



HAL
open science

Développements en Imagerie par Spectrométrie de Masse MALDI et Applications aux Problématiques Biologiques

I. Fournier

► **To cite this version:**

I. Fournier. Développements en Imagerie par Spectrométrie de Masse MALDI et Applications aux Problématiques Biologiques. Sciences pharmaceutiques. Université des Sciences et Technologie de Lille - Lille I, 2005. tel-00167305

HAL Id: tel-00167305

<https://theses.hal.science/tel-00167305>

Submitted on 18 Aug 2007

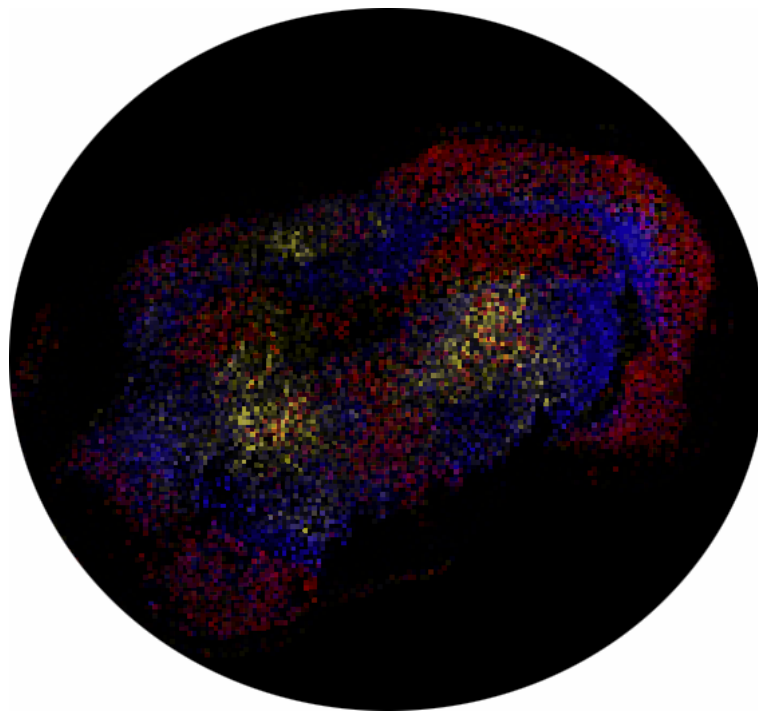
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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.

Mémoire d'Habilitation à Diriger les Recherches

Développements en Imagerie par
Spectrométrie de Masse MALDI et
Applications aux Problématiques Biologiques

Isabelle Fournier



MEMBRES DU JURY

Président :

✓ Pr. Lucien LECLERCQ

Rapporteurs :

✓ Pr. Pierre CHAURAND

✓ DR Jean-louis DACHEUX

✓ Pr. Michel MATHIEU

Examineurs :

✓ Pr. Franz HILLENKAMP

✓ Dr. Markus STOECKLI

✓ Pr. Jean-Claude TABET

CURRICULUM VITAE

1995-1996 ▶ D.E.A de Spectrochimie, Analyse et Physicochimie Organiques, Université P et M. Curie, Paris VI

▶ Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, UMR 7613, Université P et M. Curie, ParisVI, (PR. Jean-Claude Tabet)

▶ Etude par Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice du séquençage chimique de peptides

1996-2000 ▶ Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique, UMR 7613, Université P et M. Curie, ParisVI, (PR. Jean-Claude Tabet)

▶ Thèse obtenue le 26 Avril 2000 à l'Université P. et M. Curie, mention très honorable.

▶ Contribution à l'étude des mécanismes physico-chimiques impliqués dans la désorption/ionisation laser assistée par matrice

▶ Composition du jury : Mr Yvon Lebeyec (rapporteur et président du jury)
Mr Jean-François Muller (rapporteur)
Mr Michael Karas (examineur)
Mr Christian Rolando (examineur)
Mr Pierre Gouzerh (examineur)
Mr Gérard Bolbach (examineur)
Mr Jean-Claude Tabet (examineur)

2000-2001 Stage post-doctoral (15 Mai 2000-31 Août 2001) à l'Université J. W. Goethe de Frankfurt, "Instrumentelle Analytische Chemie" (PR. Michael Karas)

2001-2002 Stage post-doctoral (01 Septembre 2001-30 Septembre 2002) au laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, UMR 8017, Université des Sciences et Technologies de Lille (PR. Michel Salzet)

2002-2003 ATER (01 Octobre 2002-31 Janvier 2003) au laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, UMR 8017, Université des Sciences et Technologies de Lille (PR. Michel Salzet)

2003-2004 Maître de Conférences depuis le 01 Février 2003 au laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, UMR 8017, Université des Sciences et Technologies de Lille (PR. Michel Salzet)
1^{ère} année d'inscription en HDR

01/02/2004 Titularisation aux fonctions de Maître de Conférences

2004-2005 Equipe labellisée ACI « jeunes chercheurs », Septembre 2004
Développement, sur coupes de tissus ou biopsies, de technologies d'imagerie de peptides/protéines et de transcrits par spectrométrie de masse MALDI-TOF : IMAGER-MALDI

✓ *Publications et présentations*

- ▶ 15 publications dans des revues internationales et 3 enveloppes Soleau et 2 brevets internationaux, ainsi que 13 proceedings
- ▶ Communications dans différents congrès nationaux et internationaux dont 6 communications orales (5 conférences invitées) et plusieurs communications par affiche
- ▶ Prime d'Encadrement de Recherche depuis 2004
- ▶ Bourse de la Fondation de la Recherche Médicale, 2002-2003
- ▶ ACI jeunes chercheurs, 2004

✓ Encadrements

▶ 2005

- ▶ Thèse de N. Ben Larbi (bourse MNERT), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Thèse de R. Lemaire (bourse INRA), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Thèse de M. Wisztorski (Bourse Région Nord-Pas de Calais et Phenoswitch, Biosciences Inc.), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Thèse de O. Jardin-Mathé (Financement Génoscreen), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Thèse de J. Stauber (Bourse co-financé par le NSF), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Stage de Master 2 Interface Physico Chimie du Vivant, Lille 1 de K. Arafat, codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Stage de Master 2 Interface Physico Chimie du Vivant, Lille 1 de C. Delahye, codirection avec les Dr. F. Croq et R. Boukherroub
- ▶ Stage de Master 2 Sciences Chirurgicales, Kremlin-Bicêtre de S. Ait Menguellet, codirection avec le Pr. M. Salzet

▶ 2004

- ▶ Stage de DESS de Bioinformatique, Lille 1 de O. Jardin-Mathé
- ▶ Thèse de N. Ben Larbi (bourse MNERT), codirection avec le Pr. M. Salzet
- ▶ Thèse de R. Lemaire (bourse INRA, Paris 6), codirection avec le Pr. M. Salzet

- ▶ Thèse de M. Wisztorski (bourse région Nord-Pas de Calais et Phenoswitch, Biosciences Inc.), codirection avec le Pr. M. Salzet

▶ **2003 :**

- ▶ Stage d'IUP de Génomique et Protéomique, Lille 1 de S. Lecher
- ▶ Stage de DESS de Protéomique, Lille 1 de M. Wisztorski
- ▶ Thèse de N. Ben Larbi (bourse MNERT), codirection avec le Pr. M. Salzet

✓ *Thématique*

- ▶ Recherches fondamentales sur la technique de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice afin d'obtenir des informations supplémentaires sur les processus de désorption/ionisation.
- ▶ Application de la technique de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice pour des problématiques appliquées et notamment en biologie.
- ▶ Développements technologiques de spectrométrie de masse appliqués à la recherche en biologie.
- ▶ Développement de techniques d'analyse directes de tissus par spectrométrie de masse type MALDI-TOF

▶ *Travaux de Recherche dans le cadre du stage de D.E.A.*

- ▶ Etude de la faisabilité d'un séquençage chimique dit en échelon suivi d'une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF sur un peptide modèle ramifié dans le but d'une application à la détermination des sites d'attachements d'un neuropeptide, la Substance P, sur son récepteur membranaire NK-1.

▶ *Travaux de Recherche dans le cadre de la thèse*

- ▶ Etudes fondamentales des mécanismes physicochimiques impliqués dans la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI). Recherche d'une amélioration des capacités de ce type d'instruments par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués.

-Etude des modifications de surface et de la quantité de matière éjectée à partir de monocristaux de matrice après irradiation laser

-Etude de la dynamique d'éjection des ions au travers de l'évolution du profil temps de vol des pics des ions caractéristiques en fonction des conditions d'extraction de la source

-Etude de l'énergie interne des ions en phase gazeuse au travers de la nature et de l'intensité des ions fragments en fonction des différents paramètres instrumentaux

▶ Etude de la dégradation de matériaux en polyamide 11 par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le cadre d'une collaboration avec l'Institut Français du Pétrole suivie d'une étude des processus de fragmentations de différents polyamides.

▶ Etude de l'action de produits cosmétiques sur les cheveux, la peau ou les ongles par spectrométrie de masse MALDI-TOF dans le cadre d'une collaboration avec la société L'ORÉAL

▶ Etude de dérivés organophosphorés et organosylilés de polyoxométalates lacunaires par spectrométrie de masse MALDI-TOF

▶ Travaux de Recherche dans le cadre des stages Post-Doctoraux

-A l'université J. W. Goethe de Frankfurt

▶ Continuité des travaux de recherche fondamentaux sur les mécanismes fondamentaux impliqués en MALDI.

-Etude des modifications de surface et détermination de la structure de monocristaux pour une autre matrice

-Etude de l'incorporation et des mécanismes d'ionisation des analytes en MALDI à l'aide d'indicateurs de pH colorés

-Etude de la distribution des ions en MALDI pour différentes matrices et types de préparations par la mesure des vitesses initiales axiales et radiales

▶ Etude de la possibilité du diagnostic des complications tardives chez les patients atteints de diabète par spectrométrie de masse MALDI-TOF via l'étude du couplage des protéines glycosylées sur leur anticorps en collaboration avec la société Roche-Boehringer

▶ Etude de dérivations de peptides et leur effet sur la qualité et la simplification des spectres de masse MS/MS en Electrospray

Je dirige une équipe reconnue ACI jeunes Chercheur (2004) portant sur les développements en imagerie MALDI et les applications biologiques. Anal Chem. 1999 Dec 15;71(24):5451-8 Ces applications sont à deux niveaux *i.e.* au niveau fondamental portant sur la régénération chez la sangsue et au niveau appliqué sur la recherche de biomarqueurs dans le cadre des maladies neurodégénératives et le cancer de l'ovaire.

✓ Les activités de recherche du laboratoire ces dernières années ont été axées sur :

▶ L'étude de l'interrelation entre les systèmes immunitaire et nerveux chez la sangsue

▶ L'étude des mécanismes de régénération du système nerveux chez ce même modèle

✓ Le projet de recherche proposé s'inscrit en continuité de ces précédentes études et vise à :

▶ Mettre en évidence et suivre la biosynthèse des marqueurs de la réponse immune au niveau du système nerveux

▶ Mettre en évidence des marqueurs de la régénération nerveuse et mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans ces mécanismes de réparation.

▶ Rechercher les biomarqueurs impliqués dans les maladies Neurodégénératives *i.e.*, Maladies de Parkinson, Alzheimer et la dégénérescence maculaire dans le but de trouver des marqueurs spécifiques qui peuvent être moduler chez la sangsue.

1. I. Fournier, R. C. Beavis, J. C. Blais, J. C. Tabet, G. Bolbach,
Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes (1997) 169/170, 19-29,
Hysteresis effect observed in MALDI using oriented, protein-doped matrix crystals
2. C. Mayer, I. Fournier, R. Thouvenot,
Chem. Eur. J. (2000) 6, 105-110,
Bis- and tetrakis(organosilyl) Decatungstosilicate, $[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}(\text{RSi})_2\text{O}]^{4-}$ and $[\gamma\text{-SiW}_{10}\text{O}_{36}(\text{RSiO})_4]^{4-}$: Synthesis and Structural Determination by Multinuclear NMR Spectroscopy and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry
3. I. Fournier, P. Chaurand, G. Bolbach, F. Lützenkirchen, B. Spengler, J.C. Tabet,
J. Mass Spectrom. (2000) 35, 1425-1433,
Sequencing of a branched peptide using Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time-of-flight mass spectrometry
4. R. Krüger, A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann, M. Karas,
Anal. Chem. (2001) 73, 5812-5821,
Analyte Incorporation and Ionization in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Visualized by pH Indicator Molecular Probes
5. I. Fournier, A. Brunot, J.C. Tabet, G. Bolbach,
Int. J. Mass Spectrom. (2002) 213, 203-215,
Delayed Extraction Experiments using a Repulsing Potential Before Ion Extraction: Evidence of Clusters as Ion Precursors in UV-MALDI. Part I: Dynamical Effects with the matrix 2,5-DHB
6. I. Fournier, A. Marie, D. Lesage, G. Bolbach, F. Fournier, J.C. Tabet,
Rapid. Commun. Mass Spectrom., (2002) 16, 1-9,
Post-source Decay time-of-Flight Study of Fragmentation Mechanisms of Protonated Synthetic Polymers under Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Conditions

7. I. Fournier, J.C. Tabet, G. Bolbach,
Int. J. Mass Spectrom., (2002) 219, 515-523,
Irradiation Effects in MALDI and Surface modifications. Part I: Sinapinic Acid Monocrystals

8. I. Fournier, R. Day, M. Salzet,
Neuroendocrinol. Lett (2003) 24, 9-14.
Direct analysis of neuropeptides by *in situ* MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain

9. M. Karas, U. Bahr, I. Fournier, M. Glückmann, A. Pfenninger,
Int. J. Mass Spectrom (2003) 226, 239-248,
The Initial-Ion Velocity as a Marker for Different Desorption-Ionization Mechanisms in MALDI

10. I. Fournier, C. Marinach, J. C. Tabet, G. Bolbach,
J. Am. Soc. Mass Spectrom. (2003) 14, 893-899,
Irradiation Effects in MALDI, Ablation, Ion Production, and Surface Modifications. Part II : 2,5-Dihydroxybenzoic Acid Monocrystals

11. N. Srour, A. Lebel, S. McMahon, I. Fournier, M. Fugere, R. Day, CM. Dubois,
FEBS Lett. (2003) 554, 275-283,
TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity.

12. F. D'Anjou, LJ. Bergeron, N. Ben Larbi, I. Fournier, M. Salzet, JP. Perreault, R. Day,
J Biol Chem. (2004) 279(14),14232-14239,
Silencing of SPC2 expression using an engineered delta ribozyme in the mouse beta TC-3 endocrine cell line.

13. I. Fournier, A. Brunot, J.C. Tabet, G. Bolbach,
J. Mass Spectrom. (2005) 40(1), 50-59,
Delayed Extraction Experiments using a Repulsing Potential Before Ion Extraction: Evidence of Clusters as Ion Precursors in UV-MALDI. Part II-Dynamical Effects with the matrix α -cyano-hydroxycinnamic acid

14. G. Lansac, W. Dong, C. M. Dubois, N. BenLarbi, C.Afonso, I. Fournier, M. Salzet, R. Day.
J.Neuroimmunol. (2005) Sous presse
Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen
15. R. Lemaire, J.C. Tabet, P. Ducoroy, J.B. Hendra, M.Salzet, I. Fournier
Anal. Chem. (en revision)
Anal Chem. 1999 Dec 15;71(24):5451-8
Solid ionic matrices for direct tissue analysis and Maldi Imaging

BREVETS

1. I. Fournier, M. Dechamps, R. Lemaire, M. Wisztorski, J.C. Tabet, M. Salzet,
Enveloppe Soleau (2004), N° 195205 040504 (INPI)
Développement d'un Kit d'hybridation et de détection des ARNm par spectrométrie de masse MALDI/TOF : Oligopeptide, Tag-Mass
2. Lemaire R., Fournier I., Tabet J.C., Salzet M. (2004)
Enveloppe Soleau (2004), N°207748 011004 (INPI)
Utilisation de matrices ioniques pour l'analyse directe de tissus par spectrométrie de masse MALDI.
3. I. Fournier, R. Lemaire, M. Dechamps, J.C. Tabet, M. Salzet (2005)
US patent (2005) N°60/687,848
Use of ionic matrix and Tagmass for MS analysis of tissues
4. M. Wisztorski, V. Thomy, I. Fournier, M. Salzet
Enveloppe Soleau (2005), N°237719 (INPI)
Développement de masques conducteurs en vue de l'optimisation de l'imagerie par spectrométrie de masse

REMERCEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Lucien Leclercq de m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury,

Toute ma reconnaissance va à Monsieur le Professeur Pierre Chaurand, Monsieur le Directeur de Recherche Jean-Louis Dacheux et Monsieur le Professeur Michel Mathieu d'avoir bien voulu être rapporteur de ces recherches,

Mes plus chaleureux remerciements à Monsieur le Professeur Franz Hillenkamp qui m'a fait le grand honneur de bien vouloir examiner ce travail,

Ma plus grande gratitude également à Monsieur le Docteur Markus Stoeckli d'avoir également accepté la charge d'examiner ce travail et pour l'aide qu'il nous a donné,

Enfin, un grand merci à Monsieur le Professeur Jean-Claude Tabet, également examinateur de ce mémoire, et tout particulièrement pour son enthousiasme communicatif et les connaissances qu'il m'a transmises depuis mes débuts,

Un grand merci à tous les étudiants du groupe imagerie, pour leur gentillesse, leur enthousiasme, leur volonté à toujours accepter les défis proposés et la bonne humeur du groupe ; sans eux tout aurait été très différent,

Sans oublier non plus Mme Annie Desmons et Mme Christelle Van Camp pour leur participation à ces recherches, pour cela, mes plus vifs remerciements

Mes plus sincères remerciements vont à Monsieur le Docteur Patrick Ducoroy pour s'être investi dans l'imagerie et son amitié, je n'oublie pas non plus Jean-Baptiste Hendra qui travaille avec lui,

Un grand merci à toute l'équipe des chirurgiens de l'hôpital Jeanne de Flandre, Monsieur le Professeur Denis Vinatier, à Monsieur le Docteur Jean-Philippe Lucot et Monsieur le Docteur Pierre Collinet, pour leur confiance et leur amitié

A Monsieur le Docteur Vincent Thomy et Monsieur le Professeur Jean-Luc Camart, pour leur implication dans le projet, un grand merci

Enfin, à la société Bruker Daltonics avec laquelle nous développons une collaboration, et espérons l'eux beaucoup de développements futurs intéressants,

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	10
L'IMAGERIE MALDI	20
I. LES SOURCES MALDI	21
II. LE PRINCIPE DE L'ACQUISITION D'IMAGES	22
III. ETAT DE L'ART	25
RESULTATS	35
CHAPITRE I. IMAGERIE MALDI DES PEPTIDES ET PROTEINES : DEVELOPPEMENTS	36
I. DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MATRICES POUR L'IMAGERIE MALDI : LES MATRICES IONIQUES SOLIDES	37
1. Matrices et analyses des tissus	37
2. Des liquides ioniques aux matrices ioniques	38
3. Procédés de synthèse	39
4. Evaluation sur standards	40
5. Matrices ioniques et analyse de tissus	42
6. Imagerie MALDI et matrices ioniques	48
7. Conclusion et perspectives	50
II. ANALYSE DE TISSUS ET TRAITEMENT DES COUPES	52
1. Traitement des coupes et extraction des lipides	53
2. Analyse à partir de tissus fixes et inclus en paraffine	58
3. Digestions <i>In Situ</i> sur tissus des protéines	61
4. Dérivations N-terminales des peptides <i>In situ</i> sur tissus	63
5. Conclusion et Perspectives	66
III. SURFACE ANALYSE ET QUALITE DES IMAGES : UTILISATION DE MASQUES	68
1. Présentation de la Problématique	68
2. Présentation des systèmes de masques	70
3. Procédés de fabrication des masques	70
4. Utilisation des Caches pour l'Analyse Directe de Tissus en MALDI	71
5. Conclusion et Perspectives	74
IV. EFFETS DE CHARGE ET DEPOT DE MATERIAUX CONDUCTEURS	75
1. Effets de charge	75
2. Métallisation des échantillons	76
3. Dépôts d'or et imagerie	78
4. Conclusion et perspectives	78
CHAPITRE II. IMAGERIE DES ARNm : LE CONCEPT TAG-MASS	80
I. LE CONCEPT "TAG-MASS"	82
II. EFFICACITE DE PHOTODISSOCIATION	83
III. AMPLIFICATION D'OLIGOPEPTIDES MARQUES PAR TECHNIQUE PCR	87
IV. REALISATION DE SONDAS OLIGONUCLEOTIDIQUES MARQUEES	88
V. SONDAS OLIGONUCLEOTIDIQUES MARQUEES ET HIS	90
VI. SECONDE GENERATION DE MARQUEURS	91
VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	94
CHAPITRE III. APPLICATIONS AUX PROBLEMATIQUES BIOLOGIQUES : CAS DU CANCER DE L'OVAIRE	96
I. LE CANCER DE L'OVAIRE	97
II. ANALYSE DIRECTE DES TISSUS TUMORAUX	99
III. CARACTERISATION DES PEPTIDES POTENTIELLEMENT MARQUEURS	103
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	106
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	108

JNTRODUCTION

La spectrométrie de masse a connu aux fils des ans de nombreux développements. Les progrès technologiques, l'apparition progressive des nouveaux analyseurs et de nouvelles sources de production des ions, ont nettement contribué à ces développements. Issue des recherches en physique, l'amélioration des instruments l'a progressivement orientée dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle à la chimie au travers de l'analyse des composés organiques. Depuis les années 1970, elle se dirige progressivement vers le domaine de la biologie pour laquelle elle est devenue une technique phare pour l'analyse des biomolécules. L'apparition de nouvelles sources de production des ions dans les années 1985, les sources électrospray (ESI)¹ et de Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)^{2,3} ont définitivement ouvert cette méthode d'analyse à la biologie par la capacité de ces sources à produire des ions en phase gazeuse à partir de composés polaires, soit de nombreuses familles de biomolécules (peptides/protéines, sucres, lipides, oligonucléotides,...) et pour des masses pouvant atteindre jusqu'à 1 000 000 u. pour certaines d'entre-elles avec une énergie transférée suffisamment faible (ionisation douce) pour rendre les ions formés stables sur la durée de l'analyse et permettre l'observation des composés sous leur forme intacte. Les améliorations de la spectrométrie de masse dans le domaine de l'analyse structurale (études des fragmentations) par MS/MS en fait un élément important pour la caractérisation de ces composés et accroissent sa potentialité. La spectrométrie de masse est devenue, à l'heure actuelle, un outil incontournable et en particulier dans le domaine de la protéomique comme en témoigne les nombreuses recherches menées et publiées. De nombreuses protéines provenant des différents organismes, et même de différents organes ou cellules dans différents états physiologiques ont ainsi pu être caractérisées, avec de nombreuses études différentielles pour mettre en évidence les protéines sous ou sur modulées entre deux états physiologiques. Toutefois, cette stratégie présente un inconvénient majeur, elle nécessite l'homogénéisation de l'échantillon avant extraction puis séparation et caractérisation par spectrométrie de masse, ce qui occasionne la perte irrémédiable d'informations concernant la localisation des différents composés dans leurs tissus d'origine. Dès lors l'utilisation de cultures cellulaires d'un type cellulaire particulier pourrait constituer une bonne alternative mais dans ces conditions l'analyse se fait *ex vivo* sur des cellules hors de leur milieu d'origine et reste donc des modèles d'études qui peuvent ne refléter que partiellement les mécanismes se produisant réellement dans un organisme. Il en découle, un manque important dans les techniques permettant la réalisation de cartographie des molécules d'un point de vue moléculaire. Les approches moléculaires existantes comme l'immunohistochimie ou les techniques de microscopie utilisant un marquage avec un fluorophore ont fait leurs preuves, elles nécessitent

¹Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. ; *Science* **1989** 246(4926), 64-71

²Karas M., Hillenkamp F.; *Anal. Chem.* **1988** 60, 2299-2301

³Karas M., Hillenkamp F., Beavis R.C., Chait B.T.; *Anal. Chem.* **1991** 63, 1193A-1203A

néanmoins, que la molécule à étudier soit identifiée. Dans le cas de l'immunohistochimie, la possibilité d'obtenir des anticorps dirigés contre cette molécule n'est pas toujours évidente alors que des problèmes de réactions croisées se produisant en particulier pour des familles de protéines ou les membres sont structurellement proches. Pour les techniques de fluorescence, hormis la connaissance de la molécule cible, la difficulté de marquer la cible avec le fluorophore, les interférences possibles du marqueur sur la fonction de la protéine limite ces techniques pour la découverte de nouveaux composés. Il faut aussi noter que ces techniques présentent l'impossibilité d'étudier plusieurs composés lors d'une même expérience.

Dans un tel contexte, le développement de nouvelles technologies permettant l'analyse en une seule étape de plusieurs composés au sein de leur tissu d'origine est indispensable. La spectrométrie de masse répond parfaitement à ces critères car elle permet l'analyse de mélanges complexes en une seule étape. Son utilisation pour cartographier les composés au sein de leurs tissus d'origine offre une nouvelle dimension aux recherches dans le domaine de la biologie. La réalisation d'images est devenue possible avec les progrès technologiques et l'informatisation du traitement des données. Cette technologie est fortement conditionnée aux types de sources utilisées. La localisation de composés au sein des tissus nécessite de pouvoir travailler sur des échantillons solides pour lesquels la zone analysée est bien définie et délimitée. Seuls certaines méthodes de productions des ions répondent à ces critères, à savoir les sources pour lesquelles les ions formés proviennent du bombardement de la surface par un faisceau primaire incident qu'il soit un faisceau d'ions primaires ou un faisceau laser. Trois sources répondent plus particulièrement à ces critères, les sources de Désorption Laser (LD), les sources SIMS (Secondary ion Mass Spectrometry) et les sources MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization).

Les sources de désorption laser ont été largement utilisées comme outil d'imagerie au travers des techniques LMMS (Laser Microprobe Mass Analysis) et LAMMA (Laser Microprobe Mass Analysis)^{4,5,6,7,8,9,10}. Cette technique présente de grandes performances pour l'analyse d'éléments atomiques ou de composés de faible masse. Elle est restreinte par les propriétés d'absorption du composé étudié ainsi que son potentiel d'ionisation. Dans certains cas, beaucoup de fragmentations sont observées et dans d'autres peu d'ions seront formés. Cette méthode reste néanmoins très limitée en terme de gamme de masse.

⁴Verbueken A.H., Bruynseels F.J., Van Grieken R.E. ; *Biomed. Mass Spectrom.* **1985** 12(9):438-463

⁵Verbueken A.H., Van de Vyver F., De Broe M., Van Grieken R. ; *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **1987** 24(4), 263-285

⁶Van Vaeck L., Van Espen P., Adams F., Gijbels R. Lauwers W., Esmans E. ; *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* **1989** 18(8), 581-591

⁷Eeckhaout S., Van Vaeck L., Gijbels R., Van Grieken R.E. ; *Scanning Microsc. Suppl.* **1994** 8, 335-358

⁸Iancu T.C., Perl D.P., Sternlieb I., Lerner A., Leshinsky E., Kolodny E.H., Hsu A., Good P.F.; *Biometals* **1996** 9(1), 57-65

⁹Bakker A., Van Vaeck L., Jacob W. ; *Scanning Microsc.* **1996** 10(3):753-772

¹⁰Van Vaeck L., Poels K., De Nollin S., Hachimi A., Gijbels R. ; *Cell Biol. Int.* **1997** 21(10), 635-648.

Dans le cas du SIMS¹¹, cette source est également bien adaptée à la réalisation d'images. Les ions analysés (ions secondaires) sont émis à partir du bombardement de la surface par un faisceau d'ions primaire incident. Différents type de sources d'ions primaires peuvent être conçus, les plus classiques étant les sources LMI (Liquid Metal Ion) produisant un faisceau d'ions primaires Ga⁺ ou In⁺ avec une énergie cinétique jusqu'à 25 keV et un faisceau primaire pouvant être focalisé jusqu'à ~1µm. Les sources d'ions primaires Cs⁺ (sources d'ions solides) sont également utilisés, avec un faisceau accéléré à 10 keV et une focalisation jusqu'à ~2-3µm. L'irradiation de la surface par ces ions primaires conduit à l'émission de particules secondaires de différents types parmi lesquelles des ions (positifs ou négatifs) qui seront analysés par l'analyseur. En mode classique (SIMS dynamique), la densité d'ions reçus par la surface conduit à une érosion rapide et en profondeur du matériau, générant principalement des éléments monoatomiques ou de petits agrégats de molécules. En diminuant la densité d'ions projetés sur la surface (mode SIMS statique)^{12,13}, les dommages générés à la surface du matériau seront pratiquement restreints à la première couche de matériau permettant une analyse de surface¹⁴. Le SIMS statique est bien adapté à la réalisation d'images^{15, 16} avec une analyse pratiquement couche par couche, du matériau. De plus, dans ce mode des masses plus élevées de composés organiques peuvent être détectées. L'avantage du SIMS provient de la possibilité de focaliser le faisceau primaire incident jusqu'à une valeur inférieure à la taille d'une cellule (10-50 µm pour la plupart des cellules), donc la réalisation d'images à un niveau sub-cellulaire¹⁷. En revanche, la gamme de masse accessible avec cette technique est très restreinte et limitée à des composés de masse M<1000 u.. De plus, elle permet facilement l'étude d'éléments monoatomiques comme par exemple Na⁺ et K⁺ qui sont particulièrement abondants dans les organismes ou encore de certains composés de faible masse présents en forte concentration dans les tissus comme la famille des lipides¹⁸. Depuis plusieurs années des développements sont réalisés dans le but de rendre analysable des composés de plus haute masse tels que les peptides. Il faut en particulier noter les développements de SIMS avec une matrice (ME-SIMS Matrix Enhanced-Secondary Ion Mass Spectrometry) ou le SIMS avec des agrégats comme ions primaires incidents. Dans les deux cas, les développements permettent d'augmenter le nombre de composés analysables en SIMS et la masse de ces composés analysables. Le SIMS est donc devenu une méthode

¹¹Benninghoven A., Secondary Ion Mass Spectrometry Basic Concepts, Instrumental Aspects, Application and trends; Wiley-Interscience, New-York, **1987**

¹²Van Vaeck L., Adriaens A., Gijbels R.; *Mass Spectrom. Rev.* **1999** *18*, 1-47

¹³Adriaens A., Van Vaeck L., Adams F.; *Mass Spectrom. Rev.* **1999** *18*, 48-81

¹⁴[Belu AM, Graham DJ, Castner DG.](#) *Biomaterials.* **2003** *24*(21):3635-3653..

¹⁵Pacholski M.L., Winograd N.; *Chem. Rev.* **1999** *99*, 2977-3005

¹⁶Todd P.J., Schaaff T.G., Chaurand P., Caprioli R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2001** *36*(4):355-369

¹⁷[Colliver TL, Brummel CL, Pacholski ML, Swaneck FD, Ewing AG, Winograd N.](#) *Anal Chem.* **1997** *69*(13):2225-2231

¹⁸Todd PJ, Schaaff TG, Chaurand P, Caprioli RM. *J Mass Spectrom.* 2001 *36*(4):355-369

d'imagerie moléculaire particulièrement performante et en particulier pour l'analyse de composés de faible masse (e.g. lipides)¹⁹ avec une grande résolution spatiale.

Les sources MALDI sont quant à elles très prometteuses pour l'imagerie par spectrométrie de masse, par la grande gamme de molécules et de masses accessibles grâce à cette méthode. Les travaux de recherche de mon équipe portent sur l'utilisation de cette technologie innovante appliquée aux problématiques biologiques. .

¹⁹ [Brunelle A, Touboul D, Laprevote O. *J Mass Spectrom.* 2005 40\(8\):985-999.](#)

L'JMAGERJE

MAIDJ

I. LES SOURCES MALDI

Introduite dans la deuxième moitié des années 1980 par Hillenkamp et Karas^{2,3}, les sources MALDI ont constitué l'une des révolutions de la spectrométrie de masse avec les sources ESI, et en particulier pour les applications dans le domaine de la biologie. Cette technique venue en ligne directe des techniques de Désorption Laser (LD) est basée sur l'utilisation concomitante de l'irradiation d'une solide par un faisceau laser incident d'un petit composé organique appelé matrice et dont l'une des plus importantes propriétés est de présenter une bande d'absorption à la longueur d'onde du laser. Traditionnellement, les lasers utilisés en MALDI émettent dans l'UV. Les matrices sont donc de petits composés organiques, présentant généralement un cycle aromatique et absorbant dans l'UV. Le mélange de la matrice en forte concentration avec l'analyte en faible concentration, permet d'obtenir des solutions solides homogènes formées de micro-cristaux de matrice dans le réseau cristallin desquels sont, au moins en partie, inclus les analytes. L'irradiation 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 l'éjection de matière qui se dilue progressivement sous vide et qui se compose de plusieurs types de particules dont une grande quantité de neutres et, dans une certaine mesure, des ions qui peuvent alors être analysés par la partie « analyseur » de l'instrument. Cette méthode se révèle être sensible malgré les faibles rendements de production des ions, et permet l'analyse de composés polaires jusqu'à des poids moléculaires très élevés (1 000 000 u.). La matrice est l'élément primordial de cette méthode de production des ions puisque différentes matrices sont à utiliser suivant les familles de molécules à étudier et que l'emploi de deux matrices différentes pour une même analyse modifie l'allure des spectres (rendements ioniques, fragmentations, résolution, intensité, rapport signal/bruit,...)

Ainsi, le MALDI est particulièrement bien adapté à l'analyse des différentes familles de biomolécules et en particulier les protéines. Par rapport à l'Electrospray (ESI) il présente le net avantage d'être beaucoup plus tolérant au sels et contaminants divers souvent présents dans les échantillons biologiques. Les ions formés sont principalement monochargés, même si quelques ions multichargés sont observables pour des masses $M > 4000$ u., ce qui simplifie grandement l'analyse des données, par comparaison aux données provenant d'un ESI. Les sources MALDI sont souvent associées à des analyseurs Temps-de-vol (TOF). Les analyseurs TOF basés sur la séparation dans un champ électrique puis sur la mesure du temps d'arrivée des ions au détecteur, sont très sensibles (grande transmission des ions) et, possèdent des cycles d'analyses rapides et présentent une gamme de masse illimitée. Les instruments MALDI-TOF présentent donc de grandes performances et notamment dans le cadre d'applications pour des analyses protéomiques. Avec les progrès technologiques sont apparus ces dernières années d'autres

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

II. LE PRINCIPE DE L'ACQUISITION D'IMAGES

La possibilité de travailler sur des échantillons solides, déposés sur un support en MALDI et le fait que l'analyse soit restreinte à l'aire de l'impact du faisceau laser incident avec la surface à analyser rendent cette méthode compatible avec l'introduction et l'analyse directe d'échantillons bruts et entre autres d'échantillons biologiques, tels que des cellules, des morceaux d'organes ou des coupes de tissus.

Dans le cas de l'analyse directe de tissus (**Figure 1**), la méthodologie repose en grande partie sur la préparation de l'échantillon. De manière la plus simple après dissection de l'organe ou du tissu d'intérêt, des coupes à congélation peuvent être réalisées sur un cryostat. L'épaisseur des coupes varie entre 5 et 20 μm . Les coupes sont transférées sur la plaque métallique tenant lieu de porte échantillon de l'instrument. Dans le cas de petits organites (suffisamment petits pour ne pas altérer les conditions d'analyse dans l'instrument), comme des ganglions nerveux, l'organite est directement transféré après dissection sur le porte échantillon, la procédure est identique dans le cas de l'étude de cellules. Idéalement, le porte échantillon pourra être remplacé par un support de verre recouvert d'un matériau conducteur transparent permettant des observations microscopiques sans altérer les conditions d'analyse dans le spectromètre (perturbation des champs électriques). Par la suite, l'étape critique est liée au choix de la matrice et à son dépôt. Pour l'analyse directe des tissus des spots discrets de matrice pourront être réalisés soit à la micropipette soit selon un processus plus sophistiqué permettant le dépôt de microquantités dans différentes régions du tissu. Dans l'optique de réaliser une analyse de l'ensemble du tissu, ce dernier devra être entièrement recouvert soit par dépôt classique à la micropipette soit par utilisation de techniques de vaporisation (spray) permettant le recouvrement du tissu par la matrice en minimisant la quantité de solvant déposé. Les critères de choix de la matrice sont également importants afin d'optimiser l'analyse des composés en terme du nombre de composés détectés, de la résolution des pics, de l'intensité du signal, de rapport

signal/bruit et de la gamme de masse accessible, pour une famille particulière de composés. La nécessité d'ajouter une matrice pour l'analyse soulève un certain nombre de questions quant à la délocalisation possible des composés au sein du tissu pendant l'étape de cristallisation de la matrice. Pour cette raison, l'utilisation de technique alternative est souhaitable. Dans le cas de l'analyse d'un organite ou de cellules d'un même type cellulaire dans leur intégralité, le dépôt de la matrice est moins crucial puisque seule l'analyse des composés présente un intérêt et que la localisation des composés à ces niveau n'est pas nécessairement recherchée. Dans ce cas, le facteur limitant reste la quantité de solution de matrice déposée afin d'éviter une dilution trop importante des composés à analyser. Après dépôt de la matrice, le porte-échantillon sera introduit dans le spectromètre et des analyses pourront être réalisées en différents points de l'échantillon. Dans le cas de cellules ou organites, le signal est en général moyenné (moyenne des spectres résultants de plusieurs tirs lasers) en se déplaçant sur l'ensemble de l'échantillon. Dans le cas de tissus, les spectres sont en général moyennés sur l'ensemble du dépôt discret réalisé ou en dans le cas de tissus entièrement recouverts de matrice dans une zone particulière du tissu (e.g. noyau supraoptique pour une coupe de cerveau de rat). Les spectres sont alors enregistrés et les données analysées de manière classique. Sur coupes des tissus, il est alors possible de comparer les ions observés entre deux régions distinctes du tissu (soit la comparaison des différentes molécules observables).

La réalisation d'images en MALDI (Imagerie MALDI) comme pour les autres méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse (Imaging Mass Spectrometry IMS) passe par le développement d'outils d'acquisition automatisés ainsi que d'outils puissants de traitement des données et de reconstruction d'images. Les images sont préférentiellement réalisées à partir de coupes de tissus constituant une surface macroscopiquement plane et évitant ainsi au maximum les pertes de résolution liées à la forme de l'échantillon. L'image pourra être réalisée à partir du balayage de l'échantillon dans son entier (Figure 2). Le porte échantillon sera déplacé de manière régulière avec un pas défini sous le faisceau du laser. En chaque point, une moyenne de spectres sera enregistrée dans des conditions d'acquisitions définies par l'utilisateur sans déplacement de l'échantillon. Ainsi, l'échantillon sera déplacé de manière régulière de manière à ce que l'ensemble de la surface soit balayé et en chaque point de balayage, une analyse effectuée. Si un point de référence est fixé sur le porte-échantillon, alors les spectres peuvent être enregistrés avec comme donnée supplémentaire, les coordonnées d'enregistrement par rapport au point de référence. L'ensemble des données enregistrées se présente sous la forme d'une matrice (Figure 3) avec pour chaque coordonnée d'enregistrement un spectre qui contient sur une colonne les différents m/z et dans une seconde colonne les intensité correspondantes. Par la suite, pour un ion particulier (i.e. un m/z donné) correspondant à un composé particulier, la

mesure de l'intensité de cet ion (ou l'intégrale de l'aire du pic) permettra au travers de logiciels de reconstruction d'images d'obtenir la répartition de cet ion (et donc du composé correspondant) en prenant en compte l'intensité du pic avec les coordonnées d'enregistrement et en affectant à chaque point un pixel de couleur et/ou d'intensité de couleur définie.

Deux parties importantes se distinguent dans la réalisation d'images, l'acquisition des données et leur traitement avec leurs propres limites qui affecteront la qualité des images. Du point de vue de l'acquisition, un des facteurs limitants reste le temps d'analyse. Le temps d'analyse est tributaire de la fréquence de répétition des tirs laser de la rapidité de déplacement du support pendant l'analyse et du temps d'acquisition de l'électronique. Pour les lasers, l'utilisation de lasers pouvant atteindre de grandes fréquences de répétition est particulièrement souhaitable. Par exemple, à quelques Hz l'acquisition peut durer plus d'une journée alors qu'à 100 Hz le temps d'acquisition sera réduit à quelques heures, sachant qu'une durée d'analyse importante peut conduire à une dégradation de l'échantillon (évaporation de la matrice progressive sous vide par exemple) et une diminution de la qualité des analyses au cours du temps. Pour la vitesse de déplacement de l'échantillon, il existe sur le marché des systèmes (e.g. systèmes piézoélectriques) permettant des déplacements très rapides avec une grande précision. De la même façon les progrès dans le domaine de l'électronique permettent d'améliorer sans cesse la capacité des instruments. Pour la qualité des images, l'un des paramètres importants est la reproductibilité du déplacement. L'aire analysée en chaque point est elle aussi primordiale. L'amélioration de la résolution spatiale passe par la diminution de l'aire analysée permettant ainsi d'augmenter le nombre de points balayés, sachant qu'en toute logique le pas minimum de déplacement sera égal au diamètre du faisceau laser. Différentes méthodes peuvent être envisagées pour réduire l'aire analysée et entre autres des systèmes de focalisation du faisceau. Contrairement au SIMS, le MALDI ne permet pas d'atteindre une résolution spatiale sub-cellulaire, et ce, par la plus grande difficulté à focaliser le faisceau incident (laser) ou par les pertes de rendement de production des ions pour des faisceaux très focalisés. En plus de ces facteurs vont s'ajouter les paramètres classiques pour une analyse MALDI à savoir le choix de la matrice, du solvant et les paramètres d'acquisitions choisis. Comme dans le cas de l'analyse directe de tissus, le dépôt de la matrice sera une étape cruciale pour la qualité des images puisque sous certaines conditions, une délocalisation des composés dans le tissu peut se produire consécutivement au dépôt de la solution de matrice et influencer la qualité des images par perte d'informations sur la localisation.

Du point de vue de la reconstruction de l'image, un grand nombre de paramètres vont affecter le rendu de l'image. Différents paramètres sont à considérer. Par exemple les traitements des spectres doivent-ils être effectués ou non avant extraction des données (lissage, retrait de

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

L'avantage de l'imagerie réside dans le nombre de composés analysables en une seule étape d'acquisition même si cette dernière reste assez longue, en une seule acquisition sur un tissu (par exemple pour l'étude des protéines), plusieurs centaines d'ions pourront être observés. Sur cette base (en supprimant les informations redondantes, i.e. différents ions d'un même composé) de nombreuses images moléculaires pourront être reconstruites pour un même tissu. De plus l'imagerie MALDI tout comme les autres techniques de spectrométrie de masse ne nécessite aucune connaissance préalable et aucune caractérisation avant l'analyse.

III. ETAT DE L'ART

L'imagerie par spectrométrie de masse a fait l'objet depuis de nombreuses années de recherches assidues. La Désorption Laser et le SIMS ont connu depuis longtemps de nombreux développements dans ce sens. Le MALDI a mis plus de temps pour s'orienter vers cette voie, probablement par l'inadaptation des premiers instruments (automatisation difficile), le nombre de champs d'investigations offerts par cette technologie dans de nombreux domaines (analyses de biomolécules diverses, polymère synthétiques, composés inorganiques, etc.) ainsi que par la difficulté de compréhension des mécanismes de désorption/ionisation et donc la difficulté à contrôler la quantité de matière éjectée et les rendements d'ions.

Par contre, la grande qualité du MALDI pour l'analyse de biomolécules a conduit rapidement à l'analyse directe de cellules ou d'organes de petites tailles. Plusieurs études ont ainsi été réalisées sur différents organes issus de différents organismes (vertébrés, invertébrés), sur des cellules (neurones par exemple), puis, progressivement, l'analyse directe a été réalisée sur une seule cellule. Dans ce cadre, les premiers travaux MALDI sur tissus datent de 1994 avec

les travaux de Van Veelen et collaborateurs²⁰. Par la suite, il faut citer différentes études sur des nerfs, sur des cellules neuroendocrines d'invertébrés^{21,22,23} (escargot, limnée), de vertébrés (Xénope et rat) et sur des neurones uniques (neurones géants chez la limnée^{24,25} l'aplysie et l'écrevisse). Plus récemment des études ont été menées sur des vésicules à noyau dense à partir de l'aplysie²⁶. Sur ces cellules ont en particulier été étudiées les peptides bioactifs et la maturation de certaines hormones pour conduire à la libération de ces peptides. Certains de ces travaux permettent de remonter à la voie de maturation des hormones comme dans le cas de l'hormone procHH pour l'écrevisse²⁷ ou de l'hormone ELH pour l'aplysie. L'analyse se fait classiquement par transfert de la cellule, des cellules ou du tissu sur le support métallique. Différents paramètres peuvent influencer sur la pertinence de l'analyse, comme le milieu physiologique très riche en sels pouvant rendre ces analyses difficiles. Des études réalisées par le groupe de Sweedler²⁸ montrent l'influence du milieu qui peut être substitué au milieu physiologique sur la qualité des analyses, et par exemple l'utilité de certaines fixations ou de stabilisateurs comme le glycérol. Dans d'autres études sur cellules uniques la puissance de la méthode est démontrée au travers de la caractérisation *in situ* de certains peptides en utilisant les capacités d'élucidation structurale de la spectrométrie de masse soit par des études en mode PSD sur instrument de type MALDI-TOF²⁹ soit par des études en mode MS/MS CID sur des analyseurs magnétiques.

Dans le cas de l'imagerie, les premiers et la majorité des travaux restent l'initiative du groupe de R. Caprioli depuis 1997³⁰. Depuis les premières études, l'imagerie a constamment progressé et notamment au travers du développement de programmes informatiques spécifiques permettant l'acquisition automatique et la réalisation d'images³¹. Dans les premières études réalisées par ce groupe, il faut également souligner des essais pour réaliser des images topographiques et non pas moléculaires des échantillons, et qui s'approcheraient de la microscopie topographique³². Dans ces expériences, la topographie de l'échantillon (dans ce cas une fourmis) peut-être obtenue en se basant sur les différences d'arrivées en temps d'ions

²⁰Li K.W., Hoek R.M., Smith F., Jimenez C.R., van der Schors R.C., van Veelen P.A., Chen S., van der Greef J., Parish D.C., Benjamin P.R., et al.; *J. Biol. Chem.* **1994** 269(48), 30288-20292

²¹Dreisewerd K., Kingston R., Geraerts W.P.M., Li K.W.; *Int. J. Mass Spectrom.* **1997** 169, 291-299

²²Jimenez C.R., Burlingame A.L.; *Exp. Nephrol.* **1998** 6(5), 421-428

²³Jimenez C.R., Li K.W., Dreisewerd K., Spijker S., Kingston R., Bateman R.H., Burlingame A.L., Smit A.B., van Minnen J., Geraerts W.P.; *Biochemistry* **1998** 37, 2070-2076

²⁴Moroz L.L., Gillette R., Sweedler J.V.; *J. Exp. Biol.* **1999** 202(Pt 4), 333-341

²⁵Li L., Garden R.W., Sweedler J.V.; *Trends Biotechnol.* **2000** 18(4), 151-160.

²⁶Rubakhin S.S., Garden R.W., Fuller R.R., Sweedler J.V.; *Nat. Biotechnol.* **2000** 18(2), 172-175.

²⁷Redeker V., Toullec J.Y., Vinh J., Rossier J., Soyez D.; *Anal. Chem.* **1998** 70, 1805-1811

²⁸Rubakhin S.S., Greenough W.T., Sweedler J.V.; *Anal. Chem.* **2003** 75(20), 5374-5380

²⁹Li L., Garden R.W., Romanova E.V., Sweedler J.V.; *Anal. Chem.* **1999** 71(24), 5451-5458

³⁰Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J.; *Anal. Chem.* **1997** 69(23), 4751-4760

³¹Stoekli M., Farmer T.B., Caprioli R.M.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999** 10(1), 67-71.

³²Guillot S., Stoekli M., Chaurand P., Caprioli R.M.; *Proceeding of the 49th American Society for Mass Spectrometry and Allied Topics Conference, Chicago, IL, May 27-31, 2001*

provenant d'une surface non plane i.e. différentes épaisseurs de l'échantillon. Les ions suivis sont en particulier les ions de la matrice déposée à la surface de l'échantillon. Dès les débuts de l'imagerie MALDI un certain nombre de difficultés sont révélées. En particulier le choix de la matrice, son mode de cristallisation et le mode de dépôt sont des variables capitales en terme de reproductibilité des analyses sur l'ensemble de l'échantillon ou de délocalisation des composés au sein des tissus. Sur les trois matrices particulièrement adaptées à l'analyse des protéines (l'acide α -cyano 4-hydroxycinnamique HCCA, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque 2,5-DHB et l'acide sinapinique) en conditions classiques toutes ne se révèlent pas adaptée à l'imagerie. Le 2,5-DHB cristallise de manière non homogène sous forme de longs cristaux épais et de taille relativement importante. La cristallisation se produit à partir du bord du dépôt et peu de cristaux sont présents au centre du dépôt. Ainsi, le 2,5-DHB se révèle inadapté par sa grande hétérogénéité de cristallisation à l'obtention d'images. Finalement, seules les matrices HCCA et acide sinapinique présentent un intérêt dans ce cadre d'études, HCCA permettant l'analyse préférentiellement des composés de $m/z < 5000$ et l'acide sinapinique présentant des performances plus intéressantes dans la gamme des $m/z > 4000$. Pour améliorer le dépôt de matrice, sont rapidement proposées des méthodes par nébulisation pneumatique ou électrospray. Une deuxième stratégie d'analyse émerge également dans ces travaux. La première stratégie étant la stratégie simple de l'analyse directe des coupes de tissus après dépôt de la matrice. La deuxième stratégie proposée repose sur l'utilisation de support présentant des propriétés (hydrophobe par exemple) permettant de bloquer par interactions hydrophobes, électrostatiques ou forces de Van der Waals les composés sur les membranes. En appliquant le bloc de tissu sur la membrane, il est alors possible de réaliser un transfert (une empreinte) des composés types peptides/protéines en conservant leur localisation sur la membrane (membrane présentant des fonctions actives C18). Dans ce cas, la matrice est ajoutée sur la membrane et l'image ou l'analyse est réalisée à partir de cette membrane. Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir effectuer des étapes de rinçage permettant de retirer les sels et contaminants ainsi que l'hémoglobine excédentaire. La limite de cette stratégie réside dans le choix du type de membrane utilisé dont le critère majeur est de posséder une affinité plus spécifique pour certains composés et sur les rendements de transferts sur cette membrane. A l'inverse, la rétention des composés à la surface de la membrane permet d'éviter en partie les délocalisations liées aux dépôts de matrice. Les membranes sont non conductrices et peuvent altérer l'analyse, celles-ci sont donc rapidement remplacées par des membranes de Polyéthylène conductrices permettant un transfert également efficace des peptides et protéines et assurant de meilleures conditions d'analyse³³. Dans ces études sont également comparées les performances de l'analyse directe

³³Chaurand P., Stoeckli M., Caprioli R.M.; *Anal. Chem.* 1999 71, 5263-5270

des tissus et de l'analyse indirecte des tissus par empreinte sur membrane. Les études réalisées sur différents organes de souris démontrent l'efficacité de la méthode avec des profils protéiques obtenus différents suivant les régions analysées et ce avec une bonne reproductibilité pour les stratégies testées. Ces deux stratégies restent prédominantes pour la réalisation d'analyses directes de tissus et d'images. Comme le montrent les études, l'utilisation des membranes permet également d'effectuer des digestions enzymatiques (trypsine plus particulièrement) sur la membrane pour identifier les composés d'un intérêt plus particulier par interrogations de banques de données. Pour les peptides, la caractérisation peut être réalisée directement sur coupe en étudiant les spectres d'ions fragments obtenus en mode PSD³⁴. Parmi les développements envisagés pour l'imagerie MALDI, la possibilité d'obtenir conjointement des informations morphologiques et moléculaires. Pour cela il faut développer l'étude de la compatibilité des colorations histologiques usuelles avec l'analyse MALDI. Les travaux ont été menés par l'équipe de Caprioli sur différents colorants et notamment sur des colorants se fixant sur les oligonucléotides³⁵. Les colorants usuels étant généralement des molécules absorbant dans l'UV, les auteurs proposent également d'étudier la répartition de certains oligonucléotides (ADN, noyaux, acides nucléiques,...) au travers de l'étude de la répartition du colorant, liés de manière non covalente à leur cible en désorption laser pure (LDI). Les images obtenues montrent que l'étude de la répartition de l'ion pseudo-moléculaire correspondant au colorant permet de suivre la répartition de certaines classes de composés. Les études montrent en revanche que les colorants des protéines ne peuvent être suivis en LDI et ne donnent donc pas d'informations. Dans la même optique des études plus récentes de ce même groupe³⁶ propose une intégration des études histologiques à l'imagerie MALDI. Les études intégrant principalement des colorants marquant les ADN et n'interférant pas avec les protéines montrent que pour certaines colorations les structures sont bien observées tout en conservant des profils moléculaires après analyse MALDI similaires à ceux obtenus pour des tissus non colorés. Les études montrent également que des images peuvent être obtenues à partir de coupes colorées permettant de recueillir des informations histologiques et moléculaires sur une même coupe de tissu. La dernière stratégie proposée pour l'analyse de cellules repose sur la microdissection par un laser de cellules d'un même type cellulaire. Cette technique relève moins de l'imagerie réelle mais permet également des analyses protéomiques poussées. Dans cette stratégie³⁷ les cellules sont directement transférées sur le support métallique après microdissection permettant un gain de temps considérable par rapport aux études classiques après microdissection qui passent par la

³⁴Jespersen S., Chaurand P., van Strien F.J., Spengler B., van der Greef J. ; *Anal Chem.* **1999** 71(3), 660-666

³⁵Koomen J.M., Stoeckli M., Caprioli R.M. ; *J. Mass Spectrom.* **2000** 35(2), 258-264

³⁶Chaurand P., Schwartz S.A., Billheimer D., Xu B.J., Crecelius A., Caprioli R.M.; *Anal. Chem.* **2004** 76(4), 1145-1155

³⁷Xu B.J., Caprioli R.M., Sanders M.E., Jensen R.A. ; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002** 13(11), 1292-1297

séparation sur gels (électrophorèse 2D) puis excision de spots, digestion sur chacun d'entre eux puis analyse par spectrométrie de masse. Cette méthode d'analyse directe des cellules microdisséquées offre également l'avantage de nécessiter un nombre de cellules plus faible donc un gain de temps et d'échantillon. Les études mettent en évidence que les profils sont très similaires à ceux obtenus pour les cellules dans les coupes de tissus, validant ainsi la méthodologie. Plus récemment, le concept de transfert sur membrane est poussé plus loin par Stoeckli et collaborateurs³⁸ en proposant à partir d'empreintes de tissus sur membrane une digestion enzymatique systématique sur les membranes sur le concept du scanner moléculaire³⁹, permettant des études en mode MS/MS sur les fragments peptidiques issus de la digestion locale d'une protéine, offrant alors la possibilité de réaliser les images sur la base de certains ions fragments permettant de lever l'ambiguïté dans certains cas de chevauchement d'ions provenant de composés distincts.

Parmi les paramètres limitant la résolution des images les facteurs instrumentaux sont particulièrement importants, nous avons vu que dans ce contexte la taille du faisceau laser incident était un facteur prépondérant. Certains groupes s'intéressent plus particulièrement aux développements instrumentaux. A ce titre, le groupe de B. Spengler a développé un concept instrumental particulier le SMALDI (Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization)⁴⁰ instrument étant en quelque sorte un hybride entre la technologie utilisée en LAMMA et le MALDI classique. Sur cet instrument, le laser peut-être focalisé jusqu'à 1µm permettant une nette augmentation de la résolution spatiale jusqu'à un niveau subcellulaire. Tout comme en SIMS des images d'une grande résolution spatiale sont obtenues par études de coupes de végétaux en regardant la répartition des ions Na⁺ et K⁺. Des images sont également obtenues à partir de peptides déposés en picodépôts sur une surface. Ce concept instrumental est particulièrement prometteur et nous pouvons espérer des applications rapides sur des tissus. Parmi les développements instrumentaux de l'imagerie MALDI, un autre concept d'imagerie est proposé par le groupe de R.M. Heeren⁴¹ Dans ce cas, le concept proposé s'approche de techniques de microscopie moléculaires par spectrométrie de masse. Pour compenser les problèmes liés à la focalisation du faisceau laser incident et les temps d'analyse longs en imagerie MALDI classique, le laser est défocalisé permettant l'analyse de grandes quantités d'ions et l'image est réalisée par utilisation d'un détecteur de position. Le point d'impact de l'ion sur le détecteur est conservé comme une donnée spatiale liée à la position de départ de l'ion qui sera conservée tout au long de son trajet. Ces instruments présentent une configuration

³⁸Rohner T.C., Staab D., Stoeckli M.; *Mech. Ageing. Dev.* **2005** 126(1), 177-185

³⁹Binz P.A., Muller M., Hoogland C., Zimmermann C., Pasquarello C., Corthals G., Sanchez J.C., Hochstrasser D.F., Appel R.D. ; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004** 15(1), 17-22

⁴⁰Spengler B., Hubert M. ; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002** 13(6), 735-748

⁴¹Luxembourg S.L., Mize T.H., McDonnell L.A., Heeren R.M. ; *Anal. Chem.* **2004** 15;76(18), 5339-5344

particulière avec des systèmes de guidance des ions bien particuliers et des détecteurs de position de haute performance permettant de relier la position d'arrivée à la position de départ pour reconstruire l'image de la répartition d'un ion donné dans son contexte d'origine. Les tests effectués sur des grilles recouvertes de différents composés démontrent la fonctionnalité de l'instrument et la résolution qui peut être alors obtenue avec une vitesse d'acquisition remarquable. Cette technologie présente également un avenir très prometteur pour l'imagerie MALDI. Des études ont également été menées par ce groupe sur cette instrumentation mais avec une source IR-MALDI démontrant également la potentialité d'utiliser des lasers émettant dans l'IR plutôt que dans l'UV pour l'imagerie et notamment en terme de matrices utilisables⁴².

Dans les développements plus particuliers de l'imagerie MALDI sont également d'un intérêt tout particulier les développements réalisés par A. Woods et collaborateurs^{43,44}. Dans ces études les auteurs proposent une méthode qui permettrait l'analyse directe de tissus sans addition d'une solution de matrice. La technique proposée ou MILDI (Matrix Implanted Laser Desorption Ionization) consiste à implanter des ions d'Or dans les tissus par irradiation du tissu par un faisceau d'ions primaires avec source Or. La matrice implantée par cette voie ne peut entraîner de délocalisation des composés. Cette technique permet d'obtenir des ions pour des protéines à partir de tissus. Cependant, à l'heure actuelle les rendements d'ions restent assez faibles ainsi que le nombre de composés analysables.

Dans les développements récents, sont à noter également des études menées pour améliorer la qualité des images en utilisant des algorithmes mathématiques de clustering et des méthodes d'analyses multivariées⁴⁵.

En parallèle à ces développements méthodologiques, différentes applications de l'analyse directe des tissus et de l'imagerie MALDI ont été réalisées, démontrant l'intérêt de cette technologie pour les études biologiques et en particulier pour l'application à différentes pathologies. Il est possible de citer notamment l'analyse de tissus pituitaires de xénope pour l'étude de la maturation des POMC. Différentes études dans le cas de l'analyse de tissus cancéreux par comparaison à des tissus sains ont été menées et montrent l'utilité de la méthode dans la recherche de biomarqueurs de ces pathologies. Dans ce cas, l'analyse directe des tissus permet de mettre en évidence les protéines différenciellement représentées entre les deux types de tissus. L'imagerie de ces molécules permet par sa répartition de discriminer différents stades de cancer. Par la suite, à partir des tissus, par des stratégies plus classiques (extraction des

⁴²Luxembourg S.L., McDonnell L.A., Mize T.H., Heeren R.M. ; *J. Proteome Res.* **2005** 4(3), 671-673

⁴³Novikov 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(24), 7288-7293

⁴⁴Tempez A., Ugarov M., Egan T., Schultz J.A., Novikov A., Della-Negra S., Lebeyec Y., Pautrat M., Caroff M., Smentkowski V.S., Wang H.Y., Jackson S.N., Woods A.S. ; *J. Proteome Res.* **2005** 4(2), 540-554

⁴⁵McCombie G., Staab D., Stoeckli M., Knochenmuss R.; *Anal. Chem.* **2005** 77(19), 6118-6124

protéines, séparation par chromatographie liquide type HPLC, digestions enzymatiques des fractions et analyses par nano-ESI incluant des études en MS/MS et des confrontations aux banques de données) le marqueur pourra être caractérisé apportant de nouveaux éléments importants pour la compréhension des mécanismes de cancérisation et l'amélioration du diagnostic de ces pathologies. Les applications sont nombreuses et comprennent l'étude du cancer du colon sur des modèles souris développant la pathologie⁴⁶, l'étude d'adénocarcinome de prostate sur des modèles PCA avec différenciation des cellules neuroendocriniennes⁴⁷, l'analyse de la répartition des peptides β -amyloïdes dans le cas de souris modèles de la maladie d'Alzheimer⁴⁸, des études sur des tissus d'épididyme de souris et des biopsie de cancer du sein⁴⁹, à l'étude des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson⁵⁰, pour l'application par utilisation conjointe de méthodes de clustering à l'étude de modèles souris présentant des tumeurs du cerveau⁵¹ et de tumeurs primaires du cerveau⁵². Quelques auteurs s'intéressent plus spécifiquement à l'imagerie d'autres classes de composés comme par exemple les composés pharmaceutiques ou les lipides. Dans le cas de composés pharmaceutique l'imagerie MALDI est un outil source d'importantes informations puisqu'elle permet de savoir si le principe actif se retrouve bien dans les tissus ciblés et quelles sont les voies de métabolisation de ces composés. Elle permet également de localiser le médicament dans certaines zones plus particulières des tissus. L'étude de composés pharmaceutiques met en exergue les problèmes liés pour de petites molécules à l'interférence des ions du composé avec d'autres ions parasites (e.g. ions de matrice) et l'intérêt dans ce cadre d'utiliser d'autres types d'instruments permettant des études en mode MS/MS^{38,53,54}. Il faut également noter quelques études récentes sur l'imagerie MALDI de lipides dans les tissus^{55,56,57}.

Enfin, plusieurs revues traitant de l'imagerie MALDI et de l'analyse directe de tissus sont publiées abordant les différentes stratégies proposées et les difficultés rencontrées dans cette technologie^{58,59,60,61,62,63,64}.

⁴⁶Chaurand P., DaGue B.B., Pearsall R.S., Threadgill D.W., Caprioli R.M.; *Proteomics* **2001** 1(10), 1320-1326

⁴⁷Masumori N., Thomas T.Z., Chaurand P., Case T., Paul M., Kasper S., Caprioli R.M., Tsukamoto T., Shappell S.B., Matusik R.J.; *Cancer Res.* **2001** 61(5), 2239-2249.

⁴⁸Stoeckli M., Staab D., Staufenbiel M., Wiederhold K.H., Signor L.; *Anal. Biochem.* **2002** 311(1), 33-39

⁴⁹Chaurand P., Caprioli R.M.; *Electrophoresis* **2002** 23, 3125-3135

⁵⁰Pierson J., Norris J.L., Aerni H.R., Svenningsson P., Caprioli R.M., Andren P.E.; *J. Proteome Res.* **2004** 3(2), 289-295

⁵¹Chaurand P., Schwartz S.A., Caprioli R.M. *J. Proteome Res.* **2004** 3(2), 245-252

⁵²Schwartz S.A., Weil R.J., Johnson M.D., Toms S.A., Caprioli R.M.; *Clin. Cancer Res.* **2004** 10(3):981-987

⁵³Troendle F.J., Reddick C.D., Yost R.A.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999** 10, 1315-1321

⁵⁴Reyzer M.L., Hsieh Y., Ng K., Korfmacher W.A., Caprioli R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38(10), 1081-1092

⁵⁵Rujoi M., Estrada R., Yappert M.C.; *Anal. Chem.* **2004** 76(6), 1657-1663

⁵⁶Jackson S.N., Wang H.Y., Woods A.S.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005** (publication en-ligne)

⁵⁷Jackson S.N., Wang H.Y., Woods A.S.; *Anal. Chem.* **2005** 77(14), 4523-4527

⁵⁸Todd P.J., Schaaff T.G., Chaurand P., Caprioli R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2001** 36(4), 355-369.

⁵⁹Stoeckli M., Chaurand P., Hallahan D.E., Caprioli R.M.; *Nat. Med.* **2001** 7(4), 493-496

⁶⁰Chaurand P., Schwartz S.A., Caprioli R.M.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002** 6(5):676-681

L'imagerie MALDI se compose principalement de plusieurs axes de recherches. La majorité des études est basée sur l'étude des protéines et quelques plus rares recherches sont menées sur les composés pharmaceutiques ou les lipides. Les stratégies d'analyse sont principalement trois, à savoir l'analyse directe des tissus, l'analyse indirecte d'empreintes de tissu après transfert sur une membrane, et l'analyse de groupes cellulaires d'un même type après microdissection laser. Pour les problèmes liés à la matrice, sont principalement utilisée l'HCCA et l'acide sinapinique. Les dépôts sont réalisés soit par recouvrement total de la coupe, soit par nébulisation pneumatiques ou électrospray, sachant que bien que les dépôts par électrospray soient plus homogènes la quantité de solvant est souvent trop faible pour conduire à une incorporation suffisante des analytes dans les cristaux. Une dernière méthode consiste à réaliser des microdépôts (par différentes techniques) à l'aide d'un robot, permettant de recouvrir la coupe d'autant de dépôts que de points d'acquisition, permettant une délocalisation restreinte des molécules et une diminution artificielle de l'aire analysée. Dans le cas de nouveaux concepts instrumentaux trois directions se dégagent, des instruments avec une focalisation très importante du faisceau laser (SMALDI), les instruments peu focalisés mais fonctionnant sur une détection en position des ions et l'implantation des molécules de matrice dans les tissus (MILDI).

L'imagerie MALDI est une méthodologie en plein essor dont les applications déjà acquises montrent la pertinence dans les domaines de la pharmacologie, de la médecine et de la protéomique clinique.

Le développement de ce type de technologie est à rapprocher de celui de la Résonance Magnétique Nucléaire qui conduisit aux techniques d'imageries dites IRM dont l'implantation en milieu médical est importante et utilisées pour le diagnostic de certaines pathologies. Bien que déjà très performante, cette technologie encore jeune va connaître de nombreux développements grâce au travail des équipes de recherche. Si aujourd'hui l'imagerie MALDI est plutôt dédiée à l'analyse des peptides/protéines et aux petits composés à vocation pharmacologique, son champ d'application va s'ouvrir vers d'autres familles de composés présents dans le domaine du vivant comme les lipides, les sucres, les oligonucléotides.

Dans ce contexte, différentes questions et développements restent encore à réaliser et plusieurs développements sont envisageables, ils sont regroupés de manière synthétique et non exhaustive dans le [Tableau 1](#).

⁶¹Rubakhin S.S., Greenough W.T., Sweedler J.V.; *Anal. Chem.* **2003** *75*(20), 5374-5378

⁶²Hummon A.B., Sweedler J.V., Corbin R.W.; *Trends Anal. Chem.* **2003** *22*(9), 515-521

⁶³Rubakhin S.S., Jurchen J.C., Monroe E.B., Sweedler J.V.; *Drug Discov Today* **2005** *10*(12), 823-837

⁶⁴Heeren R.M.; *Proteomics* **2005** *5*, en-ligne

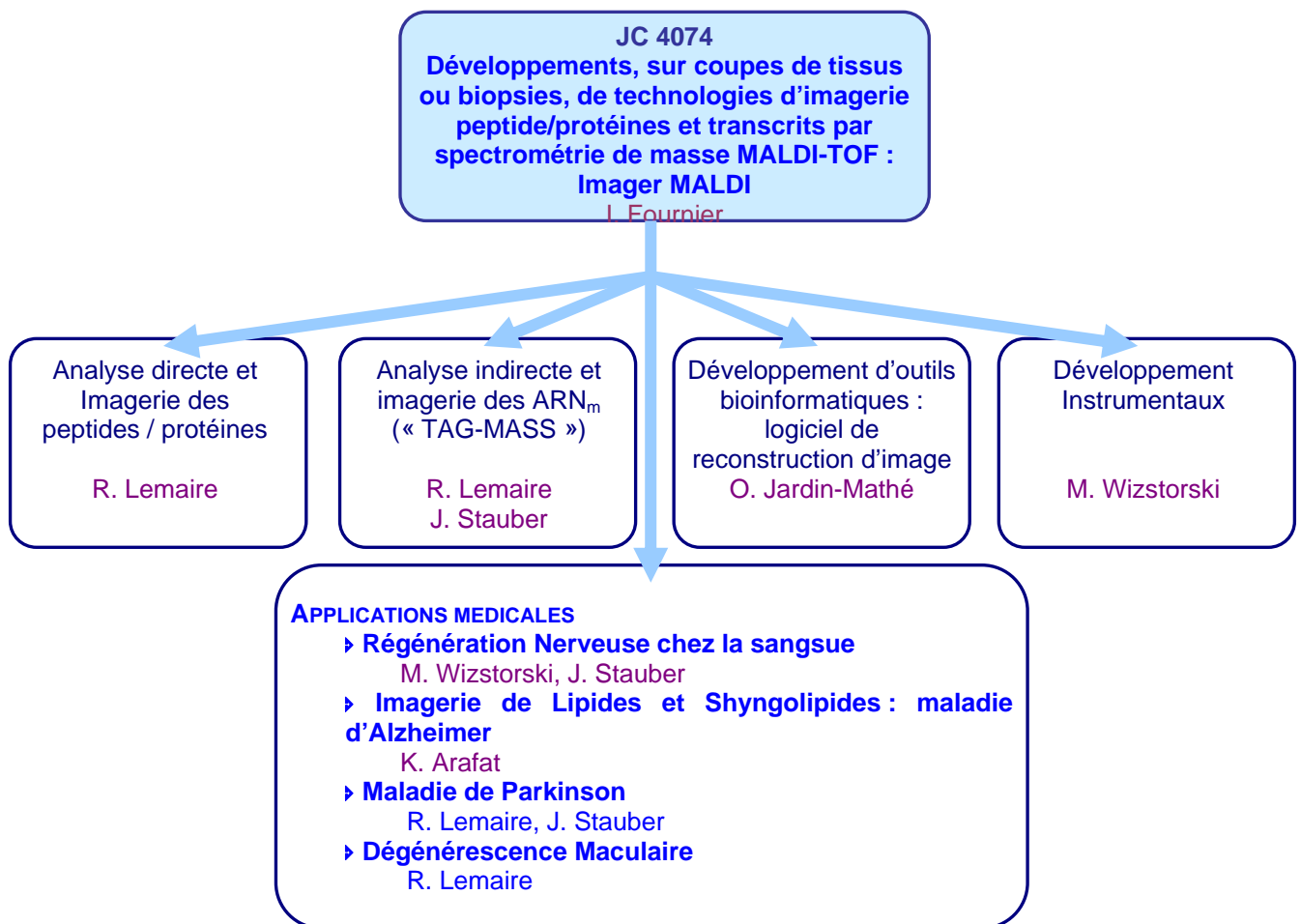
Questions/Problèmes	Développements/ Solutions
Délocalisation liée à l'application de matrice	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Utilisation de techniques de dépôts par spray ‣ Micro dépôts par robots ‣ Dépôt à la micropipette avec matrice particulière
Choix de la matrice	‣ Développement de nouvelles matrices
Focalisation du laser	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Réduction du faisceau laser par optique de focalisation ‣ Micro dépôts par robots ‣ Utilisation de masques
Augmentation du nombre de composés détectés	‣ Traitement par des solvants organiques
Etudes structurales sur coupes	‣ Augmentation du taux de fragmentations
Augmentation de la résolution spectrale	‣ Utilisation d'analyseur type FT-ICR
Imagerie d'autres familles de molécules	<ul style="list-style-type: none"> ‣ Lipides ‣ Sucres ‣ Oligonucléotides

Tableau 1 : *Récapitulatifs des difficultés et des questions se posant pour l'imagerie MALDI ainsi que les solutions qui peuvent être proposées.*

L'équipe ACI (cf. Iorganigramme) dont je suis responsable mène des recherches dans le domaine de l'imagerie MALDI et des nouveaux développements possibles pour améliorer cette technologie. Au sein du groupe, plusieurs axes de recherche ont été plus spécifiquement engagés. Une partie des travaux porte sur le développement de nouvelles matrices plus adaptées à l'analyse de tissus et l'imagerie. Dans une autre partie le traitement des échantillons avant analyse est étudié. Certains développements sont plus fondamentaux et s'intéressent à la diminution de l'aire analysée ou la résolution de problèmes spécifiques liés à la nature des tissus. Enfin, l'imagerie par MALDI des ARNm a été recherchée. Enfin dans un dernier axe, sont étudiées des applications de cette méthodologies à des problématiques biologiques et notamment au cancer de l'ovaire avec la recherche de biomarqueurs spécifiques de cette pathologie et des travaux sur Parkinson pour une meilleure compréhension des mécanismes de dégénération versus les mécanismes de régénération étudiés au laboratoires par les autres

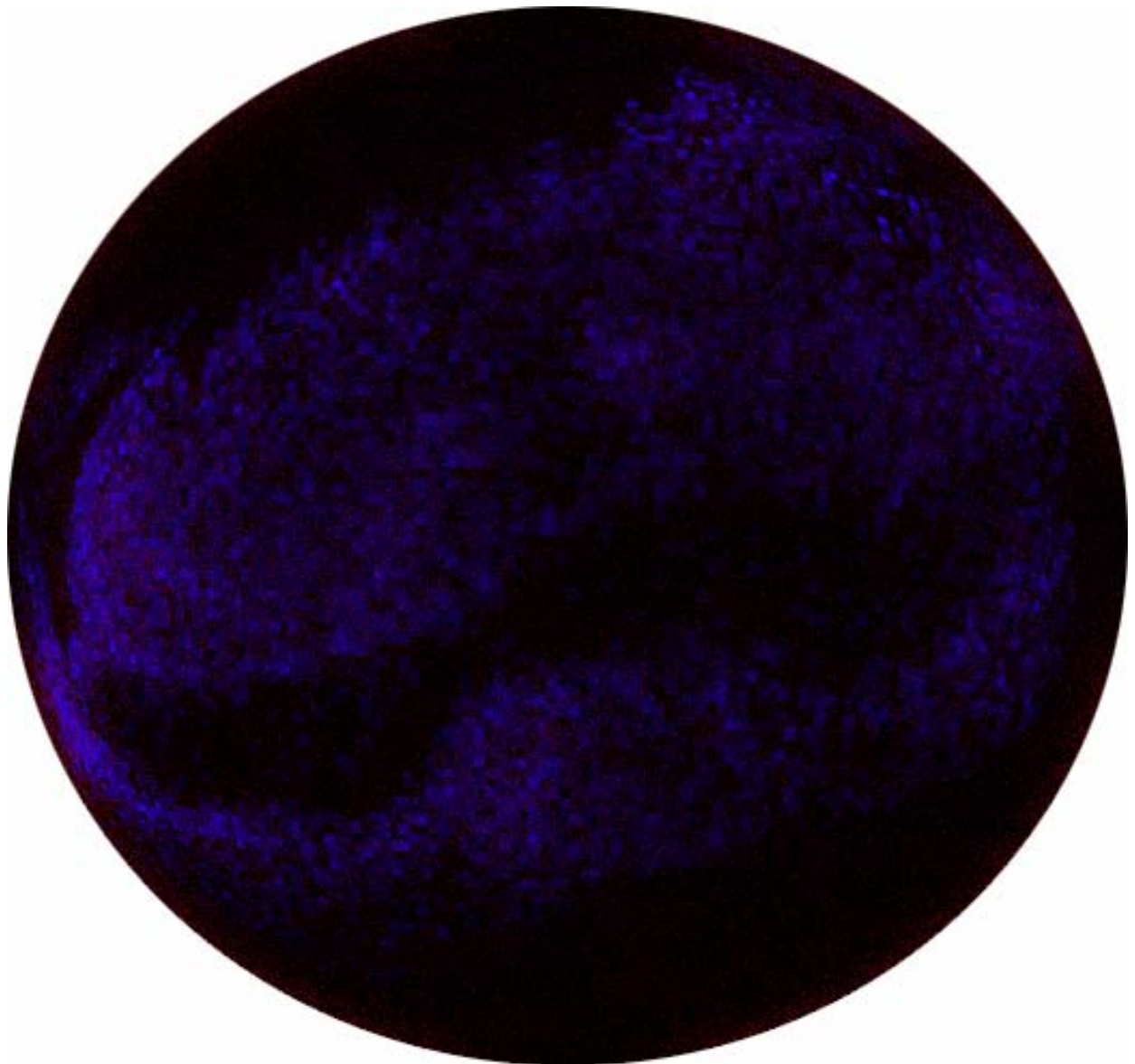
équipes de l'UMR. Une dernière partie des développements réalisés concerne la création d'un nouveau logiciel de reconstruction d'images. Ce logiciel est développé par programmation sur la base du logiciel IDL 6.2 (RSI). Les développements bioinformatiques sont tout aussi importants que les autres et contribueront à l'amélioration de la qualité des images issue de l'analyse MALDI même s'ils ne seront pas détaillés dans la suite de ce mémoire.

ORGANIGRAMME DE L'EQUIPE IMAGERIE



RESULTATS

CHAPITRE I. IMAGERIE MALDI DES PEPTIDES ET PROTEINES : DEVELOPPEMENTS



I. DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MATRICES POUR L'IMAGERIE MALDI : LES MATRICES IONIQUES SOLIDES

1. MATRICES ET ANALYSES DES TISSUS

Les performances de l'imagerie MALDI sont en partie fonction de la qualité des analyses sur les tissus. Les tissus étant des matériaux complexes constitués d'un grand nombre de molécules appartenant à des familles différentes et présentes à des niveaux de concentration variés (certaines molécules sont exprimées en très faible quantité par rapport à d'autres) rendent les analyses difficiles. Dans l'absolu pour une même famille de composés il faudrait pouvoir détecter l'ensemble des composés présents au sein du tissu même s'il présente des masses très proches et à des concentrations très faibles. Loin d'atteindre ce but ultime, il est souhaitable d'approcher le plus grand nombre de composés avec la meilleure qualité spectrale possible. L'une des voies possible d'optimisation serait d'améliorer les instruments utilisés.

Une autre voie viserait à améliorer la préparation de l'échantillon pour l'analyse. En MALDI, la matrice ayant un rôle fondamental à jouer sur les processus de désorption/ionisation, ce qui se traduit sur les spectres en terme de résolution, sensibilité, rapport signal/bruit et nombre de molécules détectées, cela consiste à rechercher de nouvelles matrices mieux adaptées à l'analyse des tissus. A l'heure actuelle, les matrices les plus couramment utilisées pour l'analyse des peptides et protéines sont l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamic⁶⁵ (HCCA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoic acid⁶⁶ (2,5-DHB) et l'acide sinapinique acid⁶⁷ (SA). Dans le cadre de l'analyse directe de tissus, le choix de la matrice est essentiel car la cristallisation de la matrice sur le tissu est un paramètre crucial. Ainsi, HCCA et SA peuvent être utilisées pour l'analyse de tissus car ces matrices cristallisent sous forme de microcristaux répartis de manière homogène à la surface du tissu. En revanche, le 2,5-DHB présente une cristallisation très hétérogène ne recouvrant pas l'ensemble du tissu et ce quelque en soient les conditions de solvant utilisées pour dissoudre ce composé. Dans tous les cas, la cristallisation ne permet généralement pas de couvrir l'ensemble du tissu et les spectres obtenus présentent une qualité inférieure. Dans ce contexte, le développement de nouvelles matrices plus spécifiques à cette application, constitue un enjeu majeur pour l'amélioration des analyses sur tissu et de l'imagerie MALDI. Les propriétés requises par ces nouvelles matrices seraient :

- 1- Une meilleure qualité spectrale en terme de résolution, de sensibilité, d'intensité du signal, de rapport signal/bruit, de nombre de composés détectés et de tolérance aux sels,

⁶⁵Beavis R.C., Chaudhary T., Chait B.T.; *Org. Mass Spectrom.* **1991** 27, 156-158

⁶⁶Strupat K., Karas M., Hillenkamp F.; *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **1991** 111, 89-102

⁶⁷Beavis R.C., Chait B.T.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989** 12, 432-435

- 2- Une meilleure cristallisation en terme de pouvoir de couverture de l'échantillon, d'homogénéité de cristallisation, d'homogénéité de la taille des cristaux et de temps de cristallisation,
- 3- Une plus grande stabilité dans le temps en terme de stabilité sous vide,
- 4- Une plus grande résistance aux tirs lasers (plus particulièrement dans le cas de laser à grande répétition de tirs) en terme d'ablation et d'endommagement du matériel suite à l'irradiation.

2. DES LIQUIDES IONIQUES AUX MATRICES IONIQUES

Les liquides ioniques sont des sels organiques possédant des points de fusion inférieurs à 100°C et même souvent inférieurs à la température ambiante, présentant la formule générale $[A^-, B^+]$. Ils sont obtenus par réaction acido-basique. Ils sont employés de plus en plus comme substituts aux solvants organiques traditionnels dans les réactions chimiques⁶⁸. Les plus courants d'entre eux sont composés de cations imidazolium ou pyridinium, mais peuvent être également constitués de cations phosphonium ou tetralkylamonium. Ces liquides ioniques présentent différentes propriétés et notamment en dissolution pour la plupart des composés organiques et inorganiques. Ils sont également stables à haute température, ils peuvent être recyclés et possèdent une très faible tension de vapeur, ils sont non inflammables et conductibles⁶⁹. Leurs caractéristiques peuvent être optimisées pour une application donnée en modifiant la nature du couple anion/cation. En reprenant ce concept, Armstrong et coll.⁷⁰ ont montré la possibilité de coupler les liquides ioniques avec les matrices MALDI. Les matrices MALDI étant pour la plupart acides, il est possible par réaction acido/basiques entre certaines matrices et différentes bases d'obtenir des complexes bivalents sous la forme $[m^-, B^+]$. Les études réalisées démontrent que ces matrices ioniques peuvent présenter des performances supérieures aux matrices classiques. Différentes matrices ioniques ont été synthétisées sur la base des matrices 2,5-DHB, HCCA, acide sinapinique et 3-hydroxypicolinique (3-HPA) et étudiées par ce groupe⁷¹. D'autres études réalisées par Mank et coll.⁷² montrent l'intérêt de telles matrices et leurs grandes gammes d'applications possibles. Les matrices ioniques présentent notamment une grande reproductibilité tir à tir, une grande stabilité sous vide, une grande sensibilité ainsi que des performances intéressantes en mode négatif. Les matrices

⁶⁸Welton T.; *Chem. Rev* **1999** 22, 2071-2083

⁶⁹Barhdadi R., Courtinard C., Nedelec J.Y., Troupel M.; *Chem. Commun.* **2003** 12, 1434-1435

⁷⁰Armstrong D.W., Zhang L.K., He L., Gross M.L.; *Anal. Chem.* **2001** 73, 3679-3686

⁷¹Carda-Broch S., Berthold A., Armstrong D.W.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003** 17, 553-560

⁷²Mank M., Stahl B., Boehm G.; *Anal. Chem.* **2004** 76(10), 2938-2950

ioniques dérivées de l'aniline et de la diméthylaniline semblent particulièrement intéressantes en terme de gain d'intensité du signal et de sensibilité.

3. PROCEDES DE SYNTHESE

Dans ce contexte, les matrices ioniques offrent une bonne alternative aux matrices classiques et de nombreuses matrices ioniques différentes ont donc été synthétisées et testées et notamment sur coupes de tissu. Dans l'optique d'une application à l'analyse des peptides et protéines, les études ont été focalisées sur les trois matrices MALDI couramment utilisées dans ce domaine d'application à savoir HCCA, 2,5-DHB et acide sinapinique. Des matrices ioniques ont été synthétisées avec ces matrices en utilisant différentes bases (aniline (ANI), N,N-diméthylaniline (DANI), N,N-diéthylaniline (DIENI), triéthylamine (Et₃NH), 2-amino-4-méthyl-5-nitropyridine (2A4M5NP), 3-aminoquinoline (3AQ), pyridine (PY), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7ene (DBU), pipéridine (PIP)). Les matrices ioniques sont synthétisées suivant les protocoles classiquement utilisés et établis pour la synthèse des liquides ioniques^{68,70}. 50 mg de matrices sont dissous dans 20 mL de méthanol, avant addition d'une quantité équimolaire de base. La solution est mise sous agitation pendant environ 1H puis le solvant évaporé sous vide. La matrice est ensuite dissoute juste avant utilisation dans 1 mL d'un mélange acétonitrile/eau (2:1, v/v, 0,1% TFA). Certaines des matrices ioniques comme HCCA/ANI ou HCCA/PY peuvent être synthétisées suivant un protocole plus rapide juste avant l'analyse. Dans ce cas, l'équivalent de base (4,8 µL pour HCCA/ANI et 4,29 µL for CHCA/PY) est ajouté à une solution de 10 mg/mL d'HCCA dans un mélange acétonitrile/eau (2:1, v/v, 0,1% TFA). Le mélange résultant est alors agité puis placé dans un bain à ultrasons pendant 10min avant d'être directement utilisé pour la préparation des échantillons pour l'analyse MALDI.

Par ces procédés il est possible de synthétiser de nombreuses matrices ioniques qui sont ensuite testées. Certaines des matrices ioniques se présentent sous la forme de liquides visqueux (e.g. HCCA/DIENI, HCCA/DBU, HCCA/Et₃NH, HCCA/PIP, HCCA/ANI, HCCA/PY) et d'autres sous la forme solide (e.g. HCCA/DANI, HCCA/2A4M5NP, HCCA/3AQ) comme les matrices classiquement utilisées.

4. EVALUATION SUR STANDARDS

L'ensemble des matrices ioniques synthétisées a dans un premier temps été évaluées sur des composés standards peptidiques ou protéiques (Substance P, ACTH 18-39, ACTH 7-38, Bovine insuline, Apomyoglobine). Dans l'ensemble, la plupart des matrices présentent des performances au moins équivalentes à celles des matrices classiques. (Ne seront présentées dans la suite que les matrices ayant les meilleures performances). Parmi celles-ci deux d'entre elles sont des matrices ioniques non encore étudiées (HCCA/2A4M5NP, HCCA/DANI), la dernière ayant déjà été étudiée par Armstrong et coll.. La matrice HCCA/2A4M5NP est particulière puisqu'elle provient de la réaction entre deux matrices classiques, l'une présentant des propriétés acides (HCCA) et l'autre basiques (2A4M5NP).

Les premières études réalisées, montrent que l'énergie laser nécessaire à la production des ions se situe dans une gamme de 3% par rapport à la matrice HCCA. Dans tous les cas les expériences sont effectuées à une énergie laser 20% au seuil de production des ions afin de disposer de signaux suffisamment intenses et d'une bonne reproductibilité. En mode positif, une augmentation significative de l'intensité des ions MH^+ correspondant aux peptides, est observée. Pour la Substance P le signal présente une intensité 3,5 fois supérieure à celle mesurée pour HCCA. Pour l'apomyoglobine, le signal augmente d'un facteur 1,8 (Tableau 2). Ces premiers résultats semblent démontrer l'intérêt de ces matrices. Il faut néanmoins noter que le signal pour l'apomyoglobine est large et peu résolu. Ce phénomène peut être attribué à la formation d'adduits de matrice comme observé pour 2A4M5NP dans sa forme classique⁷³. Dans le cas de HCCA/DANI et HCCA/ANI les résultats obtenus montrent des performances équivalentes ou légèrement moindres que pour HCCA.

Des études ont également été réalisées en mode négatif. Le mode négatif est en général délaissé à cause des faibles rendements de production d'ions et par la gamme restreinte de composés auxquels il s'applique. Cependant, dans le cadre d'analyse sur tissus, le mode négatif peut être particulièrement avantageux pour la détection des composés tels que les peptides/protéines phosphorylés⁷⁴, les lipides^{75,76} ou encore les phospholipides⁷⁷, qui peuvent être difficiles à analyser en mode positif et présenter de nombreux signaux correspondant à des adduits. Par la réduction du nombre d'adduits (sels), la résolution peut être augmentée et l'interprétation des données facilitée, ce qui est un point important notamment pour l'étude de

⁷³Fitzgerald M.C., Parr G.R., Smith L.M.; *Anal. Chem.* **1993**, *65*(22), 3204-3211

⁷⁴Asara M., Allison J.; *J Am soc Mass Spectrom* **1999** *10*, 35-44

⁷⁵Schiller J., Süb R., Arnhold J., Fuchs B., Lebig J., Muller M., Petkovic M., Spatlehotz H., Zschörnig O., Arnold K.; *Progress In Lipid Research* **2004** *43*, 449-488

⁷⁶Al Saad K.A., Zabrouskov V., Siems W.F., Knowles N.R., Hannan R.M., Hille JR H.H.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2003** *17*, 87-96

⁷⁷Estrada R., Yappert M.C. ; *J. Mass Spectrom.* **2004** *39*, 412-422

tissus formés de mélanges de complexes. Nous avons donc cherché à déterminer si certaines des matrices ioniques pouvaient présenter un rendement d'ion plus important en mode négatif que les matrices classiques. Certaines matrices ioniques avaient déjà été préalablement étudiées en mode négatif mais uniquement dans le cadre de l'analyse d'acides aminés⁷⁸. En mode négatif les signaux les plus intenses sont obtenus pour les deux matrices ioniques solides HCCA/ANI et HCCA/DANI comme le montre l'agrandissement de spectre présenté Figure 4 et correspondant à l'ion [M-H]⁻ de l'ACTH 18-39. Une très bonne réponse est également obtenue avec HCCA/2A4M5NP (Figure 4) mais la réponse dépend des standards étudiés. Une augmentation d'un facteur 2 est observée de manière générale avec les matrices ioniques par rapport aux expériences réalisées avec HCCA. Ceci pourrait être attribué à la déprotonation de la matrice par la base permettant, alors, une déprotonation plus facile de l'analyte par la matrice. Les matrices ioniques sont des complexes de sels présentant à la fois des propriétés acides et basiques comme le montrent les études réalisées en chimie organique sur les liquides ioniques. Ceci explique les bons résultats obtenus à la fois en mode positif et en mode négatif. De manière générale, les études réalisées sur les standards montrent que HCCA/DANI mais surtout HCCA/ANI, constituent les meilleures matrices en terme de gain de signal, que ce soit en mode positif ou négatif.

Matrice	Mode	Analyte	n ^a	Variation d'intensité ^b (u.a.)	Intensité moyenne ^b (u.a.)	rsd ^c (%)
HCCA/2A4M5NP	+	SP	10	14000-29000	21000	20
HCCA	+	SP	10	1830-14500	5938	63
HCCA/2A4M5NP	+	Apomyoglobine	5	1851-14500	2011	7
HCCA	+	Apomyoglobine	5	670-1528	1084	31,6
HCCA/2A4M5NP	-	ACTH 18-39	10	2208-8564	4380	50
HCCA	-	ACTH 18-39	10	1116-7226	1982	65,5
HCCA/DANI	-	ACTH 18-39	5	5529-18000	10218	48

^an nombre d'expériences (preparations analyte/matrice et analyses) pour de nouvelles solutions de matrice chaque fois

^bles valeurs d'intensité sont données pour les ions [M+H]⁺ ou [M-H]⁻ et sont données en unités arbitraires (u.a.)

^crsd correspond à la déviation standard relative

Tableau 2. *Evolution du signal en mode positif et négatif pour HCCA/2A4M5NP, HCCA/DANI comparés à HCCA*

⁷⁸Moghaddam M.Z., Heinze E., Tholey A.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004** 18, 141-148

Etant donné les faibles quantités de certains peptides et protéines dans les tissus et en particulier pour des sections de tissu d'environ 15 μm , la matrice choisie doit permettre d'atteindre la meilleure sensibilité possible. Des tests de sensibilité ont été réalisés pour HCCA/2A4M5NP et HCCA/DANI (HCCA/ANI ayant été préalablement étudiée par Armstrong et coll.) sur la Substance P et l'ACTH 18-39. Pour HCCA/DANI, la limite de détection est de 250 amole en mode positif et 100 fmole en mode négatif. Ces valeurs sont à comparer avec les valeurs obtenues pour HCCA qui permet de détecter jusqu'à 1 fmole en mode positif et 250 fmole en mode négatif. Dans les deux modes HCCA/DANI permet de travailler sur des quantités plus faibles d'échantillon. HCCA/2A4M5NP avec 150 fmole détectable en mode négatif est plus sensible que HCCA mais est, en revanche, 100 fois moins sensible que cette dernière en mode positif. Ainsi, les matrices ioniques permettent d'analyser des quantités plus faibles d'échantillon que la matrice classique équivalent HCCA et en particulier en mode négatif.

Enfin, une propriété intéressante de ces matrices est de présenter moins de signaux que les matrices classiques dans la gamme des bas m/z ($m/z < 500$) ce qui est déterminant pour l'analyse des petits peptides, des lipides ou des composés de faible masse (acides aminés, médicaments,...).

5. MATRICES IONIQUES ET ANALYSE DE TISSUS

Pour l'étude de tissus des matrices permettant d'améliorer les qualités spectrales mais également possédant des propriétés de cristallisation intéressantes sont à retenir. Les matrices précédemment étudiées (matrices dérivées de l'aniline) ont été particulièrement étudiées pour ces études étant donné l'augmentation d'intensité observée sur les standards mais d'autres matrices ioniques ont également été testées en terme de cristallisation. En particulier les matrices liquides avec Et_3N ou la diéthylaniline ou encore d'autres matrices ioniques solides connues pour leur homogénéité de cristallisation ont été testées sur tissus.

Dans un premier temps, la cristallisation sur les tissus a été étudiée. Pour ce faire, la matrice est simplement appliquée sur l'ensemble du tissu avec une micropipette sans utiliser de technique permettant d'améliorer les dépôts cristallins comme des nébuliseurs. Deux des matrices présentent une cristallisation particulièrement homogène sur les tissus (**Figure 5**) HCCA/ANI et HCCA/2A4M5NP. Pour HCCA/2A4M5NP les cristaux sont de très petites tailles et distribués de manière très homogène sur l'ensemble du tissu donnant un film polycristallin extrêmement fin. Pour les matrices classiques les cristaux sont généralement irréguliers et

couvrent seulement environ 50% du tissu⁷⁹. Pour HCCA/DANI, la cristallisation conduit à la formation de cristaux orange assez gros couvrant totalement le tissu. Le pourcentage de couverture du tissu peut-être augmenté en augmentant la concentration de matrice mais dans ce cas la taille des cristaux rend l'homogénéité plus faible que pour HCCA. Les autres matrices ioniques présentent soit des cristallisations à partir du bord du dépôt sans couverture totale de l'échantillon (HCCA/PY), soit cristallisent "en paquets" couvrant seulement quelques parties de l'échantillon (HCCA/DANI, HCCA/DIEANI, HCCA/ET3NH,...). Ce manque d'homogénéité de cristallisation rend ces matrices peu adaptées à l'analyse de tissus. De manière générale, la cristallisation, HCCA/2A4M5NP et HCCA/ANI semblent être les matrices les mieux adaptées à l'analyse de tissus.

✓Mode positif

Les différentes matrices sont alors comparées en terme de qualité spectrale sur l'analyse directe de coupes de cerveau de rat. En mode positif les différentes matrices ont été testées. En mode linéaire, les signaux les plus intenses sont obtenus avec la matrice HCCA/ANI. Pour cette matrice, les ions peptidiques présentent une plus forte intensité que pour HCCA (Tableau 3). En ce référant au tableau, cette augmentation est particulièrement marquée pour les ions à m/z 2507,8 et 4289,1. De plus, la comparaison des profils montre que tous les ions peptidiques observés pour HCCA sont observés avec HCCA/ANI avec au minimum la même intensité, mais qu'en revanche quelques peptides sont uniquement détectés avec la matrice ionique dans la gamme de masse 3000-4000. For HCCA/DANI, les signaux présentent une intensité plus forte dans la gamme des $m/z < 2000$. Dans une gamme de m/z plus élevée, les signaux détectés sont équivalents en nombre et intensité par rapport à HCCA. HCCA/2A4M5NP et HCCA/PY donnent des réponses plutôt moins bonne que la matrice HCCA sur les tissus. Pour les matrices ioniques liquides HCCA/DIENI et HCCA/TE3NH, l'analyse directe sur tissus n'est pas performante. Cet effet peut-être attribué à la forte énergie laser nécessaire pour produire des ions avec ces deux matrices, effet s'additionnant à l'augmentation d'énergie laser nécessaire pour pratiquer des analyses sur tissus. Ce résultat pourrait également être lié à une faible incorporation des analytes du tissu dans la matrice relativement visqueuse. Malgré la variation des différents paramètres d'acquisition de l'instrument aucun résultat intéressant n'est obtenu avec ces matrices.

⁷⁹Schwartz S.A., Reyzer M.L., Caprioli R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38, 699-708

m/z	m/z calculé	Assignement putatif	Intensité HCCA^b	Intensité HCCA/ANI^b	I(HCCA/ANI)/I(HCCA)
1087.4	1087.4	Arg-vasopressine	283	325	1.1
1513.9	1514.7	γ-mélanotropine	328	654	2
1641.0	1639.7	somatostatine	284	644	2.3
1690.2	1689.9	neurotensine	139	674	4.8
1789.1		unknown	1610	4190	2.6
1844.0	1845.8	C-term flanking peptide	143	425	3.0
1859.1		inconnu	1983	5896	3.0
2271.3	2273.1	Prolactine releasing peptide PrPR2	411	848	2.1
2351.1	2351.16	CLIP 1-21	100	283	2.8
2506.2	2507.8	inconnu	182	3417	18.8
3076.4		inconnu	-	220	-
3459.7	3461.6	C-term flanking peptide of NPY	-	168	-
4289.1		inconnu	131	1816	13.9
4970.1		inconnu	7187	57000	7.9
5221.4		inconnu	103	1125	10.9
6176.6		inconnu	-	130	-

^a Assignements base sur les mesures de masse^{4,11}

Table 3: *Comparaison des variations d'intensité entre HCCA/ANI et HCCA sur l'analyse d'une coupe de cerveau de rat dans la gamme de masse 1000-10000 pour 15 peptides*

Les analyses effectuées en mode réflecteur sur les coupes de cerveau de rat confirment l'augmentation d'intensité avec les matrices ioniques solides HCCA/ANI et HCCA/DANI par comparaison avec HCCA (Figure 4). Pour les deux matrices ioniques l'augmentation d'intensité est nette comme observable sur l'exemple de spectre présenté Figure 6 pour HCCA/ANI. Pour HCCA/ANI, les signaux sont systématiquement plus intenses. Des ions supplémentaires sont détectés avec cette matrice dans certaines gammes de m/z, e.g. entre 2200 et 3800 et au-dessus de m/z 5000, comme le montre les agrandissements présentés. Pour HCCA/DANI les signaux sont également plus intenses mais l'augmentation est moins forte que pour la matrice HCCA/ANI. Ainsi, HCCA/ANI et HCCA/DANI constituent les deux matrices les plus intéressantes en mode positif en terme d'augmentation d'intensité, de rapport signal/bruit et de sensibilité.

Le **Tableau 4** résume sous forme synthétique, l'ensemble des résultats obtenus pour les différentes matrices ioniques en comparant la cristallisation et les qualités spectrales en mode positif linéaire et réflecteur obtenues par analyse des coupes de tissu. Le **Tableau 4** montre clairement que les deux matrices ioniques HCCA/ANI et HCCA/DANI constituent les deux meilleures candidates pour l'analyse directe des tissus.

Matrice	Forme	Cristallisation sur tissu	Signal (mode linéaire)^a	Signal (mode réflecteur)^a
HCCA/ANI^{70,71}	solide	++++	+++++	+++++
HCCA/DANI	solide	++	+++	+++
HCCA/DIEANI^{70,71}	liquide	+	-	-
HCCA/2A4M5NP	solide	+++++	++	-
HCCA/DBU	liquide	+	-	-
HCCA/PY^{70,71}	solide	+	+	-
HCCA/ET3NH^{70,71}	liquide	+	-	-
HCCA/PIP	liquide	+	-	-
HCCA/2AQ^{70,71}	solide	+	-	-
HCCA	solide	+++	+++	++

a : "+++++" meilleurs résultats, "+" résultats les moins bons et "-" pas de signal détecté

Table 4: *Evaluation de plusieurs matrices ioniques en terme de cristallisation sur le tissu, intensité du signal en mode linéaire et réflecteur positif*

✓ Post Source Decay sur tissus

La possibilité de réaliser la fragmentation des peptides directement sur tissus est un élément clef pour l'analyse directe de tissus et l'imagerie MALDI. L'obtention de la répartition d'un peptide dans les tissus est un élément important mais la possibilité d'en vérifier la structure primaire ou de la déterminer (*de novo* sequencing) apporte un niveau d'information supérieur. Les essais précédemment réalisés sur coupes de tissu avec HCCA en mode PSD soulèvent la difficulté des études structurales sur tissus. Même pour des ions peptidiques de faible masse (m/z 1000), les rendements de fragmentation sont très faibles et ce, malgré le fait que cette matrice soit connue pour conduire à des rendements de fragmentation plus importants que d'autres matrices. Cependant, l'augmentation d'intensité observée pour HCCA/ANI et HCCA/DANI nous a conduits à tenter des études en mode Post Source Decay PSD et ce, bien

que les matrices ioniques soient connues pour conduire à des rendements de fragmentation plus faibles que HCCA en préparation d'échantillon classique⁸⁰. Cependant, sur tissus les analyses en mode PSD réalisées montrent un rendement de fragmentation supérieur avec la matrice ionique HCCA/ANI que pour HCCA (Figure 7). Bien que certaines fenêtres de tension du réflecteur (en particulier pour les rapports $U_{\text{réflecteur}}/U_{\text{cible}} < 0,75$) ne permettent pas l'observation d'ions fragments, des spectres PSD partiels peuvent être enregistrés. Répétée plusieurs fois pour différents ions peptidiques et sur différentes régions de la coupe ces analyses donnent des résultats identiques. Bien que les différents paramètres (énergie laser, temps de retard à l'extraction, tension du guide d'ion, tensions d'accélération, introduction de gaz) aient été modifiés pour augmenter la fragmentation, il n'est pas possible d'observer des ions fragments pour toutes les fenêtres, en revanche, des PSD partiels peuvent être réalisés pour des ions jusqu'à des m/z de 2000. Pour HCCA/DANI, les rendements de fragmentation sont faibles. Pour les ions de $m/z < 1000$ des ions fragments de faible intensité sont observés alors que pour des $m/z > 1000$ l'intensité des ions fragments devient insignifiante.

Ces études montrent la complexité des processus de fragmentation. En préparation classique sur différents standards peptidiques, HCCA conduit à des rendements de fragmentation plus importants que la matrice ionique HCCA/ANI, résultat prévisible puisque HCCA est la matrice MALDI connue pour ces forts rendements de fragmentation. Dans ces conditions, il est remarquable que la tendance soit inversée lors d'analyses sur tissus. Les difficultés de fragmentation rencontrées sembleraient prouver que les ions formés à partir des tissus sont plus stables. Une explication plausible à ce phénomène est que les espèces observées sur les tissus sont en parties sous forme cationisées sachant que les ions sodium et potassium sont en concentration non négligeable dans les tissus. Ainsi, si les espèces sont cationisées, leur stabilité sera plus importante comme le montre les calculs théoriques réalisés par modélisation et peu de fragments peuvent être générés. Cependant plusieurs éléments sont défavorables à cette hypothèse, comme la corrélation entre les masses mesurées et calculées pour des peptides attendus dans le cerveau du rat (Tableau 2), la non observation d'ions à m/z 23 dans les spectres PSD ainsi que la corrélation des m/z entre mode positif et négatif où généralement peu d'ions adduits sont observés. Quelques essais réalisés sur un instrument de type MALDI-LIFT-TOF connu pour ces capacités supérieures de fragmentation, conduisent également à des rendements de fragmentation médiocres. Ainsi, ces résultats semblent montrer que les ions MH^+ formés sont plus stables à partir des tissus (i.e. énergie interne plus faible) que ces mêmes ions formés à partir de préparations classiques. Comprendre pourquoi l'énergie interne des ions est plus faible à partir des tissus, reste actuellement une question.

⁸⁰Li Y.L., Gross M.L.; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004** 15, 1833-1837

✓Mode négatif

En mode négatif, trois des matrices ioniques donnent des résultats particulièrement intéressants HCCA/DANI, HCCA/2A4M5NP et HCCA/ANI. Pour ces matrices, une augmentation notable du signal est observée comparativement à HCCA confirmant les résultats précédemment obtenus sur les standards. La meilleure et la plus grande intensité sont observées avec HCCA/ANI et HCCA/DANI (Figure 8)

Une comparaison entre le mode négatif et le mode positif est réalisée pour HCCA/DANI sur tissus. Sur un même point du tissu des spectres successifs peuvent être enregistrés pour chaque polarité. La Figure 9 présente un exemple de spectres obtenus et présente plus particulièrement la région des m/z correspondant aux phospholipides. Les spectres montrent que le mode négatif reste moins sensible que le mode positif. Cependant, en mode négatif certains composés restent plus facilement détectables (e.g. m/z 959 et m/z 995) et, le plus faible nombre d'adduits conduit à une simplification des spectres et à une augmentation de la résolution.

✓Matrices ioniques et acide sinapinique

HCCA/ANI présentent les plus grandes performances, les résultats obtenus avec cette matrice sont comparés à ceux obtenus avec l'acide sinapinique, cette dernière étant la matrice la plus fréquemment utilisée à l'heure actuelle pour l'analyse directe de tissus⁸¹. Pour la gamme des $m/z < 5000$, le nombre de pics détectés est plus important avec la matrice ionique et l'intensité des ces ions est supérieure que pour l'acide sinapinique (Figure 10). Cependant, pour les m/z supérieurs et particulièrement pour $m/z > 10000$ la tendance est inversée et l'acide sinapinique permet de détecter un nombre d'ions supérieurs (e.g. 11072,72 ; 12348,14 ; 15127,19).

Des matrices ioniques synthétisées à partir de la réaction entre l'acide sinapinique et l'aniline, la N,N-diméthylaniline et N,N-diéthylaniline ont également été testées. Ces matrices ioniques présentent des performances équivalentes à l'acide sinapinique, mais sans amélioration notable. Il serait intéressant de pouvoir trouver des matrices ioniques basées sur l'acide sinapinique et présentant des performances supérieures. De telles matrices sont à l'étude actuellement.

Finalement, suivant le mode d'analyse (positif ou négatif) trois matrices ioniques présentent un intérêt particulier pour l'analyse de tissus actuellement, HCCA/ANI,

⁸¹Schwartz S.A., Rezyer M.L., Caprioli R.M.; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38, 699-708

HCCA/DANI et HCCA/2A4M5NP. Enfin, il faut souligner à nouveau une qualité supplémentaire aux matrices ioniques, la grande stabilité sous vide. Les expériences d'analyse directe et plus particulièrement d'imagerie pouvant être longues cette qualité est un atout majeur.

6. IMAGERIE MALDI ET MATRICES IONIQUES

Les matrices ioniques retenues ont alors été testées pour réaliser des images. Les images pour cette étude ont été réalisées sur un instrument de type MALDI-LIFT-TOF.

Dans le cadre de l'imagerie, la fréquence de répétition des tirs laser est le paramètre essentiel puisqu'il définit la durée de l'analyse. Dans le cadre d'applications biologiques ou cliniques, le facteur temps est crucial. Habituellement, la majeure partie des appareils commerciaux utilisaient des laser possédant une fréquence de répétition des tirs dans une gamme de 2 à 20 Hz. En supposant que 10000 points d'acquisition définissent de manière suffisamment précise une coupe de cerveau de rat et en effectuant une moyenne de 100 tirs lasers par point, cela signifie que l'acquisition dure environ 138H au minimum à 2Hz, 92H à 3 Hz et 14H à 20 Hz, et ce sans compter le déplacement de l'échantillon entre chaque point. Ainsi, les analyses sont considérablement longues. Actuellement, l'utilisation d'autres lasers permet d'atteindre des fréquences de répétition de 50 à 200 Hz réduisant, pour les mêmes conditions que précédemment, le temps d'analyse à environ 5-6H à 50 Hz et moins de 2H à 200 Hz. Cependant si l'augmentation de la fréquence de répétition diminue très avantageusement le temps d'analyse elle pose d'autres problèmes. En effet, à des fréquences aussi élevées les matrices classiques (e.g. HCCA, acide sinapinique) présentent une éjection de matériel importante. Ainsi, l'observation de coupes de cerveau de rat avec la matrice HCCA, après balayage de 10000 points à 200 tirs laser moyennés par point pour une fréquence de 50 Hz, montre que le dépôt de matrice à la surface du tissu est très fortement endommagé. A des fréquence des répétition plus faibles (e.g. 3 Hz) ce phénomène n'est pas perceptible. A 50 Hz, les cristaux de matrice sont très nettement endommagés par l'ensemble de l'acquisition, et en certains points du tissu seuls quelques cristaux subsistent. A contrario, testées dans les mêmes conditions, les matrices ioniques résistent très bien. L'observation des dépôts après une première série d'acquisition ne permet pas de déceler un endommagement visible des cristaux. Après la première acquisition sur l'ensemble de la coupe avec HCCA, il est difficile de réitérer une série d'analyse et le signal est faible. Au contraire, pour les matrices ioniques une deuxième série d'acquisition peut être réitérée sans perte notable de signal. Des études sont en cours pour

vérifier par microscopie électronique à balayage l'allure des points d'impact sur les cristaux de matrice après irradiation laser dans différentes conditions (énergie laser, fréquence de répétition des tirs, nombre de tirs,...). Les images réalisées sur le MALDI-LIFT-TOF à 50 Hz pour 10000 positions balayées sur une coupe de cerveau de rat avec 200 tirs moyennés par position, confirment ces résultats. La **Figure 11** présentent les images reconstruites à partir de ces données pour différents ions avec la matrice ionique HCCA/ANI. Une première série d'acquisition est réalisée en mode positif, puis la même coupe est balayée une deuxième fois aux mêmes points pour enregistrer des données en mode négatif. Les images sont reconstruite à l'aide du logiciel FlexImaging fournit par la constructeur de l'instrument (Bruker Daltonics). Pendant les deux séries d'acquisition le signal observé est intense. Après la deuxième série d'acquisition quelques positions sont de nouveau analysées en mode positif, sans observer une perte d'intensité du signal. Après l'ensemble de ces expériences, l'examen de la coupe ne permet pas de mettre en évidence des dommages importants sur le dépôt de matrice. Les ions détectés en mode positif et négatif ne correspondent pas dans la plupart des cas à des composés identiques, ce qui démontre clairement l'intérêt de pouvoir utiliser les deux modes consécutivement sur une même coupe. En mode positif, les ions à m/z 2468 et 4971 présentent des répartitions bien distinctes. L'ion à m/z 2468 se trouve plus spécifiquement dans la région de l'hypocampe et le ventricule alors que l'ion à m/z 4971 présente une répartition relativement ubiquitaire. Il est possible de superposer deux images de répartition. Ces images de co-localisation permettent rapidement de comparer la répartition de deux ions correspondant à deux composés distincts comme présentés à titre d'exemple par superposition des ions à m/z 1670 et 1212 ou des ions à m/z 1758 et 1869. En mode négatif, l'ion à m/z 1268 présente une répartition très localisée qui suit la région du *Caudate Putamen* alors que l'ion à m/z 2007 présente une répartition très particulière. Des images de co-localisation par superposition montrent que les différents composés présentent des répartitions très différentes. Enfin, les dépôts de matrice sont réalisés sans technique particulière en ajoutant la solution de matrice à la micropipette. Par cette méthode et en réalisant des dépôts qui dépassent de la coupe, nous avons étudié la délocalisation possible des composés au sein de la coupe. La comparaison des spectres entre un point sur le bord de la coupe et hors de la coupe pour HCCA/ANI montre qu'un profil classique est obtenu sur la coupe avec des pics intenses, alors que seuls quelques rares pics résiduels avec une intensité très faible sont observés pour la zone hors tissu. Ces expériences montrent que la délocalisation des composés par utilisation de cette matrice est très faible dans le tissu. Ceci pourrait être attribué à la cristallisation très homogène et très rapide de cette matrice sur les tissus.

La faible délocalisation avec la matrice ionique, ainsi que sa grande stabilité sous vide, son plus faible taux d'ablation en particulier pour de fortes fréquences de répétition des tirs laser

et l'augmentation notable d'intensité pour l'analyse de peptides et protéines démontrent l'intérêt de ce type de matrices pour l'analyse des tissus en MALDI et l'imagerie à haut débit.

7. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude démontre l'intérêt des matrices ioniques développées sont particulièrement intéressantes dans le cadre de l'imagerie MALDI. Car elles présentent des propriétés avantages déterminants comparativement aux matrices classiques comme

- 1- Une augmentation de l'intensité des ions, de la sensibilité et du rapport signal/bruit
- 2- Une cristallisation plus homogène et rapide sur les tissus
- 3- La possibilité d'obtenir suffisamment d'ions fragments pour enregistrer des PSD
- 4- Moins de pics correspondant à des ions de matrice dans la région des m/z plus faibles
- 5- Une plus grande stabilité sous vie
- 6- Une plus faible ablation sous conditions d'irradiation avec une forte fréquence de répétition des tirs, permettent de réaliser successivement différentes images sur la même coupe (e.g. mode positif et négatif)

Les matrices HCCA/2A4M5NP, HCCA/DANI et plus particulièrement HCCA/ANI apparaissent être les trois matrices ioniques dérivées de HCCA qui répondent le mieux à l'ensemble de ces critères. HCCA/ANI a démontré un potentiel particulièrement important pour l'imagerie. Cette matrice présente des performances supérieures en mode positif et négatif, et permet l'obtention de PSD partiels directement des tissus. Les acquisitions réalisées puis les images reconstruites pour cette matrice démontrent que le signal est plus intense, que la reproductibilité tir à tir est supérieure et que le matériel est plus résistant à l'ablation laser pour cette matrice que pour HCCA..

Les perspectives de ces études sont actuellement dirigées vers la recherche de nouvelles matrices ioniques plus spécifiquement dirigée vers l'analyse des protéines. En effet, les matrices sélectionnées sont plus spécifiques pour une gamme de masse inférieure à m/z 10000 soit des peptides. L'obtention d'une matrice performante pour l'analyse des protéines voire même une matrice plus spécifique des protéines membranaires consisterait en une avancée importante. Des matrices ioniques plus spécifiques des médicaments, des drogues ou des acides aminés sont

également à l'étude. Des expériences pour utiliser cette matrice en réalisant des micro dépôts sont également à l'étude. Enfin, les matrices ioniques sélectionnées sont également utilisées pour des applications aux problématiques biologiques et notamment pour les applications dans le cadre du cancer de l'ovaire.

II. ANALYSE DE TISSUS ET TRAITEMENT DES COUPES

L'amélioration des analyses de tissus par MALDI peut-être abordée sous plusieurs aspects. Dans le chapitre précédant nous nous sommes attachés à la recherche de nouvelles matrices MALDI plus spécifiquement adaptées à l'analyse directe des tissus et l'imagerie MALDI. Cette même problématique peut-être abordée par l'amélioration de la préparation de l'échantillon biologique et notamment par la possibilité de pratiquer un traitement de l'échantillon en vue d'améliorer les performances analytiques. Ainsi, des traitements peuvent être envisagés pour extraire spécifiquement certaines classes de molécules permettant une détection plus aisée des autres. Par exemple, des études réalisées par Schwartz et coll. montrent que le rinçage préalable de la coupe de tissu à l'éthanol permet de réduire la quantité de sels et retirer l'excès d'hémoglobine présents dans le tissu⁸². Cependant, dans ce cas la possibilité d'extraire par la même occasion certaines protéines solubles est à prendre ne compte. D'où l'utilisation de certains solvants organiques peut constituer des développements intéressants.

La possibilité de travailler sur des échantillons conservés suivant les protocoles classiques utilisés par les anatomopathologistes en hôpitaux présente un intérêt. En effet, les tissus prélevés (biopsies, prélèvements) sont tout d'abord fixé par addition de paraformaldéhyde (PAF) pendant plusieurs heures avant d'être inclus dans de la paraffine. Dans ces conditions particulières, l'analyse des tissus en MALDI nécessite des étapes de traitements de l'échantillon (déparaffinage) car l'inclusion en paraffine n'est pas compatible avec l'analyse par spectrométrie de masse. La mise au point de traitements permettant l'analyse de ce type d'échantillons est d'un enjeu majeur, qui permettent de donner un accès à l'ensemble des échantillons conservés sur près de 30 ans dans les centres hospitaliers pour différentes pathologies.

Afin de pouvoir également caractériser les peptide/protéines directement au sein des tissus (sans extraction) et sachant que la possibilité d'étudier les spectres d'ions fragments afin d'obtenir une séquence primaire (au moins partielle) est limitée à des peptide de $M < 3000$ u. (excepté sur instrument équipé d'un analyseur FT-ICR), l'hydrolyse des protéines de haut poids moléculaire en peptides devenait une étape importante. Ainsi, les digestions enzymatiques sur coupes sont à étudier. Dans la même optique, la possibilité d'obtenir des rendements de fragmentation suffisant ainsi que des spectres d'ions fragments suffisamment simples à interpréter, nous a conduit à orienter nos recherches vers la réalisation de dérivations chimiques

⁸²Schwartz S.A., Reyzer M.L., Caprioli R.M. ; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38, 699-708

des peptides directement sur les coupes afin d'augmenter le taux de fragmentation et d'orienter la fragmentation sur une série d'ions particulière.

Nous nous sommes donc attachés dans cette étude sur plus spécifiquement trois aspects. Le premier concerne le traitement des coupes par des solvants organiques dans le but de retirer au moins partiellement les lipides du tissu pour augmenter la détection des peptide/protéines. Dans une deuxième partie, nous avons étudié les traitements permettant l'analyse à partir de tissus originellement conservés en bloc de paraffine. Enfin, le troisième aspect concerne l'étude de digestions enzymatiques et de dérivation des peptides directement sur coupes dans un but de caractériser les composés.

1. TRAITEMENT DES COUPES ET EXTRACTION DES LIPIDES

Dans le but, de pouvoir mieux détecter les peptide/protéines dans les tissus par retrait d'une partie des lipides présents au sein des tissus, des rinçages avec différents solvants sont réalisés. Parmi les solvants organiques testés, ont été en particulier retenus les solvants utilisés dans les protocoles d'extraction des lipides comme le chloroforme^{83,84} ou l'hexane⁸⁵. Le traitement des coupes de tissu par ces solvants devrait permettre le retrait de certains lipides, et notamment ceux des membranes cellulaires rendant ainsi l'accès aux peptides et protéines cytoplasmiques plus facile et notamment pour l'étape d'incorporation avec la matrice. L'utilisation des détergents pour dissoudre les membranes aurait pu être envisagée mais cette classe de composés est généralement peu compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse et n'a donc pas été retenue dans cette étude.

Les expériences sont faites sur des coupes de cerveau de rat réalisées au cryostat et d'une épaisseur de 15 µm. Les principaux solvants testés ici sont le chloroforme, l'hexane, le toluène et l'acétone. Les tissus sont rapidement rincés en faisant couler le solvant sur la coupe en inclinant le support. Typiquement, 50 µL de solvant sont utilisés pour une surface de 0,25 cm². L'analyse débute lorsque le solvant restant est entièrement évaporé. Dans certains cas, le solvant utilisé est collecté après rinçage de la coupe pour réaliser des analyses supplémentaires.

⁸³Folch J., Lees M., Sloane S.G.H.; *J. Biol. Chem.* **1957** 226, 497-509

⁸⁴Bligh E.G., Dyer W.J.; *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959** 37, 911-917

⁸⁵Ferraz T.P.L., Fiùza M.C., Dos Santos M.L.A., Pontes de Carvalho L., Soares N.M.; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2004** 58, 187-193

✓ Traitement des coupes et augmentation d'intensité

La comparaison des spectres sans et avec traitement est difficile et peut-être non représentative. Les expériences sont conduites sur des moitiés de coupes de cerveau de rat, répétées au minimum 5 fois sur des coupes différentes et plusieurs localisations distinctes dans différentes régions du tissu sont analysées pour chaque coupe.

L'analyse des coupes après traitement avec les différents solvants permet d'observer des variations après traitement des coupes de tissu. L'analyse dans la région des m/z 500-1000, met en évidence une diminution du nombre de pics et de leur intensité pour cette gamme de masse. Comme attendue pour ces solvants, la diminution du signal est observée pour une gamme de masse correspondant aux lipides. Dans le cas du chloroforme, le tissu traité présente une couleur blanchâtre qui tend à confirmer que le traitement permet une extraction des lipides du tissu. Suivant le solvant utilisé pour le traitement des coupes, les effets sont différents. Pour le chloroforme (Figure 12), le spectre montre une diminution pour les composés de $m/z > 600$ alors que le massif autour de m/z 544 est toujours observé. Pour l'hexane (Figure 13) une diminution générale du signal dans toute cette gamme de masse est observée. Dans le cas du toluène (Figure 14), contrairement au chloroforme, les composés aux alentours de m/z 544 sont éliminés alors que les composés vers les m/z 750-800 sont au contraire plus facilement observés après traitement. Enfin, l'acétone (Figure 15) présente un effet relativement similaire à celui observé pour le chloroforme. De manière générale, le traitement du tissu par différents solvants permet d'éliminer une partie des composés (présents sur les spectres dans la région des m/z 500-1000) qui sont à priori des lipides. Ceci permet alors une meilleure observation soit des peptides de faibles masses, soit de certains lipides moins abondants et moins facilement extractibles des tissus. Au contraire, l'examen des spectres dans la gamme des $m/z > 1000$ montre une tendance inverse avec une augmentation de l'intensité. Dans la région des m/z 1000-4000 le signal est relativement équivalent pour les coupes non traitées et les coupes rincées au solvant. En revanche, dans la région des $m/z > 4000$ une nette augmentation du signal et du nombre de composés détectés est observé comme le montrent à titre d'exemple les agrandissements de spectres présentés pour le chloroforme (Figure 16) et l'hexane (Figure 17). L'intensité des pics et le nombre de composés détectés évalués au travers de plusieurs expériences (Tableau 5) conduit à une augmentation moyenne de 26% dans le cas du chloroforme et de 29% dans le cas de l'hexane. Pour le toluène et l'acétone une augmentation est également observée et évaluée respectivement à 25% et 10%.

Globalement, les différents solvants testés conduisent à l'obtention de résultats similaires, soit une diminution des signaux lipidiques et une augmentation de l'intensité des ions pour les peptides/protéines et plus particulièrement dans la région des hauts m/z . Les résultats montrent

également qu'un simple rinçage des coupes conduit à une élimination seulement partielle des lipides. L'augmentation d'intensité pourrait être attribuée à une dissolution partielle des bicouches lipidiques (phospholipides) formant la membrane cellulaire qui permettrait alors un accès facilité au contenu peptidique/protéique intracellulaire.

Traitement	Nombre d'expériences	Nombre de composés détectés	Augmentation du signal (%)
Chloroforme	10	77	26
Hexane	5	79	29
Toluène	5	76	25
Acétone	5	65	10
Sans traitement	10	61	-

Tableau 5 : *Variation du nombre de composés détectés et de leur intensité après différents traitements organiques*

Dans les expériences suivantes, le chloroforme sera plus particulièrement étudié.

✓ Détermination du traitement optimal des tissus

Afin d'obtenir le maximum de gain dans l'intensité des signaux, les conditions optimales de traitement ont été étudiées. L'effet du volume de solvant utilisé a en particulier été étudié. La **Figure 18** présente l'évolution moyenne du nombre de composés détectés en fonction du volume de chloroforme utilisé pour rincer les coupes. Le nombre de composés augmente pour les coupes non traitées et traitées, mais l'augmentation du volume de solvant n'induit pas de variations particulièrement importantes du nombre de composés détectés. Contrairement à ce qui pouvait être supposé l'augmentation du volume, n'entraîne pas de meilleurs rendements d'extractions et la tendance observée est plutôt à la baisse. Le volume optimum serait donc de 50 μ L de chloroforme pour une surface de tissu de 0,25 cm^2 .

Les tests de reproductibilité, démontrent l'écart type calculé sur différentes expériences est de 10%. L'augmentation moyenne du nombre de composés détectés est alors de 13% (**Tableau 6**).

	Nombre de coupes ^a	Sans traitement	Traité
Nombre de composés détectés	1	87	95
	2	78	79
	3	51	75
	4	54	76
	5	61	91
Nombre moyen de composés détectés		66	80
Ecart Type		24%	11%

^aanalyse de la même zone du tissu pour chaque coupe

Tableau 6 : *Reproductibilité des expériences au travers de 5 expériences après traitement au chloroforme*

✓ Traitement des tissus et conservation de la structure

Afin de pouvoir appliquer les traitements des tissus à l'analyse directe et à l'imagerie, nous avons cherché à vérifier que celui-ci n'entraînait ni délocalisation des composés ni destruction de la structure. A priori, les peptides/protéines ne sont pas solubles dans ces solvants et en particulier le chloroforme plus particulièrement étudié. Nous avons tout d'abord effectué une approche basée sur l'observation des tissus au microscope optique. Des études différentielles sur les coupes de tissus par MALDI ont également été réalisées afin de rechercher une délocalisation potentielle des composés. Les observations au microscope montrent (Figure 19) que la structure des tissus est bien conservée après traitement de l'échantillon. Pour la délocalisation différentes régions de tissus traités et non traités sont analysées, en se fixant plus spécifiquement sur certains composés connus pour être plus spécifiquement présents dans certaines régions^{86,87,88}. Les expériences montrent qu'après traitement les composés sont toujours spécifiquement observés dans leur région d'origine. La Figure 20 présente un exemple pour le composé a m/z 9490, observé sans et avec traitement dans la première localisation et non détecté sans et avec traitement dans la deuxième localisation. Ainsi, le traitement au chloroforme ne détruit pas la structure macromoléculaire des tissus et ne semble pas non plus

⁸⁶Caprioli R.M., Farmer T.B., Gile J.; *Anal. Chem.* **1997** 69, 4751-4760

⁸⁷Stoeckli M., Farmer T.B., Caprioli R.M.; *Nat. Med.* **2001** 7, 493-496

⁸⁸Chaurand P., Schwartz. S.A., Caprioli R.M.; *Anal. Chem. A* **2004** 76, 87A-93A

entraîner de délocalisation des peptide/protéines. Des images sont en cours de réalisation pour comparaison avec des images obtenues sur coupes sans traitement.

✓Caractérisation des composés extraits

L'extraction possible de certains peptides/protéines plus hydrophobes des tissus par utilisation des solvants organiques ne pouvant être négligée, et afin de statuer sur la nature des composés extraits, la solution de rinçage est collectée après diffusion sur la coupe. Bien, qu'à priori, de telles extractions n'aient pas été rapportées, l'utilisation de ces solvants pour précipiter les protéines est connue et méritait d'être vérifiée.

Cinq extraits successifs sont collectés puis évaporés avant d'être repris dans un mélange $\text{CHCl}_3/\text{MEOH}$ (2 :1, v/v). Les extraits sont ensuite analysés sur un instrument MALDI-TOF dans une premier temps, puis afin d'obtenir des informations structurales sur un instrument de type nano-ESI-QTOF (QSTAR, MDS Sciex) dans un second temps. Les spectres MALDI réalisés (Figure 21), montrent l'existence d'un signal intense dans la région des $m/z < 1000$ mais aucun pic significatif dans la région des $m/z > 1000$. L'agrandissement dans la région des bas m/z présente des profils qui laissent présager la présence de lipides. Au contraire, la non observation d'ions pour des m/z plus élevés est en faveur de l'absence de peptide/protéines dans ces extraits. Les extraits analysés de nouveau en nano-ESI-QTOF confirment les résultats MALDI. Certains des ions peuvent être alors étudiés en mode MS/MS pour étudier les ions fragments. Les lipides sont connus pour donner des fragmentations particulières très différentes des fragmentations attendues pour des peptides. Par l'étude des fragmentations, les ions observés peuvent être attribués à des phospholipides connus pour être la composante majeure des membranes cellulaires. Ces composés sont en particulier des phosphatidylinositols et des lysophosphatidylinositols. Comme montré par le spectre MS/MS de l'ion observé en mode MS à m/z 857,71 (Figure 22) ces composés peuvent être identifiés sur la base d'un fragment spécifique de cette classe de lipides⁸⁹, l'ion fragment m/z 259- H_2O =241. Pour l'ion à m/z 857,71, le composé peut être identifié comme étant le glycérophosphatidylinositol (PI 16:0/20:4). De manière similaire, la phosphatidylsérine peut être identifié sur la base du fragment [M-88] et la phosphatidylcholine quant à elle par la présence d'un ion fragment phosphocholine caractéristique à m/z 184. Ainsi, à titre d'exemple la Figure 23 présente les spectres MS/MS en mode négatif sur l'ion [M-H]⁻ à m/z 834,75 et en mode positif sur l'ion

⁸⁹Pulfer M., Murphy R.C.; *Mass Spect. Rev.* **2003** 22, 332-364

[M+Na]⁺ à m/z 782,55 qui permettent sur cette base d'information d'identifier respectivement la glycérophosphatidylsérine (PS 18:0/22:6) et la glycérophosphatidylcholine (PC 34:1).

L'analyse des extraits confirme donc la présence en forte abondance de phospholipides comme attendu. Le traitement permettrait d'ouvrir partiellement la bicouche lipidique des membranes cellulaires en facilitant l'accès aux peptides/protéines intracellulaire sans extraire ces peptides/protéines ni les délocaliser.

Finalement, le traitement des tissus par des solvants organiques et notamment au chloroforme est un traitement facile et rapide qui permet de gagner en nombre et intensité de peptides/protéines détectés et plus particulièrement pour les protéines. Des images sont à réaliser pour confirmer ces expériences.

2. ANALYSE A PARTIR DE TISSUS FIXES ET INCLUS EN PARAFFINE

Afin de pouvoir utiliser les échantillons conservés dans les hôpitaux par les anatomopathologistes, une partie des études est réalisée sur des cerveaux de rat fixés au paraformaldéhyde (PAF) 4% sur la nuit puis inclus en paraffine. Les blocs sont alors coupés au microtome et les coupes déposées sur le porte échantillon de l'instrument où sur des lames de verre conductrices (lames recouvertes d'un film d'Indium Tin Oxyde où lames ITO). Avant l'analyse les échantillons doivent être en premier lieu déparaffinés. Les protocoles classiques de déparaffinage au toluène sont utilisés en réalisant plusieurs bains successifs. Sur de tels échantillons, le problème majeur est la fixation. En effet, le paraformaldéhyde conduit à la formation de pontages entre les protéines⁹⁰ qui génère un réseau rigide ne permettant plus l'accès aux molécules pour l'analyse. Sous sa forme dépolymérisée (formaldéhyde) le paraformaldéhyde est un aldéhyde qui peut réagir avec les fonctions amines primaires des protéines. Si deux fonctions -NH₂ se trouvent proches dans l'espace, alors le formaldéhyde conduira à la formation d'un pont méthylène. Les études montrent que les pontages peuvent se réaliser entre le -NH₂ N-terminale de la protéine et le -NH₂ terminale de la chaîne latérale de lysines. La fixation du formaldéhyde aux protéines est finie en moins de 24H mais la formation des ponts méthylène est plus lente et peut se poursuivre dans le temps. La formation des ponts méthylène semble être difficilement réversible.

Les expériences réalisées sur les coupes après déparaffinage au toluène montrent qu'il est encore possible d'obtenir du signal sur ces tissus (Figure 24). Néanmoins, l'intensité des pics et

⁹⁰Kiernan J.A.; *Microscopy Today* 2000 1, 8-12

leur nombre sont globalement plus faibles que pour des coupes à congélation. De plus, les profils sont différents de ceux obtenus sur les coupes à congélation. Comme le montre les exemples de spectres, obtenus à partir de cerveaux fixés au PAF puis inclus en paraffine après coupe et déparaffinage, pour les deux matrices acides sinapinique et HCCA, les signaux sont encore relativement abondant pour des $m/z < 5000$ mais d'intensité très faible au-delà. Même avec l'acide sinapinique, qui habituellement permet de détecter des protéines pour des $m/z > 10000$, sur ces coupes fixées et incluses, les ions sont principalement détectés dans la gamme de masse $m/z < 5000$. Pour HCCA, la tendance est accentuée et les signaux très intenses habituellement vers $m/z 5000$ sont d'intensité relativement faible. Il semble donc, que la fixation au paraformaldéhyde rende difficile l'analyse des coupes. Un traitement consécutif au dernier bain de déparaffinage, à l'éthanol permet une légère augmentation du signal et le retrait de certains adduits de sels, comme mentionné dans de précédentes études. De plus un agrandissement des spectres permet d'observer que des massifs de pics larges et se chevauchant sont présents. La comparaison détaillée des spectres avec ceux obtenus à partir de coupes à congélation (Figure 25) permet de mettre en évidence clairement ce phénomène. Pour chaque pic observé à partir de coupes à congélation, des massifs de pics complexes et se recouvrant sont observés à partir des coupes fixées et incluses en paraffine après déparaffinage. Un examen minutieux des signaux montre des différences de 12 u. entre les pics d'un même massif. Ces adduits +12 u. ont également été observés par d'autres équipes dans des études sur des tissus ou des cellules fixés^{91,92}. Ces adduits sont attribuables au paraformaldéhyde, puisque ces études s'intéressaient à des tissus fixés mais non inclus en paraffine. Ces adduits seraient attribuables à une modification chimique provenant de l'addition d'un carbone. Le formaldéhyde libre peut ainsi réagir avec les groupements $-NH_2$ libres pour former une imine entraînant une augmentation de +12 u. de la masse. Ces réactions étant favorisées par la présence de sels provenant des tampons utilisés pendant les étapes de fixation. L'ensemble de ces adduits +12u., ainsi que les espèces cationisées au sodium, entraîne l'existence de massifs complexes, larges et rendant plus difficile la mesure des m/z avec précision et l'interprétation des spectres.

Des solutions à ces difficultés ont été recherchées. Sachant que la réaction de pontage n'est pas complète à 100% et qu'une partie des fonctions aldéhydes du formaldéhyde restent libre, il est possible d'utiliser la réactivité de ces fonctions pour induire une dérivaison chimique. La 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) est un composé connu pour réagir avec les fonctions cétones et en particulier les fonctions aldéhydiques. Cette dérivaison est employée de manière fréquente pour l'analyse des composés portant ces fonctions et en particulier pour des analyses

⁹¹Redeker V., Toullec J.Y., Vinh J., Rossier J., Soye D; *Anal. Chem.* **1998** 70(9), 1805-1811

⁹²Rubakhin S.S., Greenough W.T., Sweedler J.V.; *Anal. Chem.* **2003** 75(20), 5374-5380

en HPLC ou HPLC couplées avec un spectromètre de masse de type ESI. Plus récemment, des études MALDI montrent que le DNPH peut-être utilisé comme une matrice MALDI réactive^{93,94} car il possède des bandes d'absorption dans l'UV autour de 350 nm. Une autre étude montre qu'elle permet également d'augmenter la détection des produits aldéhydiques en MALDI⁹⁵. En réagissant, sur des produits peptidiques issus de la peroxydation, le DNPH conduit à la formation par réaction de Michael à des dérivés DNPH qui présentent de très forts rendements ioniques lors de l'analyse MALDI. L'existence dans les tissus de formaldéhyde n'ayant pas complètement réagit (pontage non réalisé) permet à priori d'utiliser une telle matrice réactive. Le DNPH est donc utilisé comme matrice sur les coupes. Les spectres obtenus sur les coupes de cerveaux de rat issus de fixation et inclusion en paraffine après déparaffinage comparés entre la matrice HCCA et la matrice réactive DNPH que les profils sont différents (Figure 26). Pour la matrice DNPH, le nombre de signaux détectés est nettement supérieur ainsi que l'intensité et le rapport signal/bruit des signaux. De très nombreux pics sont observés dans la gamme des m/z jusqu'à 5000. En revanche, pour des m/z plus élevés, le signal est équivalent aux résultats précédemment obtenus. De plus, les agrandissements de spectre montrent que les pics présents sont bien résolus. Les massifs de pics précédemment visibles sur les spectres avec les adduits de +12 u. ont disparu. La matrice DNPH se révèle donc d'un intérêt particulier pour les études de coupes issues de tissu fixé au PAF et inclu dans la paraffine (Figure 27). Elle conduit à une très nette augmentation du nombre de composés détectés tout en conduisant à la suppression des adduits liés à la fixation au PAF. L'hypothèse qui peut être avancée pour expliquer ce phénomène serait que le DNPH réagirait sur l'aldéhyde du formaldéhyde déjà engagé dans une liaison avec un peptide/protéine mais non encore ponté. Dans ce cas, soit le peptide n'est pas encore ponté, soit le DNPH pourrait réagir sur d'autres parties de la séquence pour induire la coupure d'un fragment peptidique, permettant dans les deux cas l'analyse d'un fragment libéré. Le DNPH pourrait aussi réagir avec du formaldéhyde en excès n'ayant pas réagit mais qui gênait les analyses MALDI. Cette hypothèse semble moins probable dans la mesure où les études antérieures semblent démontrer que la réaction formaldéhyde-protéine est rapide et seul le pontage entre protéines est lent.

En utilisant le DNPH comme matrice, des images ont pu être obtenues sur un instrument de type MALDI-LIFT-TOF. Des exemples d'images obtenues sur une moitié de cerveau de rat sont présentées Figures 28 et 29. La Figure 28 compare l'image moléculaire de la répartition de l'ion à m/z 1594 avec la photographie prise avant acquisition. La superposition montre une très légère délocalisation des composés à l'extérieur de la coupe avec la matrice DNPH. La Figure

⁹³Peng J., Schmidt B., Von Figura K., Dierks T.; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38(1), 80-86

⁹⁴Brombacher S., Owen S.J., Volmer D.A. ; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003** 376(6), 773-779

⁹⁵Fenaille F., Tabet J.C., Guy P.A. ; *Anal Chem.* **2004** 76(4), 867-873

28 présente les images moléculaires pour les ions à m/z 1075, 1091 et 1594. Ces images montrent une répartition différente suivant les ions étudiés. Une bonne alternative à l'effet de délocalisation lié au DNPH déposé à la micropipette serait la réalisation de micro dépôts. Malgré cela, des images ont pu être réalisées à partir de coupes issues de tissus fixés et inclus en paraffine ce qui ouvre des perspectives d'applications intéressantes.

Finalement, l'analyse directe de tissus fixés et inclus en paraffine, dans des conditions utilisées en milieu hospitalier, montre des difficultés d'analyse liées plus particulièrement à la fixation. A l'heure actuelle, seules quelques études de protéomique classique portent sur la caractérisation des protéines issues de tissus fixés au formaldéhyde montrant encore la difficulté de travailler sur ce matériel qui est en jeu pour demain^{96,97} Une partie de ces difficultés peut être levée en utilisant la matrice réactive DNPH qui permet d'obtenir des signaux intenses pour la région peptidique. Dans ces conditions, des images peuvent être alors effectuées sur ces tissus. Des recherches restent encore à mener pour essayer d'améliorer l'analyse des protéines. Dans ces conditions, des protocoles tels que ceux utilisés pour démasquer les épitopes des antigènes sont à l'étude afin de savoir s'ils permettraient un accès facilité aux protéines dans ces conditions. Enfin, les résultats encourageants obtenus offrent des perspectives de recherches intéressantes pour des applications médicales sur échantillons conservés mais également pour des recherches fondamentales sur des tissus plus facilement étudiables en conditions fixées et paraffinées sachant que ces procédés de traitement de l'échantillon permettrait une meilleure conservation de l'ultrastructure des tissus.

3. DIGESTIONS *IN SITU* SUR TISSUS DES PROTEINES

Au vu de la difficulté d'analyse des protéines à partir de tissus fixés et inclus en paraffine, et sachant que la réalisation d'images de la répartition des protéines ne conduit pas à une caractérisation de ces dernières, l'analyse directe des tissus peut être abordée sous un autre angle. Dans l'optique de pouvoir caractériser des protéines d'intérêts dans les tissus et la réalisation d'études structurales n'étant possibles que pour des peptides jusqu'à m/z 3000 avec la plupart des spectromètres de masse (sauf FT-ICR), il devient intéressant de pouvoir travailler directement sur des peptides dont la fragmentation pourra être obtenue. Ainsi, sur la base des m/z des ions fragments il sera possible soit de créer une liste permettant l'interrogation des

⁹⁶Hood BL, Darfler MM, Guiel TG, Furusato B, Lucas DA, Ringeisen BR, Sesterhenn IA, Conrads TP, Veenstra TD, Krizman DB. *Mol Cell Proteomics*. 2005, sous presse

⁹⁷Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Ornstein DK, Niu S, Zhao Y, Petricoin EF 3rd, Emmert-Buck MR. *Proteomics*. 2003 3(4):413-421.

banques de données protéiques (NCBI, SwissProt, Genpep, banques EST,...), soit de remonter à la séquence au moins partielle du peptide par interprétation des spectres MS/MS. Ainsi, nous avons choisi d'aborder ici la possibilité d'étudier des digestions enzymatiques de l'ensemble des protéines directement sur les coupes de tissus. Cette méthode paraît également intéressante dans le cas des tissus fixés et inclus en paraffine, les ponts méthylènes formés par fixation n'impliquant pas le squelette des peptides, il devrait être possible de pouvoir obtenir des fragments peptidiques à partir des protéines. Les études de digestion ont été réalisées avec la trypsine, enzyme coupant après les résidus basiques. Les études ont été menées conjointement sur des coupes de cerveau de rat à partir de tissus congelés ou fixés au PAF et inclus en paraffine. La **Figure 30** présente un exemple de spectres types obtenus après digestion directe d'une coupe de tissus frais ou fixés/paraffinés après déparaffinage. L'agrandissement des spectres dans la région des m/z 700-5000 où sont habituellement observés les fragments peptidiques issus de la digestion tryptique présentent des profils très riches en ions peptidiques. En faisant varier le temps de digestion et la concentration en trypsine, les profils obtenus varient de manière comparable à celle obtenue dans le cadre d'une digestion après extraction et séparation en électrophorèse 2D. Pour des temps très courts (5 min) ou une concentration très faible en enzyme les fragments de masse plus importante sont détectés. Pour des temps plus longs (> 45 min), les données ne sont plus exploitables car la digestion est complète. Un bon compromis peut être obtenu pour 20 min de digestion avec une concentration de trypsine de 0,03%. La grande majorité des pics observés après digestion ne correspondent pas aux peptides observés par analyse des tissus sans digestion. Certains signaux de relativement faible intensité peuvent être néanmoins attribués à des ions peptidiques originellement présents dans les tissus ou partiellement digérés (e.g. m/z 2030,38). Pour les coupes provenant de blocs fixés/paraffinés, la digestion est pratiquée après déparaffinage de la coupe. Les spectres obtenus sur les tissus (**Figure 30**) présentent également des profils très riches dans la région correspondant aux peptides. Ainsi, la digestion constituerait une bonne alternative pour surmonter les difficultés d'analyse de ces tissus fixés et en particulier pour l'analyse des protéines. Il faut noter que les profils de digestion sont très différents pour les digestions sur tissus frais et fixés/paraffinés. La fixation au PAF entraîne un pontage des protéines par les fonctions NH₂ libres en N-terminal de la protéine ou sur les chaînes latérales des lysines provoquant la formation d'un réseau. Pour ces tissus, seront préférentiellement hydrolysées les régions qui restent accessibles et qui seront alors différentes des régions facilement accessibles ou présentant les plus grandes constantes de vitesse de réaction dans le cadre de digestions sur tissus frais. Quelques études préalables des possibilités d'analyses structurales à partir des coupes digérées montrent que l'étude de la fragmentation des peptides de digestion est possible sur les deux types de tissus. En mode PSD, les rendements de fragmentations sont nettement supérieurs à ceux observés pour l'étude directe

des peptides dans des tissus non traités comme mentionné précédemment. Sur ces tissus digérés il devient possible d'obtenir suffisamment d'ions fragments pour réaliser une interrogation en banques de donnée pour caractériser le composé. Il est alors possible d'identifier rapidement certaines protéines. L'ion à m/z 1573,78 permet par exemple de remonter rapidement à l'identification de la β -tubuline. Cette stratégie présente donc une grande potentialité pour l'identification *in situ* des protéines du tissu.

4. DERIVATIONS N-TERMINALES DES PEPTIDES IN SITU SUR TISSUS

Les dérivations N ou C-terminales des peptides ont fait l'objet de nombreuses études depuis les années 1990⁹⁸. Elles ont pour but d'ajouter un groupement qui permettra de piéger la charge et d'obtenir des rendements de fragmentation augmentés tout en orientant les fragmentations vers une série d'ions spécifiques. Les dérivations N-terminales orientent les fragmentations vers les séries d'ions fragments N-terminaux (série a, b et c) alors que les dérivations C-terminales orientent vers des séries d'ions fragments C-terminaux soit des ions de type x, y et z. De manière générale, les dérivations N-terminales sont plus faciles de part la réactivité du groupement $-NH_2$. Les difficultés rencontrées pour les dérivations chimiques sont relativement proches de celles rencontrées pour les dégradations chimiques des peptides telle que la dégradation d'Edman. Le groupement chimique doit réagir uniquement sur la fonction $-NH_2$ terminale ou $-COOH$ terminale et non sur les fonctions présentes sur les chaînes latérales des différents acides aminés. Les dérivations N-terminales étudiées consistent généralement à ajouter un groupement chargé positivement ou un groupement fortement basique permettant de fixer une charge positive sur cette partie qui orientera les fragmentations. Les spectres obtenus dans de telles conditions présentent des séries d'ions fragments plus complètes et l'orientation de la fragmentation conduit à une interprétation facilitée des données. La dérivation chimique N-terminale des peptides est particulièrement intéressante pour déterminer la séquence primaire de peptides inconnus, dans la mesure où la réaction reste rapide et applicable sur de faibles quantités d'échantillon.

Plus récemment, des dérivations N-terminales par addition d'un groupement acide sulfonique ont été proposées par Keough et coll.^{99,100,101,102}. Ces dérivations sont

⁹⁸Roth K.D., Huang Z.H., Sadagopan N., Watson J.T.; *Mass Spectrom. Rev.* **1998** 17(4), 255-274

⁹⁹Keough T., Youngquist R.S., Lacey M.P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999** 96, 7131-7136.

¹⁰⁰Keough T., Lacey M.P., Youngquist R.S.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000** 14, 2348-2356.

¹⁰¹Keough T., Lacey M.P., Youngquist R.S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**; 16: 1003-1015.

¹⁰²Keough T., Youngquist R.S., Lacey M.P.; *Anal. Chem.* **2003** 75(7), 156A-165A

particulièrement bien adaptées aux fragments de digestion trypsique sur des instruments MALDI-TOF en mode PSD ou sur des instruments avec source ESI en CID. La dérivation augmente les rendements de fragmentation et oriente la fragmentation vers la série d'ions fragments y_i^+ (Figure 31). Les spectres présentent alors principalement ces ions avec une série d'ions y_i^+ complète dans la plupart des cas. Les spectres sont alors facilement interprétables et permettent de remonter sans ambiguïté à la séquence primaire du peptide. Les protocoles ont été adaptés par les auteurs de manière à pouvoir être réalisés en milieux aqueux évitant les problèmes posés par l'incompatibilité de certains réactifs avec l'analyse et permettant ainsi de réaliser la réaction de dérivation sur le peptide immobilisé sur une phase de silice stationnaire greffée phase inverse C18. La réaction peut donc être conduite sur des microquantités en micro-colonnes (Zit-Tip™) permettant une purification simultanée du composé. D'autres travaux s'intéressent aux dérivations N-terminales par le 4-sulfophenyl isothiocyanate (SPITC)^{103,104,105}. Cette dérivation présente globalement les mêmes performances que la dérivation précédente et oriente de manière similaire les fragmentations vers la série d'ions y_i^+ (Figure 32).

Nous avons, ici, étudié la possibilité de réaliser en adaptant les protocoles des dérivations sur coupes afin de pouvoir caractériser les peptides *In situ* dans les tissus. A priori, ces protocoles sont plus difficiles à adapter aux tissus puisque vont se poser un certain nombre de problèmes tel que maintenir le réactif sur le tissu pendant un temps suffisant pour que la réaction puisse se produire ou que les peptides/protéines soient suffisamment accessibles dans les tissus pour permettre au réactif d'agir. Sur l'ensemble des différentes dérivations décrites, toutes les dérivations sont efficaces sur peptides standard. Les résultats d'analyse en mode PSD démontre néanmoins, que l'orientation des fragmentations est plus efficace sur les peptides présentant un acide aminé basique en C-terminal, comme préconisé dans les études des différents auteurs. La Figure 33 présente les spectre obtenus pour le peptide modèle ASHGLAR présentant une arginine en C-terminal dans le cas de la dérivation au SPITC. Le spectre obtenu après dérivation permet d'observer différents ions qui sont caractéristiques de la dérivation (pics à m/z 868,0 et 1039,9). Dans le cas de la dérivation sont attendus un pic décalé de 215u. correspondant à l'incrément en masse lié à l'addition du groupement SPITC mais également un pic à +44 u. attribuable à une perte d'une partie du groupement de dérivation (Figure 34). L'observation d'un pic à m/z 826,2 démontre que la dérivation n'est pas totale et qu'une partie des peptides reste non modifié. L'étude en mode PSD sur le peptide standard dérivé (Figure 35), montre une nette augmentation de l'intensité des ions fragments ainsi qu'une orientation de la fragmentation. Comme attendu pour cette méthode, sont principalement observés des ions de la série y_i^+ . La

¹⁰³Marekov L.N., Steinert P.M. ; *J. Mass Spectrom.* **2003** 38, 373-377

¹⁰⁴Wang D., Kalb S.R., Cotter R.J. ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004** 18, 96-102

¹⁰⁵Lee Y.H., Kim M.S., Choie W.S., Min H.K., Lee S.W.; *Proteomics* **2004** 4, 1684-1694

série d'ions y est complète et permet aisément de remonter à la séquence primaire du peptide. Les ions très majoritaires sont les ions y . Quelques ions de plus faible intensité, correspondant à la perte de 17 (NH_3) à partir des ions y_i^+ sont présents ainsi que quelques fragments internes. Les différentes dérivations ont été testées sur les tissus frais après coupe à congélation ou sur tissus issus de blocs fixés et inclus en paraffine après déparaffinage. Sur les coupes de tissus frais, seule la dérivation au SPITC est efficace (Figure 36). Pour les autres dérivations soit la dérivation est totalement inefficace avec une perte non négligeable de l'intensité générale, soit la réaction de dérivation entraîne la suppression totale des signaux. Les spectres de dérivation au SPITC permettent d'observer ce phénomène. Comme le montre l'agrandissement des spectres, des pics correspondants à des peptides dérivés sont observés. Cependant, les profils enregistrés à partir des tissus sont pauvres. Seuls les ions les plus intenses en conditions classiques sont encore observables. Pour ces composés, la dérivation s'est produite. Il faut remarquer que les composés peuvent être dérivés plusieurs fois probablement par réaction sur les chaînes latérales des lysines présentant une fonction $\epsilon\text{-NH}_2$ terminale. Donc actuellement, les dérivations sur coupes de tissus frais ne sont pas concluantes et la réaction de dérivation directement sur coupe entraîne une diminution drastique du nombre d'ions détectables à partir des tissus. Dans le cas des coupes déparaffinés, aucune dérivation ne donne des résultats. Ce résultat est cohérent puisque la fixation au PAF génère des pontages des protéines par les fonctions terminales amines primaires, ne permettant alors plus la réaction avec le réactif de dérivation. Par la suite, étant donné les performances des digestions enzymatiques réalisées sur coupes, les dérivations sont testées sur coupes fraîches et déparaffinées après digestion à la trypsine. La dérivation au SPITC est efficace sur les coupes après digestion. Sur coupes de tissus frais (Figure 37), sont observés sur les spectres des pics déplacés en rapport m/z de la masse du dérivé. Plusieurs cas de figures sont rencontrés. Certains peptides sont non ou seulement partiellement dérivés (m/z 1101,1, 1249,26, 1506,09, 2051,18, 2143,73, 2940,5). D'autres ions correspondent à des peptides dérivé une fois (1076,84, 1283,48, 1316,45, 1553,77, 1720,78, 2359,66) alors que les autres correspondent à des peptides dérivés deux fois (1936,11, 2575,16, 2725,44, 3261,26). Un pourcentage non négligeable de peptide est dérivé. Il faut regretter cependant une diminution du nombre de peptides détectés après dérivation et de l'intensité de certains ions. Pour les tissus fixés/paraffinés après déparaffinage puis digestion par la trypsine, la dérivation au SPITC est également efficace (Figure 37). Les profils sont toujours riches en ions après dérivation même si une légère diminution dans l'intensité du signal est constatée. Une grande partie des peptides du tissus peuvent être ainsi dérivés (m/z 726,59, 1067,98, 1199,45, 1516,96, 1872,47, 2081,74, 2281,48, 2903,06, 3042,18). Sur ces tissus, le taux de peptides dérivés est estimé à environ 25% de l'ensemble des peptides présents au départ après digestion. Des études sont actuellement en cours pour vérifier si les fragmentations peuvent être augmentées et orientées par ce procédé

pour les tissus. L'utilisation conjointe de digestion et de dérivation directement sur les coupes permettrait une identification des protéines originelles et contournerait d'une certaine manière les problèmes liés à l'analyse des protéines pour des tissus fixés et paraffinés.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des recherches menées sur le traitement des tissus avant analyse permet d'accroître les performances de la technique. Le traitement des coupes par des solvants organiques permet d'augmenter le nombre de peptides/protéines détectés en ouvrant les membranes lipidiques des cellules et permettant à la matrice d'accéder aux composés qui seraient intracellulaires en temps normal. Le rinçage des coupes au chloroforme est particulièrement performant et permet une nette amélioration de la détection. Dans un autre aspect, les analyses sur coupes issus de tissus fixés et inclus en paraffine soulèvent la difficulté de travailler sur des tissus archivés, les difficultés provenant principalement de la fixation au paraformaldéhyde générant des pontages inter protéines. L'utilisation de la matrice réactive DNPH permet une très nette amélioration de l'analyse en terme d'intensité des ions et de nombres d'ions détectés pour des peptides (i.e. $M < 5000$). L'analyse des protéines à partir de ces tissus reste cependant extrêmement difficile. Afin, d'obtenir une caractérisation des protéines *in situ* dans les tissus par études en mode MS/MS (PSD ou CID), des digestions enzymatiques sont réalisées directement sur les coupes. Les digestions réalisées (notamment trypsine) montrent la possibilité d'obtenir un grand nombre de fragments de digestion des différentes protéines, et la possibilité d'identifier les protéines sur la base des ions fragments observables en MS/MS pour ces différents fragments peptidiques. Sur coupes déparaffinées, les digestions enzymatiques sont également viables et permettent d'obtenir de nombreux fragments peptidiques de digestion. Les profils obtenus sont différents de ceux obtenus sur les coupes fraîches mais contiennent tout autant d'informations. La digestion permettant probablement des hydrolyses au niveau des parties accessibles (non impliquées dans un pontage) des protéines, permettant ainsi de circonvier aux problèmes liés à la fixation. Enfin, afin d'augmenter les rendements de fragmentations et de faciliter l'interprétation des spectres MS/MS des dérivations chimiques N-Terminale sont réalisées sur les coupes. Sans digestion les dérivations sont peu efficaces. En revanche, en associant la dérivation à une digestion tryptique, il est possible actuellement de dériver environ 25% des peptides issus de la digestion et ce à la fois sur tissus frais et fixés/paraffinés. L'étude des fragmentations de ces peptides dérivés est actuellement en cours. Il est intéressant de noter la possibilité de combiner plusieurs de ces traitements pour améliorer les

performances analytiques et les possibilités de caractérisation. Nous testons actuellement d'autres enzymes de digestion de manière détaillée et étudions également la possibilité de réaliser plusieurs digestion successive sur la même coupe de tissu afin d'augmenter la quantité d'informations. Les protocoles de dérivations sont en cours d'optimisation afin d'augmenter encore le nombre de peptides dérivés sur les coupes. Nous souhaitons pouvoir rapidement effectuer des images après ces différents traitements et en particulier dans le cas de la digestion enzymatique afin de mesurer le taux de délocalisation pendant la digestion. Enfin, nous chercherons à effectuer ces mêmes expériences avec un robot permettant la manipulation de micro volumes afin d'assurer une réaction localisée et améliorer la qualité des images.

III. SURFACE ANALYSEE ET QUALITE DES IMAGES : UTILISATION DE MASQUES

1. PRESENTATION DE LA PROBLEMATIQUE

Le paramètre de première influence pour la qualité des images est le nombre de points maximum qui sera réalisé sur l'échantillon. Le processus de désorption/ionisation étant promu en MALDI par l'irradiation de l'échantillon par le faisceau laser l'analyse se trouve donc restreinte à la surface irradiée par le faisceau laser. Or, pour que les résultats soient significatifs, il faut que les surfaces analysées soient juxtaposées et ne se recouvrent pas. En conditions habituelles, le pas minimum entre deux points ne pourra être inférieur au diamètre d'intersection du faisceau laser avec la surface, paramètre pouvant légèrement varié suivant l'angle d'incidence du faisceau. Ainsi, le paramètre affectant le plus la résolution des images est le diamètre du faisceau laser. Les lasers émettant dans l'UV et notamment les lasers N₂ émettant à 337 nm commercialisés possèdent avec un système de focalisation classique un diamètre d'environ 125 µm×125 µm et un profil en énergie relativement inhomogène. Dans ce contexte, la distance minimum entre deux points de l'images devra être d'au moins 125 µm et la définition de l'image de 125 µm, ce qui correspond à l'irradiation de plusieurs cellules dans le tissu sachant que de petites cellules peuvent avoir un diamètre d'environ 10 µm. Afin d'augmenter le nombre de points par image, plusieurs solutions peuvent être envisagées. Les différentes méthodes développées à l'heure actuelle sont répertoriées dans le **Tableau 7**.

Les méthodes les plus classiques consistent à refocaliser au maximum le faisceau laser lui-même. Ceci peut-être réalisé soit par utilisation de lentilles optiques adaptées sur le principe du télescope galiléen, soit par utilisation de fibres optiques^{106,107}. Dans les deux cas, il est possible de focaliser le faisceau laser jusqu'à un diamètre d'environ 10 µm, les fibres optiques permettant en outre d'obtenir un profil d'énergie plat ("flat top"). Il est également possible d'ajouter un diaphragme sur le trajet du faisceau laser, mais si ce système est le plus simple à mettre en place, il conduit à une perte d'énergie délivrée par le laser non négligeable et nécessite le remplacement du laser N₂ par un laser de puissance supérieure de type laser phase solide.

Alternativement, une autre méthode développée pour diminuer le diamètre de la zone analysée consiste à réaliser des dépôts de matrice d'un diamètre défini avec un pas reproductible. Ainsi, même si le faisceau laser irradie une aire relativement importante, seule la zone où la matrice a été déposée conduira à l'obtention d'ions en phase gazeuse. Cette méthode donne actuellement de bons résultats mais reste limitée soit par la précision des automates de microfluidiques, soit par le volume de solution déposé qui ne permet pas à l'heure actuelle d'obtenir des dépôts inférieurs à 30-50 µm de diamètre. De plus, le dépôt par automate est très

long (12-24 H pour une coupe de cerveau de rat entière). La focalisation du faisceau laser, hormis sa difficulté de mise en œuvre et d'implantation sur un spectromètre de masse commercial, semble atteindre sa limite aux alentours d'un diamètre d'environ 25-30 μm . En effet, des travaux fondamentaux en MALDI ont permis de démontrer une très forte diminution de la quantité d'ions produits en phase gazeuse en dessous d'un certain diamètre du faisceau laser. Passé cette valeur, le faisceau peut être encore diminué mais le nombre d'ions détectés diminue drastiquement. Dans le cas de la technique de micro dépôt, le problème soulevé par l'utilisation de cette technique réside dans les processus fondamentaux de désorption/ionisation conduisant à l'obtention des ions. Ainsi, si l'éjection de matière est promue par l'onde de choc du faisceau incident et non seulement par les propriétés d'absorption des molécules de matrice, alors la matière éjectée proviendra en réalité de l'intégralité de la zone irradiée par le faisceau laser et non seulement comme attendu de la zone recouverte de matrice. Dans ce cas, la validité de la méthode reste encore à démontrer.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Références
Focalisation du laser : Télescope galiléen	Focalisation précise	Difficile de mettre en place le banc optique.	106
Focalisation du laser : Fibre optique	Focalisation précise Obtention d'un profil énergétique type « Flap-top »	Demande d'intervenir sur le trajet optique à l'intérieur de l'appareil	106,107
Focalisation du laser : obturateur	Bonne focalisation	Limite de focalisation à une cinquantaine de micron	108
Micro dépôts de matrice	Possibilité d'avoir des dépôts d'environ 30-50 μm	Temps de dépôt long	109

Tableau 7 : *Différentes méthodes développées afin de diminuer l'aire analysée et augmenter la définition des images pour l'imagerie MALDI*

¹⁰⁶Hillenkamp, F., Dreisewerd K.; *49th ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, Chicago (IL), May 27 - 31, **2001**

¹⁰⁷Dreisewerd K., Schürenberg M., Karas M., Hillenkamp F., *Int. J. Mass. Spectrom. Ion Processes* **1995** 141, 127-148

¹⁰⁸Caprioli R. M., Farmer T. B, Gile J.; *Anal. Chem.* **1997** 69(23), 4751-4760

¹⁰⁹Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM.; *J Mass. Spectrom.* **2003** 38(7), 699-708.

2. PRESENTATION DES SYSTEMES DE MASQUES

Face à ces difficultés et afin d'utiliser une méthode relativement facile à mettre quelque soit le type de spectromètre utilisé, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode alternative pour diminuer les dimensions de l'aire analysée. Nous nous proposons d'utiliser un système ne nécessitant pas de modification instrumentale et pouvant être adapté à l'ensemble des spectromètres MALDI commerciaux développés. Ce système repose sur l'utilisation de caches (ou "masques") présentant des ouvertures espacées régulièrement et d'un diamètre bien défini (Figure 38). Le masque peut être, dans un premier temps, appliqué directement en contact avec la coupe de tissu de manière à éviter au maximum la perte des ions formés (Figure 39). L'épaisseur de cache est idéalement réduite au minimum, mais dans la pratique limitée par la fragilité du matériau constituant le masque. Le masque doit être opaque et constitué d'un matériau conducteur permettant d'assurer le champ électrique dans la source de l'instrument puisque les hautes tensions sont appliquées normalement sur le porte échantillon. Ainsi, lorsque le laser vient irradier dans la zone présentant une ouverture, seule la partie évidée par laquelle le tissu est visible sera touchée réduisant l'aire irradiée à la dimension de l'ouverture (Figure 40). En théorie, ceci devrait éviter la diminution de la quantité d'ions produits puisque le profil en énergie du faisceau laser n'a pas été modifié. La fabrication de ces masques nécessite l'utilisation des techniques d'électroniques et de microfluidiques, ils ont donc été réalisés en collaboration avec le groupe du Pr. J.C. Camart (collaboration avec V. Thomy) de l'Institut d'Electronique et de Microélectronique et de Nanotechnologie de Lille (IEMN). Les supports utilisés dans cette étude sont des "wafers" de silicium matériau répondant aux critères de sélection et dont les procédés d'usinage sont bien maîtrisés même s'ils présentent une certaine fragilité.

3. PROCEDES DE FABRICATION DES MASQUES

La fabrication du prototype des masques contenant des micro-ouvertures est basée sur les principes classiques de micro technologies. Des « wafers » de Silicium sont amincis par attaque humide afin d'obtenir une épaisseur de 100µm. Après un nettoyage du substrat de type "pyrana" ($H_2SO_4 + H_2O_2$), une première couche de résine photosensible (SU-8, Microchem) est déposée (10 µm de SU-8 2010) (Figure 41-a). L'ensemble est ensuite exposé aux UV au travers d'un masque en verre recouvert de chrome dans lequel des ouvertures fixes sont définies (Figure 41-b). Puis la couche de SU-8 est enlevée en utilisant une solution de développement (Figure 41-c). Les zones de Silicium qui n'ont pas été protégées par la couche photosensible sont attaquées en

ICP (Inductively Coupled Plasma) par procédé Bosch¹¹⁰ (Figure 41-d). Le prototype est ensuite nettoyé de nouveau par "pyrana". Des damiers de 1mm de côté et contenant des ouvertures de 10 à 100 µm de côté, sont ainsi obtenus (Figure 42).

Le protocole décrit est celui utilisé dans nos expériences, mais la fabrication de ces caches pourrait être réalisée de différentes façons. Quelques exemples de procédés sont présentés ci-dessous.

- Dépôt d'autres types de résines photosensibles ou d'oxyde (oxyde de silicium par exemple) afin de reporter le masque sur le substrat
- Utilisation d'autres techniques d'attaque que le plasma, notamment des gravures humides afin de tirer profit de la structure cristalline de Silicium pour obtenir des flancs non verticaux (de 45°). Dans ce cas, les zones d'ombre décrites ci-dessous sont éliminées.
- Dépôt de matériaux conducteurs (Or, Nickel,...) sur le cache afin d'optimiser le transfert des ions.
- Réalisation de masques sur supports souples (types polymère plastique, PDMS par exemple¹¹¹) pour lesquels les ouvertures sont obtenues par moulage. La métallisation du support permet ensuite le transfert des ions.
- Utilisation d'autres techniques de micro usinage de métaux tel que par laser¹¹², électrochimie¹¹³,...

4. UTILISATION DES CACHES POUR L'ANALYSE DIRECTE DE TISSUS EN MALDI

Différents masques ont été réalisés à partir de "wafers" de silicium amincis selon le procédé décrit ci-dessus. Les masques testés présentent différentes tailles d'ouverture et deux épaisseurs différentes (65 et 100 µm), soit des masques avec ouvertures de 500 µm et 240 µm pour une épaisseur de 65 µm et des masques avec ouvertures de 100µm, 50 µm et 10 µm pour une épaisseur de 100µm. La Figure 43 montre l'importance non seulement de la taille des ouvertures mais également de l'épaisseur du cache. En effet, selon les modèles de spectromètre utilisés, l'angle d'incidence du faisceau laser peut varier. Il est de 45° sur le MALDI-TOF

¹¹⁰Brevet Laermer & Schilp, DE4241045 US 55010893, Licence de la société SMS

¹¹¹J. R. Anderson, D. T. Chiu, R. J. Jackman, O. Cherniavskaya, J. C. McDonald, H. Wu, S. H. Whitesides and G. M. Whitesides; *Anal. Chem.* **2000** 72, 3158-3164.

¹¹²*Les Nouvelles technologies laser femto secondes P. Laporte Réseau FEMTO Séminaire du 27 novembre 2001*

¹¹³*Electrochemical Micromachining, Rolf Schuster, Viola Kirchner, Philippe Allongue, et Gerhard Ertl, Science, 7 juillet 2000*

Voyager STR de la société Applied Biosystems et en revanche de 30° sur le MALDI-LIFT-TOF/TOF commercialisé par la société Bruker Daltonics. L'angle d'incidence du faisceau génère une zone d'ombre sur l'échantillon. Ainsi, la zone réellement irradiée par le faisceau sera inférieure à la taille de l'ouverture. La zone d'ombre est d'autant plus importante que le support sera épais et l'ouverture pratiquée petite. Cette zone d'ombre peut être aisément calculée si, l'épaisseur des caches, la taille de l'ouverture et l'angle d'incidence du faisceau laser, sont connus avec précision (Figure 44). A titre d'exemple, avec un cache de 65 µm d'épaisseur et une ouverture de 100 µm, et pour un faisceau laser focalisé avec un angle d'incidence de 45°, la zone d'ombre est de $d = 65 \mu\text{m}$ et la zone irradiée réelle de $D = 35 \mu\text{m}$ (Figure 44). Ainsi, dans la réalité la zone réelle analysée sera inférieure dans l'une des dimensions à la taille de l'ouverture. Le Tableau 8 donne les valeurs de zone irradiée pour des caches possédant une ouverture de 100 µm et deux épaisseurs différentes. Avec une épaisseur de 100 µm, à 50°, la zone irradiée correspond à un rectangle de 17×100 µm ; alors que pour un laser à 45°, le faisceau laser ne touche plus l'échantillon.

Angle d'incidence du faisceau laser	Zone irradiée avec un cache d'épaisseur 65µm	zone irradiée avec un cache d'épaisseur 100µm
60°	67×100µm ²	43×100µm ²
50°	45×100µm ²	17×100µm ²
45°	35×100µm ²	Pas d'irradiation
40°	13×100µm ²	Pas d'irradiation

Tableau 8 : corrélation entre épaisseur du cache et angle d'incidence du laser.

Les masques ont en premier lieu été testés sur des composés standard (mélange de peptides). Les spectres obtenus montrent des résultats très significatifs en fonction de la taille de l'ouverture du cache et en particulier au niveau de l'intensité des ions observés (Figure 45). Les analyses réalisées avec le cache possédant des ouvertures de 50 µm montrent une intensité de signal plus faible par rapport aux analyses réalisées avec les caches possédant des ouvertures de 100, 240 et 500 µm. Une augmentation du signal a été observée pour le cache avec ouvertures de 240 µm. Une intensité équivalente est observée pour les caches d'ouverture 100 et 500µm. De plus, une analyse détaillée des spectres montre une augmentation de la détection des ions de plus hautes masses *i.e.* pour les ions à m/z 4271 (bovine Ubiquitin MH_2^{2+}), à m/z 5716 (bovine insulín MH^+) et à m/z 8568 (bovine ubiquitin MH^+) pour le cache avec ouvertures de 240 µm et à m/z 5716 (bovine insulín MH^+) pour les caches d'ouverture 100 et 50 µm (Figure 45). A

l'heure actuelle, le cache avec ouvertures de 240 μm et épaisseur de 100 μm a donné les meilleurs résultats en intensité de signal et nombre d'ions détectés.

Ces résultats ont été confirmés dans le cadre de l'analyse directe de tissus. L'analyse effectuée au travers des masques sur des coupes de cerveau de rat montre une nette augmentation de l'intensité générale du signal sur les spectres obtenus avec les caches d'ouvertures 240 μm (2.7×10^4 u.a.) comparativement aux spectres obtenus par analyse classique sans cache (1.8×10^4 u.a.). De plus, comme précédemment observée sur les standards, l'intensité des signaux de $m/z > 3000$ est plus importante lorsque l'analyse est réalisée avec des caches (240 et 500 μm) que pour les analyses sans cache (Figure 46).

Les caches ont également été essayés sur un instrument de type MALDI-LIFT-TOF/TOF (Bruker Daltonics) et les résultats obtenus sont venus confirmer les résultats précédemment obtenus sur le MALDI-TOF classique. De plus, il a été possible de tester des caches d'ouverture 100 μm et d'épaisseur 100 μm . L'angle d'incidence étant de 50° sur cet instrument, il a été possible d'observer un signal d'intensité habituel sur une coupe de cerveau de rat, alors que l'aire irradiée n'est plus que de $17 \times 100 \mu\text{m}$ (Figure 47). Ces résultats confirment la potentialité d'utiliser des caches pour diminuer la taille de la zone analysée et sa possibilité d'adaptation sur différents types d'instruments.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'origine de ce phénomène avec les caches d'ouvertures 240 μm . L'une des hypothèses les plus probables serait une modification du champ électrique régnant dans la 1^{ère} zone d'accélération de la source. En effet, l'application d'un support conducteur possédant des ouvertures conduit nécessairement à une modification des lignes de champ à proximité du cache. Afin d'étudier cette hypothèse, des premières simulations des lignes de champ électrique ainsi que de la trajectoire des ions ont été entreprises à l'aide du logiciel SIMION (Figure 48). En simulant une simple ouverture de dimension 240 μm pratiquée entre deux électrodes d'épaisseur de 65 μm sur lesquels est appliqué un potentiel de 20 kV (valeur classique sur les instruments MALDI-TOF) et en délimitant la zone d'accélération par une électrode plane placée à la terre, la simulation obtenue montre une nette courbure des lignes de champ électrique au niveau de l'ouverture. Par contre, les lignes de champ sont planes dans le reste de la zone comme attendu habituellement dans le cas d'un champ électrique obtenu par différence de potentiel entre deux électrodes planes. La simulation de la trajectoire des ions dans notre configuration montre que le faisceau d'ions est refocalisé par un tel champ électrique (Figure 48). Une meilleure focalisation des ions pourrait être à l'origine de l'augmentation de sensibilité ($\times 2$) observée. Celle-ci pourrait venir s'ajouter aux différents événements accompagnant le phénomène de désorption/ionisation et expliquerait peut-être l'augmentation particulièrement nette d'intensité sur les ions de plus haut m/z .

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La taille de la zone irradiée par le faisceau laser est actuellement un point limitant pour l'imagerie par spectrométrie de masse sur des instruments avec source MALDI. En effet, plus la zone irradiée est petite, meilleure sera la résolution de l'image obtenue. De plus, il est avantageux de pouvoir analyser des éléments à l'échelle cellulaire. Afin de diminuer les dimensions de cette zone, nous avons développé des caches en support conducteurs présentant des orifices de dimension bien définie et une épaisseur la plus faible possible en tenant compte de la maniabilité des caches par rapport au matériau travaillé.

Les études réalisées démontrent qu'il est possible d'utiliser ces masques pour diminuer la taille de la zone irradiée sans diminution de l'intensité des ions observés. Il est possible, à l'heure actuelle, d'analyser des zones de dimensions jusqu'à environ $15 \times 100 \mu\text{m}$ (soit $1500 \mu\text{m}^2$). Ce qui permet déjà d'obtenir une résolution supérieure aux limites imposées par le diamètre du faisceau laser (à l'heure actuelle environ $50 \times 50 \mu\text{m}$, soit $2500 \mu\text{m}^2$). De plus, pour certains caches (et en particulier ceux d'ouverture $240 \mu\text{m}$) une nette augmentation de l'intensité du signal a été observée et notamment pour les hauts rapports m/z, phénomène observé sur des standards et vérifié sur des coupes de tissus. Une explication possible de ce phénomène résiderait dans une meilleure focalisation des ions liée à une modification des lignes de champ électrique de part la présence du cache.

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

Actuellement de nouveaux caches sont en cours de fabrication avec une ouverture en biais (**Figure 49**) qui éviterait les phénomènes de zone d'ombre et permettrait de définir plus précisément encore les dimensions de la zone irradiée. Pour ces caches seront testées différentes tailles d'ouvertures, jusqu'à $10 \times 10 \mu\text{m}$ permettant de considérablement améliorer la résolution des images. Enfin, d'autre matériau que des "wafers" de silicium seront testés et notamment des matériaux conducteurs résistants même pour des épaisseurs très fines, tel que l'inox encore très résistant pour une épaisseur de $20 \mu\text{m}$.

IV. EFFETS DE CHARGE ET DEPOT DE MATERIAUX CONDUCTEURS

1. EFFETS DE CHARGE

Les effets de charge sont des problèmes fréquemment rencontrés dans les techniques d'analyse des échantillons où une surface non conductrice est bombardée par un faisceau. Ces problèmes sont fréquents en Microscopie Electronique à Balayage (MEB) lorsque l'échantillon d'intérêt est peu conducteur voire isolant. Il se traduit dans cette technique par une accumulation de charges en surface du matériau conduisant à une distorsion des images. Ces effets sont d'autant plus marqués que la taille et l'épaisseur de l'échantillon sont importantes et que la conductivité est faible. En spectrométrie de masse ces effets sont limités aux sources d'ions utilisant un faisceau primaire (FAB, SIMS, PDMS, MALDI,...) mais restent minimales en conditions classiques d'analyse où les solutions sont déposées sur un support conducteur et forment un film polycristallin très fin. Ils peuvent être observés dans des conditions particulières d'analyse comme l'analyse par MALDI de monocristaux de matrice dopés par des protéines ^{ref}. L'utilisation de sections de tissus en imagerie MALDI amplifie ce phénomène. Les tissus sont de nature isolante, d'une épaisseur de 12-15 μm , avec une surface importante (quelques cm^2). Ainsi, lors de l'analyse directe de tissus, le tir laser va conduire à une accumulation de charges à la surface du tissu qui ne peut s'évacuer. Le phénomène d'effet de charge se traduit sur les spectres par un décalage progressif des pics vers les hauts rapports m/z avec le nombre de tirs laser. Le phénomène est d'autant plus marqué que la section de tissu est épaisse, que le temps entre deux tirs laser est faible (laser à haute fréquence de répétition) et que l'énergie laser utilisée est importante. Or, pour ce dernier point, il est expérimentalement constaté que l'énergie utilisée pour analyser des sections de tissu est supérieure à celle nécessaire pour conduire des analyses sur préparation classique. Ainsi ce phénomène conduit à un élargissement des pics (perte de résolution) pouvant entraîner une perte sur la précision des mesures, des chevauchements de pics pour des ions de m/z proches, plus des difficultés éventuelles pour les études structurales pour la sélection de l'ion. Afin d'étudier plus en détail ce phénomène, nous avons amplifié le phénomène en réalisant des tirs à plus forte énergie laser. Pour cela nous avons effectué, en plusieurs points d'une même section, 100 tirs à énergie laser juste au-dessus du seuil de production des ions sur les tissus avant d'enregistrer un spectre. 15 tirs à plus forte énergie laser sont alors réalisés avant de revenir à l'énergie seuil et effectuer de nouveau 100 tirs et enregistrer un spectre. Les expériences sont réalisées sur des coupes de cerveau de rat, en plusieurs points de la coupe. La **Figure 50** présente les spectres obtenus dans de telles conditions expérimentales sur des coupes de cerveau de rat, dans un cas pour la matrice HCCA et dans l'autre pour la matrice ionique HCCA/ANI. Un décalage est observé entre la première série de tir et la deuxième série à énergie seuil après les tirs laser à plus haute énergie. Il faut remarquer que le

décalage est différent suivant la matrice (1,31 u. avec HCCA et 5,63 u. pour HCCA/ANI) mais toujours observé. Ce phénomène observé sur les instruments de configuration axiale va donc conduire au travers du décalage progressif des pics à élargissement du pic et une perte de résolution. Ceci entraîne plusieurs difficultés, l'une étant une faible précision de la mesure ainsi que des chevauchements de pics proches possibles et l'autre des difficultés pour la sélection des ions dans le cas des études structurales.

2. METALLISATION DES ECHANTILLONS

En microscopie électronique à balayage, les effets de charge peuvent être supprimés en déposant sur les matériaux une fine couche d'or (environ 10 nm) permettant l'évacuation des charges sans modifier la topologie de l'échantillon. Nous avons adopté un traitement similaire pour nos échantillons en spectrométrie de masse sachant que dans notre cas, la couche d'or pourrait perturber l'absorption d'énergie par l'échantillon et modifier les processus de désorption/ionisation. Cette hypothèse a été encouragée par les récents travaux de Novikov et coll.¹¹⁴ et Tempez et coll.¹¹⁵ montrant la possibilité d'analyser des tissus sans utiliser de solution de matrice, et en implantant des atomes d'Or dans le tissu à l'aide d'un canon SIMS afin de remplacer la matrice. Les expériences montrent que l'implantation d'atomes Or dans les premières couches de l'échantillon permet l'obtention d'ions pour des peptides et protéines directement à partir des tissus.

Ainsi, nous avons choisi de déposer à la surface de nos échantillons après dépôt de la solution de matrice, une couche d'or. Deux épaisseurs différentes d'or ont été testées, respectivement 70 et 150 Å, et les dépôts réalisés par vaporisation à partir d'une électrode d'or. Les épaisseurs ont été obtenues en modifiant le courant et le temps d'exposition des échantillons suivant des abaques. La métallisation a été réalisée sur des coupes de cerveau de rat après dépôt de différentes matrices. L'analyse des échantillons est alors effectuée dans les mêmes conditions que précédemment à savoir une première série de tirs (100 tirs) avec l'enregistrement du spectre à une énergie proche du seuil de production des ions, 10 à 20 eV à une énergie plus forte puis de nouveau 100 tirs à une énergie seuil avec enregistrement des données. La **Figure 51** présente un agrandissement dans la zone des $m/z \sim 2000$ pour la matrice HCCA sans dépôt d'or et pour des couches d'or de respectivement 70 et 150 Å. On peut noter qu'il est toujours possible d'obtenir du signal sur les coupes de tissu recouvertes d'or. De plus, l'agrandissement permet de montrer

¹¹⁴Novikov 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** (24), 7288-7293

¹¹⁵Tempez A., Ugarov M., Egan T., Schultz J.A., Novikov A., Della-Negra S., Lebeyec Y., Pautrat M., Caroff M., Smentkowski V.S., Wang H.Y., Jackson S.N., Woods A.S.; *J. Proteome Res.* (2005) **4** (2), 540-545

alors que le décalage du pic n'est plus observé (pics superposés) pour les coupes recouvertes d'or démontrant que les effets de charge sont bien supprimés par dépôt d'un matériau conducteur. De plus, il est à noter une augmentation du signal pour ces coupes. Ce phénomène est observé de manière générale sur l'ensemble des ions observés. Le même effet est observé pour des coupes recouvertes d'or avec la matrice ionique HCCA/ANI. (Figure 52). De manière similaire les coupes traitées présentent des signaux parfaitement superposés démontrant la suppression des effets de charge ainsi qu'une augmentation du signal. Un phénomène identique est observé pour la matrice acide sinapinique.

Ainsi, il est possible de supprimer les effets de charge par dépôt d'une couche d'or. De plus, loin d'empêcher le transfert d'énergie, l'or permet d'obtenir des rendements ioniques plus importants. La Figure 53 présente des photos de coupes de cerveau de rat pour HCCA/ANI et HCCA après dépôt d'une couche d'or de 150 Å. Les photos montrent que le dépôt est homogène et que l'ensemble du matériau est recouvert. Ces expériences ouvrent donc quelques questions quant aux processus de désorption/ionisation et aux mécanismes conduisant à la formation des ions en phase gazeuse, puisque certaines hypothèses reposent sur l'absorption par les molécules de matrice des photons émis par le laser^{116,117,118}. Ainsi, dans le cas présent la matrice ne peut plus absorber les photons du laser. Ceci pourrait supposer soit que l'or absorbe l'énergie, soit que l'éjection de matière relève d'un phénomène d'onde de choc plus que du transfert d'énergie. Il est aussi possible d'invoquer l'effet photoélectrique d'Einstein par les molécules d'or. Nous ne nous sommes pas attaché pour le moment à caractériser plus en détails les processus de désorption-ionisation dans ces expériences mais les questions restent ouvertes. Il faut également remarquer qu'une augmentation similaire du signal pour des échantillons traités à l'or avait également été observée par Delcorte et coll.^{119,120} dans des études réalisées sur des instruments avec une source SIMS et pour des films polymères recouverts d'or. Les études montrent une nette augmentation du signal ainsi que la possibilité de travailler sur des échantillons de plus haute masse. En SIMS comme en MALDI seules quelques hypothèses permettent d'expliquer les processus induisant une augmentation du rendement de production des ions. Il faut, néanmoins remarquer, que des expériences réalisées avec dépôt de la couche d'or préalablement au dépôt de la solution de matrice permet également l'observation d'ions à partir du tissu. Dans ce cas le signal est plus faible que le signal détecté en conditions classiques, mais présent. En revanche, le dépôt d'or seul sans matrice ne permet pas l'observation d'un signal. Ainsi, l'or déposé ne peut supplanter le rôle de la matrice.

¹¹⁶ Dreisewerd K. ; *Chem. Rev.* **2003** 103, 395-425

¹¹⁷ Karas M., Krüger R. ; *Chem. Rev.* **2003** 103, 427-439

¹¹⁸ Knochenmuss R., Zenobi R. ; *Chem. Rev.* **2003** 103, 441-452

¹¹⁹ Delcorte A., Médard N., Bertrand P. ; *Anal. Chem.* **2002** 74, 4955-4968

¹²⁰ Delcorte A., Bour J., Aubriet F., Muller J.-F., Bertrand P.; *Anal. Chem.* **2003** 75, 6875-6885

3. DEPOTS D'OR ET IMAGERIE

La suppression des effets de charge et l'augmentation nette du signal permettant d'améliorer les performances analytiques des images peuvent être réalisées avec ce traitement d'échantillons. Les expériences montrent que le signal est plus intense et stable sur l'ensemble des points balayés sur la coupe. De même l'ablation semble plus faible, et en particulier lorsque la répétition des tirs est élevée. Des images ont été reconstruites à partir des données enregistrées en mode réflecteur positif sur un instrument MALDI-LIFT-TOF (Bruker Daltonics) avec une fréquence de répétition des tirs de 50 Hz. Les images correspondent à 10 000 points balayés avec une moyenne de 100 tirs par point balayé. La **Figure 54** présente deux spectres obtenus en différents points de balayage. A partir de ces données de nombreuses images moléculaires peuvent être reconstruites. Un exemple d'image correspondant à la répartition des ions à m/z 2019 et m/z 4971 est présenté **Figure 54**, la dernière image présentant une image composite de la répartition superposée de ces ions permettant de visualiser les zones où ils sont colocalisés vs. des zones où seul l'un des deux est détecté. L'ion à m/z 2019 est présent dans une grande partie de la coupe hormis dans des zones correspondant à l'hippocampe et à la fente ventriculaire dorsale. En revanche, l'ion à m/z 4971 est réparti de manière relativement ubiquitaire au sein de la coupe hormis dans la zone correspondant au ventricule. Les images présentent une qualité supérieure à celle obtenues sans or avec une intensité de signal plus importante

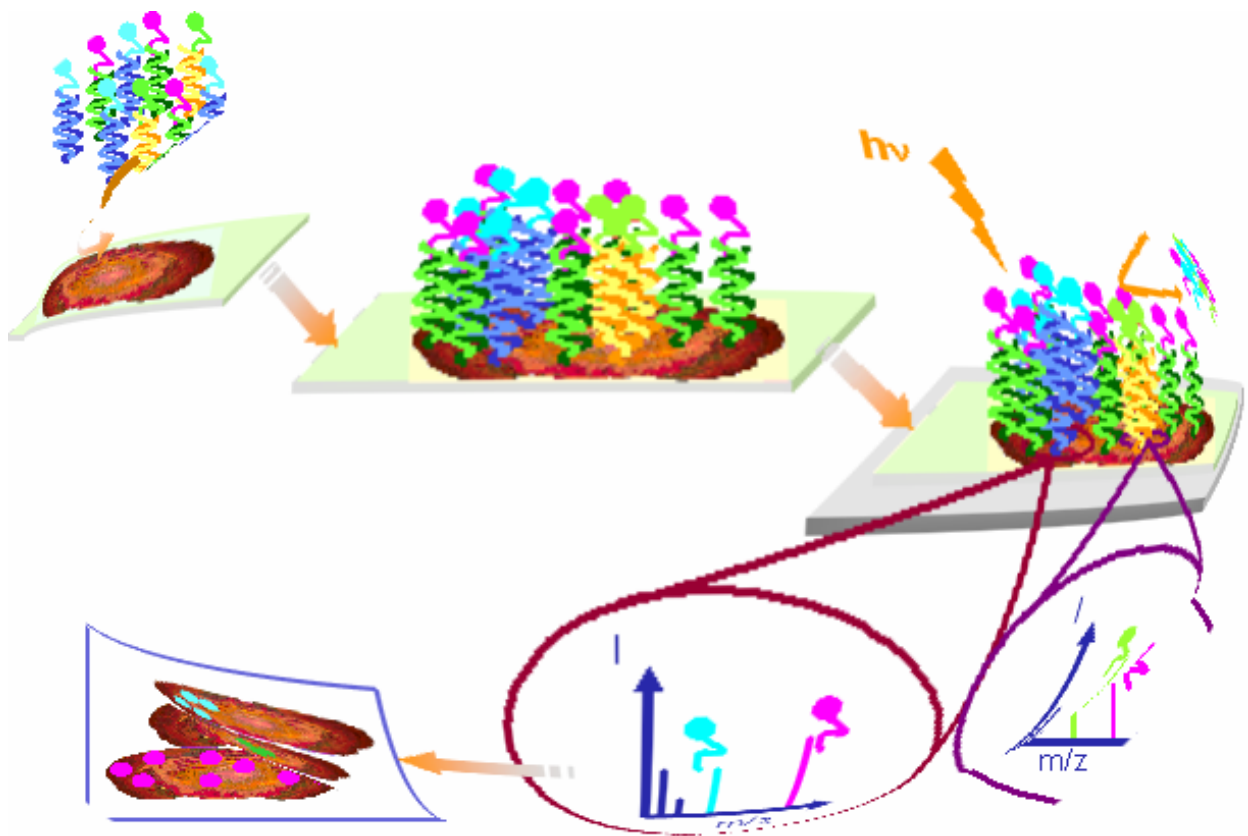
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, la réalisation de dépôts d'or après addition de matrice permet d'éviter les phénomènes d'accumulation de charges en surface de la coupe en évitant un déplacement des pics vers les hauts rapports m/z au cours des séries de tir. De plus, les expériences montrent une nette augmentation du signal et une meilleure qualité des images résultantes. Le dépôt d'or constitue donc un développement particulièrement intéressant pour l'imagerie MALDI, d'autant que les dépôts sont facilement et rapidement réalisable

En perspective de ces premiers résultats, plusieurs études différentes peuvent être envisagées. D'une part l'utilisation d'autres matériaux à la surface de l'échantillon, notamment la vaporisation d'autres métaux (Zinc, Nickel,...) ou encore le dépôt de graphite pour observer les effets sur l'intensité du signal. Il faudra également tester de nouveau les dépôt d'or ou autre élément avant le dépôt de matrice. Les expériences réalisées montrent que le signal est moins intense lorsque l'or est déposé avant la matrice, mais ceci constituerait une excellente voie de

recherche puisque la couche préalablement déposée devrait permettre d'éviter en grande partie la délocalisation des composés au sein de la coupe de tissu lors de l'application de la matrice.

CHAPITRE II. IMAGERIE DES ARNm : LE CONCEPT TAG-MASS



Les avancées technologiques réalisées dans le domaine de l'imagerie avec source MALDI en font un outil particulièrement intéressant pour des applications dans le domaine de clinique. Un exemple d'application sera traité dans la suite de ce mémoire i.e. le Cancer de l'ovaire. Cette technique recèle un potentiel particulier pour la recherche de peptides/protéines sécrétées ou néo-synthétisées dans le cas de pathologies. Néanmoins, afin de répondre aux besoins d'un diagnostic plus précoce, il est également de première importance de pouvoir avoir accès aux transcrits. Dans ce contexte, l'imagerie des ARNm constituait une étape importante. Cependant, l'analyse des oligonucléotides par spectrométrie de masse de manière générale et tout particulièrement lorsque le MALDI est utilisé comme source de production des ions, reste encore difficile. Deux principales difficultés sont rencontrées en MALDI. L'une est liée aux groupements phosphates présents dans les enchaînements d'oligonucléotides entraînant des échanges entre les protons des fonctions hydroxyles du groupement phosphate et les sels présents à l'état de trace en solution (en particulier le sodium). Ces échanges génèrent des espèces fortement cationisées, facilement observables sur des sources MALDI et se traduisant sur les spectres de masse par l'existence de massifs de pics larges et peu résolus. La seconde difficulté rencontrée lors de l'analyse provient de la faible stabilité de ces espèces en phase gazeuse. Des études ont démontré que ces fragmentations provenaient d'une protonation sur la nucléobase conduisant ainsi à la formation d'espèces instables sur la durée d'analyse. Ce phénomène provoque également un élargissement de pics. Les expériences montrent également une augmentation de l'instabilité avec la taille de l'oligonucléotide. Ainsi, pour des espèces d'une taille > 50 p.b. (~15 000 u.) les analyses ne permettent plus l'observation d'un signal. Ainsi, pour des oligonucléotides de taille inférieure à environ 50 pb, l'analyse reste possible avec source MALDI mais les signaux sont peu résolus et peu intenses. Au-delà de 50 pb l'analyse devient impossible. Or, les ARNm recherchés dans les tissus possèdent en moyenne des tailles supérieures à 1000 bases. De plus il faut noter la nécessité d'utiliser des matrices, voire des préparations particulières pour cette famille de composés, et qui ne sont pas nécessairement compatibles avec des analyses directes sur tissus. De meilleurs résultats peuvent être obtenus pour les oligonucléotides de haute masse en utilisant une source MALDI avec un laser émettant dans l'infra rouge (IR). En effet, des études réalisées par l'équipe du Pr. Hillenkamp¹²¹, ont permis de démontrer que les ions formés étaient plus stables par désorption/ionisation en IR, phénomène tout particulièrement observable pour les oligonucléotides de forte masse. Ainsi, les expériences réalisées en IR-MALDI¹²² montrent la possibilité d'analyser des espèces présentant jusqu'à ~ 1500 nucléotides (~500 000 u.) en matrice glycérol avec une résolution permettant

¹²¹Nordhoff E, Kirpekar F, Karas M, Cramer R, Hahner S, Hillenkamp F, Kristiansen K, Roepstroff P, Lezius A ; *Nucleic Acids Res.* **1994** 22, 2460-2465.

¹²²Kirpekar F, Berkenkamp S, Hillenkamp F.; *Anal Chem.* **1999** 71, 2334-2339.

d'exploiter le signal pour mesurer la masse. Cependant, les sources IR-MALDI restent non commercialisées à l'heure actuelle et difficiles à réaliser sans une certaine expérience. De plus, le nombre d'ARNm présents dans les tissus à analyser va conduire à l'analyse de mélanges complexes dépassant encore actuellement les capacités de cette technologie. Devant les nombreuses difficultés présentées par l'analyse des oligonucléotides en MALDI et plus particulièrement pour des applications d'analyses directes de tissus et d'imagerie, nous avons cherché une solution alternative et avons développé un nouveau concept d'analyse spécifique et indirecte des ARNm au sein des tissus.

I. LE CONCEPT "TAG-MASS"

L'analyse spécifique indirecte des ARNm nommé "TAG-MASS" repose sur l'utilisation d'un groupement photoclivable sous irradiation UV et plus précisément à la longueur d'onde du laser. Ainsi, si ce groupement est fixé à une sonde oligonucléotidique et lui-même relié à une molécule de masse déterminée et facilement analysable en UV-MALDI, lors de l'analyse, les tirs laser conduiront à la rupture d'une liaison au niveau du groupement photoactivable. Si l'oligonucléotide ne peut être analysé, en revanche, la molécule de masse connue étant libérée, celle-ci pourra être analysée en lieu et place de l'oligonucléotide (Figure 55). Ce concept de liaison photoclivable sous lampe UV pour l'analyse d'ADN/ARN dans le cadre des SNP a été introduit par le groupe de Olejnik and coll in 1998¹²³. La collaboration avec le groupe de Franz Hillenkamp, leur a permis d'introduire l'utilisation du MALDI pour l'analyse de ces SNP¹²⁴. De notre côté, nous avons développé le concept d'analyse de sondes d'ADNc marquées avec une liaison photoclivable associée à un peptide rapporteur puis clivées par le laser UV du MALDI. Ce concept nous l'avons étendu et adapté à la technique d'Hybridation *In Situ* (HIS) (Figure 56). En réalisant la synthèse d'une sonde oligonucléotidique portant le groupement photoclivable et le marqueur de masse connue, il doit être possible de réaliser une hybridation avec les ARNm de la coupe de tissu. Après hybridation de la sonde modifiée, l'analyse MALDI de la coupe doit conduire après tirs laser à la libération du marqueur. L'analyse étant restreinte à la dimension du faisceau, si un ARNm se situe dans la zone irradiée, alors la liaison sera photoclivée et le marqueur libéré conduira à un signal à la masse attendue sur le spectre. En revanche, dans les zones où l'ARNm n'est pas présent, le signal sera absent du spectre. La reconstruction de la répartition de l'ion correspondant au marqueur décrira donc indirectement la répartition dans le

¹²³Olejnik J., Krzymanska-Olejnik E., Rothschild K.J. **1998** 26, 3572–3576

¹²⁴Olejnik J, Ludemann HC, Krzymanska-Olejnik E, Berkenkamp S, Hillenkamp F, Rothschild KJ.; *Nucleic Acids Res.* **1999** 27, 4626-4631

tissu de la sonde à laquelle il était lié. Le marqueur pouvant être choisi par l'utilisateur, il est donc possible de concevoir différents marqueurs suivant la sone étudiée. Ainsi, l'avantage de cette technique réside dans la possibilité de réaliser des hybridations multiples en une seule expérience (Figure 57). La répartition de chaque sonde étant étudiée par rapport à la répartition de l'ion pseudomoléculaire correspondant au marqueur qu'elle porte.

II. EFFICACITE DE PHOTODISSOCIATION

La synthèse de molécule portant un groupement photoclivable étant peu aisée, celle-ci a été réalisée en collaboration avec la société Eurogentec (Liège, Belgique). Nous avons choisi de débiter nos recherches en utilisant différents peptides de séquences connues comme marqueurs. La Figure 58 présente la formule développée de la première génération de molécule synthétisée.

L'oligopeptide photoclivable est globalement constitué de 3 parties :

- une partie correspondant à l'**oligonucléotide** qui peut s'apparier à l'ARNm ou à l'ADNc et lié par sa partie 5' au groupement photoclivable,
- un groupement (**PC**) constitué **d'un bras de liaison** plus de la **partie photo clivable** dans le domaine de l'UV (photodissociation),
- la partie **peptidique interchangeable**, détectable par son m/z lors de sa libération après photoclivage et liée par sa partie C-terminale au bras de liaison au travers d'un pont disulfure formé par ajout d'une cystéine.

De part la structure du composé, la photodissociation devrait conduire à la rupture d'une liaison au niveau de la jonction entre le groupement phosphate porté en 5' par l'oligonucléotide et le groupement photoclivable (Figure 58). Cependant, les mécanismes de photodissociation sont encore méconnus et aucun mécanisme ne peut être proposé. Les premières expériences réalisées ont donc visé à déterminer la position de clivage ainsi que d'estimer l'efficacité de dissociation de la liaison lors de l'irradiation par le faisceau laser. Pour cela, 3 sondes oligonucléotidiques de séquences différentes (17-18 mers) ont été synthétisées (Tableau 9). A ces trois oligonucléotides ont été greffés trois peptides distincts, respectivement P1, P2 et P3 dont les séquences sont précisées Tableau 10. Les trois oligopeptides synthétisés ont alors été testés.

Oligonucléotide	Séquence	M (u.)	Peptide Associé
O1	5' CA CGT ACA GGA TGT ACA G 3'	5612,6	P1
O2	5' TC GAG AGG TAC ATC GTG 3'	5330,4	P2
O3	5' AA GCG GTA CGA GTA GCA 3'	5348,5	P3

Tableau 9 : *Séquences oligonucléotidiques utilisées pour la synthèse des trois oligopeptides avec les masses correspondantes*

Peptide	Séquence	M _{mono} (u.)	M _{moy} (u.)
P1 (non naturel)	H ₂ N-GRALGVFVC-CONH ₂	918,50	919,14
P2 (Substance P)	H ₂ N-RPKPQQFFGLMC-CONH ₂	1448,73	1449,79
P3 (Bradykinine)	H ₂ N-RPPGFSPFRC-CONH ₂	1160,58	1161,37

Tableau 10 : *Séquences peptidiques et masses correspondantes des trois peptides utilisés comme molécules tests*

L'analyse des trois oligopeptides démontre que l'irradiation par le faisceau laser conduit effectivement à un photoclivage. Les expériences réalisées en condition d'analyse permettant l'observation des oligonucléotides (matrice 3-hydroxypicolinique ou 3-HPA, traitement au citrate d'ammonium) démontrent, cependant, que le rendement de clivage n'est pas de 100%. A titre d'exemple, la **Figure 59** présente le spectre obtenu après analyse dans de telles conditions pour l'oligopeptide 3. Différents pics sont observés sur les spectres et ont pu être attribués soit à l'oligopeptide intact (photoclivage inefficace), soit aux deux unités après photodissociation, à savoir la partie contenant le peptide et le groupement photoclivable et à la partie correspondante à l'oligonucléotide par lui-même. Plus précisément, les ions à m/z 6970,5 et 3489,92 sont attribuables respectivement à l'oligopeptide intact sous forme monochargée ($z=1$) et dichargée ($z=2$). Les ions observés à m/z 5351,03 et 2678,79 correspondent quant à eux respectivement à l'oligonucléotide après photodissociation sous sa forme monochargée ($z=1$) et dichargée ($z=2$). Il faut néanmoins noter, que les signaux restent larges et mal résolus. Plusieurs ions sont observés pour chaque espèce, donnant lieu à des massifs complexes et larges et correspondent à des espèces cationisées par le sodium et/ou le potassium. Ainsi, la précision de mesure reste faible pour ces espèces. Pour la partie peptidique, deux ions principaux distincts sont observés sur le spectre. A m/z 1163,9, l'ion peut être attribué à l'ion quasi-moléculaire MH^+ du peptide seul. Le peptide seul ne devrait pas être observé après photodissociation. L'existence de cet ion

pourrait s'expliquer par la présence du pont disulfure liant le peptide au reste de la molécule. La protonation sur l'un des soufres conduirait alors à une fragmentation rapide de la molécule expliquant la formation de l'ion à m/z 1163,9. Le deuxième ion observé pour le peptide présente un rapport m/z de 1626,37. En supposant une rupture de la liaison entre le phosphore et l'oxygène du côté de la fonction alkyle du groupement photoclivable, l'incrément en masse attendu sur le spectre devrait être de 447,1 u. L'ion observé semble donc correspondre à l'ensemble (peptide groupement photoclivable) sous forme protonée $[M+H]^+$. Par souci de simplicité, le peptide seul sera noté P et l'ensemble peptide-bras-groupement photoclivable attendu par photodissociation sera noté P-PC. Le bras de liaison entre le groupement photoclivable et le peptide présentant un groupement phosphate, des échanges excessifs avec les sels constitueraient une explication raisonnable à ce phénomène. Les spectres obtenus pour les deux autres oligopeptides conduisent à des résultats similaires. Dans tous les cas deux ions correspondant au peptide sont observés. Dans tous les cas le photoclivage n'est pas efficace à 100% et des signaux correspondant à l'oligopeptide intact sont observés. Les expériences réalisées en conditions d'analyses plus favorables à l'observation des peptides (matrices 2,5-DHB, acide sinapinique ou HCCA) conduisent à des résultats similaires. De nombreux tests dans différentes conditions d'analyses ont été effectués. Les signaux observés caractéristiques du peptide marqueur recherché se sont révélés toujours être de même nature.

Afin de connaître la limite d'utilisation de ce type de molécules, des tests de sensibilité ont été réalisés. La concentration de l'échantillon a été diminuée progressivement. La **Figure 60** présente le spectre obtenu pour l'oligopeptide 1 pour 100 fmoles de composé déposé. Le signal est alors relativement faible et le rapport signal/bruit faible. Néanmoins il est possible d'observer à m/z 923,91 un pic correspondant au peptide sous sa forme MH^+ et deux pics à m/z 1367,73 et 1383,48 correspondant respectivement à (P1-PC) sous forme $[M+H]^+$ non oxydée et oxydée. Le pic présent à m/z 1069,54 pourrait être attribué à une fragmentation au niveau du groupement phosphate porté par le bras de liaison. Malgré une intensité relativement faible, les signaux signature de la présence du peptide sont toujours observables. La limite de détection se situerait donc un peu en dessous de 100 fmoles pour l'analyse de ce type de composés.

Afin de tester la possibilité de réaliser la détection de plusieurs marqueurs en une même étape d'analyse, les trois oligopeptides ont été analysés en mélange. Additionnés en quantité égale, l'analyse conduit à la détection des peptides marqueurs. La **Figure 61** présente un exemple de spectre obtenu après analyse du mélange avec la matrice acide sinapinique. Pour chaque oligopeptide, plusieurs pics correspondant à la partie portant le marqueur peptidique sont observés. Les pics à m/z 1346,95, 1603,74, 1619,7, 1891,72 et 1907,7 correspondent à des espèces photoclivées au site attendu de clivage. Les ions à m/z 1161,87 et 1449,88

correspondraient à des fragmentations au niveau du pont disulfure en C-terminal du peptide. L'ion à m/z 2896, 64 est attribuable au dimère phase gazeuse de l'ion de fragmentation du peptide P2. Enfin les pics à m/z 1415,93, 1520,9 et 1675,8 n'ont pu être attribués. Ils pourraient provenir de fragmentations particulières ou d'un mécanisme de photodissociation secondaire. Les ions avec leur attribution respective sont résumés dans le **Tableau 11**.

m/z	Espèce attribuée	Peptide
1161,87	[P3+H] ⁺ fragment au site S-S	P1
1346,95	[P1-PC+H] ⁺	P3
1415,93	Fragment / photodissociation différente	?
1449,88	[P2+H] ⁺ fragment au site S-S	P2
1520,9	Fragment / photodissociation différente	?
1603,94	[P3-PC+H] ⁺	P1
1619,7	[P3-PC+H] ⁺ oxydé	P1
1675,8	Fragment / photodissociation différente	?
1891,72	[P2-PC+H] ⁺	P2
1907,7	[P2-PC+H] ⁺ oxydé	P2
2896,64	2P2H ⁺	P2

Tableau 11 : *Attribution des principaux ions observés lors de l'analyse des trois oligopeptides en mélange*

En résumé, les spectres montrent la présence de nombreux pics dont certains provenant de fragmentations. Cependant, les mêmes combinaisons de pics reviennent systématiquement et suffisent pour confirmer la présence du peptide marqueur de l'oligonucléotide. Ces résultats démontrent le fonctionnement de la méthodologie même si la photodissociation n'est pas efficace à 100%. Il faut enfin noter que les rendements de photodissociation sont différents suivant le peptide marqueur utilisé. Ce point sera à étudier de manière plus détaillée pour une finalisation de la méthodologie, en particulier pour tester les peptides présentant après photodissociation la plus grande sensibilité. Cependant, la synthèse des composés étant difficile nous avons retenu le peptide P1 (bradykinine) pour la suite des expériences.

Avant de s'intéresser à la réalisation de sondes oligonucléotidiques marquées, nous avons cherché à réaliser des essais d'images à partir de nos composés. L'image d'un "X" grossier a donc été tracée à la micropipette sur le porte échantillon métallique préalablement recouvert d'une couche mince de matrice HCCA (solution HCCA ~15 mg dans 1 mL d'acétone) avec la solution contenant l'oligopeptide 3. En automatisant l'acquisition, les spectres ont été collectés

sur un rectangle défini autour du motif. A l'aide du logiciel IMS (développeur M. Stoeckli), l'image a été reconstruite à partir de l'ion à m/z 1626,37 correspondant au peptide photoclivé sous sa forme $[P3-PC+H]^+$ oxydé. L'image obtenue est présentée **Figure 62**. Les pixels jaunes présentent les points d'enregistrement où l'ion à m/z 1626,37 a été détecté dans les spectres. Les pixels sont noirs en absence de cet ion. La lettre "X" est visible sur l'image démontre que le peptide photoclivé n'est présent que dans les zones où l'oligopeptide avait été déposé. Il n'existe donc pas de délocalisation de la photodissociation. Cette première expérience permet de valider le concept de la réalisation d'images de la répartition d'oligonucléotides au travers de celle de leurs peptides associés.

III. AMPLIFICATION D'OLIGOPEPTIDES MARQUES PAR TECHNIQUE PCR

La suite logique de l'étude a consisté à réaliser des sondes oligonucléotidiques marquées. Il faut donc pouvoir utiliser le système le plus simple à synthétiser. Il faut donc passer par la technique de PCR. La stratégie choisie consistait à synthétiser des amorces PCR portant les marqueurs puis de réaliser l'amplification de la sonde par technique de PCR classique. La première étape de cette étude consiste à tester la compatibilité des oligonucléotides marqués avec la technique PCR. L'oligopeptide 3 a été utilisé pour réaliser une amplification PCR sachant que l'oligonucléotide correspondait à une partie de la séquence correspondant à la protéine Calmodulin Binding Protein (CBP) de souris, protéine redondante, et pouvait donc servir d'amorce PCR gauche. Après avoir dessinées deux amorces droites, une courte et une longue pour cette même protéine (GAC CAG ATC TTG CCG TCT), les expériences PCR ont été effectuées. La **Figure 63** présente les résultats obtenus après amplification PCR puis séparation des oligonucléotides sur gel d'agarose avec bromure d'éthidium (BET). Différentes conditions ont été testées. Tout d'abord quatre températures de PCR, puis pour chaque température a été comparée : 1, l'amorce gauche portant le marqueur avec l'amorce droite courte (puits 2), l'amorce gauche non marquée avec l'amorce droite courte (puits 3) et l'amorce gauche non marquée avec l'amorce droite longue (puits 4). Le gel montre que les amplifications sont faibles à 52°C et beaucoup plus importante pour $T > 52^\circ\text{C}$. Les puits 4 (amorce droite longue) conduisent à une amplification de 100 bp. attendue pour la séquence codant pour la CBP. Les puits 3 (amorce droite courte) conduisent à deux bandes correspondant à l'amplification de deux séquences, respectivement à 100 bp. correspondant à la CBP et une bande à un poids moléculaire autour de 2,5 kb. Cette bande n'était pas attendue mais pourrait correspondre à une amplification de l'ADN génomique de la CBP. On peut également faire l'hypothèse d'une

amplification non spécifique. Enfin, il est en particulier importante de comparer les puits 3 et 4 (amorce droite courte et amorce gauche marquée et non marquée), puisqu'il est possible d'observer une amplification identique dans les deux. Ceci démontre que la présence du marqueur ne semble en aucun cas gêner la Taq-polymérase dans son rôle d'élongation et valide la possibilité d'utiliser la technique PCR pour réaliser des sondes oligonucléotidiques portant le marqueur d'intérêt.

IV. REALISATION DE SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES MARQUEES

Afin de poursuivre l'étude du concept, la proenképhaline de rat a été choisie comme sonde oligonucléotidique test (Figure 64). En effet cette protéine est connue pour être exprimée dans le cerveau chez le rat qui constitue notre modèle pour les développements en imagerie. De plus, cette protéine avait été précédemment étudiée au laboratoire, l'HIS avait été réalisée et des images HIS de référence en sonde froide étaient donc disponibles pour comparaison avec les images qui pourraient être obtenues par le "TAG-MASS". Des amorces correspondant à ce composé classique et marquées, gauche et droite, ont donc été synthétisées (Tableau 12).

Amorces dessinées pour la proenképhaline	Séquence
Amorce gauche	5' CAG GAC TCC CCA AAG GAG AAC AGG A 3'
Amorce droite	5' GAC GTA CCA GGC GGT AGC TGC ATT T 3'

Tableau 12 : *Séquences des amorces utilisées pour réaliser l'amplification d'une sonde correspondant à la proenképhaline de rat*

De même, afin d'éviter les problèmes liés aux fragmentations et afin de faciliter les procédures de synthèse un nouveau marqueur portant une fonction maléimide est utilisé (Figure 65). La Figure 65 présente les spectres de masse MALDI, réalisés en conditions (matrice 3-HPA) permettant l'observation des oligonucléotides, des deux amorces gauche et droite marquées. Plusieurs pics ou massifs de pics sont observables sur les spectres. Dans les deux cas, les mêmes types d'ions sont détectés. Pour l'amorce gauche marquée, les pics à m/z 9499,73 et 4753,4 correspondent à l'oligopeptide entier respectivement mono et dichargé. Le pic à m/z 7795,57 est attribuable à l'oligonucléotide seul après photodissociation. De la même façon pour l'amorce droite, sont retrouvés les deux pics correspondant à l'oligopeptide z=1 et z=2 à 9509,31 et 4605,36 ainsi que le pic à m/z 7767,13 pour l'oligonucléotide. Les signaux sont faibles et larges et les mesures de masse restent peu précises. Comme attendu, pour la partie

comprenant le peptide après photodissociation, les même pics sont observés pour les deux amorces. Les ions signature du marqueur se présentent sous la forme d'un massif de trois pics à m/z 1722,4, 1744,05 et 1705,46, pour l'amorce gauche. A m/z 1722,4 le pic correspondrait au fragment de photodissociation sous forme protonée et à m/z 1744,05 sous forme cationisée par le sodium. Le pic à m/z 1705,46 apparaîtrait 16u. en dessous du pic principal et semblerait lié à la perte d'un oxygène. Pour l'amorce droite, le pic principal présente un décalage à m/z 1719,9. Cependant, comme précédemment observé avec le marqueur possédant un groupement phosphate, les pics sont assez larges révélant probablement des mécanismes de photodissociation secondaires, entraînant une moins bonne précision des mesures de masse. De nombreux pics sont également présents dans la gamme de m/z <1750. Deux séries de pics décalées présentant une répétition de 151 u. sont observées. Ces pics semblent correspondre à un polymère synthétique soit résiduel de la synthèse du composé, soit suite au relargage des plastiques utilisés pour le stockage des échantillons. Ces pics sont signalés par une étoile et ne correspondent en rien avec des pics pouvant provenir de la photodissociation du composé étudié.

Finalement, le marqueur maléimide présente également une bonne efficacité de photodissociation permettant l'observation sur les spectres de trois signaux caractéristiques.

Les amorces marquées sont utilisées pour amplifier un fragment de la proenképhaline afin de servir de sonde pour réaliser l'HIS. La **Figure 66** présente le gel d'agarose avec BET obtenu après migration de la solution correspondant aux produits issus de RT-PCR. Pour comparaison, dans la même expérience ont été testées les amorces classiques pour la proenképhaline afin de servir de témoin pour l'amplification, l'amorce gauche marquée avec une amorce droite classique, l'amorce gauche classique avec une amorce droite marquée et enfin les amorces gauche et droite marquées. Le gel présente une seule et même bande pour toutes les conditions correspondant à un fragment d'amplification de 400 pb. Il est intéressant de constater que la présence du marqueur sur l'une des amorces voir sur les deux simultanément ne gêne pas l'expérience et permet d'amplifier le fragment attendu. Les fragments obtenus par amplification ont été séquencés et les séquences montrent qu'ils correspondent bien à un fragment de la proenképhaline (**Figure 67**). Des analyses en MALDI ont été essayées après purification sur colonne de silice des produits de PCR afin de vérifier (malgré la difficulté d'analyse sur échantillons issus de PCR) si le marqueur n'avait pas subi d'endommagement lors des différentes étapes. La **Figure 68** présente un agrandissement du spectre de masse MALDI obtenu sur le fragment obtenu avec les amorces gauche et droite modifiées. Le spectre présente plusieurs pics. La plupart des pics présente une unité de répétition de 44 u. caractéristique du polymère synthétique polyéthylène glycol (PEG). Le PEG rentre dans la fabrication de

nombreux matériaux et présente des signaux particulièrement intenses en MALDI. Ainsi, les échantillons sont contaminés par du PEG provenant probablement des tubes utilisés pour conserver les différentes solutions utilisées. Cependant, il est possible d'observer les trois ions caractéristiques de la partie peptidique après photoclivage à m/z 1703,84, 1720,41, 1722,03. Le pic à m/z 1720,41 est dédoublé. Le pic de plus bas m/z correspond à l'un des pics de la distribution du PEG alors que celui de m/z le plus élevé des deux correspond au fragment de photoclivage attendu. Une ambiguïté aurait pu être soulevée si ce seul fragment de photodissociation était présent mais la présence des deux autres ions démontrent la présence du marqueur peptidique. Ainsi, le séquençage du fragment amplifié et l'analyse en spectrométrie de masse confirment qu'un fragment de 400 pb. correspondant à la proenképhaline et portant le marqueur a pu être amplifié.

V. SONDES OLIGONUCLEOTIDIQUES MARQUEES ET HIS

Les sondes réalisées ont ensuite été testées pour l'hybridation *In situ*. Dans un premier temps, nous avons testé les protocoles HIS habituellement utilisés pour la sonde proenképhaline classique. Les études ont donc été réalisées sur cerveau de rat inclus en paraffine. Les blocs ont été coupés au microtome et les sections de tissus (10 μm) déposées directement sur le porte échantillon servant aux analyses MALDI-TOF avant d'être déparaffinées par bain successifs au toluène. Afin de disposer d'un contrôle, pendant la même expérience ont été réalisées l'hybridation avec la sonde proenképhaline marquée et avec la sonde proenképhaline classique. Afin de disposer de quantités suffisantes de sonde, les produits de deux PCR ont été mélangés. Après l'ensemble de l'hybridation et des traitements nécessaires, les coupes ont été rincées à l'éthanol 96° avant d'être soumises à l'analyse par spectrométrie de masse MALDI. Plusieurs études sont alors réalisées. Sur les deux coupes de nombreux spectres sont enregistrés en différentes localisations sur la coupe de tissu. En plusieurs points de la coupe provenant de l'HIS avec la sonde modifiée, des pics caractéristiques du peptide marqueurs sont observés. En revanche, en d'autres points de cette même section ces ions n'apparaissent pas. Pour la sonde proenképhaline classique, de nombreuses analyses ont été réalisées en différents points de la coupe et ces mêmes ions ne sont pas observés. La **Figure 69** présente des agrandissements de spectres représentatifs obtenus sur ces coupes pour ces différents cas de figure. Pour la section de l'HIS avec sonde marquée sont présents différents pics. Il faut encore déplorer la présence d'ions correspondant au PEG et mis en évidence par la répétition de 44 u. entre ces pics. Sur le spectre b) correspondant à une zone où le marqueur n'est pas présent ces pics sont visibles à

m/z : 1630,44, 1674,51, 1718,84, 1762,73, 1806,8, 1851,08, 1894,67 (les pics sont annotés d'une étoile). Sur le spectre a) correspondant à une zone où le marqueur peut être retrouvé, ces mêmes ions (m/z 1630,74, 1674,51, 1763,21, 1807,63) interfèrent avec les pics correspondant au marqueur peptidique. Le pic à m/z 1719,63 est légèrement dédoublé et l'enveloppe renferme deux ions différents l'un provenant du PEG et l'autre de l'ion peptidique attendu. L'ambiguïté peut être levée par la présence de l'ion à m/z 1704,04. De la même manière, seuls les pics correspondant aux PEG sont observables sur le spectre c, qui correspond au contrôle avec sonde proenképhaline classique. Même si les signaux restent faibles, le peptide peut être détecté dans certaines zones du cerveau. Ainsi, cette étape valide le concept de pouvoir détecter une sonde oligonucléotidique hybridée au travers de l'analyse du marqueur qu'elle porte. Une image devrait être bientôt réalisée avec ce marqueur.

VI. SECONDE GENERATION DE MARQUEURS

Afin de gagner en sensibilité pour la détection des marqueurs, une seconde génération de marqueurs a été conçue. Cette nouvelle génération de molécules a aussi été dessinée pour pouvoir réaliser des ribosondes, sondes couramment utilisées à l'heure actuelle en HIS et qui permettent d'assurer que l'hybridation se fait uniquement sur les ARNm et non sur de l'ADN génomique. Cependant, la réalisation des ribosondes passe par une transcription *in vitro* impliquant que les deux extrémités 5' et 3' de la sonde soient libres. Hors, le marqueur de première génération présenté précédemment est fixé sur la partie 5' des oligonucléotides. Le concept proposé, ici est de greffer le marqueur sur la base du nucléotide afin de dégager les extrémités. La stratégie choisie est de réaliser la synthèse de nucléotides modifiés portant sur la base le marqueur. Nous avons choisi de modifier la base uracile dans une première approche. Cette stratégie conduira alors, lors de la réalisation de la ribosonde, à l'incorporation d'une uracile modifiée par le marqueur à la place de chaque uracile devant être introduite dans la séquence de la sonde. Au final, la sonde possèdera autant de marqueurs que d'uraciles dans sa séquence. Ceci devrait permettre, outre la possibilité de travailler en ribosondes, d'augmenter la quantité de marqueurs et devrait faciliter nettement la détection du peptide attendu (Figure 70). Un concept similaire a été développé par le groupe de Bai avec clivage à l'aide d'une lampe UV puis analyse par MALDI –TOF¹²⁵. Ce concept se rapproche également des sondes avec uracile marquée à la digoxigénine couramment utilisées actuellement pour l'HIS¹²⁶. La Figure 71 présente la formule développée de la molécule dessinée sur ce principe. Dans un premier temps

¹²⁵Bai X, Kim S, Li Z, Turro NJ, Ju J.; *Nucleic Acids Res.* **2004** 32, 535-451

¹²⁶Rees JL, Fisher C ; *Trends Genet.* **1992** 8, 8

nous avons choisi comme peptide marqueur de cette séquence la Bradykynine. A titre d'exemple, en reprenant la séquence de la sonde proenképhaline précédemment amplifiée (Figure 67), la réalisation de la sonde devrait entraîner l'incorporation de 79 uraciles modifiés, et en conséquence conduire à une bien meilleure sensibilité de détection.

La synthèse de l'uracile modifiée sur la base n'est pas aisée, passant par de nombreuses étapes de synthèse avec protection de certaines fonctions. Il faut en particulier noter des difficultés de solubilité des produits en fin de synthèse qui ayant nécessités plusieurs modifications des voies de synthèse. En fin de synthèse, différents pics apparaissent après séparation HPLC sur colonne phase inverse greffée C18. Les analyses effectuées en MALDI montrent qu'une seule fraction correspondrait au peptide. La Figure 72 présente le spectre obtenu lors de l'analyse. Plusieurs pics significatifs sont observés respectivement à m/z 1066,48, 1163,23, 1300,19, 1615,59 et 2323,1. Le pic à m/z 1163,23 semble correspondre au peptide seul sous forme d'ion MH^+ et le pic à m/z 2323,1 correspondrait donc au dimère $2MH^+$ de ce composé. Les dimères en abondance en phase gazeuse sont généralement beaucoup plus faible voir même quasi inexistant pour des masses si faibles. Mais dans le cas présent, nous ne pouvons exclure que ce dimère ne soit pas non covalent en phase gazeuse mais plutôt un sous produit covalent de la photoréaction. L'ion peptidique m/z 1163,23 pourrait soulever une ambiguïté, puisque dans le cas présent il pourrait correspondre au peptide n'ayant pas été greffé lors de la synthèse. Cependant, le temps de rétention en HPLC ne correspond pas à celui du peptide seul, et bien à des temps correspondant à un composé plus hydrophobe. Le pic à m/z 1066,48 pourrait quant à lui être attribué à la bradykynine ayant reperdu sa cystéine C-terminale. L'ion à m/z 1615,59 pourrait être attribué au fragment photoclivé (P+PC), soit par photactivation conduisant à la rupture de la liaison entre le CH porté par le cycle aromatique et l'oxygène du groupement phosphate. Le pic à m/z 1300,19 est difficilement attribuable. Les pics sont différents de ceux observés pour les marqueurs précédemment étudiés ce qui montre la complexité des processus de photoréaction. Néanmoins, dans le cas présent, nous souhaitons pouvoir uniquement disposer de pics caractéristiques de la présence du marqueur, et dans ces conditions, les différentes analyses effectuées démontrent que ces mêmes pics sont toujours observés. Des études par RMN sont actuellement envisagées afin de vérifier la structure de l'uracile modifiée synthétisée. Cependant, nous cherchons d'abord à avancer plus loin dans les tests avec cette seconde génération de marqueur avant d'entreprendre des analyses plus complexes et qui nécessiteront de disposer de quantités plus importantes du composé.

Les uraciles modifiées ont été utilisées pour réaliser l'amplification de la même sonde Proenképhaline (400 pb.) que précédemment. Cette fois-ci des amorces conventionnelles sont utilisées dans les deux cas. La première sonde est amplifiée avec des uraciles et la deuxième

avec des uraciles marquées. Après RT-PCR et purification, ces deux sondes sont analysées par spectrométrie de masse MALDI. En parallèle, les produits de PCR sont séparés en gel d'agarose avec BET. En utilisant les bases C, G, A en quantités classiques et l'uracile modifiée, les gels ne présentent pas de bande d'amplification. Les paramètres de RT-PCR sont donc modifiés en modifiant les quantités de dNTP. C, G et A sont alors utilisées en quantité classique avec un mélange d'U marquée et d'TPP dans un rapport 1 :3. Les difficultés rencontrées sont similaires à celles rencontrées dans le cas de l'uracile marquée à la digoxigénine nécessitant également la modification des quantités de dNTP pour obtenir des amplifications. Ce phénomène est vraisemblablement lié à un problème d'encombrement stérique par le marqueur. Dans ces conditions, les gels d'agarose obtenus permettent d'observer pour les deux cas une bande d'amplification à la même valeur de poids moléculaire et correspondant au poids attendu pour le fragment de proenkephaline étudié. La **Figure 73** présente les spectres MALDI correspondants et obtenus sur la sonde classique (b) et la sonde modifiée (a). Les conditions d'analyse sont choisies pour l'analyse des peptides et la sonde totale n'est en aucun cas recherchée dans ces expériences. Il est observable que les deux spectres présentent des ions différents. La sonde modifiée conduit à l'observation d'une série de pics à m/z 1128,23, 1163,06, 1201,75 et 1243,26 correspondant à priori aux peptides marqueurs portés par la sonde, ions non observés pour la sonde classique. L'ion à m/z 1163,06 confirme cette assertion même si les autres pics observés n'étaient pas observés lors de l'analyse de l'uracile modifiée seule. A m/z 1201,75 et 1243,26, les pics étant distants d'environ 38-40 u, ils pourraient être attribués à des cations potassium liés au milieu de réaction PCR. A m/z 1128,23 l'ion proviendrait d'une fragmentation de chaîne latérale de la cystéine avant le pont S-S. Même si tous les signaux n'ont pu être encore attribués, ils sont nettement visibles avec un bon rapport S/B sur le spectre correspondant à la sonde modifiée démontrant qu'une sonde marquée par les uraciles modifiées a bien été réalisée.

Actuellement, les étapes de tests d'HIS avec cette sonde devraient bientôt commencer. Si la détection avec cette sonde est possible sur tissu nous pourrions alors réaliser des images de la répartition de la proenkephaline au sein du tissu et les comparer aux images d'HIS classiques déjà réalisées. Nous allons également effectuer des expériences en IR-MALDI (collaboration avec Pr. F. Hillenkamp, Münster) afin de déterminer si le taux d'incorporation des molécules marquées (nombre d'uraciles modifiées incorporées par rapport aux nombres d'uraciles incorporables sur la sonde). L'IR-MALDI permettant l'analyse des oligonucléotides de haute masse, et le laser IR ne devant pas conduire à une rupture de la liaison photoactivable, il devrait être possible en comparant les spectres pour la sonde classique et la sonde modifiée de déterminer le nombre d'uraciles incorporées. Pour faciliter les analyses, il peut être envisagé

d'utiliser au préalable une enzyme de restriction qui conduira à une digestion de la séquence et des fragments de masse beaucoup plus faible.

VII. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'imagerie des ARNm par spectrométrie de masse est un défi important et qui aura d'innombrables débouchés dans le cadre en particulier de la protéomique clinique. **Nous proposons, ici un nouveau concept permettant de réaliser l'imagerie des ARNm par spectrométrie de masse MALDI.** Les différentes études menées tendent à démontrer clairement la faisabilité de ce nouveau concept. Il a été possible de montrer la possibilité de détecter indirectement des oligonucléotides au travers de la détection de peptides greffés sur ces oligonucléotides au travers d'un groupement photoactivable sous l'irradiation par le laser équipant la source MALDI. Les processus de photodissociations restent complexes mais des pics signature de la présence du peptide peuvent être retenus. La suite des études montre également, que l'amplification de sondes portant le marqueur est possible par la technique de RT-PCR. La sonde marquée ainsi réalisée peut être utilisée pour réaliser l'HIS. De plus, un signal signature de la présence du peptide est encore détecté après hybridation. En modifiant le concept du marqueur, *i.e.* en marquant une uracile, il devient alors possible d'augmenter la sensibilité en incorporant plusieurs marqueurs par sonde et de réaliser des ribosondes permettant d'exclure toute hybridation avec de l'ADN génomique. Cette seconde génération de marqueur permet de réaliser une sonde modifiée par RT-PCR et l'analyse effectuée par spectrométrie de masse après PCR montre effectivement une amélioration de la détection du peptide. Des études sont en cours, pour réaliser une image avec le marqueur de première génération, l'HIS avec le second marqueur et pour pouvoir faire des ribosondes par transcription *in vitro*.

Cependant, plusieurs aspects restent encore à étudier.

1. Optimisation des protocoles PCR avec la base modifiée
2. Etude de l'efficacité de marquage par l'uracile modifiée par comparaison aux techniques classiques de marquage telles que les bases radiomarquées, avec fluorophore ou à la digoxigénine.

3. Etude de différents type de marqueurs (peptides, petits composés organiques, biotine, matrice,...) afin de déterminer ceux présentant la plus grande sensibilité d'analyse et permettant d'atteindre les plus faibles quantité d'ARNm
4. Estimation du taux d'hybridation de la sonde marquée avec des ARNm extraits de tissus par technique du DOT-BLOT
5. Optimisation des protocoles d'HIS sur différents types de tissus (coupes à congélation, coupes paraffinées récentes ou anciennes)
6. Optimisation des conditions d'analyses permettant la réalisation d'images de la répartition des ARNm par spectrométrie de masse MALDI
7. Réalisation d'études de multi hybridations (détermination du nombre maximum de sondes pouvant être hybridées et analysées par MALDI par expérience)
8. Applications aux pathologies

L'un des axes de prospective sera la possibilité de remplacer le marqueur peptidique, en particulier, par une molécule de matrice MALDI. En supposant que la matrice conserve les mêmes propriétés liée que libre et qu'elle puisse être libérée par photodissociation, il sera possible d'envisager la réalisation d'images sans avoir à additionner de matrice sur la coupe de tissu, évitant toute délocalisation des composés.

Lorsque les différents objectifs auront été atteints, nous disposerons ainsi d'une technologie nous permettant de réaliser des analyses directement sur des tissus des peptides/protéines, ARNm. De plus, la partie bioinformatique nous permettra de reconstruire des images moléculaires de la répartition des gènes au sein des tissus et, en combinant imagerie des protéines et imagerie des gènes, il sera possible d'obtenir des cartes de co-localisation protéome/transcriptome et d'associer l'expression d'un gène marqueur d'une pathologie avec la présence de la protéine marqueur de la pathologie dans le tissu.

CHAPITRE III. APPLICATIONS AUX PROBLEMATIQUES BIOLOGIQUES : CAS DU CANCER DE L'OVAIRE



L'analyse directe de tissus par spectrométrie de masse avec des sources MALDI est une technique en plein développement qui permet l'analyse rapide de tissus. Elle permet de s'affranchir, comme nous l'avons vu, des étapes longues et coûteuses en échantillons que sont les extractions et séparations classiquement utilisées. De plus, en évitant les étapes d'extractions, elle offre l'avantage de ne pas générer de modifications potentielles des biomolécules et en particulier les protéines. Enfin, en étudiant directement les tissus il est possible de travailler sur les molécules *in vivo* dans leur contexte d'origine. Ces avantages qualitatifs font de cette technologie un outil de choix pour des applications aux problématiques biologiques dont en particulier l'étude de pathologies.

Le cancer est une des pathologies sur laquelle la science se doit d'avancer dans l'amélioration de son diagnostic et de ses traitements. L'analyse directe de tissus pourrait apporter des informations importantes et notamment dans un premier temps pour rechercher des biomarqueurs potentiels de cette pathologie. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés, ici, au cas du cancer de l'ovaire. Afin de rechercher des biomarqueurs de ce cancer, nous avons opté pour une stratégie où seront recherchés les peptides/protéines étant sous ou sur-régulés dans les tissus tumoraux par comparaison à des tissus sains. Cette approche présente l'avantage de travailler directement sur les tumeurs et non sur des cultures cellulaires qui peuvent ne pas être réellement représentatives des mécanismes se produisant dans les tissus.

I. LE CANCER DE L'OVAIRE

Le cancer de l'ovaire est la cinquième cause de cancer chez la femme après les cancers du sein, du colon, de l'utérus, de l'estomac et du pancréas. Il constitue la troisième cause de décès par cancer et plus particulièrement dans une tranche d'âge de 60 à 70 ans. Il touche en moyenne une femme sur 70 avec 4500 nouveaux cas en France par an. Sur ces 4500 cas, 3500 patientes décèdent alors que pour le cancer du col utérin, seulement 1000 décès sont à compter pour 3400 cas, et 11000 décès pour 41000 cas dans le cas du cancer du sein. Le cancer de l'ovaire se présente donc comme un cancer entraînant de nombreux décès. La majorité des cancers de l'ovaire sont des tumeurs de type épithéliale (85%) et seulement 12% sont non épithéliale et 3% des métastases ovariennes et des lymphomes. Plusieurs facteurs de risque ont pu être évalués, comme la stérilité, la pauciparité, la nulliparité, mais également les femmes ayant des règles précoces ou une ménopause tardive ou encore soumise à une irradiation pelvienne. Les facteurs génétiques sont également à prendre en compte. 3 à 5% des cas de cancer de l'ovaire sont des formes familiales. Ainsi, outre les antécédents familiaux le risque de cancer de l'ovaire est

évalué à 1,4% chez les femmes et monte à 5% pour les femmes ayant un antécédent direct. Les signes cliniques peuvent être relativement ciblés (augmentation du volume de l'abdomen, douleurs pelviennes, leucorrhées, troubles hormonaux,...) comme beaucoup d'autres plus vagues (troubles digestifs, troubles respiratoires, altération inexplicée de l'état général). Les examens proposés pour un diagnostic peuvent être de plusieurs types *i.e.* abdominaux, gynécologiques ou généraux en pratiquant des échographies endovaginales, de l'IRM ou en suivant certains marqueurs tumoraux. Actuellement trois marqueurs tumoraux sont suivis dans le cas du cancer de l'ovaire mais ne sont pour autant pas spécifique de ce cancer. Le marqueur CA 125 (Cancer Antigen 125) est élevé dans 80% des cas de tumeurs épithéliales. Mais seuls 50% des patientes à un stade peu avancé de cancer présentent une augmentation de ce marqueur. Le marqueur CA 19.9 est quant à lui, élevé dans 17-35% des cas, mais pour des tumeurs mucineuses. Enfin, le marqueur ACE (Antigène Carcino-Embryonnaire) est élevé dans 35-65% des cas pour des tumeurs épithéliales, mais pour des stades très avancés de cancer. Le suivi de ces marqueurs constitue une méthode sensible mais qui reste très peu spécifique. En revanche, l'intérêt de suivre des marqueurs comme le CA 125 et son augmentation dans une période de trois mois précédant l'apparition de signes cliniques diagnosticables. Le cancer de l'ovaire se classe en 4 stades et sous stades (Tableau 13) dépendant de l'étendue prise par la tumeur.

Stade	Description	Sous-stade		
		A	B	C
Stade I	Limité aux ovaire	IA : 1 ovaire, capsule intacte	IB : Deux ovaires, capsules intactes	IC : Rupture capsulaire ou tumeur à la surface ovarienne ou Ascite+ ou Cytologie péritonéale+
Stade II	Limité au pelvis	IIA : Extension à l'utérus et/ou trompe	IIB : Extension à la vessie et/ou au rectum	IIC : IIA ou IIB avec ascite ou cytologie péritonéale positive
Stade III	Etendu à la cavité abdominale ou aux ganglions	IIIA : Métastases péritonéales microscopiques	IIIB : Métastases péritonéales macroscopiques (<2cm)	IIIC : Métastases péritonéales > 2 cm et/ou Nodules (pelviens, para aortiques ou inguinaux)
Stade IV	Métastase à distance			

Tableau 13 : *Tableau récapitulatif des différents stades de classification du cancer de l'ovaire avec leur descriptif*

Il faut particulièrement noter que 75% des cancers de l’ovaire sont diagnostiqués tardivement, *i.e.* aux stades III ou IV. A ce stade le temps de survie des patientes est alors estimé à 5 ans et le taux de survie faible (**Tableau 14**).

Stade du cancer	Taux de survie	
	Cancer type invasif	Cancer frontière
Stade I	80%	98%
Stade II	60%	80%
Stade III	25%	50%
Stade IV	15%	-

Tableau 14 : *Taux de survie en fonction du type et du stade du cancer de l’ovaire*

Ainsi, le cancer de l’ovaire pâtit d’un diagnostic difficile et tardif. La plupart du temps le cancer est définitivement diagnostiqué après opération de la patiente et examen notamment de la chaîne ganglionnaire. La plupart des patientes sont diagnostiquées positivement, mais le cancer est alors souvent au stade IV et ces patientes sont en général condamnées. A ce stade de diagnostics les thérapies proposées, et notamment la chimiothérapie, sont souvent inefficaces.

Devant ce lourd bilan, la réalisation d’un diagnostic précoce sur la base de plusieurs biomarqueurs fiables serait une bonne alternative à un dépistage de cette pathologie. Nous avons donc entamé une collaboration avec une équipe de chirurgiens (Pr D. Vinatier, DR Jean-Philippe Lucot et Dr Pierre Collinet) de l’hôpital Jeanne de Flandre (Lille). Des morceaux des biopsies pratiquées pour les études anatomopathologiques nous ont donc été confiés afin de pouvoir rechercher directement au sein des tissus cancéreux l’existence de peptides/protéines spécifiques qui pourraient se révéler être des biomarqueurs du cancer de l’ovaire.

II. ANALYSE DIRECTE DES TISSUS TUMORAUX

Des travaux antérieurs sur le cancer de l’ovaire, comme la plupart des autres cancers, se sont focalisés sur la recherche de marqueurs dans le but de trouver des molécules prédictives, permettant de suivre l’évolution de la maladie au travers d’analyses d’échantillons pathologiques ou de liquides biologiques¹²⁷. Récemment, le concept de profils cancéreux ("fingerprinting") a été proposé. Cette notion propose la détection de plusieurs marqueurs pour identifier les tumeurs de manière spécifique avec fiabilité. Dans ce contexte, l’analyse directe des tissus cancéreux par

¹²⁷Barakat M.T., Meeran K., Bloom S.R.; *Neuroendocrine tumors* **2004** 11, 1-18

MALDI et l'imagerie MALDI répondent parfaitement à ces critères. L'imagerie MALDI permettant à partir de biopsies de cartographier l'expression des marqueurs de la pathologie reflétant ainsi le niveau de cancérogenèse et/ou sa régression suite au traitement. Les études ont été plus particulièrement focalisées sur les différences de présence des peptides, certaines études préalables ayant démontrées l'abondance de certains peptides dans le cas du cancer de l'ovaire^{128,129,130}. Le but de l'étude est tout d'abord de détecter par études différentielles ces biomarqueurs dans les tissus. Par la suite, après caractérisation, ces biomarqueurs pourront être vérifiés par anticorps. Enfin, pour un diagnostic précoce, ils seront ensuite recherchés dans le sang.

La difficulté des expériences réside dans les différences entre les tissus en contenu peptidique/protéique liés aux différences inter individus. Ayant choisi dans un premier temps de travailler sur des tissus frais, n'ont été disponibles que les tissus de patientes opérées. De plus, un soin particulier a été apporté pour que les échantillons soient traités le plus rapidement possible et dans les mêmes conditions. Pour ce faire les échantillons sont ramenés au moment de l'intervention chirurgicale puis traités et préparés immédiatement. La plupart des tissus obtenus sont confirmés par les anatomopathologistes comme étant des cancers de l'ovaire au stade III ou IV. Les analyses sur tissus cancéreux sont comparées aux analyses réalisées sur des tissus issus de biopsies provenant de patientes atteintes de pathologies bénignes (kyste non cancéreux, descendante d'organe). Afin de confirmer et de rendre plus spécifiques les résultats obtenus par l'analyse des tissus, ces analyses sont comparées avec les prélèvements de liquide d'ascite provenant des mêmes patientes. Dans le cas de pathologies bénignes, les patientes ne présentant souvent pas d'ascite du liquide kystique, est prélevé. De plus, pour des études plus étendues des prélèvements sanguins sont également effectués sur l'ensemble de ces mêmes patientes. Actuellement, les analyses ont pu être réalisées sur 11 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et comparées à celles de 11 patientes atteintes de pathologies bénignes. Dans le cas du liquide d'ascite, les peptides sont extraits du liquide à l'acide chlorhydrique 1N, puis pré-purifiés sur des cartouches de silice greffées en phase inverse C₁₈ ou sur des billes magnétiques recouvertes de silices greffées en phase inverse C₈ avant d'être analysés. Pour les tissus, lorsque le bloc est suffisamment important des coupes sont réalisées au cryostat (typiquement 15µm) et déposées sur le porte échantillon de l'instrument.

L'analyse des tissus cancéreux comparée à l'analyse de tissus sains, révèle des profils peptidiques différents. La **Figure 74** présente un exemple de profils types obtenus sur ces échantillons. Comme le montre la figure, les ions présents dans les deux spectres sont

¹²⁸Grundker C., Emons G.; *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2003** 1(1), 65

¹²⁹Conover C.A., Khosla S.; *Growth Horm. IGF Res.* **2003** 13(6), 328-335

¹³⁰Korner M., Waser B., Reubi J.C.; *Lab. Invest.* **2004** 84(1), 71-80

relativement différents, mettant en évidence une modification du contenu peptidique des tissus dans le cas de cancer. Ces analyses ont été répétées pour chacune des biopsies issues des 11 patientes atteintes de cancer. Par souci d'éviter les faux positifs, n'ont été retenus que les ions absents/présents dans les spectres des patientes atteintes de cancer (i.e. les pics présentant simplement une modulation d'intensité n'ont pas été retenus). Sur l'ensemble des analyses n'a ensuite été sélectionnés que les ions présents dans les cas de cancer mais toujours absents chez les patientes ne présentant pas la pathologie. Puis sur les patientes cancéreuses a été étudié le pourcentage de patientes présentant les ions retenus.

L'existence de liquide d'ascite étant caractéristique des patientes en cancer (jusqu'à plusieurs litres parfois) à partir du stade IC, les mêmes analyses ont été conduites sur le liquide d'ascite prélevé sur ces mêmes patientes atteintes de cancer de l'ovaire et les analyses comparées avec des prélèvements de liquide kystique de patientes ne présentant pas de cancer de l'ovaire. La **Figure 75** présente des spectres types obtenus sur ces liquides biologiques. Tout comme précédemment, certains ions sont communs aux deux spectres mais de manière général les profils peptidiques sont relativement différents avec un certain nombre de pics différentiels. Les liquides nécessitant un traitement avant analyse, deux protocoles différents ont été testés afin d'observer l'influence du traitement sur les peptides observés. A été testée une extraction classique à l'HCl 1N suivie d'une pré-purification des échantillons sur cartouche de silice greffée phase inverse C18 et les résultats comparés avec ceux d'une pré-purification directe sur billes magnétiques recouvertes de silice greffée phase inverse C8 (**Figure 76**). Les résultats obtenus sont présentés **Figure 76** dans le cas de liquide d'ascite. Les spectres montrent que le nombre de peptides détectés et l'intensité des pics sont plus importants dans le cas de l'extraction classique. La purification directement sur billes est moins efficace puisque de nombreux ions restent visibles dans la région des m/z 500-1000 correspondant aux lipides. Certains ions (e.g. m/z 3216,59) présentent une intensité supérieure pour la purification directe mais dans l'ensemble l'intensité des ions peptidiques détectés reste supérieure avec l'extraction classique. La purification directe sur billes présentant l'avantage d'être plus rapide. Comme précédemment, les résultats sont croisés pour les 11 patientes cancéreuses contre les 11 patientes saines et ne sont retenus que les ions totalement différentiels. Finalement, les résultats entre les tissus et les liquides d'ascite sont comparés. De plus, dans le cadre des analyses directes sur tissus, afin de vérifier que les marqueurs potentiels soit bien spécifiques de la tumeur où à l'inverse que des molécules soient retrouvés dans les deux cas, nous avons vérifié en réalisant des analyses PSD partiels afin de lever toute ambiguïté (**Figure 77**). Sur la base de l'ensemble de ces résultats une première liste de 8 biomarqueurs potentiels peut-être réalisée. Les biomarqueurs retenus doivent être présents dans au moins 3 patientes. Le **Tableau 15** donne la

liste des biomarqueurs avec leur pourcentage de présence et leur localisation. Le liquide d'ascite apparaissant avec l'extension de la tumeur, la présence du biomarqueur à la fois dans le tissu cancéreux et dans l'ascite permettrait d'obtenir à priori des marqueurs plus spécifiques du cancer de l'ovaire.

Biomarqueurs	% détection dans les cas de cancer	Localisation	m/z mesuré
1	60%	ovaire + ascite	1389
2	60%	ovaire + ascite	2307
3	40%	ovaire	7913
4	60%	ovaire + ascite	8353
5	40%	ascite	9144
6	40%	ovaire	9217
7	30%	ovaire + ascite	8254
8	80%	ovaire	9744

Tableau 15: biomarqueurs potentiels détectés à partir de l'analyse directe de tissus et d'extraits du liquide d'ascite, pourcentage de détection sur le nombre de patients et localisation.

Sur les biopsies suffisantes en taille des images peuvent être acquises. La **Figure 78** l'image des différents ions respectivement à m/z 1389, 2307 et 9569 ainsi que les images superposées des ions à m/z 1389 et 2307. Ces deux ions font partis des marqueurs potentiels sélectionnés par analyse directe des tissus. Ces deux ions sont retrouvés dans les tissus et le liquide d'ascite avec une incidence de 60%. Ils sont répartis de manière ubiquitaire dans le tissu cancéreux avec un marquage très net pour l'ion à m/z 2037 et très léger pour l'ion à m/z 2307. La superposition des deux images fait apparaître les zones où les deux ions sont colocalisés. Par superposition il est possible de déterminer une zone où l'ion à m/z 1389 est plus prépondérant par rapport au deuxième marqueur qui se retrouve dans le tissu. L'ion à m/z 9569 ne correspond pas à un marqueur, et ce peptide présente une distribution non homogène dans le tissu. De manière générale, les différents marqueurs se retrouvent de manière non spécifique dans l'ensemble du tissu ce qui logique pour des cancers de type III et/ou IV.

Nous avons entamé quelques études sur le sang des patientes. Dans le cas d'échantillons sanguins, les profils sont plus complexes et peuvent être, en partie, masqués par des protéines ou peptides naturellement abondants. De plus, le sang reflétant l'état pathologique général du patient des conclusions sont plus difficiles à tirer de ces échantillons. Enfin, comme nous n'avons pas la certitude que les marqueurs présents dans la zone tumorale soient retrouvés dans le sang, où tout au moins tels quels (métabolisation des protéines), nous avons choisi de caractériser les marqueurs potentiels avant de rechercher leurs présences directement dans le

sang. La caractérisation de ces marqueurs a été réalisée suivant une stratégie d'analyse plus classique.

III. CARACTERISATION DES PEPTIDES POTENTIELLEMENT MARQUEURS

A partir des tissus cancéreux une extraction acide des peptides est pratiquée (HCl, 1N). Les extraits sont alors pré-purifiés sur cartouche de silice greffée en phase inverse C18 avant d'être séparés par chromatographie liquide HPLC sur une colonne greffée en phase inverse C18 (diamètre de la colonne 4,6 mm). La séparation est réalisée avec un gradient 0.1% TFA/H₂O : 0.1% TFA/ACN avec une pente de 1% par min entre 0 et 70%. Les fractions sont collectées toutes les minutes, soit une fraction par pourcent de gradient. Les fractions sont ensuite évaporées sous vide et reprises dans l'eau avant d'être analysées sur MALDI afin de vérifier dans quelles fractions sont présents les différents biomarqueurs. Nous avons en premier cherché à caractériser le marqueur N°8 qui est le marqueur présent dans 80% des patientes cancéreuses même s'il serait à priori moins spécifique puisque uniquement trouvé dans la tumeur elle-même et pas dans le liquide d'ascite. Le marqueur N°8 de masse moyenne m/z 9763,93 est retrouvé dans la fraction N°46 d'après les analyses MALDI. La Figure 79 présente de spectre de la fraction 46. Le spectre révèle que la fraction N°46 présente bien un composé très majoritaire, pour lequel deux ions distincts sont observés correspondant respectivement à l'ion monochargé (m/z 9763,93) et dichargé (m/z 4886,76) et dont la masse moyenne correspondrait à la forme oxydée du marqueur recherché. La fraction est alors soumise à une digestion enzymatique à la trypsine conduisant à l'hydrolyse du peptide après les acides aminés basiques. La solution digérée est analysée sur un instrument MALDI-TOF pour une première identification puis sur un instrument nano-ESI-QTOF pour une vérification de l'identification sur la base de la mesure des m/z des fragments peptidiques de digestion par comparaison aux masses théoriques en banque de données ("Peptide Mass Fingerprint") puis sur la base de la mesure des m/z des ions fragments générés à partir de la sélection de certains fragments peptidiques de digestion. La Figure 80 présente le spectre MALDI enregistré en mode linéaire positif après digestion tryptique du composé. Hormis les ions fragments correspondant à des fragments d'autolyse de la trypsine ainsi que des pics liés à des contaminants, les ions correspondant à des fragments de digestion tryptique observés sont nombreux respectivement à m/z 700,68, 787,7, 841,63, 890,57, 970,47, 1032,17, 1349,16, 1500,98, 1528,99 1790,18, 1833,07, 2104,58, 2210,47 et 2280,02. L'examen des spectres dans une gamme de masse plus étendue permet d'observer deux ions à m/z 9741,61 et 4873,97 correspondant aux ions monochargés et dichargés du peptide initial n'ayant pas subi de digestion. Il faut également remarquer la présence d'un ion à m/z 5556,49

qui pourrait correspondre soit à un second composé, soit à un fragment de digestion partiel du peptide étudié. Envoyé en banque de données avec le moteur de recherche Masscot (<http://www.matrixscience.com>) en supposant un seul clivage de digestion manqué, conduit à identifier en prenant le meilleur score (63% de couverture) la chaîne N de la protéine Reg-Alpha (protéine activatrice du protéasome). La protéine aurait une masse totale de 16285 u. pour 140 acides aminés et la séquence suivante :

```

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

```

Les sites basiques étant indiqués en bleu et les fragments de digestions observés après analyse MALDI en rouge. Le fait que les fragments retrouvés couvrent une même partie de la protéine et que la masse du peptide avant digestion mesurée était plus faible tend à prouver que la protéine est clivée dans les tissus analysés. Sur la base de cette attribution, les pics correspondant dans les spectres à des fragments de digestion attendus pour cette protéine sont les ions à m/z 536,89, 700,68, 890,57, 970,47, 1158,55 et 1500,98.

L'extrait de digestion est ensuite de nouveau analysé par spectrométrie de masse avec source nano-ESI et analyseur hybride Q-TOF (QStar). La Figure 81 présente le spectre nano-ESI obtenu sur ces mêmes échantillons. Les m/z des ions principaux sont relevés et l'interrogation en banques de données, conduit à l'identification de la même protéine chaîne N de la protéine Reg-Alpha.

```

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

```

Sur la séquence sont annotés les fragments de digestion retrouvés dans les spectres nano-ESI.

Sur la base de la séquence théorique et à partir de la localisation des fragments de digestion et par connaissance de la masse du peptide intact avant digestion, il est possible de déterminer que le peptide détecté à partir des tissus cancéreux correspondrait au fragment indiqué ci-dessous de la protéine Reg-Alpha.

```

1   RIEDGNNFGA VQEKVFEFELMT SLHTKLEGFH TQISKYFSEK GDAVTKAAKQ
51  PHVGDYRQLV HELDEAEYRD IRLMVMEIRN AYAV

```

Les données MALDI et ESI croisées permettent de couvrir 59 acides aminés sur la totalité des 84 acides aminés de ce fragment de la protéine, soit une couverture de séquence de 70%.

A partir des spectres nano-ESI afin de vérifier la validité de l'identification de ce biomarqueur, certains fragments de digestion sont étudiés en mode MS/MS (CID). La **Figure 82** présente, à titre d'exemple, le spectre MS/MS obtenu pour l'un de ces fragments de digestion, à savoir l'ion à m/z 501,26 qui correspond à un ion MH_3^{3+} du fragment théorique QLVHELDEAEYR. L'envoi de la liste des m/z respectifs des différents ions fragments avec leur intensité respective conduit à l'identification avec le plus fort score (37%) de la même protéine chaîne N de Reg-Alpha. Les spectres MS/MS en mode CID réalisés sur d'autres fragments de digestion (e.g. m/z 710 et m/z 706) conduisent également à l'identification de cette même protéine avec le meilleur score. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la peptide biomarqueur des tissus tumoraux serait bien un fragment de la chaîne N de la protéine Reg-Alpha impliqué dans le protéasome. La séquence complète de la protéine Reg-Alpha I telle qu'obtenue à partir des banques de données (NCBI) est la suivante :

```
1   mamlrvqpea qakvdvfred lctktenllg syfpkkisel daflkepaln eanlsnlkap
61  ldipvpdpvk ekekeerkkq qekedkdek kgededkgrp cgpvncneki vllqrlkpe
121 ikdvieqlnl vttwlqlqip riedgnnfgv avqekvfelm tslhtklegf htqiskyfse
181 rgdavtkaak qphvgdyrql vheldeaeyr dirilmvmeir nayavlydii lknfeklkkp
241 rgetkgmiy
```

Ces résultats laissent envisager la présence de cette protéine ou de l'un de ces fragments dans les tissus cancéreux pour des patientes stades III et IV. Afin de valider ce résultat, des études morphologiques avec un anticorps mais également transcriptomiques par PCR temps-réel restent à réaliser. D'ores et déjà, il a récemment été montré¹³¹ que l'expression du gène codant la protéine Reg-Alpha I est retrouvée dans le cas de cancers épithéliaux, et en particulier pour les cancers de l'estomac¹³², du colon, de la vésicule biliaire¹³³, du pancréas¹³⁴. A l'heure actuelle, l'ensemble des études a été effectué au niveau transcriptomique et aucune donnée protéomique n'était disponible. Les études menées suggèrent l'hypothèse que Reg-Alpha I ne serait pas un initiateur de la tumorigénèse mais un promoteur de la prolifération cellulaire comme facteur de croissance. La majorité des cancers de l'ovaire (80%) étant des cancers épithéliaux, l'existence de Reg-Alpha dans notre cas constituerait une suite logique à ces études. Il serait maintenant intéressant de poursuivre ces études sur des patientes à un stade plus précoce de cancer (stade I

¹³¹ Sekikawa A., Fukui H., Fujii S., Nanakin A., Kanda N., Uenoyama Y., Sawabu T., Hisatsune H., Kusaka T., Ueno S., Nakase H., Seno H., Fujimori T., Chiba T. ; *Gut* **2005** 54, 1437-1344

¹³² Fukui H., Fujii S., Takeda J., Kayahara T., Sekikawa A., Nanakin A., Suzuki K., Hisatsune H., Seno H., Sawada M., Fujimori T., Chiba T. ; *Digestion* **2004** 69(3), 177-184

¹³³ Harada K., Zen Y., Kanemori Y., Chen T.C., Chen M.F., Yeh T.S., Jan Y.Y., Masuda S., Nimura Y., Takasawa S., Okamoto H., Nakanuma Y. ; *Hepatology* **2001** 33(5), 1036-1042

¹³⁴ Kimura N., Yonekura H., Okamoto H., Nagura H. ; *Cancer* **1992** 70(7), 1857-1863

ou II) afin de déterminer si ce facteur pourrait être un marqueur précoce du cancer. Par la suite, ce marqueur sera recherché dans le sang des patientes.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A l'heure actuelle la recherche de biomarqueurs de pathologie comme le cancer est un enjeu de santé publique important. La grande majorité des recherches menées par les différents groupes est focalisée sur la recherche des marqueurs à partir du sang dans l'optique d'un diagnostic facile. Cependant, le sang reflète l'état physiologique général du patient d'où la complexité de retrouver des marqueurs spécifiques d'une pathologie dans ce fluide biologique, difficulté renforcée par la présence de protéines majoritaires (sérum albumine, hémoglobine, anticorps,...) masquant les autres protéines à l'analyse. Dans cette étude, nous avons opté pour une stratégie inverse, où les marqueurs sont tout d'abord recherchés et caractérisés dans les tissus, pour être ensuite identifiés dans les fluides biologiques. Ce qui traduirait une régulation soit de l'expression du gène correspondant à ce marqueur, soit à la sécrétion du marqueur au sein du tissu puis son exportation dans les fluides sous une forme intacte ou métabolisée.

Les études réalisées à partir de biopsies issues de patientes au stade III et IV du cancer de l'ovaire permettent de mettre en évidence 8 marqueurs potentiels sécrétés à ces stades. Les études montrent que l'association des 2 ou 3 des ces marqueurs donnerait un diagnostic à 100% du cancer de l'ovaire. Le marqueur prévalent en terme de présence sur l'ensemble des patientes a pu être identifié comme étant un fragment de la protéine Reg-Alpha I activateur du protéasome, dont le gène a été impliqué dans les cancers épithéliaux gastro-intestinaux et potentiellement lié à la réponse inflammatoire. Des études sont en cours pour valider ce marqueur. D'autres études sont également menées pour caractériser les 7 autres marqueurs, 4 d'entre eux étant retrouvés à la fois dans la tumeur et le liquide d'ascite.

L'ensemble de ces résultats démontre l'intérêt de l'application de l'analyse directe de tissus par spectrométrie de masse MALDI. Dans le cas du cancer de l'ovaire, cette technologie permet de mettre en évidence des marqueurs de la pathologie, sans nécessité de passer par des étapes d'extraction et purification pouvant générer des artefacts. Les premières images réalisées à partir des biopsies cancéreuses montrent une répartition différente des marqueurs dans la tumeur reflétant la spécificité de la technique. La cartographie de la répartition des marqueurs en fonction des stades pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux impliqués et de pouvoir réaliser un diagnostic plus précoce et plus spécifique puisque moléculaire. A l'heure actuelle, le cancer de l'ovaire présente un grand manque au niveau du

diagnostic. Les marqueurs connus comme le CA 125 sont peu spécifiques ou d'augmentation tardive (stade III et IV par exemple). D'un autre côté, les analyses anatomopathologiques sur biopsies n'apportent pas toujours des réponses à un stade peu avancé où dans le cas de cancer frontière puisque basées sur études histologiques. Dans ce cadre, l'analyse directe et l'imagerie MALDI offrent une alternative intéressante puisque apportant des informations moléculaires sur une quantité de matériel biologique faible.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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

Néanmoins, de nombreux développements restent à réaliser pour permettre à cette technologie d'acquérir ses lettres de noblesse et devenir un outil incontournable, entre autre dans le domaine médical pour améliorer le diagnostique. C'est à ces nouveaux développements que s'intéresse le groupe. Les développements réalisés concernent plusieurs aspects différents de la technologie.

Ont en particulier été étudiés les aspects concernant la préparation des échantillons, primordiaux pour des instruments avec source de production d'ions type MALDI, avec, entre autre, la recherche de nouvelles matrices plus adaptées à l'analyse des tissus et à l'acquisition d'images. Ce qui a conduit à démontrer que les matrices ioniques solides s'avéraient mieux adaptées dans ce contexte d'études. Certaines matrices ioniques présentent d'excellentes performances en terme de cristallisation sur les tissus et de qualité spectrale obtenue sans négliger des qualités en terme de reproductibilité, de stabilité sous vide et de faible ablation de matériel sous irradiation laser à grande fréquence de répétition des tirs, par rapport aux matrices classiques et en particulier pour l'analyse des peptides. De nouvelles matrices ioniques plus adaptées à l'analyse des protéines étant en cours de tests. De plus, les études montrent que certains traitements préalables des échantillons, et notamment avec des solvants tels que le chloroforme, l'hexane, le toluène ou l'acétone, permettent d'améliorer les capacités d'analyse en nombre de composés détectés et d'intensité du signal. L'utilisation de traitements particuliers permet d'obtenir des résultats à partir de tissus fixés (fixation paraformaldéhyde) puis inclus dans la paraffine et notamment par utilisation d'une matrice MALDI réactive (2,4-dinitrophénylhydrazine). La possibilité de travailler sur de tels échantillons ouvre des perspectives d'applications importantes à l'imagerie MALDI puisqu'elle permet d'accéder aux échantillons de patients conservés dans les tumorothèques en milieu hospitaliers sur plusieurs années. Les difficultés rencontrées sur ces échantillons, difficultés liées à la fixation, peuvent être résolues en effectuant des digestions chimiques ou enzymatiques directement sur les coupes de tissus. Les fragments peptidiques alors obtenus permettant une caractérisation *in situ* en donnant accès aux peptides non engagés dans des ponts méthylènes après fixation. La caractérisation *in situ* peut être grandement facilitée en pratiquant des dérivations chimiques *in situ* sur les tissus augmentant les rendements de fragmentation et permettant l'obtention de données aisément interprétables. L'ensemble de ces traitements de coupes permet d'envisager

des études sérieuses à partir de ces tissus fixés et paraffinés avec caractérisation à la clef sachant que ces traitements sont en test par procédé de miro dépôts afin d'éviter toute délocalisation des biomolécules pendant certaines des étapes du traitement.

Les autres études menées sur des aspects plus fondamentaux de la technologie permettent de montrer que la qualité des analyses et des images peut être grandement améliorée en recouvrant le film polycristallin de la matrice par un dépôt d'or, qui permet à la fois de supprimer les effets de charges observés et liés à la nature isolante du matériau étudié, et conduit également à une augmentation de l'intensité des ions et de la reproductibilité intra expériences. Sur un autre aspect, un nouveau procédé a été testé afin d'améliorer la qualité des images par réduction de la zone analysée par point d'acquisition étudié. L'application de masques sur les coupes de tissus permet d'atteindre des dimensions de zone analysée faible sans conduire à une perte notable dans les rendements de production des ions et en travaillant avec une zone d'analyse précisément définie et ce, sans nécessité d'utilisation de procédés longs.

Enfin, dans l'optique de réaliser des études plus fondamentales en biologie ou pour la recherche d'un diagnostic plus précoce de pathologies, le développement de l'imagerie des ARNm a été étudié. La taille des ARNm présents dans les cellules et la faible quantité à laquelle ils sont exprimés ne permettent pas d'envisager la réalisation d'images directes de ces composés. Ainsi, est proposé ici un nouveau concept d'analyse indirect des ARNm reposant sur l'analyse après Hybridation *In Situ* indirect de peptides liés aux sondes par une liaison photoclivable à la longueur d'onde d'irradiation du faisceau laser, conduisant à la libération du peptide après le tir laser. Les expériences réalisées valident la faisabilité de ce concept et permettent, de plus, d'envisager l'utilisation de bases modifiées par le marqueur permettant alors la synthèse des sondes par transcription *in vitro*. La cartographie des ARNm au sein de coupes de tissus et la réalisation d'images de co-localisation avec les protéines conduiront l'imagerie à devenir un outil puissant par la connaissance de la présence du transcrit et de sa protéine correspondante. Ceci ouvre la technologie à de nombreuses applications biologiques et en particulier dans le cadre d'études de pathologies en vu d'un diagnostic précoce tel que le cancer de l'utérus lié à l'expression d'oncogène chez des papillovirus¹³⁵. De telles études pourront être réalisées en particulier sur des frottis.

L'application de l'imagerie au cancer de l'ovaire démontre l'intérêt de l'analyse directe de tissus et par extension de l'imagerie pour la recherche rapide et spécifique de biomarqueurs directement à partir de tissus tumoraux, les images permettant de suivre la localisation des

¹³⁵Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Munoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, Castellsague X, Meijer CJ, Van den Brule AJ, Franceschi S, Ashley R ;*J. Natl. Cance.r Inst.* **2002** 94, 1604-1613.

molécules dans les tissus au cours des différents stades du cancer, et apportant une dimension moléculaire à des études classiquement de type histologique.

En perspective de ce travail, les différents axes de recherches abordés seront poursuivis afin d'optimiser les conditions d'analyses. La possibilité d'utiliser des marqueurs photoclivables pour une détection indirecte des composés ouvre également un large champ d'investigation pour amener l'imagerie MALDI vers une imagerie spécifique de certains composés. Dans les grandes perspectives de ces recherches est particulièrement visée l'imagerie spécifique de certaines classes de composés. Sont en particulier envisagés, l'étude spécifique d'antigènes au travers de l'utilisation d'anticorps marqués (voir schéma), et plus particulièrement par marquage avec un marqueur photoclivable d'un anticorps secondaire. Les perspectives de recherche incluent également l'étude spécifique des sucres par des lectines marquées ou de protéines ou médicaments par des aptamères adaptés. L'imagerie des antigènes au travers d'anticorps marqués par spectrométrie de masse MALDI oriente cette technologie vers un tournant pour la protéomique clinique et le diagnostic à haut débit. L'utilisation de tels composés peut être également envisagée en milieu liquide pour aboutir des tests diagnostique type ELISA avec détection par spectrométrie de masse.

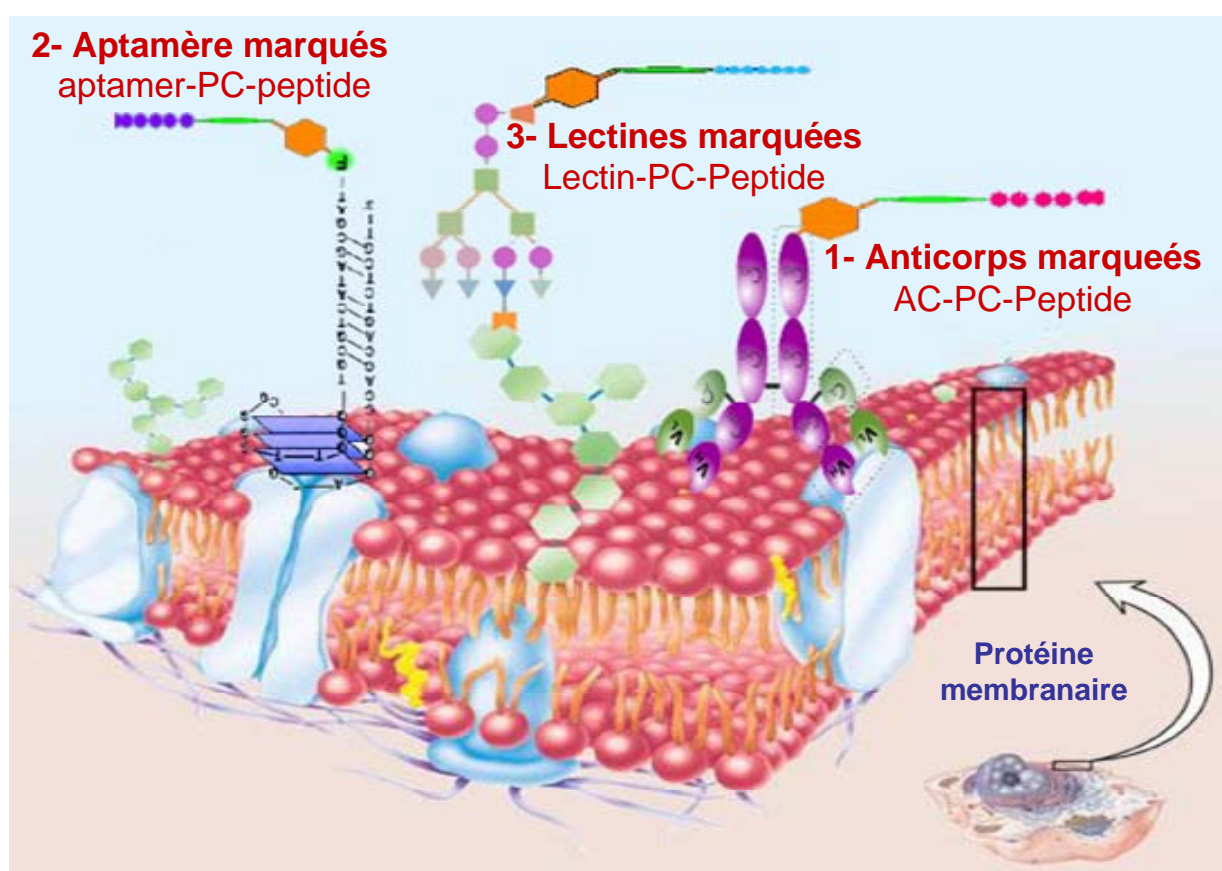


Figure 83 : Représentation de l'utilisation du concept "TAG-MASS" pour réaliser de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI spécifique

Finally, the improvements realized in the framework of MALDI imaging as a tool performing in the framework of studies realized in the laboratory to research the effectors of nerve regeneration in leech by comparing the identification of biomarkers in the presence of neurodegenerative pathologies. In this context, we focus on two pathologies *e.g.* Parkinson and Alzheimer. These comparative studies should allow to find research tracks to understand why and how the leech regenerates so fast its nervous system after a lesion. MALDI imaging constitutes therefore a performing tool for the comparative study of nerve degeneration processes linked to age, to those linked to regeneration in leech in view of therapeutic applications.

From a more technological point of view the perspectives of MALDI imaging can also be situated in the use of other MALDI sources such as MALDI with Infrared laser (IR-MALDI). The works realized in the domain of IR-MALDI show the interest of this type of sources for the analysis of certain compounds. IR presents the net advantage of implying a vibrational excitation of molecules which allows the use of matrices more compatible with biological conditions. In particular, the use of IR of glycerol as matrix could have interesting applications by the weak delocalization of compounds which would a priori lead to the use of such a matrix. It is not excluded to envisage to use ice crystals as matrix by vaporizing for example a drop of water before submitting it to a freezing allowing to avoid delocalization and to stay close to physiological conditions. From the point of view of analyzers, studies on instrument of type FT-ICR would be particularly interesting for the high resolution and the capacities of these analyzers in the domain of structural studies. At this title, the possibility to realize images by MALDI-FT-ICR would constitute a perspective of research very promising for MALDI imaging.

The actual developments of MALDI imaging and the ensemble of perspectives envisageable for this technology will surely one day know developments analogous to those, a few years ago, of its big sister NMR and will certainly become like this one to become an indispensable imaging technique for molecular diagnosis in hospital environment and alongside MRI we will find in the future ISMM (Imaging by Mass Spectrometry MALDI) ?

