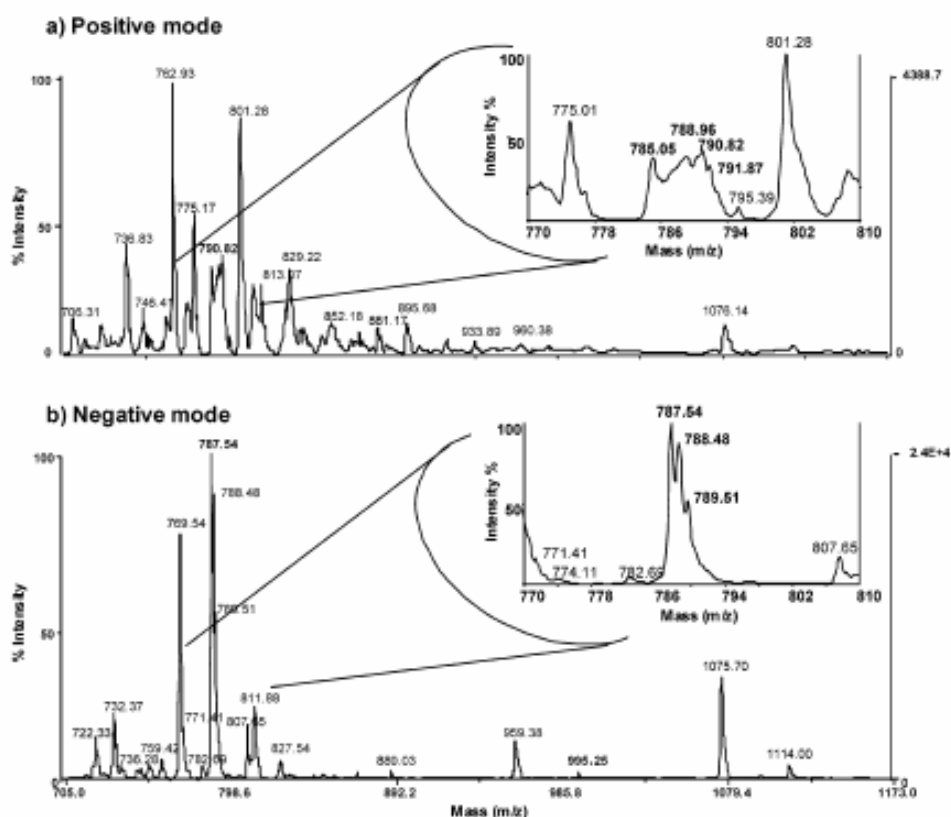


Figure 5. Typical linear MALDI mass spectra for the direct analysis of a rat brain section (a) in positive and (b) in negative modes at the same localization using CHCA/DANI. The insets present a zoom in the mass range 770–810.

studies, Sadeghi and Vertes³⁶ have demonstrated that smaller crystals are completely volatilized under laser shot irradiation whereas larger crystals undergo a kind of layer by layer (“peeling”) evaporation. Thus, considering matrix covering capacity and resistance to laser irradiation, high signal intensity, and sensitivity capabilities, CHCA/ANI was chosen among all the ionic matrixes for MALDI imaging. Experiments were performed using a MALDI-LIFT-TOF analyzer with a 50-Hz repetition rate laser. Images were obtained by scanning the whole rat brain section in 10 000 positions, averaging 100 shots per position in reflector mode. Direct analysis and imaging parameters were optimized using CHCA, and the same method was applied for an ionic matrix. A first scan was acquired in positive mode, and the section was rescanned on the same positions in negative mode. Finally, a last scan was performed in the positive mode again. Using CHCA/ANI, no major decrease in signal intensity was noticed between the first and the third scans (Figure 6). For CHCA, decrease of intensity was clearly observed as illustrated in Figure 6 for m/z 1224. After three scans, the section was still totally covered with ionic matrix, which was not the case with classical CHCA. This inevitably leads to loss in image resolutions, since some peaks are not observed any more in the corresponding mass spectra (e.g., m/z 2062 and 1224).

Several images reconstructed from both positive and negative data for some m/z ratios are shown in Figure 7a and b. The images

demonstrate a lesser delocalization for CHCA/ANI than CHCA considering a classical deposition using a micropipet. This phenomenon is well illustrated by the molecular image reconstructed for peptide at m/z 2015 (Figure 7a). This was attributed to the very fast and homogeneous crystallization of this matrix on the tissue. The comparison of the images using CHCA and the ionic matrix shows a better resolution for CHCA/ANI with a higher signal intensity and detection. Rat brain regions can be easily recognized by comparing MALDI ionic matrix imaging to rat brain maps (Figure 7c). For instance, in positive mode, peptides at m/z 2015 are found to be in forceps minor of corpus callosum (fmi) and anterior commissure (aca), but peptide at m/z 4741 is in the rest of brain. For m/z 2028 in negative mode and m/z 2030 in positive mode, similar localization was observed despite the poorer detection in negative mode for other regions than corpus callosum.

Better sensitivity using CHCA/ANI was confirmed for several ions as for m/z 4741 (positive mode) or 2092 (negative mode). Consequently, precise localization of these peptides using MALDI imaging is impossible using CHCA when it can be done using CHCA/ANI ionic matrix.

CONCLUSIONS AND APPLICATIONS

Taken together, we have developed and tested ionic matrixes for tissue analysis by MALDI. Ionic matrixes have particularly interesting properties, when compared to classical matrixes for

(36) Sadeghi, M.; Vertes, A. *Appl. Surf. Sci.* 1998, 127–129, 226–234.

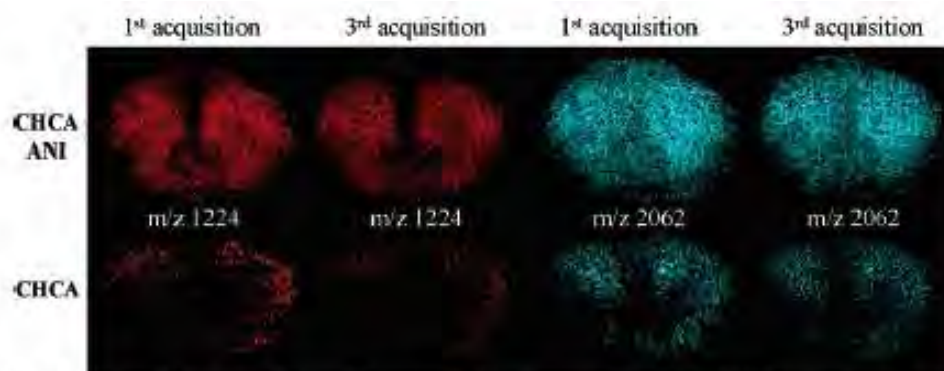


Figure 6. MALDI-IMS using MALDI LIFT-TOF in reflector mode (50-Hz laser repetition rate, 10 000 positions scanned), with ionic matrix CHCA/ANI and with CHCA in positive mode for the first and the third acquisitions on the same rat brain slice. Images have been reconstructed using FlexImaging software and represent the repartition of a m/z in the tissue slice. Same imaging parameters were used for all acquisitions.

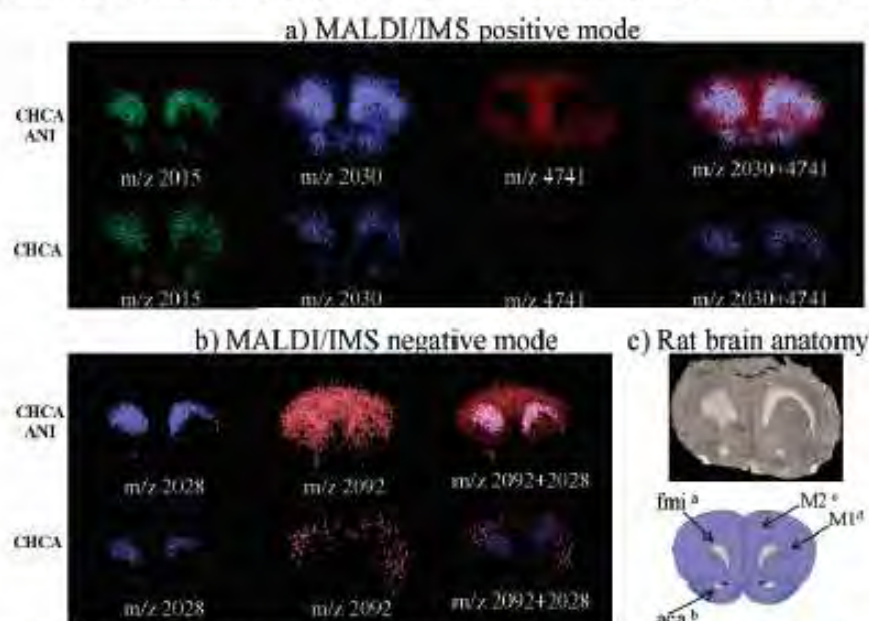


Figure 7. MALDI-IMS using MALDI LIFT-TOF in reflector mode at 50-Hz repetition rate with ionic matrixes CHCA/ANI and CHCA in positive (a) and negative modes (b). MALDI imaging can be compared with rat brain anatomy (c). For CHCA/ANI and CHCA, acquisitions in both polarities were performed on the same rat brain out. 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,d}motor cortex).

peptide direct tissue analysis: (1) a better signal intensity and sensitivity, (2) homogeneous crystallization patterns, (3) the possibility of in situ partial fragmentations, (4) a better vacuum stability, (5) a high resistance to laser ablation especially using a high repetition rate laser, and (6) the possibility to analyze compounds in positive and negative modes using the same slice for MALDI-MS high-quality imaging.

CHCA/2A4M5NP, CHCA/DANI, and especially CHCA/ANI appeared to be of great interest in solution or on tissue, with a highly significant enhancement signal. In negative mode analysis, an easier interpretation of mass spectra by suppression of adduct ions can be helpful in the future for analysis of a specific class of compounds such as phosphorylated peptides or lipids.

Applied to the study of peptide profiling in tissue, aniline derivative ionic matrixes gave better results than CHCA. CHCA/

ANI has shown great potential both in positive and negative modes as well as for peptide sequence tag by PSD with unambiguous assignment after comparison of peptides coming from different tissues using in situ PSD. Moreover, to access more information, molecular maps can be reconstructed by scanning the tissue sample. MALDI imaging performed on rat brain slices comparing ionic matrix CHCA/ANI to CHCA has shown higher signal intensity, sensitivity, better image quality and peptide localization, reproducibility, and remarkable resistance to laser ablation with the ionic matrix. Thus, with CHCA/ANI, it was possible to scan several times the whole rat brain section both in positive and in negative modes without observing consecutive damage of matrix crystals. We performed, for the first time, imaging in both modes on the same slice, using a high-frequency laser and good accuracy in reflector mode.

Thus, ionic matrix as CHCA/ANI with its remarkable properties, is an important development in direct tissue analysis and MALDI imaging techniques.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the following for support by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT, ACI jeunes Chercheurs to LF.), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, to

LF.), Génomole-Lille to M.S., also supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides.

Received for review August 15, 2005. Accepted November 17, 2005.

AC0514669

Cette étude démontre l'intérêt d'utiliser les matrices ioniques telles que HCCA/2A4M5NP, HCCA/DANI et surtout HCCA/ANI, pour des études de « profiling » sur tissus et pour l'acquisition des images en MALDI.

Plusieurs propriétés de ces matrices sont à noter par rapport aux matrices classiques :

- 1) Augmentation de l'intensité des signaux, notamment pour près d'une quarantaine de composés détectés sur tissus, et de la sensibilité pour certains ions tel qu'il a été décrit en analyse « liquide » par Armstrong et coll dans le cas de la bradykinine.
- 2) Possibilité de réaliser des analyses en mode réflecteur et des expériences PSD partiels sur tissu pour obtenir des ions fragments.

Ces acquisitions en mode réflecteur sont particulièrement intéressantes pour la réalisation d'images très précises. La reconstruction de ces dernières est effectuée en définissant la masse de l'ion, avec une précision qui peut être définie par l'opérateur dans le cas de l'utilisation du logiciel « Fleximaging ». Dans le cas du mode linéaire, la précision est généralement autour de 5Da et peut être difficilement réduite afin de compenser les fluctuations de m/z qui peuvent subvenir pendant l'acquisition sur tissu (aspérités de la coupe, effets de charge résiduels). Cette valeur est d'ailleurs un paramètre par défaut qui ne peut être modifié dans le logiciel « MALDI Imaging Tools ». Avec l'acquisition en mode réflecteur, ce paramètre peut être facilement réduit à 1Da étant donné la bonne précision en masse obtenue ; cette valeur a d'ailleurs été utilisée pour la reconstruction des images dans l'article. Cette acquisition prend toute son importance lorsque l'imagerie de deux composés de masse très proche doit être réalisée, et où le pas de 5Da utilisable en linéaire est trop important, risquant d'entraîner des co-localisations. Les expériences PSD peuvent aussi permettre de confirmer la présence ou l'absence d'un de ces composés à un endroit du tissu (cf partie cancer de l'ovaire).

- 3) Possibilité de réaliser des images en mode positif et négatif.

L'acquisition en mode négatif est évidemment cruciale pour l'imagerie des lipides, où certaines familles ne sont détectables que lors d'acquisitions dans cette polarité.

- 4) Plus faible ablation des cristaux de matrice lors de l'utilisation de laser haute cadence de tirs (50Hz et plus).

Le temps d'acquisition en imagerie MALDI est comme nous l'avons vu, un point crucial qu'il faut améliorer. L'utilisation de lasers à haute cadence de tirs (200Hz) permet de réduire considérablement cette durée, mais il faut que la matrice soit capable de résister à cette répétition. Les matrices ioniques et notamment HCCA/ANI sont des matrices résistant mieux à l'ablation, permettant de réaliser plusieurs passages sur la même coupe si nécessaire. Ce point peut évidemment être le départ d'investigations pour l'utilisation de ces matrices en protéomique à haut débit.

- 5) Cristallisation homogène et rapide sur le tissu entraînant peu de délocalisation.

Cette caractéristique permet de s'affranchir des procédés utilisant les spotters automatiques ou les sprayeurs, pour réaliser des images de bonne qualité. En matrice ionique, une simple application de la matrice avec une micropipette suffit pour pouvoir réaliser l'acquisition.

Les perspectives de cette étude sont multiples : les matrices ioniques sous forme HCCA notamment HCCA/ANI, sont plus spécifiques à la détection des composés dans la gamme de masse jusqu'à 10 kDa environ, et surtout dans la zone des 5/6kDa. Elles ont été utilisées avec succès dans des problématiques biologiques comme dans notre étude du cancer de l'ovaire (voir plus loin).

HCCA/ANI a également été utilisé avec succès en imagerie sur d'autres types de tissus ou pour d'autres régions du cerveau de rat (Figure II.1.3).

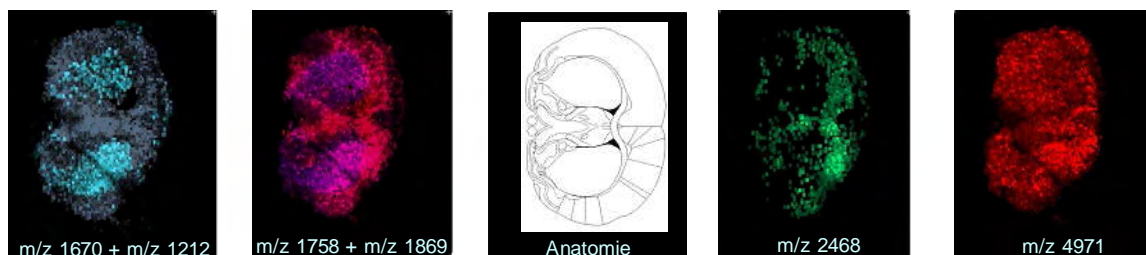


Figure II.1.3 : Imagerie MALDI d'une région du cerveau de rat (Interaural 9.20mm/Bregma 0.20mm) en utilisant la matrice ionique HCCA/ANI (mode réflecteur, polarité positive).

Pour des masses moléculaires supérieures, HCCA/ANI est en compétition avec SA, qui peut fournir de meilleurs résultats pour la détection des protéines.

Il est donc souhaitable de réaliser des matrices ioniques permettant d'améliorer les résultats pour l'acquisition des protéines. Plusieurs matrices ioniques pour protéines ont déjà été synthétisées (SA/DANI, SA/ANI, SA/DIENI...) au laboratoire, mais les résultats en terme de qualité du signal sont pour le moment comparables à ceux obtenus avec le dépôt de SA classique, avec des cristallisations plus ou moins homogènes.

A l'inverse, HCCA/ANI permet la détection de nombreux lipides sur la coupe quelle que soit la polarité utilisée lors de l'acquisition ; d'autres matrices ioniques plus spécifiques de certaines classes de lipides, de médicaments ou d'acides aminés peuvent être à l'étude.

Ainsi, notre étude a démontré l'intérêt d'utiliser ces matrices pour des acquisitions sur tissus et la réalisation d'images. Néanmoins, Si l'on désire corréler ces dernières à une problématique biologique, il est absolument nécessaire d'identifier ces composés par une approche peptidomique ou lipidomique selon la molécule à étudier. De ce fait, nous nous sommes également intéressés à la possibilité d'utiliser ces matrices pour des études de peptidomique classique, après extraction des composés du tissu. Généralement, l'identification s'effectue après extraction des composés à l'aide d'un tampon, suivie par des étapes de purification et de séparation permettant d'obtenir le composé isolé. Ce dernier pourra alors subir un traitement à la trypsine, puis une expérience de MS/MS ou de PSD sur les fragments obtenus. Ainsi, de nombreuses fractions HPLC peuvent être analysées pour repérer le composé recherché. Une piste à explorer pour un gain de temps lors de ces identifications réside dans des supports « préséptés », sur lesquels la matrice a été précédemment déposée sur la plaque d'analyse. Une partie de nos recherches se sont concentrées sur la possibilité d'utiliser ses supports, ou de nouveaux supports avec de nouvelles matrices, qui permettraient de travailler dans ces conditions pour des composés extraits des tissus.

- **Matrices ioniques en conditions préséptées.**

Tout récemment, certains constructeurs ont introduit sur le marché des plaques MALDI sur lesquels la matrice HCCA a été déposée et cristallisée à l'avance, permettant une standardisation de la préparation d'échantillon et un gain de temps pour l'analyse. Des résultats similaires à la préparation classique HCCA où l'analyte et la matrice sont mélangés au moment de l'analyse ont été trouvés en utilisant cette préparation. Cette technique vise

directement le marché de la protéomique clinique, ou plusieurs centaines d'échantillons peuvent être à analyser en peu de temps. Par la suite, les échantillons peuvent être également conservés pendant plusieurs mois après recristallisation, sans dégradation majeure des signaux, permettant ainsi un archivage de la préparation (Luebbert et coll, *HUPO 2005*). Dans ce contexte, plusieurs conditions de stockage ont été testées que ce soit au niveau de la température, ou de la présence d'un gaz neutre entourant la plaque MALDI. Ainsi, des conditions optimales (-20°C sous air ambiant) ont permis le stockage d'un digest de 250 amol de BSA pendant une période de 9 mois sans perte de signal. (Figure II.1.4)

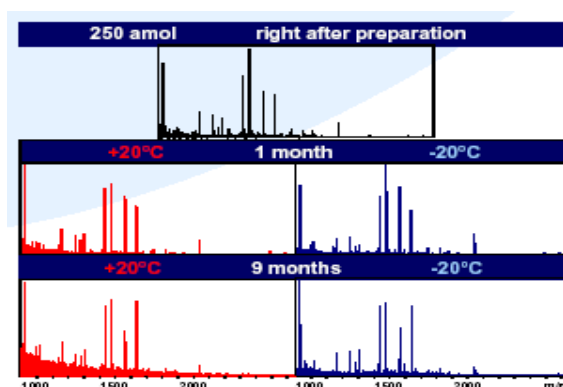


Figure II.1.4 : Influence de la température de stockage d'un digest de BSA (250 amol) analysé après préparation « préséptée » entre 1 et 9 mois. La plaque MALDI a été préalablement enfermée dans un sac rempli d'air (aucune différence majeure n'ayant été observée lors d'un stockage en gaz neutre) (Luebbert et coll, *HUPO 2005*.)

Les liquides ioniques utilisés en synthèse organique permettent de dissoudre facilement n'importe quel composé organique ou inorganique et cette propriété est également retrouvée dans le cas des matrices ioniques (Tholey et coll, *Anal. Bioanal Chem 2006*). Comme nous l'avons décrit précédemment, l'incorporation de l'analyte dans les cristaux de matrice est une étape cruciale pour la réalisation de l'analyse MALDI. Dans le cas d'une étude en condition préséptée ou précristallisée, cette étape peut être plus délicate car les cristaux sont déjà formés, doivent être redissouts, puis recristallisés avec l'analyte. Ainsi, cette propriété attribuée aux liquides et matrices ioniques de dissoudre aisément les composés peut nous être utile dans cette approche. De plus, à notre connaissance, la matrice SA n'est pas utilisable en condition préséptée limitant l'utilisation de ce système à une seule matrice (HCCA). Le passage sous forme ionique de SA permet t'il ce genre de conditions ? Est-il possible d'améliorer la qualité des signaux, les limites de détection ou tout simplement la gamme de masse pour HCCA ou pour SA en condition précristallisée après leur changement sous forme ionique ?

Différentes matrices ioniques ont donc été synthétisées notamment sous forme SA, mais également sous forme HCCA tels que décrit dans la publication N°1, avec toutefois l'introduction de nouvelles bases organiques comme la 3-acétylpyridine, et la phénylènediamine. Pour cette dernière, deux extrémités NH₂ sont disponibles, et nous permettrait d'étudier une matrice ionique doublement protonée au niveau de la base afin de former un complexe ionique du type [M⁻ B₂⁺ M⁻] avec M la matrice MALDI et B la base organique. Quelques exemples de matrices testées dans cette étude sont résumés tableau II.1.1 :

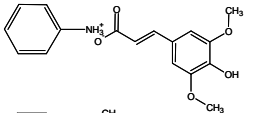
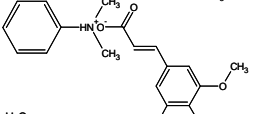
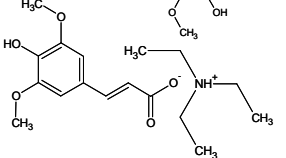
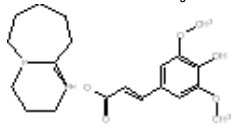
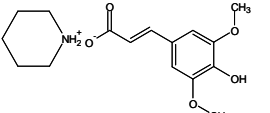
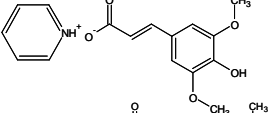
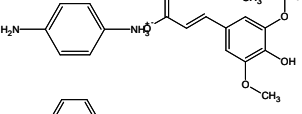
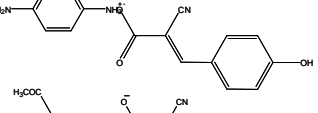
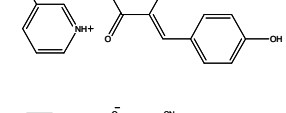
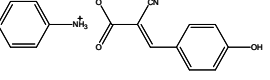
Matrice	Produits utilisés	Abréviation	Formule	Etat
1	Acide sinapinique / Aniline	SA / ANI		Solide
2	Acide sinapinique / N,N diméthylaniline	SA / DANI		Solide
3	Acide sinapinique / Triéthylamine	SA / TRIETHY		Solide
4	Acide sinapinique / Dbu	SA / DBU		Liquide
5	Acide sinapinique / Pipéridine	SA / PIP		Solide
6	Acide sinapinique / Pyridine	SA / PY		Solide
7	Acide sinapinique / phénylènediamine	SA / PA		Solide
8	acide α cyano hydroxycinnamique / phénylènediamine	HCCA / PA		Solide
9	acide α cyano hydroxycinnamique / 3 acétylpyridine	HCCA / 3APY		Solide
10	acide α cyano hydroxycinnamique / aniline	HCCA / ANI		Solide

Tableau II.1.1 : Récapitulatif de quelques matrices ioniques testées en conditions « préséptées ».

Dans un premier temps, nous avons décidé de tester la capacité des matrices ioniques en conditions préséchées sur des solutions de peptides standard comme la substance P (SbP), l'ACTH 18-39, et l'ubiquitine bovine. Les analyses ont toutes été comparées avec HCCA en conditions précristallisées ou selon la préparation classique (goutte sèche).

Pour cette gamme de masse des peptides, les meilleurs spectres en terme de rapport S/N, de résolution et de reproductibilité de recristallisation ont été obtenus avec les matrices sous forme HCCA N°8 et surtout N°9 et 10, ce qui correspond aux résultats observés dans nos études sur tissus ou dans d'autres applications décrites par différents groupes lors de l'utilisation classique d'HCCA/ANI (N°10) ou d'autres matrices sous forme HCCA.

Pour HCCA/3APY (N°9), de bons signaux ont été obtenus pour la SbP, l'ACTH et l'ubiquitine. Les distributions des peptides sont semblables comme dans le cas de la substance P avec la détection de la forme protonée majoritaire, la forme sodium, et la forme potassium ; la forme oxydée de la substance P apparaît très légèrement à m/z 1364,6, que ce soit avec HCCA ou avec HCCA/3APY en conditions préséchées ou classiques. (Figure II.1.5 spectres noirs). Pour étudier la capacité de conservation des matrices ioniques, les deux dépôts ont été analysés pendant 3 mois, chaque semaine, pour observer une éventuelle variation de l'intensité ou de la distribution des composés. De plus, de nouveaux peptides ont été déposés sur des dépôts de matrice vierge, pour confirmer que les matrices pré-déposées conservaient leurs propriétés.

Ainsi après 3 mois d'expériences sur ce premier dépôt, l'ubiquitine n'est plus (ou difficilement) détectée dans le cas d'HCCA, mais est encore présente dans le cas de la matrice ionique. Curieusement, les distributions des peptides ont subi des modifications : la forme oxydée est devenue majoritaire dans le cas d'HCCA et la forme doublement oxydée est également très abondante ; la forme non oxydée n'est quasiment plus observable. A l'inverse, dans le cas d'HCCA/3APY, la forme non oxydée est encore présente sous sa forme protonée et adduit sodium. La forme oxydée est l'espèce majoritaire, mais l'abondance de la forme doublement oxydée est plus limitée. (Figure II.1.5 spectres bleus).

Il est difficile de considérer qu'un phénomène d'oxydation se soit produit sur les peptides à l'intérieur des cristaux rendant ce signal plus important. Ainsi, l'espèce majoritaire contenue dans le cristal $(M+H)^+$ semble plus affectée par la dégradation que l'espèce oxydée $(M+H+O)^+$ qui paraît moins sensible.

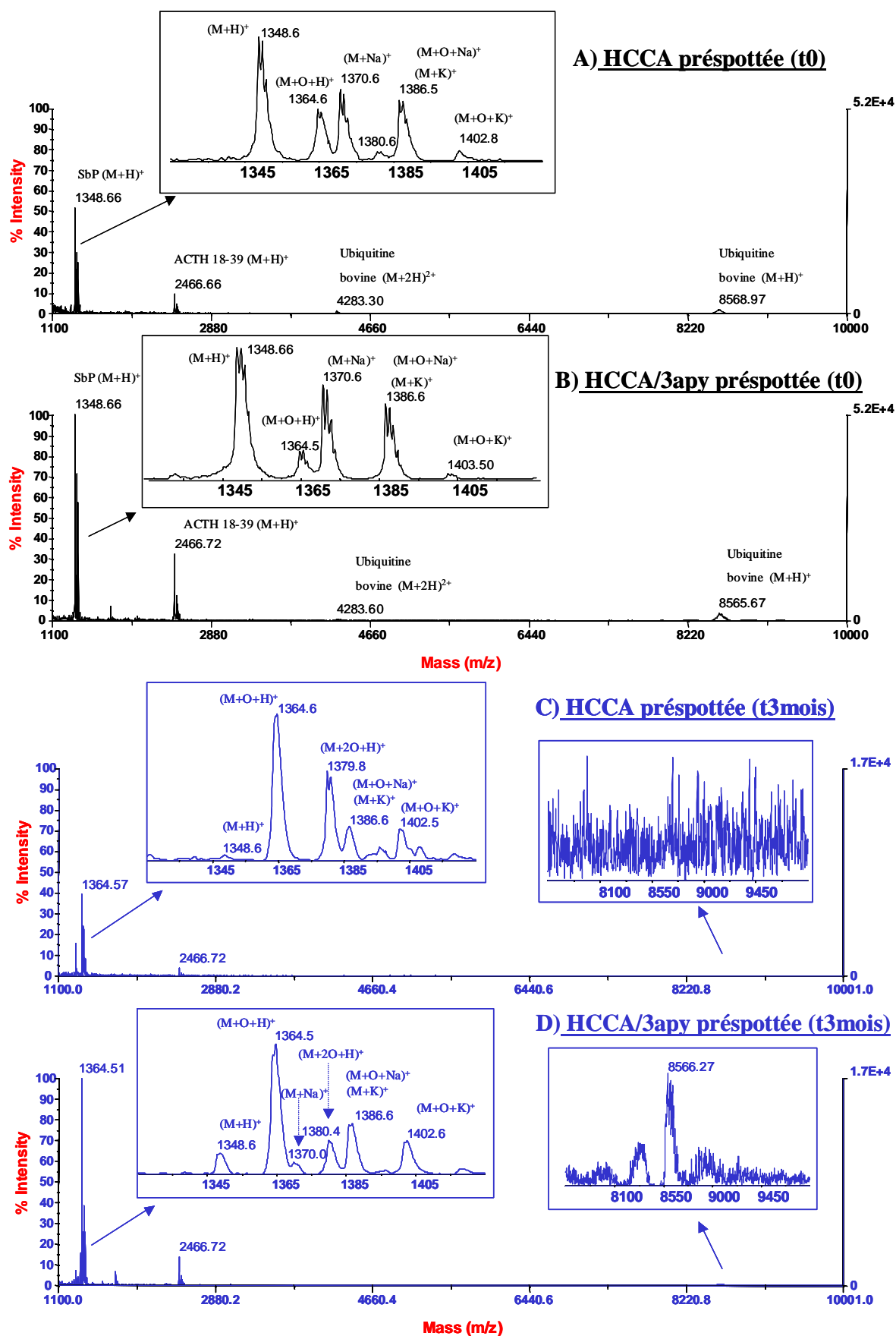


Figure II.1.5 : Analyse de peptides standard en condition présépoté pour HCCA (A) et HCCA/APY (B) avec une matrice nouvelle préparée, (spectres noirs) et après 3 mois de vieillissement (Spectres bleus) pour ces deux mêmes dépôts (C) et (D).

Dans le cas de la matrice ionique, les espèces semblent moins dégradées ou moins oxydées laissant suggérer que la matrice est plus stable, et permettrait de conserver des dépôts plus longtemps. Cette hypothèse semble renforcée par la perte du signal plus importante dans le cas de l'ubiquitine avec HCCA. Cette expérience a été de plus reproduite à plusieurs reprises (X3) avec des résultats semblables, y compris en comparant avec les préparations classiques d'HCCA. Ce phénomène est également apparu lors de l'utilisation de la matrice HCCA/ANI hormis pour la détection de l'ubiquitine qui était équivalent à HCCA en condition préspotée. Dans un deuxième temps, les matrices HCCA/ANI et HCCA/APY ont été testées dans des conditions réelles d'analyse protéomique classique ; pour cela, des peptides issus de 500 μ L de sérum humain sont extraits en conditions acides puis purifiés sur cartouche C18 (cf partie cancer de l'ovaire). Après lyophilisation de la solution obtenue, l'échantillon est repris dans 50 μ L d'eau et 1 μ L d'extrait est déposé sur les matrices précédemment cristallisées (N°9 et 10 et HCCA). (Figure II.1.6)

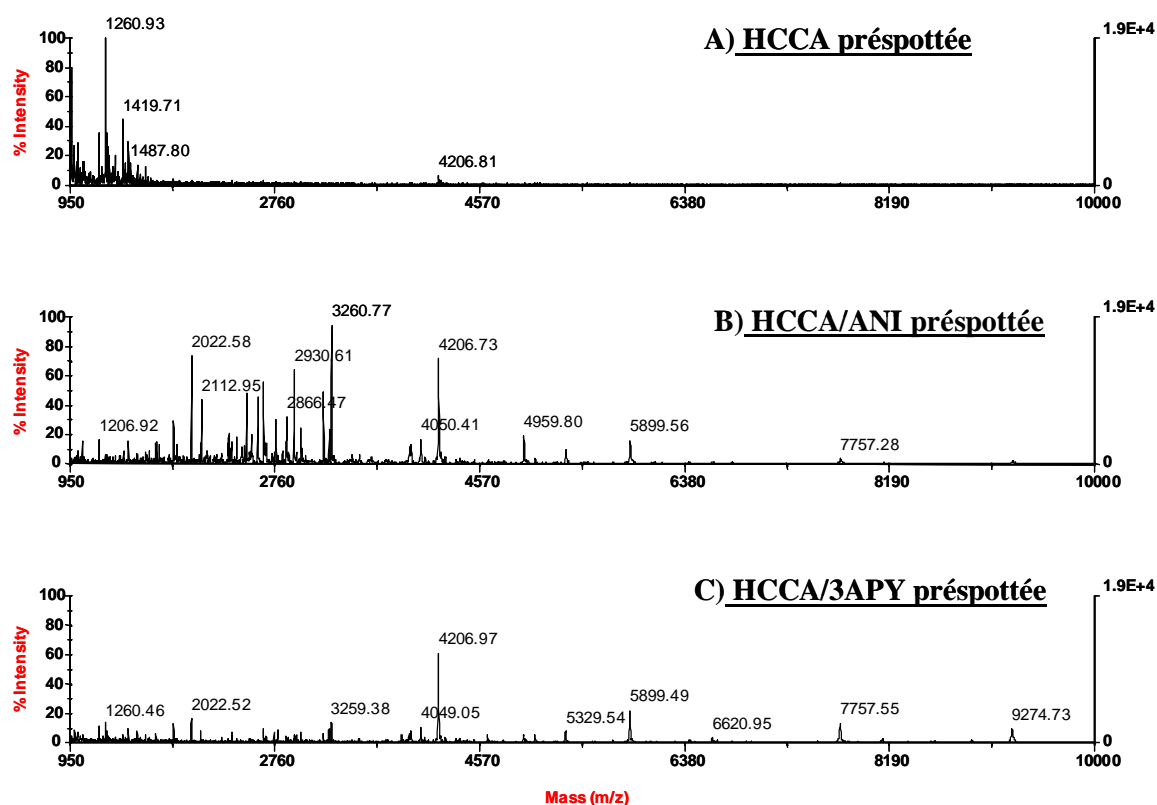


Figure II.1.6 : Analyses en conditions pré cristallisées de peptides extraits de sérum humain, avec HCCA (A), HCCA/ANI (B), HCCA/3APY (C).

Dans cette deuxième étude, les spectres obtenus lors de l'utilisation des matrices ioniques précristallisées ont tous été de meilleures qualités par rapport à HCCA utilisée dans les mêmes conditions. La différence majeure se trouve dans le nombre de peptides détecté et donc dans une meilleure sensibilité acquise avec les matrices HCCA/APY et HCCA/ANI.

Cette dernière est la plus performante pour une gamme de masse allant jusqu'à 5000 Da environ (Figure II.1.6 (B)), ce qui correspond également à la gamme observée en imagerie. Pour HCCA/APY, les signaux sont moins riches dans cette zone (Figure II.1.6 (C)), mais la désorption semble meilleure pour des composés au dessus de 5kDa par rapport à son homologue aniline.

Des analyses en conditions classiques avec HCCA ont également été réalisées à titre de comparaison. (Figure II.1.7)

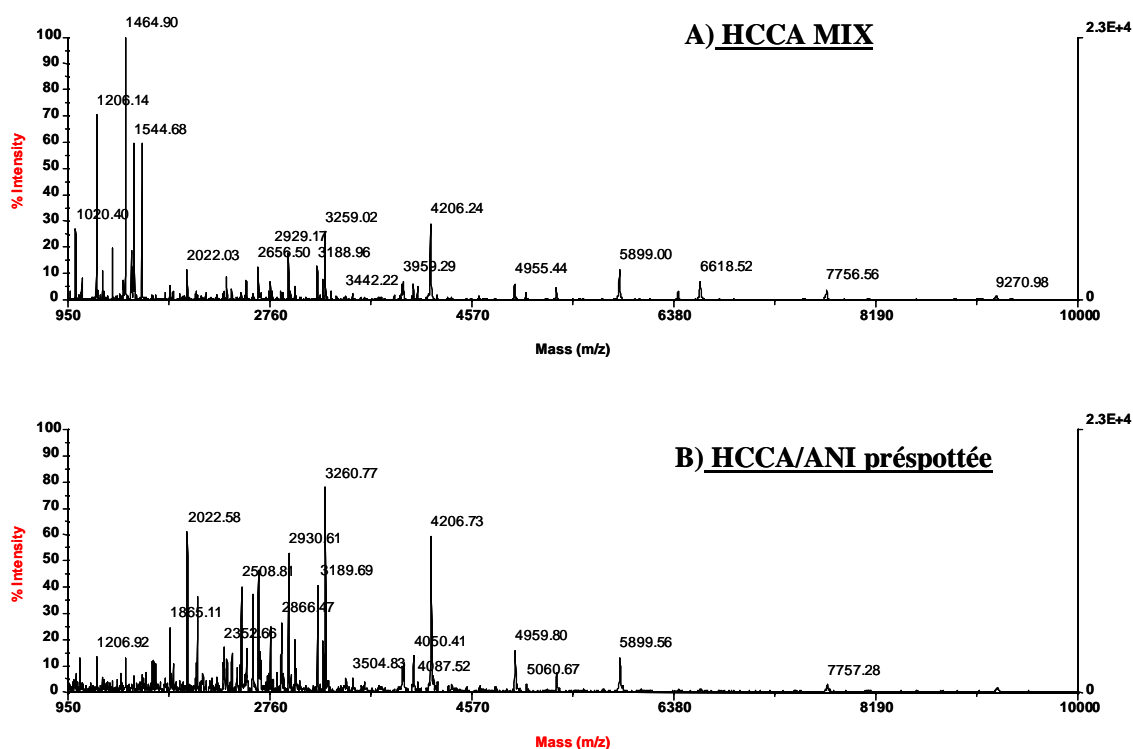


Figure II.1.7 : Analyse des peptides sériques en préparation classique avec HCCA (A) par rapport à une analyse en mode prépotté avec HCCA/ANI (B).

Dans cette analyse, le nombre de peptides détecté avec HCCA classique (A) et HCCA/ANI prépottée (B) étaient comparable. Certaines modifications en terme d'abondance ont parfois été observées (gamme de masse 2700 pour HCCA/ANI et 1500 pour HCCA) mais ce phénomène est probablement dû à la spécificité des matrices et non au mode de préparation. Des résultats équivalents ont été observés avec HCCA/ANI en dépôt classique.

Pour une gamme de masse plus étendue (supérieur à 5kDa), l'acide sinapinique (classique) a aussi été comparé avec HCCA/3APY préséchantée. (Figure II.1.8)

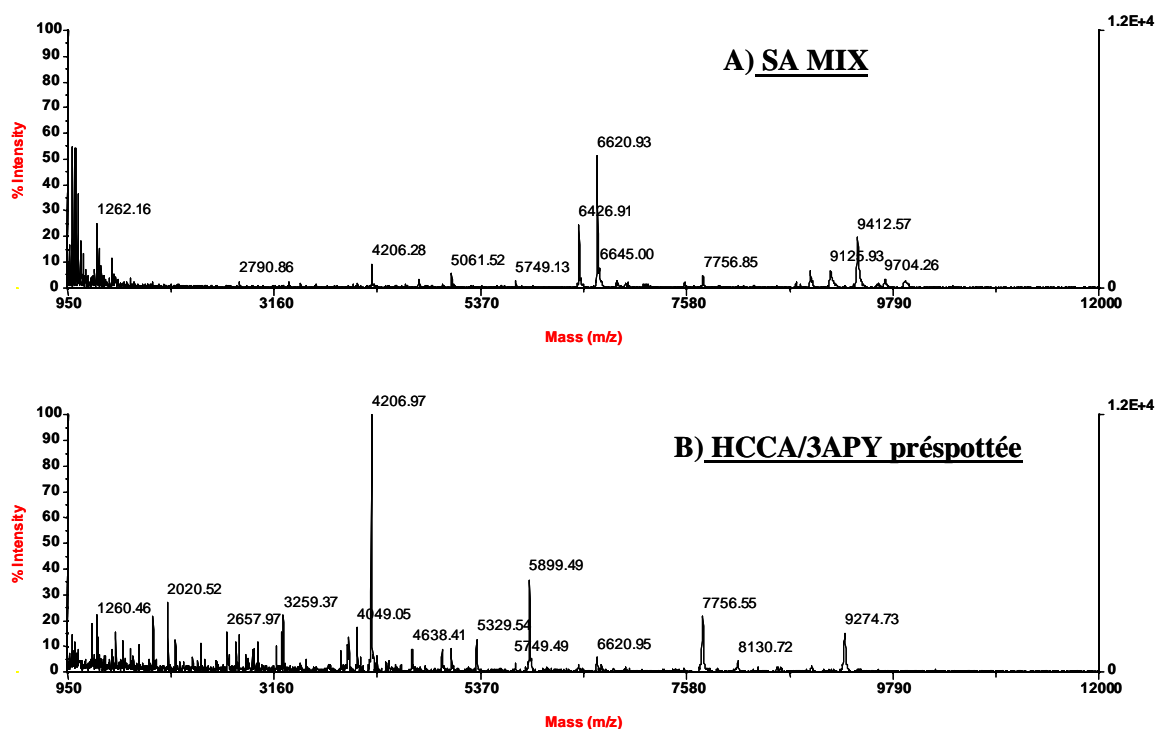


Figure II.1.8 : Comparaison entre une analyse classique de peptides sériques avec SA par rapport à une analyse préséchantée avec HCCA/3APY

Il en résulte que les signaux dans une zone de 5kDa à 8kDa sont semblables, mais que HCCA/3APY permet une meilleure détection des peptides pour les faibles masses. A l'inverse, SA permet la détection de composés dans les plus hautes masses.

Ainsi, les matrices ioniques HCCA/ANI et HCCA/3APY permettent d'obtenir de meilleurs résultats que HCCA en condition précristallisée. Par rapport à HCCA en dépôt classique, les matrices ioniques préséchantées fournissent des résultats comparables dans les masses jusqu'à 5kDa (HCCA/ANI) et même légèrement au dessus avec HCCA/3APY (5kDa/8kDa) par rapport aux analyses avec l'acide sinapinique. Dans ce sens, ces deux matrices ioniques semblent donc complémentaires avec ce type de préparation.

Dans une troisième étape, les matrices ont été testées sur un deuxième mélange constitué d'ubiquitine bovine, d'apomyoglobine de cheval et d'albumine bovine (BSA), pour étudier leurs capacités de désorption dans les hautes masses vers une détection de protéines dans ces conditions. Les analyses préséchantées ont été comparées à des analyses classiques en utilisant SA. Cette dernière en condition de précristallisation, ne nous a pas permis d'obtenir

de signal pour ces protéines ou sur des peptides. Dans cette étude, les meilleurs résultats ont été enregistrés avec les matrices 3, 4 et particulièrement la matrice N°8 (HCCA/PA).

Pour cette dernière, il semble que la matrice soit sous forme monoprotinée et non diprotinée sur les deux amines, si l'on en croit la détection de l'ion phénylènediamine détecté sous forme monochargée (Figure II.1.9).

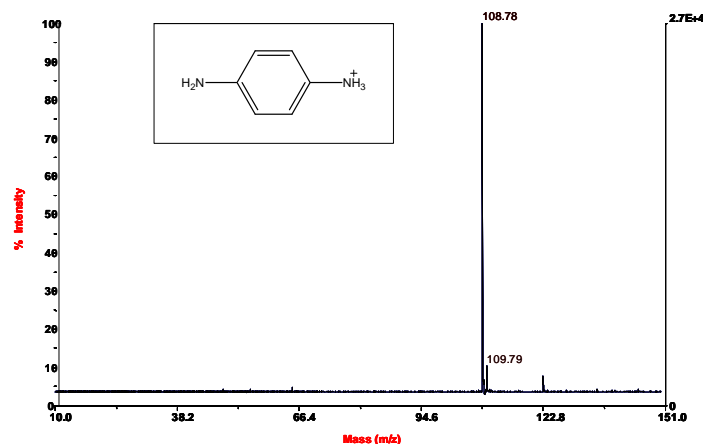


Figure II.1.9 : Détection des ions de basse masse pour la matrice HCCA/PA et observation de l'ion monochargé de m/z 108,78 correspondant à la phénylènediamine monochargée.

Des temps de synthèse plus longs n'ont pas permis d'obtenir pour l'instant la molécule doublement protonée. Des expériences à reflux peuvent être envisagées pour favoriser l'échange acide/base. Cette matrice a toutefois permis de détecter les 3 protéines en conditions préséchées avec des concentrations de l'ordre de 2 picomoles/ μ L pour l'ubiquitine et la l'apomyoglobine et de 5 picomoles/ μ L pour la BSA (Figure II.1.10). Les résultats sont semblables à ceux enregistrés avec SA en préparation classique.

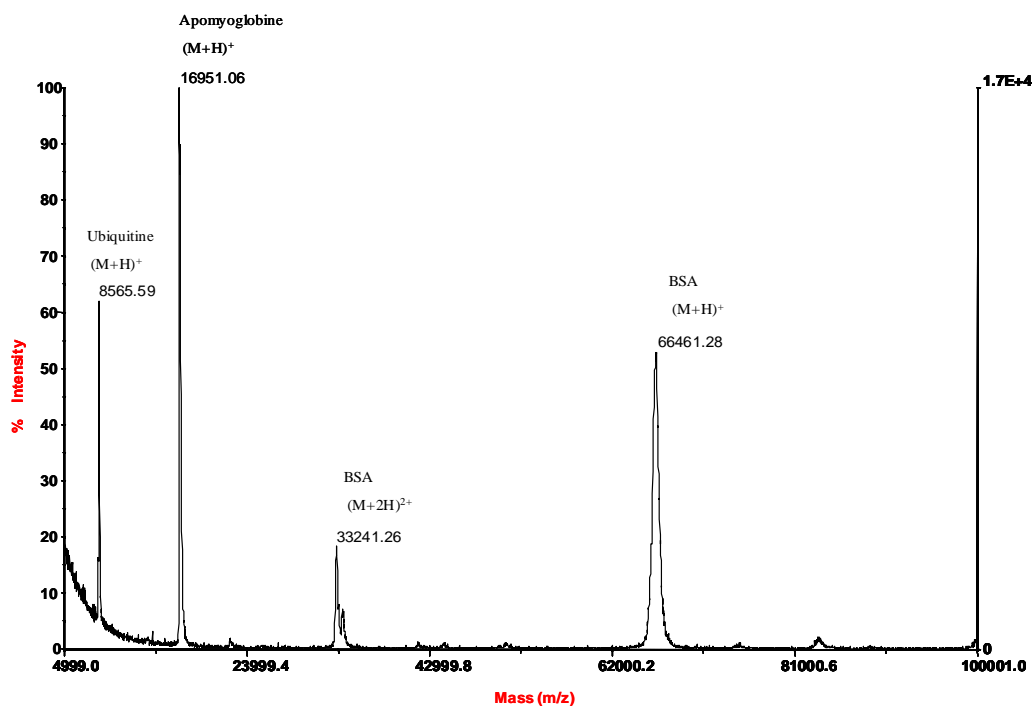


Figure II.1.10 : Analyse de protéines avec HCCA/PA en condition précristallisée.

Néanmoins, la préparation de cette matrice ionique est relativement délicate et doit être utilisée rapidement après dissolution dans le mélange ACN/H₂O-TFA. Des dépôts réalisés à des temps croissants après la dissolution de la matrice dans le solvant, nous permettent de bien visualiser le phénomène (Figure II.1.11) ; malheureusement, les propriétés de cette matrice disparaissent lorsque la préparation est agée de 30' à 180' rendant son utilisation difficile.

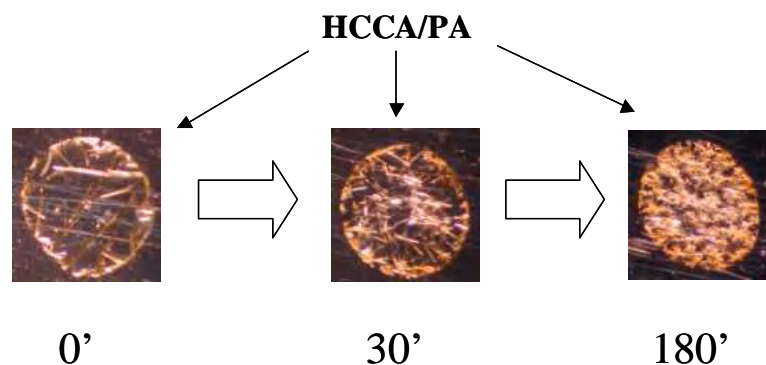


Figure II.1.11 : Evolution de la cristallisation d'HCCA/PA en fonction du vieillissement de la solution de matrice.

Il est possible que l'extrémité NH₂ non protonée réagisse avec le TFA présent dans la solution modifiant ainsi le complexe ionique. Ce phénomène devrait donc être stabilisé si l'on parvient à faire réagir les deux amines avec le groupement COOH de l'HCCA avant l'utilisation de la matrice. Des études complémentaires dans ce sens sont actuellement en cours.

Enfin, cette stratégie de matrice présotée peut éventuellement être appliquée pour l'analyse directe de tissus et l'imagerie de composés risquant d'être délocalisés lors de l'application de la matrice. Ainsi, nous avons par exemple testé la possibilité d'étudier des lipides et les phospholipides suivant ce type de préparation. Plusieurs tailles de coupes ont été analysées (5µm, 10µm, et 20µm), mais les meilleurs résultats ont été obtenus avec des coupes de 5µm d'épaisseur seulement. Les résultats obtenus avec les matrices ioniques précristallisées ont été comparés avec l'analyse directe classique lorsque la matrice est appliquée sur la coupe. (Figure II.1.12).

D'une manière surprenante, nous sommes parvenus à détecter des phospholipides issus de la coupe lorsque celle-ci est juste posée sur la matrice.

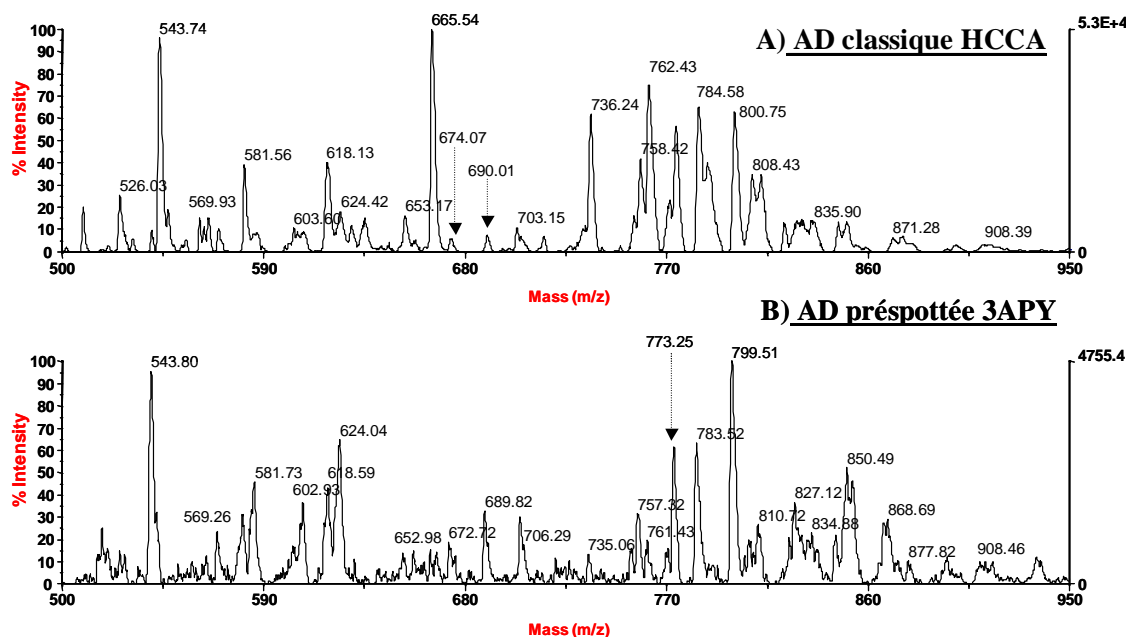


Figure II.1.12 : Analyse directe de tissu réalisée suivant les conditions classiques avec HCCA (A) (application de la matrice sur la coupe) et en préparation présotée avec HCCA/3APY (B).

Ainsi, l'analyse de phospholipides contenus dans les tissus est possible lorsque la coupe est appliquée sur une matrice précédemment cristallisée. Même si l'intensité des composés est plus faible comparée à l'analyse classique, le nombre de lipides détectés est important et

semble aussi riche que lors de l'application de la matrice sur la coupe. Ce résultat semble indiquer que cette stratégie est applicable en imagerie présottée, permettant la localisation de composés risquant d'être délocalisés lors de l'application d'un solvant quelconque sur le tissu (solvant pour dissoudre la matrice). Des résultats semblables ont été obtenus avec la matrice ionique HCCA/ANI.

Ces premiers tests nous amènent aussi à considérer la profondeur de l'analyse en imagerie MALDI : la désorption des composés lorsque la matrice se trouve à 5µm en dessous de l'analyte signifie que le laser est parvenu à traverser toute l'épaisseur de la section. Ainsi, l'analyse en un point de la coupe semble être au minimum de 5µm de profondeur, information qui n'était pas encore accessible à notre connaissance. Cette hypothèse pourra être vérifiée par une observation de l'impact du laser sur le tissu par microscopie électronique à balayage.

Ainsi, les matrices ioniques en conditions présottées peuvent permettre de réaliser des analyses de peptides jusqu'à 5kDa avec HCCA/ANI ou jusqu'à 8/9 kDa avec HCCA/3APY avec une sensibilité et une qualité spectrale équivalentes à HCCA en préparation classique. Les résultats obtenus dans cette étude nous indiquent que l'HCCA précristallisée fournit de moins bons résultats (sensibilité, S/N...) que les matrices ioniques dans les mêmes conditions. De plus, après dépôt du produit à analyser, la dégradation de la matrice et donc de l'analyte semble être ralentie pour les matrices ioniques par rapport aux matrices classiques. Ces résultats pourront être aussi confirmés sur des expériences à plus long terme (>à 6 mois ?). D'autres matrices ioniques pourront être testées par la suite pour tenter d'améliorer la gamme de masse analysable. A ce titre, HCCA/PA permettra peut-être ces études, à condition de protoner les deux amines du produit de départ.

Pour le moment, HCCA/ANI et HCCA/3APY semblent déjà utilisables en analyse à haut débit où la préparation de la matrice est préalablement effectuée et standardisée. Cette approche semble aussi envisageable pour l'analyse directe de coupes et spécialement dans le cadre de l'étude de la localisation ou de l'imagerie de composés délocalisables (phospholipides).

L'utilisation de nouvelles matrices en conditions classiques ou précristallisées est une première possibilité d'amélioration des analyses sur tissu par MALDI. Cependant ce thème peut être abordé sous plusieurs aspects et une deuxième voie d'étude peut se situer dans la préparation de l'échantillon.

2. Analyse de tissus et traitements des coupes

De nouvelles méthodes de préparation de l'échantillon, et notamment la possibilité de traiter le tissu avec un solvant ou un liquide en vue d'améliorer la détection ou l'intensité des signaux, peuvent également être envisagées. Cette préparation est d'autant plus importante que le signal est difficile à obtenir ; c'est le cas surtout pour des tissus stockés depuis longtemps où les signaux ont pu être perdus, réduits ou modifiés (clivages, oxydation des peptides/protéines ou des lipides...).

Comme nous l'avons décrit précédemment, des études réalisées par Schwartz et coll (*J. Mass Spectrom.* **2003**) ont montré que des rinçages à l'éthanol 70% pouvait réduire la concentration en sels et ainsi améliorer la détection tout en éliminant le surplus d'hémoglobine qui sature le signal. Dans ce cas, la possibilité d'extraire d'autres peptides et protéines solubles est bien sûr à considérer ; qu'en est-il par rapport à la délocalisation de ces composés ?

Cela explique peut-être les problèmes de reproductibilité observés dans le cadre de l'utilisation de ce solvant ; ce dernier semble fournir de bons résultats lors de l'utilisation d'HCCA (Figure II.2.1, gamme de masse des peptides) et semble plus délicat avec l'acide sinapinique où l'amélioration reste « marginale » (Schwartz et coll, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

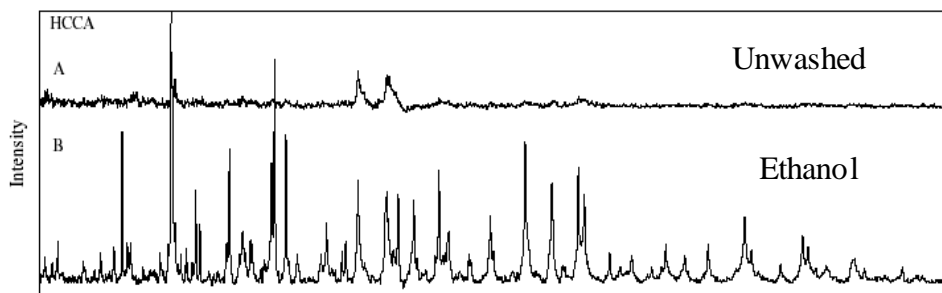


Figure II.2.1 : Effet observé lors du rinçage d'une coupe à l'éthanol en utilisant la matrice HCCA (D'après Schwartz et coll, *J. Mass Spectrom.* **2003**).

Ainsi, ce protocole paraît délicat à utiliser sur des tissus longuement conservés, où le signal a été réduit ou perdu. Pour ces biopsies, les signaux en analyse directe des peptides et protéines sont souvent plus difficiles à obtenir, au contraire des phospholipides qui restent en général facilement détectables. Parfois, on peut même remarquer une coloration légèrement jaune de la coupe, qui est probablement une marque d'oxydation ou de modification des lipides. Si ces derniers restent encore massivement détectables, est-il possible que ces signaux, devenus majoritaires, empêchent la détection des composés restants ? Un des moyens les plus

simples pourrait être d'éliminer les lipides et d'étudier la détection des peptides et protéines après cette extraction.

Les protocoles d'extraction des lipides développés depuis de nombreuses années, sont particulièrement nombreux mais peu variés au niveau du principe de départ. Ils sont majoritairement issus des travaux de Folch (*J Biol Chem* **1957**) pour l'extraction à partir de biopsies plutôt sèches et Bligh et Dyer (*Can J Biochem Physiol* **1959**) pour des échantillons plus riches en eau (plasma et sérum, tissus marins...). Ces extractions sont basées sur l'étude d'un diagramme de phases $\text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} / \text{H}_2\text{O}$ et la réalisation d'une solution où ces trois solvants sont miscibles, si l'on respecte les proportions. Différentes modifications de ces protocoles ont été réalisées, notamment concernant l'ajout de NaCl pour aider à la séparation des phases une fois l'extraction lipidique réalisée. Toutes ces techniques ont ainsi en commun l'utilisation de méthanol ou d'éthanol et surtout de chloroforme ou de dichlorométhane, qui solubilisent les lipides.

Le chloroforme étant, de plus, peu polaire, les peptides et protéines précipitent pendant l'extraction et peuvent même être récupérés pour des analyses protéomiques ; ainsi, l'extraction de ces composés pendant un rinçage éventuel de la coupe paraît limitée. D'autres solvants comme l'hexane peuvent également être utilisés pour l'extraction (Ferraz et coll, *J Biochem Biophys Methods* **2004**).

L'analyse des lipides extraits peut être réalisée par de nombreuses méthodes comme la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse (GC), l'électrospray ou le MALDI, l'APPI, ou l'APCI en fonction du type de lipide à étudier. Cependant, les lipides biologiques étant majoritairement des composés non volatils et sensibles à la température, leur analyse par GC est parfois délicate ou réduite, obligeant l'opérateur à utiliser des techniques de dérivations pour augmenter la volatilité de ces derniers. (Murphy et coll, *Chem Rev* **2001**).

L'utilisation de l'ESI permet de s'affranchir de ce type de préparation, avec la possibilité d'analyser des extraits lipidiques complexes, notamment lors de l'utilisation de la MS/MS (précurseur ou perte de neutre). De nombreuses classes de lipides sont analysables, comme les acides gras, (saturés, insaturés, branchés), les eicosanoïdes (prostaglandines, leukotriènes...) des stéroïdes, des vitamines ou des sphingolipides (céramides, sphingomyéline...) (Murphy et coll, *Chem Rev* **2001**) (Figure II.2.2).

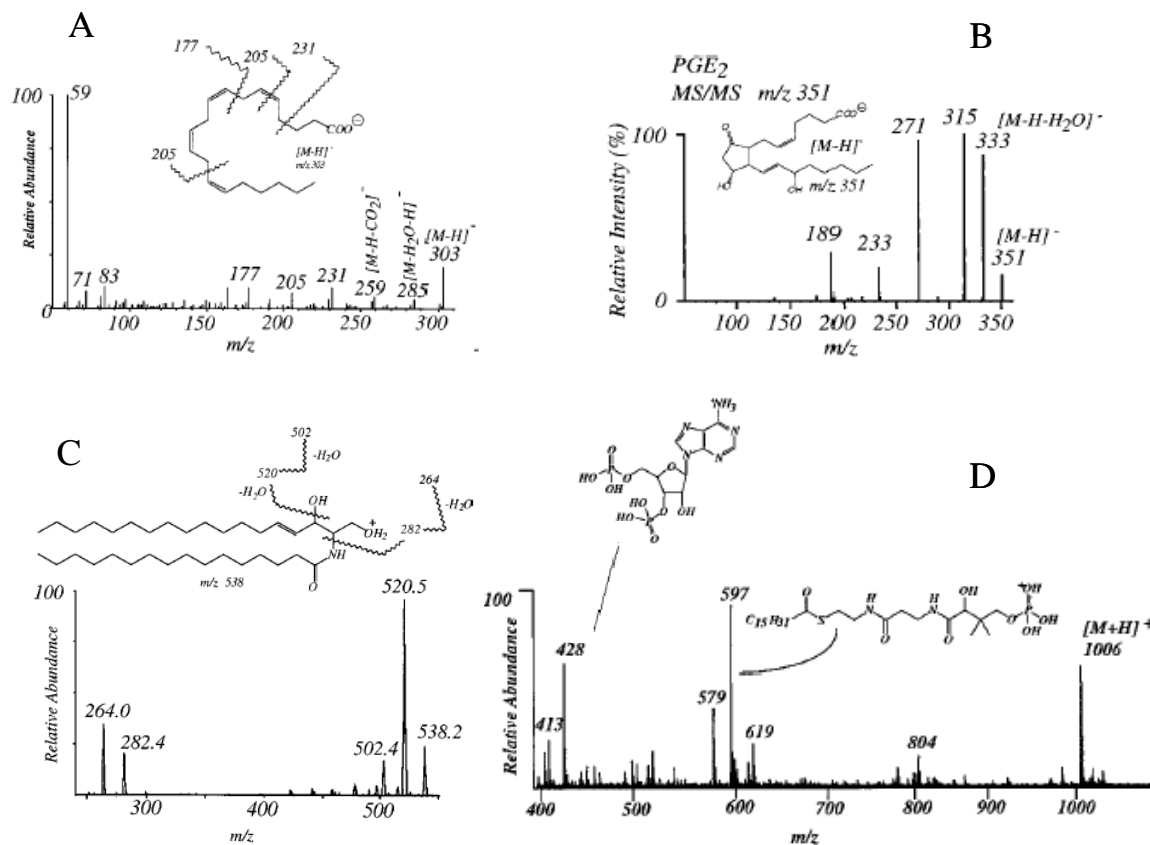


Figure II.2 : Détection des espèces moléculaires par ESI et identification en mode MS/MS de différentes classes de lipides : (A) Acide arachidonique, (B) prostaglandine (E2), (C) céramide C16, (D), hexadécanoyl coenzyme A. (Murphy et coll, *Chem Rev* 2001).

Cette technique est aussi particulièrement bien adaptée à l'étude des phospholipides et des différents constituants de cette famille. Ces lipides, constituants majeurs des membranes cellulaires, remplissent un nombre important de fonctions biologiques majeures notamment dans la compartimentation cellulaire, la signalisation des protéines, l'adhésion intracellulaire, et le support du cytosquelette. Ces composés sont également les précurseurs de nombreux médiateurs lipidiques (leukotriènes et prostaglandines (Funk, *Science*, 2001), ou de molécules de signalisation comme l'inositol triphosphate ou le diacylglycérol (Taylor, *Cell*, 2002).

Les constituants de cette famille sont multiples, mais peuvent être différenciés en spectrométrie de masse par la détection d'un ion fils caractéristique ou de la perte d'un neutre spécifique. (Figure II.2.3). La position des acides gras en position 1 ou 2 du groupement glycérol peut être quant à elle, déterminée grâce au ratio des ions correspondant à la perte des groupes R_1COOH et R_2COOH (Hsu et coll, *J Am Soc Mass Spectrom* 2000).

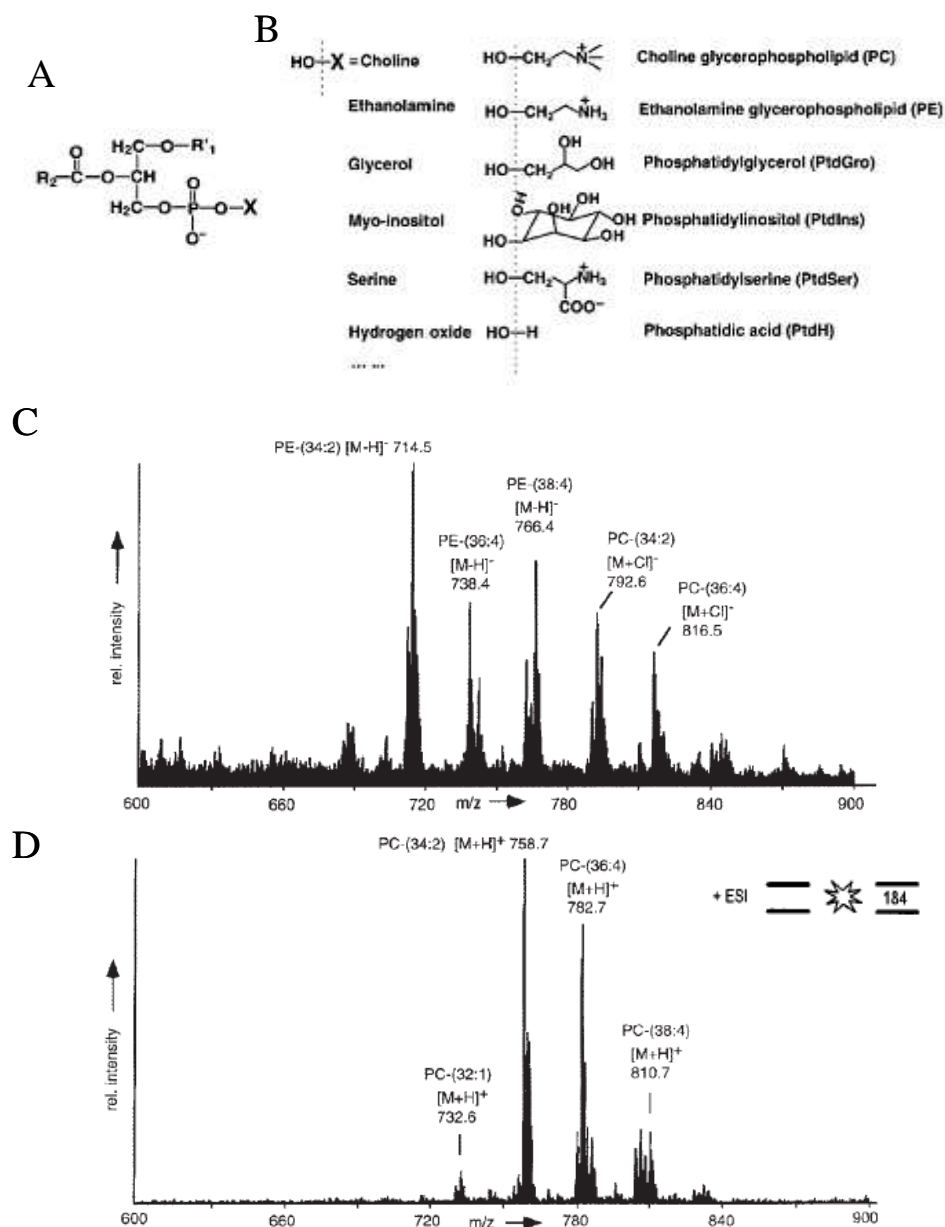


Figure II.2.3 : Structure générale (A) et différentes classes de phospholipides existants (B) (Han et coll, *Mass Spectrom Rev* **2005**) et détection d'un mélange de phosphatidyléthanolamines (PE) et de phosphatidylcholines (PC) dans un extrait de bile de rat (C). La détection des phosphatidylcholines avec les différentes chaînes d'acides gras (R1 et R2) peut être réalisée en mode précurseur (D) après sélection de l'ion caractéristique de la phosphocholine (m/z 184). (D'après Pulfer et coll, *Mass Spectrom Rev* **2003**).

Dans certains cas, l'identification de ces composés peut être facilitée par l'utilisation de métaux (cations lithium par exemple), qui favorisent les fragmentations (Hsu et coll, *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**) ou dans le cas de l'utilisation de certains appareils où les

expériences de perte de neutre ne peuvent être réalisées (ESI-Q/TOF) (Ekroos et coll, *Anal Chem* **2002**).

Des techniques de séparation à deux dimensions situées en amont de l'électrospray peuvent aussi permettre d'optimiser la détection de nombreux phospholipides en une seule analyse (Taguchi et coll, *J. Mass Spectrom.* **2000**).

Les phospholipides sont également bien analysables en MALDI avec de bonnes abondances en mode positif ou négatif, quelque soit le phospholipide considéré ; l'avantage est la tolérance aux sels et contaminants qui est plus importante par cette technique que lors d'analyse électrospray. Cependant, comme nous l'avons déjà vu, des interférences sont possibles avec des signaux issus de la matrice elle-même. En conséquence, de nombreuses analyses de lipides sont réalisées avec la matrice DHB qui produit un peu moins de ces ions. Des études de phospholipides issus de fluides biologiques par MALDI ont néanmoins été réalisées avec succès, dans le cas de fluides de sécrétions, (Schiller et coll, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2000**) ou des études de lipides de lavages bronchiques (Schiller, J et coll, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2001**). De la même manière qu'en ESI, des cations métalliques comme le lithium (Jackson et coll, *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **2005**) ou le césium peuvent être utilisés afin d'améliorer les fragmentations ou la détection ; il en va de même avec certaines matrices notamment pour l'utilisation du mode négatif (matrice *p*-nitroaniline ou PNA) (Estrada et coll. *J. Mass Spectrom.* **2004**).

Pour les études sur tissus par MALDI et quel que soit l'âge de la biopsie, les phospholipides restent détectables avec une très bonne intensité, au contraire des peptides et protéines. Partant du principe que les signaux lipidiques devenus majoritaires sur des coupes plus anciennes, pourraient éventuellement masquer les signaux des peptides ou des protéines restantes, nous avons envisagé de rincer les tissus en présence de solvants organiques, tels que chloroforme ou dichlorométhane, et d'étudier les effets de ce lavage sur la détection des composés dans différentes gammes de masse. Les lipides extraits pourront être analysés et identifiés par une approche MALDI ou électrospray telles que celles décrites un peu plus haut.

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

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

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

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

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

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

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

- (3) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* 2003, 24, 9–14.
- (4) Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Electrophoresis* 2002, 23, 3125–3135.
- (5) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* 1997, 69, 4751–4760.
- (6) Chaurand, P.; Sanders, M. E.; Jensen, R. A.; Caprioli, R. M. *Am. J. Pathol.* 2004, 165, 1057–1068.
- (7) Creceles, A. C.; Williams, B.; Cornett, D. S.; Dawson, B. M.; Bodenheimer, R. E.; Lepage, M.; Niermann, K. J.; Caprioli, R. M., Nashville TN, 2004.
- (8) Stoekli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* 2001, 7, 493–496.
- (9) Touboul, D.; Piednoel, H.; Voisin, V.; De La Porte, S.; Brunelle, A.; Hagand, P.; Laprevote, O. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Engl.)* 2004, 10, 657–664.
- (10) Tempez, A.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J. A.; Novikov, A.; Della-Negra, S.; Lebecq, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Smentkowski, V. S.; Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *J. Proteome Res.* 2005, 4, 540–545.
- (11) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Toxicol. Pathol.* 2005, 33, 92–101.
- (12) Hsieh, Y.; Casale, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, 20, 965–972.
- (13) Reyzer, M. L.; Hsieh, Y.; Ng, K.; Korfmacher, W. A.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* 2003, 38, 1061–1062.
- (14) Rohner, T. C.; Staab, D.; Stoekli, M. *Mech. Ageing Dev.* 2005, 126, 177–185.
- (15) Wang, H. Y.; Jackson, S. N.; McEuen, J.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* 2005, 77, 6682–6686.
- (16) Bunch, J.; Clench, M. R.; Richards, D. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004, 18, 9051–9060.
- (17) Caldwell, R. L.; Caprioli, R. M. *Mol. Cell. Proteomics* 2005, 4, 394–401.
- (18) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* 2004, 3, 245–252.

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

[†] Université des Sciences et Technologies de Lille.

[‡] Université Pierre et Marie Curie.

[§] Université de Sherbrooke.

(1) Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* 1991, 63, 1192A–1202A.

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

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

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapinic acid (SA), 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. from J. T. Baker.

Tissue Preparation. Adult male Wistar rats weighing 250–350 g (animal welfare accreditation by the French ministry of the agriculture No. 04960) maintained under standard care were used. Animals were sacrificed by decapitation and immediately dissected to remove the brain. Frozen sections of $15\text{ }\mu\text{m}$ were performed on a cryostat and immediately transferred onto the MALDI stainless steel plate. The matrix solution was applied to several sections after 10 min of drying at room temperature. The rest were kept for organic solvent treatments prior to matrix deposition and MALDI analysis.

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

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

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

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

Acquisition was realized using a 337-nm, pulsed nitrogen laser, with a repetition rate of 50 Hz. For images reconstruction the FlexImaging v. 1.0.6.0 software (Bruker Daltonics) was used. For positive mode, 12 000 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. Images were reconstructed using the same parameters for treated and nontreated sections.

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

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

(19) Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* 2003, **38**, 699–706.

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

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

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

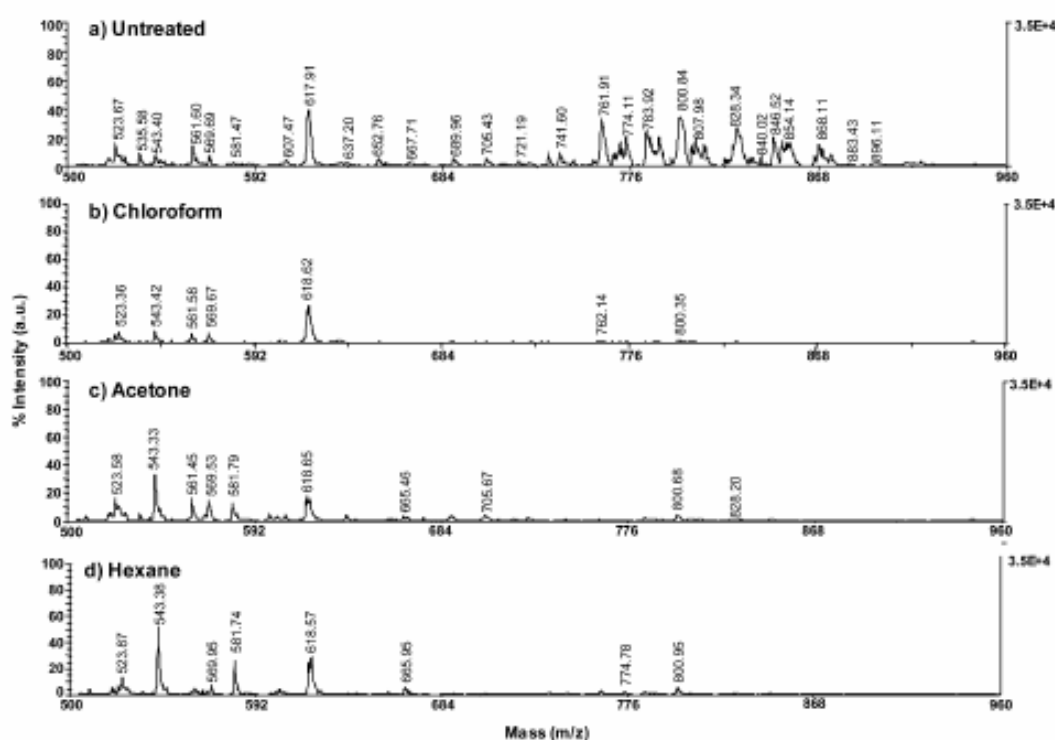


Figure 1. Low mass range region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive mode with HCCA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

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

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

RESULTS AND DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

(28) Jackson, S. N.; Wang, H. Y.; Woods, A. S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, 16, 2062–2066.

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

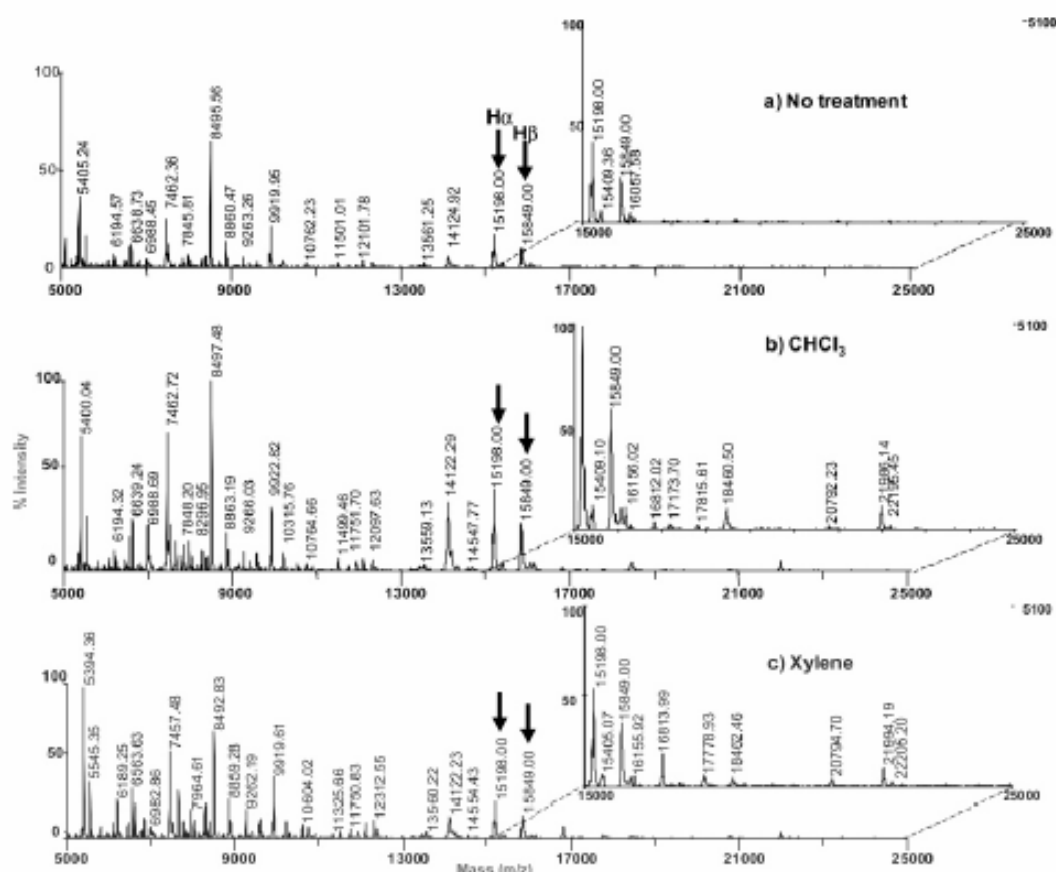


Figure 2. $m/z > 5000$ region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive ion mode with SA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at -80°C . (a) Untreated sample, after tissue treatment with (b) chloroform and (c) xylene (the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

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

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

^a Number of experiments.

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

D Analytical Chemistry

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

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

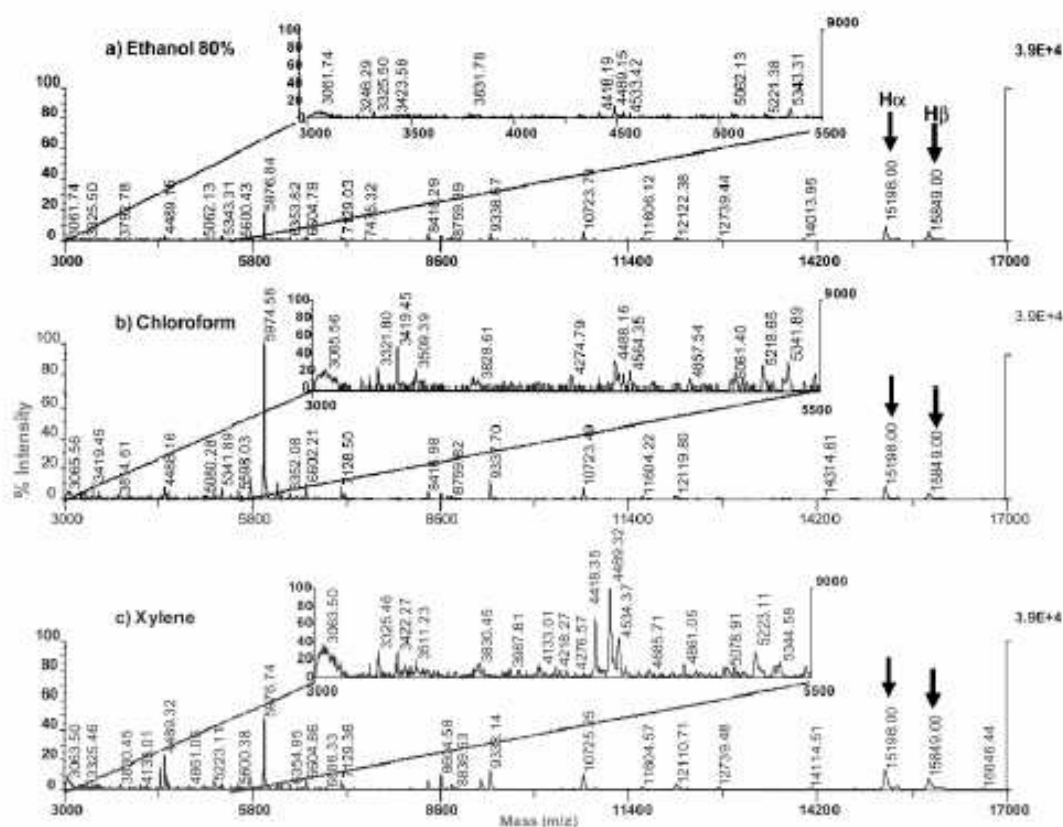


Figure 3. $m/z > 3000$ region of the MALDI-TOF mass spectra resulting from the direct analysis in linear positive ion mode with SA as matrix of rat brain tissue sections from a tissue block conserved 6 months at -80°C , after tissue treatment with (a) 80% ethanol, (b) chloroform, and (c) xylene (the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

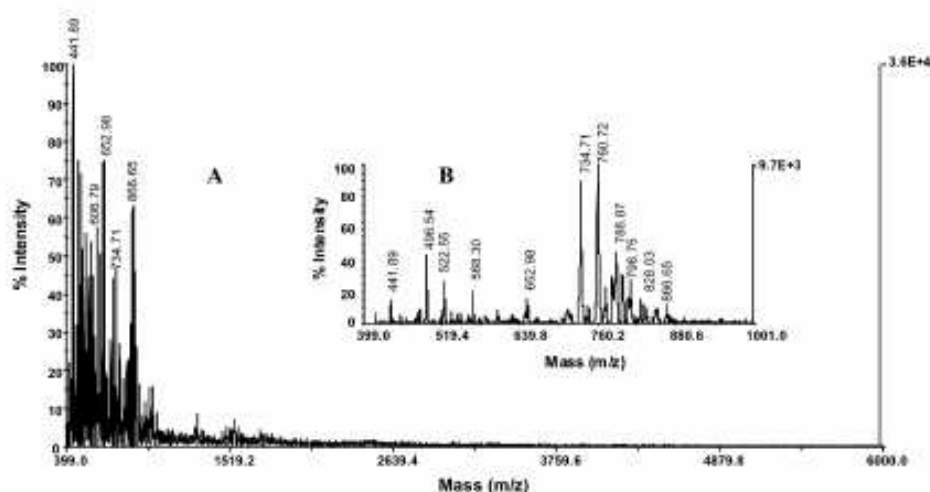


Figure 4. MALDI-TOF mass spectra using HCCA as matrix in the linear positive mode of the chloroform rinsing solution collected after tissue treatment. (A) 400–6000 and (B) 400–1000 m/z .

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

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

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

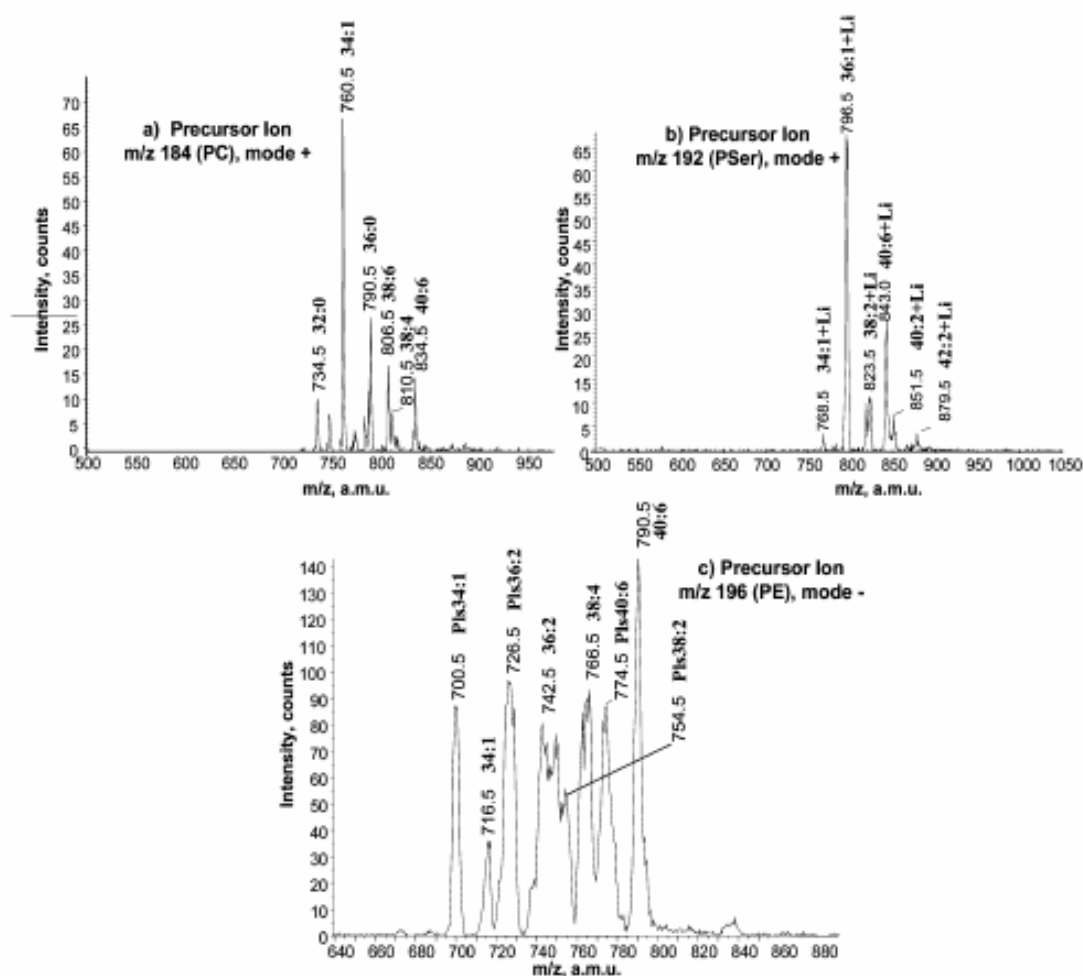


Figure 5. CID precursor ion spectra using nanoESI-QqTOF by analyzing the extracts collected after tissue treatment with chloroform for (a) m/z 184 (phosphatidylcholine) in positive mode, (b) m/z 192 (phosphatidylserine) with lithium adducts in positive mode, and (c) m/z 196 (phosphatidylethanolamine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

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

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

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

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

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

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

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

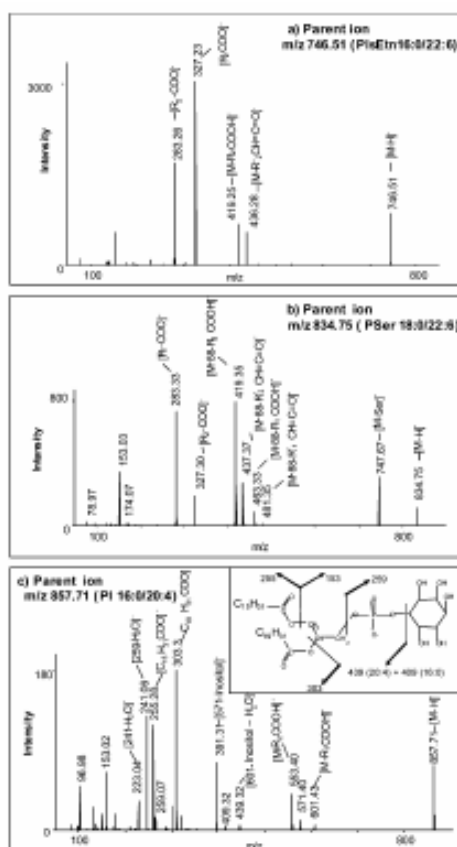


Figure 6. CID product ion spectra obtained on a nanoESI-QqTOF by analyzing the extracts collected after tissue treatment with chloroform.

of Hsu and Turk^{24–26} by performing CID parent ion scan as presented in example for P Ser 18:0/22:6 (Figure 6b) and PI 16:0/20:4 (Figure 6c). Most abundant identified lipids are summarized by class in Table 2. Several sulfatides were also detected but in lower abundance (data not shown). For the other solvents including xylene, the same lipids were identified. As expected, the abundant detection of phospholipids confirms that treatments specifically remove lipids from tissue surface, especially membrane lipids. Moreover, PtdEtn and Pser are known to be present in high concentration in the inner monolayer of plasma membranes, while PC is dominant in the outer monolayer.²⁰ But, more specific lipids such as PlsEtn known to be very abundant in neuronal cells²¹ were also detected.

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

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

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

^a Lipid abbreviations given in text.

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

Considering these results, increased detection limits of peptide/proteins can be obtained for tissue profiling in MALDI-MS without extraction of peptides/proteins. However, this does not mean that peptides/proteins do not migrate from their original location under the solvent treatment effect or that the tissue keeps its integrity. Knowing that solvents such as chloroform or acetone induced precipitation of proteins,²⁴ migration of proteins at the tissue surface by solvent dragging effects was examined. Indeed, direct tissue analysis of specific area and MALDI imaging of tissue sections fully require localization and tissue structure preservation. To confirm the latter, we used an approach based on tissue observations using optical microscopy, direct analysis of tissues, and immunohistochemistry experiments. Microscopic examination of the tissue, after treatment and solvent evaporation, shows that the tissue section has turned white. However, no change in the tissue structure was observed, demonstrating that microscope observations remain valid after tissue treatment (data not shown). To check delocalization, we studied peptide/protein signals in

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

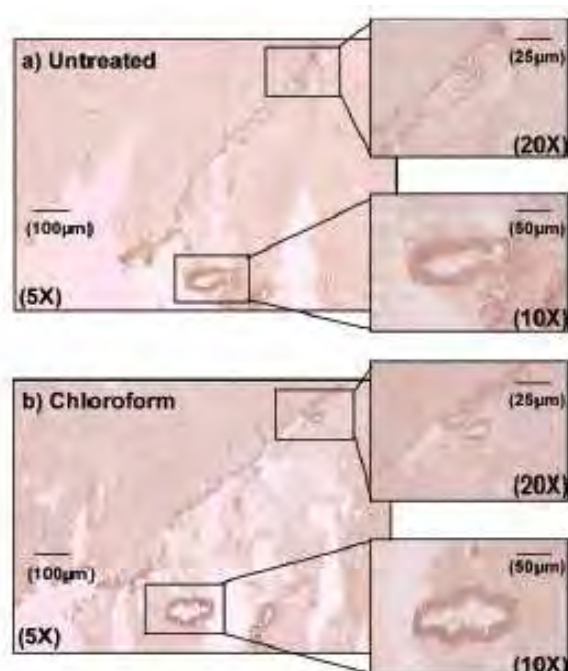


Figure 7. Immunohistochemistry staining for antibody directed against oxytocin of two adjacent rat brain sections (a) untreated and (b) rinsed with chloroform.

specific locations of treated and nontreated tissue of rat brain, known to contain specific peptides/proteins. Spectra of treated samples do not show major differences compared to nontreated ones showing no delocalization of compounds. However, immunohistochemical validation is a more powerful strategy for comparative analysis. For immunohistochemistry experiments, two adjacent rat brain sections were used, one section being treated with solvent and the other remaining untreated. The direct analysis of a section has confirmed the presence of the oxytocin peptide ($M_w = 1010.2$ amu) and protein precursor ($M_w = 12\ 822.95$ amu) in the tissue sections. Rabbit antibody against oxytocin was used on both sections. As shown in Figure 7 for treatment with

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

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

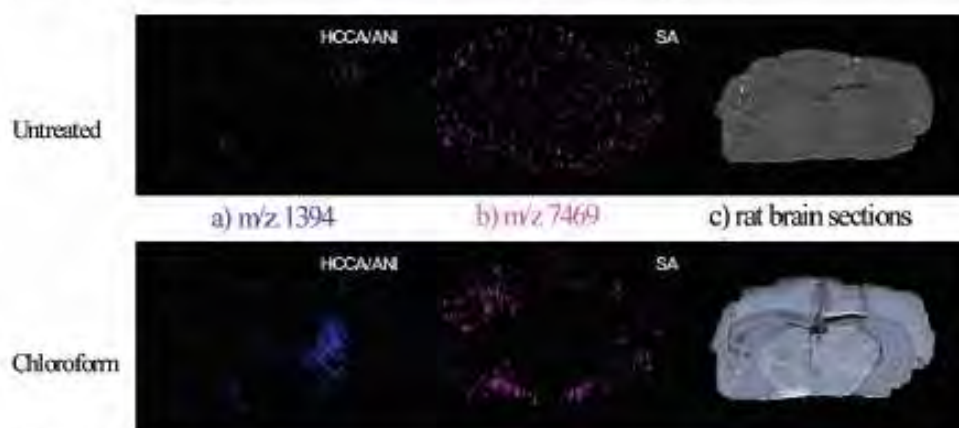


Figure 8. MALDI-LIFT-TOF/TOF molecular images reconstructed from the data obtained by scanning two adjacent rat brain sections untreated (upper panel) and chloroform treated (lower panel) (a) for m/z 1394 with HCCA/ANI as matrix and (b) for m/z 14306 with SA as matrix compared to (c) pictures of the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

CONCLUSION

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

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

ACKNOWLEDGMENT

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

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

AC060565Z

Ces travaux démontrent la possibilité d'utiliser des traitements à l'aide de solvants organiques tels que chloroforme ou toluène notamment, afin d'améliorer la détection des signaux de peptides ou de protéines. Ces traitements permettent d'élargir les outils utilisables lors de la préparation des coupes, qui était jusqu'à présent limitée à l'utilisation éventuelle d'éthanol 70%. Le rinçage avec ce type de solvant est particulièrement adapté à l'amélioration de l'analyse de vieux tissus, sur lesquels le signal avait disparu ou était limité, permettant de retrouver les localisations des peptides et protéines lors des expériences d'imagerie. Ces rinçages atteignent uniquement les lipides des membranes, comme nous avons pu le démontrer lors de l'analyse électrospray ou MALDI des rinçages, et il n'y a donc à priori aucun signe de délocalisation des peptides/protéines, si l'on s'en réfère à l'étude réalisée en immunohistochimie sur l'ocytocine. Ce point est important, car l'utilisation d'alcool réduit la quantité de sel présent sur le tissu, mais le risque d'extraire les composés solubles dans l'éthanol est à considérer. Pour étudier ce phénomène, les solutions de rinçage ainsi que la coupe rincée à l'éthanol ont été analysées par MALDI (Figure II.2.4 et Figure II.2.5).

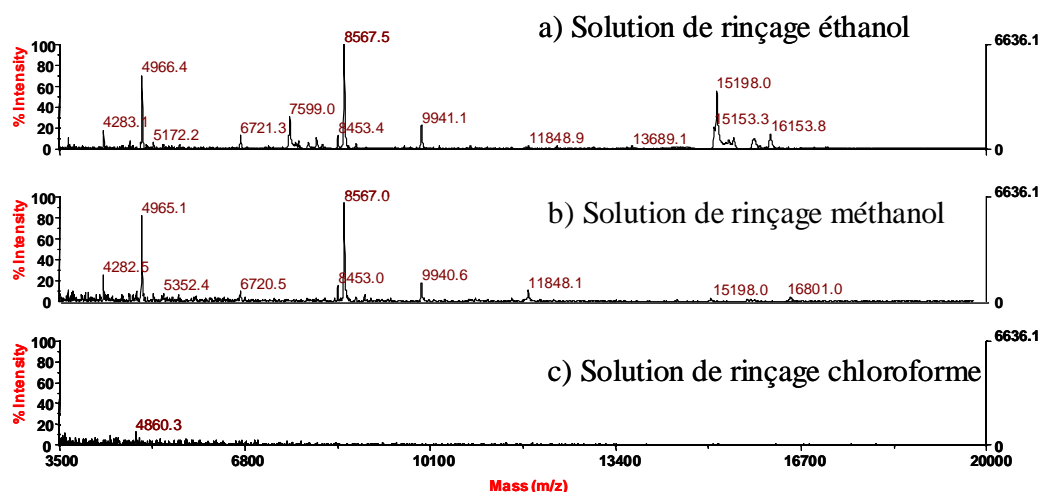


Figure II.2.4 : Analyse de différentes solutions de rinçage (éthanol, méthanol et chloroforme) utilisées pour le traitement de coupe de cerveau de rat (matrice SA)

De nombreux peptides ont pu être détectés dans la solution d'éthanol et dans une moindre mesure dans le méthanol. Pour des solutions encore plus apolaires comme le CHCl_3 , aucun signal de protéine n'a été détecté. (Figure II.2.4)

La comparaison entre le tissu traité et les protéines extraites par l'éthanol indique de nombreux signaux en commun, preuve que la proportion de composés extraits lors de cette étape est relativement importante (Figure II.2.5).

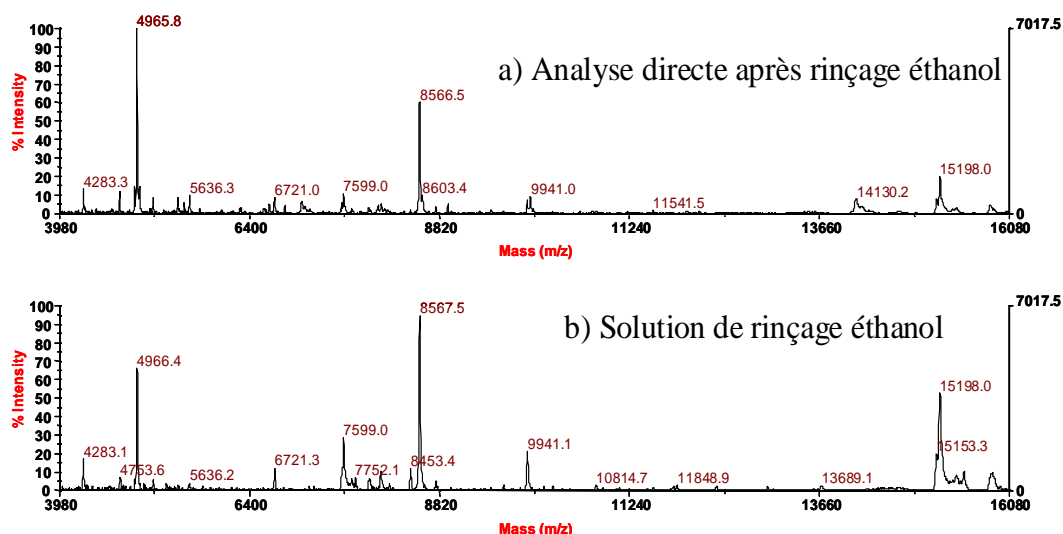


Figure II.2.5 : Analyse directe d'une coupe de cerveau de rat traité à l'éthanol 80% et analyse de la solution de lavage de cette même coupe (matrice SA).

Dans ces expériences, les solutions d'éthanol, de méthanol et de chloroforme ont été simplement évaporées avant l'analyse puis reprises dans de l'eau, si bien qu'aucune technique d'élimination des sels (ziptip ou seppack) n'a été utilisée ici.

Ainsi, la quantité de sels extraits lors du rinçage à l'éthanol 80% n'empêche pas la cristallisation de la matrice ou ne semble pas limiter le signal obtenu ni augmenter considérablement le nombre d'adduits. Il est donc probable que l'amélioration des signaux observés après rinçage d'une coupe à l'éthanol provienne plus de l'extraction des composés par la solution, que par la réduction des sels de la coupe proprement dit. Cette technique est peut-être l'une des voies possible de déplétions directes sur coupes, permettant d'éliminer les protéines majoritaires et d'accéder à d'autres composés appartenant au sous protéome. Cependant cette extraction peut s'accompagner de la délocalisation des composés sur le tissu, et cette stratégie est donc à utiliser avec précaution pour des expériences en imagerie.

Etant donné qu'aucun signal de protéine ni de peptide n'a été détecté dans le cas du chloroforme, mais que les résultats sont aussi moins reproductibles dans le cas de tissus plus récents où le « masquage » des protéines par les lipides est moins important, on peut très bien imaginer des mélanges de solvants du type $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ ou $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, (ou avec du xylène) tels que ceux utilisés dans les techniques de Folch et de Bligh, où le phénomène d'extraction provoqué par l'éthanol ou le méthanol serait ralenti par la partie apolaire apportée

par le chloroforme. De plus, ce dernier en extrayant les lipides, devrait favoriser l'accès de la matrice au travers du tissu. Dans cette approche, l'utilisation de l'imagerie devra absolument être utilisée afin de s'assurer de la limitation de la délocalisation et de l'amélioration du signal. L'approche chloroforme/xylène est ainsi particulièrement effective pour des tissus relativement anciens (environ 1 an), et il serait bien sûr intéressant d'évaluer le temps pendant lequel cette technique reste effective. Cela nous ouvre certaines interrogations quant aux processus se déroulant pendant le vieillissement des biopsies : comment sont dégradées les protéines après un temps très long de stockage ? Y a-t-il vraiment dégradation ? Y'a-t-il des protéines plus sensibles que d'autres à la conservation ? Cela pourrait nous apporter des précisions quant aux conditions optimales de stockage des tissus. Des systèmes sous vide permettraient-ils par exemple de limiter ces phénomènes ? De plus, sachant que ces lipides et surtout les phospholipides restent facilement analysables après un vieillissement prolongé, une étude plus approfondie de ces derniers avec notamment une étude de leur oxydation ou de leur dégradation (production d'acides gras provenant des phospholipides, perte d'inositol, d'éthanolamine, dosage de glycérol...) permettrait peut-être de dater la conservation d'un tissu et d'évaluer facilement le temps limite d'utilisation d'une biopsie pour des expériences d'imagerie.

Ainsi, le rinçage des coupes au solvant organique permet de prolonger l'utilisation des biopsies pour des approches d'imagerie et d'analyse directe de protéines et de peptides. Dans cette approche, les biopsies étaient congelées mais ces tissus peuvent être difficiles à obtenir lorsque il s'agit d'échantillons humains. Dans les hôpitaux, les anatomopathologistes conservent des échantillons prélevés chez des patients au cours des opérations ainsi que les résultats de toutes leurs observations. Ces prélèvements permettent aux médecins de diagnostiquer et de classer les pathologies, études primordiales afin de s'assurer qu'une zone cancéreuse a été totalement circonscrite. Dans un deuxième temps, ces études permettront aux médecins d'affiner le traitement final afin de réduire les risques de récurrence de la maladie. Toutes les biopsies sont conservées dans des bibliothèques gigantesques permettant une éventuelle étude rétrospective des tissus sur de nombreuses années (10, 20 ou 30 ans). Malheureusement, ces échantillons ne sont pas congelés, mais fixés au paraformaldehyde et enveloppés dans de la paraffine. A l'heure actuelle, très peu de méthodes permettent l'étude de ces prélèvements et aucune n'a encore été développée en MALDI ni en imagerie. L'accès à ces biopsies permettrait donc de réaliser des recherches ou des validations de biomarqueurs comme cela a déjà été réalisé en analyse directe sur tissus congelés, mais cette fois-ci sur un stock colossal d'échantillons classés depuis de très nombreuses années suivant les types de pathologies.

3. Analyse directe et imagerie de tissus fixés et paraffinés

Avant de pouvoir utiliser les échantillons conservés par les anatomopathologistes, il convient évidemment d'étudier leur système de fixation. En réalité, il en existe plusieurs suivant le délai de conservation désiré. Pour des stockages courts - environ 6 mois - la fixation au bouin ou au bouin hollandaise peut être utilisée. Pour des délais plus longs, la fixation au glutaraldéhyde et surtout au paraformaldéhyde est en général privilégiée. Sous sa forme dépolymérisée, le paraformaldéhyde peut réagir par sa fonction aldéhyde avec une amine primaire de protéine comme une extrémité NH₂ terminale ou de lysine (Figure II.3.1, étape 1). Après déshydratation partielle (étape 2), la base de Schiff peut alors former des liaisons avec d'autres acides aminés comme la tyrosine (étape 3). Il en résulte la formation de ponts méthylènes entre les protéines, formant alors un réseau particulièrement résistant, et pouvant être conservé facilement sans dégradation. Ces tissus restent parfaitement utilisables par les techniques d'immunohistochimie classique, permettant la localisation de nombreux antigènes (Shi et coll, *J. Histochem. Cytochem.*, **1995**)

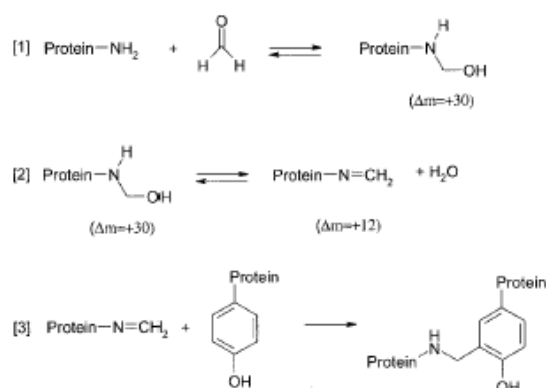


Figure II.3.1 : Mécanisme de fixation du paraformaldéhyde (PAF) entre les protéines. (Metz et coll, *J. Biol. Chem.* **2004**).

Une nuit dans une solution tampon contenant du formaldéhyde est suffisante pour maintenir la viabilité des tissus ; cependant, cette réaction ne semble pas s'arrêter après l'élimination du réactif, et la formation des ponts méthylènes continue au cours du temps, augmentant ainsi la complexité du réseau.

Ces ponts sont particulièrement difficiles à rompre et leur cassure peut s'accompagner de la destruction de la liaison peptidique elle-même. Par conséquent, très peu d'approches utilisant

la spectrométrie de masse ont été réalisées sur ces échantillons. Récemment, des équipes se sont intéressées à la possibilité de digérer par une enzyme les tissus fixés, puis d'identifier les peptides après séparation chromatographique et expériences MS/MS. (Crockett et coll, *Laboratory Investigation*. **2005**, Palmer-Toy et coll, *J Proteome Res*. **2005**, Hood et coll, *Molecular and cellular Proteomics*. **2005**).

Cette approche a permis l'identification de centaines de protéines sur des tissus cancéreux ou des cellules, mais aucune localisation ni information sur la répartition des marqueurs sur la coupe n'a pu être obtenue par cette approche, nécessitant l'utilisation d'anticorps pour des études traditionnelles d'immunohistochimie. Nous souhaitons donc réaliser une approche en imagerie MALDI sur ce type de tissu, ce qui permettrait de réaliser la localisation d'un très grand nombre de protéines en une seule acquisition (contrairement à l'immunohistochimie classique). Cependant, si la réaction de fixation continue au fil du temps, comment peut-on réaliser des études comparatives pour une recherche de biomarqueurs, si un tissu fixé depuis quelques mois ne fournit pas les mêmes résultats que lorsqu'il a été fixé depuis des années ? Pour compliquer encore la situation, aucune analyse MALDI sur du tissu fixé n'a encore été réalisée à notre connaissance.

**DIRECT ANALYSIS AND MALDI IMAGING ON FORMALIN FIXED PARAFFIN
EMBEDDED TISSUE SECTIONS (FFPE).**

Lemaire R.¹, Desmons A.¹, Tabet JC.², R. Day³, Salzet M.^{1*}, Fournier I.^{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 : Synthèse, Structure et Fonction de Molécules Bioactives, UMR-CNRS 7613, Boite 45, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

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

ABSTRACT

Formalin fixation, generally followed by paraffin embedding, is the standard and well established processing method employed by pathologist. This treatment conserves and stabilizes biopsy samples for years. Analysis of FFPE tissue from biopsy libraries has been, so far, a challenge for proteomics biomarker studies. We present here two methods to directly analyze FFPE tissues by MALDI/MS. The first is based on the use of a reactive matrix 2,4-dinitrophenylhydrazine and is only available for FFPE tissues stored less than 1 year . The second approach is applicable for all FFPE tissues whatever the time of conservation. This combines the use of automatic micro-spotting of MALDI matrix after *in situ* tissue enzymatic digest by automatic micro-spotting followed by nanoLC/MS-MS analysis. Using two adjacent tissue sections it is possible to perform protein identification and molecular images. Combination of these approaches allows MALDI direct analysis and MALDI/MS imaging to open the door to clinical studies.

*Corresponding authors

INTRODUCTION

Since its introduction in the mid 80's^{1,2,3}, MALDI mass spectrometry has become a powerful tool in the field of biological research especially in proteomic. Recently, Caprioli⁴⁻⁶ and other groups⁷⁻¹³ developed MALDI techniques for direct tissue analysis and molecular imaging allowing the detection and localization of a large number of compounds directly from tissue in one acquisition. However, at the present time all applications have been realized on fresh frozen tissues without any tissues fixations or process of conservation excepted ethanol fixation¹⁴ However, the major source of samples are FFPE tissues from hospitals libraries. No study has been published yet using the MALDI/MS approach for FFPE tissues. Recently, few studies using LC-MS/MS proteomic method on FFPE tissue have been described¹⁵⁻¹⁷. Using this strategy, large numbers of proteins were identified demonstrating the power of this approach for profiling studies. However, this method does not give access to anatomical localisation of peptides/proteins in tissue. Currently immunohistochemistry is the best technology for providing such information. However, this approach requires knowledge of the protein candidates and the use of specific antibodies. Localisation of several proteins in one experiment is difficult. Thus, this technique appeared to be more suitable for a biomarker(s) validation and less for biomarkers hunting.

RESULTS

Formalin fixation is known to induce methylene bridges formation between free amine functions and especially between lysines lateral chains NH_2 functions or N terminal part of proteins. Fixation process has also been described to pursue during conservation of the sample. Thus, direct analysis and MALDI imaging were studied here depending upon the conservation time of the sample using rat brain FFPE blocks as model.

In a first approach FFPE tissues fixed over 24 hours and stored for less than 1 year were studied and compared to unfixed frozen samples in term of spectra quality (i.e. signal intensity and resolution, signal to noise ratio and mass range) by direct MALDI analysis. Sinapinic acid (SA) and α -cyano 4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrices were both tried and results compared with those of frozen tissues. For both matrices, decrease in signal intensity and number of peptides/proteins detected were observed. Loss of signal was especially important in the higher mass range and in peculiar using HCCA as matrix. Best results in term of signal intensity and mass range were obtained using SA. Comparison of direct MALDI analysis of FFPE tissues and frozen ones (Figure 1A) with SA as matrix shows that basically same ions are observed on both mass spectra, although signal intensity is slightly lower on FFPE tissues and relative peak intensity different. Most striking observation relies in peak shape. FFPE tissue presents multiple peaks overlapping each other and inducing loss of resolution and difficulties in mass measurement, whereas frozen sample present classical single peak shape and awaited resolution. Multiple peaks show a repetition of +12 Da to the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion generally observed (e.g. m/z 5493.08 and m/z 5505.47). This multiple peaks formation is directly connected to the process of formalin fixation and had been previously described in previous works^{18,19}. These adducts formation can be explained by a mechanism described by Metz et al²⁰ suggesting the formation of a Protein-N=CH₂ compound (with $\Delta\text{M}=12$). FFPE tissues can be analyzed using direct MALDI analysis but a decrease in signal intensity and resolution were observed. Protein cross-linking cannot be reversed provoking the difficulties of analysis. However, it is extremely probable that non reacted formalin molecules could also be a problem for MALDI analysis.

Thus, we studied the possibility of neutralizing residual formalin molecules to improve signal. In traditional analytical procedures, 2,4-DNPH was successfully used to detect the presence of ketones or aldehydes molecules in solution. Moreover, 2,4-DNPH was used as a MALDI matrix²¹ by reacting with reactive function and especially free aldehydes. Here, we show that 2,4-DNPH can be used as matrix for direct tissue analysis (Figure 1B). Used on FFPE tissues, this matrix gives particularly good results. High increase in signal intensity is

observed for the m/z range corresponding to peptides (< 5000) and peak of adducts corresponding to protein-N=CH₂ ions are suppressed (Figure 1B). Adducts suppression allows for much more precise m/z determination, and for peptide mass range MALDI direct analysis performances are similar those of frozen tissues. The methylene bridges are very strong links but it is likely that the 2,4-DNPH is able to neutralize aldehydes which have not reacted with NH₂ groups, thus increasing the signal of unreacted species. 2,4-DNPH has good performances on tissues. However, for proteins of higher mass, direct analysis remains difficult. One of the major obstacles for the use of this matrix for MALDI imaging was its crystallization pattern. 2,4-DNPH crystallizes in long needles that do not cover the whole surface of the tissue. However, mix of 2,4DNPH with HCCA in equal proportion preserves the benefit of the DNPH *i.e.* neutralization of formalin, while HCCA gives the desired even crystallization of the whole tissue surface. This matrix mix was, then, used to perform MALDI imaging on FFPE rat brain tissue sections stored for 6 months to 1 year. As shown on Figure 1C for images reconstructed from data recorded in the cerebellum area, specific localization of peptides is observed as given in example for m/z 1075, 1594, 2726 and 5163 ions.

For FFPE rat brain tissues stored over more than 1 year (here 2 years), it is impossible to obtain good signal by direct analysis of tissue after paraffin removal (Figure 1D). This phenomenon can be attributed to formalin reticulation which still progresses with time, creating a particularly abundant protein network. For such tissue another analytical strategy must be developed. Considering that methylene bond is a strong link, difficult to break without destroying the peptide backbone, we designed a biochemical approach using endopeptidases enzymatic digestion. Recently, this approach was successfully applied for protein identification from formalin fixed tissues using LC/MS/MS^{15, 16, 17}. However, to our knowledge, direct digestion on FFPE tissues for direct MALDI-MS analysis was never developed. Using enzymatic digestion directly on tissue performing whole section digestion by covering the whole slice with enzyme solution, numerous signals corresponding to digest peptides can be observed, as presented Figure 2A for trypsin digestion of the whole tissue section over 15 min. Interestingly, despite the fact that directly on tissues, even on frozen ones, fragmentation studies present a difficulty with very low fragmentation yields as previously described²², peptides from enzymatic digestion present the classical behaviour of peptides toward fragmentation. Metastable decay experiments performed on observed peptide ions with a MALDI-LIFT-TOF directly on the tissue after digestion, enabled us to identify several proteins, as exemplified for fragmentation study on peptide at m/z 1372.68 that can be identified to tubulin β -chain by data bank interrogation, confirming that the peptides

correspond to digest peptides coming from the tissue. Several parameters, such as, the buffer used, the concentration of the enzyme, the temperature and time of digestion were tested. The Tris or bicarbonate buffers gave similar results.. Concerning temperature, digestion was preferably carried out at ambient temperature and no major difference was observed compared with a digestion at 37°C, probably due to the strong concentration of enzyme used. Concerning the time of digestion, many signals were obtained with very short incubations (2 min) as well as longer ones (up to 3 hours). These incubation times remain shorter than the traditional overnight digestions which could lead to saturation of signal due to the abundance of detected peptides. In all cases, experiments were extremely reproducible for identical time and enzyme concentration. Various enzymes were also tested, mainly V8 protease, aspN and lys C endopeptidases. As expected, very specific profiles were obtained according to the enzyme used (Figure 2B). Other fixation procedures were also studied (e.g. Bouin's protocol,²³), and successfully analyzed after enzymatic digest (data not shown). It is thus possible to obtain and detect peptides/proteins directly from fixed tissues, by MALDI direct analysis after enzymatic digestion with various types of enzyme whatever the fixation process used.

Same experiments of *in situ* digestion can be carried out on micro-area (up to 1 mm) by micro- depositing the enzyme solution on specific area of the tissue using either a micro-pipette for larger spot or a very fine capillary. Digestions on very small areas give excellent results. Micro digestion presents several advantages which are less complex peptides/proteins mixture to analyze since less of these compounds are present on small areas, better enzymatic hydrolysis yields, delocalisation of only compounds digested on the micro deposited area. Comparison of digestion profiles obtained from two different regions of the same rat brain section after MALDI direct analysis clearly demonstrates the specificity of the strategy

Moreover, in order to give MALDI direct analysis of tissues compatible with histological procedures and especially histological staining that are classically used in hospital for diagnosis on biopsy samples, the 2 years old rat brain FFPE tissue sections were submitted to enzymatic digestion after coloration. Chaurand et al. have shown that many staining procedures were compatible with direct analysis, as well as imaging of frozen tissues²⁴. The area of interest can be located then directly analyzed by mass spectrometry after matrix deposition. In our study, methylene blue, toluidine blue, and hematoxylin eosin safran (HES) staining were tested and compared to adjacent unstained tissue sections using direct MALDI analysis at the same locations after micro-spotting of the enzyme in these specific areas. As expected, the procedure resulted in good signals (Figure 2C). The detection of peptides is slightly lower than for untreated tissue, in the mass ranges 1000-1500 and 1800-2300 u, but is

basically the same as for unstained sections. This phenomenon has also been noted during the study of frozen tissues by Chaurand *et al.*²⁴, and for FFPE tissues, a correlation between time and coloration of the tissue leads to a considerable reduction of spectral quality. Nevertheless, when traditional times of staining are used, very good signals, mainly equal to signals obtained from unstained sections, were observed for direct MALDI analysis after trypsin digestion.

For improving protein identification extraction procedures after *in situ* digestion was studied. Extraction using various techniques and in particular Tris buffer, H₂O, ethanol and direct deposition of functionalized magnetic beads (C8 or C3 functionalized silica beads) were tested²⁵. Figure 2D presents MALDI analysis of digestion peptides after on tissue digestion and extraction with different protocols. These results show the importance of the extraction step that orientates protein identification depending on the physico-chemical properties of the buffer or support used inducing a pre-fractionation of the very complex sample. Extraction of digestion peptides was followed by purification step for desalting and buffer removal when needed (especially for Tris buffer or ethanol extraction) before injection on a nanoLC-nanoESI system. Method was validated by comparing nano-HPLC profiles to profiles obtained by *in vial* enzymatic digestion after removing the tissue region of interest on a slice with a scalpel. Very comparable results were obtained in both strategies comparing same extraction protocols demonstrating that *in situ* digestion and extraction present identical performances as *in vitro* ones. Figure 3A presents the traced chromatogram obtained reporting the total ion current of the mass spectrometer detector against the retention time obtained after on tissue digestion with trypsin and extraction using C8 functionalized silica beads. Measuring *m/z* of peptides for each chromatographic peak, performing automatic MS/MS experiments on most intense ones and using these data for databanks interrogation, more than one hundred proteins were identified by this approach (Figure 3B). All identified proteins are proteins expected to be found in rat brain. From databank information subcellular localization of these proteins can be obtained. It is very interesting to observe that proteins from very different cellular compartment such as cytoplasm, cytosol, nuclear envelope or cytoskeleton are present demonstrating that “MALDI enzyme assisted direct analysis” digestion does not occur just at the surface of the cell but really induce efficient hydrolysis inside cells. Similarly, identified proteins are implied in very different biological activities (e.g. enzyme, regulation, or signal transduction) showing that this strategy allows for obtaining a large panel of protein functions. Moreover, detection of very high mass proteins directly from the tissue e.g. Na⁺/K⁺ transporting ATPase (111kDa) or neural cell adhesion molecule (95kDa) was possible in this method. Validation of the strategy on *in situ* enzymatic digestion of FFPE tissues was

obtained performing a similar analysis by nanoLC-MS/MS of frozen tissues treated with trypsin, using same digestion time and studying same area of the brain, with very similar protein profiles.

The last challenge was of course to perform MALDI imaging of these 2 years old FFPE tissues using enzymatic digestion strategy. Digesting the whole tissue section was possible but would have induced a possible delocalization of certain peptides liberate by the digestion process. Different solution were tested to limit this phenomenon including in particular spray of matrix, ionic matrices²² or the use of an automatic spotter which allows the deposition of micro-droplets of matrix point by point²⁶. Studies clearly demonstrate that micro-spotting method is the best suited for MALDI imaging. Rastering the tissue section with automatic micro-spotting of trypsin enzyme allows for getting digest peptides profile of the whole sample with a maximum delocalization of the size of matrix spot (i.e. 300 μm). For these studies Tris buffer classically used was replaced by bicarbonate buffer to avoid desalting steps required when using Tris buffer. Digestion was efficient only after several spotting of the enzyme (3 in general) on the same spots requiring, thus, a high accuracy positioning micro-spotter. After digestion, matrix solution was then spotted on the same spots as enzyme and the tissue section submitted MALDI analysis, recording the images again following the same pathway of deposition. From the data recorded, images of numerous proteins could be indirectly obtained by looking to their corresponding digestion peptides images. Especially images of proteins identified by the LC-MS/MS experiments can be obtained such as Histone H3.3 with m/z 1033 ion, NCAM 1 with m/z 1521 ion, Myelin protein with m/z 1803 ion and malate dehydrogenase with m/z 1103 ions as presented Figure 3C. All these proteins as observed from the MALDI images have very different repartition inside the rat brain tissue section. Using similar automatic micro digestion followed by micro deposition of the matrix it was possible to check out that same protein localization was obtained for FFPE tissues and frozen ones, as presented for m/z 1103 ion repartition corresponding to a digestion peptide of Malate dehydrogenase protein.

DISCUSSION-CONCLUSION

FFPE is so far the easiest way for pathologist to preserve and conserve tissue pieces in hospital tissue banks but FFPE induces proteins cross-linking and provokes difficulties for MALDI direct analysis. Moreover, cross-linking continues in time course thus different analytical strategies must be developed. For conservation time below 1 year, direct analysis remains possible, but notable loss in resolution and signal are observed especially for higher mass proteins. Using the 2,4-DNPH reactive matrix, signal of peptides (less than 5 kDa) can

be retrieved with a normal resolution. Mixing 2,4-DNPH reactive matrix to HCCA, very good matrix crystallization pattern is obtained and then MALDI imaging of the peptides/proteins can be even directly performed from such tissues, with comparable results to frozen conserved samples.

For longer stored tissue (> 1 year) very few signals can be obtained from the FFPE tissues and another strategy was developed based on tissue enzymatic digestion. This approach gives abundant signal for MALDI direct analysis of 2 years old FFPE rat brain tissues and was proved to be compatible with classical histology colorations. Protein identification was also possible by extraction after the digestion and analysis by LC-MS/MS. "MALDI-MS enzyme assisted direct analysis" allows the detection of many proteins with different subcellular location, biological activities, or molecular mass including high molecular weight compounds. By combining enzymatic cleavage on tissue with high accuracy automatic spotting of enzyme and matrix, and ESI identification of peptides/proteins, we performed for the first time MALDI imaging on 2 years old archived FFPE rat brain tissues, and successfully obtained the location of several proteins that have been identified. Localization of several proteins on frozen tissue appeared to be similar when compared to FFPE tissue as in the case of Malate dehydrogenase.

These results open the door to archived tissues for proteomic studies using MALDI-MS direct analysis and imaging experiments for localization of a high number of compounds in just one experiment.

METHODS

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 (Sigma-Aldrich). Trypsin (Promega), Asp-N and Lys-C endopeptidases (Roche), Trifluoroacetic acid (Applied Biosystems.) Acetonitrile p.a. and methanol p.a. (J.T. Baker). Indium Teen Oxide (ITO) coated glass slides were from Bruker Daltonique (Wissembourg, France).

Tissue fixation

Adult male Wistar rats weighing 250-350g (animal welfare accreditation by the French ministry of the agriculture N° 04860) maintained under standard care were used¹¹. Animals

were sacrificed by decapitation and immediately dissected to remove the brain.. Formalin fixation was obtained according to classical procedures²³.

Tissue dewaxing and preparation

Tissue sections of 10 μm were applied onto ITO (Indium Teen Oxided) coated conductive glass slides. Paraffin was removed as previously described²³.

6 months stored FFPE tissues.

2,4-DNPH or a mix of 2,4-DNPH and HCCA was used as matrix. 20-30 μL of the mix was applied onto the tissue using a micropipette and dried at room temperature.

2 years stored FFPE tissues.

For direct analysis, several spots of 2 μL of enzyme (trypsin 0.033 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in 25mM Tris buffer pH 7.4) were performed at different spots on the tissue to obtain representative proteins/peptides profile. Enzymatic digestion was realized at room temperature after covering the tissue section to decrease liquid evaporation. Each 10 minutes, enzyme was again deposited on the same spots. After final digestion, tissue was rinsed with ethanol 80%. 30 μL of matrix was then applied on the tissue.

For MALDI imaging, spots of enzyme (trypsin at 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in ammonium bicarbonate 25 mM filtered in a 0.45 μm Pall GxF/GHP filter) were performed using a high accurate position automatic microspotter (MALDI Sun Collect Spotter, GmbH germany) operated with a 75 μm capillary column. Thus, the whole tissue section was micro-spotted with enzyme following a regular raster of spots of ~ ? μm size spaced by ? μm center to center. Flow rate was after optimization set to 300 nL/min, and ?? nL of trypsin was applied each second at different spots covering the surface of tissue. The program was repeated several times to increase time of digestion. HCCA matrix was spotted on the same spots as for the enzyme using the same program. No ethanol washing tissue step was used between trypsin and HCCA in that case.

Mass Spectrometry

MALDI-MS

MALDI-TOF mass spectra were performed on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with delayed extraction (DE) and a 337nm pulsed nitrogen laser operating at 3 Hz and 2 ns pulse width as previously described²². Either HCCA, SA, or 2,4-DNPH were used at concentrations of 10 mg/mL, 20 mg/mL and 4 mg/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. Each recorded mass spectrum was resulting from the average of 200 laser shots on the area of interest.

MALDI-Imaging

For MALDI-IMS of 6 months stored fixed and paraffin embedded tissues, imaging was performed on an Ultraflex II LIFT-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, DE) as previously described²². After dewaxing, images were obtained in positive linear mode using a mixture of HCCA and 2,4 DNPH (1:1, v/v). 30 μ L of the mix was applied onto the tissue using a micropipette and dried at room temperature.

For MALDI-IMS of 2 years stored fixed and paraffin embedded tissues, imaging was performed on the voyager DE STR, using MALDI Imaging Tools (M. Stoeckli, Novartis, Switzerland).

Nano RPLC MS/MS

Analyses were performed on an ion trap mass spectrometer (LCQ deca XP plus, Thermo electron). For each run, 0.5 μ L of digest was injected with a Switchos Autosampler (Dionex Corporation) and separation performed on a reverse phase C18 silica bonded stationary phase (75 μ m i.d., 150 mm long, 3 μ m 100 Å pore size, Dionex Corporation). Samples were washed during 2 minutes at 10 μ L/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%) during 70 minutes at a flow rate of 0.200 μ L/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 the MASCOT sequence query search program using the SwissProt database filtered for the taxonomy “rattus”. A tolerance of 2Da for peptide and 0.8 Da for MS/MS was fixed. 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.

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). The authors would also like to thanks Adeline Page, David Bonnel and Laetitia Venel for their technical collaborations. Also supported by a collaboration agreement between Bruker Daltonics GmbH and the Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides. The authors would sincerely like to thanks Mr. W. Amoyal (Disruptive Technology, France) for its collaboration in this project through access to MALDI Sun Collect Spotter.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

REFERENCES

- (1) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- (2) Karas, M.; Hillenkamp, F.; Beavis, R.C.; Chait, B.T. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1193A-1203A.
- (3) Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yashida, Y.; Yohida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- (4) Caprioli, R.M.; Farmer, T.B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751-4760.
- (5) Stoeckli, M.; Farmer, T.B.; Caprioli, R.M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493-496.
- (6) Chaurand, P.; Schwartz, S.A.; Caprioli, R.M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 87A-93A.
- (7) Spengler, B.; Hubert, M. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 735-748;
- (8) Li, L.; Garden, R.W.; Sweedler, J.V. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 151-160.
- (9) Rubakhin, S.S.; Jurchen, J.C.; Monroe, E.B.; Sweedler, J.V. **2005**, *Drug Discovery Today*, Vol 10, Number 12.
- (10) Luxembourg, S.L.; Mile, T.H.; McDonnell, L.A.; Heeren, R.M.A. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 5339-5344.
- (11) Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M.; *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9-14.
- (12) Rohner, T.C.; Staab, D.; Stoeckli, M.; *Mechanisms of Ageing and Development.* **2005**, *126*, 177-185.
- (13) Bunch, J.; Clench, M.R.; Richards, D.S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3051-3060.
- (14) Chaurand, P.; Lane, K.B.; Stathopoulos, G.; Caprioli, R.M.; Poster presented at the 53rd ASMS conference, San Antonio, USA, 2005.

- (15) Hood, B.L.; Darfler, M.M.; Guiel, T.G.; Furusato, B.; Lucas D.A.; Ringeisen, B.R.; Sesterhenn, I.A.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D; Krizman D.B. *Molecular and cellular Proteomics*. **2005**, *11*, 1141-1153.
- (16) Crockett, D.K.; Zhaosheng L.; Vaughn, C.P.; Lim, M.S.; Elenitoba-Johnson, K.S.J. ; *Laboratory Investigation*. **2005**, 1-11.
- (17) Palmer-Toy, D.E.; Krastins, B.; Sarracino, D.A.; Nadol, J.B.; Merchant, S.N.; *J Proteome Res*. **2005**, *4*, 2404-2411.
- (18) Redeker V., Toullec J.Y, Vinh J., Rossier J., Soyez D; *Anal. Chem*. **1998**, *70*, 1805-1811
- (19) Rubakhin S.S., Greenough W.T., Sweedler J.V.; *Anal. Chem*. **2003**, *75*, 5374-5380
- (20) Metz, B.; Kesrstein G.F.A.; Hoogheroot, P.; Brugghe, F.H.; Timmermans, H.A.M.; De Jong, A.; Meiring, H.; Hove, T.J.; Hennink W.E.; Crommelin D.J.A.; Jiskoot, W.; *J. Biol. Chem*. **2004**, *279*, 6235-6243.
- (21) Fenaille, F.; Tabet, J.C.; Guy, P.A. ; *Anal. Chem*. **2004**, *76*, 867-873.
- (22) Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* **2006**, *78*, 809-819.
- (23) Salzet, M, Watez, C., Verger-Bocquet, M., Beauvillain, J.C., Malecha, J. *Brain Res*. **1993**, *601*, 173-184.
- (24) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheiner, D.; Xu, B.J.; Crecelius, A.. Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2004**, *76*, 1145-1155.
- (25) Villanueva, J.; Philip, J.; Entenberg, D.; Chaparro, C.A. ; Tanwar, M.K. ; Holland, E.C. ; Tempst, P. ; *Anal.Chem*. **2004**, *76*, 1550-1570.
- (26) Haerni, H.R.; Cornet, D.S.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 823-834.

Figure Legends

Figure 1 :

A: Direct analysis on a recent FFPE tissue compared to fresh frozen direct analysis of the same region. (matrix SA).

B : Direct analysis on a recent FFPE tissue compared to fresh frozen direct analysis of the same region using 2,4 DNPH as matrix.

C : MALDI imaging experiments on recently FFPE tissues performed on MALDI-LIFT-TOF/TOF (matrix 2,4 DNPH and HCCA) (upper panel) and direct analysis on a 2 years old FFPE tissue (lower panel, matrix : HCCA).D : direct analysis on FFPE tissue after trypsin digestion (15 minutes) and MS/MS experiments on parent ion m/z 1547,69.on tissue sections using MALDI-LIFT-TOF/TOF.

Figure 2 :

A : Direct analysis on FFPE tissue after trypsin digestion (upper panel) or V8 digestion, using MALDI-MS (linear mode, positive polarity, matrix HCCA).

B: Direct analysis on HES stained FFPE tissue after trypsin digestion (upper panel) or unstained FFPE tissue (lower panel) in the same area using MALDI-MS (matrix HCCA).

C : direct analysis on FFPE tissue after a typical 30 minutes trypsin digestion (lower panel) and “multistep” of trypsin digestion (2 minutes of digestion /extraction /and 28 minutes of digestion).

Figure 3

A : nanoLC-MS/MS analysis of digested FFPE tissue (a) and correlation between direct analysis and electrospray analysis for several identified peptides/proteins after trypsin digestion (b).

B : MALDI Imaging on digested tissue in linear mode using HCCA as matrix in positive mode. Imaging can be compared with rat brain anatomy. Malate dehydrogenase localization was superimposed on that of the tissue section.

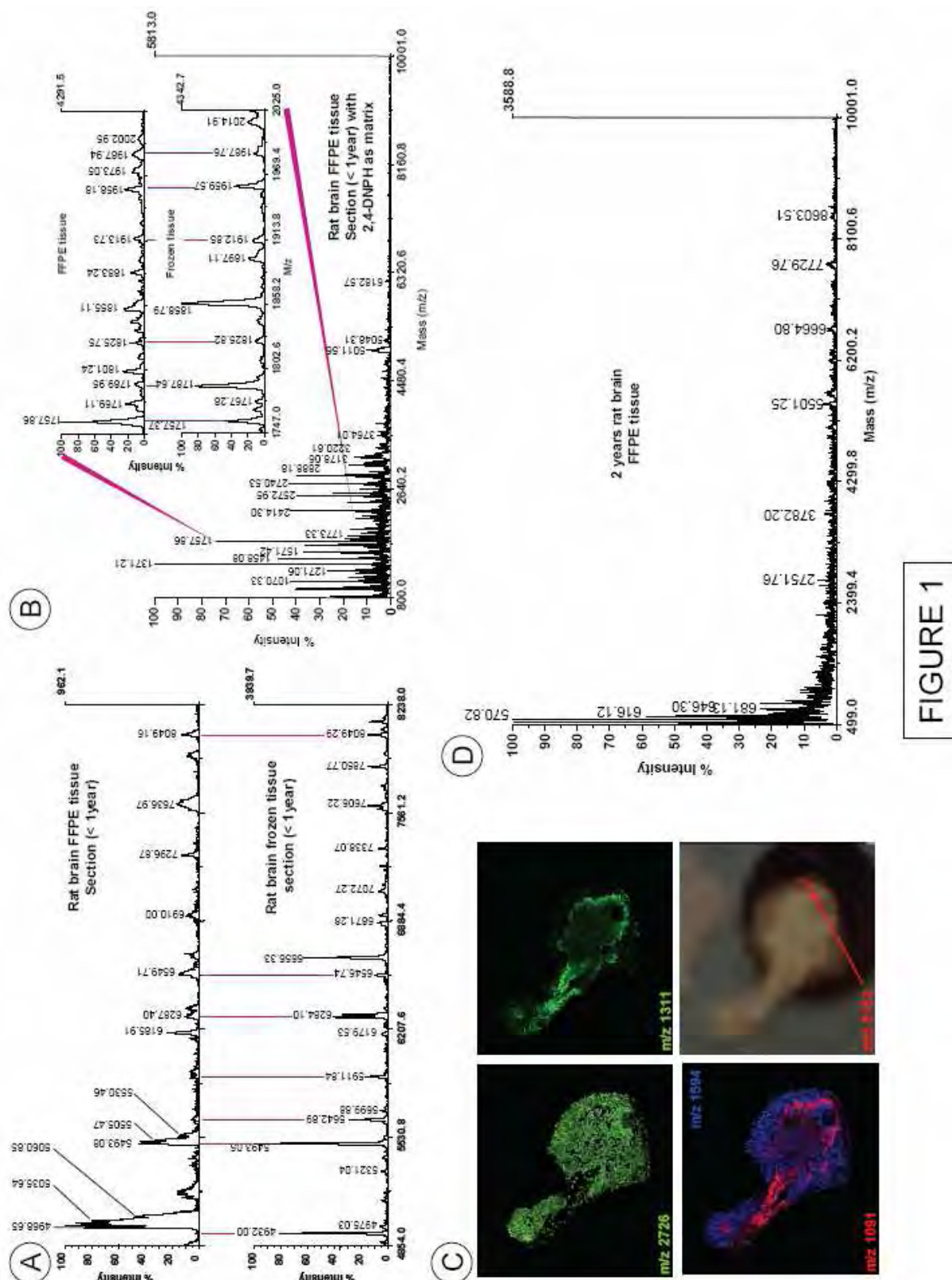


FIGURE 1

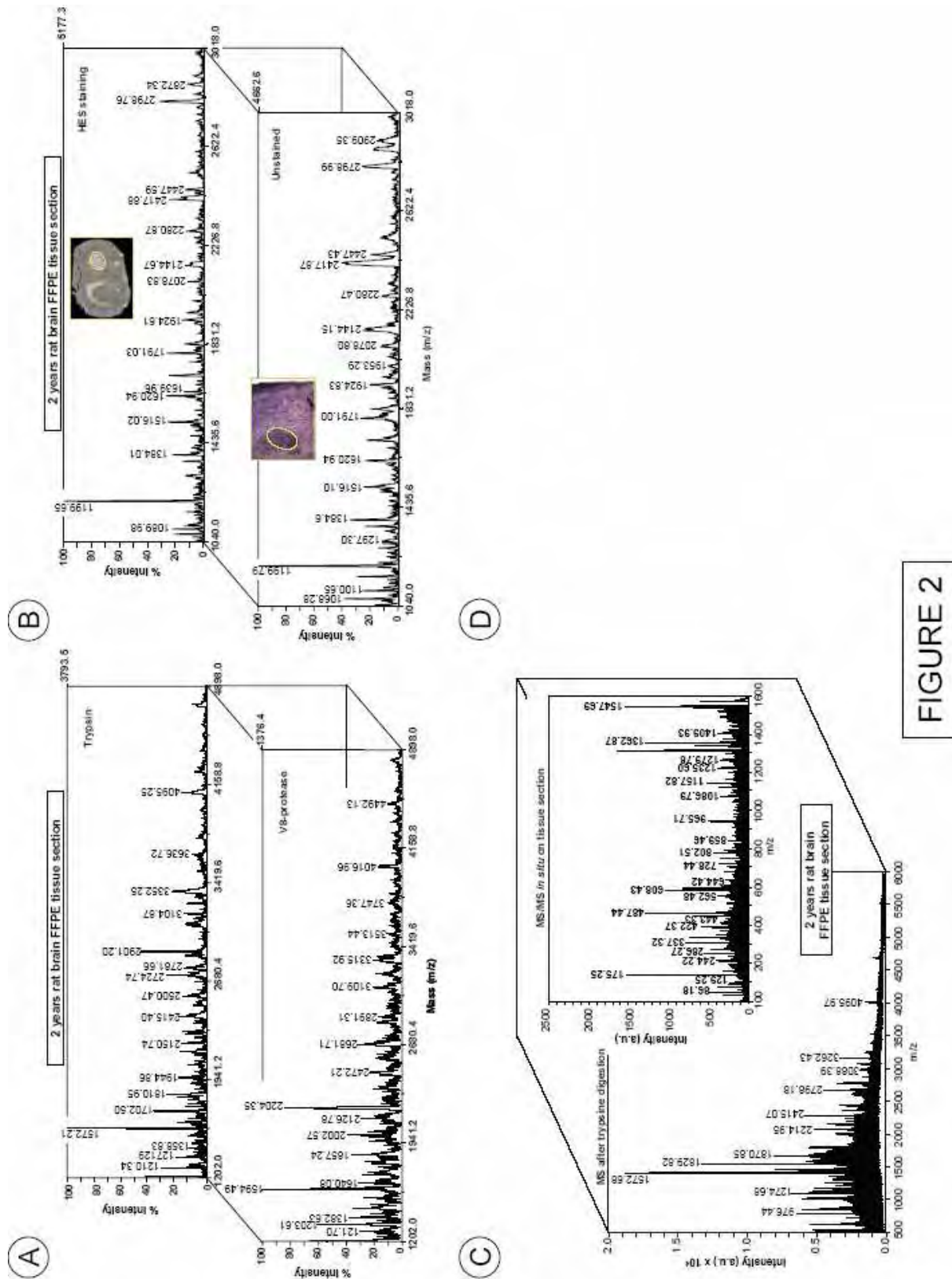


FIGURE 2

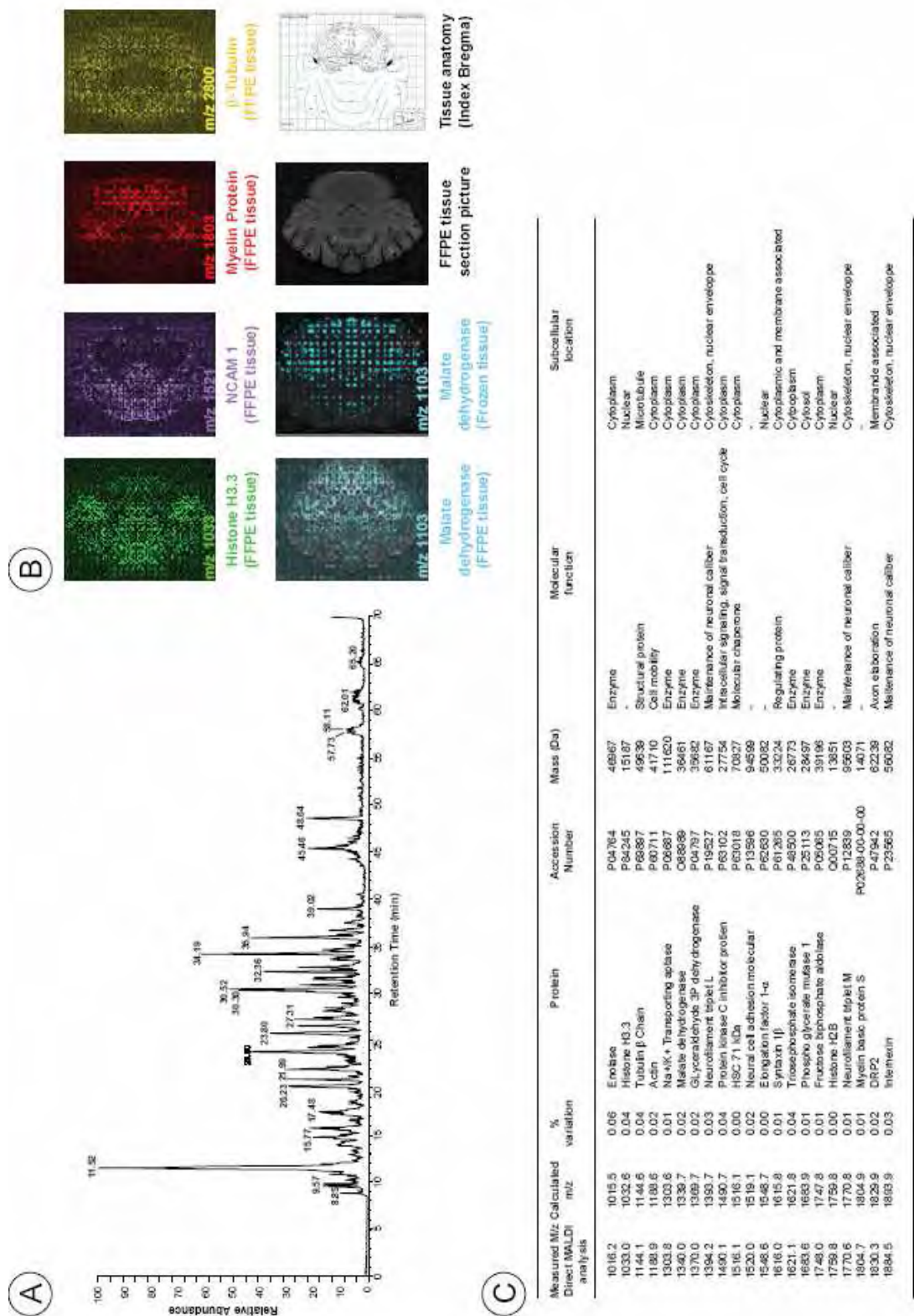


FIGURE 3

Ces travaux démontrent la possibilité de travailler en MALDI sur des tissus fixés et inclus en paraffine. La comparaison des tissus âgés de moins de 6 mois à 2 ans démontre que la procédure de fixation continue au cours du temps après élimination du réactif. Cependant, l'utilisation de la trypsine (ou de tout autre enzyme) permet d'obtenir de nombreux signaux sur coupe, quel que soit son âge et son moment de fixation, et même de réaliser des expériences MS/MS pour des identifications *in situ*.

Dans ce domaine, nous avons également étudié la possibilité d'améliorer les fragmentations sur tissus en utilisant une modification chimique. Ce type d'approche a été développé avec succès par Keough et coll pour des peptides en solution (Keough et coll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999), où une dérivation côté N terminal du peptide a permis d'orienter les fragmentations et d'améliorer la sensibilité pendant des expériences en mode PSD.

- **Dérivations sur tissus**

Les dérivations N terminales sont basées sur l'ajout d'un groupement chargé positivement (ou fortement basique) à l'extrémité NH₂ du peptide. Les spectres obtenus fournissent une série d'ions plus complète et surtout unique (uniquement la série y) et non un mélange de fragments b et y, facilitant ainsi l'interprétation des spectres (Figure II.3.2). Cette stratégie est particulièrement utile pour l'identification de protéines ou peptides notamment lorsque l'utilisation des banques de données est délicate (génomme non séquencé).

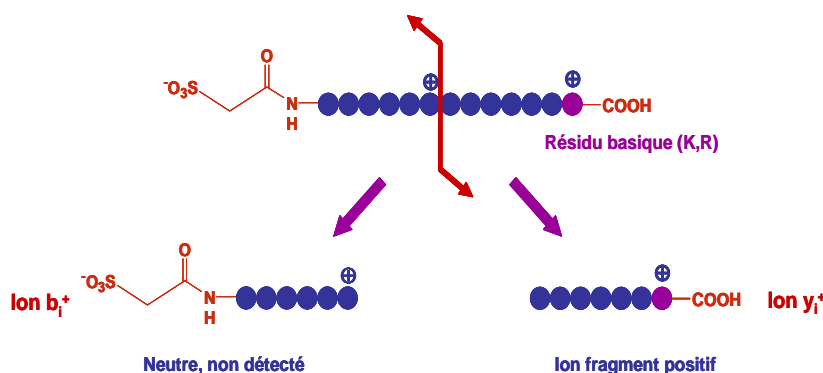


Figure II.3.2 : Représentation de l'orientation des fragmentations dans le cas d'une dérivation par un groupement acide sulfonique en N-terminal (travaux de Keough et coll.)

Pour la réaction, on utilise généralement des groupements sulfoniques (Figure II.3.2) se greffant sur la partie N terminale. Ces dérivations sont particulièrement bien adaptées aux fragments issus de digestion trypsique, avec des instruments du type MALDI/TOF (PSD) ou en ESI avec le CID. On peut distinguer : les dérivations utilisant l'acide sulfonique ; un NHS ester compatible avec le milieu aqueux (Keough et coll, *Anal Chem* **2003**) ; celles à partir de SPITC (4-Sulfofenyl isothiocyanate) utilisable en milieu organique (ethanol/pyridine) (Marekov et coll, *J. Mass. Spectrom.* **2003**) ou en milieu tamponné (tampon bicarbonate, Lee et coll, *Proteomics*, **2004**). Le mécanisme proposé pour la fragmentation après dérivation au SPITC est le suivant : (Figure II.3.3)

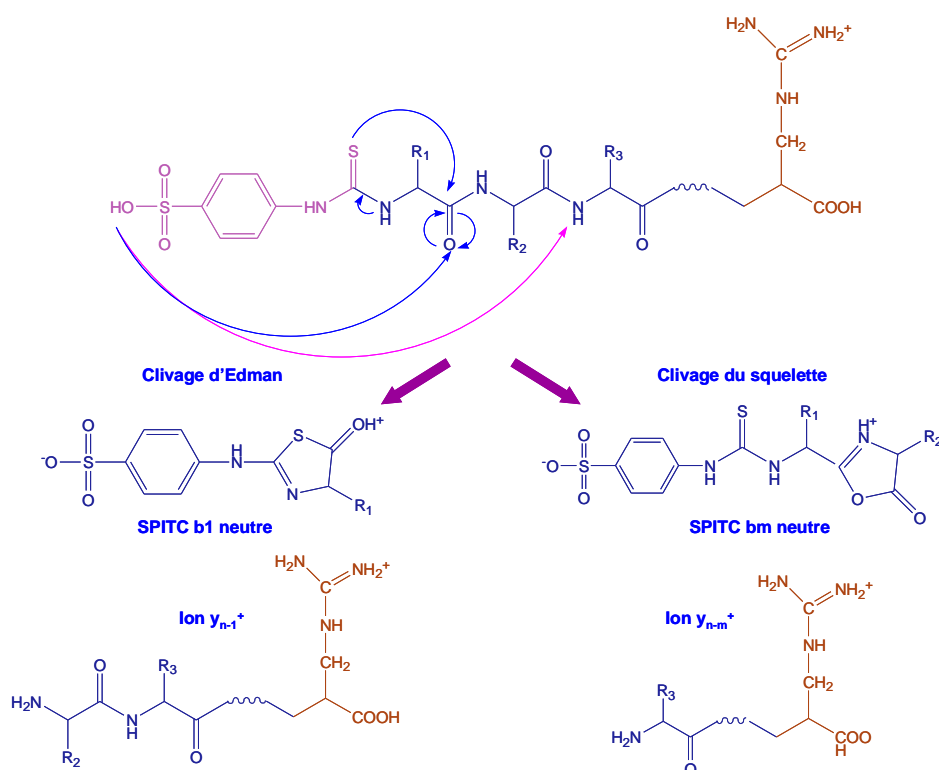


Figure II.3.3 : Représentation de l'orientation des fragmentations par dérivation N-terminale des peptides au SPITC (Travaux de Lee et coll.)

L'utilisation de ce type de produit sur tissus implique que le solvant et le dérivatif puisse pénétrer à l'intérieur de la coupe et que le temps de contact entre les peptides et le réactif puisse être suffisamment long. Ces réactions nécessitent très souvent un chauffage au minimum à une cinquantaine de degrés pendant une heure, ce qui est classique des systèmes de dérivations tels que ceux utilisés en chromatographie en phase gazeuse. Ce chauffage renforce cependant la difficulté de maintenir constant le volume du milieu réactionnel.

Appliquées sur des standards, toutes ces dérivations ont permis l'accès à l'orientation des fragmentations ; les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque le peptide est terminé par un résidu basique, comme c'est le cas pour le peptide témoin de séquence ASHGLAR ou l'ion m/z 1040 (peptide + dérivatif de masse 215u) a été détecté. Des ions de masse m/z 868 (peptide+dérivé-171) correspondant à la perte d'une partie de la dérivation ont également été repérés. (Figure II.3.4).

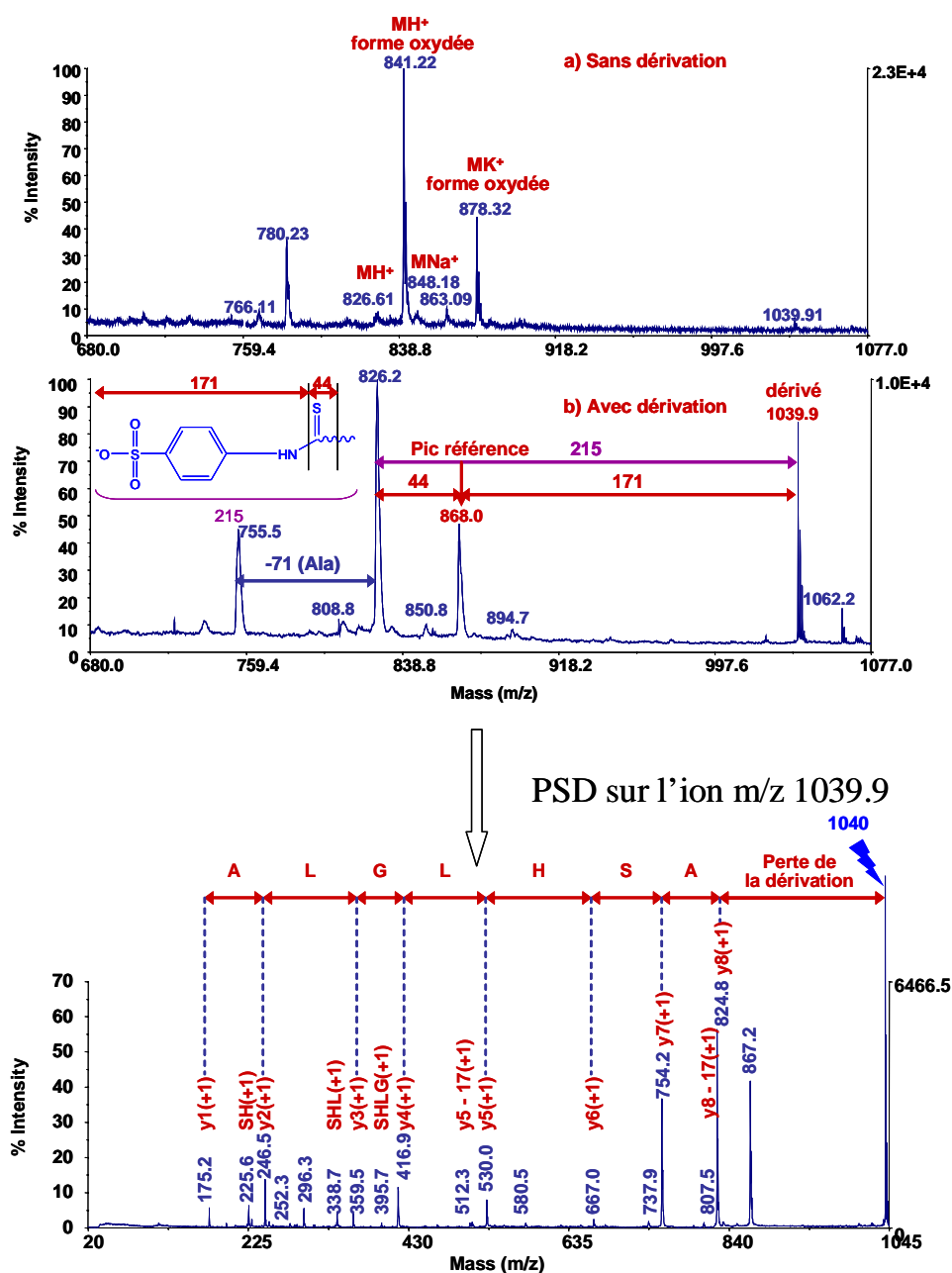


Figure II.3.4 : Spectres MALDI en mode réflecteur positif du peptide standard ASHLGLAR avant et après dérivation N-terminale au SPITC (panel du haut) et Spectre PSD (mode positif) du peptide ASHLGLAR dérivé en N-terminal par le SPITC (panel du bas).

Ces expériences PSD nous permettent de constater que l'intensité des ions fragments est augmentée et à cela s'ajoute, comme nous l'attendions, la présence majoritaire de la série y qui se révèle complète (de y1 à y8). Quelques ions correspondants à une perte de NH₃ (-17) sont également observés ainsi que quelques fragments internes. Tous ces protocoles ont été testés sur tissus fixés après traitement à la trypsine ; les meilleurs résultats en nombre de peptides dérivés ont été obtenus en utilisant le SPITC en milieu organique ethanol/pyridine ou le milieu réactionnel et le dérivatif sont rajoutés au fur et à mesure de la réaction pour maintenir un volume constant à 60°C.

Après rincage à l'éthanol 80% pour éliminer l'excès de réactif, l'analyse directe révèle près d'une trentaine de composés dérivés avec succès (Figure II.3.5). Cependant il apparaît que les composés dérivés sont les composés majoritaires. Des expériences PSD ont été ensuite réalisées, mais des séquences « orientées » sur tissus n'ont pas encore été obtenues. La perte du dérivatif a cependant été observée pour certains (comme pour l'ion de m/z 1200) permettant de confirmer que le peptide a bien été modifié.

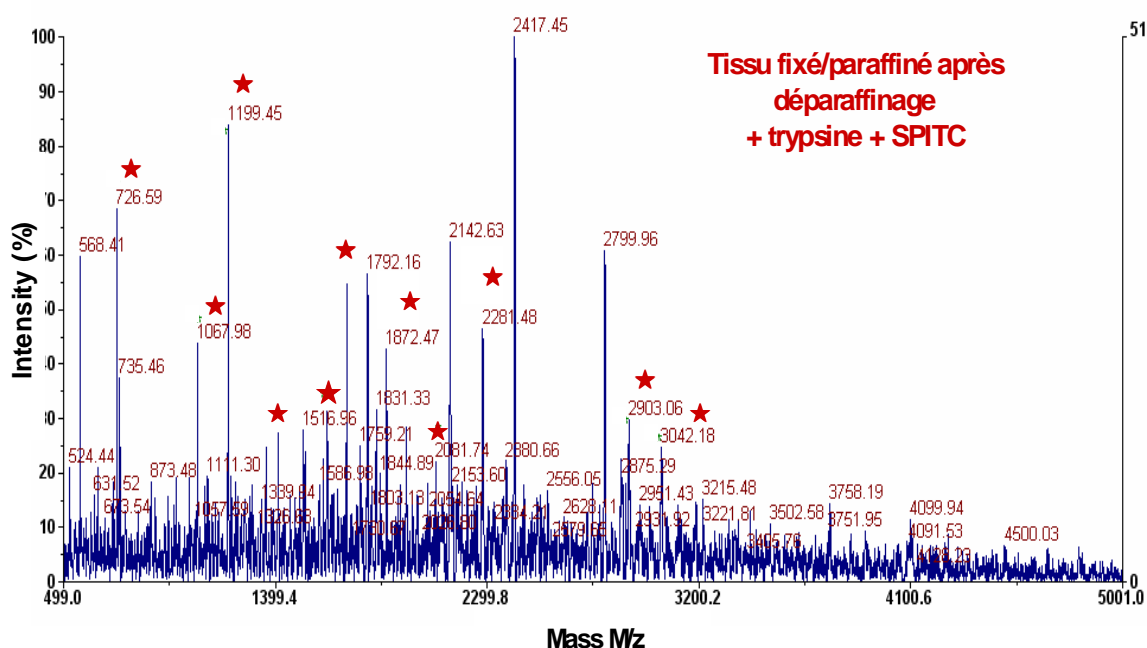


Figure II.3.5 : Spectres obtenus en analyse directe sur tissu fixé et déparaffiné après digestion à la trypsine et dérivatif au SPITC.

Des expériences similaires ont été effectuées sur du tissu frais, avec ou sans digestion enzymatique. Des résultats équivalents ont été observés preuve que cette absence de fragmentation n'est pas propre aux tissus fixés.

Sur tissus congelés, nous détectons plus facilement des peptides deux fois ou trois fois dérivés (probablement sur les chaînes latérales des lysines) ce qui laisse penser que le rendement de dérivatif est correct mais qu'une partie du réactif est utilisée pour une réaction parasite.

Ici encore, les meilleurs résultats ont été obtenus avec le SPITC en milieu organique et après une digestion à la trypsine (Figure II.3.6).

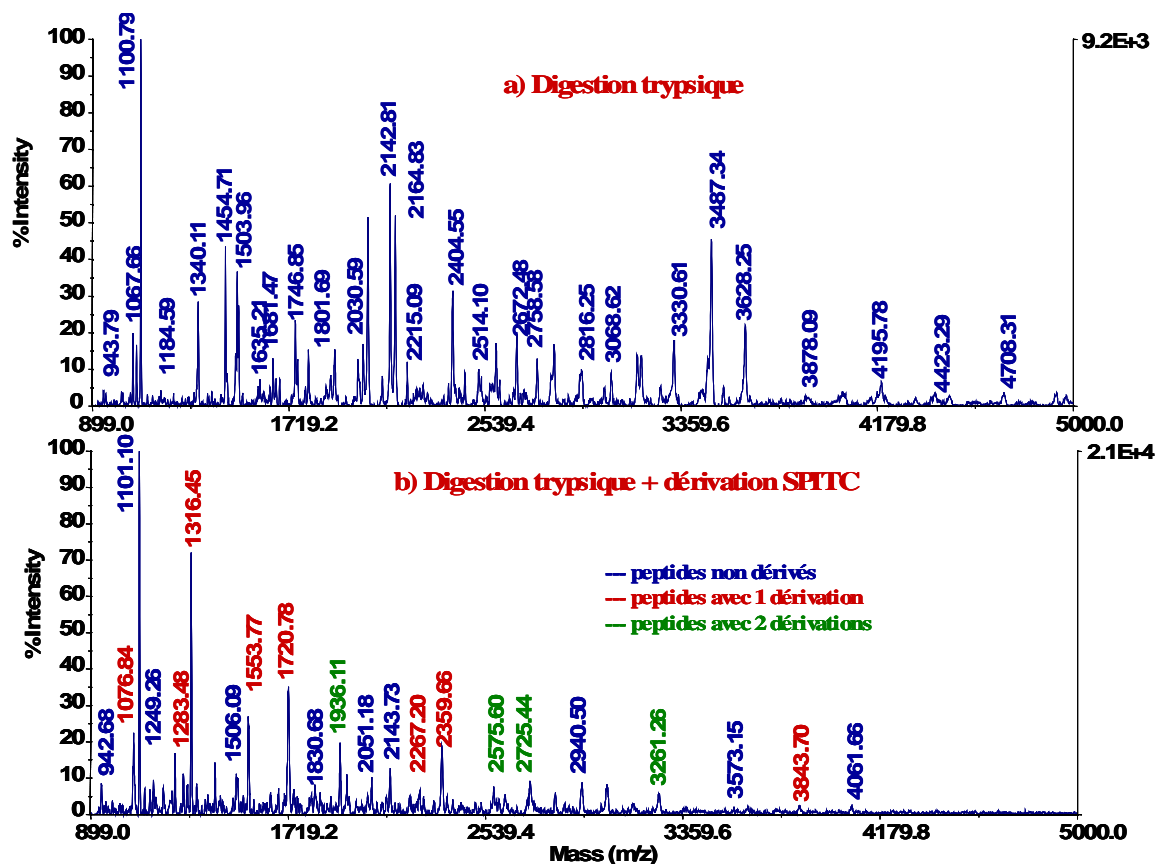


Figure II.3.6 : Spectre MALDI en mode linéaire positif enregistré sur une coupe de cerveau de rat fraîche (congelée) après avoir soumis la coupe à une dérivation au SPITC.

Ces réactions secondaires peuvent néanmoins être réduites par des systèmes de protection chimique se greffant sur les chaînes latérales des lysines. On peut par suite envisager une étape de guanidination en présence d'O-méthylisourée (Keough et coll *Anal.Chem.* **2003**) mais il est nécessaire d'adapter ce protocole pour les tissus.

Ainsi, même si les fragments orientés sur coupes n'ont pas encore été obtenus, nous démontrons clairement qu'il est possible de modifier chimiquement des molécules contenues dans les tissus ; ces dérivations sur tissus sont à notre connaissance les premières modifications chimiques décrites sur coupes. Par suite, il est envisageable de réaliser des méthylation après réductions de ponts disulfures des protéines dans les coupes, afin d'augmenter le taux de clivage par l'enzyme. L'utilisation du MALDI TOF/TOF devrait nous aider à améliorer le signal après dérivation mais aussi à gagner en temps d'acquisition.

En attendant, une identification plus rapide et plus efficace peut être réalisée par nanoLC-MS/MS en mode automatique (data dépendant mode), suivi d'une interrogation en banque de données comme il a été décrit dans la publication N°3. Dans cette étude, des expériences d'imagerie ont également été réalisées avec succès en utilisant un spotter automatique de haute précision ; la trypsine est déposée point par point, puis la matrice, aux mêmes endroits que l'enzyme, limitant ainsi les risques de délocalisation. Les localisations obtenues sur des tissus fixés sont semblables aux localisations de la même protéine sur tissu frais.

Plusieurs points sont importants à souligner dans cette méthode ; tout d'abord, du fait du nombre très important de signaux obtenus après digestion, une calibration interne sur le tissu est quasi obligatoire pour ne pas attribuer un signal qui appartiendrait à une autre protéine. De la même manière, pour des applications sur la localisation de biomarqueurs par exemple, les paramètres de reconstruction des images doivent être choisis avec suffisamment de précision (précision de 1 ou 2 Da maximum), pour ne pas obtenir d'images résultant de la colocalisation de 2 protéines.

L'utilisation du mode réflecteur peut également permettre de lever certaines ambiguïtés, notamment lorsque la largeur d'un signal laisse supposer que plusieurs peptides peuvent être détectés avec des masses très proches. Cependant, les mêmes difficultés à utiliser le mode réflecteur sur tissus frais se retrouvent également sur tissus fixés même après digestion, et les signaux sont bien souvent trop faibles, voire inexistantes avec les matrices traditionnelles. Pour ce faire, le recours à la matrice ionique HCCA/ANI peut être envisagé.

Ainsi, même si la cristallisation de cette dernière est moins homogène que sur le tissu congelé, des acquisitions peuvent être réalisées avec succès en mode réflecteur, avec des intensités toutefois plus faibles que sur tissu non fixé. (Figure II.3.7).

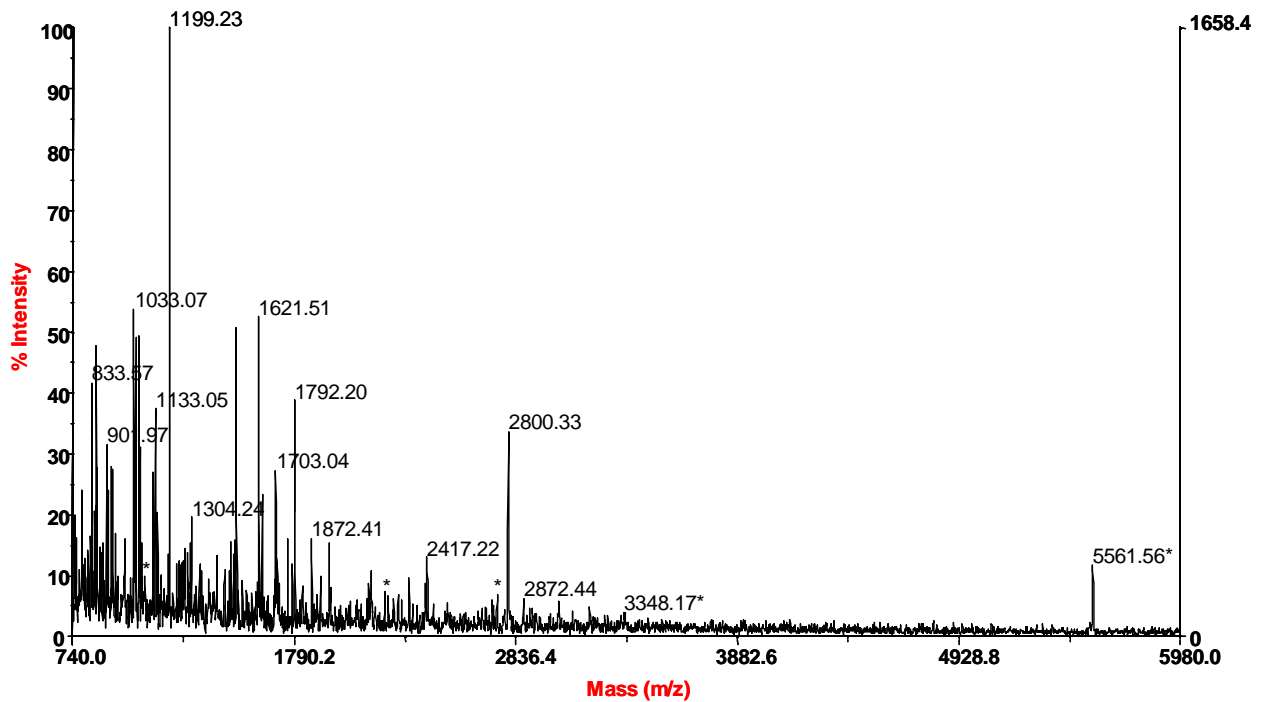


Figure II.3.7 : Analyse directe d'un tissu fixé au PAF (après déparaffinage) en mode réflecteur positif, avec la matrice HCCA/ANI. Les astérisques signalent les signaux attribués à la trypsine.

Afin de s'assurer de la possibilité de réaliser une recherche ou une confirmation de biomarqueurs par analyse directe sur tissus après digestion trypsique tel que décrite dans la publication 3, nous avons expérimenté ce protocole (analyse directe après digestion + identification par LC-MS/MS) sur l'étude de cerveaux de rats lésés à la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Cette molécule en provoquant une dégénérescence des neurones à la dopamine par production de radicaux libres, est couramment utilisée comme modèle pour l'étude de la maladie de Parkinson.

- **Etude sur des cerveaux de rats lésés au 6-OHDA (maladie de Parkinson) :**

Cette maladie, qui est la deuxième plus forte maladie neurodégénérative dans le monde, touche un peu plus d'un million de personnes âgées de 65 ans et plus et se traduit par des signes cliniques sévères tels que rigidité musculaire, tremblements et lenteur des mouvements ou instabilités de posture.

Les caractéristiques principales de cette maladie sont la dégénérescence des neurones à la dopamine de la substance noire, et la présence d'inclusions cytoplasmiques appelés corps de Lewy où s'accumulent certaines protéines et notamment l' α synucléine. (Beal, *Nature Reviews Neurosciences*, 2001)

Des mutations dans les gènes codant l' α synucléine, parkin, et l'ubiquitine carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH L1), 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 dans l'organisme (Giasson et coll, *Cell*, 2003). La perte d'activité de ce système contribue au développement de la maladie à travers l'accumulation de protéines (Mc Naught, et coll, *Nature Review Neurosciences*, 2001).

De nombreuses études protéomiques ont déjà permis de déterminer certains biomarqueurs impliqués dans cette pathologie ; ces marqueurs peuvent être un bon point de départ pour valider notre approche de « profiling » après digestion sur tissus fixés. (Tableau II.3.1).

Protéine	Approche protéomique	Modification Parkinson	modele	Publication
pyruvate déshydrogénase	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
NADH ubiquinone oxydoreductase 24kDa	gel 2D	upregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
NADH ubiquinone oxydoreductase 30kDa	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
cytochrome c oxydase	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
peroxiredoxin 1	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
peroxiredoxin 2	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
peroxiredoxin 6	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
lactoylglutathione lyase	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
profilin	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
vacuolar protein sorting 29	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
α crystallin chain b	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
Lasp-1	gel 2D	downregulated	parkin -/-	Palacino et coll, 2004
α enolase	gel 2D	upregulated	6OHDA	De luliis et coll, 2005
β actin	gel 2D	upregulated	6OHDA	De luliis et coll, 2005
calmodulin	analyse directe MALDI	downregulated	6OHDA	Pierson et coll, 2004
cytochrome c	analyse directe MALDI	downregulated	6OHDA	Pierson et coll, 2004
cytochrome c oxydase	analyse directe MALDI	downregulated	6OHDA	Pierson et coll, 2004
ubiquitin	analyse directe MALDI	upregulated	6OHDA	Pierson et coll, 2005
Sérum creatine kinase	sang (réduction du NADPH)	upregulated	human	Takubo et coll, 2003
Neurofilament triplet L	gel 2D	downregulated	human	Basso et coll, 2004
Neurofilament triplet M	gel 2D	downregulated	human	Basso et coll, 2004
peroxiredoxin 2	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
mitochondrial complex III	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
ATP synthase D chain	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
complexin I	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
profilin	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
L type calcium channel δ subunit	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
fatty acid binding protein	gel 2D	upregulated	human	Basso et coll, 2004
PEP19	analyse directe MALDI	downregulated	MPTP	Skold et coll, 2006
α enolase	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004
HSP25	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004
HSP27	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004
phosphatidyl inostol transfer protein α	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004
apolipoprotein E	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004
ferritin heavy chain	gel 2D	upregulated	G93A (gene SOD1)	Strey et coll, 2004

Tableau II.3.1 : Protéines découvertes comme régulées dans différents modèles de la maladie de Parkinson.

Ces résultats sont parfois curieux, car ils peuvent grandement varier entre les différentes analyses et même être contradictoires dans certains cas ; par exemple, la peroxyredoxine 2, protéine impliquée dans le stress oxydatif, a été successivement découverte comme « downregulated » dans le modèle parkin (Palacino et coll), et « upregulated » chez l'homme (Basso et coll). Il en va de même pour d'autres protéines, comme la profilin.

Heureusement, d'autres semblent soumises à moins d'ambiguïté concernant leur régulation ; c'est le cas de l' α émolase, (De Iullis et coll, Strey et coll,) et des neurofilaments (Liu et coll, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004** et Basso et coll).

Dans l'étude de la faisabilité d'une approche en « profiling », pour la recherche ou la validation de biomarqueurs sur tissus fixés au PAF après digestion, des analyses directes des zones de cerveau traitées au 6-OHDA ont été réalisées, puis comparées à des analyses directes dans les mêmes localisations de régions saines. Ces études, réalisées sur 10 échantillons (dont 5 traités) restent bien entendu des études préliminaires dues au faible nombre d'échantillons analysés, et les résultats obtenus sont donc à considérer avec précaution. Notre but ici n'est cependant pas de découvrir de nouveaux biomarqueurs, mais simplement d'observer si des peptides (ou protéines) régulés peuvent être détectés et correspondent à des travaux précédemment réalisés. Pour palier le faible nombre d'échantillons analysés, nous ne considérons dans cette étude que les composés apparaissant ou disparaissant complètement entre des zones traitées et non traitées. (Figure II.3.8)

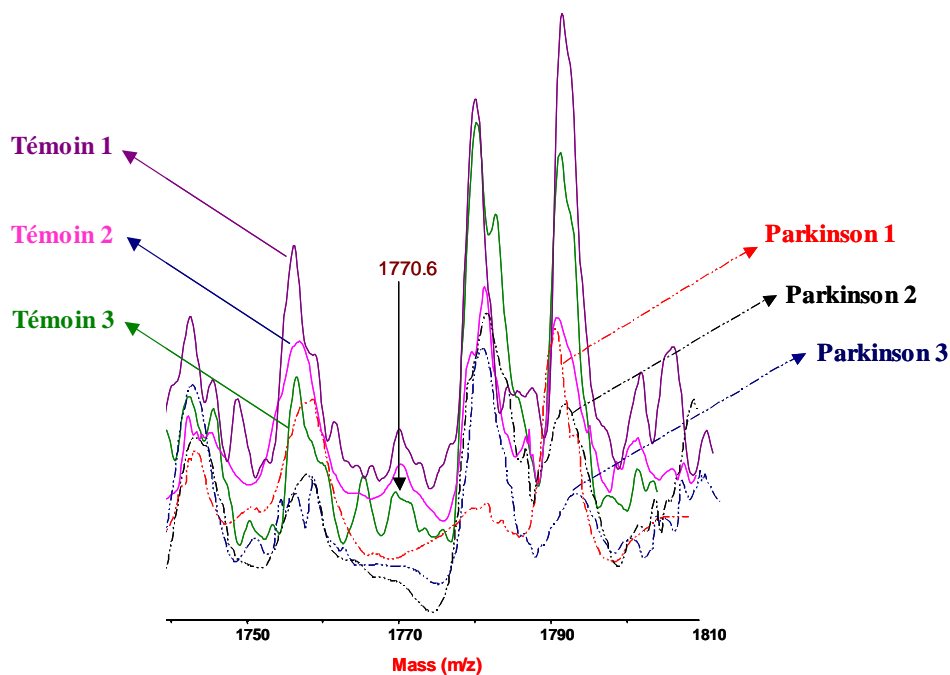


Figure II.3.8 : Superposition de 6 spectres obtenus lors d'analyses directes sur tissus fixés de régions de cerveaux lésés au 6-OHDA (pointillés) et de mêmes régions saines (ligne pleine) après digestion à la trypsine. Un biomarqueur potentiel de masse 1770,3 est signalé par la flèche.

Les digestions trypsiques sur tissus des zones saines et des zones atteintes ont ensuite été analysées par nano-LC/LS/MS, en sélectionnant les ions repérés lors de l'analyse directe. Le même type de comparaison a été réalisé en digérant dans un tube, au même temps que précédemment (3 heures), une zone entière découpée au scalpel, comparée à la même zone saine avec une surface équivalente.

Cette approche n'est évidemment pas réalisée dans des conditions de bonne quantification, qui nécessiteraient par exemple le prélèvement d'un même nombre de cellules dans les deux cas (utilisation de la microdissection laser) et la labélisation des peptides d'intérêt par des systèmes ITRAQ ou O¹⁶/O¹⁸ (Hood et coll, *Molecular and cellular Proteomics*. 2005). Nous souhaitons pour le moment réaliser une identification des composés détectés comme régulés lors de l'analyse directe, et observer les importantes variations (apparition ou disparition quasi-totale des signaux) dans les profils chromatographiques pour une possible future étude, plus approfondie dans ce cas, de recherche de nouveaux biomarqueurs.

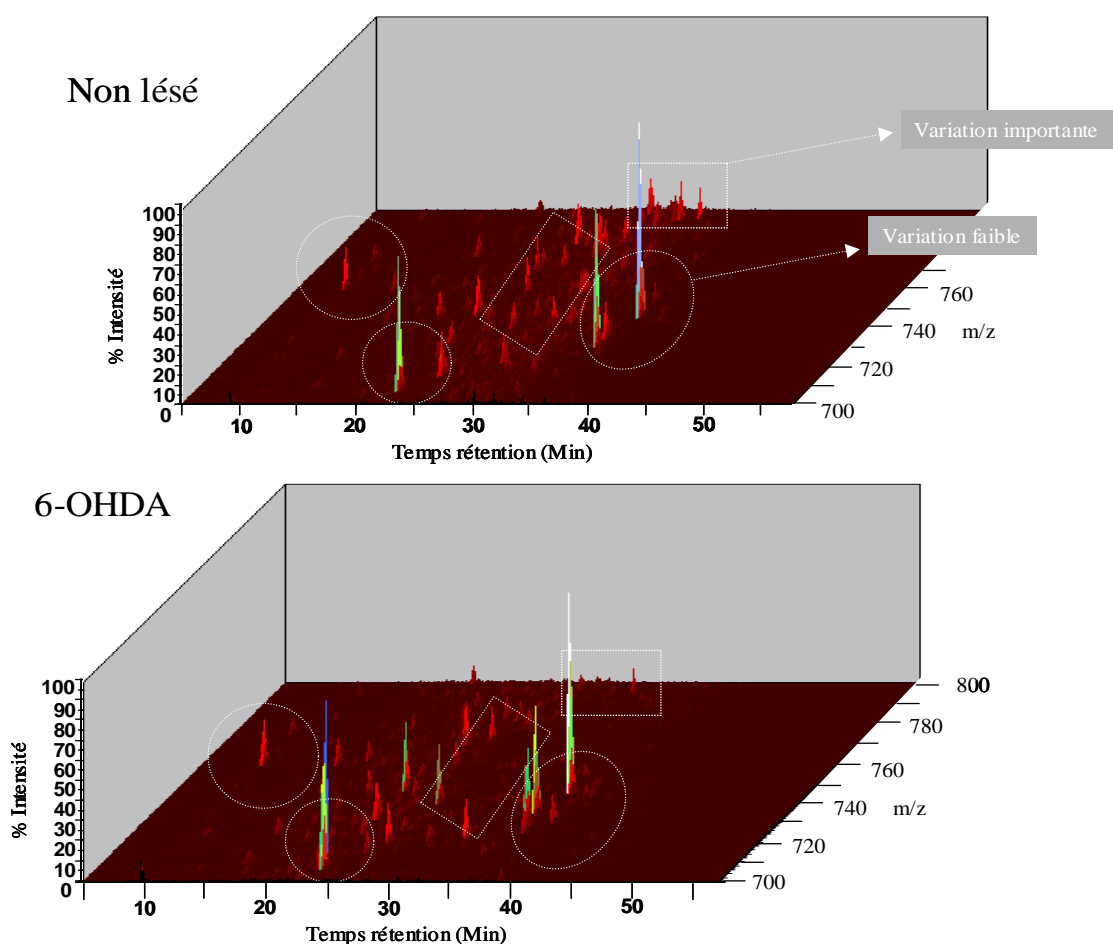


Figure II.3.9 : Comparaison des profils en 3 dimensions de peptides de masse comprise entre 700 et 800 m/z et élués entre 10 et 60 minutes de deux régions semblables de cerveau ce rat traité et non traité au 6-OHDA.

La représentation 3D du temps de rétention des peptides en fonction de l'intensité et de la masse, nous permet de repérer certaines variations importantes entre une zone traitée et une zone témoin (Figure II.3.9), démontrant que ce genre d'approche peut être utilisée pour une recherche de biomarqueurs dans la maladie de Parkinson.

Un marqueur apparaissant comme régulé négativement lors de l'analyse directe sur tissu après digestion semble également fortement régulé lors de l'analyse LC/MS ; il s'agit du peptide de masse 1770,3, identifié comme appartenant à la protéine du neurofilament triplet M, et qui n'a pas été identifié (ou détecté) lors de l'injection LC/MS des échantillons simulant la maladie de Parkinson. Cette protéine a déjà été décrite dans plusieurs études sur la maladie (cf tableau II.3.1 : Liu et coll, *Cell. Mol. Life Sci.* **2004** et Basso et coll) où celle-ci apparaît comme régulée négativement dans la maladie de parkinson. De plus, la diminution de la quantité d'ARNm semble être corrélée avec la sévérité de la maladie (Liu et coll). Ces deux informations sont concordantes avec notre résultat.

D'autres protéines apparues comme régulées dans cette étude ont également été identifiées pendant les analyses LC-MS/MS. La confirmation par la détection (ou non détection) entre les deux types d'échantillons analysés en LC apparaît cependant moins franche et nécessite une approche plus quantitative. Néanmoins, d'une manière surprenante, de nombreuses protéines apparaissant régulées dans cette approche de digestion et d'analyse directe MALDI sur coupe, ont déjà été décrites comme étant régulées dans la maladie de Parkinson. (Tableau II.3.2.)

analyse directe (MALDI)	masse identifiée (ESI)	% var calculée	protéine	score	nbre de fois détection		régulation	publication référence
					sur zone saine ^a	sur tissu lésé ^a		
1399,9	1400,5	0.04	hékokinase	71	3X/5	0X/5	"downregulated"	Pastosis et coll
1499,9	1498,8	0.07	péroxirédoxine 6	65	0X/5	4X/5	"upregulated"	Strey et coll
1770,6	1770,8	0.01	neurofilament (M)	57	4X/5	0X/5	"downregulated"	Basso et coll, Liu et coll
3062,9	3063,6	0.02	α énoïase ?	62	0X/5	3X/5	"upregulated"	De Iulius et coll, Strey et coll

^a Détection dans des régions analogues.

Tableau II.3.2 : Récapitulatif des molécules repérées comme régulées en analyse directe MALDI sur tissus fixés et digérés (avec le nombre de fois où elles ont été détectées), ainsi que leur identification réalisée en LC-MS/MS et les références où ces molécules ont été précédemment décrites dans la maladie de Parkinson.

Dans notre analyse, la péroxirédoxine 6 apparaît comme plus abondante, en accord avec les travaux de Strey et coll ; cette molécule antioxydante est produite lors des phénomènes de stress oxydatif. Cependant, la péroxirédoxine 2 avait également été décrite comme régulée, mais le sens de la régulation semblait contradictoire suivant les publications.

Ne sachant pas si cela peut être le cas pour la forme 6, nous nous en tiendrons au fait que cette forme est simplement impliquée dans la maladie.

Une autre protéine, l' α enolase apparaît aussi en augmentation dans notre étude ; pour son identification, étant donné la masse élevée du fragment de digestion, la MS/MS n'a pu être réalisée avec succès sur ce peptide. Le match correspondant représente la somme des peptides détectés appartenant à la séquence, l'identification ayant été confirmée sur un peptide de masse plus faible (m/z 1803). L' α enolase a également été détectée dans le cerveau non lésé lors de l'analyse LC/MS, mais avec d'autre peptide que celui de masse m/z 3063. Même s'il faudrait confirmer notre résultat avec une approche plus quantitative, l' α enolase a également été décrite comme étant régulée positivement dans la maladie de Parkinson, confirmant ici aussi notre résultat. Cette enzyme, surtout présente dans les cellules gliales, intervient dans la glycolyse et se retrouve également plus riche dans la maladie d'Alzheimer. Dans cette dernière, l' α enolase est connue comme cible spécifique d'oxydation et de nitrozylation (Iulius et coll).

Enfin, une kinase, elle aussi précédemment décrite comme étant modifiée dans la maladie, nous apparaît comme régulée négativement. Cette dernière, tout comme l' α enolase, est une enzyme intervenant dans la glycolyse.

Ainsi, 4 protéines avec notamment le neurofilament triplet M, que nous avons découvertes comme régulées dans la maladie de Parkinson après « profiling » MALDI sur des tissus fixés après une digestion à la trypsine, sont des protéines connues et déjà décrites dans cette maladie. La possibilité d'une recherche de nouveaux biomarqueurs par cette technique semble donc viable, à condition bien évidemment de s'appuyer sur d'autres approches permettant d'une part, d'identifier les composés (LC MS/MS), et d'autre part de valider les variations observées (méthodes de quantifications en spectrométrie de masse, utilisation d'anticorps...)

Afin d'augmenter la visibilité des biomarqueurs lors des analyses, il peut être intéressant de considérer la même approche par spectrométrie de masse à mobilité d'ions. De cette manière, les ions isobares seraient séparés limitant ainsi les ambiguïtés dues aux nombres de signaux trop importants.

Une autre voie peut aussi utiliser d'autres enzymes présentant moins de sites de coupures que la trypsine afin de limiter ici aussi le nombre de peptides. Nous avons d'ailleurs démontré que d'autres enzymes pouvaient être utilisés avec succès sur les coupes.

L'imagerie par MALDI sur tissus fixés et la recherche de biomarqueurs par « profiling » sont donc réalisables au même titre que pour le tissu frais. Il est donc maintenant possible de réaliser des études rétrospectives sur un grand nombre d'échantillons en utilisant les biopsies conservées depuis de nombreuses années dans les bibliothèques des anatomopathologistes.

Cependant, certaines informations restent encore inaccessibles en imagerie MALDI, que ce soit sur du tissu fixé ou sur du tissu frais. Notamment, la détection des ARN messagers, de l'ADN, ou de protéines de très haut poids moléculaire pose problème. Par exemple, du fait de la fragilité des acides nucléiques, la détection de ces composés est limitée à environ 80 bases, alors qu'un ARNm peut en compter jusqu'à des milliers !

L'enjeu de cette recherche est grand ; la détection rapide et simple sur tissu des ARNm répondrait aux besoins de diagnostics toujours plus précoces, en permettant la détection des transcrits avant la production de la protéine impliquée dans la pathologie.

De même, le traitement de cette dernière passera également par l'étude de médicaments et de leur répartition dans un organisme, ainsi que de leur faculté à se fixer sur leurs cibles, incluant des récepteurs qui sont des protéines de très haute masse. Dans la même optique, le clivage de certaines protéines en peptides actifs impliqués dans certaines tumeurs est un phénomène qui peut être intéressant à suivre par imagerie. Cependant, la gamme de masse analysable sur tissu frais en MALDI se limite à environ 30kDa. Il reste la possibilité de digérer *in situ* les protéines afin de détecter comme pour les tissus fixés, des protéines de plus hautes masses. Néanmoins, l'abondance des peptides produits par la trypsine rendra difficile la détection des peptides issus de maturation naturelle.

Ainsi, il est pour le moment impossible avec la technique d'imagerie MALDI de réaliser des cartes de co-localisation ARNm / protéine, drogue/récepteur ou peptide/protéines etc.

L'obtention de ce genre d'informations revient à développer un nouveau concept permettant de s'affranchir de ces contraintes analytiques.

4. L'imagerie spécifique par détection indirecte : le concept Tag-Mass

L'imagerie éventuelle des ARNm implique bien évidemment une détection simple et sensible de ces composés sur le tissu, au même titre que les signaux obtenus pour les peptides et protéines. Hélas, l'étude des oligonucléotides par spectrométrie de masse et notamment par MALDI reste de manière générale assez complexe. Comme nous avons déjà vu dans la partie d'introduction du MALDI (Chapitre I.3), deux principales difficultés sont rencontrées lors de cette analyse ; la première est liée aux groupements phosphates présents dans les enchainements d'oligonucléotides (Figure II.4.1) entraînant des échanges de protons de ces groupements avec les sels présents dans l'environnement (Na^+ et K^+ notamment).

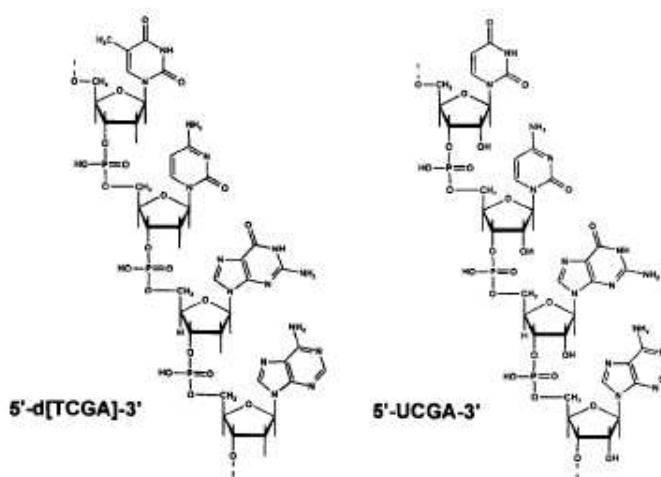


Figure II.4.1 : Structure de l'ADN (à gauche) et de l'ARN (à droite) avec la liaison phosphate reliant les différentes bases. (Nordhoff et coll, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**).

Ces échanges génèrent des espèces fortement cationisées, et donc des distributions complexes lors de l'analyse, conduisant à une baisse de la résolution. Comme décrit précédemment, il existe des systèmes de préparations d'échantillons permettant d'améliorer les résultats : utilisation de co-analyte comme citrate d'ammonium ou acétate d'ammonium, mais également utilisation de résines échangeuses d'ions sous forme ammonium, permettant de réaliser une étape de dessalage et de conditionnement des molécules pour l'analyse (Nordhoff et coll, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**).

La seconde difficulté réside dans la faible stabilité des bases en phase gazeuse ; des études ont démontré que la protonation de la nucléobase conduisait à la formation d'espèces ayant tendance à se fragmenter pendant l'analyse. Par conséquent, la sensibilité est fortement altérée, et la résolution est elle aussi atteinte. Cette instabilité est proportionnelle à la taille de l'oligonucléotide et de plus, des séquences riches en guanosine sont plus difficiles à détecter, car l'ionisation de cette base est moins effective (Banoub et coll, *Chem Rev* **2005**) ; cela implique que les oligonucléotides de longues tailles, statistiquement plus riches en base G, sont plus difficiles à ioniser. Cet aspect affecte également la sensibilité de la détection de ces composés ; de manière générale, un oligonucléotide de 13 bases peut être détecté à une quantité de 3 à 5 fmol, alors qu'une séquence de 40 bases nécessite de 1 à 30 pmol (Nordhoff et coll, *Mass Spectrom. Rev.* **1996**). Ainsi, même si des études avec les mêmes compositions en bases démontrent que les ARNm sont cependant plus stables que les ADN, il devient difficile dans tous les cas de détecter ces molécules à partir d'une longueur de 50 pbases en utilisant un laser UV, à moins de travailler avec des quantités assez élevées.

Sur tissus, les ARNm d'intérêt sont de très larges biomolécules allant jusqu'à plusieurs milliers de bases (1000 bases = environ 300000 Da), et bien sûr, la quantité de ces molécules dans la biopsie n'est pas très importante.

De meilleurs résultats peuvent être obtenus pour l'analyse de l'ADN ou de l'ARN en utilisant un laser émettant dans l'IR. Les études réalisées par le Pr Hillenkamp ont démontré que les ions formés étaient plus stables avec cette source (Nordhoff et coll, *Nucleic Acids Res*, **1994**).

De ce fait, la sensibilité est grandement améliorée, permettant la détection de produits PCR de 515p bases avec seulement quelques femtomoles de produit (Figure II.4.2).

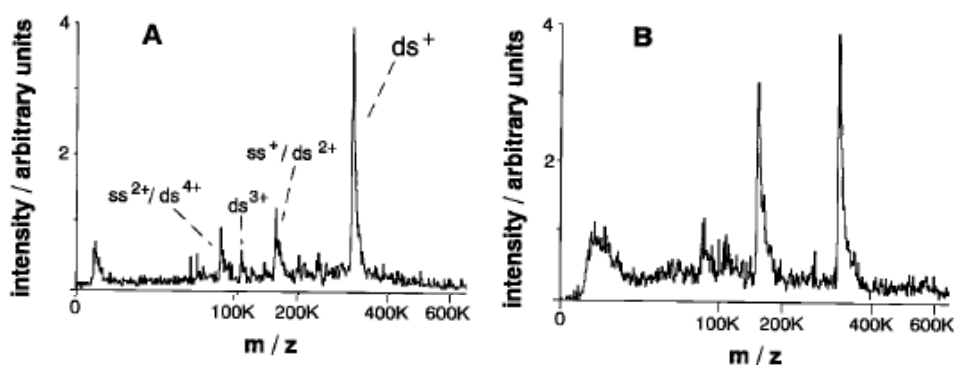


Figure II.4.2 : Détection d'un produit PCR de 515 pbases à 300 fmol (A) et 300 amol (B) en IR MALDI (matrice : glycérol). (Berkenkamp et coll, *Science*, **1998**).

Par la suite, des oligonucléotides jusqu'à 1500 bases (500000 u.) ont été analysés avec succès par cette même équipe (Kirpekar et coll, *Anal.Chem.* **1999**), tout en conservant une bonne sensibilité avec la matrice glycérol.

Cependant, les sources IR ne sont pas encore commercialisées et sont plus délicates à utiliser que les sources UV classiques. De plus, étant donné le mélange complexe de protéines, d'ARNm ou d'ADN présent sur la coupe, il est fort possible que l'interprétation des spectres soit délicate, voire que la technologie elle-même ne permette pas encore cette analyse.

Dans ce contexte, il est nécessaire de développer une imagerie qui soit spécifique de l'ARNm, de l'ADN ou de très grosses protéines, mais avec la possibilité de pouvoir corréler ces informations entre elles pour la réalisation de cartes de co-expressions.

Une des possibilités qui s'offre à nous peut être de détecter ces molécules de manière indirecte ; cette stratégie repose sur l'utilisation de liens photoclivables sous un laser UV. Ainsi, pour l'ARN ou l'ADN par exemple, un de ces groupements fixé sur un oligonucléotide peut être clivé par le laser et permettre le relargage et la détection par le spectromètre d'une molécule de masse connue : celle-ci peut alors être analysée à la place de l'oligonucléotide.

Ce concept de liaison photoclivable sous lampe UV a déjà été utilisé auparavant avec succès pour la détection de SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) par le groupe d'Olejnik (*Nucleic Acids Research*, **1998**) appliqué ensuite dans ce même domaine en MALDI lors d'une collaboration avec l'équipe du Pr Hillenkamp (Olejnik et coll, *Nucleic Acids Research*, **1999**).

Nous avons décidé d'utiliser ce concept pour l'imagerie par spectrométrie de masse en marquant des molécules avec un lien photoclivable au bout duquel se trouve un peptide de masse connue ; ce dernier est appelé Tag.

Plusieurs voies peuvent être étudiées, comme l'utilisation de sondes d'ADNc « taggées » pouvant s'hybrider avec l'ARNm ou l'ADN d'intérêt (Figure II.4.3), ou l'étude d'anticorps marqués pour la détection de protéines de haute masse.

La plupart des Tags utilisés dans nos études sont résumés dans le tableau II.4.1

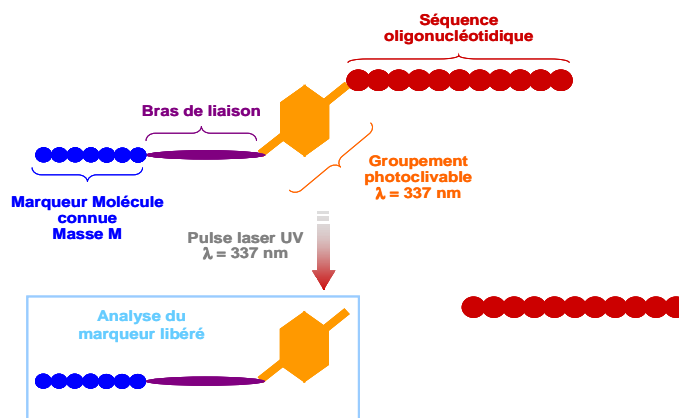


Figure II.4.3 : Schéma de principe de l'analyse indirecte des oligonucléotides par Tag-mass.

Nom	Séquence oligonucléotidique	Peptide du tag	Masse peptide seul	Masse calculée attendue après clivage	Remarques
O1P1	5' CA CGT ACA GGA TGT ACA G 3'	H2N-GRALGVFVC-CONH2	(M+H) ⁺ =921,1	(M+H) ⁺ =1368,5 (M+H+O) ⁺ =1384,5	Liaison S-S (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=447,4 u.
O2P2	5'TC GAG AGG TAC ATC GTG 3'	H2N-RPKPQQFFGLMC-CONH2 (Substance P + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1451,8	(M+H) ⁺ =1899,2 (M+H+O) ⁺ =1915,2	Liaison S-S (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=447,4 u.
O3P3	5'AA GCG GTA CGA GTA GCA 3'	H2N-RPPGFSPFRC-CONH2 (Bradykinine + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1163,6	(M+H) ⁺ =1611,0 (M+H+O) ⁺ =1627,0	Liaison S-S (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=447,4 u.
Preng	5'CAG GAC TCC CCA AAG GAG AAC AGG A 3'	H2N-RPPGFSPFRC-CONH2 (Bradykinine + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1163,6	(M+H) ⁺ =1718,3 (M+H+O) ⁺ =1702,3	Liaison Maléimide (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=554,7 u.
PrengD	5'GAC GTA CCA GGC GGT AGC TGC ATT T 3'	H2N-RPPGFSPFRC-CONH2 (Bradykinine + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1163,6	(M+H) ⁺ =1718,3 (M+H+O) ⁺ =1702,3	Liaison Maléimide (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=554,7 u.
U-tag	dUTP-Tag	H2N-RPPGFSPFRC-CONH2 (Bradykinine + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1163,6	(M+H) ⁺ =1718,3 (M+H+O) ⁺ =1702,3	Liaison Maléimide (Peptide-groupement activable) groupement photocyclable M=554,7 u.
Ac-Tag		H2N-DSPEGLNRKQKPA-CONH2 (Bradykinine + Cystéine)	(M+H) ⁺ =1439,6	(M+H) ⁺ =1702,8 (M+H+O) ⁺ =1686,8	Ac secondaire anti lapin groupement photocyclable M=263,2 u.

Tableau II.4.1 : Récapitulatif des différents Tags utilisés dans nos études, ainsi que les masses attendues après clivage (= masse du peptide seul + masse du groupement photocyclable).

PUBLICATION N°4

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

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

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

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

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

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

***Equal contribution**

@ Corresponding author

ONE-SENTENCE SUMMARIES

Biomolecules Specific MALDI Imaging

ABSTRACT -

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

INTRODUCTION

MALDI Imaging method is a new essential tool for the direct detection and localization of biomolecules(1-5). Developments in this field have led to study and localize drugs, lipids, peptides and proteins in tissue sections. The advantage is to avoid time consuming and work intensive steps such as extraction, pre-purification or separation(1-3, 5). Many applications of this method have recently been successfully realized. Especially MALDI imaging and direct tissue analysis can be applied to diseased tissues to directly hunt for biomarkers in tissues(4, 6). However the analysis of nucleotidic sequences is difficult and presents a real challenge for mass spectrometry. Moreover, as classical MALDI analysis, MALDI Imaging of protein show restricted mass range, where some proteins like low abundance molecules, membrane or high molecular weight proteins do not appear(2, 4-6).

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

RESULTS AND DISCUSSION

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

Direct analysis of tissues does not allow the generation of signal from oligonucleotides due to their large size and low abundance at the cellular level jointly to analytical difficulties in mass spectrometry(7, 8). Similar challenges are encountered for high mass (> 30 kDa), membrane and low abundant proteins when probing tissue by MALDI-MS(2, 4, 5). To solve these problems and to access the full proteome and transcriptome for MALDI imaging, we advance a new concept for the specific imaging of these molecules. The approach is based on the indirect detection of mRNA and proteins *via* a “Tag-mass”. The “Tag-mass” is composed by a molecule of known mass(9), easily analyzable with high sensitivity by MALDI coupled to a probe *via* a linker that will be cleaved during analysis allowing its liberation. In MALDI, laser irradiation is an efficient way to release tags by using a UV photocleavable linker (Figure 1A).The approach can be extended to perform MALDI imaging by using specific probes that will target either mRNA or proteins. Many probes incorporating a photocleavable linker and a tag can be designed (DNA, cDNA or simple strand cRNA, antibodies) to perform hybridization methods like *in Situ* Hybridization (ISH) for oligonucleotides probes or ImmunoCytoChemistry (ICC) for antibodies probe to specifically target mRNA or proteins. Photocleavable tagged oligonucleotides probes can be used in combination with ISH for hybridizing the probe to its mRNA target. In MALDI, material ejection is promoted by laser irradiation and restricted to the cross section area between the laser beam and the sample surface. The mass spectrum reflects the molecular composition of the tissue in this specific site. If the tagged probe hybridizes to its complementary mRNA sequence then the laser irradiation will photocleave the linker, inducing tag release, leading to a characteristic signal of known mass. At positions where no target mRNA are present, the characteristic signal for the tag will not be observed. Thus, similarly to classical MALDI imaging, by scanning the tissue section, images of mRNA can be indirectly obtained by reconstructing the molecular image of the tag molecule on the basis of its mass signal in the mass data. This approach brings mass spectrometry’s sensitivity and the possibility of multiple imaging at once using multiple tags (Figure 1B).

The same strategy can be adapted for mapping target proteins using tagged antibodies in combination with ICC experiments. A specific tagged antibody can be used for direct experiments. However, to our point of view, addition of the linker and tag on a secondary antibody recognizing the C-terminus of a primary antibody is easier to use and allows for

signal amplification. Thus, as for ICC experiments, a primary antibody will specifically bind its target antigen. The tagged secondary antibody will then specifically recognize the first one. Then, as for mRNA, the scanning of the tissue section by MALDI MS will allow to indirectly get the protein molecular images, by monitoring the tag in the mass spectra. As for oligonucleotides, multiple different proteins specific images can be obtained by MALDI in one experiment by using tagged secondary antibodies developed in different animal species.

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

Photocleavable tagged oligonucleotide probes: mRNA MALDI imaging

As first step(9), performances of photocleavage dissociation under the MALDI UV laser were evaluated for oligonucleotides. Photocleavable linker was bounded to the 5' oligonucleotide end and peptides were chosen as tags and photodissociation was assumed to induce cleavage directly between the phosphate group and the photoactivable linker (Figure 2A). As shown Figure 2B, photocleavage is efficient under the laser irradiation and lead to the observation of the expected characteristic signal for the tag (m/z 1626.37 noted P-PC). However, the MALDI mass spectrum clearly show that 100% photocleavage yields 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+} signals of the oligophosphate after photocleavage. Peaks are broads inducing decrease in mass measurement precision because of salt adducts formation and metastable fragmentations as always observed for oligonucleotides analysis in MALDI. At m/z 1163.9, the low abundance peak was attributed to a fast fragmentation process liberating the peptide alone and associated to the existence in the structure of a disulfide bridge. To study the possibility of using photocleavage under multiplex analysis conditions, a mixture of three oligopeptides corresponding to three different 20 mers oligonucleotides and three different peptides was investigated. As presented Figure 2C, expected characteristic signals of the photodissociation (P-PC) were observed as proved by the presence of peaks at m/z 1346.95, 1603.74 and 1891.72. As expected from previous data fast fragmentation ions were also observed (m/z 1161.87, 1449.88) and were especially intense for one of the peptide. For subsequent experiments, bradykinin which gives the best sensitivity (100 fmoles) and ease of detection in all analytical conditions was selected (P3). To increase sensitivity by suppressing fast fragmentation signals a new photocleavable

linker/tag system was designed replacing the disulfide bridge by a maleimid group for bounding the tag peptide to the photocleavable linker (Figure 3A). Studies performed on this structure clearly demonstrate the suppression fast fragmentation signal and increase of expected signal for photocleavage. This photocleavable linker/tag system was used to construct double strand cDNA oligonucleotidic probes. Proenkephalin was chosen as model target mRNA because of previous studies giving a good background on this molecules mRNA repartition in the rat brain(10, 11). Classical untagged primers and tagged primers bearing the photocleavable linker/tag system were designed on the proenkephalin cDNA sequence. Both types of primers were used for RT-PCR amplification and have demonstrated to give same results in term of amplification product and yield of amplification. Using RT-PCR a 400 b.p. double strand cDNA oligonucleotidic probe was obtained. The probe was tested for ISH experiments followed by MALDI direct analysis of the hybridized rat brain tissue section for tag detection. Obtained mass spectra, clearly demonstrated the possibility of detecting the characteristic ion signal for the tag in some specific region of the section hybridized with the tagged probes. This signal was never found for the tissue sections where the classical untagged proenkephalin probes were used. However, signal intensity for the tag was weak and the method slightly lacking of sensitivity. Nevertheless, the feasibility of the proposed strategy was unambiguously demonstrated here. To improve sensitivity but also to increase specificity and ease of use strategy was slightly modified.

An alternative approach called dUTP-TAG was developed, based on labeling with the same photocleavable linker/tag system of an uracile base on the pyrimidic moiety. This new designed keep free both 5' and 3' end of the nucleotide allowing the synthesis of riboprobes by *in vitro* translation to be performed. This first aspect give opportunity for increasing specificity of the method avoiding for non specific binding to genomic DNA. Moreover, used of tagged nucleotide basis lead to the incorporation of one tag for each T nucleotide required by the amplification process according to the base sequence (Figure 3B). This second aspect increase sensitivity. Finally, the use of tagged nucleotides as a very practical aspect, since these nucleotides can be used for all purposes *i.e.* whatever probe amplification. U-tagged nucleotides were tested for photocleavage as presented Figure 3C. Again characteristic signal of the tag peptide was observed (m/z 1163.23) with a very good S/N ratio and signal intensity, again maleimid group incorporation preserving from fast fragmentation process. dU-tagged system was used for amplifying by RT-PCR the proenkephalin probe. As expected from the structure (Figure 4A) and previously described for dUTP-DIG systems (12) (Ree et al., 1992) dNTP ratios had to be optimized and best results were obtained with dU-TAG and dTPP in a ratio of 1:3. ISH was performed with the multiple tagged proenkephalin amplified probes.

Direct MALDI analysis of the hybridized rat brain tissue section was then carried out and compared to the analysis of the adjacent tissue section after ISH with same untagged proenkephalin probe amplified in the same conditions with unmodified dNTP (Figure 5A). For the multiple tagged proenkephalin probe in specific region the characteristic signal of the tag peptide was observed as shown on the mass spectrum, whereas this signal never appear in none of the region of the rat brain for the classical probe. As expected, mass spectra reveal a clear increase in detection for 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). Based on the characteristic tag signal, molecular image was reconstructed as presented Figure 5B. Thus, the obtained image gives the molecular image of proenkephalin mRNA. As observed, the image very well fit the tissue morphology and matches with proenkephalin mRNA distribution obtained by ISH with autoradiography detection(13). These experiments are clearly the proof that the concept of specific mRNA imaging by MALDI mass spectrometry is feasible.

Photocleavable tagged antibody probes for antigen MALDI imaging

The same concept was applied for performing specific images of proteins using tagged secondary antibody. As previously explained, in order to gain sensibility and ease of use secondary antibodies were tagged on the C-terminal part of their Fc chain (Figure 4B). Immunocytochemistry (ICC) experiments were performed with a classical primary antibody directed against the protein of interest and habitual peroxylase or FITC tagged secondary antibody was replaced by our specifically modified antibody for MALDI imaging. Tagged antibody was firstly tested for evaluating yield of photocleavage and checking out the presence of expected tag signals. Mass spectra lead to the observation of two characteristic signals for the tag (m/z 1686.43 and 1703.23). Higher m/z signal correspond to the P-PC moiety observed with the oligonucleotide probes. The m/z 1686.43 signal corresponds to same moiety, minus one oxygen molecule. Such signals have already been described from photocleavable system but no mechanism was proposed. Two unexpected less abundant signals were also observed and were attributed to some of the maleimide intermediates of reaction remaining in the solution even after purification. As for oligonucleotides, photocleavage with antibodies was highly efficient conducting to the observation of characteristic signals. For imaging experiments after ICC, Carboxypeptidase D (CPD) protein was chosen as the target protein for different reasons and in particular its specific presence in some rat brain regions as known from previous studies and its impossibility of direct detection by MALDI imaging because of its mass and nature (membrane protein of 180 kDa)(14). ICC

experiment was carried out in parallel on two adjacent rat brain sections using the same primary antibody and comparing our tagged antibody to the same FITC labeled antibody. As shown Figure 5C, several signals were observed from the direct analysis of the tissue section with the FITC antibody corresponding to peptides present in the tissue section. Mass spectrum obtained in the same region with the tagged antibody also presents these signals, however, in this case two more signal that correspond to the expected signals for the tag peptide are also observed. This tissue section was then kept for MALDI imaging scanning on 30 000 spots, 100 μm steps. On the base of signal intensity for the characteristic ion at m/z 1686.43 which is the most abundant one, the image was reconstructed giving indirectly the image of the protein (Figure 5D). As observed in the figure very good image resolution was obtained. It is remarkable that protein distribution in the section is perfectly correlated to tissue structure as observed when comparing to a picture of the section before ICC experiments. In parallel, on adjacent sections same experiments were performed with anti rabbit antibody coupled to a peroxydase enzyme for specific reaction with colorimetric detection using either DAB or 4-chloronaphtol. Comparison of pictures with T-chloronaphtol or DAB labelling to MALDI image based on the tag detection show that CPD protein is detected in the same brain area using both methods, thus validating the methodology. Even, in some specific area such as hippocampus protein was detected with the tag-mass system while no signal was detected with the colorimetric reaction, meaning that the indirect detection by mass spectrometry is much sensitive than classical revelations. Comparing the MALDI image of CPD to the fluorescence one obtained on the section on which FITC antibody was used; it is observed that MALDI was even quite as sensitive as fluorescence. It is noted that the MALDI molecular strategy gives a more localized signal as compared to fluorescence that diffuses and present a certain amount of background noise due to the natural fluorescence of the tissue. Moreover, at a low magnification, signals are found in the same areas by fluorescence and MALDI imaging. However, by the present time MALDI imaging does not allow for sub-cellular localization such as what can be achieved by fluorescence. Moreover, no quenching as well as auto fluorescence problems can be observed with tagged-antibodies.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

We demonstrate, here, a new concept for specific imaging of mRNA and proteins with MALDI mass spectrometry. This technique is a specific approach to image a targeted molecule in a tissue. The strategy relies on the addition of a probe molecule, which specifically targets a biomolecule with a photocleavable linker bearing a tag moiety released by MALDI laser irradiation through photodissociation and thus easily analyzable. We have

successfully tested this strategy with peptide tags for oligonucleotide and antibody probes. Thus with this method a 180 kDa membrane protein and proenkephalin mRNA were imaged. For oligonucleotides, U-TAGGED nucleotide was found to be the best alternative for increased sensitivity and flexibility. Mass spectrometric detection was shown to be very sensitive giving repartition of the molecule on the whole tissue section and even more sensitive than most of the classical method using peroxydase as substrate, and to give highly resolved images of molecules that could not be observed directly by MALDI imaging.

However, sensibility of the method can still be increased multiplex experiments with several different tags will be explored. Images' resolution as also to be improved and is currently under development. This concept is also to be extended to other probes including lectins or aptamers that will allow for imaging polysaccharides, peptides, proteins or drugs respectively (Figure 6). It is also obvious that different families of tags that will give better signal detection by MALDI should be developed. Thus, MALDI matrices or compounds absorbing at the laser wavelength and possibly detectable by Laser Desorption Ionization (LDI) will be looked for in order to acquire images without the need for matrix. Finally, photocleavage is a very elegant strategy but linker that will dissociate by prompt fragmentation during desorption/ionization process could be a good alternative. Linker dissociation by fragmentation could perhaps lead to a higher tag release rate. Moreover, using such linkers could extend the concept from UV to IR MALDI or even to SIMS mass spectrometry for specifically designed linkers and tags depending on the ion production method used. SIMS applications could also be very attractive, as SIMS imaging allows subcellular probing (classically 1 μm resolution), however in the current state SIMS is limited to monoatomic elements or small organic compounds such as lipids. Finally, Tag-mass could open a great opportunity for mass spectrometry to image all biomolecules present in tissues, with a very high sensitivity and without being restricted by low abundance or size. In addition, specific imaging could be used for relative quantification of target molecules. Using similar tags that differ from each others by isotopic composition (e.g. deuteriated molecules) and presenting the same behavior when analyzed MALDI, thus opening the way for quantification by MALDI imaging. Finally, the concept could also be transferred to microarrays for more quantitative and specific detection.

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

BIBLIOGRAPHY

1. R. M. CAPRIOLI, T. B. FARMER, J. GILE, *ANAL CHEM* 69, 4751 (DEC 1, 1997).
2. P. CHAURAND, S. A. SCHWARTZ, R. M. CAPRIOLI, *ANAL CHEM* 76, 87A (MAR 1, 2004).
3. I. FOURNIER, R. DAY, M. SALZET, *NEURO ENDOCRINOL LETT* 24, 9 (FEB-APR, 2003).
4. S. S. RUBAKHIN, J. C. JURCHEN, E. B. MONROE, J. V. SWEEDLER, *DRUG DISCOV TODAY* 10, 823 (JUN 15, 2005).
5. M. STOECKLI, P. CHAURAND, D. E. HALLAHAN, R. M. CAPRIOLI, *NAT MED* 7, 493 (APR, 2001).
6. T. C. ROHNER, D. STAAB, M. STOECKLI, *MECH AGEING DEV* 126, 177 (JAN, 2005).
7. F. KIRPEKAR, S. BERKENKAMP, F. HILLENKAMP, *ANAL CHEM* 71, 2334 (JUL 1, 1999).
8. E. NORDHOFF *ET AL.*, *NUCLEIC ACIDS RES* 22, 2460 (JUL 11, 1994).
9. J. OLEJNIK *ET AL.*, *NUCLEIC ACIDS RES* 27, 4626 (DEC 1, 1999).
10. M. SALZET, *NEURO ENDOCRINOL LETT* 22, 467 (DEC, 2001).
11. M. SALZET, D. VIEAU, R. DAY, *TRENDS NEUROSCI* 23, 550 (Nov, 2000).
12. J. L. REES, C. FISHER, *TRENDS GENET* 8, 8 (JAN, 1992).
13. B. D. SHIVERS, R. E. HARLAN, G. J. ROMANO, R. D. HOWELLS, D. W. PFAFF, *PROC NATL ACAD SCI U S A* 83, 6221 (AUG, 1986).
14. W. DONG, L. D. FRICKER, R. DAY, *NEUROSCIENCE* 89, 1301 (1999).

FIGURE CAPTIONS

FIGURE 1:

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

FIGURE 2:

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

FIGURE 3:

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

FIGURE 4:

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

FIGURE 5:

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

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

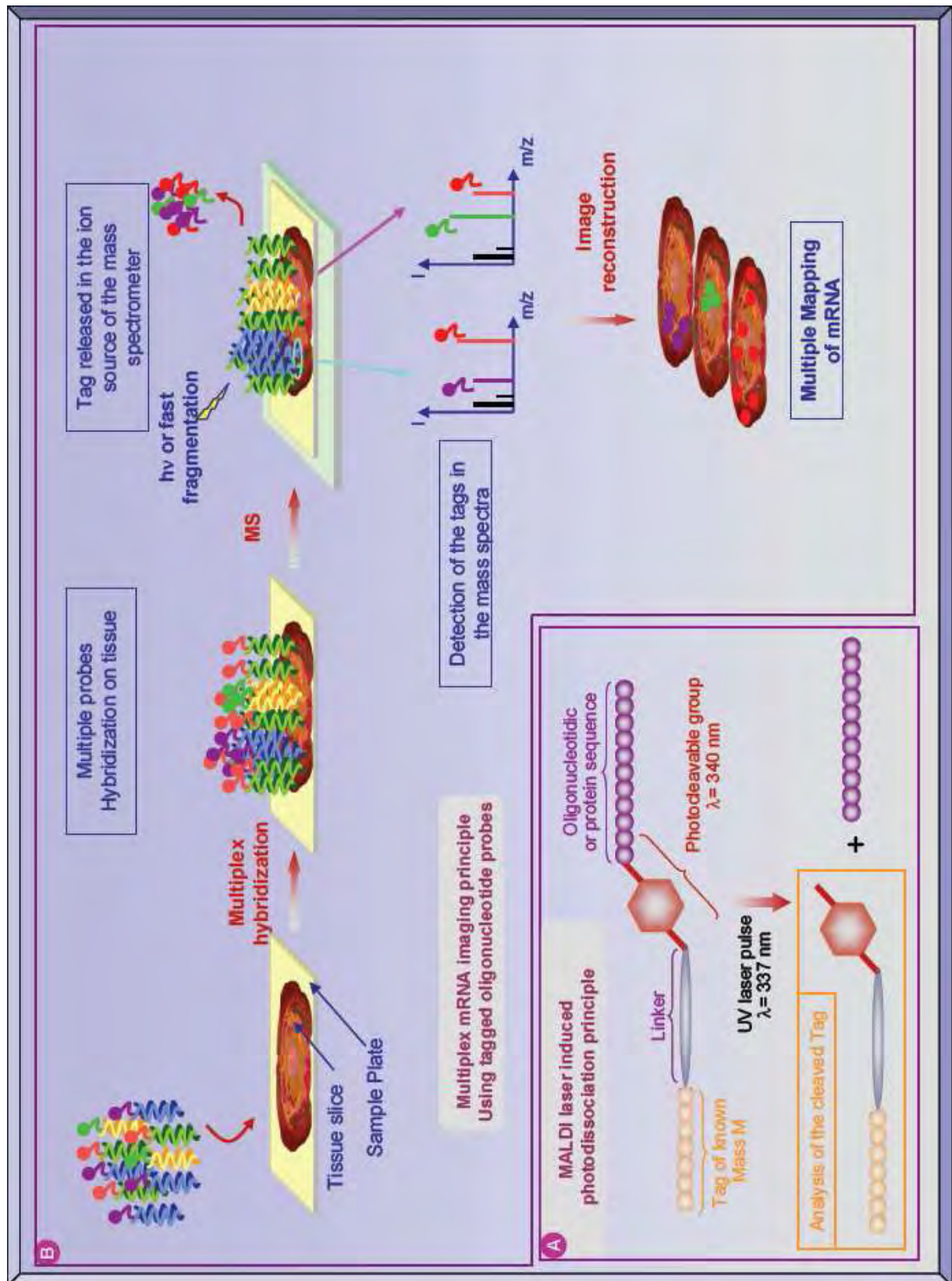
B. Rat brain tissue section picture before ISH experiments and MALDI image reconstructed by scanning the tissue section after ISH experiment with the U-tagged proenkephalin probe (7000 spots separated each of 100 μm).

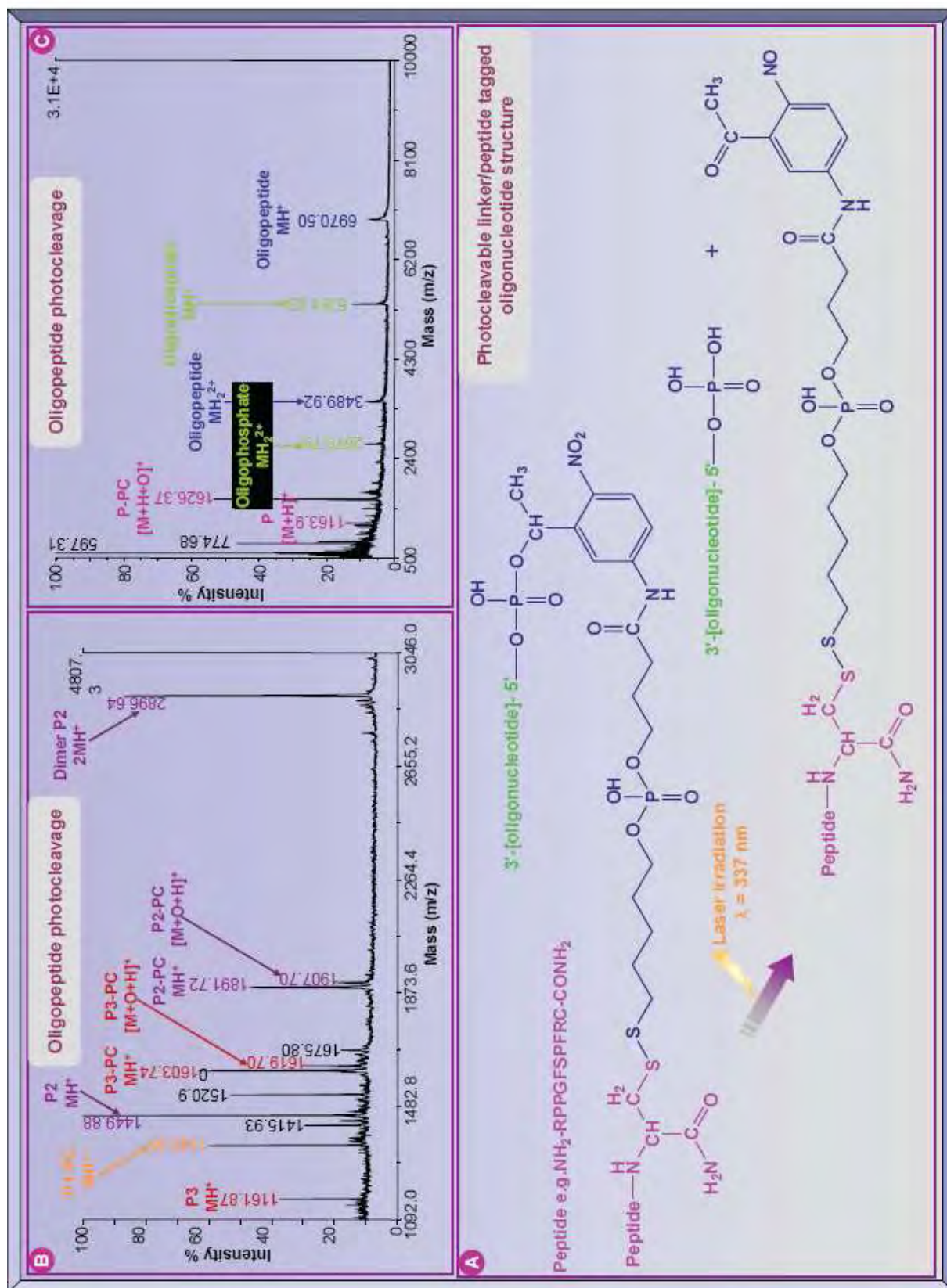
C. Compared MALDI mass spectra in the linear positive mode recorded on two adjacent rat brain sections in the same region of the brain after ICC experiment with a primary antibody directed against carboxypeptidase D protein and a rabbit FITC polyclonal secondary antibody labeled with a FITC or bearing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

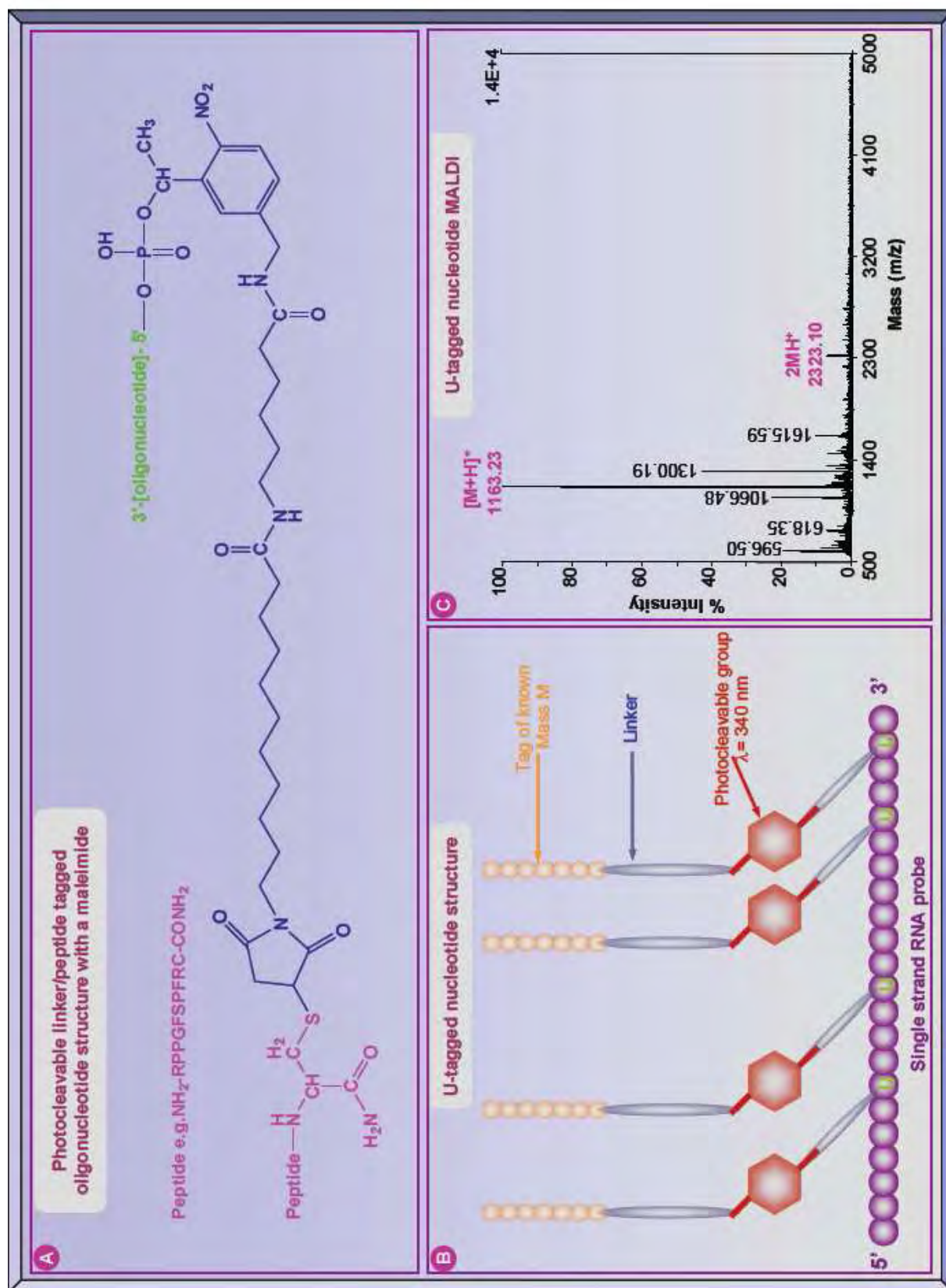
D. Rat brain tissue section picture before the ICC experiment and corresponding MALDI molecular image reconstructed on the tag peptide characteristic ion screening after ICC experiment with the tagged secondary antibody (30000 spots separated each of 100 μm). and comparison to pictures of specific region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

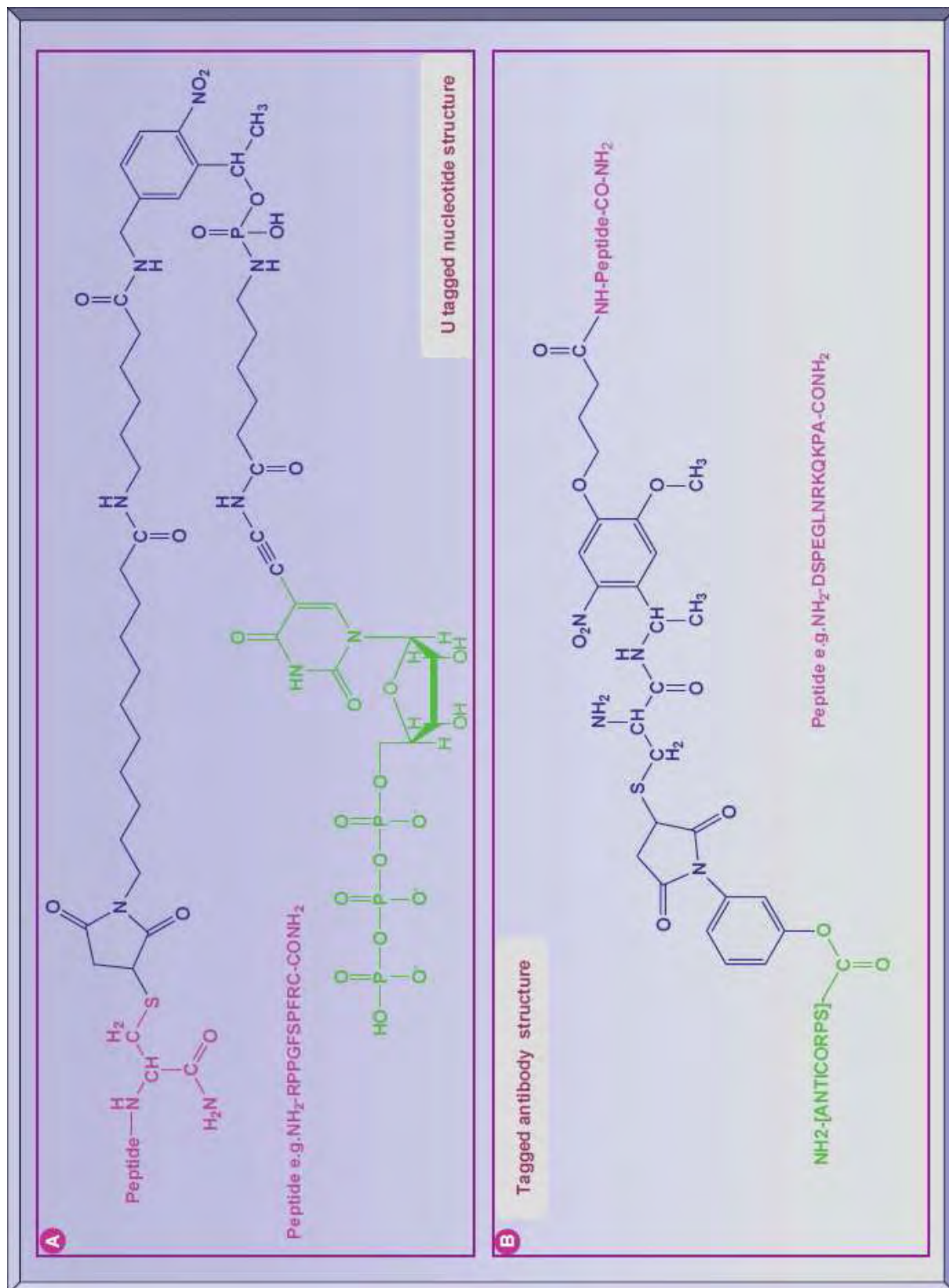
FIGURE 6:

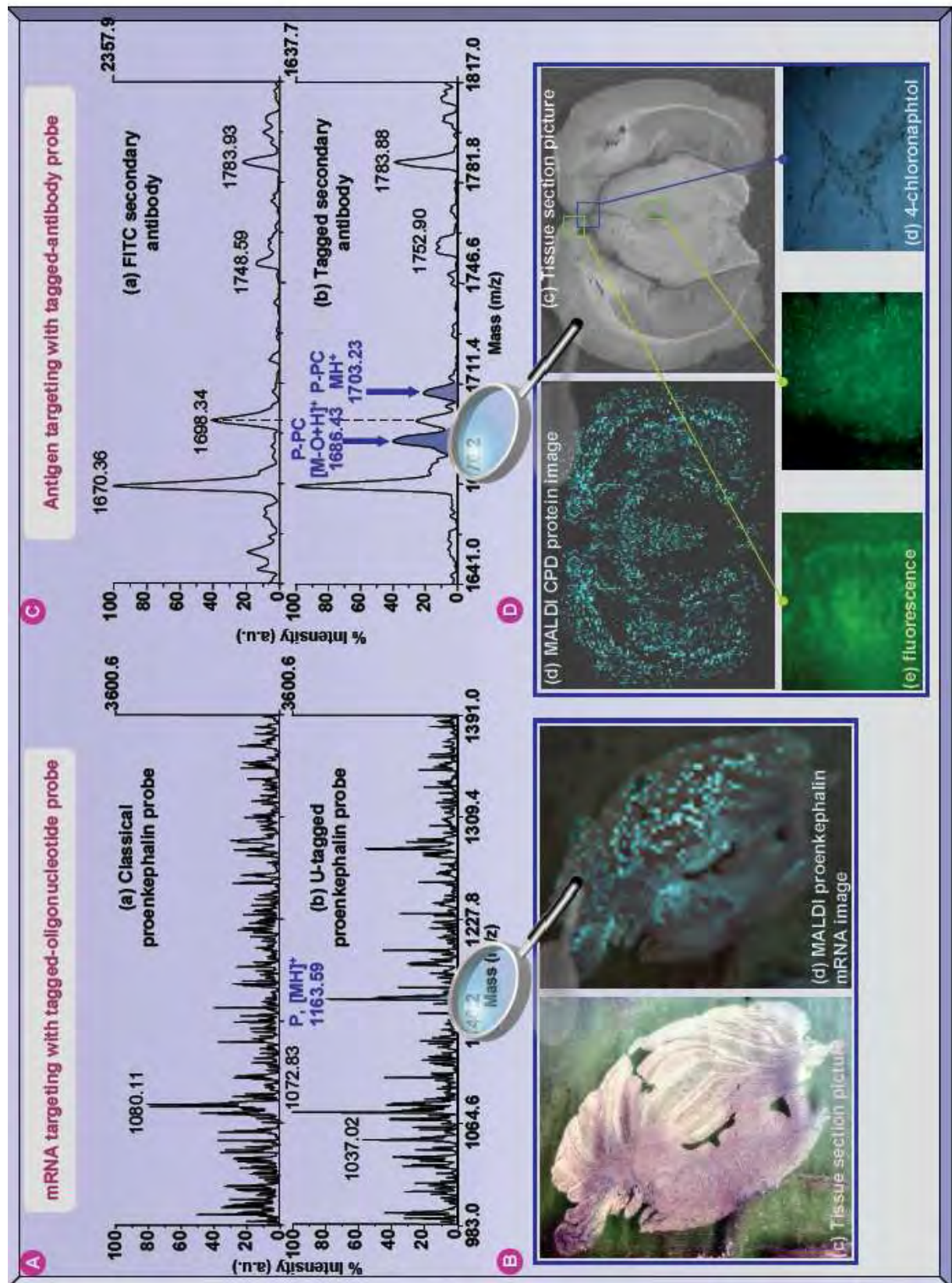
Schematic representation of the concept of the specific imaging for different target biomolecules and probes.

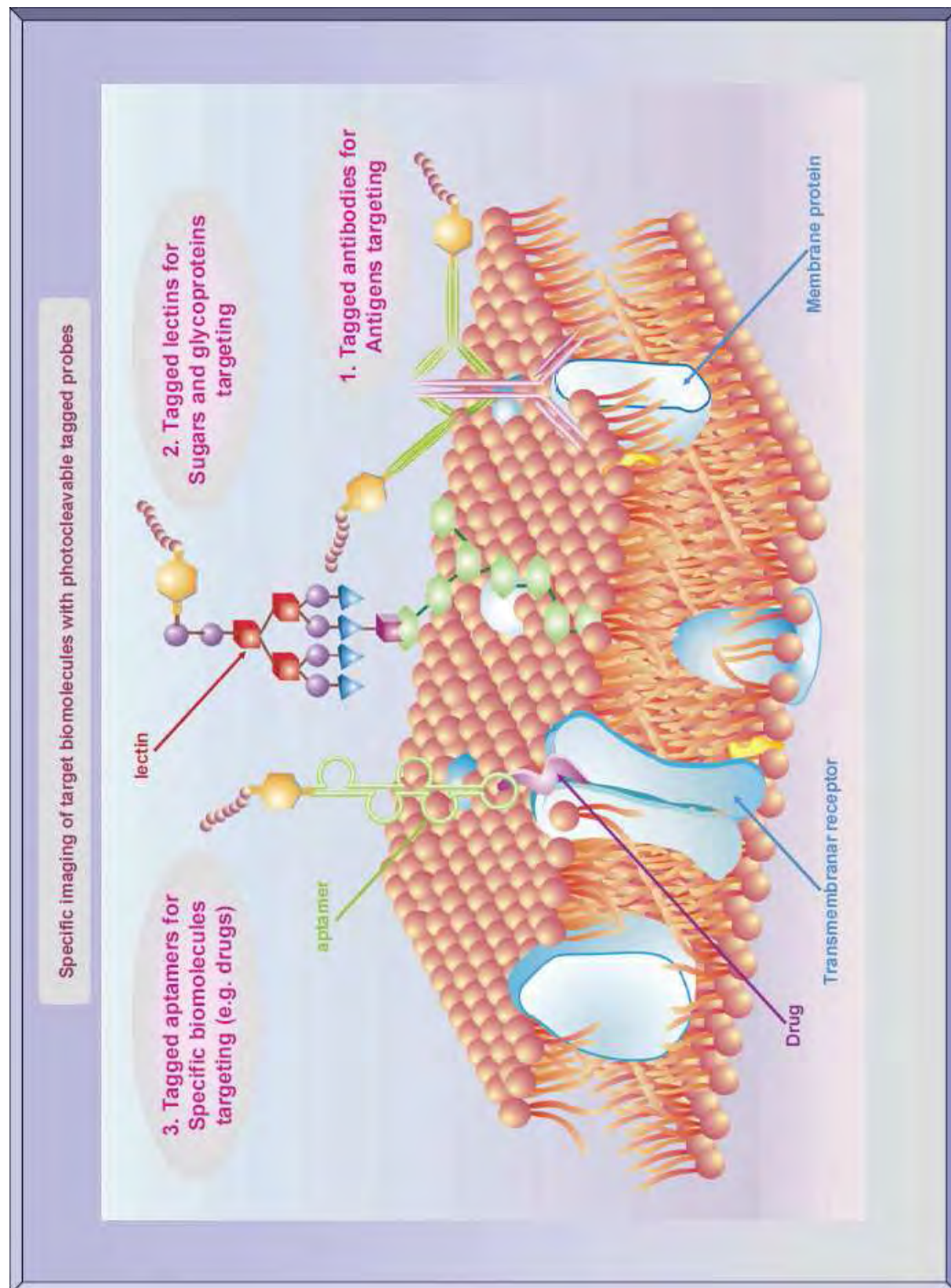












ADDITIONAL MATERIALS

MATERIAL MATERIAL AND METHODS

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

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

Tag synthesis

Photocleavable tagged oligonucleotide

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

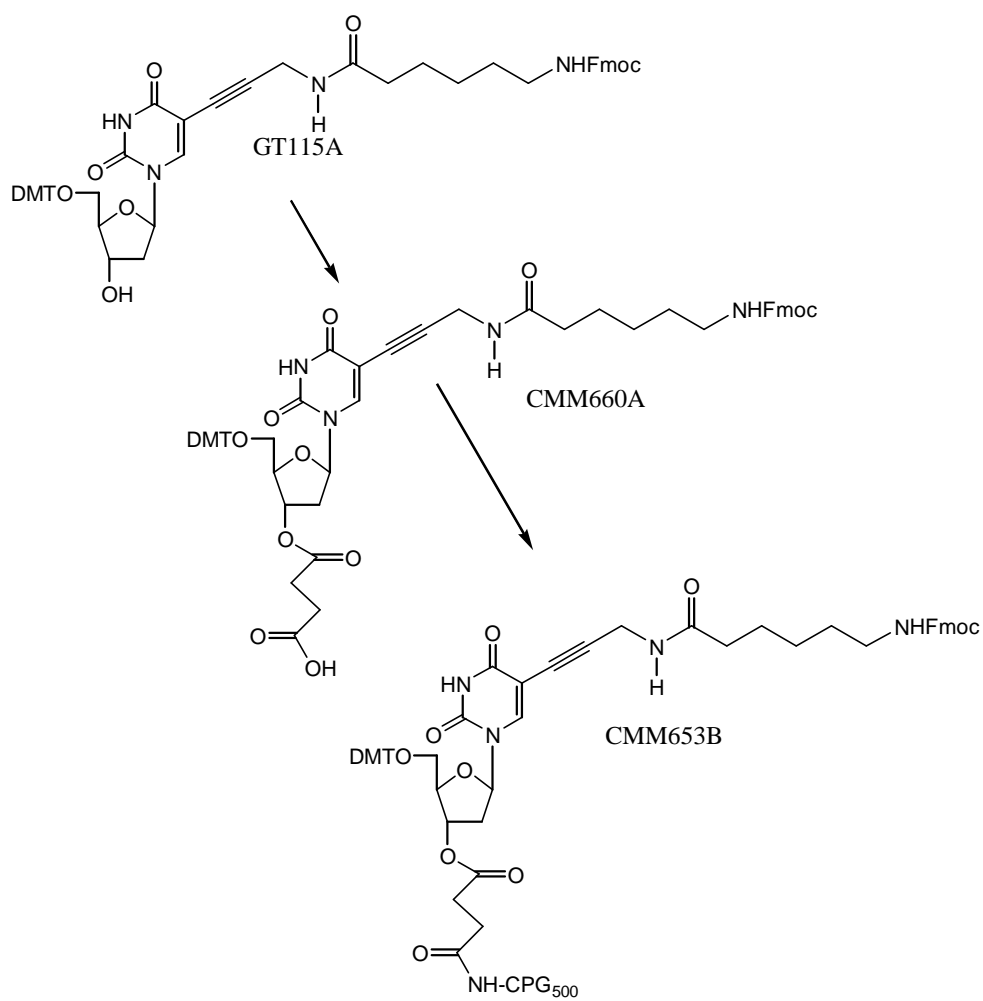
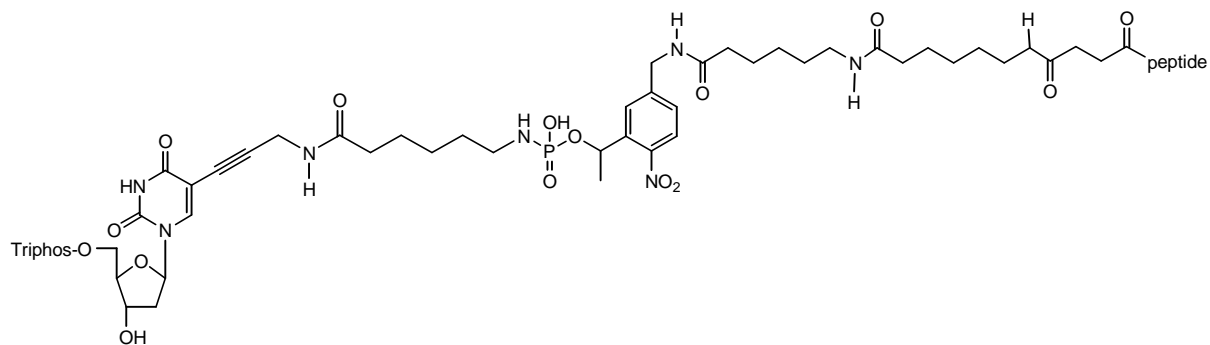
The oligo-peptide conjugate is then purified on a Delta-Pak C18 15 μ m 300A column (Waters) and characterized by MALDI-MS (see Mass Spectrometry section).

Photocleavable tagged antibody

Peptides were custom made by Eurogentec S.A. using solid phase peptide synthesis (SPPS) on a 0.25 millimole (mmole) scale using Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl amino-terminus protection) standard synthesis protocols (4 equivalent of Fmoc-AA) with double coupling reactions (twice 40minutes) using TBTU/NMM as activator on a Symphony (Rainin Instrument Co, Woburn, MA, USA) synthesizer. The photocleavable linker (4 equivalents) was introduced manually using DIPC/DIPEA (2 hours) as activator. Purifications were performed by RP-HPLC on a Waters (Milford, MA, USA) Delta-Pak C18 [15µm-100A-25x100mm] column using a Waters liquid chromatography system consisting of Model 600 solvent delivery pump, a Rheodine injector and a automated gradient controller (Solvent A: H₂O-0.125% TFA; Solvent B: CH₃CN-0.1% TFA, Gradients: 5-15% to 30-60% B in 20minutes). Detection was carried out using Model M2487 variable wavelength UV detector connected to the Waters Millennium software control unit. The Quality Control was performed by analytical RP-HPLC on a Waters Delta-Pak C18 [5µm-100A-150x3.9mm] column (Solvent A: H₂O-0.125% TFA; Solvent B: CH₃CN-0.1% TFA. Gradient: 100% A to 60% B in 20minutes) using a Waters Alliance 2690 Separation Module equipped with a Waters 996 Photodiode Array Detector and by MALDI-TOF MS (see mass spectrometry section).

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

Synthesis of a dUTP-peptide conjugates with a photocleavable linker



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

The resin was detritylated using 2% TCA/DCM washed with DCM and the process repeated until no orange colour due to the DMT cation was observed. This was then dried (suction under argon) and the resin soaked in pyr/DMF 1:3 (0.4ml) for 5 minutes before a solution of 0.1M Eckstein's reagent in dioxane was added (0.1ml). The reaction was allowed to stand for 15 minutes after which time the resin was washed (dioxane, MeCN) and dried (suction under argon). The resin was then soaked in a solution on 0.5M *bis*-(tributylammonium) pyrophosphate in anhydrous DMF and tri-*n*-butylamine for 20 minutes and the resin washed (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). The product was oxidised (iodine/water/pyridine/THF for 30 minutes), washed (MeCN) dried (suction under argon). The Fmoc protecting group was removed (20% piperidine/DMF, 0.5ml, 20mins) and the resin washed thoroughly, (DMF, MeCN) and dried (suction under argon). This was then washed with DCI and a solution of DCI/photolabile amino linker CEP (1:1, 0.5ml) was added and the reaction allowed standing for 20 minutes. The solution was removed and the resin washed (MeCN) and dried (suction under argon). A mixture of cap A/cap B (1:1, 0.5ml) was added and the resin soaked for 5 minutes before removing the capping reagents and washing and drying the resin as before. The product was oxidised ($\text{I}_2/\text{THF}/\text{pyr}/\text{H}_2\text{O}$, 5mins) and the resin washed and dried as before. This was cleaved from the resin with cNH_4OH at room temperature for 30 mins, then purified by anion exchange HPLC on a Dionex NucleoPac100 HPLC column using the following solvent system Buffer A:0.1M NH_4Cl with 10% acetonitrile; Buffer B: 1M NH_4Cl with 10% acetonitrile; flow rate 2.5 mL/min. using 6Triphos.mth. This gave 3 fractions (A:-7mins, B:-7.9mins and C:-10.3mins). All 3 fractions were lyophilized over night before being desalted by reverse phase HPLC Buffer A: Water;

Buffer B: acetonitrile; flow rate 4 mL/min. The 3 fractions were again lyophilized overnight before being suspended in 200ul of water. M.S. showed that CMM661A pk 1 was definitely not the triphosphate but it could be either CMM661pk 2 or 3 (very similar M.S. profiles). (CMM662A was formed from CMM661A pk 2 and CMM663A was formed from CMM661A pk 3). Both samples were then used in the subsequent reaction. Bicarbonate buffer (10ul) and the maleimide NHS ester (50ul) were added to each sample and the reactions agitated overnight. The samples were diluted with milliQ water (500ul) and filtered. The samples were purified by RP-HPLC, buffer A: 0.1M TEAA, buffer B: MeCN, flow rate 4mL/min. using MeCN50.mth and the coupling of the peptide was carried out on these fractions.

Tissue preparation for *in situ* hybridization (ISH)

Formalin Fixed Paraffin Embedded tissues (FFPE) sections of 10 µm were transferred onto a conductive ITO-glass. Sections were stored at 30°C overnight for good adherence. Tissues were then dewaxed using xylene (2x15 minutes), and then hydrated during 5 minutes in 3 steps mixed ethanol/water baths (96°, 70°, 30°). Sections were prepared according to classical ISH protocols. Tissues were incubated in glycine 0,1M/Tris HCl buffer (pH7.4), then treated during 15 minutes with proteinase K for protein digestion (1µg/µL in 1M/Tris HCl, 0.5M EDTA pH 8). After post-fixation with 4% paraformaldehyde (0.1M Phosphate/5mM MgCl₂ buffer pH 7.4) during 15 minutes, bath of 10 minutes with triethanolamine (0.1M pH 8) were realized. Sections were washed with SSC 2X then ultrapure water during 5 minutes. Probes were denaturated at 100°C during 10 minutes, and after a 3 steps tissue dehydration (30°, 70°; 96°), hybridization was done during 16H at 55°C dissolving cDNA probes in hybridization buffer (Dextran sulfate 10%, formamide 50%, SSC 20X 20%, Denhardt's 100 X 10%). Tissues were incubated with Rnase (10µg/mL, 37°C 30 minutes) then rinsed 10 minutes with successive SSC/2mercaptoethanol (0.07%) solutions (2X, 1X) and twice 0.5X at 55°C during 30 minutes. After rinsing slices with SSC 0.1X during 5 minutes at room temperature, one bath of ultrapure water was realized to remove excess of polymers. Tissues were kept drying at room temperature before MALDI matrix application.

Tissue preparation for immunocytochemistry (ICC)

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

After drying sections during 5 minutes at room temperature, tissues were heated at 80°C during 20 secondes for good adherence on slides. Rat brain sections were incubated at room temperature with 500 µL buffer (0.1M PBS / 1% BSA / 1% normal goat serum / 0.05% triton X100) for 30 minutes. The same buffer was used to dilute carboxypeptisase D (CPD) antibody (1/400), and incubation was performed overnight at 4°C. After 3 times washing in PBS, sections were incubated with peroxidase-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat; Jackson Immunoresearch Inc. Europe LTD) or FITC-conjugated secondary antibody (anti-rabbit IgG 1/100 developed in goat; Jackson Immunoresearch Inc. Europe LTD) or using photocleavable tagged antibody (1/100) during 80 minutes at room temperature. After another 3 washing steps in PBS buffer, the sections for peroxydase ICC were incubated in chloronaphtol with 0.05% H₂O₂ for detection. Reaction was stopped with several PBS and ultrapurewater baths. For FITC ICC, slices were prepared using phenylenediamine in glycerol. For photocleavable tagged antibody, tissues were rinsed 3 times during 5 minutes with ultrapure water to remove salts, and sections were kept drying at room temperature before matrix application. Tissues were then, compared using microscopy

Mass Spectrometry

Sample preparation for MALDI/MS analysis.

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

Classical analysis in linear Mode.

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

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

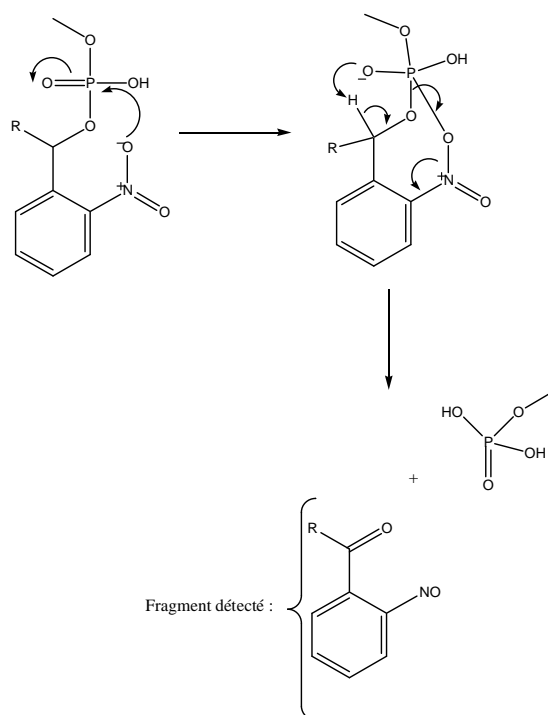
MALDI-MS Direct Analysis and MALDI imaging

MALDI-TOF mass spectra and imaging were performed on a Voyager-DE STR mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) with delayed extraction (DE) and a 337 nm pulsed nitrogen laser. For classical analysis, HCCA was used at concentration's of 10 mg/mL in ACN /H₂O (2:1, v/v, 0.1% TFA) and 3HPA at 50mg/mL in H₂O/ammonium citrate (100mM). For direct tissue analysis and MALDI imaging, HCCA was used at 10 mg/mL in ACN /H₂O (2:1, v/v). Matrix was applied onto the tissue using a micropipette (typically 20 µL for a whole rat brain slice) and then dried at room temperature. External calibration was performed using a mixed solution of peptides (1.6 µM bradykinin, 1.6 µM Substance P, 1.6 µM ACTH 18-39, 3.2 µM ACTH 7-38, 4.8 µM bovine Insulin and 4.8 µM

bovine Ubiquitin in H₂O). Slices were visualized in the mass spectrometer using a color CCD camera (SONY). Each recorded mass spectrum is resulting from the average of 100 laser shots on the area of interest. Acquisition parameters were set as follow: acceleration voltage: 25 kV, 1st grid voltage: 94%, guide-wire voltage: 0.1%, extraction delay time: 200 ns.

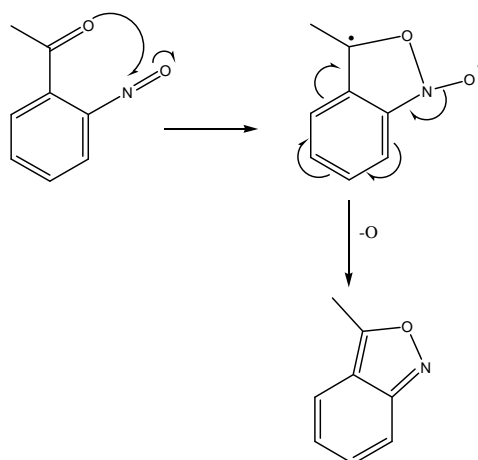
Images were reconstructed using MALDI Imaging Tools (MIT, M. Stoeckli, Novartis Inc., Switzerland). 30 000 points covering the whole slice with 100 laser shots per position were scanned. From each position the software measures an average mass spectrum with its coordinates on the slice.

Comme décrit dans cette étude, deux ions caractéristiques sont détectés après clivage des Tags sous irradiation UV. Les ions $(M+H)^+$ sont probablement formés suivant le mécanisme suivant :



Réaction 1 : Mécanisme proposé pour la formation des ions $(M+H)^+$ après photoclivage.

Le deuxième ion observé correspondant à la perte d'un atome d'oxygène $(M+H-O)^+$ est sans doute formé par un mécanisme radicalaire à partir de l'ion clivé $(M+H)^+$ résultant de la réaction 1 :



Réaction 2 : Mécanisme proposé pour la formation des ions $(M+H-O)^+$ après photoclivage.

L'utilisation de molécules marquées couplées avec un lien photoclivable nous a permis de développer un nouveau concept d'imagerie permettant la localisation spécifique de molécules de différentes classes telles qu'acides nucléiques ou hautes protéines.

Ce type d'information était pour le moment inaccessible par spectrométrie de masse et s'appuie au départ sur les techniques d'imagerie biologique classique comme l'HIS et l'ICC. Cependant, un réel apport de la technologie Tag-Mass pour l'imagerie de manière générale est bien décelable. En effet, la révélation au DAB ou à la digoxigénine ne permet la localisation que d'une protéine ou d'un type d'ARNm à la fois. Avec l'utilisation de la fluorescence, cette limitation est repoussée à la détection de 2 ou 3 protéines en utilisant des fluorophores différents et avec un protocole bien adapté. Dans le cas de l'imagerie tag-mass, où la sensibilité semble moins bonne qu'en fluorescence, mais meilleure qu'avec le DAB, il est théoriquement possible d'utiliser une infinité de molécules marquées étant donnée la gamme de masses théoriquement illimitée du MALDI. En pratique, il faut bien évidemment considérer l'encombrement stérique maximum des sondes sur la coupe lors des hybridations, ainsi que la sensibilité de détection qui reste meilleure pour des masses plus faibles. De la même manière, dans le cas de l'anticorps taggé, une multi détection de protéines de haut poids moléculaire n'est possible que par l'utilisation d'anticorps secondaires spécifiques de la même classe que l'anticorps primaire (anti-souris, anti-chèvre, anti-cheval etc.) ce qui peut également limiter l'approche. En conséquence, il est raisonnable de penser que l'imagerie d'une dizaine ou d'une vingtaine de ces molécules peut être obtenue sans trop de difficulté. Ceci représente un gain en terme de vitesse d'acquisition d'un facteur 20 par rapport aux techniques DIG ou DAB et d'un facteur 8/10 par rapport à la fluorescence dans le cas bien sûr où les composés sont détectables par spectrométrie de masse. Cette vitesse d'acquisition trouve tout son sens pour la recherche de biomarqueurs connus dans certaines pathologies, et comme outil supplémentaire de détection permettant par exemple à des chirurgiens de déceler sans ambiguïté les frontières d'une tumeur.

Un deuxième aspect, qui peut être corrélé au premier pour la détection de biomarqueurs, réside au niveau de l'aspect semi-quantitatif de l'analyse. 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 majoritairement dépendante de la composition de l'échantillon (présence d'impuretés ou de sels) et surtout de la structure du produit à analyser : lipides ou peptides, peptides ayant des séquences primaires différentes etc. Dans le cas de l'imagerie Tag-mass de

deux molécules, il est tout à fait 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 semi-quantitative de protéines, ou d'ARNm à l'état basal, et de suivre cette évolution après l'ajout de drogues, d'ARNi (ARN interférences), de protéines, de peptides, ou de lipides etc. De ce fait, les possibilités et les applications en imagerie « par tag » sont multiples et diversifiées. De plus, cette technique prometteuse n'en est qu'à ses débuts et de nombreux développements futurs peuvent être envisagés (Tableau II.4.2).

Développement	Type de Tag concerné	Applications
multipléxe imaging	Tous (ARNm, ADN, Protéines...)	Multi-détection de biomarqueurs
Ribosondes Tag	ARNm	Détection spécifique des ARNm
Ac taggé anti DIG	ARNm	Détection spécifique des ARNm
Tag couplé à une matrice MALDI	Tous	Imagerie quantitative, Pas de délocalisation du tag sur le tissu
Lectine taggée	Lectine	Imagerie des sucres
Aptamère taggé	Aptamère	Imagerie de tout type de molécule
Matrice ionique pour imagerie du tag	Tous	amélioration de la signal et sensibilité, accès au mode réflecteur (reconstruction précise d'images), réduction de la délocalisation sur le tissu
Tag et tissus fixés / paraffinés	Tous	2ème voie d'utilisation possible des tissus fixés

Tableau II.4.2 : Exemples de développements possibles utilisant la technologie Tag-mass.

Parmi ces développements, on peut évidemment retrouver l'imagerie multipléxe de plusieurs protéines qui peuvent être en relation du point de vue biologique : protéine et son récepteur, protéines protégées par des protéines chaperonnes, processus d'activation enzymatique (enzyme de phosphorylation et leurs cibles)... De cette manière, il sera possible de dédier l'imagerie MALDI à un véritable processus physiologique ou médical et plus uniquement à une stratégie de recherche de biomarqueurs pathologiques. Ces expériences peuvent probablement être réalisées sur des tissus fixés et paraffinés, ouvrant une deuxième voie possible à l'utilisation de ces tissus par spectrométrie de masse.

De même, l'activation d'une protéine ou l'augmentation d'une quantité protéique peut être suivie du point de vue de l'ARNm, par l'utilisation de ribosondes « Tag » marquées ; cette technique également utilisée avec les systèmes DIG, permet de réduire l'hybridation non spécifique ou l'hybridation avec l'ADN génomique qui apparaît lors de l'utilisation de sondes ADNc taggées obtenues au cours d'une expérience PCR et que nous avons utilisées dans nos travaux. Dans cette optique, il est envisageable d'utiliser un anticorps taggé dirigé contre la digoxigénine qui serait intercalée dans les sondes, dans le but de gagner en sensibilité en

utilisant la spectrométrie de masse comme détection, puisque celle-ci semble plus sensible que les techniques de révélation classique. Des expériences de multiplexes ne pourront cependant pas être réalisées si l'on utilise uniquement cet anticorps.

La détection par le Tag reste cependant moins sensible que la fluorescence à la vue des images réalisées avec l'anticorps taggé dirigé contre la protéine CPD. La sensibilité peut néanmoins être probablement améliorée en utilisant des matrices MALDI plus sensibles et compatibles avec l'imagerie ; dans ce cas, il est possible que l'utilisation des matrices ioniques puisse apporter les mêmes avantages lors d'expériences avec le Tag que lors d'imagerie classique sur tissus frais : sensibilité, accès au mode réflecteur pour une reconstruction d'image plus précise, diminution de la délocalisation des composés de la coupe, et accès à la MS/MS sur tissu peuvent être des outils supplémentaires utiles à cette stratégie. Pour la MS/MS, si le signal et les fragments sont suffisamment abondants, il serait alors possible de réaliser des images en mode précurseur sur un fragment provenant de la molécule clivée pour une détection très spécifique.

Les premières analyses du Tag en utilisant des matrices ioniques nous ont permis d'obtenir des signaux intéressants et nous permettent de penser que ces matrices pourraient être utilisées avec succès dans l'imagerie spécifique. (Figure II.4.4)

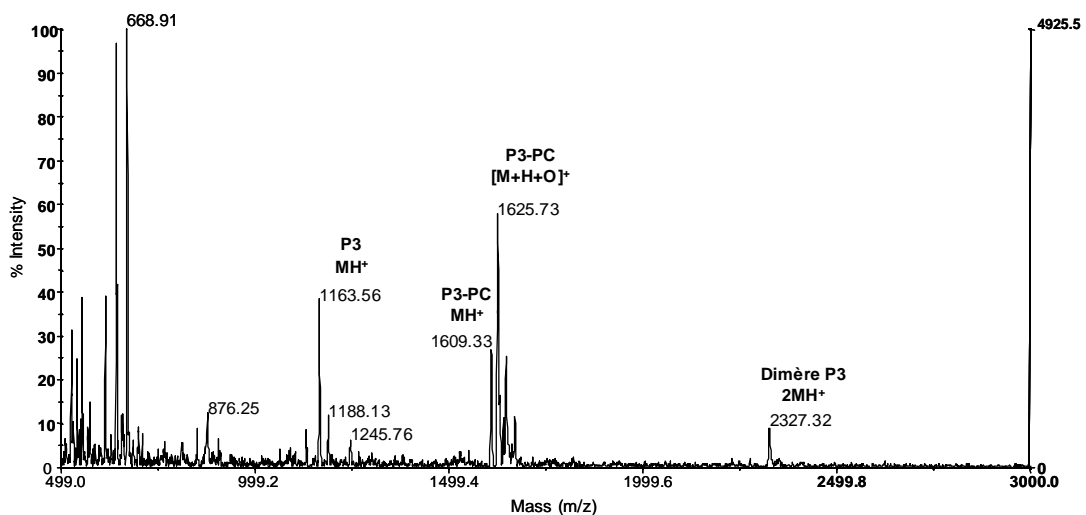


Figure II.4.4 : Détection du Tag O3P3 à 500fmol (Liaison photoclivable positionnée en 5' phosphate, contenant une bradykinine+ cystéine) en mode linéaire postif et en utilisant la matrice ionique HCCA/ANI. (Analyse réalisée après pré-clivage aux UVs)

Même si l'une des caractéristiques des matrices ioniques (et surtout d'HCCA/ANI) est la réduction de la délocalisation des composés du tissu, la meilleure solution pour éliminer ce phénomène est probablement de fixer une matrice MALDI directement sur le Tag. De ce fait,

le clivage et la désorption du composé photodissocié seront réalisés sans l'addition de matrice sur le tissu. Cela pourrait cependant nous conduire à certaines interrogations quant au mécanisme de dissociation et de désorption : la fixation de la matrice (par exemple HCCA) sur le lien photoclivable sera très probablement réalisée par l'extrémité COOH de la matrice qui est la plus réactive. Si cette partie contribue comme il se doit au processus MALDI, le mécanisme de désorption et d'ionisation pourrait alors être modifié. D'autres molécules riches en cycles aromatiques pourraient également être utilisées pour obtenir un mécanisme de désorption laser.

De nombreuses autres molécules taggées peuvent ensuite être envisagées, avec l'utilisation de lectines marquées pour l'imagerie des sucres, ou des aptamères qui permettraient alors l'imagerie de n'importe quelle molécule avec une affinité plus importante (10^{-14} mole) et un accrochage plus spécifique.

CHAPITRE III

LE CANCER DE L'OVAIRE

CHAPITRE III : APPLICATIONS AUX PROBLEMES BIOLOGIQUES : RECHERCHE DE BIOMARQUEURS PEPTIDIQUES DU CANCER DE L'OVAIRE

En partenariat avec Sonia Ait Menguellet, interne en gynécologie.

1. Le cancer de l'ovaire

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI a démontré son intérêt par les nombreuses applications qui ont été réalisées.

La majeure partie des études utilisant l'analyse directe et l'imagerie MALDI, ont été axées sur la recherche de biomarqueurs dans des cancers tels que celui du cerveau, de la prostate ou du colon, mais il est bien sûr important de pouvoir utiliser cette technique pour d'autres types de cancers ou de pathologies.

Parmi celles-ci, le cancer de l'ovaire avec 3500 décès par an en France, représente la quatrième cause de mortalité féminine par cancer. Il atteint une femme sur 70, particulièrement dans la tranche d'âge 60-70 ans, avec 4500 nouveaux cas décelés par an. Ces statistiques font de cette maladie la première responsable des décès gynécologiques.

Plusieurs explications sont à l'origine de ces chiffres préoccupants. La première est l'absence de diagnostic précoce efficace, où les cas sont généralement décelés à un stade tardif d'extension tumorale. De ce fait, 75% des cancers de l'ovaire sont décelés aux stades III et IV (envahissement péritonéal, ganglionnaire ou métastatique à distance) sachant que le taux de survie à 5 ans passe de 90% pour des stades Ia (cancer limité aux ovaires avec capsule intacte), à seulement 25 % pour des stades III et 15% pour des stades IV (Rapkiewicz et coll, *European Journal of Cancer*, **2004**).

La deuxième raison est l'absence de traitements efficaces sur des stades déjà avancés, due à l'incompréhension des mécanismes mis en jeu. (Nanora et coll, *Nature Reviews Cancer*, **2005**).

La majeure partie des cancers sont épithéliaux (90%) et certains résultats obtenus sur des modèles de souris laissent penser que les carcinomes ovariens proviennent de l'épithélium bordant la surface de l'ovaire ; ils migrent ensuite de manière très invasive vers les organes

adjacents (utérus, trompes etc.) et la formation de liquide d'ascites dans la cavité péritonéale est un signe largement utilisé pour déceler sans ambiguïté la formation de ces carcinomes et donc, des stades les plus avancés de la maladie.

L'étude des processus impliqués dans cette mobilité cellulaire utilise de nombreux modèles animaux produisant des cellules épithéliales envahissantes. C'est le cas par exemple pour l'étude de cellules folliculaires chez *Drosophila melanogaster*. Ces études de « screening » ont permis de décrire de nombreux gènes et protéines impliqués dans ce phénomène invasif, particulièrement important dans le cancer de l'ovaire. (Tableau III.1.1)

Gene name	Protein product	Biochemical activity	Proposed role in migration
<i>slbo</i>	C/EBP	Transcriptional activator	Required for initiation of migration
<i>chic</i>	Profilin	Actin-monomer-binding protein stimulates actin polymerization	Regulates G-actin pool
<i>Rac1</i>	RAC	21-kDa GTPase	Actin polymerization at leading edge
<i>shg</i>	E-cadherin	Homophilic cell adhesion	Border-cell-border-cell adhesion and border-cell-nurse-cell traction
<i>zip</i>	Myosin II	Barbed-end-directed actin motor	Retraction of trailing edge
<i>jing</i>	AEBP2 homologue	Zinc-finger transcriptional activator	Cooperates with C/EBP
<i>tai</i>	AIB1 homologue	Steroid-hormone-receptor-coactivator	Regulates timing of migration in response to ecdysone
<i>EcR</i>	EcR	Hormone-binding subunit of ecdysone receptor	Regulates timing of migration in response to ecdysone
<i>usp</i>	RXR homologue	Ecdysone-receptor subunit	Regulates timing of migration in response to ecdysone
<i>ecd</i>	Not known	Ecdysone biosynthesis	Regulates ecdysone production
<i>pvf1</i>	PVF1 or VEGF17E	Secreted ligand for receptor tyrosine kinase	Guidance of border cells towards the cocyte
<i>pvr</i>	PVR	Receptor for PVF1, PVF2 and PVF3	Guidance of border cells to the oocyte; might function redundantly with EGFR
<i>Torpedo (Egfr)</i>	EGFR	EGFR homologue	Functions redundantly with PVR to guide border cells to the oocyte and guides border cells to the dorsal side, once they reach the oocyte
<i>Stat92e</i>	STAT	Signal-activated transcription factor	Functions autonomously within border cells to cause cells to become migratory in response to signal from polar cells
<i>upd</i>	UPD	Secreted cytokine that activates the JAK-STAT pathway	Paracrine signal that stimulates cells next to the polar cells to cluster around the polar cells and migrate
<i>hop</i>	Janus-kinase homologue	Non-receptor tyrosine kinase	Its activation is necessary and sufficient to convert epithelial follicle cells to migratory cells
<i>dome</i>	DOME	UPD receptor	It is required for JAK-STAT activity

Tableau III.1.1 : Exemples de gènes et protéines impliqués dans la migration de cellules épithéliales. (Nanora et coll, *Nature Reviews Cancer*, 2005).

Les signes cliniques de la maladie sont variables ; ils peuvent être gynécologiquement ciblés comme une augmentation de l'abdomen, des douleurs pelviennes ou des leucorrhées. D'autres sont plus généraux, allant des troubles digestifs aux troubles respiratoires.

Il existe à l'heure actuelle quelques biomarqueurs tumoraux utilisés dans le cancer de l'ovaire ; le plus connu est le CA 125 (Cancer Antigen 125) une glycoprotéine qui est élevée dans 80% des tumeurs épithéliales, mais seulement dans 50% des patientes évoluant à des stades précoces. La spécificité de ce marqueur est parfois critique, car ce dernier peut aussi augmenter dans les premiers mois de la grossesse, dans les cancers du sein, dans les cas d'endométriose ou les irritations péritonéales ; son élévation est donc possible dans des conditions physiologiques classiques ou bénignes. Associé à d'autres biomarqueurs comme le CA 15-3, ou le CA 19-9, l'efficacité du diagnostic peut être améliorée, au profit parfois de la spécificité du dépistage. Malheureusement aucune de ces combinaisons n'est encore valable pour un dépistage précoce (Rapkiewicz et coll, *European Journal of Cancer*, **2004**).

Le cancer de l'ovaire manque ainsi de nouvelles thérapies ou chimiothérapies efficaces dans les stades les plus avancés ainsi et d'outils diagnostics performants aux stades les plus précoces. Ces développements ne seront possibles que par l'augmentation des connaissances sur les mécanismes mis en jeu dans cette maladie et donc la compréhension des différents acteurs impliqués dans le cancer de l'ovaire. (Nanora et coll, *Nature Reviews Cancer*, **2005**).

Devant cette nécessité, et grâce à un partenariat avec une équipe de chirurgiens en gynécologie à l'hôpital Jeanne de Flandre de Lille (Pr D. Vinatier, Dr J. Lucot et Dr P. Collinet) nous avons étudié par analyse directe sur tissus et imagerie MALDI les profils de biopsies ovariennes cancéreuses humaines que nous avons ensuite comparés à des profils obtenus sur des kystes bénins ou des ovaires sains (descente d'organes).

Dans cette approche, les profils peptidiques de liquides d'ascites et de liquides péritonéaux des patientes ont également été effectués pour être corrélés aux résultats obtenus sur tissus et observer d'éventuelles modifications de biomarqueurs.

Cette approche présente l'avantage de travailler directement sur des biopsies, qui de plus sont humaines, et non sur des cultures cellulaires qui peuvent ne pas être parfaitement représentatives des processus se produisant dans les tissus entiers.

2. Analyses d'échantillons tumoraux

Le but de notre étude est de détecter par « profiling » différentiel la présence de biomarqueurs potentiels dans les tissus. Dans un deuxième temps, ces molécules pourront être identifiées puis validées par une approche différente de la spectrométrie de masse comme une approche d'immunohistochimie ou une approche western blot plus quantitative.

Plusieurs difficultés pour ce type de projet sont à souligner : tout d'abord, cette approche protéomique est réalisée sur des échantillons prélevés au bloc opératoire. Le temps nécessaire pour réaliser les analyses doit être équivalent pour chaque prélèvement afin de réduire les variabilités inter-échantillons due à des dégradations des protéines par les protéases. De la même manière, le stockage des échantillons doit être identique et doit permettre de maintenir les échantillons viables. Dans cette optique, tous les prélèvements (Ovaire et liquides ovariens) ont été stockés dans un premier temps à 4°C au bloc opératoire avant le traitement de ces derniers. Après transport à 4°C, les tumeurs ont été rapidement placées à -80°C et les liquides ovariens aliquotés par 500µL puis stockés dans les mêmes conditions que les tissus.

Un soin particulier a été apporté pour que les tumeurs et les liquides soient traités dans les plus brefs délais.

Une autre difficulté réside, comme pour toute approche protéomique, à contrôler la variabilité naturelle intra-patiente. Pour une bonne représentation du profil peptidique détectable sur le tissu, une coupe a été analysée en plusieurs points couvrant les principales régions de celle-ci, en accumulant un nombre de tirs suffisant à l'obtention d'un bon rapport S/N (généralement 200 tirs par positions). Plusieurs coupes dans des régions différentes de l'ovaire ont été analysées afin d'assurer une bonne reproductibilité de l'analyse.

La dernière se trouve dans la variabilité inter-patiente ; cette modification est beaucoup plus difficile à contrôler et nécessite un grand nombre d'échantillons pour être palliée. Dans cette étude, tous les tissus obtenus ont été confirmés par les anatomopathologistes comme étant de stade III ou IV, et les analyses ont été conduites sur des tissus histologiquement comparables. De plus, nous n'avons considéré que les marqueurs absents/présents entre les biopsies cancéreuses et les tumeurs/kystes bénins ou ovaires sains (prolapsus) ; les pics présentant simplement une modulation d'intensité n'ont pas été considérés.

En première partie, les profils d'analyses directes sur des coupes de 15µm « cancer VS bénin » ont été comparés en utilisant différentes matrices (HCCA, SA, HCCA/ANI). Les profils ont été effectués suivant les mêmes conditions d'analyse, et notamment en ce qui concerne les matrices : les profils cancéreux ont été réalisés en HCCA et comparés aux profils bénins obtenus avec cette même matrice. Des expériences utilisant la matrice SA et HCCA/ANI ont également été menées.

Dans l'étude, aucun rinçage de tissus ni traitement de coupes n'a été utilisé. Comme nous l'avons précédemment décrit dans la section « traitements des tissus », l'éthanol 70/80% améliore les signaux en extrayant une partie des peptides de la biopsie ; dès lors, il paraît difficile de s'assurer de la bonne reproductibilité de cette méthode, et notamment de confirmer que l'extraction est semblable dans un tissu nécrosé et dans un tissu sain. De même, nous n'avons pas jugé utile pour le moment d'utiliser les traitements au CHCl₃ ou au Xylène, étant donné que les ovaires sont analysés rapidement après le prélèvement et que les signaux sont donc riches et abondants. Comme nous l'espérons, des profils différents semblent être détectés suivant la pathologie, même si certains signaux restent en commun entre les deux analyses (Figure III.2.1). Cependant, une partie de ces signaux apparaissant comme variables sont le reflet de la variabilité inter et intra patientes décrite un peu plus haut. Ces spectres reflètent ainsi très bien la nécessité de réaliser plusieurs acquisitions en différents points du tissu et en également plusieurs endroits de la biopsie. Nous avons renouvelé l'expérience sur des échantillons provenant de 13 patientes cancéreuses et 15 patientes bénignes.

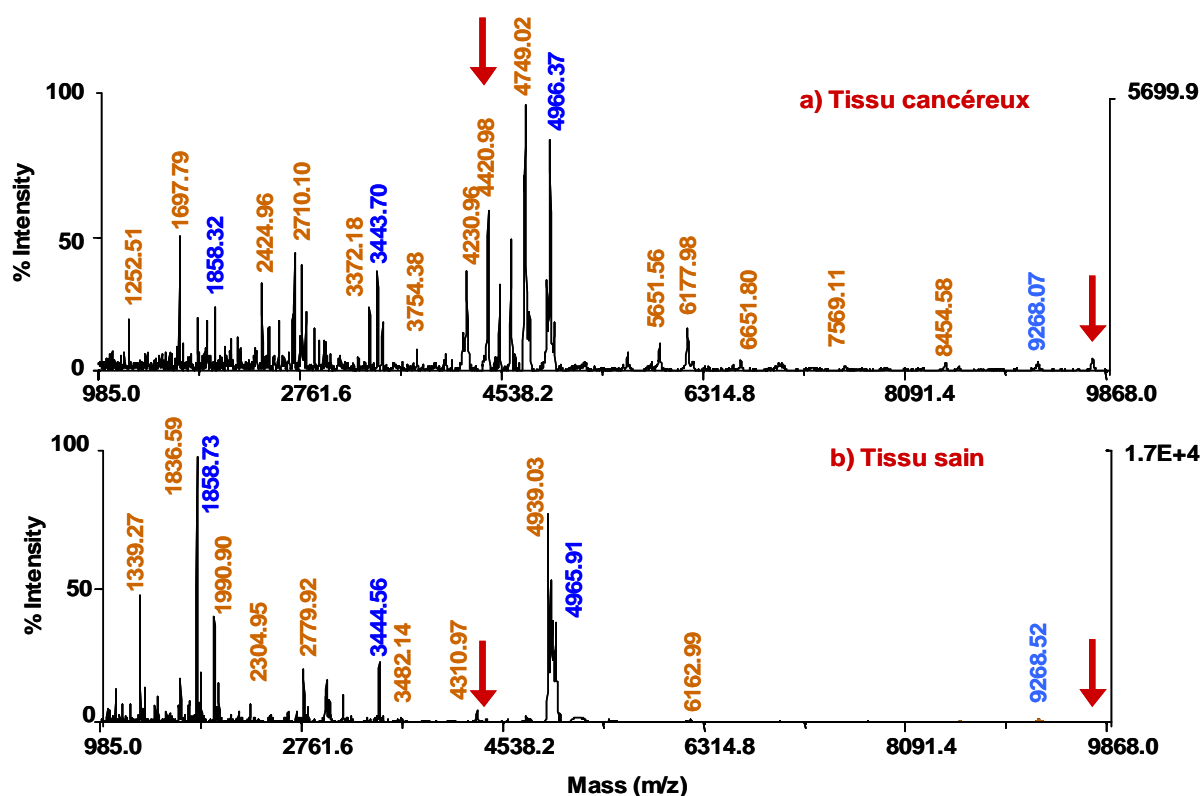


Figure III.2.1 : Exemple de spectres MALDI en mode linéaire positif (matrice HCCA) enregistrés sur une coupe de biopsie d'ovaire a) biopsie d'une patiente atteinte du cancer de l'ovaire et b) biopsie d'une patiente présentant un kyste (en bleu clair les pics communs aux deux spectres et en orange les pics différentiels). Les flèches rouges représentent la localisation de biomarqueurs repérés sur plusieurs patientes.

Certaines confirmations de la présence des mêmes composés sur deux tissus différents ont été réalisées par l'utilisation de la matrice ionique HCCA/ANI, d'une part par l'utilisation du mode réflecteur sur tissu et d'autre part pour certains peptides, en réalisant des expériences de PSD partiels *in situ*. (Figure III.2.2). Par exemple, une ambiguïté était apparue pour certains peptides comme l'ion de masse m/z 1264 détecté en mode linéaire chez des patientes cancéreuses et l'ion de masse 1265 environ pour l'analyse sur du tissu sain. Une première acquisition en mode réflecteur nous a permis d'obtenir une masse plus précise (m/z 1252,24 et 1252,36) laissant grandement penser que ces deux ions sont identiques. L'observation des PSD partiels identiques entre les deux ions a confirmé ce résultat.

Les masses obtenues en mode réflecteur avec la matrice ionique ont pu être utilisées lors des acquisitions avec HCCA pour limiter les effets de décalibration dus au tissu. De même, lors des analyses avec l'acide sinapinique, les signaux d'hémoglobine ont permis d'effectuer une calibration interne sur les ions mono et dichargés de cette protéine, après la recherche de la

masse précise dans les banques de données. Les masses obtenues dans ces spectres calibrés ont ensuite été réutilisées comme « calibrant interne » pour d'autres matrices, réalisant ainsi une calibration croisée.

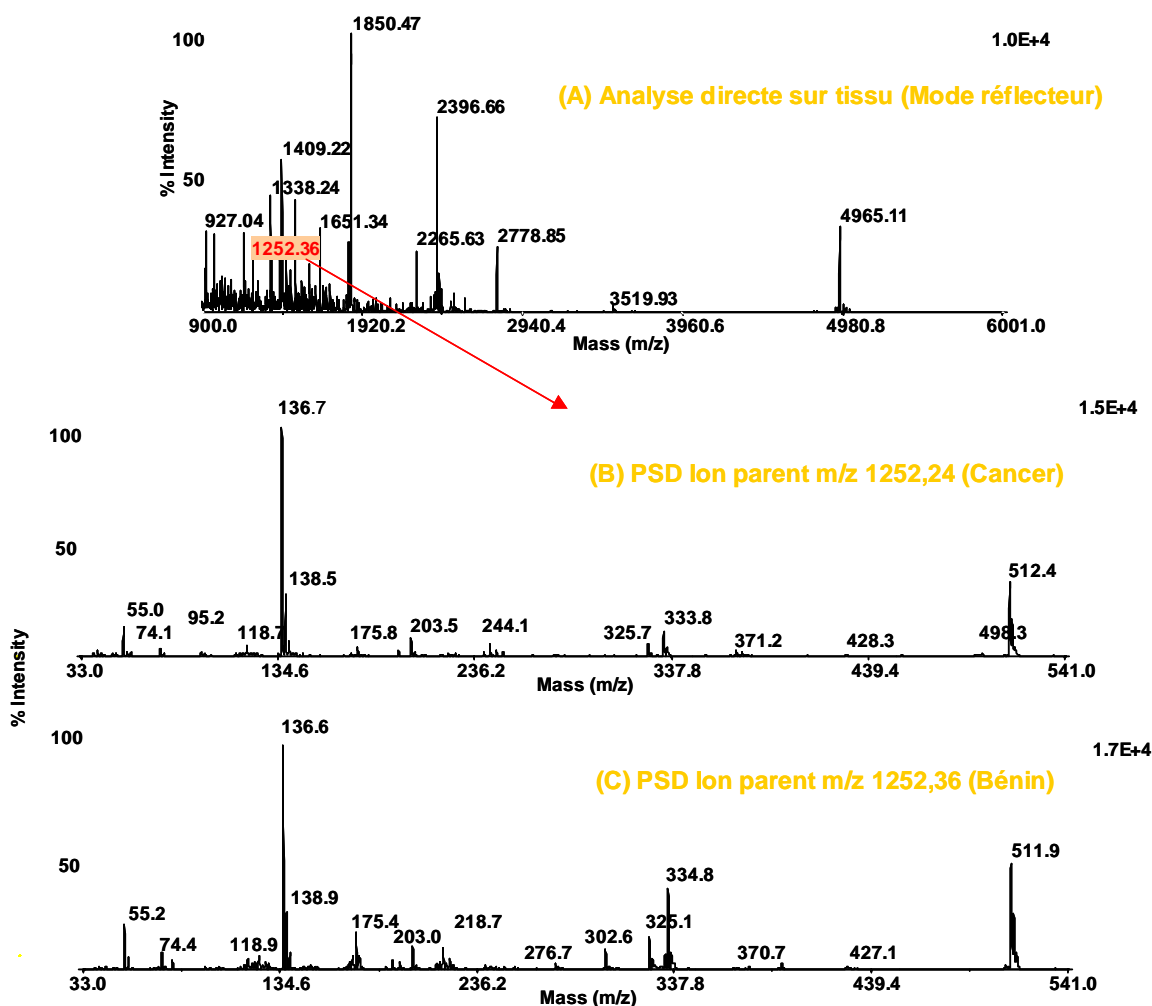


Figure III.2.2 : Spectres d'analyse directe MALDI en mode réflecteur sur tissu (A) PSD partiels enregistrés directement sur des tissus soit cancéreux (m/z 1252,24) soit bénin (m/z 1252,36) en utilisant la matrice ionique HCCA/ANI (gaz de collision : Xénon)

Nous avons ensuite étudié les résultats obtenus avec les différentiels observés pour l'extraction des liquides d'ascites cancéreux par rapport à des liquides kystiques bénins. Pour ces derniers, les peptides ont été extraits à l'aide d'une solution d'HCl 1N, puis pré-purifiés à l'aide de cartouche de C18 après centrifugation et élimination du culot protéique.

Cette analyse de liquides d'ascites est importante, car cette substance est abondamment produite dans les stades cancéreux avancés, et est, comme décrit dans la partie introductive, souvent utilisée comme confirmation de la production de carcinomes ovariens.

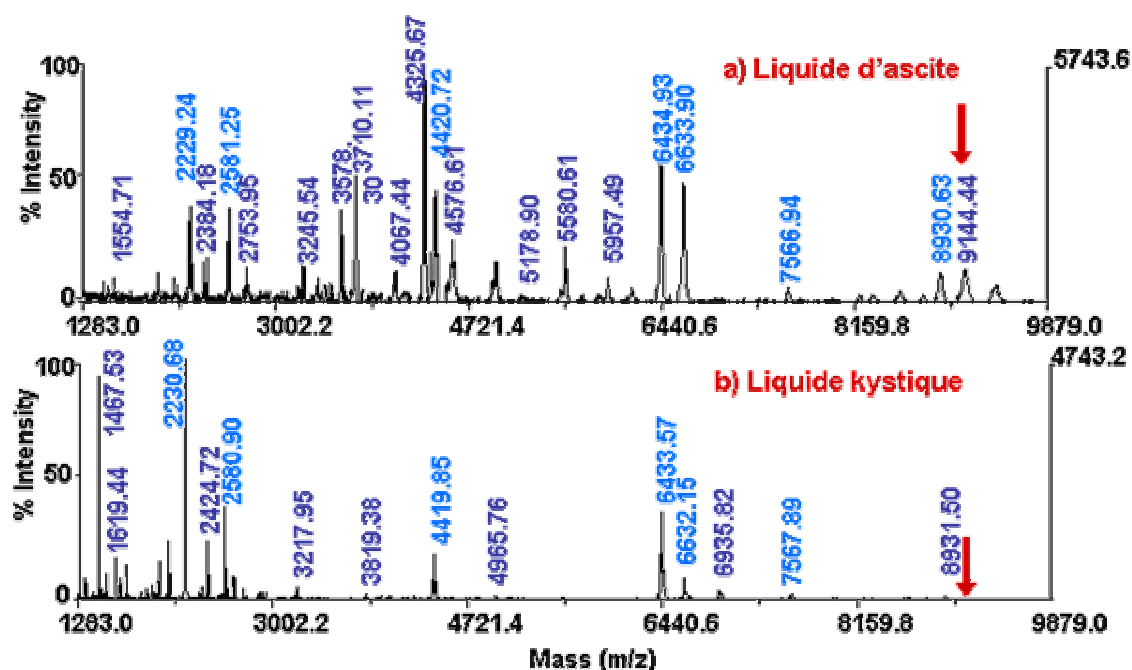


Figure III.2.2 : Spectres MALDI en mode linéaire positif (matrice HCCA) enregistrés à partir des extraits HCl pré-purifiés a) de liquide d'ascite et b) de liquide kystique (en bleu clair les pics communs aux deux spectres et en bleu foncé les pics différentiels).

Comme dans le cas de l'analyse directe de tissus, certains composés sont en commun et d'autres peuvent être des molécules plus spécifiques. Le milieu acide utilisé pour l'extraction dénature en grande partie les protéines du milieu provoquant leur précipitation. De ce fait, le risque de ne pas extraire certains composés fixés sur des protéines transporteurs comme l'albumine paraît fortement réduit.

Cependant, il était important de valider l'absence ou la présence des peptides dans ces liquides par une deuxième méthode d'extraction basée sur un système différent. Nous avons choisi d'utiliser le système Clinprot (Bruker Daltonics) où des billes magnétiques sont recouvertes de silices greffées C8, C18, C4 ou ioniques. Une fois ces billes dans le liquide biologique, les peptides et petites protéines viennent s'adsorber sur les surfaces greffées, et les composés peuvent être extraits puis analysés après rinçage. (Figure III.2.3)

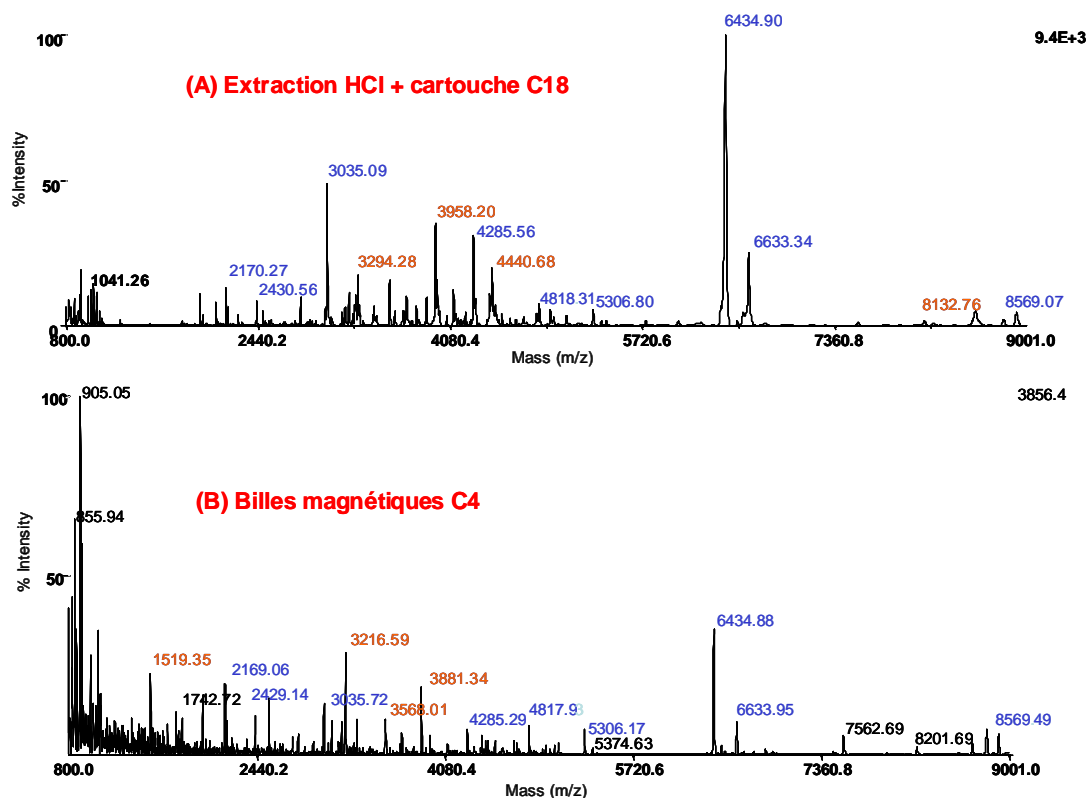


Figure III.2.3 : Comparaison des profils peptidiques de liquides d'ascites obtenus après extraction HCl 1N (A) et système d'adsorption directe Clinprot C4 (B).

Les profils d'extraction HCl et clinprot sont globalement semblables, et les ions majoritaires sont retrouvés quelles que soient les techniques utilisées. Les différences au niveau de l'intensité des ions, plus importantes dans le cas de l'acide proviennent de la quantité d'échantillon traité qui est plus faible par la technique Clinprot (10 μ L de solution contre 500 μ L). Cependant, certains composés semblent être extraits avec une technique et pas avec l'autre et réciproquement. Par exemple, les ions de masse m/z 1519,3 ou 3216,6 sont extraits par les billes C4, mais ne sont pas détectables en extraction. A l'inverse, les peptides de m/z 4440,6 ou m/z 8132,7 n'ont été détectés que lors de l'extraction HCl.

Ces deux approches semblent donc complémentaires et le protocole Clinprot peut donc être utilisé pour valider l'absence ou la présence de certains peptides détectés après extraction acide.

L'approche des billes présente également l'avantage de n'utiliser que très peu d'échantillons et de pouvoir réaliser rapidement les confirmations.

Sur la base de l'ensemble des résultats, une première liste de 8 biomarqueurs a été dressée. Ces derniers ont été retenus car présents dans au moins 25% des échantillons cancéreux et jamais dans les échantillons sains équivalents. (Tableau III.2.2)

Biomarqueur	% détection dans les cancers	Localisation	m/z
1	54%	Ascite et ovaire*	1389*
2	46%	Ascite et ovaire*	2307*
3	38%	Ovaire	7913
4	38%	Ascite et ovaire	8254
5	53%	Ascite et ovaire	8353
6	46%	Ascite	9144
7	46%	Ovaire	9217
8	77%	Ovaire	9744

Tableau III.2.2 : Récapitulatif des biomarqueurs potentiels détectés lors d'analyse directe de tissus et d'analyse d'extraits peptidiques provenant de liquides d'ascites (% de sensibilité calculé sur 13 patientes cancéreuses VS 15 patientes saines ou bénigne).

La présence des biomarqueurs à la fois dans les tissus cancéreux et dans l'ascite (extension de la tumeur) nous renseigne sur la mobilité de ce type de composé. Par exemple, les biomarqueurs à m/z 7913, 9217 et 9744 semblent être spécifiques de l'ovaire et ne semblent donc pas être sécrétés ou relargués dans le liquide ovarien tumoral. Ces derniers ont probablement une action ciblée au sein des cellules de la biopsie. A l'inverse, le peptide de masse m/z 9144 n'a été détecté que dans le liquide d'ascite, ce qui laisse penser à un clivage biologique de cette molécule par des protéases ou à une synthèse par des cellules uniquement localisées dans le fluide.

Les peptides portant les astérisques (m/z 1389 et 2307) sont des biomarqueurs que nous avons détectés dans les liquides d'ascites mais jamais dans les liquides kystiques bénins ; ces derniers ont cependant été observés lors des analyses directes de tissus cancéreux et parfois aussi de tissus sains. Cela nous laisse penser que ces composés sont présents à l'état basal, mais qu'ils sont majoritairement produits dans le liquide d'ascite suite à la présence de la tumeur. Cette hypothèse reste encore à confirmer par des études complémentaires.

Les deux peptides de masse m/z 8254 et 8353 ont été détectés dans l'ovaire cancéreux et dans le liquide d'ascite, mais jamais dans une partie saine (liquide ou ovaire). Ces composés

peuvent être nouvellement synthétisés par la tumeur et relargués dans l'ascite laissant présager un rôle dans la prolifération.

Nous avons également entamé quelques études sur du sang prélevé pendant l'opération suivant le même type de comparaison ; le but est évidemment de rechercher dans le sérum les biomarqueurs repérés au sein de la tumeur pour tester leur viabilité dans un diagnostic précoce de la pathologie. Cependant, les profils obtenus sont plus complexes et parfois moins reproductibles, car ils sont le reflet de l'état physiologique général de la patiente.

Ainsi, nous avons choisi d'identifier les biomarqueurs potentiels repérés dans ce travail, afin de comprendre leur(s) rôle(s) dans le processus pathologique. Nos études se sont centrées pour le moment sur le biomarqueur majoritaire que nous avons détecté dans 80% des cas cancéreux environ et de m/z 9744 (Figure III.2.3).

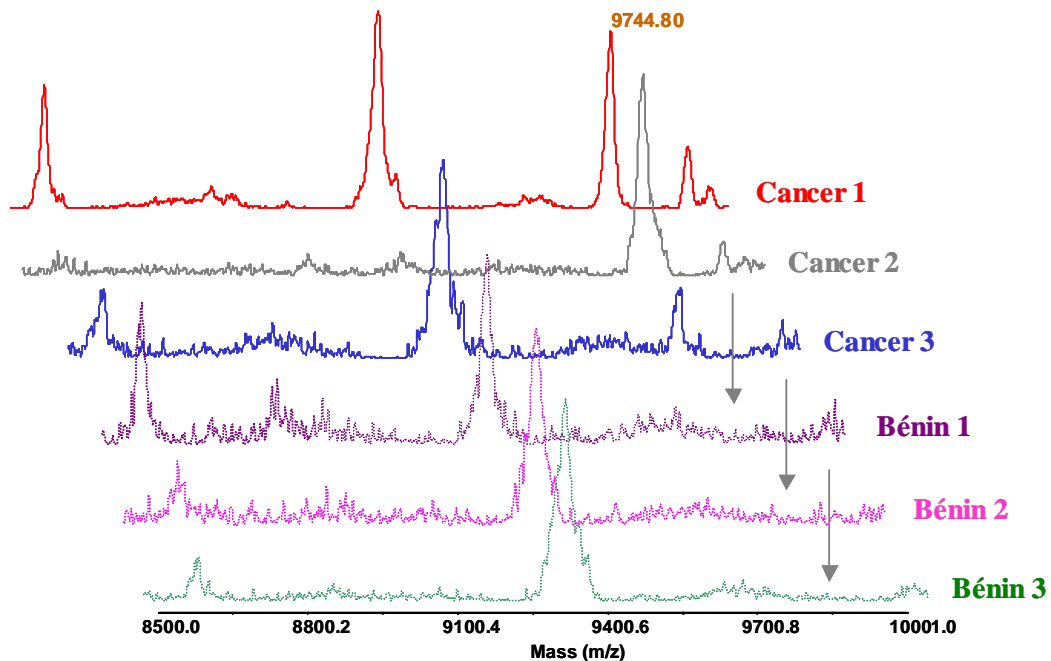


Figure III.2.3 : Profils peptidiques obtenus lors d'analyses directes par MALDI sur des coupes d'ovaires cancéreux et des coupes d'ovaires présentant des tumeurs bénignes, et détection du biomarqueur potentiel m/z 9744 présent dans les tumeurs malignes.

- **Identification d'un biomarqueur potentiel du cancer de l'ovaire : le peptide m/z 9744**

Une extraction acide au HCl 1N de tissus cancéreux a été réalisée afin d'obtenir un pool peptidique relativement conséquent. Les extraits sont d'abord pré-purifiés sur cartouche C18 et séparés en trois éluions (une fraction 10%, 40% et 100%). Chaque fraction est elle-même séparée par chromatographie liquide préparative C18, avec un gradient croissant d'ACN de 1% par minute. Les peptides sont recueillis séparément dans des tubes toutes les minutes puis analysés par spectrométrie de masse MALDI pour repérer la fraction correspondant au biomarqueur recherché.

Le marqueur N°8 a été retrouvé sous forme oxydée dans la fraction N° 46 correspondant à la fraction sepack 100%, ce qui représente une élution à 45% d'ACN environ. (Figure III.2.4)

Le composé est largement majoritaire, et deux ions distincts correspondant aux ions mono (m/z 9763,93) et dichargés (m/z 4886,73) sont détectés.

La même extration réalisée sur une patiente saine n'a pas permis de détecter ce composé après HPLC.

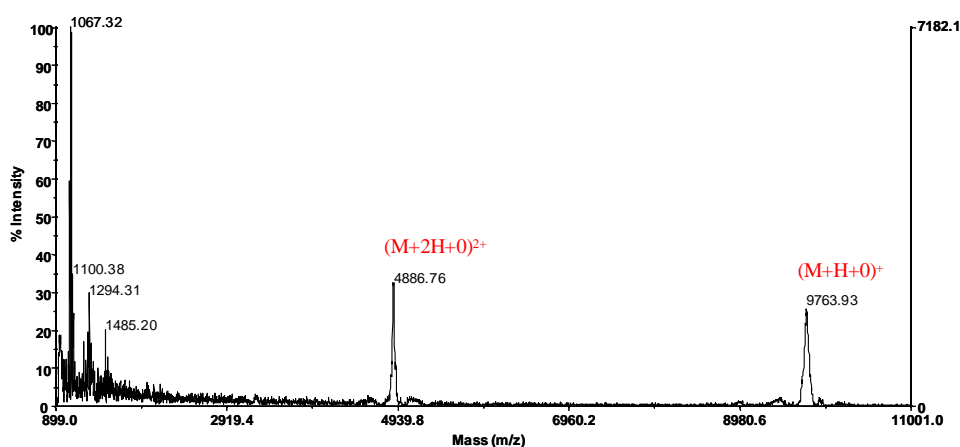


Figure III.2.4 : Analyse MALDI en mode linéaire positif de la fraction HPLC N° 46 (matrice HCCA)

La fraction N°46 est ensuite soumise à une digestion enzymatique à la trypsine pendant une nuit. Le digest est analysé par MALDI TOF et malgré les signaux provenant de l'autolyse de la trypsine, de nombreux peptides issus du composé de départ peuvent être détectés. Une première interrogation en banque de données nous indique une possible similitude avec une protéine nommée REG α mais avec un score faible.

Pour lever toute ambiguïté, certains peptides sont fragmentés en mode MS/MS (CID) sur un instrument du type nano ESI-Q/TOF. Les peptides séquencés à savoir les m/z 454, 0^{2+} , 760, 0^{2+} , 751, 0^{2+} et 706, 8^{2+} (Figure III.2.5) ont tous permis l'identification du fragment m/z 9744 comme appartenant à la chaîne N de REG α (ou PA 28 α), avec des matchs considérés comme significatifs (supérieurs à 24), allant de 26 (706, 8^{2+}), à 45 (751, 0^{2+}) lors de l'interrogation en banques de données (NCBIInr). Le séquençage du même peptide que le 751, 0^{2+} mais de charge différente ($501,0^{3+}$) nous fournit également la même identification.

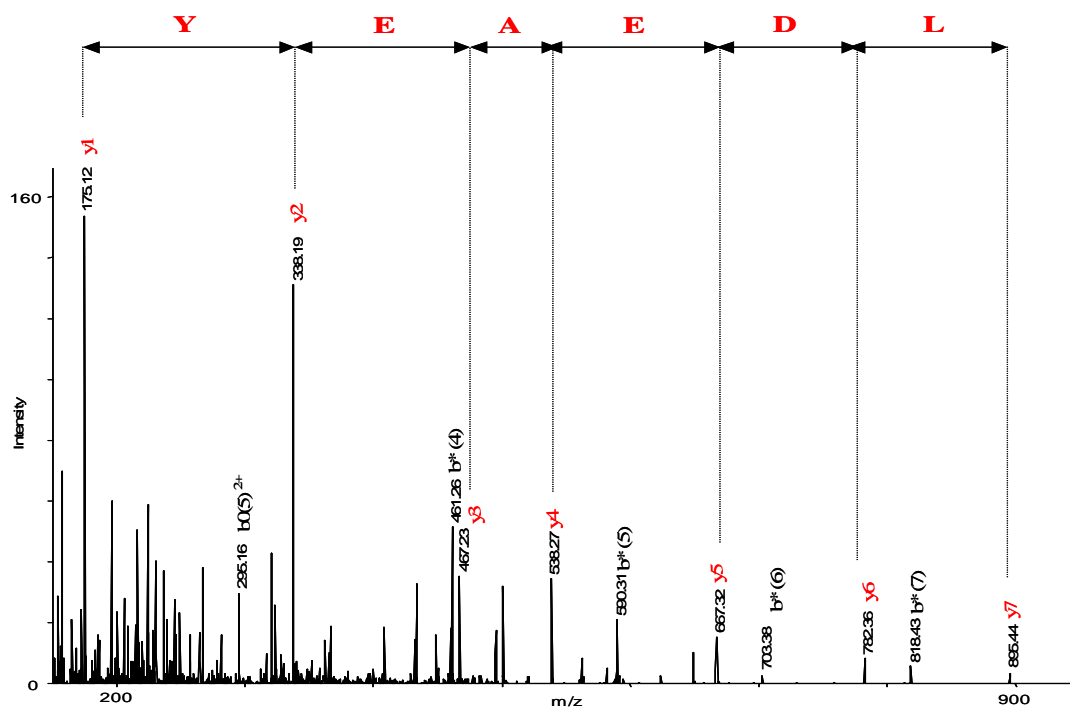


Figure III.2.5 : Expériences MS/MS réalisées en nano ESI-Q/TOF sur l'ion précurseur 501^{3+} de séquence QLVHELDEAEYR et permettant une identification de la chaîne N de REG α (Score du match : 37).

Cette chaîne N de la protéine REG α a une masse de 16285 u et est composée de 140 acides aminés, comme numéro de référence : [gi|2780883](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/gi|2780883) (NCNInr)

```

1  AVNCNEKIVV LLQRLKPEIK DVIEQLNLVT TWLQLQIPRI EDGNNFGVAV
51  QEKVFELMTS LHTKLEGFHT QISKYFSEK DAVTKAAKQP HVGDYRQLVH
101 ELDEAEYRDI RLMVMEIRNA YAVLYDIILK NFEKLLKPRG
    
```

A partir de la séquence théorique de la chaîne N de REG, nous avons réalisé une simulation de la digestion à la trypsine afin d'obtenir le « fingerprint » théorique de la molécule.

Ainsi, les peptides résultant normalement de la digestion (coupures après les acides aminés basiques en bleu dans la séquence) peuvent être repérés sur les spectres MALDI du digest de la protéine. Les signaux repérés sont les suivants : m/z 536,89, 700,68, 890,57, 970,47, 1158,55, 1500,98. Ils sont signalés en rouge dans la séquence et en bleu dans le spectre de digestion tryptique ci-dessous (Figure III.2.5) :

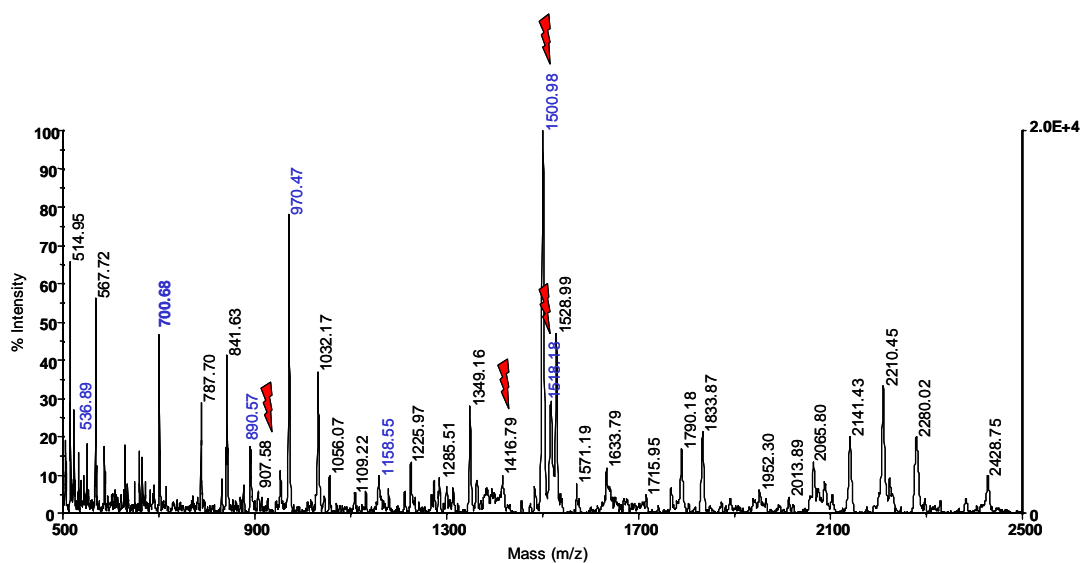


Figure III.2.6 : Analyse MALDI du « digest » de la fraction N°46 ; les peptides en bleu clair sont ceux qui ont été repérés par la simulation de la coupure de la chaîne N de REG α . Les éclairs sont les peptides détectés et séquencés en MS/MS sous forme 2⁺ ou 3⁺ en nano ESI-Q/TOF.

A ces derniers doivent évidemment s'ajouter les peptides détectés lors de l'analyse ESI-Q/TOF en mode MS ou MS/MS, également signalés en rouge dans la séquence suivante :

1 AVNCNEKIVV LLQRLKPEIK DVIEQLNLVT TWLQLQIPRI EDGMNFGVAV
 51 QEKVFELMTS LHTKLEGFHT QISKYFSEK DAVTKAAKQP HVGDYRQLVH
 101 ELDEAEYRDI RLMVMEIRNA YAVLYDIILK NFEKLLKPRG

Ainsi, sur la base de la séquence théorique, sur la localisation des fragments de digestion et en considérant la masse du peptide intact, il est possible de déterminer la séquence du peptide détecté sur tissu et dans la fraction 46 ayant comme masse 9744 Da :

```
1 RIEDGNNFGA VQEKVFELMT SLHTKLEGFH TQISKYFSER GDAVTKAAKQ
51 PHVG DYRQLV HELDEAEYRD IRLMVMEIRN AYAV (84 acides aminés)
```

Le croisement des données ESI et MALDI permettent de couvrir 59 acides aminés sur la totalité des 84 acides aminés de ce fragment, soit 70 % de couverture pour cette séquence. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le peptide biomarqueur des tissus tumoraux est un fragment de la chaîne N de la protéine REG α qui est un activateur du protéasome. La séquence complète de la protéine REG α (28 kDa) est la suivante, avec en rouge, la partie identifiée lors de la digestion trypsique et les expériences MS/MS :

```
1 mamlrvqpea qakvdvfred lctktenllg syfppkisel daflkepaln
eanlsnlkap

61 ldipvpdpvk ekekeerkkq qekedkdekk kgededkqpp cgpvncneki
vllqrlkpe

121 ikdvieqlnl vttwlqlqip riedgnnfgv avqekvfelm tslhtklegf
htqiskyfse

181 rgdavtkaak qphvgdyrql vheldeaeyr dirlmvmeir nayavlydii
lknfeklkkp

241 rgetkgmiy
```

La protéine REG α semble donc impliquée dans le cancer de l'ovaire si l'on considère les premiers résultats obtenus par profilage sur tissus par MALDI/TOF. Ces résultats doivent néanmoins être validés par une approche différente de la spectrométrie de masse afin de confirmer la régulation de cette protéine dans le cancer.

L'utilisation d'anticorps anti-REG doit nous permettre d'obtenir des informations plus fines quant à la localisation de cette protéine dans la cellule, étude qui n'est pour le moment pas réalisable en imagerie MALDI étant donnée la taille du laser. Dans un deuxième temps, une approche plus quantitative par Western-Blot devrait nous confirmer s'il y a ou non augmentation de cette protéine dans les tissus.

3. Etude de la protéine REG α par approche immunologique.

Les premières expériences sur ce sujet ont consisté à étudier l'évolution de la protéine sur les tissus par immunohistochimie en utilisant un anticorps anti REG α polyclonal dirigé vers la partie CTER de la protéine. C'est dans cette zone que se situe le fragment détecté en analyses directes MALDI.

Les expériences ont été réalisées sur des coupes de 4 μ m de tissus fixés et paraffinés de cancer de l'ovaire, et comparées à des tumeurs bénignes. L'anticorps primaire a été utilisé au 1/50^{ème} et l'anticorps secondaire (Streptavidine/biotine/péroxydase DAB) utilisé au 200^{ème}. Ces expériences ont été réalisées sur une partie des échantillons analysés en MALDI ainsi que des échantillons stockés dans les bibliothèques des anatomopathologistes, incluant des tumeurs malignes épithéliales et non épithéliales et quelques cancers frontières. (Tableau III.3.1)

La comparaison du marquage de la protéine dans des tumeurs malignes épithéliales et des tumeurs bénignes laisse apparaître des premières différences intéressantes. Dans la plupart des expériences, le marquage de REG α est moins important dans les tumeurs bénignes (2 marquages forts sur 12 échantillons bénins), inexistant dans l'ovaire sain (1 échantillon) et intense dans le malin (7marquage forts sur 11 malins) (Tableau III.3.1). Dans le meilleur des cas pour le bénin, REG est majoritairement présent dans le noyau des cellules, alors que ce dernier semble avoir massivement envahi le cytoplasme dans le cas des cancers. (Figure III.3.1).

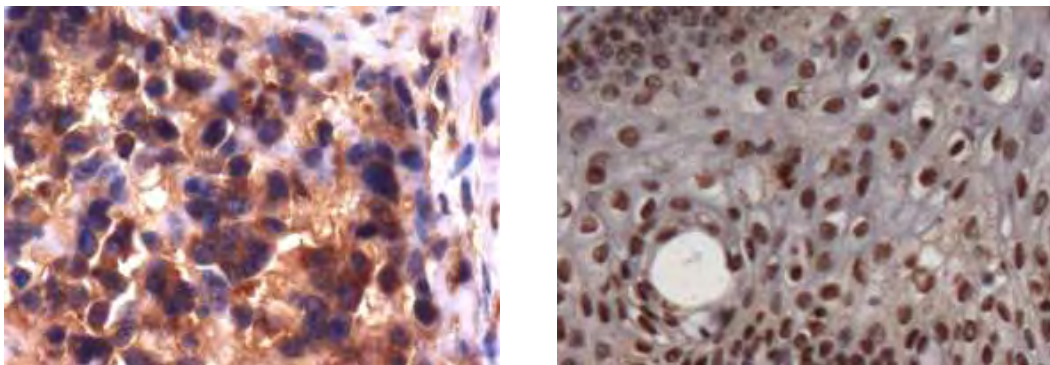


Figure III.3.1 : Immunohistochimie d'une tumeur épithéliale maligne (à gauche) et d'un kyste dermoïde (bénin à droite). Le marquage de REG α (en marron) est particulièrement important dans le cytoplasme dans le cas des cancers et présent dans le noyau chez les bénins à des intensités plus ou moins fortes.

Patiente	Bénin-Malin	Type histologique	MALDI : fragment 9744	WESTERN BLOT Cterm	ICC Cterm: intensité du marquage	ICC Cterm: loc. majoritaire du signal
1	malin	adénocarcinome séreux peu différencié	X	+	faible	cytoplasmique
2	malin	adénocarcinome séropapillaire	0	+	fort	cytoplasmique
3	malin	adénocarcinome ovarien séreux peu différencié	X	+	faible	équilibrée
4	malin	adénocarcinome peu différencié		-	fort	cytoplasmique
5	malin	adénocarcinome séreux peu différencié	X		fort	équilibrée
6	malin	adénocarcinome endométrioïde ovarien	X	+	faible	cytoplasmique
7	malin	carcinome neuro endocrine	0		fort	équilibrée
8	malin	adénocarcinome séreux peu différencié		+	faible	nucléaire
9	malin	sarcome non ovarien	0	+		
10	malin + frontière	d'une tumeur frontière mullérienne mixte avec aspect prédominant séromucineux	X	+	fort	équilibrée
11	malin +frontière	carcinome mucineux intra épithélial au sein d'un kyste mucineux frontière		+	fort	équilibrée
12	malin	adénocarcinome séreux peu différencié	X		fort	équilibrée
				8 malins positifs sur 9 testés (88.8%)	Malin : 7 marquages "fort" sur 11 testés (63.6%)	Malin : 4 marquages cytoplasmiques sur 11 testés (36.3%)
						Malin : 6 marquages équilibrés sur 11 testés
						Malin: 1 marquage nucléaire sur 11 testés (9%)
13	bénin	thécome ovarien + kyste séreux bénin	0	-	faible	nucléaire
14	bénin	Cystadénome séreux bénin	0	-	faible	nucléaire
15	bénin	kyste endométriosique	0	+		
16	bénin	fibrothécome et kyste séreux	0	-	faible	nucléaire
17	bénin	Cystadénome séreux bénin+ carcinome iléal	0	+	faible	nucléaire
18	bénin	fibrothécome	0		faible	nucléaire
19	bénin	Kyste dermoïde	0	-	faible	nucléaire
20	bénin	kyste folliculaire	0	-	faible	nucléaire
21	bénin	cystadénofibrome séreux ovarien	0	-	faible	équilibrée
22	bénin	kyste séreux		-	faible	nucléaire
23	bénin	cystadénome mucineux	0	-	fort	nucléaire
24	bénin	kyste endométriosique		-		
25	bénin	kyste endométriosique	0	-		
26	bénin	téatome mature goitre thyroïdien		-	fort	nucléaire
27	bénin	kyste endométriosique	0	-		
28	bénin	cystadénofibrome séreux ovarien		-	faible	équilibrée
29	benin	kystes endométriosiques (+mélanome)		+		
30	ovaire sain		0		nul	
31	endomètre sain	endomètre oestrogénique			faible	cytoplasmique
32	trompe saine				faible	nucléaire
33	endocol utérin malin	adénoK endocervical microinvasif + adénoK in situ			fort	cytoplasmique
34	endocol utérin sain	glandes saines sur coupe d'adénoK endocervical microinvasif + adénoK in situ			faible	nucléaire
35	estomac sain	glandes saines sur coupe d'adénocarcinome infiltrant peu différencié			faible	équilibré
36	estomac malin	adénocarcinome infiltrant peu différencié			fort	?
37	colon bénin	adénome colon			faible	équilibré
38	malin	carcinome ovarien	X			
39	malin	adénocarcinome séreux invasif	X			
40	malin	adénocarcinome séreux peu différencié	X			
41	bénin	kyste endométriosique+kyste séreux	0			
42	?					
43	?					
44	malin	carcinome ovarien	X			
45	bénin	Cystadénome séreux bénin				
46	bénin	Hydrosalpinx sans kyste ovarien	0			

Tableau III.3.1 : Récapitulatif des analyses directes MALDI (X=9744 présent et 0=absent), immunocytochimiques (ICC) et Western Blot réalisées sur 46 patientes ; 39 analyses concernent l'ovaire (malin, bénin ou sain) et 7 d'autres biopsies (colon, estomac, utérus).

Comme nous l'avons précédemment décrit dans la partie bibliographique sur le cancer, la plupart des cancers ovariens sont des cancers épithéliaux où il y a production importante d'épithélium. Or ce dernier est quasi inexistant à l'état sain ou bénin. Ainsi, dans une deuxième série d'expériences, nous avons étudié des biopsies saines et cancéreuses riches en épithélium afin de s'assurer que REG α ne pouvait pas être un marqueur de la production de ce dernier (Figure III.3.2).

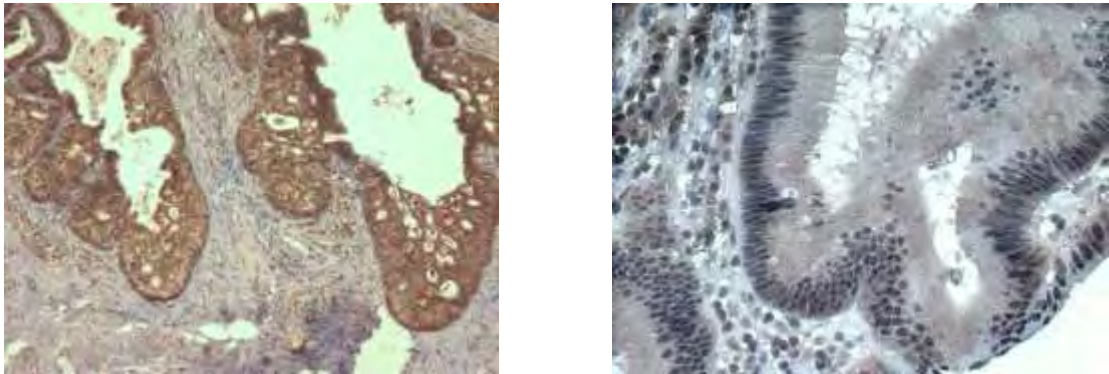


Figure III.3.2 : Marquage de REG α observé dans le cas d'un adénocarcinome de col utérin (à gauche) et plus faible marquage dans le cas d'un adénome de colon bénin (à droite) riche en épithélium.

Ainsi, si le marquage de REG α est facilement repérable dans un cancer du col utérin, ce dernier est plus faible dans le cas du colon bénin riche en épithélium. A l'inverse, un colon cancéreux aura un marquage abondant pour REG et un col utérin bénin aura un marquage plus faible. De cette manière, nous démontrons que l'augmentation du marquage de REG semble réellement en relation avec la présence de cancer dans les tissus. Cependant, cette expérience laisse penser que ce marqueur n'est pas spécifique du cancer de l'ovaire. D'autres expériences réalisées sur de l'estomac cancéreux où le marquage était fort comparé à de l'estomac sain ou le signal de la protéine était faible semblent confirmer ce résultat. L'abondance de REG α semble en tout cas être plus importante dans le cas des cancers que pour les biopsies saines ou bénignes ; il est cependant nécessaire de confirmer ces résultats par une approche plus quantitative comme le Western Blot.

Les protéines sont extraites des biopsies à l'aide d'un tampon TRIS-HCl à pH 7,4 contenant des inhibiteurs de protéases. La quantité de protéines totale de chaque échantillon a ensuite été comparée entre les extraits à l'aide d'un dosage Bradford, de manière à déposer une quantité semblable de matériel dans le gel. Les extractions sont réalisées sur 26 patientes dont 9 atteintes d'un cancer (cf Tableau III.3.1). Après migration et révélation, il apparaît ici encore que la quantité de REG α est plus importante lors des analyses des biopsies cancéreuses (puits 1, 3 et 4 par rapport au puit 2) (Figure III.3.3). Sur l'ensemble des patientes atteintes de la maladie, ce marquage positif et assez intense représente 89% des cas (8 malins positifs sur 9 : Tableau III.3.1).

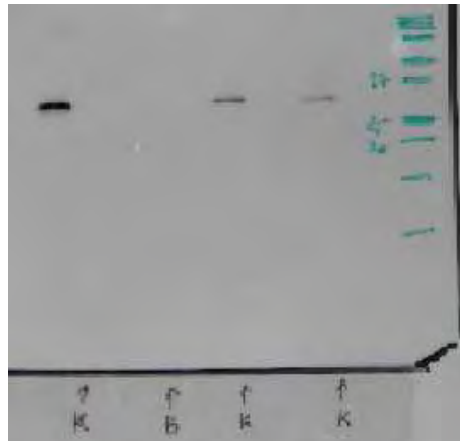


Figure III.3.3 : Western-Blot réalisés sur des extraits protéiques issus de tumeurs (puits 1, 3 et 4), par rapport à un extrait de tissu bénin (puits 2).

Dans certains cas, on observe également un marquage de REG α dans les extraits bénins, mais les intensités restent plus faibles par rapport aux extraits cancéreux. Ce résultat était en outre prévisible puisque REG α est une protéine existant à l'état basal et qui possède de plus un rôle physiologique important.

Ces westerns ne nous ont pas permis de détecter le fragment de 9744 Da repéré lors des analyses directes MALDI. Cette absence est probablement due à la migration plus délicate dans cette gamme de masse qui ne nous permet pas de visualiser ce composé sur le gel. Il est aussi possible que la sensibilité de cette technique ne soit pas suffisante pour nous permettre de l'observer ou tout simplement que l'anticorps ne reconnaisse pas la partie clivée.

L'utilisation d'un anticorps ou d'un aptamère spécifique de cette séquence pourra être envisagé par la suite.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que la protéine REG α est impliquée et plus abondante dans le cancer de l'ovaire. Elle semble être un marqueur de cancer, peut-être même de plusieurs cancers (colon ou estomac, cancers endocriniens) et pas une molécule impliquée dans la synthèse d'épithélium. Cette protéine joue le rôle d'activateur du complexe protéasome dont nous avons déjà parlé dans le cas de la maladie de Parkinson. Cet énorme complexe de 700kDa est responsable de la dégradation naturelle des protéines intracellulaires chez les eucaryotes, régulant ainsi la présence des protéines synthétisées à partir du génome (Figure III.3.4). Deux voies de dégradation sont envisageables : dans le premier système, ATP dépendant, les protéines à dégrader sont marquées par de l'ubiquitine et régulées par une protéine appelée PA700 (ou 19S).

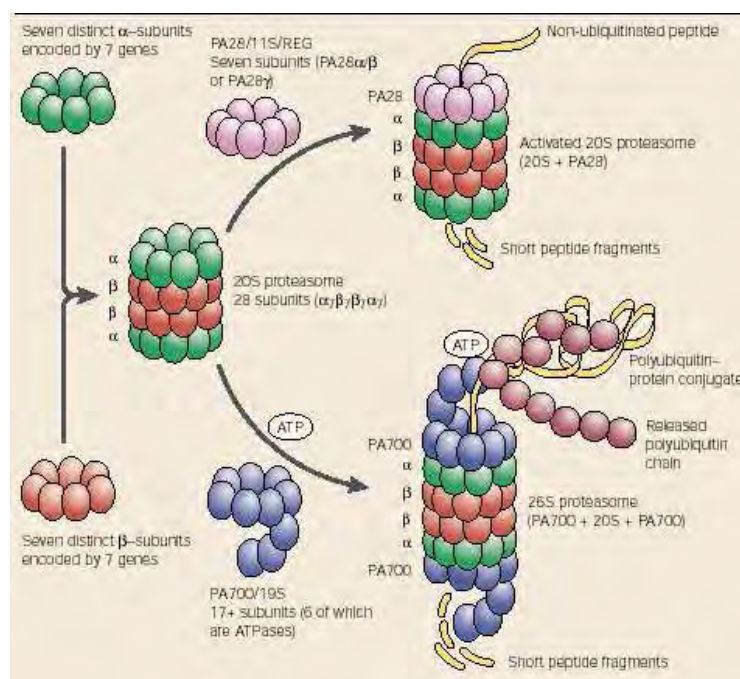


Figure III.3.4 : Composition et organisation du protéasome avec ses différents activateurs intracellulaires. (McNaught et coll, *Nature Reviews Neurosciences*, 2001).

Dans le deuxième cas, les protéines ne sont pas ubiquitinées, et les complexes activateurs sont les protéines REG (ou PA 28, ou 11S) composées de différentes sous-unités (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 régule également des facteurs de transcription comme le NF- κ B.

Le protéasome est également, dans le cas des eucaryotes supérieurs, la source principale des antigènes présentés à la surface des cellules via le CMH de classe 1 et il participe donc dans l'intégrité de la cellule et dans la réponse immunitaire. (Rechsteiner et coll, *Trends in Cell Biology*, 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, *Nat Rev Cancer*, 2004). De plus, et c'est ici la partie qui nous intéresse le plus, l'inhibition du protéasome provoque le blocage du cycle cellulaire dans les cellules normales et induit l'apoptose dans les cellules tumorales. A notre connaissance, aucun travail n'avait relié jusqu'à présent REG α et le cancer de l'ovaire. Mais quel peut-être le rôle exact de cette protéine ?

REG α étant un activateur du protéasome, une augmentation de cette protéine dans les cancers pourrait empêcher l'apoptose des cellules malades. Néanmoins des études ont montré que PA 28 α empêchait la prolifération excessive des cellules du système vasculaire humain (Faries et coll, *Inter. Journ of Vasc Surg*, 2001). Ainsi, l'apparition d'un fragment de REG dans les tumeurs est-elle due à une augmentation de cette protéine permettant de ralentir la prolifération tumorale par l'activation du protéasome ? Au contraire, y a-t-il une augmentation pour bloquer les phénomènes d'apoptose ? Ou encore y a-t-il coupure de PA28 α pour inactiver le protéasome et un rétrocontrôle négatif (surproduction de la protéine) pour compenser cet effet ? Curieusement, ce clivage se produit aux endroits de fixation de REG avec le protéasome, ce qui laisse suggérer que l'activation du complexe n'est plus viable une fois le clivage effectué.

Des expériences sur des cultures cellulaires tumorales ovariennes ou des animaux modèles simulant la maladie peuvent ainsi être envisagées par la suite pour tenter de comprendre certains mécanismes. Des injections de PA28 α au sein des tumeurs pourraient être réalisées pour savoir si la protéine favorise ou réduit la croissance tumorale via le protéasome, ou à l'inverse l'utilisation d'inhibiteurs REG. Ces expériences sont également valables du point de vue génétique avec l'utilisation de RNAi ou d'animaux KO. Il peut être

aussi envisagé d'étudier l'action du fragment de REG administré à des animaux pour voir si ce dernier est un simple résidu de la protéine ou s'il possède un rôle biologique.

Une autre voie d'étude peut être de suivre l'évolution du biomarqueur au sein de la tumeur après administration d'anti cancéreux et de drogues.

4. Conclusion

Les études réalisées à partir 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) ont permis de mettre 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 α qui est un activateur puissant 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 α n'avait encore jamais été décrit comme impliqué dans le cancer de l'ovaire.

Des études immunohistologiques laissent apparaître une augmentation de cette protéine dans les biopsies tumorales, avec une localisation parfois plus cytoplasmique que nucléaire comme c'est le cas dans les tissus bénins. Ces résultats ont tous été validés par une équipe d'anatomopathologistes (Dr Farine, Hopital Jeanne de Flandre, Lille). Des immunohistochimies sur d'autres tissus cancéreux (colon ou estomac) positifs eux aussi, laissent penser que ce marqueur n'est pas spécifique de l'ovaire, mais reste cependant un marqueur de la présence de cancer ; il ne semble pas être un marqueur de la production d'épithélium. Des expériences de Western-Blot ont confirmé cette augmentation de REG dans le cas des cancers par rapport à des kystes bénins.

Ainsi, le fragment détecté lors d'analyses directes semble être le résultat d'une augmentation de la quantité de REG α dans les tumeurs malignes. Nos expériences ne nous permettent pas de savoir pour le moment le rôle de PA28 α dans le cancer : rôle de prolifération, rôle protecteur ou action sur le cycle cellulaire ; de nombreuses questions restent en suspens.

Des informations pourront probablement être obtenues grâce à l'étude sur des modèles animaux et aussi en réalisant la carte de co-localisation du peptide de masse 9744 et de la protéine entière par approche Tag-Mass.

La technologie d'imagerie MALDI ayant permis de découvrir cette molécule dans le cancer de l'ovaire pour des stades III et IV, elle peut être ensuite appliquée pour des stades plus précoces afin de commencer une étude pour le diagnostic de cette maladie. Ce travail pourra être mené en parallèle à l'étude du sang, afin de savoir si l'activateur du protéasome ou ses métabolites sont présents dans le sang des patientes cancéreuses, sachant que REG a une action bénéfique sur le système vasculaire.

Le marqueur pourra aussi être recherché par spectrométrie de masse dans les tissus fixés et paraffinés selon une approche semblable à celle de la publication N°3 pour une étude sur un plus grand nombre d'échantillons.

Conclusion générale

L'analyse directe et l'imagerie par spectrométrie de masse sont des technologies prometteuses permettant la localisation simultanée de nombreux composés en une seule analyse. Chaque composant de l'imagerie possède ses avantages propres ; pour le DESI, la possibilité d'étudier des composés *in vivo* en temps réel ; pour le SIMS, la réalisation d'images au niveau sub-cellulaire, particulièrement utile pour l'imagerie des lipides et des drogues. Le MALDI quant à lui, offre la possibilité de détecter des protéines de masse relativement importante directement dans le tissu, permettant la réalisation de « profiling » pour la recherche de biomarqueurs potentiels sans extraction préalable ni traitement délicat de l'échantillon. Des expériences d'imagerie sur parfois près d'une centaine de protéines peuvent ainsi être réalisées.

Cette technologie étant à ses débuts, de nombreux développements restent à réaliser. La première partie concerne la préparation d'échantillons avec notamment la recherche de nouvelles matrices plus adaptées à l'analyse des tissus et à l'acquisition d'images. Dans nos études, les matrices ioniques et principalement HCCA/ANI se révèlent être un outil intéressant en terme d'intensité des signaux obtenus et de qualité spectrale (accès plus facile au mode réflecteur), de couverture de la matrice sur la coupe, de stabilité sous vide, et surtout de faible ablation de matériel sous irradiation laser à haute fréquence, ouvrant l'accès à des acquisitions d'images à haut débit. Pour l'instant, ces matrices sont surtout utilisables dans la gamme de masse des peptides, et des travaux concernant la recherche de nouvelles matrices pour l'amélioration des signaux des protéines sont actuellement en cours.

La technique d'imagerie idéale, que nous espérons pouvoir utiliser un jour, doit être capable de travailler sur tous les types de tissus, qu'ils soient jeunes, vieux ou abîmés. Une partie de nos études s'est axée sur l'amélioration des signaux grâce à l'utilisation de solvants organiques. Ces derniers, notamment chloroforme et xylène, permettent de retrouver des signaux perdus en imagerie par de mauvaises conditions de stockage ou des temps de conservation trop longs. Leur principe est basé sur l'extraction des lipides du tissu, permettant un meilleur accès de la matrice dans la coupe. Ces travaux nous amènent à nous interroger sur les processus se déroulant lors du vieillissement de ces derniers et les conditions de stockage optimales qui pourraient être envisagées (conservation sous vide, sous atmosphère inerte etc.). Cependant, ces traitements ne sont utilisables que sur des tissus congelés, ces derniers étant la source unique de toutes les analyses sur tissus par spectrométrie de masse.

Une troisième partie de nos études s'est donc axée sur la possibilité de travailler sur des tissus fixés et paraffinés tels que ceux utilisés classiquement dans les bibliothèques des anatomopathologistes. L'analyse de ces types de tissus permettrait de réaliser des études rétrospectives sur un grand nombre d'années, et ainsi augmenter le nombre de biopsies

analysables pour des recherches ou des confirmations de biomarqueurs. Ces biopsies sont, de plus, classées suivant leur type histologique, ce qui permettrait de réaliser des études de « profiling » sur des échantillons comparables du point de vue médical. Nous avons développé deux types d'approches permettant de résoudre cette problématique ; la première est basée sur l'utilisation d'une matrice réactive, la 2,4 DNP, qui permet d'analyser avec succès des tissus fixés depuis moins de 6 mois. Cependant, la fixation au paraformaldehyde étant un processus actif continuant au cours du temps, il est nécessaire d'utiliser une deuxième méthode axée sur une digestion enzymatique afin d'obtenir des signaux lors d'analyse de biopsies fixées depuis des temps plus longs. Des expériences de MS/MS sont alors réalisables sur ces échantillons soit par MS/MS in situ (MALDI-TOF/TOF), soit après séparation des composés par HPLC et séquençage automatique en mode data dépendant sur une trappe d'ions. En couplant la digestion trypsique et un spotter automatique ayant une grande précision, nous sommes parvenus à réaliser des images de la localisation de plusieurs protéines sur ces tissus, permettant donc la co-localisation de plusieurs protéines en une seule analyse. Cette étude est à notre connaissance la première utilisant la spectrométrie de masse MALDI sur ce genre de tissus. Des études de « profiling » réalisées sur quelques cerveaux de rats traités au 6-OHDA simulant la maladie de Parkinson, (comparés à des cerveaux de rat témoins) nous ont permis de repérer et d'identifier quelques biomarqueurs connus dans cette pathologie et notamment le neurofilament M. Cette étude semble démontrer que la recherche de composés régulés sur des coupes fixées au PAF est possible en utilisant conjointement l'analyse directe MALDI et l'identification LC-trappe.

Par la suite, de nombreux tests pourront être réalisés pour améliorer la détection dans ce nouveau champ d'application. Plusieurs axes de recherches peuvent être envisagés, comme celui d'utiliser un instrument doté d'un « ion mobility » donnant l'accès à des cartographies peptidiques/protéiques à plusieurs dimensions ou l'apport d'un analyseur ayant une très haute résolution (FTICR). L'utilisation des matrices ioniques peut aussi être envisagée.

Dans l'optique de réaliser des études plus fondamentales en biologie ou dans la recherche d'un diagnostic plus précoce en médecine, nous avons développé un nouveau concept appelé Tag-Mass, basé sur la détection indirecte d'un composé relargué après photoclivage sous UV de la molécule. Par cette technique, il est possible de détecter spécifiquement sur tissus des molécules de haut poids moléculaire, inaccessibles jusqu'à présent en imagerie MALDI, telles que les ARNm, les ADN et des protéines de plusieurs centaines de kilodaltons.

Ainsi, nous sommes parvenus dans cette étude à localiser l'ARNm de la proenképhaline à partir d'une sonde de 414 pbases « taggées », et la Carboxypeptidase D, une protéine transmembranaire de 180 kDa grâce à l'utilisation d'un anticorps marqué par un Tag.

Ce développement ouvre donc la voie de l'imagerie spécifique, et, avec l'utilisation de plusieurs Tag sur une même coupe, permettrait la réalisation de cartes de co-localisation telles que ARNm/protéines, protéines/peptides, protéines/drogues etc. La sensibilité de cette technique semble meilleure que des révélations classiques au DAB, mais probablement inférieure aux techniques de fluorescence. L'avantage majeur réside dans la possibilité de réaliser des multi-localisations de composés en une seule analyse, avec peut-être prochainement la répartition sur un tissu d'une dizaine de composés en une seule analyse...

Cette approche peut aussi être envisagée pour des analyses semi-quantitatives sur tissus.

Plusieurs développements dans ce domaine restent encore à réaliser ; la possibilité d'utiliser les matrices ioniques pour l'imagerie Tag-mass est actuellement à l'étude et pourrait permettre d'améliorer la qualité des images et l'accès sans dégradation majeure de la matrice à des acquisitions plus rapides sur tissus. Des études peuvent être menées sur des tissus fixés pour appliquer la technologie Tag-Mass à des biopsies conservées dans les bibliothèques. De plus, l'imagerie des sucres avec des lectines taggées ou de n'importe quelle autre molécule avec des aptamères marqués est parfaitement envisageable et permettrait d'obtenir des images uniques dans ce domaine. Ces images devraient être réalisables en mode MS/MS permettant une reconstruction des images encore plus spécifique.

Des tags couplés avec une matrice MALDI permettraient quant à eux d'éliminer tout risque de délocalisation.

Cette technologie pourra par la suite être appliquée à l'imagerie SIMS, où une liaison du tag serait cassée par le faisceau d'ions primaires offrant ainsi la possibilité de détecter tous les types de molécules, y compris les protéines. Cette approche est aussi envisageable en MALDI IR.

Appliquée au cancer de l'ovaire, la technique d'analyse directe et par extension d'imagerie MALDI sur tissus nous a révélé la présence d'un peptide de masse 9744 Da dans des biopsies tumorales, identifié comme appartenant à la protéine REG α (ou PA28 α), un activateur du protéasome. Ces travaux, réalisés en partenariat avec des gynécologues et des anatomopathologistes, ont permis de valider par approche immunologique l'augmentation de PA28 α dans les tumeurs (approche Western-Blot et immunohistologique). Même si le protéasome et REG ont déjà été décrits dans d'autres pathologies, - et notamment tumorales -, c'est la première fois que cette PA28 apparaît impliquée dans le cancer de l'ovaire. Cette

molécule est peut être impliquée dans d'autres tumeurs (estomac ou colon) laissant penser que celle-ci n'est peut être pas spécifique du cancer de l'ovaire, mais corrélée à la présence de tumeur maligne dans la biopsie.

Le rôle de cette protéine est encore à découvrir, afin de déterminer si son action est bénéfique ou au contraire, participe à la prolifération des cellules. De futures expériences sur des modèles animaux ou des cellules peuvent prétendre répondre à certaines de ces questions. L'étude des transcrits peut également nous fournir des informations précieuses et paraît importante pour un éventuel dépistage précoce de la maladie. Ce dépistage nécessite l'analyse de biopsies de stades I et II, afin de vérifier la présence de REG et son augmentation dans ces stades plus jeunes de la maladie. Cette étude pourra être réalisée sur des tissus fixés afin d'assurer un nombre de biopsies conséquent.

L'apport du Tag-Mass au cancer de l'ovaire permettrait de co-localiser le peptide de masse 9744, avec la protéine native ; il convient de s'assurer en premier lieu que l'anticorps CTER anti REG ne reconnaît évidemment pas le peptide 9744 seul.

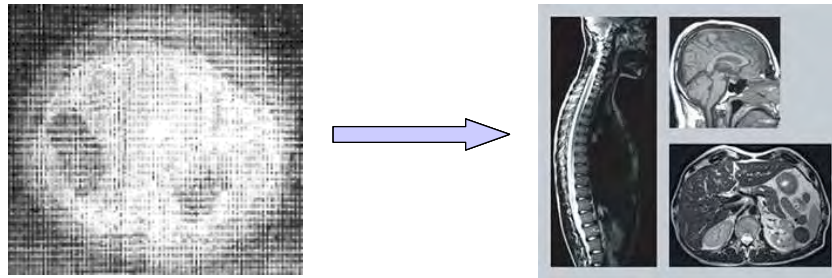
Du point de vue appareillage, des perspectives en imagerie MALDI peuvent se situer dans l'utilisation de source IR qui utilise des matrices plus compatibles avec les conditions biologiques. Des expériences réalisées sur des tissus avec Klaus Dreisewerd à Munster, nous ont déjà permis d'obtenir des résultats intéressants en utilisant du glycérol et un spectromètre doté d'un TOF orthogonal assurant une très bonne précision en masse. Certains résultats laissent penser que des composés de la coupe peuvent être détectés sans même l'utilisation de matrice.

Plusieurs utilisations sont donc possibles pour l'imagerie MALDI, mais plusieurs voies peuvent aussi être empruntées : le profilage sur tissu doit-il être utilisé pour obtenir une grande série de profils sans validation supplémentaire tel qu'il a été fait pour le SELDI au départ ? Est-elle une solution de « démélage » des biomarqueurs ou une méthode de validation de ces derniers déterminés par une autre technique ?

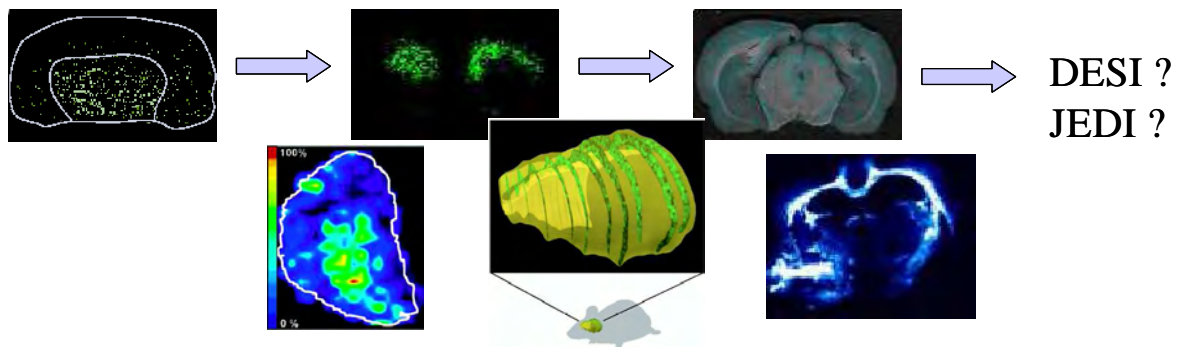
Les développements actuels en imagerie MALDI et l'ensemble des perspectives dans ce domaine permettront peut être un jour à l'IMS de connaître le succès de son homologue médical qu'est l'IRM. (Figure 4)

Ceci implique que l'imagerie MALDI « de recherche » soit introduite comme technique d'imagerie moléculaire en diagnostic dans les hôpitaux à partir d'un prélèvement (imagerie clinique ou pathologique). Cet outil peut trouver son intérêt dans le cas des tumeurs frontières qui sont parfois difficiles à classer pour les anatomopathologistes, ou pour le chirurgien afin de différencier les parties tumorales des parties saines pendant une opération. Ce genre

d'utilisation sera probablement facilitée par l'introduction de source compatible avec l'analyse *in vivo* à pression atmosphérique telle que le DESI, qui de plus est de structure plus compacte que MALDI ou SIMS. Ce type de source doté d'un spray plus fin (JEDI) permettra probablement l'accès à des molécules de masses plus élevées avec une résolution plus fine. L'accès facile à la MS/MS par le DESI pourrait être une clef supplémentaire pour ce genre d'application.



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



L'imagerie MALDI de 2001 à 2006...

Tout comme Lavoisier ou Galilée il y a quelques siècles, les chercheurs d'aujourd'hui continuent à élaborer des théories et des explications à partir de leur capacité d'observation et de synthèse face à une réaction qui se déroule sous leurs yeux. La différence majeure réside dans les outils utilisés pour ces études. Ces derniers appellent à une amélioration constante, pour participer à une meilleure compréhension des mécanismes biologiques complexes, compréhension primordiale pour le développement de nouveaux traitements pour vaincre des maladies telles que le cancer.

PARTIE EXPERIMENTALE

1) Matrices Ioniques

1.1 : Synthèse des matrices ioniques

Les conditions de synthèses des matrices ioniques sont réunies dans la publication d'analyse directe et d'imagerie par spectrométrie de masse (publication n°1). On distingue deux types de synthèse, une synthèse dite classique ou la matrice MALDI (généralement 50 ou 100mg) est dissoute dans du méthanol (20mL) et agitée à température ambiante pendant quelques heures après ajout de la base en proportion équimolaire. Le solvant est ensuite évaporé au rotavapor et la matrice ionique obtenue peut être utilisée après sa dissolution dans un mélange ACN/H₂O (2/1 v/v, 0,1% TFA).

La deuxième voie décrite par l'équipe de A Tholey (Moghaddam et coll, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**) consiste à dissoudre la matrice acide (10mg/mL) directement dans la solution ACN/H₂O et de rajouter la base organique. La quantité de base peut être équimolaire, mais peut aussi être augmentée jusqu'à 1.5 eq permettant une meilleure cristallisation de la matrice sur le tissu (publication n°2).

Ces matrices ont été comparées aux matrices MALDI classiquement utilisées (ou on ionique) : HCCA (10mg/mL, ACN/H₂O (2/1 v/v, 0,1% TFA)), SA (20mg/mL, ACN/H₂O (2/1 v/v, 0,1% TFA)) ou DHB, (10mg/mL, ACN/H₂O (1/2 v/v, 0,1% TFA) ou DNPH (4mg/mL ACN/H₂O (2/1 v/v, 0,1% TFA)).

1.2 : Matrices ioniques en préséptées

Les synthèses ont été en général réalisées avec le protocole de Tholey et coll, hormis pour la synthèse d'HCCA/PA.

0,5µl de matrice (10mg/mL dans ACN/H₂O 2/1 V/V 0,1% TFA) est déposée sur plaque MALDI et laissée cristallisée à température ambiante. 0,5µl/1µL de solution est ensuite déposée sur le dépôt jusqu'à séchage complet.

Dans le cas de l'étude des dépôts sur trois mois, une solution de standards composés de SbP (1pmol/µL), ACTH 18-39 (1pmol/µL) et ubiquitine bovine (2pmol/µL) a été utilisée (dépôt de 1µL de la solution finale) sur les matrices préseptées. La plaque MALDI a été conservée à température ambiante à l'abri de la lumière.

Les expériences sur la BSA ont été réalisées à partir d'une solution à 5pmol/µL dans l'eau.

1.3 : Préparation des tissus

Des rats Wistar, de masse comprise entre 250 et 350g ont été utilisés dans nos différentes études ; pour les injections au 6-OHDA, les animaux ont été anesthésiés avec du pentobarbital (50mg/kg) et perfusés pendant 8 minutes avec du 6-OHDA (8µg dans 4µL de sérum physiologique et 0,05% d'acide ascorbique) au coordonnées A=-3,8mm, L=1,5mm, H=-8,5mm.

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation, et les principaux organes (notamment le cerveau) ont été prélevés puis stockés à -80°C.

Des coupes de 15-20µm ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat et déposées directement sur plaque MALDI. Après séchage de 5 minutes à température ambiante, la matrice MALDI est appliquée sur la section en utilisant une micropipette.

Pour l'application à l'aide du microspotter, les conditions sont résumées dans la publication N°3.

Dans le cas de l'étude sur des tissus fixés et paraffinés, les protocoles utilisés sont ceux décrits dans la publication n°3. Brièvement, la paraffine est éliminée par des bains successifs de 5' dans le xylène ou le toluène, puis légèrement réhydratée avec des bains d'éthanol à 100%, 96% et 70%.

Après séchage, la trypsine (0,1µg/µL ou 0,033µg/µL dans tampon bicarbonate) est appliquée à l'aide d'une micropipette ou du spotter automatique. Pour le profiling, les tissus sont rincés à l'éthanol 70% pour éliminer l'excès du digest. Pour l'imagerie, cette étape n'est pas réalisée pour limiter les phénomènes de délocalisation.

1.4 : Analyses MALDI :

Les spectres MALDI ont été obtenus sur un Voyager DE STR (Applied, biosystem, Framingham, USA) doté d'un laser pulsé et d'un délai d'extraction.

En mode linéaire, les paramètres étaient : accélération, 20kV, Grid, 94%, Gwire, 0,05%, DE 200ns.

En mode réflecteur, les paramètres étaient : accélération, 20kV, Grid, 75%, Gwire, 0,05%, DE 200ns.

Pour les analyses sur tissus, les mêmes paramètres sont utilisés hormis pour l'accélération qui est réglée à 25kV. (cf publication n°1)

2) Rincages des coupes

Les protocoles utilisés sont résumés dans la publication N°2 ; les tissus sont rincés par les différents solvants en inclinant la plaque MALDI où on a été déposées les sections.

Les identifications des lipides ont été réalisées sur nanoESI-QTOF (QSTAR applied biosystem) en mode MS/MS ou en ion précurseur pour détecter les différentes familles.

3) Identification des protéines des tissus fixés et paraffinés (Publication N°3)

Les peptides sont digérés sur le tissu à la trypsine (0,1µg/µL) et extraits à l'aide d'un tampon TRIS ou par rinçage à l'éthanol ou encore à l'eau MQ. L'échantillon est déssalé sur ZipTip selon le protocole du fabricant et élué avec 80% d'ACN/ H₂O (TFA 0,1%). Après lyophilisation les échantillons sont repris dans 50µL d'H₂O AF 0,1%.

Les séparations sont réalisées sur nanoLC/trappe (LCQ thermofinigan) couplée à une colonne C18 Dionex (150 x 75µm x 3µm x 100Å) ; les peptides sont élués avec un gradient d'ACN/H₂O AF 0,1% à 1% par minutes pendant 70 minutes avec un débit de 200nL/min.

Le LCQ est réglé sur le mode « data dependant » ou un scan MS est suivi d'un scan MS/MS sur l'ion majoritaire.

L'énergie de collision était réglée à 35%, la température du capillaire de 160°C et la tension aux bornes du cône 1.5kV.

Pour la dérivation sur tissu au SPITC, le protocole suivant a été utilisé : après digestion du tissu et rinçage de la coupe à l'éthanol 70%, 20µL d'une solution H₂O/Pyridine (1/1 v/v) est appliquée sur la coupe complétée par 20µL d'une solution de SPITC à 1mg dans 200µL d'éthanol/pyridine/H₂O (1/1/2). La coupe est placée à 50°C pendant 30 minutes et de la solution ethanol/H₂O/pyridine est rajouté pendant la réaction pour maintenir un volume de réactif sur la coupe.

La coupe est laissée séchée à l'étuve puis rapidement rincée à l'éthanol 80% avant ajout de matrice.

4) Tag-Mass (cf Publication N°4)

Les synthèses des Tags ont été réalisées par la société Eurogentec (Liège Belgique) ; les protocoles sont réunis Publication 4 (additional materials).

Les sondes ADNc ont été préparées à partir d'ARNm extraits du cerveau de rat au trizol. Les ARNm sont traités à la DNase pour empêcher les amplifications d'ADN génomique lors de la réaction de RT-PCR. Cette dernière est réalisée sur un fragment de la proenkephaline (414pb) en utilisant les primers CAGGACTCCCCAAAGGAGAACAGGA (gauche) et GACGTACCAGGCGGTAGCTGCATTT. Le mix de PCR (50µL) était constitué de 1µL de chaque primer (20pmol), 2µL de cDNA, et 0,2µL Taq polymérase. Les conditions d'amplifications sont classiques (94°C, 60°C (hybridation), 72°C). L'ADN amplifié est ensuite purifié sur colonne de silice (Proméga) selon le protocole du fabricant. Pour le primer taggé, la PCR est réalisée en utilisant cette molécule à la place des primers habituels. Pour l'UTP tag, cette dernière est utilisée en mix avec du dTTP en proportion 1/3 (Tag/dTTP). Le témoin positif est réalisé à partir du même ADN amplifié mais marqué à la digoxigénine (DIG) selon le protocole Roche pour produits PCR.

Les protocoles HIS et ICC sont décrits Publication n°4.

5) Cancer de l'ovaire

5.1 : Nature et préparation des prélèvements biologiques

Pour chaque patiente, 4 prélèvements biologiques ont été réalisés :

- sang hépariné
- sang non hépariné
- biopsie ovarienne
- liquide d'ascite. En l'absence d'ascite on prélève un liquide de lavage péritonéal au sérum physiologique.

Les échantillons sont ensuite transportés dans un compartiment à 4°C jusqu'au laboratoire et les prélèvements ovariens sont alors placés à -80°C. Immédiatement avant analyse MALDI on réalise des coupes d'ovaire (15µm) au cryostat à -20°C. (cf partie préparation des tissus pour l'imagerie ou l'analyse directe)

Le sang subit une centrifugation (1500g, 10', 4°C) permettant de séparer sérum ou plasma des globules rouges. Les surnageants sont aliquotés par 200µL et stockés à -80°C.

Les liquides d'ascite ou de lavage péritonéal sont directement aliquotés par 500µL dans des tubes de 1.5mL. En cas de présence de sang dans l'échantillon ; une centrifugation (1500g, 10', 4°C) est réalisée pour éliminer les globules rouges et les liquides ovariens sont stockés à -80°C.

5.2 : Extraction des peptides des liquides biologiques (cas du sérum)

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

La fraction peptidique est purifiée sur une mini cartouche SPE C18 (Machery Nagel) de 10mg. 2 éluions de 10% puis de 60% d'ACN/H₂O TFA 0,1% sont réalisées pour préfractionner les peptides. Les solutions d'extractions sont lyophilisées et reprises dans 50µL d'H₂O pour analyse.

5.3 : Extraction des peptides à partir de biospies

400mg d'échantillon solide conservé à -80°C est pesé puis broyé à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide. La poudre obtenue est reprise dans de 5mL d'HCl 1N et le mortier est rincé avec la solution d'extraction ; le tout est versé dans un tube de 20mL et centrifugé à 8000g pendant 30' à 4°C. Les peptides contenus dans le surnageant sont purifiés sur cartouche C18 (seppack C18, 2g) puis élués avec des solutions de 10%, 40%, et 100% d'ACN/H₂O TFA 0,1%.

Après lyophilisation des fractions, les protéines sont reprises dans 400µL d'H₂O pour analyse ou séparation HPLC.

5.4 : Conditions chromatographiques préparatives

Les HPLC préparatives ont été réalisées sur une chaîne HPLC Beckman couplée à une barrette de diode. Les longueurs d'ondes de détection ont été réglées à 220nm (longueur d'onde de détection des liaisons peptidiques) et 440nm (cycles aromatiques). La séparation a été effectuée sur colonne Interchim C18, (4,6mm x 15 x 3,5µm) avec un gradient d'ACN 0,1% TFA à 1% par minute, un débit de 0,5mL/min et après injection de 200µL de solution. La collecte des fractions est réalisée toute les minutes, puis les échantillons sont lyophilisés avant reprise dans 50µL d'eau pour analyse.

5.5 : Western Blot

Electrophorèse en gel de polyacrylamide

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'acrylamide.

- Gel de séparation (12% acrylamide) : Acrylamide 40%-Bisacrylamide 0.8% / Tris HCl 4X pH 8.8 / H₂O. La polymérisation de l'acrylamide est catalysée par l'ammonium persulfate 10% (w/v) et le Temed (N,N,N,N'-tétra-méthyl-éthylènediamide) ajoutés extemporanément.
- Gel de concentration (3.9% acrylamide) : préparé comme précédemment.

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

- Les protéines déposées sont les protéines dénaturées. (i.e. la solution [surnageant d'extraction + tampon dénaturant de Laemmli]).
- 5 échantillons de protéines sont déposés par gel, laissant un puit libre entre chaque dépôt : 1 marqueur de poids moléculaire et 4 échantillons de protéines (correspondant à 4 biopsies ovariennes différentes).
- L'équivalent de 18 µg en protéines totales est déposé dans chaque puit.

La migration des protéines en SDS-PAGE est réalisée dans un tampon de migration Tris/Glycine /SDS (2mM / 129mM/0.1%w/v pH 8.3), à température ambiante. La tension appliquée pendant les premières 15 minutes est de 80 V avant d'être augmentée à 180 V pendant 60 minutes (la migration sera surveillée et le gel est arrêté lorsque le front de migration atteint le bas du gel).

Transfert sur membrane de nitrocellulose

L'électrophorèse terminée, les gels et les membranes de nitrocellulose sont équilibrés pendant 30 minutes dans un bain de tampon de transfert réfrigéré à 10°C, sous agitation douce.

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

Incubation avec l'Ac primaire et secondaire

Avant incubation avec l'Ac primaire, la membrane est saturée par un bain de PBS-Lait 5% pendant 45 minutes, à température ambiante et sous agitation douce. Cette étape permet de saturer les sites d'interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps.

La membrane est alors mise en contact avec l'Ac primaire (Cterm) dilué au 1/250^o dans du PBS-Lait 5% (5g de lait/ 100mL PBS), toute la nuit (18 heures) à 4°C et sous agitation douce.

Le lendemain, la membrane est rincée trois fois 5 minutes dans un volume de PBS-Tween 0.05%, puis elle est alors incubée avec l'Ac secondaire, dilué au 1/5000^o dans une solution de PBS-Lait 5%, pendant une heure à température ambiante et sous agitation douce. La membrane est alors rincée deux fois 5 minutes dans un volume de PBS puis 5 minutes dans un tampon phosphate.

Révélation

Les protéines sont maintenant marquées spécifiquement et peuvent être révélées par le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique.

La membrane est mise au contact du luminol pendant une minute : par bain dans un mélange des solutions 1 et 2 du kit ECL dans une proportion de 1/1.

La membrane est ensuite mise en contact avec un film radiographique en chambre noire, puis séchés et annotés.

TRAVAUX COMPLEMENTAIRES

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

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

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

Résumé

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

* pour la correspondance

Abstract

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

Introduction

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

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

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

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

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

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

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

Développement

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

1. Supports conducteurs transparents

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

2. Préparation de l'échantillon et digestion trypsique.

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

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

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

3. La matrice

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

4. Le dépôt de matrice

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

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

Perspectives

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

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

Conclusion

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

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

Remerciements

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

Bibliographie

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

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

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

Légendes des figures

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

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

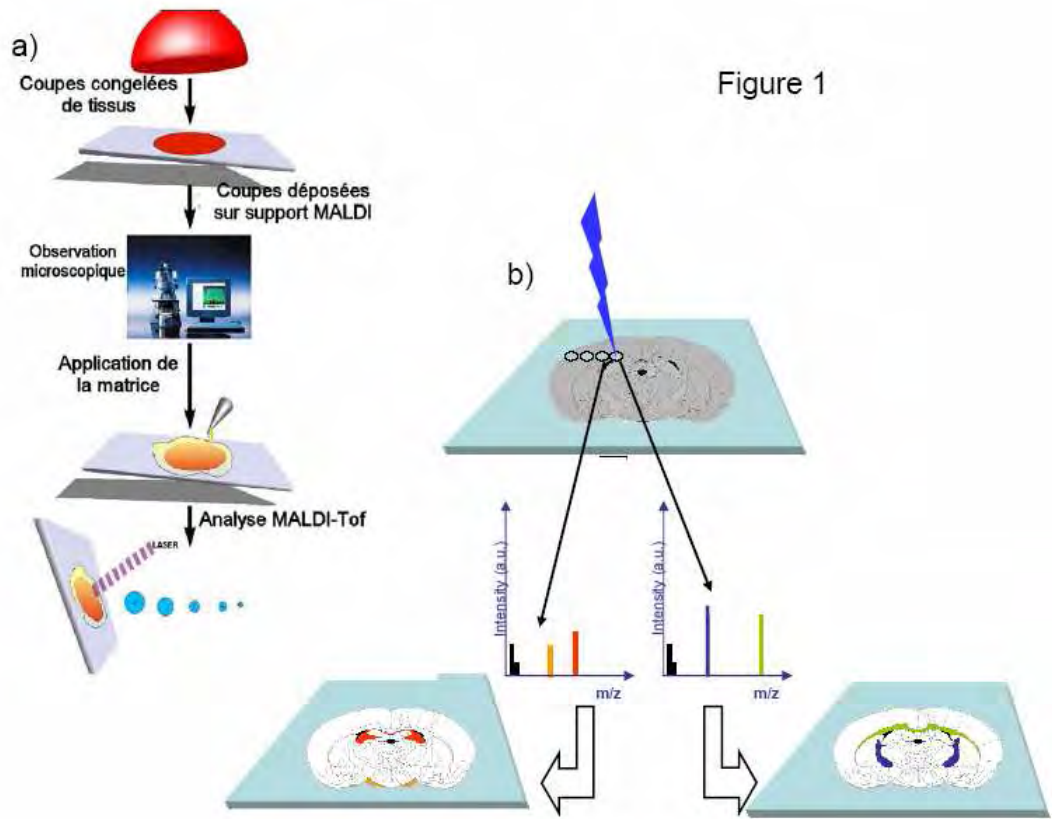
Figure 2 : a) Image par microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue déposée sur une lame conductrice recouverte de nickel. b) Analyse directe de la coupe en mode réflecteur. c) Mode PSD de l'ion m/z 861.7

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

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

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

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



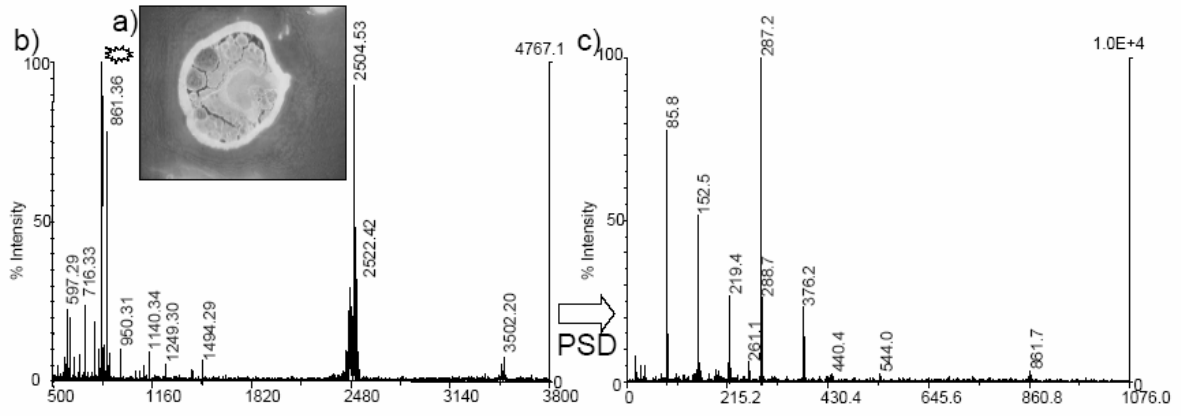


Figure 2:

Figure 3:

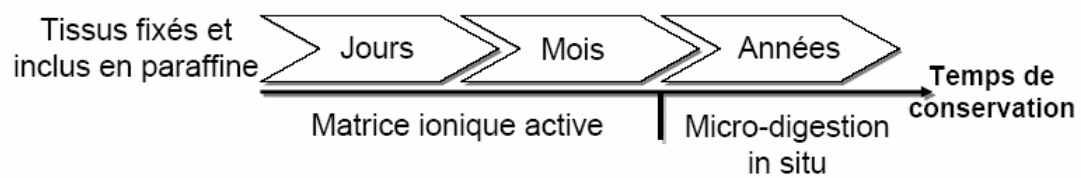


Figure 4

a) Mode positif



b) Mode négatif

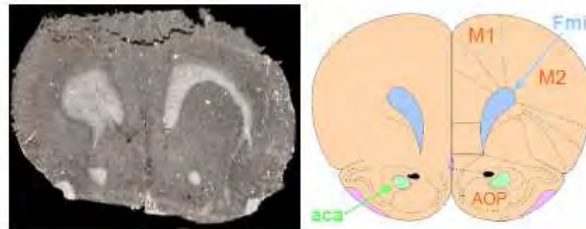
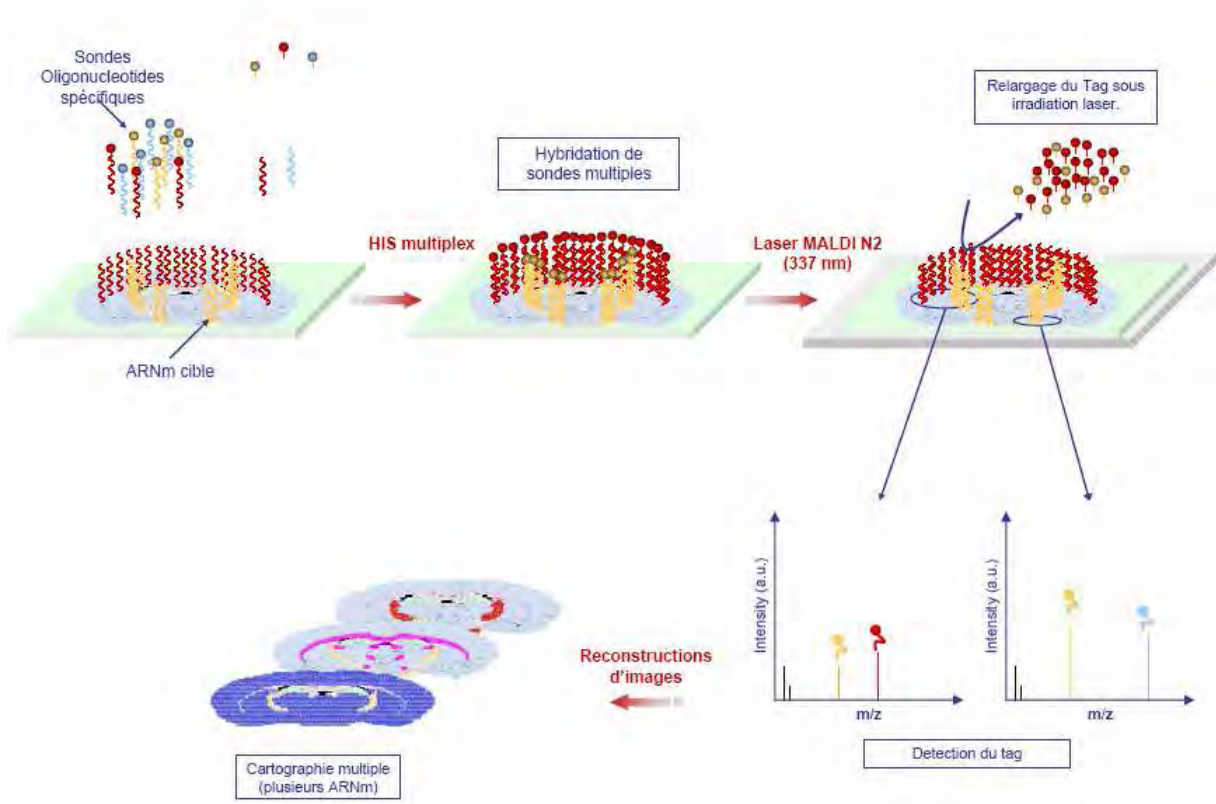
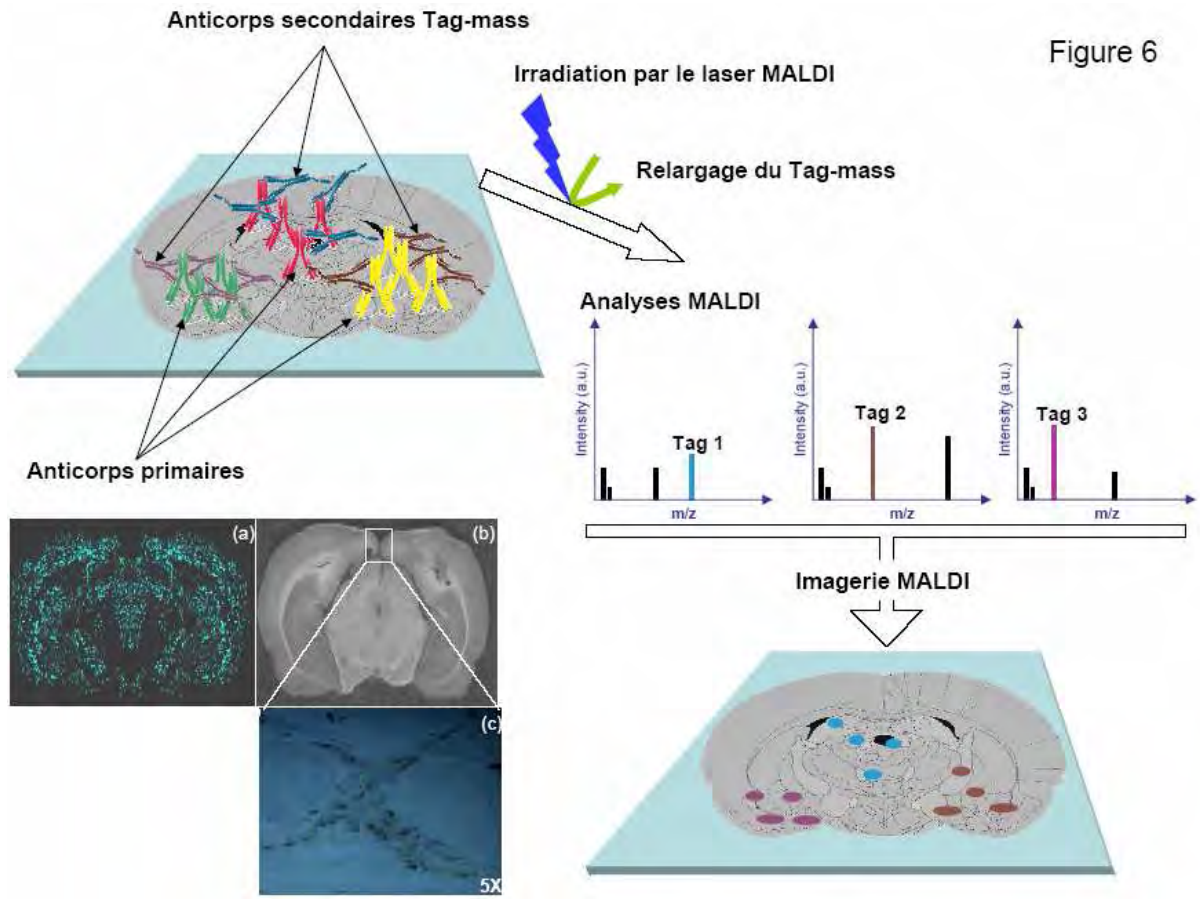


Figure 5:





MALDI-O-TOF experiments (en cours)

**Molecular Profiling of Native and Matrix-Coated Tissue Slices from Rat Brain by
Infrared and Ultraviolet Laser Desorption/Ionization Orthogonal-Time-of-Flight Mass
Spectrometry**

Klaus Dreisewerd,[†] Remi Lemaire,[‡] Michel Salzet,[‡] Maxence Wisztorski,[‡] Stefan
Berkenkamp,[¶] Isabelle Fournier.[‡]

[†] Institute of Medical Physics and Biophysics, Westfälische Wilhelms-Universität Münster,
Germany

[¶] Sequenom GmbH, Hamburg, Germany

[‡] *Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Université des Sciences et Technologies de
Lille, France*

Keywords:

Running Title: IR-LDI- and UV-/IR-MALDI-o-TOF-MS profiling of rat brain tissue

Address reprint requests to: Dr. Klaus Dreisewerd, Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Münster, Robert-Koch-Str. 31,
D-48149 Münster; email: dreisew@uni-muenster.de

Abstract: Phospholipids and glycosphingolipids (sulfatides, cerebroside, gangliosides) contained in the plasma membrane of neuronal tissue were profiled by direct infrared laser desorption/ionization orthogonal time-of-flight mass spectrometry (IR-LDI-o-TOF-MS), performed on cryosected native slices generated from rat brain. Spraying of potassium acetate onto the slices was found to facilitate data interpretation in positive ion mode by suppression of sodium adduct ions. The high mass resolving power of the instrument of ~10,000 (FWHM) along with an accuracy of the analysis in the low 10 ppm range allows a putative identification of the lipids and differentiation of variations in the fatty acid residues based on their molecular weight. Moreover standard histology glass slides can be used as substrates without degrading the mass accuracy of the analysis. Resolving power and mass accuracy are also independent of the laser wavelength and thickness of the tissue slices. Coating the slices with matrix and using an ultraviolet (UV-) laser for matrix-assisted laser desorption/ionization (UV-MALDI)-o-TOF mass spectrometry extends the analysis to peptides and small proteins with molecular weights ranging from several hundred to well above 10,000 Da. Tryptic digest peptides and partially-cleaved proteins were recorded after incubation of native sections with enzyme and subsequent coating of the slices with MALDI matrix.

INTRODUCTION

Molecular profiling and spatially-resolved molecular imaging of biological tissue by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS) has recently found a wide research interest,^{1,2} for example to identify biological markers or for differential analysis studies.³ In its simplest form MALDI-MS profiling can allow a rapid analysis: simple mixing of a tissue (micro-) section with a suitable matrix can generate a profile of the major peptide/protein content, for example of neuroendocrine tissue⁴, or that of the major phospho- and glycolipid constituents of the cell membranes.⁵ More sophisticated matrix preparation protocols allow to preserve the spatial distribution of analyte molecules within the tissue to a certain extent and to generate a molecular image by scanning the laser across the slices.⁶ Under ideal preparation conditions, the achievable lateral resolution would be as small as the focal laser beam diameter.⁷ However, owing to molecular diffusion the spatial resolution is frequently diminished during the matrix application step. Direct laser desorption ionization (LDI) mass analysis of native slices avoids the critical preparation step. However, lacking the MALDI matrix this approach has so far essentially been limited to the analysis of small cations or anions within tissue slices and cells.^{8,9} Direct infrared (IR-)LDI analysis of peptides and small proteins from lyophilized samples¹⁰ or from protein-loaded polyacrylamide gels¹¹ has been reported in a few studies. In particular the use of the water of hydration as the “IR matrix” may have its merits for the analysis of tissue cryosections.¹⁰ However, for the analysis of peptides and proteins this latter approach seems to be restricted to samples containing exceedingly high concentrations of analyte.^{10,11} In contrast to UV-MALDI-MS, where only monolayers of material are desorbed at the ion detection threshold,¹² material on the order of 5-10 μm in thickness is typically ablated by a single IR laser pulse.¹³

In by far the most applications, “axial” time-of-flight (a-TOF) analyzers have hitherto been employed for MALDI-MS tissue profiling and imaging.¹⁴ These instruments, in which the normal of the sample plate is collinear with the ion axis of the first field-free drift tube, have the advantage of a high ion transmission and an unlimited mass range but require well-defined electrical field conditions in the ion source (i.e., flat and preferably electrically well conducting surfaces). Moreover, they need to be operated with a high-vacuum in the MALDI ion source. The preparation of tissue slices on non-conducting glass slides –as standard in histology– inherently leads to a substantial loss in sensitivity and in the mass accuracy of the analysis. Furthermore, any variation in the thickness of the samples requires adjustment of the instrumental calibration. Metallization of the glass substrate or sputtering of a metal layer onto the preparation can improve the performance (M. Wisztorski, unpublished data),¹⁵ but these protocols add additional costs and/or cumbersome preparation steps. Also unwanted side effects caused by the metallization (e.g., adduct formation between metal and analyte) may be a concern.

The use of orthogonal (o-)TOF-MS instrumentation,¹⁶ in which the initially wide kinetic energy distributions, imparted onto the ions during the desorption process, are first thermalized by multiple collisions with a background gas and ions are then extracted perpendicular to their original direction of motion, has recently been shown to permit a high constant mass accuracy of the analysis that is widely independent of the type and morphology of the sample surface.¹⁷ Moreover, laser fluence is a much less critical parameter than in axial-TOF-measurements. However, a disadvantage associated with the o-TOF-instrumentation is a potentially high abundance of background signals from matrix clusters and potential analyte-matrix adduct ion formation. Both effects can be attributed to the elevated background pressure in the ion source allowing for extensive ion-molecule reactions.¹⁸ Moreover, substantial ion transfer times from the ion source to the analyzer regions limit the use of o-TOF-MS for high-speed imaging if “cross-talk” needs to be prevented. On the other hand,

being based on “continuous” ion extraction in the push-out region and a time-to-digital conversion detection principle, the o-TOF-instrumentation is ideally suited for operation with high-repetition rate lasers to cut down average analysis time substantially. Owing to the high amount of material ablated per IR laser pulse, the decoupling of desorption/ionization and mass analysis is particularly beneficial for IR-MALDI-MS analysis and efficiently increases the accuracy of the analysis by an order of magnitude if compared to IR-MALDI-MS-axial-TOF-MS. Dreisewerd et al. showed recently that this opens up the possibility for the high mass accuracy analysis of glycolipids directly from thin-layer plates.¹⁷ In a study performed in parallel to ours, in which direct IR-LDI was coupled with an hybrid ion mobility orthogonal extraction TOF mass spectrometer, Woods et al. have recently reported the detection of some major phospholipids from matrix-coated and native brain tissue (mostly sphingomyelin and phosphatidylcholine).¹⁹

In the present paper, molecular profiling of cryosected native and matrix-coated rat brain tissue slices by high-resolution IR-LDI-o-TOF-MS and by UV-/IR-MALDI-o-TOF-MS is reported. Phospho- and glycolipids are tentatively assigned based on the detected monoisotopic masses. Peptide and small proteins are detected by UV-MALDI-MS after coating of the slices with matrix. Tryptic digest products are furthermore detected after treating native slices with enzyme followed by matrix-coating.

EXPERIMENTAL

Abbreviations.

Galactose (Gal); Ceramide (Cer); N-acetyl cysteine (NAc); N-acetyl neuraminic acid (NeuAc)
Gal β 1-3GalNAc β 1-4(NeuAc α 2-3)Gal β 1-4Glc β -Cer (GM1); Cerebroside (CB), hydroxylated cerebroside (CB-OH); sulfated cerebroside (ST-CB); hydroxylated sulfated cerebroside (ST-CB-OH); α -cyano-hydroxycinnamic acid (HCCA); phosphatic acid (PA); phosphatidylcholine (PC); phosphatidylamine (PE); phosphatidylglycerol (PG);

phosphatidylinositol (PI); phosphatidylserine (PS); plasménylethanolamine (PlsEtn); sphingomyelin (SM); hydroxylated sphingomyelin (SM-OH); sulfatide (ST); hydroxylated sulfatide (ST-OH).

Materials. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), sinapic acid, bradykinin fragment 1-7, substance P, melittin, and potassium acetate were obtained from Sigma-Aldrich (Deisenhoven, Germany) and used without further purification. Trypsin was from Promega (Framingham, MA).

Tissue preparation. Adult male Wistar rats weighing 250 - 350 g (animal use accreditation by the French ministry of the agriculture N° 04860) were maintained under standard care. Animals were sacrificed by decapitation and immediately dissected to remove the brain. Frozen sections of either 15 or 60 μ m were obtained with a cryotome and thaw-mounted onto standard histology glass slides.

Tryptic digestion. 30 μ L of enzyme solution (33 ng/ μ L in 25 mM Tris buffer, pH 7.4) were applied onto tissue slices using a micropipette. To reduce solvent evaporation, samples were covered with a small dish. After digestion for either 3 or 10 minutes at room temperature, the slices were rinsed with 80% ethanol and allowed to dry at room temperature.

Sample preparation for LDI- and MALDI-MS analysis.

HCCA matrix solution was prepared by dissolving 10 - 20 mg of HCCA in 1 mL of acetonitrile/0.1%TFA (2:1, v/v). Sinapic acid matrix was prepared by dissolving 20 mg of sinapic acid in 1 mL of acetonitrile/0.1%TFA (1:1, v/v). A volume of matrix solution of 10 - 20 μ l was spread over the tissue sections using a micropipette. The sample was allowed to dry at room temperature, forming a homogeneous microcrystalline preparation. Cryosected tissue

slices were stored at -20 or -70°C prior to use. For analysis, samples were thawed under air and condensed water was allowed to evaporate at room temperature. For LDI, samples were either transferred directly into the mass spectrometer or tissue slices were rewetted with 0.5 M of potassium acetate using a pneumatic nebulizer. Transfer into the mass spectrometer was done after evaporation of the water solvent.

Orthogonal-TOF-Mass Spectrometer

The o-TOF-MS is a modified prototype, similar to the one described by Loboda et al.²⁰ By default, this instrument is equipped with an N_2 laser emitting 3 ns long pulses at a wavelength of 337 nm and a repetition rate of 30 Hz . The UV-beam is delivered via a fiber optical system, producing a spot size on the sample of $\sim 200 \times 230\ \mu\text{m}^2$. In our modified version, a second laser port has been added to adopt the beam of an Er:YAG-laser (BiOptics Laser Systeme, Berlin, Germany). This laser emits pulses of $\sim 100\text{ ns}$ in duration at a wavelength of $2.94\ \mu\text{m}$ and a repetition rate of $\sim 2\text{ Hz}$. The IR laser beam irradiates the sample under an angle of incidence of 45° . The focal spot size is approximately $150 \times 200\ \mu\text{m}^2$. Samples can be observed with a CCD-camera of $\sim 10\ \mu\text{m}$ optical resolution. To accommodate glass slides of up to $30 \times 50\text{ mm}^2$ in size and 1.8 mm in thickness, the central part of the sample plate ($50 \times 30\text{ mm}^2$) was milled out to a thickness of $\sim 2\text{ mm}$. An adapter was used for 1 mm thick microscopic slides. Substrates were fixed with double sided pads.

Ions are generated in an elevated-pressure ion source filled with nitrogen gas ($p \sim 1 - 5 \times 10^{-1}\text{ mbar}$) and are accelerated by a low extraction field of $\sim 25\text{ V/mm}$ into a quadrupole ion guide. The quadrupole is filled with N_2 at a pressure of $\sim 10^{-3}\text{ mbar}$. In normal operation the lower m/z cut-off of the quadrupole was set to $m/z\ 500$ in order to optimize ion transmission for the lipid and peptide mass range. In two experiments monitoring low mass ions, this cut-off was set to $m/z\ 150$. After extraction through a differentially pumped region, ions enter the high-vacuum part of the instrument ($p \sim 1 \times 10^{-7}\text{ mbar}$) where they are accelerated in orthogonal direction with respect to their original movement. Time-of-flight analysis was

performed in negative and positive ion mode, using acceleration potentials of 10 or 20 kV and a repetition rate of the push-out pulser of a few kHz. Time-to-digital measurements were typically performed with a time resolution of 256 ns. Calibration of the instrument was achieved with a two-point calibration using molecular ions of bradykinin fragment 1-7 and either substance P or melittin desorbed from a regular analyte/matrix preparation. For acquisition of UV-MALDI mass spectra ~7000 single laser pulses were typically applied according to an acquisition time of ~4 min. Owing to the lower repetition rate of the IR-laser and the larger amounts of material ablated per pulse, a maximum of 1200 IR-laser pulses was applied for IR-LDI- and IR-MALDI-MS. Laser fluences were adjusted to values moderately above the ion detection threshold for the individual matrix/wavelength combinations. For the IR, the sample plate was typically moved to a neighboring position after a few to ten single exposures whereas for UV-MALDI a few ten to some hundred laser pulses were typically applied on a certain position before the position was changed. Mass spectra were processed using the MoverZ3 software (vs. 2001.02.13, Genomic Solutions, Ann Arbor, MI).

RESULTS AND DISCUSSION

Direct IR-LDI-MS

Direct IR-LDI-o-TOF mass spectra that were acquired from a cryosected slice of 60 μm thickness in negative and positive ion mode are plotted in Figures 1 and 2, respectively. The native slice was sprayed with 0.5 M KAc prior to MS analysis. The two mass spectra were recorded from random positions in a central area of the slice of approximately 5 x 5 mm^2 in size. In both ion modes the mass spectra are dominated by a series of ions in the m/z -range between ~ 700 – 900 (Figures 1a, 2a). The mass ranges and characteristic mass differences of 2, 16, and 28, observed for several sets of ions (see for example insets in Figure 1a, 2a) suggest that these species represent phospholipids with varying fatty acid residues on the one

hand, and glycolipids, in particular hydroxylated or non-hydroxylated sulfatides and cerebrosides on the other. Owing to the high resolution of $\sim 10,000$ (FWHM) of the MS analysis and taking documented data about the lipid content in rat brain into account, the identity of these ions may tentatively be assigned based on their monoisotopic mass. Major phospholipid structures from rat brain tissue have been identified previously in several studies, for example by nano-ESI-tandem MS analysis.²¹ Likely identities of the detected species are proposed in Tables 1 and 2 for the two ion modes, respectively, along with the theoretical m/z values of the charged molecule and the experimentally determined m/z values. The detected ion species are likely to represent the major phospho- and glycosphingolipids as they are expected for rat brain plasma membranes: hydroxylated and non-hydroxylated sulfatides (ST, ST-OH) and cerebrosides (CB), phosphatidylcholine (PC), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol (PI), plasménylethanolamine (PlsEtn), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SM). Although variations in the fatty acid chain residues (i.e., the number of C-atoms and the degree of saturation), are straightforwardly detectable, the MS¹ data do not allow further differentiation as to the site of the modification. For example, the ion at m/z 885.54 (Figure 1b) could in principle represent an PI 18:1/16:0 or an PI 18:0/16:1. However, the second isoform is the naturally occurring in much higher abundance. A differentiation would be possible by structural tandem MS analysis, for example by using collisional activation. This option was not available on the employed prototype instrument. Tandem MS analysis would also allow for a safe identification of the head groups and thus type of the lipids. In part, the distributions of the lipids overlap closely such that they can't be differentiated unambiguously by the mere MS¹ data.

A noteworthy observation is the apparent detection of the particularly acidic phospholipids, PI, PG, and PS, as radical ion species (Table 1). Less acid lipids (sulfatides, SM, PlsEtn) on the other hand are only detected as deprotonated molecules.

Direct IR-LDI apparently does not induce sizable fragmentation of the lipids. For example, lysolipids frequently observed in MS-analysis using different methods, are as good as entirely absent. The low mass ranges from m/z 130-600, recorded in negative and positive ion mode, are shown in Figures 1b and 2b, respectively. The likely identity of a few of these low-intensity ions are indicated in the figure. Again, ions representing head groups or fatty acid side chains are almost absent. Further exploration of the identity of the observed low-intensity ion species of low mass was beyond the scope of the present work.

In the negative ion mode singly sialylated gangliosides, presumably of GM1 type,²² namely GM1 36:1 (theoretical m/z of the deprotonated molecule, 1544.87) and GM1 38:1 (theoretical m/z , 1572.90) are furthermore detected (see Figure 1c). Overlap with unspecific dimeric phospholipid ions, produced in the laser desorption process, and an apparently generally low ion yield renders their identification impossible in the positive ion mode mass spectra (Figure 2 c). Discrete ions seen in this figure must entirely be attributed to unspecific dimer formation.

Expectedly, the acidic phospholipids are detected preferentially or even exclusively in the negative ion mode (Figure 1a, Table 1). More neutral phospholipids, in particular PE and SM, are detected with comparable intensity in both ion modes. In positive ion mode, these species are almost exclusively detected as potassiated molecules $[M+K]^+$ (Figure 2b). Only the most abundant phospholipids also generate $[M+Na]^+$ ions of some intensity (Table 2). Owing to the high natural concentration of potassium in brain tissue, $[M+K]^+$ ions form the base peaks even if spraying of the native slices with KAc is omitted (data not shown). However, a higher abundance of sodiated lipids then complicates data interpretation. Spraying the slices with 0.5 M KAc solution prior to analysis was found to reduce the sodiated signals effectively. As a slight drawback comes the fact that potassium exhibits a distribution of

naturally occurring isotopes which contains about 7% of ^{41}K . In negative ion mode, mass spectra that were recorded from KAc-coated and non-coated slices look similar by both ion pattern and signal intensities. However, the preliminary studies indicate that the addition of KAc may reduce the unspecific chemical background to some extent; further studies are needed to elucidated this effect in sufficient detail. Rupture of the cell membranes is not expected to occur as a consequence of the application of KAc solution. Like in the negative ion mode, data interpretation is complicated by the closely overlapping lipid distributions. This finding again points to the need for a high instrumental mass resolving power if an accurate analysis of lipids directly from tissue is looked for. Peptide ions of notable intensity do not seem to be produced by direct IR-LDI. Unspecific fragment ions stemming from these and other cell constituents are, however, likely to contribute to the chemical background.

Table 1 and 2 can also provide some information about the relative composition of the lipids. In particular specific lipids, for which only the fatty acid composition varies, may be roughly quantified. Ionization efficiencies are not expected to be influenced significantly by changes in the fatty acid composition. A quantitative comparison between ions of different types of lipids is less straightforward due to the rather different ionization efficiencies. The different locations, from which different lipid species may originate (e.g., inner versus outer layer of the membranes, or membranes from different cell organelles or the cell wall) may potentially also result in a different desorption/ionization behavior; nothing is known about this potential effect. The natural isotopic distributions of C and K also make quantification more difficult. On the other hand, the ratios between the ^{12}C to ^{13}C or ^{39}K and ^{41}K isotopic abundance are fixed and could be corrected for in a more sophisticated quantitative analysis. Only raw data are presented in Tables 1 and 2. At least for the major lipids a relative quantification may nevertheless be extracted from the table. For example, the ion abundances suggest that the ratio of singly unsaturated PC (34:1) and saturated PC (34:0) in the cell

membrane is approximately 3:1 (Table 1), whereas the PC 36:1 to PC 36:0 yield is somewhat higher and about 4:1.

Figure 3 demonstrates that direct IR-LDI profiling has the potential to be developed into a true imaging technique. Two negative ion mode mass spectra were recorded from the central part of the brain and from the outer part. Expectedly the outer region contains a higher percentage of sulfatides.

UV-MALDI-MS

UV-MALDI-o-TOF-MS analysis from HCCA-coated slices extends the detectable mass range to about 10,000 Da. Being the subject of several imaging studies, ions above 1000 Da are in their majority believed to represent peptides and small proteins.² Figure 4a displays an UV-MALDI-o-TOF mass spectrum that was recorded from a HCCA-coated slice in positive ion mode. The HCCA matrix produced only comparatively low signal intensities of both negatively charged lipids and peptide molecules (data not shown). The use of sinapic acid as matrix favors the detection of proteins above m/z 10,000 and extended the accessible mass range even further – to about an m/z of 40,000 (data not shown). As is demonstrated by the insets in Figures 4a for three sets of ions of m/z 2028.01, 4961.36, and 8560.4 Da, up to about an m/z of ~9000 ¹²C-isotopic resolution is achieved by the o-TOF-analysis. Previous studies employing a sister instrument have moreover shown that a uniform mass accuracy and calibration over a wide mass range is achieved by o-TOF-MS analysis.¹⁶ This is in contrast to delayed extraction (DE) axial-TOF-MS analysis for which typically only a limited part of the mass spectra exhibits a high accuracy. Compared to typical axial-UV-MALDI-TOF measurements (e.g. demonstrated in ref. ²³) an improvement in mass accuracy by an order of magnitude is achieved. An experiment in which neighboring slices have been determined in parallel by axial- and o-TOF-MS showed, however, that qua profile essentially the same

peptides are detected by the two methods (data not shown). Further going peptide identification was beyond the scope of the present study

High intensities of phospholipid and sulfatide ions are also generated by positive ion mode UV-MALDI (Figure 4b). A closer look into the phospholipid mass region shows that essentially the same lipid species are detected by UV-MALDI-o-TOF-MS than by direct IR-LDI-MS (Figures 2a, 4b). However, in addition to potassiated species, higher intensities of sodiated molecules and even protonated lipids are produced. The latter species are not generated by IR-LDI, pointing to substantially different or additional ionization pathways, respectively. The additional signals complicate the interpretation of the positive ion mode mass spectra considerably. Moreover, the potential overlap with smaller peptides (e.g. the ion observed at m/z 943.47 in Figure 4b probably presents such a peptide), matrix cluster ions and the potential formation of lipid- (and peptide) matrix adduct complexes come as further drawbacks. Matrix cluster ions are partly assigned in Figure 4b with an asterisk (these species were identified from a mass spectrum that was taken from a neat matrix sample). Adduct complexes between analyte (both lipid and peptide) and matrix form another concern. Such complexes have in fact been observed in some of the experiments. Apparently, the extent of adduct formation depends critically on the detailed –not fully elucidated– sample and possibly on the irradiation conditions. Comparing standard and tissue preparations, the degree of both matrix cluster and adduct complex formation is generally lower, or eventually even absent for the tissue preparations –like in the mass spectrum displayed in Figure 4–. Other groups have reported that matrix cluster ions and matrix adduct ions are especially prominent in elevated pressure MALDI sources^{24,25}. Matrix cluster and adduct formation is moreover particularly pronounced for cinnamic acid derivatives. Other researcher have suggested to use high concentration of additives (e.g., ammoniumphosphate²⁶) to reduce this problem. Using different matrix systems which are less prone to cluster and adduct formation may also reduce

this problem. It needs to be seen, however, as to how far additives and other matrix systems would be compatible with the delicate matrix preparation procedure necessary for laterally-resolved imaging studies. Using matrices that are more widely employed for the detection of lipids [e.g., 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB)¹⁹ or 2,6-dihydroxyacetophenone (DHA)²⁷] may, however, further facilitate the detection of lipids. Finally UV-MALDI-generated peptide ions of smaller size are inevitably also falling into the lipid mass range. For example, the ion at m/z 943.47 detected by UV-MALDI-o-TOF-MS (Figure 4b) may represent such a small peptide.

A substantial drawback accompanying MALDI imaging of tissue is the easy delocalization of molecules from their original lateral position during the matrix preparation step. Indeed, medium intensities of lipids and peptides were well detected from an area just next to the slices to which matrix (and analytes) have eluted during the matrix preparation step (data not shown). Apparently lipids are partly desolved by the matrix solution containing 50% acetonitrile.²¹ Although this problem is clearly aggravated if –like in the current work– rather simple sample preparation protocols are employed, it clearly poses one of the major obstacles for laterally well-resolved MALDI-MS imaging. In contrast, any major delocalization by polar solvents (including the almost unavoidable condensed water), or by effect of the laser ablation is rather unlikely to take place. For example, IR irradiation of a position just next to the tissue slice, that was previously extensively wetted with aqueous KAc solution, did not produce any lipid ion signals.

IR-MALDI-MS

IR-MALDI-o-TOF-MS analysis of HCCA- or sinapic acid-coated slices hardly produced any ions with molecular weights in excess of 1000 (data not shown). However, abundant lipid signals are again produced in both ion modes (Figure 5a,b). Notably, some phospholipids (notably PE, PlsEtn, SM) that are detected in medium to high abundance by negative ion

mode IR-LDI (Figure 1b) are almost completely suppressed in the IR-MALDI mass spectra (Figure 5a). As similar effect is observed for UV-MALDI-MS. Sulfatides, on the other hand, are generated with enhanced signal intensities by IR-MALDI-MS. This observation comes as a surprise because only part of the tissue (by size below 50%) is visibly covered with HCCA matrix. The suppression must be attributed to extensive gas phase reactions taking place in the expanding MALDI plume and thermodynamically favoring certain products. In positive ion mode (Figure 5b), essentially all phospholipids are observed by IR-MALDI-MS that were already detected in IR-LDI- (Figure 2a, Table 2) and UV-MALDI-MS (Figure 4b). However, like in the UV-MALDI case, owing to the occurrence of additional sodiated and protonated molecules the mass spectra become much more complex. Notably, in both IR-MALDI ion modes the degree of matrix cluster formation is rather low if not absent.

UV-MALDI-MS analysis of tissue treated with trypsin

Molecular identification based on the mass of the detected ion alone is hardly ever unequivocal. Immunology can provide specific identification but is restricted to individual target structures. MALDI tandem-MS can be used for structural analysis and identification of small molecules directly from tissue sections but is typically limited to ions not exceeding 2000 – 3000 Da in mass. Enzymatic digestion of peptidergic components contained –and being accessible to the enzyme– in the tissue can form an interesting “shotgun” approach to cleave larger peptides and proteins to product ion sizes falling well into this mass range. Large proteins that are not detectable by direct MALDI-MS of the original tissue sample may even become demasked. Owing to the high number of enzymatic fragment ions that will in general be produced by this approach, a high resolving power of the mass spectrometer for differentiation of precursor species will be compulsory.

A tryptic digestion experiment, performed at room temperature on two native slices, demonstrates the principle feasibility of this approach. In a first experiment, trypsin was

applied for 3 min before the slice was rinsed with ethanol and HCCA matrix was added. The UV-MALDI-o-TOF mass spectrum recorded from this preparation is displayed in Figure 6a. Besides for the tryptic peptides this approach also produces a set of larger (and new) ions with m/z values up to above 25000 Da. These species presumably represent partially cleaved larger proteins that do not show up in the mass spectrum taken from the untreated sample. Applying trypsin for a longer time of 10 min expectedly leads to more complete digestion. The exceedingly large number of ion signals in the tryptic fragment mass range renders a data bank search less meaningful but the results clearly demonstrate that tandem-MS analysis on such a preparation should be possible.

CONCLUSIONS

Molecular analysis of tissue slices employing a MALDI ion source operated at an elevated pressure of ~1 mbar and an orthogonal TOF mass analyzer provides several advantageous features. The analysis can be performed with slices of almost arbitrary thickness without degradation of a high and mass-independent resolving power of about 10,000. For convenience and compatibility with histology, tissue slices can also simply be prepared on standard glass substrates. The employment of an IR-laser allows to generate spatially-resolved phospholipid profiles even from native cryosected slices. Spraying of a concentrated KAc solution onto the slices was found to facilitate data interpretation in positive ion mode by effectively suppressing the formation of sodium-adduct ions. In contrast to UV- or IR-MALDI-MS, the IR-LDI mode moreover produces no protonated lipids. Both UV- and IR-MALDI-MS were further found to suppress some type of lipids, presumably owing to extensive ion-molecule reactions in the MALDI plume. UV-MALDI-o-TOF-MS allows the precise profiling of peptides and small proteins from matrix-coated tissue with equally high mass resolution. Larger proteins can partially be demasked by treatment of the tissue with trypsin. Employing miniaturized digestion and matrix preparation protocols in combination

with structural analysis and protein identification by tandem MS may in the future allow spatially resolved shot-gun proteomics directly from tissue slices.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are grateful to Sequenom GmbH (Hamburg, Germany) for use of their o-TOF-instrument and would like to thank Franz Hillenkamp for support of the project, and Gottfried Pohlentz, Sarah Kruppe, and Andreas Rohlfing for help with the identification of the phospholipids. Supported by grants from Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Ministère de la Recherche et des Technologies (MRT, ACI jeunes Chercheurs to I. Fournier), Foundation pour la Recherche Médicale (FRM, to I. Fournier), Génopole-Lille to M. Salzet. Financial support by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant DR 416/5-1) is furthermore acknowledged.

Table 1. IR-LDI neg. ion mode slices coated with 0.5 M KAc			
Experimental <i>m/z</i>	Theoretical <i>m/z</i>	Identity	Signal Intensity arb. units.
599.33	589.40	LPI 32:0	
670.52	670.46	PA 34:2	507
673.51	673.52	SM 32:1	222
699.49	699.53	SM 34:0	904
700.51	700.53	PlsEtn 34:1	1019
701.51	701.55	SM 34:1	1019
702.51	700.54	PlsEtn 34:0	448
715.57	715.53	SM 34:0- OH?	907
716.56	716.52	PE 34:1	626
718.55	718.53	PE 34:0	409
726.53	726.56	PlsEtn 36:2	1021
728.56	728.57	PlsEtn 36:1	1288
742.56	742.54	PE 36:2	487
744.55	744.55	PE 36:1	742
745.53	745.50	PG 34:2	
746.54	746.54	PlsEtn 38:6	689
747.53	747.51	PG 34:1	843
748.52	748.55	PlsEtn 38:5	825
750.53	750.55	PlsEtn 38:4	934
752.57	752.57	PlsEtn 38:3	
754.56	756.59	PlsEtn 38:2	404
756.59	756.60	PlsEtn 38:1	315
762.49	762.53	PS 34:0	530
764.51	764.52	PE 38:5	389
766.54	766.54	PE 38:4	1096
770.56	770.56	PE 38:2	221
772.56	772.58	PE 38:1	646
773.54	773.53	PG 36:2	
774.55	774.54	PlsEtn 40:6	983
775.55	775.55	PG 36:1	
776.56	776.58	PlsEtn 40:5	743
778.57	778.60	PlsEtn 40:4	754
788.51	788.54	PS 36:1	566
790.53	790.56	PS 36:0	1114
792.54	792.56	PE 40:5	660
794.56	794.57	PE 40:4	765
806.53	806.55	ST 36:1	1114
808.54	808.56	ST 36:0	660
821.54		?	765
822.55	822.55	ST-OH 36:1	720
834.56	834.58	ST 38:1	1142
835.56	835.54	PI 34:1	1036
849.54		?	
850.55	850.58	ST-OH 38:1	354
857.51	857.52	PI 36:4	1178
860.58	860.60	ST 40:2	530

Table 1. Putative identities of phospho- and glycosphingolipid ions observed by direct IR-LDI-o-TOF-MS from native rat brain tissue slice (sprayed with 0.5 M KAc prior to the analysis) in the negative ion mode, along with the theoretical and experimental *m/z*-values of the monoisotopic deprotonated molecular ion, [M-H]⁻, or radical molecular ion, M[•],^a respectively ^b

^a putative radical ions are denoted by “R”

^b to guide the eye, lipids detected with high signal intensity (> 1000 a.u.) are highlighted

Table 2. IR-LDI pos. ion mode slices coated with 0.5 M KAc			
Experimental m/z	Theoretical m/z	Identity	Signal Intensity
478.32			129
577.50			127
694.50			129
697.45			127
710.47	710.43	PA 32:2 (K)	879
712.47	710.44	PA 32:1 (K)	203
713.44			771
715.44			336
723.48	723.53	SM 34:1 (Na)	160
725.48	725.55	SM 34:1 (Na)	128
727.48	727.57	SM 34:0 (Na)	72
737.44	737.50	?	130
738.529	738.47	PA 34:0 (K)??	
739.45	739.50	SM 34:2 (K)	3155
740.45	740.49	PA 34:1 (K)??	
741.46	741.52	SM 34:1 (K)	1093
743.48	743.54	SM 34:0 (K)	133
748.58			198
751.40			175
753.59			266
756.53	756.49	PC 32:1 (Na)	462
758.54	758.51	PC 32:0 (Na)	171
761.44	761.47	PG 32:0 / SM 36:0 (K)	568
763.44	763.49	SM 36:4 (K)	198
765.47	765.51	SM 36:3 (K)	279
767.48	767.53	SM 36:2(K)	1276
768.49	768.51	PA 36:1 (K)	PlsEtn 36:1 (K)
769.53	769.55	SM 36:1 (K)	2145
770.54	770.53	PA 36:1 (K)	
771.55	771.56	SM 36:0 (K)	713
772.55	772.52	PC 32:1 (K)	3818

Table 2. Putative identities of phospho- and glycosphingolipid ions observed by direct IR-LDI-o-TOF-MS from native rat brain tissue slice (sprayed with 0.5 M KAc solution prior to analysis in the positive ion mode, along with the theoretical and experimental m/z -values of the monoisotopic cationized ions, $[M+K]^+$ and $[M+Na]^+$.^{a,b}

^a the type of cation is denoted in brackets; protonated lipid species are not detected by IR-LDI, though they are generated by UV- and IR-MALDI.

^b to guide the eye, lipids detected with high signal intensity (> 1000 a.u.) are highlighted

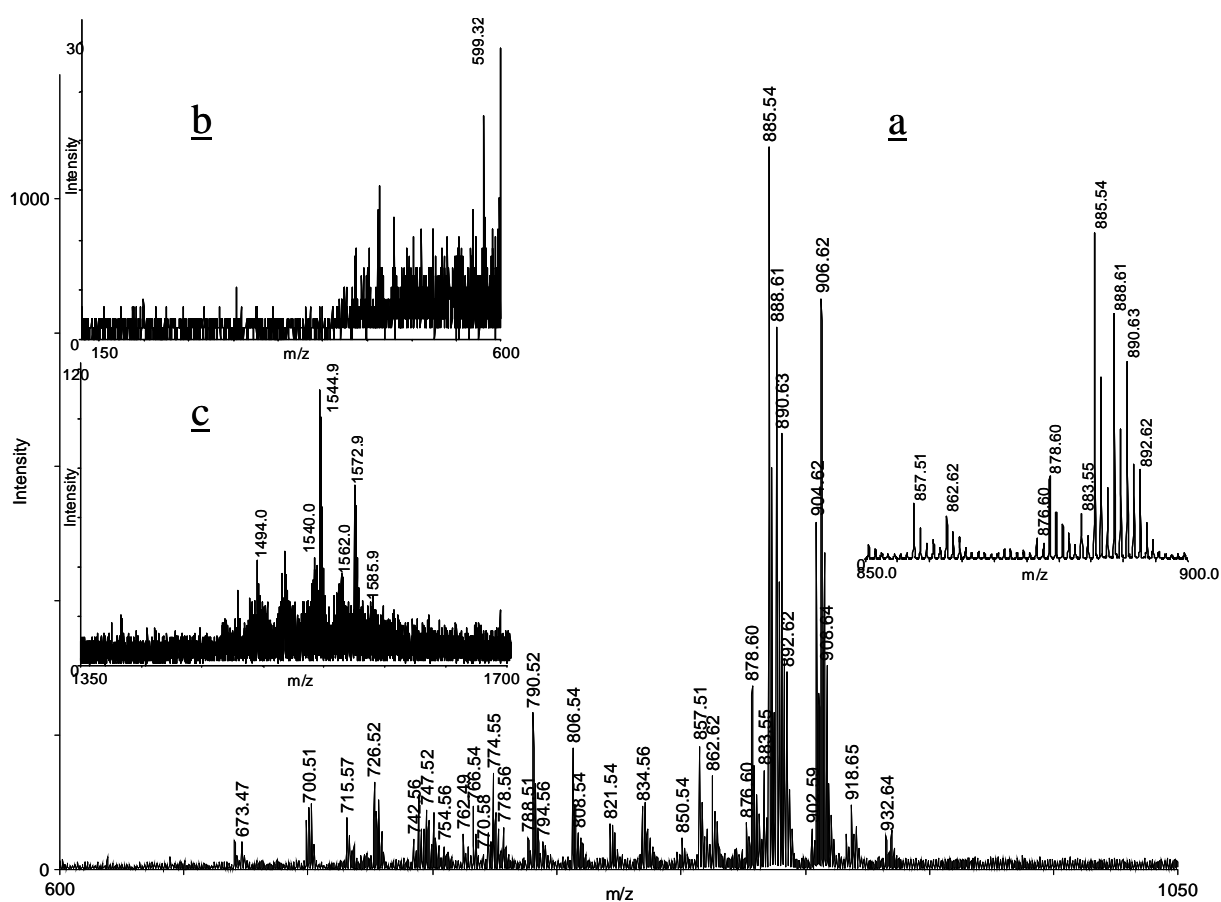


Figure 1. Direct IR-LDI-o-TOF mass spectra recorded from a 60 μm -thick rat brain tissue slice in negative ion mode. The tissue slice was sprayed with a 0.5 M KAc solution prior to the analysis. (a) m/z -range from 600 to 1050, displaying a series of phospholipid and hydroxylated and non-hydroxylated sulfatide ions. Major ions are assigned with their putative identity (see Table 1 for an extensive list); unless noted, labeled ions represent deprotonated molecular species, $[\text{M}-\text{H}]^-$; presumable radical ions are labeled with “R”. The inset shows an enlarged section showing the m/z range from m/z 850-900. (b) m/z range from 130 – 600; this spectrum was recorded with the low m/z cut-off of the quadrupole set to 150. (c) m/z range from 1350 – 1700 displaying putative GM1 ganglioside ions; not-assigned ions are presumably representing “unspecific” phospholipid dimers that are produced during the desorption/plume expansion process

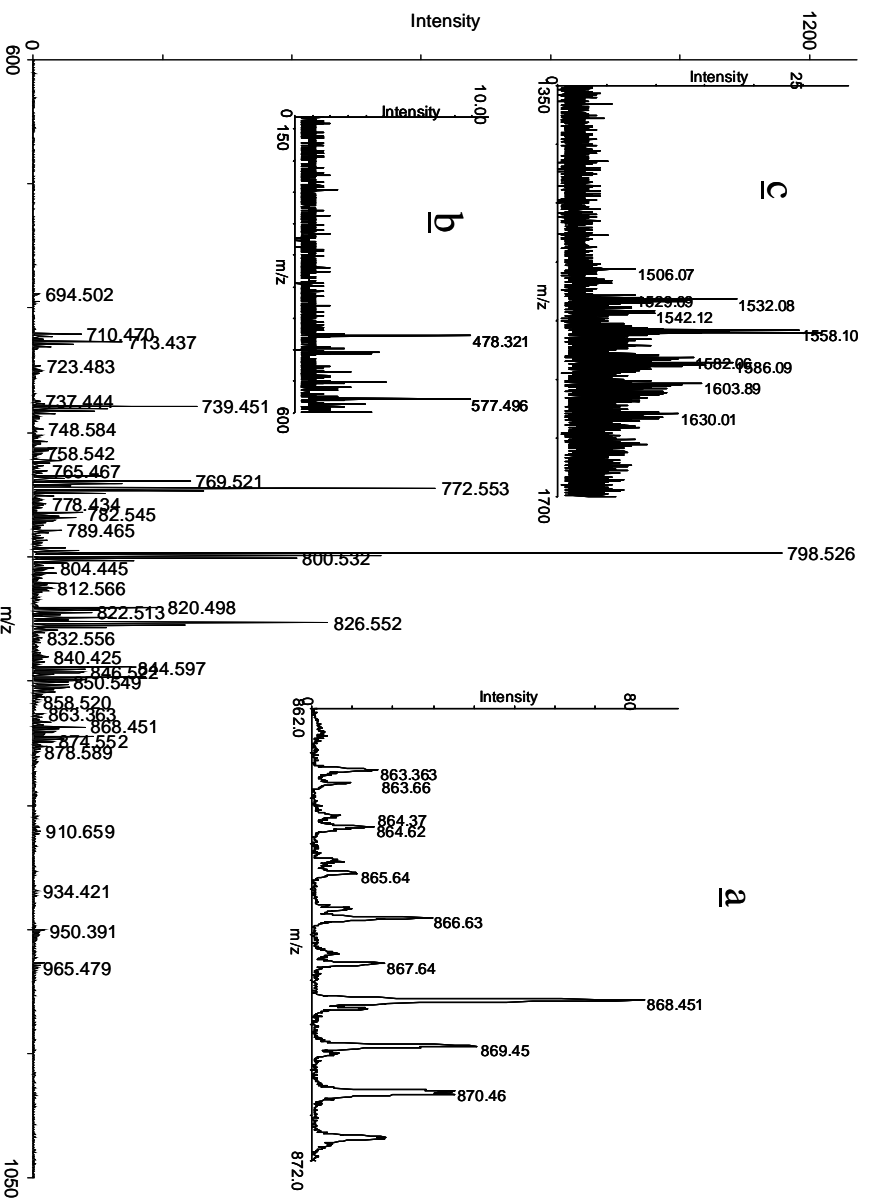


Figure 2. Direct IR-LDI-o-TOF mass spectra recorded from a 60 μm -thick rat brain tissue slice in positive ion mode. The tissue slice was sprayed with a 0.5 M KAc solution prior to the analysis. (a) m/z -range from 600 to 1050, displaying a series of phospholipid and sulfate ions. Major ions, representing exclusively $[\text{M}+\text{K}]^+$ ions, are assigned with their putative identity (see Table 2 for an extensive list). The inset shows an enlarged section showing the m/z range from 862 - 872 (b) m/z range from 130 – 600; this spectrum was recorded with the low m/z cut-off of the quadrupole set to 150. (c) m/z range from 1350 – 1700. Only unspecific phospholipid dimers, produced during the desorption/plume expansion process, are found.

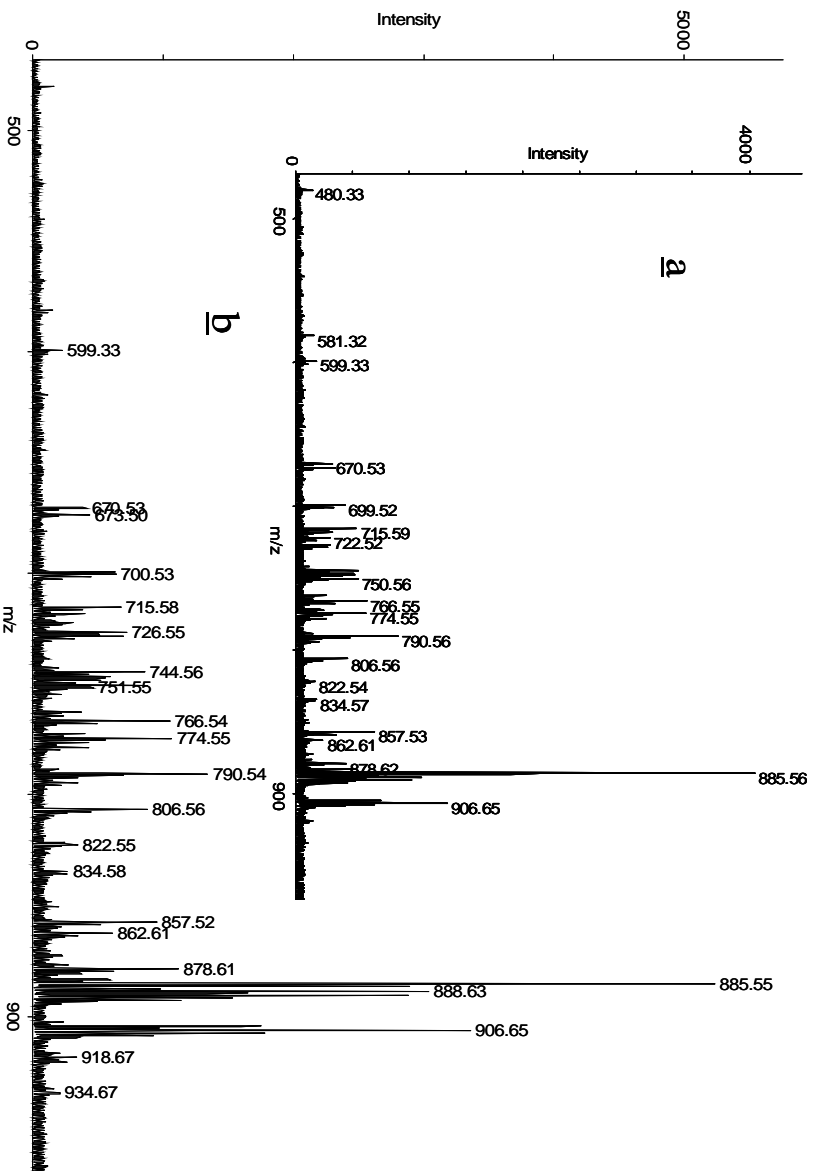


Figure 3. Direct IR-LDI-o-TOF mass spectra recorded from two areas on a 60 μm-thick rat brain tissue slice in the negative ion mode. (a) central area, (b) outer area. The tissue slice was sprayed with a 0.5 M KAc solution prior to the analysis. Major ions are assigned with their putative identity (see Table 1 for an extensive list); unless noted all labeled ions represent deprotonated molecular species, $[M-H]^-$; presumable radical ions are labeled with “R”.

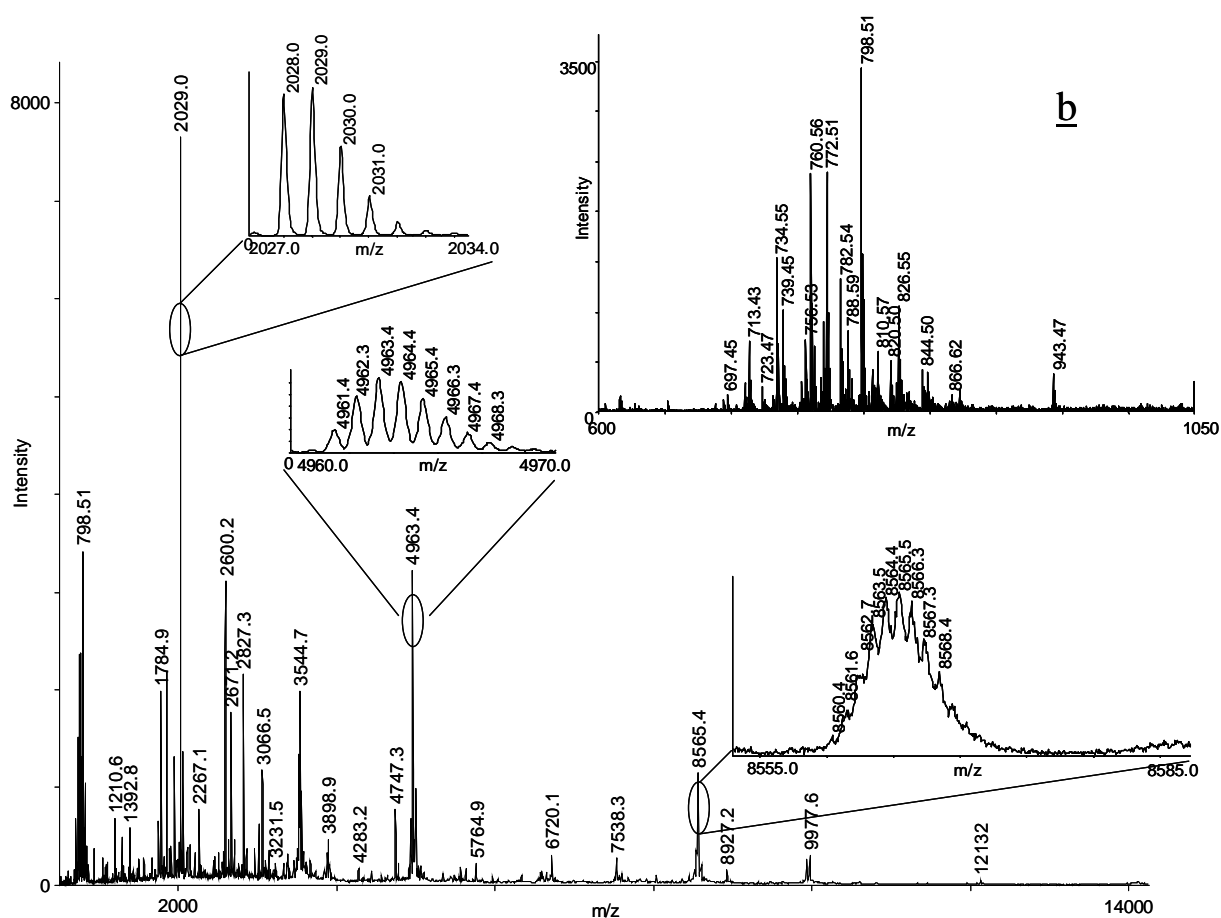


Figure 4. UV-MALDI-o-TOF mass spectra recorded from a 60 μm -thick HCCA-coated rat brain tissue slice in positive ion mode. (a) full mass spectrum (m/z 500 – 14,250). The three insets demonstrate the high mass resolution throughout the recorded mass range. M/z values are given for the ^{12}C -monoisotopic peak besides for high mass values for which average molecular weights, denoted by brackets $\langle \rangle$, are given. (b) m/z -range from 600 to 1050, displaying a series of phospholipid and sulfatide ions. Major ions are assigned with their putative identity (see Table 1 for an extensive list). Positive ions are observed with comparable intensities as $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, or $[\text{M}+\text{K}]^+$ ions (the cation is indicated in brackets). Identified matrix cluster ion signals are labeled with an asterisk. “/ *” denotes that matrix cluster and lipid ions could not be distinguished. In this experiment, the acceleration potential of the TOF analyzer was set to 20 kV (instead of the regularly used 10 kV) to favor the detection of larger ions.

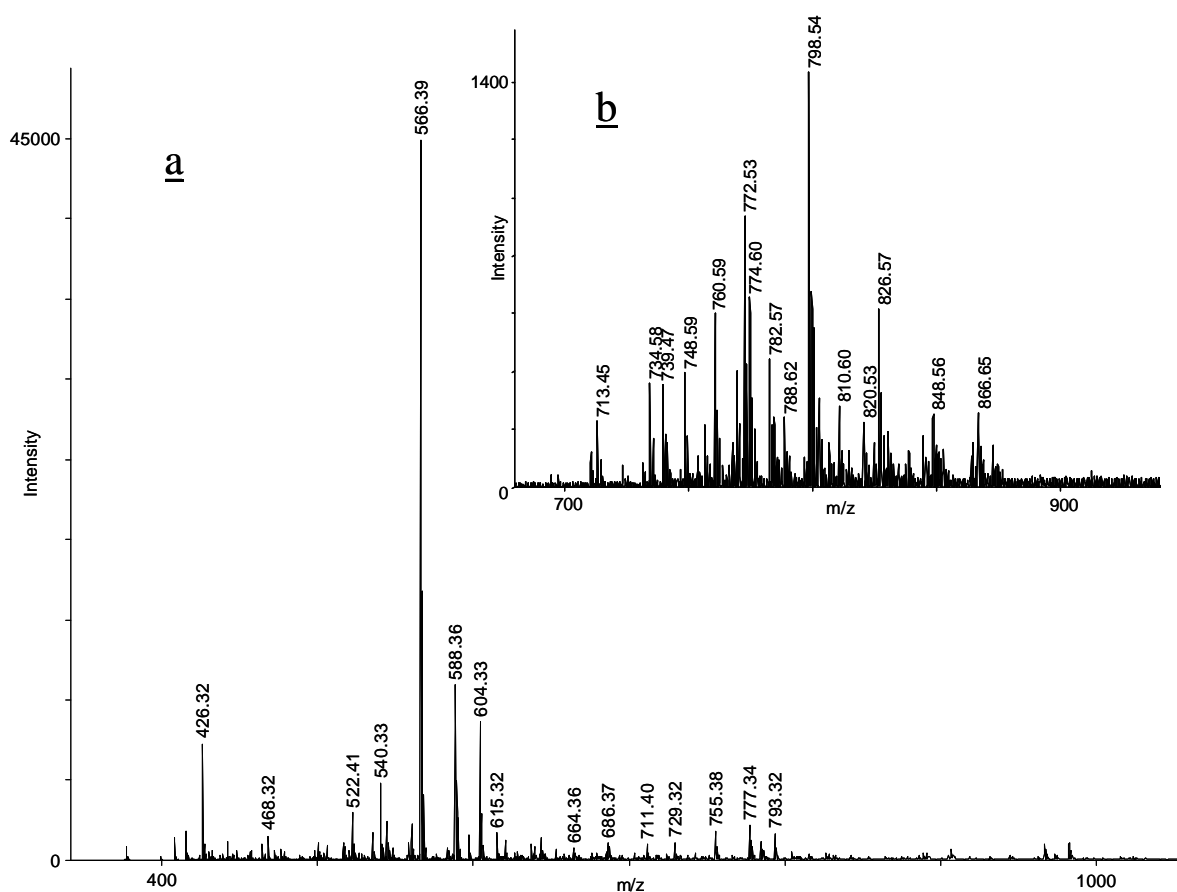


Figure 5. IR-MALDI-o-TOF mass spectrum recorded from a 60 μm -thick HCCA-coated rat brain tissue slice in (a) negative and (b) positive ion mode, displaying a series of phospholipid and sulfatide ions. Major ions are assigned with their putative identity. Unless noted all labeled negatively charged ions represent deprotonated molecules $[\text{M}-\text{H}]^-$; presumable radical ions are labeled with “R”. Positive ions are observed with comparable intensities as $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$, and $[\text{M}+\text{K}]^+$ ions (the cation is indicated in the figure).

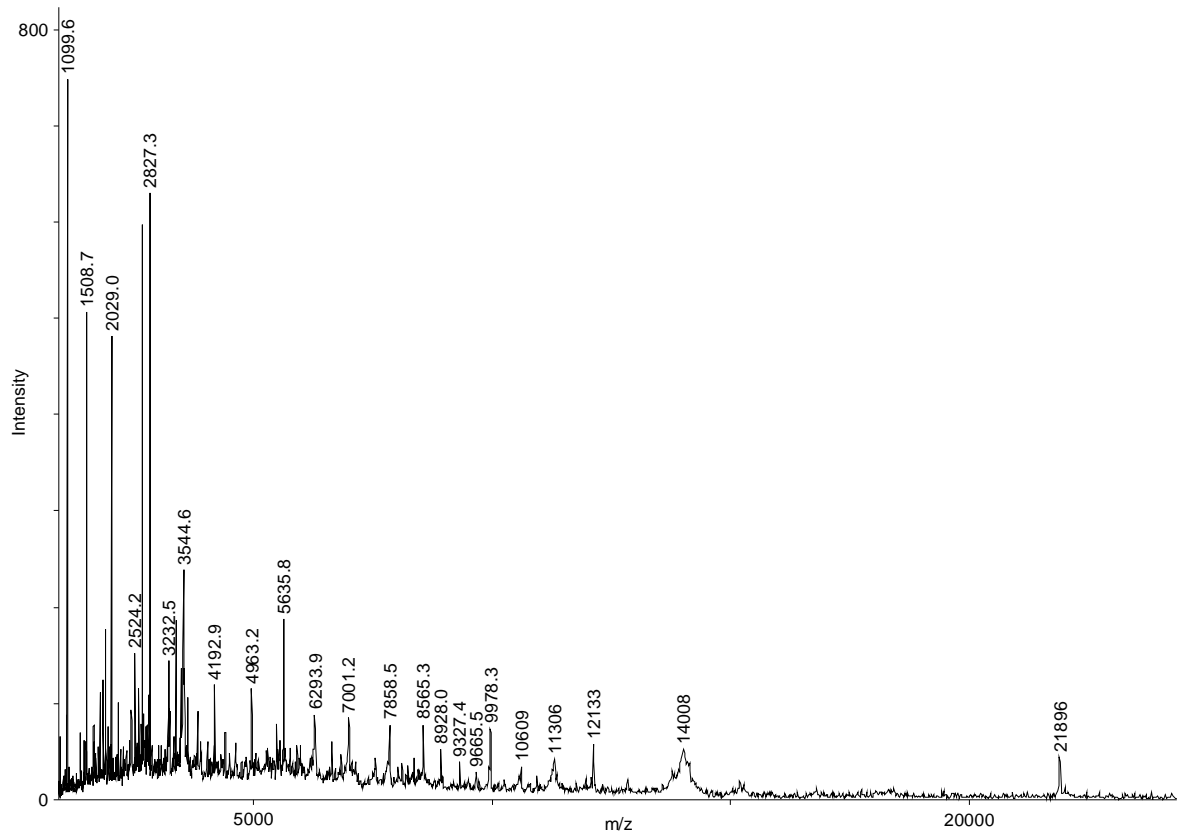


Figure 6. UV-MALDI-o-TOF mass spectra recorded in positive ion mode from two 15 μm -thick rat brain tissue slices after tryptic digestion for 3 min at room temperature. Digestion was stopped by rinsing the slices with 80% ethanol and subsequent application of HCCA matrix.

REFERENCES

- ¹ Caldwell, R. L.; Caprioli, R. M., *Mol. Cell. Proteom.* **2005**, *4*, 394.
- ² Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 87A-93A.
- ³ Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocr. Lett.* **2003**, *24*, 9
- ⁴ Dreisewerd K.; Kingston, R.; Geraerts, W. P. M.; Li, K. W. *Int. J. Mass Spectrom.* **1997**, *169*, 291.
- ⁵ Jackson, S. N.; Wang, H. Y. J.; Woods, A. S. *Anal. Chem.* **2005** *77* 4523.
- ⁶ Schwartz, S.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 699.
- ⁷ Spengler, B.; Hubert, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* *2002*, *13*, 735.
- ⁸ Proceedings of LAMMA Symposium, Düsseldorf, Germany, October 8-10, 1980, *Fres. Z. Anal. Chem.*, **1981**, Vol. *308*.
- ⁹ Hillenkamp, F.; Unsold, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R., *Appl. Phys.* **1975**, *8*, 341.
- ¹⁰ Berkenkamp, S.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 7003.
- ¹¹ Rousell, D. J.; Dutta, S. M.; Little, M. W.; Murray, K. K. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1182.
- ¹² Dreisewerd, K. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 395.
- ¹³ Menzel, C.; Dreisewerd, K.; Berkenkamp, S.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom.* *2001*, *207*, 73-96.
- ¹⁴ Chaurand, P.; Reyzer, M. L., Caprioli, R. M. in M. Gross, R. M. Caprioli (Eds.) *Encyclopedia of Mass Spectrometry*, Elsevier, 2004, Vol. *2*, pp. 339.
- ¹⁵ Delcorte, A.; Bour, J.; Aubriet, F.; Muller, J. F.; Bertrand, P. *Anal. Chem.* *2003*, *75*, 6875.
- ¹⁶ Krutchinsky, A. N.; Loboda, A. V.; Spicer, V. L.; Dworschak, R.; Ens, W.; Standing, K. G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, *12*, 508.

- ¹⁷ Dreisewerd, K.; Muthing, J.; Rohlfing A.; Meisen I.; Vukelic, Z.; Peter-Katalinic, J.; Hillenkamp, F.; Berkenkamp, S. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 4098.
- ¹⁸ Loboda, A. V.; Chernushevich, I. V. *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *240* 101.
- ¹⁹ Woods, A. S.; Ugarov, M.; Jackson, S. N.; Egan, T.; Wang, H. Y. J.; Murray, K. K.; Schultz, J. A. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 1484.
- ²⁰ Loboda, A. V.; Ackloo, S.; Chernushevich, I. V. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2003**, *17*, 2508.
- ²¹ Lemaire et al. *Anal. Chem.*, in press
- ²² Schwartz, A.; Futermann, A. H. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1286*, 247.
- ²³ Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.*, **2006**, *78*, 809.
- ²⁴ Ivleva, V. B.; Elkin, Y. N.; Budnik, B. A.; Moyer, S. C.; O'Connor, P. B.; Costello, C. E. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6484.
- ²⁵ Krutchinsky, A. N.; Chait, B. T. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* 129.
- ²⁶ Cramer R.; Corless, S. *Proteomics* **2005**, *5*, 360.
- ²⁷ Woods, A. S.; Jackson, S. N, *AAPS Journal* **2006**, *8*, E391.

AUTRES PUBLICATIONS EN COURS DE REALISATION

Metal Coating : How To Solve Surface Charging Effect In MALDI/MS Imaging

Wisztorski, M.; Lemaire, R. ; Dreisewerd, K. ; Berkenkamp, S.; Salzet, M.; Fournier, I .

New Developments In MALDI Imaging For Pathological Proteomic Studies

Wisztorski, M.; Lemaire, R.; Stauber, J.; Salzet, M.; Fournier, I.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.; *Nat Rev Cancer*, **2004**, *4*, 349-360.
- Aerni, H.R.; Cornet, D.S.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78*, 823-834.
- Armstrong, D.W.; Zhang, L.K.; He, L.; Gross, M.L. *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 3679-3686.
- Asara, J.M. ; Allison, J. ; *Anal.Chem.* **1999**, *71*, 2866-2870.
- Banoub, J.H. ; Newton, R.P. ; Esmans, E.; Ewing, D.F.; Mackenzie, G.; *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1869-1915.
- Barhdadi, R.; Courtinard, C.; Nedelec, J.Y.; Troupel, M.; *Chem. Commun.* **2003**, *12*, 1434-1435.
- Beal, F. ; *Nature Reviews Neurosciences*, **2001**, *2*, 325-332.
- Beavis, R.C. ; Chait, B.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 432-435.
- Beavis, R.C. ; Chaudhary, T. ; Chait, B. ; *Org. Mass. Spectrom.* **1992**, *27*, 156-158.
- Berkenkamp, S. ; Kirpekar, F. ; Hillenkamp, F. ; *Science*, **1998**, *281*, 260-262.
- Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Can J Biochem Physiol* **1959**, *37*, 911-917.
- Brown, R.S.; Lennon, J.J.; *Anal.chem.* **1995**, *67*, 1998-2003.
- Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprévotte, O.; *J. Mass Spectrom*, **2005**, *40*, 985-999.
- Bunch, J.; Clench, M.R.; Richards, D.S.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 3051-3060.
- Caprioli, R.M.; *CancerRes.* **2005**, *65*, 10642-10645.
- Caprioli, R.M.; Farmer, T.B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751-4760.
- Chait, B.T.; Standing, K.G.; *Int. J. Mass spectrom. Ion phy*, **1981**, *40*, 185-193.
- Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B.; *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, *10*, 91-103.
- Chaurand, P.; DaGue, B.B.; Pearsall, R.S.; Threadgill, D.W.; Caprioli, R.M.; *Proteomics.* **2001**, *1*, 1320-1326.
- Chaurand, P.; Schwartz, S.A.; Billheimer, D.; Xu, B.J.; Crecelius, A.; Caprioli, R.M.; *Anal.Chem.* **2004**, *76*, 1145-1155.
- Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R.M.; *Anal. Chem* **1999**, *71*, 5263-5270.
- Colliver, T.L.; Brummel, C.L.; Pacholski, M.L.; Swanek, F.D.; Ewing, A.G.; Winograd, N.; *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2225-2231.

- Cooks, R.G.; Glish, G.L.; McLuckey, S.A.; Kaiser, R.E.; *Chem. Eng. News*. **1991**, *69*, 26-41.
- Cooks, R.G. ; Ouyang, Z. ; Takats, Z.; Wiseman, J.M.; *Science*, **2006**, *311*, 1566-1570.
- Cotte-Rodriguez, I. ; Takats, Z. ; Talaty, N.N. ; Chen, H. ; Cooks, R.G. ; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6755-6764.
- Crockett, D.K.; Zhaosheng L.; Vaughn, C.P.; Lim, M.S.; Elenitoba-Johnson, K.S.J. ; *Laboratory Investigation*. **2005**, 1-11.
- De Hoffman, E. ; Charrette, J. ; Stroobant, V. ; *Dunod*, 2^{ème} édition, **1999**, p26.
- De Iuliis, A.; Grigoletto, J.; Recchia, A.; Giusti P.; Arslan, P.; *Clinica Chimica Acta*, **2005**, *357*, 202-209.
- Distler, A.M.; Allison, J.; *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 5000-5003.
- Dreisewerd, K. ; Kingston, R. ; Geraerts, W.P.M.; Li, K.W. ; *Int. J. Mass Spectrom*, **1997**, *169*, 291-299.
- Ekroos, K.; Chernushevich, I. V.; Simons, K.; Shevchenko, A. *Anal Chem* **2002**, *74*, 941-949.
- Estrada, R.; Yappert, C.M.; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 412-422
- Faries, P.L.; Rohan, D.L.; Wyers, M.C.; Marin, M.L.; Hollier, L.H.; Quist, W.C.; LoGerfo, F.W.; *Inter. Journ of Vasc Surg*, **2001**, *15*, 628-633.
- Ferraz, T. P.; Fiuza, M. C.; Dos Santos, M. L.; Pontes De Carvalho, L.; Soares, N. M. *J Biochem Biophys Methods* **2004**, *58*, 187-193.
- Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. *J Biol Chem* **1957**, *226*, 497-509.
- Ford, M.J. ; Van Berkel, G.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1303-1309.
- Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M.; *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9-14.
- Funk, C.D.; *Science*, **2001**, *294*, 1871-1875.
- Garrett, T.J.; Yost, R.A.; *Anal Chem* **2006**, *78*, 2465-2469.
- Giasson, B.I.; Lee, V.M.; *Cell*, **2003**, *114*, 1-8.
- Glunde, K.; Jie, C.; Bhujwala, Z.M.; *Cancer Research*. **2004**, *566*, 291-293.
- Good, P.F. ; *Ann, Neurol*, **1992**, *31*, 286-292.
- Han, X.; Gross, R. W. *Mass Spectrom Rev* **2005**, *24*, 367-412.
- Hanash, S.; *Nature Reviews*, **2004**, *4*, 638-643.

- Holle, A.; Haase, A.; Kayser, M.; Höhdorf, J.; *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 705-716.
- Honig, R.E.; *Int. J. Mass Spectrom. Ion process.* **1985**, *66*, 31-54.
- Hood, B.L.; Darfler, M.M.; Guiel, T.G.; Furusato, B.; Lucas D.A.; Ringeisen, B.R.; Sesterhenn, I.A.; Conrads, T.P.; Veenstra, T.D; Krizman D.B. *Molecular and cellular Proteomics.* **2005**, *11*, 1141-1153.
- Hsieh, Y.; Casal, R.; Fukuda, E.; Chen, J.; Knemeyer, I.; Wingate, J.; Morrison, R.; Korfmacher, W.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 965-972.
- Hsu, F. F.; Turk, J. *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**, *11*, 892-899.
- Hsu, F. F.; Turk, J. *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**, *11*, 986-999.
- Hsu, F. F.; Turk, J. *J Am Soc Mass Spectrom* **2003**, *14*, 352-363.
- Jackson, S.N.; Wang, H.Y.; Woods, A.S.; *Anal Chem* **2005**, *77*, 4523-4527.
- Jackson, S.N.; Wang, H.Y.; Woods, A.S.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **2005**, *16*, 2052-2056.
- Jimenez, C.R. ; Burlingame, A.L. ; *Exp. Nephrol.* **1998**, *6*, 421-428.
- Jimenez, C.R.; Li, K.W.; Dreisewerd, K.; Spijker, S.; Kingston, R.; bateman, R.H;; Burlingaeme, A.L.; Smit, A.B.; Van Minnen, J.; Geraerts, W.P.; *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2070-2076.
- Karas, M. ; Bahr, U. ; Strupat, K. ; Hillenkamp, F.; Tsarbopoulos, A.; Pramanik, B.N.; *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 675-679.
- Karas, M.; Ehring, H.; Nordhoff, E.; Stahl, B.; Strupat, K.; Hillenkamp, F.; Grehl, M.; Krebs, B.; *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28*, 1476.
- Karas, M.; Hillenkamp, F.; *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299-2301.
- Keough, T.; Youngquist, R.S.; Lacey, M.P.; *Proc. Natl. Sci. USA*, **1999**, *96*, 7131-7136.
- Keough, T.; Youngquist, R.S.; Lacey, M.P.; *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 156A-165A.
- Kirpekar, F. ; Berkenkamp, S. ; Hillenkamp, F. ; *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 2334-2339.
- Laugesen, S.; Roepstorff, P.; *J Am Soc Mass Spectrom.* **2003**, *14*, 992-1002.
- Lecchi, P. ; Le, H.M.T. ; Pannel, L.K. ; *Nucleic Acids Research*, **1995**, *23*, 1276-1277.
- Lee, Y.H.; Kim, M.S.; Choie, W.S.; Min, H.K.; Lee, S.W.; *Proteomics*, **2004**, *4*, 1684-1694.
- Leuthold, L.A.; Mandscheff, J.F.; Fathl, M.; Glroud, C.; Augsburg, M.; Vareslo, E.; Hopfgartner, G ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 103-110.

Li, K.W. ; hoek, R.M. ; Smith, F. ; Jimenez, C.R. ; Van Der Schors, R.C. ; Van Veelen, P.A. ; Chen, S. ; Van der Greef, J. ; Parish, D.C. ; Benjamin, P.R.; *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 30288-30292.

Li, L.; Garden, R.W.; Romanova, E.V.; Sweedler, J.V.; *Anal. Chem* **1999**, *15*, 5451-5458.

Li, Y.L.; Gross, M.L. *J Am Soc Mass Spectrom.* **2004**, *15*, 1833-1837.

Lin, Y.S.; Chen, Y.C.; *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5793-5798.

Liu, Q.; Xie, F.; Siedalk, S.L.; Nunomura, A.; Honda, K.; Moreira, P.I.; Zhua, X.; Smith, M.A.; Perry, G.; *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, **61**, 3057-3075.

Luebbert, C.; Ziegmann, C.; Schuereberg, M.; **2005**, *Poster présenté au congrès HUPO*, (Munich).

Luxembourg, S.L.; McDonnell, L.A.; Mize, T.H.; Heeren, R.M.; *J. proteome Res.* **2005**, *4*, 671-673.

Luxembourg, S.L.; Mize, T.H.; McDonnell, L.A.; Heeren, R.M.; *Anal. Chem* **2004**, *15*, 5339-5344.

Maarten-Altelaar, A.F.; Klinkert, I.; Jalink, K.; De Lange, R.P.J.; Adan, R.A.H.; Heeren, R.M.A.; Piersma, S.R.; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 734-742.

Maarten-Altelaar, A.F.; Minnen, J.V.; Jimenez, C.R.; Heeren, R.M.A.; Piersma, S.R.; *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 735-741.

Mamyryn, B.A.; Karataev, V.I.; Schmikk, D.V.; Zagulin, V.A.; *Sov. Phys. JETP.*; **1973**, *37*, 45-48.

Mank, M.; Stahl, B.; Boehm, G. *Anal.Chem.* **2004**, *10*, 2939-2950.

Marekov, I.N.; Steinert, P.M.; *J. Mass. Spectrom.* **2003**, *38*, 373-377.

Masumori, N.; Thomas, T.Z.; Chaurand, P.; Case, T.; Paul, M.; Kasper, S.; Caprioli, R.M.; Tsukamoto, T.; Shapell, S.B.; Matusik R.J.; *CancerRes.* **2001**, *61*, 2239-2249.

McDonnell, L.A.; heeren, R.M.A.; de Lange, R.P.J.; Fletcher, I.W.; *J Am Soc Mass Spectrom.* **2006**, *17*, 1041-1048.

McNaught, K.P. ; Olanow, C.W. ; Halliwell, B.; Isacson, O.; Jenner, P.; *Nature Reviews Neurosciences*, **2001**, *2*, 589-594.

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.; *Molecular and Cellular Proteomics*. **2006**, (sous presse).

Metz, B.; Kesrstein G.F.A.; Hoogheroot, P.; Brugghe, F.H.; Timmermans, H.A.M.; De Jong, A.; Meiring, H.; Hove, T.J.; Hennink W.E.; Crommelin D.J.A.; Jiskoot, W.; *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 6235-6243.

Moghaddam, M.Z.; Heinzle, E.; Tholey, A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 141-148.

Moroz, L.L.; Gillette, R.; Sweedler, J.V.; *J. Exp. Biol.* **1999**, 262, 333-341.

Murphy, R. C.; Fiedler, J.; Hevko, J. *Chem Rev* **2001**, 101, 479-526.

Naora, H. ; Montell, D.J. ; *Nature Reviews Cancer*, **2005**, 5, 355-366.

Nokinov, A.; Caroff, M.; Della-Negra, S.; Lebeyec, Y.; Pautrat, M.; Schultz, J.A.; Tempez, A.; Wang, H.Y.; Jackson, S.N.; Woods, A.S.; *Anal Chem* **2004**, 76, 7288-7293.

Nordhoff, E. ; Kirpekar, F. ; Karas, M. ; Cramer, R.; Hahner, S.; Hillenkamp F.; Kristiansen, K.; Roepstorff, P.; Lezius, A.; *Nucleic Acids Res*, **1994**, 22, 2460-2465.

Nordhoff, E. ; Kirpekar, F. ; Roepstorff, P. ; *Mass Spectrom. Rev.* **1996**, 16, 67-138.

Nygren, H.; Malmberg, P.; Kriegeskotte, C.; Arlinghaus, H.F.; *FEBS Lett.* **2004**, 566, 291-293.

Olejnik, J. ; Krzymanska-Olejnik, E. ; Rothschild, K.J. ; *Nucleic Acids Res*, **1998**, 26, 3572-3576.

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

Ostrowski, S.G. ; Szakal, C. ; Kozole, J. ; Roddy, T.P. ; Xu, J. ; Ewing, A.G. ; Winograd, N. ; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6190-6196.

Pacholski, M.L. ; Winograd, N. ; *Chem Rev*, **1999**, 99, 2977-3005.

Palacino, J.J.; Sagi, D.; Goldberg, M.S.; Krauss, S.; Motz, C.; Wacker, M.; Klose, J.; Shen, J.; *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 18614-18622.

Palmer-Toy, D.E.; Krastins, B.; Sarracino, D.A.; Nadol, J.B.; Merchant, S.N.; *J Proteome Res.* **2005**, 4, 2404-2411.

Pastoris, O.; Dossena, M. ; Foppa, P. ; Catapano, M.; Ferrari, R. ; Dagani, F. ; *Pharm Res* **1995**, 31, 361-369.

Pierson, J. ; Norris, J.L. ; Haerni, H.R. ; Svenningsson, P. ; Caprioli, R.M. ; Andren, P.E. ; *J. proteome Res.* **2004**, 3, 289-295.

Pierson, J. ; Svenningsson, P. ; Caprioli, R.M. ; Andren, P.E. ; *J. proteome Res.* **2005**, 4, 223-226.

Pulfer, M.; Murphy, R. C. *Mass Spectrom Rev* **2003**, 22, 332-364

Pulfer, M.; Murphy, R. C. *Mass Spectrom Rev* **2003**, 22, 332-364.

Rapkiewicz, A.V.; Espina, V.; Petricoin III, E.F.; Liotta, L.A.; *European Journal of Cancer*, **2004**, 40, 2604-2612.

Rechsteiner, M.; Hill, C.P.; *Trends in Cell Biology*, **2005**.

Reyzer, M.L. Caprioli, R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 1081-1092.

Reyzer, M.L.; Caprioli, R.M.; *J. proteome Res.* **2005**, 4, 1138-1142.

Reyzer, M.L.; Caprioli, R.M.; *Journal of Proteome Research*, **2005**, 4, 1138-1142.

Rodriguez-Cruz, S.E. ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 53-60.

Rosty, C.; Christa, L.; Kuzdzal, S.; Baldwin, W.M.; Zahurak, M.L.; Carnot, F.; Chan, D.W.; Canto, M.; Lillemoe, K.D.; Cameron, J.L.; Yeo, C.J.; Hruban, R.H.; Goggling, M.; *Cancer Research*, **2002**, 62, 1868-1875.

Rubakhin, S.S.; Garde, R.W.; Fuller, R.R.; Sweedler, J.V.; *Nat. Biotechnol*, **2000**, 18, 172-175.

Rubakhin, S.S.; Greenough, W.T. ; Sweedler, J.V.; *Anal. Chem* **2003**, 75, 5374-5380.

Rubakhin, S.S.; Jurchen, J.C.; Monroe, E.B.; Sweedler, J.V. **2005**, *Drug Discovery Today*, Vol 10, Number 12.

Rujoi, M. ; Estrada, R. ; Yappert, M.C. ; *Anal Chem* **2004**, 76, 1657-1663.

Santos, L.S.; Haddad R.; Höehr, N.F.; Pilli, R.A.; Eberlin, M.N.; *Anal.Chem.* **2004**, 76, 2144-2147.

Schiller, J. ; Arnhold, J. ; Glander, H.J. ; Arnold, K. ; *Chemistry and Physics of Lipids*, **2000**, 106, 145-146.

Schiller, J. ; Hammerschmidt, S.; Wirtz, H.; Arnhold, J. ; Arnold, K. ; *Chemistry and Physics of Lipids*, **2001**, 112, 67-69.

Schwartz, S.A.; Reyzer, M.L.; Caprioli, R.M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, 38, 699-708

- Schwartz, S.A.; Weil, R.J.; Johnson, M.D.; Toms, S.A.; Caprioli, R.M.; *Clin. CancerRes.* **2004**, *10*, 981-987.
- Schwartz, S.A.; Weil, R.J.; Thompson, R.C.; Shyr, Y.; Moore, J.H.; Toms, S.A.; Johnson, M.D.; Caprioli, R.M.; *CancerRes.* **2005**, *65*, 7674-7681.
- Seydel, U. ; Lindner, B. ; *Biomed. Environ. Mass Spectrom*, **1988**, *16*, 457-459.
- Shahgholi, M.; Garcia, B.A.; Chiu, N.H.L. ; Heaney, P.J.; Tang, K.; *Nucleic Acids Research*, **2001**, *19*, 1-10.
- Shi, S.R.; Imam, A.; Young, L.; Cote, R.J.; Taylor, R.C.; *J. Histochem. Cytochem.*, **1995**, *43*, 193-201.
- Skold, K.; Svensson, M.; Nilson, A.; Zhang, Nydahl, K.; Caprioli, R.M.; Svenningsson, P.; Andrén, P.E.; *J. proteome Res.* **2006**, *5*, 262-269.
- Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Jaeger, E.; *Rapid. Comm. Mass. Spectrom* **1992**, *6*, 105-108.
- Spengler, B.; Hubert, M.; *J Am Soc Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 735-748.
- Stoeckli, M.; *Anal. Biochem*, **2002**, *311*, 33-39.
- Stoeckli, M.; Farmer, T.B.; Caprioli, R.M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493-496.
- Strey, C.W.; Spellman, D.; Stieber, A.; Gonatas, J.O.; Wang, X.; Lambris, J.D.; Gonatas, N.K.; *American Journal of Pathology*, **2004**, *165*, 1701-1718.
- Strupat, K.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; *Int. J. Mass spectrom. Ion Processes*, **1991**, *111*, 89-102.
- Taguchi, R, Hayakawa, J.; Takeuchi, Y.; Ishida, M.; *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 953-956.
- Takats, Z.; Wiseman, J.M.; Cooks, R.G.; *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 1261-1275.
- Takubo, H.; Shimoda-Matsubayashi, S.; Mizuno, Y.; *Parkinsonism and Related Disorders*, **2003**, *9*, S43-S46.
- Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151-153.
- Taylor, C.W.; *Cell*, **2002**, *111*, 767-769.
- Tempez, A.; Ugarov, M.; Egan, T.; Schultz, J.A.; Nokinov, A.; Della-Negra, S.; Lebeyec, Y.; Pautrat, M.; Caroff, M.; Smentkowski, V.S.; Wang, H.Y.; Jackson, S.N.; Woods, A.S.; *J. Proteome Res.* **2005**, *4*, 540-554.

- Tholey, A.; Heinzle, E.; *Anal. Bioanal Chem* **2006**, publication en ligne.
- Tholey, A.; Moghaddam, M.Z.; Heinzle, E, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 291-297.
- Todd, P.J.; Schaaff, G.; Chaurand, P.; Caprioli, R.M.; *J. Mass Spectrom*, **2001**, 36, 355-369.
- Touboul, D. ; Brunelle, A. ; Halgand, F.; De La Porte, S. ; Laprevote, O. ; *J. Lipid. Res.* ; **2005**, 46, 1388-1395.
- Touboul, D. ; Brunelle, A. ; Laprevote, O. ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 703-709.
- Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A; Kersting, R. ; Tallarek, E.; Hagenhoff, B.; Laprevote, O.; *Anal. Chem.* **2004**, 76, 1550-1559.
- Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprevote, O.; *J Am Soc Mass Spectrom.* **2005**, 16, 1608-1618.
- Vestal M.L.; Juhasz, P.; Martin, S.A.; *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* **1995**, 9, 1044-1050.
- Walker et al.; Walker's Research Group (*Washington University*), www.chemistry.wustl.edu/~walker/sims_exp.gif.
- Wang et coll, *Anal Chem* **2005**
- Welton, T.; *Chem. Rev.* **1999**, 22, 2071-2083.
- Weston, D.J.; Bateman, R.; Wilson, I.D.; Wood, T.R.; Creaser, C.S.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7572-7580.
- Wiley, W.C.; Mc Laren, J.B.; *Rev. Sci. Instrum.*, **1955**, 26, 1150-1157.
- Winograd, N.; *Anal. Chem.* **2005**, 77, 142A-149A.
- Wiseman, J.M. ; Puolitaival, S.M. ; takats, Z. ; Cooks, R.G.; Caprioli, R.M.; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7094-7097.
- Wu, K.J. ; Odom, R.W. ; *Anal. Chem.* **1996**, 68, 573-882.
- Wu, K.J.; Steding, A.; Becker, C.H.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, 7, 142-146.
- Xu, B.J.; Caprioli, R.M.; sanders, M.E.; jensen, R.A.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, 1292-1297.
- Xu, S. ; Mingliang, Y. ; Xu, D. ; Li, X.; Pan, C.; Zou, H.; *Anal. Chem.* **2006**, 78, 2593-2599.
- Zenobi, R. ; Knochenmuss, R. ; *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, 337-366.
- Zhou, L. ; Deng, H. ; Deng, Q.; Zhao, S.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 787-794.

ANNEXES

I) Quelques mots sur les analyseurs utilisés...

1) L'analyseur à temps de vol

Développé par Wiley et Mac laren en 1955, le temps de vol repose sur le fait qu'il est possible de connaître le rapport m/z lorsque on connaît l'énergie cinétique et la vitesse d'un ion.

Ainsi, si l'on connaît le potentiel d'accélération initial de l'ion et la distance qu'il doit parcourir, il est possible de relier le temps de vol au rapport m/z .

Tous les ions possèdent la même énergie cinétique, fonction du potentiel d'accélération, mais des ions de masse différentes forment une hétérogénéité en terme de vitesse. Par conséquent, un ion léger arrivera plus rapidement au détecteur qu'un ion lourd à énergie cinétique égale.

Pour être viable, le temps de vol requiert l'introduction des ions par paquets ce qui le rend particulièrement adapté aux sources MALDI où les lasers utilisés sont des lasers pulsés.

Le temps de vol ne procédant à aucun balayage, tous les ions introduits sont détectés ce qui rend le tandem MALDI/TOF particulièrement sensible.

En mode linéaire, le temps de vol souffre d'un manque de résolution du d'une part à la dispersion spatiale des ions causée par le caractère pulsé de l'analyse et d'autre part par la dispersion en énergie cinétique des ions.

L'extraction retardée (Brown et coll *Anal.chem.* 1995) permet de compenser la dispersion spatiale et la dispersion en vitesse peut être contrebalancée par l'utilisation d'un réflecteur électrostatique appelé réflectron (Mamyrin et coll, *Sov. Phys. JETP.*; **1973**).

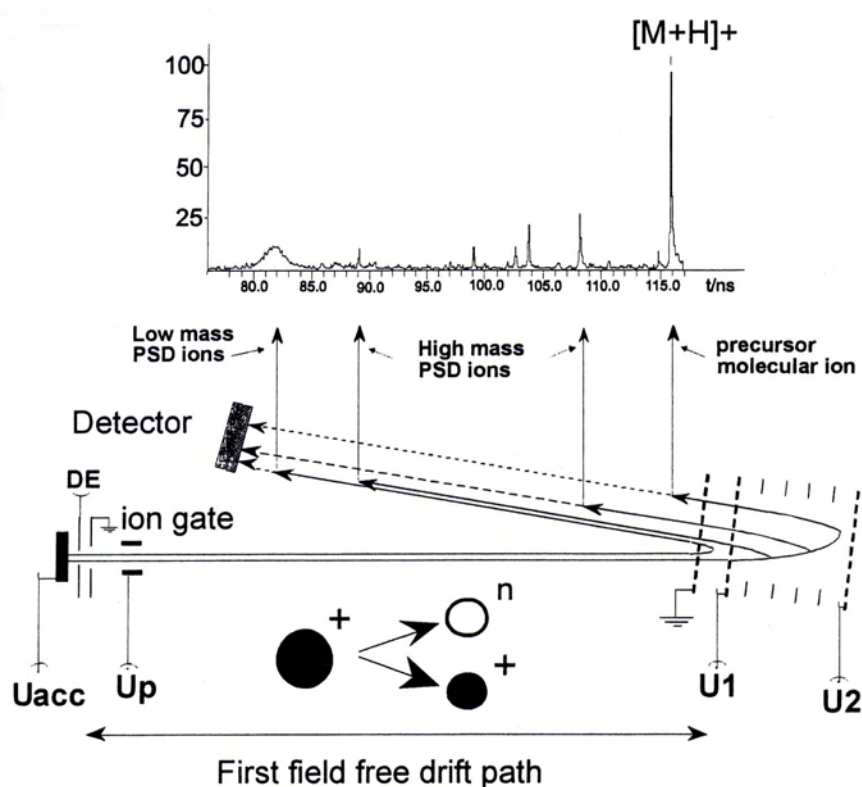


Figure 1 : Principe du PSD en MALDI/TOF (Chaurand et coll, **1999**)

Son principe consiste à réfléchir les ions incidents sachant que deux ions de même masse mais avec des énergies cinétiques différentes ne pénétreront pas à la même profondeur dans le réflecteur (l'ion le plus rapide pénétrera plus profondément). (Figure 1)

Ainsi l'utilisation de ces deux systèmes permet d'obtenir des résolutions de l'ordre de 10000 (Vestal et coll, *Rapid. Comm. Mass. Spectrom.* **1995**)

L'utilisation du réflecteur permet aussi l'étude des fragmentations d'ions métastables dans le tube de vol (Spengler et coll, *Rapid. Comm. Mass. Spectrom* **1992.**) par le mode PSD. Les ions parents et les ions fils ont la même vitesse mais des énergies cinétiques et ils passeront donc des temps différents dans le réflecteur. La différence de temps de vol entre l'ion parent et les fragments permet de calculer la masse des ions fils. (Chaurand et coll, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**) (Figure 1)

2) Le piège à ions

Décrit par Paul et Steinwedel dans les années 60, le piège à ions est constitué d'une électrode circulaire chapeauté par deux calottes hyperboliques. A l'intérieur du piège, les ions suivent une trajectoire en forme selle de cheval. Les zones de stabilité des ions sont définies par les équations de Mathieu. Les répulsions mutuelles des ions conduisent à une augmentation du rayon de leur trajectoire, et une pression avec un gaz neutre permet de les reconcentrer à l'intérieur du piège.

Les ions oscillent selon une fréquence qui leur est propre et ils peuvent être expulsés et détectés suivant deux modes : dans l'ordre croissant de leur masse (« mass selective instability ») en balayant les radiofréquences (électrode circulaire) ou en appliquant des tensions alternatives aux électrodes externes provoquant une destabilisation de leur trajectoire (et leur expulsion du piège) ; c'est l'expulsion résonante. Ce mode combiné avec avec une réduction de la vitesse de balayage permet d'augmenter la résolution (Cooks et coll, *Chem. Eng. News*. 1991)

Cet appareil permet d'obtenir des spectres de masse en mode full scan avec une excellente sensibilité. Au sein du piège, il est également possible de réaliser des expériences MS/MS et MSⁿ (généralement n<10). Le gaz de collision est celui utilisé pour reconcentrer les ions dans le piège (généralement de l'hélium)

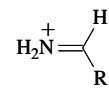
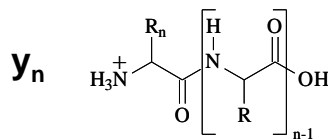
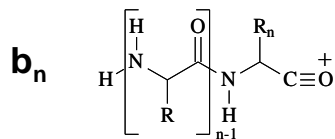
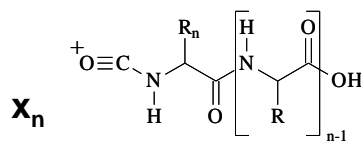
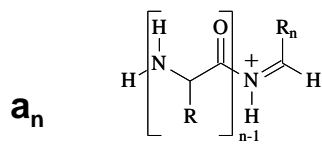
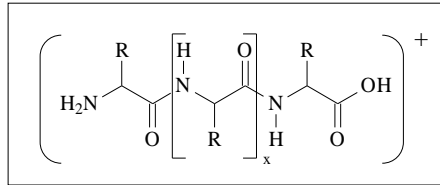
II) Caractéristiques physico-chimiques des acides aminés...

Acide aminé	Code	Masse de l'acide aminé entier	Masse du résidu impliqué dans le peptide/ la protéine	pH iso-électrique ^a
Glycine	Gly (G)	75	57	6,0
Alanine	Ala (A)	89	71	6,0
Sérine	Ser (S)	105	87	5,7
Proline	Pro (P)	115	97	6,3
Valine	Val (V)	117	99	6,0
Thréonine	Thr (T)	119	101	5,6
Homosérine (Met, clivage CNBr, milieu basique)	Hs	119		
Homosérine Lactone (Met, clivage CNBr, milieu acide)	Hsl	101		
Cystéine	Cys (C)	121	103	5,1
Isoleucine	Ile (I)	131	113	6,0
Leucine	Leu (L)	131	113	6,0
Asparagine	Asn (N)	132	114	5,4
Acide aspartique	Asp (D)	133	115	2,8
Glutamine	Gln (Q)	146	128	5,7
Lysine	Lys (K)	146	128	9,7
Acide glutamique	Glu (E)	147	129	3,2
Méthionine	Met (M)	149	131	5,7

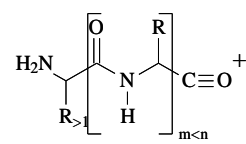
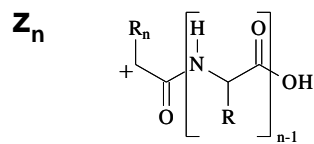
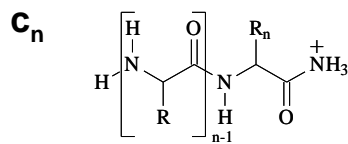
Histidine	His (H)	155	137	7,6
Phénylalanine	Phe (F)	165	147	5,5
Arginine	Arg (R)	174	156	10,8
Cystéine carbamido- méthylée	Cam	178	160	
Cystéine carboxy- méthylée	CmC	179	161	
Tyrosine	Tyr (Y)	181	163	5,7
Tryptophane	Trp (W)	204	186	6,0

III) Séquençage des peptides par spectrométrie de masse en tandem

(MS/MS) : nomenclature



Ion immonium



Fragment interne

ions fragments N-term
(1 liaison clivée)

ions fragments C-term
(1 liaison clivée)

2 liaisons clivées

IV) Les méthodes de clivages enzymatiques...

Enzyme	Site de clivage	Conditions
Endoprotéases		
Trypsine	Après Arg et Lys	pH 8,0-8,5
Chymotrypsine	Surtout après Tyr, Phe et Trp mais aussi après Ala, Leu et Met	pH 7,5-8,5
Endoprotéase <i>S. aureus</i> V8 Endoprotéase Glu-C	Après Glu, Asp Après Glu	<u>Glu</u> : pH 7,8 dans tampon bicarbonate ammonium ou pH 4,0 acétate ammonium 8,0 <u>Glu + Asp</u> : pH 7,8 avec tampon phosphate
Endoprotéase Asp-N	Avant Asp et acide cystéique	pH 6,0-8,5
Endoprotéase Lys-C	Après Lys	pH 8,5
Endoprotéase Arg-C	Après Arg	pH 8
Pepsine	Après Tyr, Phe, Trp et Leu	pH < 2,0 : Phe, Leu pH > 2,0 : Phe, Leu, Trp, Tyr, Ala, Glu, Gln
Thermolysine	Avant Leu, Ile, Met, Val, Phe et Trp	7,0-9,0
Proteinase K	Non spécifique	7,5-12,0
Exoprotéases		
Carboxypeptidase A	Tout résidu C-term	8,0
Carboxypeptidase B	Coupe à Arg, Lys et Orn	8,0
Carboxypeptidase P	Tout résidu C-term	3,7
Carboxypeptidase Y	Tout résidu C-term	6,0
Aminopeptidase M	Coupe résidu N-term principalement di- et tripeptides	7,2