



**HAL**  
open science

# Développement d'une nouvelle approche combinant la radioimagerie et l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse de nanoparticules

Hélène Cazier

► **To cite this version:**

Hélène Cazier. Développement d'une nouvelle approche combinant la radioimagerie et l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse de nanoparticules. Chimie analytique. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS399 . tel-03929773

**HAL Id: tel-03929773**

**<https://theses.hal.science/tel-03929773>**

Submitted on 9 Jan 2023

**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.



# DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES

Thèse de doctorat préparée à l'Université Paris Sud et au sein du  
Commissariat aux énergies atomiques et aux énergies alternatives

École doctorale n°571 sciences chimiques : molécules, matériaux,  
instrumentation et biosystèmes (2MIB)  
Spécialité de doctorat : Chimie

Thèse présentée et soutenue à Saclay, le 8 novembre 2019 par

**Hélène Cazier**

## Composition du Jury :

CARLOS AFONSO Professeur, Université de Rouen, Département de chimie	Président du jury Examineur
ISABELLE FOURNIER Professeur, Université de Lille, PRISM Inserm U1192	Rapporteur
ALAIN BRUNELLE Directeur de recherche, Université Sorbonne, LAMS UMR 8220	Rapporteur
FREDERIC TARAN Chef du SCBM, CEA, Université Paris - Saclay	Examineur
CHRISTOPHE JUNOT Chef du SPI, CEA, INRA, Université Paris - Saclay	Directeur de thèse
BENOIT COLSCH Ingénieur - Chercheur, SPI/LEMM, CEA, INRA, Université Paris Saclay	Encadrant de thèse



## REMERCIEMENTS

---

Je remercie premièrement les membres rapporteurs, Isabelle Fournier et Alain Brunelle, ainsi que les membres examinateurs du jury, Frédéric Taran et Carlos Afonso, de bien vouloir évaluer mes travaux réalisés au CEA de Saclay dans le Laboratoire d'Etudes du Métabolisme du Médicament (LEMM) du Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI). Je souhaite également remercier David Touboul pour ses conseils lors des différents comités de suivi de thèse.

Je tiens ensuite à remercier Christophe Junot, directeur de cette thèse et chef du SPI pour m'avoir permis de réaliser mes travaux au sein du LEMM. Merci pour ta positivité, toujours le mot pour rire ! Je remercie également Benoit Colsch, co-encadrant de ma thèse et François Fenaille, responsable du LEMM pour m'avoir aiguillé tout au long de ces 3 années. Merci de m'avoir fait confiance pour la mise en place et le développement des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse au sein de ce laboratoire. Plus particulièrement, Benoit, merci de m'avoir permis d'évoluer dans le domaine de la MSI et d'avoir fait en sorte que je prenne confiance en moi pour la gestion de ces projets de thèse. Merci pour m'avoir fait grandir sur le plan personnel, professionnel et scientifique. François, je te remercie pour ta grande rigueur et tes nombreux conseils tant expérimentaux que rédactionnels qui m'auront été et qui me seront d'une grande aide. Je te suis aussi très reconnaissante pour ta disponibilité et tes réponses à mes questions à toutes heures « du soir » !

Je remercie également toute les équipes avec qui j'ai collaboré et qui ont fait de ce sujet de recherche une thèse passionnante pour moi. Au SCBM, je remercie Frédéric Taran, Antoine Sallustrau et Dominique Georgin de m'avoir accompagné dans l'étude des nanoparticules de graphène. Je te remercie Frédéric pour ta gentillesse et ton intérêt pour la spectrométrie de masse. Antoine, je te remercie tout particulièrement pour l'aide et le soutien que m'a apporté en cette fin de thèse pleine de rebondissements. Je remercie également Eric Doris, Edmond Gravel et Lucie Jamgotchian pour leur collaboration sur le projet micelle. Au SIMOPRO, je remercie Vincent Dive, Carole Malgorn, Robert Thaï, Fabrice beau, Marion Deladilhe, Mylène Bernes et Jeanne Gourlay pour leur forte participation au projet d'imagerie duale. Merci Vincent pour le partage de votre savoir sur la biodistribution de ces nanoparticules et merci Fabrice pour le partage de tes connaissances sur la radioactivité et le  $\beta$ -imager. Merci à toi Robert pour ta participation en MALDI - MS et MSI, un grand merci à toi Carole, pour ta disponibilité et ta réactivité ; j'ai particulièrement apprécié collaborer avec toi. Marion, merci pour les clés ;)

Je remercie également tous ceux qui ont participé à ma formation scientifique et plus particulièrement, Capucine Lepers, Paul Genevray, Sébastien Anthérieu, Anne Garat, Malcolm Ward, Claire

## REMERCIEMENTS

Russel, Valarnila Franklin, Grégory Hamm, Guillaume Hochart et Jonathan Stauber pour m'avoir permis d'intégrer vos laboratoires et de m'avoir formé pour la recherche.

Je remercie également tout le SPI pour son accueil, rez-de-chaussée, premier et second étage, j'ai adoré mes trois années de thèse passées avec vous ! Je souhaite remercier tous mes compatriotes MALDI : Sophie Cholet, Jihana Achour, Sandrine Livet, Hervé Bernard et Cécile Tарisse-Féraudet, pas facile parmi toute cette équipe faisant de la chromatologie. Je souhaite également remercier Jean Claude Tabet pour ses cours, ses conseils et sa grande gentillesse. Je remercie aussi, Insaf Ben Terdayet et Maxime Riberaud pour avoir eu la curiosité de faire du MALDI et de la MSI pendant votre stage M2.

Je voudrais ensuite remercier tous les anciens : Lydie Olivera, Noémie Butin, Samuel Terrier, Mikail Berdi, Pierre Barbier Saint Hilaire, Coralie Ruel, Marie Zemire, Aurélie Delvaux, Yu Min Kiw, Jessica Michieletto et Amir Louaar pour avoir contribué à la bonne humeur qui règne au LEMM. Je remercie également Donatien Lefebvre, Thais Hautbergue, Yasmina Adimy, Kathleen Rousseau, Stéphanie Oursel, Fanny Leroux et Jennifer Hamoniaux pour tous nos bons moments, passés et futurs, et nos grandes discussions en salle de pause pour le petit déjeuner du mardi et le goûter de 16H. Parler de primes CEA, enfants, soirées, mariages, vacances, enfants, primes CEA, pompes qui lâchent, quantification, mariages, enfants, primes CEA et encore enfants a été un réel plaisir au quotidien.

Je remercie bien sûr mes colocataires de bureau : Alexandre Seyer, Sylvain Deschaumet, Céline Chollet, Sandrine Aros et Simon Broudin, merci de m'avoir supporté et surtout soutenu. Promis Alex j'arrête de râler si t'arrêtes de fumer :p. Sylvain, non je ne te regarde pas je réfléchis, t'es juste à la mauvaise place :p Céline, merci pour ton soutien et les supers services (pro et perso) que tu me rends, je t'en dois une !!! Enfin, MERCI à Sandrine et Simon pour nos loooooongues conversations et votre soutien en ces soirées de thèse difficiles, je vous en suis très reconnaissante.

Je souhaite de tout cœur remercier « **La Team** » : Arthuche Viodé, Loic Morvant et Christhellene euh Christelle Dubois avec qui tout a commencé. Merci les amis pour ces folles aventures ! Ski, carnaval de Dunkerque, Road Trip et weekend à Bruxelles, à quand la suite ?!

A cette team, j'ajoute maintenant Anne-Sophie Mierzala et Daniel Leonço. Anne so' 6.2 et 5.9 peuvent finalement très bien s'entendre ;) Je ne sais pas comment je vais faire maintenant si je ne peux plus descendre dans la bat'Cave :p Un ENORME merci à vous !!!

Je remercie naturellement toute ma famille. Merci à mes parents et à ma sœur sans qui je ne serais certainement jamais arrivée jusqu'ici. Merci pour votre soutien indéfectible, votre grande patience et pour tous ces souvenirs géniaux que l'on a ensemble. Merci au plus patient de tous, Vincente qui me supporte, me soutient et qui a compati et partagé au meilleur et au moins bon de ces trois années de thèse avec moi.

## PREAMBULE

---

L'utilisation de nanoparticules métalliques, polymériques, lipidiques ou encore de type graphène constitue une tendance émergente en raison de leurs propriétés physico-chimiques très intéressantes comme leurs propriétés conductrices et thermiques ainsi que leur haute résistance à la dégradation biologique. D'abord employés en laboratoire, ces nanomatériaux sont de plus en plus industrialisés et sont dorénavant impliqués dans la fabrication de composants dans les domaines de l'énergie, de l'électronique, de l'aéronautique ou encore pour des applications biomédicales.

Dans le domaine biomédical, certaines de ces nanoparticules sont très employées dans les études d'exploration biologique et constituent une plateforme idéale pour la vectorisation de molécules médicamenteuses qui leur sont associées par fixation covalente ou par physisorption. Leur taille nanoscopique et leur compatibilité biologique en font des candidats potentiels pour les systèmes de vectorisation de biomolécules ou dans la bioingénierie. Toutefois, la pharmacocinétique et la pharmacodynamique de systèmes nanoparticulaires sont encore peu connues [1]. Ces approches souvent appelées ADME, étudient l'Absorption, la Distribution, le Métabolisme et l'Excrétion de molécules et permettent notamment de déterminer leur concentration dans l'organisme ainsi que la genèse, la durée et l'intensité de leurs effets. Leur utilisation dans de nombreux domaines et leur taille nanoscopique amènent des questions quant à leur capacité à traverser des barrières biologiques. L'optimisation de techniques analytiques afin de mieux appréhender le mode d'action de ces nanoparticules dans les systèmes biologiques est donc actuellement en pleine expansion.

Dans ce contexte, de nombreuses techniques d'imagerie sont actuellement employées. Depuis la première autoradiographie en 1865 par Wilhelm Röntgen [2] ou encore l'utilisation des ultrasons pour la réalisation d'échographie en 1952 par Wild [3], les découvertes en physique ou en chimie nucléaire ont ouverts la voie au développement des techniques d'imagerie. Si certaines techniques comme l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), la radiologie (rayon X), ou les échographies (ultrasons), permettent la réalisation d'images macroscopiques, les techniques comme la microscopie optique ou plus récemment l'imagerie par spectrométrie de masse donnent accès à l'observation des molécules endogènes ou exogènes voire d'organismes cellulaires dans le cas d'études de médicaments ou de nanoparticules.

Actuellement, il est possible de suivre un panel de molécules, naturelles ou de synthèse, avec des techniques comme l'immunofluorescence (grâce à sa grande spécificité de reconnaissance vis-à-vis d'une molécule cible amenée par les anticorps), la radioimagerie (pour sa capacité de quantification absolue) ou la spectrométrie de masse (pour ces aptitudes particulières de caractérisation structurale). Cependant, l'utilisation de l'immunofluorescence est restreinte à l'étude des macromolécules contre lesquelles il est possible de produire des anticorps. Quant à la radioimagerie, elle implique l'emploi de molécules radiomarquées ce qui en restreint le champ d'application. L'imagerie par spectrométrie de masse (MSI) permet, quant à elle, d'analyser des molécules d'origines endogènes, exogènes, naturelles ou synthétiques avec une certaine spécificité d'analyse en raison de sa capacité à obtenir des informations structurales fines. Néanmoins, il est nécessaire que les molécules soient ionisables *in situ* et que leur détection soit suffisamment sensible. De manière plus récente, les développements effectués en MSI donnent accès aux études quantitatives, relatives ou absolues, pour l'étude de molécules biologiques, comme les xénobiotiques ou les nanoparticules.

L'un des enjeux principaux de ce travail de thèse a donc été de positionner la MSI dans ce contexte d'évolution de l'imagerie moléculaire par rapport à une des techniques de référence comme la radioimagerie et ceci dans le cadre de l'étude de nanoparticules. La spectrométrie de masse est employée depuis 1997 suite aux travaux de R. Caprioli *et al.* [4] comme technique d'imagerie pour la visualisation de différentes espèces moléculaires endogènes ou médicamenteuses détectées à la surface d'une coupe tissulaire. Néanmoins, elle est largement moins utilisée pour l'analyse structurale de molécules de type nanoparticulaire. C'est pourquoi, l'objectif de cette thèse a porté sur l'analyse par imagerie de nouveaux systèmes de vectorisation que sont les nanoparticules de graphène ou les systèmes micellaires polymériques. Dans le contexte d'un nombre limité d'études sur les effets de la taille de ces nanoparticules et de leur effet de charge de surface sur leur biodistribution et leur pharmacocinétique [5], la mise en œuvre d'une technique d'imagerie performante peut en effet contribuer à appréhender leur efficacité de vectorisation et leur devenir au sein d'un organisme vivant.

Afin d'aborder cet objectif, les études détaillées dans ce manuscrit sont divisées en deux parties. La première partie de cette thèse est une analyse bibliographique qui comporte deux chapitres. Le premier

## PREAMBULE

chapitre présentera l'utilisation des systèmes nanoparticulaires dans des domaines tels que la biologie ou la recherche biomédicale. Un intérêt plus particulier sera porté aux systèmes nanoparticulaires à visée thérapeutique tels que les nanoparticules de type graphène et les systèmes micellaires. Ensuite, les différentes méthodes d'imagerie utilisées pour la détection de ces molécules au sein d'organismes biologiques seront abordées

Le second chapitre introduira la technique d'imagerie par spectrométrie de masse et exposera en détails les avantages et inconvénients de cette méthode : de la préparation d'échantillons au traitement des données. Ce chapitre permettra également de positionner la MSI par rapport à la radioimagerie, technique de référence pour des études de biodistribution quantitative.

La seconde partie de cette thèse illustre les travaux de recherche effectués pendant ce travail de thèse et est divisée en deux chapitres. Le premier chapitre exposera la mise au point d'une méthode d'imagerie combinant MSI et imagerie  $\beta$  pour l'étude de la biodistribution et la quantification de nanoparticules de type graphène. Le second chapitre exposera la mise au point d'une méthode d'analyse en spectrométrie de masse et de protocoles de traitement tissulaire pour la détection de vecteurs micellaires polymériques encapsulant un principe actif.





## TABLE DES MATIERES

---

REMERCIEMENTS .....	- 3 -
PREAMBULE.....	- 5 -
TABLE DES MATIERES.....	- 9 -
LISTE DES FIGURES .....	- 15 -
LISTE DES TABLEAUX .....	- 21 -
LISTE DES ABREVIATIONS .....	- 23 -
PRODUCTION SCIENTIFIQUE.....	- 25 -
<b>PARTIE A : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE.....</b>	<b>- 27 -</b>
<b>CHAPITRE 1 : L'ETUDE DES NANOPARTICULES .....</b>	<b>- 29 -</b>
<b>A. Les Nanoparticules : Généralités .....</b>	<b>- 31 -</b>
I. LES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE .....	- 35 -
II. CLASSIFICATION ET PROPRIETES DES MATERIAUX DE TYPE GRAPHENE .....	- 35 -
III.    UTILISATIONS ET TOXICITE DES NANOPARTICULES DE GRAPHENE .....	- 37 -
1. Les utilisations des espèces dérivées du graphène .....	- 38 -
<i>a. Utilisation du graphène en chimie analytique.....</i>	<i>- 38 -</i>
<i>b. Utilisation du graphène en recherche biomédicale.....</i>	<i>- 41 -</i>
2. Les effets biologiques observés.....	- 42 -
<b>B. Les autres nanovecteurs .....</b>	<b>- 48 -</b>
I. GENERALITES .....	- 48 -
II. LES LIPOSOMES .....	- 49 -
III.    LES MICELLES DE POLYMERES .....	- 51 -

<b>C. Les techniques d'analyse des nanoparticules .....</b>	<b>- 53 -</b>
<b>CHAPITRE 2 : L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....</b>	<b>- 55 -</b>
<b>A.Principe général de la spectrométrie de masse .....</b>	<b>- 57 -</b>
<b>B.L'imagerie par spectrométrie de masse.....</b>	<b>- 58 -</b>
I. PRINCIPES GENERAUX DE L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....	- 58 -
II. INSTRUMENTATIONS POUR L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE.....	- 60 -
1. Les principales sources d'ionisation .....	- 60 -
2. Les analyseurs pour la MSI .....	- 61 -
3. La caractérisation structurale en MSI.....	- 62 -
III. TECHNIQUES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES ANALYSES MSI .....	- 63 -
1. Du sacrifice de l'animal à la conservation des organes.....	- 65 -
2. La découpe des tissus biologiques .....	- 68 -
3. Les traitements appliqués aux tissus.....	- 71 -
a. <i>Le lavage des tissus</i> .....	- 72 -
b. <i>Les traitements enzymatiques sur tissus</i> .....	- 75 -
c. <i>La dérivation des molécules sur tissus</i> .....	- 76 -
4. Les dépôts de matrice MALDI.....	- 80 -
a. <i>Les matrices MALDI</i> .....	- 80 -
b. <i>Les différents types de dépôts de la matrice MALDI</i> .....	- 81 -
<b>C.Le traitement des données en imagerie par spectrométrie de masse.....</b>	<b>- 84 -</b>
<b>D.La quantification en imagerie par spectrométrie de masse.....</b>	<b>- 87 -</b>
I. INTRODUCTION A LA QUANTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....	- 87 -
II. LA QMSI (MSI QUANTITATIVE).....	- 88 -
1. La normalisation des données spectrales .....	- 88 -
2. Le coefficient d'extinction tissulaire.....	- 90 -
3. Les gammes de calibration en qMSI.....	- 92 -

a. Les gammes par dépôts sur coupes tissulaires.....	- 93 -
b. Les gammes en homogénats de tissus .....	- 98 -
4. Fidélité des études qMSI .....	- 100 -
<b>E. La MSI combinée aux autres techniques d'imagerie. ....</b>	<b>- 102 -</b>
I. LE COUPLAGE DES DIFFERENTES SOURCES MSI .....	- 102 -
II. LA MSI COUPLEE A D'AUTRES TECHNIQUES D'IMAGERIE .....	- 103 -
<b>F. L'imagerie des nanoparticules.....</b>	<b>- 109 -</b>
<b>LES OBJECTIFS DE LA THESE .....</b>	<b>- 115 -</b>
<b>PARTIE B : ETUDES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>- 119 -</b>
<b>CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE D'IMAGERIE COMBINEE POUR L'ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DE L'OXYDE DE GRAPHENE CHEZ LA SOURIS</b>	<b>- 121 -</b>
<b>A.Introduction .....</b>	<b>- 123 -</b>
<b>B.Matériels et méthodes.....</b>	<b>- 126 -</b>
I. LES NANOPARTICULES DE GRAPHENE : MARQUEES OU NON MARQUEES.....	- 126 -
1. Synthèses des nanoparticules .....	- 126 -
2. Caractérisation des nanoparticules .....	- 127 -
II. EXPERIMENTATIONS SUR LE MODELE MURIN.....	- 127 -
1. Protocole d'administration des nanoparticules chez la souris.....	- 128 -
2. Sacrifice et conservation des organes .....	- 128 -
III. PREPARATION DES TISSUS .....	- 129 -
1. Coupes de tissus utilisées pour la mise au point des méthodes MS et MSI.....	- 129 -
2. Préparation des tissus pour l'imagerie duale .....	- 129 -
3. Préparation d'homogénats incorporant du GO.....	- 130 -
IV. COLORATION DES TISSUS .....	- 132 -
V. ANALYSES PAR RADIOIMAGERIE .....	- 132 -

VI.	ANALYSES EN SPECTROMETRIE DE MASSE DES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE .....	- 133 -
1.	Analyses MALDI et LDI.....	- 134 -
a.	<i>Matrices MALDI utilisées.....</i>	- 134 -
b.	<i>Paramétrages du spectromètre de masse .....</i>	- 134 -
2.	Analyses MSI des nanoparticules .....	- 135 -
<b>C. Résultats et discussions .....</b>		<b>- 136 -</b>
I.	CARACTERISATION DES NANOPARTICULES .....	- 136 -
II.	DETECTION DES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE .....	- 139 -
1.	Profilage des nanoparticules de GO et rGO .....	- 139 -
2.	Optimisation des paramètres MS.....	- 146 -
a.	<i>Qualification des performances du MALDI-TOF/TOF.....</i>	- 146 -
b.	<i>Optimisation de la calibration.....</i>	- 146 -
c.	<i>Optimisation du délai d'extraction.....</i>	- 147 -
3.	Spécificité de la signature graphène .....	- 148 -
a.	<i>Spécificité des analyses MS selon le type de nanoparticules : GO et rGO.....</i>	- 148 -
b.	<i>Stabilité des profils MS hors et sur tissus .....</i>	- 149 -
c.	<i>Analyse de nanoparticules de type graphène azotées.....</i>	- 151 -
d.	<i>Analyse de nanoparticules <sup>14</sup>C-GO .....</i>	- 154 -
III.	DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'IMAGERIE MS .....	- 155 -
1.	Optimisation des paramètres instrumentaux .....	- 155 -
a.	<i>Etude des paramètres du laser.....</i>	- 156 -
b.	<i>Application à l'analyse du GO .....</i>	- 157 -
2.	Développements de la méthode LDI - MS pour la détection du GOI.....	- 160 -
IV.	ÉVALUATION DES PERFORMANCES QUANTITATIVES DE LA METHODE LDI - MSI.....	- 162 -
1.	Evaluation de gammes de concentration réalisées en homogénats ou en dépôts.....	- 162 -
2.	Gammes de concentrations en dépôts directs sur coupes tissulaires .....	- 167 -
a.	<i>Modalité de création d'une région d'intérêt.....</i>	- 167 -
b.	<i>Evaluation de la reproductibilité des analyses.....</i>	- 169 -
c.	<i>Evaluation préliminaire des limites de détection et de la linéarité .....</i>	- 171 -

<i>d. Evaluation de la justesse des analyses quantitatives</i> .....	- 173 -
3. Application à la détection du GO et du rGO dans les tissus .....	- 174 -
<i>a. Détection par LDI - MSI du GO et rGO au sein de tissus issus de souris exposées</i> .....	- 174 -
<i>b. Imagerie combinée : MSI et <math>\beta</math>-imagerie</i> .....	- 177 -
V. ESSAIS DE QUANTIFICATION DES NANOPARTICULES DE GO EN MSI .....	- 179 -
1. Réalisation de courbes de calibration pour chaque type de tissu .....	- 180 -
2. Comparaison des quantifications réalisées en imagerie $\beta$ et MS .....	- 182 -
3. Application de l'Imagerie duale à l'étude de la biodistribution du GO .....	- 184 -
<i>a. Les analyses en radioimagerie</i> .....	- 184 -
<i>b. Les analyses en MSI</i> .....	- 186 -
<b>D. Conclusions et perspectives</b> .....	<b>- 190 -</b>
<b>CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE ANALYTIQUE POUR L'ETUDE DE NANO-OBJETS DE TYPE MICELLAIRE</b> .....	<b>- 193 -</b>
<b>A. Introduction</b> .....	<b>- 195 -</b>
<b>B. Matériels et méthodes</b> .....	<b>- 197 -</b>
I. SYNTHESSES DES MICELLES ET DES PRINCIPES ACTIFS .....	- 197 -
1. Les molécules cibles .....	- 197 -
2. Formation des micelles et encapsulation du principe actif .....	- 197 -
II. MODES OPERATOIRES POUR LA DETECTION DES PRINCIPES ACTIFS SUR TISSUS .....	- 198 -
1. Préparation des coupes de tissus .....	- 198 -
2. Extraction lipidique pour les essais de dégradation chimique et enzymatique .....	- 198 -
3. Essais de dégradation chimique sur les extraits lipidiques .....	- 199 -
4. Essais dégradation enzymatique des lipides interférents .....	- 199 -
5. Protocole de dérivation du GW3965 .....	- 201 -
<b>C. Résultats et Discussions</b> .....	<b>- 202 -</b>
1. Analyse du principe actif par MALDI – MS .....	- 202 -
2. Analyse des micelles par MALDI – MS .....	- 206 -

TABLE DES MATIERES

a. Analyses MALDI-TOF des micelles PDAPEG.....	- 206 -
b. Optimisation du profil d'adduits de la micelle .....	- 210 -
c. Spécificité de la signature de la micelle et optimisation des paramètres MS .....	- 212 -
3. Analyses du principe actif encapsulé dans la micelle .....	- 218 -
III.    DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES POUR LA DETECTION DU PRINCIPE ACTIF SUR TISSU .....	- 220 -
1. Détection du principe actif et de la micelle sur coupes de tissus .....	- 220 -
2. Traitements pour l'élimination des ions endogènes interférents.....	- 223 -
a. Lavage au chloroforme des coupes de tissu.....	- 224 -
b. Dégradation chimique en extrait lipidique.....	- 226 -
c. Essais de dégradation enzymatique en extrait lipidique.....	- 228 -
3. Essais de dérivation du principe actif .....	- 231 -
<b>D.Conclusions et perspectives .....</b>	<b>- 233 -</b>
<b>CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS GENERALES.....</b>	<b>- 237 -</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>- 241 -</b>
<b>PARTIE C : ANNEXES.....</b>	<b>- 261 -</b>

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1.1 : Comparaison des tailles des nanoparticules avec des éléments du domaine biologique. Modifiée de Buzea <i>et al.</i> , 2007 [6].....	- 31 -
Figure 1.2 : Utilisation des nanoparticules pour des applications allant de la recherche au monde de l'industrie. Modifiée de V. Kumar <i>et al.</i> , 2017 [7].....	- 32 -
Figure 1.3 : Evolution des publications concernant les nanoparticules aux cours des années. ....	- 33 -
Figure 1.4 : Les différents types de nanoparticules à visée thérapeutique. Modifiée de M. Massserini, 2013 [12].....	- 34 -
Figure 1.5 : Les nanoparticules de type graphène. Traduite de H.P Bei <i>et al.</i> , 2019 [21] .....	- 36 -
Figure 1.6 : Utilisation du graphène oxyde pour la chimie analytique. Issue de J. Lee <i>et al.</i> , 2016 [31] .....	- 38 -
Figure 1.7 : Amélioration de la reproductibilité de détection de l'histidine grâce au couplage 9-AA/CDs. Issue de Y. Chen <i>et al.</i> , 2016 [55]. .....	- 40 -
Figure 1.8 : Effets des différentes formes de graphène sur la souche <i>E. coli</i> . Traduite et modifiée à partir de S. Liu <i>et al.</i> , 2011 [69].....	- 42 -
Figure 1.9 : Accumulations de nanoparticules de type graphène au sein de différentes lignées cellulaires. Issue et modifiée de N. Chatterjee <i>et al.</i> , 2014 [83] et R. Li <i>et al.</i> , 2018 [84].....	- 44 -
Figure 1.10 : Biodistribution du <sup>14</sup> C-FLG chez la souris. Modifiée de L. Mao <i>et al.</i> , 2016 [89].....	- 45 -
Figure 1.11 : Différents types de nanovecteurs. Issues de A. P. Singh <i>et al.</i> , 2019 [93] de la thèse d'Annaëlle Doerflinger [92] .....	- 49 -
Figure 1.12 : Différents liposomes classés selon leurs fonctionnalisations. Issue de M. K. Riaz <i>et al.</i> , 2018 [97].....	- 50 -
Figure 1.13 : Formation des micelles de polymères. Issue de la thèse d'Annaëlle Doerflinger [92]-	- 51 -
Figure 1.14 : Biodistribution de micelles polydiacétyleniques obtenues par imagerie planaire NIR. Issue de N. Mackiewicz <i>et al.</i> , 2011 [107] .....	- 52 -
Figure 2.1 : Organisation d'un spectromètre de masse. ....	- 57 -
Figure 2.2 : La résolution spatiale en MSI selon le « raster » utilisé.....	- 58 -
Figure 2.3 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse .....	- 59 -
Figure 2.4 : Chronologie de l'instrumentation pour l'imagerie par spectrométrie de masse. Issue de R.M.A. Heeren, 2015 [126].....	- 60 -
Figure 2.5 : Les étapes principales de la préparation des échantillons en analyses MSI. ....	- 64 -
Figure 2.6 : Différence de détection selon le mode de conservation des échantillons. Issue de I.A Mulder <i>et al.</i> , 2016 [141] .....	- 66 -
Figure 2.7 : Tissus congelés versus tissus FFPE. Issue de A. Ly <i>et al.</i> , 2016 [142] .....	- 68 -
Figure 2.8 : Effet du réchauffement des coupes sur la détection de marqueurs peptidiques. Issue de R.J.A. Goodwin <i>et al.</i> , 2008 [152].....	- 70 -
Figure 2.9 : Effet de l'épaisseur de la coupe sur l'intensité des ions détectés. Issue de Y. Suguira <i>et al.</i> , 2006 [153] .....	- 71 -
Figure 2.10 : Effet du lavage au chloroforme sur coupe de cerveau. Issue de H. Yang <i>et al.</i> , 2018 [176]. .....	- 73 -
Figure 2.11 : Effets du lavage avec solutions salines. Issue de P. M. Angel <i>et al.</i> , 2012 [156].....	- 74 -



## LISTE DES FIGURES

Figure 2.12 : Effets du temps d'incubation et de l'enzyme utilisée pour l'analyse de peptides. Issue de H.C Diehl <i>et al.</i> , 2015 [176].	- 75 -
Figure 2.13 : Effets de la phospholipase C sur coupes de cerveaux. Issue de S. Vens-Cappell <i>et al.</i> , 2016 [158].	- 76 -
Figure 2.14 : Exemple de dérivation de neurotransmetteurs sur coupes de cerveaux. Issue de C. Esteve <i>et al.</i> , 2016 [164].	- 77 -
Figure 2.15 : Différents procédés de dépôt de matrices MALDI et leurs caractéristiques associées.	- 82 -
Figure 2.16 : Effet des différents types de dépôt de matrice sur l'ionisation des molécules. Issue de E. Gemperline <i>et al.</i> , 2014 [192].	- 83 -
Figure 2.17 : Images MS obtenues avant et après normalisation. Modifiée de P. Källback <i>et al.</i> , 2012 [213].	- 89 -
Figure 2.18 : Amélioration de la gamme de calibration avec standard interne. Modifiée de P. Källback <i>et al.</i> , 2012 [213].	- 90 -
Figure 2.19 : Le TEC selon la concentration du standard déposé par spray. Issue de Hamm <i>et al.</i> en 2012 [213].	- 91 -
Figure 2.20 : Application du TEC en DESI et MALDI - MSI. Issue de A. Taylor <i>et al.</i> en 2018 [215].	- 92 -
Figure 2.21 : Les différentes méthodes pour la qMSI	- 93 -
Figure 2.22 : Quantification par dépôts de gamme sur tissus avec standard interne. Images modifiées de A. Buck <i>et al.</i> , 2015 [217].	- 94 -
Figure 2.23 : Comparaison de méthodes de quantification en MSI. Modifiées de C. W. Chumbley <i>et al.</i> , 2016 [220].	- 95 -
Figure 2.24 : Corrélation des données LC - MS et MSI. Issus de S. L. Koeniger <i>et al.</i> , 2011 [221], N. Takai <i>et al.</i> , 2012 [222].	- 96 -
Figure 2.25 : Corrélation des données quantitative en MSI et en GC-MS. Issues de M. Lagarrigue <i>et al.</i> , 2014 [224].	- 97 -
Figure 2.26 : Comparaison de différentes méthodes d'homogénéisation des tissus pour la création de modèle mimétiques. L. Jadoul <i>et al.</i> , 2015 [227].	- 99 -
Figure 2.27 : Quantification de la clazopine et de la norclozapine sur 3 sites différents. Issue de J. A. Barry <i>et al.</i> , 2019 [234].	- 101 -
Figure 2.28 : Combinaison de l'imagerie SIMS et MALDI. Issue de Chughtai <i>et al.</i> , 2012 [237].	- 102 -
Figure 2.29 : Apport de la source SIMS à l'imagerie MALDI. Issu de S. Van Nuffel <i>et al.</i> , 2018 [193].	- 103 -
Figure 2.30 : Couplage de la MSI avec la fluorescence. Issue de K. Fuchs <i>et al.</i> , 2018 [238].	- 105 -
Figure 2.31 : Utilisation de la fluorescence couplée à la MSI. Issue de N. H. Patterson <i>et al.</i> , 2018 [194].	- 106 -
Figure 2.32 : Radioimagerie et MALDI - MSI pour la biodistribution d'un médicament. Issues de D. M. Drexler <i>et al.</i> , 2011 [242].	- 107 -
Figure 2.33 : MSI vs radioimagerie. Issue de R. J. A. Goodwin <i>et al.</i> , 2016 [244].	- 108 -
Figure 2.34 : Radioactivité observée chez la souris après injection de MWCNTs. Issue de B. Czarny <i>et al.</i> , 2014 [248].	- 110 -
Figure 2.35 : Analyse ICP-MSI de nanoparticules d'argent. Issues de D. Drescher <i>et al.</i> , 2012 [249].	- 110 -
Figure 2.36 : Utilisation des nanoparticules d'or comme matrice. Issue de N. Goto-Inoue <i>et al.</i> , 2010 [253].	- 111 -

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.37 : Biodistribution des nanoparticules de type graphène chez la souris. Issue de S. Chen <i>et al.</i> , 2015 [260] .....	- 113 -
Figure 1.1 : Comparaison des signatures graphène en MALDI ou LDI - MS .....	- 124 -
Figure 1.2 : Objectifs de l'imagerie combinée. Images issues de M. Stoeckli <i>et al.</i> , 2007 [146].-	- 124 -
Figure 1.3 : Procédé de fabrication de l'oxyde de graphène et de l'oxyde graphène réduit à partir de nanotubes de carbone marqués.....	- 126 -
Figure 1.4 : Expérimentations d'administration du GO et rGO chez le modèle murin. ....	- 127 -
Figure 1.5 : Développement d'une expérience d'imagerie combinée. ....	- 130 -
Figure 1.6 : Préparation des gammes de calibration en homogénats. ....	- 131 -
Figure 1.7 : Matrices utilisées pour la détection des nanoparticules de type graphène. ....	- 134 -
Figure 1.8 : Caractérisation par MET des lots de NF de GO. ....	- 136 -
Figure 1.9 : Caractérisation par MET des nanoparticules présentes dans la solution de GO provenant des lots NF 65/68.....	- 137 -
Figure 1.10 : Caractérisation par MET du lot de GO marquées. ....	- 138 -
Figure 1.11 : Spectres de masse LDI-TOF du GO dans les modes d'ionisation positif et négatif.-	- 140 -
Figure 1.12 : Spectres de masse MALDI - TOF du GO acquis avec un panel de matrices différentes. ...	- 142 -
Figure 1.13 : Spectres de mase LDI - MS de la signature du GO et du SDBS. ....	- 143 -
Figure 1.14 : Spectre de masse LDI - MS des ions analysés dans le massif correspondant au tensioactif. ....	- 144 -
Figure 1.15 : Spectres de masse LDI - TOF du GO et rGO. ....	- 145 -
Figure 1.16 : Intensité de la signature du GO obtenue en fonction du délai d'extraction en source. .-	- 147 -
Figure 1.17 : Spectres de masse LDI-TOF du GO et rGO sur coupe de foie et lame ITO.....	- 150 -
Figure 1.18 : Comparaison de la signature LDI - MS du GO avec celles des CNTs (carbone 12 et 13) enrichis en azote. ....	- 152 -
Figure 1.19 : Attribution des pics de la signature LDI - MS du <sup>12</sup> C-CNT. ....	- 153 -
Figure 1.20 : Attribution des pics de la signature <sup>13</sup> C-CNT. ....	- 154 -
Figure 1.21 : Spectres de masse LDI - MS du GO marqué et non marqué au carbon 14. ....	- 155 -
Figure 1.22 : Allure des impacts laser pour l'Ultraflex extreme™ à différentes focalisations. ....	- 156 -
Figure 1.23 : Exemple de l'apport de la résolution pour la biodistribution de molécules. ....	- 157 -
Figure 1.24 : Spectres de masse LDI - MS du rGO selon les conditions de paramétrage du laser.-	- 159 -
Figure 1.25 : Représentation individuelle des ions appartenant à la signature GO. ....	- 160 -
Figure 1.26 : Spectre de masse et image LDI - MS de l'oxyde de graphène en dépôt.....	- 161 -
Figure 1.27 : Coupes des tissus mimétiques selon les conditions. ....	- 163 -
Figure 1.28 : Courbe de calibration en homogénats de foies et de poumons. ....	- 165 -
Figure 1.29 : Evaluation de l'épuisement des dépôts de GO et des homogénats. ....	- 166 -
Figure 1.30 : Variation des analyses LDI-MSI au sein d'une même concentration de GO. ....	- 168 -
Figure 1.31 : Courbes de calibration réalisées sur coupes de poumons. ....	- 172 -
Figure 1.32 : Détection du GO et rGO dans le foie et les poumons de souris exposés à 4 µg de ces nanoparticules.....	- 176 -

## LISTE DES FIGURES

Figure 1.33 : Analyses MSI des coupes de poumons et de foies exposées à 50 µg de 50/50 <sup>12</sup> C/ <sup>14</sup> C-GO. ....	- 177 -
Figure 1.34 : Comparaison de la résolution spatiale en MSI et au β-imager. ....	- 178 -
Figure 1.35 : Plan de lames pour les expérimentations de quantification. ....	- 180 -
Figure 1.36 : Courbes de calibration obtenues sur différents tissus. ....	- 181 -
Figure 1.37 : Corrélation des données obtenues en radioimagerie β et en MSI. ....	- 183 -
Figure 1.38 : Quantification du GO au β-imager au sein d'organes en fonction de la dose injectée ..	- 184 -
Figure 1.39 : Comparaison de l'analyse des poumons en MSI et β-imageur après exposition à 50 et 75 µg de GO 50/50 <sup>14</sup> C/ <sup>12</sup> C-GO. ....	- 187 -
Figure 2.1 : Structures de molécules cibles de cette étude. ....	- 197 -
Figure 2.2 : Méthode de préparation des micelles et encapsulation des molécules de GW. ....	- 198 -
Figure 2.3 : Dégradation des phospholipides avec la phospholipase C ou D. ....	- 200 -
Figure 2.4 : Essais de méthylation de l'amine tertiaire du GW en conditions douces. ....	- 201 -
Figure 2.5: Dérivation du GW en conditions drastiques. ....	- 201 -
Figure 2.6 : Spectres MALDI - MS du GW-OC12 selon les matrices MALDI. ....	- 203 -
Figure 2.7 : Optimisation des conditions de matrices. ....	- 204 -
Figure 2.8 : Comparaison des spectres MALDI - MS et MALDI - MS/MS du GW-OC12 et du GW-OC16. ....	- 205 -
Figure 2.9 : Détection des micelles selon les matrices MALDI. ....	- 207 -
Figure 2.10 : Spectre MALDI - MS de la signature correspondant à la micelle de PDAPEG. ....	- 208 -
Figure 2.11 : Effet du solvant de reprise sur la signature de la micelle. ....	- 209 -
Figure 2.12 : Effet de l'ajout de sels sur la signature PEG. ....	- 211 -
Figure 2.13 : Analyses MALDI - MS des micelles encapsulant un principe actif selon la concentration d'acétate de sodium. ....	- 212 -
Figure 2.14 : Comparaison du profil PEG selon les traitements de la micelle. ....	- 213 -
Figure 2.15 : Effet du délai d'extraction pour la signature de la micelle. ....	- 215 -
Figure 2.16 : Spectre MALDI - MS de la micelle en fonction de la fluence laser. ....	- 216 -
Figure 2.17 : Variation du signal PDAPEG selon la fluence laser. ....	- 217 -
Figure 2.18 : Spectres MALDI - MS de la détection simultanée du GW-OC12 et de la micelle. ....	- 218 -
Figure 2.19: Analyses MALDI - MS du GW-OC12 encapsulé selon les conditions de solvant. ....	- 219 -
Figure 2.20 : Effet de la dilution et du solvant de reprise sur le signal du GW-OC16. ....	- 221 -
Figure 2.21 : Analyse MALDI - MS du GWOC16 sur coupes de tissus. ....	- 222 -
Figure 2.22 : Analyses MALDI - MS de la micelle encapsulant le GW-OC12 sur coupes de foie. ....	- 223 -
Figure 2.23 : Spectre MALDI - MS obtenus après lavage au chloroforme du tissu. ....	- 224 -
Figure 2.24 : Analyses MS <sup>2</sup> après délipidation de la coupe de foie au chloroforme. ....	- 225 -
Figure 2.25 : Répartition des GO dans les phases d'extraction lipidique. ....	- 226 -
Figure 2.26 : Spectre MALDI - MS après hydrolyse alcaline sur des extraits lipidiques de foie. ....	- 227 -
Figure 2.27 : Analyses MALDI - MS des phospholipases C et D en solution tampon. ....	- 229 -
Figure 2.28 : Analyses MALDI - MS des extraits de foie avec les principes actifs et traités avec la PLD. ....	- 230 -

## LISTE DES FIGURES

Figure 2.29 : Analyses MALDI - MS des extraits de foie issu de souris traitées au GW-OC16 et traités avec la PLD. ....	- 231 -
Figure 2.30 : Analyse MALDI - MS après dérivaison du GW-OCH <sub>3</sub> .....	- 232 -
Figure 2.31 : Réactions de chimie click pour la détection de la phénylbutyne en MALDI - MS. Issue du rapport de stage de M. Ribéraud (2019) .....	- 234 -



## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1.1 : Utilisation des nanoparticules de type graphène selon leurs caractéristiques. Traduit de K. S. Novoselov, 2012 [18] .....	- 37 -
Tableau 1.2 : Synthèses des nanoparticules. ....	- 37 -
Tableau 1.3 : Etudes utilisant les nanoparticules de type graphène comme matrice MALDI. ....	- 39 -
Tableau 1.4 : Etude de la biodistribution des nanoparticules de type graphène chez l'animal selon le mode d'exposition. Issu de N. Kurantowicz <i>et al.</i> , 2015 [88]. ....	- 45 -
Tableau 1.5 : Techniques d'analyses pour les nanoparticules. ....	- 53 -
Tableau 2.1 : Comparaison des sources SIMS, DESI et MALDI. Inspiré de D. Touboul <i>et al.</i> , 2011 [127] .....	- 61 -
Tableau 2.2 : Les analyseurs pour la MSI. Modifié et adapté de F. Fenaille <i>et al.</i> , 2017 [128], et de J. L. Noris et R. M. Caprioli, 2013 [129]. ....	- 62 -
Tableau 2.3 : Réactifs de dérivation pour différentes classes de molécules retrouvées dans la littérature. ....	- 79 -
Tableau 2.4 : Les matrices les plus courantes (liste non exhaustive). ....	- 80 -
Tableau 2.5 : Comparaison des méthodes de dépôt de matrice. Modifié de B. K. Kaletas <i>et al.</i> , 2009 [152]. ....	- 81 -
Tableau 2.6 : Logiciels commerciaux disponibles pour le traitement des images acquises par spectrométrie de masse. ....	- 84 -
Tableau 2.7 : Logiciels d'imagerie par spectrométrie de masse disponibles dans la littérature. .-	- 86 -
Tableau 1.1 : Données issues des expériences d'administration du GO et rGO chez la souris. ...	- 129 -
Tableau 1.2 : Protocole de coloration H&E. ....	- 132 -
Tableau 1.3 : Protocoles d'acquisition au $\beta$ -imager selon les expériences réalisées. ....	- 133 -
Tableau 1.4 : Bilan des différents lots de GO et rGO analysés par MET. ....	- 138 -
Tableau 1.5 : Caractéristiques des matrices MALDI dans les basses masses. ....	- 146 -
Tableau 1.6 : Répétabilité des signatures de GO et de rGO selon les lots de synthèse. ....	- 149 -
Tableau 1.7 : Détection des massifs caractéristiques des solutions de GO selon les matrices MALDI. -	- 149 -
Tableau 1.8 : Variabilité de l'intensité de l'ion $m/z$ 72 retrouvée au sein des tissus mimétiques. -	- 164 -
Tableau 1.9 : Evaluation de différentes modalités de création des régions d'intérêts. ....	- 167 -
Tableau 1.10 : Reproductibilité des analyses MSI sur 3 gammes de dilution obtenues en parallèle. ...	- 170 -
Tableau 1.11 : Reproductibilité inter-jour des analyses MSI sur la gamme A. ....	- 170 -
Tableau 1.12 : Estimation des limites de détection et de quantification du GO. ....	- 171 -
Tableau 1.13 : Evaluation de la justesse de quantification selon les courbes de calibration obtenues sur coupes pulmonaire. ....	- 173 -
Tableau 1.14 : Quantités retrouvées par organe après injection de 25, 50 et 75 $\mu$ g de GO au $\beta$ -imager. ....	- 185 -
Tableau 1.15 : Comparaison des quantifications obtenues au $\beta$ -imager et en qMSI. ....	- 188 -



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>3-SBASE</b> : Acide 3-sulfobenzoïque	<b>DRIFTS</b> : Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy
<b>4-SPITC</b> : 4-Sulphophenyl isothiocyanate	<b>EC</b> : Effective Concentration
<b>9-AA</b> : 9-AminoAcridine	<b>FDA</b> : Foods and Drugs Administration
<b>AAC</b> : 2-Aminoanthracenyl-N-hydroxysuccinimidyl 2-Aminoanthracenyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate	<b>FFPE</b> : Formalin – fixed, Paraffin – embedded
<b>ADME</b> : Absorption, Distribution, Métabolisme, Excrétion	<b>FRET</b> : Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>ADN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>GO</b> : graphene oxide
<b>AF</b> AutoFluorescence	<b>H&amp;E</b> : Hématoxyline & Eosine
<b>AgNPs</b> : NanoParticules d'argent	<b>HCCA</b> : acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique
<b>APPI</b> : atmospheric pressure photoionization	<b>hGO</b> : hydrated GO
<b>AQC</b> : 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate	<b>IRM</b> : Imagerie par Résonance Magnétique
<b>ARN</b> : Acide DésoxyriboNucléique	<b>ITO</b> : Indium Tin Oxide
<b>AuNPs</b> : NanoParticules d'or	<b>IUPAC</b> : Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
<b>Bcl-2</b> : B-cell lymphoma 2	<b>LDI-MS</b> : Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry
<b>CA</b> : 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldéhyde	<b>LESA</b> : Liquid Extraction Surface Analysis
<b>CAX-B</b> : cationic xylyl-bromide	<b>LOD</b> : Limit Of Detection
<b>CD</b> : Carbon Dot	<b>LOQ</b> : Limit Of Quantitation
<b>CMC</b> : Concentration Micellaire Critique, : CarboxyMethylCellulose	<b><math>m/z</math></b> : rapport masse sur charge
<b>CNT</b> : Carbone NanoTube	<b>MALDI</b> : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation
<b>CV</b> : Coefficient de Variation	<b>MET</b> : Microscopie Electronique à Transmission
<b>CVD</b> : Chemical Vapor Deposition	<b>MSI</b> : Mass Spectrometry Imaging
<b>DESI</b> : Desorption electrospray ionization	<b>OCT</b> : Optimal Cutting Temperature
<b>DHAP</b> : 2,6-Dihydroxyacetophenone	<b>PBDPP</b> : 1,4- phenylene-4,4'-bis (2,6-diphenyl-4-pyrylium)
<b>DHB</b> : acide 2,5-Dyhydroxybenzoïque	<b>PBS</b> : Phosphate Buffer Saline
<b>DMIS</b> : 1,2-dimethylimidazole-5-sulfonyl chloride	<b>PDANTA</b> : PolyDiAcétylène NitriloTriacetic Acids
<b>DNPH</b> : 2,4-dinitrophenylhydrazine	<b>PDA-NTA</b> : PolyDiAcétylène-NitriloTriacetic Acids
<b>DPP</b> : 2,4-diphenyl-pyranylum	<b>PDAPEG</b> : PolyDiAcétylène PEG
<b>DPP-TFB</b> : 2,3-diphenyl-pyranylum tetrafluoroborate	<b>PDA-PEG</b> : PolyDiAcétylène-PEG
	<b>PEG</b> : PolyEthylène Glycol



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>PEI</b> : PolyEthleneleimine	<b>SIMS</b> : Secondary Ion Mass Spectrometry
<b>PET</b> : Positron Emission Tomography	<b>siRNA</b> : small interfering RNA
<b>PLC</b> : PhosphoLipase C	<b>SPECT</b> : Single photon emission computed tomography
<b>QD</b> : Quantum Dot	<b>TAHS</b> : p-N,N,N-trimethylammonioanilyl N-hydroxysuccinimidyl carbamate iodide
<b>rGO</b> : reduced graphene oxide	<b>TCDI</b> : 1,1'-thiocarbonyldiimidazole
<b>RMS</b> : Root Mean Square	<b>TEC</b> : Tissue Extinction Coefficient
<b>ROS</b> : Reactive Species Oxygen	<b>THAP</b> : 4.6-trihydroxyacetophenone
<b>S/N</b> : rapport signal sur bruit (Signal to Noise)	<b>TIC</b> : Total Ion Current
<b>SA</b> : Acide sinapinique	<b>TMP</b> : 2,4,6-trimethylpyrylium
<b>SALDI</b> : Surface Assisted Laser Desorption Ionisation	<b>TMPP</b> : N-succinimidylloxycarbonylmethyl)-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)phosphonium bromide
<b>SCBM</b> : Service de Chimie Bioorganique et de Marquage	<b>TSPC</b> : N-(p-toluenesulfonyl)-L-phenylalanyl chloride
<b>SDBS</b> : Sodium DodecylBenzène Sulfonate	<b>UPLC</b> : Ultra Performance Liquid Chromatography
<b>SERS</b> : Surface Enhanced Raman Spectroscopy	
<b>SIMOPRO</b> : Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines	

## PRODUCTION SCIENTIFIQUE

---

### POSTER

- *Development of a dual imaging strategy combining radio- and mass spectrometry -imaging to study the biodistribution of <sup>14</sup>C-graphene oxide* – Journées des Doctorants JOLIOT (JDD 2017), Saclay, France (5 au 7 juillet)

### PRESENTATIONS ORALES

- *Development of a dual imaging strategy combining radio- and mass spectrometry-imaging to study the biodistribution of <sup>14</sup>C-graphene oxide* – 1<sup>er</sup> congrès commun entre la Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM), le Réseau Francophone de Métabolomique et Fluxomique (RFMF) et de la Société Française d'Electrophorèse et Analyse Protéomique (SFEAP) (SMAAP 2017), Marne-la-vallée, France (3 au 5 Octobre)
- *Development of a dual imaging strategy combining radio- and mass spectrometry -imaging to study the biodistribution of <sup>14</sup>C-graphene oxide* – 3<sup>ème</sup> Journée de l'École Doctorale 2MIB, Paris, France (17/10/2017)
- *Development of a dual imaging strategy combining radio- and mass spectrometry -imaging to study the biodistribution of nanoparticles* - Séminaire du Service de Pharmacologie et d'Immunologie, Saclay, Paris (17/02/2018)
- *Development of a dual imaging strategy combining radio- and mass spectrometry-imaging to study the biodistribution of <sup>14</sup>C-graphene oxide* – 66<sup>ème</sup> conference of the American Society of Mass Spectrometry (ASMS 2018), San Diego, USA (3 au 7 Juin)

### PUBLICATION

- **H. Cazier**, C. Malgorn, D. Georgan, C. Chollet, F. Taran, V. Dive, C. Junot, F. Fenaille, B. Colsch: *Mass spectrometry imaging of Graphene based-nanomaterials: optimization for imaging and quantification* – En cours d'écriture.



# Partie A : Contexte scientifique et technologique

---



Hélène Cazier



## Chapitre 1 : L'ETUDE DES NANOPARTICULES

---

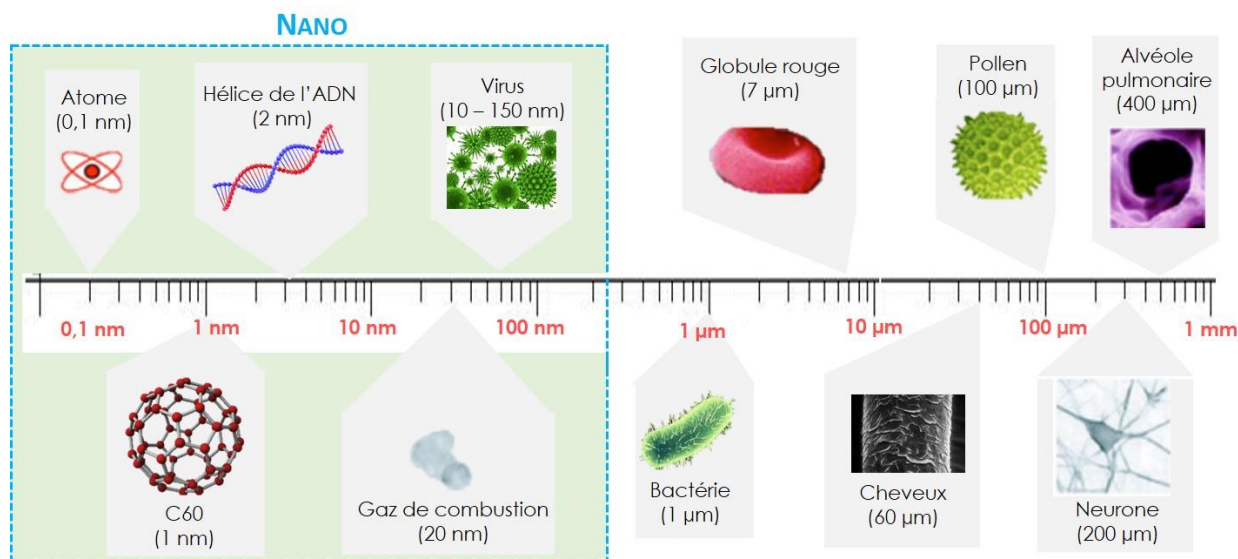
DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES



## A. LES NANOPARTICULES : GENERALITES

Les nanoparticules ou particules ultrafines sont des molécules dont la taille est inférieure à 100 nm pour au moins une des trois dimensions (longueur, hauteur et profondeur). Elles sont plus petites qu'une cellule mais plus grande qu'un atome (**Figure 1.1**). Parmi ces molécules, trois catégories sont distinguées :

- **Les nano-objets**, dont les trois dimensions sont inférieures à 100 nm, tels que le dioxyde de titane ou le carbonate de calcium,
- **Les nanotubes**, nanofilaments ou nanofibres, dont deux dimensions sont inférieures à 100 nm comme les nanotubes de carbone ou les fibres de polyester,
- Et **les nanofeuillets** ou nano-plaquettes, qui possèdent une seule dimension en dessous de 100 nm, comme les nanofeuillets d'argile.

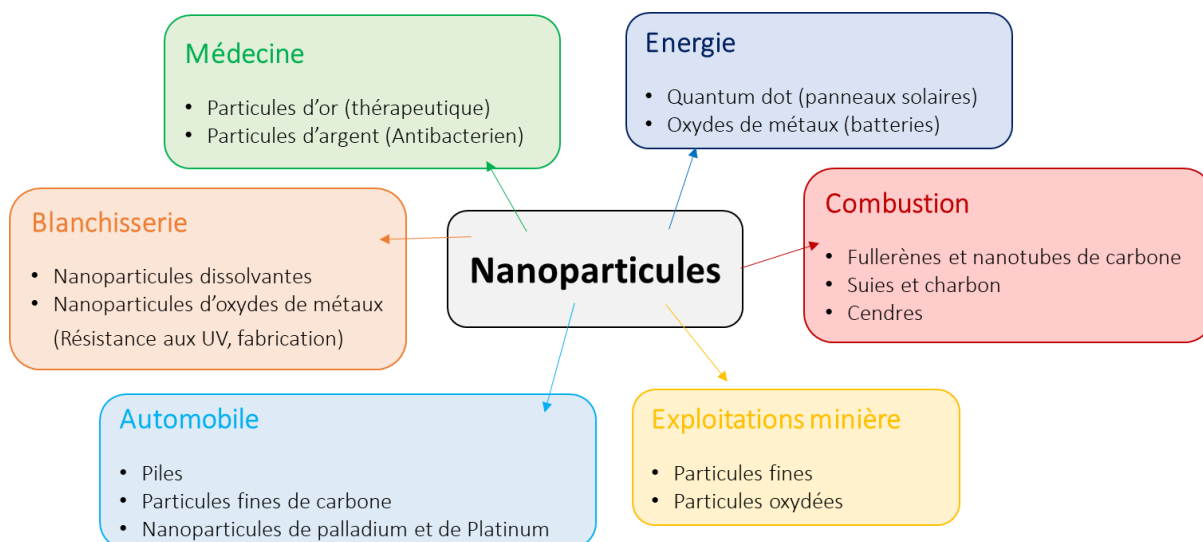


**Figure 1.1 : Comparaison des tailles des nanoparticules avec des éléments du domaine biologique. Modifiée de Buzea *et al.*, 2007 [6]**

Schéma comparant la taille de nanomatériaux comme le fullerène ou les particules fines de combustion aux composants biologiques. Cette représentation illustre la notion de taille "nanométrique" ou "micrométrique".

Ces nanoparticules sont catégorisées en deux groupes selon leurs procédés de fabrication : les nanoparticules dites élaborées ou synthétisées, et les nanoparticules provenant d'émissions secondaires comme des réactions de combustion. Chacune d'entre elles possède des propriétés physico-chimiques différentes et sont utilisées selon leur nature dans des domaines distincts tels que l'électronique, l'automobile, la chimie, le textile, la cosmétique, l'agroalimentaire ou encore la santé (**Figure 1.2**).

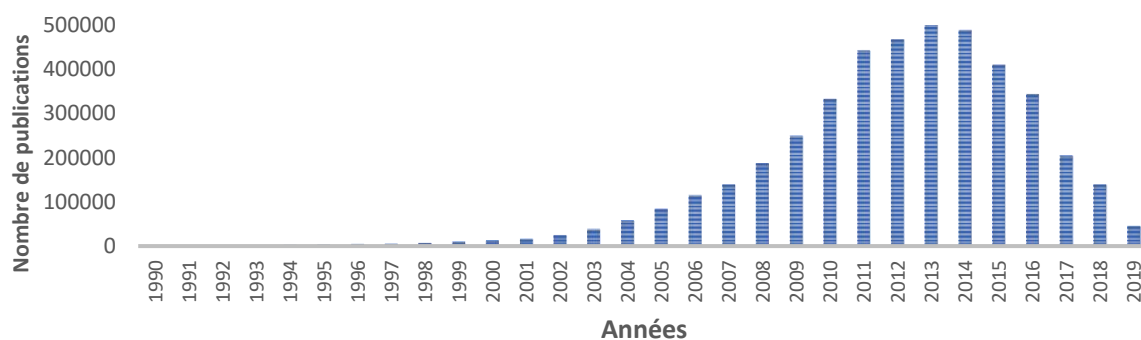




**Figure 1.2 : Utilisation des nanoparticules pour des applications allant de la recherche au monde de l'industrie. Modifiée de V. Kumar *et al.*, 2017 [7]**

Dans ces différents axes de recherche, l'emploi grandissant de nanoparticules depuis les années 1990 pose question quant à leur potentiel impact sur l'environnement et la santé humaine car leurs effets sont encore mal connus. De par leur taille nanoscopique, elles peuvent traverser les barrières biologiques puis se propager dans le système physiologique de l'hôte ou s'accumuler le long des membranes biologiques. Les portes d'entrée les plus classiques pour ces nanoparticules sont la peau, par passage transcutané, les poumons, par inhalation [8] et le système digestif, par absorption [6]. Cependant, avec le développement des systèmes de bioingénierie, il est maintenant envisagé d'injecter à l'Homme ces nanoparticules à des fins thérapeutiques, notamment en nanomédecine [9]. Cette pratique se définit comme l'utilisation de nanotechnologies pour faciliter le diagnostic de maladie, leur traitement et leur suivi [10].

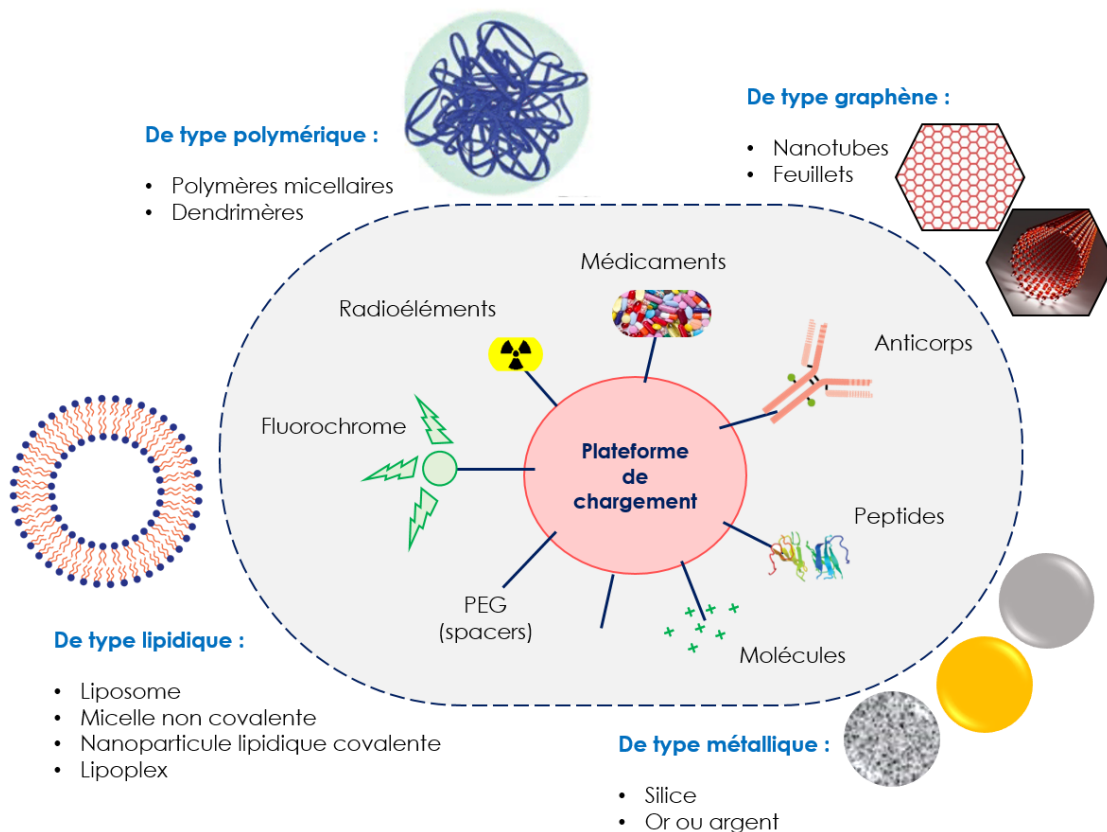
A l'intérieur de l'organisme, ces nanoparticules peuvent donc transloquer dans le système circulatoire ou lymphatique, mais aussi potentiellement s'accumuler dans les organes et causer des dommages irréversibles notamment au niveau cellulaire [11]. La toxicité de ces nanoparticules dépendrait de leur taille, de leur système d'agrégation, de leur composition et des fonctionnalisations qu'elles possèdent, car elles vont ainsi pouvoir traverser ou non les barrières biologiques. Selon le mode d'exposition, plusieurs maladies ont déjà été corrélées avec la présence de nanoparticules, comme dans le cas de l'asthme, des maladies neurodégénératives comme les maladies de Parkinson ou d'Alzheimer et dans plusieurs cancers ou maladies auto-immunes [6]. Par conséquent, le nombre de publications ayant trait aux nanoparticules, aussi bien sur leur fabrication que sur leur toxicité éventuelle a significativement augmenté lors des deux dernières décennies, avec un nombre maximal d'études atteintes en 2013 (**Figure 1.3**).



**Figure 1.3 : Evolution des publications concernant les nanoparticules aux cours des années.**

Evolution des publications pour la recherche du mot « *nanoparticles* » dans le moteur de recherche Google Scholar des années 1990 à nos jours (Mai 2019). Les publications concernent aussi bien la fabrication, l'analyse ou les effets biologiques de ces nanoparticules.

Ces nouvelles utilisations des nanoparticules nécessitent un intérêt tout particulier quant à l'étude de leur biodistribution. C'est la raison pour laquelle nous aborderons les notions d'ADME dans cette thèse. Dans la suite de ce chapitre, les nanoparticules dites élaborées car développées à des fins d'analyses biologiques ou avec un intérêt thérapeutique seront plus particulièrement évoquées. Les nanoparticules les plus usuelles dans ce domaine de recherche sont celles présentées dans la **Figure 1.4**, comportant des fonctionnalisations variées selon les finalités d'utilisation de chaque objet. Ces nanoparticules peuvent être de type polymérique, lipidique, métallique ou de type graphène. Présentes selon un large choix tant sur le modèle de la nanoparticule que sur la façon de la fonctionnaliser, elles sont donc très largement employées. Leur fonctionnalisation a pour objectif d'éviter une élimination trop rapide, de permettre un adressage particulier vers un type de cellule, ou encore de faciliter leur détection dès qu'elles ont atteint leurs cibles biologiques. Cette reconnaissance peut se faire par fluorescence moléculaire avec la fixation d'un fluorochrome, par affinité immunologique via la fixation d'anticorps, par radioimagerie avec l'incorporation d'un radioélément sur la nanoparticule, ou encore par détection directe grâce à la spectrométrie de masse. Dans le cadre de ce chapitre, une importance plus particulière sera portée à la radioimagerie et l'imagerie par spectrométrie de masse pour la détection de nanoparticules.



**Figure 1.4 : Les différents types de nanoparticules à visée thérapeutique. Modifiée de M. Masserini, 2013 [12]**

Représentation schématisée des nanoparticules modifiées en surface par des médicaments, des anticorps, peptides, aptamères ou molécules cationiques pour le ciblage moléculaire après administration *in vivo*.

Ces travaux se déroulant dans le cadre d'une collaboration entre les trois services du Département « Médicaments et Technologies pour la Santé (avec le SCBM : Service de Chimie Bioorganique et de Marquage et le SIMOPRO : Service d'Ingénierie Moléculaire des Protéines) du site du CEA de Saclay ; une attention particulière a été portée à la description des nanoparticules de type graphène et de type micellaire. En effet, la synthèse et l'étude de ces nanoparticules marquées ou non est devenue l'une des thématiques phares de ces laboratoires avec l'élaboration de systèmes micellaires de type polymérique [13] [14] et de nanoparticules carbonées [15]. Les paragraphes suivants décriront dans un premier temps, les propriétés physico-chimiques particulières des nanoparticules de graphène ainsi que leurs utilisations à des fins biologiques ou thérapeutiques. Dans un second temps, les systèmes nanoparticulaires de type micellaire seront plus amplement détaillés dans un contexte de délivrance de médicament. Enfin, un intérêt particulier sera porté envers les systèmes de détection de ces nanoparticules dans des milieux complexes comme des systèmes biologiques.

## I. LES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE

L'appellation « graphène » selon la nomenclature de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) est utilisée pour désigner une structure carbonée possédant deux dimensions et étant composée uniquement de couches individuelles [16]. Étudiée depuis 1940 [17], les travaux relatifs à sa découverte ont fait l'objet d'un prix Nobel de physique en 2010 [18] et sa structure est maintenant déclinée en plusieurs catégories de nano-objets comportant des propriétés physico-chimiques distinctes. Le graphène correspond à une molécule plane comportant des atomes de carbones hybridés  $sp^2$  dont les électrons participent à la formation de cycles aromatiques. Ses propriétés physico-chimiques et électroniques contribuent à son utilisation importante dans divers domaines tels que l'électronique, l'aéronautique et les applications biomédicales [19]. Dans cette partie, l'utilisation du graphène pour des applications biomédicales sera plus largement étudiée. Un accent particulier sera mis sur la biodistribution de cette nanoparticule à l'issue du passage des barrières physiologiques et les effets toxiques qu'elle pourrait induire.

## II. CLASSIFICATION ET PROPRIÉTÉS DES MATÉRIAUX DE TYPE GRAPHENE

Le terme « graphène » regroupe une famille de nanoparticules réparties selon plusieurs classes qui dépendent du nombre de couches composant la nanoparticule ou les modifications chimiques présentes autour de celle-ci. Parmi la large famille des nanomatériaux de type graphène il existe donc (**Figure 1.5**) : les nanotubes de carbone, les nanorubans, le graphène dit simple couche, bicouches ou multicouches ainsi que le graphène oxyde ou le graphène oxyde réduit. Chacune de ces nanoparticules possède des tailles différentes. Les CNTs ( de l'anglais Carbone NanoTubes) ont des dimensions supérieures au micromètre, les nanorubans font entre 500 et 1000 nm et les feuillets font en moyenne 100 nm [20]. Ces nanoparticules possèdent des caractéristiques variées en termes de conductivité, de propriétés d'absorption dans l'UV ou d'adsorption par interactions électrostatiques,  $\pi$ - $\pi$  ou hydrophobes. Grâce à ces caractéristiques variées, les nanoparticules de graphène sont utilisées dans des domaines très diversifiés.

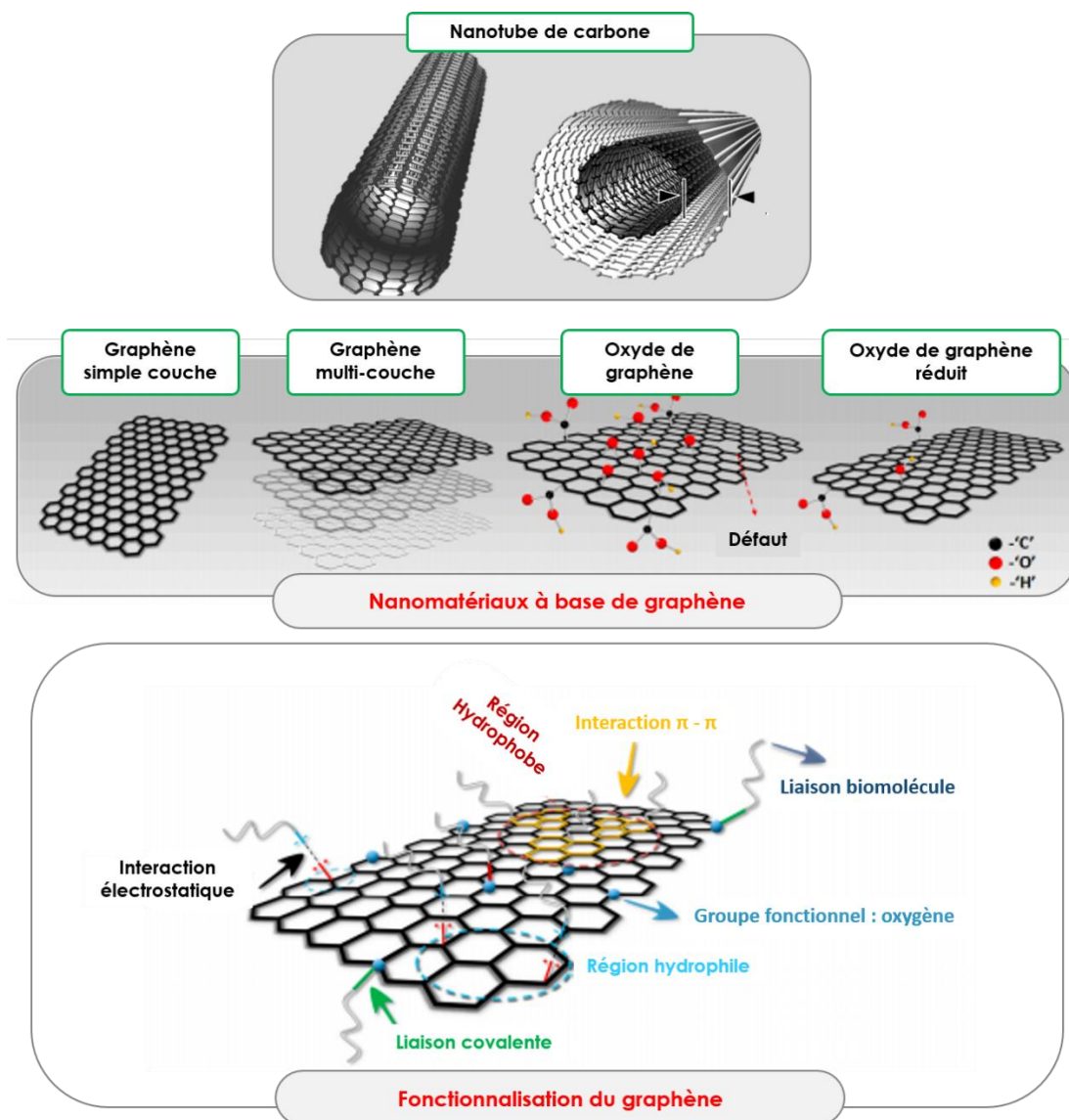


Figure 1.5 : Les nanoparticules de type graphène. Traduite de H.P Bei *et al.*, 2019 [21]

Vue d'ensemble des différentes structures des nanomatériaux à base de graphène et illustration de la fonctionnalisation covalente/non-covalente de ces nanomatériaux.

Parmi toutes les applications citées dans le **Tableau 1.1**, le sujet principal de cette thèse pose la problématique de l'utilisation du graphène dont les propriétés le rendent potentiellement prometteurs en biologie :

- Son innocuité chimique, sa large surface et la délocalisation des électrons permettent de solubiliser et d'y adsorber des molécules médicamenteuses.
- Ses propriétés de conductivité en font un support idéal pour l'imagerie de biomolécules en microscopie électronique à transmission [22].
- Enfin, ses propriétés mécaniques uniques suggèrent des applications en génie tissulaire et en médecine régénérative [23].

Tableau 1.1 : Utilisation des nanoparticules de type graphène selon leurs caractéristiques. Traduit de K. S. Novoselov, 2012 [18]

Méthode	Taille des cristaux ( $\mu\text{m}$ )	Taille de l'échantillon (mm)	Applications
Exfoliation mécanique	> 1 000	> 1	Recherche
Exfoliation chimique	$\leq 0.1$	Superposition à l'infini	Revêtements, peinture/encre, composites, couches conductrices transparentes, stockage d'énergie, <b>Bioapplications</b>
	100		
CVD	1000	1000	Photonique, nanoélectronique, couches conductrices transparentes, capteurs, <b>Bioapplications</b>
Croissance sur SiC	50	100	Transistors à haute fréquence et autres dispositifs électroniques

CVD = Chemical vapor deposition

Ces propriétés dépendent de la synthèse dont est issu le graphène mais également des traitements qui leur sont appliqués. Pour les synthétiser, il existe deux approches distinctes. La première méthode est une approche dite « top-down ». Elle permet la formation de graphène à partir de matériaux macroscopiques mais ne permet pas de contrôler de façon précise la synthèse de la nanoparticule. Cette méthode s'oppose aux approches « Bottom-up » qui permettent une meilleure maîtrise de la structure de la nanoparticule [24]. Ces approches utilisent une source de carbone pour obtenir des nanotubes ou des feuillets de graphène. Les méthodes utilisées dans cette thèse pour la synthèse des nanoparticules de graphène sont décrites en **Partie C annexe A**.

Selon les modes de synthèse utilisés (Tableau 1.2), une grande hétérogénéité en taille ou en degré d'oxydation peut être obtenue et ainsi mener à des nanoparticules de graphène avec des propriétés variées. Ces dissimilarités peuvent engendrer des différences quant à leur utilisation mais aussi quant à leur toxicité potentielle.

Tableau 1.2 : Synthèses des nanoparticules.

« Bottom up »	« Top down »
Chemical Vapor Deposition	Décharge électrique
Méthode Hummer's	Ablation laser
Croissance sur SiC	Ouverture unzipping des nanotubes
Carbonisation	Exfoliation chimique ou mécanique

### III. UTILISATIONS ET TOXICITE DES NANOPARTICULES DE GRAPHENE

Depuis sa découverte en 2010 et avec la création d'un [Flagship Graphène](#) en 2013 (programme de recherche financé par l'UE), les scientifiques travaillent aujourd'hui au transfert de ces matériaux du laboratoire vers l'industrie. Ainsi, avec une possible industrialisation de la production du graphène [25], les effets d'une exposition du grand public à ces nanoparticules devient un sujet d'étude important vis-à-vis de son devenir *in vivo* [26] [27]. De ce fait, les applications du graphène à des fins de bioanalyses ou médicales seront plus particulièrement détaillées dans la suite de ce paragraphe.

## 1. LES UTILISATIONS DES ESPÈCES DÉRIVÉES DU GRAPHÈNE

### a. Utilisation du graphène en chimie analytique

L'oxyde de graphène (GO de l'anglais « graphene oxide ») est un matériau très utilisé pour le développement de nouvelles méthodes d'analyses physico-chimiques en bioanalyse et notamment comme plateforme capable d'adsorber des molécules. En raison de la présence de groupements hydrophiles, le GO présente une bonne dispersibilité dans l'eau, biocompatibilité et résistance à l'oxydation. De ce fait, le graphène est aussi bien utilisé en laboratoire (**Figure 1.6**) que dans le milieu médical pour le développement de techniques analytiques pour la détection de molécules telles que le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) [28], la LDI - MS (Laser Desorption Ionisation Mass Spectrometry) [29] [30] ou le SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) [31]. Ces méthodes utilisent ainsi les propriétés du graphène comme son influence sur la fluorescence (quenching), sa forte absorbance aux longueurs d'onde du laser à 337 et 355 nm ou encore sa capacité d'interaction  $\pi$ - $\pi$  ou de transfert d'électrons.

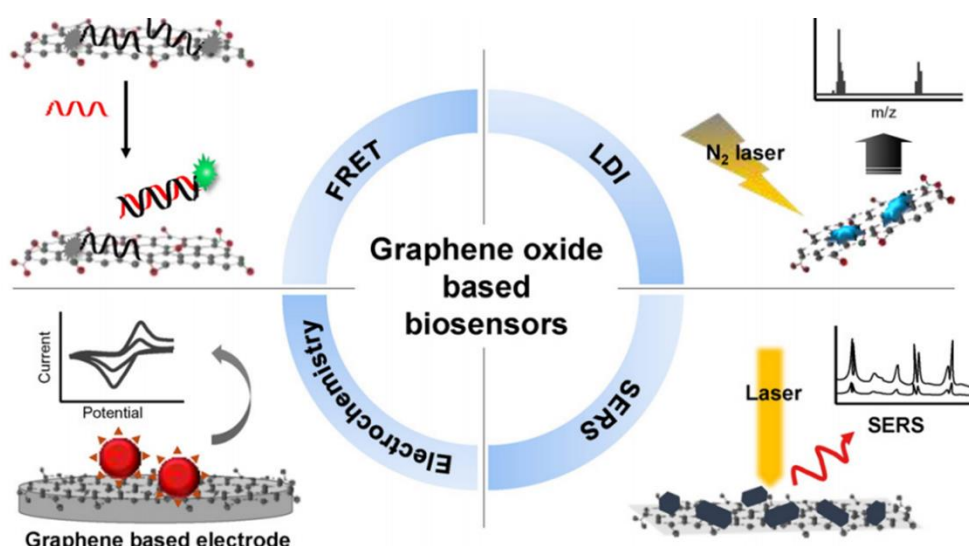


Figure 1.6 : Utilisation du graphène oxyde pour la chimie analytique. Issue de J. Lee *et al.*, 2016 [31]

Plus spécialement pour les techniques d'analyse impliquant l'ionisation MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation), des matériaux de type graphène tels que des fullerènes, des nanotubes de carbone, du graphène et leurs formes dérivées sont utilisés comme matrice ou comme support. Ces nanoparticules peuvent être utilisées comme matrices ou co-matrices (**Tableau 1.3**) pour l'analyse de molécules tels que les métabolites [32] [33], les lipides [34], les xénobiotiques [35] ou encore des composés environnementaux [36]. Ils possèdent en effet des avantages supplémentaires par rapport aux matrices organiques, comme la possibilité de réaliser des analyses en ionisation positive ou négative [37], une efficacité élevée dans la désorption/ionisation de l'analyte [38], une bonne reproductibilité des intensités de pics pour les analytes et une haute tolérance aux sels [39].

Tableau 1.3 : Etudes utilisant les nanoparticules de type graphène comme matrice MALDI.

Auteurs	Molécules analysées	Nanoparticules	Tailles ( $\mu\text{m}$ )	Provenances	Méthodes
Z. Jing, 2005 [40]	Acides aminés	CNT	/	Sun nanotech	/
S. Ren, 2005 [41]	Biomolécules	MWCNT	0.6	Sun nanotech	/
X. Dong, 2010 [32]	Petites molécules	Graphène	1	Synthétisées	Méthode de Hummer's [42]
X. Zhou, 2010 [43]	Octachlorodibenzo-p-dioxine	rGO	3 à 8	Synthétisées	GO sur substrat de SiO <sub>2</sub> puis réduction avec de la vapeur d'hydrazine [44]
J. Lee, 2010 [45]	Phospholipases	GO et CNT(NH <sub>2</sub> )	5	Synthétisées	Méthode de Hummer's [46]
M. Lu, 2011 [47]	Petites molécules	Graphène	3 - 5	Graphene Laboratories	/
J. Zhang, 2011 [36]	Contaminants environnementaux non polaires	Graphène	1	Synthétisées	Méthode de Hummer's [42]
Y. Liu, 2011 [48]	Herbes médicinales traditionnelles chinoises	Graphène et GO	/	Shanghai Boson Technology	/
C. W. Liu, 2012 [49]	Flavonoïdes	GO, rGO et Graphène	10	Synthétisées	Méthode de Hummer's [50]
S. Chen, 2013 [37]	Petites molécules	CD	< 10	Synthétisées	Voir la publication
Q. Min, 2014 [38]	Petites molécules	N-Graphène et GtO	0.2	Synthétisées	GtO par la méthode de Hummer's. NGt par recuit thermique en présence de mélamine [51]
H. Wei, 2016 [33]	Petites molécules	HBCCs	/	Synthétisées	Synthèse selon Zhang <i>et al</i> , 2014 [52]
Z. Wang, 2017 [34]	Phospholipides	GO	/	Nanjing XFNANO Materials Tech	/

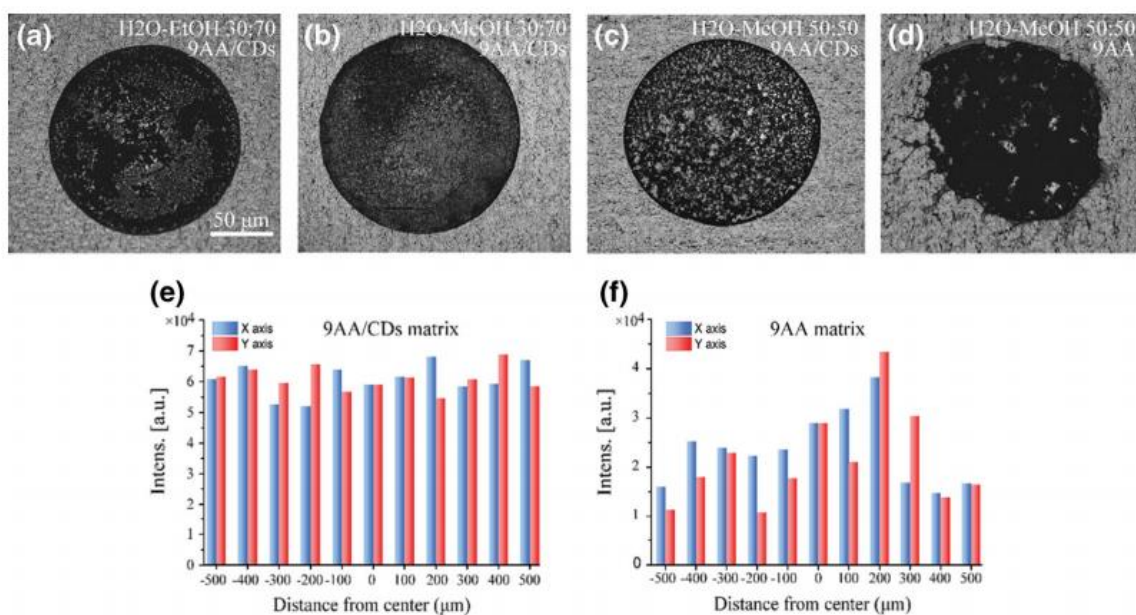
Cette liste correspond à un bref exemple de publications utilisant les nanoparticules de graphène comme matrice dans la littérature. CNT : Carbone NanoTube, MWCNT : Multiple Wall Carbone NanoTube, rGO, reduced Graphene Oxide, GO : Graphène Oxide, CD : Carbon Dot, GtO : Graphite oxide, HBCC : hexaperi-hexabenzocircumcoronene

Selon les études, les auteurs ont fait appel à différentes nanoparticules de graphène comme matrice MALDI. Certaines équipes utilisent du graphène commercial alors que d'autres le synthétisent avant utilisation. Ces différentes façons de procéder peuvent engendrer des changements dans les résultats obtenus. En effet, selon la taille de la nanoparticule, l'efficacité d'absorption pourrait varier et induire des processus de désorption/ionisation plus ou moins efficaces. Pour tester cette hypothèse, C.W Liu *et al.*, 2012 [49], ont fait varier le temps de sonication des feuillets de GO dans le but de modifier leur taille. Ils ont donc obtenu deux types de GO de tailles différentes après 1 heure (feuillets très larges, 10  $\mu\text{m}$ ) ou 6 heures (feuillets de petite largeur, de 1-2  $\mu\text{m}$ ) de sonication. Ils ont ainsi montré que la taille des feuillets a bien une incidence sur l'efficacité de la désorption et de l'ionisation en comparant les intensités obtenues sur 5 molécules de flavonoïdes différentes. Parmi celles-ci, trois possèdent une intensité plus importante avec les feuillets de très large dimension latérale. La taille des feuillets des nanoparticules de graphène semble donc



être un facteur important à prendre en compte pour son efficacité en tant que matrice [53]. En effet, on remarque dans le **Tableau 1.3** ci-dessus que la majorité des nanoparticules ont une taille de l'ordre du micron.

D'autre part, des équipes utilisent également ces mêmes nanoparticules combinées à des matrices organiques dans le but d'augmenter l'efficacité de désorption/ionisation. Par exemple, H. N. Abdelhamid et H-F. Wuou ont utilisé la matrice acide sinapinique (SA) combinée au GO en 2015 pour des analyses SALDI (Surface Assisted Laser Desorption Ionisation) [54]. Cette combinaison leur a permis d'améliorer de deux à cinq fois l'intensité de leurs signaux pour l'analyse de colonies bactériennes. Sur le même principe, Y. Chen *et al.*, 2016 ont utilisé les CDs (Carbon Dots) combinés à la matrice 9- aminoacridine pour l'analyse de petites molécules [55]. Ils ont ainsi augmenté la sensibilité de leurs analyses pour la détection de l'histidine. Étonnement, malgré une synthèse qui peut entraîner une distribution hétérogène de ces nanoparticules, la reproductibilité des analyses est également améliorée grâce à l'obtention de dépôts plus homogènes avec ajout de ces CDs à la matrice 9-AA. (**Figure 1.7**).



**Figure 1.7 : Amélioration de la reproductibilité de détection de l'histidine grâce au couplage 9-AA/CDs. Issue de Y. Chen *et al.*, 2016 [55].**

Images optiques de dépôts 9-AA/CDs et leur co-cristallisation avec l'histidine préparés dans (a.) H<sub>2</sub>O-EtOH (30:70, v/v), (b.) H<sub>2</sub>O-MeOH (30:70, v/v), et (c.) H<sub>2</sub>O-EtOH (50:50, v/v). (d.) Cristallisation de la 9AA et de l'histidine préparés dans H<sub>2</sub>O-EtOH (50:50, v/v). La distribution du signal de l'histidine est obtenue à partir de (e.) 9-AA/CDs et (f.) 9-AA seule. La résolution spatiale est fixée à 100 µm.

Au cours des dernières années, le graphène a fait l'objet d'un vif intérêt dans différents domaines et notamment en chimie analytique. Sa large surface spécifique de 100 nm et ses propriétés d'absorption en font une matrice MALDI très efficace pour l'analyse de composés biologiques suite à sa longueur d'onde d'absorption similaire à celle du laser. Par ailleurs employés en recherche biomédicale, ce domaine fait largement appel au graphène ainsi qu'à ses dérivés pour les applications décrites dans le paragraphe suivant.

### b. Utilisation du graphène en recherche biomédicale

La surface du graphène d'une centaine de nanomètre lui permet de servir de plateforme de chargement pour de nombreuses molécules et offre donc un système de délivrance médicamenteuse aux multiples possibilités. De plus, selon sa fonctionnalisation, le graphène peut permettre d'atteindre différentes cibles cellulaires. Certaines modifications telles que l'ajout de PEG (PolyEthylène Glycol) induisent une plus grande stabilité de la plateforme. Cette stabilité permet de garder une quantité supérieure du complexe en circulation et induit une meilleure distribution du médicament chargé. En effet, l'ajout de PEG rend les nanoparticules moins hydrophobes et entraîne la diminution du phénomène d'opsonisation qui est le système de « marquage » des molécules ou cellules à éliminer [6] [56]. Ensuite, sur ce système d'oxyde de graphène PEGylé, peuvent venir s'adsorber différents médicaments par interactions  $\pi - \pi$  telle que la Doxorubicine : anticancéreux en chimiothérapie [57]. L'adsorption de cette molécule sur cette plateforme de graphène peut ainsi permettre une délivrance plus précise de la molécule soit grâce à une fonctionnalisation ciblée du GO pour les récepteurs des cellules cancéreuses de type acide folique [58], soit grâce à un système de relargage contrôlé déclenché par le glutathion par exemple [59].

Pour la délivrance d'acides nucléiques : ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ou ARN (Acide Ribonucléique), l'oxyde de graphène est préférentiellement fonctionnalisé avec de PEI (PolyEthylène Imine) [60] [61] [62]. Il a été démontré dans l'étude de Zhang *et al.*, 2011 [63] que le siRNA ciblant Bcl-2 (B-cell lymphoma 2, protéine anti-apoptotique) chargé sur la GO-PEI pourrait efficacement annihiler l'expression de la protéine Bcl-2. Cette technique couple les avantages suivants : les interactions électrostatiques favorables du GO qui permettent le chargement du siRNA et une meilleure internalisation du complexe via la fonctionnalisation PEI.

Le graphène, qui est également un agent absorbant, peut être employé en thérapie photothermique pour générer de la chaleur sous irradiation. L'utilisation de photosensibilisateurs entraîne la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, de l'anglais Reactive Species Oxygen) ce qui engendre l'apoptose chez la cellule cancéreuse [64]. Le rGO (de l'anglais : reduced graphene oxide) est cependant préféré pour cette technique car il est plus absorbant et nécessite donc des irradiations plus faibles que le GO ou d'autres nanoparticules comme les nanoparticules d'or.

Suite à ces utilisations en biologie, les risques d'accumulation et de toxicité de ces nanoparticules de type graphène sont potentiellement importants et leurs effets dans les systèmes biologiques nécessitent une attention particulière. Pour cela, la toxicité et la biodistribution du graphène seront donc évaluées dans le paragraphe suivant au travers d'une description du comportement du graphène et de ses dérivés au sein de modèles biologiques.

## 2. LES EFFETS BIOLOGIQUES OBSERVÉS

Afin de mieux comprendre les objectifs de cette thèse, les effets biologiques des nanoparticules à base de graphène seront plus amplement détaillés [65]. En effet, des études sont actuellement menées sur la toxicologie [66] de ces nanoparticules *in vitro* et *in vivo* au sein de différents modèles biologiques comme des organismes cellulaires ou des modèles animaux.

Premièrement, des études réalisées sur des bactéries *Escherichia coli* (Gram -) par S. Kang *et al.*, 2007 [67] et 2008 [68] ont montré une dégradation de leur membrane cellulaire suite à l'adsorption des nanotubes de carbone. L'équipe de S. Liu *et al.*, 2011 [69] a également prouvé une baisse de la viabilité cellulaire de bactéries *E. coli* en comparant les effets du graphite, de l'oxyde de graphite, du GO et du rGO (Figure 1.8). La toxicité plus importante induite par le GO serait due à une plus grande interaction de la membrane avec les nanoparticules en raison de la présence de groupements hydrophiles. Ces résultats ont été reproduits par les équipes de W. Hu *et al.*, 2010 [70], O. Akhavan et E. Ghaderi, 2010 [71] et M. U. Farid *et al.*, 2018 [72] sur des souches de *Staphylococcus aureus* (Gram +). Ils ont démontré une plus grande résistance des souches *E. coli* en raison de la composition de leur membrane externe de type Gram -. Il avance l'hypothèse que les interactions par contact direct de la bactérie avec le bord très tranchant des nanoparticules causeraient plus de dommages à la membrane cellulaire de la bactérie Gram +, dépourvue de la membrane externe, qu'à celle de la bactérie Gram -, qui possède la membrane externe.

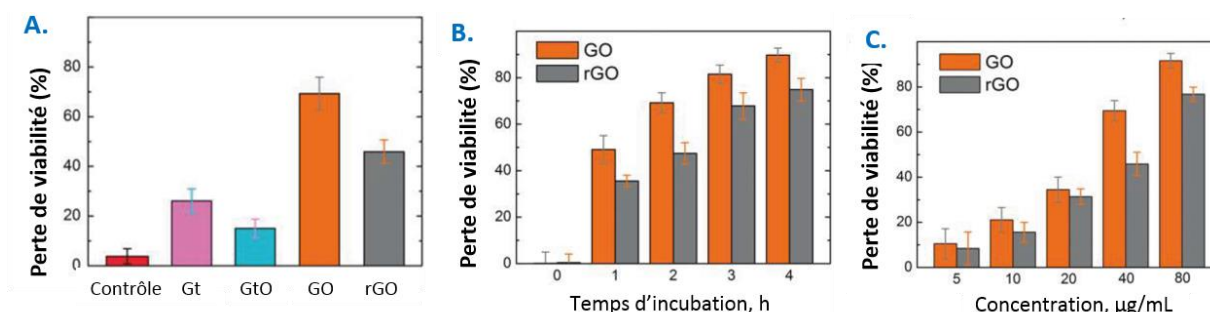


Figure 1.8 : Effets des différentes formes de graphène sur la souche *E. coli*. Traduite et modifiée à partir de S. Liu *et al.*, 2011 [69]

A. Mesure de la viabilité cellulaire de la souche bactérienne *E. coli* après une incubation de 2 heures avec 80 µg/mL de graphite (Gt), d'oxyde de graphite (GtO), de GO ou de rGO. La perte de viabilité cellulaire a été analysée par la méthode de comptage des colonies. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Une solution saline isotonique à base de graphène a été utilisée comme témoin. B. Activités antibactériennes de GO et de rGO en fonction du temps avec les mêmes concentrations. La perte de viabilité a été mesurée à 0, 1, 2, 3 et 4h, respectivement. C. Activités antibactériennes dépendant de la concentration de GO et rGO.

D'autre part, M. Mortimer *et al.*, 2018 [73] ont étudié la souche *Pseudomonas aeruginosa* par analyse transcriptomique après exposition à des nanotubes de carbone (15 µm x 20 nm) et feuillets de graphène (2 µm). Ils ont montré que les nanotubes induisent une dérégulation de l'expression de plus de 111 gènes contre 44 pour le graphène. Ces gènes sont majoritairement impliqués dans la réponse à un stress,

dans la production des protéines membranaires et dans la résistance aux antibiotiques. Toutes ces données tendent à prouver que les nanoparticules de type graphène comme les nanotubes ou les feuillets de graphène entraînent un effet cytotoxique chez la bactérie. Pour cette raison, certains groupes reportent l'utilisation des nanoparticules de la famille du graphène comme agent antibactérien [74] [75].

Par ailleurs, des études effectuées sur des modèles de cellules cancéreuses pulmonaires humaines (GLC-82) [76] ont également souligné cette même dérégulation de l'expression des gènes suite à des expositions au GO ou rGO. T. Zhou *et al.*, 2014 [77] ont montré plus particulièrement une diminution de l'expression des protéines mitochondriales au sein de cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231, MDA-MB-436, et SK-BR-3) après exposition à du PEG-GO. Le GO aurait ici un rôle dans la diminution du phénotype métastatique en régulant le métabolisme énergétique. Par conséquent, certains groupes œuvrent au développement de ces nanoparticules pour l'élimination de cellules cancéreuses [78]. Les effets cytotoxiques des nanoparticules de graphène pourraient ainsi être exploités en nanomédecine. Cependant les études de toxicité *in vitro* et *in vivo* relatées dans la littérature ne convergent pas toutes vers les mêmes conclusions. Par exemple, Y. Chang *et al.*, 2010 [79] ou H. Ali-Boucetta *et al.*, 2013 [80] n'ont pas attribué d'effets toxiques ni même de réaction inflammatoire particulière après l'exposition des cellules A549 (cellules alvéolaires de l'épithélium bronchique) à des concentrations de GO pouvant aller respectivement jusqu'à 120 µg/mL ou 200 µg/mL. B. Drasler *et al.*, 2018 [81] ont apporté les mêmes conclusions après l'exposition d'un modèle 3D de cellules pulmonaires à trois formes de graphène : le GO, les nanoplaquettes de graphène et le carbone noir. Cette divergence trouvée dans la littérature pourrait provenir du type de nanoparticule utilisée. En effet, selon les dimensions de celle-ci, elle pourrait avoir des effets biologiques qui varient considérablement comme ont pu le démontrer P-P Jia *et al.*, 2019 [82] en comparant l'effet de la taille du graphène ou de l'oxyde de graphène sur la viabilité cellulaire. De plus, N. Chatterjee *et al.*, 2014 [83], ou R. Li *et al.*, 2018 [84] ont montré que selon l'état d'oxydation du graphène, les effets sur la toxicité cellulaire peuvent être différents. Par exemple, l'étude de cellules HepG2 (lignée cellulaire de cancer du foie humain) a indiqué une internalisation du GO alors que le rGO reste à la surface des membranes cellulaires (**Figure 1.9, A.**). Là encore, les propriétés hydrophobes des feuillets de rGO peuvent expliquer que la nanoparticule ne soit pas internalisée par la cellule HepG2. Cependant, cet effet s'est retrouvé inversé pour la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 (**Figure 1.9, B.**) pour laquelle seul le GO a été accumulé au niveau de la membrane cellulaire.

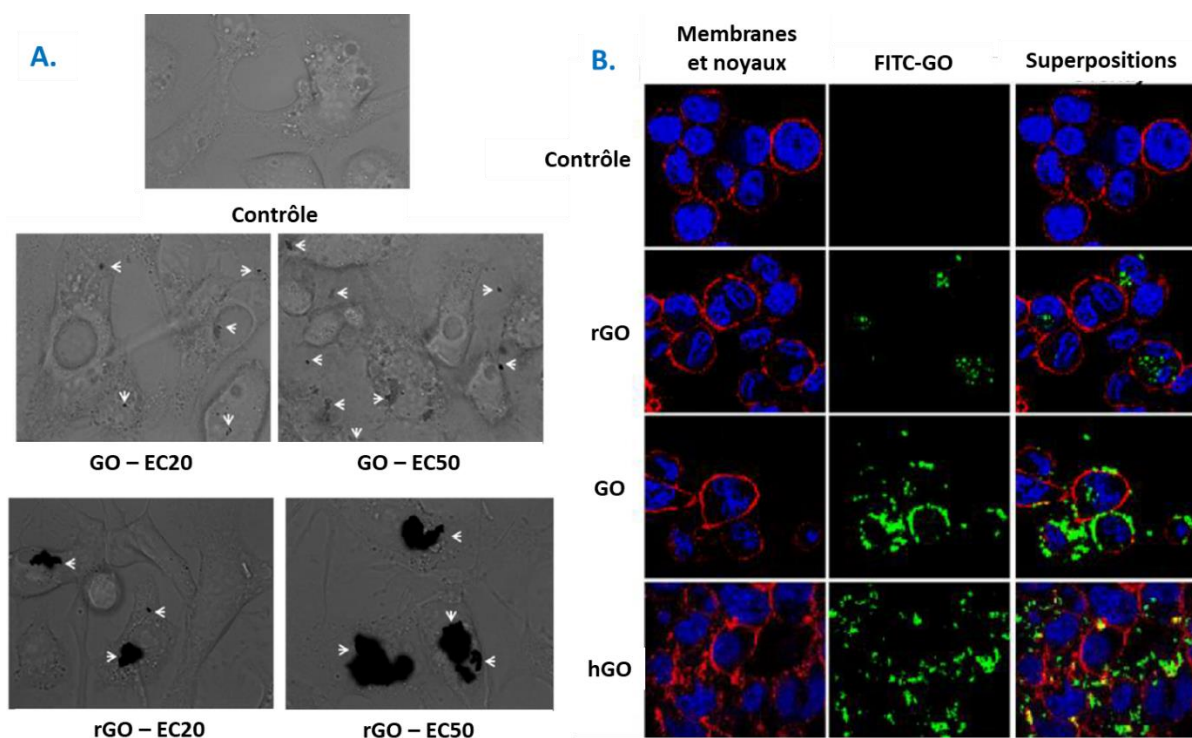


Figure 1.9 : Accumulations de nanoparticules de type graphène au sein de différentes lignées cellulaires. Issue et modifiée de N. Chatterjee *et al.*, 2014 [83] et R. Li *et al.*, 2018 [84].

A. Microscopie à contraste interférentiel montrant l'absorption et l'accumulation de GO (supérieur) et du rGO (inférieur) dans les cellules HepG2 à leurs doses respectives EC20 et EC50 (Effective Concentration). B. Imagerie confocale de cellules THP-1 après exposition au rGO, GO ou hGO (hydrated GO) pendant 16 h à 25 µg/mL.

Des expérimentations ont aussi été effectuées sur des modèles animaux (**Tableau 1.4**) tels que la souris, le rat ou le poisson zèbre [85] [86] pour évaluer la toxicité selon le mode d'administration des nanoparticules de graphène. L'équipe de X. Zhang *et al.*, 2011 [87] a montré une accumulation majoritaire du GO dans les poumons puis dans les organes liés au système réticulo-endothélial (RES) après injection par voie intraveineuse. Les organes de ce système RES sont impliqués dans l'élimination de corps étrangers et dans les phénomènes d'immunité. Les auteurs ont noté une atteinte des poumons avec inflammation et formation de granulome. En 2012, P. A. Stapleton *et al.*, [88] et en 2016, L. Mao *et al.*, [89], ont montré le passage de la barrière air - sang par des nanoparticules de MWCNT et FLG respectivement après inhalation ou gavage avec des nanoparticules retrouvées dans les organes lié au RES et dans le système digestif. Ainsi, 40 % de la dose a été éliminée dans les fèces et 40 % reste dans les poumons 28 jours après instillation de 5 µg de  $^{14}\text{C}$ -FLG chez la souris, (**Figure 1.10, A.**). Les 20 % restant des  $^{14}\text{C}$ -FLG se sont retrouvés, quant à eux, dans le foie, la rate, l'estomac, et l'intestin. Après gavage, toute la dose s'est retrouvée dans les organes du système digestif (**Figure 1.10, B.**).

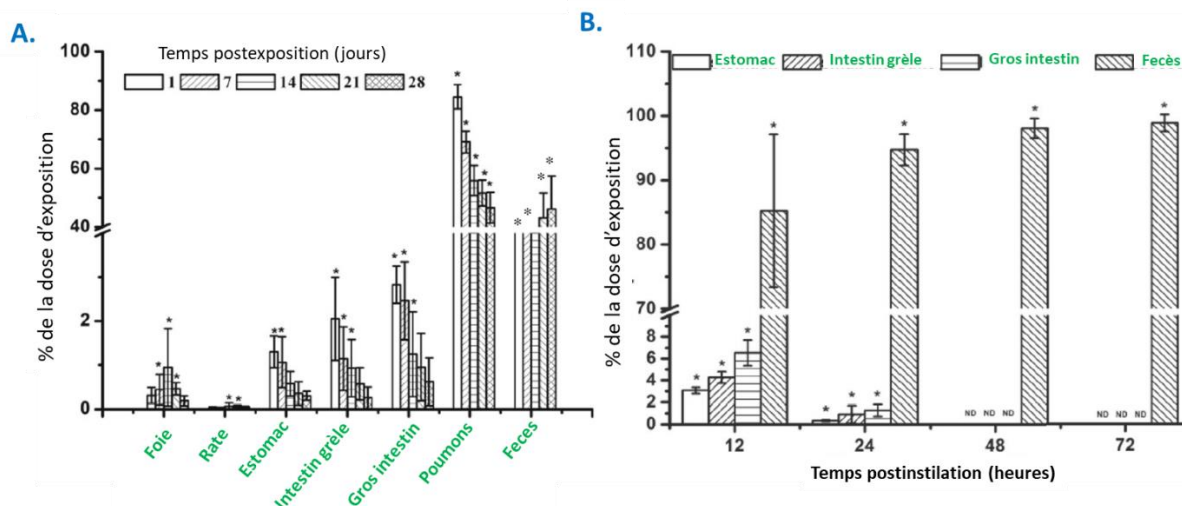


Figure 1.10 : Biodistribution du <sup>14</sup>C-FLG chez la souris. Modifiée de L. Mao *et al.*, 2016 [89].

Détection par scintillation liquide de la radioactivité retrouvée dans les différents organes après injection de 5 µg de <sup>14</sup>C-FLG chez la souris soit par instillation (A.) ou par gavage (B.). Les organes non décrits possèdent une radioactivité en dessous de la limite de détection. \* indique des différences significatives avec le groupe contrôle (P ≤ 0.05).

Ces études ont indiqué que quel que soit le mode d'administration, l'ensemble des organes peut être exposé. Malgré une réaction toxique ou inflammatoire non systématique selon les études, il reste important de diminuer le taux d'exposition à ces nanoparticules. Pour cela, des études parallèles expérimentent la fonctionnalisation du GO pour améliorer sa clairance après injection sur un modèle murin. En effet, S. Zhang *et al.*, 2011 [90] ont injecté un GO fonctionnalisé avec du dextran qui augmente la stabilité de cette nanoparticule en milieu physiologique. Grâce au dextran, le GO est premièrement accumulé dans les organes du RES mais contrairement aux études précédentes, la nanoparticule est éliminée après seulement une semaine.

Tableau 1.4 : Etude de la biodistribution des nanoparticules de type graphène chez l'animal selon le mode d'exposition. Issu de N. Kurantowicz *et al.*, 2015 [88].

Classes	Nom de la nanoparticule	Expositions	Animaux	Organes	
Graphène	Feuilles de nanographène PEGylées avec du Cy7	Intraveineuse	Souris BALB/c	Rein et excrété dans l'urine	
	Oxyde de graphène	<sup>125</sup> I-nGO-PEG		Intrapéritonéal	Foie, rate
<sup>125</sup> I-RGO-PEG		Intragastrique			Estomac, intestin
<sup>125</sup> I-nRGO-PEG					Foie, rate
<sup>125</sup> I-nGO-PEG		Intraveineuse		Poumons, Foie	
<sup>125</sup> I-RGO-PEG				Oxyde de graphène	Foie
<sup>125</sup> I-nRGO-PEG					Oxyde de graphène et Tween 80

	Oxyde de graphène	Intravitréen	Lapin blanc japonais	Globe oculaire	
	I-NGS-PEG	Intraveineuse	Souris BALB/c	Foie, rate et excréments dans l'urine	
	Nanocristaux de 60Co-Co		Souris blanches à tête grise	Foie, poumons, rate	
<b>Nanoparticules de graphite</b>	Nanoparticules de graphite	Intragastrique	Caenorhabditis elegans	Le long du corps du nématode	
<b>Nanodiamants</b>	<sup>188</sup> Re-NDs	Intratrachéale	Souris Kunming	Os, cœur, foie, poumons, rate	
	NDs-4		Souris ICR	Poumons	
	NDs-50	Foie, poumons, rate			
	<sup>125</sup> I-NDs	Rats Sprague-Dawley		Foie, poumons, rate et excréments dans l'urine	
	<sup>18</sup> F-DNPs	Intraveineuse	Souris CD1 suisses	Foie, poumons, rate et excréments dans l'urine	
			Rats Sprague-Dawley et souris BALB/c	Foie	
			Lapins Chinchilla	Pas d'agrégats mais des effets sur les paramètres biochimiques du sang	
	NDX (nanodiamant+DOX)		Sous-cutanée	Souris ICR	Région d'injection sous-cutanée, peau
	NDX (nanodiamant+DOX)				Gonade
	RUDDM (Vrai-Dzerzhinsk diamant ultra-dispersé modifié)		Intragastrique	Caenorhabditis elegans	L'intestin (voie digestive, après 20 min les FND ont été excrétés) - agrégats
	RUDDM (Vrai-Dzerzhinsk diamant ultra-dispersé modifié)	Cellules intestinales			
Nanodiamant fluorescent					
Nanodiamants fluorescents recouvert de Dextran et FND recouvert de BSA					
<b>Nanotubes de carbone à simple paroi</b>	SWCNTs	Intraveineuse	Souris CD-ICR	Foie, poumon, rate	
	SWNT-PEG2000 marqué au <sup>64</sup> Cu		Souris nues	Foie, rein, rate, intestin, poumon	
	SWNT-PEG5400				
<b>Nanotubes de carbone à parois multiples</b>	MWCNT	Intrapéritonéal	Souris Swiss-Webster	Foie	
	<sup>125</sup> I-tau-MWNTs	Intraveineuse	Souris Kunming	Foie, poumons et rate	
	<sup>125</sup> I-Tween-MWNTs			Foie, poumons, rate, estomac, reins, gros intestin et intestin grêle	

PEG = PolyÉthylène Glycol, NDs = NanoDiamants, NDX = NanoDiamant, DOX = DOXorubicine, RUDDM = Real-Dzerzhinsk ultra-disperse diamond modified), SWNT = Single Wall NanoTube, MWCNT = MultiWall Carbon NanoTube, FND = Fluorescente NanoDiamonds.

De nombreux sujets sont donc à l'étude concernant les nanoparticules de type graphène. De la bactérie à l'animal, dans un cadre environnemental ou de santé humaine, ces nanoparticules posent

questions quant à leurs effets nocifs. Même si cette toxicité peut être associée à des propriétés antibactériennes ou anticancéreuses, de nombreux résultats contradictoires restent encore à expliquer. En effet, selon la taille de la nanoparticule, son degré d'oxydation, sa fonctionnalisation et son mode d'administration, ces nanoparticules possèdent des biodistributions différentes (**Tableau 1.4**). De plus, dans les études concernant le graphène, la littérature évoque des doses d'exposition allant de 0,01 à 400 µg/mL sur des modèles cellulaires et des doses s'étendant de 5 à 250 µg/mL ou de 0,250 à 20 mg/kg selon les unités utilisées chez l'animal [91]. Cette variabilité dans les doses d'exposition souligne une certaine méconnaissance des conditions réelles d'exposition et prouve encore la nécessité de compléter et préciser ces études. C'est pourquoi, il est important d'avoir des outils analytiques performants qui permettent de les caractériser et de les analyser avec une plus grande précision.

Enfin, ces nanoparticules, avec ou sans fonctionnalisation, pourraient être utilisées comme nanovecteurs pour le transport de molécules médicamenteuses. Parallèlement, d'autres types de systèmes nanoparticulaires existent dans la littérature et leur pharmacocinétique est également très largement étudiée afin de pouvoir les employer en nanomédecine. La **partie C** qui suit sera donc consacrée à la description de ces autres nanovecteurs tels que les liposomes ou les micelles polymériques.



## B. LES AUTRES NANOVECTEURS

Les nanoparticules de type graphène ne sont pas les seuls nano-objets à se révéler utiles pour la bioingénierie et la médecine. D'autres nanoparticules également appelées nanovecteurs nécessitent qu'on leur porte une certaine attention car ils sont souvent davantage compatibles avec les milieux biologiques de par leur constitution plus hydrophile.

### I. GENERALITES

L'intérêt d'un nanovecteur est d'améliorer les propriétés physico-chimiques des principes actifs. En effet, ces molécules sont souvent hydrophobes et donc peu stables en conditions physiologiques. Les nanovecteurs facilitent la distribution des composés en améliorant leur solubilité, en les protégeant de la dégradation, en augmentant leur capacité à cibler un tissu ou une cellule et en réduisant leur toxicité.

Pour cela, un nanovecteur doit donc répondre à certaines caractéristiques [92] :

- Il doit être biocompatible et/ou biodégradable, il ne doit pas induire d'effets secondaires liés à son administration,
- Il doit présenter des propriétés de furtivité afin d'échapper au système immunitaire et ainsi éviter sa capture par des cellules du système réticulo-endothélial comme les macrophages,
- Il doit faciliter le transport de la molécule thérapeutique jusqu'à sa cible et la protéger dans les conditions physiologiques,
- Et il doit spécifiquement libérer la molécule au niveau de sa cible de manière efficace.

De plus, un nanovecteur peut être conçu différemment selon la cible à atteindre et les barrières physiologiques à franchir. Pour cela, différentes catégories existent et ont déjà été brièvement évoquées dans le début de ce chapitre sur les nanoparticules. Ces catégories sont détaillées dans la **Figure 1.11** ci-après avec les dendrimères qui possèdent une organisation macromoléculaire hyperbranchée, les liposomes constitués d'une ou plusieurs bicouches lipidiques formant ainsi un environnement lipophile et les micelles de polymères capables d'enrober une molécule. Ces nanovecteurs sont généralement synthétisés de façon à se dégrader ou se dissocier facilement une fois présents dans un organisme.

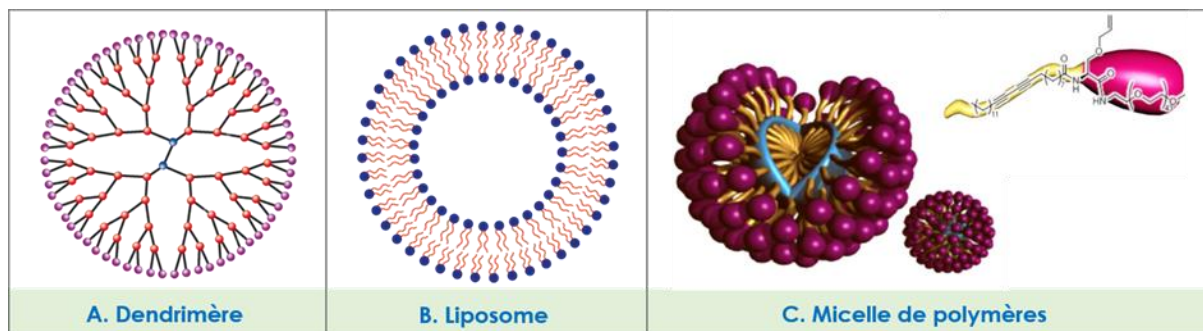


Figure 1.11 : Différents types de nanovecteurs. Issues de A. P. Singh *et al.*, 2019 [93] de la thèse d'Annaëlle Doerflinger [92]

**A.** Dendrimères : Organisation moléculaire hyperbranchée favorable aux molécules hydrophiles ou lipophiles. **B.** Liposome : bicouche lipidique qui forme un environnement favorable aux molécules hydrophiles. **C.** Micelles de polymères : polymères assemblés spontanément en milieu aqueux qui forment environnement favorable aux molécules lipophiles

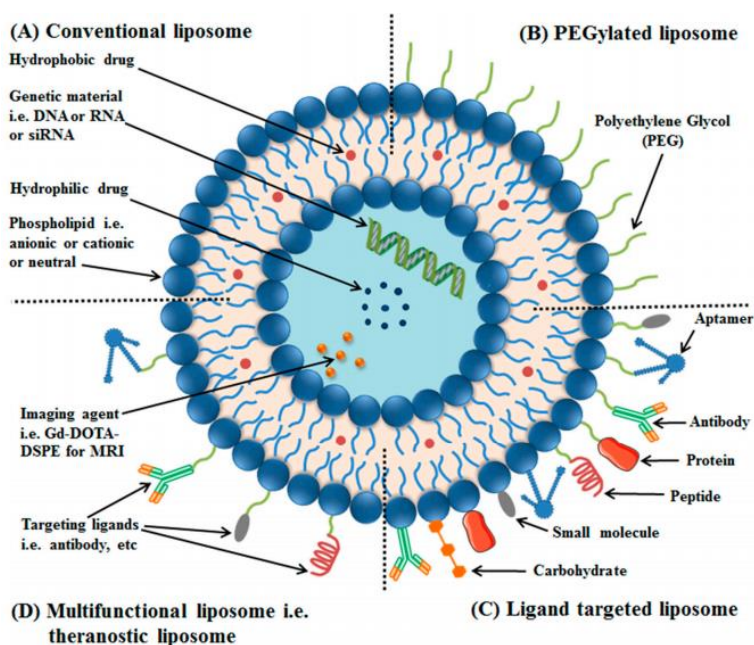
Les nanovecteurs qui seront plus amplement détaillés dans la suite de cette partie sont les liposomes et les micelles polymériques. En effet, les liposomes sont les nanovecteurs les plus connus et les plus référencés dans la littérature. Les micelles polymériques font quant à elles l'objet d'études poussées au sein des laboratoires en collaborant dans le cadre de cette thèse et correspondent donc à la thématique de recherche du **chapitre 3 de la partie B : Etudes expérimentales**.

## II. LES LIPOSOMES

Les liposomes, vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques sont les premières générations de nanoparticules utilisées comme système de délivrance de médicament [94]. Ce sont notamment les plus utilisées pour cibler le système nerveux central [95] [96] ou les tumeurs cancéreuses [97]. En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques uniques, les liposomes ont fait l'objet d'études approfondies (de façon indirecte) pour le traitement et/ou le diagnostic de maladies neurologiques, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux et les gliomes.

Selon leur utilisation, les liposomes peuvent être fonctionnalisés de façon spécifique. Les liposomes cationiques permettent par exemple une interaction entre leurs charges positives et les polyanions présents au niveau de la barrière hématoencéphalique, entraînant une endocytose après adsorption. Ainsi, S. Joshi *et al.*, 2015 [98] ont utilisé des liposomes cationiques (**Figure 1.12, A.**) injectés par voie intra-artérielle pendant une hypoperfusion cérébrale pour vérifier cette hypothèse de délivrance dans des tissus cérébraux normaux et porteurs de gliomes. Une forte absorption de liposomes cationiques par rapport aux liposomes anioniques et neutres a été prouvée par spectroscopie par réflectance diffuse (DRIFTS) et par imagerie par fluorescence.

Les liposomes peuvent également être fonctionnalisés par des ligands ciblés sur les récepteurs endothéliaux du cerveau et peuvent être utilisés afin de permettre la transcytose de la nanoparticule. En effet, H. Ding *et al.*, 2014 [99] utilisent la transferrine, protéine transportant le fer dans le sang, dans le but d'améliorer le passage de la barrière hématoencéphalique de magnétoliposomes fluorescents (**Figure 1.12, C**).



**Figure 1.12** : Différents liposomes classés selon leurs fonctionnalisations. Issue de M. K. Riaz *et al.*, 2018 [97].

**A.** Les liposomes conventionnels sont constitués de phospholipides **B.** Les liposomes PEGylés oufurtifs contiennent une couche de polyéthylène glycol (PEG) à la surface des liposomes **C.** Les liposomes ciblés contiennent un ligand spécifique pour cibler un récepteur **D.** Les liposomes multifonctionnels, comme les liposomes théranostiques peuvent servir au diagnostic et au traitement des tumeurs solides.

**1.12, C**). Ces magnétoliposomes sont utilisés pour la mise au point de stratégies déclenchant leur libération en réponse à des stimuli externes spécifiques telles que des variations de champs magnétiques. Par exemple, H. Guo *et al.*, 2015 [100] montrent que des magnétoliposomes enrobés de dextran sont capables de délivrer la doxorubicine, un médicament anticancéreux, après application d'un champ magnétique alternatif basse fréquence. D'autres systèmes existent pour répondre à un changement de température, d'intensité des ultrasons, d'impulsions lumineuses ou électriques.

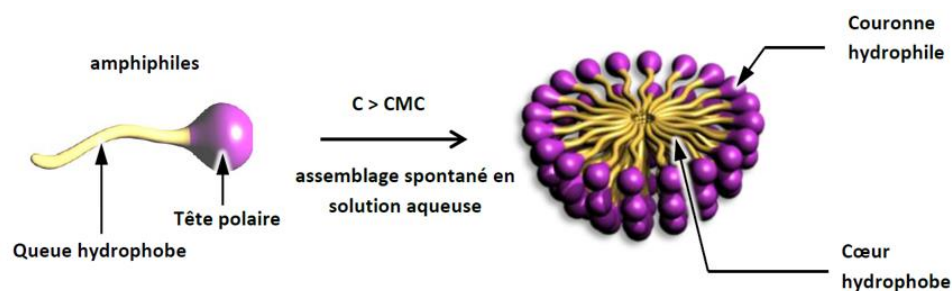
De plus, ces liposomes sont aussi très utilisés pour des applications de bioimagerie *in vivo* avec des techniques utilisant le radiomarquage [101] ou la fluorescence [102]. S. Li *et al.*, 2012 [103] ont conçu un système théranostique liposomale multifonctionnel (**Figure 1.12, D**). Leurs nanoparticules permettent l'utilisation de la résonance magnétique multimodale (RM), l'imagerie fluorescente dans le proche infrarouge (NIR) et l'imagerie nucléaire via tomographie par émission monophotonique de photons (SPECT) ou via tomographie par émission de positrons (PET). Cette approche a comme objectif la surveillance et la prédiction de distribution des médicaments administrés par des liposomes. M. Silindir-Gunay *et al.*, 2019 [104] ont développé également des liposomes d'acide folique connus pour cibler spécifiquement les tumeurs possédant des récepteurs spécifiques à cette classe de molécules. L'acide folique est en effet impliqué dans la réplication de l'ADN, la division cellulaire, la croissance et la survie des cellules en division rapide [105] [104]. Ils sont ensuite marqués au technétium 99 pour permettre l'imagerie de ces tumeurs en SPECT. Ils ont également

fonctionnalisés leurs liposomes avec du PEG (**Figure 1.12, B.**) pour accroître le temps de circulation et donc permettre une plus grande absorption de ces liposomes par les tumeurs cancéreuses.

Malgré tous ces avantages, les liposomes possèdent une faible solubilité, peuvent manquer de stabilité dans les milieux biologiques et peuvent subir des réactions d'oxydation ou d'hydrolyse. Pour pallier cela, il existe d'autres systèmes de délivrance de molécules comme les micelles polymériques. C'est ce type de molécules qui ont été utilisées lors de cette thèse et qui feront l'objet d'expérimentation dans le **chapitre 3 de la partie B** de ce manuscrit.

### III. LES MICELLES DE POLYMERES

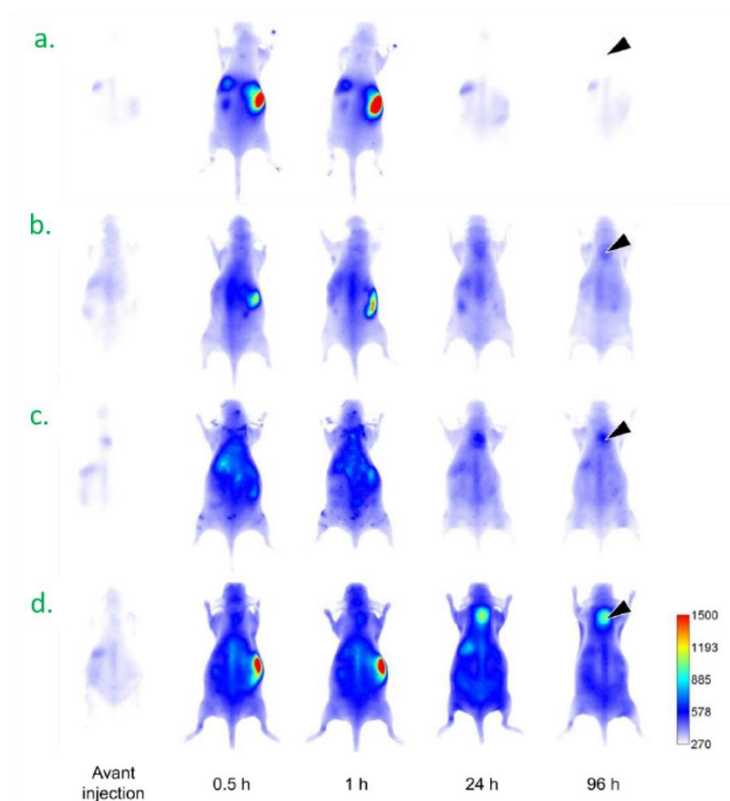
Les micelles de polymères sont constituées de polymères qui s'assemblent spontanément en micelles dans un milieu aqueux. Elles possèdent l'avantage d'avoir une plus petite taille modulable que les liposomes et une surface qui peut être modifiée via différentes fonctions selon le polymère utilisé. Les micelles de polymères sont composées d'unités monomériques qui possèdent à la fois une partie hydrophile et une partie hydrophobe. Une fois en solution aqueuse, ces unités s'assemblent d'elles-mêmes et les parties hydrophobes forment un cœur lipophile (**Figure 1.13**). Il existe donc un équilibre entre les micelles assemblées et les unités monomériques libres qui dépend de la concentration micellaire critique (CMC). Les micelles utilisées à des fins biomédicales possèdent majoritairement une taille allant de 10 à 80 nm, une CMC de l'ordre du millimolaire et un taux de chargement de 5 à 25 % de sa masse selon leur taille [106].



**Figure 1.13 : Formation des micelles de polymères. Issue de la thèse d'Annaëlle Doerflinger [92]**

La partie amphiphile est le plus souvent formée de PEG car non toxique. La partie hydrophobe peut être polymérisée grâce à la présence de fonctions polydiacétyleniques. L'optimisation et la combinaison des deux parties de l'unité monomérique peuvent donner lieu à de meilleures biodistributions des micelles et du médicament qu'elles délivrent. N. Mackiewicz *et al.*, [107] ont réalisé en 2011 une étude avec 3 types de micelles de polymère : le PDAPEG2000 (PolyDiAcétylènePEG), le PDAPEG350 et le PDANTA (PolyDiAcétylèneNitriloTriacetic Acids) encapsulant tous les trois la même sonde fluorescente (FP730). Les

résultats ont montré une fluorescence plus intense chez la souris traitée au PDAPEG2000 comparativement à celles traitées avec le PDAPEG350 et le PDANTA (Figure 1.14). Ces données semblent indiquer une plus grande absorption de la micelle PDAPEG2000 par la tumeur et une plus grande persistance dans le système sanguin.



**Figure 1.14 : Biodistribution de micelles polydiacétyleniques obtenues par imagerie planaire NIR. Issue de N. Mackiewicz *et al.*, 2011 [107]**

Après l'injection des micelles par intraveineuse chez la souris portant des xénogreffes, les images NIR ont été réalisées pour obtenir la biodistribution de **a.** FP730 seul, **b.** micelles PDANTA-FP730, **c.** micelles PDAPEG350-FP730, **d.** micelles PDAPEG2000-FP730. Comparaison du côté dorsal avec des flèches indiquant les tumeurs 96 h après l'injection.

Ces nanoparticules ou nanovecteurs telles que les micelles polymériques et les nanoparticules de type graphène sont donc étudiés via de nombreuses techniques d'analyse et d'imagerie dans le but d'étudier leur biodistribution au sein d'organismes biologiques. Pour cela, un large panel de techniques analytiques est disponible. Elles possèdent chacune leur spécificité et sont souvent très complémentaires. Ces diverses techniques seront présentées dans la **partie D** suivante.

## C. LES TECHNIQUES D'ANALYSE DES NANOPARTICULES

Selon leurs formes et leurs tailles, les nanoparticules peuvent avoir des biodistributions ou des toxicités différentes. Il est donc important de savoir caractériser avec précision ces nanoparticules. Pour cela, différentes méthodes existent pour la caractérisation des nanoparticules ou pour l'imagerie *in vivo* de celles-ci (Tableau 1.5). D'une part, la DLS qui est une technique d'analyse spectroscopique basée sur la diffusion dynamique de la lumière ou le SAXS qui se base sur la diffusion des photons au travers de l'échantillon fournissent des informations sur les propriétés structurales sur des nanomatériaux à une échelle allant de 1 à 100 nm. Ces techniques permettent une caractérisation fine des nanoparticules. D'autre part, il existe des techniques d'imagerie permettant l'étude de leur devenir *in vivo*. Ces techniques correspondent notamment à la microscopie électronique à transmission ou à l'imagerie à rayons X et permettent une visualisation directe des nanoparticules. Il y a également, la fluorescence, la radioimagerie ou le PET qui nécessitent un marquage préalable des nanoparticules ou encore l'ICP-MS, qui est une méthode d'analyse sans marquage. Ces techniques possèdent chacune leurs avantages et inconvénients pour la mesure des propriétés physiques ou l'imagerie des nanoparticules. Cependant, pour l'étude de la biodistribution des nanoparticules, la suite du paragraphe s'intéressera uniquement aux techniques d'imagerie les plus fréquemment utilisées pour l'analyse de nanoparticules.

Tableau 1.5 : Techniques d'analyses pour les nanoparticules.

	Techniques	Type de nanoparticules	Avantages	Inconvénients
Caractérisations	DLS (Dynamic Light Scattering)	Suspensions	Rapide, information structurale	Pas de visualisation de la nanoparticule
	SAXS (Small Angle X-Ray)	Solutions, solides et poudres		
Imageries	TEM (Transmission Electron Microscopy)		Résolution en angström [108] [109]	
	Rayon X	Substances cristallines de 1 à 100 nm		
	ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry)	Métaux [110]	Analyses de biomatériaux [111]	
	Florescence	Fonctionnalisées	Spécificité	Reconnaissance nécessaire
	PET (Positron Emission Tomography)			
	Radioimagerie	Radiomarquées	Grande sensibilité	Radiomarquage nécessaire
	Imagerie par spectrométrie de masse	Marquées et non marquées	Caractérisation structurale	Sensibilité

L'imagerie des nanoparticules a donc deux objectifs : le premier vise à les détecter afin d'étudier leur devenir dans des échantillons variés. Le second a pour but d'employer ces nanoparticules comme

vecteurs d'information et ainsi utiliser leurs propriétés intrinsèques pour l'imagerie d'autres molécules. Cette liste de techniques d'imagerie pour les nanoparticules n'est pas exhaustive mais fixe une représentation de la diversité des méthodes existantes pour l'étude de ces objets. Chacune possède ses avantages, comme la spécificité de détection ou la quantification absolue, et il peut être intéressant d'exploiter la complémentarité de ces techniques permettant une analyse structurale plus fine afin d'obtenir des outils analytiques puissants. Les techniques d'imagerie par spectrométrie de masse sont peu représentées pour l'analyse de nanoparticules alors que la caractérisation structurale est importante dans les notions de biodistribution. Cet aspect est donc détaillé dans la partie expérimentale de cette thèse. Pour cela, le chapitre suivant sera donc consacré à la présentation de l'imagerie par spectrométrie de masse. Une description détaillée des protocoles de MSI sera présentée allant de la préparation des échantillons jusqu'au traitement des données. Les étapes clés seront détaillées ainsi que les avantages et difficultés qu'elles présentent. Une réflexion sera également proposée sur la position de la MSI parmi les méthodes d'imagerie déjà existantes à la fois dans un contexte quantitatif et dans un contexte de biodistribution.



## Chapitre 2 : L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

---

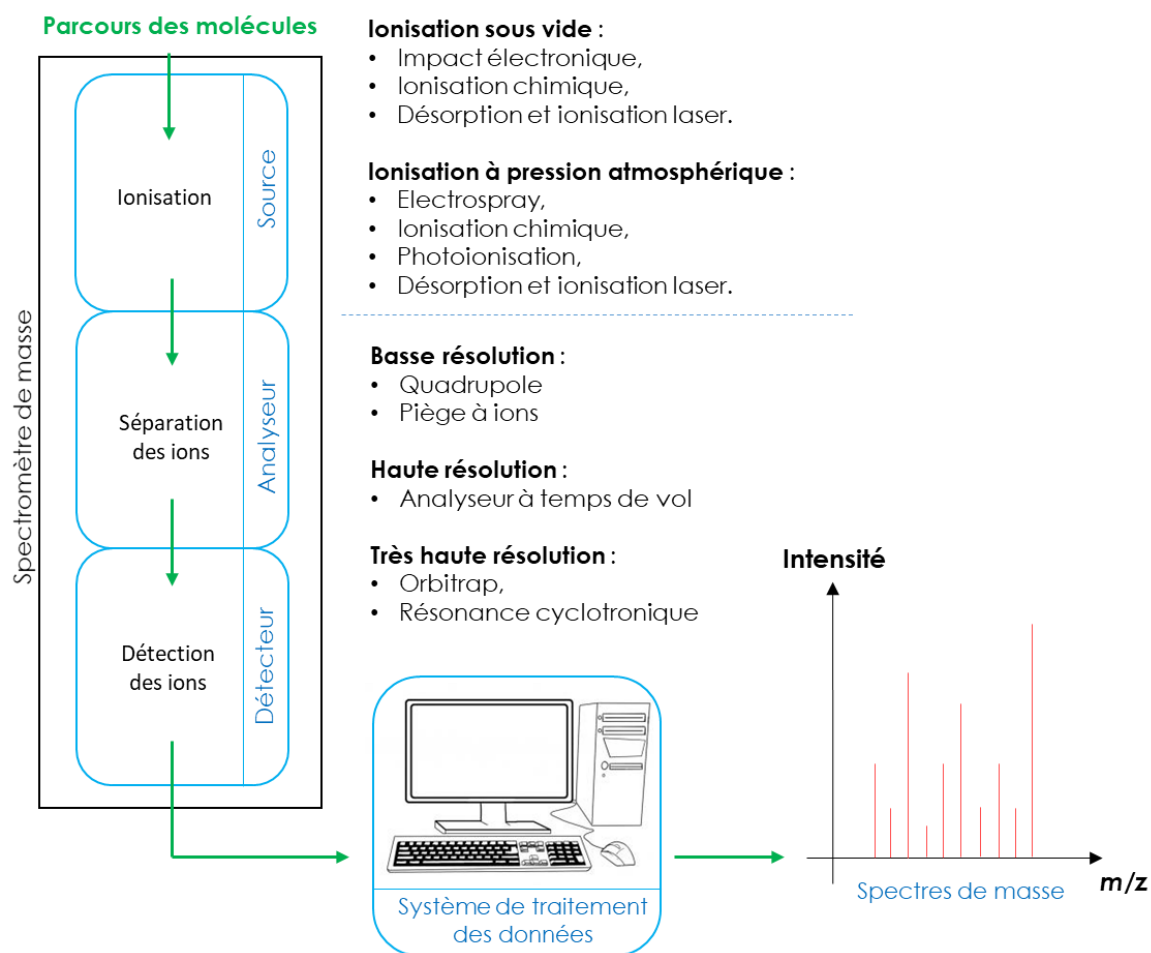
DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES





## A. PRINCIPE GENERAL DE LA SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de mesurer le rapport masse sur charge ( $m/z$ ) de composés afin d'obtenir des masses ou des informations structurales précises. Ces analyses se font au moyen d'un spectromètre de masse qui est composé de quatre modules distincts : une source, un analyseur, un détecteur et un système de traitement des données (**Figure 2.1**). Les molécules sont premièrement ionisées dans une source puis les ions obtenus sont accélérés et focalisés pour ensuite être transmis vers un analyseur où ils sont séparés selon leur  $m/z$ . Le signal ionique est enfin détecté et amplifié afin de dénombrer l'abondance des ions. Il est ensuite traité par un système informatique afin d'obtenir un résultat sous la forme d'un spectre de masse (**Partie C., Annexe 3**).



**Figure 2.1 : Organisation d'un spectromètre de masse.**

Un spectromètre de masse est composé d'une source, d'un analyseur, d'un détecteur et d'un système de traitement de données. La source permet une ionisation des composés sous vide ou à pression atmosphérique. Ces ions sont ensuite envoyés dans l'analyseur pour y être séparés et analysés à une résolution spectrale allant de la basse à la très haute résolution. Les ions sont ensuite détectés puis le signal est converti en spectre de masse exprimant l'intensité en fonction du rapport masse sur charge des molécules analysées.

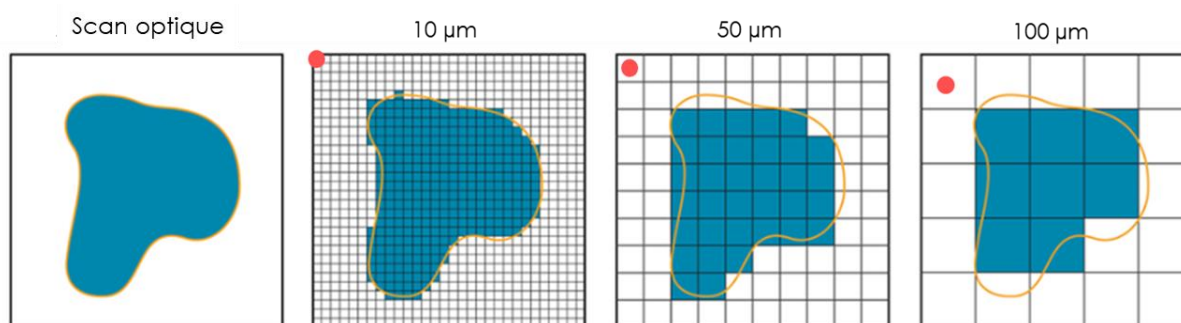
## B. L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Ces étapes d'ionisation, séparation et détection sont également applicables à l'imagerie par spectrométrie de masse. Cependant, la MSI nécessite des sources d'ionisation particulière qui permettent l'analyse d'échantillons solides. Après une présentation générale de la MSI, ces sources seront décrites dans le **paragraphe II** suivant. Ensuite, les méthodes de préparation d'échantillons en MALDI - MSI seront plus particulièrement présentées car elles sont utilisées dans la partie expérimentale de cette thèse.

### I. PRINCIPES GENERAUX DE L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

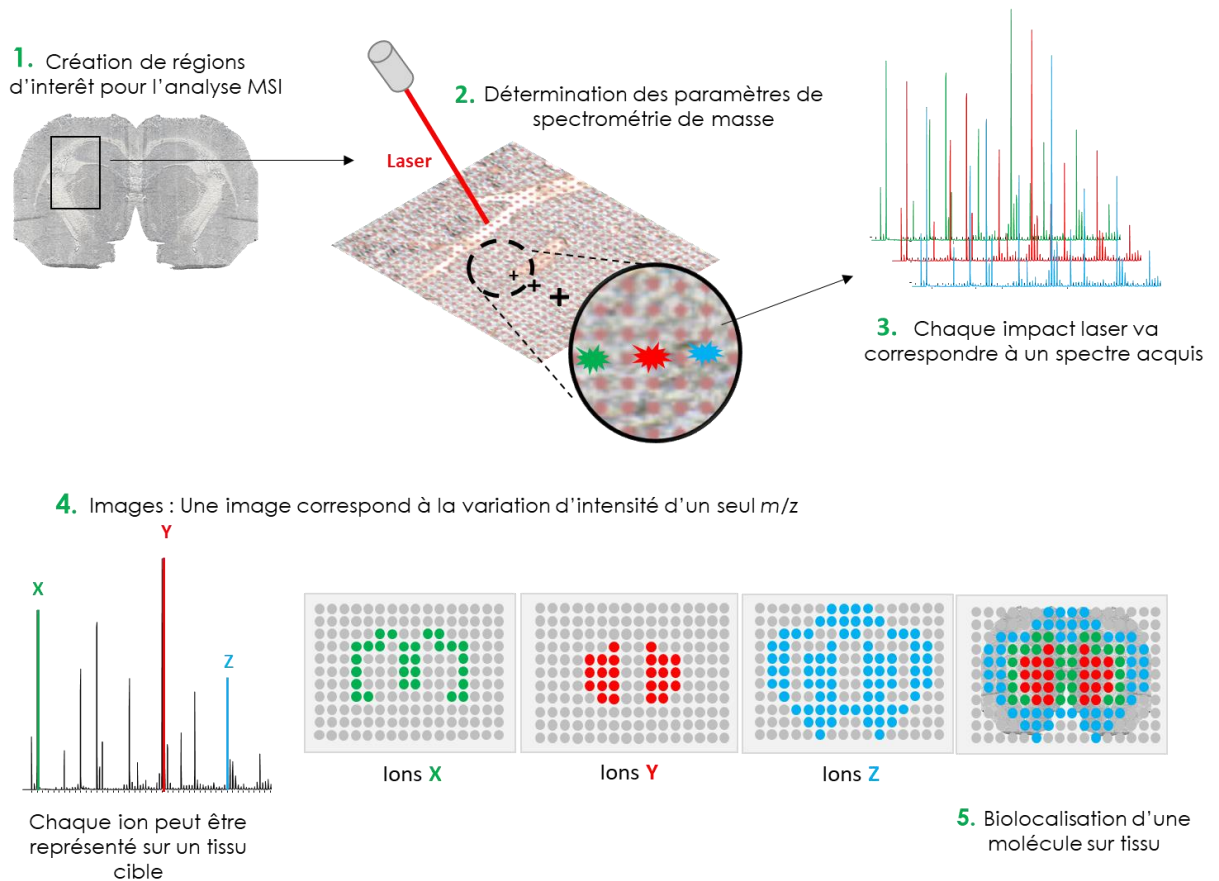
La spectrométrie de masse est devenue une technique très largement utilisée pour l'analyse de molécules et notamment de biomolécules. Le développement croissant d'outils informatiques de traitement de données a permis de lui associer une composante supplémentaire qui est l'imagerie. Depuis sa première description en 1997 par le groupe de R. Caprioli [4], la MSI est devenue de plus en plus utilisée en biologie où la composition moléculaire au sein des matrices biologiques est de plus en plus nécessaire afin de relier biodistribution, fonctions biologiques et structures moléculaires [112]. De ce fait, la MSI est employée en pharmacologie avec l'étude de la pharmacodynamique ou encore de la pharmacocinétique pour l'analyse de molécules à visée thérapeutique [113]. De plus, les analyses en lipidomique [114] [115] [116], protéomique [117] [118] [119] ou métabolomique [120], [121] se développent également *in situ* grâce à la MSI et s'appliquent largement à la recherche de biomarqueurs dans un contexte clinique.

La MSI, qui consiste donc à analyser et localiser des molécules au sein de tissus, a pour objectif principal de réaliser des cartographies moléculaires. A partir de régions d'intérêt au sein de tissus cibles, l'acquisition de spectres de masses à différentes coordonnées va permettre la représentation de plusieurs molécules avec une résolution spatiale moyenne de 20  $\mu\text{m}$  et pouvant descendre en dessous du micron [122] [123]. Cette résolution spatiale correspond à la distance parcourue sur le tissu entre deux acquisitions. En MSI, on parle souvent de « raster », c'est à dire la taille des pixels représentés après acquisition (**Figure 2.2**).



**Figure 2.2 : La résolution spatiale en MSI selon le « raster » utilisé.**

La forme bleue représente une coupe de tissu. Le quadrillage représente la résolution spatiale de l'image et le rond rouge représente le point d'impact de la source d'ionisation.



**Figure 2.3 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse**

Sur une région d'intérêt (1.), le laser parcourt avec des paramètres précis (2.) la coupe de tissu afin d'acquérir en chaque point un spectre de masse. Au sein de ces spectres de masses (3.), un rapport masse sur charge est sélectionné afin de représenter l'image moléculaire (4.) de la molécule ciblée. Il devient donc possible de représenter la biodistribution (5.) d'une molécule ou de mettre en évidence la co-localisation de plusieurs molécules.

Un spectre de masses est ainsi acquis pour chaque position et au sein de ces spectres, un ion précis va être sélectionné afin d'obtenir sa biodistribution (**Figure 2.3**). Cette technique possède l'avantage de pouvoir recréer des images moléculaires sans avoir besoin d'étapes spécifiques de marquage (radioactivité, fluorescence, immunohistochimie) lors de la préparation des échantillons. Il est également possible de cibler une molécule d'intérêt pour procéder à sa quantification ainsi que celles de ses métabolites secondaires.

Selon l'organe analysé, les coupes de tissus peuvent être homogènes tel que le foie ou hétérogènes tels que le cerveau ou la rate. Selon la composition moléculaire en différents points de la coupe, le rendement d'ionisation pour une molécule donnée peut varier. Ce phénomène est ainsi appelé l'effet matrice. Afin de le prendre en compte, différentes méthodes sont à mettre en place lors de la préparation des échantillons ou lors du retraitement des données et qui implique la normalisation du signal. Ces protocoles seront abordés dans la suite de ce chapitre

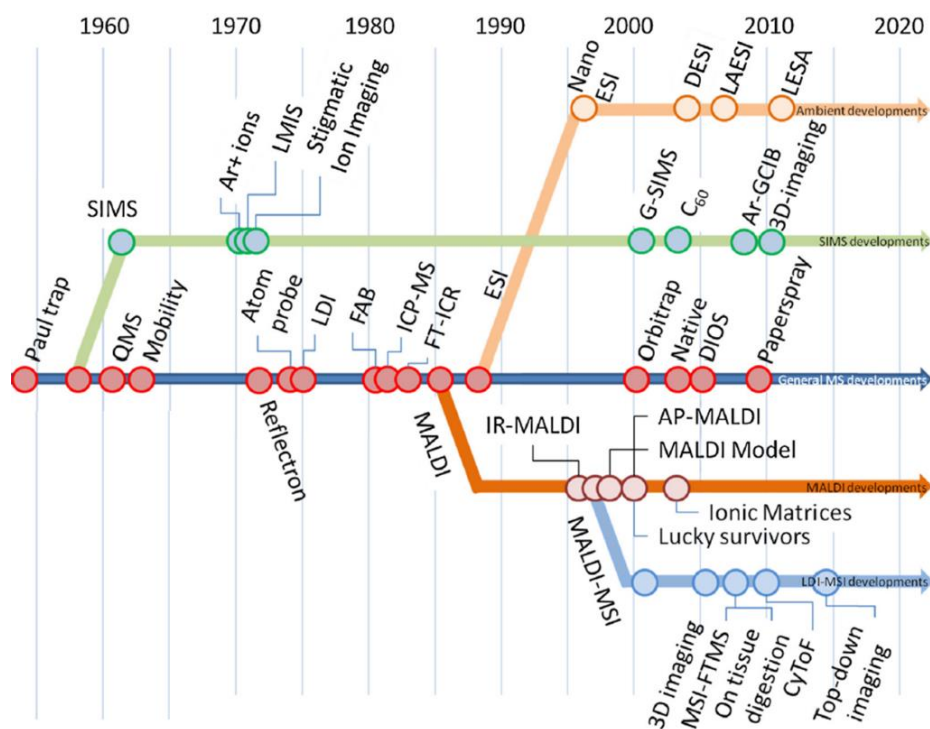
La maîtrise des différentes étapes de la préparation des échantillons en MSI est donc nécessaire pour obtenir des images à des résolutions spatiales pouvant descendre jusqu'au micron. Ces étapes seront donc

présentées dans le **paragraphe IV.** de cette partie. Cependant, il existe différentes sources pour la réalisation d'image par spectrométrie de masse et chacune nécessite des préparations d'échantillons différentes. Pour cela, il est important de connaître qu'elle sera la source d'ionisation à utiliser. Ces sources sont donc détaillées dans l'**Annexe 3.**

## II. INSTRUMENTATIONS POUR L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

### 1. LES PRINCIPALES SOURCES D'IONISATION

Les avancées technologiques qui ont permis l'amélioration de la MSI concernent en grande partie la conception de nouvelles sources d'ionisation (**Figure 2.4**). Afin de réaliser des images en spectrométrie de masse, des sources d'ionisation en phases solides sont utilisées et les trois principales sont l'ionisation par un faisceau d'ions primaires qui correspond à la source SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), la désorption par électronébullisation nommée DESI (Desorption electrospray ionization) ou encore assistée d'une matrice MALDI [124] [125]. Ces sources, plus amplement détaillées dans la **Partie C., Annexe 3** ont été développées successivement entre 1960 et 2005 et possèdent chacune leur spécificité d'ionisation.



**Figure 2.4 : Chronologie de l'instrumentation pour l'imagerie par spectrométrie de masse. Issue de R.M.A. Heeren, 2015 [126]**

La flèche bleue foncée correspond au développement général de la MSI, la flèche verte aux développements de la source SIMS et la flèche orange foncée à ceux associés au MALDI. La flèche orange pastel indique les avancées des sources à atmosphère ambiante alors que la flèche bleu clair introduit les développements en LDI - MSI.

Chacune de ses trois sources possède donc des avantages et des inconvénients correspondant aux mécanismes considérés d'ionisation (**Tableau 2.1**). La source SIMS permet de réaliser des images à des résolutions spatiales inférieures au micron mais le mode d'ionisation par faisceau d'ions peut engendrer une importante fragmentation des molécules. Cette source peut donc parfois rendre l'interprétation des données spectrales compliquée. Au contraire, la source DESI permet une extraction des molécules sous leur forme protonée ou déprotonée et facilite ainsi l'attribution et l'annotation des pics obtenus. Cependant, l'utilisation d'un aérosol pour la désorption des ions diminue grandement la résolution spatiale des images acquises. La source MALDI permet quant à elle une résolution spatiale intermédiaire qui varie de 10 à 150  $\mu\text{m}$  selon les études référencées dans la littérature. Par ailleurs, cette source permet de réaliser une ionisation selon le type de molécules à détecter grâce à l'existence d'un large panel de matrices qui aide au processus de désorption/ionisation sur tissu.

**Tableau 2.1 : Comparaison des sources SIMS, DESI et MALDI. Inspiré de D. Touboul *et al.*, 2011 [127]**

Sources	Résolution spatiale	Détection	Préparation des échantillons	Les analyseurs associés
SIMS	< 1 $\mu\text{m}$	Ions élémentaires ou fragmentés, lipides	Parfois, un dépôt métallique	Orbitrap, TOF, TOF/TOF
MALDI	10 à 150 $\mu\text{m}$	Dépend de la matrice utilisée	Dépôt d'une matrice MALDI	TOF/TOF, Q-TOF, FT-Orbitrap, FT-ICR, ion mobility-Q-TOF, QqQ
DESI	200 $\mu\text{m}$	Lipides, peptides, métabolites. Les molécules les plus abondantes	Aucune	Q-TOF, FT (Orbitrap)

La source MALDI représente donc un bon compromis entre résolution spatiale et possibilité de détection des molécules présentes au sein de tissus biologiques. Cependant, cela implique l'ajout d'une étape lors de la préparation des échantillons pour la réalisation d'analyses MSI.

## 2. LES ANALYSEURS POUR LA MSI

L'obtention d'images biologiquement explorables passe par le couplage de ces sources à des analyseurs à haute résolution. De plus, les sources utilisant des moyens d'ionisation pulsée comme les lasers ou les faisceaux d'ions induisent une formation d'ions par paquets successifs et sont plutôt associées aux analyseurs quadripolaires, à temps de vol (TOF = Time Of Flight) ou à résonance cyclotronique.

Récemment, un certain nombre de développements instrumentaux ont eu lieu pour la MSI dans le but d'augmenter le pouvoir résolutif, la précision de mesure ainsi que les capacités  $\text{MS}^2$  des analyses [124] (**Tableau 2.2**). Ces paramètres sont plus amplement détaillés dans la **Partie C., Annexe 3**. L'analyseur à temps de vol, qui est un outil de choix pour la MSI MALDI et SIMS, possède une grande vitesse d'acquisition grâce à des lasers de 20 KHz, une résolution de détection de l'ordre du ppm et une gamme de masses (jusqu'à 5000  $m/z$  en reflectron) qui le rendent très attrayant pour l'imagerie. Le développement des sources MALDI

couplées à des analyseurs de masse à haute résolution tels que le FT-ICR et FT-Orbitrap (FT-MS) ont également favorisé la séparation des ions isobares issus de petites molécules tels que les lipides et a ainsi amélioré l'annotation des jeux de données grâce aux formules élémentaires. D'autre part, l'ajout d'un second TOF ou d'un quadripôle en amont de l'analyseur principal a été préconisé pour apporter un aspect de caractérisation structurale supplémentaire aux analyses MSI.

Tableau 2.2 : Les analyseurs pour la MSI. Modifié et adapté de F. Fenaille *et al.*, 2017 [128], et de J. L. Noris et R. M. Caprioli, 2013 [129]

Analyseurs	Résolution ( $m/\Delta m$ )	Gamme de masses ( $m/z$ )	Précision (ppm)	Débit (pixel/s)	MS/MS
TOF linéaire	$10^3$	0 – 1 000 000	200	2 – 5	/
TOF reflectron	$10^3 - 10^4$	0 – 100 000	1 - 2	2 – 5	MS <sup>2</sup>
TOF/TOF	$10^3 - 10^4$	0 – 10 000	1 - 2	2 – 5	MS <sup>2</sup>
Q-TOF	$10^3 - 10^4$	100 – 6 000	1 - 5	< 1	MS <sup>2</sup>
Piège à ion linéaire	$10^2 - 10^3$	50 – 3 000	50 - 500	< 1	MS <sup>n</sup>
Triple quadripôle	$10^2 - 10^3$	50 – 5 000	5 - 500	> 100	MS <sup>2</sup>
FT-orbitrap	$10^4 - 10^5$	50 – 10k	< 1	< 1	MS <sup>2</sup>
FT-ICR	$10^4 - 10^6$	100 – 10k	< 1	1 – 3	MS <sup>n</sup>

Actuellement, les méthodes de MSI doivent donc faire des compromis entre des critères de vitesse, spécificité, résolution spatiale et de sensibilité [113]. Les instruments FTMS de haute spécificité sont donc privilégiés pour une précision de masse inférieure à 1 ppm et un pouvoir de résolution pouvant aller jusqu'à un million ( $m/z$  400). Cependant, pour des analyses beaucoup plus rapides les instruments TOF sont favorisés (Annexe 3, B.).

Malgré l'utilisation d'instrument à haute résolution spectrale comme les MALDI-FTICR, la caractérisation structurale de molécules sur tissu peut s'avérer compliquée de par l'analyse de milieu biologique complexe. Pour cela, différentes stratégies sont développées dans la littérature afin d'avoir des informations supplémentaires à la simple précision de masse.

### 3. LA CARACTERISATION STRUCTURALE EN MSI

La caractérisation structurale en imagerie par spectrométrie de masse est également un aspect important à considérer. L'utilisation d'analyseurs à haute résolution spectrale permet d'obtenir des précisions en masse de l'ordre du ppb mais parfois, la précision de masse peut ne pas être suffisante pour différencier certaines espèces moléculaires. Pour cela, différents recours peuvent être envisagés et afin de réaliser des analyses MSI avec une caractérisation structurale plus précise, certaines études ont proposé la réalisation d'images acquises en MS/MS. Par exemple, M. L. Manier *et al.*, 2011 [130] ont réalisé des images MS<sup>2</sup> avec un MALDI - LTQ - XL (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) et après dérivatisation de l'isoniazid, médicament anti-

tuberculose, avec le trans-cinnamaldehyde sur des tissus provenant d'animaux infectés. B. Flinders *et al.*, 2017 [131], ont également utilisé une méthode MRM avec un MALDI-Q-TOF (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) afin d'obtenir des images spécifiques de la cocaïne en ciblant le produit de fragmentation majoritaire de cette molécule sur des échantillons de cheveux. Ces images acquises en MS<sup>2</sup> permettent d'obtenir une validation structurale de la molécule cible dans un environnement moléculaire très varié avec de possible interférence en masse.

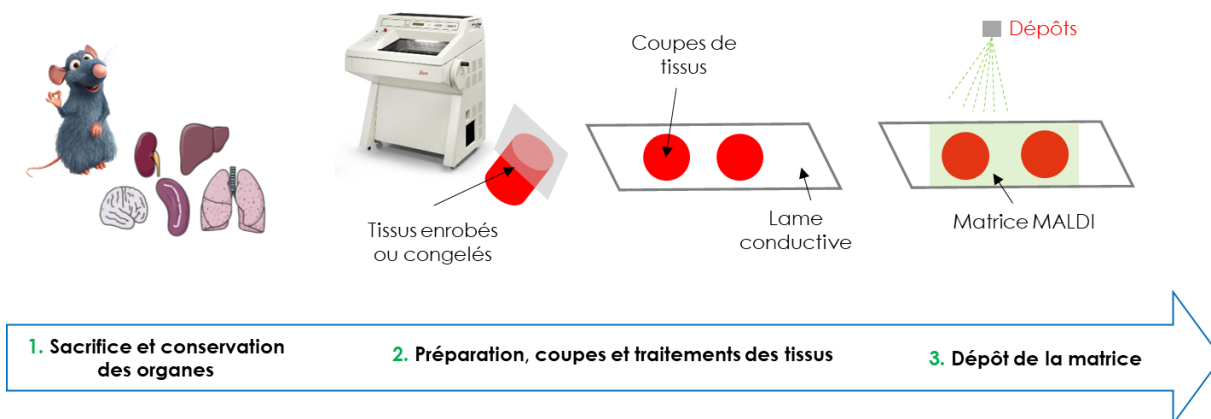
Certaines équipes proposent quant à elle des améliorations technologiques et méthodologiques afin d'améliorer la caractérisation moléculaire sur tissus. B. M. Prentice *et al.*, [132] ont proposé en 2016 une méthodologie afin de pouvoir créer plusieurs évènement TOF/TOF après un seul tir laser en source MALDI afin d'accroître la spécificité d'analyse. D'autre part, des avancées instrumentales tel que le couplage du temps de vol à mobilité ionique [133] avec l'imagerie par spectrométrie de masse a récemment permis de faciliter l'étude de matrices biologiques complexes sur tissus. L'ajout de cette étape de séparation en phase gazeuse avant l'analyse MS permet l'amélioration de la détection des ions de faible abondance ainsi que la séparation des ions isobares des espèces moléculaires.

La caractérisation structurale grâce à la précision de masse et/ou l'utilisation d'analyses MS<sup>2</sup> permet de s'affranchir des interférences possibles au sein de la matrice complexe que représentent les coupes tissulaires analysées en MSI. Cette résolution spectrale et la spécificité des analyses MS<sup>2</sup> peuvent également permettre d'améliorer la qualité de la résolution spatiale en évitant ainsi les interférences en masse. Cependant, cette résolution spatiale est également fonction de toutes les étapes de préparation des échantillons réalisés en amont des analyses MSI. Le bon déroulement de ces étapes est donc décrit dans le paragraphe suivant.

### III. TECHNIQUES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LES ANALYSES MSI

L'utilisation de la MSI, notamment dans les domaines de la recherche médicale et pharmaceutique, requiert une grande précision dans la préparation des échantillons ainsi que dans l'analyse. Cette précision impacte notamment la résolution spectrale des appareils de spectrométrie de masse mais également la résolution spatiale de l'image. Les différentes étapes du protocole de préparation des échantillons (**Figure 2.5**) [125] doivent donc préserver l'intégrité des échantillons. Pour cela, un soin particulier doit être apporté à la préparation des échantillons et différents protocoles peuvent être utilisées afin d'optimiser les conditions d'analyses.





**Figure 2.5 : Les étapes principales de la préparation des échantillons en analyses MSI.**

La première étape consiste en la conservation des organes après sacrifice de l'animal (1.). Ensuite les tissus sont coupés à une épaisseur donnée puis déposés sur une lame. La matrice est ensuite appliquée (2.) sur les tissus puis l'acquisition est réalisée pour l'obtention d'images moléculaires (3.).

Selon l'étude réalisée, la collecte des échantillons peut être différente. En effet, en MSI de nombreuses thématiques de recherche peuvent être abordées et notamment l'étude des plantes [134], des insectes [135], des cellules [136] ou encore des tissus humains. Les étapes qui seront présentées par la suite concerneront en grande partie la préparation de tissus animaux car les travaux de cette thèse se basent sur ce modèle.

L'étude peut porter sur l'analyse d'un corps entier ou seulement d'organes cibles qui vont alors être prélevés. Dans ce cas, les procédures classiques pour la préparation d'échantillon en imagerie par spectrométrie de masse sont donc les suivantes [125] [137] [138]. Premièrement, les tissus sont prélevés suite à une biopsie ou un prélèvement post-mortem. Ensuite, différents procédés de stabilisation de l'échantillon peuvent être mis en place avant de les conserver à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . L'organe ou le corps entier sont ensuite découpés à l'aide d'un cryostat ou d'un microtome. Pour cela, ils peuvent être enrobés ou non dans un matériau facilitant leur découpe. Selon les tissus, l'épaisseur et la température de coupe sont optimisées [129] afin d'obtenir une coupe fine entre 5 et 20  $\mu\text{m}$ . La taille de la coupe peut influencer l'ionisation des molécules lors de l'analyse MSI. La coupe est ensuite déposée sur une lame conductrice et préparée de façon spécifique selon les objectifs de l'étude ou la source d'ionisation utilisée. Enfin, les tissus sont analysés en spectrométrie de masse et un traitement des données adapté va permettre de générer les images moléculaires.

La qualité de l'analyse MSI va donc dépendre de la conservation de l'échantillon, de la qualité de sa découpe, des différents traitements qui lui seront appliqués et de la façon dont sera déposée la matrice MALDI.

### 1. DU SACRIFICE DE L'ANIMAL A LA CONSERVATION DES ORGANES

Selon le type d'étude réalisée, différents protocoles peuvent être appliqués aux échantillons [139] [140]. En effet, le conditionnement du tissu va grandement influencer l'analyse MSI en modifiant potentiellement la biodistribution des analytes, leur intégrité et donc leur sensibilité de détection. Après le prélèvement des tissus, différents protocoles de traitement post-mortem peuvent être utilisés dans le but de les conserver et bloquer toute activité enzymatique. Pour cela, deux méthodes principales sont généralement envisagées : la congélation instantanée ou la stabilisation thermique [141]. I. A. Mulder *et al.*, 2016 ont comparé ces deux protocoles impliquant une congélation à l'azote liquide et une thermostabilisation à 95 °C. Ils ont ainsi prouvé en comparant ces deux techniques que pour l'analyse de métabolites dans des coupes de cerveau de souris sur une gamme de masse de 50 à 1000  $m/z$ , le protocole de conservation avait une grande influence sur leur détectabilité. Ils ont montré, une perte dans la détection de métabolites tels que le fumarate, l'hydroxyproline, le malate, le glutamate, la glutamine et l'inosine après stabilisation thermique (**Figure 2.6**). Ces métabolites sont cependant détectés au sein de coupes de cerveaux de souris directement congelés. Malgré la désactivation des enzymes via la stabilisation thermique cette technique semble toutefois induire une dégradation des métabolites les plus labiles. La conservation des organes par congélation semble la plus prometteuse pour des organes issus de modèles animaux.

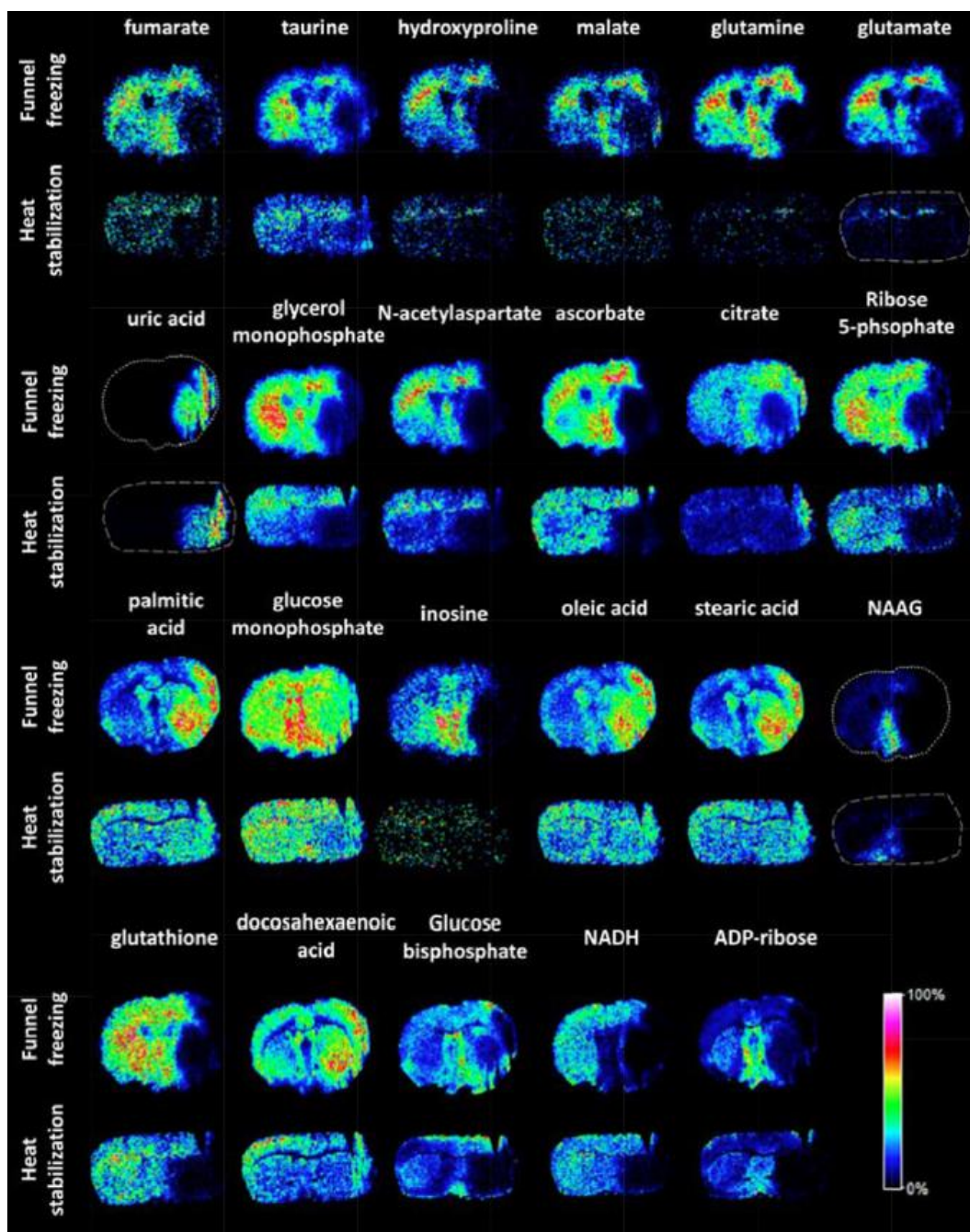


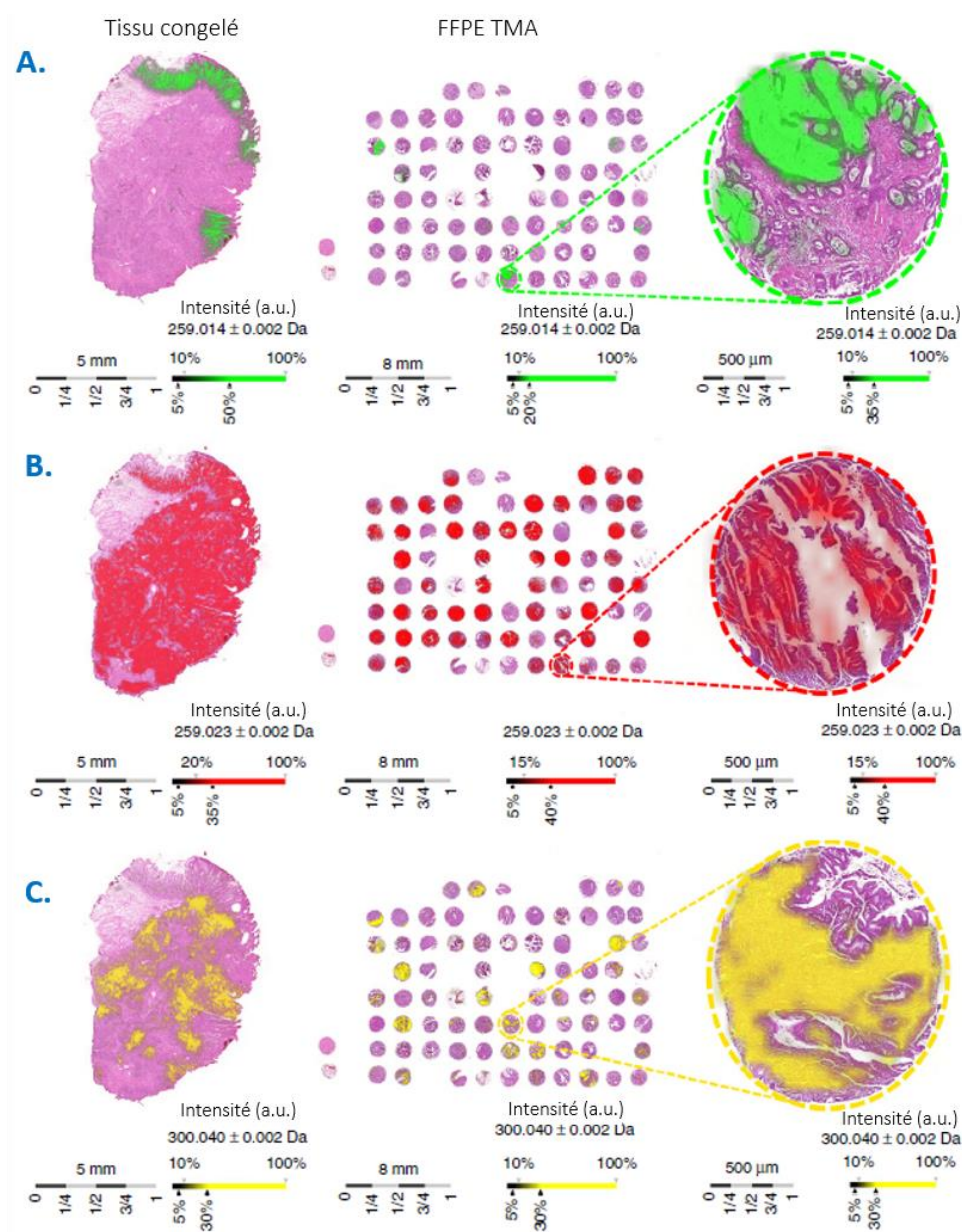
Figure 2.6 : Différence de détection selon le mode de conservation des échantillons. Issue de I.A Mulder *et al.*, 2016 [141]

Images MSI de métabolites cérébraux analysés en ionisation négative avec la matrice MALDI 9-AA par MALDI - FT - ICR après congélation ou thermostabilisation.

De ce fait, une majorité d'analyses MSI se pratique donc sur tissus congelés afin de faciliter et de ne pas biaiser la démarche analytique. Les organes sont soumis à une congélation rapide dans le but de conserver leur morphologie et leur intégrité moléculaire. Cette technique permet d'éviter la formation de caillots de sang et de dommages cellulaires. Il existe différentes techniques de congélation instantanée : l'utilisation d'azote liquide ou d'isopentane à  $-45^{\circ}\text{C}$  avec de la carboglace ou de l'azote liquide. La seconde méthode est un procédé privilégié pour la congélation des tissus car l'azote liquide peut entraîner des fissures

ou la fragmentation des organes. La congélation de corps entiers peut se faire quant à elle sur la carboglace dans un bain d'hexane. Selon la taille de l'animal, la congélation peut prendre entre 5 et 15 minutes [138]. Une fois les tissus congelés, ils sont ensuite conservés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  avant l'étape de découpe. Lors de cette étape, les échantillons doivent être traités avec la plus grande précaution.

Parallèlement au protocole de congélation, un second protocole de conservation des échantillons existe tels que la fixation des tissus. En effet, certaines applications en recherche nécessitent la mise en œuvre de protocoles de fixation afin de conserver des tissus humains dits sensibles tels que des biopsies. A titre d'exemple, la recherche médicale utilise des protocoles cliniques qui induisent une fixation des tissus dans du formaldéhyde puis dans la paraffine [142] pour conserver les tissus après diagnostic. Ces tissus nommés tissus FFPE (Formalin – Fixed, Paraffin – Embedded), sont archivés et constituent donc une base de données conséquente pour la recherche clinique. Ces stratégies de fixation assurent la stabilité des composés tels que les peptides et les protéines pour plusieurs années mais représentent un obstacle aux analyses MSI à cause de la formation de liens covalents avec les protéines. En effet, la création de ponts moléculaires induits par l'enrobage FFPE peut entraîner une diminution de l'ionisation des molécules et nécessitent donc d'effectuer un prétraitement via des méthodes de déparaffinage et de réhydratation des tissus. Oetjen *et al.* [143] ont proposé en 2016 une méthode standardisée pour la mise au point de procédures opérationnelles de déparaffinage optimisées sur des coupes de cerveaux FFPE. A. Ly *et al.*, ont comparé dans leurs travaux de 2016 des images moléculaires obtenues en MALDI - FTICR à partir de coupes congelées ou FFPE (**Figure 2.7**). Ils ont ainsi montré qu'avec un protocole de déparaffinage optimisé et maîtrisé, il est possible d'obtenir une localisation aussi précise des métabolites tout en ayant une intégrité morphologique supérieure à celle des tissus congelés. Là aussi, les étapes de préparation sont, selon le type d'échantillon choisi, d'une grande importance pour l'obtention d'images informatives.



**Figure 2.7 : Tissus congelés versus tissus FFPE.** Issue de A. Ly *et al.*, 2016 [142]

Comparaison de la localisation des ions : **A.**  $m/z$  259,014 correspondant au mucus (galactose-1-phosphate; vert), **B.**  $m/z$  259,023 correspondant à la tumeur (hexose-6-phosphate; rouge) et **C.**  $m/z$  300,040 correspondant à la matrice extracellulaire (N-acétylglucosamine sulfate; jaune) entre les tissus congelé et les tissus FFPE – TMA (Tissue MicroArray). Résolution spatiale de 60  $\mu\text{m}$  avec un MALDI - FTICR.

## 2. LA DECOUPE DES TISSUS BIOLOGIQUES

Pour la découpe des tissus, différents appareils peuvent être employés comme les microtomes, majoritairement utilisés pour une découpe à température ambiante d'échantillons fixés, ou une enceinte réfrigérée comme les cryotomes pour la découpe de tissus congelés. Lors de la découpe de tissus congelés, les échantillons peuvent être enrobés ou simplement collés au support de coupe à l'aide d'un matériau adéquat comme l'OCT (Optimal Cutting Temperature compound) [144] [145] ou de la CMC

(CarboxyMethylCellulose) [146] [147] [148] pour faciliter la manipulation et permettre une découpe plus précise. Cependant, les composants constituant ces enrobages sont très facilement ionisés en spectrométrie de masse et peuvent donc grandement interférer avec les analyses à réaliser. Ainsi, il peut être préférable d'utiliser de l'eau afin de fixer les tissus et ainsi permettre une découpe exempte de toute contamination.

Les tissus sont ensuite déposés sur des lames conductrices comme les lames ITO (Indium Tin Oxide) recouvertes d'un film de 130 Å [125] afin de permettre l'accélération des ions en source. Ce film conducteur transparent n'empêche donc pas les observations au microscope optique permettant ainsi la comparaison de l'image MSI aux images obtenues après coloration histologique. Cette coloration peut être réalisée sur une coupe adjacente ou sur la même coupe après analyse MSI après le retrait de la matrice MALDI. Il existe également d'autres moyens de rendre la lame conductrice en utilisant par exemple des scotchs double face conducteurs [149] [150] ou des lames métalliques recouvertes de particules d'or [151]. En effet, D. Saigusa *et al.*, 2019 ont comparé l'utilisation de rubans adhésifs double face conducteurs ou non constitués d'une feuille de cuivre, d'une feuille d'aluminium et d'un film adhésif de type conducteur (Cryofilm type MS1) avec l'utilisation de lames ITO pour la préparation de coupe de tissus. Après analyses MSI, aucune différence notable sur l'ionisation des molécules n'est révélée lors de l'utilisation du film adhésif cryofilm MS1. L'efficacité de ces rubans adhésifs pour l'obtention de coupes de corps entiers semble donc confirmée.

Après le montage des tissus sur lames conductrices, le passage de la coupe à température ambiante (même pour un court laps de temps) peut provoquer une variation significative de l'intensité de certains ions observables en spectrométrie de masse. En effet, R. J. A. Goodwin *et al.* [152] ont prouvé en 2008 l'effet du réchauffement des coupes sur la détection de marqueurs peptidiques. Après une incubation à température ambiante de 0 à 5,25 minutes des coupes déposées sur lame ITO, différents comportements sont observés concernant l'intensité des ions en MSI (**Figure 2.8**). L'incubation à température ambiante n'a pas semblé avoir d'impact sur l'ionisation du peptide  $m/z$  2608 contrairement aux ions  $m/z$  2479 et  $m/z$  6724. En effet, l'ion  $m/z$  2479 a montré une augmentation de son intensité contrairement à celle de l'ion  $m/z$  6724 qui diminue avec l'augmentation du temps d'incubation. Ces changements, fonctions de la séquence peptidique considérée, peuvent être attribués à une lyse cellulaire, un clivage protéolytique, un effet dépendant du pH ou de l'oxydation induit par l'autodigestion de l'échantillon par protéolyse suite à la libération de protéases intracellulaires lors de la décongélation des tissus et de leur découpe.

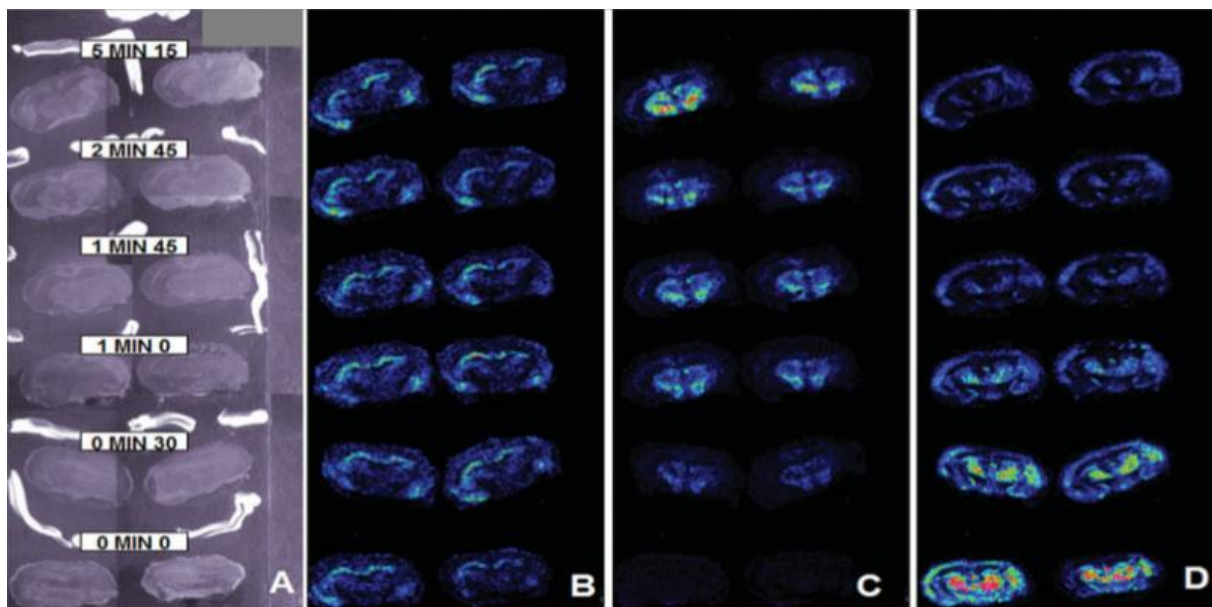


Figure 2.8 : Effet du réchauffement des coupes sur la détection de marqueurs peptidiques. Issue de R.J.A. Goodwin *et al.*, 2008 [152]

A. Image optique des sections de cerveau transcoronales de 14  $\mu\text{m}$  d'épaisseur montées sur lame ITO correspondant à B, C et D. B., C. et D. Incubations à température ambiante pendant 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,75 ; 2,75 ; et 5,25 min. B.  $m/z$  2608 C.  $m/z$  2479,2 et D.  $m/z$  6724,4.

Pour des analyses en MSI, l'épaisseur moyenne des coupes est de 5  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$  et varie selon le type d'échantillon étudié. Si la coupe est plus épaisse, la durée de temps de séchage peut rapidement augmenter et les coupes peuvent ne plus être suffisamment conductrices pour avoir un signal satisfaisant. Par conséquent, les étapes de lavages (décrites ultérieurement dans ce chapitre) effectuées sur des coupes plus épaisses peuvent être moins efficaces. Y. Sugiura *et al.*, 2006 [153] ont donc choisi d'étudier le rôle de l'épaisseur des coupes sur la qualité du signal. Ils ont pour cela analysé l'effet que pourrait avoir l'épaisseur d'une coupe de cerveau de souris sur la capacité de détection de protéines analysées avec un MALDI - TOF/TOF Ultraflex™ (Bruker Daltonics, Allemagne). Parmi des coupes de 2  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ , 10  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  et à 40  $\mu\text{m}$ , l'efficacité d'ionisation des protéines a été analysée en MALDI - MS et les études ont ainsi démontré que plus la coupe est fine, plus l'ionisation est efficace avec une détection de 49 signaux protéiques à 2  $\mu\text{m}$  contre moitié moins à 5, 10 et 20  $\mu\text{m}$ . Par ailleurs, en imagerie par spectrométrie de masse, l'influence de l'épaisseur de la coupe n'est pas la même selon la gamme de masses utilisée. En effet, plus la masse moléculaire est importante ( $m/z$  6 717 à 17 870) plus la finesse de la coupe a un impact positif sur l'ionisation de la protéine et donc sur la visualisation de la biodistribution des protéines (Figure 2.9). Ce phénomène peut potentiellement être expliqué par une meilleure extraction des protéines de plus faible masse moléculaire du tissu par le solvant de la matrice sur des coupes plus fines. Sur les coupes plus épaisses, la formation des cristaux « analytes-matrice » entraîneraient selon les auteurs une « isolation de la coupe » vis-à-vis de la conductivité de la lame.

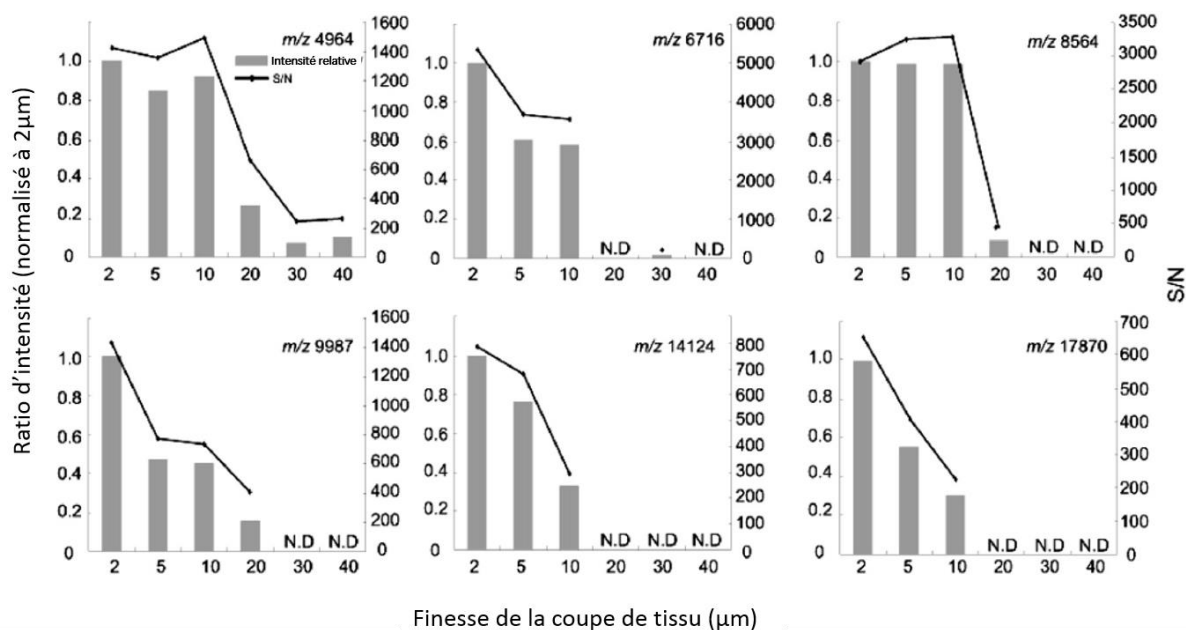


Figure 2.9 : Effet de l'épaisseur de la coupe sur l'intensité des ions détectés. Issue de Y. Suguira *et al.*, 2006 [153]

Comparaison des intensités relatives normalisées à 2 μm et du rapport signal/bruit pour les signaux majeurs obtenus à partir de protéines abondantes comme la thymosine ( $m/z$  4964) ou l'ubiquitine ( $m/z$  8565) sur des coupes de cerveau d'une épaisseur comprise entre 2 μm et 40 μm.

En plus de l'épaisseur de la coupe, les températures maintenues dans l'enclume du cryostat sont à optimiser selon l'organe cible qui est sectionné et sont généralement repartis entre -30 et -15°C. Des tissus contenant une majorité d'acides gras nécessitent une température plus basse alors que pour des tissus comme les poumons ou les viscères des températures plus élevée sont recommandées pour éviter toute coagulation [154].

Parfois, malgré le respect du protocole MSI, et les tentatives d'amélioration de celui-ci par les chercheurs, certains échantillons se révèlent encore difficiles à analyser. Ces difficultés peuvent provenir d'un problème d'interférences avec d'autres ions ou d'un manque de sensibilité. Dans ce cas, il existe des méthodes qui permettent d'optimiser le signal des molécules cibles en procédant à des étapes de prétraitements des coupes de tissus sur lame MSI.

### 3. LES TRAITEMENTS APPLIQUES AUX TISSUS.

Après découpe des tissus, il peut donc être nécessaire de réaliser différents traitements du tissu comme des lavages, des traitements enzymatiques ou une dérivation *in situ*. Selon la thématique abordée, on peut avoir recours à un seul de ces traitements ou à leur intégralité. Cependant, les protocoles utilisés impliquent la présence de solvants et peuvent donc induire une délocalisation des molécules voire une perte de sensibilité pour certaines molécules.



### a. Le lavage des tissus

La détection de métabolites sur tissus reste un challenge en MSI car de nombreuses molécules sont affectées par l'effet de suppression des ions induit par des molécules plus abondamment présentes comme les lipides. Pour remédier à ce phénomène, des lavages peuvent être réalisés. Ces lavages peuvent servir divers objectifs comme enlever des molécules du tissu en utilisant des solvants pour diminuer les effets matrices, ou y ajouter des composés comme des sels pour favoriser l'ionisation de certaines classes de molécules.

A titre d'exemple, des lavages au chloroforme ont été réalisés par l'équipe de H. Yang et *al.*, 2018 [155] sur coupes de cerveaux afin d'éliminer des classes de lipides comme les glycérophospholipides ou les glycérolipides afin de favoriser la visualisation de métabolites (**Figure 2.10**). Ainsi, ils favorisent la visualisation de molécules tels que les métabolites associés à l'ATP comme l'AMP ou les dérivés d'acides aminés. Plus précisément, l'utilisation du chloroforme permet d'obtenir la biodistribution de la spermine, de la phosphosérine et de certaines molécules dérivées du glucose qui ne sont pas détectés sans ce lavage. L'élimination d'une classe de molécules abondantes sur tissu peut donc permettre de détecter des molécules distinctes en diminuant l'effet matrice.

PARTIE A : CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE, CHAPITRE 2 : L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

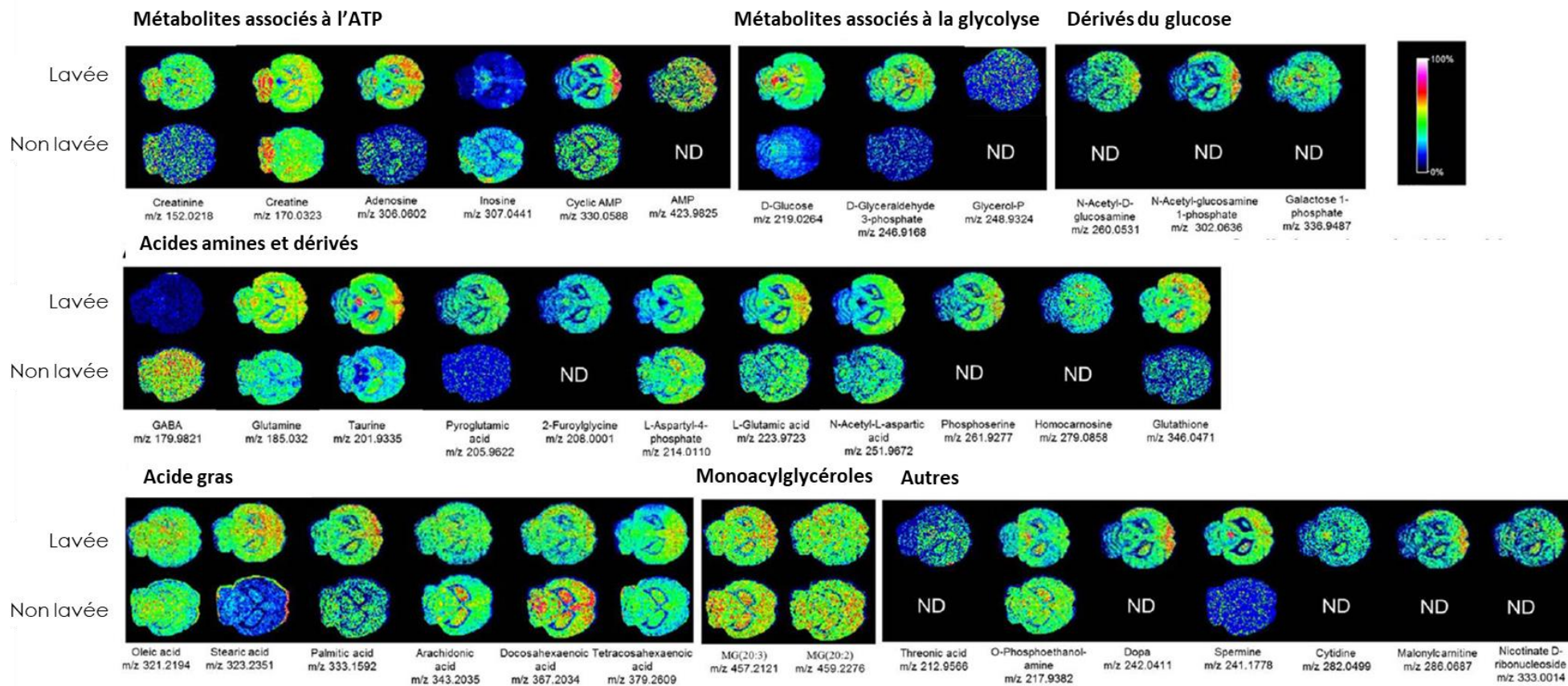
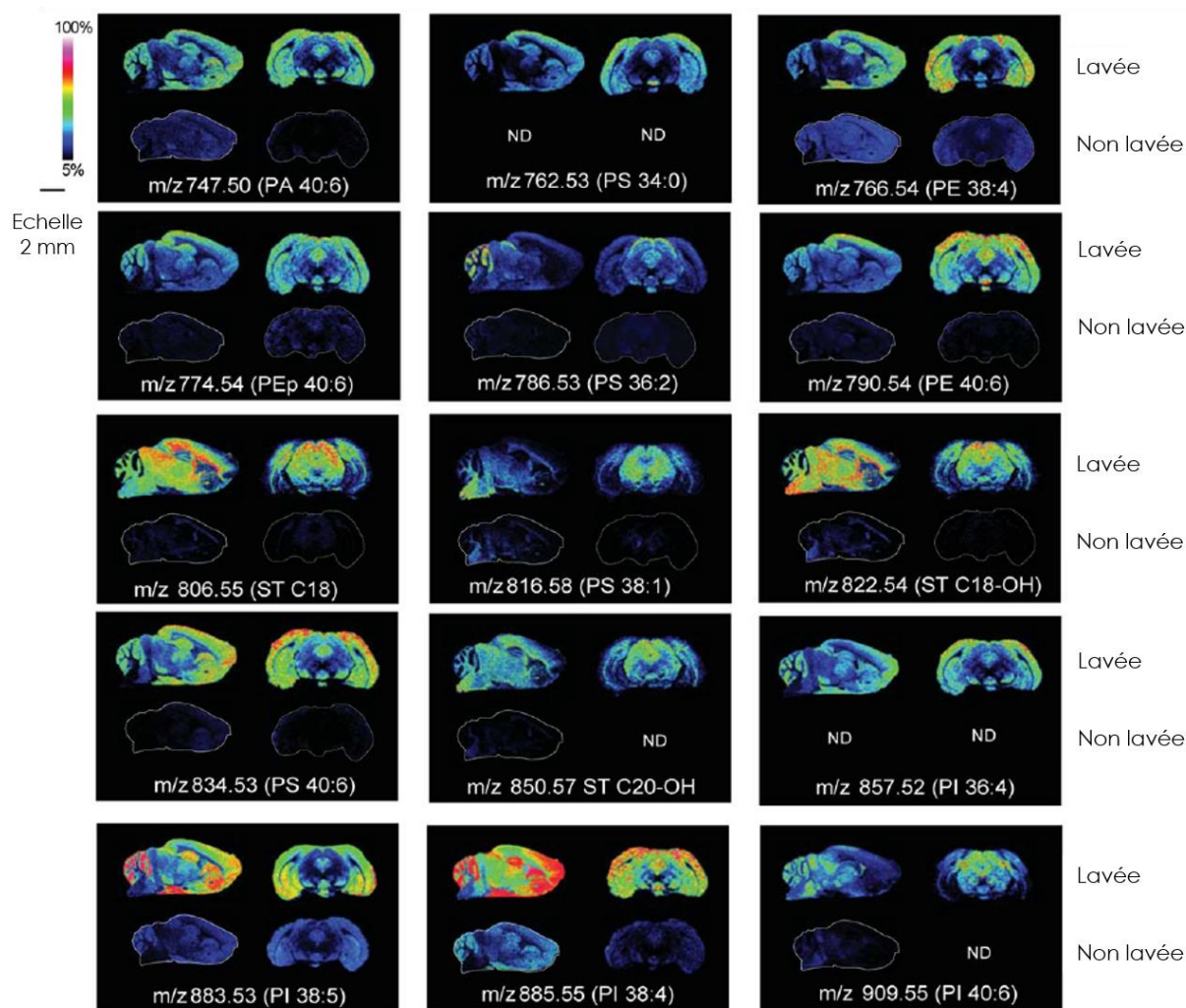


Figure 2.10 : Effet du lavage au chloroforme sur coupe de cerveau. Issue de H. Yang *et al.*, 2018 [176].

Comparaison d'images moléculaires provenant de coupes de cerveau lavées avec du  $\text{CHCl}_3$  à  $-20^\circ\text{C}$  et de coupes non lavées. Les images ont été acquises par MALDI - FT - ICR à une résolution spatiale de  $250\ \mu\text{m}$ .

De plus, des lavages avec des solutions salines sont couramment effectués lors de la préparation des échantillons en MSI notamment pour chélater les sels ou induire la formation d'adduits avec des espèces moléculaires présentes dans le tissu. P. M. Angel *et al.*, 2012 [156] ont examiné en particulier l'effet de lavages via une solution tampon de formiate d'ammonium 50 mM à différents pH (allant de 3 à 8.4) sur des coupes de cerveaux (**Figure 2.11**). Ces lavages ont eu pour but de favoriser la détection de lipides en mode négatif d'ionisation. Ainsi, le lavage a permis de mieux observer les PE38:4 (PhosphoEthanolamine), PI38:5 et PI38:4 (Phospholipositol) et a également permis d'observer des espèces non détectées sans lavage comme la PS34:0 (PhosphoSérine), la STC20-OH (SulfaTide), la PI36:4 et PI40:6.



**Figure 2.11 : Effets du lavage avec solutions salines. Issue de P. M. Angel *et al.*, 2012 [156].**

Comparaison par imagerie MALDI - TOF du signal entre les sections sagittales et coronales du tissu cérébral de souris adultes lavées (haut) ou non lavées (bas) au formiate d'ammonium. Les images ont été acquises avec une résolution spatiale de 60 µm. PI : glycerophosphoinositol, PA : glycerophosphatidic acid, PS : glycerophosphoserine, PG : glycerophosphoglycerol, ST : sulfatide).

Le lavage des coupes de tissus peut donc être envisagé lors d'un manque de sensibilité pour une molécule donnée dû à un effet matrice important. Cependant, ces lavages sont à employer avec précaution

car ils peuvent induire une délocalisation des molécules au sein des tissus ou un décollement de coupes de tissus de la lame d'imagerie.

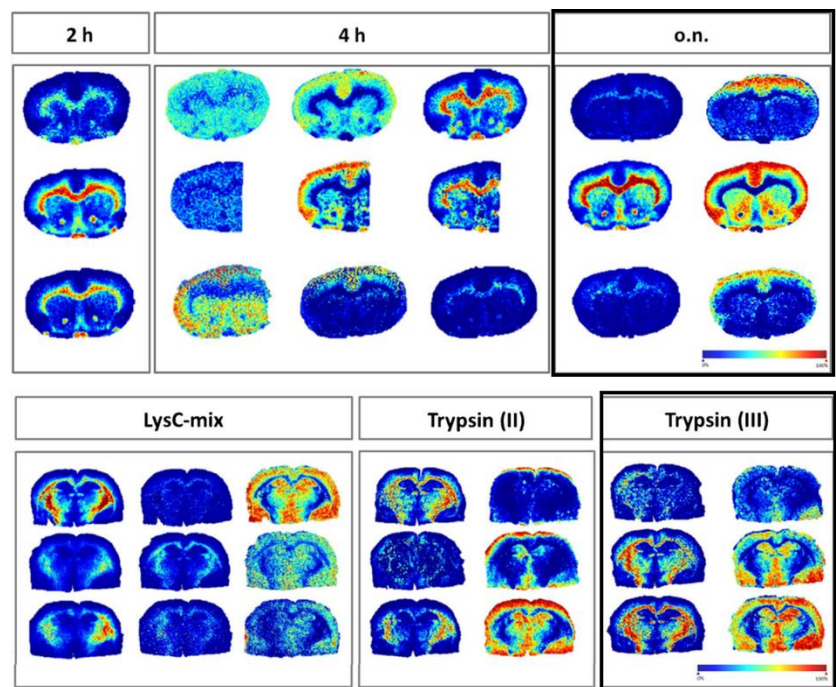
Une autre technique intéressante pour l'élimination de molécules interférentes sur tissus est l'utilisation de traitements enzymatiques.

### b. Les traitements enzymatiques sur tissus

Sur tissu, il est fréquent de détecter plusieurs molécules sur une gamme de masses très faible. Pour cela, des réactions enzymatiques sur coupes tissulaires peuvent être utilisées afin d'éliminer les interférences. Cependant, les protocoles mis en place pour la réalisation de digestions enzymatiques sur tissus sont complexes et nécessitent beaucoup de précautions afin d'éviter d'abimer le tissu ou de délocaliser les molécules.

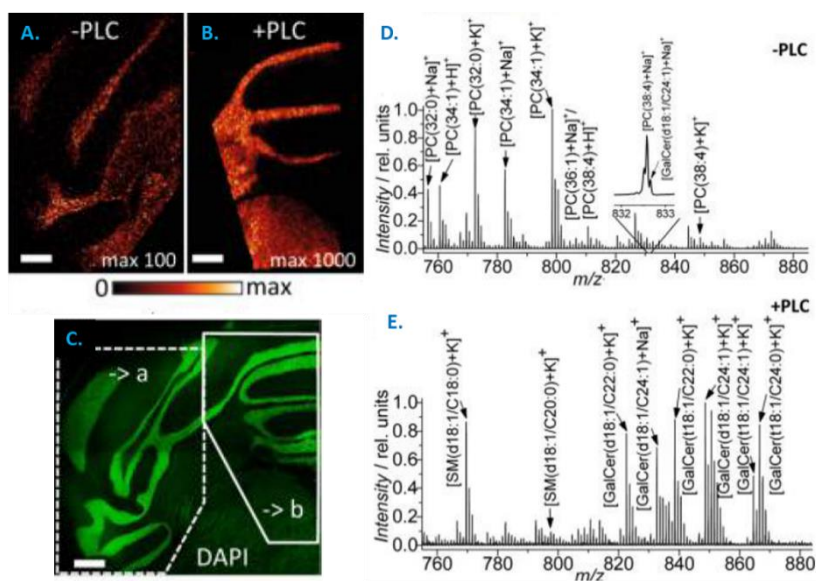
Sachant que les peptides sont plus aisés à analyser que les protéines, la réalisation de digestions tryptiques sur tissus est devenue très courante. Pour cela, H. C. Diehl *et al.*, 2015 [176] ont testé différentes approches sur coupe de cerveau congelés ou FFPE en expérimentant des trypsines d'origines différentes et des temps d'incubation de 2 heures, 4 heures ou de 12 heures (Figure 2.12). Les protocoles ont été comparés en

se basant sur la détection des structures peptidiques issues de la protéine MBP (Myelin Basic Protein) qui est l'une des plus abondantes du système nerveux centrale. Une efficacité plus importante de la digestion a été observée après 12 heures d'incubation et avec la trypsine V5280 provenant de Promega Corporation (Etats Unis).



**Figure 2.12 : Effets du temps d'incubation et de l'enzyme utilisée pour l'analyse de peptides. Issue de H.C Diehl *et al.*, 2015 [176]**

Comparaison des temps de digestion (2 heures, 4 heures et une nuit (o.n.) puis de différentes trypsines sur coupes de cerveaux congelés en utilisant la matrice DHB (acide 2.5-Dyhydroxybenzoïque). Les images sont obtenues sur la base des fragments peptidiques de la protéine MBP détectés.



**Figure 2.13 : Effets de la phospholipase C sur coupes de cerveaux. Issue de S. Vens-Cappell *et al.*, 2016 [158].**

Images de GalCer(d18:1/C24:1) ( $[M + Na]^+$ ,  $m/z$  832.66) acquises à 22.5 $\mu$ m sur des coupes adjacentes (A.) sans PLC et (B.) avec traitement PLC. C. La coloration DAPI a été obtenue après rinçage de la matrice sur la section de tissu traitée avec la PLC. Elle permet de distinguer la substance grise de la substance blanche. Échelle : 500  $\mu$ m. (D.) et (E.) Somme des spectres (pris sur 1000 spectres aléatoires) des sections indiquées en (A.) et (B.) respectivement.

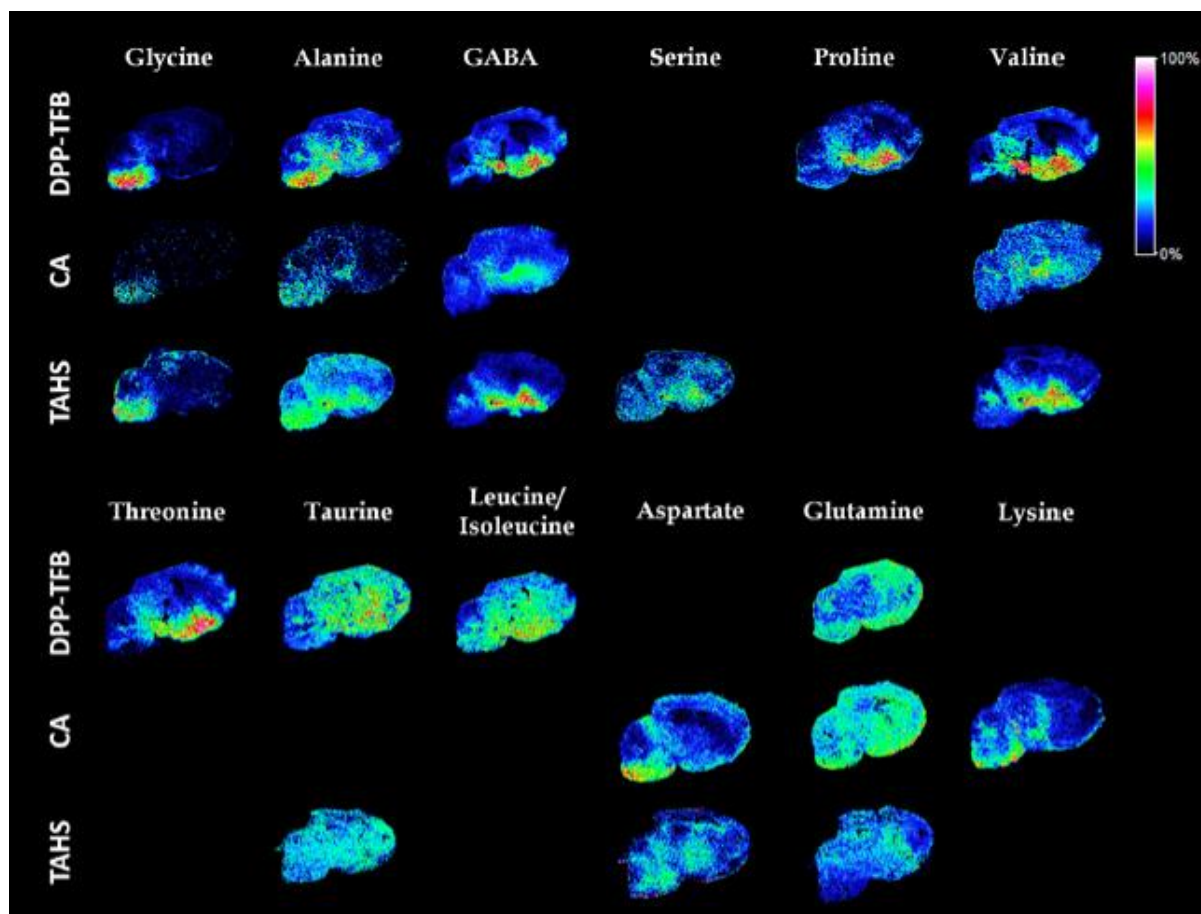
des tissus (B.II.2.a.) de ce chapitre, la présence massive de lipides comme les phosphatidylcholines peut réduire l'ionisation d'autres espèces lipidiques moins concentrées.

### c. La dérivation des molécules sur tissus

La méthode de dérivation des molécules pour l'amélioration de la sensibilité a précédemment été développée en chromatographie liquide ou gazeuse [159] [160], [161] et s'ouvre aux applications en MSI par introduction d'un fluorophore ou d'un chromophore. La dérivation consiste à insérer un groupement supplémentaire à une molécule d'intérêt afin de permettre sa détection optimale. Cet ajout favorise l'ionisation de la molécule grâce par exemple à l'addition d'une charge permanente ou d'un groupement aromatique permettant un meilleur transfert d'énergie par rapport à la molécule non dérivée. Pour exemple A. Chacon *et al.*, 2011 [162] ont réussi à détecter la 3-méthoxysalicylamine dans une étude de distribution de médicaments grâce à un procédé de dérivation sur tissu avec le 1,1'-thiocarbonyldiimidazole (TCDI). Cette technique permet ainsi d'augmenter la détectabilité de cette molécule qui se trouve en dessous des seuils de sensibilité sur coupes de rein. Par ailleurs, la dérivation a été appliquée à plusieurs reprises pour la détection de neurotransmetteurs en MSI dans des maladies telles que la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. Pour cela, M.L Manier *et al.*, 2011 [130], 2014 [163] ou encore C. Esteve *et al.*, 2016 [164] ont démontré que l'usage du CA (4-hydroxy-3-méthoxycinnamaldehyde), du TAHS (p-N,N,N-triméthylammonioanilyl N-hydroxysuccinimidyl carbamate iodide) et du DPP-TFB (2,3-diphényl-pyranylium tétrafluoroborate) pouvait améliorer leur détection et permettre ainsi la biolocalisation de ces composés aminés au sein des tissus

Par ailleurs, d'autres enzymes peuvent être appliquées sur tissus. En effet, S. Vens-Cappell *et al.*, 2016 [158] ont utilisé la phospholipase C (PLC) qui permet d'hydrolyser la liaison ester entre le glycérol et le phosphate des phospholipides et sphingomyélines. Cette technique permet ainsi de mieux visualiser les mono-, di-, et oligohexosylcéramides sans diminuer la qualité de la résolution spatiale (Figure 2.13). En effet, comme décrit précédemment dans le paragraphe concernant le lavage

provenant de cerveaux. Ces neurotransmetteurs sont connus pour être particulièrement difficiles à analyser en MALDI - MSI à cause d'une faible sensibilité de détection et à des interférences avec des pics de matrice. Cependant, grâce à ces trois agents de dérivation, 23 de ces acides aminés ont été détectés sur coupes de cerveaux dont 18 sont illustrés dans la **Figure 2.14**.



**Figure 2.14** : Exemple de dérivation de neurotransmetteurs sur coupes de cerveaux. Issue de C. Esteve *et al.*, 2016 [164]

Visualisations MSI de dérivés de métabolites aminés après dérivation avec le TAHS, CA et DPP - TFB dans des coupes sagittales cérébrales de souris. L'ensemble des données sur les métabolites a été enregistré en mode ion positif avec une matrice DHB en MALDI - FT - ICR.

Cependant, ces méthodes nécessitent une optimisation importante des protocoles afin d'aboutir à des résultats satisfaisants car le temps, la température ou le milieu de réaction peuvent influencer sur le rendement de la dérivation. Les protocoles de dérivation doivent donc prendre en compte ces phénomènes en évitant d'ajouter trop d'étapes de lavages réalisées par exemple pour l'élimination de l'agent de dérivation qui n'a pas réagi. Sachant que la MSI est une technique récente pour la réalisation d'images moléculaires, les méthodes de dérivation se basent souvent sur des techniques puisées dans les protocoles de spectrométrie de masse classiques. Il est donc indispensable d'ajuster et d'optimiser ces techniques analytiques.

En spectrométrie de masse, un large panel de molécules de dérivation est utilisé afin de pouvoir fonctionnaliser plusieurs classes de biomolécules portant des fonctions différentes (**Tableau 2.3**). Majoritairement, les réactifs de dérivation visent les fonctions amines, alcools, cétones ou aldéhydes. Ces trois groupements permettent de cibler la quasi-totalité des biomolécules. En effet grâce à la dérivation des fonctions amines, il est possible d'augmenter la sensibilité de détection des acides aminés, de peptides ou de protéines. De plus, les réactions avec les cétones ou les alcools permettent l'analyse plus sensible d'hormones ou de stéroïdes. Ces molécules de dérivation peuvent également être classées selon deux catégories : les réactifs ajoutant une charge (négative [165] ou positive [166]) et les réactifs ajoutant un groupement qui améliore la transmission de l'énergie du laser [167] dans les analyses MALDI - MS. Ces deux classes permettent un accroissement du rendement d'ionisation afin d'atteindre une sensibilité de détection plus importante. De plus, l'incrément en masse induit par l'ajout du groupement sur la molécule cible peut permettre de l'extraire du massif de pics interférents engendré par la matrice MALDI. Certains réactifs peuvent être plus particulièrement utilisés sans ajout de matrice comme le 2,4-diphényl-pyranilium (DPP) [168] ou le 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [169]. En effet, l'utilisation du DPP a permis aux auteurs de gagner en sensibilité et en résolution spatiale pour la réalisation d'images moléculaires de la dopamine. Le fait de ne pas déposer de matrice sur le tissu élimine ici une étape qui peut potentiellement entraîner une délocalisation. Cependant, contrairement au DPP, l'emploi de la DNPH seule induit une augmentation de la sensibilité plus faible à celle obtenue avec l'utilisation conjointe du DNPH et d'une matrice. L'ajout de HCCA (acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique) permettrait en effet un transfert d'énergie du laser plus homogène sur la totalité du tissu.

Tableau 2.3 : Réactifs de dérivation pour différentes classes de molécules retrouvées dans la littérature.

Fonctions dérivables	Molécules dérivées	Réactifs de dérivation	Auteurs	Années	MS
Amines	3-methoxysalicylamine	TCDI	A. Chacon <i>et al.</i> [162]	2011	MALDI - MSI
	Isoniazide	CA	M.L. Manier <i>et al.</i> [130]	2011	MALDI - MSI
	Acides aminés et neurotransmetteurs		M.L. Manier <i>et al.</i> [24]	2014	MALDI - MSI
		TAHS	C. Esteve <i>et al.</i> [164]	2016	MALDI - FT – ICR - MSI MALDI - FT – ICR - MSI
		DPP, TMP, PBDPP	S., Toue <i>et al.</i> [170]	2013	MALDI - MSI/LC - ESI - MS - MS
		Peptides	AQC, AAC	M. Shariatgorji <i>et al.</i> [168]	2015
	Protéines	3-SBASE, 4-SPITC, TMPP	P. D. Edirisinghe <i>et al.</i> [171]	2007	LDI - MSI
	Ammonium quaternaire	Sulfate d'ammonium	J. Franck <i>et al.</i> [165]	2009	MALDI - MSI
E. Sugiyama <i>et al.</i> [172]	2015	MALDI - MS et MALDI - MSI			
Cétones	Glycosphingolipides	Girard T reagent	Y. G. Kim <i>et al.</i> [173]	2009	MALDI - TOF - MS
	Corticostéroïdes		F. Cobice <i>et al.</i> [174]	2013	MALDI - MSI/LESA - ESI - FT - ICR
	Prostaglandines		J. D. Manna <i>et al.</i> [175]	2011	MALDI - MSI
	Plasmagènes	DNPH	A. Nimptsch <i>et al.</i> [167]	2013	MALDI - TOF - MS
	Glucocorticoïdes		B. Flinders <i>et al.</i> [169]	2014	MALDI - MSI
Alcools	Stérols	Complexe trioxyde de soufre et pyridine	L. Hailat <i>et al.</i> [166]	2013	MALDI - TOF - MS
		Acide picolinique			
	D- et L-2-hydroxyglutarate	TSPC	Q. Y. Cheng <i>et al.</i> [160]	2015	LC - ESI - MS
Œstrogènes	DMIS	P. Keski-Rahkonen <i>et al.</i> [176]	2015	UPLC - APPI - MS/MS	
Hydrogènes labiles	Nucléotides, œstradiol, bisphénol	CAX-B	P. Wang <i>et al.</i> [177]	2015	LC - MALDI - TOF/TOF - MS

TCDI : 1,1'-thiocarbonyldiimidazole, CA : 4-hydroxy-3-methoxycinnamaldéhyde, TAHS : N,N,N-triméthylammonioanilyl N-hydroxysuccinimidyl carbamate iodide, TMP : 2,4,6-triméthylpyrylium, PBDPP : 1,4- phénylene-4,4'-bis (2,6-diphényl-4-pyrylium), AQC : 6-Aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate, AAC : 2-Aminoanthracenyl-N-hydroxysuccinimidyl 2-Aminoanthracenyl-N-hydroxysuccinimidyl Carbamate, 3-SBASE : 3-sulfobenzoic acid, 4-SPITC : 4-Sulphophényl isothiocyanate, TMPP : N-succinimidylloxycarbonylméthyl)- tris(2,4,6-triméthoxyphényl)phosphonium bromide, DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine , TSPC : N-(p-toluènesulfonyl)-L-phénylalanyl chloride, DMIS : 1,2-diméthylimidazole-5-sulfonyl chloride, CAX-B : cationic xylil-bromide



#### 4. LES DEPOTS DE MATRICE MALDI

Le dépôt de matrice présente deux types de difficultés. La première est liée à la matrice en elle-même qui induit une ionisation différente selon sa composition, son solvant de reprise et le ratio matrice/analytes. La seconde concerne la formation des cristaux de matrice sur le tissu qui, selon son homogénéité, agit sur la résolution de l'image obtenue (pixels) et sur la reproductibilité des analyses.

##### a. Les matrices MALDI

En plus de la préparation des échantillons, le choix de la matrice est primordial afin d'obtenir une détection optimale car elle est impliquée dans les phénomènes de désorption/ionisation. En effet, les matrices doivent comprendre un groupement chromophore qui est généralement un noyau aromatique et qui permet l'absorption à la longueur d'onde du faisceau laser. La relaxation de l'énergie accumulée va permettre l'ablation d'agrégats composés de molécules de matrices et d'analytes. Les matrices doivent donc présenter des critères indispensables à la désorption et l'ionisation des molécules cibles comme :

- Un coefficient d'absorption à la longueur d'onde du laser de l'instrument utilisé. Ce laser peut être un laser UV (Nd : YAG ou un laser à azote, 355 - 337 nm) ou un laser IR (> 1000 nm),
- Former des cristaux homogènes avec les analytes tout en restant inerte chimiquement (hors matrices réactives),
- Être donneur ou accepteur de protons ou source de cations, d'anions ou de radicaux,
- Ne pas sublimer dans le vide poussé ( $1 \times 10^{-6}$  ou  $1 \times 10^{-7}$  mbar) de la source du spectromètre de masse.

De plus, les matrices MALDI sont souvent spécifiques d'un type de molécules et permettent d'obtenir une plus grande sensibilité pour un composé ciblé (**Tableau 2.4**). Par exemple, la matrice DHB est plus favorable à l'ionisation des lipides ou des oligonucléotides alors que la matrice HCCA est plus souvent utilisée pour l'ionisation des peptides et protéines. Les métabolites possèdent, quant à eux, une meilleure ionisation avec la matrice 9-AA. La qualité de l'ionisation dépend également du ratio matrice/analyte présent dans l'échantillon.

**Tableau 2.4 : Les matrices les plus courantes (liste non exhaustive).**

Matrices	Applications
DHB : acide 2.5-Dyhydroxybenzoïque [178]	Lipides, carbohydrates, peptides, nucléotides
HCCA : acide $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique [179]	Peptides, glycopeptides, oligonucléotides
SA : Acide sinapinique [180]	Protéines, glycoprotéines
DHAP : 2.6-Dihydroxyacetophenone [181]	Phospholipides
THAP : 4.6-trihydroxyacetophenone [182]	Oligonucléotides, carbohydrates et glycoprotéines
9-AA : 9-aminoacridine [183]	Métabolites

## b. Les différents types de dépôts de la matrice MALDI

La résolution et la sensibilité d'analyse dépendent également de la méthode de dépôt de la matrice. Différentes techniques ont donc été développées impliquant des dépôts par spray [184], des dépôts au goutte-à-goutte [185] [186] ou encore par sublimation [187]. Les techniques de dépôt ont particulièrement été améliorées afin d'augmenter la résolution des images obtenues et le rendement d'ionisation. Même si la sublimation permet d'obtenir une résolution bien supérieure de l'ordre de 2  $\mu\text{m}$ , le dépôt par vaporisation représente un meilleur compromis entre le contrôle du volume déposé et la résolution spatiale (20  $\mu\text{m}$ ). En effet, le contrôle du dépôt peut améliorer l'homogénéité de la matrice et donc favoriser la sensibilité de détection. Par ailleurs, la qualité du dépôt de matrice va dépendre des mélanges de solvants choisis, du temps de séchage entre les passages de dépôts de matrice et les débits appliqués.

Tableau 2.5 : Comparaison des méthodes de dépôt de matrice. Modifié de B. K. Kaletas *et al.*, 2009 [152].

Techniques	Diamètres	Avantages	Inconvénients
Dépôt de gouttelettes à la main	Variable et > 900 $\mu\text{m}$	Rapide, simple, bon marché	Faible reproductibilité
Aérographe	Variable, petit	Couche rapide, simple, homogène, bon marché	Contrôle de l'environnement limité, varie d'une personne à l'autre, gouttelettes non constantes.
Sprayeur pneumatique	Variable, petit	Homogène, automatisée, environnement contrôlé, adaptée aux grandes surfaces	Très grandes quantités de solution de matrice utilisées (50-150 mL), taille des gouttelettes non constante.
Dépôt par électronébulisation	Petit	Homogène, cristaux de même taille	Temps limité pour l'interaction analyte-matrice, varie d'une personne à l'autre.
Revêtement à sec	20 $\mu\text{m}$	Bon marché, très homogène, haute pureté de la matrice organique, reproductible	Temps limité pour l'interaction analyte-matrice
Sublimation	Très petit	Bon marché, très homogène, haute pureté de la matrice organique, reproductible, rapide	Temps limité pour l'interaction analyte-matrice
Imprimante à jet d'encre	Très petit	Uniformes, automatisé et simultanément de différentes solutions, bon marché.	Lent, non compatible avec tous les solvants, colmatage

Dans le commerce, il existe plusieurs modèles proposant des options complémentaires (Tableau 2.5). Le sprayeur manuel (Figure 2.15, A.) qui permet un dépôt homogène de la matrice une fois le système maîtrisé ne permet cependant pas de contrôler précisément la quantité de matrice déposée. En effet, les sprays et dépôts manuels entraînent une faible reproductibilité inter-analyses en raison des changements de manipulateur mais également à cause de la grande diffusion de la matrice qui engendre la délocalisation des molécules. Pour cela, des systèmes automatisés sont proposés notamment par SunChrom® et HTX technologies™ afin de déposer la matrice MALDI avec une maîtrise de la quantité de matière déposée et du débit. Le système Suncollect de chez SunChrom® (Figure 2.15, B.) possède l'avantage de pouvoir déposer

la matrice selon deux façons : le dépôt de matrice goutte à goutte et le spray. Le système TM - sprayer de chez HTX™ (Figure 2.15, C.) permet quant à lui une maîtrise plus précise du dépôt de la matrice via la présence d'une tête chauffante au niveau de la sortie du sprayeur. Outre les systèmes commerciaux, de nombreux laboratoires se lancent dans la confection de leur propre sprayeur comme les équipes de D. L. Baluya *et al.*, 2007 [188] à partir d'une imprimante à jet d'encre ou plus récemment Tucker *et al.*, 2018 [189] qui utilise une imprimante 3D. Enfin, Markus Stoekli et Dieter Staab, 2015 [190] propose un système de sprayeur accessible sur le site de l'[iMatrixSpray](#).

Il existe également un troisième système de dépôt de la matrice qui est la sublimation (Figure 2.15, D.). Cette méthode est celle qui permet d'obtenir la meilleure résolution spatiale due à une cristallisation très fine de la matrice et une absence de solvants. Ce procédé est souvent réalisé à partir d'une construction maison [187] qui permet de chauffer la matrice à très haute température sous vide. La matrice sublime et finit par se déposer sur la lame ITO qui est refroidie.

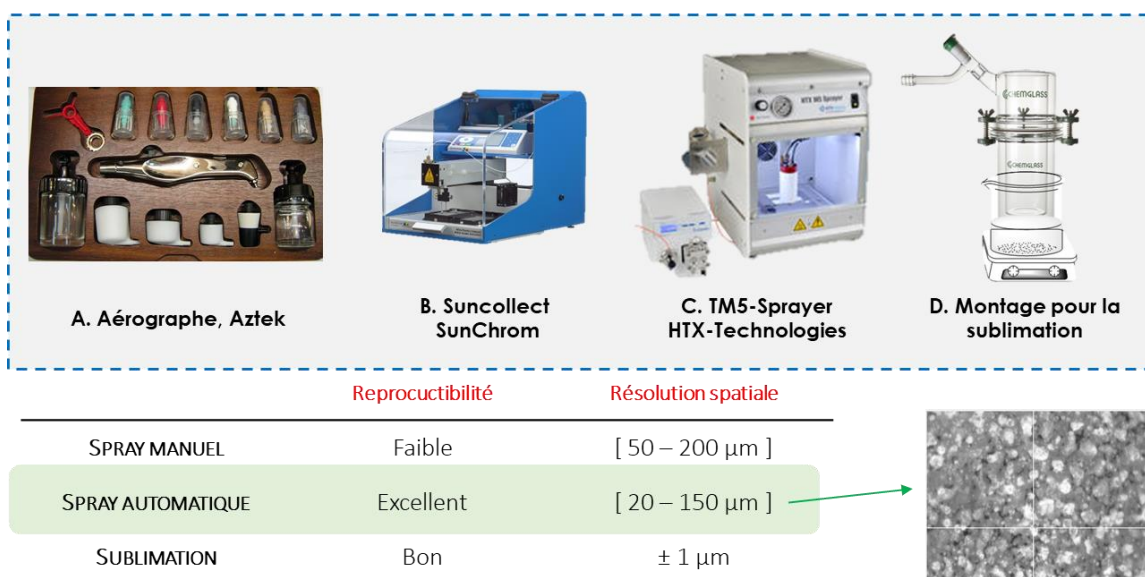
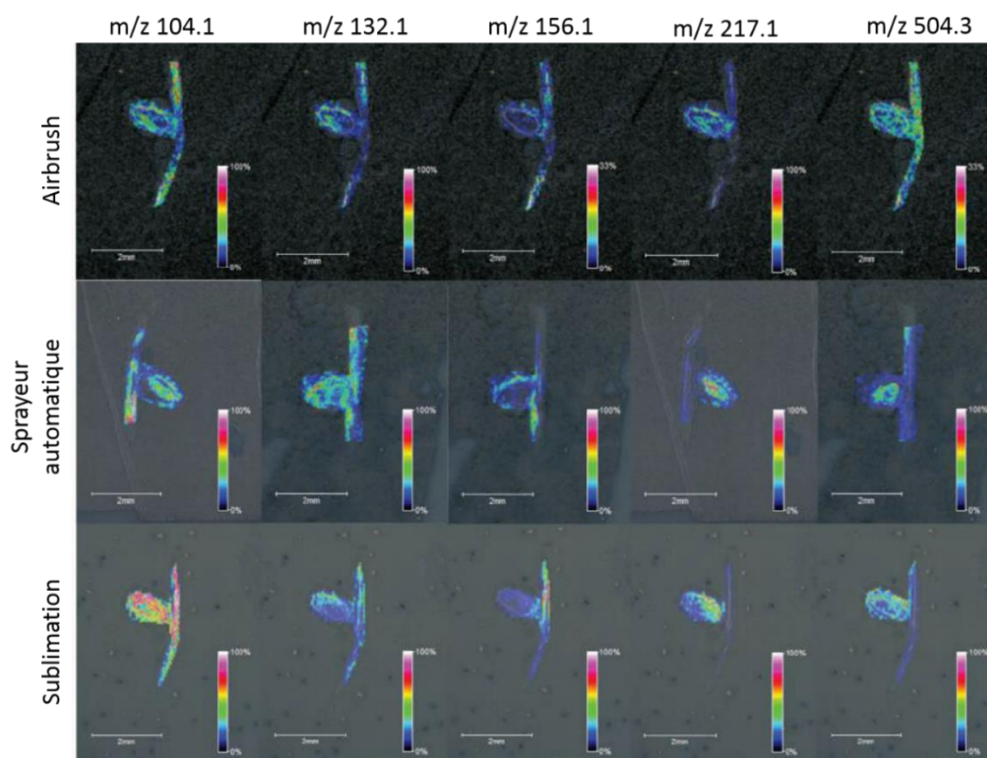


Figure 2.15 : Différents procédés de dépôt de matrices MALDI et leurs caractéristiques associées.

Malgré un gain certain en résolution spatiale avec la sublimation, une étude de E. Gemperline *et al.*, 2014 [191] ont montré que la méthode de spray automatisée permet une augmentation de la visualisation de métabolites au sein de racines de *Medicago truncatula* comparée aux deux autres techniques citées précédemment (Figure 2.16). Le manque de contrôle sur la quantité de solvant déposé avec le spray manuel peut induire une délocalisation plus importante des molécules. La sublimation permet quant à elle une meilleure résolution mais induit une diminution du nombre de molécules détectées au sein du tissu car elle ne permet pas d'extraire les molécules aussi bien qu'avec un spray. De ce fait, le spray automatisé semble être plus le adéquats selon cette étude.



**Figure 2.16 : Effet des différents types de dépôt de matrice sur l'ionisation des molécules. Issue de E. Gemperline *et al.*, 2014 [192].**

Images générées à partir des ions  $m/z$  104,1 (choline),  $m/z$  132,1, (leucine), 156,1 (histidine),  $m/z$  217,1 (inconnu), et  $m/z$  504,3 inconnu), en appliquant de la DHB à l'aérographe (en haut), une méthode de spray automatisée (milieu) et une méthode de sublimation optimale. Ces techniques ont été appliquées sur des coupes de nodule radiculaire de *Medicago truncatula* de 16  $\mu\text{m}$  puis analysées à une résolution spatiale de 20  $\mu\text{m}$ .

Le dépôt de la matrice est donc la dernière étape de la préparation des échantillons. Selon les conditions d'analyses, certains types de dépôts de matrice sont donc à privilégier. En effet, pour une extraction optimale des molécules du tissu [193], il est préférable d'opter pour un spray manuel ou automatisé qui va permettre d'appliquer une grande quantité de solvant et induire une plus grande extraction de molécule vers la surface. Le sprayeur automatisé va offrir une maîtrise du dépôt de matrice et du volume de solvant contrairement au spray manuel qui peut engendrer plus de délocalisation des molécules. Pour favoriser la résolution spatiale, il est préférable de choisir la sublimation qui va former des cristaux de matrice très fins mais qui ne permettra pas d'extraire les molécules vers la surface du tissu. Le choix de la technique de dépôt de matrice correspond donc à un équilibre voulu entre une extraction des molécules et résolution spatiale optimale tout en ayant une délocalisation minimale des molécules.

Chacune des étapes détaillées précédemment a donc une importance sur la qualité des acquisitions en imagerie par spectrométrie de masse. Elles peuvent influencer la résolution spatiale et la sensibilité de détection. Cependant, en plus des étapes de préparation, le retraitement des données obtenues peut influencer les cartographies moléculaires au sein des tissus. En effet, selon le logiciel utilisé, différentes analyses peuvent être réalisées comme des études quantitatives ou statistiques dans le but d'interpréter au mieux les résultats.

## C. LE TRAITEMENT DES DONNEES EN IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

En imagerie par spectrométrie de masse, un échantillon est scanné dans le but de recréer une image pixélisée correspondant au signal ionique obtenu pour un ion considéré. Les données brutes générées par cette technique analytique fournissent pour chaque position de l'image un profil d'intensité en fonction de la gamme de masses sur charge sélectionnée et des coordonnées des points d'acquisition. Les instruments les plus récents sont maintenant capables de générer des données à très haute résolution spectrale induisant des jeux de données très riches. Ces données conséquentes nécessitent donc la mise à disposition d'outils puissants pour le retraitement des informations. Les outils commerciaux sont donc listés ci-dessous (**Tableau 2.6**).

**Tableau 2.6 : Logiciels commerciaux disponibles pour le traitement des images acquises par spectrométrie de masse.**

Fournisseurs	Noms	Objectifs	Formats acceptés
Bruker	FlexImaging	Acquisition / Reconstruction de l'image / Analyses statistiques	Acquisition Bruker
	SciLs Lab	Reconstruction de l'image / Analyses statistiques	Format FlexImaging
Waters	High Definition Imaging	Reconstruction de l'image/ Analyses statistiques	Acquisition Waters
Thermo	ImageQuest	Acquisition / Reconstruction de l'image	Acquisition Thermo Scientific
Shimadzu	IMAGEREVEAL	Acquisition / Reconstruction de l'image / Quantification	Acquisition Shimadzu
PREMIER Biosoft	MALDIVision	Reconstruction de l'image	imzML, analyze 7.5
ImaBiotech	Multimaging	Reconstruction de l'image	
	Quantinetix	Reconstruction de l'image / quantification	Format FlexImaging, Thermo et Waters, imzML, analyze 7.5
AB Sciex	TissueView	Acquisition / Reconstruction de l'image / Analyses statistiques	Analyze 7.5

Cependant, l'intérêt grandissant de la communauté scientifique pour l'imagerie par spectrométrie de masse a également conduit au développement de nombreux logiciels en libre accès (**Tableau 2.7**) qui ont pour objectif de faciliter le retraitement de ces données. Ces logiciels sont disponibles sur le site [MS Imaging \(https://ms-imaging.org/wp/\)](https://ms-imaging.org/wp/). En effet, de nouveaux outils bio-informatiques sont actuellement nécessaires pour reconstruire ces cartes moléculaires très fournies dues au pouvoir résolutif croissant des spectromètres de masse. De plus, pour sonder les processus pathologiques au sein de tissus à l'aide d'outils statistiques notamment pour des études cliniques, il est intéressant de posséder des outils informatiques prenant en compte les données issues de la MSI.

La création de plateformes comme OpenMSI [194], METASPACE [195] ou pyBASIS [196] permet de standardiser plus spécifiquement ces traitements des données. La première propose un outil de partage des données, la seconde un outil d'annotation des spectres automatisés et la troisième un outil de corrélation

des données MSI avec les images optiques des colorations histologiques. Des logiciels proposent également des outils d'analyses statistiques comme SciLS, massPix [197] ou spectralanalysis [198] pour la réalisation entre autre de PCA (principal component analysis), PLSA ou du clustering selon la ressemblance des spectres acquis. Masspix [197] est cependant plus spécialisé pour le traitement de données lipidiques. Enfin, certaines équipes ont développé des outils de quantification pour la MSI avec par exemple msiQuant [199] ou MSIReader [200].

Depuis, l'apparition de la MSI, les optimisations des protocoles de préparation des échantillons ainsi que le développement de logiciels pour le retraitement des données a permis à la MSI de passer des études qualitatives à des études quantitatives. Cependant de nombreux paramètres sont à prendre en compte comme la variation au sein des dépôts, la préparation des gammes de calibration, la normalisation des données ainsi que la répétabilité et reproductibilité des analyses. Tous ces aspects de l'imagerie par spectrométrie de masse quantitative seront donc repris dans la partie suivante.

Tableau 2.7 : Logiciels d'imagerie par spectrométrie de masse disponibles dans la littérature.

Publications	Années	Noms	Types d'outils	Disponibilités	Objectifs	Formats acceptés
<i>Clerens et al.</i> [201]	2006	<b>Create target and Analyze this!</b>	Logiciel	Open source	Acquisition/ Conversion des données	Bruker data
<i>Gibb et al.</i> [202]	2012	<b>MALDIquant</b>	R package	Open source	Quantification	imzML et BrukerFlexData
<i>Rübel et al.</i> [194]	2013	<b>OpenMSI</b>	Plateforme	Web	Partage des données MSI	imzML
<i>Parry et al.</i> [203]	2013	<b>Omnispect</b>	Logiciel sous MATLAB	Open source	Reconstruction de l'image/ Analyses statistiques	imzML, analyze 7.5 format, netCDF et mzXML
<i>Klinkert et al.</i> [204]	2014	<b>DataCube Explorer</b>	Logiciel	Open source	Reconstruction de l'image/ Analyses statistiques	imzML et analyze 7.5
<i>Robbe et al.</i> [205]	2014	<b>SpectViewer</b>	Logiciel	Open source	Reconstruction de l'image	imzML
<i>Bemis et al.</i> [206]	2015	<b>Cardinal</b>	R package	Open source	Analyses statistiques	imzML et analyze 7.5
<i>Palmer et al.</i> [195]	2016	<b>METASPACE</b>	Plateforme	Web	Annotations	imzML
<i>Källback et al.</i> [199]	2016	<b>mslQuant</b>	Logiciel	Open source	Reconstruction de l'image/ Quantification	FlexImaging et imzML
<i>Race et al.</i> [198]	2016	<b>spectralanalysis</b>	Logiciel	Open source	Reconstruction de l'image/ Analyses statistiques	imzML
<i>Bokhart et al.</i> [200]	2017	<b>MSiReader</b>	Logiciel sous MATLAB	Open source	Reconstruction de l'image/ Quantification	imzML, Analyze 7.5, ASCII et mzXML
<i>Bond et al.</i> [197]	2017	<b>massPix</b>	R package	Open source	Analyses statistiques	imzML
<i>Veselkov et al.</i> [196]	2018	<b>pyBASIS</b>	Plateforme	Open source	Processing de base de données MSI	imzML

## D. LA QUANTIFICATION EN IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

### I. INTRODUCTION A LA QUANTIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Deux types de stratégies peuvent actuellement être envisagées pour réaliser une quantification par spectrométrie de masse : la quantification relative qui permet d'observer des différences d'abondances de signaux entre différents groupes d'échantillons et qui permet de corriger des biais expérimentaux et la quantification absolue, qui permet une mesure réelle des concentrations de molécules cibles dans un échantillon.

Dans le cas d'études quantitatives, différents paramètres sont à considérer comme les valeurs limites [207]:

- la limite de détection (LOD) qui peut être déterminée comme étant la plus petite concentration d'un composé détectée dans une matrice réelle,
- et la limite de quantification (LOQ) considérée comme la plus petite concentration d'un composé déterminé avec une fidélité et une exactitude acceptable (80%).

Un second paramètre important à considérer est l'amplitude qui représente l'intervalle de concentration où la méthode allie à la fois linéarité, justesse et précision. La justesse correspond ici à la variation entre la valeur théorique et la valeur expérimentale alors que la fidélité correspond à la variation entre plusieurs valeurs expérimentales. Afin d'assurer la proportionnalité de la réponse de quantification, un coefficient de détermination ( $R^2$ ) de 0,99 est souhaité dans le cas d'une régression linéaire. La gamme de calibration doit être composée d'au moins 6 points incluant une limite de détection basse avec une erreur sur la justesse de mesure inférieure à 20 % [208].

Ces méthodes de calculs de LOD, LOQ et de linéarité sont majoritairement mise en place pour des quantifications réalisées par des techniques telles que la GC-MC ou la LC-MS. Etonnamment, dans la littérature, très peu d'explications sont données sur la façon dont sont calculées ces valeurs en MSI et la majorité des auteurs se basent sur une estimation du bruit de fond. Cette estimation n'est donc pas aussi stricte qu'en spectrométrie de masse dite classique. Cependant, les analyses MSI peuvent engendrer un bruit de fond plus important car il n'y a pas de méthode séparative en amont du module de spectrométrie de masse. De ce fait, les effets matrice peuvent être plus élevés et la variabilité d'analyse plus importante en raison des caractéristiques d'acquisition de la source MALDI. Cet aspect fera donc l'objet d'étude dans le **chapitre 2 de la partie expérimentale** de cette thèse.



## II. LA QMSI (MSI QUANTITATIVE)

Les techniques d'imagerie par spectrométrie de masse ont dans un premier temps été utilisées dans le but de réaliser des études qualitatives. Les différentes étapes de la préparation des échantillons entraînant une variabilité certaine, la quantification de la molécule cible va grandement dépendre du dépôt de matrice et de la composition du tissu environnant. Cependant, la MSI est une des seules techniques d'imagerie à pouvoir apporter des données de biodistribution structurale pour des molécules non marquées à une très haute résolution spatiale, ce qui la rend donc très intéressante pour la réalisation d'études quantitatives. Néanmoins, suivant la position de la molécule dans le tissu, l'ionisation peut varier selon l'effet de suppression des ions et l'effet matrice. Ces effets entraînent une variation de la sensibilité de détection et constituent une des principales limites pour la quantification en imagerie par spectrométrie de masse.

Cependant, avec le développement des techniques MSI actuelles, les capacités quantitatives de l'imagerie en spectrométrie de masse se sont améliorées. Premièrement, le développement des appareils de dépôts automatisés et standardisés a permis de perfectionner la reproductibilité des analyses. Cette approche automatisée est devenue indispensable aux études qMSI car elle permet à la fois d'obtenir un dépôt de matrice homogène et une meilleure extraction des molécules sur la totalité de la surface analysée. Ces dépôts automatisés ont également permis le développement d'approches de quantification absolue grâce à l'application homogène de standards internes sur tissus. Cette méthode permet ainsi de normaliser le signal en spectrométrie de masse et de pallier les changements d'environnement inhérent à la molécule ciblée.

### 1. LA NORMALISATION DES DONNEES SPECTRALES

Pour réaliser des études de quantification par MSI, la normalisation du signal joue un rôle important [209] [210] [211]. Ce procédé de transformation des intensités de chaque pixel afin de les obtenir à une échelle commune est une étape qui permet d'éliminer certaines variabilités dues aux principes d'imagerie par spectrométrie de masse. Pour cela, il existe plusieurs approches mathématiques telles que la normalisation par le courant ionique total (TIC : Total Ion Current), le rapport signal sur bruit (S/N), la racine carrée de la moyenne (RMS : Root Mean Square) ou la médiane des signaux.

La normalisation par le TIC implique une variation égale sur la totalité du tissu et peut permettre d'éliminer les variations induites par un dépôt inhomogène de la matrice. Pour cette même raison, cette normalisation doit être appliquée uniquement sur des tissus homogènes pour ne pas lisser le signal qui peut être dû à une hétérogénéité de zone. Une autre normalisation tel que le ratio S/N peut être appliqué sur tissu homogène. Cela consiste à remplacer les intensités des pics par le ratio S/N ce qui implique que la concentration des analytes doit être proportionnelle au S/N.

Il existe également une normalisation plus expérimentale via le coefficient d'extinction tissulaire ou grâce au dépôt d'un standard interne. Ces normalisations sont plus efficaces car elles permettent de pallier l'effet matrice et sont donc très utilisées lors d'études de qMSI. P. Källback *et al.*, 2012 [213] ont démontré (Figure 2.17) dans leur étude que seule la normalisation par un standard interne comparativement aux normalisations par la médiane, le TIC et le RMS a été en mesure de compenser totalement les zones sans tissus.

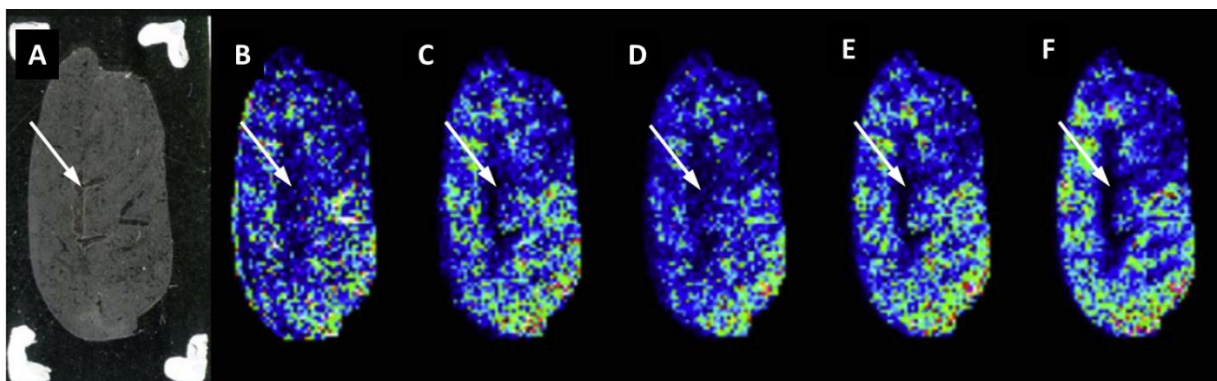


Figure 2.17 : Images MS obtenues avant et après normalisation. Modifiée de P. Källback *et al.*, 2012 [213]

Images de la distribution spatiale du Tiotropium sur des coupes centrales de tissus pulmonaires de rats. **A.** Scan optique indiquant par une flèche l'absence de tissus. **B.** Images MS sans normalisation, **C.** normalisée par la médiane, **D.** normalisée par le TIC, **E.** normalisée par le RMS, **F.** et normalisée via la molécule deutérée du Tiotropium.

La normalisation des intensités joue donc un rôle important sur la visualisation du signal en MSI mais peut aussi influencer la justesse des quantifications. La Figure 2.18, montre une amélioration de la linéarité d'une gamme de calibration après normalisation par le TIC, la médiane, le RMS ou par un standard interne marqué. Le  $R^2$  obtenue croit de 0,617 à 0,747 ou 0,797 après une normalisation par la médiane ou le RMS, à 0,841 avec une normalisation par le TIC et à 0,985 avec la normalisation par le standard interne.

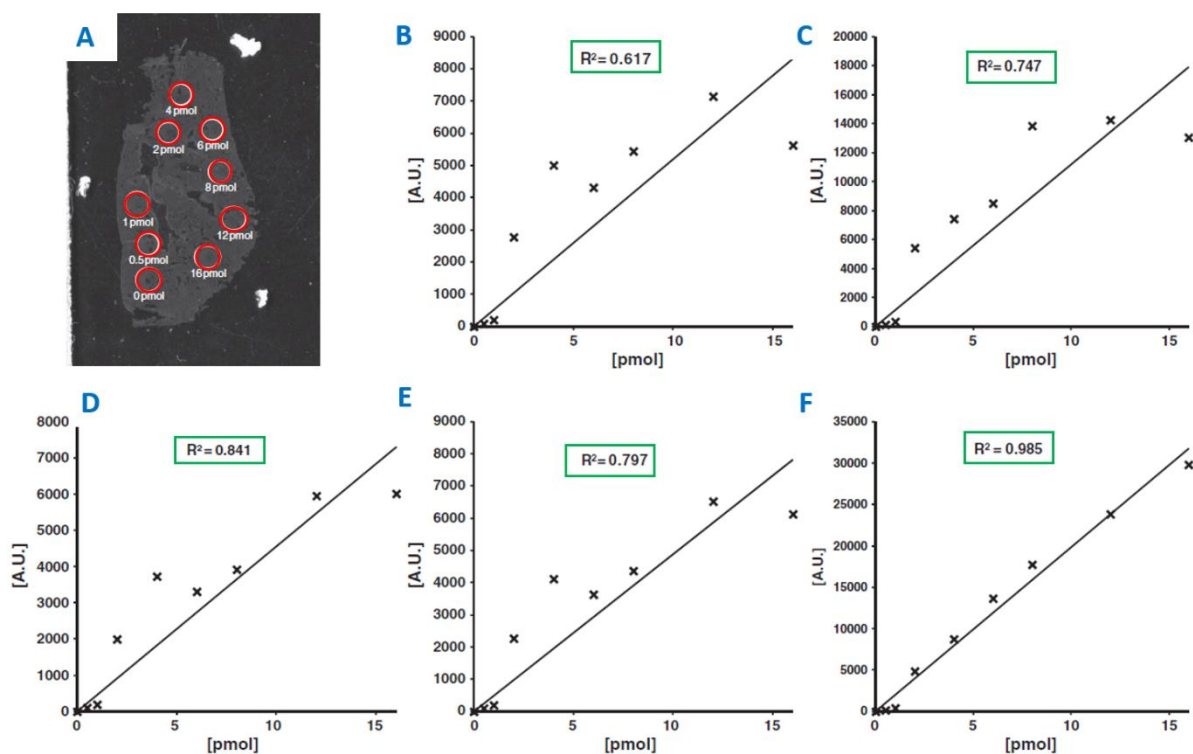


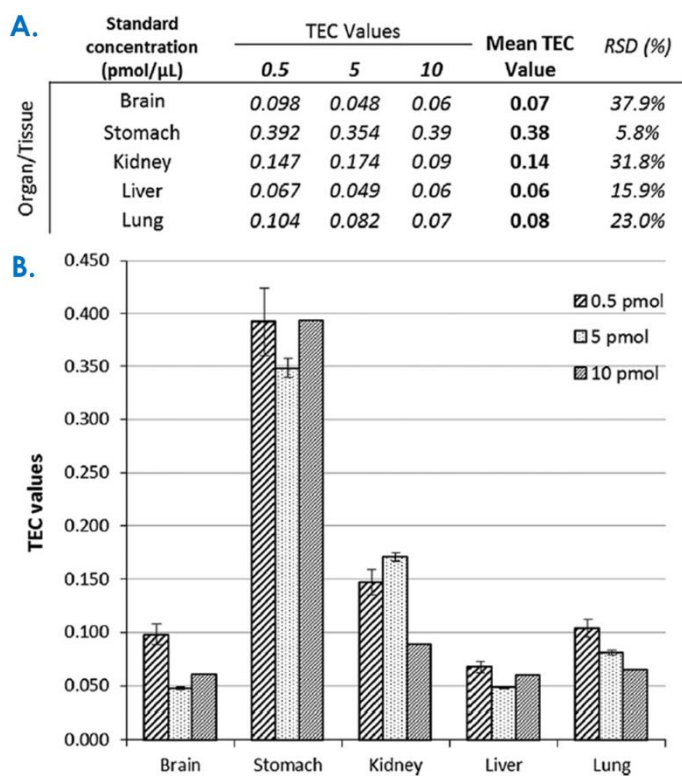
Figure 2.18 : Amélioration de la gamme de calibration avec standard interne. Modifiée de P. Källback *et al.*, 2012 [213]

Courbes d'étalonnages d'imipramine utilisant différentes méthodes de normalisation. **A.** Scan optique d'un poumon de rat avec différentes quantités d'imipramine déposées. Coefficients de corrélation calculés à l'aide des différentes méthodes de normalisation : **B.** sans normalisation, **C.** normalisation par la médiane, **D.** normalisation par le TIC, **E.** normalisation par le RMS, et **F.** normalisation avec le standard marqué.

Le standard interne permet donc d'éliminer les variations d'ionisation observées pour une molécule donnée au sein d'un tissu. Cependant, selon le type de molécule analysée, il n'est pas toujours possible de disposer d'un standard interne pour normaliser le signal, qu'il soit marqué ou non. Pour cela, il existe d'autres méthodes de normalisation comme le coefficient d'extinction tissulaire.

## 2. LE COEFFICIENT D'EXTINCTION TISSULAIRE

Malgré l'utilisation de standard interne pour normaliser le signal, l'analyse de tissus reste complexe en MSI. En effet, il n'est pas toujours possible de disposer de molécules marquées aux isotopes stables qui répondent de façon similaire à la molécule cible sur tissus. Pour cela, le coefficient d'extinction tissulaire (TEC : Tissue Extinction Coefficient) a été introduit par Hamm *et al.* en 2012 [214] et correspond au ratio de la molécule détectée sur tissu par rapport à la molécule détectée hors tissu. Pour illustrer leur concept, les



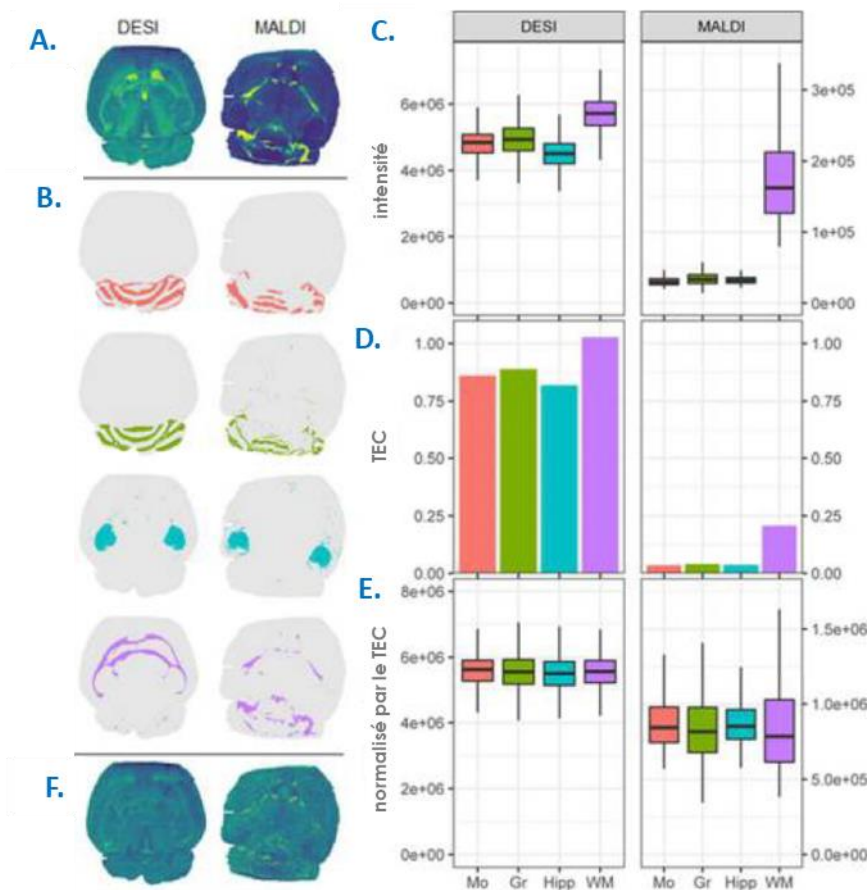
**Figure 2.19 : Le TEC selon la concentration du standard déposé par spray. Issue de Hamm *et al.* en 2012 [213].**

**A.** Valeurs du TEC, moyenne et écart-type par organe selon la concentration de l'étalon mélangé et déposé avec la matrice.  
**B.** Histogramme des valeurs TEC calculées pour chaque organe selon la concentration de propranolol. Les barres d'erreur ont été calculées en comparant trois valeurs TEC par tissu pour chaque concentration.

auteurs ont donc déposé sur trois coupes de corps entier de rat, trois concentrations de propranolol : 0,5, 5 et 10 pmol/ $\mu$ L mélangées à la matrice DHB. A partir de ces trois dépôts réalisés par spray, le TEC calculé est resté constant quelle que soit la concentration, excepté l'estomac (**Figure 2.19**). Ainsi, en normalisant le signal d'une gamme de calibration déposée sur lame ITO par les TEC obtenues, ils ont pu quantifier le propranolol dans les reins, poumons et cerveaux de rats exposés. Cette approche est donc une alternative au spray de standard interne pour des études plutôt dirigées vers l'analyse de corps entiers ou de tissus hétérogènes.

Cette même méthode a été reprise par A. Taylor *et al.* en 2018 [215] pour l'analyse de coupes de cerveaux de

souris de 10  $\mu$ m recouvertes de façon homogène d'olanzapine déposée par sublimation. Ces coupes ont ensuite été analysées en MALDI et DESI MSI. Ils ont premièrement procédé à la segmentation des régions anatomiques du cerveau à l'aide de regroupements par région de segmentation. Pour une même concentration d'olanzapine, les intensités retrouvées sont plus importantes dans la substance blanche que dans la couche granulaire ou moléculaire du cerebellum ou l'hippocampe. Cette différence d'effet matrice est plus particulièrement observée avec la source d'ionisation MALDI (**Figure 2.20, C.**). Après avoir appliqué le TEC calculé pour chacun de ces clusters, les différences de rendement d'ionisation de l'olanzapine sont normalisées selon les régions du cerveau (**Figure 2.20, E. et F.**) et ainsi une même intensité de détection est mesurée quelle que soit la région du cerveau analysée et quelle que soit la technique.



**Figure 2.20 : Application du TEC en DESI et MALDI - MSI. Issue de A. Taylor *et al.* en 2018 [215]**

**A.** Images DESI et MALDI - MSI de l'olanzapine. **B.** Sélection de clusters appariés à partir des regroupements de région par segmentation ( $k=15$ ) obtenus avec les données DESI et MALDI correspondant aux zones moléculaires (Mo) et granulaires (Gr) du cervelet, à l'hippocampe (Hipp) et à la substance blanche (WM). **C.** Box plot montrant l'intensité de l'olanzapine dans chaque cluster sélectionné. **D.** Coefficients d'extinction tissulaire calculés pour les groupes sélectionnés. **E.** Box plots de l'intensité de l'olanzapine normalisée par le TEC de chaque groupe. **F.** Images DESI - MSI et MALDI - MSI après normalisation de l'olanzapine.

Cette méthode de standardisation permettrait donc de normaliser les différences d'ionisation pour une même molécule au sein de tissus hétérogènes. Ce tissu peut aussi bien être composé de différentes zones issues d'un même organe ou de différents organes si l'on procède à l'analyse de corps entier.

### 3. LES GAMMES DE CALIBRATION EN QMSI

Outre l'aspect hétérogène du tissu et l'effet de suppression d'ionisation, la façon dont la gamme de calibration est réalisée joue un rôle majeur sur la qualité de la quantification. Différentes approches sont proposées dans la littérature [212] [216] (**Figure 2.21**).

- A. L'utilisation du coefficient d'extinction tissulaire qui permet donc de prendre en compte l'effet matrice dans le calcul de quantification,
- B. L'utilisation d'une gamme déposée hors tissu ou sur tissu,

C. L'utilisation d'homogénat de matrice biologique (tissus biomimétiques) afin de mimer l'analyte au sein du tissu cible.

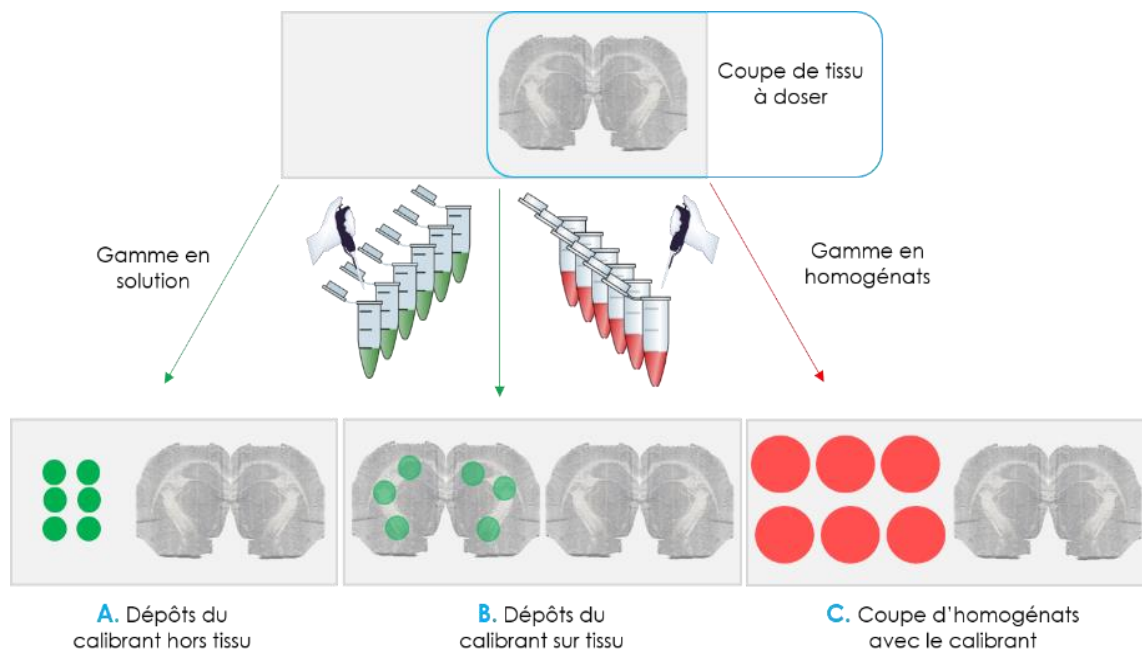


Figure 2.21 : Les différentes méthodes pour la qMSI

#### a. Les gammes par dépôts sur coupes tissulaires.

La technique la plus utilisée correspond aux dépôts des différents points de la gamme sur tissus afin de prendre en compte les effets matrices (**Figure 2.21, B.**). La gamme se doit donc d'être déposée sur le même tissu que le tissu cible afin de reproduire les mêmes effets de matrice. Ce type de gamme est plus largement utilisé pour quantifier des molécules exogènes. Dans les publications de A. Buck *et al.*, 2015 [217] et de N. Sun *et al.*, 2016 [218], des médicaments tels que le pirféridone et l'irinotécan (**Figure 2.22**) ont été quantifiés via cette approche chez la souris. Cette méthode permet d'obtenir des coefficients de détermination de  $R^2 = 0,99$  pour la pirféridone et la CPT 11 et de  $R^2 = 0,95$  pour la SN-38. Plus particulièrement, l'étude de A. Buck *et al.*, 2015 [217] permet de quantifier le médicament CPT 11 et sa forme active le SN-38 sur des coupes de tubes digestifs de souris. Les résultats ont indiqué que le CPT 11 était majoritairement présent dans la lumière intestinale à  $15 \text{ pmol/mm}^2$  au sein des coupes II et III et à  $5 \text{ pmol/mm}^2$  au sein de la coupe. IV. Sa forme active n'est que peu retrouvée au sein des trois coupes analysées. Cette étude montre l'utilité de la qMSI dans une étude de pharmacocinétique dans le cadre d'analyse de médicament. Cependant, si la molécule à doser est présente dans le tissu, la gamme de calibration peut être réalisée avec cette même molécule marquée aux isotopes stables tels que le deutérium ou le carbone 13. Les points de gamme peuvent alors être déposés sur tissu afin de mimer la réaction du

composé endogène sans réaliser d'ajouts dosés. J. G. Swales *et al.*, 2018 [219] ont utilisé cette méthode sur des coupes de tumeurs de souris afin de réaliser une gamme de calibration et quantifier le lactate en se basant sur la molécule marquée trois fois au carbone 13.

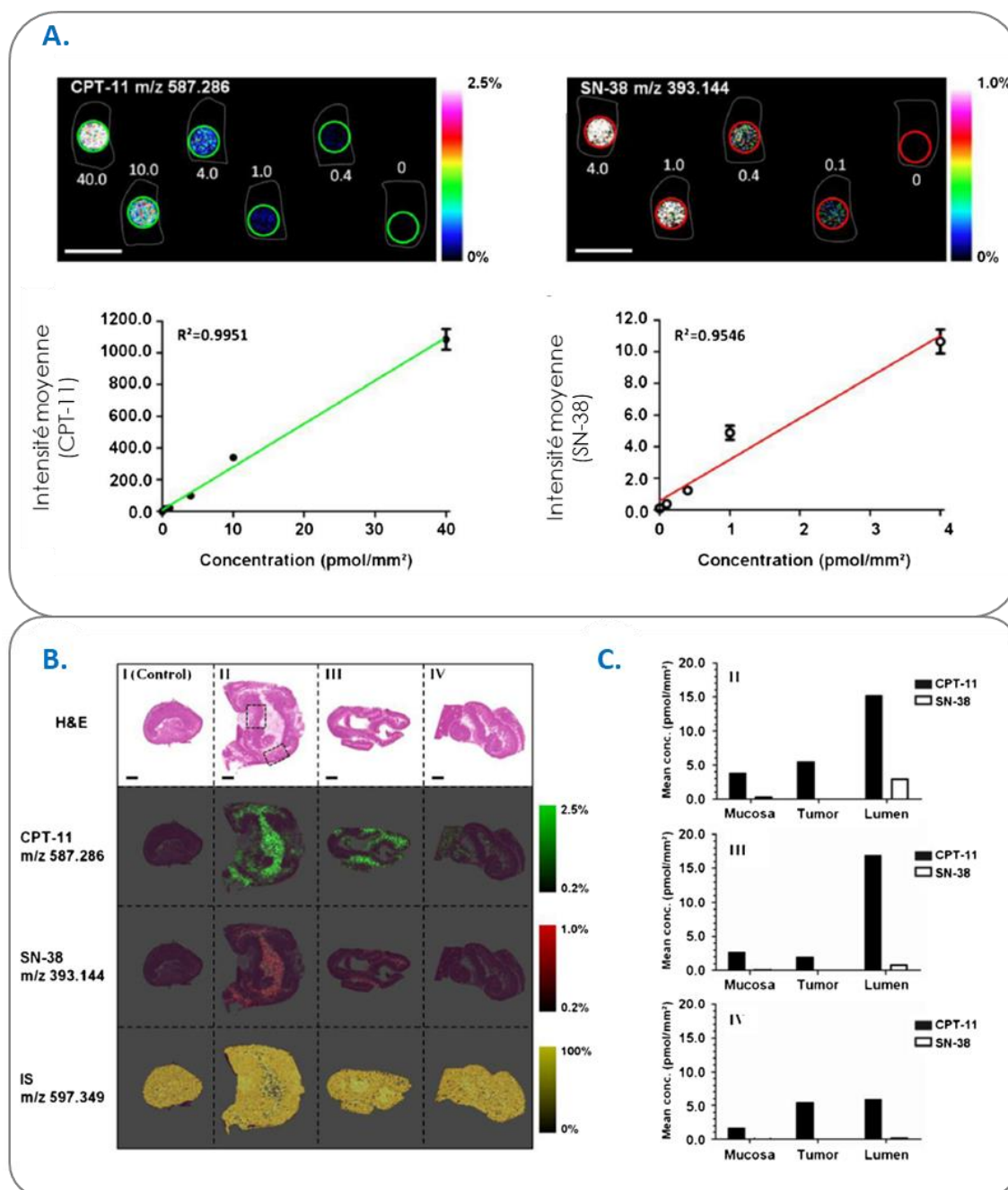


Figure 2.22 : Quantification par dépôts de gamme sur tissu avec standard interne. Images modifiées de A. Buck *et al.*, 2015 [217].

A. Gamme de dilution observée sur des cryosections du tube digestif pour le CPT-11 (Irinotécan hydrochloride,  $m/z$  587,286  $\pm$  0,002 Da) et le SN-38 (7-ethyl-10hydroxycamptothecin,  $m/z$  393,144  $\pm$  0,002 Da). La courbe d'étalonnage est tracée en utilisant le rapport d'intensité de la molécule et du standard interne  $m/z$  597,349  $\pm$  0,002 Da. Barre d'échelle 5 mm. B.II. à B.IV : Images montrant les colorations H&E (Hématoxyline & Eosine) des sections I, II, III et IV du tissu intestinal et leurs images MALDI FT-ICR MS dans la tumeur contrôle la muqueuse intestinale, la tumeur et la lumière gastro-intestinale. C. Concentrations retrouvées au sein des différentes coupes.

De plus, différentes façons de réaliser des gammes de calibration en dépôts existent. Pour évaluer ces différentes méthodes de quantification en imagerie par spectrométrie de masse, C. W. Chumbley *et al.*, 2016 [220] ont comparé ces différentes approches quantitatives en réalisant des dépôts de standard sur le tissu, sous le tissu, en sandwich et en pré-mélange sur le tissu (Figure 2.23, A.). Les dépôts en sandwich correspondent à un dépôt sous le tissu puis sur le tissu et le dépôt en pré-mélange correspond à l'ajout du standard et de la matrice simultanément sur le tissu. Cette étude a été réalisée avec un appareil de dépôts automatisés pour l'analyse de la rifampicine déposée en huit répliquats pour cinq points de concentrations. Les équations des courbes associées à chacune de ces gammes de calibration semblent similaires (Figure 2.23, B.), mais la quantité de rifampicine retrouvée dans les tissus dosés *in vitro* par les auteurs diffère selon le mode de dépôt. Elle est dosée à 10 µg/g à partir de la gamme en dépôt sous tissus, à 6,5 µg/g avec la gamme en dépôts en sandwich, 2,5 µg/g avec la gamme en dépôts sur tissus et enfin à 1 µg/g avec la gamme réalisée en pré-mélange (Figure 2.23, C.).

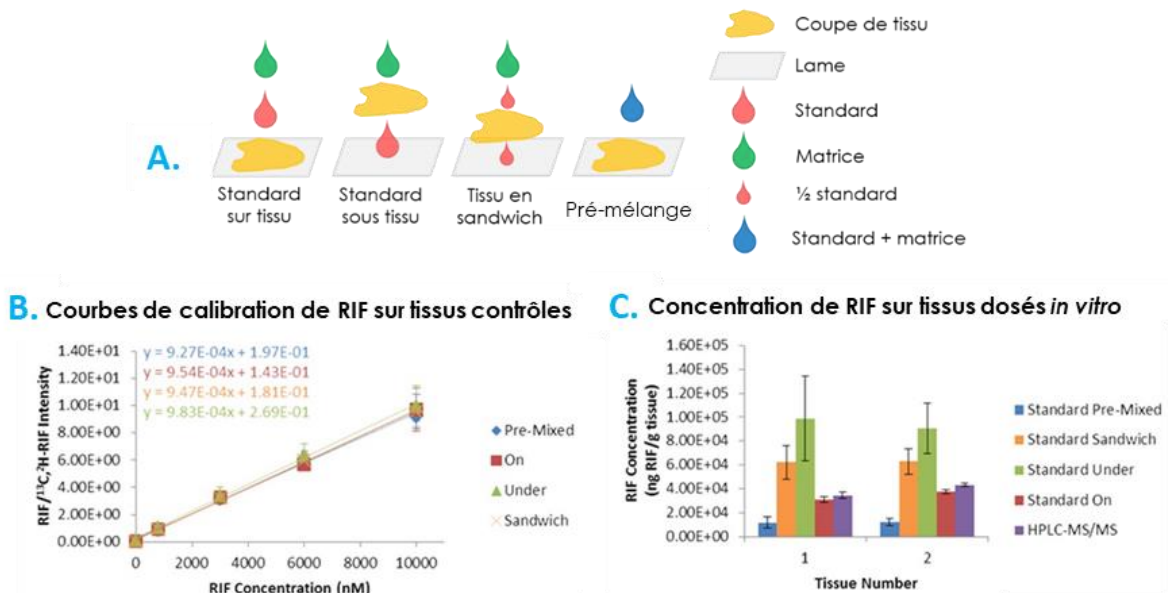


Figure 2.23 : Comparaison de méthodes de quantification en MSI. Modifiées de C. W. Chumbley *et al.*, 2016 [220].

**B.** Courbes d'étalonnage obtenues à l'aide de 4 méthodes différentes représentées en **A.** **C.** Graphique comparant les données MALDI - MS/MS ( $n = 3$ ) aux données LC - MS/MS ( $n = 5$ ). Après analyse des variances avec un test de Tukey, des différences significatives ont été trouvées entre les résultats obtenus par LC - MS/MS et ceux obtenus par dépôts sur tissus et sous tissus ainsi qu'en pré-mélange de matrice et standard.

Dans le but de déterminer quelle méthode est la plus juste, les concentrations dosées via ces différentes techniques ont ensuite été comparées à la méthode de quantification par LC - MS/MS. Il s'avère ici que la gamme de rifampicine effectuée en dépôt sur tissu est la méthode qui permet d'obtenir une quantification la plus proche de la méthode LC - MS/MS avec 2,54 µg/g contre 2,29 µg/g, respectivement. La méthode qui utilise le pré-mélange de l'étalon induit une sous-estimation des quantités de rifampicine expliquée par une co-cristallisation qui se déroule avant d'atteindre le tissu et qui conduit donc à une plus



grande intensité détectée pour le standard marqué. Etonnamment, la méthode qui surestime le plus les quantités de rifampicine est la méthode où le dépôt a été réalisé sous le tissu. Ceci est probablement causé par la pénétration incomplète de l'étalon à travers le tissu et qui réduit le rendement d'extraction de la matrice pour l'analyse.

Cette dernière étude montre que les dépôts de standard interne sur coupe de tissus donnent des résultats proches de la LC - MS. D'autres équipes ont donc cherché à corréliser leurs résultats avec des données issues de la LC-MS et de la GC - MS quantitative. En effet, S. L. Koeniger *et al.*, 2011 [221], N. Takai *et al.*, 2012 [222] et E. Takeo et S. Shimma en 2019 [223] ont réalisé parallèlement différentes gammes de calibration de médicaments au sein de tissus avec les techniques LC - MS et MSI. La technique de dépôt sur tissus a été utilisée en MSI. Ils ont ensuite corrélé les résultats obtenus via ces deux méthodes dans le but de quantifier les données obtenues en MSI. Par exemple, S. L. Koeniger *et al.*, 2011 [221] ont quantifié l'olanzapine dans du foie de souris après injection de différentes doses. En utilisant des coupes adjacentes, ils ont ainsi corrélé les intensités obtenues par dose injectée en fonction du signal MSI ( $R^2 = 0,9$ ) et la quantification effectuée en LC - MS ( $R^2 = 0.89$ ) (Figure 2.24, A.) et ont obtenu ainsi un coefficient de détermination  $R^2$  de 0,9792. L'équation de la courbe est ensuite utilisée afin de remonter aux quantités analysées par MSI. Cette expérience est réalisée sur un organe homogène comme le foie et laisse supposer que la formation d'homogénats pour la quantification LC - MS ne va pas entraver la bonne corrélation des signaux obtenue par chaque méthode. Cependant, N. Takai *et al.*, 2012 [222] ont utilisé le même procédé pour différents organes comme le cerveau ou la rate, c'est à dire des tissus hétérogènes et ont obtenu eux aussi une corrélation satisfaisante de  $R^2 = 0,95$  (Figure 2.24, B.).

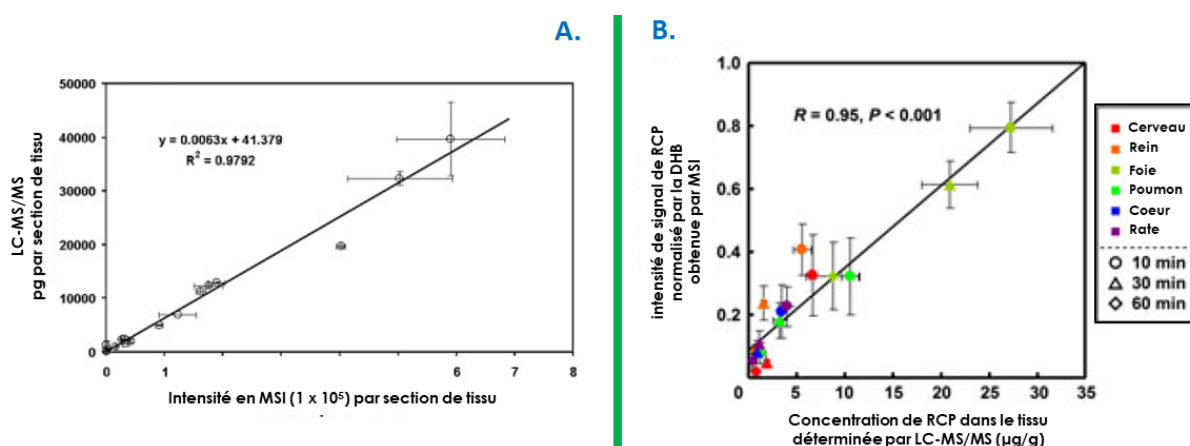


Figure 2.24 : Corrélation des données LC - MS et MSI. Issus de S. L. Koeniger *et al.*, 2011 [221], N. Takai *et al.*, 2012 [222]

A. Relation linéaire entre la quantité d'olanzapine mesurée par LC - MS et la réponse MSI. B. Corrélation entre les concentrations tissulaires du raclopride déterminées par LC - MS et les intensités obtenues par MSI normalisée ou non avec la DHB ( $n = 3$ ).

Quel que soit l'organe utilisé, les auteurs obtiennent des corrélations élevées entre les intensités MSI et les quantifications effectuées en LC - MS. Malgré tout, la capacité quantitative de la MSI n'est pas rigoureusement étayée dans la mesure où la corrélation des données est réalisée entre les intensités obtenues par chaque technique et non pas entre les quantités retrouvées. Dans cette optique, M. Lagarrigue *et al.*, 2014 [224] ont comparé les quantifications réalisées par MSI et GC-MS pour la chlordécone dans du foie de souris. Ces travaux effectuent de façon indépendante le dosage de ce médicament à la fois par GC - MS et par qMSI et montrent une corrélation de  $R^2 = 0.995$  (Figure 2.25, D.), prouvant ainsi les possibilités quantitatives de la MSI. Même si cette étude indique une forte corrélation entre les données quantifiées, la chlordécone est retrouvée quatre fois moindre par la méthode de qMSI que par la méthode de GC - MS. Différentes hypothèses ont été proposées par les auteurs pour expliquer ce résultat : la conversion du chlordécone en hydrate de chlordécone pourrait être plus importante dans les solutions d'étalonnage qu'*in vivo* et entraînerait une sous-estimation de la quantité de chlordécone dans la section hépatique exposée ; l'extraction de la chlordécone pendant la cristallisation de la matrice pourrait être moins efficace dans la section hépatique exposée que dans les solutions d'étalonnage ou alors la chlordécone pourrait être séquestrée *in vivo* par d'autres espèces moléculaires telles que l'albumine et les lipoprotéines de haute densité (HDL) pour lesquelles la chlordécone a une forte affinité. Etonnamment, pour pallier cette différence de quantité calculée, les auteurs ont donc utilisé l'équation obtenue sur ce graphique de corrélation afin de corriger les quantités quantifiées en MSI et obtiennent ainsi des valeurs similaires en GC - MS et MALDI - MSI pour les différents temps d'expositions (Figure 2.25, E.).

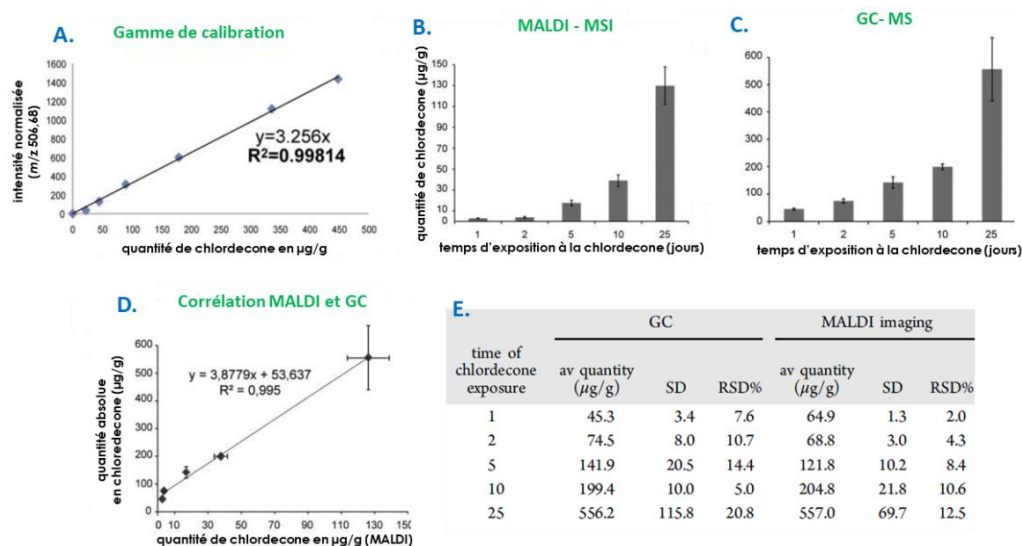


Figure 2.25 : Corrélation des données quantitative en MSI et en GC-MS. Issues de M. Lagarrigue *et al.*, 2014 [224].

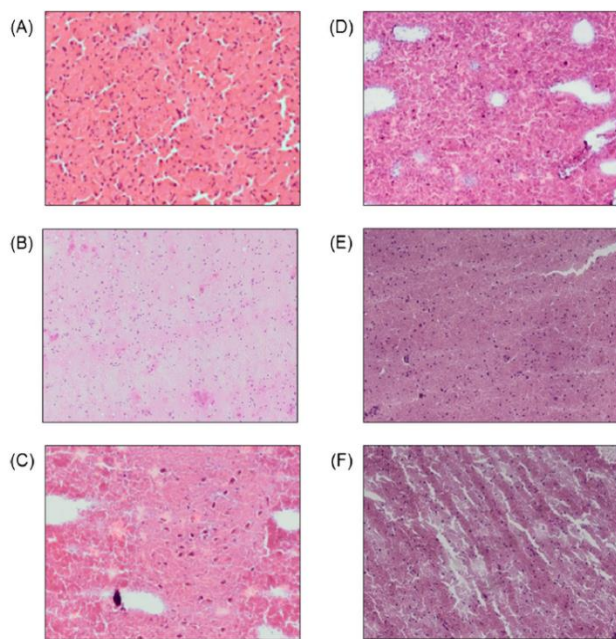
A. Courbe d'étalonnage obtenue par normalisation de l'intensité de l'hydrate de chlordécone à l'intensité de l'hydrate de  $^{13}\text{C}10$ -chlordécone. B. Profils d'accumulation du chlordécone par MALDI - MSI et (C.) par analyse GC-MS. (D.) La quantité de chlordécone mesurée par imagerie MALDI est corrélée à la quantité absolue de chlordécone mesurée par GC-MS. Les barres d'erreur représentent l'écart-type des valeurs moyennes. (E.) Quantités calculées en MSI à partir de l'équation en D.

Cependant, le dépôt de molécules sur tissus pour la quantification pose encore certaines interrogations quant à la pénétration du standard dans le tissu ou quant à l'effet matrice que subit la molécule étalon. Pour cela, d'autres approches sont proposées dans la littérature comme l'utilisation d'homogénats.

#### b. Les gammes en homogénats de tissus

Pour réaliser des quantifications en mimant de façon globale l'effet matrice d'une molécule au sein d'un tissu, certaines équipes proposent l'utilisation d'homogénats ou de tissus mimétiques. M. Groseclose et S. Castelino [225] [226] ont été les premiers à introduire en 2013 les modèles de tissus « mimétiques » pour la quantification de médicaments par imagerie MALDI. Le but de ces modèles de tissus mimétiques est de représenter au plus proche les effets d'extraction et de suppression des ions que pourraient subir la ou les molécules cibles au sein de tissus réels. Cette approche consiste donc à créer des homogénats (**Figure 2.21, A.**) de tissus issus d'organes pour ensuite venir y ajouter des concentrations connues et croissantes de la molécule à analyser. Ces homogénats sont ensuite moulés et congelés afin d'obtenir des tissus mimétiques d'organes contenant la molécule cible répartie de façon la plus homogène. Ces tissus congelés sont ultérieurement découpés et montés sur une même lame d'imagerie afin d'avoir des analyses reproductives et palier l'hétérogénéité du dépôt de matrice.

Suite à cette première étude MSI sur homogénats menée par M. Groseclose et S. Castelino où ils ont inséré des homogénats de tissus dans un bloc d'OCT et coupé l'ensemble au cryotome, d'autres équipes ont proposé des approches alternatives. Par exemple, L. Jadoul *et al.*, 2015 [227] et H. Hansen et C. Janfelt, 2016 [228] ont respectivement publié leurs méthodes pour des homogénats de cerveaux et de foies. Le premier groupe a proposé de mouler les homogénats dans des tubes type Eppendorf alors que le second propose de créer un bloc d'homogénat de cerveau pour ensuite venir y insérer des homogénats dosés avec une concentration croissante de la molécule à doser. Chacun de ces travaux a abouti à des coefficients de détermination de  $R^2 = 0.9$  pour les gammes de calibration réalisées et H. Hansen et C. Janfelt ont montré en plus une superposition des gammes obtenues par la méthode des homogénats avec celle des dépôts sur tissus pour une même concentration analysée par tissu. M. Groseclose et S. Castelino ont montré quant à eux que leur méthode permet de quantifier la nevirapine dans du foie de rat à des valeurs proches de la LC - MS/MS : 42,3 ng/g contre 46,5 ng/g respectivement. Ils ont reproduit l'expérience avec la lapatinib dans des xénogreffes de tumeurs de souris (2500 ng/g et 2850 ng/g, respectivement) et des foies de chien (110 ng/g et 122 ng/g, respectivement).



**Figure 2.26 : Comparaison de différentes méthodes d'homogénéisation des tissus pour la création de modèle mimétiques. L. Jadoul *et al.*, 2015 [227]**

Coloration H&E de section provenant (A) d'une coupe de cerveau intacte comparée à (B-F) des homogénats de cerveaux obtenus selon différentes conditions. Quatre outils pour l'homogénéisation de tissus : (B) Potter-Elvehjem, (C) une sonde à ultrason, (D) un mixeur, et (E) un lyseur MagNA. Deux méthodes de congélation pour des homogénats réalisés avec le lyseur : (E) tube immergé dans l'isopentane à  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , (F) Tubes placés dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Parallèlement, L. Jadoul *et al.*, 2015 [227] ont évalué après coloration H&E, l'allure de leurs homogénats de cerveaux obtenus à partir de quatre appareils différents, Potter, sonde à ultrason, mixeur et lyseur, et deux méthodes de congélation, immergé dans l'isopentane ou dans un congélateur. Ces coupes d'homogénats ont donc été comparées à une coupe de cerveau intacte (Figure 2.26). Cette étude révèle que l'utilisation d'un Potter ou d'un lyseur pour la réalisation des homogénats suivie d'une congélation dans un bain d'isopentane à  $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  est favorable à la réalisation d'homogénats proche du tissu d'origine (Figure 2.26, E.). En effet, une congélation trop longue peut entraîner la formation de cristaux et donc des irrégularités lors de la découpe du tissu. De plus, un mauvais broyat du tissu peut engendrer des homogénats moins denses avec moins de matière biologique qui ne représente pas l'effet matrice d'un réel tissu. La densité du tissu va également influencer la distribution du standard dans l'homogénat ainsi que son extraction après cristallisation de la

matrice et donc le signal détecté pour la molécule à quantifier.

Chacune de ses équipes a évalué avec succès la capacité à réaliser des études de qMSI à partir de courbes de calibration réalisées en homogénats. Cependant, comparativement à la technique en dépôt, cette méthode peut être plus difficile à maîtriser car elle demande beaucoup de tissus biologiques et nécessite plus de temps et d'étapes de réalisation. Néanmoins, la MSI montre au travers de ces études un fort potentiel pour la réalisation d'études quantitatives.

Actuellement, la quantification en MSI pose donc encore question et de nombreux paramètres doivent être pris en compte pour obtenir des données fiables. Premièrement, selon la molécule à analyser, il faut veiller à être au plus proche des conditions d'ionisation de celle-ci au sein du tissu. Pour cela, la gamme peut être réalisée par dépôt, en homogénat ou en prenant compte du coefficient d'extinction tissulaire avec ou sans standard interne pour la normalisation. Malgré ces précautions, il est parfois nécessaire de confronter les résultats de qMSI à d'autres techniques de quantification. Pour compléter cet état de l'art qui

illustre les difficultés d'obtention de gammes d'étalonnage pertinentes, les aspects de répétabilité et de reproductibilité de ces analyses quantitatives sur tissus vont maintenant être abordés.

#### 4. FIDELITE DES ETUDES QMSI

Comme décrit précédemment, le protocole MSI se décompose en 5 étapes qui sont : la découpe du tissu et sa préparation, le dépôt de matrice sur ce tissu, le choix de la source, l'acquisition des données et le traitement des données pour la génération de l'image. Toutes ces étapes peuvent être sources de variabilité.

Dans le domaine de la chimie analytique, la FDA (Foods and Drugs Administration) propose que le coefficient de variation (CV) de la reproductibilité ne dépasse pas les 20 % [229]. Cependant peu d'études démontrent les capacités de reproductibilité de la MSI. Néanmoins, des améliorations ont été apportées notamment sur les dépôts de matrices avec la création de protocoles de dépôts automatisés [230] [231] ou grâce à la mise en place d'études MSI inter laboratoires en DESI - MSI [232] [233] et en MALDI - MSI. Récemment, J. A. Barry *et al.*, 2019 [234] ont effectué une étude visant à évaluer les variabilités dans le protocole de qMSI pour des études inter-laboratoires. Trois sites ont donc reçu des échantillons de foies de rats perfusés avec de la clozapine et ceux-ci ont été analysés à l'aide d'une méthode précédemment standardisée. Les quantifications effectuées à partir de gammes en dépôts et en homogénats ont été réalisées en 6 réplicatas par un expérimentateur présent sur chaque site et comparées avec une méthode de quantification LC - MS/MS. Les comparaisons ont été faites sans normalisation des données avec une normalisation par un standard deutérée.

Premièrement, les données normalisées ou non ont montré une quantification de la clozapine et de la norclozapine similaire à la fois en homogénats et en dépôts sur tissus. De plus, les quantités obtenues en qMSI sont similaires à celles obtenues en LC-MS, avec respectivement 9 µg/g et 11,7 µg/g de clozapine et 150 µg/g et 190 µg/g de norclozapine. Deuxièmement, les expériences ont montré la capacité de la qMSI à fournir des données quantitatives répétables ( $CV \leq 16\%$ ) sur deux molécules au sein d'un même laboratoire et avec une justesse de mesure par rapport à la LC - MS allant de 52 % à 110 % (**Figure 2.27**). De plus, les données sont reproductibles entre les laboratoires avec un CV variant de 13 à 29 % selon les quantifications.

		CLZ				NCLZ			
		mimetic model		dilution series		mimetic model		dilution series	
		raw	norm	raw	norm	raw	norm	raw	norm
mean concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	IMS Analyst 1	7.62	10.16	6.39	7.81	160.40	209.33	137.33	143.08
	IMS Analyst 2	10.09	9.09	7.42	9.10	150.92	137.50	192.71	191.66
	IMS Analyst 3	9.64	10.06	11.08	9.88	126.20	120.27	133.13	98.53
	IMS pooled	9.12	9.77	8.30	8.93	145.84	155.70	154.39	144.42
	LC-MS/MS			11.7				190.7	
repeatability (% RSD)	IMS Analyst 1	7	7	11	9	4	6	12	23
	IMS Analyst 2	11	12	17	8	13	13	9	8
	IMS Analyst 3	5	16	15	15	4	16	5	7
	mean	8	12	14	11	7	12	9	13
	LC-MS/MS			8				8	
reproducibility (% RSD)	IMS pooled	14	13	29	15	13	27	20	30
accuracy <sup>a</sup> (%)	IMS Analyst 1	65	87	55	67	84	110	72	75
	IMS Analyst 2	86	78	63	78	79	72	101	101
	IMS Analyst 3	82	86	95	84	66	63	70	52
	IMS pooled	78	84	71	76	76	82	81	76

Figure 2.27 : Quantification de la clazopine et de la norclozapine sur 3 sites différents. Issue de J. A. Barry *et al.*, 2019 [234].

Comparaison de la quantification en LC - MS et en qMSI de la clazopine et de son métabolite majeur : la norclozapine. La quantification a été réalisée dans un foie de rat à partir de trois méthodes de quantification : la LC-MS, la qMSI à partir de gamme en dépôt et de gamme en homogénat. La répétabilité a été mesurée pour chaque expérimentateur puis la reproductibilité a été évaluée entre les laboratoires. Enfin, la justesse de mesure a été estimée.

Cette étude montre que la réalisation d'analyses quantitatives répétables et reproductibles est concevable en MSI mais nécessite néanmoins d'exécuter un protocole de préparation d'échantillons fastidieux. Par ailleurs, il apparaît que la majorité des études quantitatives référencées dans la littérature s'orientent vers une quantification de métabolites ou de molécules médicamenteuses et non pas vers celle des nanoparticules qui font l'objet de cette thèse.

L'étude de la distribution des nanoparticules en MSI est un domaine émergent qui pourrait certainement bénéficier de l'apport de techniques complémentaires d'imagerie. La partie suivante sera donc dédiée aux travaux impliquant une combinaison de la MSI à d'autres techniques d'imagerie pour l'étude de molécules d'intérêt, qu'elles soient non nanoparticulaires ou nanoparticulaires.

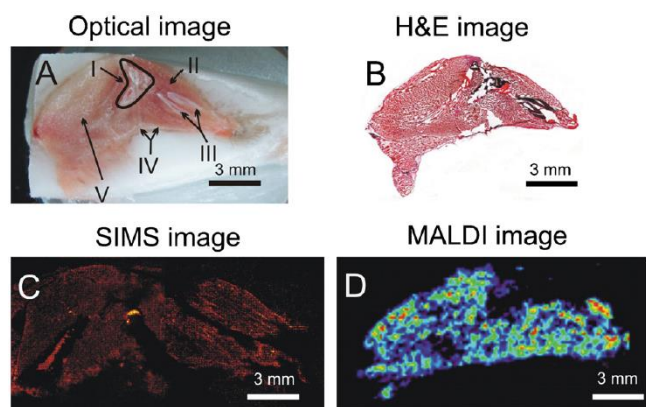
## E. LA MSI COMBINEE AUX AUTRES TECHNIQUES D'IMAGERIE.

L'intérêt de l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'étude de la distribution de molécules au sein de tissus biologiques ayant été démontré, l'intérêt de la coupler à d'autres techniques d'imagerie va maintenant être illustré. En effet, chaque technique d'imagerie apporte une spécificité bien particulière et il peut donc être judicieux d'associer deux approches d'imagerie afin d'en combiner les avantages et ainsi obtenir des outils analytiques plus puissants. La MSI peut être associée avec des techniques d'imagerie telles que la fluorescence ou la radioimagerie dans le but d'obtenir par exemple des informations de spécificité de liaison, de caractérisation structurale ou des données quantitatives.

### I. LE COUPLAGE DES DIFFERENTES SOURCES MSI

L'imagerie par spectrométrie de masse peut être réalisée avec différentes sources comme la source MALDI, la source SIMS et la source DESI. Ces trois techniques, décrites dans le chapitre en **Annexe 3** sont complémentaires et peuvent donc être utilisées de façon successive pour l'analyse d'un même échantillon.

Pour exemple, D. Touboul *et al.*, 2007 [235] et N. Desbenoit *et al.*, 2018 [236] ont combiné deux techniques d'imagerie par spectrométrie de masse pour la recherche de biomarqueurs dans la maladie de Fabry ou pour l'analyse de lipides au sein d'une même coupe de tissu cancéreux du colon. Les seconds ont donc utilisé successivement un TOF - SIMS afin d'obtenir des images à une très haute résolution spatiale de 1  $\mu\text{m}$

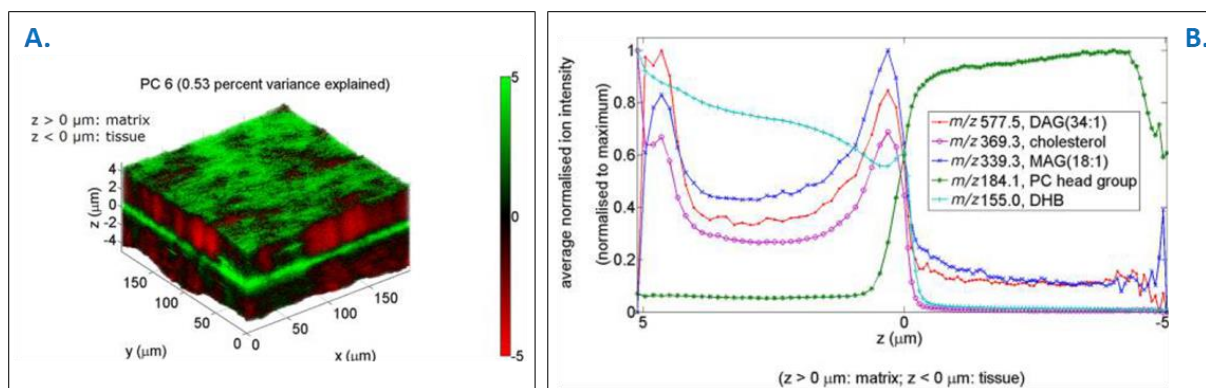


**Figure 2.28 : Combinaison de l'imagerie SIMS et MALDI. Issue de Chughtai *et al.*, 2012 [237].**

Imagerie multimodale d'un membre chez une souris. **A.** Image optique du tissu indiquant les différentes régions d'une jambe de souris : articulation du genou (I), muscle (II), péroné et tibia (III), ligaments (IV) et fémur sous le muscle (V). **B.** Coloration H&E. **C.** Image SIMS à haute résolution spatiale du cholestérol à  $m/z$  369. **D.** Image MALDI de phosphatidylcholine PC 34:1 à  $m/z$  760,5.

et un AP - MALDI - orbitrap pour réaliser une caractérisation moléculaire plus précise grâce à une résolution spectrale de 140 000 et des analyses MS/MS. Plus particulièrement l'étude de Desbenoit *et al.*, 2018 ont montré pour la première fois une analyse de la même coupe par deux techniques d'imagerie. Dans le même esprit, Chughtai *et al.*, 2012 [237] ont choisi de coupler ces deux sources MSI pour tirer profit de leur complémentarité de détection. Le SIMS a permis la détection de petites molécules et de lipides alors que le MALDI a permis d'étudier les phospholipides et les peptides et protéines du tissu musculosquelettique d'une souris (**Figure 2.28**).

Enfin, S. Van Nuffel *et al.*, 2018 [193] ont analysé à l'aide d'analyses TOF - SIMS 3D la délocalisation des lipides au sein de coupes de foie de souris après application de la matrice MALDI (**Figure 2.29**). Cette étude a montré une délocalisation des molécules telles que le cholestérol vers les couches de matrices alors que les phospholipides restent au niveau du tissu.



**Figure 2.29 : Apport de la source SIMS à l'imagerie MALDI. Issu de S. Van Nuffel *et al.*, 2018 [193]**

**A.** Image des scores 3D pour la sixième composante principale (PC6) des données d'image ToF-SIMS 3D issus d'une section de tissu hépatique recouverte d'une matrice sur une lame de microscope recouverte d'ITO. Le cholestérol est présent dans les scores supérieurs à zéro alors que les DAG et MAG sont présents dans les scores inférieurs à zéro. **B.** Profils de profondeur de la DHB avec l'ion  $[M+H]^+$  à  $m/z$  155,0, des groupes des têtes phosphatidylcholine avec l'ion  $C_5H_{15}NPO_4$  à  $m/z$  184,1, du cholestérol avec le fragment  $[M+H-H_2O]^+$  à  $m/z$  369,3, des monoacylglycérols avec l'ion  $MAG(18:1)$   $[M+H-OH]^+$  à  $m/z$  339,3 et les diacylglycérols avec le DAG(34:1)  $[M+H-OH]^+$  à  $m/z$  577,5. Ces profils sont obtenus à partir de l'image ToF-SIMS illustrées en **A**. Echelles de la matrice ( $z > 0 \mu m$ ) et de la couche tissulaire ( $z < 0 \mu m$ ).

Grâce à la combinaison de ces deux sources et à la réalisation d'images 3D, il est maintenant possible de savoir quelles molécules sont les mieux extraites du tissu vers la couche matricielle et cela explique parfois les différences de sensibilité pour une même classe de molécule au sein d'un même tissu.

Ce couplage entre les sources permet de tirer avantages des caractéristiques propres à chaque source, telles que la résolution spatiale ou encore une caractérisation structurale complémentaire selon les sources. Cette complémentarité d'analyse peut aussi être complétée à l'aide d'autres techniques d'imageries telles que la fluorescence ou la radioimagerie.

## II. LA MSI COUPLEE A D'AUTRES TECHNIQUES D'IMAGERIE

Par exemple, Liu *et al.*, 2018 [238] ont conjointement utilisé des méthodes de MSI et de fluorescence. Souhaitant visualiser le cetuximab, un anticorps monoclonal (150 kDa), sur des organoïdes de colon en culture cellulaire 3D, ils ont choisi une approche de réduction et alkylation sur tissus afin de faciliter la visualisation de cet anticorps en MALDI - MSI et former deux chaînes lourdes de 50 kDa et deux chaînes légères de 25 kDa. Après obtention d'images des chaînes légères par MALDI - MSI, cette méthode a été validée par immunofluorescence grâce à la spécificité de reconnaissance de cette technique. Ils ont ainsi pu



superposer les images obtenues via ces deux techniques d'imagerie et ainsi valider leur protocole expérimental. K. Fuchs *et al.*, 2018 [238] ont employé la MSI afin de mener leur recherche sur la biodistribution et la métabolisation du Sunitinib qui est un anticancéreux. Après avoir réalisé la biodistribution spécifique du Sunitinib sur des coupes de tumeurs, les auteurs ont souhaité visualiser les métabolites induits dans des coupes adjacentes (**Figure 2.30**). Ils ont ainsi observé une colocalisation du sunitinib avec ses métabolites sur les coupes de tumeurs analysées.

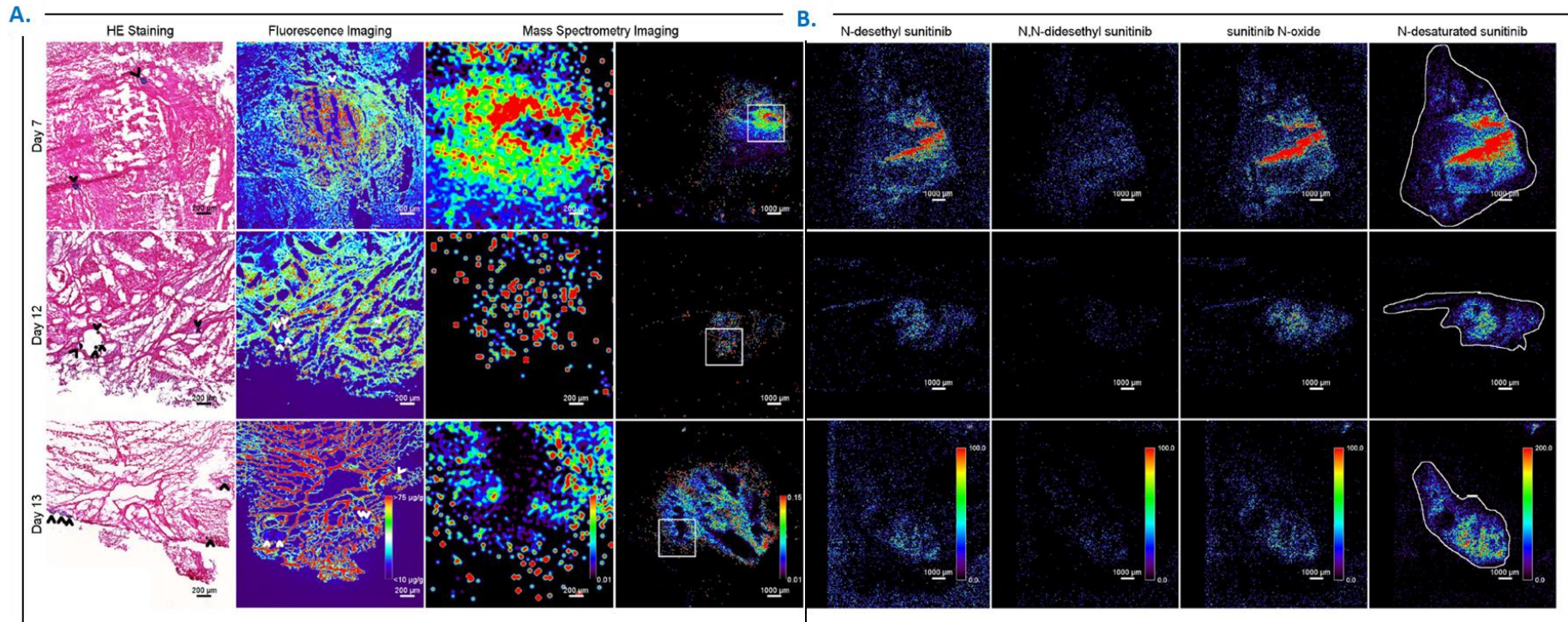


Figure 2.30 : Couplage de la MSI avec la fluorescence. Issue de K. Fuchs *et al.*, 2018 [238].

Coupes de tumeurs adjacentes du 7<sup>ème</sup> au 13<sup>ème</sup> jour après l'exposition aux billes éluent le sunitinib. **A.** Coloration H&E (1<sup>ère</sup> colonne), images représentatives de la fluorescence du sunitinib (2<sup>ème</sup> colonne) et de l'intensité du signal du sunitinib par MSI (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> colonne). La zone affichée dans la 3<sup>ème</sup> colonne est délimitée par un carré sur l'image de la 4<sup>ème</sup> colonne. Les images MSI sont normalisées pixel par pixel en fonction du signal de l'étalon interne. Chaque pointe de flèche converge vers une bille. **B.** Diffusion des métabolites N-déséthyl sunitinib (SU12662, 5<sup>ème</sup> colonne), N,N-déséthyl-sunitinib (6<sup>ème</sup> colonne), N-oxyde de sunitinib (7<sup>ème</sup> colonne) et N-sunitinib (8<sup>ème</sup> colonne) obtenue par MSI. La position de ces ions correspond à la position du sunitinib. Dans la colonne 8, la surface de la section de tissu est délimitée par une ligne blanche.

Cependant, le défaut majeur de la combinaison de deux techniques d'imagerie réside dans le fait que les images sont souvent réalisées sur des coupes adjacentes qui ne sont pas exactement identiques, pouvant ainsi compliquer la comparaison des images. Pour cela, N. H. Patterson *et al.*, 2018 [193] [194] ont proposé d'utiliser de nouveau l'autofluorescence (AF) pour simplifier cette superposition d'images et ainsi faciliter les interprétations de biodistributions moléculaires sur tissu (Figure 2.31).

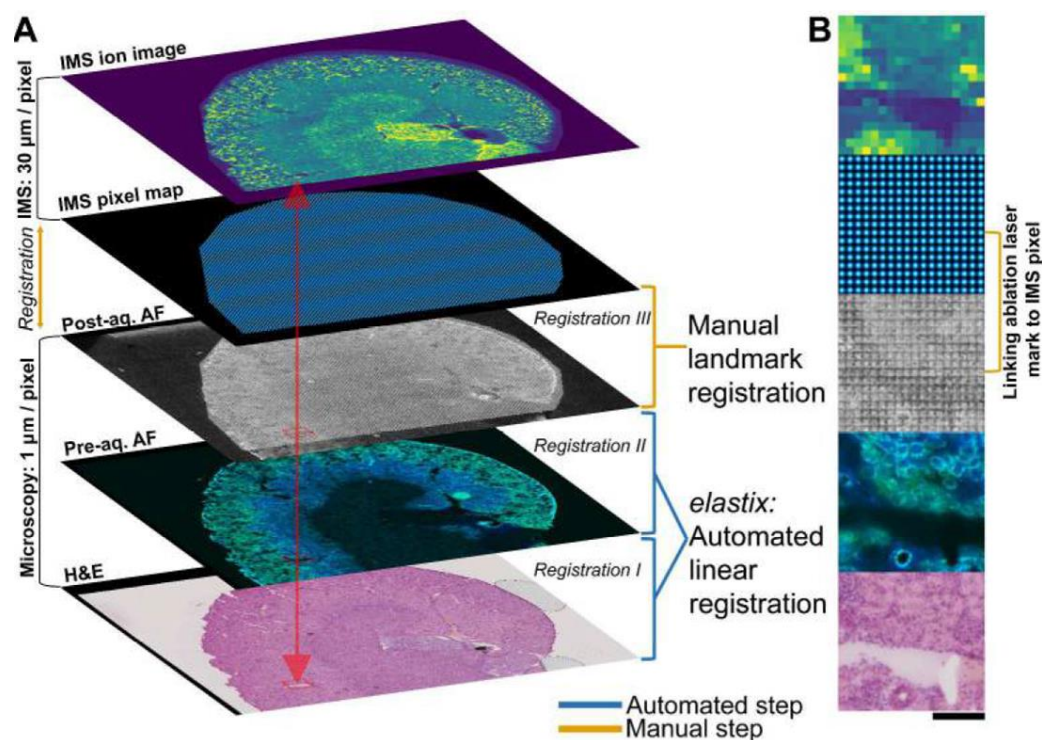


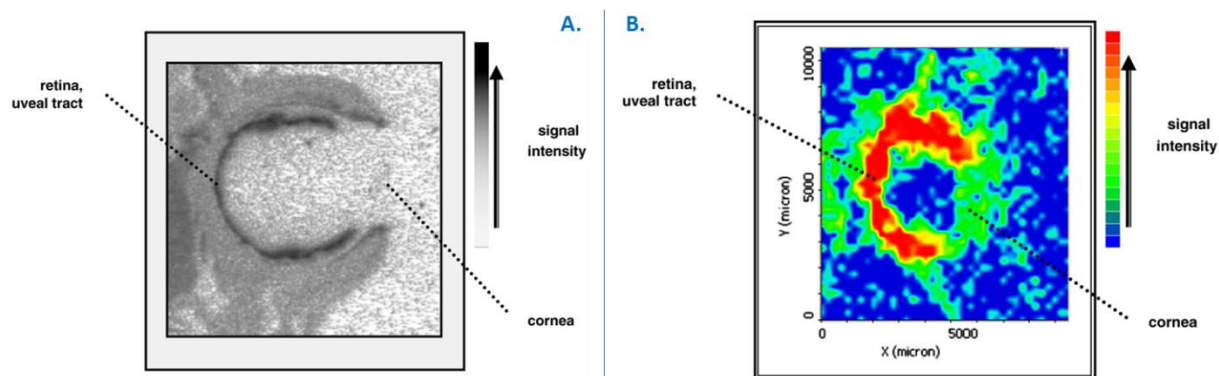
Figure 2.31 : Utilisation de la fluorescence couplée à la MSI. Issue de N. H. Patterson *et al.*, 2018 [194].

Processus de co-enregistrement d'une section de tissu prise en microscopie avec celle acquise en MSI sur une coupe de cerveau de rat. **A.** Vue à faible grossissement des images H&E, AF et MSI des tissus avec de bas en haut la coloration H&E, l'image AF avant puis après acquisition MS, la représentation des pixels sur les coupes puis le co-enregistrement. **B.** Grossissement des images correspondantes. Barre d'échelle 150 µm. Pré-acq : pré-acquisition. Post-acq : post-acquisition.

Ils ont donc fait appel dans leur étude à l'autofluorescence émise par les tissus déposés sur lame et à un système de reconnaissance informatique pour superposer parfaitement les images obtenues en MSI et après coloration H&E. Cette méthode pourrait être étendue à d'autres techniques d'imagerie.

La fluorescence et la MSI allient donc spécificité d'analyse et caractérisation structurale. Pour un aspect plus quantitatif, la MSI peut être couplée à la radioimagerie. L'autoradiographie [241] et les analyses MALDI - MSI sont des techniques d'imagerie permettant l'étude de la biodistribution moléculaire sur tissus de molécules marquées ou non. Ces techniques peuvent fournir des informations complémentaires avec une quantification absolue en radioimagerie et la caractérisation structurale MALDI - MSI [146]. C'est donc cette complémentarité d'information que D. M. Drexler *et al.*, 2011 [242] et R. J. A. Goodwin *et al.*, 2016 [243] ont présenté dans leurs travaux. D. M. Drexler *et al.*, 2011 [242] ont proposé l'analyse d'un médicament et de

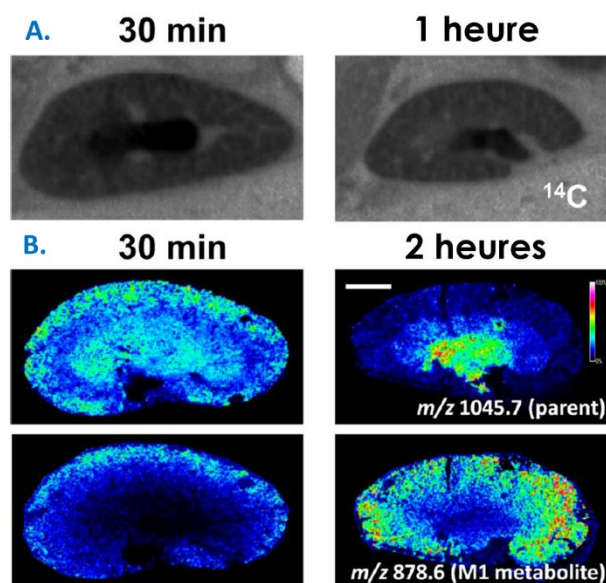
son homologue marqué au tritium dans des coupes d'yeux de rats exposés à ces molécules. Bien que l'autoradiographie ait fourni la localisation quantitative de l'espèce radiomarquée liée au médicament dans les échantillons de tissus, l'utilisation de la MSI a confirmé la localisation du médicament et a permis l'identification de l'analyte (**Figure 2.32**). Les images obtenues avec ces deux techniques ne sont pas parfaitement superposables car réalisées sur des coupes adjacentes.



**Figure 2.32 : Radioimagerie et MALDI - MSI pour la biodistribution d'un médicament. Issues de D. M. Drexler *et al.*, 2011 [242].**

**A.** Autoradiogramme avec une accumulation de 35 jours. Image d'une section oculaire indiquant la distribution préférentielle de l'analyte ou des analytes radiomarqués à l'arrière de l'œil (rétine et/ou voie uvéale). **B.** Cartographie du médicament obtenu par analyses MALDI - MSI où les concentrations les plus élevées sont présentes à l'arrière de l'œil (rétine et/ou voie uvéale).

D'autre part, R. J. A. Goodwin *et al.*, 2016 [243] ont étudié la biodistribution d'un cyclopeptide thérapeutique nommé AZD2820 marqué ou non au carbone 14 sur coupes de reins de souris et obtiennent une biodistribution similaire selon la MSI et la radioimagerie (**Figure 2.33**). Ils illustrent dans leurs travaux les avantages des analyses MSI par rapport à la radioimagerie. La biodistribution de l'AZD2820 et de ces deux métabolites est rendu possible grâce à la MSI là où la radioimagerie ne parvient pas à faire la différence. De plus, dans cette étude, les analyses ont été réalisées sur des coupes adjacentes d'épaisseur différentes ne permettant pas une superposition des images acquises via la MSI et la radioimagerie.



**Figure 2.33 : MSI vs radioimagerie. Issue de R. J. A. Goodwin *et al.*, 2016 [244]**

Images obtenues dans la section rénale sagittale de souris 30 min et 1 h après une administration sous-cutanée. **A.** Autoradiogramme montrant la distribution de la radioactivité issue du  $^{14}\text{C}$ -AZD820 (zones sombres) **B.** Abondance relative de l'AZD2820 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  1045,7) et d'un métabolite ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  878,6). Images MSI acquises à 50  $\mu\text{m}$ . Barre d'échelle 2 mm.

La combinaison de différentes techniques d'imagerie est donc essentielle pour obtenir une meilleure compréhension des données biologiques lors d'études scientifiques. C'est pourquoi, une approche d'imagerie combinée alliant radioimagerie et MALDI - MSI pour l'analyse successive d'une seule et même coupe par ces deux méthodes d'imagerie est proposée dans le développement de cette thèse. Cette approche étant déployée dans le cadre de l'analyse de nanoparticules, l'utilisation de la MSI pour l'étude des nanoparticules sera détaillée dans la partie suivant

## F. L'IMAGERIE DES NANOPARTICULES

Selon les propriétés physico-chimiques des nanoparticules ciblées, différentes techniques analytiques peuvent être employées pour les étudier. Par exemple, certaines nanoparticules sont des fluorophores et peuvent donc absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Pour cela, S. Ghaderi *et al.*, 2011 [244] ont reporté dans leur revue différentes études exploitant notamment les propriétés fluorescentes des QDs (Quantum Dots) pour leur détection. Ces nanoparticules possèdent un noyau cristallin métalloïde qui, en fonction de sa composition et de sa taille, émettra un type de fluorescence particulier à une longueur d'onde donnée. D'autre part, L. Ceppi *et al.*, 2018 [245] ont prouvé l'utilité des MWCNT pour réaliser de l'imagerie par fluorescence en temps réel lors d'interventions chirurgicales. Ceci contribue grandement à l'amélioration du taux de survie de patients lors de la réduction de tumeurs ovariennes. Ainsi, les auteurs ont observé un taux de survie de 65 jours comparativement à la méthode classique pour laquelle le taux de survie n'est que de 35 jours. Par ailleurs, H. Jin *et al.*, 2019 [246] ont utilisé ces QDs pour la création d'une nanosonde fluorescente à double émission pour l'imagerie spécifique de l'avidine présente à la surface de cellules hépatiques et pulmonaire cancéreuses. Selon la liaison de la sonde sur la biotine, la couleur issue de la fluorescence émise varie. Ces applications fournissent de nouvelles opportunités pour la visualisation des biomarqueurs de surface cellulaire avec une résolution d'imagerie remarquable (200 nm) grâce à l'imagerie confocale à fluorescence.

D'autres groupes de recherche ont utilisé les propriétés radioactives de nanoparticules dans le but de réaliser de l'imagerie médicale. Pour cela, certaines équipes comme celle de H. Y. Kim *et al.*, 2018 [247] ont utilisé des nanoparticules de polyglucose marquées au cuivre 64 pour la tomographie quantitative par émission de positons (PET de l'anglais Positron Emission Tomography). Cette technique est ici utilisée pour l'imagerie de macrophages dans les cancers car ces cellules sont largement impliquées dans la progression tumorale et la réponse immunitaire. Les auteurs ont montré que ces nanoparticules de polyglucose marquées au cuivre 64 étaient absorbées par les macrophages avec une sélectivité supérieure à 90 %. Ainsi, ces nanoparticules analysées par PET offrent un moyen d'imagerie sélectif pour les macrophages associés aux tumeurs et permet alors de fournir une aide au suivi thérapeutiques lors de traitements médicamenteux.

D'autres équipes, comme B. Czarny *et al.*, 2014 [248] ont utilisé la radioactivité pour marquer des nanoparticules et ainsi pouvoir obtenir leur biodistribution *in situ*. Ils ont ainsi présenté une méthode qui utilise la radioimagerie de type  $\beta$  pour étudier la biodistribution des  $^{14}\text{C}$ -MWCNTs chez la souris après injection d'une dose unique de 20  $\mu\text{g}$ . Grâce à cette expérience, ils ont montré une translocation des nanotubes de carbone du poumon vers d'autres organes comme le foie (0,2 % de la dose), la rate (0,75 % de la dose) ou la moelle osseuse sur un an (**Figure 2.34**). Cependant, 10 % de la dose reste dans les poumons et le reste est éliminé par la voie gastro-intestinale après translocation.

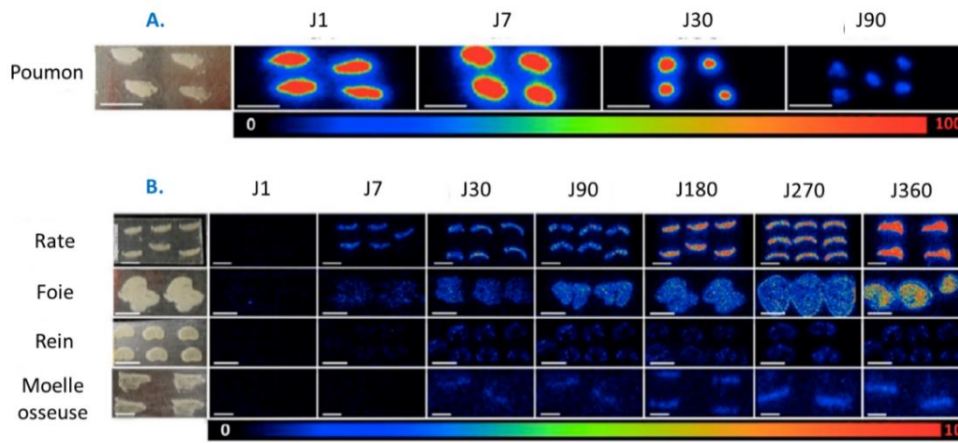


Figure 2.34 : Radioactivité observée chez la souris après injection de MWCNTs. Issue de B. Czarny *et al.*, 2014 [248].

Après une exposition pulmonaire aux  $^{14}\text{C}$ -MWCNTs, des coupes de poumons ont été montées sur lame en verre (images optiques à gauche). Elles ont été analysées par radioimagerie  $\beta$  du jour 1 au jour 360 post-exposition.

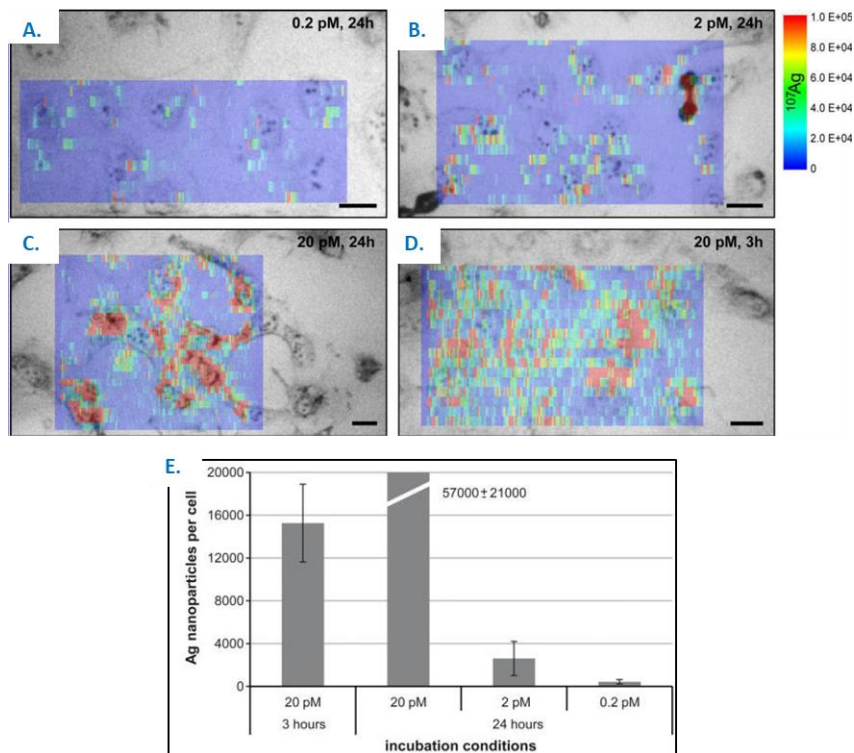
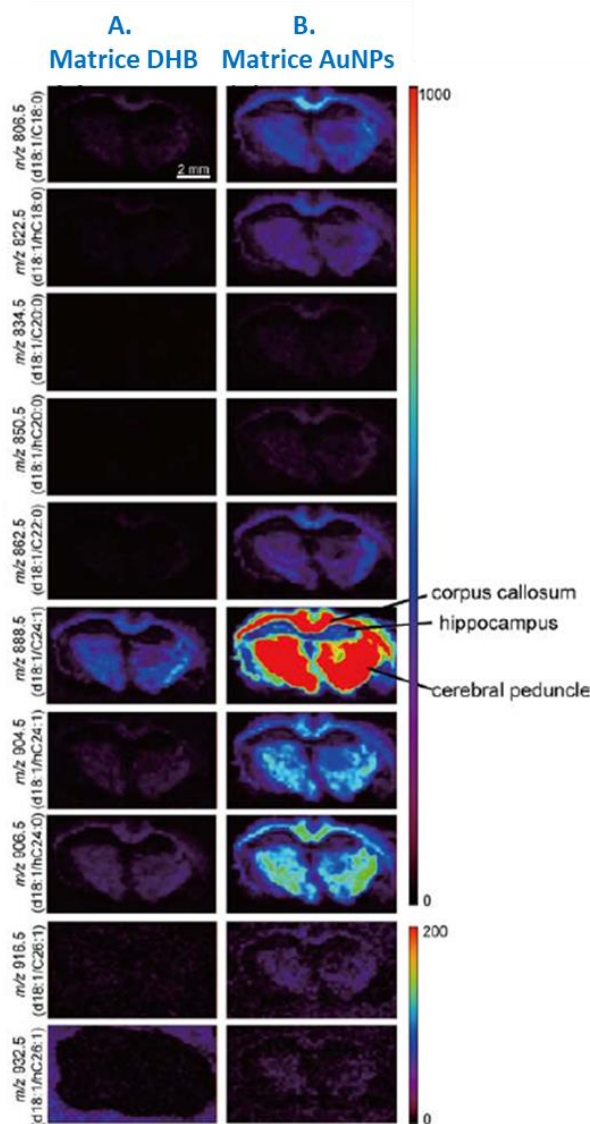


Figure 2.35 : Analyse ICP-MSI de nanoparticules d'argent. Issues de D. Drescher *et al.*, 2012 [249]

Images optiques de cellules fibroblastes 3T3 fixes superposées à des images LA-ICP-MS. Distribution en intensité de  $^{107}\text{Ag}^+$ . Après incubation à une concentration de 0,2 (A.) ; 2 (B.) ou 20 pM (C.) pendant 24 h (D.) ou à 20 pM pendant 24 heures (D.). Les barres d'échelle représentent 25  $\mu\text{m}$ . Paramètres : taille du spot laser, 8  $\mu\text{m}$ . E. Quantification des nanoparticules d'argent à l'intérieur de ces mêmes cellules de fibroblastes.

Par ailleurs, pour l'étude de molécules non fluorescentes ou radioactives, il est également aussi possible d'utiliser la technique LA-ICP-MSI (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Imaging). Par exemple, D. Drescher *et al.*, 2012 [249] se sont servis de cette technique de spectrométrie de masse dans le cas d'analyses quantitatives de nanoparticules d'or et d'argent au sein de fibroblastes. La technique LA-ICP-MSI permet dans cette étude de quantifier le nombre de nanoparticules au niveau cellulaire grâce à une résolution spatiale élevée (**Figure 2.35**). O. B. Bauer *et al.*, 2018 [250] ont aussi proposé l'utilisation de l'ICP-MSI pour la quantification du Platinium 194 dans des reins de rats.



**Figure 2.36** : Utilisation des nanoparticules d'or comme matrice. Issue de N. Goto-Inoue *et al.*, 2010 [253]

Imagerie MALDI en mode négatif d'ionisation acquise à partir d'une coupe de tissu cérébral de souris et analysée avec la matrice DHB et avec des AuNPs. Les images ioniques représentent 10 types d'espèces moléculaires de sulfatides.

Comme précédemment développé dans le **paragraphe III.1.a de la partie B du chapitre I**, les nanoparticules sont également très utilisées en imagerie par spectrométrie de masse pour favoriser la détection de molécules endogènes. En plus des nanoparticules de type graphène, des nano-objets tels que les nanoparticules d'or (AuNPs) ou d'argent (AgNPs) sont aussi utilisés comme matrices MALDI [251]. En effet, ces nanoparticules d'or ou d'argent possèdent l'avantage d'engendrer moins de signaux interférents dans les basses masses ( $< 500 m/z$ ). Pour cela, N. Goto-Inoue *et al.*, 2010 [252] et A. Arendowski et T. Ruman, 2017 [253] ont fait appel dans leurs travaux aux nanoparticules d'or pour l'imagerie MS des lipides et métabolites. N. Goto-Inoue *et al.*, 2010 [252] ont utilisé les AuNPs comme matrice et ont comparé leurs résultats avec ceux obtenus à partir de la matrice MALDI DHB. Ils ont ainsi montré une sensibilité de détection pour les sphingolipides 20 fois supérieure avec les AuNPs (**Figure 2.36**) qu'avec la DHB. Cette augmentation est corrélée avec la diminution du S/N dans les spectres acquis avec ces nanoparticules. A. Arendowski et T. Ruman, 2017 [253] ont quant à eux, différemment utilisé ces AuNPs en déposant leurs tissus sur des lames recouvertes de nanoparticules d'or et en s'affranchissant de l'étape de dépôts de matrice pour des analyses SALDI - MSI de bois d'if (*Taxus baccata*). Par ailleurs, des nanoparticules d'argent peuvent



également être utilisées plus spécifiquement pour l'analyse de molécules lipidiques. En effet, T. Hayasaka *et al.*, 2010 [254] prouvent l'utilité des AgNPs pour la détection d'acides gras comme les acides stéarique, oléique, linoléique, arachidonique, palmitique et eicosapentaénoïque qui ne sont pas détectés avec la matrice DHB. S. N. Jackson *et al.*, 2014 [255] et L. Muller *et al.*, 2015 [256] ont également utilisé les AgNPs pour la détection de lipides dans des cœurs et des reins de rats. Grâce à l'utilisation d'une source de pulvérisation magnétron pour former des ions AgNPs en phase gazeuse (sprayeur de nanoparticules), il est possible de réaliser un dépôt homogène de ces nanoparticules et d'obtenir des images avec une résolution spatiale importante (50  $\mu\text{m}$ ).

Toutefois, d'autres classes de nanoparticules comme les liposomes ou les dendrimères sont par ailleurs étudiés en MSI pour leur fonction de nanovecteurs. Par exemple, A. Gunnarsson *et al.*, 2010 [257] ont analysé la biodistribution de liposomes fonctionnalisés pour reconnaître des séquences d'ADN particulières. Ainsi ces liposomes peuvent servir de code barre chimique pour obtenir des biodistribution spécifiques d'ADN par imagerie TOF-SIMS. C. Zandanel *et al.*, 2018 [258] analysent également la biodistribution de nanoparticules de polycyanoacrylate encapsulant la doxorubicine dans des coupes de foie de souris.

Cependant, pour toutes les études menées à l'aide de molécules fluorescente ou radiomarquées, des interrogations sur la spécificité d'analyse peuvent être posées. Par exemple, la radioactivité observée peut provenir du radioélément initial et/ou des produits potentiellement issus de sa métabolisation et/ou de son instabilité chimique. En effet, si ces études utilisant des radioéléments permettent de quantifier de façon absolue et de localiser ces molécules radiomarquées, d'autres approches complémentaires basées sur la spectrométrie de masse doivent être utilisées pour augmenter la spécificité de détection et obtenir des informations structurales complémentaires. Notamment, V. Mendonça *et al.*, 2015 [259] et S. Chen *et al.*, 2015 [260] ont utilisé la MSI pour étudier le devenir des nanoparticules de graphène après injection par intraveineuse chez la souris. Les premiers ont observé les feuillets d'oxyde de graphène dans des coupes de cerveau et les seconds ont analysé la biodistributions des CNTs, GO et CD dans divers organes à des doses croissantes (**Figure 2.37**).

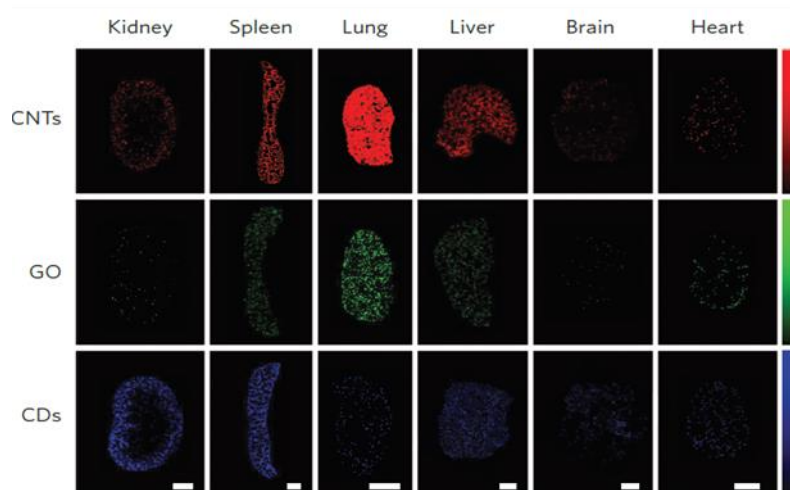


Figure 2.37 : Biodistribution des nanoparticules de type graphène chez la souris. Issue de S. Chen *et al.*, 2015 [260]

Images MSI montrant la distribution des CNT (Carbon NanoTube), GO (Graphène Oxyde) et CD (Carbon Dot) dans les reins, la rate, les poumons, le foie, le cerveau et le cœur. Barres d'échelle, 2 mm. La barre de couleur à droite de chaque rangée d'images indique l'augmentation de l'intensité de bas en haut.

Cependant, peu d'études sont disponibles dans la littérature concernant l'analyse de ces nanoparticules de graphène en MSI de par l'existence de nombreux verrous expérimentaux tels que la difficulté d'obtenir des lots de synthèse homogènes et caractérisés entravant la possibilité d'obtenir des analyses MS reproductibles (**Annexe 2**). La structure particulière de ces nanoparticules rend donc leur détection variable selon les espèces analysées avec un spectre de clusters de carbones en mode positif d'ionisation [40] ou négatif [37] et avec ou sans matrice MALDI. De plus, les deux auteurs cités ci-dessus n'ont pas obtenu le même profil MS pour des nanoparticules de type GO. Le premier a utilisé une méthode MALDI - MSI avec la SA qui a permis de détecter des ions  $m/z$  285, 421, 465 et 506, alors que le second a employé une méthode LDI - MSI et a observé des clusters de carbone. C'est pourquoi, un développement méthodologique en imagerie par spectrométrie de masse pour la détection de ce type de molécules au sein de tissus biologiques a été entrepris dans le cadre de cette thèse.



## LES OBJECTIFS DE LA THESE

---

La vectorisation de médicaments, qui permet de les acheminer sur les tissus cibles pour accroître leur activité pharmacologique tout en limitant leur toxicité et effets indésirables, est un axe de recherche en forte expansion dans lequel les nanotechnologies sont un des facteurs clés. L'emploi grandissant de ces nouvelles stratégies de ciblage interpelle quant à au devenir *in vivo* et à la toxicité des nanoparticules utilisées [261] [262]. Cette toxicité est notamment engendrée par leur taille nanoscopique qui leur permet de franchir les barrières biologiques [96], de se distribuer dans le système physiologique de l'hôte, mais aussi de s'accumuler au niveau des membranes biologiques. Pour pallier cela, de nouvelles générations de nanoparticules ont été fonctionnalisées en surface [263] pour assurer le ciblage de récepteurs, ou encore encapsuler des drogues [106] afin de garantir l'effet thérapeutique. Cependant leurs propriétés pharmacocinétiques sont encore peu connues. Notre étude bibliographique a ainsi révélé la nécessité de développer de nouveaux outils analytiques afin d'étudier plus efficacement le comportement en milieu biologique des nanoparticules de type graphène ou les systèmes micellaires polymériques [264] de plus en plus employés dans la recherche biomédicale.

Afin d'appréhender ces nouveaux systèmes de délivrance, l'utilisation de méthodes analytiques plus sensibles et plus performantes est indispensable pour assurer à la fois le suivi ainsi que la mesure des quantités de nanoparticules et de médicament délivrées conjointement au niveau du site pathologique ciblé. En conséquence, de nombreuses techniques d'imagerie des nanoparticules ont été développées et ont fait l'objet de publications scientifiques. Certaines de ces techniques permettent d'obtenir des informations sur leur taille, comme la DLS, la microscopie électronique à transmission ou les rayons X [265] [266]. Cependant, les analyses doivent être réalisées sur des échantillons solides, cristallins ou sous forme de poudre. D'autres

techniques, comme la fluorescence [245], la radioimagerie [248] ou encore la spectrométrie de masse [259], permettent quant à elles d'obtenir des informations de biodistribution tissulaire. Elles permettent respectivement une reconnaissance très affine mais qui nécessite une fonctionnalisation des nanoparticules pour la spécificité des anticorps, une quantification absolue à condition d'analyser des nanoparticules radiomarquées et une caractérisation structurale des nanoparticules. Plus particulièrement, l'analyse par ICP-MS est largement utilisée pour l'étude des nanoparticules d'or ou d'argent aussi bien pour la caractérisation de leur dispersion que pour leur analyse au sein de milieux biologiques complexes [110] [249]. Cependant certaines de ces approches sont émergentes et manquent de maturité ou de standardisation. Ainsi, les études *in vitro et in vivo* effectuées en microscopie [83], fluorescence [84] ou encore radioactivité [89] et référencées dans l'état de l'art de cette thèse ne convergent pas toutes vers les mêmes conclusions concernant la toxicité des nanoparticules de type graphène. Selon le type ou la taille de ces nanoparticules, certains résultats ont montré une internalisation de celles-ci, induisant une toxicité, alors que d'autres études ont indiqué une accumulation de ces nanoparticules de graphène à la surface des cellules. Ces résultats sont variables selon le modèle biologique utilisé et mettent en avant les difficultés rencontrées lors de l'étude de ces nanoparticules. En effet, selon la voie de synthèse de la nanoparticule, les distributions en taille peuvent varier et induire une hétérogénéité des résultats. Pour cela, un intérêt particulier doit être porté à la préparation des échantillons et à leur homogénéité.

Concernant l'imagerie par spectrométrie de masse, notre analyse de la littérature a souligné les difficultés rencontrées lors de l'utilisation de cette technique pour étudier la biodistribution de nanoparticules au sein de tissus biologiques. L'analyse de l'état de l'art a en effet montré que chacune des étapes du processus de MSI (préparation des échantillons, conservation des échantillons, traitement des tissus, dépôt de la matrice et acquisition des données) nécessitait des optimisations. De nombreuses études en MSI ont donc pour objet de diminuer les variabilités engendrées par chacune des étapes de l'analyse par imagerie MS. Certaines études visent à améliorer le procédé de conservation des échantillons [143], de la découpe des organes ou du dépôt de matrice alors que d'autres visent à améliorer la normalisation des signaux par le TEC [214] [215], l'utilisation de standard interne [220] ou des calibrations virtuelles [267]. Un travail important a déjà été réalisé sur le développement de systèmes de dépôts automatisés [189] [268] permettant de réduire les variabilités induites par l'hétérogénéité de cristallisation de la matrice MALDI. De nombreuses équipes ont également cherché à faciliter et harmoniser le traitement des données via la mise en place de plateforme en libre accès comme OpenMSI [194] [269] ou BASIS [196], de suites logicielles en langage « R » pour l'annotation des jeux de données [197] [206] ou encore pour l'amélioration des analyses statistiques pour la MSI [211] [270]. Par ailleurs, en analyse quantitative par MSI et de manière plus globale en chimie analytique, la répétabilité et la reproductibilité des analyses sont cruciales pour obtenir des valeurs les plus proches de la réalité. Cependant, la question de la quantification en imagerie par spectrométrie de masse fait toujours débat. Les travaux de J. Barry *et al* [271], ont récemment exposé différentes hypothèses sur les différences de quantification réalisées en LC-MS et en qMSI à partir de tissus mimétiques. En dépit de

certaines études qui montrent une reproductibilité au sein des analyses MSI [234], des travaux divergents ont montré la difficulté de corrélérer leurs données avec des méthodes quantitatives distinctes comme la GC-MS ou la LC-MS. De plus, certains travaux montrent que malgré une corrélation de ces données issues de techniques différentes, les quantifications obtenues ne sont pas toujours similaires aux techniques de quantification [224]. Enfin, nous avons illustré l'intérêt de combiner plusieurs techniques d'imagerie pour aborder les études de biodistribution de nanoobjets. La combinaison de ces techniques d'imagerie telle que la fluorescence, la radioimagerie ou la spectrométrie de masse permettrait d'obtenir des informations complémentaires alliant spécificité, caractérisation structurale et quantification absolue afin de créer un outil analytique puissant.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail doctoral a été de développer une nouvelle approche analytique combinant la radioimagerie et l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse de nanoparticules. Pour cela, l'un des axes majeurs proposé dans cette thèse a été de positionner la MSI par rapport à la radioimagerie au travers de deux projets. Le chapitre 1 de la partie expérimentale expose les développements méthodologiques nécessaires à l'obtention d'images de qualité en MSI pour l'étude du devenir des nanoparticules de graphène chez la souris. Ce projet a dans un premier temps porté sur la caractérisation d'une signature graphène par MALDI - MS, qui a ensuite permis de développer et d'optimiser une méthode MSI d'analyse de ces nanoparticules. Dans un second temps, des études de faisabilité d'analyses quantitatives en imagerie par spectrométrie de masse (qMSI) ont été réalisées. La méthode développée a ensuite été appliquée à une étude preuve de concept de biodistribution, en combinaison avec la radioimagerie.

Le chapitre 2 de la partie expérimentale aborde un projet novateur de vectorisation d'un agent anti-inflammatoire par des micelles dans la plaque d'athérome de souris dans la cadre d'un projet financé par le Laboratoire d'excellence Lermite. L'objectif visé est de déterminer par MSI les doses de nanoparticules et de principe actif délivrées au niveau du site d'activité afin de définir un protocole d'administration. Celui-ci sera alors appliqué afin de déterminer les effets thérapeutiques du traitement sur la croissance des plaques et leur stabilité. Pour cela, il est nécessaire de développer une méthode permettant de détecter à la fois la micelle et le médicament encapsulé. Ce projet a montré la difficulté d'obtenir une détection sensible sur tissu et a donc nécessité la mise en place de traitements tissulaires tels que des traitements enzymatiques et des dérivations, compatibles avec l'analyse MSI. Suite à cette étude, un nouveau projet de collaboration est donc né pour la mise en place d'une chimie click au service de la MSI.

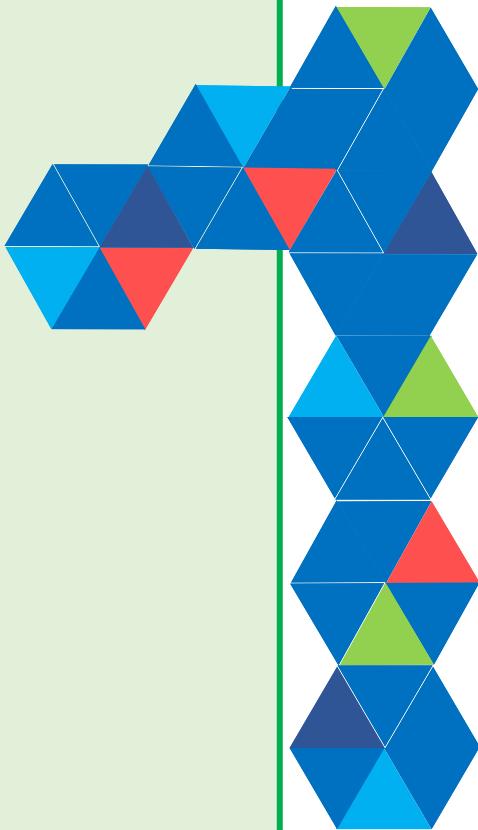


## Partie B : Etudes expérimentales

---







**Chapitre 1** : DEVELOPPEMENT D'UNE  
STRATEGIE D'IMAGERIE COMBINEE POUR  
L'ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DE  
L'OXYDE DE GRAPHENE CHEZ LA SOURIS

---



## A. INTRODUCTION

Dans la famille des nanoparticules de type graphène, le GO et rGO représentent les nanoparticules les plus utilisées et constituent une plateforme idéale pour la fonctionnalisation de molécules thérapeutiques réalisée par fixation covalente ou physisorption. Ces nanoparticules sont également très étudiées concernant leurs mécanismes d'action ou de toxicité éventuelle vis-à-vis de milieux biologiques complexes (notamment cellulaires *in vitro*). De plus, comme précisé dans le **chapitre 1 de la partie A** de cette thèse, leur comportement *in vivo* après administration reste encore mal connu, et le développement de nouveaux outils analytiques est actuellement nécessaire afin de comprendre ces différents aspects.

Dans la littérature, des techniques telles que la fluorescence ou la radioimagerie sont utilisées pour la détection *in vivo* de nanoparticules de graphène mais elles nécessitent le marquage préalable de ces nanoparticules par des sondes fluorescentes ou par des radioéléments. Par exemple, Czarny *et al.*, 2014 [248], ont observé par radioimagerie une accumulation majoritaire de nanotubes de carbone marqués au  $^{14}\text{C}$  dans les poumons de souris après exposition par aspiration pharyngée. Une translocation progressive de 80 % de ces nanotubes vers les organes du RES a ensuite été observée sur une période d'un an après l'exposition initiale. Dans ces conditions, le signal radioactif détecté peut potentiellement ne pas provenir uniquement des nanotubes marqués « parents » mais également de potentiels produits de dégradation ou de métabolisation. Ce dernier aspect s'applique également à la détection de composés fluorescents.

Afin de pallier cette limite inhérente à ces 2 techniques de détection, d'autres groupes ont proposé l'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse. Deux publications de M. Mendonça *et al.*, 2015 [259] et S. Chen *et al.*, 2015 [260], pionnières dans ce domaine, ont présenté l'application de la technique MALDI - MSI ou LDI - MSI pour l'étude de la biodistribution de rGO ou de GO, CNT et CDs *in situ*. Plus particulièrement, S. Chen *et al.*, 2015 [260] ont proposé une méthodologie détaillée pour la détection de trois nanoparticules carbonées par LDI - MSI permettant ainsi de cartographier et de quantifier ces nanomatériaux au sein de tissus provenant de souris exposées. Ainsi, suite à la caractérisation MET et AFM des CNTs (200 nm x 5 nm), GOs (de l'ordre de 3  $\mu\text{m}$ ) et CDs (4 nm), une signature constituée de clusters de carbones (a priori sous formes anioniques) allant de  $m/z$  24 à 156 a été identifiée par LDI - MS (**Figure 1.1**). En LDI également mais dans le mode positif d'ionisation, Z. Jing *et al.*, 2005 [40] détectent des clusters de carbones dans des plus hautes masses ( $m/z$  180 à  $m/z$  336). En MALDI - MS (mode négatif, avec la matrice acide sinapinique), M. Mendonça *et al.*, 2015 [259] visualisent des ions provenant de leurs nanoparticules de rGO sous la forme de 3 pics centrés sur  $m/z$  465 et distants les uns des autres de 44 unités de masse. Ainsi, il apparaît clairement que les profils MS de nanoparticules ne sont pas toujours identiques selon les études publiées. Ces différences peuvent provenir des variations observées au niveau de la taille des nanoparticules (**Tableau 1.3, partie A, chapitre 1**) ou des conditions d'utilisation des spectromètres de masse.

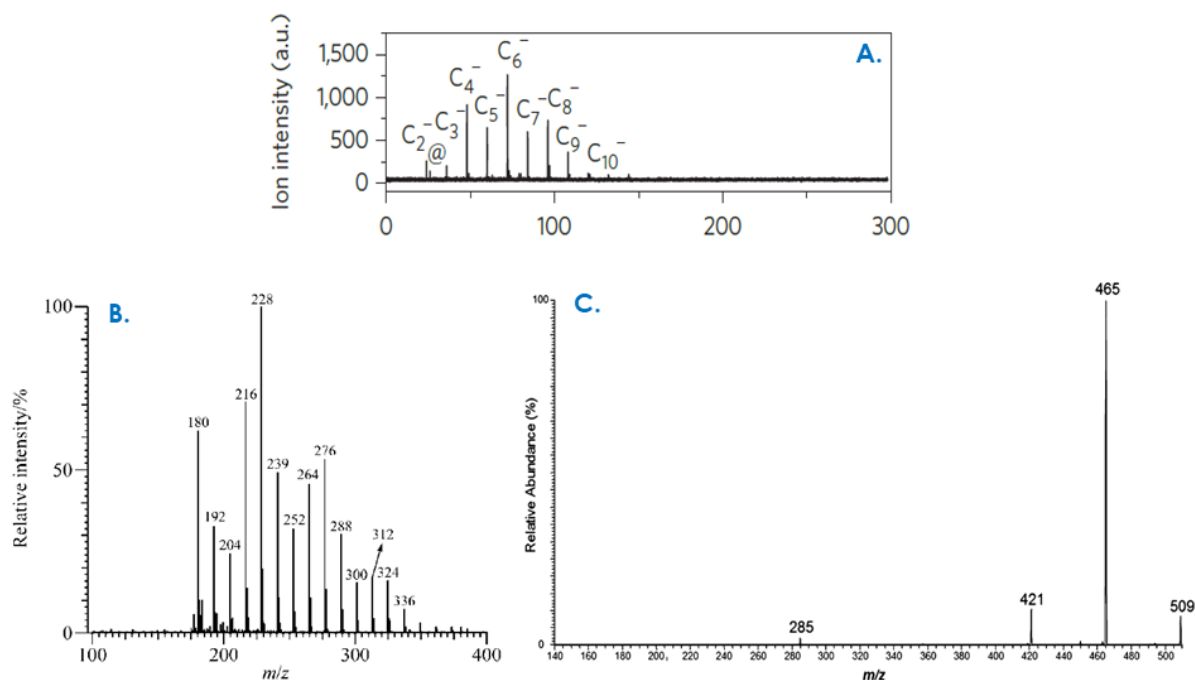


Figure 1.1 : Comparaison des signatures graphène en MALDI ou LDI - MS

A. S. Chen *et al.*, 2013 [37] et 2015 [260], analyses LDI-TOF en mode négatif d'ionisation, (CNT, GO (3 µm) et CDs). B. Z. Jing *et al.*, 2005 [40], analyses LDI-FT en mode positif d'ionisation. C. M. Mendonça *et al.*, 2015 [259], analyses MALDI-FT en mode négatif d'ionisation (rGO : 342 nm),

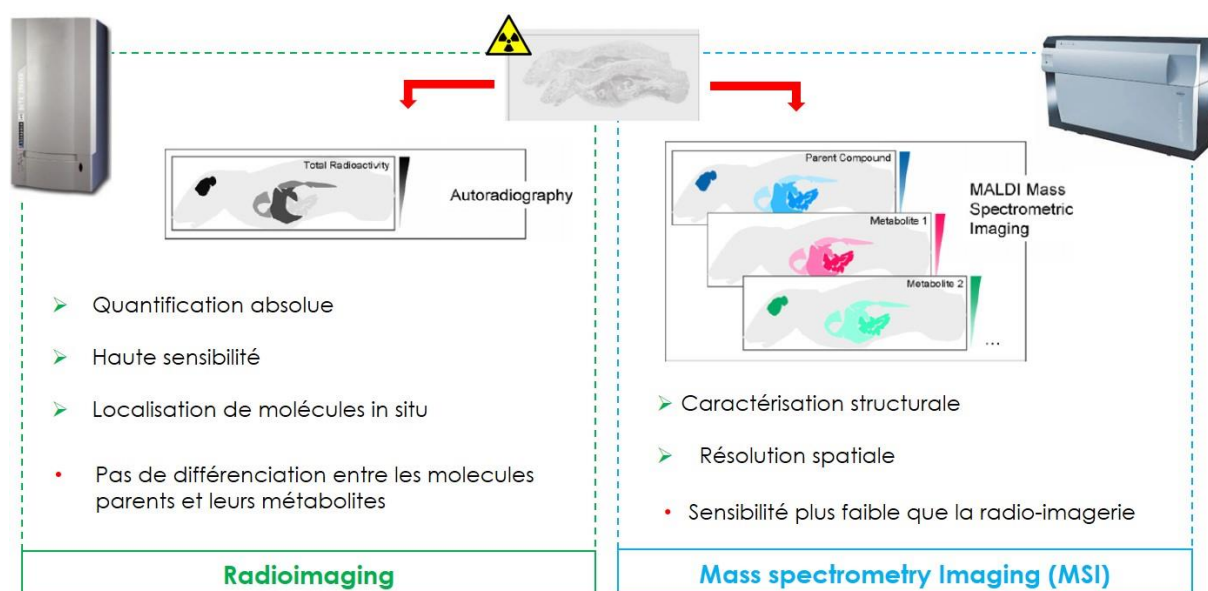


Figure 1.2 : Objectifs de l'imagerie combinée. Images issues de M. Stoekli *et al.*, 2007 [146].

Couplage des avantages analytiques de la radioimagerie β et de la MSI soit respectivement la quantification absolue avec une grande sensibilité et la caractérisation structurale.

Quand ce travail de thèse a été initié (et encore actuellement), seuls les 3 articles mentionnés ci-dessus s'intéressant à l'imagerie de nanoparticules carbonées ont été publiés. Etant donnée l'absence de consensus quant au choix de la méthode pour détecter ces nanoobjets, la première phase de ce travail de thèse a été consacrée à la mise en place et à l'optimisation d'une méthode de détection de nanoparticules de graphène par spectrométrie de masse MALDI ou LDI. Nous avons ensuite évalué les performances de l'approche mise en place notamment en termes de reproductibilité, linéarité et sensibilité avant d'envisager la réalisation d'expériences de MSI. Ainsi, une étude de biodistribution quantitative de nanoparticules de  $^{14}\text{C}$ -graphène administrées à des souris a été réalisée en combinant MSI et radioimagerie et en exploitant leur complémentarité (**Figure 1.2**). Dans ces conditions, la possibilité de quantifier ces nanoparticules par MSI a également été évaluée en utilisant l'imagerie radioactive comme référence.

## B. MATERIELS ET METHODES

### I. LES NANOPARTICULES DE GRAPHENE : MARQUEES OU NON MARQUEES

#### 1. SYNTHESES DES NANOPARTICULES

La synthèse des nanotubes de carbone a été réalisée via la technique CVD soit « Chemical Vapor Deposition » sur mousse de nickel (**Figure 1.3, A.**). Les nanotubes de carbone marqués au carbone 14 ont été obtenus à partir d'une source de carbone correspondant au  $^{14}\text{C}$ -benzène et les nanotubes non marqués ont été réalisés à partir de  $^{12}\text{C}$ -toluène [15]. Les nanotubes de carbone dopés à l'azote ont été synthétisés à partir du  $^{12}\text{C}$ -dicyanopentane ou de son homologue doublement marqué au carbone 13.

A partir de ces nanotubes de carbone marqués ou non, des nanorubans sont obtenus à l'issue de leur ouverture par la méthode « unzipping » qui consiste à ajouter une solution oxydante de  $\text{KMnO}_4$  et de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (**Figure 1.3, B.**). Les feuillets d'oxyde de graphène (GO) sont ensuite obtenus après une étape de sonication de 12 heures dans une solution de SDBS (Sodium DodecylBenzène Sulfonate) à l'aide d'une sonde à ultrason (Ultrasonic convertor Misomix : puissance 18, 10-11 Watts RMS) (**Figure 1.3, C.**). Ces feuillets de graphène sont finalement réduits en oxyde de graphène réduit (rGO) avec de l'hydrazine monohydrate (**Figure 1.3, D.**).

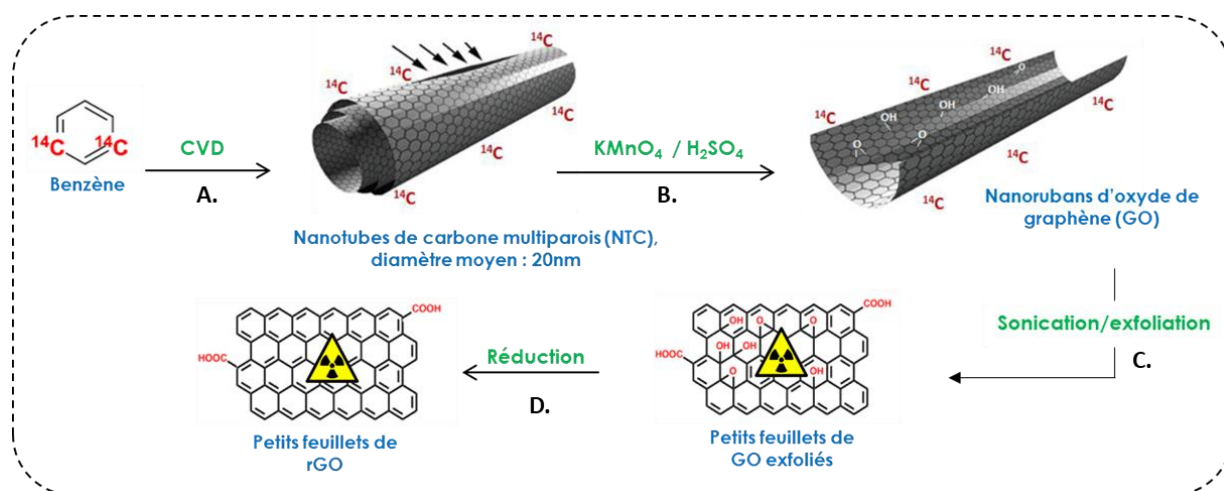


Figure 1.3 : Procédé de fabrication de l'oxyde de graphène et de l'oxyde graphène réduit à partir de nanotubes de carbone marqués.

A. Synthèse CVD des nanotubes de carbone. B. Ouverture de ces nanotubes de carbones par réactions chimiques. C. Sonication et exfoliation des nanorubans en feuillets d'oxyde de graphène. D. Réduction de feuillets d'oxyde de graphène. La synthèse des nanotubes non marqués est identique, seule la source de carbone change.

Les lots qui ont été utilisés au cours de cette étude sont les lots NF 52, 55, 65, 66, 67 et 68. Les initiales NF sont celles de Nathalie Freneau qui a optimisé et réalisé les synthèses au SCBM. Les lots NF 52, 65, 66 et

68 sont des lots de GO, les lots NF 55 et 67 sont des lots de rGO respectivement obtenus à partir des lots NF 52 et 66. Les suspensions NF 52, 55, 66, 67 et 65/68 aux concentrations respectives de 0,4 ; 0,2 ; 1 ; 0,2 et 0,5 mg/mL ont été fournies par Dominique Georjin travaillant également au SCBM.

## 2. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

Les nanoparticules synthétisées ont été caractérisées par microscopie électronique à transmission (MET, LVEM5 (Low-voltage Transmission Electron Microscope) CORDOUAN Technologies (Pessac, France)) à une tension d'accélération de 5 kV et un grossissement de 25 000 à 200 000 selon les échantillons. Ces expériences ont été réalisées au SCBM par Céline Chollet.

## II. EXPERIMENTATIONS SUR LE MODELE MURIN

Trois expériences d'administration de nanoparticules de graphène ont été réalisées au SIMOPRO par Mylène Bernes, Jeanne Gourlay et Marion Doladilhe. De l'oxyde de graphène et de l'oxyde de graphène réduit ont été administrés selon deux voies d'injection chez la souris (Figure 1.4).

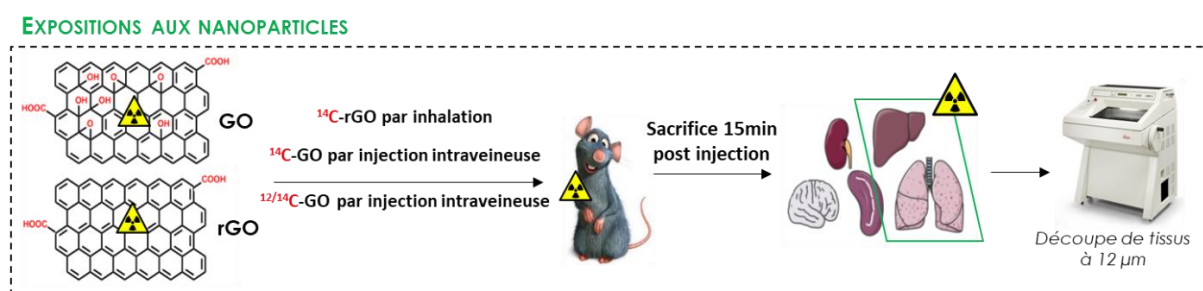


Figure 1.4 : Expérimentations d'administration du GO et rGO chez le modèle murin.

Les nanoparticules de GO et rGO marquées au carbone 14 ont été synthétisées au SCBM par CVD, unzipping puis par réaction de réduction. Ces nanoparticules ont été injectées chez la souris par injection intraveineuse ou par instillation. Les souris ont été sacrifiées 15 minutes après injection puis les organes ont été prélevés et coupés en tranches de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avant d'être déposés sur lame ITO.

Les deux premiers essais ont contribué à optimiser la méthode d'imagerie par spectrométrie de masse en lien avec la radioimagerie. La troisième a été utilisée pour une étude de biodistribution et une quantification du GO. Les souris ont été placées individuellement dans des cages en polycarbonate au sein d'une animalerie conventionnelle et ont eu accès *ad libitum* à la nourriture et aux boissons. Le comité d'éthique local pour l'expérimentation animale a approuvé le protocole expérimental.



## **1. PROTOCOLE D'ADMINISTRATION DES NANOPARTICULES CHEZ LA SOURIS**

La première expérience a été réalisée avec des souris balb/c femelles (Laboratoires Charles River, L'Arbresle, France) qui ont été exposées au GO ou rGO via deux protocoles d'injection distincts d'une solution de 4 µg de <sup>14</sup>C-GO soit 197 nCi ou de 4 µg de <sup>14</sup>C-rGO soit 56 nCi. La première solution a été administrée par injection intraveineuse dans la queue alors que la seconde a été administrée par instillation dans la trachée.

Une seconde expérience a été réalisée sur une souris balb/c mâle via le mode d'exposition par injection intraveineuse dans la queue. Pour cela, 50 µg provenant d'une suspension à 0,5 mg/mL (0,25 mg/mL de <sup>12</sup>C-GO et 0,25 mg/mL de <sup>14</sup>C-GO, 43,5 µCi/mL dans du SDBS) ont été injectés en parallèle du véhicule seul (SDBS).

Pour la troisième expérience, quatre souris mâles Balb/c de 1 an et pesant 30 g (Laboratoires Charles River, L'Arbresle, France) ont été exposées à quatre doses différentes de GO. Une suspension d'oxyde de graphène marquée au <sup>14/12</sup>C à 0,5 mg/mL (0,25 mg/mL de <sup>12</sup>C-GO et 0,25 mg/mL de <sup>14</sup>C-GO, 43,5 µCi/mL) dans une solution de SDBS a été administrée à des souris par injection intraveineuse pour obtenir quatre concentrations différentes de GO (0 µg, 25 µg, 50 µg et 75 µg).

## **2. SACRIFICE ET CONSERVATION DES ORGANES**

Toutes les souris ont été sacrifiées 15 minutes après l'exposition aux nanoparticules suite à une injection intrapéritonéale d'un barbiturique : l'Exagon® (Pentobarbital, laboratoire Richter Pharma, Autriche). Les organes ont été prélevés puis congelés dans un bain d'hexane refroidi par de l'acétone contenant de la carboglace puis placés à -80 °C jusqu'à analyse. Le détail des pesées pour chaque souris et pour chaque organe de la troisième expérience est résumé dans le **Tableau 1.1** ci-dessous.

Tableau 1.1 : Données issues des expériences d'administration du GO et rGO chez la souris.

Expériences	Expérience n°1		Expérience n°2	Expérience n°3			
	Souris 1	Souris 2	Souris	Souris 1	Souris 2	Souris 3	Souris 4
Genre	Femelle	Femelle	Femelle	Mâle	Mâle	Mâle	Mâle
Age	/	/	/	5 semaines le 07/06/2017			
Poids	/	/	/	30,1 g	33 g	33,6 g	35 g
Type d'injection	IV	Instillation	IV (Queue)	IV (Queue)	IV (Queue)	IV (Queue)	IV (Queue)
Quantité	4µg de <sup>14</sup> C-GO	4µg de <sup>14</sup> C-rGO	50µg de GO ( <sup>14</sup> C/ <sup>12</sup> C)	(SDBS)	25µg de GO ( <sup>14</sup> C/ <sup>12</sup> C)	50µg de GO ( <sup>14</sup> C/ <sup>12</sup> C)	75µg de GO ( <sup>14</sup> C/ <sup>12</sup> C)
Volume d'injection	/	/	100 µL	100 µL	50 µL	100 µL	150 µL
Heure d'injection	/	/	/	13h45	14h16	14h47	15h18
Heure de sacrifice	/	/	/	14h00	14h31	15h02	15h33
Poids du foie	/	/	/	1,4048 g	1,6586 g	1,8126 g	2,1302 g
Poids des reins	/	/	/	0,8879 g	1,0794 g	0,9432 g	1,1118 g
Poids de la rate	/	/	/	0,1173 g	0,0930 g	0,1157 g	0,1299 g
Poids des poumons	/	/	/	0,3014 g	0,3286 g	0,2436 g	0,2484 g

### III. PREPARATION DES TISSUS

#### 1. COUPES DE TISSUS UTILISEES POUR LA MISE AU POINT DES METHODES MS ET MSI

Pour l'optimisation des méthodes de détection MS et MSI, des coupes de foie et de poumons issus de souris non exposées aux nanoparticules de graphène ont été utilisés. Pour cela, les organes congelés ont été placés dans le cryostat (LEICA Microsystems, France) environ 15 minutes avant découpe. Les organes ont été sectionnés à 12 µm d'épaisseur avec une température de la chambre à - 20 °C et une température de l'objet à - 18 °C.

#### 2. PREPARATION DES TISSUS POUR L'IMAGERIE DUALE

Les tissus sont placés après découpe sur lame ITO afin d'être analysés de façon successive par imagerie β (car non destructive) puis par la MSI (Figure 1.5). Pour permettre la lecture de ces lames au β-imager, celles-ci sont recouvertes d'une bande adhésive conductrice sur leur face non conductrice. Suite à cela, cette bande adhésive est retirée des lames ITO avant la réalisation des analyses par MALDI - TOF.

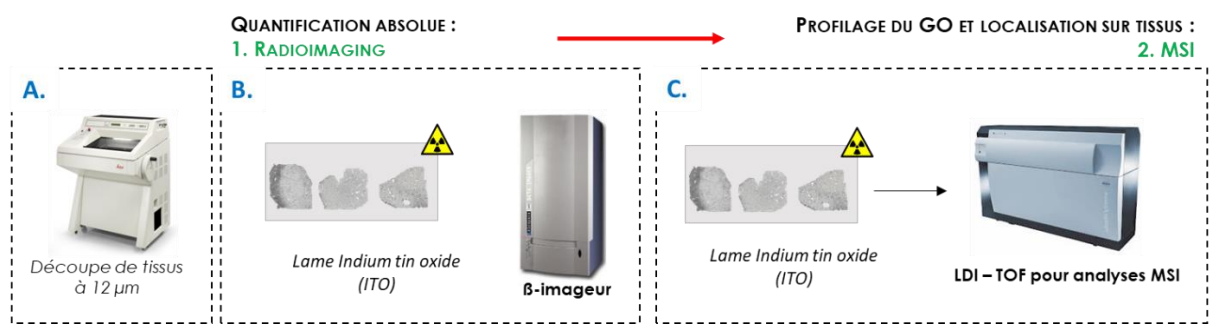


Figure 1.5 : Développement d'une expérience d'imagerie combinée.

A. Découpe des tissus et dépôts sur lame ITO. B. Analyses des coupes au β-imageur après ajout d'un scotch conducteur sur la face non conductrice des lames. C. Analyse de ces mêmes coupes en MALDI - MSI après retrait de ce scotch conducteur.

Pour étudier la biodistribution du GO injecté à différentes doses à la souris, les reins, rates, foies et poumons ont été prélevés, congelés puis sectionnés à 12 µm d'épaisseur avec un cryostat à - 20 °C (LEICA Microsystems, France). Pour chaque quantité de GO injectée, des coupes adjacentes ont été également récupérées sur lame Superfrost plus® gold (Thermo Scientific) afin de réaliser des colorations à H&E. Les organes issus de la souris exposée à la solution de SDBS seule ont également été coupés à 12 µm d'épaisseur et déposés sur lame ITO afin de servir de support pour les dépôts de gamme de calibration pour la réalisation de quantification en MSI et de tissus contrôles.

Les coupes de tissus exposées et montées sur une lame ITO ont été maintenues à température ambiante pendant une journée en présence de gel de silice afin d'assurer un séchage complet avant lecture au β-imageur. Les lames sont ensuite placées dans un dessiccateur pendant 30 minutes avant l'analyse MSI.

### 3. PREPARATION D'HOMOGENATS INCORPORANT DU GO

Des homogénats de tissus ont été préparés dans le but de réaliser des courbes d'étalonnage et ont été obtenus à partir de foies et de poumons de souris non exposées. De façon générale, ces tissus sont premièrement broyés et homogénéisés afin de pouvoir ensuite ajouter la molécule cible (Figure 1.6). Après ajout de celle-ci à différentes concentrations, les homogénats sont placés dans des seringues de 1 mL puis congelés à - 80 °C. Ces homogénats congelés sont ensuite démoulés puis coupés pour les analyses MALDI - MSI.

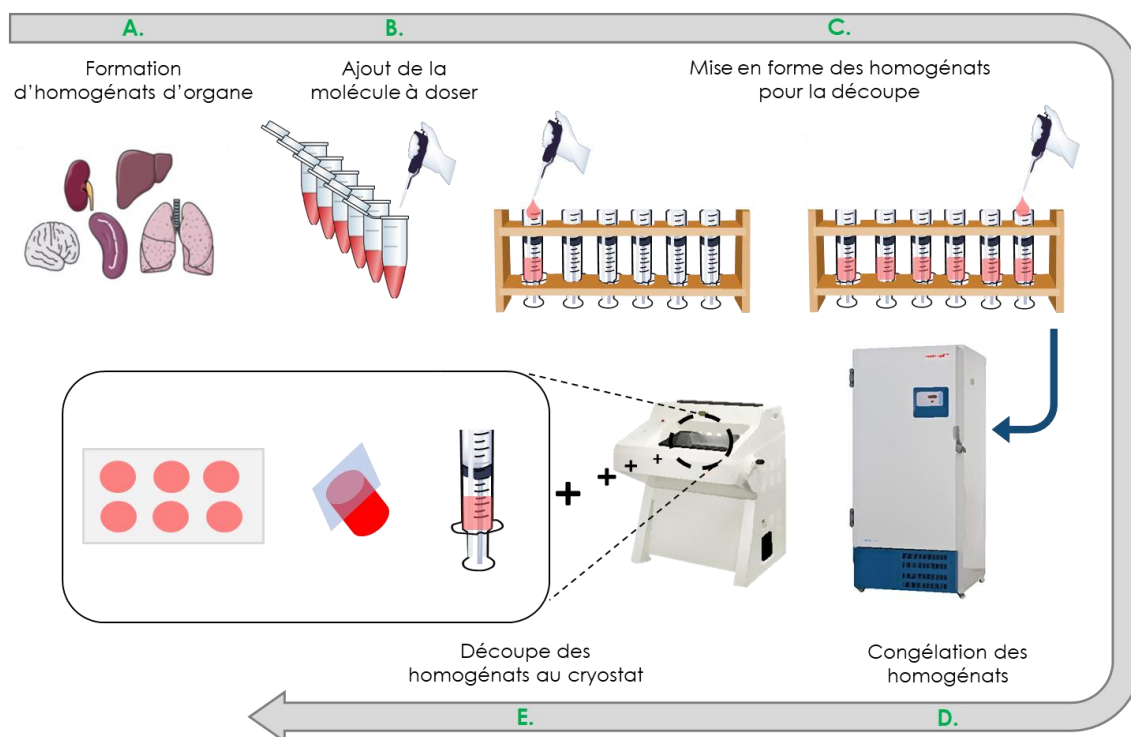


Figure 1.6 : Préparation des gammes de calibration en homogénats.

A. Les organes sont broyés et homogénéisés à l'aide du système Precellys. B. La molécule cible est ajoutée à ces homogénats à des concentrations connues. C. Les homogénats dosés sont transférés dans un moule, ici des seringues, puis placés au congélateur (D.). E. Les homogénats sont ensuite démoulés puis coupés à une épaisseur voulue dans un cryostat.

Après la pesée des tissus dans des tubes Precellys préalablement tarés, différents volumes de solution de SDBS à 0,05 % ont été utilisés pour réaliser les homogénats. Ces tests préliminaires ont été effectués sur des échantillons de foie : (1) ajout de SDBS à hauteur de 20 % du poids des tissus, (2) ajout de 1 mL de SDBS pour 200 mg de tissus, (3) ajout de 2  $\mu$ L de SDBS pour 1 mg de tissus. Ces conditions ont ensuite été optimisées pour les échantillons de poumon : (1) ajout de 2  $\mu$ L de SDBS pour 1 mg de tissus, (2) ajout de 1  $\mu$ L de SDBS pour 2 mg de tissus.

Les échantillons résultants ont ensuite été homogénéisés à l'aide d'un Precellys Evolution (Bertin Instruments, France) préalablement réfrigéré à 0 °C avec de la carboglace. Pour le foie, deux cycles différents de broyage ont été expérimentés : 3 x 30 secondes et 3 x 60 secondes à 5800 rpm. Pour les poumons, le cycle à 3 x 30 secondes a été satisfaisant afin d'obtenir des homogénats. Ces cycles sont tous espacés d'un temps de refroidissement de 15 secondes. Les broyats tissulaires ont ensuite été scindés dans des tubes Eppendorf afin d'y ajouter du GO et obtenir un volume final de 200  $\mu$ L.

Les 200  $\mu$ L obtenus après ajout de ces concentrations respectives dans les homogénats de foies et de poumons ont ensuite été transférés dans des seringues de 1 mL avec l'embout préalablement retiré. Ces seringues sont placées verticalement à - 80 °C pendant une nuit *a minima*. Les tissus ont été coupés à 30  $\mu$ m

d'épaisseur avec un cryostat (Leica, CM3050 S, Biosystem, USA) aux températures suivantes : T°C = - 30 °C et T°O = - 25 °C. Les coupes obtenues sont ensuite montées sur lame ITO (Bruker).

#### IV. COLORATION DES TISSUS

Les colorations H&E ont été réalisées à l'aide de bains successifs dans des solutions dont les compositions sont décrites dans le **Tableau 1.2**. Premièrement, les tissus ont été plongés deux minutes dans un bain de formol à 10 % dans l'éthanol pour permettre leur fixation. Les tissus ont ensuite été réhydratés grâce à des bains successifs d'une minute dans de l'éthanol à 100 %, 90 % et 70 % et un dernier bain d'une minute dans de l'eau. La coloration hématoxyline a été effectuée suite à un bain de 30 secondes, suivi de deux rinçages d'une minute dans de l'eau. La coloration éosine à 0,5 % dans de l'eau a été réalisée avec un bain de 30 secondes suivis

**Tableau 1.2 : Protocole de coloration H&E.**

Bains	Temps (secondes)	Rôle
Formol 10 % (EtOH)	120	Fixation
EtOH 100 % (H <sub>2</sub> O)	60	Hydratation
EtOH 90 % (H <sub>2</sub> O)	60	
EtOH 70 % (H <sub>2</sub> O)	60	
H <sub>2</sub> O, 100 %	60	
Hématoxyline	30	Coloration nucléaire
H <sub>2</sub> O, 100 % x 2	60	Rinçage
Eosine 0,5 % (H <sub>2</sub> O)	30	Coloration cytoplasmique
EtOH 70 % (H <sub>2</sub> O)	60	Déshydratation
EtOH 90 % (H <sub>2</sub> O)	60	
EtOH 100 % (H <sub>2</sub> O)	60	
Xylène (100 %)	120	Clarification

d'une déshydratation des tissus dans des bains successifs d'éthanol à 70 %, 90 % et 100 % pendant une minute. Enfin les tissus ont été clarifiés à l'aide d'un bain de xylène de deux minutes. Après coloration, les coupes ont été montées entre lames et lamelles avec un milieu de montage ProLong™ (Fischer Scientific) permettant la fixation des tissus.

#### V. ANALYSES PAR RADIOIMAGERIE

La quantification du GO et rGO dans les organes a été réalisée en radioimagerie au SIMOPRO avec l'aide de Carole Malgorn et de Fabrice Beau. Un imageur de haute performance ( $\beta$ -imager 2000, Biospace Lab, Paris, France) permettant un comptage en temps réel des particules  $\beta$  et une quantification absolue (avec un seuil de détection de 0,01 cpm/mm<sup>2</sup> pour le carbone 14) a été utilisée. Les lames portant les tissus ont été rendues plus conductrices en fixant une feuille d'aluminium adhésive (3M, Diegem, Belgique). Les acquisitions ont été réalisées en « Low Resolution » sur des cassettes de 15 lames. Ce mode « basse résolution » est plus tolérant aux échantillons non parfaits (planéité, propreté) mais la résolution est plus faible (150 $\mu$ m) qu'en

« high resolution ». Les temps d'acquisition ainsi que les références ayant servi à la quantification des différents organes analysés sont exposés dans le **Tableau 1.3**.

**Tableau 1.3 : Protocoles d'acquisition au  $\beta$ -imager selon les expériences réalisées.**

	Injections	Organes/support	Temps d'accumulation	Références	Solutions stock
Expérience n°1	4 $\mu$ g de GO (IV)	Poumons et Foie	4 heures	- 0,044 nCi - 0,087 nCi	22 $\mu$ g/mL = 45 nCi/mL
	4 $\mu$ g de rGO (instillation)				
Expérience n°2	50 $\mu$ g de 50/50 $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ -GO (IV)	Poumons et Foie	15 minutes	- 0,12 nCi	0,5 mg/mL = 43,5 $\mu$ Ci/mL
Expérience n°3	25 $\mu$ g de 50/50 $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ -GO	Poumons, Foie, Rate et Reins	22 heures	- 0,0016 nCi - 0,01 nCi	
	50 $\mu$ g de 50/50 $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ -GO	Poumons et Foie	30 minutes	- 0,1 nCi - 0,483 nCi	
		Rate et Reins	3 heures		
	75 $\mu$ g de 50/50 $^{12}\text{C}/^{14}\text{C}$ -GO	Poumons et Foie	30 minutes	- 0,1 nCi - 0,483 nCi	
Rate et Reins		3 heures			
Gamme en homogénats	De 2,5 à 100 $\mu$ g/mL	Poumons	1 heures	- 0,1 nCi - 0,483 nCi	
Gamme en dépôt	De 0,25 à 2,5 $\mu$ g/mL	Lame ITO	1 heures	- 0,1 nCi - 0,483 nCi	

Les images d'autoradiographie ont été traitées avec le logiciel d'analyse M3Vision. Les sections ont été analysées afin de déterminer le nombre de coups par minute obtenu au sein de chaque section de tissus. Cette valeur a ensuite été convertie en nanogrammes par coupe de tissus à partir de la concentration de la solution mère. Les quantités ont ensuite été transposées aux grammes totaux correspondant au volume total de chaque organe.

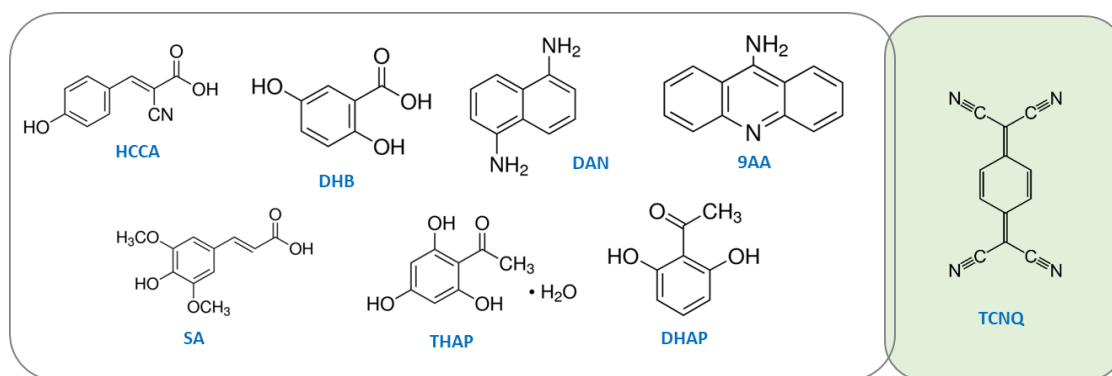
## **VI. ANALYSES EN SPECTROMETRIE DE MASSE DES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE**

Le développement de la méthode MSI a été réalisé à l'aide d'un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF (Matrix assisted Laser Desorption Ionization - tandem Time Of Flight) de type Ultraflextreme™ (Bruker Daltonics, Allemagne). Les analyses ont été effectuées à un taux de répétition laser de 2 kHz avec un laser Smartbeam-II™ à faisceau top-hat à 355 nm (Bruker Daltonics, Allemagne) (**Annexe 3, partie D**). Les paramètres donnés dans cette partie « matériel et méthode » sont les paramètres obtenus après optimisations. Ces optimisations seront développées dans la partie résultats et discussion.

## 1. ANALYSES MALDI ET LDI

### a. Matrices MALDI utilisées.

Les optimisations de détection des nanoparticules de type graphène ont été réalisées sur des lots de GO nommés NF 52 (0,1 mg/mL) et NF 66 (1,08 mg/mL) et des lots de rGO nommés NF 55 et NF 67 (0,2 mg/mL). Des analyses ont également été réalisées sur des nanotubes de graphène carbone 12 et carbone 13 dopés à l'azote. Pour les essais de détection, les nanoparticules ont été diluées dans une solution à 0,05 % de SDBS pour les feuillets ou 0,1 % pour les nanotubes pour obtenir une concentration finale de 0,1 mg/mL. Les analyses de ces différents lots ont été réalisées avec les matrices à disposition au laboratoire et présentées dans la **Figure 1.7**. Toutes ces matrices ont été reprises à une concentration finale de 10 mg/mL dans un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA) 50/50.



**Figure 1.7 : Matrices utilisées pour la détection des nanoparticules de type graphène.**

HCCA :  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, DHB : 2,5-Dihydroxybenzoic acid, DAN : 1,5-Diaminonaphthalene, 9AA : 9-aminoacridine, SA : sinapic acid, THAP : 2',4',6'-Trihydroxyacetophenone, DHAP : 2',6'-Dihydroxyacetophenone, TCNQ : 7,7,8,8-Tetracyanoquinodimethane.

### b. Paramétrages du spectromètre de masse

Le spectromètre de masse a été utilisé en mode réflectron et en ionisation négative. La pression de source du TOF était inférieure à  $10^{-7}$  mbar et les tensions étaient réglées comme suit : IS1 = 20,02 kV, IS2 = 18,02 kV, lentille = 6,99 kV, réflectron = 21,03 kV et réflectron 2 = 10,93 kV. Les mesures MALDI et LDI ont été effectuées avec la focalisation appelée « medium » du laser, une gamme de masses de 0 à 1000  $m/z$  et une accumulation de 4000 tirs par spectre. Le délai d'extraction a été optimisé et fixé à 10 ns. Les traitements des données ont été effectués à l'aide de FlexAnalysis 3.4. Toutes les acquisitions réalisées pour la détection et l'optimisation de la signature graphène ont été effectuées avec les paramètres cités ci-dessus.

## **2. ANALYSES MSI DES NANOPARTICULES**

La méthode d'imagerie par spectrométrie de masse est basée sur les mêmes paramètres que la méthode MS à l'exception de la gamme de masses fixée de 0 à 200  $m/z$ , le nombre de tirs accumulés est fixé à 1000 tandis que le faisceau du laser passé en « small » pour permettre une plus grande résolution spatiale. Les images ont été acquises avec un pas de 100  $\mu\text{m}$  pour les études de répétabilité, de reproductibilité, de linéarité et de quantification et de 25  $\mu\text{m}$  pour les études de biodistribution. Le traitement des données a été effectué avec FlexImaging 4.1 (Bruker, Allemagne) et mslQuant [199]. Les exports imzML nécessaires à la lecture des fichiers dans mslQuant [199] ont été obtenus à partir de FlexImaging 4.1 entre  $m/z$  20 et  $m/z$  150. L'image moléculaire de ces nanoparticules a été reconstituée sur la base des intensités moyennes des ions  $\text{C}_6^-$  à  $m/z$  72, ion le plus intense au sein de la « signature graphène ».



## C. RESULTATS ET DISCUSSIONS

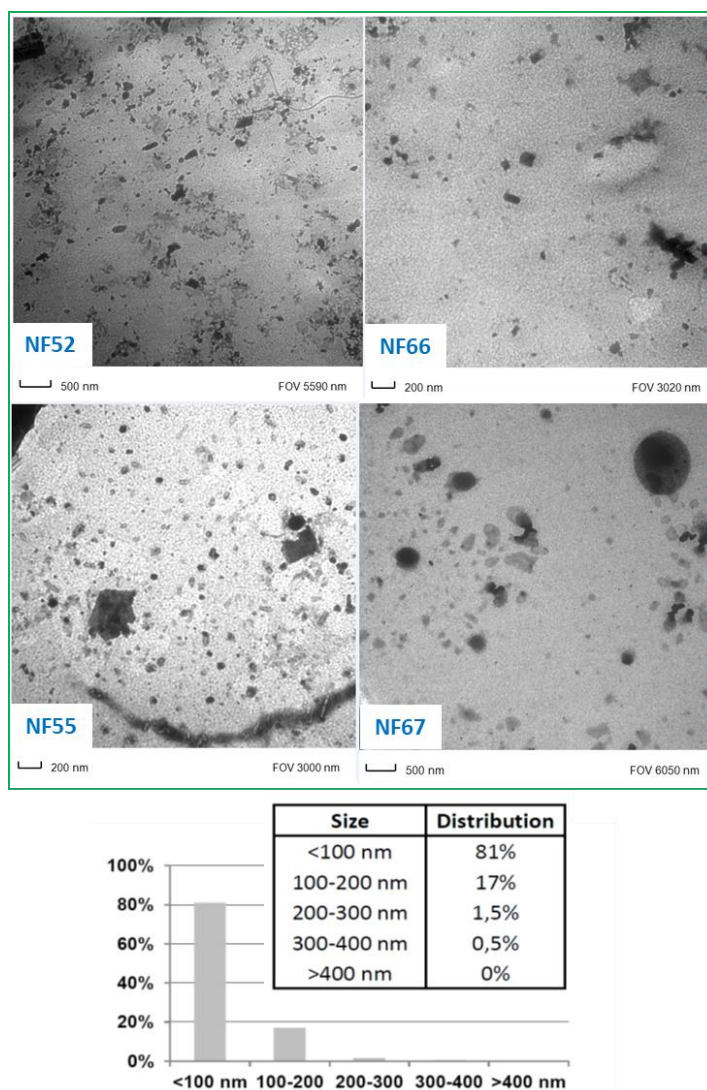
Notre étude sur les nanoparticules de graphène a eu pour but de développer une méthode analytique combinant la radioimagerie et la MSI dans l'objectif d'allier quantification absolue, caractérisation structurale *in situ*, et résolution spatiale. Pour cela, il est essentiel d'avoir une connaissance approfondie des nanoparticules analysées. La première étape entreprise a donc été dédiée à la caractérisation des lots de nanoparticules d'oxyde de graphène marquées ou non marquées fournies par le SCBM.

### I. CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

La synthèse des nanoparticules de GO et rGO passe par une étape de sonication pouvant donner des nanoparticules de tailles différentes d'un lot à l'autre. Cette étape dure 12 heures pour les nanoparticules produites au SCBM. Pour l'étude du graphène, trois lots de ces nanoparticules synthétisées au SCBM ont été utilisés. Un premier lot comporte des nanoparticules NF 52, 66 (GO), 55 et 67 (rGO) qui ont servi à l'identification de la signature du GO et rGO ainsi que pour l'étude de la répétabilité de celle-ci. Un second lot, composé des nanoparticules NF65 et NF 68 (GO) a été utilisé pour le développement analytique en MSI ainsi que pour les études de répétabilité, reproductibilité et de linéarité de ces analyses. Enfin, un troisième lot a été synthétisé avec une source de carbone 14 pour les études d'imageries combinées.

Afin d'évaluer les différences potentielles entre ces différents lots de nanoparticules, la microscopie électronique à transmission a été utilisée. Les images de la **Figure 1.8**, indiquent

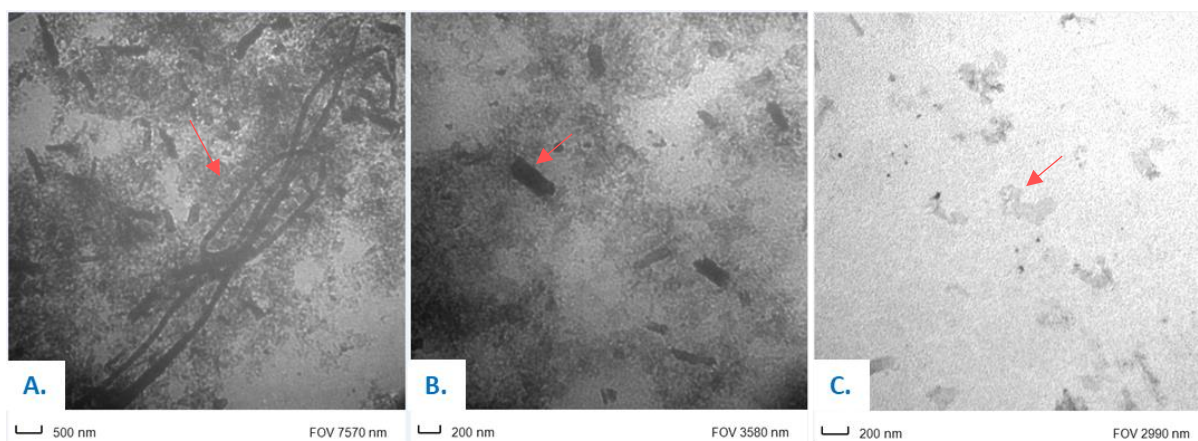
la taille des nanoparticules utilisées pour l'étude de la signature graphène. Pour ces lots, les feuillets semblent



**Figure 1.8 : Caractérisation par MET des lots de NF de GO.** Microscopie électronique à transmission des lots de d'oxyde de graphène oxyde réduit ou non. La distribution en taille des nanoparticules a été réalisée sur 288 mesures. GO : NF 52 et NF 66, rGO : NF 55 et NF 67.

majoritairement inférieurs à 100 nm. Plus particulièrement, 81 % des nanoparticules de ces lots ont une taille inférieure à 100 nm tandis que 19 % des nanoparticules font entre 100 et 400 nm.

L'homogénéité du lot ayant servi au développement de la méthode MSI a également été étudiée. Pour cela, la **Figure 1.9** expose des images de microscopie électronique obtenues pour la solution de GO (NF 65 et 68). Cette solution est composée de nanotubes de carbones de plusieurs dizaines de microns de longueur (**Figure 1.9, A**), de nanorubans de 200 nm de largeur sur 400 nm de longueur (**Figure 1.9, B**) et de feuillets de GO avec un diamètre inférieur à 200 nm (**Figure 1.9, C**). Ce mélange hétérogène de nanoparticules est inhérent au procédé de synthèse des nanoparticules à partir de nanotubes de carbone (**Matériel et Méthode** et **Annexe 1**). Les feuillets sont issus dans cette étude de l'ouverture de nanotubes de carbone et d'une sonication des nanorubans obtenus. Le protocole appliqué à ce lot d'oxyde de graphène NF 65/68 pourrait être amélioré afin d'obtenir une ouverture des nanotubes plus efficace suite au traitement  $\text{KMnO}_4$  et  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et ainsi obtenir un meilleur rendement d'obtention des nanorubans. Cette hétérogénéité peut également résulter d'une sonication insuffisamment efficace pour transformer tous les nanorubans en feuillets de GO.

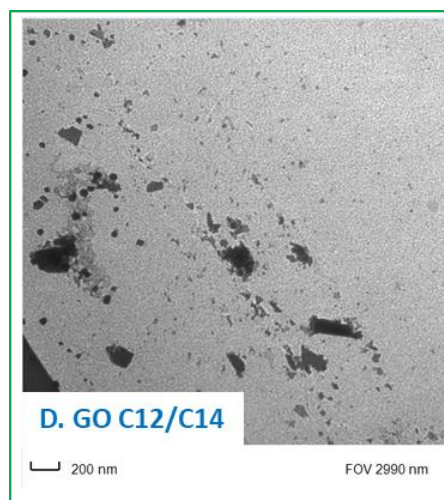


**Figure 1.9 : Caractérisation par MET des nanoparticules présentes dans la solution de GO provenant des lots NF 65/68.**

Images obtenues en microscopie électronique à transmission à partir de la solution de GO NF 65/68. L'image **A**. montre la présence de nanotube de carbone. L'image **B**. indique la présence de nanorubans et l'image **C**. celle de feuillets d'oxyde de graphène.

Enfin, les images MET des nanoparticules de GO marquées au carbone 14 montrent une taille de feuillets de GO inférieure à 200 nm (**Figure 1.10**). La comparaison des images de GO marqué et non marqué permet de confirmer que l'utilisation de benzène marqué au carbone 14 comme source de carbone n'induit pas de changement sur la structure des feuillets de GO.

Ces analyses effectuées au MET mettent en évidence la difficulté d'obtention de nanoparticules présentant des caractéristiques structurales et dimensions similaires (**Tableau 1.4**). L'hétérogénéité des solutions et les différences observées entre lots de synthèse devront être prises en compte pour l'interprétation des données obtenues en spectrométrie de masse ou en imagerie. Il est également important de noter ici, qu'aucune étude de stabilité de ces nanoparticules n'a été effectuée.



**Figure 1.10 : Caractérisation par MET du lot de GO marquées.**

Image obtenue par microscopie électronique à transmission de la solution de GO avec 50 % de <sup>12</sup>C-GO et 50 % de <sup>14</sup>C-GO.

**Tableau 1.4 : Bilan des différents lots de GO et rGO analysés par MET.**

Lots des nanoparticules de type graphène analysés	Tailles	Caractérisation	Utilisation dans cette étude
GO (NF 52 et 66)	<100 nm	Feuillets	Caractérisation et répétabilité de la signature
rGO (NF 55 et 67)	< 100 nm	Feuillets	Caractérisation et répétabilité de la signature
GO NF65/68	400, 200 et 100 nm respectivement	Nanotubes, Nanorubans et Feuillets	Reproductibilité des courbes de calibration, linéarité et limite de quantification
GO marqués	< 200	Feuillets	Biodistribution et effet dose chez la souris

Suite à cette caractérisation des nanoparticules présentes dans les différents lots de synthèses et l'étude de la distribution en taille des GO et rGO, ces premiers résultats obtenus en MET montrent qu'il est difficile d'obtenir des lots similaires. Ces différences peuvent engendrer des complications lors de la mise au point des méthodes de spectrométrie de masse. Ces analyses MALDI - MS ont cependant été réalisées afin d'obtenir une caractérisation structurale de ces nanoparticules. Le but de la première partie du développement analytique en spectrométrie de masse a donc consisté à obtenir une signature répétable des nanoparticules de type graphène malgré l'hétérogénéité des lots de synthèse.

## II. DETECTION DES NANOPARTICULES DE TYPE GRAPHENE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

Dans un premier temps, le développement de la méthode a été effectué sur un MALDI - TOF/TOF Ultraflextreme™ en utilisant les nanoparticules de GO et rGO non marquées : NF 52 et NF 66, et NF 55 et NF 67, présentant des distributions de tailles homogènes. Sachant qu'il est difficile d'obtenir des solutions homogènes en raison des propriétés hydrophobes des espèces dérivées du graphène, l'utilisation d'un agent tensioactif a été nécessaire pour la resuspension de ces nanoparticules. Ainsi, une suspension uniforme de  $^{12}\text{C}$ -GO/ $^{12}\text{C}$ -rGO a pu être obtenue après addition d'une solution de SDBS à 0,05 %, solution précédemment utilisée par M. Suttipong *et al.*, 2011 [272] pour la monodispersion de SWCNT. Cependant les rGO restent moins dispersibles car possédant moins de groupements hydrophiles (hydroxyles, carbonyles ou époxydes) que les nanoparticules de GO. L'obtention de suspensions et non de solutions parfaitement homogènes engendre une seconde complication qui est la difficulté de réaliser des prélèvements représentatifs. Cet aspect, relatif à la difficulté de production et de manipulation des nanoparticules peut de plus constituer un obstacle aux développements de méthodes MS, notamment dans une optique de quantification.

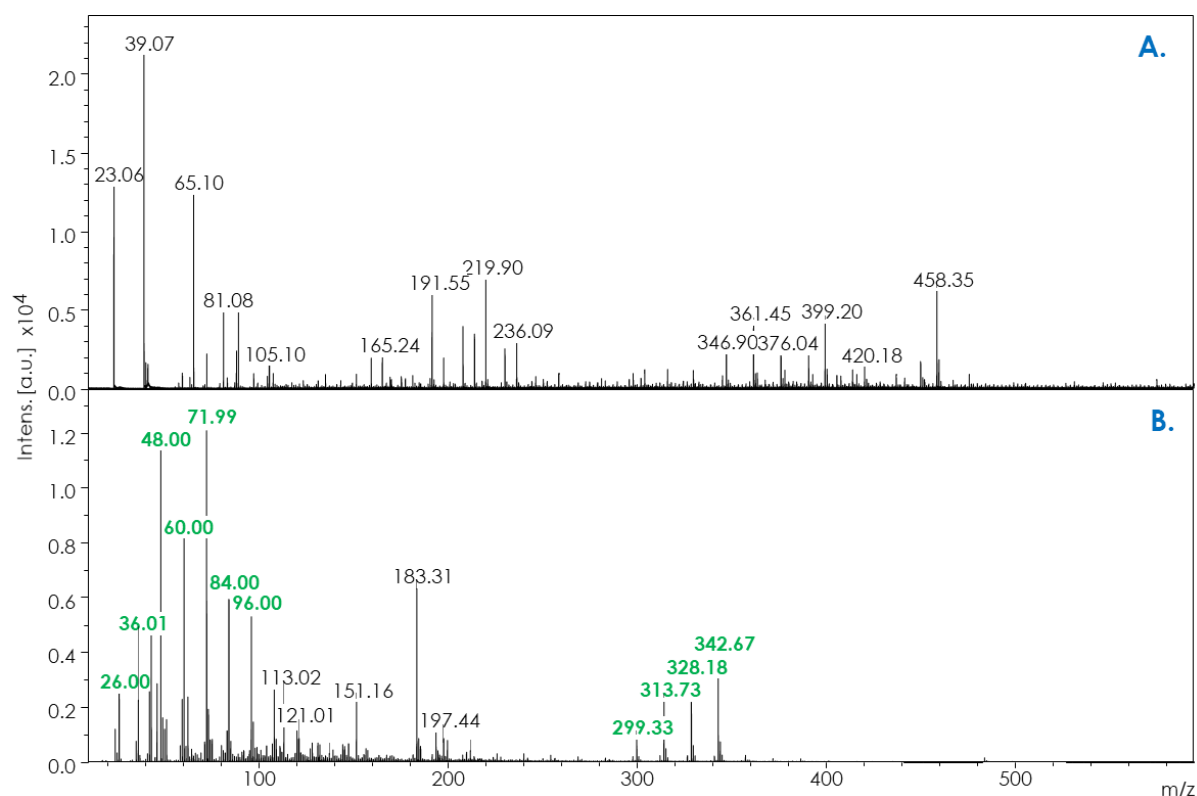
En analysant ces espèces dérivées du graphène, l'objectif premier a consisté à rechercher des ions représentatifs de ces nanoparticules. Pour cela, une comparaison des signaux obtenus pour les différents lots et types de nanoparticules produites a été réalisée. Ensuite les paramètres de spectrométrie de masse ont été optimisés afin d'améliorer la détection des ions constituant cette signature et d'en évaluer la répétabilité et ce, pour chaque nanoparticule.

### 1. PROFILAGE DES NANOPARTICULES DE GO ET RGO

Les nanoparticules de graphène sont des entités très particulières à analyser, pour lesquelles peu de protocoles sont disponibles dans la littérature. Par conséquent, de nombreuses conditions MALDI et LDI ont été testées et optimisées afin de détecter au mieux ces nano-objets. Ces nanoparticules reprises dans une solution de SDBS à 0,05 % ont donc été analysées à la fois en modes d'ionisation négatif et positif, dans les modes de détection réflectron ou linéaire et avec ou sans addition de matrice.

Les premières analyses LDI effectuées en mode de détection linéaire ou réflectron n'ont pas révélé d'ions au-delà de  $m/z$  1000, que cela soit en mode positif d'ionisation ou négatif, mais plutôt dans la gamme des bas rapports  $m/z$  ( $< m/z$  500) (**Figure 1.11**). Le mode réflectron a été retenu afin d'obtenir des spectres plus résolus pour les ions de masses inférieures à  $m/z$  400. Après comparaison et étude des spectres résultant, l'ionisation négative, contrairement à l'ionisation positive, a permis de mettre en évidence des ions possédant des différences de masse de 12 Da ( $^{12}\text{C}$ ) ou de 14 Da ( $^{12}\text{CH}_2$ ) avec des distributions s'étalant respectivement de  $m/z$  20 à 100 et de  $m/z$  290 à 350. Ces différences de masses sont en adéquation avec la structure carbonée des nanoparticules GO et rGO et avec les données préalablement publiées. Z. Jing *et al.*, 2005 [40] ont détecté

des clusters de carbone de  $m/z$  180 à 336 en LDI (ionisation positive) pour des nanotubes de carbone, S. Cheng *et al.*, 2013 [37] ont identifié des clusters de carbones de  $m/z$  12 à 120 lors de l'analyse de carbon nanodots en LDI (ionisation négative) alors que M. Mendonça *et al.*, 2015 [259] ont détecté 4 ions spécifiques de rGO aux  $m/z$  421, 465 et 509 en ionisation négative avec la matrice acide sinapinique. Dans ces conditions, ce type de clusters n'a été observé que dans le mode négatif alors que W. Xie *et al.*, 2017 [273] ont obtenu pour des nanoparticules de graphène par analyse TOF-SIMS des signatures carbonées dans les deux modes d'ionisation.



**Figure 1.11 : Spectres de masse LDI-TOF du GO dans les modes d'ionisation positif et négatif.**

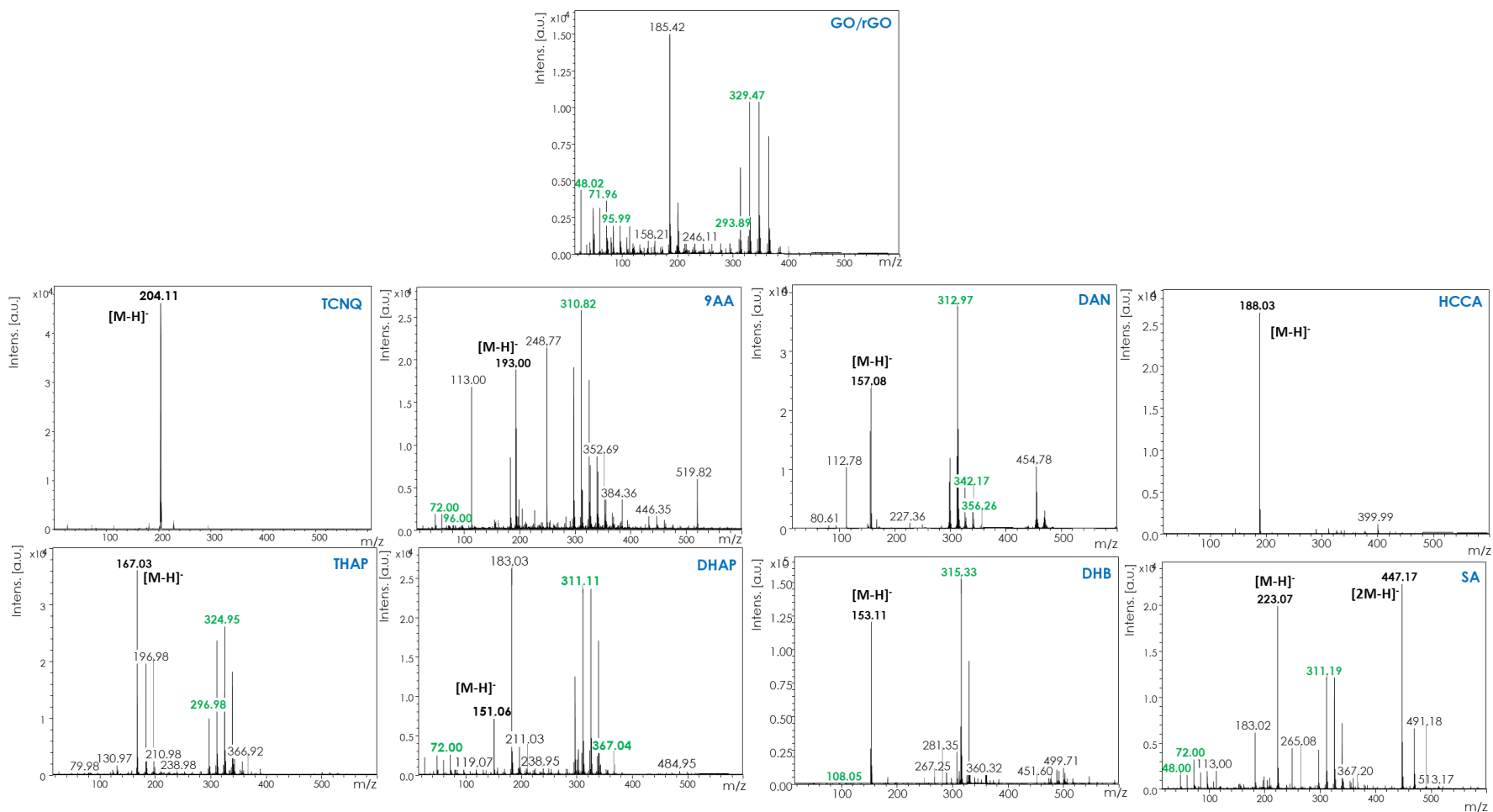
**A.** Analyses LDI - MS sur plaque MTP ground steel en mode positif d'ionisation des nanoparticules d'oxyde de graphène à une concentration de 0,1 mg/mL. **B.** Mêmes analyses en mode négatif d'ionisation. Les données ont été acquises avec une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz, un délai d'extraction (DIE) de 80 ns et une fluence laser de 90%.

Les nanoparticules GO et rGO ont également été analysées sans ou avec matrice MALDI telles que HCCA, DAN, SA, DHAP, THAP et la matrice 9-AA (**Figure 1.12**) afin de potentiellement améliorer leur sensibilité de détection. Cependant, aucune amélioration significative n'a été observée quant aux intensités des ions composant la signature carbonée pouvant être affiliée au GO ou rGO. Plus spécifiquement, étant donnée la nature radicalaire des ions observés, l'emploi d'une matrice radicalaire telle que le TCNQ a été jugé judicieux afin d'en favoriser la détection. Cette matrice a précédemment été utilisée par Przybilla *et al.*, 2000 [274] pour l'analyse d'hydrocarbures aromatiques polycycliques sous formes intactes, non fragmentés. L'utilisation de la matrice TCNQ à radicaux libres, qui est un accepteur d'électrons, n'a cependant pas permis d'améliorer l'intensité des signaux observés. L'absence de détection des nanoparticules de GO/rGO avec cette matrice

radicalaire pourrait s'expliquer par la stabilisation des feuillets de graphène anionique et la « neutralisation » des ions résultants par le TCNQ. En effet, Hao *et al.*, [275] ont rapporté en 2008 la dispersion du graphène dans une solution aqueuse grâce à la neutralisation des charges via l'ajout de TCNQ. A noter que les spectres du rGO analysé avec le TCNQ ou encore l'HCCA ont principalement permis d'observer les ions de matrices (**Figure 1.12**).

Suite à ces premiers résultats, la détection du GO et du rGO a été fixée pour toutes nos études en LDI - MS avec un mode négatif d'ionisation et une analyse en mode d'acquisition réflectron, l'ajout de matrice ici n'ayant pas permis d'améliorer la détection du GO et du rGO. Ceci peut être consistant avec le fait que ces matériaux de type graphène sont souvent utilisés comme matrice ou co-matrice MALDI (voir la **partie contexte, chapitre 1, Partie B, paragraphe III. 1. b.**). Le GO et le rGO possèdent des cycles aromatiques qui facilitent leur désorption et leur ionisation et qui les rendent ainsi autosuffisants pour des analyses LDI.

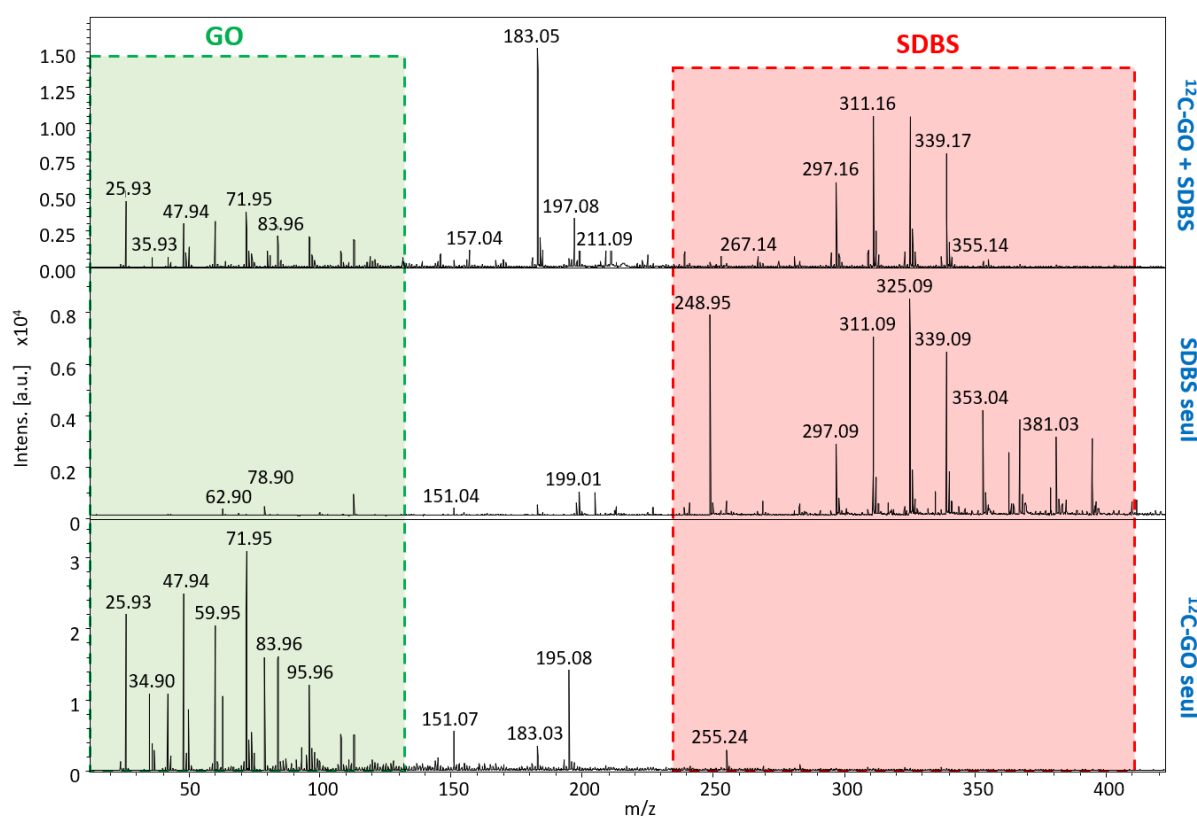
**PARTIE B : ETUDES EXPERIMENTALES, CHAPITRE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE D'IMAGERIE COMBINEE POUR L'ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DE L'OXYDE DE GRAPHENE CHEZ LA SOURIS**



**Figure 1.12 : Spectres de masse MALDI - TOF du GO acquis avec un panel de matrices différentes.**

Analyse de l'oxyde de graphène avec les matrices MALDI TCNQ, 9AA, THAP, DHAP, DAN, HCCA, DHB et SA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA), 50:50, v/v) en mode réflectron et en mode négatif d'ionisation avec un DIE de 80 ns, une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 KHz et une intensité laser de 90 %

Les ions détectés en mode négatif d'ionisation ont été étudiés plus en détails afin d'en préciser la nature et l'origine. Deux profils d'ions ont été observés de  $m/z$  20 à  $m/z$  110 et de  $m/z$  290 à  $m/z$  400 (**Figure 1.13**). Sachant que les nanoparticules de GO et de rGO ont été reprises dans une solution contenant 0,05 % de SDBS, le GO et le SDBS seul ainsi qu'en mélange ont été analysés successivement afin de différencier leurs signaux respectifs en analyse LDI - MS. La comparaison de spectres résultants a permis d'attribuer spécifiquement la signature GO entre  $m/z$  20 et  $m/z$  110 et la signature du SDBS entre  $m/z$  290 à  $m/z$  400.

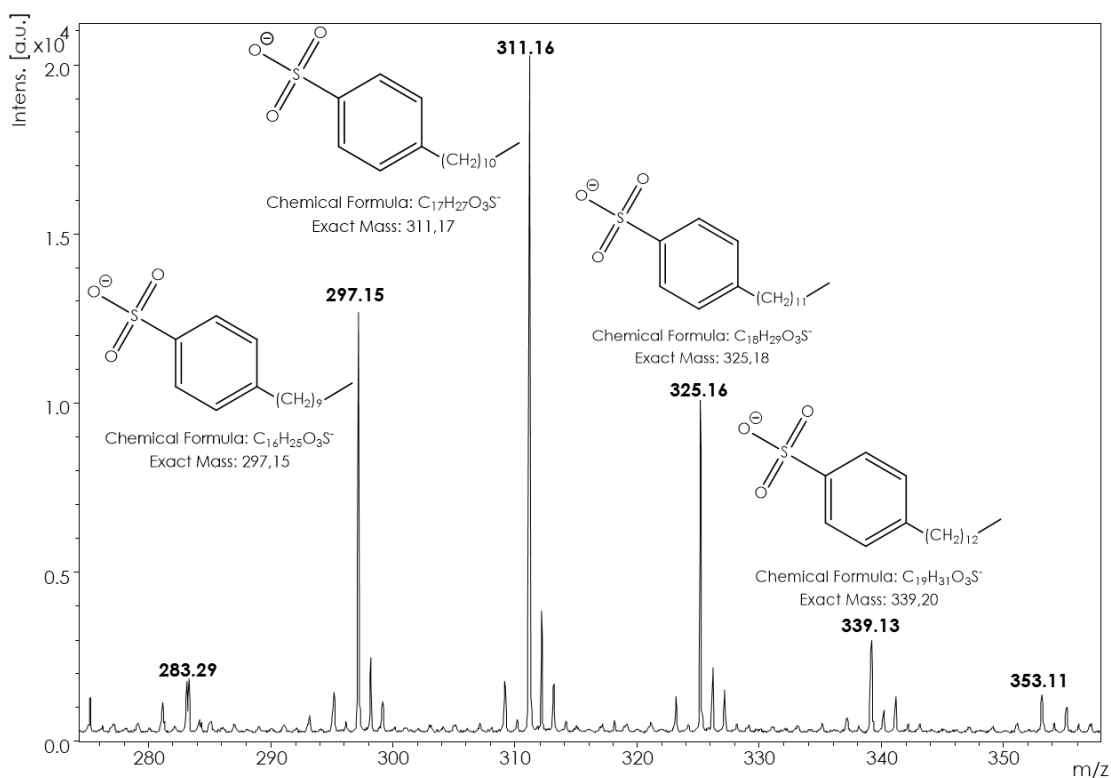


**Figure 1.13 : Spectres de masse LDI - MS de la signature du GO et du SDBS.**

Analyses LDI - MS du GO et du SDBS seul et en mélange sur plaque MTP ground steel avec le mode d'acquisition réflectron et le mode négatif d'ionisation. Le DIE est de 80 ns avec une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 KHz et une intensité laser de 90 %.

Certains des ions observés pour la suspension de GO en SDBS et ceux provenant du tensioactif (SDBS) seul possèdent des différences de masse successives de 14 Da correspondant à des longueurs de chaînes carbonées différentes. Les ions à  $m/z$  297,15 ; 311,16 ; 325,16 et 339,13 ont ainsi été détectés et peuvent être attribués à des longueurs de chaîne allant de  $C_{10}$  à  $C_{15}$  (**Figure 1.14**). Ces ions issus du SDBS ont également été détectés par W. H. Zhong en 2013 [276] lors de l'étude de la dispersion et de l'encapsulation de nanotubes de carbone en milieu aqueux.





**Figure 1.14 : Spectre de masse LDI - MS des ions analysés dans le massif correspondant au tensioactif.** Analyses LDI du SDBS seul sur plaque MTP ground steel : Mode réflectron et mode négatif d'ionisation avec un DIE de 80 ns, une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 KHz et une intensité laser de 90 %. Zoom sur les ions spécifiques du SDBS correspondant à des longueurs de chaîne différentes.

Les ions entre  $m/z$  20 et 110 ont pu être affectés à une distribution de clusters de carbone radicalaires de type cumulènes. Ces anions radicalaires sont formés par capture d'électron résonante due à une intensité du laser importante utilisée. Pour les signatures GO et rGO, les clusters de carbones radicalaires varient  $C_2^-$  à  $m/z$  23,95 au  $C_9^-$  à  $m/z$  108,07 avec un pic de base à  $m/z$  71,99 correspondant  $C_6^-$ . Ces ions ont été identifiés à la fois dans la signature des nanoparticules de GO et de rGO (**Figure 1.15**). De plus, deux ions spécifiques semblaient distinguer les ions rGO des nanoparticules GO à  $m/z$  25,95 (**Figure 1.15, A.**) et  $m/z$  42,96 (**Figure 1.15, B.**) et pourraient être affectés respectivement à des fragments  $C_2H_2^-$  et  $C_2H_3O^-$ . Sachant que la confirmation  $MS^2$  de ces ions sur l'Ultraflex extreme n'a pas été possible en raison de l'impossibilité d'effectuer ce type d'expériences pour des ions inférieurs à  $m/z$  100. Des essais ont donc été entrepris sur un LTQ - Orbitrap équipé d'une source MALDI à pression atmosphérique, malheureusement sans succès en raison d'une mauvaise détectabilité des ions d'intérêt dans ces conditions. Une demande a également été réalisée auprès du laboratoire de Metz pour réaliser des analyses sur un MALDI - FTICR. Là encore, « nos ions » se sont révélés trop petits pour être efficacement transmis et détectés.

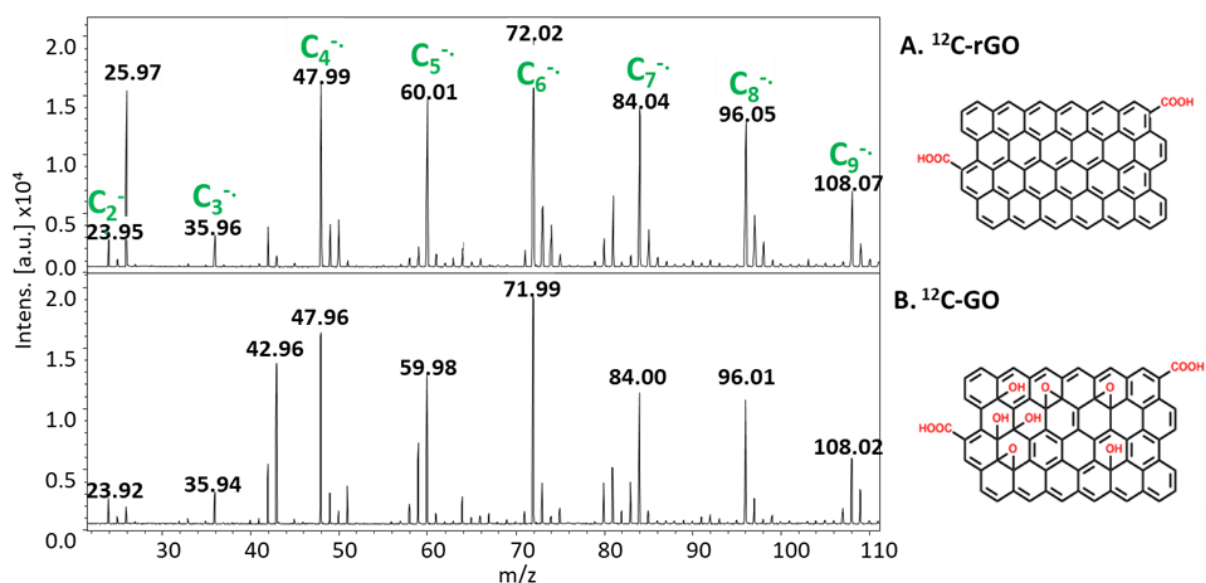


Figure 1.15 : Spectres de masse LDI - TOF du GO et rGO.

A. Signature des clusters de carbone de rGO observée par LDI - MS de  $C_2^-$  à  $C_9^-$ . B. Des signatures similaires ont été identifiées pour les nanoparticules de type GO. Analyses LDI - MS en mode reflectron et mode ionisation négative avec un DIE de 80 ns, une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz et une intensité laser de 90 %.

Cette signature carbonée indique une fragmentation en source des nanoparticules de type graphène. L'équipe de W. Xie *et al.*, 2017 [273] a retrouvé cette même signature lors de l'étude du graphène en analyses TOF - SIMS. Trois voies de fragmentation typiques de ces nanoparticules et conduisant à des ions de type  $C_x$ ,  $C_xH$  et  $C_xH_2$  et  $C_xH_x$  (dans les deux modes d'ionisation) ont été proposés par les auteurs. Contrairement à nos résultats, le pic majoritaire de leur signature graphène correspond au cluster  $C_4^-$  à  $m/z$  48. Cette différence peut être due à une énergie plus élevée du faisceau d'ions primaires de  $Bi_3^+$  de la source SIMS utilisée par rapport au laser de la source MALDI de notre instrument. En analyse LDI - MS, S. Chen *et al.*, 2015 [260] ont observé une signature correspondant également à des clusters de carbone et similaires aux nôtres en analysant des CNTs, des GOs et des CDs, également avec l'Ultraflex™ équipé d'un laser smartbeam™II. Lors des analyses du GO en LDI - MS, ils ont observé des clusters de carbone allant du  $C_2^-$  au  $C_{10}^-$  correspondant aux rapports masse/charge  $m/z$  24,0 ; 36,0 ; 48,0 ; 60,0 ; 72,0 ; 84,0 ; 96,0 ; 108,0 and 120,0. Ils ont également détecté les ions  $m/z$  26,0 et  $m/z$  42,0 mais qu'ils ont attribué aux composés  $[CN]^-$  et  $[CNO]^-$ . Ces analyses ayant été réalisées à partir de coupes de tissus, leur origine peut également être endogène, ce qui serait consistant avec la présence d'atomes d'azote dont sont dépourvues les nanoparticules analysées. M. Mendonça *et al.*, 2015 [259] ont quant à eux remarqué quatre autres ions caractéristiques pour la détection de rGO aux  $m/z$  421, 465 et 509 en ionisation négative avec la matrice MALDI SA. Ces ions seraient des ions moins ou non fragmentés des nanoparticules de rGO obtenus à l'aide d'un MALDI - LTQ - XL (Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) équipé d'un laser Nd:YAG (355 nm). La fragmentation ou non des nanoparticules de graphène peut ici dépendre du laser utilisé en analyse MALDI

ou LDI ainsi que des conditions de source. De plus, l'usage de méthode LDI peut nécessiter une fluence du laser plus élevée induisant ainsi une fragmentation plus importante des GO ou rGO en source.

Suite aux analyses réalisées en MALDI - MS ou en LDI - MS et à la comparaison de la signature GO et rGO avec et sans ajout de tensioactif, les paramètres instrumentaux ont été optimisés afin d'améliorer le signal de la signature obtenue.

## 2. OPTIMISATION DES PARAMETRES MS

Dans un premier temps des analyses ont été effectuées pour améliorer la qualité de la calibration de l'instrument dans les bas rapports  $m/z$  et la précision de mesure de masse des clusters de carbone détectés. Ensuite, le délai d'extraction des ions en source (**Annexe 3, partie B**) a été optimisé pour obtenir une résolution spectrale plus importante.

### a. Qualification des performances du MALDI-TOF/TOF

Premièrement, pour s'assurer du bon fonctionnement de l'instrument, la mise en place d'une procédure de qualification des performances de l'appareil a été nécessaire. Cette procédure (**Annexe 4**) a permis le suivi de la sensibilité des détecteurs linéaire et réflectron, de la qualité de la résolution spectrale, de la fluence du laser et de la répétabilité et reproductibilité des analyses au cours de ces trois années de thèse. Cette procédure s'est avérée très utile par la suite notamment pour le suivi de la puissance laser.

### b. Optimisation de la calibration

Une fois la signature GO et rGO caractérisée, la méthode LDI - MS a été optimisée afin d'obtenir une précision de mesure de masse satisfaisante pour les clusters de carbone. Afin de calibrer en externe les acquisitions LDI - TOF, différentes matrices MALDI ont été utilisées dans le but d'obtenir une calibration des faibles masses moléculaires inférieures à  $m/z$  500. Pour cela, le référencement des ions formés par ces matrices MALDI à partir de la littérature et la génération de listes de novo en ionisation négative a été entrepris (**Tableau 1.5**). Ces informations ont également été générées en ionisation positive expérimentalement et par analogie avec la bibliographie. Cependant, les ions de matrices ne commençant qu'à partir de

**Tableau 1.5 : Caractéristiques des matrices MALDI dans les basses masses.**

	Pics de calibrations	Gamme de masse	Attributions des pics
9AA	2	/	2
DAN	8	156 – 473	7
DHAP	5	150 - 325	4
THAP	2	/	1
DHB	4	152 -329	3
HCCA	5	189 - 377	1
SA	6	209 - 671	6
DT	6	225 - 1349	6

Export des pics avec un signal sur bruit  $\geq 10$

$m/z$  150 (DHAP), la calibration sur ces ions n'était pas satisfaisante. De ce fait, une calibration interne a été réalisée sur les clusters de carbone de  $C_2^-$  à  $C_9^-$  eux-mêmes. Malheureusement, la méthode d'acquisition est une méthode LDI et l'Ultraflex™ ne permet pas d'effectuer des calibrations en temps réel des spectres de masse. La calibration réalisée en MSI sera donc une calibration interne réalisée avant le lancement de l'image sur les clusters de carbone.

### c. Optimisation du délai d'extraction

Dès lors que la signature GO et rGO a été caractérisée, la méthode LDI - MS a été optimisée afin d'obtenir les signaux les plus intenses et résolus. Pour cela, différents délais d'extraction ont été expérimentés entre 10 ns et 350 ns et les signaux et résolutions obtenus ont été comparés (Figure 1.16). Les comparaisons ont été réalisées sur 6 spectres acquis sur 3 dépôts MALDI différents. La signature la plus intense observée pour tous les clusters de carbone a été obtenue avec un délai d'extraction de 10 ns. En effet, plus le délai d'extraction augmente plus on observe une diminution du signal pour chacun des ions de la signature. Malgré des écarts-types plus faibles avec des délais d'extraction de 100 ns et 150 ns, le délai d'extraction de 10 ns a été préféré car l'intensité du signal y était deux fois supérieure pour la majorité des clusters de carbone.

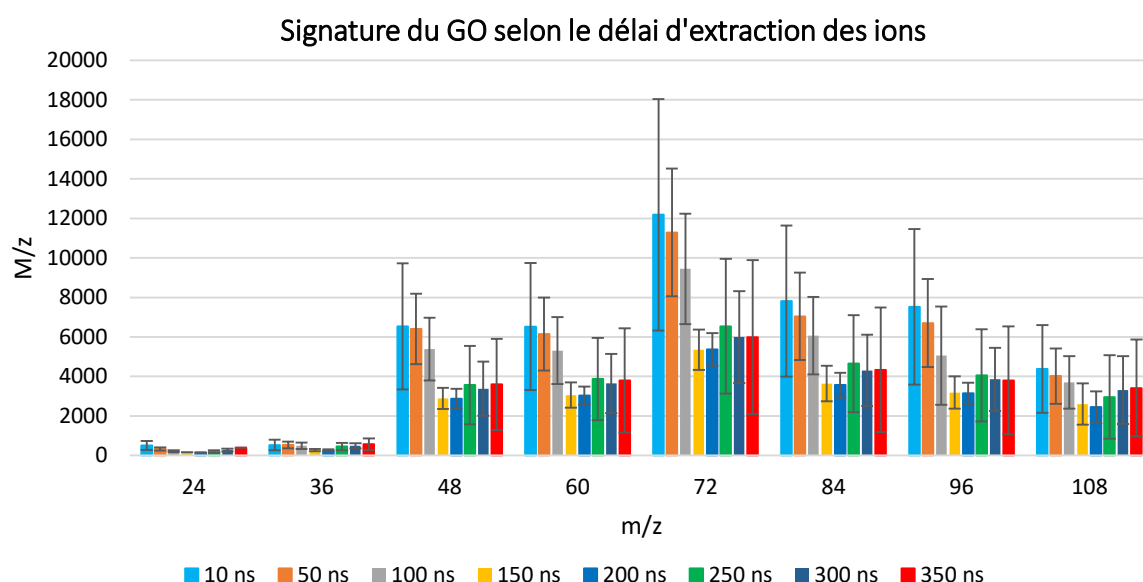


Figure 1.16 : Intensité de la signature du GO obtenue en fonction du délai d'extraction en source.

Analyses LDI du GO plaque MTP ground steel : Mode réflectron et mode négatif d'ionisation, accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 KHz et à une intensité laser de 90%. Variation du délai d'extraction de 10 à 350 nanosecondes.

Cette première étape d'optimisation a permis de déterminer la méthode de détection des feuillets d'oxyde de graphène en analyse LDI - MS avec un mode de détection réflectron, une ionisation négative et un délai d'extraction de 10 nanosecondes. Elle a également permis l'attribution d'une signature de type clusters de carbone allant de  $C_2^-$  et  $C_9^-$  avec un pic majoritaire en  $C_6^-$  pour la détection du GO et rGO. La spécificité de cette signature GO et rGO dans les conditions d'analyse précédemment définies a été étudiée dans la continuité de cette étude. Des essais concernant la variabilité de cette signature sont présentés dans le paragraphe suivant.

### 3. SPECIFICITE DE LA SIGNATURE GRAPHENE

Une fois la signature GO et rGO déterminée, la spécificité et répétabilité de cette signature ont été évaluées selon le type de nanoparticules et le support d'analyse soit la plaque MALDI ou ITO et des coupes de foie. Pour cela, des lots de feuillets de GO et rGO ont été comparés ainsi que d'autres nanoparticules de type graphène tel que des nanotubes de carbone incorporant notamment différents hétéroatomes. Enfin, la signature de GO non marqué a été comparée à celle du GO marqué au  $^{14}C$ .

#### a. Spécificité des analyses MS selon le type de nanoparticules : GO et rGO

La répétabilité de l'analyse a été estimée en analysant les quatre lots de GO/rGO synthétisés, i.e. NF 52, 66 (GO), et NF 55 et 67 (rGO). Tout d'abord, les analyses ont été comparées sur dix acquisitions réalisées sur deux dépôts via les intensités relatives obtenues pour les clusters de carbone de  $C_2^-$  et  $C_9^-$ . Les intensités relatives détectées pour le GO et le rGO se sont révélées similaires (**Tableau 1.6**).

Plus particulièrement, la comparaison des moyennes des intensités relatives de l'ion  $m/z$  72 n'a pas montré de différence significative entre les lots NF 52, NF 66 (GO), NF 55 et NF67 (rGO) avec des moyennes des intensités relatives respectives de 22,2 % et 24,5% pour l'ion  $m/z$  72. De plus, la stabilité de cette signature a été établie pour le GO et le rGO avec un coefficient de variation inférieur à 30 % pour chaque nanoparticule (12 répliquas acquis sur deux dépôts distincts). Ainsi, malgré des propriétés hydrophobes pouvant potentiellement induire la formation d'agrégats en solution aqueuse contenant 0,05 % de SDBS, la suspension de ces nanoparticules semble suffisamment homogène pour permettre des analyses LDI - MS répétibles.

Lors de l'analyse de nanomatériaux à base de graphène en spectrométrie de masse, les mêmes nanoparticules issues de lots de synthèse différents semblent pouvoir être comparées qualitativement et ce, malgré une dégradation des nanorubans en GO potentiellement variable et à l'origine de nanoobjets de tailles potentiellement non homogènes. Les mises en place et optimisations des approches MALDI - MS/LDI - MS et MSI décrites ci-dessous ont été réalisées sur les nanoparticules de GO.

Tableau 1.6 : Répétabilité des signatures de GO et de rGO selon les lots de synthèse.

m/z	GO				rGO			
	NF 52		NF 66		NF 55		NF 67	
	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV	Moyenne	CV
24	2,7	19,7	3,7	26,4	2,4	24,1	3,2	9,6
36	2,9	7,2	3,9	10,6	3,4	11,2	3,7	17,6
48	16,0	7,3	21,5	12,6	15,0	11,1	17,4	27,8
60	13,2	4,5	15,9	8,5	15,4	5,7	14,9	5,5
72	21,6	5,6	22,7	26,8	22,4	3,6	26,5	5,5
84	12,6	4,3	13,1	6,9	15,8	6,2	14,9	13,9
96	12,4	6,2	12,9	6,7	15,1	6,9	13,7	8,4
108	18,6	20,8	6,3	14,2	10,4	22,1	5,7	15,3

Moyennes et CVs obtenus à partir des abondances relatives acquises sur 12 spectres et sur deux dépôts MALDI. Moyennes et CVs exprimés en pourcentage.

### b. Stabilité des profils MS hors et sur tissus

Les lots de graphène ont été analysés sur coupe de foie et sur lame ITO avec et sans matrices pour observer la répétabilité de la signature selon le support d'analyse et confirmer l'intérêt des conditions LDI. On constate tout d'abord que même sur coupe de tissus, l'ajout de matrice ne favorise pas l'ionisation des feuillets d'oxyde graphène (Tableau 1.7).

Tableau 1.7 : Détection des massifs caractéristiques des solutions de GO selon les matrices MALDI.

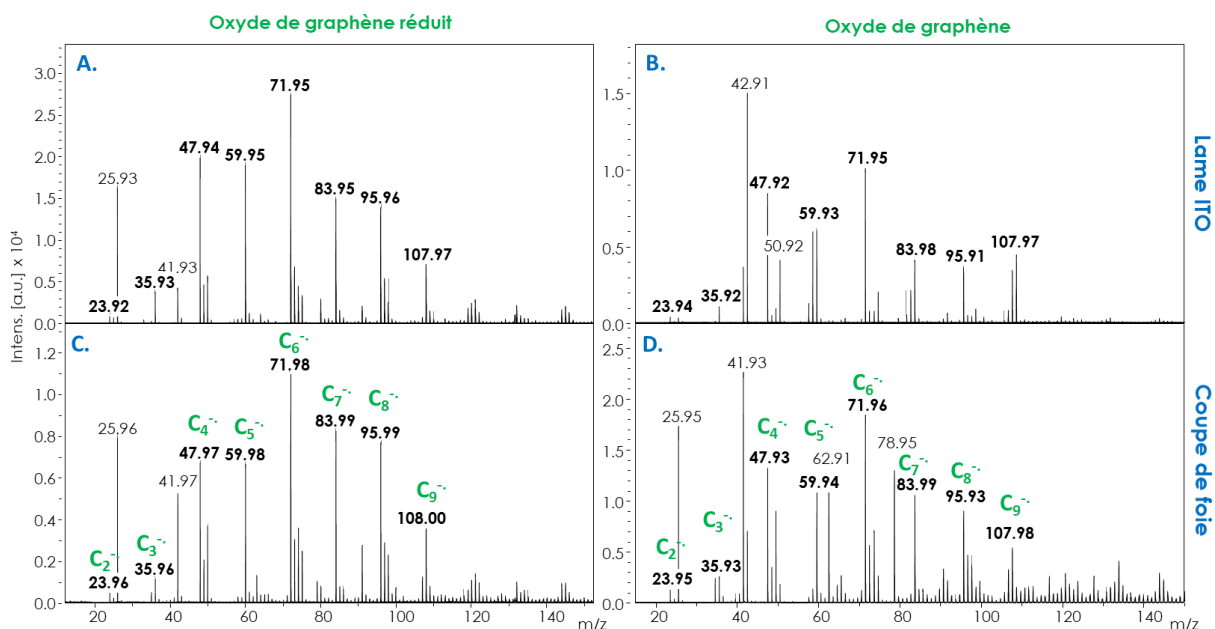
Massif	Intensités obtenues sur lame ITO (a.u.)		Intensités obtenues sur coupe de tissu (a.u.)	
	GO m/z 24 à 108	SDBS m/z 280 à 350	GO m/z 24 à 108	SDBS m/z 280 à 350
9-AA	3000	2000	800	3000
DAN	-	Interférences	-	Interférences
DHB	600	-	1500	-
HCCA	-	-	-	-
SA	3000	1,25 <sup>E4</sup>	1,5 <sup>E4</sup>	-
DHAP	3 <sup>E4</sup>	6 <sup>E4</sup>	2000	4000
THAP	3000	8000	1,5 <sup>E4</sup>	-
TCNQ	400	-	-	-
LDI	5 <sup>E4</sup>	3 <sup>E4</sup>	4 <sup>E4</sup>	-

GO (NF 52) déposé à 0,1 mg/mL avec ou sans matrice à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 50:50, v/v) sur une coupe de foie de 12 µm. Les intensités correspondent à l'ion le plus intense du massif et sont données en unité arbitraire, de l'anglais a.u., arbitrary unit.

Ces données sont donc en adéquation avec celles exposées dans le paragraphe précédent. En effet, seule la matrice DHAP sur lame ITO ou les matrices SA et THAP sur des coupes de foie permettent d'obtenir une intensité proche de la méthode LDI - MS avec des intensités respectives de 3 x 10<sup>4</sup> a.u. (de l'anglais arbitrary unit) et 1,5 x 10<sup>4</sup> a.u.. Ces intensités restent cependant inférieures à celles obtenues en LDI - MS avec 5 x 10<sup>4</sup> a.u. sur des lames ITO et 4 x 10<sup>4</sup> a.u. sur des coupes de foie. D'autre part, en LDI - MS, le dépôt du GO sur coupe de foie s'accompagne de la disparition des ions correspondant au SDBS. Cette suppression

d'ions est également observée avec les matrices SA et THAP alors qu'avec la matrice DHAP, l'intensité des ions du SDBS n'est que peu diminuée. Cette diminution ou disparition du signal SDBS est probablement due à un effet d'extinction tissulaire, la nécessité d'une matrice plus adaptée ou d'une solubilisation du SDBS dans le tissu.

Suite à l'étude des intensités des spectres GO acquis sur plaque ITO et sur tissu hépatique selon les matrices MALDI, la signature du GO et du rGO a été comparée après dépôts de solution à 0,1 mg/mL en LDI - MS afin de confirmer la répétabilité de la signature graphène. Aucune différence significative des intensités de la signature de clusters de carbone de  $C_2^-$  à  $C_9^-$  a été observée après analyse sur plaque MTP ground steel, plaque ITO et sur coupe de foie (**Figure 1.17**). Comme une importante concentration de GO ou rGO est déposée ici, l'effet d'extinction tissulaire n'est pas observé. De plus, connaissant les propriétés du GO/rGO et son utilisation comme matrice MALDI, la désorption de certaines molécules endogènes pourrait être observée sur des coupes de foie. Cependant, seuls deux ions semblent apparaître à  $m/z$  62,91 et  $m/z$  78,95 en présence de GO, ces ions pouvant correspondre à des ions phosphates de type  $PO_3^-$  et  $PO_2^-$  (**Figure 1.17, D.**) potentiellement issus de la fragmentation de molécules endogènes. Aucun ion endogène ne semble créer d'interférences avec la signature GO ou rGO dans ces basses masses (0 à 150  $m/z$ ). Ces premières données d'analyse du GO et du rGO sur coupe de tissus en LDI - MS sont donc très encourageantes pour la mise au point d'une méthode de détection des nanoparticules de graphène et l'étude de leur biodistribution en MSI.



**Figure 1.17 : Spectres de masse LDI-TOF du GO et rGO sur coupe de foie et lame ITO.**

Analyses LDI - MS des nanoparticules de type graphène. Les résultats sont obtenus après une accumulation de 1000 spectres à 2 kHz, un DIE de 10 ns et une fluence laser de 90%. Les spectres en **A.** et en **B.** représentent le rGO et le GO sur lame ITO. Les spectres en **C.** et **D.** représentent le rGO et le GO sur une coupe de foie de 12  $\mu m$  d'épaisseur.

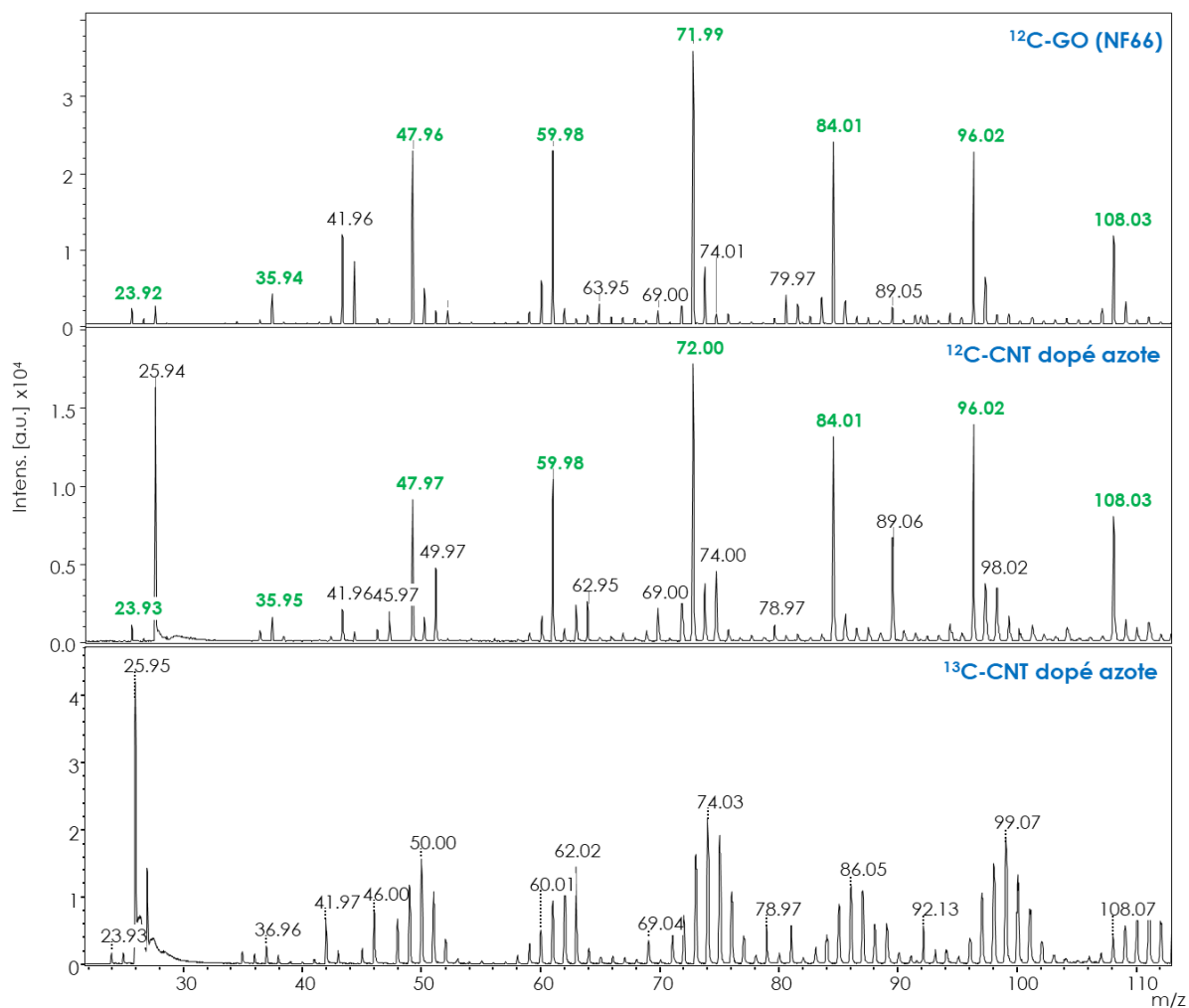
Suite aux analyses de la signature sur coupe de tissus et sur lame ITO pour les nanoparticules de GO et de rGO, le paragraphe suivant s'intéresse aux signatures obtenues à partir d'autres nanoparticules de type graphène tels que les nanotubes de carbone.

### c. Analyse de nanoparticules de type graphène azotées

Des nanoparticules de type graphène distinctes tels que des nanotubes de carbone enrichis en azote ont été analysées afin d'évaluer l'impact de ces modifications chimiques sur les profils LDI - MS. Ces nanotubes azotés ont été synthétisés à partir de carbone 12 et de carbone 13. Les échantillons ont été déposés à 0,1 mg/mL sur plaque MTP ground steel puis analysés via la même méthode LDI - MS. Les signatures des CNTs ont ensuite été comparées à celles du GO (NF 66).

Premièrement, les mêmes profils de clusters de carbone sont observés dans la gamme de masses  $m/z$  20 à 200 pour le GO NF 66 et le  $^{12}\text{C}$ -CNT dopé à l'azote (**Figure 1.18**). On retrouve ainsi les ions radicalaires de  $\text{C}_2^-$  à  $\text{C}_9^-$  avec toujours le pic le plus intense à  $m/z$  72,0. De plus, l'ion  $m/z$  26,0 est retrouvé plus intense dans la signature  $^{12}\text{C}$ -CNT dopé à l'azote que dans celle du GO. Ce pic précédemment attribué à un ion  $\text{C}_2\text{H}_2^-$  dans la signature du rGO (identique à celle du GO) correspondrait ici à un ion  $\text{CN}^-$  dans la signature du  $^{12}\text{C}$ -CNT dopés à l'azote. La différence d'intensité concernant ce pic pourrait permettre de distinguer les  $^{12}\text{C}$ -CNT dopés à l'azote du GO.





**Figure 1.18** : Comparaison de la signature LDI - MS du GO avec celles des CNTs (carbone 12 et 13) enrichis en azote.

Les résultats sont obtenus après une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz, un DIE de 10 ns et une fluence laser de 90 %. Les spectres exposent les différences de signature entre les espèces  $^{12}\text{C-GO}$ ,  $^{12}\text{C-CNT}$  et  $^{13}\text{C-CNT}$  dopés azote.

Pour chaque massif isotopique de chaque ion de la signature des  $^{12}\text{C-CNT}$  dopés à l'azote, un ion à « M+2 » est également observé. Ces ions, systématiquement détectés à une intensité plus importante que dans la signature GO, semblent donc liés à la présence d'azote dans la composition de la nanoparticule et non à la présence d'isotopes. En effet, une différence de masse de 14 est observée entre un cluster de carbone et cet ion M+2 du cluster suivant (**Figure 1.19**). Ces ions correspondraient aux ions  $^{12}\text{C}_3\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}_5\text{N}^-$  et  $^{12}\text{C}_7\text{N}^-$  spécifiques de ces nanotubes azotés.

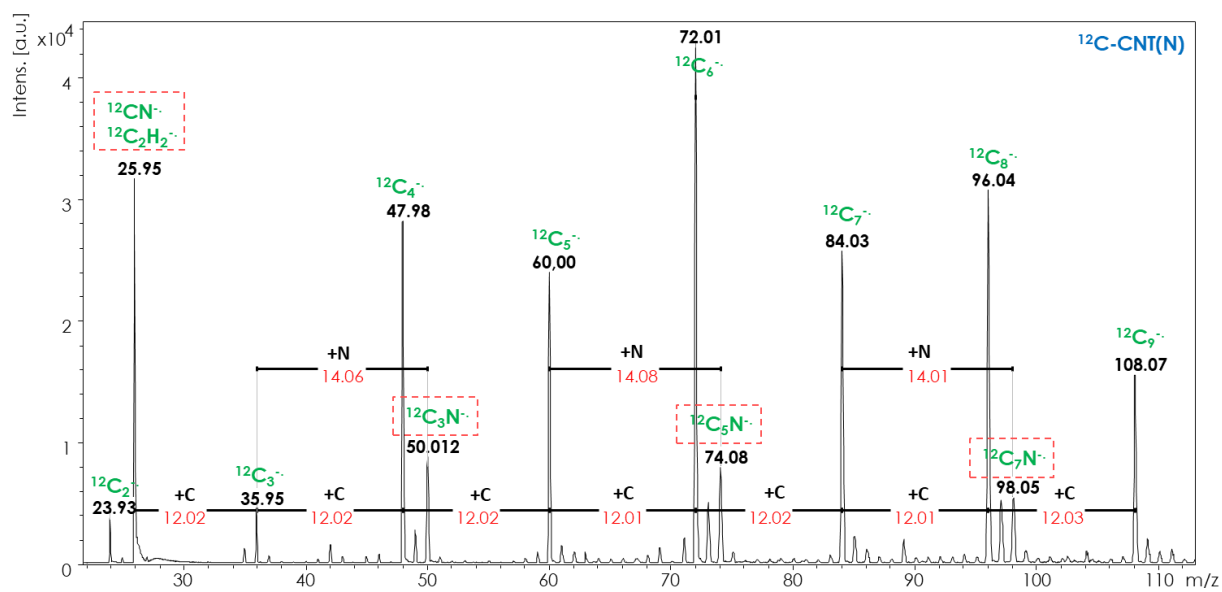


Figure 1.19 : Attribution des pics de la signature LDI - MS du  $^{12}\text{C}$ -CNT.

Les résultats sont obtenus après une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz, un DIE de 10 ns et une fluence laser de 90 %. La même signature est observée pour la signature du  $^{12}\text{C}$ -CNT dopé azote avec l'apparition des ions  $^{12}\text{C}_3\text{N}^-$ ,  $^{12}\text{C}_5\text{N}^-$  et  $^{12}\text{C}_7\text{N}^-$  spécifiques à ces nanotubes.

Ensuite, la signature des  $^{13}\text{C}$ -CNT dopés à l'azote a été comparée à celle du GO NF 66 (Figure 1.18). Avec un taux d'incorporation de deux carbones 13 pour cinq carbones 12 dans la nanoparticule, le profil observé est modifié. Ainsi, chaque ion de la signature se retrouve sous forme d'un massif reflétant la présence des  $^{13}\text{C}$ . Par exemple, l'ion  $\text{C}_6^-$  initialement détecté à  $m/z$  72,0 pour le GO, est visualisé sous la forme d'un massif dispersé autour de l'ion  $m/z$  74,08 pour les  $^{13}\text{C}$ -CNT dopés à l'azote. L'ion  $m/z$  72,01 est toujours présent mais observé en minorité par rapport aux ions  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_5^-$ ,  $^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_4^-$ ,  $^{13}\text{C}_3^{12}\text{C}_3^-$ , et  $^{13}\text{C}_4^{12}\text{C}_2^-$ . Ces ions pourraient aussi être attribués au  $^{12}\text{C}_5\text{N}^-$ ,  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_4\text{N}^-$  et  $^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_3\text{N}^-$  (Figure 1.20).

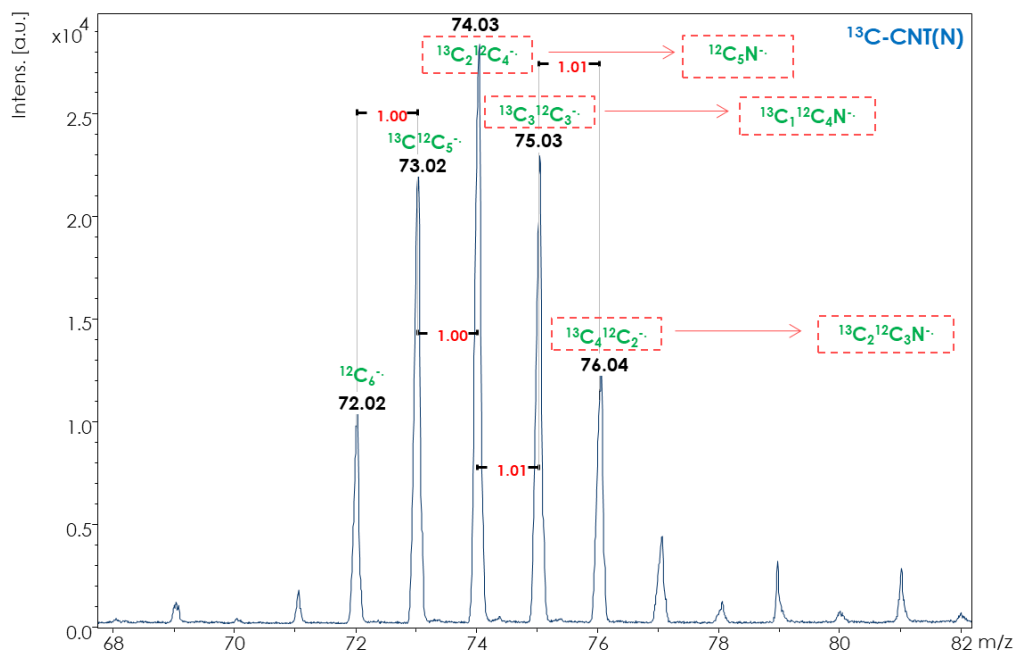


Figure 1.20 : Attribution des pics de la signature  $^{13}\text{C}$ -CNT.

Les résultats sont obtenus après une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz, un DIE de 10 ns et une fluence laser de 90 %. Pour la signature de  $^{13}\text{C}$ -CNT(N), l'ion  $m/z$  72 est toujours présent mais observé en minorité par rapport aux ions  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_5^-$ ,  $^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_4^-$ ,  $^{13}\text{C}_3^{12}\text{C}_3^-$ , et  $^{13}\text{C}_4^{12}\text{C}_2^-$ . Ces ions pourraient aussi être attribués au  $^{12}\text{C}_5\text{N}^-$ ,  $^{13}\text{C}^{12}\text{C}_4\text{N}^-$  et  $^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_3\text{N}^-$ .

Ces comparaisons indiquent donc que pour les différentes nanoparticules de type graphène étudiées, la signature de clusters de carbone semble conservée. De plus, si des hétéroatomes ou différents isotopes du carbone sont utilisés dans la synthèse de nanoparticules, des différences claires sont observées sur les profils LDI - MS permettant ainsi de les différencier sans ambiguïtés. Cette même étude a ensuite été réalisée avec des oxydes de graphène radiomarqués.

#### d. Analyse de nanoparticules $^{14}\text{C}$ -GO

Une analyse comparative a été réalisée concernant les feuillets d'oxyde de graphène radiomarqués ( $^{14}\text{C}$ -GO) ou non ( $^{12}\text{C}$ -GO). Les spectres obtenus après analyses LDI - MS sont présentés sur la **Figure 1.21**. De nouveau, la signature des clusters de carbone est retrouvée de  $\text{C}_2^-$  à  $\text{C}_9^-$  avec le pic le plus intense à  $m/z$  71,99 pour le  $^{14}\text{C}$ -GO. Seule une légère augmentation de la proportion du  $^{14}\text{C}$  est observée en raison du faible taux d'incorporation du  $^{14}\text{C}$  qui n'est dans ce cas « que » d'un  $^{14}\text{C}$  pour 15  $^{12}\text{C}$ . Ce changement dans la composition de la nanoparticule n'engendre donc pas de modification de la signature des feuillets d'oxyde de graphène. Les profils LDI - MS des GO radiomarqué et non marqué sont donc très similaires. Ainsi, les analyses réalisées au  $\beta$ -imager pourront également être réalisées en MSI sans différence au niveau des ions détectés.

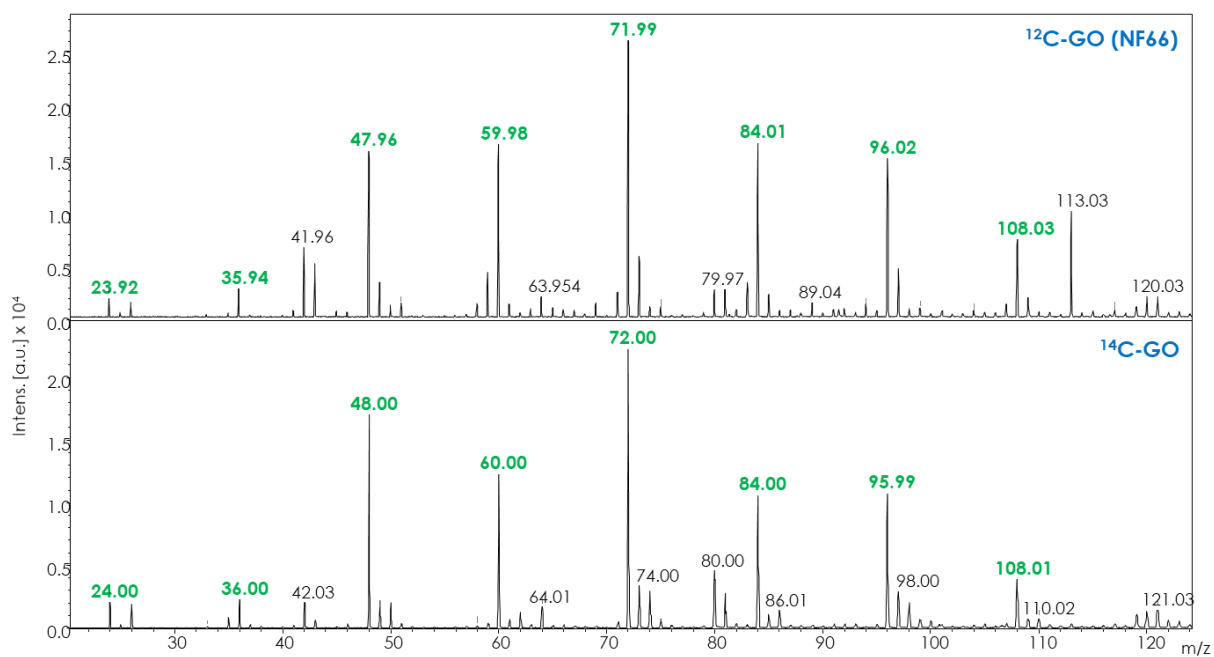


Figure 1.21 : Spectres de masse LDI - MS du GO marqué et non marqué au carbone 14.

Les résultats sont obtenus après une accumulation de 4000 tirs par spectre à 2 kHz, un DIE de 10 ns et une fluence laser de 90 %. Aucune différence n'est observée entre la signature <sup>12</sup>C-GO et <sup>14</sup>C-GO.

Les résultats obtenus dans ce paragraphe ont permis de souligner la grande stabilité des signatures LDI - MS pour différentes nanoparticules dérivées du graphène. Les feuillets de GO ou de rGO et les nanotubes composés uniquement de carbone possèdent le même profil MS avec des ions attribuables à des clusters de carbones allant de C<sub>2</sub><sup>-</sup> à C<sub>9</sub><sup>-</sup>. C'est donc sur la base de cette signature que les développements analytiques ont été effectués pour la réalisation d'images par spectrométrie de masse de nanoparticules de graphène marquées ou non.

### III. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE D'IMAGERIE MS

Dans un premier temps, certains paramètres instrumentaux du MALDI - TOF/TOF ont été évalués comme prérequis à l'obtention d'images de qualité. Ensuite, la méthode LDI - MS a été transposée à la MSI en tenant compte de ces paramètres pour finalement être appliquée aux études préliminaires de détection du GO chez la souris exposée.

#### 1. OPTIMISATION DES PARAMETRES INSTRUMENTAUX

L'Ultraflex™ présenté en Annexe 3 et utilisé dans ce projet offre plusieurs possibilités quant à la focalisation du laser ainsi que les mouvements de celui-ci. Le premier élément permet d'optimiser la résolution latérale et la puissance du laser afin d'avoir une sensibilité optimale pour le composé cible. C'est

donc ce paramètre qui est évalué dans le paragraphe suivant. Pour cela, le diamètre ou la surface des impacts laser à trois focalisations différentes a été étudiée afin d'évaluer la taille des impacts laser et leurs effets sur la sensibilité de détection du GO et afin de pouvoir régler le pas du laser lors des expériences de MSI.

### a. Etude des paramètres du laser

Premièrement, l'évaluation de la taille des impacts laser correspondant aux focalisations appelées « medium », « small » et « minimum » a été entreprise (Annexe 3). Ces focalisations sont celles conseillées par le fournisseur Bruker pour l'acquisition d'images en spectrométrie de masse. Pour faciliter la visualisation des impacts laser, la matrice HCCA a été déposée sur lame ITO à l'aide d'un aérographe. La fluence du laser a été fixée à 90 % avec une accumulation de 1000 tirs par spectre pour une vitesse d'acquisition fixée à 2 kHz afin de s'assurer d'une ablation suffisante de la matrice nécessaire à l'estimation de la largeur de l'impact laser. Ces paramètres sont également ceux appliqués pour la détection de nanoparticules de GO par LDI - MSI. Différentes conditions ont donc été expérimentées avec ces paramètres (Figure 1.22) :

- Quatre pas de laser de 25, 50, 75, et 100  $\mu\text{m}$  pour la focalisation « medium »,
- Trois pas de laser de 10, 25 et 50  $\mu\text{m}$  pour la focalisation « small »,
- Et deux pas de laser de 10 et 25  $\mu\text{m}$  pour la focalisation « minimum ».

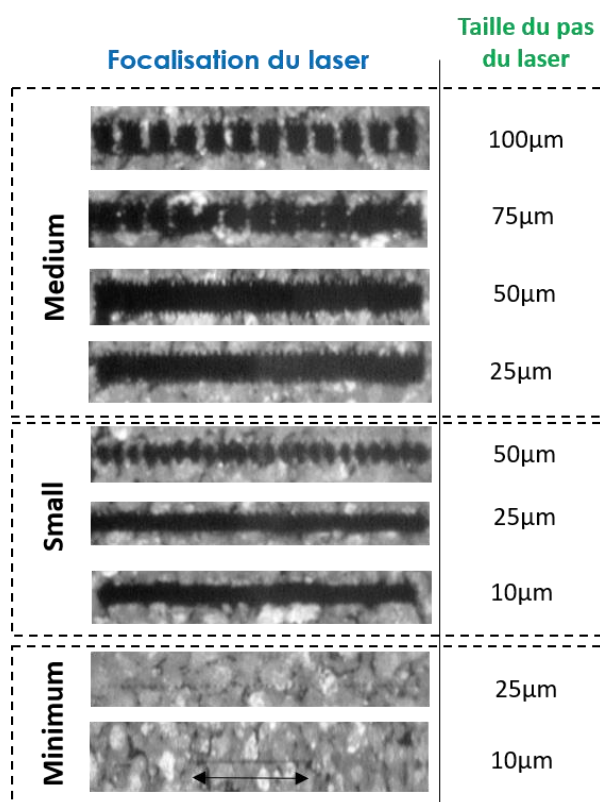


Figure 1.22 : Allure des impacts laser pour l'Ultraflex™ à différentes focalisations.

Evaluation de la taille des impacts laser avec les focalisations « medium », « small » et « minimum » dans la matrice HCCA déposé à l'aide d'un aérographe.

Grâce à ces expériences, la largeur du laser pour chaque focalisation a pu être estimée. Pour les focalisations « medium » et « small », un chevauchement des impacts est observé avec des pas respectifs supérieurs à 50  $\mu\text{m}$  et 25  $\mu\text{m}$ . Une résolution latérale du laser a donc été estimée à 70  $\mu\text{m}$  pour la focalisation « medium » et à 40  $\mu\text{m}$  pour la focalisation « small ». En effet, l'absence complète de matrice après impact avec des pas de 25 et 50  $\mu\text{m}$  en « medium » et de 25 et 50  $\mu\text{m}$  en « small » indique que la totalité de l'échantillon est désorbée dans ces cas, contrairement aux impacts réalisés à 75 et 100  $\mu\text{m}$  en « medium » et à 50  $\mu\text{m}$  en « small ». Ce facteur est important à prendre en compte pour le phénomène

d'« oversampling », où un chevauchement trop grand des impacts peut engendrer une baisse de la sensibilité de détection pour molécule donnée malgré une résolution spatiale plus élevée. La largeur latérale de l'impact laser consécutivement à une focalisation minimum n'a pas pu être estimée avec suffisamment de précision par simple visualisation. L'effet du pas du laser sur la résolution de l'image a ensuite été évalué en analysant une coupe d'hémisphère de cerveau avec des pas de 35, 52 et 70  $\mu\text{m}$  avec la focalisation laser « medium ». Ces pas correspondent soit à la totalité, au tiers ou à la moitié de la largeur estimée de l'impact laser avec une focalisation « medium ». La diminution du pas du laser a clairement montré une amélioration de la résolution spatiale de l'image moléculaire d'une phosphatidylcholine (Figure 1.23) et plus particulièrement au niveau du striatum sans engendrer une perte de sensibilité.

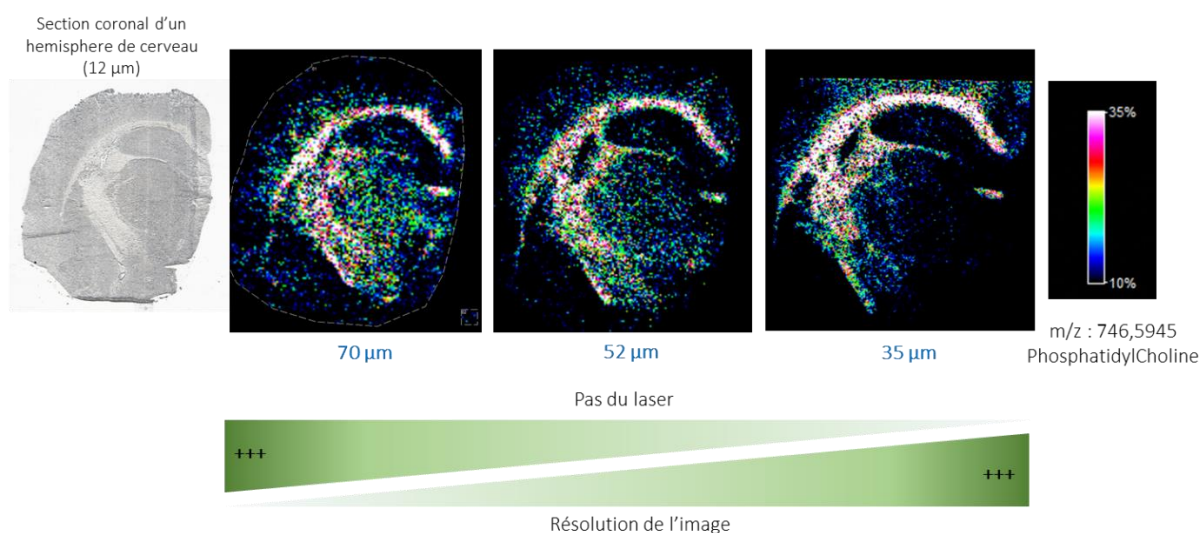


Figure 1.23 : Exemple de l'apport de la résolution pour la biodistribution de molécules.

Imagerie par spectrométrie de masse d'une coupe transversale de cerveau de souris analysée avec la matrice DHB (40 mg/mL dans EtOH/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 70:30, v/v). L'acquisition a été réalisée avec une focalisation « medium » et un pas laser croissant. L'image moléculaire a été représentée à partir de l'ion  $m/z$  746,59 correspondant à une phosphatidylcholine.

Une fois ces paramètres caractérisés, les focalisations « medium », « small » et « minimum » ont été appliquées à l'analyse de tissus issus de souris exposées au GO ou au rGO via différentes voies d'administration.

### b. Application à l'analyse du GO

Afin d'optimiser la méthode d'imagerie des GO et rGO, plusieurs paramètres laser ont été évalués sur coupes de poumons issus d'une souris exposée à 4  $\mu\text{g}$  de <sup>14</sup>C-rGO par instillation. Pour cela, trois résolutions spatiales ont été évaluées en utilisant les trois résolutions latérales décrites précédemment avec (« randomwalk ») ou sans mouvements aléatoire du laser au sein du « raster » (Figure 1.24). Premièrement, les résolutions spatiales 25, 50 et 75  $\mu\text{m}$  ont été utilisées avec une focalisation laser « medium » sans

mouvements aléatoires. Suite à ces acquisitions, la comparaison des spectres moyens obtenus sur des régions d'intérêt similaires montre que la diminution du pas du laser n'a pas induit de diminution drastique de la sensibilité de détection. Ainsi, dans le but d'obtenir une biodistribution plus précise du GO au sein d'organes, le pas du laser a donc été fixé à 25  $\mu\text{m}$  (**Figure 1.24, A.**). Ensuite, différentes focalisations du laser : « medium », « small » et « minimum » ont été utilisées avec cette résolution spatiale de 25  $\mu\text{m}$  avec et sans mouvement laser. Cette fois-ci les résultats ont montré qu'une augmentation de la focalisation laser et donc une diminution de la résolution latérale du laser entraîne une baisse du signal moyen par région d'intérêt. De plus, sans mouvement laser et avec la focalisation laser « minimum », le signal moyen se retrouve diminué de moitié comparativement aux signaux moyens obtenus en condition de focalisation du laser « small » et « medium ». En comparant ensuite ces deux dernières conditions, la focalisation du laser en « medium » a induit un rapport signal sur bruit plus élevé qu'avec la focalisation « small » (**Figure 1.24, B.**). Cependant, la résolution latérale du laser en « medium » étant de 70  $\mu\text{m}$ , elle s'accompagne d'un phénomène d'« oversampling ». Cette notion de chevauchement des impacts laser et son impact sur la résolution spatiale sont assez controversés dans la littérature. En effet, J. C. Jurchen *et al.*, 2005 [277] ont proposé l'utilisation d'un pas de laser plus petit que la résolution du laser afin de gagner en résolution spatiale alors que A. D. Feenstra *et al.*, 2017 [122] ont cherché quant à eux à diminuer la résolution latérale du faisceau laser afin d'éviter ces phénomènes d'oversampling et éviter une perte de sensibilité. Cette perte de sensibilité via l'application d'un pas plus petit que la largeur du laser a également été observée par M. Nazari et D. C. Muddiman en 2015 [278] avec une source IR-MALDESI où l'analyse du cholestérol dans des conditions d'« oversampling » a diminué par deux le rapport signal sur bruit retrouvé. Ce phénomène peut être lié à un épuisement du signal ou du matériel inhérent à l'analyse répétée d'une même région. En ce qui concerne l'étude du GO, ce phénomène de chevauchement a été limité afin d'éviter une perte de sensibilité trop importante. De ce fait, les focalisations laser « small » et « minimum » ont été sélectionnées pour évaluer l'effet du mouvement laser en aléatoire (randomwalk). La « randomisation » du mouvement du laser a permis d'augmenter la sensibilité de détection avec ces focalisations « small » et « minimum ». Cependant, la focalisation « minimum » engendre un rapport signal sur bruit trop important pour détecter correctement la signature GO sur coupe de poumons provenant de souris exposées par intraveineuse (**Figure 1.24, C.**).

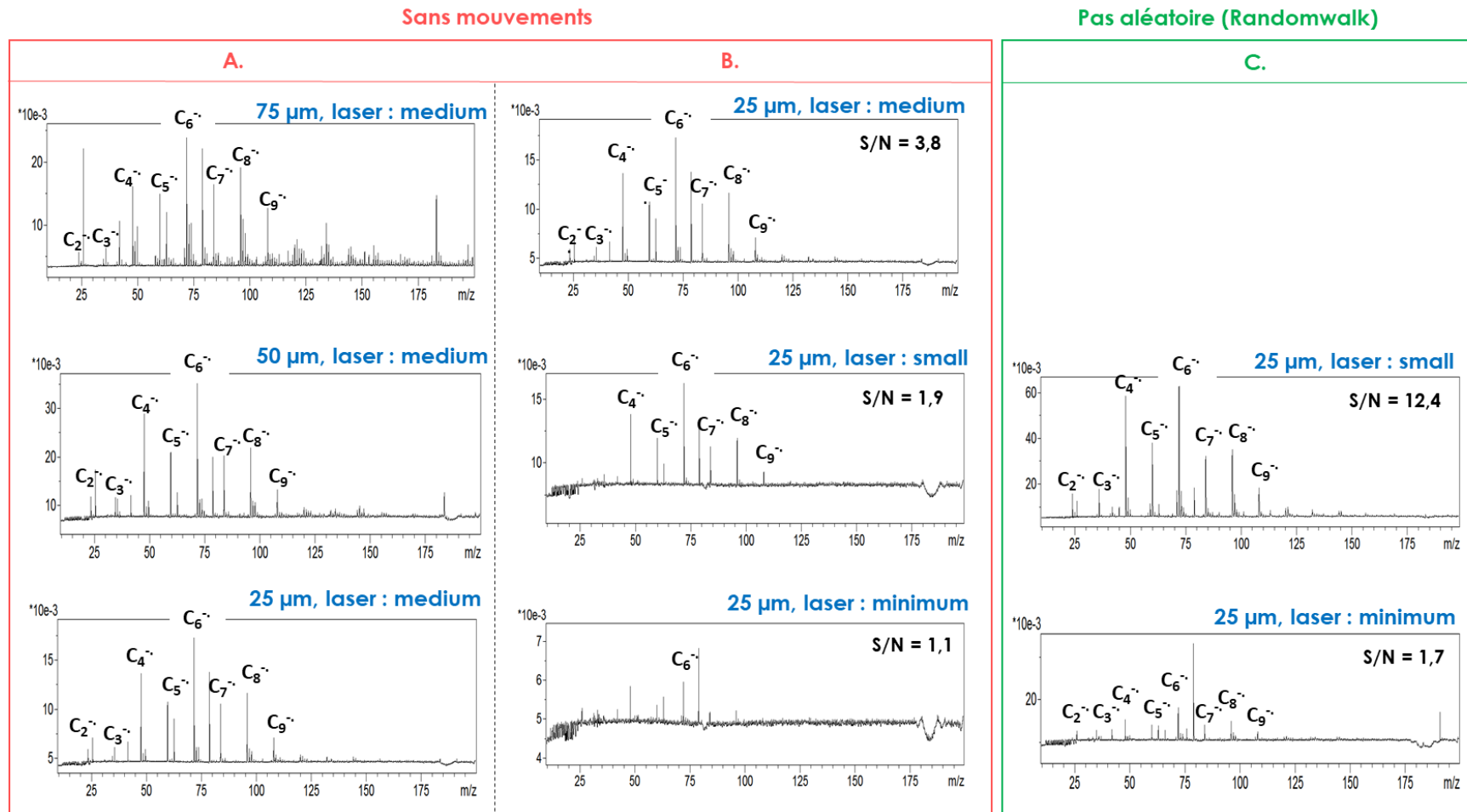


Figure 1.24 : Spectres de masse LDI - MS du rGO selon les conditions de paramétrage du laser.

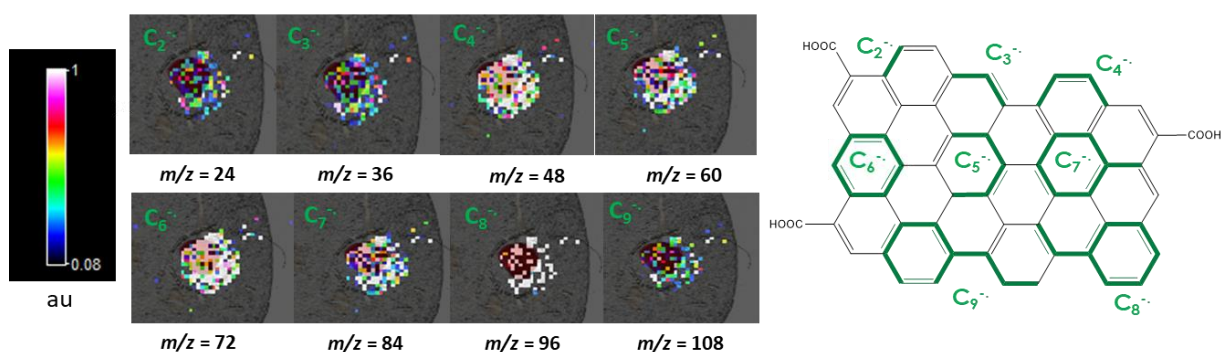
Spectres du rGO acquis sur des coupes de poumon d'une épaisseur de 12 μm avec les focalisations laser « medium », « small » et « minimum », à une résolution spatiale de 25, 50 ou 75 μm avec et sans mouvements laser. **A.** Effet de la résolution spatiale sur la signature GO en focalisation « médium ». **B.** Effet de la focalisation laser sur la signature GO à 25 μm de résolution spatiale. **C.** Effet du mouvement du laser sur la détection du GO à une résolution de 25 μm avec les focalisations « small » et « minimum ». Les signaux sur bruit correspondent à ceux de l'ion  $m/z$  72 et sont calculés manuellement sur le logiciel FlexImaging 4.1 à partir des spectres moyens obtenus sur la zone du poumon acquise. Les ROIs sont de tailles similaires.



À la suite de ces tests de résolution et de focalisation, le laser a été réglé en focalisation « small » avec un mouvement aléatoire et un pas de 100  $\mu\text{m}$  pour la mise au point de la méthode MSI, pour la détection du GO et les études de quantification. Un pas de 25  $\mu\text{m}$  a été sélectionné pour la détection du GO et rGO sur tissus afin d'obtenir une résolution spatiale supérieure. Cette méthode sera utilisée dans la suite de ce manuscrit pour l'étude de la biodistribution du GO au sein d'organes issus de souris exposés.

## 2. DEVELOPPEMENTS DE LA METHODE LDI - MS POUR LA DETECTION DU GOI

Après une meilleure définition des paramètres du laser, la transposition de la méthode LDI - MS vers des acquisitions en MSI a été réalisée de façon préliminaire grâce à un dépôt de GO à 0,1 mg/mL sur une coupe de foie à 12  $\mu\text{m}$ . Ce dépôt a ensuite été acquis à une résolution spatiale de 100  $\mu\text{m}$ , avec une focalisation latérale « medium » du laser et 1000 spectres accumulés par position. Grâce au logiciel FlexImaging 4.1, chaque ion de la signature carbonée du GO a été représenté (**Figure 1.25**) afin de déterminer la meilleure stratégie de visualisation du GO en MSI. L'ion  $\text{C}_6^-$  ( $m/z$  72) dont l'image moléculaire est la plus intense sur tissu parmi les neuf clusters de carbones radicalaires, a été sélectionné pour représenter la biodistribution du GO en MSI. La somme des intensités des neuf ions de la signature a également été expérimentée et effectuée à l'aide d'un script R. Ce procédé a permis d'améliorer le rapport signal sur bruit de la signature GO globale mais l'addition des signaux aux différentes masses pour un dépôt contrôlé contenant uniquement le tensioactif entraîne cependant une augmentation significative du bruit de fond. Cette façon de procéder n'a donc pas été poursuivie.



**Figure 1.25 : Représentation individuelle des ions appartenant à la signature GO.**

L'analyse LDI - MSI a été effectuée sur tissu hépatique après dépôt du GO à 0,1 mg/mL. Les images représentent tous les ions carbonés de la signature GO à une résolution spatiale de 100  $\mu\text{m}$ . L'image a été acquise avec une accumulation à 2 kHz de 1000 tirs par spectre et donc par pixel avec un DIE de 10 ns, une focalisation du laser en « small » et une fluence laser à 90 %.

Ensuite, cette même solution de GO à 0,1 mg/mL a été déposée en triplicatas sur une coupe de foie de 12  $\mu\text{m}$  qui a été analysée entièrement et dans les mêmes conditions. En utilisant l'image moléculaire du

cluster de carbone radicalaire  $C_6^-$ , le GO n'a été visualisé que dans les 3 zones de dépôts sur tissus et sur le dépôt réalisé sur la lame ITO, démontrant ainsi la spécificité de détection de l'approche LDI - MS (Figure 1.26, B). En comparant les intensités moyennes au sein des dépôts sur tissus et sur lame ITO, une baisse du signal est observée sur coupe de foie indiquant un effet d'extinction tissulaire d'un facteur deux à trois (Figure 1.26, A). Cependant, cette diminution n'entrave pas la bonne détection du GO avec une intensité de 5000 a.u. pour l'ion à  $m/z$  72 sur coupe hépatique. De plus, aucune interférence de molécules endogènes n'a été observée en dehors et au sein des dépôts de GO en analyse LDI - MS en dehors des deux ions précédemment évoqués à  $m/z$  62,91 et  $m/z$  78,95 provenant vraisemblablement de la fragmentation de molécules endogènes contenant un groupement phosphate (e.g. phospholipides membranaires). Là encore, la désorption d'ions endogènes aurait été attendue en raison des propriétés du GO qui en font une matrice MALDI efficace pour les molécules de faibles masses moléculaires [48]. Cependant, dans la littérature, les nanoparticules de graphène utilisées comme matrice sont caractérisées par des tailles de l'ordre du micron [49] [77] et possèdent donc une plus grande surface que les celles utilisées dans cette étude, qui sont de l'ordre de 100 nanomètre. Ainsi, la surface spécifique des nanoparticules synthétisées au SCBM pourrait être insuffisante pour une propagation efficace de l'énergie du laser qui permet le processus de désorption/ionisation.

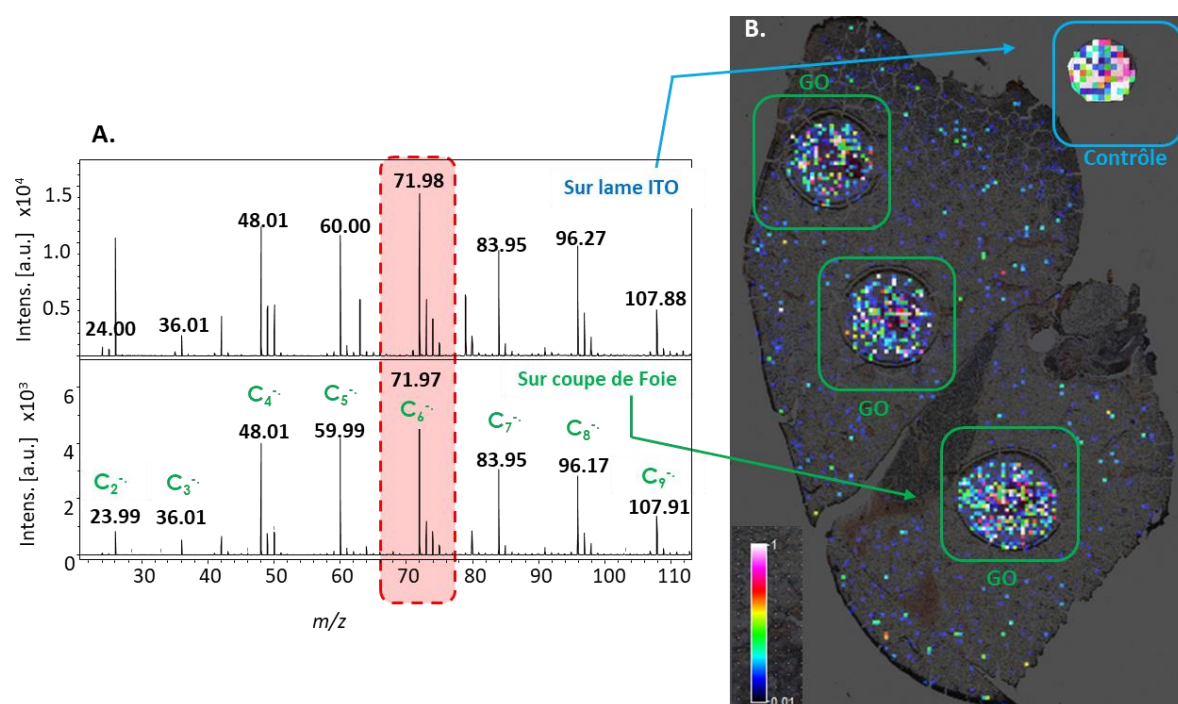


Figure 1.26 : Spectre de masse et image LDI - MS de l'oxyde de graphène en dépôt.

A. Comparaison de la signature de l'oxyde de graphène sur la lame ITO et sur coupe de tissu hépatique : des clusters de carbone ont été observés sur les deux supports de  $C_2^-$  à  $C_9^-$  avec un ion majoritaire à  $m/z$  72 :  $C_6^-$ . B. Imagerie par spectrométrie de masse de l'ion  $m/z$  72 GO sur coupe de foie. La signature GO n'a été trouvée que dans les zones de dépôts acquises à 100  $\mu$ m. L'image a été acquise avec une accumulation de 1000 spectres par pixel à 2 kHz avec une DIE de 10 ns, une focalisation du laser en « small » et une fluence laser de 90 %.

Cette étape du développement analytique a permis de transposer la méthode LDI - MS vers une méthode LDI - MSI pour la détection de feuillets d'oxyde de graphène. Les optimisations présentées ont eu pour objectif d'améliorer la résolution spatiale des images sans perdre en sensibilité afin d'obtenir *in fine* des biodistributions du GO au sein de tissus provenant de souris exposées à ces nanoparticules. De plus, l'évaluation des performances quantitatives de l'approche LDI - MSI (e.g. linéarité, sensibilité) a également été réalisée en se basant à la fois sur des gammes effectuées en tissus mimétiques et sur des gammes en dépôts sur tissus.

#### IV. ÉVALUATION DES PERFORMANCES QUANTITATIVES DE LA METHODE LDI - MSI

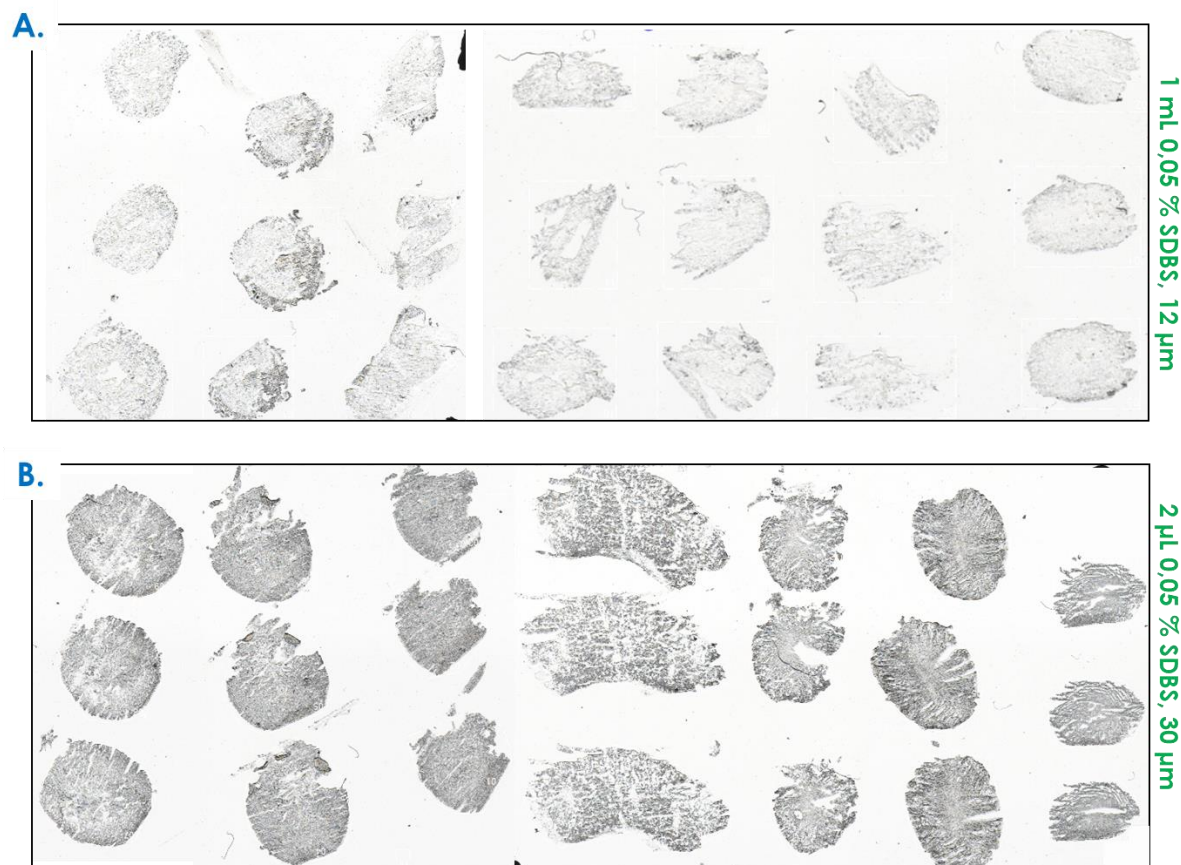
Dans le but d'évaluer les capacités quantitatives de notre méthode LDI - MSI pour les nanoparticules de graphène, différents protocoles de quantification couramment utilisés en imagerie par spectrométrie de masse ont été expérimentés. Premièrement, des gammes de dilution en tissus mimétiques ont été réalisées à partir de la solution de GO NG65/68 et de la solution marquée précédemment caractérisée par MET. Ensuite, des gammes de dilution sériée ont été réalisées à partir de cette même solution non marquée et déposées sur tissus. Les coefficients de variation ont été déterminés afin d'estimer la répétabilité et la reproductibilité de ces gammes.

##### 1. EVALUATION DE GAMMES DE CONCENTRATION REALISEES EN HOMOGENATS OU EN DEPOTS

Des homogénats de foie ont servi pour la réalisation de gammes en sept points à partir de GO non marqué avec des concentrations finales de 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 et 50 µg/mL. Par ailleurs, les homogénats de poumons ont servi à réaliser des gammes avec la solution de GO marquée 50/50 <sup>12</sup>C/<sup>14</sup>C avec des concentrations finales de 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 µg/mL. Des échantillons blancs ont été obtenus avec une solution de SDBS à 0,05 %.

Dans le but d'obtenir des tissus mimétiques homogènes, plusieurs protocoles ont été expérimentés. Ces optimisations ont tout d'abord été réalisées pour des homogénats de foie. Premièrement, 20 % de la masse du tissu a été ajoutée en solution aqueuse à 0,05 % de SDBS avant l'homogénéisation au Precellys Evolution® (Bertin Instruments, France) [228]. Cette quantité de tensioactif s'est avérée trop faible car l'homogénat obtenu était trop visqueux pour être prélevé à la pipette. De ce fait, la quantité de solvant aqueux à 0,05 % de SDBS a été augmentée à 1 mL pour 200 mg de tissus. Cette fois-ci, la proportion d'eau était beaucoup trop importante car engendrant la formation de cristaux lors de la congélation et entraînant également un démoulage difficile de l'homogénat. De plus, la découpe de ces cylindres à 12 µm a clairement montré une hétérogénéité et un manque de reproductibilité des homogénats (**Figure 1.27**). Finalement, la proportion d'eau contenant 0,05 % de SDBS a été fixée à 2 µL pour 200 mg de tissu afin d'obtenir des tissus

mimétiques homogènes [260]. Cependant, la découpe a été réalisée à 30  $\mu\text{m}$  en raison du très petit diamètre des cylindres obtenus.



**Figure 1.27 : Coupes des tissus mimétiques selon les conditions.**

Gammes de calibration en homogénats réalisées avec 1 mL (A.) ou 2  $\mu\text{L}$  (B.) de SDBS à 0,05 % par tube Precellys contenant 200 mg de tissus. Les coupes ont été réalisées à 12  $\mu\text{m}$  ou 30  $\mu\text{m}$  respectivement.

Après optimisation des conditions d'homogénéisation des tissus hépatiques, ce protocole a été transposé et modifié de nouveau pour la création d'homogénats de poumons. L'ajout de solution a été réduit à 1  $\mu\text{L}$  de solution de SDBS à 0,05 % pour 200 mg de tissu pulmonaire. En effet selon la composition des tissus homogénéisés, les conditions du protocole ont dû être spécifiquement optimisées, ce qui souligne la difficulté de réalisation de cette approche basée sur des homogénats.

Après homogénéisation des tissus pulmonaires et hépatiques, des suspensions de GO ont été incorporées à des concentrations respectives allant de 2,5 à 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  et 1 à 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . La gamme en homogénats de foie a été réalisée à partir de la solution  $^{12}\text{C}$ -GO NF65/68 alors que celle en poumons a été réalisée à partir de la solution 50/50  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -GO. Les homogénats obtenus ont ensuite été coupés à 30  $\mu\text{m}$  puis déposés sur lame ITO en triplicatas pour être analysés par LDI - MSI. Les images ont été obtenues en représentant l'ion à  $m/z$  72. Les différences d'intensité retrouvées entre les homogénats de poumons et de

foies pourraient être expliquées par un effet matrice différent mais il est important de noter ici que les intensités retrouvées dans les homogénats de foies et de poumons ne sont néanmoins pas directement comparables car un changement de laser et de détecteur a eu lieu entre les deux acquisitions. Cependant, les coefficients de variation indiqués dans le **Tableau 1.8** sont en majorité en dessous de 30 % sauf l'homogénat contrôle de poumons et l'homogénat de foie à 1 ng/μL. Des vérifications ont été entreprises pour le point contrôle à 0 ng/μL de GO dans les homogénats de poumons. Cette interférence n'a plus été observée dans les analyses suivantes.

**Tableau 1.8 : Variabilité de l'intensité de l'ion  $m/z$  72 retrouvée au sein des tissus mimétiques.**

	ng/μL	Moyenne	Ecart-type	CV%
Poumon	Ctrl	0,549*	0,317	57,8
	2,5	0,223	0,027	12,1
	5	0,313	0,036	11,4
	10	0,461	0,140	30,4
	25	0,449	0,014	3,2
	50	1,013	0,055	5,5
	100	2,097	0,247	11,8
Foie	Ctrl	0,010	0,001	11,1
	1	0,014	0,006	44,0
	2,5	0,020	0,006	29,9
	5	0,041	0,004	9,2
	10	0,065	0,001	1,0
	25	0,148	0,024	16,4
	50	0,150	0,010	6,4

Les moyennes et coefficients de variation (CV %) ont été réalisés pour une même concentration à partir de l'intensité moyenne obtenue par coupe d'homogénat pour l'ion  $m/z$  72. (\*) Des vérifications ont été entreprises pour le point contrôle à 0 ng/μL de GO dans les homogénats de poumons. Cette interférence n'a plus été observée dans les analyses suivantes.

Les valeurs a ensuite été effectuée sur les triplicatas de chaque concentration. Les droites de régression linéaire ont montré de meilleurs résultats pour les homogénats de foie et de poumon lorsqu'elles sont réalisées à partir des moyennes et non des sommes des intensités de l'ion  $m/z$  72 au sein d'une coupe. Si on prend pour exemple la **Figure 1.28, A.**, le point D possède une surface d'analyse plus grande et la somme des intensités trouvées en chaque position de l'image est plus élevée que pour les autres points de la gamme. Via cette méthode, la courbe possède un  $R^2$  de 0,773. Si la moyenne des intensités est réalisée, le  $R^2$  passe à 0,999 et ainsi les différences surfaces des dépôts semblent efficacement pondérées. Cette amélioration est également observée à partir des homogénats de poumons mais de façon plus nuancée (**Figure 1.28, B.**).

En comparaison, S. Chen *et al.*, 2015 ont obtenu 4,2 % de variation lors de leur étude sur 7 coupes successives d'homogénat de foie avec des CNTs. Nos résultats pourraient être liés à une plus grande hétérogénéité des suspensions utilisées ainsi qu'à une dispersion du GO non homogène au sein des homogénats (potentiellement en lien avec une certaine agrégation des nanoparticules). Ces différents aspects soulignent la difficulté de réaliser des mesures quantitatives dans ces conditions via des homogénats. La congélation des homogénats pendant une nuit à  $-80^{\circ}\text{C}$  a également pu entraîner une certaine hétérogénéité au niveau du tissu, comme semblent indiquer les cristaux visibles sur les scans optiques de la **Figure 1.27.**

La linéarité des courbes obtenues à partir de la gamme de dilution a été étudiée en comparant les résultats obtenus à partir des sommes ou des moyennes au sein d'un dépôt. La moyenne de ces

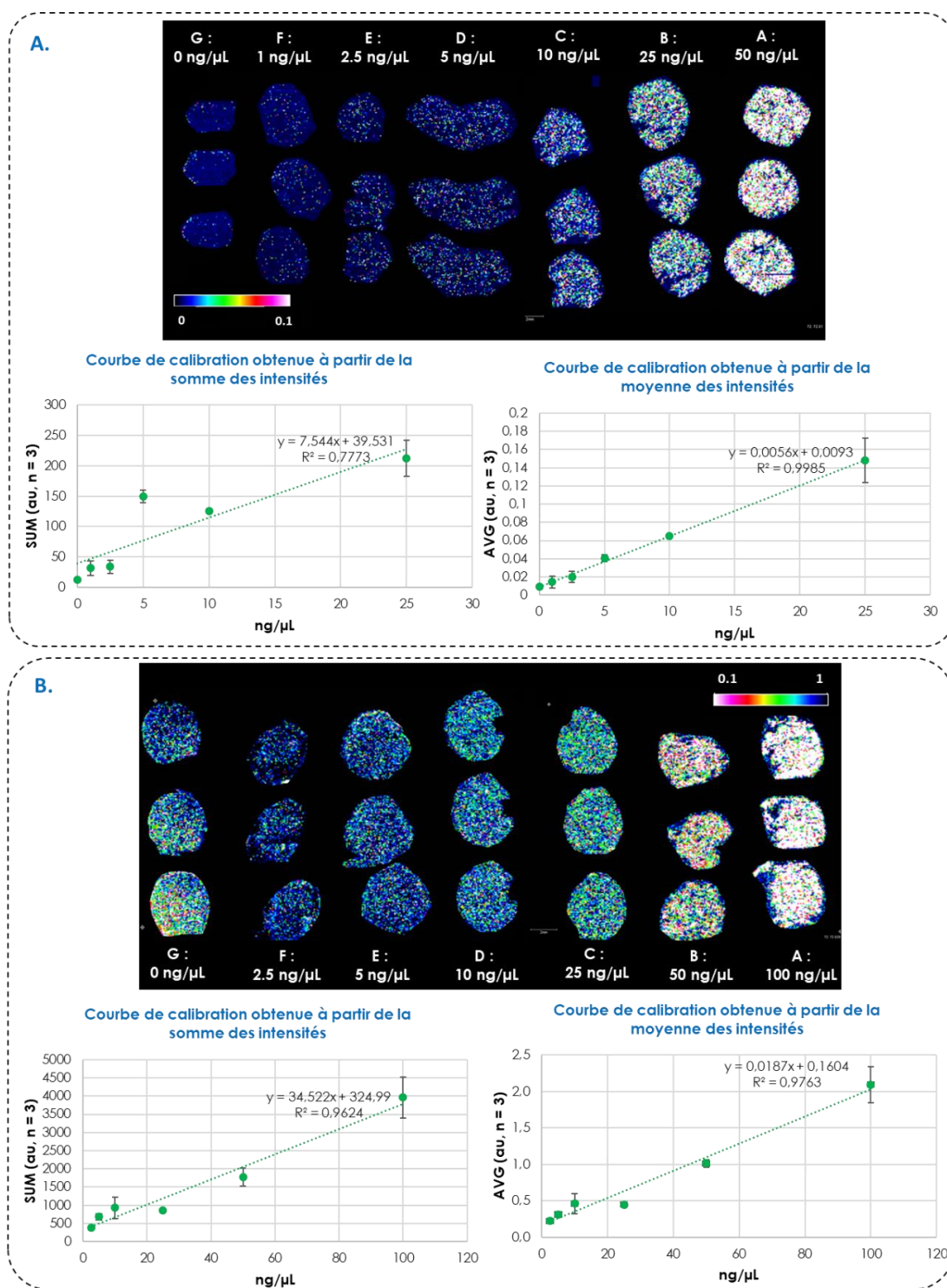


Figure 1.28 : Courbe de calibration en homogénats de foies et de poumons.

Images LDI - MSI des homogénats de foie (A.) ou de poumons (B.) d'une épaisseur de 30 μm acquis à une résolution spatiale de 100 μm. Les gammes de calibration sont calculées à partir de la somme ou des moyennes de l'intensité par pixel au sein d'un homogénat obtenu à partir de l'ion  $m/z$  72. Cette intensité est ensuite moyennée par triplicata et représentée en fonction de ng/μL de GO ajouté.

Cette technique de réalisation de courbes de calibration a également été comparée à celle réalisée en dépôts. Pour cela, les gammes de GO déposées directement sur coupes de poumons ou de GO incorporé

aux tissus mimétiques pulmonaires ont été analysées par LDI - MSI. Un fichier FlexImaging contenant des ROIs identiques a donc été chargé cinq fois de suite afin d'analyser exactement la même zone de l'échantillon. Après comparaison des intensités enregistrées au cours de 5 acquisitions successives, une diminution significative du signal, synonyme d'un épuisement progressif du matériel présent, est observée pour les trois concentrations de GO déposées sur coupes de poumons. En effet, plus de la moitié de l'intensité du GO est perdue après une seule acquisition pour les trois concentrations du GO en dépôts. Dans le tissu mimétique, la diminution du signal au cours des cinq analyses est inférieure à 40 % contrairement aux dépôts réalisés en surface directement sur coupes de poumons (Figure 1.29). Cette expérience semble souligner une très faible efficacité de pénétration du GO dans le tissu lorsqu'il est ajouté en surface sur le tissu pulmonaire et donc un épuisement rapide des quantités déposées. Parallèlement, une plus grande homogénéité des tissus mimétiques a été montrée ici, confirmant l'intérêt des tissus mimétiques plus proches des sections de tissus obtenues à partir des organes d'intérêt.

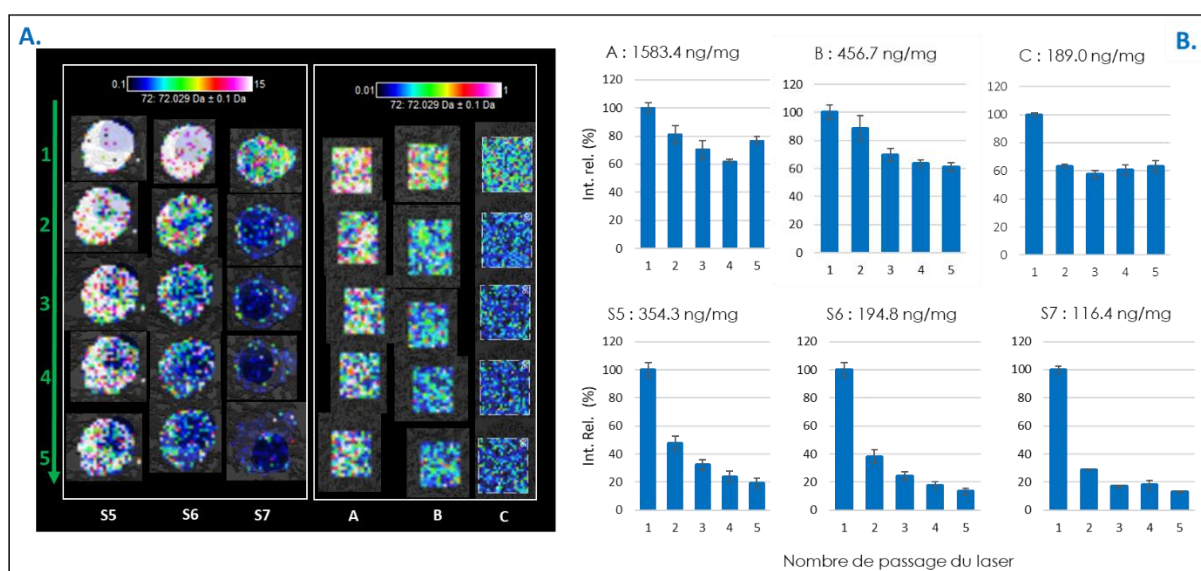


Figure 1.29 : Evaluation de l'épuisement des dépôts de GO et des homogénats.

Images LDI - MSI de 3 concentrations de GO en dépôt ou en tissu mimétique (de droite à gauche). **A.** Représentation des images selon le nombre d'acquisition (1 à 5, de haut en bas) de la même région analysée. **B.** Représentation de l'intensité relative de l'ion  $m/z$  72 par rapport à l'intensité de la première acquisition.

Bien que les gammes réalisées en tissus mimétiques soient plus proches des coupes de tissus et qu'elles présentent une linéarité satisfaisante, elles impliquent cependant de nombreuses étapes de préparation et nécessitent des quantités importantes d'organes « contrôles » et de molécule cible pour leur préparation. Pour cette raison, la faisabilité de réalisation de gammes de dilution linéaire en dépôts sur coupe de tissu a été évaluée plus en détails dans le cadre de l'évaluation des capacités quantitatives de la MSI pour des nanoparticules d'oxyde de graphène. De plus, même si de récentes études ont montré l'efficacité de l'utilisation de gamme en homogénats pour la quantification en MSI [226] [234], les gammes en dépôts restent cependant les plus utilisées à ce jour dans la littérature.

## 2. GAMMES DE CONCENTRATIONS EN DEPOTS DIRECTS SUR COUPES TISSULAIRES

Pour évaluer plus précisément la répétabilité et la reproductibilité des analyses, la solution à 0,5 mg/mL de GO (NF 65 et NF 68) a été employée et trois gammes de dilution (A, B et C) ont été réalisées le même jour à partir de cette même solution stock. Les dilutions en série ont été réalisées pour obtenir onze concentrations allant de 0,025 µg/mL à 100 µg/mL. Les différentes gammes de dilution A, B et C ont été déposées sur des coupes de tissus pulmonaires montées sur des lames ITO. Un volume de 0,5 µL pour chaque concentration a été déposé en triples exemplaires. Cette première expérience a servi à estimer la répétabilité des acquisitions MSI. Ensuite, les différents points de concentrations de la courbe de calibration A ont été déposés de la même façon sur une même coupe de poumons puis analysées sur quatre jours consécutifs pour évaluer la reproductibilité de l'approche de quantification.

Dans un premier temps, la modalité de sélection des ROIs a été estimée ainsi que la répétabilité d'analyses pour une même concentration. Ensuite, la reproductibilité de la méthode a été évaluée sur trois gammes de dilution sériées et réalisées en parallèle à partir de la même solution mère à 0,5 mg/mL. Enfin, des études de linéarité et de justesse des analyses ont également été réalisées sur ces mêmes gammes de dilutions.

### a. Modalité de création d'une région d'intérêt

Pour évaluer l'efficacité de la sélection des ROIs, trois dépôts de 5 ng ont été réalisés sur une coupe de foie puis analysés avec la méthode LDI - MSI précédemment décrite. Après acquisition, les fichiers ont été exportés au format imzML grâce au logiciel FlexImaging 4.1 et traités avec le logiciel msiQuant [199] sans normalisation préalable du signal. Les normalisations par le TIC, le RMS ou la médiane ont engendré de plus grandes variations du signal pour l'ion  $m/z$  72. Les régions d'intérêt de ces trois dépôts ont été sélectionnées cinq fois consécutives dans le but de comparer la répétabilité dans les mesures du nombre de pixels, de l'aire des dépôts, de la masse du tissu présent sous le dépôt et de la moyenne des intensités (Tableau 1.9). La moyenne correspond ici à la moyenne de l'intensité de l'ion  $m/z$  72 en chaque pixel d'une goutte de GO imagée.

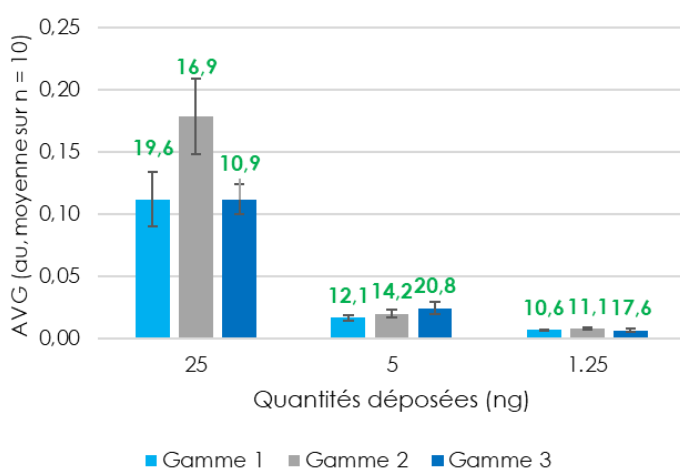
Tableau 1.9 : Evaluation de différentes modalités de création des régions d'intérêts.

	Dépôt 1			Dépôt 2			Dépôt 3		
	Moyenne	Ecart-type	CV %	Moyenne	Ecart-type	CV %	Moyenne	Ecart-type	CV %
Pixels	350	22	6,4	387	10	2,5	321	33	10,2
Aire (mm <sup>2</sup> )	3,495	0,228	6,5	3,877	0,099	2,6	3,224	0,319	9,9
Masse (mg)	0,044	0,003	6,5	0,049	0,001	2,6	0,041	0,004	9,9
Moyenne (au)	0,021	0,001	7,1	0,031	0,001	1,9	0,023	0,002	7,8

Répétabilité du zonage de la zone d'intérêt pour un dépôt de 0,5 µL, soit à 5 ng, sur coupe de foie de 12 µm. La répétabilité a été évaluée sur cinq sélections consécutives réalisées pour trois dépôts.



Sur 3 dépôts, les coefficients de variation indiquent un faible écart entre les cinq ROIs créés pour chacun des dépôts. Le nombre de pixel varie uniquement de 30 sur un total moyen de 350. De ce fait, l'aire et la masse ne sont que faiblement modifiées selon les régions d'intérêt sélectionnées et n'impactent pas significativement la quantité de nanoparticules estimées dans ces régions. Pour les 5 ng déposés, les quantités estimées et rapportées à la surface ou à la quantité de tissus sont respectivement de 1,42 +/- 0,13 ng/mm<sup>2</sup> et 112,89 +/- 10,37 ng/mg sur les 3 dépôts avec une variation pouvant aller jusqu'à 10 %. La sélection manuelle des ROIs a également induit une faible variation sur les moyennes des intensités. Dans la suite des résultats, les données seront exprimées en ng par dépôt, en ng/μL ou en ng/mg selon les cas exposés.



**Figure 1.30 : Variation des analyses LDI-MSI au sein d'une même concentration de GO.**

Analyse de 10 dépôts de 0,5 μL de trois concentrations différentes obtenues à partir de 3 gammes de dilution sériées parallèles et issues de la même solution mère. La moyenne est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt puis cette intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les 10 dépôts. Les valeurs indiquées en vert correspondent au CV en %.

1.30) quelle que soit la concentration analysée. Cependant, la mesure de l'intensité moyenne sur 10 dépôts semble varier selon la gamme de dilution utilisée. Aucune différence d'intensité n'est observée entre les gammes pour les quantités de 1,5 et 5 μg alors que pour la quantité de 25 μg déposée, les intensités de la gamme B semblent plus élevées que celles des gammes A et C.

Des études présentes dans la littérature font état de ces variations et notamment Chen *et al.*, 2015 [260] qui ont mesuré un CV de 41,4 % après 7 acquisitions MSI de dépôts de CNTs sur tissus. Comparativement, notre méthode a montré un coefficient de variation inférieur à 30 % sur 10 réplicatas d'un même point de concentration de GO également déposé sur tissu. Ces informations montrent également la difficulté d'analyser les nanoparticules à base de graphène en raison des difficultés de resuspension des nanoparticules qui induisent des variations en fonction de chaque échantillonnage. Ainsi, compte tenu de

Après avoir déterminé la meilleure méthode de sélection des zones d'intérêt, la répétabilité d'acquisition pour trois concentrations a été étudiée. Trois gammes de dilutions sériées (A, B et C) ont donc été réalisées en parallèle à partir de la même solution mère de GO à 0,5 mg/mL. Ensuite, 1,25 ; 5 et 25 ng provenant des concentrations de ces trois gammes de dilutions ont été déposées 10 fois sur des coupes de foies montées sur lame ITO. Après acquisition, les moyennes des intensités obtenues sur l'ensemble des pixels ont été moyennées pour 10 dépôts et par concentration. Les variations observées sont inférieures à 21 % (Figure

nos résultats et des données de la littérature, la reproductibilité de notre méthode a été étudiée plus précisément.

#### b. Evaluation de la reproductibilité des analyses

Afin d'étudier la reproductibilité de notre méthode MSI et d'en évaluer les capacités de quantification pour les nanoparticules de GO, trois gammes de dilutions (A, B, et C) ont été employées. Onze points de concentrations allant de 0,1 ng/μL à 100 ng/μL ont ainsi été utilisés pour estimer la répétabilité, la reproductibilité, les limites de détection et de quantification, la linéarité et la justesse des analyses MSI pour le GO. Pour cela, 0,5 μL de chaque concentration a été déposé en triplicatas sur des coupes des tissus pulmonaires de 12 μm puis analysé par notre méthode LDI - MSI. Ainsi, la répétabilité a été évaluée pour chaque concentration sur ces triplicatas et la reproductibilité a été étudiée entre ces trois gammes de dilution sur un même jour. De plus, la reproductibilité inter-jours a été évaluée à partir de la gamme de dilution A analysée sur quatre jours. Les analyses ont été arbitrairement considérées comme suffisamment répétables et reproductibles si les variations inter-dépôts inférieures à 30 %, l'objectif n'étant pas ici de faire de la quantification absolue de nanoparticules. Cette valeur seuil pour le coefficient de variation est en adéquation avec les données issues de la littérature. J. A. Barry *et al.*, 2019 [234] ont en effet évalué la répétabilité et la reproductibilité de l'analyse qMSI à partir de gammes d'étalonnage en dépôts et en homogénats pour la clozapine et la norclozapine et ont obtenu des CV variant 4 à 23 %.

Tout d'abord, la répétabilité obtenue avec la méthode LDI - MSI entre les triplicatas de GO au sein d'une même concentration a été évaluée en utilisant l'intensité moyenne mesurée pour un dépôt de GO. Les moyennes de ces triplicatas ont ensuite été réalisées. Pour la gamme de dilution A, les coefficients de variation ont été mesurés avec un CV inférieur à 30 %. Toutefois, les gammes de dilutions B et C ont respectivement 2 et 4 concentrations avec un CV supérieur à 30 % (**Tableau 1.10**). Les coefficients de variations obtenus sont jugés assez satisfaisants pour la solution NF65/68 qui est constituée à la fois de nanotubes, de nanorubans et de feuillets d'oxyde de graphène (**Figure 1.10, paragraphe C.I.**).

Ensuite, la reproductibilité de la méthode a été évaluée en comparant les trois gammes de dilution de GO obtenues à partir de la même solution mère. Ces gammes ont été déposées sur des coupes de poumons elles-mêmes déposées sur trois lames ITO différentes. Les CVs ont été calculés à partir des neuf dépôts de GO ainsi obtenus. Seuls les coefficients de variation de trois points de concentration sur onze sont inférieurs à 30 % (**Tableau 1.10, Gamme A à C**). L'hétérogénéité de la solution stock de GO NF 65/68 pourrait être à l'origine de la variation observée lors de la création de ces 3 gammes de dilution. La caractérisation des nanoparticules est donc essentielle avant de démarrer une expérience et d'autant plus pour des analyses quantitatives.

Tableau 1.10 : Reproductibilité des analyses MSI sur 3 gammes de dilution obtenues en parallèle.

ng/ $\mu$ L	Gamme A		Gamme B		Gamme C		Gamme A à C
	Moyennes	CV %	Moyennes	CV %	Moyennes	CV %	CV %
0	0,0125	14,5	0,0101	1,1	0,0214	47,6	49,8
0,1	0,0133	12,4	0,0131	19,9	0,0179	13,3	20,6
0,5	0,0358	28,3	0,0139	16,2	0,0708	48,4	52,7
1	0,0756	15,7	0,068	26,6	0,162	18,1	48,3
2,5	0,203	23,2	0,338	43,9	0,204	7,9	41,6
5	0,777	24,5	0,318	1,1	0,217	105,5	70,9
10	1,21	21,7	1,30	11,7	1,90	6,6	24,0
25	3,19	20,1	4,48	13,3	5,09	33,9	35,1
50	9,19	7,4	7,62	43,4	14,1	20,3	35,7
100	24,4	16,9	26,3	26,9	18,9	19,5	24,1

Les moyennes et coefficients de variation (CV%) des signaux moyens ont été réalisés à partir de l'intensité moyenne obtenue par dépôt pour l'ion  $m/z$  72. Cette moyenne est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt puis l'intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les trois dépôts.

Par la suite, la reproductibilité inter-jours a été évaluée à l'aide de la courbe d'étalonnage A. Cette gamme de GO NF 65/68 a montré les résultats les plus reproductibles et donc les suspensions de GO les plus homogènes pour les différentes dilutions obtenues. Les acquisitions LDI - MSI ont été effectuées sur quatre jours successifs et les coefficients de variation indiquent une bonne reproductibilité des résultats sur cette durée d'analyse avec des CVs majoritairement inférieurs à 30% (Tableau 1.11).

Tableau 1.11 : Reproductibilité inter-jour des analyses MSI sur la gamme A.

ng/ $\mu$ L	Jour 1		Jour 2		Jour 3		Jour 4	
	Moyennes	CV %	Moyennes	CV %	Moyennes	CV %	Moyennes	CV %
0	0,010	6,8	0,020	29,2	0,020	56,3	0,013	14,5
0,1	0,017	9,4	0,019	11,9	0,018	17,1	0,013	12,4
0,5	0,060	24,8	0,142	30,1	0,087	22,4	0,036	28,3
1	0,287	26,7	0,289	2,4	0,294	25,6	0,076	15,7
2,5	0,311	12,6	0,296	19,2	0,471	30,2	0,203	23,2
5	1,07	1,9	1,13	11,7	1,12	20,9	0,777	24,5
10	1,74	17,7	1,56	9,6	1,90	33,3	1,21	21,7
25	6,32	7,8	4,61	12,5	4,69	14,2	3,19	20,1
50	15,9	14,0	14,2	6,9	10,3	14,9	9,19	7,4
100	37,0	8,9	29,3	3,3	42,4	2,2	24,4	16,9

Les moyennes et coefficients de variation (CV %) des signaux moyens ont été réalisés à partir de l'intensité moyenne obtenue par dépôt pour l'ion  $m/z$  72. Cette moyenne est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt puis l'intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les trois dépôts.

Ces résultats soulignent la difficulté de travailler avec des nanomatériaux à base de graphène dans une optique de quantification. En effet, l'hétérogénéité des solutions de GO et leur simple suspension dans le SDBS peuvent entraîner des disparités lors des prélèvements même en utilisant une solution mère

identique. Il est donc important de prendre toutes les précautions possibles afin d'obtenir des conditions en solution optimales en passant les échantillons au bain à ultrasons 30 secondes et en utilisant un mélangeur de type « vortex » entre chaque point de concentration. De plus, ces conditions de sonication, beaucoup moins drastiques que la sonication réalisée avec la sonde lors la production du GO, n'altère donc pas la taille des feuillets. Cette dernière étape doit également être réalisée avant chaque dépôt des solutions de la gamme de solution. Cependant, ces résultats restent tout de même très satisfaisants pour des analyses de nanoparticules de type graphène en LDI - MS avec des coefficients de variation inférieur à 30 % pour la majorité des gammes analysées. En effet, alors que la préparation des gammes de calibration semble être assez variable probablement en raison de la difficulté à réaliser des prélèvements homogènes et représentatifs à partir d'une même solution mère, l'analyse d'une seule et même gamme s'est avérée beaucoup plus robuste. Les résultats obtenus le quatrième jour d'acquisition étant caractérisés par des intensités plus faibles et des CVs de J1 à J4 supérieurs à 30 % contrairement à ceux réalisées sur les moyennes de J1 à J3, la suite de l'étude portera uniquement sur les résultats des jours 1 à 3.

### c. Evaluation préliminaire des limites de détection et de la linéarité

La possibilité de réaliser des études quantitatives en MSI pour les nanomatériaux de type graphène a été considérée en comparant la linéarité, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) à partir des courbes de calibration A, B et C. La LOD et la LOQ ont été estimées en multipliant respectivement l'écart type de l'échantillon contrôle par 3 ou par 10 pour ensuite l'ajouter au signal mesuré, ce qui est préconisé pour toute analyse quantitative [208]. Dans le **Tableau 1.12**, qui regroupe les LODs et LOQs de chaque gamme analysée, la démarcation entre ces deux valeurs n'est pas clairement établie et les deux valeurs sont souvent très proches. En effet, la LOD et la LOQ sont équivalentes pour la gamme A et B et pour le jour 1 et le jour 2 et estimées à 0,5 ng/μL sauf pour la gamme B où elles sont estimées à 0,1 ng/μL. La gamme C et le jour 3 possèdent quant à eux des LOD et LOQ différentes fixées à 0,5 ng/μL et 1 ng/μL. Ces divergences peuvent

**Tableau 1.12 : Estimation des limites de détection et de quantification du GO.**

	LOD		LOQ	
	ng/μL	ng/mg	ng/μL	ng/mg
Gamme A	0,5	5,2	0,5	5,2
Gamme B	0,1	1,3	0,1	1,3
Gamme C	0,5	8,2	1	14,6
Jour 1	0,5	5,2	0,5	5,2
Jour 2	0,5	5,7	0,5	5,7
Jour 3	0,5	7,1	1	11,6

Comparaison des LOD et LOQ calculés sur la base des moyennes du signal moyen obtenu pour l'ion 72 (n = 3) dans les contrôles à 0,05 % de SDBS de chacune des gammes déposées.

provenir d'un rapport signal sur bruit plus ou moins important obtenu dans les dépôts contrôles réalisés avec la solution à 0,05 % de SDBS. Ce phénomène pourrait donc entrainer une surestimation de la LOD et de la LOQ. Dans ces conditions, la LOD a donc été évaluée à 0,5 ng/μL et la LOQ à 1 ng/μL. S. Chen *et al.*, 2015 [260] ont trouvé quant à eux une LOD de 0,05 ng/μL pour leurs nanoparticules de GO via la réalisation de courbes de

calibration en homogénats, soit une valeur dix fois inférieure à nos résultats. Ces différences de LOD peuvent provenir d'une disparité dans la taille et la nature des nanoparticules de GO étudiées. A noter que les nanoparticules présentaient une dimension de 2 µm dans l'étude de S. Chen *et al.*, 2015 [260] contre 100 nm dans notre étude.

Les courbes de calibration A (Figure 1.31, A.) et B possèdent un coefficient de détermination égal à 0,99 et celui de la courbe de calibration C est égal à 0,93 (Figure 1.31, B.) soulignant la linéarité de l'approche LDI - MSI réalisée sur coupe de poumons. Ces trois gammes possèdent une pente similaire de 0,02 et peuvent donc conduire à des résultats de quantification similaires. Concernant les analyses inter-jours, les 3 pentes issues des régressions linéaires avec un coefficient de détermination de 0,98 pour le jour 1, 0,99 pour le jour 2 et 0,93 pour le jour 3 (Figure 1.31, C.), avec des pentes également proches (respectivement 0,03 ; 0,03 et 0,04).

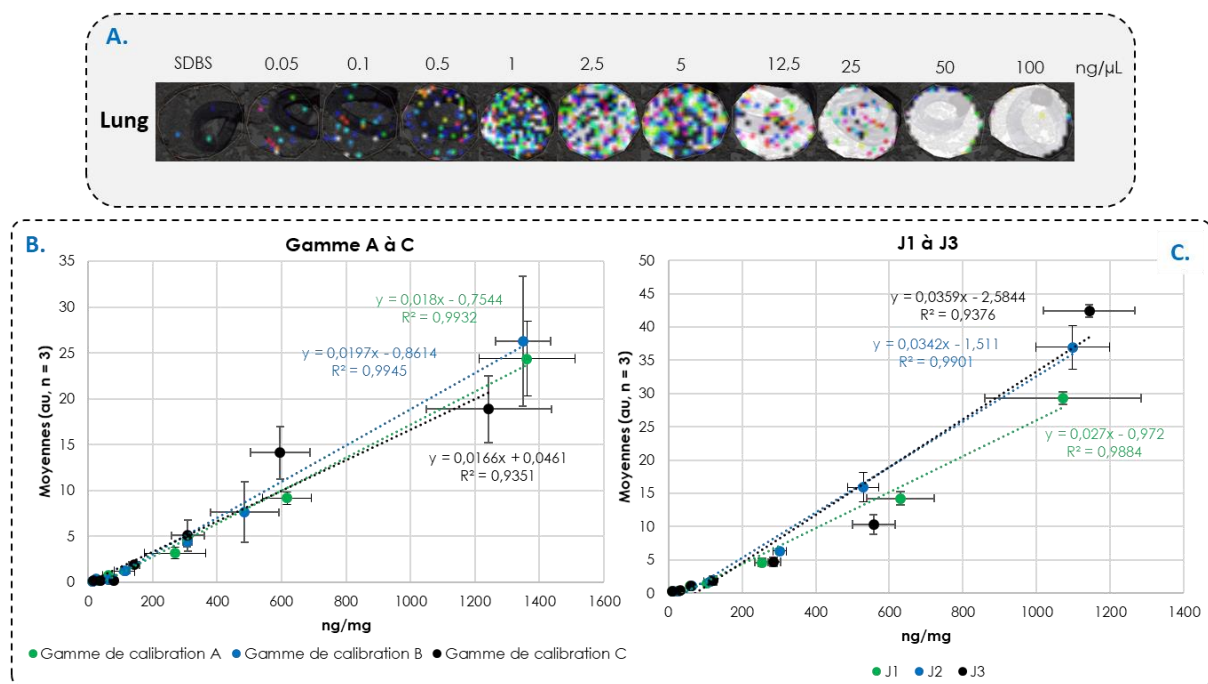


Figure 1.31 : Courbes de calibration réalisées sur coupes de poumons.

A. Analyses LDI - MSI de l'ion  $m/z$  72 pour l'étude de la courbe de calibration A réalisée en dépôts sur coupes de poumons. Une seule goutte par triplicatas est représentée ici. B. Représentation des courbes de calibration A, B et C la LOQ (1 ng/µL) à 100 ng/µL. C. Représentation de la courbe de calibration A acquise les jours 1, 2 et 3 de la LOQ (1 ng/µL) à 100 ng/µL. La moyenne est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt d'une concentration donnée puis l'intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les 3 dépôts de cette concentration. Ceci est répété pour chaque point de concentration évalué.

Les 3 courbes de calibration acquises sur 3 jours restent très proches les unes des autres et pourraient donc conduire à des quantifications répétables et reproductibles du GO au sein de coupes de

tissu. Pour vérifier ces résultats, la justesse des gammes et la précision de la quantification au sein de tissus provenant de tissus exposés sont décrites dans les paragraphes suivants.

#### d. Evaluation de la justesse des analyses quantitatives

Suite à l'étude de la linéarité des gammes, la justesse des concentrations retrouvées à partir des courbes de calibration a été évaluée pour les gammes A, B, et C ainsi que pour la gamme A acquise sur 3 jours successifs. L'exactitude de mesure a été calculée à partir de l'équation de régression linéaire obtenue avec les courbes de calibration réalisées à partir de la LOQ (0,5 ng/μL) jusqu'à 100 ng/μL. Pour chacune de ces gammes, l'erreur relative a donc été mesurée à partir des quantités de GO par milligramme de tissus (Tableau 1.13). Cette mesure est communément utilisée dans la littérature pour la quantification de molécules présentes au sein de tissus exposés.

Tableau 1.13 : Evaluation de la justesse de quantification selon les courbes de calibration obtenues sur coupes pulmonaire.

Gamme A				Gamme B			Gamme C		
ng/μL	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)
0	0,0	36,9	-	0,0	37,2	-	0,0	48,6	-
0,1	1,3	37,0	2669,4	1,3	37,4	2820,6	1,5	48,5	3215,2
0,5	5,2	38,2	634,3	5,1	37,4	638,2	8,2	50,0	508,0
1	13,0	40,4	210,5	12,4	40,2	224,4	14,6	52,5	259,1
2,5	30,1	46,2	53,3	24,8	54,0	118,0	38,3	53,7	40,0
5	62,5	73,7	18,1	62,6	52,9	15,4	78,5	53,7	31,5
10	112,1	104,0	7,2	114,2	103,2	9,6	142,8	100,2	29,8
25	269,4	214,6	20,3	307,0	265,1	13,7	308,8	189,5	38,6
50	616,5	549,7	10,8	484,8	425,3	12,3	595,6	440,9	26,0
100	1361,1	1398,5	2,7	1348,6	1377,2	2,1	1241,9	572,1	53,9

Gamme A, Jour 1				Gamme A, Jour 2			Gamme A, Jour 3		
ng/μL	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)	ng/mg (exp)	ng/mg (mesuré)	er rel (%)
0	0	37,1	-	0	30,0	-	0,00	48,6	-
0,1	1,1	37,3	3214,8	1,2	29,9	2469,7	1,30	48,5	3635,4
0,5	5,7	38,6	580,1	5,2	34,5	566,2	7,10	50,4	609,8
1	12,7	45,3	255,4	10,6	40,0	277,1	11,62	56,5	383,5
2,5	25,4	46,0	81,3	28,2	40,3	43,1	31,74	63,4	99,7
5	62,5	68,3	9,4	58,9	71,5	21,3	60,89	92,7	52,2
10	113,4	88,2	22,2	103,6	87,6	15,5	121,15	91,5	24,5
25	302,2	223,9	25,9	252,9	201,3	20,4	285,06	217,9	23,6
50	529,5	507,9	4,1	630,0	560,4	11,1	557,21	419,1	24,8
100	1097,3	1130,7	3,0	1070,9	1122,6	4,8	1142,54	1227,1	7,4

Ces gammes ont été acquises sur coupes de tissus pulmonaires de 12 μm d'épaisseur avec la méthode LDI - MSI précédemment décrite. L'équation de la régression linéaire utilisée pour calculer la justesse de chacune des concentrations obtenues correspond à celle réalisée à partir de la courbe de calibration allant de la LOQ à 100 ng/μL.

Premièrement, les résultats ont montré une variabilité (parfois importante) dans la justesse des quantités de GO mesurées en ng/mg pour une même concentration au sein des six gammes analysées. Par exemple pour les dépôts correspondant à 10 ng/μL la moyenne expérimentale est de 117,9 +/- 19,6 ng/mg et la moyenne calculée est de 95,8 +/- 8,2 ng/mg. En effet, selon la taille des gouttes de GO déposées, la quantité de tissus présente sous cette goutte peut varier et donc entraîner une variation de cette mesure. Cependant, les coefficients de variation pour ces 6 mesures expérimentales et calculées obtenues à 10 μg/mL correspondent respectivement à 11,4 % et 7,9 % et restent donc satisfaisants pour une estimation correcte des concentrations au sein de tissus à partir de gammes différentes. De plus, le coefficient de variation mesuré pour les ng/mg calculées au sein des triplicatas déposés pour chaque concentration de chaque gamme est inférieur à 30 %, ce qui en souligne le caractère répétable. Les erreurs sur les concentrations augmentent à mesure que la quantité analysée diminue, ce qui tendrait à indiquer que la « vraie » LOQ serait plus de l'ordre de 5 que de 1 ng/μL.

Ces résultats ont montré une erreur de mesure inférieure à 30 % pour les cinq points les plus concentrés des gammes A et B et pour les jours 1 et 2 d'acquisition soit de 5 ; 10 ; 25 ; 50 et 100 ng/μL. La gamme A acquise le troisième jour a uniquement permis d'obtenir quatre points justes de 10 à 100 ng/μL et la gamme C uniquement deux points correspondant à 10 ng/μL et 50 ng/μL. Des résultats identiques à ceux présentés dans le **Tableau 1.13** sont observés en mesurant la justesse à partir des nanogrammes de GO déposés sur coupes de tissu pulmonaire (données non montrées). L'analyse de l'exactitude de mesure a donc montré une erreur relative inférieure à 30 % et variant de 3 % à 25,9 %, à partir de 60 ng de GO par milligramme de tissu pulmonaire. Cette même démarche doit être reproduite sur d'autres tissus comme le foie, les reins et la rate afin de comparer les résultats et évaluer l'effet matrice pour la quantification du GO au sein de différents tissus.

À la suite des études de répétabilité de la signature graphène, à l'optimisation de la méthode LDI - MSI pour la détection du GO sur coupe de tissus et à l'évaluation de la reproductibilité des analyses, l'étape suivante a donc été d'utiliser toutes ces données pour la détection de GO au sein de tissus provenant de souris exposées au GO ou au rGO.

### **3. APPLICATION A LA DETECTION DU GO ET DU RGO DANS LES TISSUS**

#### **a. Détection par LDI - MSI du GO et rGO au sein de tissus issus de souris exposées**

La première étude de biodistribution de GO a été réalisée à partir du foie et des poumons respectivement prélevés chez des souris exposées à 4 μg de <sup>14</sup>C-GO par injection intraveineuse ou à 4 μg de <sup>14</sup>C-rGO par instillation pharyngée. Des analyses LDI - MS ont été effectuées à 25 μm de résolution spatiale

sur des coupes de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (**Figure 1.32, A.**). Ces premières analyses ont permis l'identification de la signature graphène dans les poumons mais pas dans le foie (**Figure 1.32, B.**), ce qui indique les plus grandes quantités de GO dans les poumons. De plus, la signature GO n'a pas été retrouvée dans les tissus contrôles. Ces résultats peuvent provenir d'un manque de sensibilité de notre méthode LDI - MS et/ou d'une différence de sensibilité selon les tissus. La quantification du GO présent dans ces tissus en  $\beta$ -imagerie indique 4 ng ( $n = 4$ ) de GO par coupe de foie et 8 ng ( $n = 10$ ) de rGO par coupe de poumons. La seconde hypothèse avancée ici correspond à une différence de biodistribution ou à une translocation des nanoparticules qui diffère selon le mode d'exposition des souris. En effet, les nanoparticules de rGO, administrées par instillation, sont accumulées directement dans les poumons alors que l'injection des GO par voie intraveineuse implique le transport des nanoparticules par les macrophages vers le système réticulo-endothélial dont fait partie le foie. Cet organe est responsable de l'élimination des corps étrangers. La quantité de GO accumulée dans le foie est donc probablement inférieure à celle de rGO retrouvée dans les poumons pour cette raison.



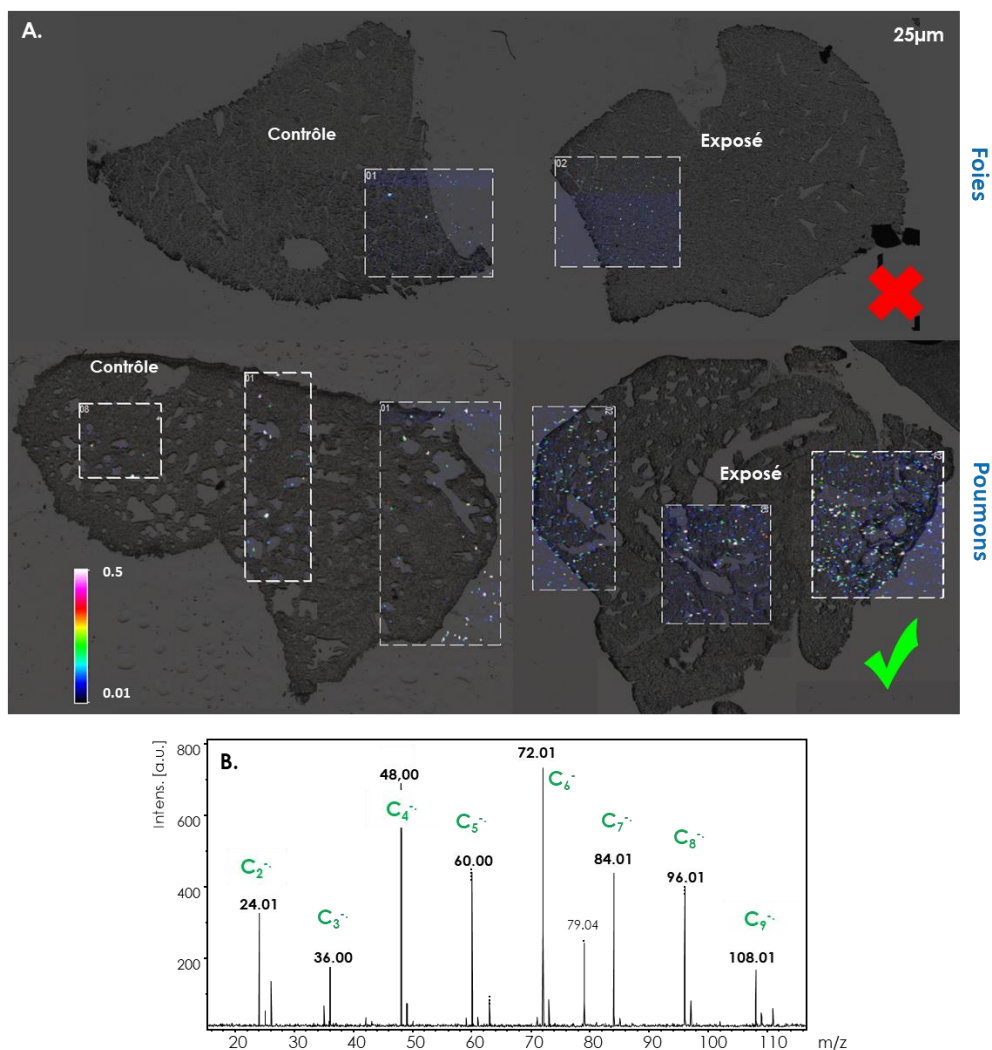


Figure 1.32 : Détection du GO et rGO dans le foie et les poumons de souris exposés à 4 µg de ces nanoparticules.

Imagerie par spectrométrie de masse de l'ion  $m/z$  72 GO sur coupe de foie et de poumons respectivement exposés à 4 µg de GO par injection intraveineuse et par instillation. La signature GO n'a été retrouvée que dans les images acquises à 25 µm sur les poumons. Les images ont été acquises avec une accumulation de 1000 spectres par pixel à 2 kHz avec une DIE de 10 ns, une focalisation du laser en « small » et une fluence laser à 90 %.

Afin de vérifier cette seconde hypothèse, une deuxième exposition au GO a été effectuée chez la souris en injectant par intraveineuse dans la queue 100 µL contenant cette fois-ci 50 µg de GO (50 µg/mL) resuspendus dans le SDBS. Cette quantité a également été administrée à la souris par l'équipe de S. Chen *et al.*, 2015 en injectant par intraveineuse dans la queue, 200 µL d'une solution à 25 µg/mL. Cette quantité injectée correspond à une valeur plutôt en deçà de la valeur moyenne trouvée dans la littérature où les doses injectées à l'animal varient généralement de 5 à 250 µg/mL.

Dans le but d'éviter un effet de saturation du détecteur du β-imager, la solution a été préparée à partir de 25 µg de GO non marqué et 25 µg de GO marqué. Cette stratégie permet ainsi d'augmenter les quantités d'administration pour être plus proche du seuil de détection MSI tout en évitant les seuils de saturation en radioimagerie. En analysant les poumons et le foie issus de cette seconde exposition, la

signature du GO a pu être identifiée au sein des deux organes (Figure 1.33, A.) mais avec une intensité plus élevée dans les poumons (Figure 1.33, B.).

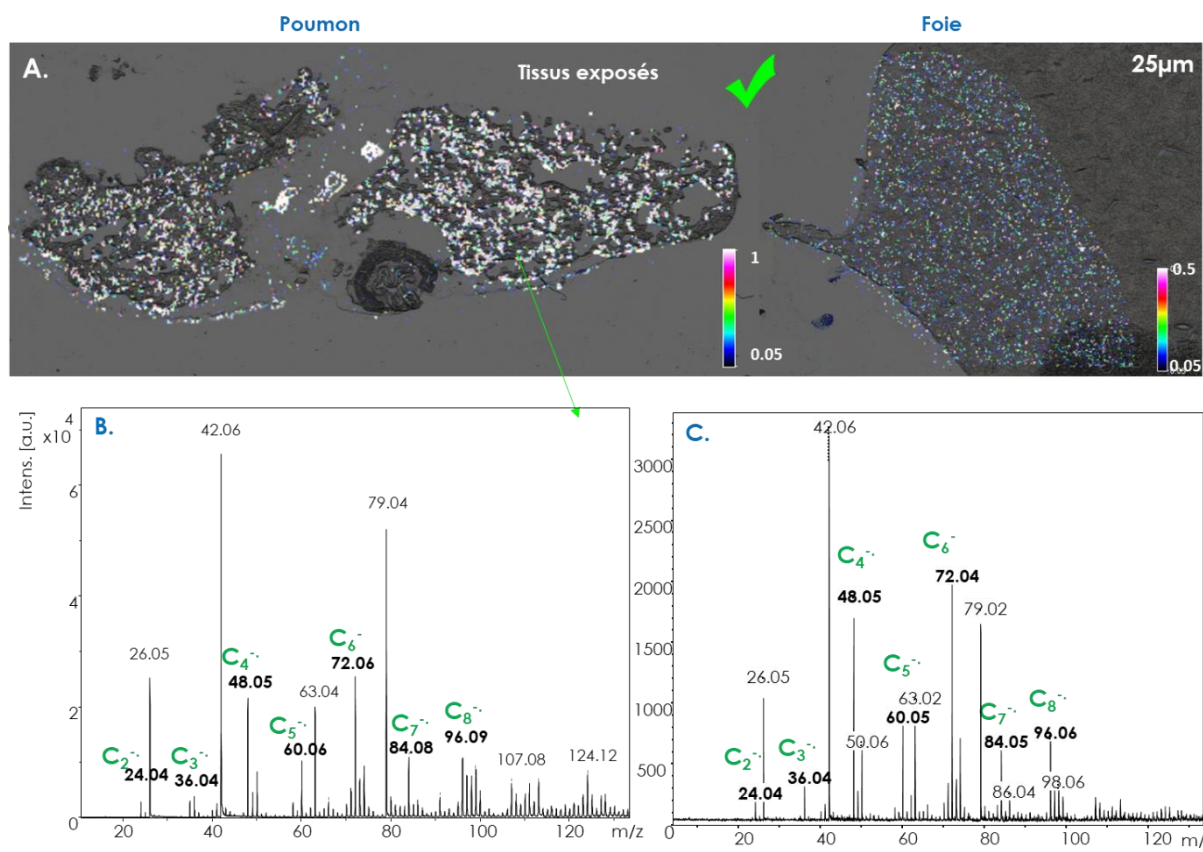


Figure 1.33 : Analyses MSI des coupes de poumons et de foies exposées à 50 µg de 50/50 <sup>12</sup>C/<sup>14</sup>C-GO.

A. Analyses LDI - MSI à 12 µm d'épaisseur d'une coupe de poumon et de foie à 12 µm d'épaisseur issues d'une souris exposée à 50 µg d'une solution de composé de 50 % de <sup>14</sup>C-GO et de 50 % de GO <sup>12</sup>C-GO. Les images ont été acquises à une résolution spatiale de 25 µm. B. Spectres représentatifs de la signature GO retrouvée dans la coupe de poumon et dans la coupe de foie (C.). Les images ont été acquises avec une accumulation de 1000 tirs par spectre et par pixel à 2 kHz avec une DIE de 10 ns, une focalisation du laser en « small » et une fluence laser à 90 %.

Ces deux premières expériences démontrent donc les capacités de notre méthode LDI - MSI à réaliser une biodistribution de l'oxyde de graphène au sein de tissus biologiques provenant de souris exposées à ces nanoparticules d'oxyde de graphène. Les images obtenues en imagerie LDI - MS ont ensuite été comparées à celles réalisées en imagerie β.

### b. Imagerie combinée : MSI et β-imagerie

À la suite de l'étude de la signature GO et à l'optimisation de la méthode LDI - MSI à 25 µm, la biodistribution obtenue en MSI a pu être comparée à celle obtenue au β-imager. En effet, l'un des objectifs de ce projet doctoral était d'apporter la preuve que la radioactivité observée provenait bien de la nanoparticule de GO, en MSI. Pour cela, une même coupe de poumon de 12 µm issue d'une souris exposée à 50 µg de 50/50 <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C-GO et montée sur lame ITO a été analysée successivement par radioimagerie puis

par MSI. Les études d'imagerie ont pu être effectuées sur une même lame car les lames ITO se sont révélées compatibles avec les analyses réalisées en imagerie  $\beta$  grâce à l'ajout d'un film adhésif conducteur sur la face non conductrice de la lame ITO. Ce ruban adhésif est ensuite enlevé pour l'analyse MSI. Les analyses de quantifications ont premièrement été réalisées en radioimagerie  $\beta$  puis en MSI. Cet ordre d'analyse a été préféré en raison des propriétés destructrices de la source laser.

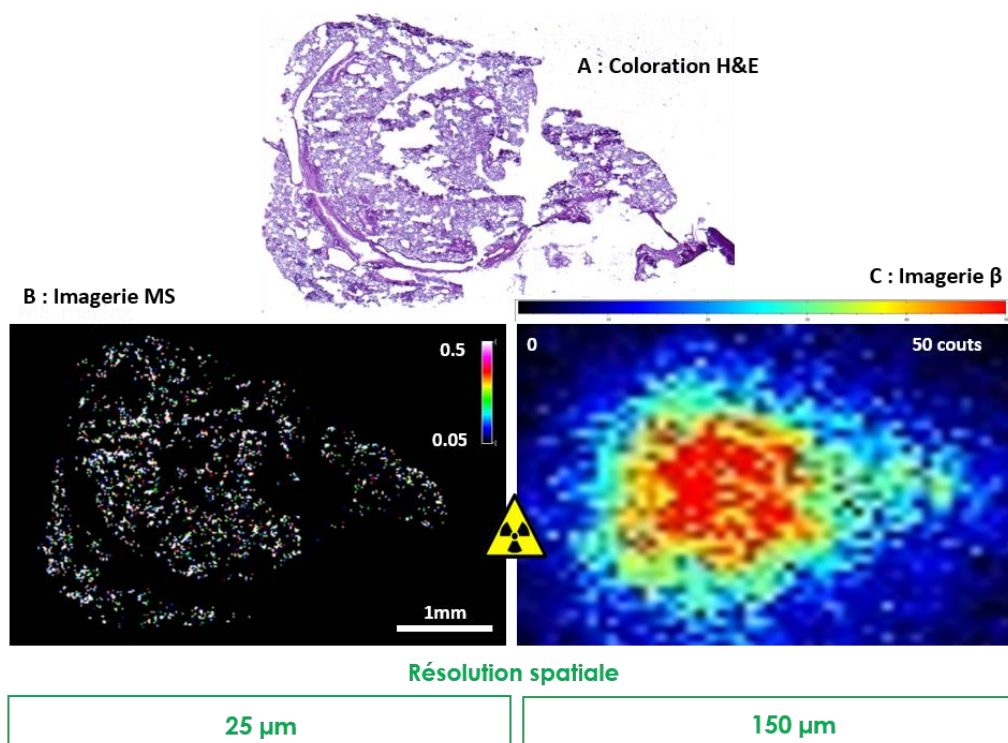


Figure 1.34 : Comparaison de la résolution spatiale en MSI et au  $\beta$ -imager.

A. Coloration H&E de la coupe de poumon de 12  $\mu\text{m}$  précédemment analysée en MSI et au  $\beta$ -imager. B. Analyse MSI d'une coupe de poumons issue d'une souris exposée à 50  $\mu\text{g}$  de 50/50  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -GO avec une résolution spatiale de 25  $\mu\text{m}$ . L'image MS a été acquises avec une accumulation de 1000 tirs par spectre et par pixel à 2 kHz avec une DIE de 10 ns, une focalisation du laser en « small » et une fluence laser à 90 %. Cette coupe a été préalablement analysée au  $\beta$ -imager avec 15 minutes d'accumulation pour obtenir l'image C.

Les 2 techniques d'imagerie confirment la présence de nanoparticules dans les poumons de souris exposées. Notre méthode d'imagerie par spectrométrie de masse permet donc l'analyse du GO à une résolution spatiale supérieure à celle du  $\beta$ -imager utilisé dans cette étude. En comparant l'image MS acquise à 25  $\mu\text{m}$  et l'image issue de la radioactivité avec une résolution moyenne de 150  $\mu\text{m}$  sur la **Figure 1.34**, la MSI apporte très nettement une information supplémentaire concernant la biodistribution de GO dans les tissus en mettant en évidence l'aspect alvéolé du tissu pulmonaire.

Après avoir constaté l'amélioration apportée par la MSI pour la biodistribution du GO au sein de ces coupes pulmonaires, l'association des deux techniques a donc été poussée plus loin en comparant les quantifications obtenues en MSI à celles obtenues en radioimagerie. La comparaison avec cette dernière,

qui permet de réaliser des quantifications absolues, permettra donc de mieux évaluer les capacités quantitatives de la MSI pour l'analyse de nanoparticules de graphène.

## **V. ESSAIS DE QUANTIFICATION DES NANOPARTICULES DE GO EN MSI**

Pour les expérimentations de quantification des organes issus des souris exposées aux trois doses de GO, une lame ITO a été préparée par condition, soit une lame pour chaque organe et par quantité injectée. La souris contrôle a servi pour le dépôt des gammes de calibration. Pour cela, la stratégie proposée ici pour la quantification de l'oxyde de graphène est d'analyser dans l'ordre suivant : une gamme de calibration, les lames exposées à 25, 50 et 75 µg, puis une seconde gamme de calibration (**Figure 1.35**).

Les gammes déposées sur des coupes de poumons, foie, rate et rein ont premièrement été analysées afin d'évaluer les possibilités de quantification de ces tissus dosés en MSI. Ensuite, les gammes acquises en homogénats et en dépôts ont été comparées entre les techniques d'acquisitions afin de vérifier la corrélation des données. Pour finir, la quantification de ces tissus issus des souris exposées au 25, 50 et 75 µg de GO a été réalisée au  $\beta$ -imager pour puis en MSI.

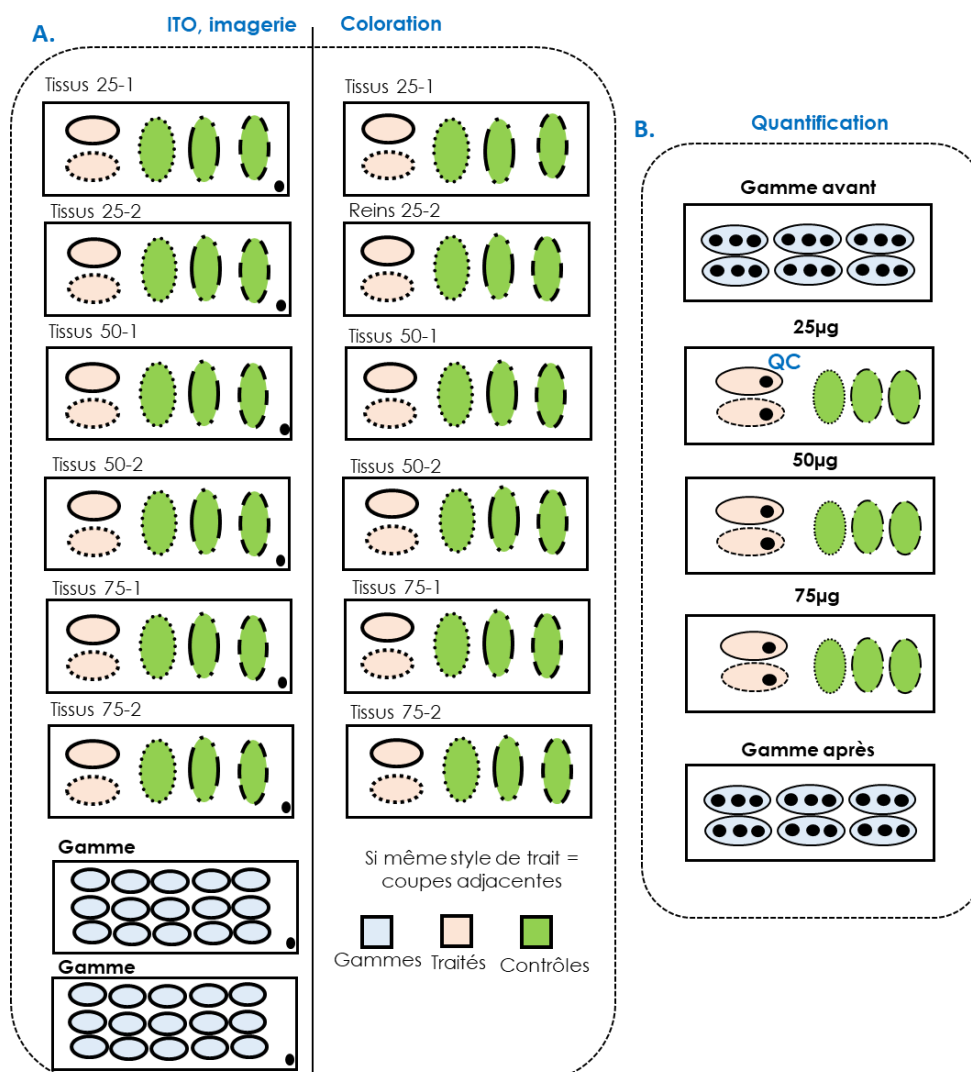


Figure 1.35 : Plan de lames pour les expérimentations de quantification.

A. Des coupes adjacentes pour chaque organe de chaque dose d'exposition ont été coupé puis déposés sur lame ITO et sur lame de coloration de façon successive. B. Pour les analyses de qMSI, la gamme A a été déposées sur les tissus issus de la souris contrôlée. Ces gammes ont été analysées avant puis après les tissus dosés avec la méthode LDI - MSI précédemment développée.

### 1. REALISATION DE COURBES DE CALIBRATION POUR CHAQUE TYPE DE TISSU

Lors de la quantification des tissus exposés aux 25, 50 et 75 µg de GO, deux courbes de calibration ont été acquises à 100 µm à 2 jours d'intervalle soit avant et après l'analyse des tissus quantifiés (Figure 1.35). Cette gamme correspond à la gamme A précédemment décrite dans ce manuscrit, réalisée à partir de la solution NG65/68 hétérogène mais montrant des CV% inférieurs à 30 % et une justesse de mesure d'au moins 70 %. Les tissus exposés ont été acquis à 100 µm, soit la résolution spatiale utilisée pour l'acquisition des courbes de calibration et avec 3 réplicatas par dose injectée.

Selon les poumons, le foie, la rate ou les reins, l'étude de ces gammes a montré une linéarité avec un coefficient de détermination variant de  $R^2 = 0,94$  à  $R^2 = 0,99$  (Figure 1.36). Hormis une gamme sur la rate,

les linéarités observées sont comparables à celles obtenues sur le poumon et ayant servi aux études de répétabilité et de reproductibilité. Ces linéarités sur les trois autres organes sont donc également satisfaisantes. Cependant, après comparaison des intensités, les résultats ont montré que les droites ne se superposaient pas totalement. Concernant les gammes analysées sur les poumons et la rates, celles acquises avant les tissus exposés possèdent une intensité supérieure à celles acquises après. Sachant que les précédents résultats ont montré une reproductibilité des analyses sur 3 jours, ces résultats pourraient être expliqués par une diminution de la puissance du laser due à un grand nombre de tirs laser réalisés ou à un encrassement de la source et du détecteur au cours des 3 jours d'analyses. Ces trois jours sont néanmoins nécessaires à l'analyse des deux lames comportant les gammes et des 3 lames comportant les tissus à doser. Etonnement, ce phénomène est inversé pour les gammes acquises sur le foie. Cependant, cette hypothèse semble être confirmée par les gammes acquises sur les reins, seules gammes possédant des intensités similaires et qui ont été acquises après le changement du laser et du détecteur réflectron. Ces différences observées entre les deux gammes analysées avant et après les tissus exposés peuvent donc entraîner une variation lors de la quantification des tissus provenant des souris exposées aux différentes doses de GO.

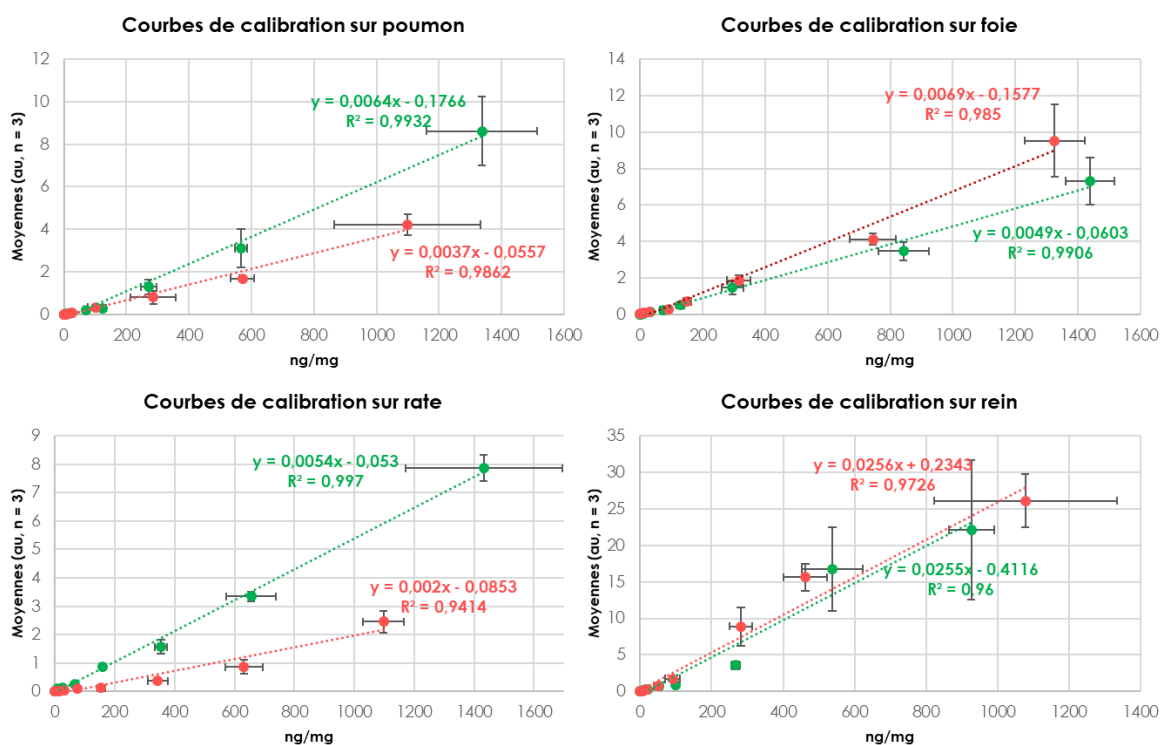


Figure 1.36 : Courbes de calibration obtenues sur différents tissus.

En vert, la gamme acquise avant analyse des tissus exposés et en rouge, la gamme acquise après analyse des tissus exposés. A noter que les courbes de calibration sur les reins ont été acquises après changement du laser et du détecteur réflectron. Les gammes ont été acquises sur coupes de tissus de 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur avec la méthode LDI - MSI suivante : DIE = 10 ns, Fluence = 90 %, accumulation de 1000 spectres, 2 kHz et une résolution spatiale de 100  $\mu\text{m}$ . La moyenne est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt d'une concentration donnée puis l'intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les 3 dépôts de cette concentration.

Pour éviter les variations inhérentes au laser, il semble essentiel ici de disposer de protocole de qualification des performances de l'appareil afin d'assurer un suivi du bon fonctionnement du spectromètre. De plus, il paraît important de déposer une gamme de calibration sur la même lame que le tissu à doser comme le préconise la littérature. Cependant, notre méthode nécessite le dépôt en triplicatas de chaque concentration et il est donc difficile de déposer l'ensemble des points sur la même lame que le tissu à doser. Pour cela, une courbe de calibration par dose d'exposition aurait dû être utilisée au lieu d'une gamme avant et après. Toutefois, pour les quantifications réalisées dans cette étude, la gamme acquise en premier a servi à la quantification des tissus provenant des souris exposées à 25 µg alors que la gamme acquise après les analyses a servi pour la quantification des tissus provenant des souris exposées à 75 µg. Pour les tissus provenant de la souris exposée à 50 µg de GO, la quantification a été réalisée avec la gamme de calibration permettant de retrouver les quantités de GO déposés dans les QC les plus justes.

## 2. COMPARAISON DES QUANTIFICATIONS REALISEES EN IMAGERIE B ET MSI

L'évaluation de la répétabilité, de la reproductibilité, de la linéarité des courbes de calibration ainsi que de la justesse de mesure laisse entrevoir la possibilité de réaliser des études (semi)quantitatives pour l'analyse de ces nanoparticules. Pour approfondir les capacités quantitatives de notre méthode MSI pour l'oxyde de graphène, les résultats obtenus via les deux techniques d'imagerie pour les gammes en homogénats et en dépôts ont également été évalués comparativement. Les courbes de calibration ont été effectuées à partir de la solution de 50/50  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -GO afin de pouvoir être analysées en  $\beta$ -imager et en MSI.

La **Figure 1.37** indique une corrélation entre les données obtenues en MSI et au  $\beta$ -imager avec un coefficient de détermination égal à 0,945. Bien que corrélées, ces deux techniques restent difficiles à comparer strictement. En effet, la première difficulté résulte du mode d'acquisition : la source  $\beta$  nécessite un temps d'accumulation alors que la source LDI analyse un pixel donné en moins d'une seconde. Deuxièmement, le  $\beta$ -imager analyse les coupes sur toute leur épaisseur car le carbone 14 peut émettre sur 100 µm alors qu'en MSI, l'analyse est réalisée en surface et sur moins d'un micron de profondeur. Enfin, les zones analysées ne sont pas relevées de la même manière : en MSI, les zones sont sélectionnées à partir des scans optiques avant l'acquisition alors qu'en radioimagerie, la zone est sélectionnée après acquisition sur la zone détectée comme radioactive. Ainsi, le zonage au  $\beta$ -imager est plus aléatoire et dépend de l'échelle d'intensité sélectionnée contrairement à la MSI qui permet de choisir très précisément la zone du tissu. Pour ces trois raisons, le choix des unités de mesure est essentiel pour la comparaison de ces deux techniques et plus particulièrement pour la réalisation de mesures quantitatives. Dans cette étude, les comparaisons ont donc été réalisées en ng/coupe de tissus puis les résultats ont été transposés en ng/mg de tissus à partir des ROIs sélectionnés en MSI.

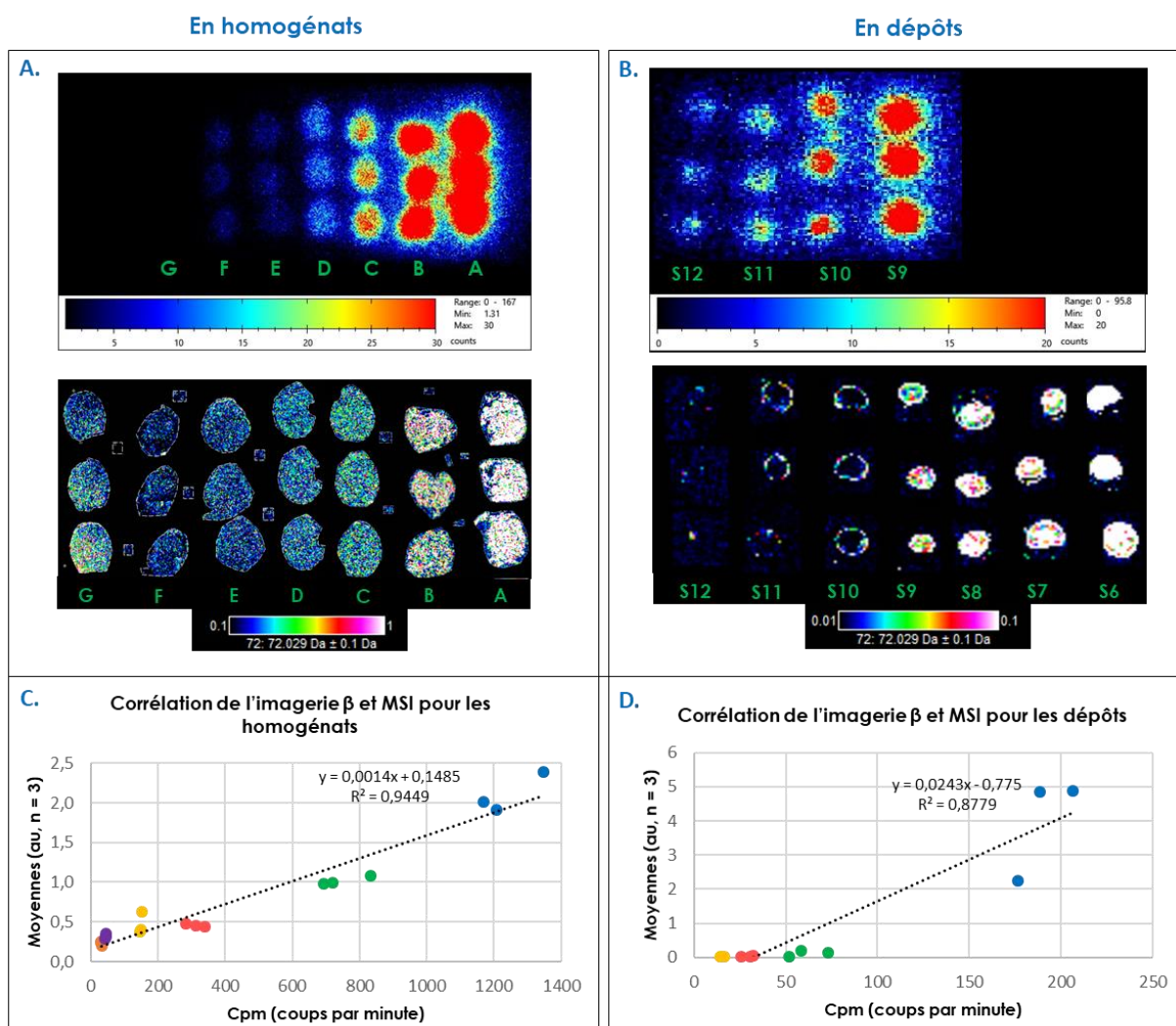


Figure 1.37 : Corrélation des données obtenues en radioimagerie β et en MSI.

A. Analyses au β-imager et en MSI de la même gamme de dilution de GO en tissus mimétiques de poumons de 30 μm d'épaisseur ou en dépôts sur coupe pulmonaire de 12 μm d'épaisseur. La représentation des coups par minute en fonction des moyennes d'intensités de l'ion  $m/z$  72 par coupe d'homogénat montre une corrélation des données obtenues à partir de ces deux techniques d'imagerie pour les homogénats (C.) et pour la gamme en dépôts (D.). Les gammes ont été acquises sur coupes de tissus de 12 μm d'épaisseur avec la méthode LDI - MSI suivante : DIE = 10 ns, Fluence = 90 %, accumulation de 1000 tirs par spectre, 2 kHz et une résolution spatiale de 100 μm et la méthode beta suivante : 1 heure d'accumulation en low resolution. La moyenne en MSI est obtenue à partir de la moyenne des pixels au sein d'un dépôt d'une concentration donnée puis l'intensité moyenne est de nouveau moyennée sur les 3 dépôts de cette concentration. Chaque concentration est représentée par une couleur.

Les résultats obtenus via ces deux méthodes communément utilisées en MSI pour la quantification semblent donc montrer des intensités qui corrént entre les deux techniques d'imagerie.

Malgré tous les obstacles rencontrés lors de l'optimisation de la méthode LDI - MSI à partir d'une suspension de GO hétérogène, les efforts consacrés aux développements expérimentaux et de paramétrages de l'Ultraflex™ ont permis de rendre la méthode répétable et reproductible avec une linéarité et une justesse de courbes de calibration satisfaisantes. De plus, la corrélation entre les données brutes des deux



techniques d'imagerie est en faveur de la qMSI. Pour cela, dans le chapitre suivant, les données de quantification en MSI ont été comparées aux quantifications réalisées avec le  $\beta$ -imager lors d'une étude de biodistribution chez la souris.

### 3. APPLICATION DE L'IMAGERIE DUALE A L'ETUDE DE LA BIODISTRIBUTION DU GO

#### a. Les analyses en radioimagerie

L'effet de la dose administrée sur la biodistribution de l'oxyde de graphène a été évalué en administrant par injection intraveineuse trois quantités de la solution 50/50  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -GO à des souris. Après prélèvement des organes, découpes des poumons, du foie, de la rate et d'un rein et du dépôt des coupes adjacentes sur lame ITO et Superfrost®, les tissus ont été analysés en radioimagerie. Ceux-ci ont été placés en chambre d'accumulation (Annexe 2) du  $\beta$ -imageur entre 30 minutes et 22 heures selon la quantité de GO présente dans les coupes. Les quantités de GO retrouvées dans ces différents organes sont présentées dans la Figure 1.38 suivante :

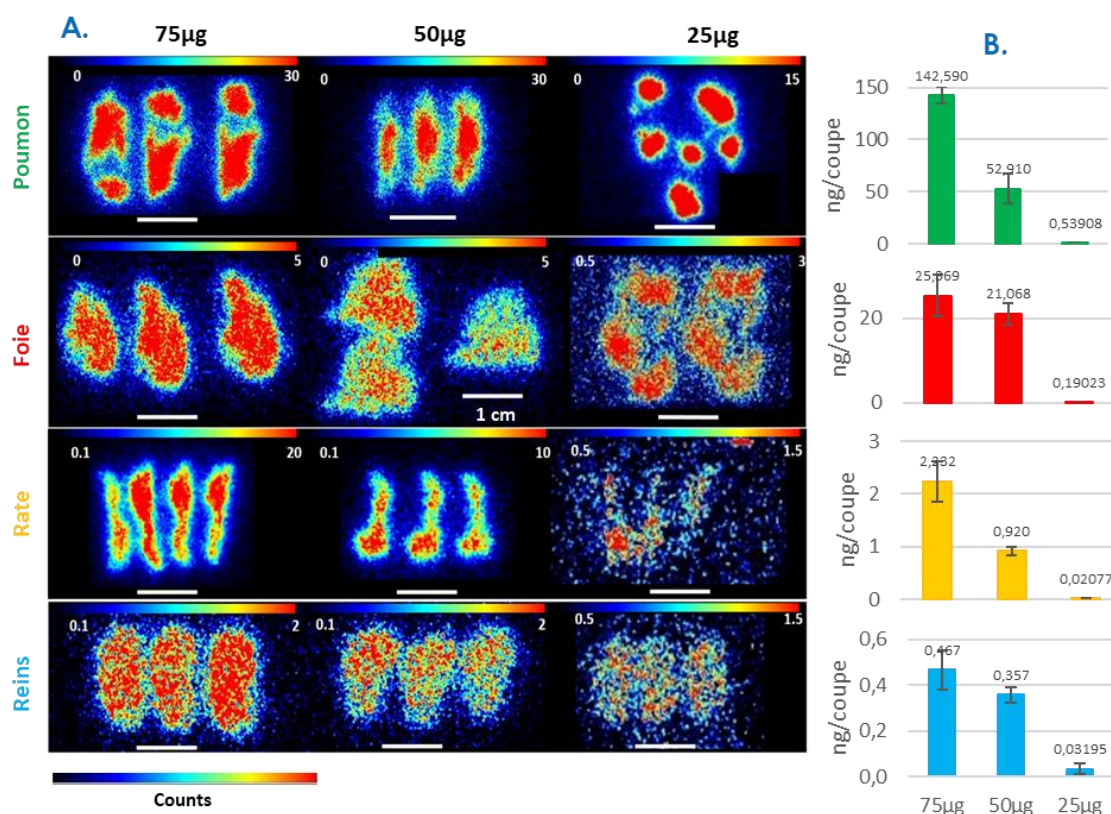


Figure 1.38 : Quantification du GO au  $\beta$ -imager au sein d'organes en fonction de la dose injectée

Quantification au  $\beta$ -imager dans les organes exposés. A. Les poumons et foies exposés à 75  $\mu\text{g}$  de GO ont été accumulés pendant 30 minutes contre 3 heures pour les poumons et foie exposés à 50  $\mu\text{g}$ . Les quatre organes exposés à la dose de 25  $\mu\text{g}$  ont été accumulés pendant 22 heures dans la source. B. Représentation graphique des quantités de GO retrouvées dans chaque organe en fonctions des doses d'injection.

Une fois les quantités rapportées au poids total des organes, 0,6 % ; 50,9 % et 56,8 % des 25, 50 et 75 µg ont été retrouvés dans le foie contre 0,7 % ; 44,9 % et 39,1 % dans les poumons. Cependant, moins de 1 % des doses injectées ont été détectées dans la rate et les reins (Tableau 1.14). Concernant les injections réalisées avec les doses de 50 et 75 µg de la solution 50/50 <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C-GO, 96,8 % et 97,1 % des doses sont respectivement retrouvées dans les quatre organes analysés et les ratios entre les doses d'injection et les quantités dosées sont conservés. Cependant, pour l'injection de 25 µg, seul 1,5 % de la dose injectée est quantifiée et les ratios ne sont pas maintenus. Ces résultats peuvent être dus soit un problème lors de l'injection de la solution par intraveineuse dans la queue soit à un temps d'accumulation trop faible en chambre de détection du β-imager. En effet, le signal du carbone 14 a été accumulé 30 minutes pour les poumons et les foies des doses 50 et 75 µg contre trois heures pour les rates et les reins issus de ces mêmes doses et 22 heures pour les organes issus de l'injection de 25 µg. L'hypothèse selon laquelle un problème serait survenu lors de l'injection semble cependant plus vraisemblable.

Tableau 1.14 : Quantités retrouvées par organe après injection de 25, 50 et 75 µg de GO au β-imager.

	Doses	Moyennes (ng/coupe)	Écart-type	ng/mg	µg/organes	%/organes
Poumons	75 µg	142,6	8,0	151,8	29,3	39,1
	50 µg	52,9	14,7	26,8	22,4	44,9
	25 µg	0,5	0,4	0,5	0,2	0,72
Foie	75 µg	25,4	4,9	29,2	42,6	56,8
	50 µg	21,1	2,4	28,6	25,4	50,9
	25 µg	0,2	0,1	0,4	0,1	0,58
Rate	75 µg	2,2	0,4	1,3	0,5	0,60
	50 µg	1,0	0,08	0,5	0,2	0,36
	25 µg	0,02	0,02	0,01	0,003	0,01
Reins	75 µg	0,5	0,09	0,5	0,5	0,64
	50 µg	0,4	0,03	0,4	0,3	0,60
	25 µg	0,03	0,02	0,03	0,040	0,16

Les cpm/coupe ont premièrement été convertis en nCi/coupe à partir des références puis en ng/coupe à partir de la solution mère (voir Tableau 1.3). Les moyennes ont été réalisées sur trois coupes pour chaque tissu et pour chaque dose injectée. Les ng/mg ont été calculés à partir de la densité de chaque tissu et de la taille des coupes. A partir de cette valeur, les µg/organes ainsi que les % de dose injectée retrouvés ont pu être calculés.

S. Chen *et al.*, 2015 [260] ont administré par injection intraveineuse 50 µg de GO et ont retrouvé après quantification en LDI - MSI 21,6 ; 1,1 ; 3,3 et 0,6 ng/mg de tissus après 24 heures après exposition soit respectivement 8 % ; 3 % et moins de 1 % de la dose dans les poumons, le foie, la rate et les reins. Leurs résultats comparés à ceux de notre étude indiquent une élimination du GO après 24 heures d'exposition. B. Czarny *et al.*, 2014 [248], qui ont analysé la rate, le foie, les reins, et la moelle osseuse après une aspiration

pharyngée de 20 µg de <sup>14</sup>C-MWCNT ont retrouvé quant à eux 100 % de la dose dans les poumons après un jour d'exposition puis cette dose a diminué à 20 % après un an après translocation et élimination par la voie gastro-intestinale. De plus, les doses retrouvées dans la rate et le foie sont respectivement inférieures à 0,2 % et 0,8 %. Leurs résultats ont montré la difficulté des nanotubes de carbone à passer la barrière air/sang même un an après une exposition par aspiration pharyngée. La comparaison de ces trois études montre de nouveau la difficulté de trouver un consensus concernant la biodistribution des nanoparticules de graphène car celle-ci semble dépendante du mode d'exposition, du type de nanoparticules administrées et du temps auquel a lieu le sacrifice de l'animal après administration des nanoparticules.

#### b. Les analyses en MSI

Les expériences précédentes ont donc permis de prouver les capacités de la MSI à analyser des nanoparticules de graphène tels que l'oxyde de graphène. Les études de répétabilité, de reproductibilité et de linéarité de courbes de calibration ont indiqué un potentiel de la MSI pour évaluer la quantité de ces mêmes nanoparticules au sein de tissus. L'étape suivante a donc consisté à comparer les analyses de quantification absolues réalisées au β-imager pour l'étude de l'effet dose du GO avec les analyses de qMSI.

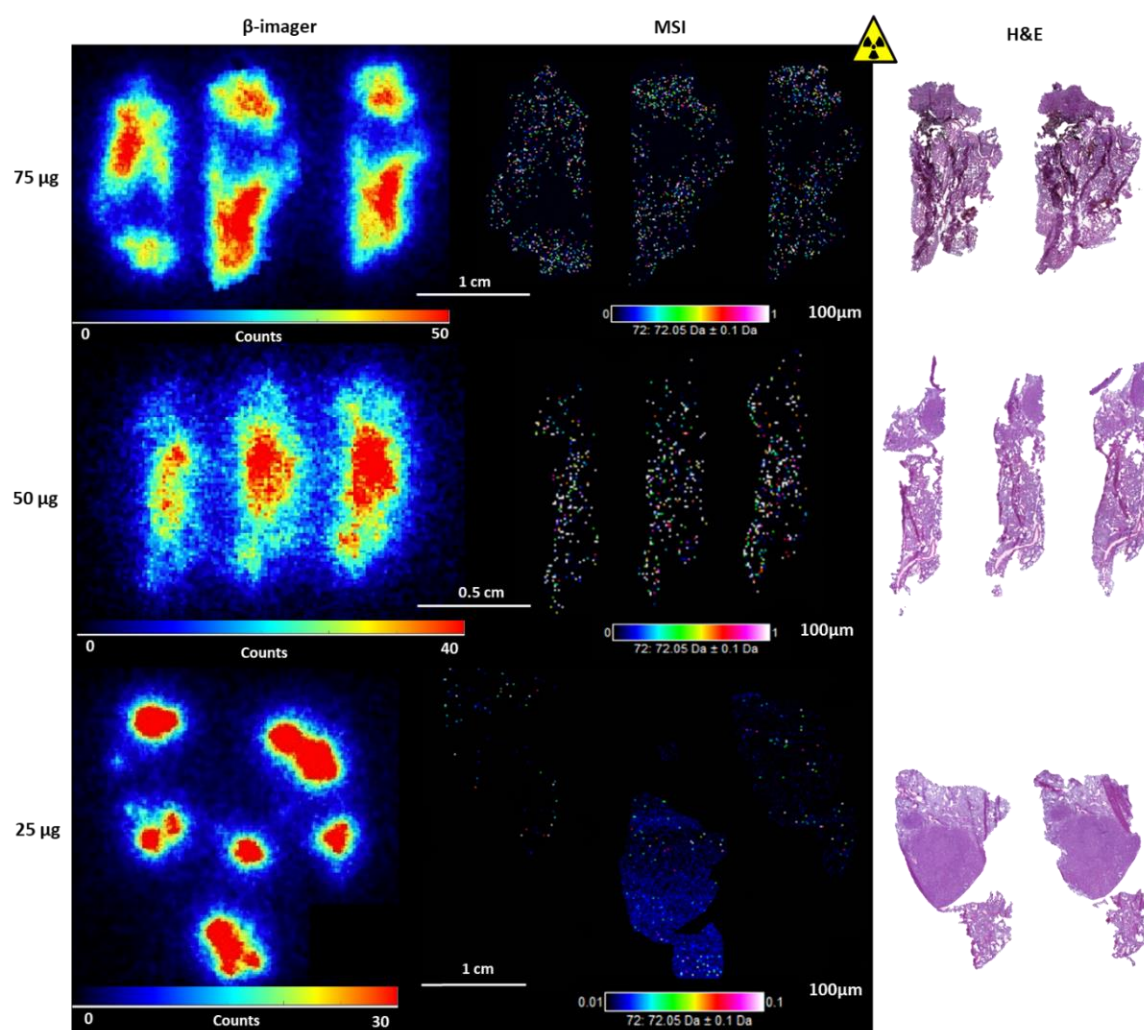


Figure 1.39 : Comparaison de l'analyse des poumons en MSI et  $\beta$ -imageur après exposition à 50 et 75  $\mu\text{g}$  de GO 50/50  $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ -GO.

Image du  $\beta$ -imageur acquises après 30 minutes d'accumulation. Analyses LDI - MSI réalisées à 25  $\mu\text{m}$  de résolution spatiale. Coloration H&E des coupes de poumons adjacentes à celles analysées.

Premièrement, la comparaison des images obtenues avec les deux techniques a été effectuée sur les résultats obtenus pour les poumons issus des souris exposées à 50  $\mu\text{g}$  et 75  $\mu\text{g}$  de GO (Figure 1.39). Les autres organes ont montré des intensités proches de la limite de détection, donc trop faibles pour être mesurées avec suffisamment de précision. De nouveau, la détection du GO obtenue en LDI - MSI correspond aux zones de radioactivité observées lors des analyses de radioimagerie. Les zones indiquant l'absence de radioactivité sont également retrouvées en MSI avec une résolution plus fine, permettant une superposition fidèle entre l'image MSI et l'image H&E. Cependant, la superposition des images MSI et  $\beta$ -imageur est plus difficile en raison de la diffusion du signal du carbone 14.

Les quantités de GO retrouvées par LDI - MS au sein des tissus diffèrent de celles obtenues par le  $\beta$ -imageur (Tableau 1.15). Bien que les données brutes corrélient entre les deux techniques d'imagerie, les quantifications du GO en ng/coupe et en ng/mg obtenues dans le foie sont systématiquement inférieures en

radioimagerie qu'en MSI alors que pour les poumons, les quantités dosées sont supérieures en radioimagerie, excepté pour les quantités de GO retrouvé après exposition à 50 µg et exprimées en ng/mg. Cependant, des études indiquent dans la littérature que malgré une corrélation des données brutes, les quantifications obtenues peuvent diverger entre les techniques analytiques. En effet, certaines équipes obtiennent les mêmes valeurs en comparant la LC - MS et la MSI [220] alors que d'autres n'arrivent pas aux mêmes valeurs quantifiées en comparant la GC - MS et la MSI [224]. Ces différences peuvent provenir d'une ionisation et/ou d'un effet matrice variable ou encore d'un mode de quantification intrinsèquement différentes selon les techniques.

**Tableau 1.15 : Comparaison des quantifications obtenues au β-imager et en qMSI.**

		Poumons exposés		Foies exposés	
		MSI	β-imager	MSI	β-imager
Dose injectée de 50 µg	ng/coupe	34,3	52,9	47,61	21,1
	ng/mg	88,3	26,8	33,5	28,6
	Ecart - type	5,8	14,7	0,9	2,5
	CV %	16,9	27,7	1,8	11,6
Dose injectée de 75 µg	ng/coupe	54,6	142,6	97,3	25,4
	ng/mg	47,9	151,8	73,7	29,2
	Ecart - type	3,8	8,0	2,3	4,9
	CV %	6,9	5,6	2,3	19,2

Au β-imager : les cpm/coupe ont premièrement été convertis en nCi/coupe à partir des références puis en ng/coupe à partir de la concentration de la solution mère (voir Tableau 1.3). Les moyennes ont été réalisées sur trois coupes pour chaque tissu et pour chaque dose injectée. Les ng/mg ont été calculés à partir de la densité de chaque tissu et de la taille des coupes. En MSI : les ng/mg ont été calculés à partir des équations des courbes de calibration (moyennes des intensités en fonction des ng/mg de tissu). A partir de cette valeur les ng/coupe ont été obtenus en utilisant la densité de chaque tissu pour obtenir des mg/coupe.

Ces variations de quantités de GO retrouvées dans les tissus peuvent provenir d'une différence dans les paramètres de quantification intrinsèques aux deux techniques, des différences de calibrants utilisés et/ou d'une sélection des ROIs différente selon la technique d'imagerie. En effet, en MSI la sélection des ROIs se fait avant acquisition et sur la base du scan optique alors que la sélection des ROIs en imagerie se fait après acquisition et sur le signal du carbone 14 obtenu. De plus, l'acquisition au β-imager se fait par accumulation du signal de désintégration du carbone 14. Selon la durée de l'analyse et le seuil des intensités sélectionné, la saturation de l'image

peut donc varier et engendrer une surévaluation de la région d'intérêt et donc une mauvaise estimation des données. En MSI, la sélection des ROIs est plus fiable mais la quantification est plus variable avec des coefficients plus importants pour nos nanoparticules de GO comme indiqué par les études de d'évaluation de répétabilité et de reproductibilité. L'utilisation de ng/coupe semble donc plus judicieuse pour la comparaison des deux techniques mais les ng/mg doivent être utilisés pour la comparaison aux autres études. Malgré l'analyse des mêmes tissus déposés sur une même lame ITO compatible avec les deux techniques, des variations de quantification ont cependant été observées entre le MSI et l'imagerie β malgré des coefficients de variation inférieure à 30 % en ng/coupe et en ng/mg au sein des triplicatas analytiques. Par ailleurs, les calibrants de la méthode de radioimagerie n'ont pas pu être directement utilisés en MSI car

la radioimagerie étant plus sensible, les concentrations se sont avérées trop faibles pour obtenir un signal détectable en MSI. De plus, l'utilisation de calibrants différents peut donc également expliquer les différences de quantification.

La quantification des nanoparticules de graphène en MSI nécessite donc de réaliser des études complémentaires. En effet, l'analyse de suspensions de GO hétérogènes peut induire des biais analytiques et expérimentaux pouvant dans une certaine mesure expliquer les différences de quantification obtenues. Cependant, l'objectif premier de ce projet concernant la mise en place de l'imagerie duale est donc effectif grâce aux nombreux développements effectués en LDI - MSI. La méthode développée permet d'obtenir une signature répétable, des analyses reproductibles et des gammes linéaires. Les images peuvent être réalisées à partir des mêmes coupes de tissus en MSI et au  $\beta$ -imager grâce à l'utilisation des lames ITO recouverte de film adhésif conducteur. Ainsi, l'imagerie combinée proposée permet de fournir une quantification absolue, une caractérisation structurale et une biodistribution à 25  $\mu\text{m}$  de résolution spatiale de nanoparticules de type graphène au sein de tissus biologiques.

## D. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Suite à l'utilisation grandissante des nanoparticules, le besoin de développer de nouveaux outils analytiques ou de perfectionner ceux existant s'est accru. C'est donc dans ce contexte qu'est venu s'insérer l'un des projets de cette thèse portant sur l'analyse des nanoparticules de graphène en imagerie par spectrométrie de masse et en imagerie  $\beta$ . Afin de mieux connaître leur biodistribution, l'objectif était donc de mettre en place une imagerie duale combinant quantification absolue et caractérisation structurale *in situ* pour l'analyse d'oxyde de graphène et d'oxyde de graphène réduit marquée ou non après administration à la souris.

Dans cette optique, la caractérisation de ces nanoparticules a été effectuée dans un premier temps en microscopie électronique à transmission. Les résultats ont ainsi souligné la difficulté d'obtenir des nanoparticules de synthèse présentant des caractéristiques structurales similaires. Ainsi, les six différents lots de nanoparticules analysés au cours de ce travail de thèse ont présenté des nanostructures de dimensions assez variables allant de 100 à 500 nm au sein de solutions parfois composées de nanotubes, de nanorubans et de feuillets de graphène. C'est donc sur ces lots relativement hétérogènes, que les développements en spectrométrie de masse ont été entrepris avec la nécessité d'obtenir des suspensions de ces nanoparticules les plus homogènes possibles. Pour cela, les nanoparticules de GO et rGO ont donc été reprises dans une solution contenant un tensioactif : le SDBS. Quatre de ces lots (NF 52, 55, 66 et 67) mis en suspension dans le SDBS à 0,05 % dans de l'eau ont servi à l'analyse de ces nanoparticules de graphène par MS. Ces nanoparticules de GO et rGO se sont révélées détectables sans ajout de matrice MALDI, donc dans des conditions de LDI, grâce à leur structure aromatique favorisant les phénomènes de désorption/ionisation. Après analyses LDI - MS de ces lots, un profil de clusters carbonés et radicalaires a été détecté avec des structures de  $C_2^-$  à  $C_9^-$ . Cette signature s'est avérée spécifique des nanoparticules de carbone car elle a également été retrouvée en analysant des nanotubes de carbones azotés  $^{12}C$  et pour des nanoparticules d'oxyde de graphène marquées au  $^{14}C$ . Ce profil LDI - MS est donc caractéristique des nanoparticules et non du GO. Les nanoparticules de GO ont ensuite été utilisées pour la mise au point de la méthode LDI - MS car plus faciles à suspendre dans le milieu à 0,05 % de SDBS que les rGO. La présence d'un plus grand nombre de groupements hydrophiles semble favoriser leur mise en suspension dans cette solution aqueuse. Les paramètres MS ont ensuite été optimisés et fixés pour une meilleure détectabilité de ces structures, avec un délai d'extraction de 10 nanosecondes, une fluence de 90 % en acquisition rélectron et en mode négatif d'ionisation. Ces paramètres ont également permis la détection de la signature GO sur coupes de tissus avec succès. À la suite de ces nouvelles optimisations en LDI - MSI portant essentiellement sur les modalités d'utilisation du laser, les paramètres utilisés ont été fixés avec une focalisation « minimum », un mouvement aléatoire du laser au sein du « raster », une résolution spatiale de 100  $\mu m$  pour les études de quantification et de 25  $\mu m$  pour les études de biodistribution. Une calibration interne est

réalisée sur les clusters de carbones avant acquisition des images MS afin de garantir une précision de mesure de masse.

Dans une seconde partie de ce travail, des études ont été entreprises dans le but d'évaluer les capacités quantitatives de notre méthode LDI - MSI envers ces nanoparticules. Malgré des lots de graphène assez hétérogènes, des études de répétabilité, linéarité et de justesse ont pu être menées avec succès. Pour cela, trois gammes de dilutions préparées à partir de la même solution mère de GO ont été analysées en LDI - MSI afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité des analyses. Malgré les obstacles rencontrés, les coefficients de variation obtenus entre les triplicatas de chaque point de concentration se sont avérés inférieurs à 30 %. La LOD a tout d'abord été évaluée à 0,5 ng/ $\mu$ L et la LOQ à 1 ng/ $\mu$ L (quantités déposées sur des coupes de poumons). Les mesures des justesses ont montré une exactitude de mesure supérieure à 70 % à partir de 60 ng de GO par milligramme de tissu sur coupe de poumons. Ces tests ont également permis d'affiner la LOQ comme étant plutôt de l'ordre de 5 ng/ $\mu$ L.

Enfin, des études de biodistribution réalisées au  $\beta$ -imageur puis en MSI ont été réalisées chez la souris selon la dose de GO injectée à partir de la même coupe de tissu. Les quantifications réalisées au  $\beta$ -imageur ont montré des quantités de GO plus élevées dans le foie que dans les poumons, la rate et les reins. Cependant, la biodistribution au sein de chaque organe est obtenue avec une résolution spatiale plus importante en MSI (25  $\mu$ m) qu'au  $\beta$ -imageur (150  $\mu$ m). La combinaison des deux techniques souligne donc ici l'apport de la MSI qui ajoute donc caractérisation structurale et surtout résolution spatiale aux données quantitatives obtenues par radioimagerie.

Avec notre imagerie combinée, la difficulté d'analyses des nanoparticules de graphène a été démontrée et des divergences dans les données quantitatives ont été observées entre les deux techniques. De plus, des dissemblances ont également été pointées entre les données issues du  $\beta$ -imageur et de la MSI malgré une bonne corrélation au niveau des données brutes. Suite aux injections de 25, 50 et 75  $\mu$ g, la dose de 25  $\mu$ g n'est pas retrouvée *in vivo*, indiquant une variation dans le mode de préparation ou plus vraisemblablement d'injection des suspensions de GO.

Les données obtenues dans le cadre de ce travail de thèse ont soulevé quelques points à considérer lors d'études MSI (ou MS) de nanoparticules :

- il est essentiel de caractériser avec précision ces nanoparticules avant de débiter toute étude de biodistribution ou de quantification.
- il est nécessaire d'obtenir des suspensions les plus homogènes possibles dans le SDBS ou un autre tensioactif afin de pouvoir réaliser des solutions pour analyse ou injection à l'animal possédant des concentrations fiables et connues.



- un suivi précis et régulier des performances du spectromètre au cours du temps est apparu essentiel pour garantir le bon déroulement et la comparabilité des expériences de LDI - MSI. En effet, une fluence du laser élevée est nécessaire en analyse LDI, ce qui peut induire un épuisement des capacités du laser plus rapide.

Cette étude a donc montré les limites analytiques de la quantification en MSI vis-à-vis des nanoparticules graphène. Dans le cadre d'une suite à ce projet, il conviendrait de réaliser une caractérisation des nanoparticules plus fine, des études de stabilité des suspensions obtenues seraient également à envisager pour une quantification la plus robuste possible. Les études de répétabilité et reproductibilité pourraient être réalisées sur d'autres matrices biologiques que le poumon et la programmation de nouvelles expérimentations chez l'animal serait souhaitable pour confirmer et préciser les résultats obtenus. Ces analyses futures devront prendre en compte les développements réalisés lors cette première étude avec un plan expérimental plus spécifiquement établi pour une comparaison plus objective des valeurs quantitatives obtenues en imagerie  $\beta$  et en LDI - MSI. Il est en effet nécessaire d'augmenter le nombre de réplicatas biologiques et analytiques. De plus, une évaluation de la reproductibilité des quantifications obtenues en imagerie  $\beta$  pourrait aussi être envisagée. Un plus grand nombre d'échantillons analysés devrait permettre de mieux appréhender l'origine des variations de biodistribution et de quantification. De plus, des analyses de dégradation ou d'agrégation forcées de ces nanoparticules ou l'étude des protéines adsorbées par ces nanoparticules *in vivo* seraient très complémentaires à cette étude et permettraient de mieux comprendre les mécanismes d'élimination de ces nanoparticules.



## Chapitre 2 : DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE ANALYTIQUE POUR L'ETUDE DE NANO-OBJETS DE TYPE MICELLAIRE

---



## A. INTRODUCTION

Un nanovecteur est un composé biodégradable, possédant des propriétés de furtivité pour échapper au système immunitaire dans le but de transporter une molécule et de la libérer une fois arrivé à sa cible [92]. Deux types principaux de vecteurs micellaires sont utilisés : les liposomes et les micelles polymériques. Les liposomes, vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches phospholipidiques sont les plus connus et les plus référencés dans la littérature car ce sont les premières générations de nanoparticules utilisées [94]. Malgré tous ces avantages, les liposomes manquent parfois de stabilité dans les milieux biologiques et peuvent subir des réactions d'oxydation ou d'hydrolyse. Pour pallier cela, d'autres systèmes de délivrance de molécules peuvent être développés, comme les micelles polymériques qui possèdent l'avantage d'avoir une taille modulable et une surface modifiable.

Selon la fonctionnalisation de surface de ces systèmes micellaires, ils peuvent à la fois être utilisés pour le transport de médicaments, ou en diagnostic médical par imagerie moléculaire via le transport de traceurs. Plus particulièrement, le développement de techniques de radiomarquage des liposomes permet de les utiliser en SPECT ou en PET [101] dans le cadre d'approches théranostiques (i.e. thérapie et diagnostic). Ces nanovecteurs sont également utilisés pour d'autres techniques d'imagerie comme la fluorescence [102] [103] pour l'étude de leur biodistribution ou celle des principes actifs qu'ils portent et délivrent. Cependant ces techniques nécessitent souvent plusieurs types de marquage pour suivre à la fois le nanovecteur et l'agent encapsulé. Dans ce contexte, l'imagerie par spectrométrie de masse peut être une technique de choix pour l'étude de la biolocalisation de ces systèmes.

Par exemple, A. Fulop *et al.*, 2016 [279] ont étudié la distribution de nanovecteurs au travers de l'analyse de deux marqueurs liposomaux et d'une molécule incorporée dans la micelle au travers de leur biodistribution dans les reins, le foie et le cerveau de souris. L'intégrité du vecteur a donc été étudié en MALDI - MSI via la visualisation ou non de la colocalisation des différentes molécules incorporées aux micelles. Les auteurs notent cependant un manque de sensibilité de la méthode MALDI - MSI pour obtenir une colocalisation avec une résolution spatiale inférieure à 50  $\mu\text{m}$ . J. K. Lukowski *et al.*, 2017 [280] ont également étudié l'efficacité de délivrance de liposomes encapsulant la doxorubicine grâce à la MSI mais au sein de modèles de culture cellulaire tridimensionnelle grâce à la MSI. Enfin, C. Zandanel *et al.*, 2018 [258] ont étudié par MALDI - MSI la biodistribution de micelles polymériques composées de polycyanoacrylate et encapsulant également la doxorubicine au sein de coupes de tumeur de souris. Ces derniers ont détecté à la fois la doxorubicine et un profil polymérique sur tissus mais n'ont pas montré d'images de colocalisation de ces deux composés car ces molécules ont été détectées avec deux méthodes MS différentes.

Dans ce contexte d'analyse MSI de micelles polymériques, le second axe de cette thèse a donc été consacré à la mise au point d'une méthode de MSI permettant d'étudier simultanément la biodistribution

de molécules encapsulées et celles du système d'encapsulation dans le cadre d'un projet financé par le Laboratoire d'excellence LERMIT. Le but de ce projet a été d'étudier la délivrance d'un agent anti-inflammatoire le GW3965, agoniste des récepteurs LRX (Liver X Receptor) [281] [282]. Ces récepteurs LRX sont des récepteurs nucléaires aux oxystérols qui activent des facteurs de transcription des gènes impliqués dans les voies de synthèse du cholestérol. Ce sont donc des récepteurs centraux dans l'homéostasie des lipides. Le GW3965 est donc à l'étude pour le traitement de l'athérosclérose, maladie artérielle chronique caractérisée par des dépôts de lipides dans les artères. Une étude réalisée par S. B. Joseph *et al.*, 2002 [283] a préalablement montré l'efficacité du GW3965 pour inhiber le développement de l'athérosclérose dans un modèle murin : LDLR -/- et apoE -/-. D'autre part, l'optimisation des micelles polymériques a déjà été réalisée par N. Mackiewicz *et al.*, en 2011 [107] dans une étude testant le PDAPEG2000 (PolyDiAcétylène-PEG), le PDAPEG350 et le PDANTA (PolyDiAcétylène-NitriloTriacetic Acids), tous trois encapsulant la même sonde fluorescente (FP730). Les résultats ont ainsi montré une fluorescence plus intense au sein des tumeurs présentes chez la souris traitée au PDAPEG2000 comparativement à celles traitées avec le PDAPEG350 et le PDANTA. Cette étude a donc prouvé une plus grande efficacité de délivrance de ces micelles polymériques et ont donc été utilisées pour encapsuler le GW3965. C'est donc ce modèle de micelles polymériques PDAPEG2000 encapsulant le GW3965 qui sera utilisé dans notre étude. N. E. Manicke *et al.*, 2019 [284] ont montré la faisabilité d'analyser des lipides dans des plaques d'athéromes humaines en DESI - MSI.

Dans ce contexte, l'objectif de ce projet a donc été de réaliser des études MSI de ce principe actif encapsulé au sein de micelles PDAPEG au sein de plaque d'athérome en MALDI - MSI. Les développements ont eu pour but d'obtenir une détection simultanée de la micelle et du GW3965 en imagerie par spectrométrie de masse afin de déterminer *a minima* la co-localisation des deux entités administrées ainsi que les doses de nanoparticules et de principe actif délivrées au niveau des plaques d'athérome.

## B. MATERIELS ET METHODES

### I. SYNTHESES DES MICELLES ET DES PRINCIPES ACTIFS

#### 1. LES MOLECULES CIBLES

La synthèse des principes actifs a été effectuée au SCBM (CEA de Saclay) au sein de l'équipe d'Eric Doris. Toutes les solutions mères de GW3965-OC12 et GW3965-OC16 ont été fournies à une concentration de 1 mg/mL dans un mélange chloroforme/méthanol, 50:50, v/v. Les GW-OC12 et GW-OC16 ont été utilisés pour la mise au point de la méthode d'analyse par MALDI - MS et le GW-OCH<sub>3</sub> n'a servi qu'aux protocoles de dérivation.

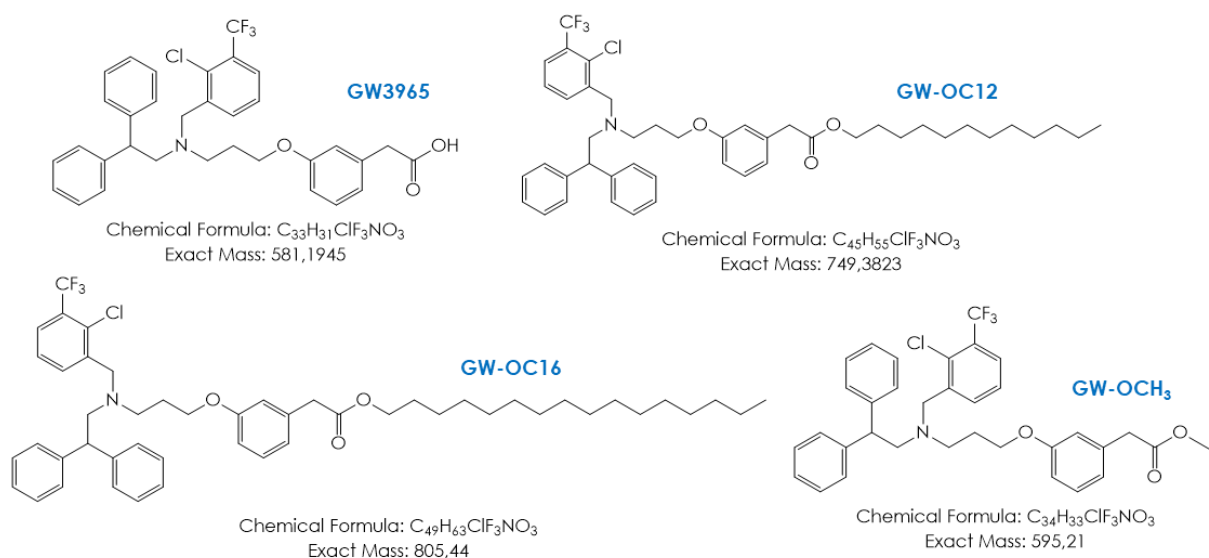


Figure 2.1 : Structures de molécules cibles de cette étude.

#### 2. FORMATION DES MICELLES ET ENCAPSULATION DU PRINCIPE ACTIF

Les micelles correspondent à des micelles polymériques constituées de monomères de PDAPEG 2000. Les unités PDAPEG 2000 mises en solution aqueuse se regroupent en micelles. Les unités monomériques de PDAPEG ont ensuite été polymérisées par irradiation à la lumière UV (254 nm) (Figure 2.2). Cette étape de photopolymérisation permet de former des liaisons covalentes entre les unités amphiphiles dans le noyau des micelles individuelles. Des liaisons en 1-4 ont donc été formées au niveau des fonctions alcynes de la chaîne polydiacétylène des monomères [13] [14]. Le GW-OC12 ou GW-OC16 ont

ensuite été incorporés par sonication à la micelle polymérisée. Ces réactions ont été effectuées au sein du SCBM (CEA de Saclay) [107] par Lucie Jamgotchian.

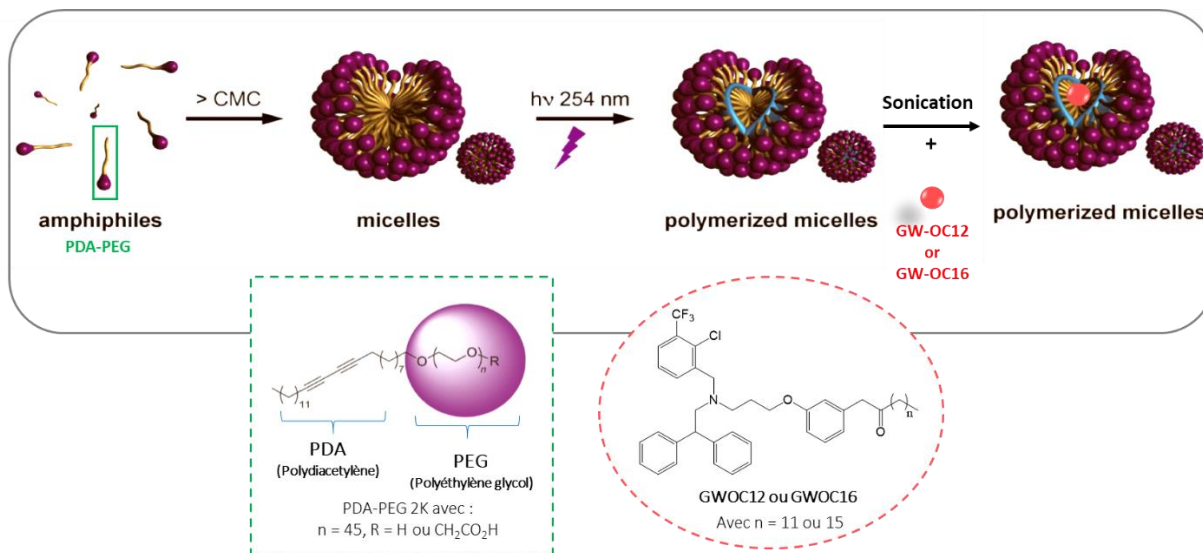


Figure 2.2 : Méthode de préparation des micelles et encapsulation des molécules de GW.

Les solutions mères ont été fournies à une concentration de 10 mg/mL de micelle avec ou sans de principe actif encapsulé à une concentration de 1 mg/mL. Les micelles ont été reprises dans l'eau ou le méthanol et le principe actif dans le chloroforme. Toutes les solutions mères de PDAPEG non polymérisées ont également été fournies à une concentration de 10 mg/mL. Les micelles ont été reprises dans l'eau afin d'obtenir une micelle dissociée en oligomère de 5 à 15 unités ou alors dans le méthanol pour être sous forme micellaire.

## II. MODES OPERATOIRES POUR LA DETECTION DES PRINCIPES ACTIFS SUR TISSUS

### 1. PREPARATION DES COUPES DE TISSUS

Pour la détection de la micelle encapsulant le GW, des expériences ont été réalisées sur coupes de foie et de cerveau de souris. Les coupes ont été réalisées à 12  $\mu\text{m}$  grâce à un cryostat avec une température de la chambre réglée à - 18 °C et de l'objet réglée à - 20 °C. Celles-ci ont ensuite été montées sur lame ITO et conservées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

### 2. EXTRACTION LIPIDIQUE POUR LES ESSAIS DE DEGRADATION CHIMIQUE ET ENZYMATIQUE

Des extraits lipidiques ont été réalisés à l'aide de la méthode d'extraction Folch [285]. Pour cela, 4 x 60 mg de foie ont été pesés puis placés dans 4 tubes Eppendorf. Les échantillons de foie doivent être

finement coupés pour être correctement soniqués dans les étapes suivantes. Pour 1 mg de tissu, 20 µL d'un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v) ont été ajoutés à chaque tube pour permettre l'extraction lipidique. Pour trois de ces tubes, du GW-OC12, du GW-OC16 ou les deux ont été ajoutés dans le volume d'extraction pour obtenir une concentration finale de 0,05 mg/mL. Les échantillons ont été mélangés à l'aide d'un vortex pendant une minute à puissance maximale avant d'être soniqués à la sonde à ultrasons (Vibracell, Bioblock scientific, Illkirch, France) pendant 6 x 30 secondes, Il est important ici de ne pas « faire chauffer » les échantillons pour obtenir un broyat homogène. L'extraction est ensuite poursuivie pendant deux heures sous agitation puis 1 µL d'H<sub>2</sub>O pour 10 µL de mélange a été ajouté aux échantillons. Le tout a ensuite été centrifugé à 10 000 g et à 4 °C pendant 15 minutes pour obtenir un disque protéique séparant les deux phases soit la phase supérieure qui est la phase aqueuse, et la phase inférieure qui est la phase organique et qui contient les lipides totaux. Ces phases ont donc été séparées puis évaporées sous azote pour ensuite être reprises dans un mélange CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (2:1, v/v) correspondant au volume d'extraction initial. La pureté de ces deux phases a été vérifiée par analyse MALDI - MS avec la matrice HCCA, 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL d'acétate de sodium.

Un autre protocole d'extraction a été appliqué sur un échantillon de foie dont la quantité de GW-OC16 a précédemment été dosé par LC - MS à 10 µM. Ces dosages ont été effectués par Robert Thai au SIMOPRO (CEA de Saclay). Des coupes d'une épaisseur de 12 µm ont été prélevées puis reprises dans 500 µL d'une solution de tampon phosphate (PBS : Phosphate Buffer Saline) pour 300 mg de tissus. 10 µL de cette solution ont ensuite été mélangés avec 40 µL d'acétone et placés 1 heure à - 20 °C. Le surnageant a été récupéré après centrifugation à 15 000 g pendant 15 minutes puis l'extraction a été effectuée une seconde fois dans les mêmes conditions. Le surnageant a cette fois-ci été évaporé avant traitement enzymatique.

### **3. ESSAIS DE DEGRADATION CHIMIQUE SUR LES EXTRAITS LIPIDIQUES**

Les essais préliminaires de dégradation chimique ont été réalisés sur des extraits lipidiques (0,1 mg) contenant 3 µg de GW-OC12 et GW-OC16, séparément ou en mélange. Pour cela, 30 µL des quatre extraits lipidiques réalisés sur le foie ont été évaporés puis repris dans 500 µL d'un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) avec ou sans NaOH à 0,25 N. Les échantillons ont ensuite été incubés 1 heure à 60 °C et 1,5 mL de chloroforme a été ajouté. Après avoir été vortexées et centrifugées à 3000 rpm pendant 15 minutes, les phases supérieures et inférieures des solutions ont été séparées et analysées par MALDI - MS avec la matrice HCCA à une concentration de 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v, + 1 mg/mL AcNa).

### **4. ESSAIS DEGRADATION ENZYMATIQUE DES LIPIDES INTERFERENTS**

Deux phospholipases différentes ont été utilisées : (1) les phospholipase C de *C. perfringens* (36 unités catalytiques pour 1mg de protéine) et celle de *B. cereus*, toutes deux reprises à 38 U/mL dans un



tampon Tris à 50 mM et à pH = 7,3 (ajusté avec de l'acide chlorhydrique) et (2) la phospholipase D de chou reprise à 146 U/mL dans un tampon acétate de sodium à 1 M et à pH = 5,6 (ajusté avec de la soude) (Figure 2.3).

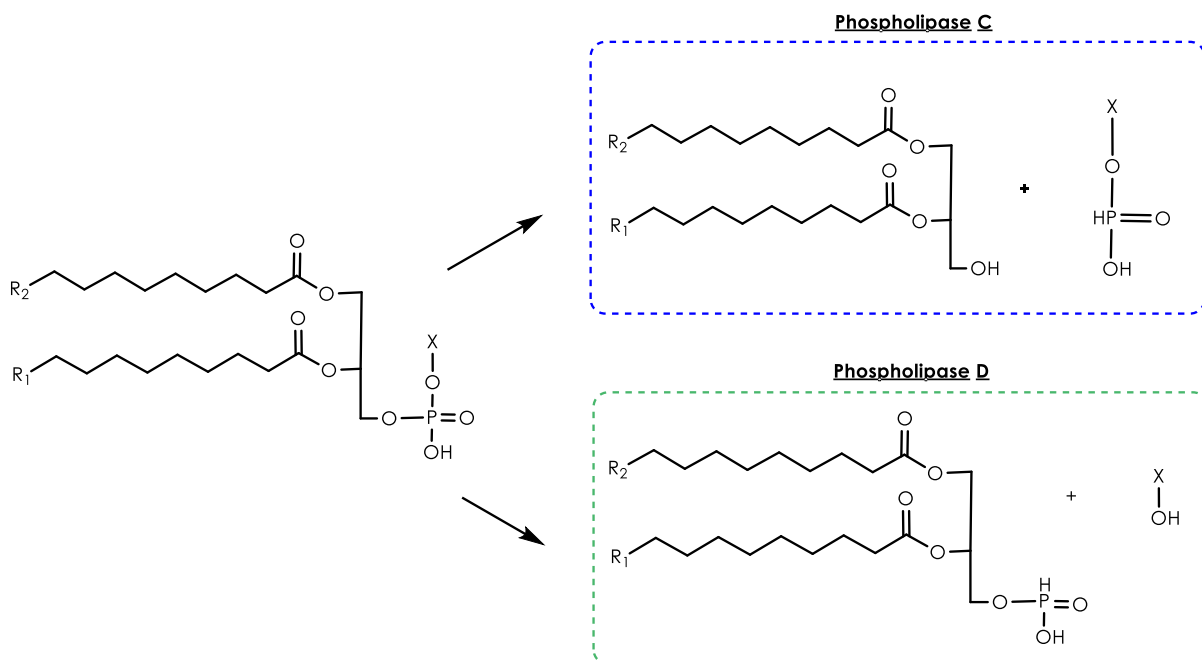


Figure 2.3 : Dégradation des phospholipides avec la phospholipase C ou D.

25  $\mu$ L des quatre extraits lipidiques ont ensuite été évaporés puis repris dans 25  $\mu$ L d'une solution contenant 0,95 U pour 6,3  $\mu$ g de lipides de phospholipase C. La réaction a été placée sous incubation une nuit entière à 37 °C avant d'être analysée par MALDI - MS.

Pour la phospholipase D, 250  $\mu$ L d'extraits lipidiques ont été évaporés puis repris dans 9  $\mu$ L de solution SDS à 50 mM, 18  $\mu$ L de tampon acétate de sodium, 0,8  $\mu$ L d'EtOH (17,9 % dans l'eau) et 64  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O. Ensuite 24  $\mu$ L de cette solution lipidique ont été mélangés à 3  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O et 1  $\mu$ L de phospholipase D à 20 U/mL soit 0,02 U pour 2  $\mu$ g de lipides. L'ajout de CaCl<sub>2</sub> est nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme. L'incubation a ensuite eu lieu à 30 °C pendant 10 minutes. Ce même protocole a également été utilisé sur les extraits de foies exposés au GW-OC16.

Pour la réalisation de la dégradation enzymatique sur tissu, les proportions de phospholipase D ont été ajustées car la quantité de lipides sur coupe était inconnue. Pour cela, une première solution a été préparée avec 27  $\mu$ L de tampon acétate de sodium à 1 M pH = 5,6 (ajusté avec NaOH), 0,8  $\mu$ L d'EtOH et 64  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O. Ensuite 20  $\mu$ L de cette solution ont été mélangés avec 9  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> et 3  $\mu$ L de phospholipase D. L'incubation a eu lieu à 30 °C pendant 10 minutes avant que les échantillons soient analysés par MALDI - MS avec la matrice HCCA, 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa.

## 5. PROTOCOLE DE DERIVATION DU GW3965

Des expériences de dérivation avec l'iodure de méthyle ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) ont été réalisées pour améliorer sa détection en MSI. Celles-ci ont premièrement été réalisées dans l'EtOH avec une équivalence molaire entre le  $\text{CH}_3\text{I}$  et le GW-OC16. Dans un deuxième temps, le  $\text{CH}_3\text{I}$  a été placé en excès à 1 M par rapport au GW-OC16 (**Figure 2.4**). Les solutions ont été agitées à 37 °C au Thermomixer® pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou une nuit d'incubation. Un second procédé a également été testé (**Figure 2.5**) pour la dérivation du GW. Pour ces essais, une solution de GW-OCH<sub>3</sub> à 20 mg/mL a été utilisée. 30 équivalents de  $\text{CH}_3\text{I}$  ont été ajoutés à 5 mg de GW-OCH<sub>3</sub> et le mélange a été placé sous argon dans des tubes scellés pendant une nuit à 50°C. Parallèlement, une seconde réaction a été effectuée en conditions dites « neat » soit pures sous argon dans des tubes scellés avec ajout direct de 200 équivalents de  $\text{CH}_3\text{I}$  sur 5 mg GW-OCH<sub>3</sub> évaporé. Ce mélange réactionnel a été incubé une nuit à température ambiante.

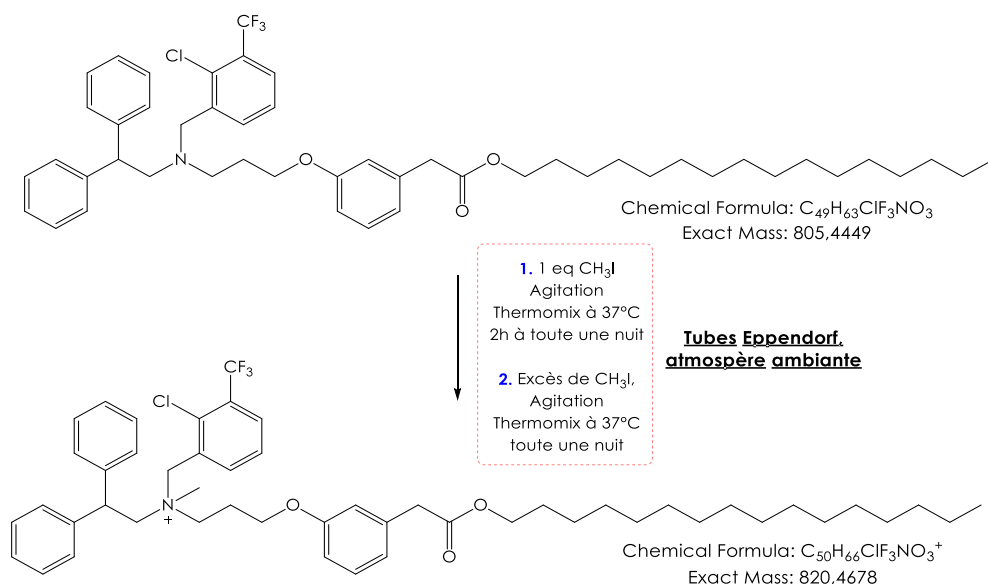


Figure 2.4 : Essais de méthylation de l'amine tertiaire du GW en conditions douces.

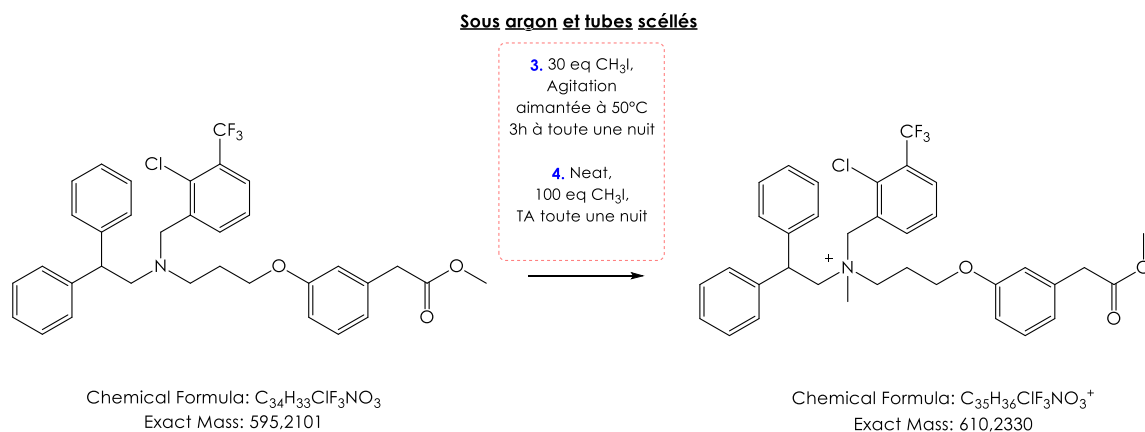


Figure 2.5: Dérivation du GW en conditions drastiques.

## C. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Afin d'analyser *in situ* par MSI les micelles et le principe actif encapsulé, la première étape a été de mettre au point une méthode de détection simultanée de ces 2 molécules par spectrométrie de masse. Pour cela, le principe actif et les micelles ont tout d'abord été analysés séparément pour permettre leur caractérisation précise. Pour chacune de ces molécules, un panel de matrices a été testé pour favoriser leur détection puis différents sels ont été utilisés pour favoriser l'ionisation de la micelle. Ensuite, les paramètres optimaux de détection de chacune de ces molécules ont été combinés afin de les détecter simultanément. Enfin, les molécules ont été analysées sur tissu. Tous les développements ont été effectués sur un MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme™ de chez Bruker.

### 1. ANALYSE DU PRINCIPE ACTIF PAR MALDI – MS

Dans cette étude, deux dérivés du GW3965 ont été utilisés. Le GW-OC12 et le GW-OC16 ont été modifiés par l'ajout d'une chaîne de 12 ou 16 carbones afin de les rendre plus lipophiles et favoriser leur encapsulation. Les développements MALDI - MS ont été effectués sur ces deux molécules en parallèle.

Les études sur le GW3965 ont débuté par la mise au point d'une méthode MALDI - MS pour la détection du GW-OC12 sur plaque MALDI MTP ground steel (Bruker, Allemagne). Les optimisations ont été réalisées à partir d'une solution à une concentration de 0,1 mg/mL dans un mélange CHCl<sub>3</sub>/MeOH, 50:50, v/v. Les matrices HCCA, THAP, DHB, 1,5-DAN, 9AA, SA et le dithranol à 10 mg/mL dans une solution ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % TFA) (50:50, v/v) ont été testées et comparées afin d'obtenir une ionisation optimale du GW-OC12. Les tests de détection ont été réalisés en mode positif et négatif d'ionisation en mode réflectron, une accumulation de 1000 tirs sommés par spectre et un délai d'extraction de 100 ns.

La détection du GW-OC12 en mode négatif d'ionisation n'a pas permis d'observer des ions caractéristiques de cette molécule. Seul le mode positif d'ionisation a révélé la présence d'ions issus du GW-OC12 avec les matrices HCCA, DHB, THAP, DHAP, DAN et dithranol (**Figure 2.6**). Plus particulièrement, le GW est principalement détecté sous une forme protonnée [M+H]<sup>+</sup> avec les matrices DHB, dithranol, HCCA, DHAP et THAP. Cependant, une intensité plus faible est observée avec les matrices DHB et dithranol. De plus, le massif isotopique de l'ion *m/z* 750,3 reflète la présence d'un atome de chlore (<sup>35</sup>Cl et <sup>37</sup>Cl). La matrice DAN a favorisé quant à elle la formation de l'ion [(M+H)-HCl]<sup>+</sup> et n'a donc pas été retenue pour la suite de l'étude. La présence d'un ion [M+Na]<sup>+</sup> a également été observée avec les matrices DHAP et HCCA (**Figure 2.6**).

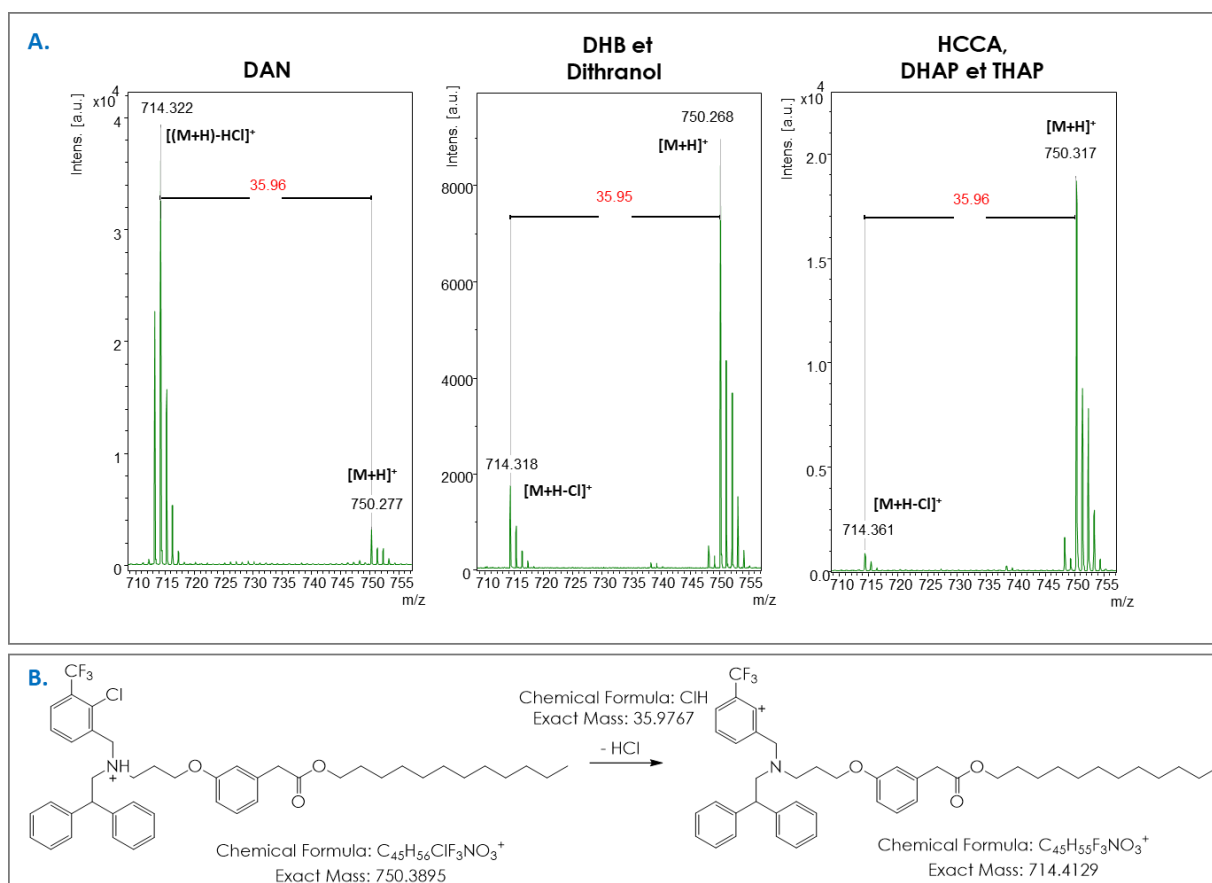


Figure 2.6 : Spectres MALDI - MS du GW-OC12 selon les matrices MALDI.

Analyse MALDI - MS du GW-OC12 avec les matrices DAN, Dithranol, DHB, HCCA, DHAP et THAP à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 50:50, v/v) sur plaque MTP ground steel.

Suite à ces premiers tests de détections, les conditions de solvants ont donc été optimisées pour les matrices DHAP, THAP, DHB, HCCA et dithranol afin d'obtenir des dépôts plus homogènes et favoriser l'ionisation. Toutes ces matrices ont donc été reprises à 10 mg/mL selon différentes proportions de solvants soit 50:50, 70:30 et 90:10 (v/v) pour les conditions ACN/H<sub>2</sub>O et EtOH/H<sub>2</sub>O. Après l'acquisition de 10 spectres par condition, la variation des données obtenues pour chaque ion protoné [M+H]<sup>+</sup> de chaque matrice a été comparée (Figure 2.7). Le choix de la condition optimale a été fait en se basant sur les intensités les plus élevées obtenues indiquant les capacités de dissolution de la matrice et l'aspect des dépôts. Ces paramètres, confrontés aux capacités d'ionisation de la matrice pour le GW3965 ont permis de sélectionner les matrices HCCA et THAP pour les analyses ultérieures. En effet, celles-ci permettent une ionisation supérieure du GW3965 comparée à l'utilisation de la matrice DHB ou dithranol. De plus, des analyses effectuées en parallèle ont montré que la matrice DHAP sublime [286] dans les conditions de vide de la source (1x10<sup>-7</sup> mbar) du MALDI - TOF/TOF Ultraflextreme™, cette matrice n'a donc pas été retenue. Les conditions de solvants pour la matrice HCCA et THAP ont donc été sélectionnés avec les proportions de 70:30 en condition ACN/H<sub>2</sub>O et de 70:30 en conditions EtOH/H<sub>2</sub>O, respectivement, car ces conditions ont permis d'obtenir des dépôts plus homogènes.

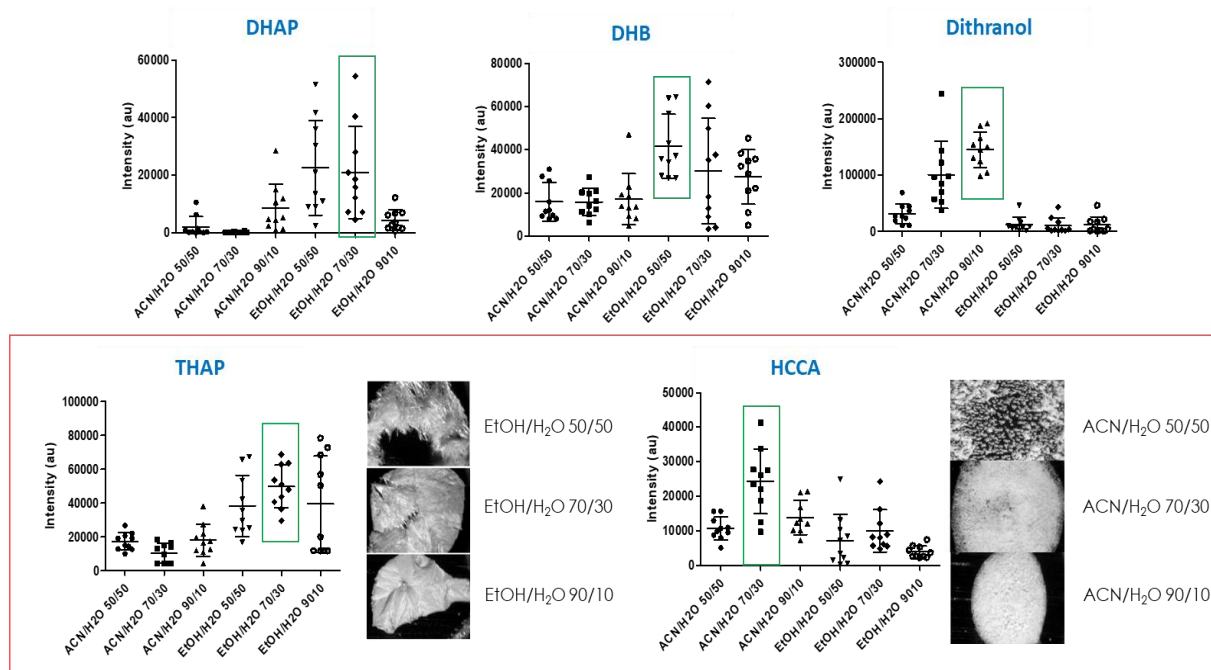


Figure 2.7 : Optimisation des conditions de matrices.

Toutes les matrices ont été pesées à 10 mg/mL puis analysées selon les conditions ACN/H<sub>2</sub>O ou EtOH/H<sub>2</sub>O en proportion 50:50 70:30 et 90:10. L'intensité représentées sur les graphique correspond aux ions [M+H]<sup>+</sup> des matrices correspondantes. Les images associées aux matrices THAP et HCCA montre la cristallisation de la matrice selon les conditions de solvants utilisés.

Suite à ces premiers tests réalisés avec le GW-OC12, la méthode a pu être transposée au GW-OC16 en présence de la matrice HCCA. Les ions [M+H]<sup>+</sup>, [M+Na]<sup>+</sup> ainsi que la perte d'acide chlorhydrique ont de nouveau été observés pour le GW-OC16 aux *m/z* respectifs de 806,4 ; 828,4 et 770,4. Un ion supplémentaire a cependant été observé à *m/z* 794,5 correspondant à l'ion [(M+H-HCl)+Na]<sup>+</sup> (Figure 2.8, A.).

Suite à ces premières analyses par MALDI - MS, des analyses MS<sup>2</sup> ont ensuite été réalisées, avec la matrice HCCA (Figure 2.8, B. Erreur ! Source du renvoi introuvable.). Les fragmentations du GW-OC12 et du GW-OC16 ont fait apparaître deux ions fragments caractéristiques communs : le *m/z* 181,1 correspondant à l'ion 1,1-diphenylethan-1-ylum (pic de base) et le *m/z* 402,2 correspondant à la perte du 2-chloro-1-methyl-3-(trifluoromethyl)benzène et de la chaîne grasse. De plus, des ions fragments spécifiques ont également été détectés à *m/z* 570,3 et *m/z* 626,4 et correspondant à la perte du 2-chloro-1-methyl-3-(trifluoromethyl)benzène donnant lieu à l'ion N-(2,2-diphenylethyl)-3-(3-(2-(dodecyloxy)-2-oxoethyl)phenoxy)-N-méthylpropan-1-aminium.

On observe également sur les spectres correspondant au GW-OC16 des ions similaires à ceux de GW-OC12 avec la présence des ions *m/z* 750,4 et 714,3. Des ions fils identiques sont obtenus après fragmentation de ces ions parents pour le GW-OC12 et le GW-OC16.

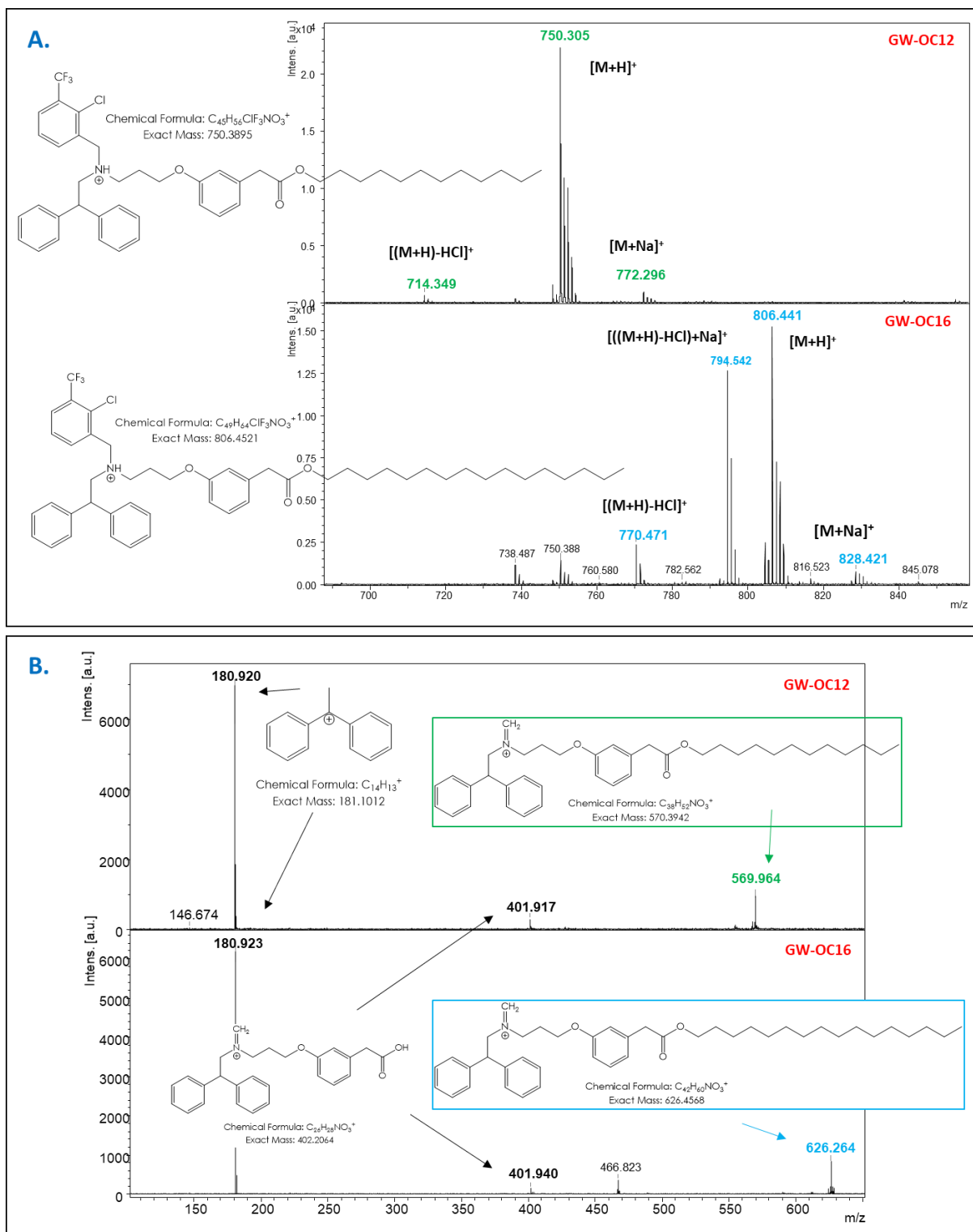


Figure 2.8 : Comparaison des spectres MALDI - MS et MALDI - MS/MS du GW-OC12 et du GW-OC16.

A. Analyses MALDI - TOF - MS et B. Analyses MALDI - TOF - MS/MS du GW-OC12 et du GW-OC16 avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v).

## 2. ANALYSE DES MICELLES PAR MALDI – MS

Après optimisation de la détection des principes actifs GW-OC12 et GW-OC16, des tests de détection concernant la micelle polymérique ont été réalisés. Comme précédemment, différentes matrices ont été testées afin de détecter au mieux les micelles puis les conditions de la préparation d'échantillon ont été optimisées afin de favoriser ce profil. La signature de la micelle a ensuite été validée par comparaison avec des PDAPEG libres et des micelles dialysées pour enfin optimiser les paramètres MS de la méthode de détection MALDI.

### a. Analyses MALDI-TOF des micelles PDAPEG

Les analyses MALDI - MS de la micelle polymérisée composée de PDAPEG ont été effectuées en modes d'ionisation positif et négatif et en modes réflectron et linéaire. Les matrices identiques à celles de la détection des principes actifs GWO-C12 et GW-OC16 ont été utilisées, i.e. HCCA, THAP, DHB, DAN, 9AA, SA et dithranol (10 mg/mL dans une solution ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 50:50, v/v). Les micelles ont d'abord été analysées seules à une concentration de 0,1 mg/mL sur plaque MTP Ground Steel (Bruker, Allemagne) et ont pu être détectées en mode positif d'ionisation et en mode réflectron avec toutes ces matrices. Cependant, les matrices DHB, HCCA et THAP permettent d'obtenir des signaux supérieurs à  $1 \times 10^4$  a.u. (arbitrary unit) contrairement aux matrices DAN, SA, 9AA, DHAP et dithranol (**Figure 2.9**). Après optimisation, la méthode d'acquisition a donc été fixée en mode réflectron avec une accumulation de 1000 tirs par spectre.

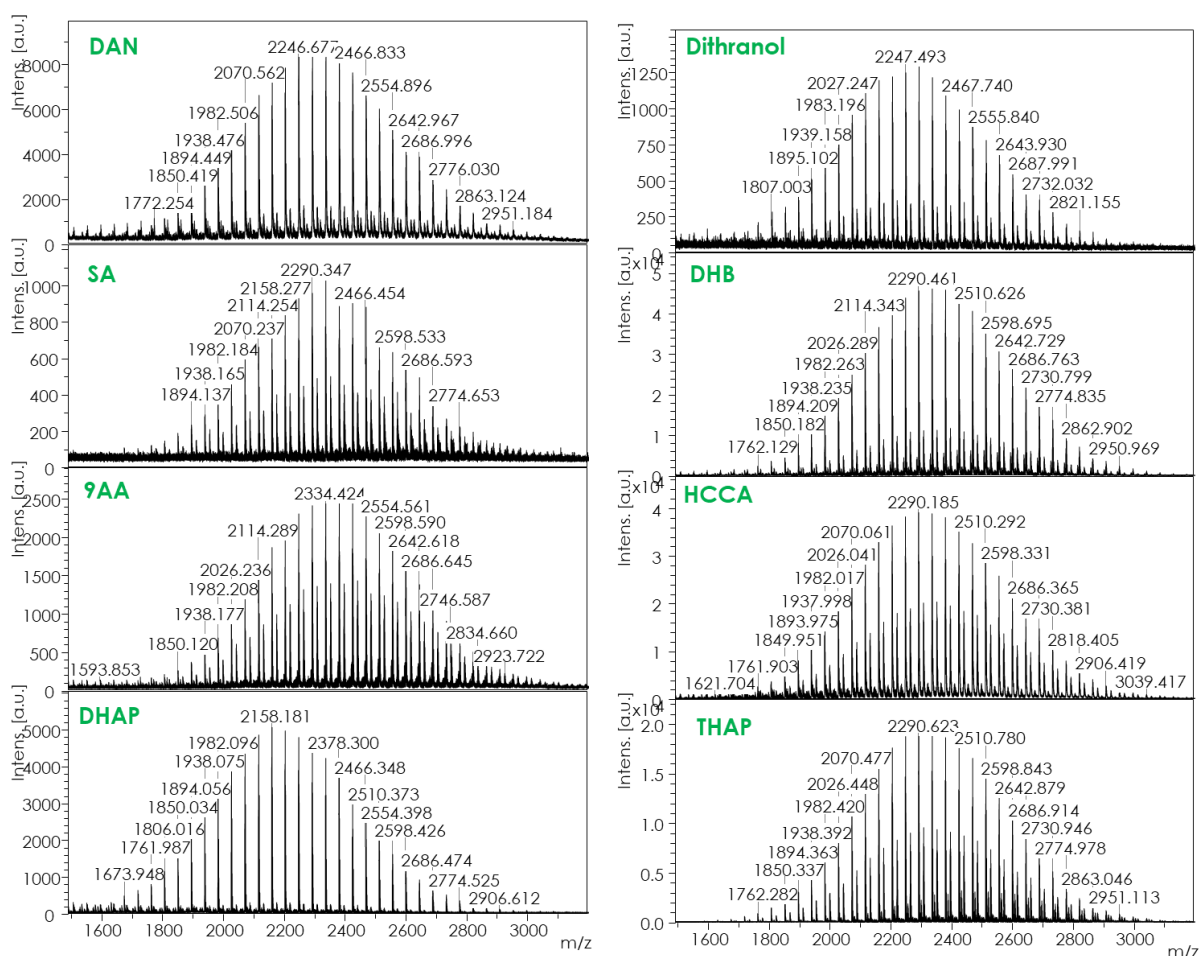


Figure 2.9 : Détection des micelles selon les matrices MALDI

Analyse MALDI - MS de la micelle avec les matrices DAN, Dithranol, SA, DHB, 9AA, HCCA, DHAP et THAP à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 50:50, v/v) sur plaque MTP ground steel.

Chacune de ces matrices a permis d'observer une signature PEG provenant des monomères de PDAPEG qui composent la micelle. Le PDAPEG utilisé ici a été synthétisé à partir d'un PEG 2000 constitué de 45 unités monomériques et qui possède une masse de  $m/z$  2341,5 après ajout du groupement polydiacétylène. Ce profil PDAPEG est donc détecté en MALDI - MS pour la micelle polymérique et est composé d'ions  $[M+Na]^+$  et  $[M+K]^+$  avec une intensité plus importante pour les adduits  $Na^+$ . Les ions observés et provenant de cette signature possèdent une différence de masse de 15,95 Da soit la différence entre les deux adduits. De plus, les ions correspondant aux adduits  $[M+Na]^+$  ou  $[M+K]^+$  possèdent une différence de masse de 44 Da caractéristiques des unités  $C_2H_2O$  composant le PEG. Prenant uniquement en compte les adduits  $[M+Na]^+$ , le spectre a également permis de remonter au monomère principal du PDAPEG qui a donc été détecté à  $m/z$  2378,5 (Figure 2.10). Ces données permettent ainsi de valider que le profil observé correspond bien à la signature de la micelle de PDAPEG polymérisé. Ces mêmes adduits ont été observés en analyses MALDI-TOF par J. Kemptnera *et al.*, 2010 [287] pour le développement de méthodes MALDI - MS afin d'analyser des monomères uniquement composés de PEGs réactifs dans des applications



pharmaceutiques. Szyszka *et al.*, 2011 [288] ont retrouvé ces mêmes spectres dans une étude visant à quantifier des monomères de PEG dans des surfactants éthoxylés.

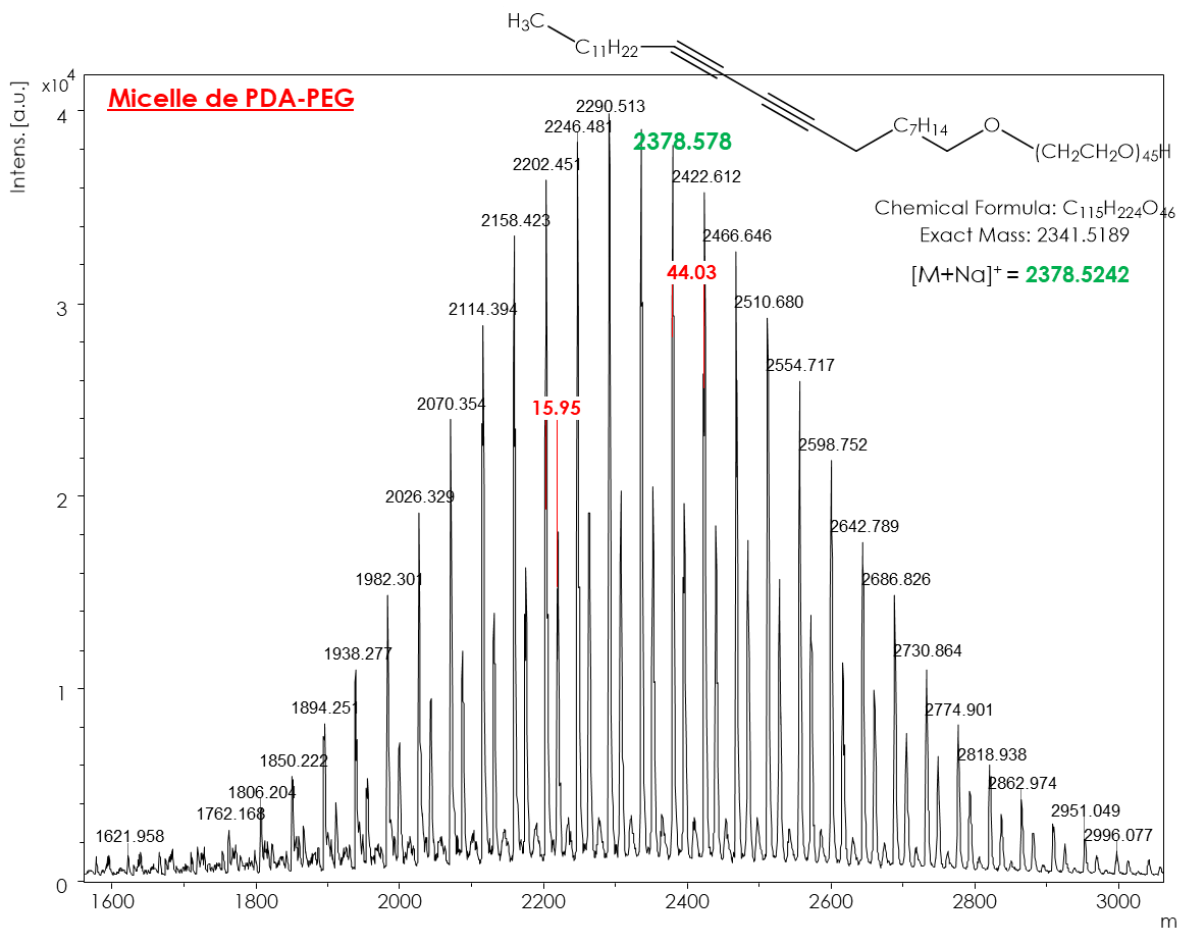


Figure 2.10 : Spectre MALDI - MS de la signature correspondant à la micelle de PDAPEG.

Analyse MALDI - MS sur plaque MTP ground steel de la micelle avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 50:50, v/v) en ionisation positive et avec le mode d'acquisition reflectron. Accumulation de 1000 tirs par spectre avec un DIE de 250 ns et une fluence laser fixée à 70 %.

Selon que les micelles polymériques sont reprises dans l'eau ou dans le méthanol, elles peuvent se présenter sous une forme associée ou dissociée. Malgré une potentielle dissociation pouvant être induite par l'impact laser, des études ont été réalisées concernant l'incidence de ces deux solvants de reprise sur le profil MS des micelles obtenu. En effet. Des analyses MALDI - MS ont donc été effectuées après reprise des micelles dans ces deux solvants et avec la matrice HCCA. Pour chaque matrice utilisée, le signal est systématiquement plus faible lorsque les micelles sont sous forme dissociée et donc reprises dans le méthanol. Les résultats sont exposés en Figure 2.11 avec uniquement les 3 matrices permettant d'obtenir les signaux les plus intenses du profil de la micelle à savoir les matrices DHAP, HCCA et DHB. Sachant que les micelles sont associées en milieu aqueux, une intensité plus faible suite à la difficulté de désorber de plus gros objets en MALDI pouvait être attendue. Cependant, il semblerait ici que la dissociation des micelles en plusieurs oligomères de 5 à 15 unités en solution 100 % MeOH rende la détection du profil PEG plus difficile.

En effet, le MeOH étant moins polaire que l'eau, ce solvant ne permet pas une ionisation aussi efficace que celle obtenue en solution aqueuse en analyse MALDI.

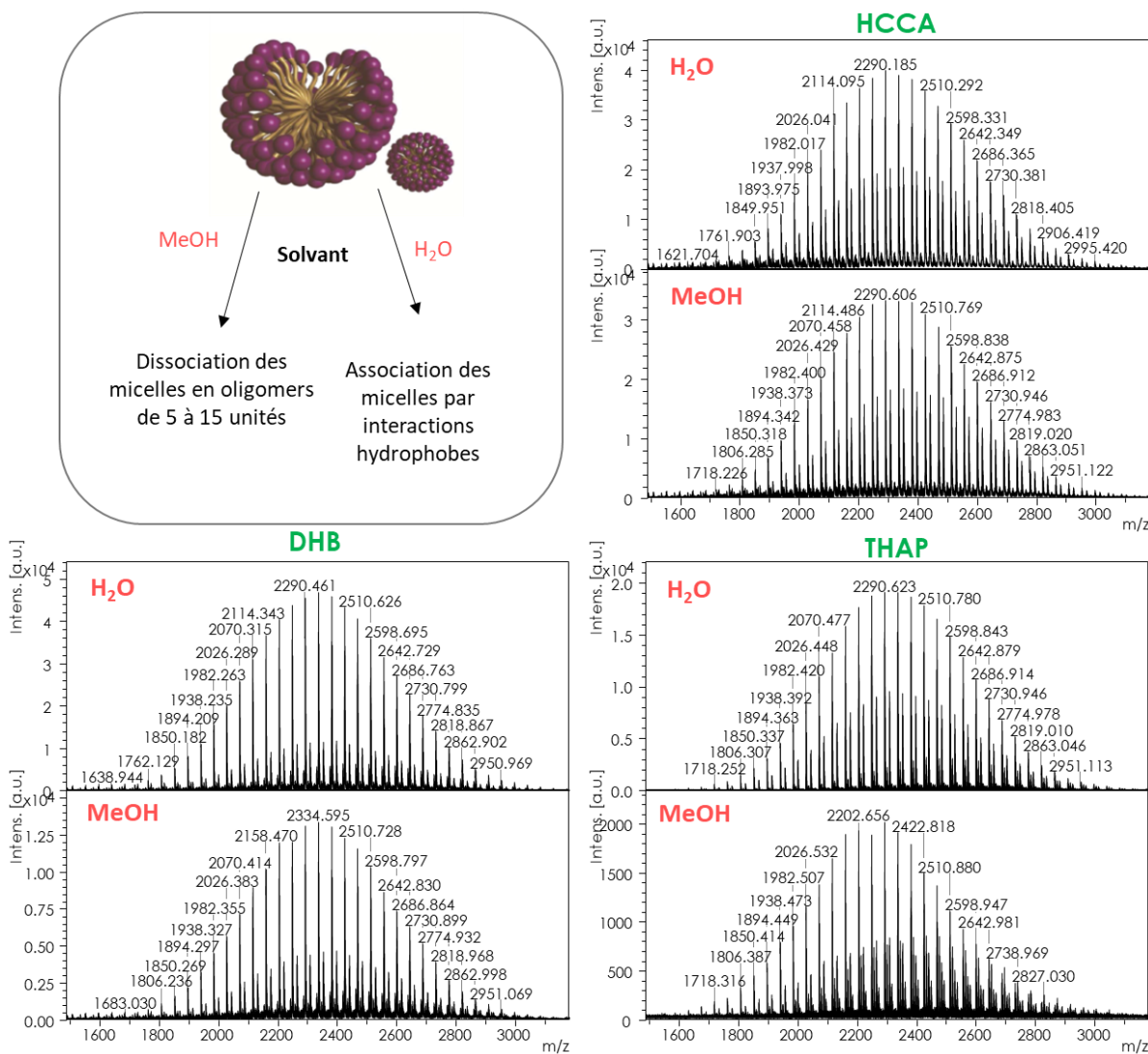


Figure 2.11 : Effet du solvant de reprise sur la signature de la micelle.

Analyses MALDI - MS sur plaque MTP ground steel des micelles PDAPEG avec les matrices HCCA, THAP et DHB à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA), 50:50, v/v). La micelle PDAPEG a été reprise soit dans une solution 100 % MeOH ou 100 % H<sub>2</sub>O à une concentration de 0,1 mg/mL. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser fixée à 70 %.

Ces tests de détection ont montré que la matrice HCCA permettait d'obtenir de meilleures performances d'ionisation de la micelle et des principes actifs. En effet, cette matrice induit ici une meilleure ionisation de la micelle polymérique que la THAP et elle permet également une détection optimale du GW. La matrice HCCA a donc été sélectionnée et la matrice DHB a été écartée car elle provoque une ionisation

plus faible du GW3965 que l'HCCA. Dès lors que la matrice et les conditions de solvants ont pu être sélectionnées, l'optimisation de la détection du profil de la micelle a été entreprise.

#### b. Optimisation du profil d'adduits de la micelle

Avec une signature claire des micelles polymériques et suite au choix pertinent de la matrice, une optimisation des sels ajoutés à la matrice HCCA a ensuite été réalisée afin d'obtenir un seul massif d'adduits. Différents sels ont donc été évalués tels que l'acétate de sodium, l'acétate de lithium [289], le chlorure de potassium, le sulfate de cuivre ou le nitrate d'argent. Ces sels ont premièrement été ajoutés à une concentration de 1 mg/mL au solvant de la matrice. Parmi ces sels, l'acétate de sodium, l'acétate de lithium et le chlorure de potassium ont semblé donner les meilleurs résultats. De plus, l'ajout d'acétate de sodium (**Figure 2.12, A.1. et A.2.**) ou de chlorure de potassium (**Figure 2.12, A.4. et A.5.**) a permis d'observer un seul massif d'adduits sur les spectres de masse contrairement à l'acétate de lithium (**Figure 2.12, A.3. et A.2.**) ou une faible proportion d'ions  $[M+Na]^+$  est encore observée. L'ajout d'acétate de sodium générant une intensité plus importante du signal, les expérimentations suivantes ont été réalisées dans ces conditions.

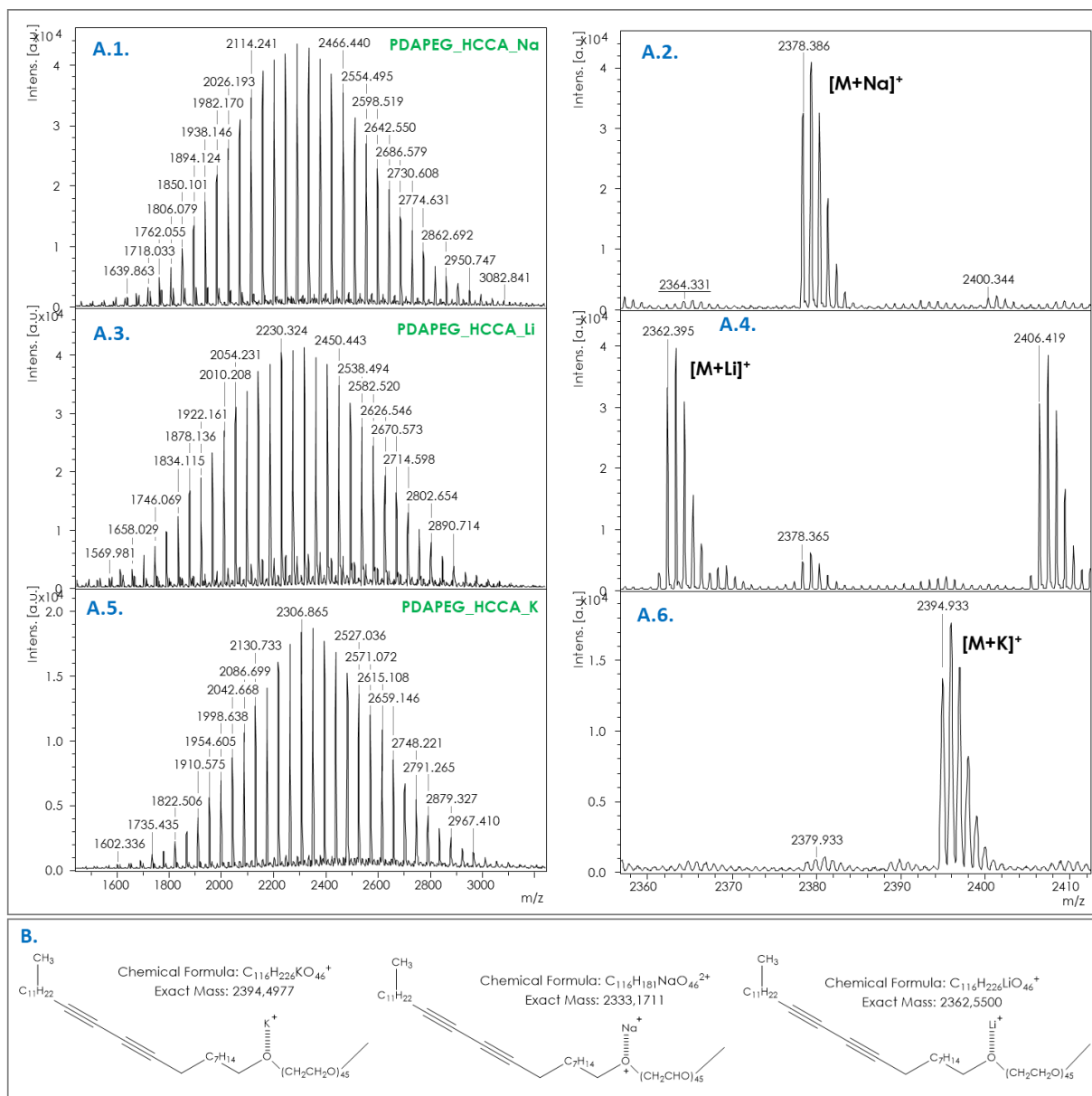


Figure 2.12 : Effet de l'ajout de sels sur la signature PEG.

A. Analyses MALDI - MS des micelles PDAPEG à 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) et 1 mg/mL de AcNa (A.1. et A.2.), de AcLi (A.3. et A.4.) et de KCl (A.5. et A.6.). B. Formules du polymère PDAPEG avec les adduits Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Li<sup>+</sup>. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser fixée à 70 %.

Les tests suivants ont consisté à évaluer les effets de la concentration de l'acétate de sodium sur le massif observé de la micelle. Pour cela, 3 concentrations ont été ajoutées à la matrice soit 0,1 ; 1 et 10 mg/mL. La concentration en sel ne semble pas avoir un effet sur l'intensité du massif PEG représentant les micelles (Figure 2.13). La concentration en acétate de sodium a donc été fixée à 1 mg/mL, soit la concentration intermédiaire.

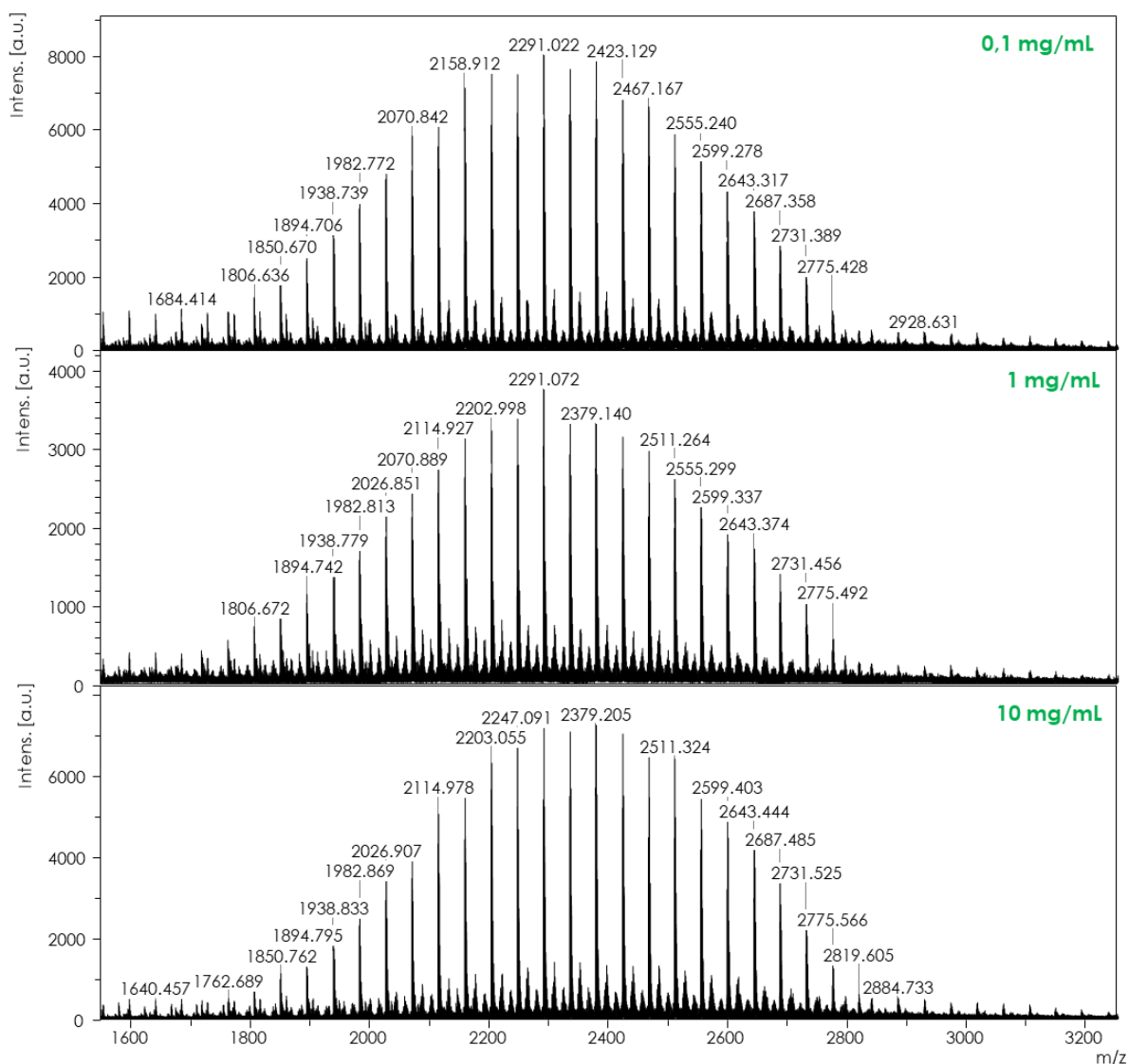


Figure 2.13 : Analyses MALDI - MS des micelles encapsulant un principe actif selon la concentration d'acétate de sodium.

Spectres MALDI - MS des micelles PDAPEG sur plaque MTP ground steel selon la concentration en acétate de sodium ajoutée à 0,1 ; 1 ou 10 mg/mL à la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v + 1 mg/mL de AcNa). Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser fixée à 70 %.

La suite des expériences de validation et d'optimisation de la méthode de détection de la micelle ont donc été réalisées avec une concentration de 1 mg/mL d'acétate de sodium incorporée au solvant de la matrice HCCA (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v).

### c. Spécificité de la signature de la micelle et optimisation des paramètres MS

Les protocoles de synthèse des micelles polymérisées de PDAPEG nécessitent des étapes de polymérisation et de sonication pour l'encapsulation du GW3965. Pour rappel, les monomères de PDAPEG sont d'abord placés en condition micellaire critique afin de former des micelles. Ces micelles sont ensuite

assemblées par irradiation à la lumière UV (254 nm). Cette étape de photopolymérisation conduit à la formation de liaisons covalentes en 1-4 entre les unités amphiphiles des chaînes polydiacétylène des monomères. Enfin, le GW3965 est encapsulé au sein des micelles grâce à une étape de sonication. Les solutions obtenues après chacune de ces étapes ont donc été analysées pour s'assurer que la signature obtenue provient bien de la micelle et non de potentiels PDAPEG libres restant. De plus, une étape de dialyse a été réalisée pour filtrer les micelles polymérisées des PDAPEG restés libres et le dialysat a également été analysé par MALDI - MS.

Ces analyses ont uniquement été effectuées avec la matrice HCCA à une concentration de 10 mg/mL (EtOH/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v, 1 mg/mL de AcNa). Les spectres du PDAPEG seul, du PDAPEG soniqué, de la micelle polymérisée et soniquée et de la micelle polymérisée, soniquée et dialysée ont été comparés (Figure 2.14).

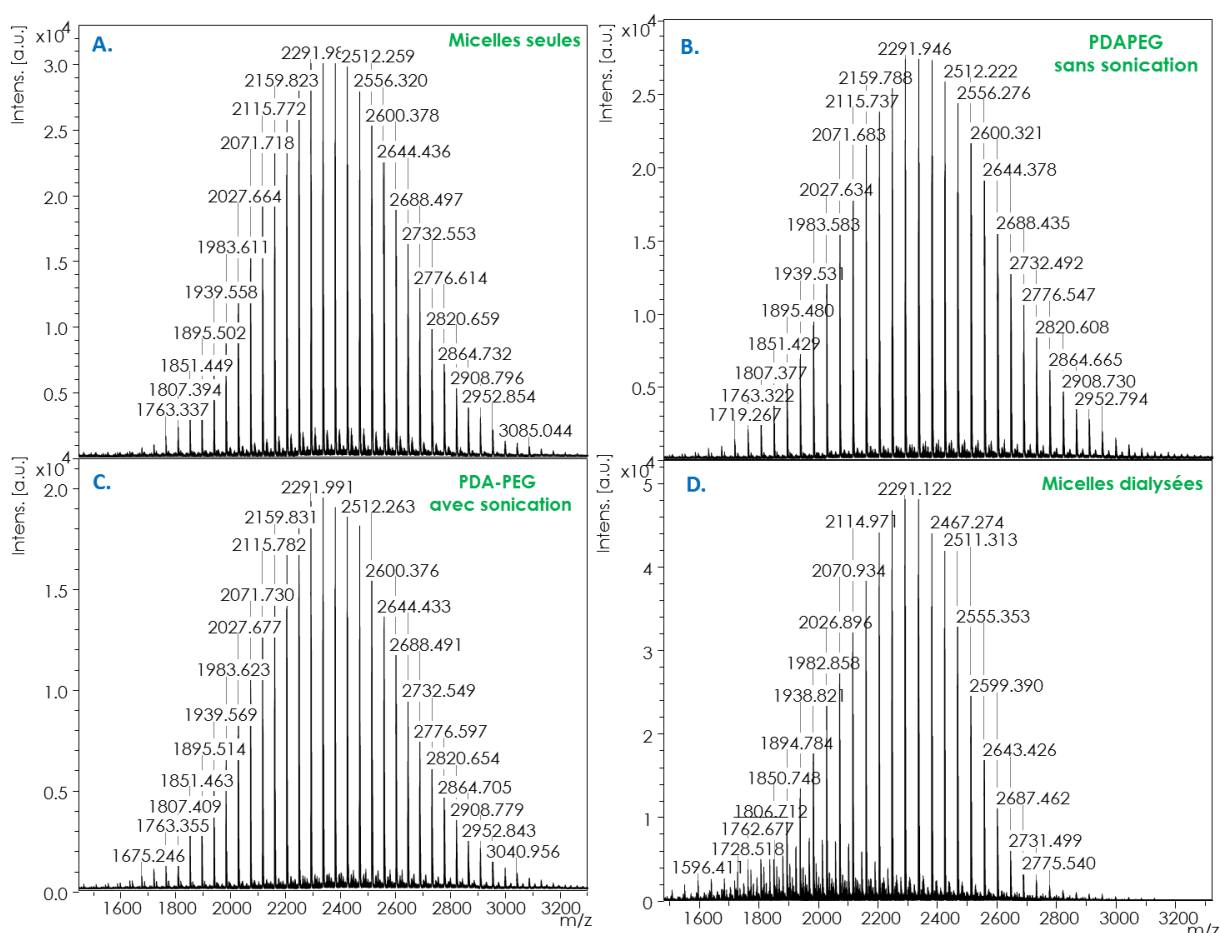


Figure 2.14 : Comparaison du profil PEG selon les traitements de la micelle.

Analyses MALDI - MS des micelles PDAPEG (A.), de PDAPEG non polymérisées sans (B.) et avec sonication (C.) ainsi que des micelles dialysées (D.) à 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v + 1 mg/mL de AcNa) et sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser fixée à 70 %.

Chaque spectre acquis correspond à la signature de la micelle polymérisée et soniquée. Si la signature des PDAPEG non polymérisés correspond à celle de la micelle polymérisée, soniquée et dialysée, cela confirme que la signature analysée provient effectivement de monomères de PDAPEG qui n'ont pas été polymérisés et qui sont incorporés à la micelle. Ce test permet donc de confirmer la présence caractéristique de micelles via l'observation de cette signature PDAPEG. De plus des analyses en ESI-QTOF ont été réalisées et ont également permis l'observation des massifs de monomère de PDAPEG non polymérisée mais pas de la micelle entière.

Les paramètres d'acquisition MS ont ensuite été optimisés. Tout d'abord, le délai d'extraction a été modifié de 50 à 350 nanosecondes et des variations dans la distribution du profil ont été observées. En effet, un dédoublement du massif PDAPEG est observé avec des différences de masse de 44 entre  $m/z$  1200 et 1900 et fonction de la diminution du temps d'accumulation en source. (**Figure 2.15**). Ce massif pourrait provenir d'un effet de pyrolyse entraîné par la source laser ou d'une fragmentation du PDAPEG en source. Plus particulièrement à 50 ns, un troisième massif semble même apparaître entre  $m/z$  600 et 1100. De plus, l'intensité la plus importante a été observée à  $1,25 \times 10^4$  à 150 ns. Cette intensité diminue de 150 ns à 50 ns et de 150 ns à 350 ns. La variation dans les délais d'extraction permet de mieux visualiser l'une ou l'autre des deux distributions mais ne contribue pas à leur formation. Ce type de spectre a également été observé par R. P. Lattimer, 2000 [290], les auteurs ont proposé un mécanisme de décomposition radicalaire suite à la pyrolyse de PEG 2000. A. Marie *et al.*, 2000 [291] ont proposé cette même interprétation mais suite à une pyrolyse de PEG 6000 induite en source par la température du laser. Les auteurs ont proposé comme hypothèse que les oligomères PEG neutres de masses élevées désorbés se fragmentent pour donner des oligomères de masses inférieures qui sont ensuite ionisés par désolvatation des agrégats.

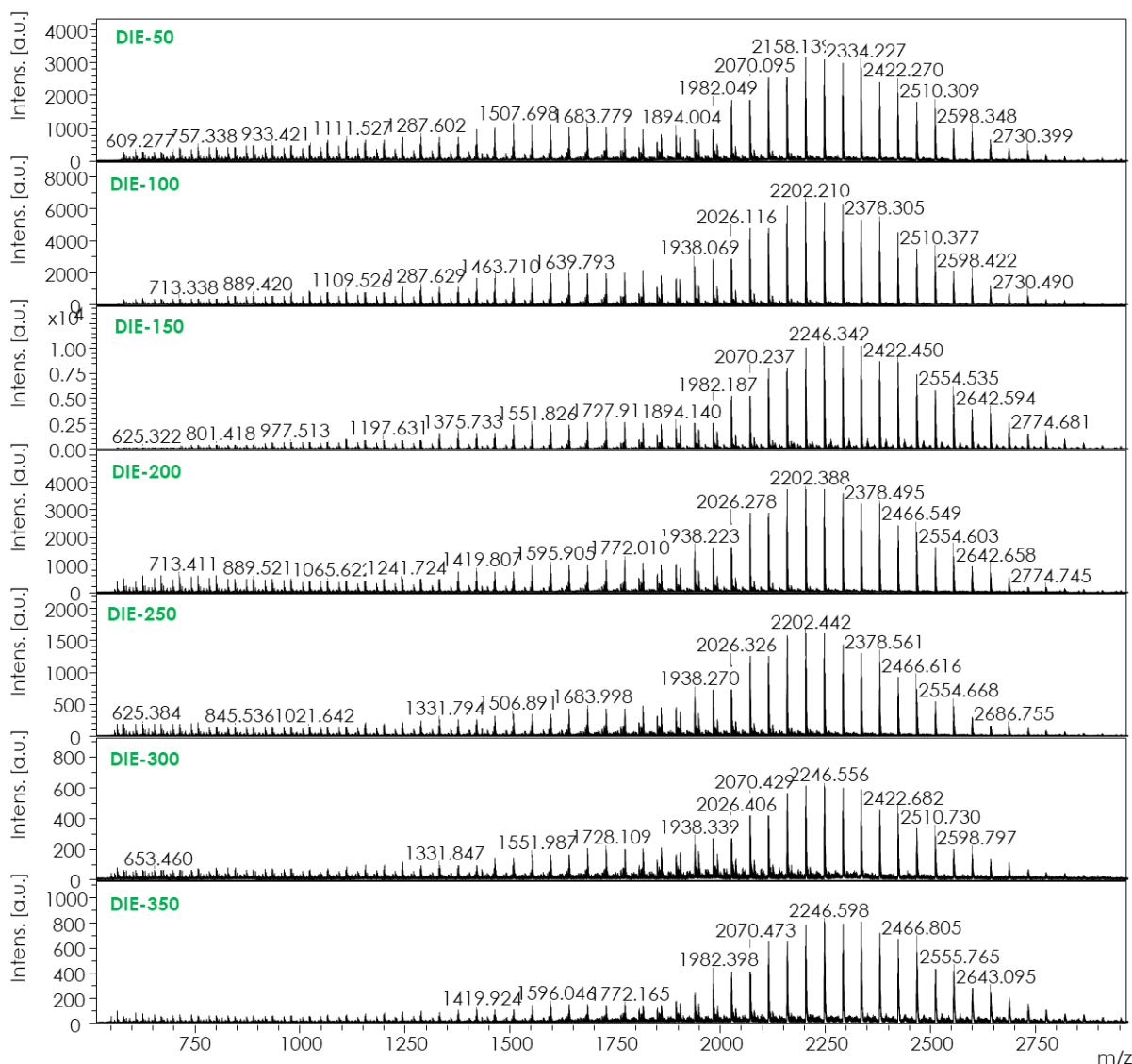


Figure 2.15 : Effet du délai d'extraction pour la signature de la micelle.

Variation du délai d'extraction de 50 à 350 nanosecondes lors d'analyses MALDI - MS des micelles à 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) et 1 mg/mL de AcNa sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 spectres une fluence laser fixée à 70 %.

En plus de la variation du délai d'extraction, l'effet de l'augmentation de la fluence a également été évalué. Après analyse, l'apparition des produits de dégradation du PEG en fragments de masses inférieures a également été observée à partir d'une fluence laser de 65 % (Figure 2.16). L'apparition de ce massif à des fluences plus élevées confirmerait la fragmentation du PDAPEG en source. S. J. Wetzela *et al.* [292] ont également observé en 2004 un phénomène de modification du massif suite à une étude de l'effet de l'énergie matricielle et laser sur quatre polymères synthétiques de faible polydispersité et de stabilité thermique variable, dont le PEG. Néanmoins, ils ont davantage observé un décalage du poids moléculaire moyen de la micelle qu'un dédoublement du massif. En effet, selon les polymères analysés les réactions observées face aux variations de laser et de matrices peuvent différer en raison d'une stabilité thermique variable du



polymère. Ce phénomène pourrait ici expliquer les différences observées entre la micelle et le PDAPEG non polymérisé qui semble donc plus stable vis-à-vis de l'énergie du laser (Figure 2.17).

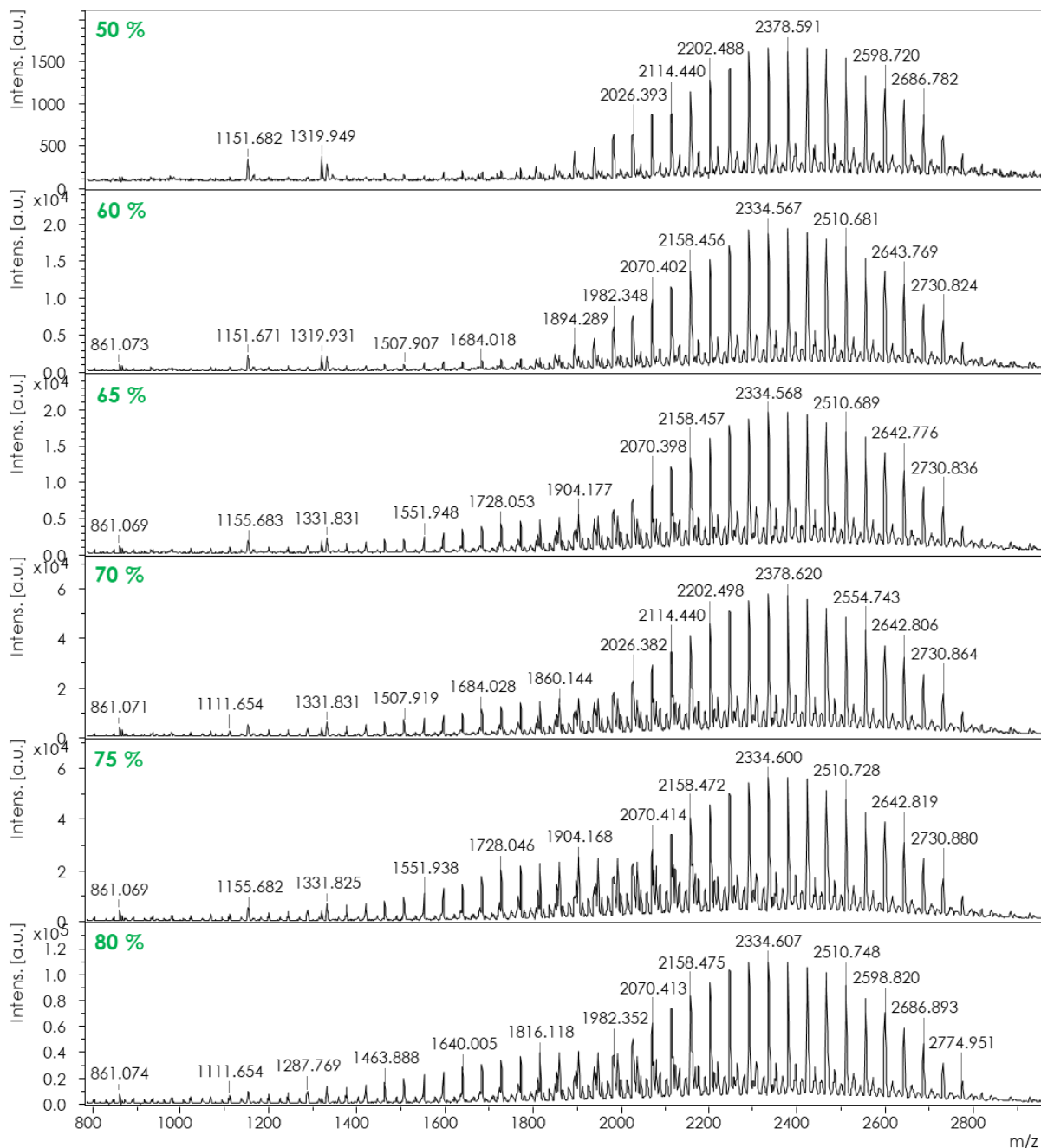
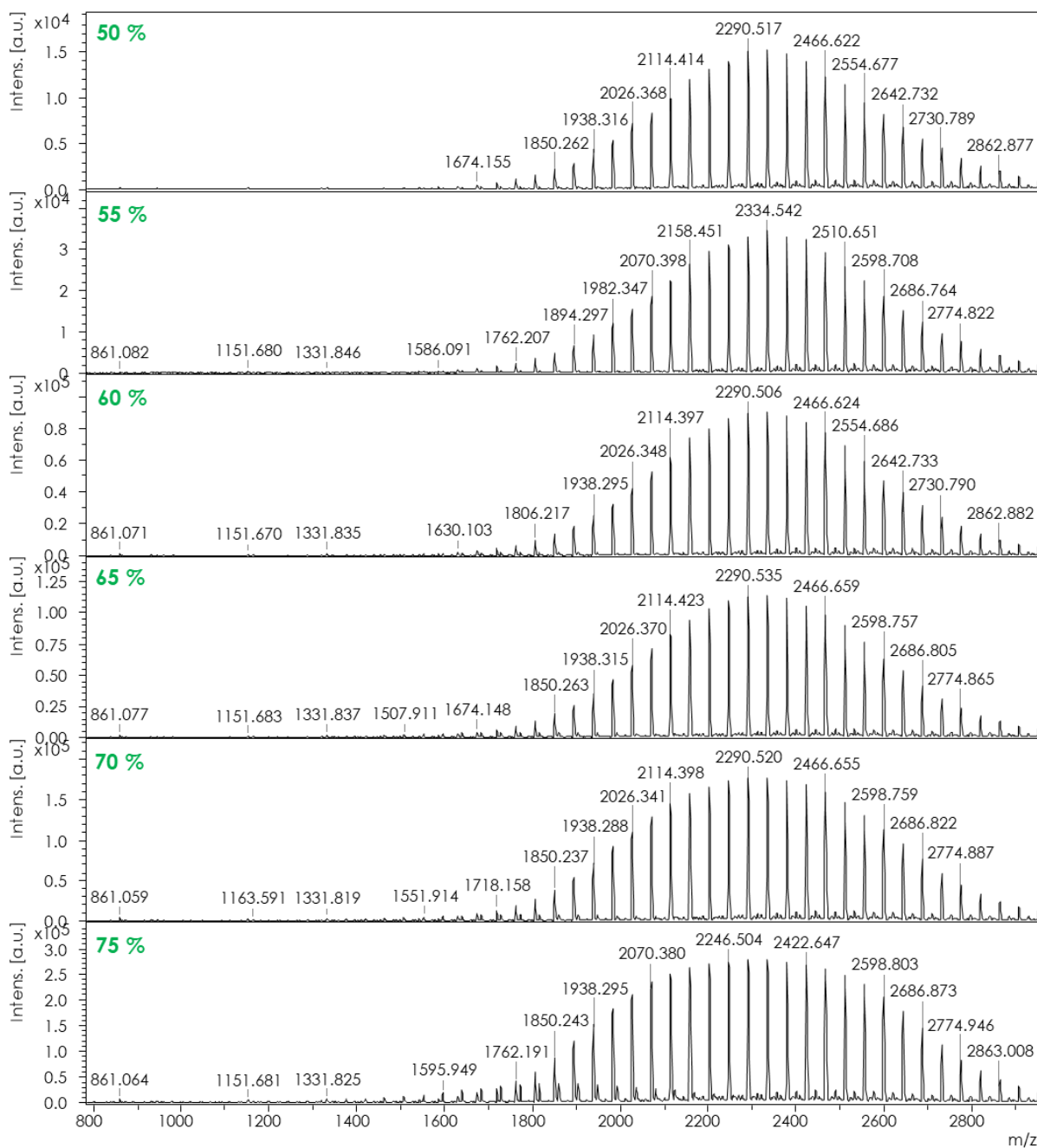


Figure 2.16 : Spectre MALDI - MS de la micelle en fonction de la fluence laser.

Variation de la fluence de 50 % à 75 % lors des analyses MALDI - MS des micelles à une concentration de 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v + 1 mg/mL de AcNa) et avec un délai d'extraction de 250 ns sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre et un DIE de 250 ns.



**Figure 2.17 : Variation du signal PDAPEG selon la fluence laser.**

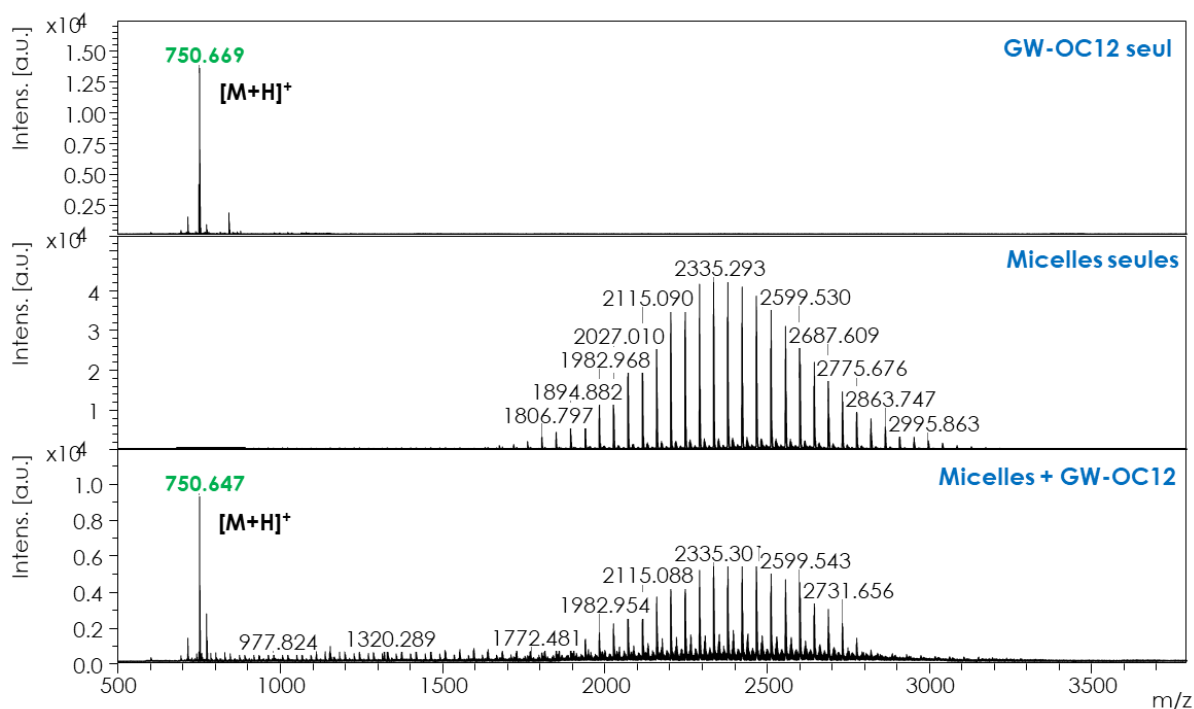
Variation de la fluence de 50 % à 75 % lors des analyses MALDI-TOF des monomères de PDAPEG non polymérisés à une concentration de 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v + 1 mg/mL de AcNa) et avec un délai d'extraction de 250 ns sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre et un DIE de 250 ns.

Ces analyses de la micelle polymérique et des monomères de PDAPEG ont permis de déterminer une signature PEG spécifique de la présence des micelles fabriquées à partir du polymère PDAPEG polymérisé par impulsion laser UV. La détection de la micelle est donc optimale en milieu aqueux avec la matrice HCCA et l'ajout de 1 mg/mL d'acétate de sodium. Cet ajout permet la formation d'un massif monodisperse du PEG.

Après étude du DIE et de la fluence laser, le délai d'extraction a été fixé à 250 nanosecondes avec une fluence inférieure à 65 % pour éviter l'apparition du massif de dégradation.

### 3. ANALYSES DU PRINCIPE ACTIF ENCAPSULE DANS LA MICELLE

Suite aux développements et optimisations des méthodes pour l'analyse du principe actif et de la micelle, les molécules cibles ont maintenant été analysées simultanément. L'utilisation de la matrice HCCA avec ajout d'acétate de sodium, condition optimale pour la détection de la micelle, permet une détection des deux composés (**Figure 2.18**) en MALDI - MS. Ces sels ont permis de garder un profil de micelles polymériques monodisperses et n'ont pas ou peu entraîné la formation d'un ion  $[M+Na]^+$  pour le principe actif GW-OC12. Cependant, l'analyse du GW3965 incorporé à la micelle a montré une diminution du signal de la micelle polymérique et non du GW-OC12.

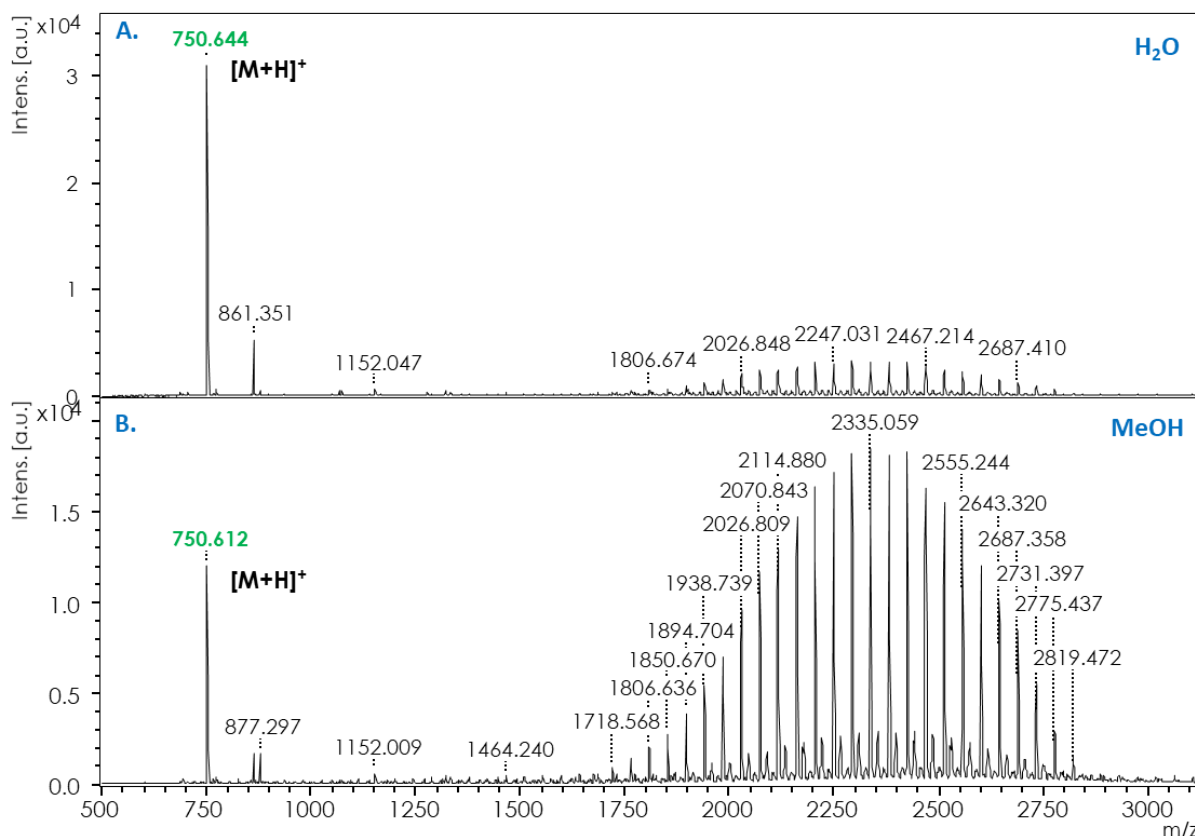


**Figure 2.18 : Spectres MALDI - MS de la détection simultanée du GW-OC12 et de la micelle.**

Analyses MALDI - MS de la micelle PDAPEG seule à 0,1 mg/mL ou encapsulant le GWOC12 (0,01 mg/mL) et du GW-OC12 seul à 0,1 mg/mL avec la matrice HCCA 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v, 1 mg/mL de AcNa) sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Les analyses MALDI - MS ont également été réalisées sur les solutions du principe actif encapsulé repris dans l'eau (micelles associées) ou le méthanol (micelles dissociées). Contrairement aux résultats précédents où les analyses de la micelle en condition aqueuse favorisaient sa détection, ici l'analyse de la micelle encapsulant le GW3965 donne des signaux plus ou moins similaires lorsque le solvant de reprise est le MeOH (**Figure 2.19**). Cependant, le spectre **A**, de la **Figure 2.19** correspondant au GW3965 encapsulé a

montré une détection du GW-OC12 à  $3 \times 10^4$  a.u. soit une intensité plus importante que sur le spectre B, où le GW3965 est libéré et possède un intensité de  $2 \times 10^4$  a.u.. Ces résultats soulèvent la question de la réelle encapsulation du principe actif au sein de la micelle. Les hypothèses d'une simple adsorption de la molécule à la surface de la micelle polymérique ou de l'encapsulation d'une faible proportion du GW3965 peuvent être émises sur la base de ces résultats.



**Figure 2.19: Analyses MALDI - MS du GW-OC12 encapsulé selon les conditions de solvant.**

Analyses MALDI - MS de la micelle encapsulant le GW-OC12 ( $m/z$  750,6) dans les solvants de reprise 100 % H<sub>2</sub>O (A.) ou 100 % MeOH (B.) (spectres répétables sur  $n = 3$ ) avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O (0,1 % de TFA), 70:30, v/v + 1 mg/mL de AcNa) sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 spectres et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

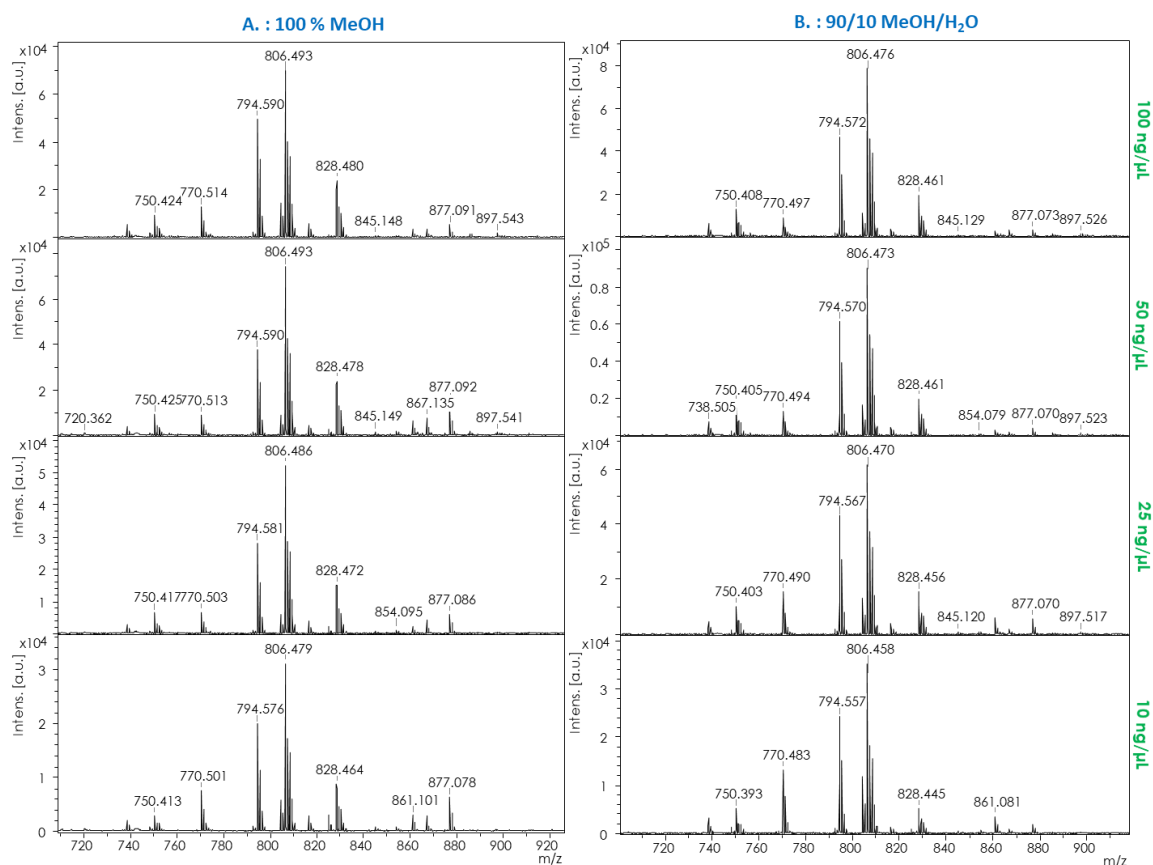
Les méthodes MALDI - MS développées suite aux analyses du principe actif et de la micelle ont donc permis de les détecter simultanément. Les conditions optimales correspondent donc à l'utilisation de la matrice HCCA à une concentration de 10 mg/mL en conditions de solvant ACN/H<sub>2</sub>O (70:30 v/v) et avec l'incorporation de 1 mg/mL d'acétate de sodium. Les paramètres d'acquisition définitifs sont donc : mode positif d'ionisation et d'acquisition en réflectron avec 1000 tirs accumulés par spectre, un DIE de 250 nanosecondes et fluence laser de 65 %

### III. DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES POUR LA DETECTION DU PRINCIPE ACTIF SUR TISSU

Pour la détection sur coupe tissulaire du principe actif encapsulé dans la micelle, les solvants de reprises ont tout d'abord été optimisés afin d'être compatibles avec des dépôts sur tissus. Des analyses sur coupes de foies et de cerveaux ou sur des extraits de foies ont ensuite été réalisées. Enfin, la détection du principe actif a été optimisée grâce à des lavages, des dégradations chimiques ou enzymatiques et des dérivations chimiques réalisées directement sur coupes de tissus.

#### 1. DETECTION DU PRINCIPE ACTIF ET DE LA MICELLE SUR COUPES DE TISSUS

Le mélange chloroforme/méthanol préconisé par le SCBM pour la reprise du principe actif modifié par les chaînes hydrophobes semble incompatible avec les développements analytiques sur tissu. En effet, un lavage au chloroforme peut entraîner une délipidation de la zone d'intérêt et une délocalisation des lipides [155]. Nous avons donc choisi de reprendre le GW3965 dans 100 % de méthanol ou dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O, 90:10, v/v, évitant la délipidation mais pas forcément la délocalisation. Une faible proportion d'eau a été ajoutée ici pour améliorer la qualité des dépôts et éviter la propagation des gouttes sur plaque MALDI ou sur coupes de tissus. La reprise du GW-OC16 avec ces deux conditions de solvants n'a pas eu d'effet sur sa détection hors tissus même après diminution de la concentration de 100 à 10 ng/μL (Figure 2.20).



**Figure 2.20 : Effet de la dilution et du solvant de reprise sur le signal du GW-OC16.**

Analyses MALDI - MS du GW-OC16 ( $m/z$  806,4) à 10 ; 25 ; 50 et 100 ng/mL. La molécule a été reprise soit dans le MeOH (A.) ou dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) (B.) puis analysées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL de AcNa sur plaque MTP ground steel. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 spectres et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Le GW-OC16 a ensuite été analysé à l'aide de la matrice HCCA (10 mg/mL, ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v + 1 mg/mL d'AcNa) sur coupes de foie à ces 4 mêmes concentrations et un effet d'extinction tissulaire a clairement été observé, même à la concentration de 100 ng/mL (Figure 2.21, A.). Les ions  $m/z$  794,5 et 806,4 caractéristiques du GW-OC16 ne sont plus détectés sur coupes de foie à cause de l'interférence d'ions endogènes provenant des lipides présents dans la gamme de masse  $m/z$  720 à 900. Afin de vérifier cet effet matrice, le GW-OC16 à la concentration de 0,1 mg/mL a également été déposé sur coupe de cerveau (Figure 2.21, B.). Après comparaison des spectres, le GW3965 a été détecté avec plus de facilité sur coupes de cerveaux que de foies. Cette expérience confirme donc un effet d'extinction du signal fonction de la matrice considérée. Pour éviter ces interférences, des protocoles de lavage, de dégradation chimique ou enzymatique ont été testés et sont décrits la suite de ce chapitre.

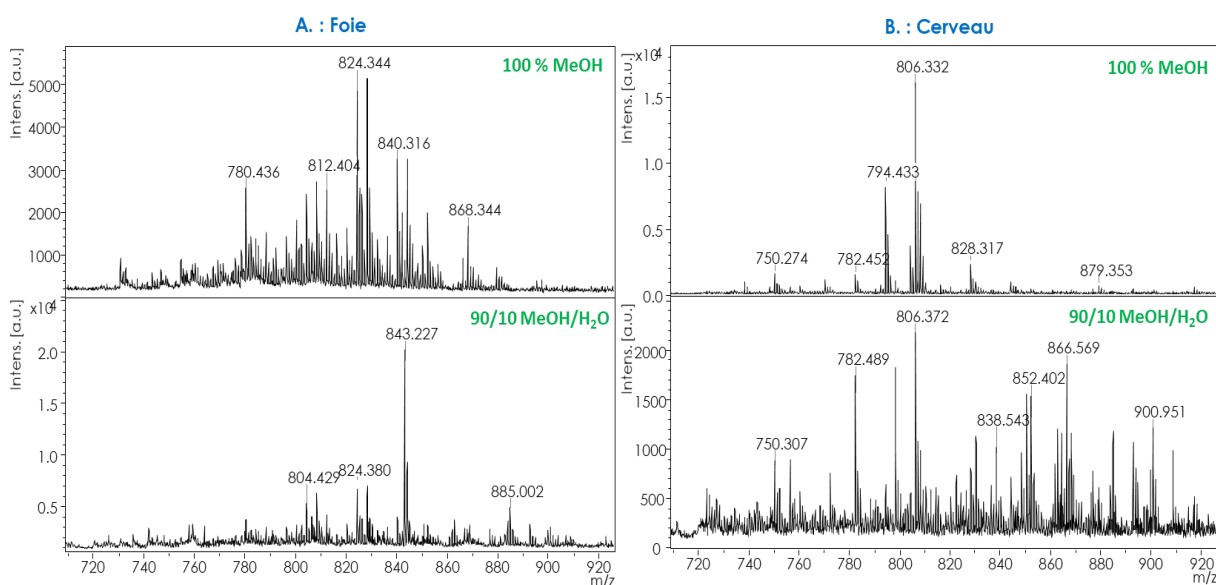


Figure 2.21 : Analyse MALDI - MS du GWOC16 sur coupes de tissus.

Analyses MALDI - MS du GW-OC16 à 0,1 mg/mL. La molécule a été reprises soit dans le MeOH ou dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10, v/v) puis analysées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa sur coupe de foie (A) ou de cerveau (B.) à 12 µm d'épaisseur. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Parallèlement, la détection de la micelle encapsulant le GW-OC12 a également été effectuée sur coupe de foie. Ces analyses ont uniquement permis d'observer le principe actif lorsque le solvant de reprise correspondait à l'eau et que la micelle était donc encore associée (Figure 2.22, A.). Etonnamment, en présence de méthanol où la micelle y est dissociée (Figure 2.22, B.) le GW-OC12 n'est pas observé. L'encapsulation du GW3965 semble donc avoir un effet bénéfique sur la détection du principe actif et diminuerait donc les effets matrices. De plus, l'ajout d'acétate de sodium dans le solvant de la matrice ne semble pas améliorer la monodispersion du signal PEG avec autant d'efficacité sur coupe de foie que sur plaque MALDI. En effet, la détection d'ions [M+Na]<sup>+</sup> et [M+K]<sup>+</sup> a été observée ici.

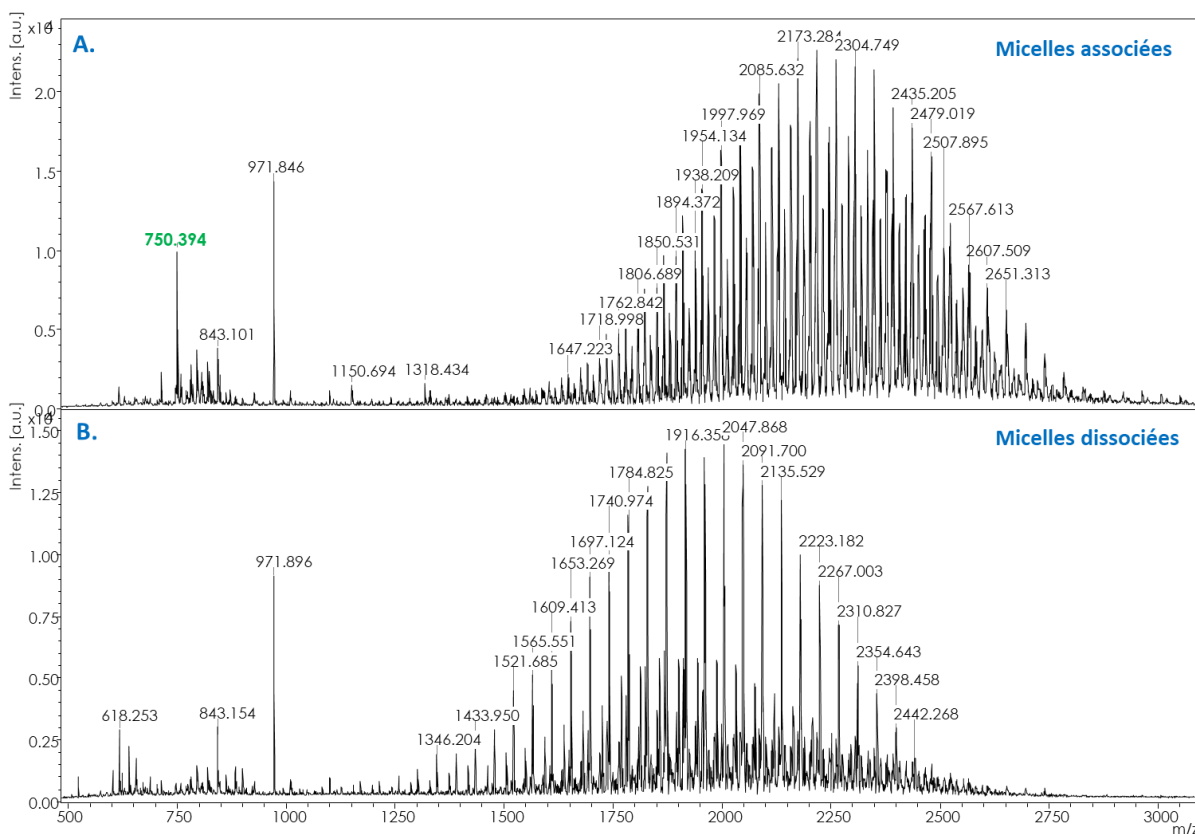


Figure 2.22 : Analyses MALDI - MS de la micelle encapsulant le GW-OC12 sur coupes de foie.

Analyses MALDI - MS des micelles encapsulant le GW-OC12 (indiqué en vert sur le spectre) à 0,1 et 0,01 mg/mL respectivement. Les molécules ont été reprises soit dans l'eau (A.) ou dans le MeOH (B.) puis analysées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL (ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa sur coupe de foie à 12 µm d'épaisseur. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectres, un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

L'analyse sur tissus du principe actif semble être entravée par les interférences générées par les espèces lipidiques en présence. Cependant la transposition de la méthode MALDI - MS pour la détection de la micelle est effective et le GW paraît plus détectable sur tissus après encapsulation dans la micelle. Malgré cela, des développements ont été réalisés soit dans le but d'éliminer les lipides soit pour améliorer la sensibilité de détection du GW-OC16.

## 2. TRAITEMENTS POUR L'ELIMINATION DES IONS ENDOGENES INTERFERENTS

Pour pallier ces interférences issues des lipides endogènes, différents protocoles ont été expérimentés comme des lavages sur tissus, la dégradation chimique et la dégradation enzymatique. Pour cela, des tests ont premièrement été réalisés en solution sur des mélanges de lipides ou sur des extraits lipidiques issus de foies.



a. Lavage au chloroforme des coupes de tissu

Afin d'éliminer ces interférences induites par la présence de lipides au sein du tissu, la première étape a été de réaliser un lavage au chloroforme pour tenter de les éliminer [155]. La coupe a donc été lavée dans un bain de chloroforme avant dépôt du GW-OC12 ou du GW-OC16 à une concentration de 0,1 mg/mL. Les spectres ont été comparés avec des dépôts réalisés sur des coupes sans lavage. Le GW-OC12, possédant une masse plus faible que les lipides endogènes observés ici a été détecté quelle que soit la condition d'analyse. Cependant, le GW-OC16 se trouve au milieu du massif interférent (**Figure 2.23**). La comparaison du spectre acquis sur tissu lavé ou non semble indiquer une amélioration de la détection grâce au lavage au chloroforme. Pourtant, H. Yang *et al.*, [155] ont utilisé en 2018 ce lavage sur coupes de tissus pour l'amélioration de la détection de petites molécules tels que les métabolites en imagerie MALDI MS.

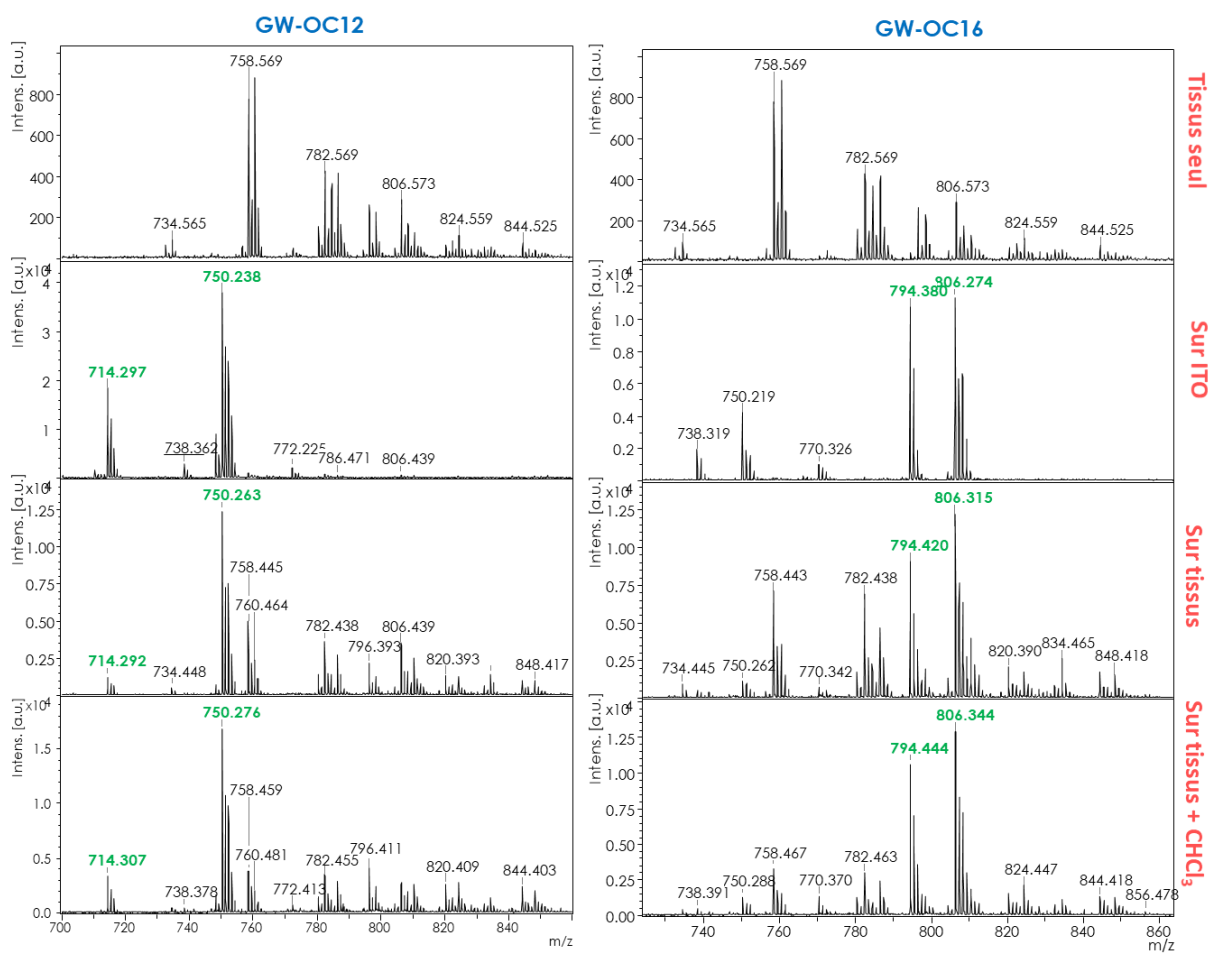


Figure 2.23 : Spectre MALDI - MS obtenus après lavage au chloroforme du tissu.

Analyses MALDI - MS des GW-OC12 et GW-OC16 à 0,1 mg/mL sur lame ITO et sur coupe de foie de 12 µm préalablement lavée au chloroforme ou non. Les acquisitions ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition reflectron, une accumulation de 1000 spectres et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Les ions retrouvés sur le spectre MS<sup>2</sup> de l'ion  $m/z$  750 acquis sur coupe de foie après lavage au chloroforme correspondent bien à la signature du GW-OC12. Les ions isobares au GW-OC12 qui proviennent majoritairement de diglycérides et triglycérides n'interfèrent pas avec ce dernier et ne sont pas observés sur les spectres. Cependant, en comparant les spectres MS<sup>2</sup> obtenus à partir de l'ion  $m/z$  806, les ions retrouvés sont caractéristiques d'un lipide isobare et non du GW-OC16. (Figure 2.24). En effet, l'ion interférent au GW-OC16 peut provenir ici d'un diglyceride, d'un triglyceride, d'un acide phosphatidique, d'une phosphatidylcholine (PC), d'un phosphatidylinositol, d'un hexosecéramide d'un dihexosecéramide ou d'une sphingomyéline possédant tous un  $m/z$  de 806. Cependant, l'ion  $m/z$  183,93 obtenu en MS<sup>2</sup> provient de la fragmentation au niveau d'une tête phosphocholine validant ainsi la présence de la PC. De plus, la présence de deux ions  $m/z$  183,93 et à  $m/z$  146,84 indiquerait la présence de deux PC interférentes : la PC 38a:6 à  $[M+H]^+ = 806,5694$  et la PC 36a:3 à  $[M+Na]^+ = 806,5670$ . Il est important de noter ici que le mode de fragmentation du MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme™ élimine les ions parents du spectre MS<sup>2</sup> via la cellule PLMS, Post LIFT Metastable Suppression (voir l'Annexe 3).

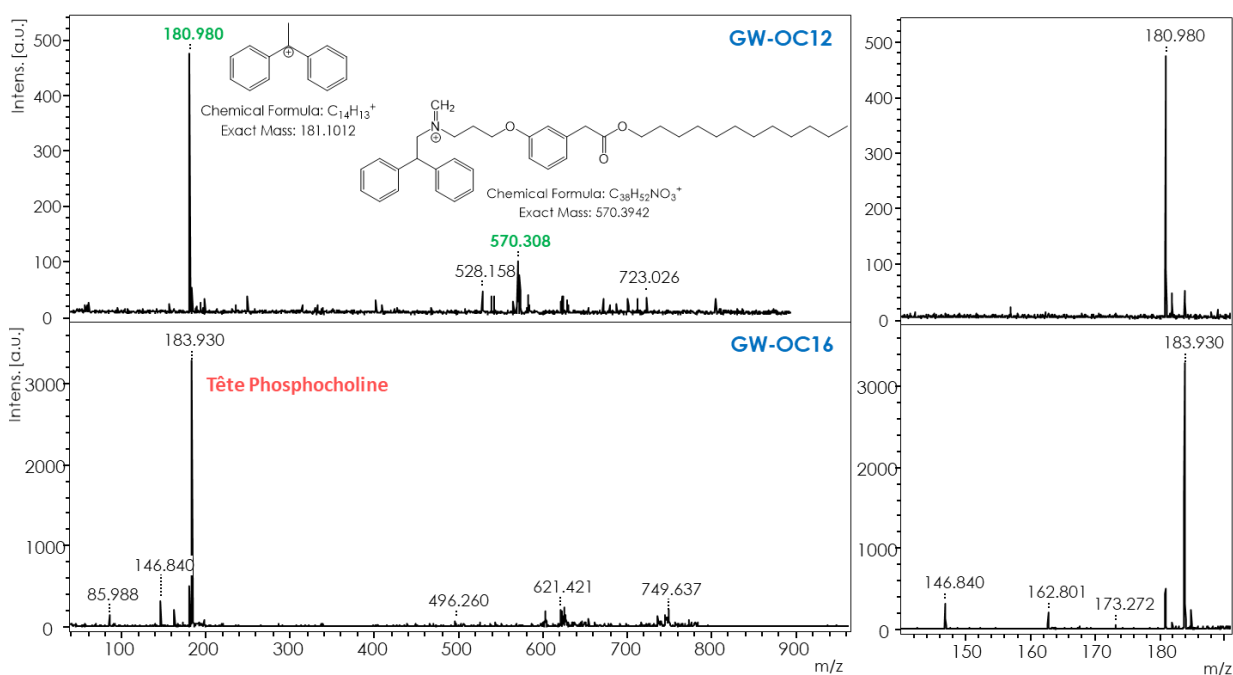


Figure 2.24 : Analyses MS<sup>2</sup> après délipidation de la coupe de foie au chloroforme.

Analyses MS<sup>2</sup> des ions  $m/z$  750 et  $m/z$  806 après lavage de la coupe de foie au chloroforme. La fragmentation de l'ion parent 750 induit la formation des ions spécifique au GW-OC12 à  $m/z$  180 et  $m/z$  570. La fragmentation de l'ion parent 806 induit la formation d'ions caractéristiques aux phosphocholines.

Le lavage au chloroforme semble donc efficace pour la détection du GW-OC12 mais pas pour celle du GW-OC16. Pour cela, des protocoles de dégradation chimique et enzymatique ont été entrepris à la fois sur extraits lipidiques totaux et sur coupes de tissus.

### b. Dégradation chimique en extrait lipidique

L'hydrolyse alcaline, ou saponification, a pour but d'hydrolyser les liaisons ester afin de diminuer la masse exacte des lipides par hydrolyse et permettre ainsi la détection des principes actifs entre 700 et 850  $m/z$ . Pour cela, les dégradations ont tout d'abord été réalisées sur des extraits lipidiques incorporant les principes actifs. La première étape a donc été de déterminer la phase d'extraction des GWs. Dans le but de simuler un protocole d'extraction de foies provenant de souris exposées au GW3965 encapsulé dans la

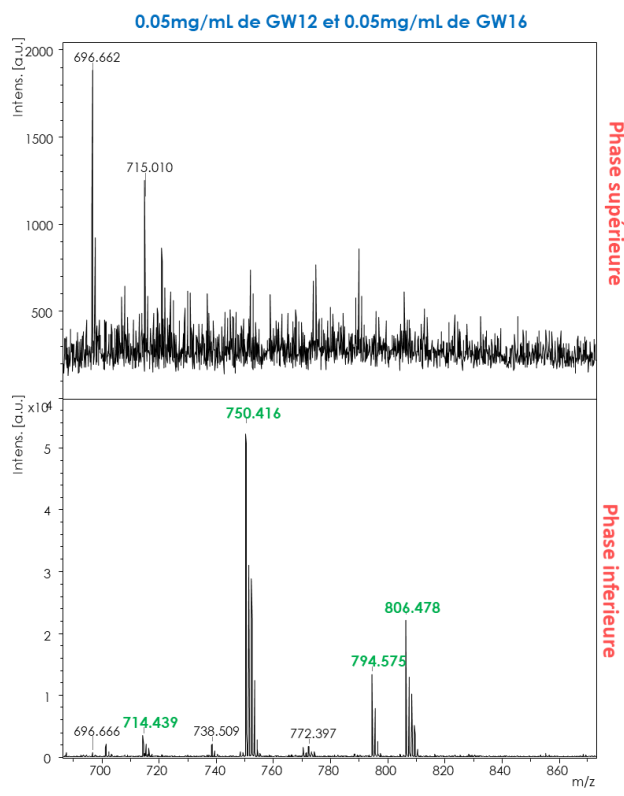


Figure 2.25 : Répartition des GO dans les phases d'extraction lipidique.

Analyses MALDI - MS avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) de la phase aqueuse et de la phase organique après extraction lipidique de foies de souris. Les acquisitions ont été réalisées en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

extractions lipidiques. L'ajout de NaOH va ainsi permettre l'hydrolyse des fonctions ester des lipides présents au sein du mélange. Sachant que les principes actifs modifiés par une chaîne carbonée possèdent également cette fonction, la dégradation chimique va également les impacter. En effet, sur la Figure 2.26, l'ion  $m/z$  582,1, commun aux deux GWs sans leur chaîne grasse de 12 ou 16 carbones a été observé après analyse MALDI - MS. De plus, après analyses MS<sup>2</sup>, les ions  $m/z$  180,8 et 401,9 sont également retrouvés, preuve que l'ion  $m/z$  582,1 provient des bien des GWs hydrolysés.

micelle, ces molécules ont été ajoutées seules ou en mélanges à une concentration de 0,05 mg/mL via le solvant d'extraction chloroforme/méthanol. Suite au protocole d'extraction, les phases inférieures (phase organique, Chloroforme) et les phases supérieures (phase aqueuse, MeOH/H<sub>2</sub>O) ont été analysées en MALDI - MS. Lors de l'ajout de 0,05 mg/mL, les ions [M+H]<sup>+</sup> des GW-OC12 et de GW-OC16 ont été détectés dans la phase inférieure soit la phase organique contenant le chloroforme (Figure 2.25). En effet, la structure hydrophobe des principes actifs semble entraîner une plus grande affinité de ces molécules pour la phase organique. De ce fait, les dégradations chimiques ont été réalisées sur la phase organique après extraction lipidique.

Une fois la phase d'extraction identifiée pour les GW3965, les étapes de dégradation chimique des principes actifs ont pu être effectuées. Pour cela, une solution de 0,25 M de NaOH dans un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O (90:10) a été ajoutée à la phase organique obtenue suite aux

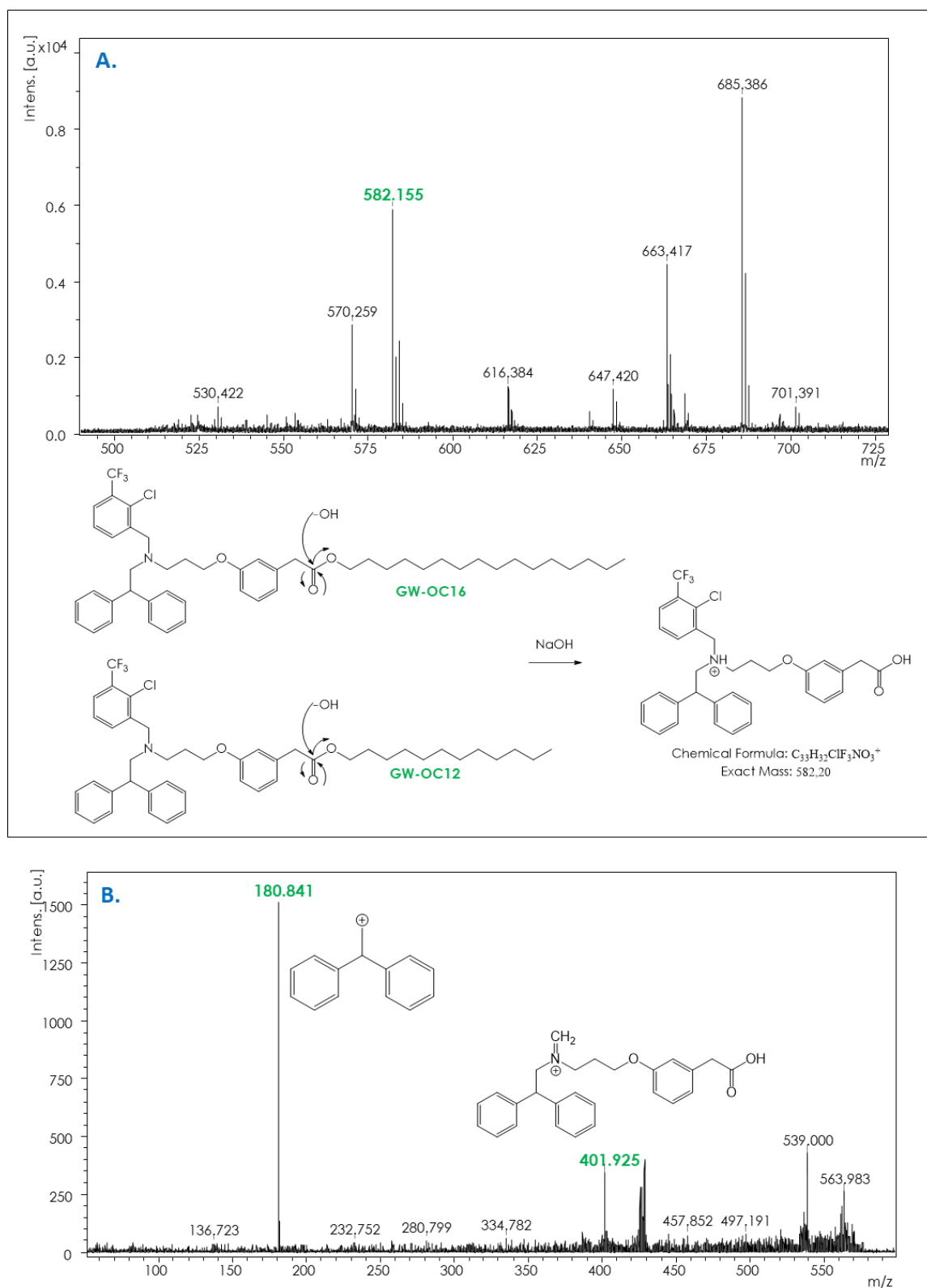


Figure 2.26 : Spectre MALDI - MS après hydrolyse alcaline sur des extraits lipidiques de foie.

**A.** Analyses MALDI - MS de l'hydrolyse alcaline sur les extraits lipidiques de foie réalisés selon la méthode d'extraction de Folch. Les acquisitions ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 spectres et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %. **B.** Analyses MS<sup>2</sup> de l'ion  $m/z$  582 correspondant à l'ion issu de la saponification de l'ester des GW-OC12 et GW-OC16.

Malgré le succès de l'hydrolyse alcaline sur les lipides et sur les deux principes actifs, les conditions utilisées pour cette dernière ont semblé trop drastiques pour être appliquées sur tissus sans altérer l'intégrité des coupes tissulaires. En effet, l'utilisation de soude à 0,25 N peut entraîner la dégradation des tissus. De plus, suite à cette hydrolyse, la distinction entre le GW-OC12 et le GW-OC16 n'est plus possible. Pour cela, l'utilisation d'un traitement enzymatique plus doux et dégradant uniquement les lipides a donc été investiguée comme alternative.

### c. Essais de dégradation enzymatique en extrait lipidique

Dans le but de dégrader les espèces lipidiques à l'origine des ions interférents, qui sont notamment des phospholipides présents dans la même gamme de masses que le GW-OC16, une seconde stratégie de dégradation enzymatique a été expérimentée sur les extraits lipidiques et sur tissus. Le choix des enzymes s'est tourné vers des phospholipases telles que les phospholipases C (PLC) de *C. perfringens* et de *B. cereus* et la phospholipase D issu du chou. I. U. Kouzel *et al.*, 2014 [293] ont également utilisé la PLC pour la caractérisation structurale des glycosphingolipides au sein d'extraits lipidiques grâce à la dégradation enzymatique des phospholipides préalablement aux analyses MALDI – MS. Plus particulièrement en MSI, S. Vens-Cappell *et al.*, 2016 [158] ont également utilisé la PLC sur tissu pour une meilleure imagerie MALDI - MS de ces glycosphingolipides neutres grâce à l'élimination des PC.

Lors des analyses MALDI - MS, la première difficulté rencontrée a été la présence de PEG interférents dans les solutions contenant uniquement les phospholipases C (**Figure 2.27, A. et B.**). Malgré l'utilisation de contenant en verre, un massif PEG 2000 a systématiquement été observé avec la méthode MALDI - MS destinée à l'analyse du principe actif et de la micelle. De plus, le massif de PEG analysé a été observé aux mêmes masses que celui du massif signature de la micelle polymérique. Ce PEG est présent dès le lyophilisat des enzymes car il est en fait utilisé lors des procédés de dialyse impliqués dans la production de ces enzymes. Pour cela, le choix s'est donc porté sur l'utilisation de la phospholipase D pour la dégradation des phosphocholines interférentes (**Figure 2.27, C.**).

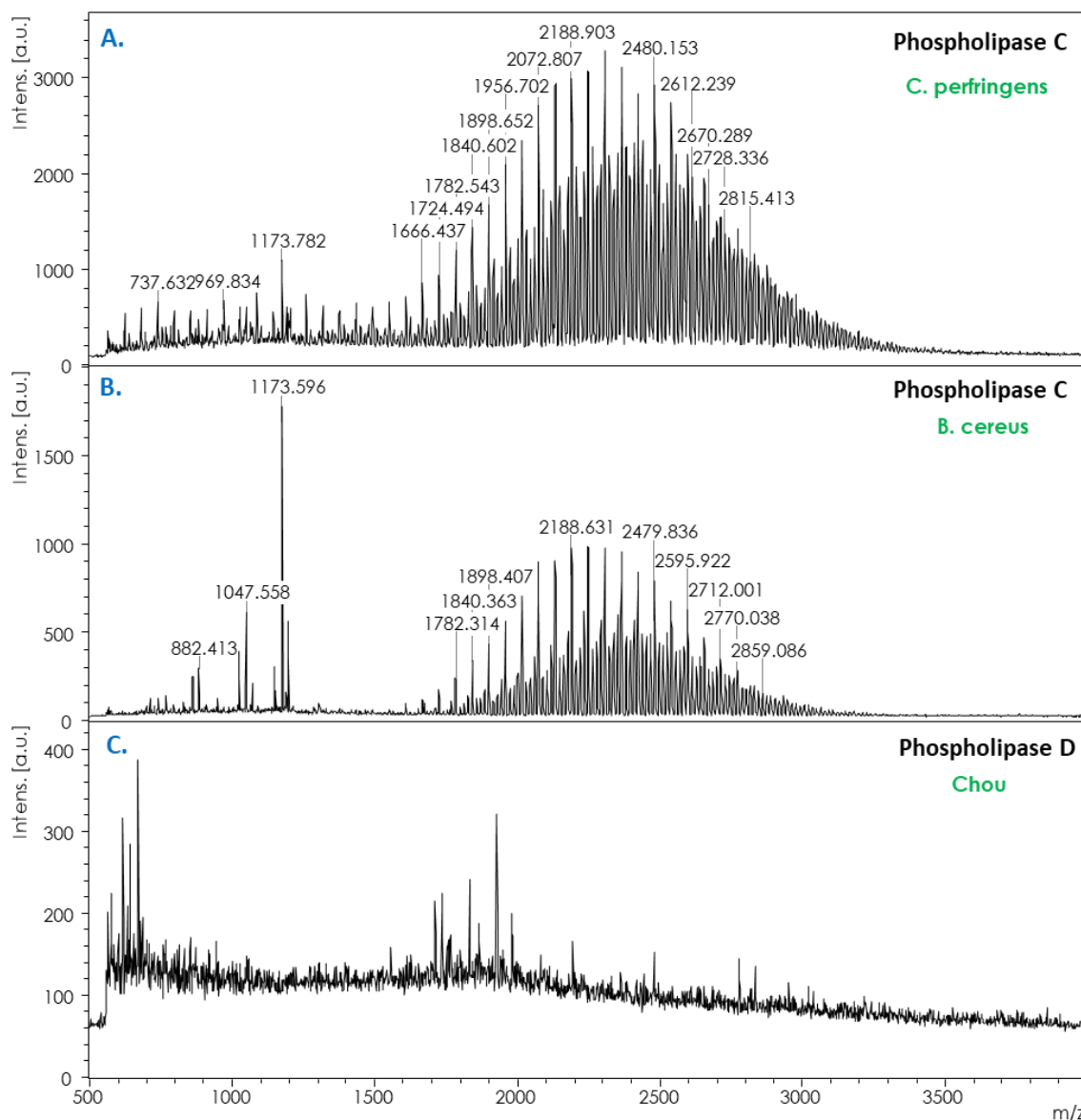
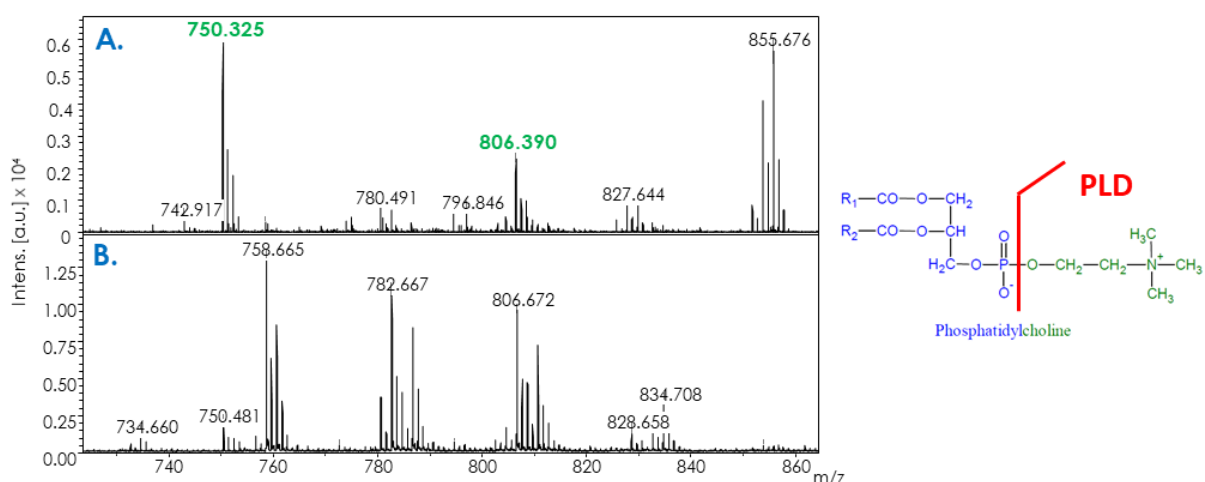


Figure 2.27 : Analyses MALDI - MS des phospholipases C et D en solution tampon.

Analyse MALDI - MS des enzymes PLC et PLD reprises chacune dans leur tampon optimal. Les acquisitions ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Dans un premier temps, la dégradation enzymatique a été effectuée sur les phases organiques des extraits lipidiques totaux contenant les GW-OC12 et GW-OC16. L'utilisation de la PLD a permis l'élimination des ions endogènes interférents (Figure 2.28, A.) pour une meilleure détection des GWs au sein des extraits lipidiques (Figure 2.28, B.). L'utilisation des PLC a également permis la détection des principes actifs dans ces mêmes extraits lipidiques mais ces enzymes ne peuvent pas être utilisées pour la détection des principes actifs encapsulés de par la présence de motifs PEG interférents.



**Figure 2.28 : Analyses MALDI - MS des extraits de foie avec les principes actifs et traités avec la PLD.** Analyses MALDI - MS de la phase organique des extraits lipidiques avec incorporation du GW-OC12 ( $m/z$  750,3) et GW-OC16 ( $m/z$  806,3) sans action de la PLD (**B.**) et après dégradation des lipides avec la PLD (**A.**) Les acquisitions ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

Après le succès de la dégradation enzymatique des ions interférents pour la détection des principes actifs, cette dégradation a été expérimentée sur des extraits de foie provenant de souris ayant été exposées aux micelles encapsulant le GW-OC16. Les expériences *in vivo*, ont finalement été réalisées uniquement avec le GW-OC16 car il permet une plus grande stabilité au sein des micelles de PDAPEG polymérisés. Cette molécule a précédemment été dosée à 10  $\mu$ M (8,06 ng/mL) dans ces mêmes extraits de foie par LC-MS. Les extractions ont donc été réalisées avec le même protocole que celui utilisé pour ces dosages. Ce protocole correspond à celui mis au point par Robert Thaï, qui a réalisé les expérimentations au SIMOPRO. Après analyses MALDI - MS des extraits lipidiques (**Figure 2.29, A.**) et des extraits lipidiques traités à la PLD (**Figure 2.29, B.**), les résultats ont montré une dégradation efficace des lipides endogènes mais n'ont cependant pas permis d'améliorer la détection du GW-OC16. Il semblerait ici que les problèmes de détection des principes actifs au sein de la matrice foie ne soit pas seulement imputables à un problème d'interférences mais également à un manque de sensibilité dû à un effet de suppression d'ions trop important de par la présence des lipides.

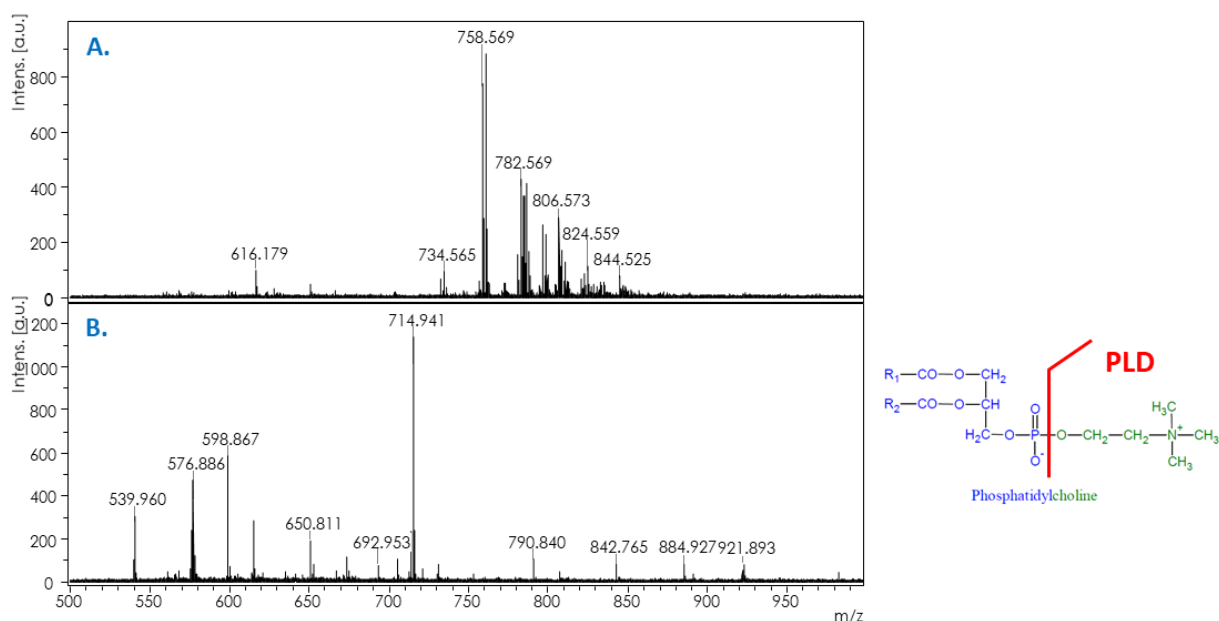


Figure 2.29 : Analyses MALDI - MS des extraits de foie issu de souris traitées au GW-OC16 et traités avec la PLD.

Analyses MALDI - MS de la phase organique des extraits lipidiques de foie de la souris exposée au GW-OC16 encapsulé dans la micelle sans action de la PLD (A.) et après dégradation des lipides avec la PLD (B.) Les acquisitions ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 spectres et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %.

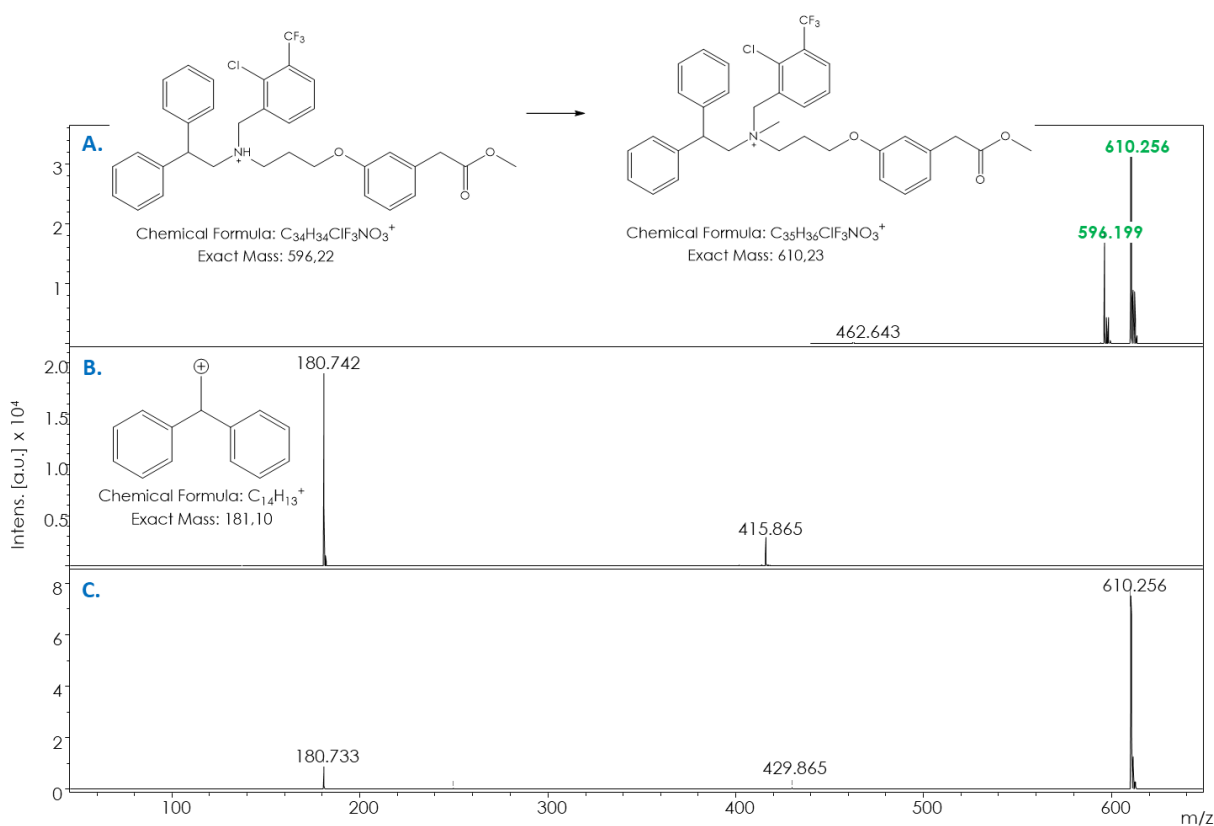
Des alternatives pour l'élimination des phosphatidylcholines ont été proposées par d'autres équipes comme celle de R. A. Johanson *et al.*, [294]. Elles reposent sur l'utilisation d'une colonne échangeuse de cations sur gel de silice afin d'adsorber les lipides cationiques et ainsi éliminer les PC de leurs extraits lipidiques. Cependant ces techniques ne sont pas directement transposables aux protocoles d'imagerie par spectrométrie de masse. Pour l'analyse des principes actifs sur coupes de tissus, un protocole alternatif de dérivation des principes actifs a été expérimenté afin d'augmenter leur sensibilité de détection.

### 3. ESSAIS DE DERIVATION DU PRINCIPE ACTIF

Dans le but d'améliorer la détection des principes actifs en milieu biologique, une troisième option a été envisagée : la dérivation chimique. Un protocole de méthylation à base de CH<sub>3</sub>I [295] [296] [297] a été choisi étant donné la faible disponibilité de fonctions réactives sur les GW-OC12 et GW-OC16. La méthylation de l'amine tertiaire permettrait d'obtenir une charge permanente sur la molécule et ainsi diminuer l'effet d'extinction tissulaire que l'on observe en améliorant sa détectabilité. Sachant que le GW-OC16 a été dosé à 10 μM dans des foies de souris exposée à cette molécule, les réactions de dérivation ont dans un premier temps été réalisées à cette concentration dans l'EtOH. Les solutions ont été agitées à 37 °C au Thermomixer® pendant 30 minutes, 1 heure, 2 heures ou une nuit d'incubation. Différents protocoles de dérivation ont été testés mais aucun n'a donné de résultat probant à température ambiante, et ce même dans des conditions extrêmes après une nuit d'incubation avec 1 M de CH<sub>3</sub>I. Malgré cette importante concentration de CH<sub>3</sub>I, la



formation de l'azote quaternaire n'est pas obtenue. De ce fait, des conditions plus drastiques ont été appliquées aux réactions avec une atmosphère sous argon, des températures de 50 °C et une agitation avec barreau aimanté. Seuls les protocoles de dérivation effectués en condition « neat », soit par ajout direct du CH<sub>3</sub>I sur la poudre de GW-OCH<sub>3</sub> ont permis d'observer une méthylation partielle de l'amine tertiaire (**Figure 2.30**). L'encombrement stérique de l'amine tertiaire limite sa fonctionnalisation et sa méthylation et nécessite donc des conditions drastiques. Celles-ci sont malheureusement difficilement transposables aux analyses MALDI - MS ou MSI.



**Figure 2.30 : Analyse MALDI - MS après dérivation du GW-OCH<sub>3</sub>.**

Analyse du GW-OCH<sub>3</sub> après dérivation avec le CH<sub>3</sub>I en conditions drastiques (**A.**). Les acquisitions MALDI - MS ont été réalisées avec la matrice HCCA à 10 mg/mL ((ACN/H<sub>2</sub>O, 70:30, v/v) + 1 mg/mL AcNa) en mode positif d'ionisation avec le mode d'acquisition réflectron, une accumulation de 1000 tirs par spectre et un DIE de 250 ns et une fluence laser de 65 %. **B.** Analyses MS<sup>2</sup> du GW-OCH<sub>3</sub> après dérivation. **C.** Analyse du GW-OCH<sub>3</sub> sans dérivation.

Malgré toutes les procédures expérimentales entreprises dans le but d'éliminer les interférences engendrées par les lipides endogènes ou les essais de dérivation afin de gagner en sensibilité, la détection des principes actifs sur coupes de tissus n'a pas pu être observée. C'est pourquoi, il est primordial de continuer à développer des méthodes permettant d'améliorer la détection de molécules au sein de milieux biologiques complexes en imagerie par spectrométrie de masse.

## D. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les micelles ont fait l'objet d'analyses dans le cadre d'une étude visant à développer des systèmes micellaires polymériques de PDAPEG ciblant des plaques d'athéromes et délivrant le GW3965 ou ses analogues, agonistes des récepteurs LRX. Souhaitant connaître le devenir de ces deux composés au sein de tissus, des études ont donc été effectuées en MALDI - MS et MALDI - MSI dans le but d'obtenir une caractérisation structurale et une biodistribution simultanée de la micelle et du principe actif *in situ*.

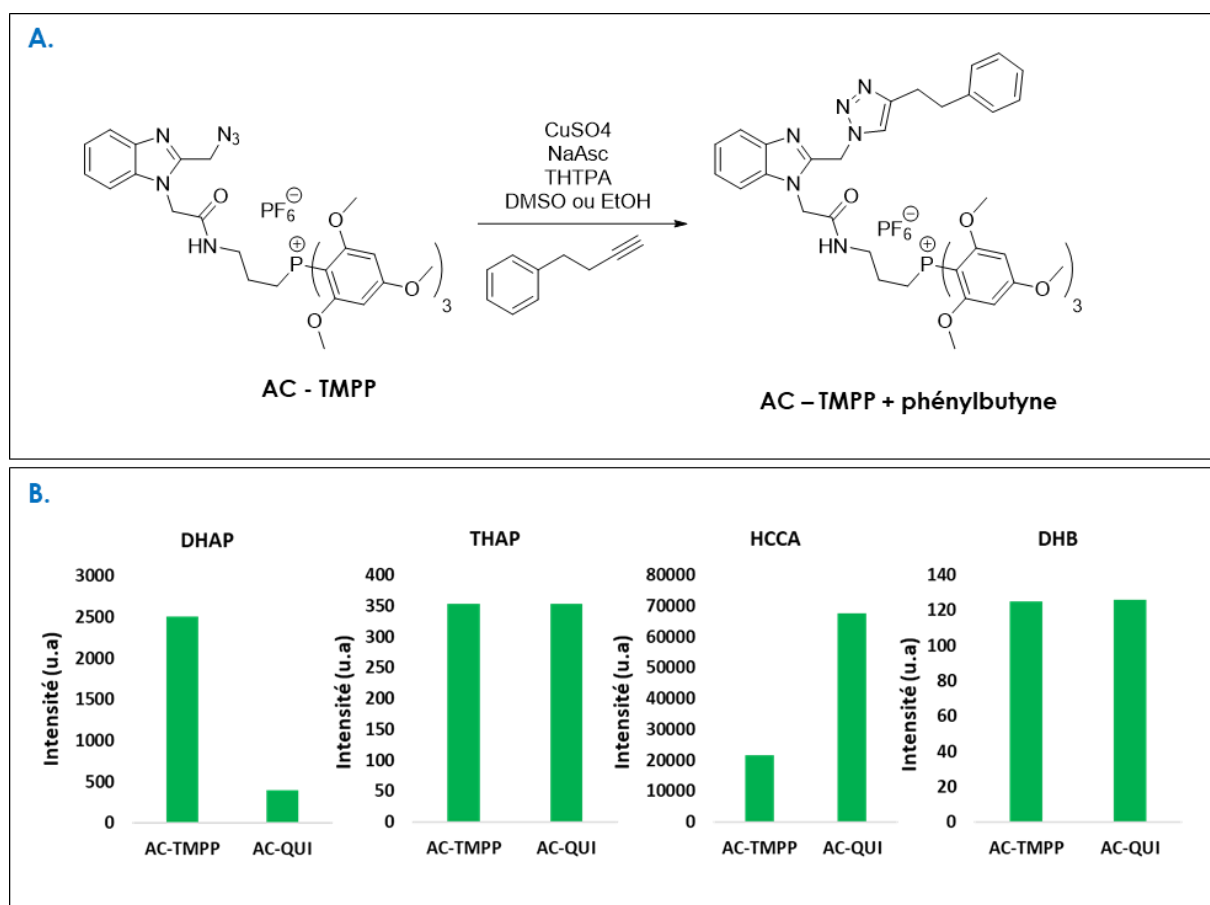
Des développements analytiques ont tout d'abord été entrepris afin de détecter séparément les principes actifs : GWOC12 et GW-OC16, et la micelle de PDAPEG polymérisés. Pour cela, un panel de matrice MALDI a été utilisé pour l'optimisation de la détection de ces composés. La matrice permettant la détection optimale du principe actif et de la micelle s'est révélée être la même soit la matrice HCCA à une concentration de 10 mg/mL (70:30, ACN/H<sub>2</sub>O, v/v). Cette matrice a donc permis la détection du GW-OC12 et du GW-OC16 sous leur forme protonée [M+H]<sup>+</sup> et du massif PDPEG sous forme d'adduits [M+Na]<sup>+</sup> et [M+K]<sup>+</sup>. Afin d'obtenir un seul massif correspondant à la micelle, des sels d'acétate de sodium ont été ajoutés à la matrice à une concentration de 1 mg/mL. Le profil MS détecté pour la micelle polymérique PDAPEG a ensuite été comparé au monomère seul et non polymérisé et à la micelle polymérisée et dialysée afin de confirmer la signature observée. Suite à la mise au point de la détection des composés analysés séparément, les conditions optimales de chaque méthode ont été combinées dans le but d'obtenir une détection conjointe du principe actif et de la micelle en MALDI - MS. Les paramètres ont donc été fixés en utilisant le mode positif d'ionisation et d'acquisition réflectron avec 1000 tirs par spectre, un DIE de 250 nanosecondes et une fluence laser moyenne de 65 % avec la matrice HCCA (10 mg/mL (70:30, ACN/H<sub>2</sub>O, v/v) + 1 mg/mL d'AcNa).

L'étape suivante a donc été de détecter ces molécules dans un milieu biologique complexe. Cependant, le GW-OC16 s'est révélé non détectable sur coupe tissulaire en raison de l'interférence d'ions provenant de phosphatidylcholines. Le GW-OC12, détectable sur coupe de foie et de cerveau, n'a cependant pas été utilisé pour les injections *in vivo* à cause d'une stabilité inférieure au sein des micelles polymériques PDAPEG. Par ailleurs, de futures études pourraient être réalisées sur des plaques d'athérome afin de vérifier le seuil de détectabilité des principes actifs sur ces tissus.

Afin de pallier le manque de sensibilité d'une détection sur tissus, plusieurs protocoles de prétraitement des échantillons ont été évalués, dont les lavages sur coupes, la dégradation chimique, la dégradation enzymatique et la dérivation. Seule la dégradation enzymatique utilisant la phospholipase D a permis la détection du GW-OC16 après ajout dans des extraits lipidiques. Cependant cette technique n'a pas permis de le détecter dans les extraits lipidiques issus de foies de souris exposées au GW-OC16 encapsulé dans la micelle PDAPEG. Cette absence de détection, potentiellement due à un manque de sensibilité de la technique MALDI - MS a donc nécessité le développement de protocoles de dérivation du GW-OC16. Pour

cela, l'ajout d'un groupement méthyl sur l'azote tertiaire a été expérimenté afin d'introduire une charge permanente grâce à la formation d'une amine quaternaire et ainsi augmenter la sensibilité de détection de cette molécule. Il s'est avéré que les conditions nécessaires à cette méthylation ont été trop drastiques pour son application sur coupes tissulaires afin d'obtenir des données MALDI - MSI.

C'est pourquoi, un projet en collaboration avec les équipes du SCBM a été débuté à la fin de cette thèse concernant la synthèse de nouvelles molécules pour la réalisation d'une chimie click *in situ* pour la MSI. Des premiers travaux très prometteurs ont déjà été initiés par Maxime Riberaud (stagiaire M2) sous la direction d'Antoine Sallustrau et de Frédéric Taran, pour la détection de la phénylbutyne. Ils sont présentés dans la **Figure 2.31**.



**Figure 2.31 : Réactions de chimie click pour la détection de la phénylbutyne en MALDI - MS. Issue du rapport de stage de M. Riberaud (2019)**

A. Réactifs nécessaires pour la réalisation de chimie click avec la phénylbutyne avec les azotures chélatants (AC) TMPP (Triméthoxytriphenylphosphine) et QUI (quinolinium). B. Détection de la phénylbutyne après réaction avec les matrices MALDI DHAP, THAP, HCCA et DHB. La phénylbutyne n'est pas détectée sans réaction de click avec ces mêmes matrices.

La phénylbutyne non détectée en MALDI - MS avec un large panel de matrices a été dérivée en solution à l'aide de deux agents chélateurs : le TMPP (Triméthoxytriphenylphosphine) et le quinolinium

possédant à la fois des noyaux aromatiques et une charge permanente favorisant ainsi leur détection en MALDI - MS. Cette dérivation a ainsi permis de la détecter efficacement avec les matrices DHAP, THAP, HCCA et DHB. Des résultats prometteurs ont également été obtenus après une chimie click réalisée directement sur coupes de tissus avec un alcyne cyclique : une conotoxine.

Ce projet a donc été révélateur des difficultés inhérentes au développement de nouveaux outils analytiques en imagerie par spectrométrie de masse pour l'étude de la biodistribution de candidats médicaments ou plus généralement de composés pharmacologiquement actifs. Cependant, malgré le manque de sensibilité de la méthode MALDI - MS pour la détection des principes actifs sur tissus, nos travaux ont tout de même permis d'obtenir une unique méthode pour la détection simultanée du GW-OC12/16 et des micelles polymérique PDAPEG. Cette étude est donc prometteuse et ouvre donc les possibilités quant à l'analyse de nanovecteurs en MALDI - MSI dans le cadre de la délivrance de médicament.



## CONCLUSIONS ET DISCUSSIONS GENERALES

---

L'emploi grandissant de nouvelles stratégies de vectorisation de médicaments en nanomédecine interpelle quant au devenir *in vivo* des vecteurs [261] [262]. Les enjeux actuels visent donc à optimiser la réponse thérapeutique au travers d'une libération optimisée et contrôlée du médicament au niveau du site pathologique tout en minimisant les effets toxiques potentiels de ces nanoparticules. De ce fait, un besoin croissant d'outils analytique se fait ressentir pour le suivi de ces vecteurs et il peut être intéressant d'exploiter la complémentarité de ces techniques afin d'obtenir des outils analytiques puissants. L'un des objectifs de ce travail doctoral a donc été de développer une nouvelle approche analytique combinant la radioimagerie et l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse de nanoparticules de type graphène. L'originalité de cette approche d'imagerie duale repose sur la complémentarité des savoir-faire disponibles au sein du Département Médicaments et Technologies pour la Santé du CEA en matière de synthèse de nanoparticules marquées aux radio-isotopes, de radioimagerie et de spectrométrie de masse appliquée à l'étude des échantillons biologiques. Nous pourrions ainsi avoir accès à la sensibilité de détection, à la quantification absolue, à la caractérisation structurale des potentiels métabolites ou produits de dégradation ainsi qu'à la résolution spatiale grâce à la MSI. De plus, la publication des travaux de S. Chen *et al.*, 2015 [260], pionnière dans l'analyse des nanoparticules de graphène en MSI et indiquant la possibilité d'obtenir des données MSI quantitatives a conforté ce projet d'imagerie combinée.

Les développements méthodologiques et analytiques réalisés pour l'étude du GO et rGO en imagerie dual ont donc permis l'analyse de ces nanoparticules sur coupes de tissus déposées sur une même lame ITO compatible avec les deux techniques d'imagerie. Notre méthode permet donc bien une quantification

absolue grâce à la radioimagerie ainsi qu'une résolution spatiale fine et une caractérisation structurale de ces nanoparticules grâce à la MSI. Cependant, nos résultats ont soulevé certaines questions quant à la reproductibilité d'analyses des nanoparticules et la quantification de celles-ci. Les premiers points d'amélioration soulignés concernent un contrôle plus important de la variabilité de la synthèse des nanoparticules. En effet, la reproductibilité inter-lot est délicate à maîtriser de par la variabilité au niveau de la taille des nanoparticules obtenues et la difficulté de peser ces objets à l'état de poudre. De plus, ces disparités peuvent également induire une suspension de ces nanoparticules hétérogènes avec une tendance à l'agrégation selon les tensioactifs utilisés. Toutes ces variations sont donc à ajouter aux difficultés inhérentes aux analyses de qMSI et peuvent donc influencer sur le signal généré en spectrométrie de masse. De plus, l'obtention de solution correctement calibrées est indispensable à la validation de méthodes quantitatives afin de réaliser des dépôts reproductibles sur tissus, à la fois en termes de concentration et de répétabilité des analyses pixel à pixel. Pour cela, il semble important de développer de nouveau système de normalisation du signal en LDI ou MALDI - MS pour l'analyse de ces nanoparticules avec par exemple le calcul du coefficient d'extinction tissulaire [214] ou l'utilisation d'une calibration virtuelle [267]. D'autre part, la mise en place d'un suivi plus poussé des performances de l'appareil semble également nécessaire pour le bon déroulement d'analyse LDI - MS qui demande une fluence laser plus élevée. Pour cela, le développement de procédures de qualification des performances doit être réalisé afin de s'assurer du bon fonctionnement de l'instrument. Ces protocoles peuvent pallier aux problèmes dus à une usure prématurée du laser, et permettent aussi de s'assurer de la bonne calibration dans les basses masses. L'utilisation d'une seconde source d'imagerie tel que le SIMS pourrait également venir confirmer la signature des nanoparticules de graphène synthétisé au SCBM. Malgré toutes ces bonnes pratiques, la question d'une quantification précise des nanoparticules en imagerie par spectrométrie de masse reste en suspens et nécessite plus d'investigation à ce jour.

Le second projet de cette thèse a eu pour objectif de développer une méthode analytique pour l'étude de micelles polymériques encapsulant un principe actif afin de démontrer la colocalisation du système micelles/principe actif et étudier leur métabolisation/dégradation. Les expérimentations réalisées dans cette optique ont donc permis la détection de la micelle et du principe actif avec une même méthode MALDI -MS. Toutefois des problèmes récurrents de sensibilité de détection en raison de phénomènes d'extinction du signal par des phospholipides endogènes ont été observés. Pour cela, plusieurs stratégies de traitements des échantillons ont été expérimentées *in vitro* et *in situ* avec notamment des tests de lavage, de traitements enzymatiques et chimiques et des essais de dérivation chimique. Ces divers développements n'ont pas permis d'obtenir une sensibilité de détection suffisante pour ces principes actifs mais ont permis d'ouvrir une réflexion quant au besoin de développer de nouveaux protocoles spécifiquement dédiés à l'imagerie par spectrométrie de masse. En effet, les méthodes actuellement utilisées sont souvent conçues pour d'autres méthodes et adaptées et optimisées pour la MSI et peuvent donc engendrer des problèmes

de délocalisation, de résolution spatiale. Pour cela, un projet de « chimie click » a donc débuté en collaboration avec le SCBM pour la synthèse de TagMass clickable sur coupe tissulaire et donc en milieu biologique complexe. L'objectif ici est donc l'introduction d'une charge permanente sur la molécule d'intérêt mais également de fonctionnaliser l'agent de dérivation afin de pouvoir réaliser une imagerie combinée avec de la fluorescence et/ou de la radioimagerie. Les avantages de cette chimie click *in situ* sont d'éviter les modifications structurales du principe actif avant son administration à l'animal, de ne pas entraîner de modifications de ses propriétés physico-chimiques, et donc de ne pas modifier la biodistribution de la molécule cible comme cela peut se produire avec l'ajout de fluorophores. Par ailleurs, d'autres études portent également sur l'amélioration de la sensibilité de détection en MSI avec notamment les développements instrumentaux réalisés par F. Barré *et al.*, 2019 [298] et M. Niehaus *et al.*, 2019 [299] qui proposent l'utilisation d'une source MALDI-2 (deux processus d'ionisation successifs).

D'un point de vue plus personnel, ces deux projets m'ont donc permis de couvrir tous les aspects de la MSI appliquée à la détection de nanoparticules et à l'analyses de petites molécules. Ces travaux ont donc été très formateurs notamment grâce à la mise en place des techniques d'imagerie au sein du Laboratoire d'Etude du Métabolisme des Médicament et de la qualification de performance de l'Ultraflex™. De plus, ma contribution au développement des techniques d'imagerie duale en collaboration avec trois laboratoires aux savoirs très complémentaires m'a permis d'étendre mes connaissances et compétences scientifiques.





## RÉFÉRENCES

---

- [1] J. E. Riviere, « Pharmacokinetics of nanomaterials: an overview of carbon nanotubes, fullerenes and quantum dots », *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, vol. 1, n° 1, p. 26-34, janv. 2009, doi: 10.1002/wnan.24.
- [2] S. F. Keevil, « Physics and medicine: a historical perspective », *The Lancet*, vol. 379, n° 9825, p. 1517-1524, avr. 2012, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60282-1.
- [3] J. J. Wild et J. M. Reid, « Further Pilot Echographic Studies on the Histologic Structure of Tumors of the Living Intact Human Breast », *Am. J. Pathol.*, vol. 28, n° 5, p. 839-861, oct. 1952.
- [4] R. M. Caprioli, T. B. Farmer, et J. Gile, « Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS », *Anal. Chem.*, vol. 69, n° 23, p. 4751-4760, déc. 1997, doi: 10.1021/ac970888i.
- [5] H. S. Choi *et al.*, « Design considerations for tumour-targeted nanoparticles », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 5, n° 1, p. 42-47, janv. 2010, doi: 10.1038/nnano.2009.314.
- [6] C. Buzea, I. I. Pacheco, et K. Robbie, « Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity », *Biointerphases*, vol. 2, 2007, doi: 10.1116/1.2815690.
- [7] V. Kumar, N. Sharma, et S. S. Maitra, « In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles », *Int. Nano Lett.*, vol. 7, n° 4, p. 243-256, déc. 2017, doi: 10.1007/s40089-017-0221-3.
- [8] G. Oberdörster, E. Oberdörster, et J. Oberdörster, « Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles », *Environ. Health Perspect.*, vol. 113, n° 7, p. 823-839, juill. 2005, doi: 10.1289/ehp.7339.
- [9] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, et A. Zweck, « The emerging nanomedicine landscape », *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, n° 10, p. 1211, oct. 2006, doi: 10.1038/nbt1006-1211.
- [10] R. K. Jain et T. Stylianopoulos, « Delivering nanomedicine to solid tumors », *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, vol. 7, n° 11, p. 653-664, nov. 2010, doi: 10.1038/nrclinonc.2010.139.
- [11] H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, et H. Ghandehari, « Nanoparticle uptake: The phagocyte problem », *Nano Today*, vol. 10, n° 4, p. 487-510, août 2015, doi: 10.1016/j.nantod.2015.06.006.
- [12] M. Masserini, « Nanoparticles for brain drug delivery », *ISRN Biochem*, vol. 2013, 2013, doi: 10.1155/2013/238428.
- [13] A. Doerflinger *et al.*, « Biotin-functionalized targeted polydiacetylene micelles », *Chem. Commun.*, vol. 54, n° 29, p. 3613-3616, avr. 2018, doi: 10.1039/C8CC00533B.
- [14] N. M. Thielens *et al.*, « Impact of the surface charge of polydiacetylene micelles on their interaction with human innate immune protein C1q and the complement system », *Int. J. Pharm.*, vol. 536, n° 1, p. 434-439, janv. 2018, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.11.072.
- [15] D. Georgin *et al.*, « Preparation of <sup>14</sup>C-Labeled Multiwalled Carbon Nanotubes for Biodistribution Investigations », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, n° 41, p. 14658-14659, oct. 2009, doi: 10.1021/ja906319z.
- [16] E. Fitzer, K.-H. Kochling, H. P. Boehm, et H. Marsh, « Recommended terminology for the description of carbon as a solid (IUPAC Recommendations 1995) », *Pure Appl. Chem.*, vol. 67, n° 3, p. 473-506, 1995, doi: 10.1351/pac199567030473.
- [17] P. R. Wallace, « The Band Theory of Graphite », *Phys. Rev.*, vol. 71, n° 9, p. 622-634, mai 1947, doi: 10.1103/PhysRev.71.622.
- [18] A. K. Geim et K. S. Novoselov, « The rise of graphene », *Nat. Mater.*, vol. 6, n° 3, p. 183-191, mars 2007, doi: 10.1038/nmat1849.

## REFERENCES

- [19] K. S. Novoselov, V. I. Fal'ko, L. Colombo, P. R. Gellert, M. G. Schwab, et K. Kim, « A roadmap for graphene », *Nature*, vol. 490, n° 7419, p. 192-200, oct. 2012, doi: 10.1038/nature11458.
- [20] A. Bianco *et al.*, « All in the graphene family – A recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials », *Carbon*, vol. 65, p. 1-6, déc. 2013, doi: 10.1016/j.carbon.2013.08.038.
- [21] H. P. Bei *et al.*, « Graphene-Based Nanocomposites for Neural Tissue Engineering », *Molecules*, vol. 24, n° 4, p. 658, janv. 2019, doi: 10.3390/molecules24040658.
- [22] R. R. Nair *et al.*, « Graphene as a transparent conductive support for studying biological molecules by transmission electron microscopy », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 97, n° 15, p. 153102, oct. 2010, doi: 10.1063/1.3492845.
- [23] T. R. Nayak *et al.*, « Graphene for Controlled and Accelerated Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells », *ACS Nano*, vol. 5, n° 6, p. 4670-4678, juin 2011, doi: 10.1021/nn200500h.
- [24] S. Gurunathan et J.-H. Kim, « Synthesis, toxicity, biocompatibility, and biomedical applications of graphene and graphene-related materials », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, p. 1927-1945, mai 2016, doi: 10.2147/IJN.S105264.
- [25] R. Rao *et al.*, « Carbon Nanotubes and Related Nanomaterials: Critical Advances and Challenges for Synthesis toward Mainstream Commercial Applications », *ACS Nano*, vol. 12, n° 12, p. 11756-11784, déc. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b06511.
- [26] B. Fadeel *et al.*, « Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment », *ACS Nano*, nov. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b04758.
- [27] C. Bussy, H. Ali-Boucetta, et K. Kostarelos, « Safety Considerations for Graphene: Lessons Learnt from Carbon Nanotubes », *Acc. Chem. Res.*, vol. 46, n° 3, p. 692-701, mars 2013, doi: 10.1021/ar300199e.
- [28] Y. Wang, Z. Li, D. Hu, C.-T. Lin, J. Li, et Y. Lin, « Aptamer/Graphene Oxide Nanocomplex for in Situ Molecular Probing in Living Cells », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 27, p. 9274-9276, juill. 2010, doi: 10.1021/ja103169v.
- [29] H. Jang *et al.*, « Discovery of Hepatitis C Virus NS3 Helicase Inhibitors by a Multiplexed, High-Throughput Helicase Activity Assay Based on Graphene Oxide », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, n° 8, p. 2340-2344, 2013, doi: 10.1002/anie.201209222.
- [30] Y.-K. Kim *et al.*, « Synergistic Effect of Graphene Oxide/MWCNT Films in Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Small Molecules and Tissue Imaging », *ACS Nano*, vol. 5, n° 6, p. 4550-4561, juin 2011, doi: 10.1021/nn200245v.
- [31] J. Lee, J. Kim, S. Kim, et D.-H. Min, « Biosensors based on graphene oxide and its biomedical application », *Graphene-Based Mater. Nanomedicine*, vol. 105, Part B, p. 275-287, oct. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.06.001.
- [32] X. Dong, J. Cheng, J. Li, et Y. Wang, « Graphene as a Novel Matrix for the Analysis of Small Molecules by MALDI-TOF MS », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 14, p. 6208-6214, juill. 2010, doi: 10.1021/ac101022m.
- [33] H. Wei, J. Wei, Z. Zhang, Y. Wang, et J. Zhang, « Soluble nanographene as a novel cool matrix for small molecule analysis using MALDI-TOF MS », *RSC Adv.*, vol. 6, n° 72, p. 67833-67838, 2016, doi: 10.1039/C6RA10447A.
- [34] Z. Wang, Y. Cai, Y. Wang, X. Zhou, Y. Zhang, et H. Lu, « Improved MALDI imaging MS analysis of phospholipids using graphene oxide as new matrix », *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 44466, mars 2017.
- [35] H. Kang, H. Yun, S. W. Lee, et W.-S. Yeo, « Analysis of small biomolecules and xenobiotic metabolism using converted graphene-like monolayer plates and laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Talanta*, vol. 168, n° Supplement C, p. 240-245, juin 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2017.03.046.

## REFERENCES

- [36] J. Zhang, X. Dong, J. Cheng, J. Li, et Y. Wang, « Efficient Analysis of Non-Polar Environmental Contaminants by MALDI-TOF MS with Graphene as Matrix », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 22, n° 7, p. 1294-1298, 2011, doi: 10.1007/s13361-011-0143-7.
- [37] S. Chen *et al.*, « Carbon Nanodots As a Matrix for the Analysis of Low-Molecular-Weight Molecules in Both Positive- and Negative-Ion Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Quantification of Glucose and Uric Acid in Real Samples », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 14, p. 6646-6652, juill. 2013, doi: 10.1021/ac401601r.
- [38] Q. Min, X. Zhang, X. Chen, S. Li, et J.-J. Zhu, « N-Doped Graphene: An Alternative Carbon-Based Matrix for Highly Efficient Detection of Small Molecules by Negative Ion MALDI-TOF MS », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 18, p. 9122-9130, sept. 2014, doi: 10.1021/ac501943n.
- [39] J. Wang, Q. Liu, Y. Liang, et G. Jiang, « Recent progress in application of carbon nanomaterials in laser desorption/ionization mass spectrometry », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, n° 11, p. 2861-2873, 2016, doi: 10.1007/s00216-015-9255-4.
- [40] Z. Jing, W. Hao-Yang, et G. Yin-Long, « Amino Acids Analysis by MALDI Mass Spectrometry Using Carbon Nanotube as Matrix », *Chin. J. Chem.*, vol. 23, n° 2, p. 185-189, févr. 2005, doi: 10.1002/cjoc.200590185.
- [41] S. Ren et Y. Guo, « Oxidized carbon nanotubes as matrix for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of biomolecules », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 19, n° 2, p. 255-260, janv. 2005, doi: 10.1002/rcm.1779.
- [42] H. Chang, L. Tang, Y. Wang, J. Jiang, et J. Li, « Graphene Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for the Thrombin Detection », *Anal. Chem.*, vol. 82, n° 6, p. 2341-2346, mars 2010, doi: 10.1021/ac9025384.
- [43] X. Zhou, Y. Wei, Q. He, F. Boey, Q. Zhang, et H. Zhang, « Reduced graphene oxide films used as matrix of MALDI-TOF-MS for detection of octachlorodibenzo-p-dioxin », *Chem. Commun.*, vol. 46, n° 37, p. 6974-6976, 2010, doi: 10.1039/C0CC01681K.
- [44] J. T. Robinson *et al.*, « Wafer-scale Reduced Graphene Oxide Films for Nanomechanical Devices », *Nano Lett.*, vol. 8, n° 10, p. 3441-3445, oct. 2008, doi: 10.1021/nl8023092.
- [45] J. Lee, Y.-K. Kim, et D.-H. Min, « Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Assay for Phospholipase Activity Based on Graphene Oxide/Carbon Nanotube Double-Layer Films », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 42, p. 14714-14717, oct. 2010, doi: 10.1021/ja106276j.
- [46] L. A. L. Tang, J. Wang, et K. P. Loh, « Graphene-Based SELDI Probe with Ultrahigh Extraction and Sensitivity for DNA Oligomer », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, n° 32, p. 10976-10977, août 2010, doi: 10.1021/ja104017y.
- [47] M. Lu, Y. Lai, G. Chen, et Z. Cai, « Matrix Interference-Free Method for the Analysis of Small Molecules by Using Negative Ion Laser Desorption/Ionization on Graphene Flakes », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 8, p. 3161-3169, avr. 2011, doi: 10.1021/ac2002559.
- [48] Y. Liu, J. Liu, P. Yin, M. Gao, C. Deng, et X. Zhang, « High throughput identification of components from traditional Chinese medicine herbs by utilizing graphene or graphene oxide as MALDI-TOF-MS matrix », *J. Mass Spectrom.*, vol. 46, n° 8, p. 804-815, 2011, doi: 10.1002/jms.1952.
- [49] C.-W. Liu, M.-W. Chien, C.-Y. Su, H.-Y. Chen, L.-J. Li, et C.-C. Lai, « Analysis of flavonoids by graphene-based surface-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry », *Analyst*, vol. 137, n° 24, p. 5809-5816, 2012, doi: 10.1039/C2AN36155H.
- [50] C.-Y. Su *et al.*, « Electrical and Spectroscopic Characterizations of Ultra-Large Reduced Graphene Oxide Monolayers », *Chem. Mater.*, vol. 21, n° 23, p. 5674-5680, déc. 2009, doi: 10.1021/cm902182y.

## REFERENCES

- [51] Z.-H. Sheng, L. Shao, J.-J. Chen, W.-J. Bao, F.-B. Wang, et X.-H. Xia, « Catalyst-Free Synthesis of Nitrogen-Doped Graphene *via* Thermal Annealing Graphite Oxide with Melamine and Its Excellent Electrocatalysis », *ACS Nano*, vol. 5, n° 6, p. 4350-4358, juin 2011, doi: 10.1021/nn103584t.
- [52] Q. Zhang *et al.*, « Facile Bottom-Up Synthesis of Coronene-based 3-Fold Symmetrical and Highly Substituted Nanographenes from Simple Aromatics », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 136, n° 13, p. 5057-5064, avr. 2014, doi: 10.1021/ja413018f.
- [53] Y.-K. Kim et D.-H. Min, « The Structural Influence of Graphene Oxide on Its Fragmentation during Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry for Efficient Small-Molecule Analysis », *Chem. – Eur. J.*, vol. 21, n° 19, p. 7217-7223, mai 2015, doi: 10.1002/chem.201404067.
- [54] H. Nasser Abdelhamid et H.-F. Wu, « Synthesis of a highly dispersive sinapinic acid@graphene oxide (SA@GO) and its applications as a novel surface assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for proteomics and pathogenic bacteria biosensing », *Analyst*, vol. 140, n° 5, p. 1555-1565, 2015, doi: 10.1039/C4AN02158D.
- [55] Y. Chen, D. Gao, H. Bai, H. Liu, S. Lin, et Y. Jiang, « Carbon Dots and 9AA as a Binary Matrix for the Detection of Small Molecules by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 27, n° 7, p. 1227-1235, 2016, doi: 10.1007/s13361-016-1396-y.
- [56] Z. Liu, J. T. Robinson, X. Sun, et H. Dai, « PEGylated Nanographene Oxide for Delivery of Water-Insoluble Cancer Drugs », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, n° 33, p. 10876-10877, août 2008, doi: 10.1021/ja803688x.
- [57] X. Sun *et al.*, « Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery », *Nano Res.*, vol. 1, n° 3, p. 203-212, sept. 2008, doi: 10.1007/s12274-008-8021-8.
- [58] Y. Yang, Y.-M. Zhang, Y. Chen, D. Zhao, J.-T. Chen, et Y. Liu, « Construction of a Graphene Oxide Based Noncovalent Multiple Nanosupramolecular Assembly as a Scaffold for Drug Delivery », *Chem. – Eur. J.*, vol. 18, n° 14, p. 4208-4215, 2012, doi: 10.1002/chem.201103445.
- [59] U. Dembereldorj, M. Kim, S. Kim, E.-O. Ganbold, S. Yeong Lee, et S.-W. Joo, « A spatiotemporal anticancer drug release platform of PEGylated graphene oxide triggered by glutathione in vitro and in vivo », *J. Mater. Chem.*, vol. 22, n° 45, p. 23845-23851, 2012, doi: 10.1039/C2JM34853E.
- [60] B. Chen, M. Liu, L. Zhang, J. Huang, J. Yao, et Z. Zhang, « Polyethylenimine-functionalized graphene oxide as an efficient gene delivery vector », *J. Mater. Chem.*, vol. 21, n° 21, p. 7736-7741, 2011, doi: 10.1039/C1JM10341E.
- [61] T. Ren, L. Li, X. Cai, H. Dong, S. Liu, et Y. Li, « Engineered polyethylenimine/graphene oxide nanocomposite for nuclear localized gene delivery », *Polym. Chem.*, vol. 3, n° 9, p. 2561-2569, 2012, doi: 10.1039/C2PY20343J.
- [62] K. Yang, L. Feng, X. Shi, et Z. Liu, « Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, n° 2, p. 530-547, 2013, doi: 10.1039/C2CS35342C.
- [63] L. Zhang, Z. Lu, Q. Zhao, J. Huang, H. Shen, et Z. Zhang, « Enhanced Chemotherapy Efficacy by Sequential Delivery of siRNA and Anticancer Drugs Using PEI-Grafted Graphene Oxide », *Small*, vol. 7, n° 4, p. 460-464, 2011, doi: 10.1002/smll.201001522.
- [64] « Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy - Nano Letters (ACS Publications) ». [En ligne]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl100996u>. [Consulté le: 19-mai-2019].
- [65] K. Wang *et al.*, « Biocompatibility of Graphene Oxide », *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 6, n° 1, p. 8, déc. 2011, doi: 10.1007/s11671-010-9751-6.
- [66] L. Yan, F. Zhao, S. Li, Z. Hu, et Y. Zhao, « Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes », *Nanoscale*, vol. 3, n° 2, p. 362-382, 2011, doi: 10.1039/CONR00647E.

## REFERENCES

- [67] S. Kang, M. Pinault, L. D. Pfefferle, et M. Elimelech, « Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity », *Langmuir*, vol. 23, n° 17, p. 8670-8673, août 2007, doi: 10.1021/la701067r.
- [68] S. Kang, M. Herzberg, D. F. Rodrigues, et M. Elimelech, « Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter! », *Langmuir*, vol. 24, n° 13, p. 6409-6413, juill. 2008, doi: 10.1021/la800951v.
- [69] S. Liu *et al.*, « Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress », *ACS Nano*, vol. 5, n° 9, p. 6971-6980, sept. 2011, doi: 10.1021/nn202451x.
- [70] W. Hu *et al.*, « Graphene-Based Antibacterial Paper », *ACS Nano*, vol. 4, n° 7, p. 4317-4323, juill. 2010, doi: 10.1021/nn101097v.
- [71] O. Akhavan et E. Ghaderi, « Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria », *ACS Nano*, vol. 4, n° 10, p. 5731-5736, oct. 2010, doi: 10.1021/nn101390x.
- [72] M. Usman Farid *et al.*, « Mechanistic insight into the in vitro toxicity of graphene oxide against biofilm forming bacteria using laser-induced breakdown spectroscopy », *Nanoscale*, vol. 10, n° 9, p. 4475-4487, 2018, doi: 10.1039/C8NR00189H.
- [73] M. Mortimer, N. Devarajan, D. Li, et P. A. Holden, « Multiwall Carbon Nanotubes Induce More Pronounced Transcriptomic Responses in *Pseudomonas aeruginosa* PG201 than Graphene, Exfoliated Boron Nitride, or Carbon Black », *ACS Nano*, févr. 2018, doi: 10.1021/acsnano.7b08977.
- [74] Q. Bao, D. Zhang, et P. Qi, « Synthesis and characterization of silver nanoparticle and graphene oxide nanosheet composites as a bactericidal agent for water disinfection », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 360, n° 2, p. 463-470, août 2011, doi: 10.1016/j.jcis.2011.05.009.
- [75] T. Dutta *et al.*, « ROS generation by reduced graphene oxide (rGO) induced by visible light showing antibacterial activity: comparison with graphene oxide (GO) », *RSC Adv.*, vol. 5, n° 98, p. 80192-80195, 2015, doi: 10.1039/C5RA14061G.
- [76] Y. Li *et al.*, « Response of MicroRNAs to In Vitro Treatment with Graphene Oxide », *ACS Nano*, vol. 8, n° 3, p. 2100-2110, mars 2014, doi: 10.1021/nn4065378.
- [77] T. Zhou *et al.*, « Energy metabolism analysis reveals the mechanism of inhibition of breast cancer cell metastasis by PEG-modified graphene oxide nanosheets », *Biomaterials*, vol. 35, n° 37, p. 9833-9843, déc. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.08.033.
- [78] B. Zhang, P. Wei, Z. Zhou, et T. Wei, « Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 105, p. 145-162, oct. 2016, doi: 10.1016/j.addr.2016.08.009.
- [79] Y. Chang *et al.*, « In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells », *Toxicol. Lett.*, vol. 200, n° 3, p. 201-210, févr. 2011, doi: 10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
- [80] H. Ali-Boucetta, D. Bitounis, R. Raveendran-Nair, A. Servant, J. V. den Bossche, et K. Kostarelos, « Purified Graphene Oxide Dispersions Lack In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Pathogenicity », *Adv. Healthc. Mater.*, vol. 2, n° 3, p. 433-441, mars 2013, doi: 10.1002/adhm.201200248.
- [81] B. Drasler *et al.*, « Single exposure to aerosolized graphene oxide and graphene nanoplatelets did not initiate an acute biological response in a 3D human lung model », *Carbon*, vol. 137, p. 125-135, oct. 2018, doi: 10.1016/j.carbon.2018.05.012.
- [82] P.-P. Jia *et al.*, « Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) in vitro and in vivo », *Environ. Pollut.*, vol. 247, p. 595-606, avr. 2019, doi: 10.1016/j.envpol.2019.01.072.
- [83] N. Chatterjee, H.-J. Eom, et J. Choi, « A systems toxicology approach to the surface functionality control of graphene-cell interactions », *Biomaterials*, vol. 35, n° 4, p. 1109-1127, janv. 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.09.108.

## REFERENCES

- [84] R. Li *et al.*, « Surface Oxidation of Graphene Oxide Determines Membrane Damage, Lipid Peroxidation, and Cytotoxicity in Macrophages in a Pulmonary Toxicity Model », *ACS Nano*, vol. 12, n° 2, p. 1390-1402, févr. 2018, doi: 10.1021/acsnano.7b07737.
- [85] L. Chen, P. Hu, L. Zhang, S. Huang, L. Luo, et C. Huang, « Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish », *Sci. China Chem.*, vol. 55, n° 10, p. 2209-2216, oct. 2012, doi: 10.1007/s11426-012-4620-z.
- [86] X. T. Liu *et al.*, « Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide to Zebrafish Embryos », *Biomed. Environ. Sci.*, vol. 27, n° 9, p. 676-683, sept. 2014, doi: 10.3967/bes2014.103.
- [87] X. Zhang *et al.*, « Distribution and biocompatibility studies of graphene oxide in mice after intravenous administration », *Carbon*, vol. 49, n° 3, p. 986-995, mars 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2010.11.005.
- [88] P. A. Stapleton *et al.*, « Impairment of coronary arteriolar endothelium-dependent dilation after multi-walled carbon nanotube inhalation: a time-course study », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, n° 11, p. 13781-13803, oct. 2012, doi: 10.3390/ijms131113781.
- [89] L. Mao, M. Hu, B. Pan, Y. Xie, et E. J. Petersen, « Biodistribution and toxicity of radio-labeled few layer graphene in mice after intratracheal instillation », *Part. Fibre Toxicol.*, vol. 13, févr. 2016, doi: 10.1186/s12989-016-0120-1.
- [90] S. Zhang, K. Yang, L. Feng, et Z. Liu, « In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized graphene », *Carbon*, vol. 49, n° 12, p. 4040-4049, oct. 2011, doi: 10.1016/j.carbon.2011.05.056.
- [91] A. Bianco, « Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, n° 19, p. 4986-4997, mai 2013, doi: 10.1002/anie.201209099.
- [92] A. Doerflinger, « Conception et synthèse de micelles polymérisées pour le diagnostic et la thérapie de tumeurs », thesis, Université Paris-Saclay, 2017.
- [93] A. P. Singh, A. Biswas, A. Shukla, et P. Maiti, « Targeted therapy in chronic diseases using nanomaterial-based drug delivery vehicles », *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 4, n° 1, p. 1-21, août 2019, doi: 10.1038/s41392-019-0068-3.
- [94] M. Budai et M. Szógyi, « Liposomes as drug carrier systems. Preparation, classification and therapeutic advantages of liposomes », *Acta Pharm. Hung.*, vol. 71, n° 1, p. 114-118, 2001.
- [95] F. Lai, A. M. Fadda, et C. Sinico, « Liposomes for brain delivery », *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, n° 7, p. 1003-1022, juill. 2013, doi: 10.1517/17425247.2013.766714.
- [96] D. B. Vieira et L. F. Gamarra, « Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood–brain barrier », *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, p. 5381-5414, oct. 2016, doi: 10.2147/IJN.S117210.
- [97] M. K. Riaz *et al.*, « Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n° 1, p. 195, janv. 2018, doi: 10.3390/ijms19010195.
- [98] S. Joshi *et al.*, « Cerebral Hypoperfusion-Assisted Intra-arterial Deposition of Liposomes in Normal and Glioma-Bearing Rats », *Neurosurgery*, vol. 76, n° 1, p. 92-100, janv. 2015, doi: 10.1227/NEU.0000000000000552.
- [99] H. Ding *et al.*, « Enhanced blood–brain barrier transmigration using a novel transferrin embedded fluorescent magneto-liposome nanoformulation », *Nanotechnology*, vol. 25, n° 5, p. 055101, janv. 2014, doi: 10.1088/0957-4484/25/5/055101.
- [100] H. Guo, W. Chen, X. Sun, Y.-N. Liu, J. Li, et J. Wang, « Theranostic magnetoliposomes coated by carboxymethyl dextran with controlled release by low-frequency alternating magnetic field », *Carbohydr. Polym.*, vol. 118, p. 209-217, mars 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.076.

## REFERENCES

- [101] A. L. Petersen, A. E. Hansen, A. Gabizon, et T. L. Andresen, « Liposome imaging agents in personalized medicine », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, n° 13, p. 1417-1435, oct. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.003.
- [102] E. Portnoy, S. Lecht, P. Lazarovici, D. Danino, et S. Magdassi, « Cetuximab-labeled liposomes containing near-infrared probe for in vivo imaging », *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.*, vol. 7, n° 4, p. 480-488, août 2011, doi: 10.1016/j.nano.2011.01.001.
- [103] S. Li, B. Goins, L. Zhang, et A. Bao, « Novel Multifunctional Theranostic Liposome Drug Delivery System: Construction, Characterization, and Multimodality MR, Near-Infrared Fluorescent, and Nuclear Imaging », *Bioconjug. Chem.*, vol. 23, n° 6, p. 1322-1332, juin 2012, doi: 10.1021/bc300175d.
- [104] M. Silindir-Gunay, M. Karpuz, N. Ozturk, A. Yekta Ozer, S. Erdogan, et M. Tuncel, « Radiolabeled, folate-conjugated liposomes as tumor imaging agents: Formulation and in vitro evaluation », *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 50, p. 321-328, avr. 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.02.003.
- [105] A. R. Hilgenbrink et P. S. Low, « Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics », *J. Pharm. Sci.*, vol. 94, n° 10, p. 2135-2146, oct. 2005, doi: 10.1002/jps.20457.
- [106] V. P. Torchilin, « Micellar Nanocarriers: Pharmaceutical Perspectives », *Pharm. Res.*, vol. 24, n° 1, p. 1, nov. 2006, doi: 10.1007/s11095-006-9132-0.
- [107] N. Mackiewicz *et al.*, « Tumor-Targeted Polydiacetylene Micelles for In Vivo Imaging and Drug Delivery », *Small*, vol. 7, n° 19, p. 2786-2792, 2011, doi: 10.1002/smll.201100212.
- [108] J. Rodenburg, « A record-breaking microscope », *Nature*, vol. 559, n° 7714, p. 334, juill. 2018, doi: 10.1038/d41586-018-05711-y.
- [109] Y. Jiang *et al.*, « Electron ptychography of 2D materials to deep sub-ångström resolution », *Nature*, vol. 559, n° 7714, p. 343, juill. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0298-5.
- [110] A. R. Montoro Bustos *et al.*, « Validation of Single Particle ICP-MS for Routine Measurements of Nanoparticle Size and Number Size Distribution », *Anal. Chem.*, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b03871.
- [111] D. Metarapi, M. Šala, K. Vogel-Mikuš, V. S. Šelih, et J. T. van Elteren, « Nanoparticle Analysis in Biomaterials Using Laser Ablation–Single Particle–Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 9, p. 6200-6205, mai 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00853.
- [112] D. S. Cornett, M. L. Reyzer, P. Chaurand, et R. M. Caprioli, « MALDI imaging mass spectrometry: molecular snapshots of biochemical systems », *Nat Meth*, vol. 4, n° 10, p. 828-833, oct. 2007, doi: 10.1038/nmeth1094.
- [113] S. Schulz, M. Becker, M. R. Groseclose, S. Schadt, et C. Hopf, « Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development », *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 55, p. 51-59, févr. 2019, doi: 10.1016/j.copbio.2018.08.003.
- [114] A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, et C. Lechene, « Transport of <sup>13</sup>C-oleate in adipocytes measured using multi imaging mass spectrometry », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, n° 11, p. 1572-1580, nov. 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2004.07.010.
- [115] X. Wang, J. Han, J. Pan, et C. H. Borchers, « Comprehensive Imaging of Porcine Adrenal Gland Lipids by MALDI-FTMS Using Quercetin as a Matrix », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 1, p. 638-646, janv. 2014, doi: 10.1021/ac404044k.
- [116] M. Hunter, N. J. Demarais, R. L. M. Faull, A. C. Grey, et M. A. Curtis, « Layer-specific lipid signatures in the human subventricular zone demonstrated by imaging mass spectrometry », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 2551, févr. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-20793-4.
- [117] X. Liu *et al.*, « MALDI-MSI of Immunotherapy: Mapping the EGFR-Targeting Antibody Cetuximab in 3D Colon Cancer Cell Cultures », *Anal. Chem.*, nov. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b02151.



## REFERENCES

- [118] K. Y. Garza, C. L. Feider, D. R. Klein, J. A. Rosenberg, J. S. Brodbelt, et L. S. Eberlin, « Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging of Proteins Directly from Biological Tissue Sections », *Anal. Chem.*, mai 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b00967.
- [119] V. Delcourt *et al.*, « Spatially-Resolved Top-down Proteomics Bridged to MALDI MS Imaging Reveals the Molecular Physiome of Brain Regions », *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 17, n° 2, p. 357-372, févr. 2018, doi: 10.1074/mcp.M116.065755.
- [120] Y. Fujimura et D. Miura, « MALDI Mass Spectrometry Imaging for Visualizing In Situ Metabolism of Endogenous Metabolites and Dietary Phytochemicals », *Metabolites*, vol. 4, n° 2, p. 319-346, juin 2014, doi: 10.3390/metabo4020319.
- [121] S. A. Stopka *et al.*, « Ambient Metabolic Profiling and Imaging of Biological Samples with Ultrahigh Molecular Resolution Using Laser Ablation Electrospray Ionization 21 Tesla FTICR Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 8, p. 5028-5035, avr. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b05084.
- [122] A. D. Feenstra, M. E. Dueñas, et Y. J. Lee, « Five Micron High Resolution MALDI Mass Spectrometry Imaging with Simple, Interchangeable, Multi-Resolution Optical System », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, n° 3, p. 434-442, mars 2017, doi: 10.1007/s13361-016-1577-8.
- [123] M. Kompauer, S. Heiles, et B. Spengler, « Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- $\mu$ m lateral resolution », *Nat Meth*, vol. 14, n° 1, p. 90-96, janv. 2017.
- [124] E. R. Amstalden van Hove, D. F. Smith, et R. M. A. Heeren, « A concise review of mass spectrometry imaging », *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, n° 25, p. 3946-3954, juin 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.01.033.
- [125] K. Chughtai et R. M. A. Heeren, « Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis », *Chem Rev*, vol. 110, 2010, doi: 10.1021/cr100012c.
- [126] R. M. A. Heeren, « Getting the picture: The coming of age of imaging MS », *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 377, p. 672-680, févr. 2015, doi: 10.1016/j.ijms.2014.04.021.
- [127] D. Touboul, O. Laprévotte, et A. Brunelle, « Micrometric molecular histology of lipids by mass spectrometry imaging », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 15, n° 5, p. 725-732, oct. 2011, doi: 10.1016/j.cbpa.2011.04.017.
- [128] F. Fenaille, P. Barbier Saint-Hilaire, K. Rousseau, et C. Junot, « Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? », *J. Chromatogr. A*, vol. 1526, p. 1-12, déc. 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.10.043.
- [129] J. L. Norris et R. M. Caprioli, « Analysis of Tissue Specimens by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry in Biological and Clinical Research », *Chem. Rev.*, vol. 113, n° 4, p. 2309-2342, avr. 2013, doi: 10.1021/cr3004295.
- [130] M. L. Manier *et al.*, « Reagent Precoated Targets for Rapid In-Tissue Derivatization of the Anti-Tuberculosis Drug Isoniazid Followed by MALDI Imaging Mass Spectrometry », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 22, n° 8, p. 1409-1419, août 2011, doi: 10.1007/s13361-011-0150-8.
- [131] B. Flinders *et al.*, « Optimization of Sample Preparation and Instrumental Parameters for the Rapid Analysis of Drugs of Abuse in Hair samples by MALDI-MS/MS Imaging », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 28, n° 11, p. 2462-2468, nov. 2017, doi: 10.1007/s13361-017-1766-0.
- [132] B. M. Prentice, C. W. Chumbley, B. C. Hachey, J. L. Norris, et R. M. Caprioli, « Multiple Time-of-Flight/Time-of-Flight Events in a Single Laser Shot for Improved Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Tandem Mass Spectrometry Quantification », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 19, p. 9780-9788, oct. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02821.
- [133] M. Sans, C. L. Feider, et L. S. Eberlin, « Advances in mass spectrometry imaging coupled to ion mobility spectrometry for enhanced imaging of biological tissues », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 42, p. 138-146, févr. 2018, doi: 10.1016/j.cbpa.2017.12.005.

## REFERENCES

- [134] A. Moreno-Pedraza *et al.*, « Elucidating the Distribution of Plant Metabolites from Native Tissues with Laser Desorption Low-Temperature Plasma Mass Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 4, p. 2734-2743, févr. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04406.
- [135] E. Gemperline, H. A. Horn, K. DeLaney, C. R. Currie, et L. Li, « Imaging with Mass Spectrometry of Bacteria on the Exoskeleton of Fungus-Growing Ants », *ACS Chem. Biol.*, vol. 12, n° 8, p. 1980-1985, août 2017, doi: 10.1021/acscchembio.7b00038.
- [136] E. K. Neumann, T. J. Comi, S. S. Rubakhin, et J. V. Sweedler, « Lipid Heterogeneity between Astrocytes and Neurons Revealed by Single-Cell MALDI-MS Combined with Immunocytochemical Classification », *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 58, n° 18, p. 5910-5914, 2019, doi: 10.1002/anie.201812892.
- [137] B. K. Kaletaş *et al.*, « Sample preparation issues for tissue imaging by imaging MS », *PROTEOMICS*, vol. 9, n° 10, p. 2622-2633, 2009, doi: 10.1002/pmic.200800364.
- [138] R. J. A. Goodwin, « Sample preparation for mass spectrometry imaging: Small mistakes can lead to big consequences », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 16, p. 4893-4911, août 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.012.
- [139] Y. Masuo *et al.*, « Brain Proteomics: Sample Preparation Techniques for the Analysis of Rat Brain Samples Using Mass Spectrometry », in *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*, A. R. Ivanov et A. V. Lazarev, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, p. 171-195.
- [140] D. Tran *et al.*, « Sample Preparation of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Tissue for Proteomic Analyses », in *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry*, A. R. Ivanov et A. V. Lazarev, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011, p. 159-170.
- [141] I. A. Mulder *et al.*, « Funnel-freezing versus heat-stabilization for the visualization of metabolites by mass spectrometry imaging in a mouse stroke model », *PROTEOMICS*, vol. 16, n° 11-12, p. 1652-1659, 2016, doi: 10.1002/pmic.201500402.
- [142] A. Ly *et al.*, « High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue », *Nat Protoc.*, vol. 11, n° 8, p. 1428-1443, août 2016.
- [143] J. Oetjen *et al.*, « An approach to optimize sample preparation for MALDI imaging MS of FFPE sections using fractional factorial design of experiments », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, n° 24, p. 6729-6740, sept. 2016, doi: 10.1007/s00216-016-9793-4.
- [144] S. Kaspar, M. Peukert, A. Svatos, A. Matros, et H.-P. Mock, « MALDI-imaging mass spectrometry – An emerging technique in plant biology », *PROTEOMICS*, vol. 11, n° 9, p. 1840-1850, 2011, doi: 10.1002/pmic.201000756.
- [145] R. J. A. Goodwin, S. R. Pennington, et A. R. Pitt, « Protein and peptides in pictures: Imaging with MALDI mass spectrometry », *PROTEOMICS*, vol. 8, n° 18, p. 3785-3800, 2008, doi: 10.1002/pmic.200800320.
- [146] M. Stoeckli, D. Staab, et A. Schweitzer, « Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections », *Imaging Mass Spectrom. Spec. Issue*, vol. 260, n° 2-3, p. 195-202, févr. 2007, doi: 10.1016/j.ijms.2006.10.007.
- [147] N. Zaima, N. Goto-Inoue, T. Hayasaka, et M. Setou, « Application of imaging mass spectrometry for the analysis of *Oryza sativa* rice », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, n° 18, p. 2723-2729, 2010, doi: 10.1002/rcm.4693.
- [148] M. Demeyer *et al.*, « Inter- and intra-organ spatial distributions of sea star saponins by MALDI imaging », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 29, p. 8813-8824, nov. 2015, doi: 10.1007/s00216-015-9044-0.
- [149] R. J. A. Goodwin *et al.*, « Conductive carbon tape used for support and mounting of both whole animal and fragile heat-treated tissue sections for MALDI MS imaging and quantitation », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 16, p. 4912-4920, août 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.006.

## REFERENCES

- [150] D. Saigusa *et al.*, « Conductive Adhesive Film Expands the Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, juin 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01159.
- [151] A. Arendowski et T. Ruman, « Laser Desorption/Ionisation Mass Spectrometry Imaging of European Yew (*Taxus baccata*) on Gold Nanoparticle-enhanced Target », *Phytochem. Anal.*, vol. 28, n° 5, p. 448-453, 2017, doi: 10.1002/pca.2693.
- [152] R. J. Goodwin, J. C. Dungworth, S. R. Cobb, et A. R. Pitt, « Time-dependent evolution of tissue markers by MALDI-MS imaging », *Proteomics*, vol. 8, n° 18, p. 3801–3808, 2008.
- [153] Y. Sugiura, S. Shimma, et M. Setou, « Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry », *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, vol. 54, n° 2, p. 45-48, 2006, doi: 10.5702/massspec.54.45.
- [154] S. A. Schwartz, M. L. Reyzer, et R. M. Caprioli, « Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation », *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, n° 7, p. 699-708, juill. 2003, doi: 10.1002/jms.505.
- [155] H. Yang *et al.*, « Organic washes of tissue sections for comprehensive analysis of small molecule metabolites by MALDI MS imaging of rat brain following status epilepticus », *Metabolomics*, vol. 14, n° 4, p. 50, avr. 2018, doi: 10.1007/s11306-018-1348-6.
- [156] P. M. Angel, J. M. Spraggins, H. S. Baldwin, et R. Caprioli, « Enhanced Sensitivity for High Spatial Resolution Lipid Analysis by Negative Ion Mode Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 3, p. 1557-1564, févr. 2012, doi: 10.1021/ac202383m.
- [157] H. C. Diehl *et al.*, « The challenge of on-tissue digestion for MALDI MSI— a comparison of different protocols to improve imaging experiments », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 8, p. 2223-2243, mars 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8345-z.
- [158] S. Vens-Cappell *et al.*, « On-Tissue Phospholipase C Digestion for Enhanced MALDI-MS Imaging of Neutral Glycosphingolipids », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 11, p. 5595-5599, juin 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01084.
- [159] T. Toyo'oka, « LC-MS determination of bioactive molecules based upon stable isotope-coded derivatization method », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 69, n° Supplement C, p. 174-184, oct. 2012, doi: 10.1016/j.jpba.2012.04.018.
- [160] Q.-Y. Cheng *et al.*, « Sensitive Determination of Onco-metabolites of D- and L-2-hydroxyglutarate Enantiomers by Chiral Derivatization Combined with Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis », *Sci. Rep.*, vol. 5, n° 1, déc. 2015, doi: 10.1038/srep15217.
- [161] J.-M. T. Wong, P. A. Malec, O. S. Mabrouk, J. Ro, M. Dus, et R. T. Kennedy, « Benzoyl chloride derivatization with liquid chromatography–mass spectrometry for targeted metabolomics of neurochemicals in biological samples », *J. Chromatogr. A*, vol. 1446, p. 78-90, mai 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.04.006.
- [162] A. Chacon *et al.*, « On-tissue chemical derivatization of 3-methoxysalicylamine for MALDI-imaging mass spectrometry », *J. Mass Spectrom.*, vol. 46, n° 8, p. 840-846, 2011, doi: 10.1002/jms.1958.
- [163] M. L. Manier, J. M. Spraggins, M. L. Reyzer, J. L. Norris, et R. M. Caprioli, « A derivatization and validation strategy for determining the spatial localization of endogenous amine metabolites in tissues using MALDI imaging mass spectrometry », *J. Mass Spectrom.*, vol. 49, n° 8, p. 665-673, 2014, doi: 10.1002/jms.3411.
- [164] C. Esteve, E. A. Tolner, R. Shyti, A. M. J. M. van den Maagdenberg, et L. A. McDonnell, « Mass spectrometry imaging of amino neurotransmitters: a comparison of derivatization methods and application in mouse brain tissue », *Metabolomics*, vol. 12, n° 2, p. 30, févr. 2016, doi: 10.1007/s11306-015-0926-0.

## REFERENCES

- [165] J. Franck, M. El Ayed, M. Wisztorski, M. Salzet, et I. Fournier, « On-Tissue N-Terminal Peptide Derivatizations for Enhancing Protein Identification in MALDI Mass Spectrometric Imaging Strategies », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 20, p. 8305-8317, oct. 2009, doi: 10.1021/ac901043n.
- [166] I. Hailat et R. J. Helleur, « Direct analysis of sterols by derivatization matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 28, n° 2, p. 149-158, 2013, doi: 10.1002/rcm.6766.
- [167] A. Nimptsch *et al.*, « A simple method to identify ether lipids in spermatozoa samples by MALDI-TOF mass spectrometry », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, n° 21, p. 6675-6682, août 2013, doi: 10.1007/s00216-013-7147-z.
- [168] M. Shariatgorji *et al.*, « Pyrylium Salts as Reactive Matrices for MALDI-MS Imaging of Biologically Active Primary Amines », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, n° 6, p. 934-939, juin 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1119-9.
- [169] B. Flinders, J. Morrell, P. S. Marshall, L. E. Ranshaw, et M. R. Clench, « The use of hydrazine-based derivatization reagents for improved sensitivity and detection of carbonyl containing compounds using MALDI-MSI », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 8, p. 2085-2094, mars 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8223-8.
- [170] S. Toue *et al.*, « Microscopic imaging mass spectrometry assisted by on-tissue chemical derivatization for visualizing multiple amino acids in human colon cancer xenografts », *PROTEOMICS*, vol. 14, n° 7-8, p. 810-819, 2014, doi: 10.1002/pmic.201300041.
- [171] P. D. Edirisinghe *et al.*, « Detection of In Situ Derivatized Peptides in Microbial Biofilms by Laser Desorption 7.87 eV Postionizaton Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 2, p. 508-514, janv. 2007, doi: 10.1021/ac0615605.
- [172] E. Sugiyama, N. Masaki, S. Matsushita, et M. Setou, « Ammonium Sulfate Improves Detection of Hydrophilic Quaternary Ammonium Compounds through Decreased Ion Suppression in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 22, p. 11176-11181, nov. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b02672.
- [173] Y.-G. Kim, D. J. Harvey, Y.-H. Yang, C.-G. Park, et B.-G. Kim, « Mass spectrometric analysis of the glycosphingolipid-derived glycans from miniature pig endothelial cells and islets: identification of NeuGc epitope in pig islets », *J. Mass Spectrom.*, vol. 44, n° 10, p. 1489-1499, 2009, doi: 10.1002/jms.1638.
- [174] D. F. Cobice *et al.*, « Mass Spectrometry Imaging for Dissecting Steroid Intracrinology within Target Tissues », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 23, p. 11576-11584, déc. 2013, doi: 10.1021/ac402777k.
- [175] J. D. Manna, M. L. Reyzer, J. C. Latham, C. D. Weaver, L. J. Marnett, et R. M. Caprioli, « High-Throughput Quantification of Bioactive Lipids by MALDI Mass Spectrometry: Application to Prostaglandins », *Anal. Chem.*, vol. 83, n° 17, p. 6683-6688, sept. 2011, doi: 10.1021/ac201224n.
- [176] P. Keski-Rahkonen, R. Desai, M. Jimenez, D. T. Harwood, et D. J. Handelsman, « Measurement of Estradiol in Human Serum by LC-MS/MS Using a Novel Estrogen-Specific Derivatization Reagent », *Anal. Chem.*, vol. 87, n° 14, p. 7180-7186, juill. 2015, doi: 10.1021/acs.analchem.5b01042.
- [177] P. Wang, Q. Zhang, Y. Yao, et R. W. Giese, « Cationic Xylene Tag for Increasing Sensitivity in Mass Spectrometry », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, n° 10, p. 1713-1721, oct. 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1200-4.
- [178] K. Strupat, M. Karas, et F. Hillenkamp, « 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption—ionization mass spectrometry », *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 111, p. 89-102, déc. 1991, doi: 10.1016/0168-1176(91)85050-V.

## REFERENCES

- [179] R. C. Beavis, T. Chaudhary, et B. T. Chait, «  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix-assisted laser desorption mass spectrometry », *Org. Mass Spectrom.*, vol. 27, n° 2, p. 156-158, 1992, doi: 10.1002/oms.1210270217.
- [180] R. C. Beavis, B. T. Chait, et K. G. Standing, « Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 3, n° 12, p. 436-439, 1989, doi: 10.1002/rcm.1290031208.
- [181] A. Tholey et E. Heinzle, « Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry—applications and perspectives », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 386, n° 1, p. 24-37, sept. 2006, doi: 10.1007/s00216-006-0600-5.
- [182] G. Stübiger et O. Belgacem, « Analysis of Lipids Using 2,4,6-Trihydroxyacetophenone as a Matrix for MALDI Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 8, p. 3206-3213, avr. 2007, doi: 10.1021/ac062236c.
- [183] R. L. Vermillion-Salsbury et D. M. Hercules, « 9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, n° 16, p. 1575-1581, 2002, doi: 10.1002/rcm.750.
- [184] H.-R. Aerni, D. S. Cornett, et R. M. Caprioli, « Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation », *Anal. Chem.*, vol. 78, n° 3, p. 827-834, févr. 2006, doi: 10.1021/ac051534r.
- [185] M. A. R. Meier, B.-J. de Gans, A. M. J. van den Berg, et U. S. Schubert, « Automated multiple-layer spotting for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of synthetic polymers utilizing ink-jet printing technology », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, n° 20, p. 2349-2353, 2003, doi: 10.1002/rcm.1195.
- [186] A. M. Delvolve et A. S. Woods, « Optimization of automated matrix deposition for biomolecular mapping using a spotter », *J. Mass Spectrom.*, vol. 46, n° 10, p. 1046-1050, 2011, doi: 10.1002/jms.1986.
- [187] R. Fernandez, J. Garate, L. Martín-Saiz, I. Galetich, et J. A. Fernandez, « NOVEL MATRIX SUBLIMATION DEVICE FOR MALDI MASS SPECTROMETRY IMAGING », *Anal. Chem.*, déc. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04765.
- [188] D. L. Baluya, T. J. Garrett, et R. A. Yost, « Automated MALDI Matrix Deposition Method with Inkjet Printing for Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 17, p. 6862-6867, sept. 2007, doi: 10.1021/ac070958d.
- [189] L. Tucker *et al.*, « MALDI Matrix Application Utilizing a Modified 3D Printer for Accessible High Resolution Mass Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, juin 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b00670.
- [190] M. Stoeckli et D. Staab, « Reproducible Matrix Deposition for MALDI MSI Based on Open-Source Software and Hardware », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, n° 6, p. 911-914, juin 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1099-9.
- [191] E. Gemperline, S. Rawson, et L. Li, « Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 20, p. 10030-10035, oct. 2014, doi: 10.1021/ac5028534.
- [192] E. Gemperline, S. Rawson, et L. Li, « Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 20, p. 10030-10035, oct. 2014, doi: 10.1021/ac5028534.
- [193] S. Van Nuffel *et al.*, « Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 3, p. 1907-1914, févr. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b03993.
- [194] O. Rübél *et al.*, « OpenMSI: A High-Performance Web-Based Platform for Mass Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 21, p. 10354-10361, nov. 2013, doi: 10.1021/ac402540a.

## REFERENCES

- [195] A. Palmer *et al.*, « FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry », *Nat Meth*, vol. 14, n° 1, p. 57-60, janv. 2017.
- [196] K. Veselkov *et al.*, « BASIS: High-performance bioinformatics platform for processing of large-scale mass spectrometry imaging data in chemically augmented histology », *Sci. Rep.*, vol. 8, n° 1, p. 4053, mars 2018, doi: 10.1038/s41598-018-22499-z.
- [197] N. J. Bond, A. Koulman, J. L. Griffin, et Z. Hall, « massPix: an R package for annotation and interpretation of mass spectrometry imaging data for lipidomics », *Metabolomics*, vol. 13, n° 11, p. 128, sept. 2017, doi: 10.1007/s11306-017-1252-5.
- [198] A. M. Race, A. D. Palmer, A. Dexter, R. T. Steven, I. B. Styles, et J. Bunch, « SpectralAnalysis: Software for the Masses », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 19, p. 9451-9458, oct. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b01643.
- [199] P. Källback, A. Nilsson, M. Shariatgorji, et P. E. Andrén, « mslQuant – Quantitation Software for Mass Spectrometry Imaging Enabling Fast Access, Visualization, and Analysis of Large Data Sets », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 8, p. 4346-4353, avr. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04603.
- [200] M. T. Bokhart, M. Nazari, K. P. Garrard, et D. C. Muddiman, « MSiReader v1.0: Evolving Open-Source Mass Spectrometry Imaging Software for Targeted and Untargeted Analyses », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 29, n° 1, p. 8-16, janv. 2018, doi: 10.1007/s13361-017-1809-6.
- [201] S. Clerens, R. Ceuppens, et L. Arckens, « CreateTarget and Analyze This!: new software assisting imaging mass spectrometry on Bruker Reflex IV and Ultraflex II instruments », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 20, n° 20, p. 3061-3066, oct. 2006, doi: 10.1002/rcm.2698.
- [202] S. Gibb et K. Strimmer, « MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data », *Bioinformatics*, vol. 28, n° 17, p. 2270-2271, sept. 2012, doi: 10.1093/bioinformatics/bts447.
- [203] R. M. Parry, A. S. Galhena, C. M. Gamage, R. V. Bennett, M. D. Wang, et F. M. Fernández, « OmniSpect: An Open MATLAB-Based Tool for Visualization and Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Images », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 24, n° 4, p. 646-649, avr. 2013, doi: 10.1007/s13361-012-0572-y.
- [204] I. Klinkert, K. Chughtai, S. R. Ellis, et R. M. A. Heeren, « Methods for full resolution data exploration and visualization for large 2D and 3D mass spectrometry imaging datasets », *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 362, p. 40-47, avr. 2014, doi: 10.1016/j.ijms.2013.12.012.
- [205] M.-F. Robbe *et al.*, « Software Tools of the Computis European Project to Process Mass Spectrometry Images », *Eur. J. Mass Spectrom.*, vol. 20, n° 5, p. 351-360, oct. 2014, doi: 10.1255/ejms.1293.
- [206] K. D. Bemis *et al.*, « Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments », *Bioinformatics*, vol. 31, n° 14, p. 2418-2420, juill. 2015, doi: 10.1093/bioinformatics/btv146.
- [207] A. Shrivastava et V. Gupta, « Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods », *Chron. Young Sci.*, vol. 2, n° 1, p. 21, 2011, doi: 10.4103/2229-5186.79345.
- [208] V. P. Shah *et al.*, « Conference report: analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies », *Pharm Res*, vol. 9, n° 4, p. 588-592, 1992.
- [209] E. A. Jones, S.-O. Deininger, P. C. W. Hogendoorn, A. M. Deelder, et L. A. McDonnell, « Imaging mass spectrometry statistical analysis », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 16, p. 4962-4989, août 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.06.014.
- [210] J. M. Fonville *et al.*, « Robust Data Processing and Normalization Strategy for MALDI Mass Spectrometric Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 3, p. 1310-1319, févr. 2012, doi: 10.1021/ac201767g.

## REFERENCES

- [211] P. Ràfols *et al.*, « Signal preprocessing, multivariate analysis and software tools for MA(LDI)-TOF mass spectrometry imaging for biological applications », *Mass Spectrom. Rev.*, p. n/a–n/a, 2016, doi: 10.1002/mas.21527.
- [212] S. R. Ellis, A. L. Bruinen, et R. M. A. Heeren, « A critical evaluation of the current state-of-the-art in quantitative imaging mass spectrometry », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 5, p. 1275-1289, févr. 2014, doi: 10.1007/s00216-013-7478-9.
- [213] P. Källback, M. Shariatgorji, A. Nilsson, et P. E. Andrén, « Novel mass spectrometry imaging software assisting labeled normalization and quantitation of drugs and neuropeptides directly in tissue sections », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 16, p. 4941-4951, août 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.034.
- [214] G. Hamm *et al.*, « Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor », *J. Proteomics*, vol. 75, n° 16, p. 4952-4961, août 2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.035.
- [215] A. Taylor, A. Dexter, et J. Bunch, « Exploring ion suppression in mass spectrometry imaging of a heterogeneous tissue », *Anal. Chem.*, févr. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b05005.
- [216] I. Rzagalinski et D. A. Volmer, « Quantification of low molecular weight compounds by MALDI imaging mass spectrometry – A tutorial review », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics*, vol. 1865, n° 7, p. 726-739, juill. 2017, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.12.011.
- [217] A. Buck *et al.*, « Distribution and quantification of irinotecan and its active metabolite SN-38 in colon cancer murine model systems using MALDI MSI », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 8, p. 2107-2116, mars 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8237-2.
- [218] N. Sun *et al.*, « Pharmacokinetic and pharmacometabolomic study of pirfenidone in normal mouse tissues using high mass resolution MALDI-FTICR-mass spectrometry imaging », *Histochem. Cell Biol.*, vol. 145, n° 2, p. 201-211, févr. 2016, doi: 10.1007/s00418-015-1382-7.
- [219] J. G. Swales *et al.*, « Quantitation of Endogenous Metabolites in Mouse Tumors Using Mass-Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 10, p. 6051-6058, mai 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b05239.
- [220] C. W. Chumbley *et al.*, « Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 4, p. 2392-2398, févr. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04409.
- [221] S. L. Koeniger *et al.*, « A quantitation method for mass spectrometry imaging », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 25, n° 4, p. 503-510, févr. 2011, doi: 10.1002/rcm.4891.
- [222] N. Takai, Y. Tanaka, K. Inazawa, et H. Saji, « Quantitative analysis of pharmaceutical drug distribution in multiple organs by imaging mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 26, n° 13, p. 1549-1556, juill. 2012, doi: 10.1002/rcm.6256.
- [223] E. Takeo et S. Shimma, « Development of quantitative imaging mass spectrometry (q-IMS) for drug visualization using animal tissues », *Surf. Interface Anal.*, vol. 51, n° 1, p. 21-26, 2019, doi: 10.1002/sia.6537.
- [224] M. Lagarrigue *et al.*, « Localization and in Situ Absolute Quantification of Chlordecone in the Mouse Liver by MALDI Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 12, p. 5775-5783, juin 2014, doi: 10.1021/ac500313s.
- [225] M. R. Groseclose et S. Castellino, « A Mimetic Tissue Model for the Quantification of Drug Distributions by MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 85, n° 21, p. 10099-10106, nov. 2013, doi: 10.1021/ac400892z.
- [226] J. A. Barry, M. R. Groseclose, D. D. Fraser, et S. Castellino, « Revised Preparation of a Mimetic Tissue Model for Quantitative Imaging Mass Spectrometry | Research Square », 2018. [En ligne]. Disponible sur: <https://protocolexchange.researchsquare.com/article/nprot-6995/v1>. [Consulté le: 18-juill-2019].

## REFERENCES

- [227] L. Jadoul, R. Longuespée, A. Noël, et E. D. Pauw, « A spiked tissue-based approach for quantification of phosphatidylcholines in brain section by MALDI mass spectrometry imaging », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 8, p. 2095-2106, mars 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8232-7.
- [228] H. T. Hansen et C. Janfelt, « Aspects of Quantitation in Mass Spectrometry Imaging Investigated on Cryo-Sections of Spiked Tissue Homogenates », *Anal. Chem.*, vol. 88, n° 23, p. 11513-11520, déc. 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.6b02711.
- [229] MICHAEL THOMPSON, STEPHEN L. R. ELLISON, et ROGER WOOD, « HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS ». [En ligne]. Disponible sur: <http://www.nicpbp.org.cn/directory/web/WS02/images/SVVQQUMgbWV0aG9kIHZhbGlkYXRpb24ucGRm.pdf>. [Consulté le: 12-sept-2018].
- [230] M. B. O'Rourke, S. P. Djordjevic, et M. P. Padula, « The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry », *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 37, n° 2, p. 217-228, 2016, doi: 10.1002/mas.21515.
- [231] G. De Sio *et al.*, « A MALDI-Mass Spectrometry Imaging method applicable to different formalin-fixed paraffin-embedded human tissues », *Mol. Biosyst.*, vol. 11, n° 6, p. 1507-1514, 2015, doi: 10.1039/C4MB00716F.
- [232] N. Abbassi-Ghadi *et al.*, « Repeatability and reproducibility of desorption electrospray ionization-mass spectrometry (DESI-MS) for the imaging analysis of human cancer tissue: a gateway for clinical applications », *Anal. Methods*, vol. 7, n° 1, p. 71-80, 2015, doi: 10.1039/C4AY01770F.
- [233] A. M. Porcari *et al.*, « Multicenter Study Using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for Breast-Cancer Diagnosis », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 19, p. 11324-11332, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01961.
- [234] J. A. Barry *et al.*, « Multicenter Validation Study of Quantitative Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, avr. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b01016.
- [235] D. Touboul, S. Roy, D. P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, et O. Laprèvote, « MALDI-TOF and cluster-TOF-SIMS imaging of Fabry disease biomarkers », *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 260, n° 2, p. 158-165, févr. 2007, doi: 10.1016/j.ijms.2006.09.027.
- [236] N. Desbenoit, A. Walch, B. Spengler, A. Brunelle, et A. Römpf, « Correlative mass spectrometry imaging, applying time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization to a single tissue section », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 32, n° 2, p. 159-166, janv. 2018, doi: 10.1002/rcm.8022.
- [237] S. Chughtai *et al.*, « A multimodal mass spectrometry imaging approach for the study of musculoskeletal tissues », *Int. J. Mass Spectrom.*, vol. 325-327, p. 150-160, juill. 2012, doi: 10.1016/j.ijms.2012.07.008.
- [238] K. Fuchs *et al.*, « Mapping of drug distribution in the rabbit liver tumor model by complementary fluorescence and mass spectrometry imaging », *J. Controlled Release*, vol. 269, p. 128-135, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jconrel.2017.10.042.
- [239] N. H. Patterson *et al.*, « Next Generation Histology-directed Imaging Mass Spectrometry Driven by Autofluorescence Microscopy », *Anal. Chem.*, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b02885.
- [240] N. H. Patterson, M. Tuck, R. Van de Plas, et R. M. Caprioli, « Advanced Registration and Analysis of MALDI Imaging Mass Spectrometry Measurements through Autofluorescence Microscopy », *Anal. Chem.*, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b02884.
- [241] E. G. Solon, A. Schweitzer, M. Stoeckli, et B. Prideaux, « Autoradiography, MALDI-MS, and SIMS-MS Imaging in Pharmaceutical Discovery and Development », *AAPS J.*, vol. 12, n° 1, p. 11-26, 2010, doi: 10.1208/s12248-009-9158-4.
- [242] D. M. Drexler, S. H. Tannehill-Gregg, L. Wang, et B. J. Brock, « Utility of quantitative whole-body autoradiography (QWBA) and imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser



## REFERENCES

- desorption/ionization (MALDI) in the assessment of ocular distribution of drugs », *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 63, n° 2, p. 205-208, mars 2011, doi: 10.1016/j.vascn.2010.10.003.
- [243] R. J. A. Goodwin *et al.*, « Exemplifying the Screening Power of Mass Spectrometry Imaging over Label-Based Technologies for Simultaneous Monitoring of Drug and Metabolite Distributions in Tissue Sections », *J. Biomol. Screen.*, vol. 21, n° 2, p. 187-193, févr. 2016, doi: 10.1177/1087057115623740.
- [244] S. Ghaderi, B. Ramesh, et A. M. Seifalian, « Fluorescence nanoparticles “quantum dots” as drug delivery system and their toxicity: a review », *J. Drug Target.*, vol. 19, n° 7, p. 475-486, août 2011, doi: 10.3109/1061186X.2010.526227.
- [245] L. Ceppi *et al.*, « Real-Time Single-Walled Carbon Nanotube-Based Fluorescence Imaging Improves Survival after Debulking Surgery in an Ovarian Cancer Model », *ACS Nano*, avr. 2019, doi: 10.1021/acsnano.8b09829.
- [246] H. Jin, Q. Jin, Z. Liang, Y. Liu, X. Qu, et Q. Sun, « Quantum Dots Based Fluorescent Traffic Light Nanoprobe for Specific Imaging of Avidin-Type Biotin Receptor and Differentiation of Cancer Cells », *Anal. Chem.*, p. acs.analchem.9b00924, juin 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b00924.
- [247] H.-Y. Kim *et al.*, « Quantitative Imaging of Tumor Associated Macrophages and Their Response to Therapy Using <sup>64</sup>Cu-Labeled Macrin », *ACS Nano*, déc. 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b04338.
- [248] B. Czarny *et al.*, « Carbon Nanotube Translocation to Distant Organs after Pulmonary Exposure: Insights from in Situ <sup>14</sup>C-Radiolabeling and Tissue Radioimaging », *ACS Nano*, vol. 8, n° 6, p. 5715-5724, juin 2014, doi: 10.1021/nn500475u.
- [249] D. Drescher, C. Giesen, H. Traub, U. Panne, J. Kneipp, et N. Jakubowski, « Quantitative Imaging of Gold and Silver Nanoparticles in Single Eukaryotic Cells by Laser Ablation ICP-MS », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 22, p. 9684-9688, nov. 2012, doi: 10.1021/ac302639c.
- [250] O. B. Bauer, C. Köppen, M. Sperling, H.-J. Schurek, G. Ciarimboli, et U. Karst, « Quantitative Bioimaging of Platinum via Online Isotope Dilution-Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, mai 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.8b01429.
- [251] H.-W. Chu, B. Unnikrishnan, A. Anand, J.-Y. Mao, et C.-C. Huang, « Nanoparticle-based laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of drugs and metabolites », *J. Food Drug Anal.*, vol. 26, n° 4, p. 1215-1228, oct. 2018, doi: 10.1016/j.jfda.2018.07.001.
- [252] N. Goto-Inoue *et al.*, « The detection of glycosphingolipids in brain tissue sections by imaging mass spectrometry using gold nanoparticles », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, n° 11, p. 1940-1943, nov. 2010, doi: 10.1016/j.jasms.2010.08.002.
- [253] A. Arendowski *et al.*, « Laser desorption/ionization MS imaging of cancer kidney tissue on silver nanoparticle-enhanced target », *Bioanalysis*, vol. 10, n° 2, p. 83-94, déc. 2017, doi: 10.4155/bio-2017-0195.
- [254] T. Hayasaka *et al.*, « Imaging mass spectrometry with silver nanoparticles reveals the distribution of fatty acids in mouse retinal sections », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 21, n° 8, p. 1446-1454, août 2010, doi: 10.1016/j.jasms.2010.04.005.
- [255] S. N. Jackson *et al.*, « Imaging of lipids in rat heart by MALDI-MS with silver nanoparticles », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, n° 5, p. 1377-1386, févr. 2014, doi: 10.1007/s00216-013-7525-6.
- [256] L. Muller *et al.*, « Lipid imaging within the normal rat kidney using silver nanoparticles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Kidney Int.*, vol. 88, n° 1, p. 186-192, juill. 2015, doi: 10.1038/ki.2015.3.
- [257] A. Gunnarsson, P. Sjövall, et F. Höök, « Liposome-Based Chemical Barcodes for Single Molecule DNA Detection Using Imaging Mass Spectrometry », *Nano Lett.*, vol. 10, n° 2, p. 732-737, févr. 2010, doi: 10.1021/nl904208y.

## REFERENCES

- [258] C. Zandanel *et al.*, « Biodistribution of polycyanoacrylate nanoparticles encapsulating doxorubicin by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass Spectrometry Imaging (MSI) », *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 47, p. 55-61, oct. 2018, doi: 10.1016/j.jddst.2018.06.023.
- [259] M. C. P. Mendonça *et al.*, « Reduced graphene oxide induces transient blood–brain barrier opening: an in vivo study », *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, n° 1, p. 78, 2015, doi: 10.1186/s12951-015-0143-z.
- [260] S. Chen *et al.*, « Mass spectrometry imaging reveals the sub-organ distribution of carbon nanomaterials », *Nat Nano*, vol. 10, n° 2, p. 176-182, févr. 2015.
- [261] I. Fratoddi, I. Venditti, C. Cametti, et M. V. Russo, « Gold nanoparticles and gold nanoparticle-conjugates for delivery of therapeutic molecules. Progress and challenges », *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, n° 27, p. 4204-4220, 2014, doi: 10.1039/C4TB00383G.
- [262] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, et A. Akbarzadeh, « Application of liposomes in medicine and drug delivery », *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, n° 1, p. 381-391, janv. 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.953633.
- [263] K. Yang, Y. Li, X. Tan, R. Peng, et Z. Liu, « Behavior and Toxicity of Graphene and Its Functionalized Derivatives in Biological Systems », *Small*, vol. 9, n° 9-10, p. 1492-1503, 2013, doi: 10.1002/smll.201201417.
- [264] E. Gravel, J. Ogier, T. Arnauld, N. Mackiewicz, F. Ducongé, et E. Doris, « Drug Delivery and Imaging with Polydiacetylene Micelles », *Chem. – Eur. J.*, vol. 18, n° 2, p. 400-408, 2012, doi: 10.1002/chem.201102769.
- [265] V. Goertz, N. Dingenouts, et H. Nirschl, « Comparison of Nanometric Particle Size Distributions as Determined by SAXS, TEM and Analytical Ultracentrifuge », *Part. Part. Syst. Charact.*, vol. 26, n° 1-2, p. 17-24, 2009, doi: 10.1002/ppsc.200800002.
- [266] S. Pabisch, B. Feichtenschlager, G. Kickelbick, et H. Peterlik, « Effect of interparticle interactions on size determination of zirconia and silica based systems – A comparison of SAXS, DLS, BET, XRD and TEM », *Chem. Phys. Lett.*, vol. 521, p. 91-97, janv. 2012, doi: 10.1016/j.cplett.2011.11.049.
- [267] X. Song *et al.*, « Virtual Calibration Quantitative Mass Spectrometry Imaging for Accurately Mapping Analytes Across Heterogenous Bio-tissue », *Anal. Chem.*, janv. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.8b04762.
- [268] M. Stoeckli et D. Staab, « Reproducible Matrix Deposition for MALDI MSI Based on Open-Source Software and Hardware », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, n° 6, p. 911-914, juin 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1099-9.
- [269] M. de Raad, T. de Rond, O. Rübel, J. D. Keasling, T. R. Northen, et B. P. Bowen, « OpenMSI Arrayed Analysis Toolkit: Analyzing Spatially Defined Samples Using Mass Spectrometry Imaging », *Anal. Chem.*, vol. 89, n° 11, p. 5818-5823, juin 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.6b05004.
- [270] V. S. Smentkowski, S. G. Ostrowski, E. Braunstein, M. R. Keenan, J. A. (Tony) Ohlhausen, et P. G. Kotula, « Multivariate Statistical Analysis of Three-Spatial-Dimension TOF-SIMS Raw Data Sets », *Anal. Chem.*, vol. 79, n° 20, p. 7719-7726, oct. 2007, doi: 10.1021/ac071019o.
- [271] J. A. Barry, M. R. Groseclose, et S. Castellino, « Quantification and assessment of detection capability in imaging mass spectrometry using a revised mimetic tissue model », p. 18, 2019.
- [272] M. Suttipong, N. R. Tummala, B. Kitiyanan, et A. Striolo, « Role of Surfactant Molecular Structure on Self-Assembly: Aqueous SDBS on Carbon Nanotubes », *J. Phys. Chem. C*, vol. 115, n° 35, p. 17286-17296, sept. 2011, doi: 10.1021/jp203247r.
- [273] W. Xie, L.-T. Weng, K. M. Ng, C. K. Chan, et C.-M. Chan, « Defects of clean graphene and sputtered graphite surfaces characterized by time-of-flight secondary ion mass spectrometry and X-ray photoelectron spectroscopy », *Carbon*, vol. 112, p. 192-200, févr. 2017, doi: 10.1016/j.carbon.2016.11.002.

## REFERENCES

- [274] L. Przybilla, J.-D. Brand, K. Yoshimura, H. J. Räder, et K. Müllen, « MALDI-TOF Mass Spectrometry of Insoluble Giant Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a New Method of Sample Preparation », *Anal. Chem.*, vol. 72, n° 19, p. 4591-4597, oct. 2000, doi: 10.1021/ac000372q.
- [275] R. Hao, W. Qian, L. Zhang, et Y. Hou, « Aqueous dispersions of TCNQ-anion-stabilized graphene sheets », *Chem Commun*, n° 48, p. 6576-6578, 2008, doi: 10.1039/B816971C.
- [276] W. H. Zhong, « Études de la dispersion et de l'encapsulation des nanotubes de carbone en milieu aqueux », 2013.
- [277] J. C. Jurchen, S. S. Rubakhin, et J. V. Sweedler, « MALDI-MS Imaging of Features Smaller than the Size of the Laser Beam », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 16, n° 10, p. 1654-1659, oct. 2005, doi: 10.1016/j.jasms.2005.06.006.
- [278] M. Nazari et D. C. Muddiman, « Cellular-level mass spectrometry imaging using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (IR-MALDESI) by oversampling », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, n° 8, p. 2265-2271, mars 2015, doi: 10.1007/s00216-014-8376-5.
- [279] A. Fülöp *et al.*, « Molecular imaging of brain localization of liposomes in mice using MALDI mass spectrometry », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 33791, sept. 2016, doi: 10.1038/srep33791.
- [280] J. K. Lukowski, E. M. Weaver, et A. B. Hummon, « Analyzing Liposomal Drug Delivery Systems in Three-Dimensional Cell Culture Models Using MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 89, n° 16, p. 8453-8458, août 2017, doi: 10.1021/acs.analchem.7b02006.
- [281] A. Archer *et al.*, « LXR activation by GW3965 alters fat tissue distribution and adipose tissue inflammation in ob/ob female mice », *J. Lipid Res.*, vol. 54, n° 5, p. 1300-1311, mai 2013, doi: 10.1194/jlr.M033977.
- [282] Z. Ma *et al.*, « Liver X Receptors and their Agonists: Targeting for Cholesterol Homeostasis and Cardiovascular Diseases », *Curr. Issues Mol. Biol.*, p. 41-64, 2017, doi: 10.21775/cimb.022.041.
- [283] S. B. Joseph *et al.*, « Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, n° 11, p. 7604-7609, mai 2002, doi: 10.1073/pnas.112059299.
- [284] N. E. Manicke *et al.*, « Imaging of Lipids in Atheroma by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 21, p. 8702-8707, nov. 2009, doi: 10.1021/ac901739s.
- [285] J. Folsch, M. Lees, et G. H. Sloane Stanley, « A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues », 1956. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.jbc.org/content/226/1/497.full.pdf>. [Consulté le: 02-août-2019].
- [286] S. N. Jackson *et al.*, « AP-MALDI Mass Spectrometry Imaging of Gangliosides Using 2,6-Dihydroxyacetophenone », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 29, n° 7, p. 1463-1472, juill. 2018, doi: 10.1007/s13361-018-1928-8.
- [287] J. Kemptner, M. Marchetti-Deschmann, J. Siekmann, P. L. Turecek, H. P. Schwarz, et G. Allmaier, « GEMMA and MALDI-TOF MS of reactive PEGs for pharmaceutical applications », *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 52, n° 4, p. 432-437, août 2010, doi: 10.1016/j.jpba.2010.01.017.
- [288] R. Szyzka, S. D. Hanton, D. Henning, et K. G. Owens, « Development of a Combined Standard Additions/Internal Standards Method to Quantify Residual PEG in Ethoxylated Surfactants by MALDI TOFMS », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 22, n° 4, p. 633-640, 2011, doi: 10.1007/s13361-010-0065-9.
- [289] A. Maciejczek, V. Mass, K. Rode, et H. Pasch, « Analysis of poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide) block copolymers by MALDI-TOF mass spectrometry using collision induced dissociation », *Polymer*, vol. 51, n° 26, p. 6140-6150, déc. 2010, doi: 10.1016/j.polymer.2010.10.031.

## REFERENCES

- [290] R. P. Lattimer, « Mass spectral analysis of low-temperature pyrolysis products from poly(ethylene glycol) », *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, vol. 56, n° 1, p. 61-78, sept. 2000, doi: 10.1016/S0165-2370(00)00074-7.
- [291] A. Marie, F. Fournier, et J. C. Tabet, « Characterization of Synthetic Polymers by MALDI-TOF/MS: Investigation into New Methods of Sample Target Preparation and Consequence on Mass Spectrum Finger Print », *Anal. Chem.*, vol. 72, n° 20, p. 5106-5114, oct. 2000, doi: 10.1021/ac000124u.
- [292] S. J. Wetzel, C. M. Guttman, et J. E. Girard, « The influence of matrix and laser energy on the molecular mass distribution of synthetic polymers obtained by MALDI-TOF-MS », *Polym. Characterisation Means Mass Spectrom. Snapshot*, vol. 238, n° 3, p. 215-225, nov. 2004, doi: 10.1016/j.ijms.2004.04.019.
- [293] I. U. Kouzel *et al.*, « Progress in Detection and Structural Characterization of Glycosphingolipids in Crude Lipid Extracts by Enzymatic Phospholipid Disintegration Combined with Thin-Layer Chromatography Immunodetection and IR-MALDI Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 86, n° 2, p. 1215-1222, janv. 2014, doi: 10.1021/ac4035696.
- [294] R. A. Johanson, R. Buccafusca, J. N. Quong, M. A. Shaw, et G. T. Berry, « Phosphatidylcholine removal from brain lipid extracts expands lipid detection and enhances phosphoinositide quantification by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry », *Anal. Biochem.*, vol. 362, n° 2, p. 155-167, mars 2007, doi: 10.1016/j.ab.2006.12.026.
- [295] J. L. Kreider et W. T. Ford, « Quaternary ammonium ion dendrimers from methylation of poly(propylene imine)s », *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.*, vol. 39, n° 6, p. 821-832, 2000, doi: 10.1002/1099-0518(20010315)39:6<821::AID-POLA1055>3.0.CO;2-F.
- [296] E. Curti, D. de Britto, et S. P. Campana-Filho, « Methylation of Chitosan with Iodomethane: Effect of Reaction Conditions on Chemoselectivity and Degree of Substitution », *Macromol. Biosci.*, vol. 3, n° 10, p. 571-576, 2003, doi: 10.1002/mabi.200300030.
- [297] A. Polnok, G. Borchard, J. C. Verhoef, N. Sarisuta, et H. E. Junginger, « Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride », *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 57, n° 1, p. 77-83, janv. 2004, doi: 10.1016/S0939-6411(03)00151-6.
- [298] F. P. Y. Barré *et al.*, « Enhanced Sensitivity Using MALDI Imaging Coupled with Laser Postionization (MALDI-2) for Pharmaceutical Research », *Anal. Chem.*, vol. 91, n° 16, p. 10840-10848, août 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b02495.
- [299] M. Niehaus, J. Soltwisch, M. E. Belov, et K. Dreisewerd, « Transmission-mode MALDI-2 mass spectrometry imaging of cells and tissues at subcellular resolution », *Nat. Methods*, p. 1-7, août 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0536-2.



## **PARTIE C : ANNEXES**

---



## TABLE DES ANNEXES

---

<b>TABLE DES ANNEXES .....</b>	<b>- 263 -</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>- 265 -</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>- 265 -</b>
<b>LISTE DE ABBREVIATIONS.....</b>	<b>- 266 -</b>
<b>ANNEXE 1 : SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES.....</b>	<b>- 267 -</b>
<b>A. Les approches dites « top-down ».....</b>	<b>- 269 -</b>
I. LA METHODE PAR DECHARGE ELECTRIQUE .....	- 269 -
II. LA METHODE PAR ABLATION LASER .....	- 269 -
III. OUVERTURE DES NANOTUBES DE GRAPHENE .....	- 270 -
<b>B. Les approches dites « bottom-up » .....</b>	<b>- 271 -</b>
I. LA METHODE « CHEMICAL VAPOR DEPOSITION » .....	- 271 -
II. OXYDATION DU GRAPHENE .....	- 271 -
<b>ANNEXE 2 : PRINCIPE DE LA RADIOIMAGERIE .....</b>	<b>- 273 -</b>
<b>ANNEXE 3 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE .....</b>	<b>- 279 -</b>
<b>A. L'ionisation : Les sources en spectrométrie de masse .....</b>	<b>- 281 -</b>
I. LES SOURCE D'IONISATION POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE DITE CLASSIQUE .....	- 281 -
II. LES SOURCES D'IONISATION POUR LA MSI .....	- 282 -
<b>B. Les analyseurs en spectrométrie de masse .....</b>	<b>- 287 -</b>
I. GENERALITES .....	- 287 -
II. L'ANALYSEUR A TEMPS DE VOL.....	- 289 -
<b>C. Les détecteurs en spectrométrie de masse.....</b>	<b>- 293 -</b>



<b>D.L'Ultraflex™ de chez Bruker.....</b>	<b>- 295 -</b>
<b>RÉFÉRENCES DES ANNEXES 1, 2 ET 3.....</b>	<b>- 297 -</b>
<b>ANNEXE 4 : QUALIFICATION DE PERFORMANCE POUR L'ULTRAFLEX™ ..</b>	<b>- 299 -</b>
<b>ANNEXE 5 : POSTER.....</b>	<b>- 303 -</b>

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1 : Synthèse par décharges électriques. ....	- 269 -
Figure 2 : Synthèse par ablation laser. ....	- 270 -
Figure 3 : Unzipping des nanotubes de carbone. Issue de D. V. Kosynkin <i>et al.</i> , 2009 [7] .....	- 270 -
Figure 4 : Synthèse par « Chemical Vapor Deposition » .....	- 271 -
Figure 5 : Schéma du $\beta$ -imager. Modifiée de N. Barthe <i>et al.</i> , 2007 [13].....	- 277 -
Figure 6 : Schématisation des sources à impact électronique et à ionisation chimique. ....	- 281 -
Figure 7 : Schématisation de la source electrospray. ....	- 282 -
Figure 8 : Principe d'ionisation en source SIMS. ....	- 282 -
Figure 9 : Analyses SIMS-MSI. Issues de M. Brulet <i>et al.</i> , 2010 [18]. ....	- 283 -
Figure 10 : Principe d'ionisation en source MALDI.....	- 284 -
Figure 11 : Mécanisme d'ionisation sous forme de cluster. Modifiée de R. Knochenmuss, 2003 [24].- 285 -	
Figure 12 : Principe d'ionisation en source DESI.....	- 285 -
Figure 13 : Analyseur à temps de vol. Modifié du livre de E. De Hoffman et V. Stroobant, 2007 (3 <sup>ème</sup> édition) [31] .....	- 289 -
Figure 14 : Principe de l'extraction retardée. Image modifiée de A. Seyer, 2010 [33] .....	- 290 -
Figure 15 : Principe de l'analyseur par reflectron.....	- 291 -
Figure 16 : Principe des analyses MS <sup>2</sup> en TOF/TOF. ....	- 292 -
Figure 17 : Représentation schématique de détecteurs courant en spectrométrie de masse. Modifié du livre de E. De Hoffman, 3 <sup>ème</sup> édition [35]. ....	- 293 -
Figure 18 : L'Ultraflex <sup>™</sup> de chez Bruker.....	- 295 -
Figure 19 : Paramètres du laser Smartbeam-II <sup>™</sup> , Issue de la note technique 97 de Bruker. ....	- 296 -

## LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Radioéléments émetteurs $\beta$ pour l'autoradiographie. Issu de la thèse de J. Donnard, 2008, [12]. ....	- 276 -
Tableau 2 : Les analyseurs les plus communs en spectrométrie de masse. Traduit du livre de J. H. Gross, 2010 (3 <sup>ème</sup> édition) [312]. ....	- 288 -
Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques principales des différents analyseurs. Modifié de F. Fenaille <i>et al.</i> , 2017 [30] .....	- 288 -

## LISTE DE ABBREVIATIONS

---

**CCD** : Charge Coupled Device

**ESI** : Electrospray

**FT - ICR** : Fourier Transformation - Ion Cyclotronic  
Resonance

**GNP** : Graphite carbon NanoParticle

**IC** : Ionisation Chimique

**IE** : Impact Electronique

**MWCNT** : Multiple Wall Carbon Nano-Tube

**PCIS** : Precursor Ion Selector

**PLMS** : Post LIFT Metastable Suppression

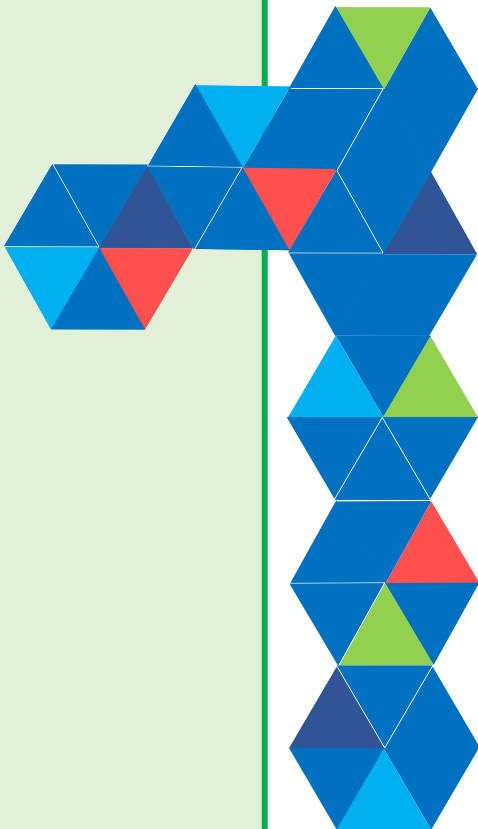
**SWCNT** : Single wall carbon Nano-Tube

**TEA** : Triéthylamine

**TOF** : Time Of Flight

**UV** : UltraViolet

Hélène Cazier



## ANNEXE 1 : SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES

---

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES

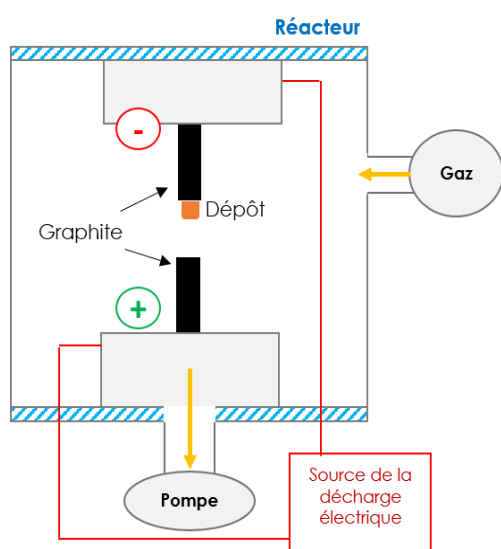


## A. LES APPROCHES DITES « TOP-DOWN »

L'approche dite « top-down » concerne différentes méthodes de synthèse comme la méthode par décharge électrique, par ablation laser ou par « unzipping » [1] [2]. Chaque méthode de synthèse utilise une source d'énergie et une source de carbone différente. Selon ces sources, la synthèse va engendrer des tailles de nanotubes ou de feuillets de graphène à des niveaux d'oxydation différents.

### I. LA METHODE PAR DECHARGE ELECTRIQUE

La méthode de synthèse du graphène par décharge électrique (**Figure 1**) est la plus simple et la plus utilisée depuis sa mise en place en 1991 par S. Iijima [3] [4]. Elle est notamment utilisée pour la synthèse de fullerène [5]. La méthode implique l'utilisation de deux électrodes de graphite de très grande pureté et une décharge électrique aux alentours de 50 à 100 ampères. La décharge est appliquée dans le vide, dans une atmosphère contrôlée et en présence ou non de cobalt, de nickel ou de fer. Ces conditions permettent



d'atteindre une température suffisante qui va induire la sublimation du graphite de la surface de l'électrode positive. La réaction peut être maintenue de 30 secondes à 10 minutes et selon les zones du réacteur, différents produits vont être formés. Les dépôts de carbone se trouvent sur la cathode et contiennent les nanotubes de carbone. Si la réaction a eu lieu avec un catalyseur métallique, un mélange complexe de GNP (Graphite carbon NanoParticle), MWCNTs, SWCNTs (Single Wall Carbon Nanotube) est obtenu. Cette méthode se caractérise par un faible niveau de pureté.

**Figure 1 : Synthèse par décharges électriques.**

La taille des nanotubes allant de 0,6 à 1,2 nm dépend de la sublimation du carbone, de la dispersion de ce carbone dans le gaz inerte, de la température dans le réacteur, de la concentration en composition du catalyseur et de la présence d'hydrogène. Ces facteurs affectent la nucléation et la croissance des nanotubes, leurs diamètres intérieurs et extérieurs et le type de nanotubes,

### II. LA METHODE PAR ABLATION LASER

Pour ce type de synthèse (Figure 2), un laser est utilisé comme source d'énergie [6]. Des impulsions successives du laser sont appliquées sur l'électrode de carbone qui est placée dans un four à 1200°C. Après

l'impulsion laser, les nanotubes de carbones créés sont réduits par les impulsions ultérieures. La suie produite est aspirée par le flux de gaz et est collectée à la sortie du four.

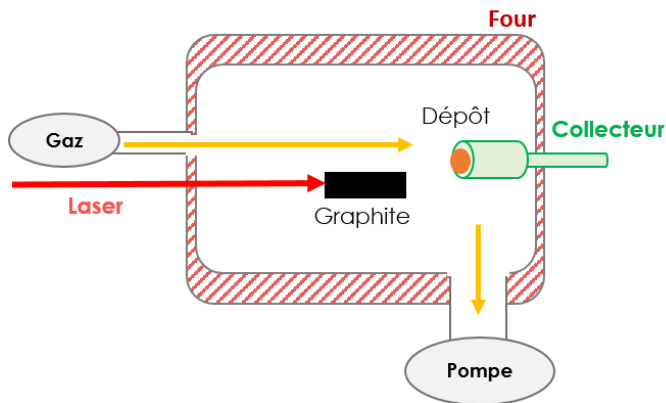


Figure 2 : Synthèse par ablation laser.

Cette méthode présente plusieurs avantages, tels que la haute qualité des SWCNTs, un contrôle du diamètre et de la croissance des nanoparticules. Les nanotubes sont généralement de taille uniforme avec un diamètre de 10 à 20 nm et une longueur de 100  $\mu\text{m}$  et les produits obtenus via cette méthode sont souvent plus purs et mieux organisés que ceux obtenus via la méthode par décharge électrique.

### III. OUVERTURE DES NANOTUBES DE GRAPHENE

La fabrication de nanorubans de graphène à partir de nanotubes de carbone (NTC) traités au permanganate de potassium dans une solution concentrée d'acide sulfurique a été rapportée par D. V. Kosynkin *et al.*, 2009 [7]. Cette technique est appelée méthode unzipping car elle permet l'ouverture des nanotubes de carbone selon leur axe longitudinal. C'est une approche simple mais qui fournit des nanoparticules avec plus de défauts que l'approche bottom-up.

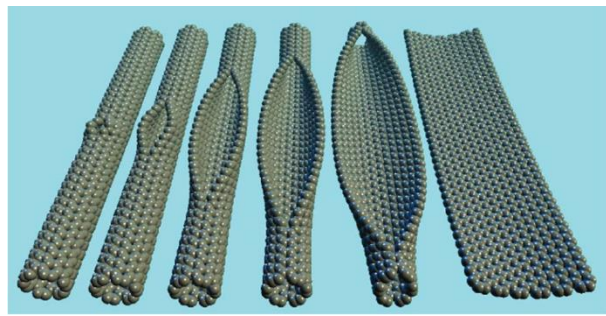


Figure 3 : Unzipping des nanotubes de carbone. Issue de D. V. Kosynkin *et al.*, 2009 [7]

## B. LES APPROCHES DITES « BOTTOM-UP »

### I. LA METHODE « CHEMICAL VAPOR DEPOSITION »

La méthode CVD (**Figure 4**) ou Chemical Vapor Deposition [8] est utilisée pour la production de grandes quantités de nanotubes de carbone. La source de carbone correspond ici à du méthane, du benzène ou autres molécules carbonées. Dans un four, les échantillons sont chauffés à 1200 °C afin d'induire une décomposition thermique et ainsi former les nanotubes. La présence de catalyseurs métalliques tels que le cobalt, le nickel ou la silice permet aux nanotubes de croître sur ce support. Cette synthèse engendre principalement des SWCNTs.

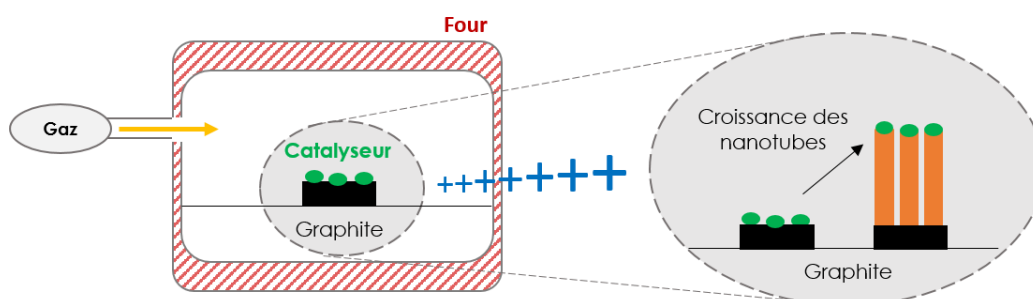


Figure 4 : Synthèse par « Chemical Vapor Deposition »

Cette méthode est plus simple et plus économique que les deux méthodes précédentes et permet un meilleur contrôle des nanotubes obtenus que ceux générés via les deux précédentes méthodes.

À l'issue de chacune de ses synthèses, des nanoparticules de structures différentes peuvent être obtenues, majoritairement composés de nanotubes de carbone mono ou multicouches. Afin d'obtenir des feuillets de graphène (nanoparticules d'intérêt dans cette thèse), il est nécessaire d'ajouter des étapes de traitements de ces nanotubes.

### II. OXYDATION DU GRAPHÈNE

La **méthode Hummers** [9] permet d'obtenir du graphène oxyde à partir d'une source de graphène via l'addition de permanganate de potassium à un mélange de graphène, de nitrate de sodium et d'acide sulfurique.





Hélène Cazier



## ANNEXE 2 : PRINCIPE DE LA RADIOIMAGERIE

---

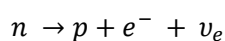
DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES



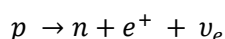
Les techniques d'imagerie connaissent un succès grandissant ces dernières années suite à leur évolution technologique. Celles-ci sont plus spécifiquement développées pour des thématiques telles que l'imagerie médicale avec le PET, l'IRM ou une imagerie plutôt tournée vers la recherche comme la radioimagerie. La première méthode d'autohistoradiographie fut expérimentée par A. Lacassagne et J. Lattès Ferrier en 1924 [10] à l'aide d'un film d'autohistoradiographie. Cette technique est basée sur l'identification, la localisation et la quantification de molécules marquées avec un radio-isotope tel que le  $^{14}\text{C}$  carbone, le  $^3\text{H}$  tritium, le  $^{35}\text{S}$  soufre ou encore le  $^{18}\text{F}$  fluor au sein de tissus biologiques. Cette méthode implique l'utilisation d'un film et d'une émulsion photographique composée par exemple d'halogénures d'argent. L'échantillon est ensuite mis en contact avec le film ou s'y imprime une image latente révélée de façon chimique sous forme d'une distribution de grain d'argent. Cette technique possède donc certains avantages comme : une résolution spatiale importante obtenue en 2D de l'ordre du micron et pouvant aller jusqu'à la visualisation de cellules ou d'organelles, la possibilité d'analyser de grandes surfaces pour l'analyse de corps entier de modèle animal et un stockage des données simple correspondant aux films d'autohistoradiographie. Cependant, elle possède certains inconvénients qui sont une longue latence d'image conditionnée par la sensibilité du radioélément et une variabilité de révélation de l'image qui peut rendre la quantification fastidieuse. Pour la quantification, cette méthode possède également une faible linéarité et, une gamme dynamique limitée [11].

C'est pourquoi, des radioimageurs ont été développés afin de pallier à ses défauts et permettre d'obtenir des images avec une homogénéité de réponse en tout point et un rendement constant pour un radioélément donné. Le but des radioimageurs est donc de pouvoir fournir des images en temps réel où les désintégrations sont converties en pixels. Dans cette thèse, la radioimagerie obtenue à partir des émissions  $\beta$  sera plus amplement exposé ; celle-ci correspond à un type de désintégration radioactive dans laquelle une particule bêta (un électron ou un positon) est émise. On parle de désintégration bêta moins ( $\beta^-$ ) lorsqu'un électron est émis ou bêta plus ( $\beta^+$ ) lorsqu'un positron est émis.

La radioactivité  $\beta^-$  affecte les nucléides présentant un excès de neutrons. Un neutron est donc converti en proton et ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un électron (ou particule bêta moins) et d'un antineutrino :



Inversement, la radioactivité  $\beta^+$  concerne les nucléides avec un excès de protons. Un proton est converti en neutron puis ce phénomène s'accompagne de l'émission d'un positron (ou particule bêta plus) et d'un neutrino :



Pour des études en biologie ou pharmacologie, les émetteurs  $\beta$  utilisés peuvent être des molécules auxquelles on a substitué un atome ou encore des molécules liées à un ligand émetteur. Selon la molécule étudiée, les propriétés de fixation vont donc influencer le choix de l'isotope émetteur (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Radioéléments émetteurs  $\beta$  pour l'autoradiographie. Issu de la thèse de J. Donnard, 2008, [12].

Rayonnement	Isotope	Durée de vie	Energie max (KeV)
$\beta^-$ pur	$^3\text{H}$	12,8 ans	18
	$^{14}\text{C}$	5700 ans	156
	$^{35}\text{S}$	87,5 jours	167
	$^{33}\text{P}$	25,3 jours	250
	$^{45}\text{Ca}$	162,6 jours	257
	$^{32}\text{P}$	14,3 jours	1710
$\beta^-$ - $\gamma$ et $\gamma$ -Auger	$^{125}\text{I}$	59,4 jours	$\gamma$ : 35,6   électron : 3 et 22
	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 heures	$\gamma$ : 140 et 2   électron : 2,15 et 120
	$^{111}\text{In}$	2,8 jours	$\gamma$ : 171 et 145   électron : 1,9-4 et 18-27
	$^{123}\text{I}$	13 heures	$\gamma$ : 159   électron : 3,23, 22,7 et 127
	$^{131}\text{I}$	8 jours	$\gamma$ : 365   $\beta^-$ : 247   électron : 45
$\beta^+$	$^{11}\text{C}$	20 minutes	961
	$^{13}\text{N}$	10 minutes	1119
	$^{15}\text{O}$	2 minutes	1720
	$^{18}\text{F}$	109 minutes	650

Il existe différents types de détecteurs [12] utilisant des détecteurs de rayonnements ionisants comme des imageurs à écran photostimulable (phospho-imager), des imageurs à détecteurs gazeux ( $\beta$ -imager) ou à film scintillant ( $\mu$ -imager). Les particules  $\beta$  induisent sous la force d'un champ électrique des électrons d'ionisation qui permettent la localisation de la molécule émettrice.

Le  $\beta$ -imager utilise un détecteur gazeux à scintillation (**Figure 5, A.**) impliquant une chambre de détection remplie d'un mélange d'argon et de triéthylamine (TEA). Ces gaz permettent l'amplification de la trainée d'ionisation dans la chambre. Ensuite, l'ionisation du gaz entraîne l'émission de lumière qui va ensuite être détectée par la caméra CCD (Charge Coupled Device) (**Figure 5, B.**). Selon le temps d'accumulation de l'échantillon dans cette chambre, le signal obtenu peut être plus ou moins intense.

Le  $\beta$ -imager permet l'analyse d'échantillons de 20 cm x 25 cm avec une résolution spatiale de 50  $\mu\text{m}$  pour le tritium et de 120  $\mu\text{m}$  pour le carbone 14 avec une sensibilité respective de 0,007 cpm/mm<sup>2</sup> et 0,01 cpm/mm<sup>2</sup>. Cette technique de radioimagerie possède une plus grande sensibilité que l'autoradiographie mais une résolution spatiale plus faible.

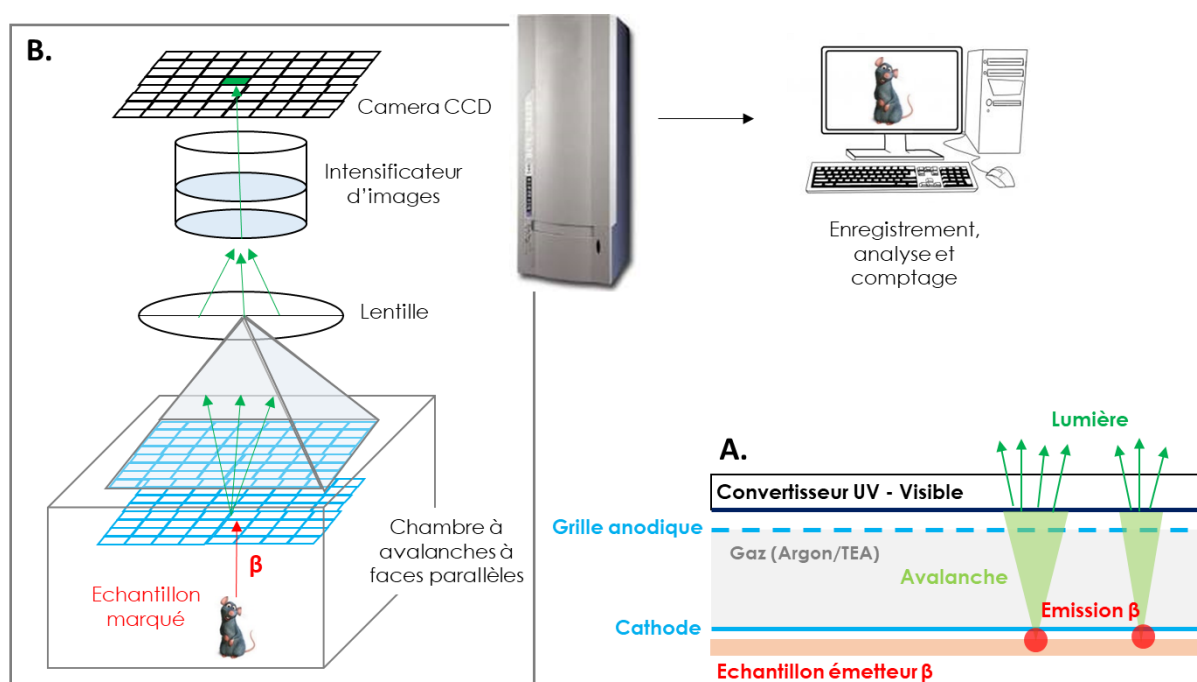


Figure 5 : Schéma du  $\beta$ -imager. Modifiée de N. Barthe *et al.*, 2007 [13].

L'échantillon est placé à l'intérieur de la chambre (A.) ou un rayonnement  $\beta$  interagit avec le gaz par ionisation. Les électrons d'ionisation sont accélérés dans le champ électrique entre les grilles et produisent des photons lumineux. La détection est effectuée par une caméra CCD intensifiée (B.).

La technologie du  $\beta$ -imager permet donc une lecture en temps réel de la radioactivité présente au sein d'un échantillon et permet de réaliser une quantification absolue avec une sensibilité de détection encore inégalée.



Hélène Cazier



## ANNEXE 3 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE

---

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES



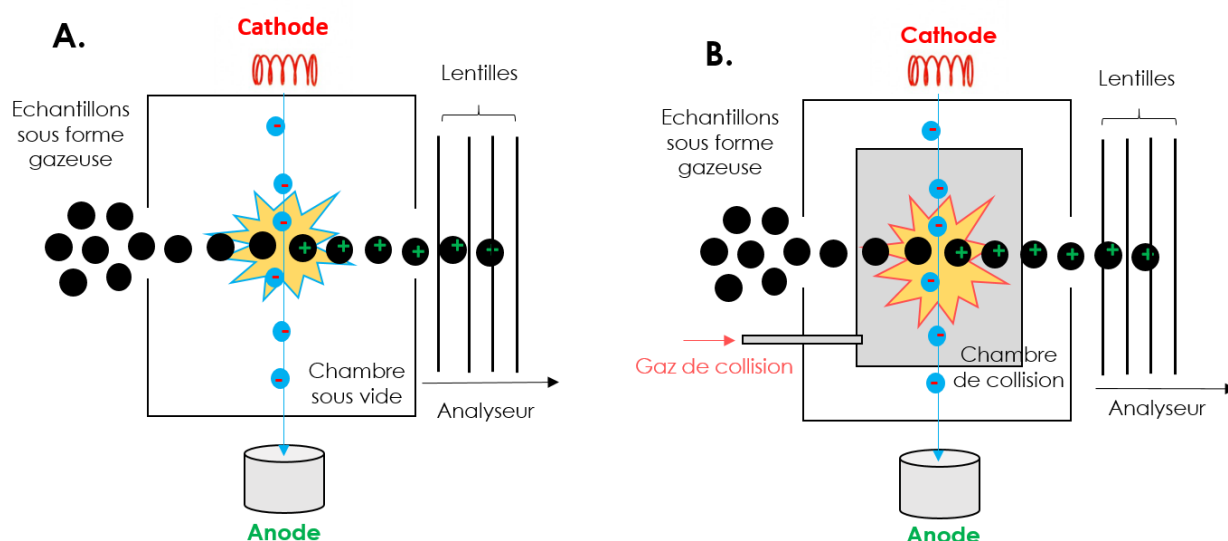


## A. L'IONISATION : LES SOURCES EN SPECTROMETRIE DE MASSE

### I. LES SOURCE D'IONISATION POUR LA SPECTROMETRIE DE MASSE DITE CLASSIQUE

Un large panel de sources d'ionisation existe et fait de la spectrométrie de masse une technique polyvalente permettant l'analyse d'une très grande gamme de composés. L'ionisation des molécules peut être réalisée sous vide avec par exemple, une source en ionisation par électron (IE) ou à ionisation chimique (IC), ou être réalisées à pression atmosphérique à l'aide de sources comme l'électronébullition (ESI). De plus, le choix de la source dépend également du choix de la méthode séparative placée en amont de la source d'ionisation. Par exemple, les sources en ionisation par électron seront majoritairement couplées avec une chromatographie phase gazeuse alors que les échantillons liquides seront ionisés avec des sources ESI couplées à la chromatographie phase liquide.

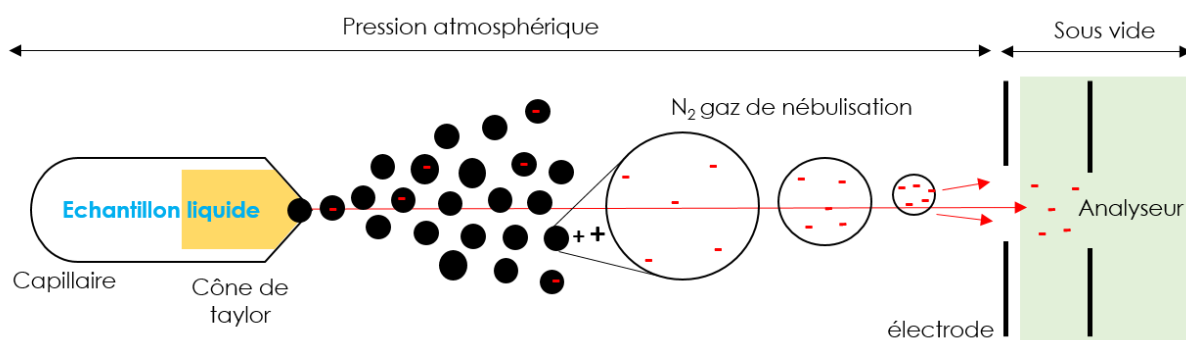
Le choix de la source va aussi grandement dépendre du type d'ions voulus, La source à IE (**Figure 6 A.**) induit une fragmentation très reproductible et importante de la molécule due au fort potentiel (70 eV) appliqué dans la source. Les spectres de masse seront majoritairement constitués d'ions fragments avec un ion moléculaire parfois difficile à détecter. Contrairement à l'IE, la source à IC (**Figure 6, B.**) va quant à elle permettre la formation de molécules protonées ou déprotonées avec la présence de quelques fragments, Ces deux sources sont donc très souvent complémentaires.



**Figure 6 : Schématisation des sources à impact électronique et à ionisation chimique.**

**A.** La source à impact électronique est constituée d'un filament chauffé qui produit des électrons. Ces électrons sont accélérés vers une anode et rencontrent ainsi l'échantillon gazeux introduit dans la source pour former des ions majoritairement sous forme d'ions fragments des molécules analysées. **B.** La source à ionisation chimique favorise plutôt la formation de l'ion moléculaire grâce à l'ionisation induite par un gaz réactif (réaction ion-molécule), moins énergétique que les électrons.

La source ESI (**Figure 7**) est quant à elle une technique d'ionisation dite « douce » qui permet d'obtenir des molécules protonées  $[M+H]^+$  ou déprotonées  $[M-H]^-$  selon la polarité d'ionisation.



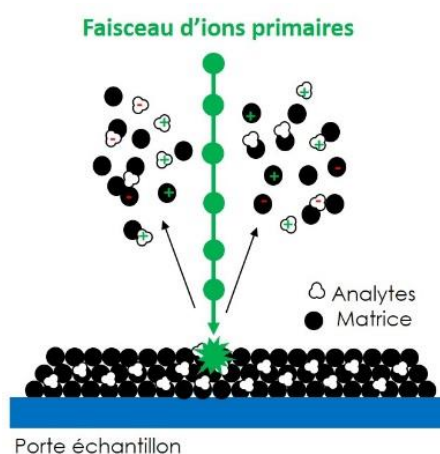
**Figure 7 : Schématisation de la source electrospray.**

Développé par Fenn en 1984, l'electrospray est produit par application à pression atmosphérique d'un champ électrique sur un liquide traversant un capillaire. Via l'application d'une différence de potentiel entre le capillaire et l'électrode, une accumulation de charges se forme à la surface du liquide pour ensuite donner lieu à la formation d'une gouttelette comprenant, entre autres, les analytes à la sortie du capillaire. Suite à l'augmentation de la répulsion due aux charges accumulées, la gouttelette se transforme en cône de Taylor et le spray de gouttelettes chargées apparaît. L'évaporation du solvant va ensuite entraîner le rétrécissement des gouttelettes et augmenter la densité de charge jusqu'au moment où les forces coulombiennes répulsives vont leur entraîner l'explosion. Les ions formés sont alors dirigés vers l'analyseur.

Ces sources permettent donc l'ionisation de molécules selon différents procédés. Dès que ces ions sont formés, ceux-ci sont focalisés puis envoyés dans un analyseur pour y être séparés selon leur ratio masse sur charge. Chacun des analyseurs existants possède des caractéristiques particulières qui permettent une séparation plus ou moins fines des ions sur gamme de masse plus ou moins large. Ces paramètres sont donc explicités dans le paragraphe ci-dessous.

## II. LES SOURCES D'IONISATION POUR LA MSI

La première des sources d'ionisation/désorption développée pour l'analyse de surface est la source SIMS en 1960 [14]. Elle consiste à ioniser les molécules cibles en dirigeant un faisceau d'ions primaires sur la surface d'intérêt (**Figure 8**) permettant l'éjection des ions vers l'analyseur. Deux instruments sont principalement utilisés pour cette technique : les systèmes NanoSIMS et TOF-SIMS. Le premier utilise un faisceau d'ions primaires atomiques de type  $Cs^+$  très énergétique avec une résolution latérale de 50 nm et qui induit entre autres une détection d'ions de type  $Na^+$ ,  $S^-$  ou  $CN^-$ . A titre d'exemple, A. M. Kleinfeld et J. P. Kampf [15], ont étudié en 2004 le transport du  $^{13}C$ -oleate grâce au rapport  $^{12}C/^{13}C$  dans des cellules adipocytaires avec un système nanoSIMS à une résolution spatiale de  $60 \mu m \times 60 \mu m$ , 256

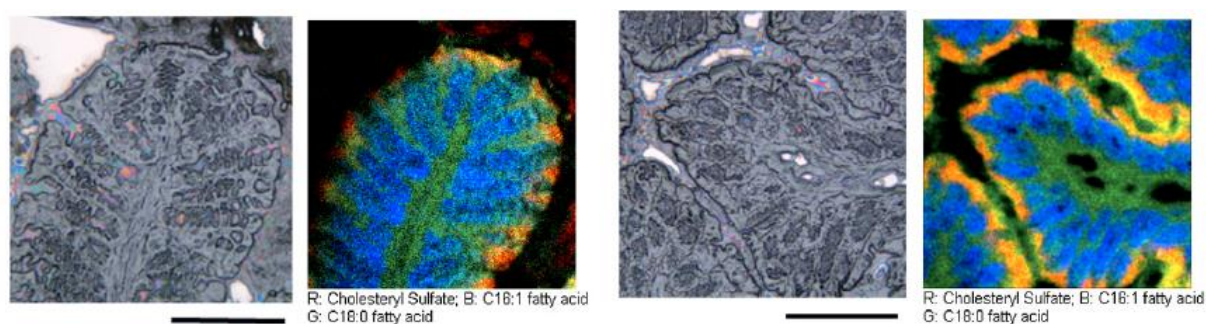


**Figure 8 : Principe d'ionisation en source SIMS.**

ionisation des molécules au sein de tissus grâce à l'application d'un faisceau d'ions primaires qui induit la formation d'un faisceau d'ions secondaires.

x 256 pixels. Ces résolutions rendues possibles par l'utilisation d'un faisceau d'ions primaires permettent ainsi de réaliser des images au niveau cellulaire.

Le second système utilise un faisceau d'ions primaires composé de clusters  $C_{60}^+$  ou  $Bi_n^{9+}$  avec une résolution latérale moyenne de 400 nm. Selon le type de cluster choisi, il est possible de faire varier cette résolution latérale et donc obtenir des énergies différentes pour l'ionisation d'ions présents dans la gamme de masse 0 et 1000  $m/z$  [16]. Cette source permet également d'obtenir une haute résolution spatiale de 1 à 2  $\mu m$  afin de réaliser des études au niveau cellulaire [17]. Par exemple, M. Brulet *et al.*, 2010 [18] ont réussi grâce à la résolution spatiale élevée de la méthode TOF-SIMS à imager certains lipides dans la muqueuse du colon (**Figure 9**).

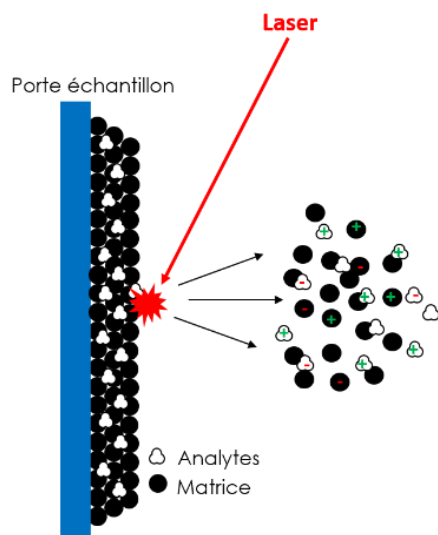


**Figure 9 : Analyses SIMS-MSI. Issues de M. Brulet *et al.*, 2010 [18].**

Localisation des lipides dans la muqueuse du côlon de souris. Images optiques (barre d'échelle = 200  $\mu m$ ) et superposition tricolore des ions des acides gras C16 :1, C18 :0 et du sulfate de cholestéryl en MSI.

En imagerie SIMS, l'ionisation/désorption à haute énergie engendre un taux important de fragmentation de la molécule et est donc préférentiellement utilisée pour l'analyse de molécules de faibles poids moléculaires. Cependant, il est possible de réaliser des images moléculaires à très haute résolution spatiale. Cette résolution n'est pas influencée par les étapes de préparation des échantillons car il n'est pas nécessaire de réaliser un dépôt de matrice pouvant entraîner des problèmes de reproductibilité comme pour la source d'ionisation MALDI.

Développée parallèlement par les équipes de M. Karas et F. Hillenkamp [19] et de K. Tanaka [20] dans les années 1980, la source à désorption laser assistée par matrice utilise un laser pulsé majoritairement ultraviolet (UV) pour désorber et ioniser des molécules cristallisées sur une surface conductrice. Se basant sur le principe de désorption laser, ces équipes ont cherché à ajouter une composante médiatrice à savoir

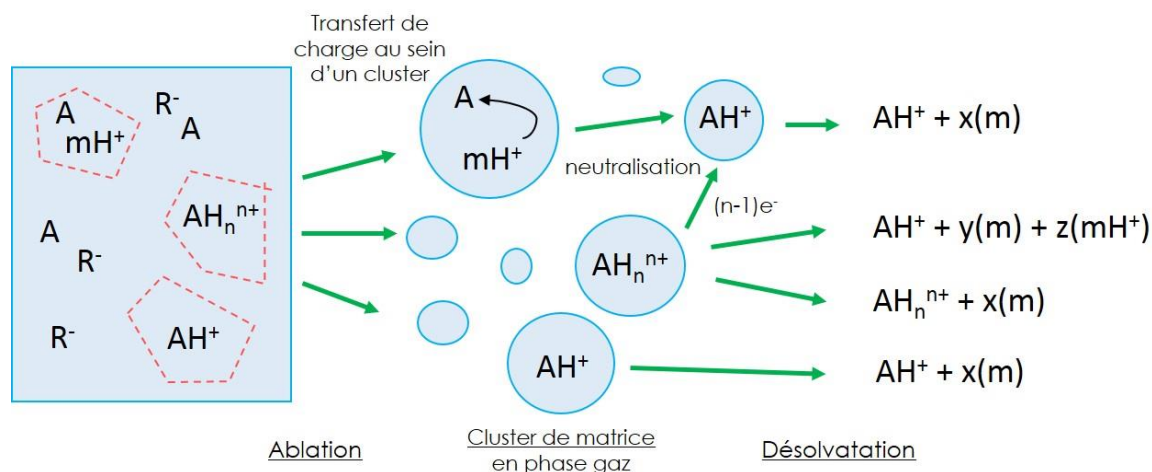


**Figure 10 : Principe d'ionisation en source MALDI.**

ionisation après co-cristallisation avec la matrice par un processus de désorption ionisation grâce à l'énergie du laser appliquée sur le tissu.

une matrice composée de molécules organiques et aromatiques, afin d'accroître les possibilités analytiques pour cette technique d'ionisation/désorption. Les premiers ont proposé d'utiliser une matrice liquide telle que le glycérol [20] alors que les seconds introduisent les matrices solides comme l'acide nicotinique absorbant dans l'UV [19]. Grâce à l'ajout de la matrice, les auteurs ont ainsi proposé de mettre au point une méthode applicable à une plus large gamme de molécules avec une sensibilité plus importante. Cette matrice permet l'obtention d'un mélange solide et homogène après évaporation du solvant suite à la co-cristallisation de la matrice avec la molécule à étudier. Lors de l'application du laser sur cet échantillon, il y a une excitation électronique de la matrice par absorption de l'énergie produite qui permet ensuite la désorption des analytes en phase gazeuse. (**Figure 10**).

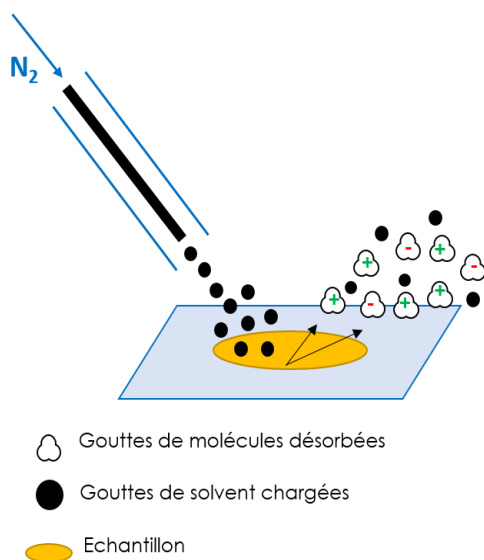
Différentes théories existent concernant les mécanismes d'ionisation ayant lieu au sein de cette source. Suite aux travaux sur la dynamique moléculaire de L.V. Zhigilei et de B.J. Garrison [21], sur la désorption par K. Dreisewerd [22], le développement du modèle de cluster par M. Karas and R. Krüger [23] et les mécanismes d'ionisation secondaire par R. Knochenmuss et R. Zenobi [24] en 2003, le modèle d'ionisation en MALDI converge vers une seule et même idée : un processus d'ionisation en deux étapes. La première étape d'ionisation résulterait d'une réaction dans le plumeau du laser entre les molécules et la matrice. Selon le modèle d'ionisation sous forme de cluster (**Figure 11**), la matrice serait chargée dès l'étape de cristallisation sur le support solide. Ainsi, lors de la désolvatation, un échange de protons se produit entre les molécules de la matrice et l'analyte. Cette étape permet donc la formation d'un ion secondaire qui va ensuite être envoyé vers l'analyseur et le détecteur.



**Figure 11 : Mécanisme d'ionisation sous forme de cluster. Modifiée de R. Knochenmuss, 2003 [24].**

Le modèle des clusters propose que les molécules cristallisées sur le support solide soient sous forme ionisées avant que la désolvation des agrégats ne se produise. Les molécules de matrices sont ainsi déjà protonées dans les clusters formés sous phase gazeuse et permettraient alors les échanges de protons avec les analytes. A = analyte, m = matrice, R = contre ion.

Grâce à l'utilisation d'une matrice MALDI permettant l'analyse de molécules de masses moléculaires variées, la source à désorption laser est pour l'imagerie par spectrométrie de masse une des sources les plus utilisées pour l'étude de la métabolomique, la lipidomique et la protéomique. Outre l'aspect de la large gamme de masse qui peut être analysée, cette source permet d'atteindre des résolutions spatiales très avantageuses ( $\pm 20 \mu m$ ) pour l'obtention d'une biodistribution moléculaire précise.



**Figure 12 : Principe d'ionisation en source DESI**

Application d'un électroaérosol contenant un gaz ainsi qu'un solvant afin d'ioniser les molécules sur tissu. L'ionisation dépend de la composition du spray qui est utilisé et de la polarité. Ceci permet d'ioniser directement les molécules au sein du tissu.

Afin de pouvoir analyser des molécules sur tissu à pression ambiante, la technique DESI a été mise en place dans les années 2000 par l'équipe de R. G. Cooks [25] [26]. C'est donc une technique dite d'ionisation douce à faisceau d'ions primaires (Figure 12). Le DESI utilise un électroaérosol qui contient un gaz ( $N_2$ ) ainsi qu'un solvant protonique tel que le méthanol, l'acétonitrile ou l'eau afin d'ioniser les molécules. Ce mode d'ionisation dépend de la composition du spray qui est utilisé et permet d'ioniser directement les molécules au sein du tissu sans dépôt de matrice. L. Lamont *et al.*, 2018 [27] ont démontré l'avantage de pouvoir s'affranchir de cette étape pour la réalisation d'image de lipides et de métabolites en ionisation négative et positive successive sur des

coupes issues de rats et de chiens. Pour cela, ils ont utilisé un mode d'acquisition QqQ-MRM alternant une double polarité avec la source DESI lors d'une même analyse.

Cette source pour la MSI est donc utilisée par de nombreuses équipes car elle ne nécessite que très peu de préparation d'échantillons. Cependant, elle engendre uniquement l'ionisation des molécules abondantes au sein du tissu comme la classe des lipides [28] [29] ou des métabolites [27] et possède une résolution spatiale bien plus faible que le SIMS de l'ordre de 200  $\mu\text{m}$ , dû à l'utilisation d'un aérosol comme faisceau d'ionisation.

## B. LES ANALYSEURS EN SPECTROMETRIE DE MASSE

### I. GENERALITES

La séparation des ions formés s'effectue selon leur ratio masse sur charge. Pour cela, différents analyseurs existent et se distinguent selon leur principe de mesure de ce rapport  $m/z$ . On retrouve les analyseurs à balayage qui permettent une détection successive des ions comme les quadripôles et les pièges à ions. Il existe également ceux qui permettent une détection simultanée de ces ions comme les analyseurs à temps de vol.

Le choix entre ces analyseurs (**Tableau 2 et 3**) peut se faire selon les critères suivants :

- Leur **pouvoir résolutif** qui correspond à la capacité à séparer deux ions de rapports  $m/z$  très proches. Il est calculé selon la formule,  $R = \frac{m/z}{\Delta m}$  où  $\Delta m$  correspond à la largeur à mi-hauteur du pic  $m/z$  isolé d'un spectre masse (terme utilisé FWHM, «Full Width at Half Maximum»), Le  $\Delta m$  peut également correspondre à la distance minimale distinguable entre le sommet du pic considéré et son voisin le plus proche.
- La **gamme de masse** disponible avec des valeurs limites hautes et basses déterminant les  $m/z$  possiblement détectés.
- La **précision en masse** qui correspond à la justesse des rapports  $m/z$  mesurés et qui dépend de la résolution et de la stabilité des ions (pour un TOF). Elle s'exprime en ppm (partie par million).
- La **transmission des ions** soit le nombre d'ions arrivant jusqu'au détecteur par rapport au nombre d'ions formés.
- Et la **vitesse d'analyse** ou balayage correspond à la gamme de masse analysée par unité de temps.



Tableau 2 : Les analyseurs les plus communs en spectrométrie de masse. Traduit du livre de J. H. Gross, 2010 (3<sup>ème</sup> édition) [312].

Types d'analyseurs	Acronymes	Principes
Temps de vol	TOF	Dispersion temporelle d'un faisceau d'ions pulsé. Séparation via le temps de vol.
Quadripôle	Q	Faisceau ionique continu dans un champ linéaire de radiofréquence quadripolaire. Séparation dû à l'instabilité des trajectoires ioniques.
Résonance cyclotronique des ions avec transformée de Fourier	FT - ICR	Piège des ions dans un champ magnétique (force de Lorentz). Séparation par fréquence cyclotronique avec transformation de Fourier du signal transitoire.
Orbitrap	Orbitrap	Oscillation axiale dans un champ électrique non homogène. Détection de la fréquence après transformation de Fourier d'un signal transitoire.

Tableau 3 : Comparaison des caractéristiques principales des différents analyseurs. Modifié de F. Fenaille *et al.*, 2017 [30]

	Quadripôle	Ion trap	TOF	TOF réflectron	FT - ICR	Orbitrap
Limite en masse	4 000	6 000	1 000 000	10 000	30 000	6 000
Résolution	4 000	10 000	10 000	50 000	1 000 000	500 000
Exactitude en masse	100 ppm	100 ppm	200 ppm	10 ppm	< 1 ppm	< 1 ppm
Spectrométrie de masse en tandem	Triple quadripôle			PSD ou TOF/TOF		
	MS/MS fragments précurseurs neutre	MS <sup>n</sup> fragments		MS/MS fragments	MS <sup>n</sup> fragments	MS <sup>n</sup> fragments
	Collision à basse énergie	Collision à basse énergie		Collision à haute énergie	Collision à basse énergie	Collision à basse énergie

## II. L'ANALYSEUR A TEMPS DE VOL

### 1. PRINCIPE DU TEMPS DE VOL

Le principe du spectromètre à temps de vol consiste à mesurer la relation qui existe entre la vitesse de l'ion et sa masse. L'analyseur mesure le temps que met un ion, créé par une source pulsée et accéléré par un champ électrique, à parcourir une distance correspondant au tube de vol (**Figure 13**).

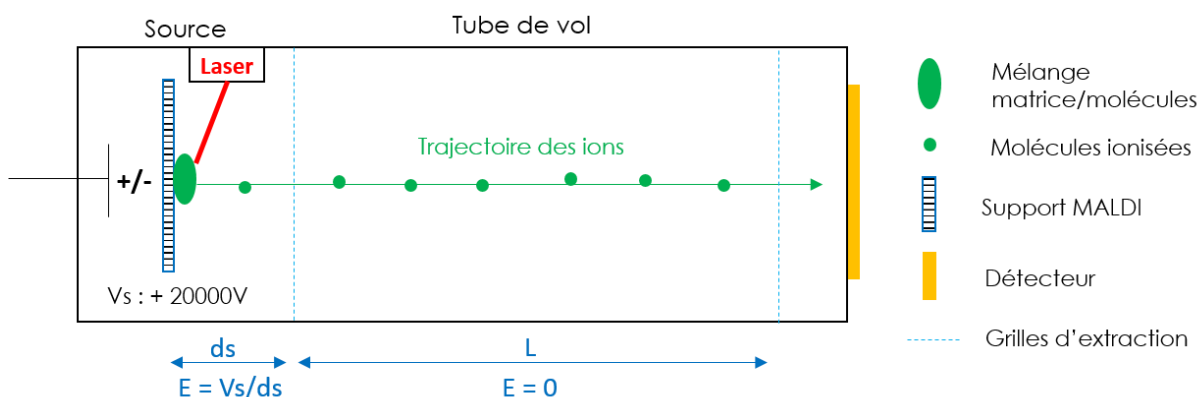


Figure 13 : Analyseur à temps de vol. Modifié du livre de E. De Hoffman et V. Stroobant, 2007 (3<sup>ème</sup> édition) [31]

Dans un temps de vol, les ions sont éjectés de la source vers l'analyseur via une différence de potentiels et sont séparés selon leur temps de parcours.

Les ions sont éjectés de la source et accélérés via une différence de potentiel électrique ( $E$ ) appliquée entre le support ( $V_s$ ) et les grilles d'extraction placées à une distance donnée ( $ds$ ). Ainsi, l'ion présent dans la source est accéléré par ce champ électrique selon sa masse ( $m$ ) et sa charge ( $q = ze$ ). Son énergie potentielle électrique ( $E_e$ ) est donc convertie en énergie cinétique ( $E_c$ ) et sa vitesse ( $v$ ) peut être calculée selon les équations suivantes :

$$E_c = \frac{mv^2}{2} = qVs = zeVs = E_e \text{ soit } v = \sqrt{\left(\frac{2zeVs}{m}\right)}$$

Connaissant la vitesse des ions, on peut connaître le temps ( $t$ ) que met l'ion à parcourir la distance ( $L$ ) du tube de vol :

$$t = \frac{L}{v} \text{ soit } t = \frac{L}{\sqrt{\left(\frac{2zeVs}{m}\right)}}$$

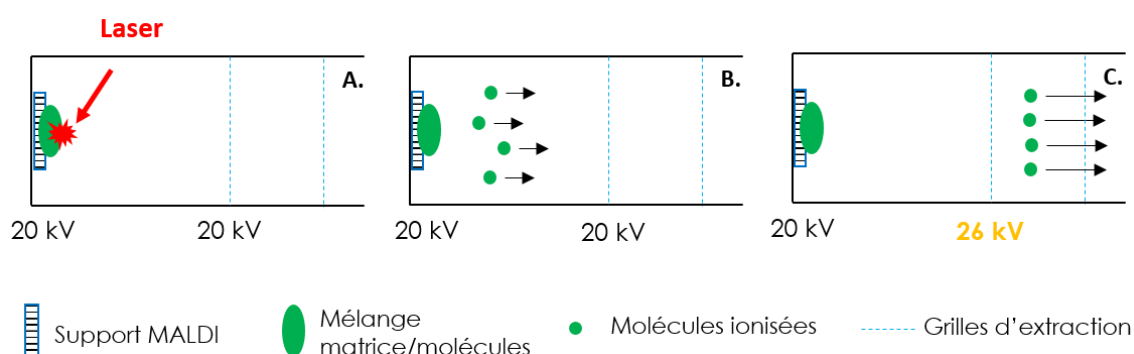
A partir de cette équation, il est possible de retrouver le rapport  $m/z$  de l'ion d'intérêt :

$$t^2 = \frac{L^2}{\frac{2zeVs}{m}} \text{ soit } t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{L^2}{2eVs}\right) \text{ et donc } \frac{m}{z} = \left(\frac{2eVs}{L^2}\right) t^2$$

Cet analyseur qui permet donc une séparation selon leur temps de vol permet d'atteindre des résolutions de l'ordre de 40 000. Cependant, la qualité de séparations des ions et donc de la résolution va dépendre du délai d'extraction et du mode de séparation utilisé : linéaire ou reflectron.

## 2. L'EXTRACTION RETARDEE OU LE DELAI D'EXTRACTION

La technique d'ionisation MALDI entraîne une forte dispersion en temps de départ des ions et induit donc une diminution de la résolution en masse. Pour compenser ce phénomène, l'extraction retardée (**Figure 14**) a donc été mise en place. De cette façon, l'extraction des ions de la source vers l'analyseur à temps de vol se fait avec un retard de quelques nanosecondes [32].



**Figure 14 : Principe de l'extraction retardée. Image modifiée de A. Seyer, 2010 [33]**

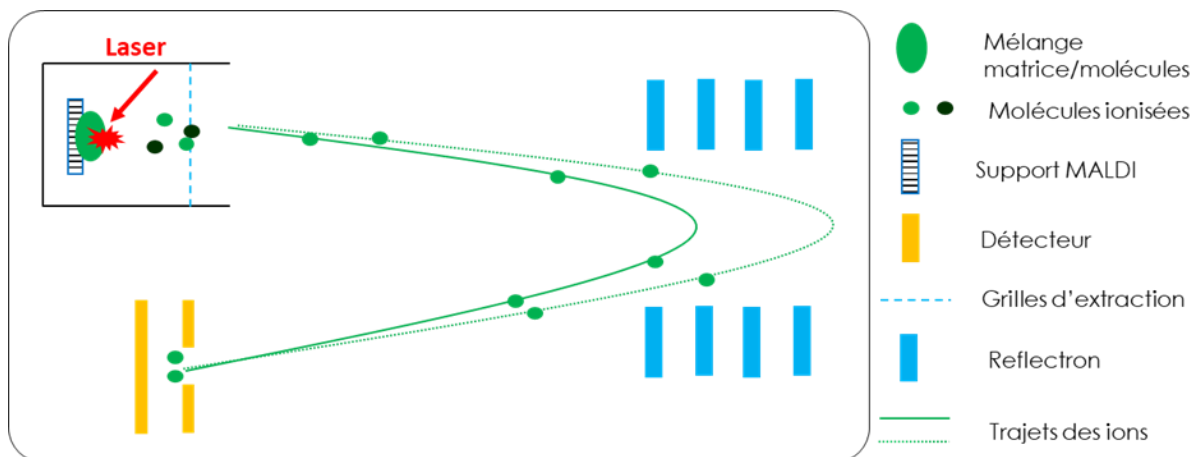
L'extraction retardée consiste à accumuler les ions entre deux grilles réglées à une valeur pendant quelques nanosecondes. Une fois cette durée passée, une différence de potentiel est appliquée pour accélérer les ions lentement et ainsi réduire leur dispersion dans l'espace. Ensuite les ions sont accélérés vers l'analyseur.

Lors du tir laser, une grille est placée à un même potentiel que celui du support de l'échantillon (**Figure 14, A.**). Les ions formés ne subissent donc pas de champ électrique et sont donc accumulés dans cette zone pour une période donnée allant de 10 ns à 300 ns en moyenne (**Figure 14, B.**). Selon la gamme de masse analysée, la durée d'extraction varie. Plus on augmente la masse moléculaire, plus le temps augmente. Après cette période, une différence de potentiel est appliquée entre le support et la grille d'extraction pour dans un premier temps accélérer lentement les ions et réduire la dispersion spatiale (**Figure 14, C.**). Une fois la grille d'extraction passée, les ions sont accélérés de façon plus rapide pour être envoyés vers l'analyseur. Ce dispositif permet donc d'améliorer grandement la précision de mesure en masse et la résolution spectrale.

## 3. LE REFLECTRON

Le reflectron [34] est un dispositif qui permet de remédier à la dispersion en énergie cinétique des ions envoyés dans le tube de vol. Ce système est constitué de miroirs électrostatiques réglés à des potentiels croissants permettant de focaliser les ions selon leur vitesse et donc leur parcours dans ces champs. Deux ions de même rapport  $m/z$  mais avec des vitesses différentes peuvent ainsi être réfléchis de façon à arriver

en même temps sur le détecteur (**Figure 15**). Le reflectron permet donc d'accroître la résolution spatiale jusqu'à des masses aux alentours de 5000 Da. Au-delà, l'apport n'est plus suffisant et le mode linéaire sera préféré.



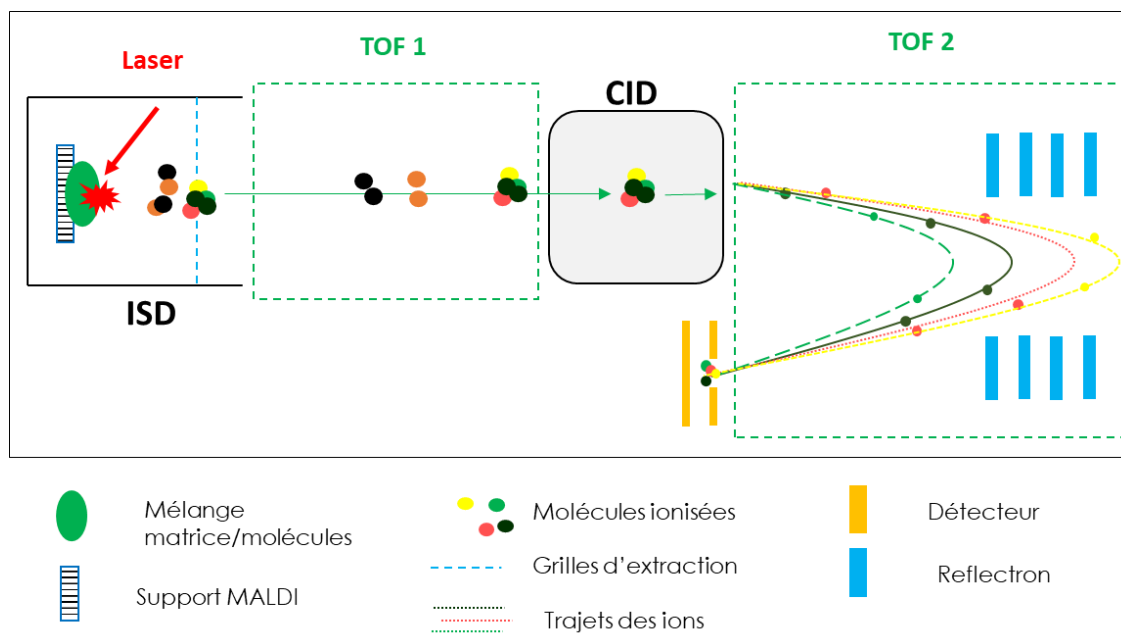
**Figure 15 : Principe de l'analyseur par reflectron**

Après désorption des ions, les ions sont accumulés à l'entrée du temps de vol. Les ions de même rapport masse sur charge arrivant avec une vitesse différente sont refocalisés dans le temps de vol. En mode reflectron, la présence de miroirs électrostatiques réglés à des potentiels croissants permet d'ajuster la vitesse de ces ions selon leur énergie cinétique.

#### 4. LES ANALYSES $MS^2$ : TOF/TOF

Les analyses  $MS/MS$ ,  $MS^2$  ou dites en tandem consistent en la fragmentation d'ions précurseurs dans le but de réaliser des caractérisations structurales de molécules. Pour la fragmentation de cet ion précurseur, il est nécessaire de lui apporter une source d'énergie afin d'engendrer des ions fragments qui vont pouvoir être séparés de nouveau selon leur rapport masse sur charge.

Des analyses  $MS^2$  avec un analyseur en temps de vol nécessitent la présence de deux analyseurs à temps de vol (**Figure 16**). Avec une source d'ionisation MALDI, deux processus de fragmentations peuvent être utilisés afin d'obtenir les ions fragments. La fragmentation peut avoir lieu en source grâce à l'énergie induite par le laser (ISD = In Source Decay) ou alors grâce à une cellule de collision (CID = collision induced dissociation) remplie d'un gaz.



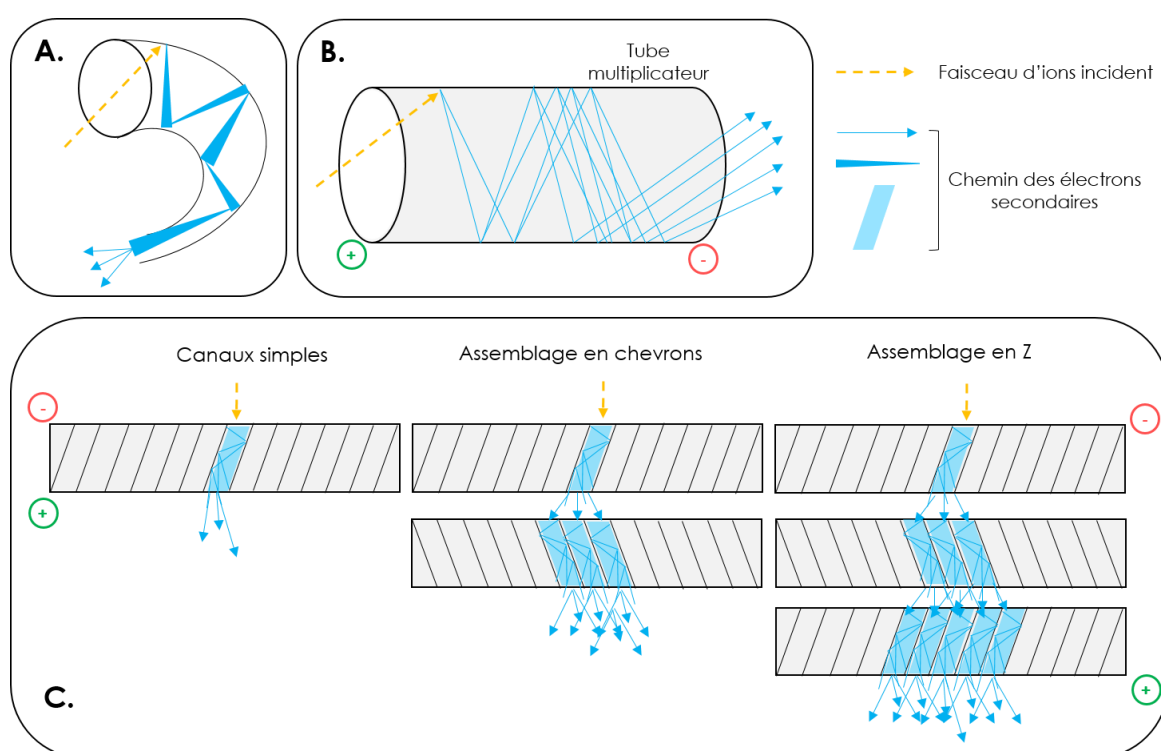
**Figure 16 : Principe des analyses MS<sup>2</sup> en TOF/TOF.**

Les ions peuvent être fragmentés soit en ISD (In Source Decay) ou en CID (Collision Induced Dissociation). Les ions fragments obtenus en ISD et l'ion précurseur sont premièrement séparés dans le TOF 1 des autres ions formés. Les ions fragments sont ensuite séparés dans le TOF 2. En CID, l'ion précurseur sélectionné est séparé des autres ions dans le TOF 1, fragmenté en cellule de collision puis séparé des ions fragments obtenus dans le TOF 2.

Dans le cas d'une fragmentation ISD, les ions précurseurs et les ions fragments sont formés simultanément, ils sont séparés des autres ions dans le premier temps de vol. Pour la fragmentation CID, les ions précurseurs sont fragmentés dans la cellule à collision. Une fois l'étape de fragmentation passée, ces ions précurseurs et fragments sont ensuite refocalisés puis séparés dans le second temps de vol reflectron selon leur rapport  $m/z$ .

## C. LES DETECTEURS EN SPECTROMETRIE DE MASSE

A l'issue de la séparation des ions dans l'analyseur, le faisceau d'ions obtenu doit être amplifié afin d'obtenir un signal mesurable. Le courant ionique va donc être transformé en courant électronique. Pour cela, plusieurs types de détecteurs existent et se différencient selon le mode de courant détecté : un courant ionique pour les plaques photographiques et cylindre de Faraday et un courant électronique pour les détecteurs multiplicateurs d'électrons. Actuellement, les détecteurs les plus utilisés sont donc les seconds, permettant la mesure d'un courant électronique. Parmi ceux-ci, on retrouve les multiplicateurs à dynode continu ou channeltron ou les détecteurs à microcanaux [35].



**Figure 17 : Représentation schématique de détecteurs courant en spectrométrie de masse. Modifié du livre de E. De Hoffman, 3ème édition [35].**

L'amplification du signal en spectrométrie de masse se fait via la transformation d'un signal ionique en un signal mesurable soit un courant électronique. **A.** Le channeltron ou multiplicateur à dynode continu. **B.** et **C.** Le détecteur à microcanaux simples en chevrons ou en Z.

Le channeltron (**Figure 17, A.**) est constitué de dynodes de conversions et d'un tube dopé de plomb avec de bonnes propriétés d'émission. De ce fait lorsqu'un ion incident avec une charge donnée frappe la dynode, des particules secondaires sont émises avec une charge inverse et sont accélérées via un courant appliqué entre les deux extrémités du tube. Les particules entrées dans le tube vont engendrer la formation d'électrons qui vont eux même induire d'autres électrons. La multiplication du signal qui peut être de  $10^6$  à  $10^7$  dépend donc du nombre de particules formées qui vont à leur tour entrainer la formation d'électrons. Le temps de réponse de ce détecteur est très court et permet un balayage rapide des ions.

D'autre part, les détecteurs à microcanaux sont des plaques percées, constituées de canaux simples parallèles. Au sein d'un canal, la surface est recouverte d'un matériel semi-conducteur permettant la formation d'ions secondaires (**Figure 17, B.**). Ces plaques peuvent être assemblées de façon à créer des motifs en chevrons en Z (**Figure 17, C.**) pour amplifier l'effet avalanche du courant électronique induit jusqu'à  $10^8$ .

## D. L'ULTRAFLEXTREME™ DE CHEZ BRUKER.

L'Ultraflex™ (Figure 18) de chez Bruker est un MALDI-TOF/TOF qui permet une acquisition des données MS et MS/MS. Il est équipé d'un laser smartbeam-II™ qui possède un taux de répétitions de 2 kHz en mode reflectron et de 1 kHz en mode linéaire et en MS/MS. La résolution spectrale peut être optimisée en faisant varier le délai d'extraction des ions en source. Plus ce délai d'extraction est élevé, plus la résolution sera optimisée pour les molécules de haute masse moléculaire.

Pourvu du FlashDetector™, il permet d'atteindre une résolution spectrale supérieure à 40 000 dans la gamme de masse des peptides avec une précision de l'ordre du ppm. Il est également doté de module PCIS (Precursor Ion Selector), LIFT et PLMS (Post LIFT Metastable Suppression) pour l'acquisition de spectre MS/MS. Ce dernier module provoque l'absence des ions parents sur les spectres MS<sup>2</sup>. En effet, il les élimine afin d'éviter d'engendrer des ions supplémentaires sur les spectres de masse alors que ce sont les mêmes ions fils formés.

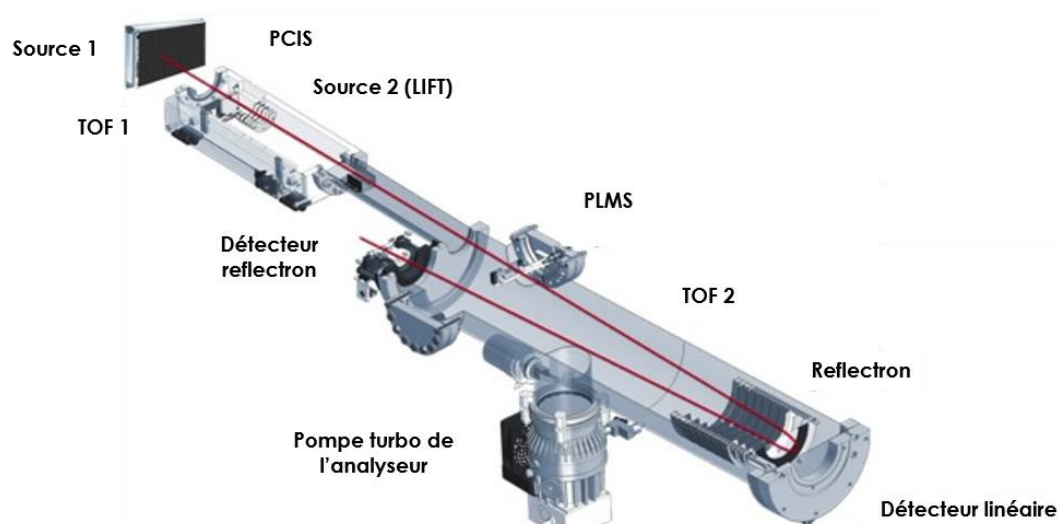


Figure 18 : L'Ultraflex™ de chez Bruker.

En rouge, le trajet des ions partant de la source vers le temps de vol en mode linéaire ou reflectron. Abbreviations: PCIS = Precursor Ion Selector, TOF = Time Of Flight, PLMS = Post LIFT Metastable Suppression.

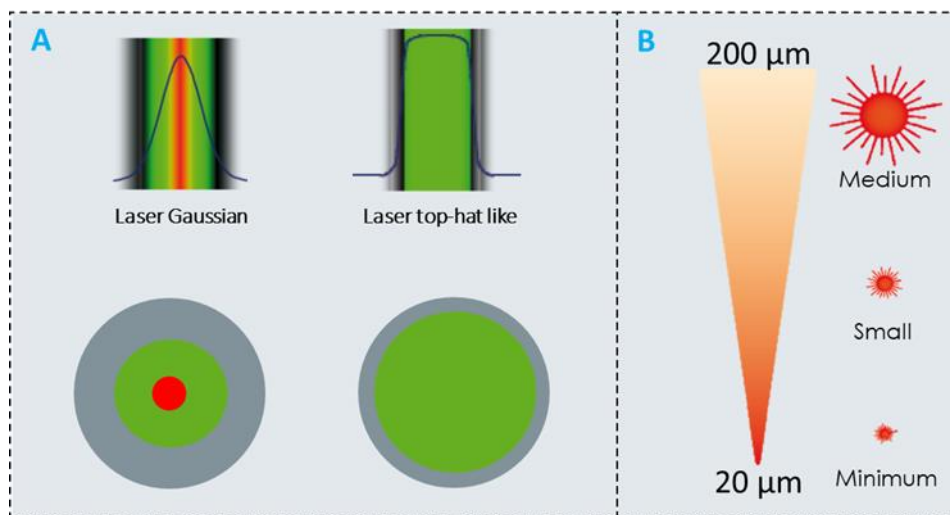
Le laser présent sur ce spectromètre de masse est un laser smartbeam-II™ avec un faisceau laser de type « top-hat like » [36], c'est-à-dire que la puissance laser appliquée en un pixel est égale en tout point contrairement au laser gaussien où l'énergie est plus importante au centre de l'impact. Plus précisément, l'impact d'un faisceau laser gaussien est composé de plusieurs zones (Figure 19, A) :

- La zone centrale où la puissance du laser dépasse celle fixée (en rouge).
- Une zone de désorption et d'ionisation laser où la matrice est ablatée et les molécules ionisées (en vert).



- Et une zone où la matrice est ablatée mais les molécules ne sont pas ionisées car la puissance du laser devient trop faible pour permettre le phénomène de désorption (en gris).

C'est pourquoi le laser smartbeam-II™ propose ici un faisceau plus uniforme [37] avec une zone de désorption-ionisation plus large pour permettre l'analyse d'une plus grande quantité de molécules.



**Figure 19 : Paramètres du laser Smartbeam-II™, Issue de la note technique 97 de Bruker.**

**A.** Faisceau laser de type Gaussien avec en rouge la zone la plus impactée par le laser. Faisceau laser de type Top-Hat avec en vert la zone d'impact du laser plus homogène que le laser gaussien. **B.** Largeur des faisceaux laser proposés par l'Ultraflex™.

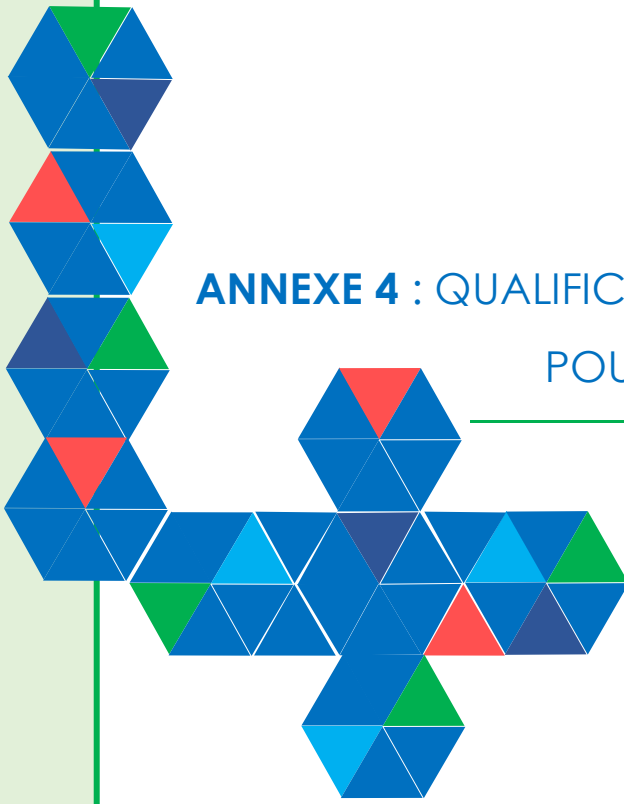
Ce laser possède également différentes tailles de focalisation laser afin d'obtenir des résolutions spatiales allant de 10 μm à 100 μm ou plus. Parmi les focalisations proposées, il y a donc les focalisations « medium », « small » et « minimum » qui permettent donc d'optimiser la résolution latérale d'acquisition et la sensibilité de détection pour une molécule donnée.

## RÉFÉRENCES DES ANNEXES 1, 2 ET 3

---

- [1] Y. Ando, X. Zhao, T. Sugai, et M. Kumar, « Growing carbon nanotubes », *Mater. Today*, vol. 7, n° 10, p. 22-29, oct. 2004.
- [2] A. Szabó, C. Perri, A. Csató, G. Giordano, D. Vuono, et J. B. Nagy, « Synthesis Methods of Carbon Nanotubes and Related Materials », *Materials*, vol. 3, n° 5, p. 3092-3140, mai 2010.
- [3] S. Iijima, « Helical microtubules of graphitic carbon », *Nature*, vol. 354, n° 6348, p. 56, nov. 1991.
- [4] Y. Ando et S. Iijima, « Preparation of Carbon Nanotubes by Arc-Discharge Evaporation », *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 32, n° 1A, p. L107, janv. 1993.
- [5] W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, et D. R. Huffman, « Solid C 60 : a new form of carbon », *Nature*, vol. 347, n° 6291, p. 354, sept. 1990.
- [6] T. Guo, P. Nikolaev, A. G. Rinzler, D. Tomanek, D. T. Colbert, et R. E. Smalley, « Self-Assembly of Tubular Fullerenes », *J. Phys. Chem.*, vol. 99, n° 27, p. 10694-10697, juill. 1995.
- [7] D. V. Kosynkin *et al.*, « Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons », *Nature*, vol. 458, n° 7240, p. 872-876, avr. 2009.
- [8] M. José-Yacamán, M. Miki-Yoshida, L. Rendón, et J. G. Santiesteban, « Catalytic growth of carbon microtubules with fullerene structure », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 62, n° 6, p. 657-659, févr. 1993.
- [9] W. S. Hummers et R. E. Offeman, « Preparation of Graphitic Oxide », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 80, n° 6, p. 1339-1339, mars 1958.
- [10] Y. Cohen, « Centenaire Becquerel : Les grandes étapes de la découverte et de l'utilisation des radioéléments (1896-1996) », *Rev. Hist. Pharm.*, vol. 85, n° 316, p. 415-422, 1997.
- [11] A. Coquerel, G. Gaudriault, V. Le Cam-Duchez, F. Pfaff, N. Zsürger, et J.-P. Vincent, « Imagerie in vitro par radio-imageurs: Application à la quantification de récepteurs et de sondes nucléiques », *Immuno-Anal. Biol. Spéc.*, vol. 11, n° 1, p. 8-23, janv. 1996.
- [12] N. Barthe, K. Chatti, P. Coulon, S. Maîtrejean, et B. Basse-Cathalinat, « Recent technologic developments on high-resolution beta imaging systems for quantitative autoradiography and double labeling applications », *Proc. 2nd Int. Conf. Imaging Technol. Biomed. Sci.*, vol. 527, n° 1, p. 41-45, juill. 2004.
- [13] N. Barthe, « L'imagerie bêta haute résolution », *9è Conférence Int. ACOMENInstrumentation En Médecine Nucl.*, vol. 31, n° 4, p. 193-201, avr. 2007.
- [14] R. Castaing et G. Slodzian, « MICROANALYSIS BY SECONDARY ION EMISSION », *Adv. Mass Spectrom.*, vol. Vol: 3, janv. 1966.
- [15] A. M. Kleinfeld, J. P. Kampf, et C. Lechene, « Transport of <sup>13</sup>C-oleate in adipocytes measured using multi imaging mass spectrometry », *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 15, n° 11, p. 1572-1580, nov. 2004.
- [16] C. Bich, D. Touboul, et A. Brunelle, « Biomedical studies by TOF-SIMS imaging », *Biointerphases*, vol. 10, n° 1, p. 018901, nov. 2014.
- [17] D. Touboul, O. Laprévotte, et A. Brunelle, « Micrometric molecular histology of lipids by mass spectrometry imaging », *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 15, n° 5, p. 725-732, oct. 2011.
- [18] M. Brulet *et al.*, « Lipid mapping of colonic mucosa by cluster TOF-SIMS imaging and multivariate analysis in cfr knockout mice », *J. Lipid Res.*, vol. 51, n° 10, p. 3034-3045, oct. 2010.
- [19] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, et F. Hillenkamp, « Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds », *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, vol. 78, p. 53-68, sept. 1987.
- [20] K. Tanaka *et al.*, « Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 2, n° 8, p. 151-153, 1988.

- [21] L. V. Zhigilei, E. Leveugle, B. J. Garrison, Y. G. Yingling, et M. I. Zeifman, « Computer Simulations of Laser Ablation of Molecular Substrates », *Chem. Rev.*, vol. 103, n° 2, p. 321-348, févr. 2003.
- [22] K. Dreisewerd, « The Desorption Process in MALDI », *Chem. Rev.*, vol. 103, n° 2, p. 395-426, févr. 2003.
- [23] M. Karas et R. Krüger, « Ion Formation in MALDI: The Cluster Ionization Mechanism », *Chem. Rev.*, vol. 103, n° 2, p. 427-440, févr. 2003.
- [24] R. Knochenmuss et R. Zenobi, « MALDI Ionization: The Role of In-Plume Processes », *Chem. Rev.*, vol. 103, n° 2, p. 441-452, févr. 2003.
- [25] Z. Takats, « Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization », *Science*, vol. 306, n° 5695, p. 471-473, oct. 2004.
- [26] Z. Takáts, J. M. Wiseman, et R. G. Cooks, « Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology », *J. Mass Spectrom.*, vol. 40, n° 10, p. 1261-1275, oct. 2005.
- [27] L. Lamont *et al.*, « Targeted Drug and Metabolite Imaging: Desorption Electrospray Ionization Combined with Triple Quadrupole Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 22, p. 13229-13235, nov. 2018.
- [28] R. Yin *et al.*, « High Spatial Resolution Imaging of Mouse Pancreatic Islets Using Nanospray Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Anal. Chem.*, mai 2018.
- [29] A. M. Porcari *et al.*, « Multicenter Study Using Desorption-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry Imaging for Breast-Cancer Diagnosis », *Anal. Chem.*, vol. 90, n° 19, p. 11324-11332, oct. 2018.
- [30] F. Fenaille, P. Barbier Saint-Hilaire, K. Rousseau, et C. Junot, « Data acquisition workflows in liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry-based metabolomics: Where do we stand? », *J. Chromatogr. A*, vol. 1526, p. 1-12, déc. 2017.
- [31] E. de Hoffmann, « Mass Spectrometry », in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, American Cancer Society, 2005.
- [32] M. L. Vestal, P. Juhasz, et S. A. Martin, « Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry », *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 9, n° 11, p. 1044-1050, 1995.
- [33] A. Seyer, « Imagerie par spectrométrie de masse : développements méthodologiques et applications biologiques », thesis, Université d'Evry-Val d'Essonne, 2010.
- [34] B. A. Mamyrin, V. I. Karataev, D. V. Shmikk, et V. A. Zagulin, « The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution », p. 4, 1973.
- [35] Edmond De Hoffman et Vincent Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*, Third edition. Wiley, 2007.
- [36] H.-Y. Kim *et al.*, « Morphologies of femtosecond laser ablation of ITO thin films using gaussian or quasi-flat top beams for OLED repair », *Appl. Phys. A*, vol. 124, n° 2, p. 123, janv. 2018.
- [37] A. Holle, A. Haase, M. Kayser, et J. Höhndorf, « Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance », *J. Mass Spectrom.*, vol. 41, n° 6, p. 705-716, juin 2006.



## ANNEXE 4 : QUALIFICATION DE PERFORMANCE POUR L'ULTRAFLEXTREME™

---

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES



## Partie C : Annexe 4 : Qualification de performance pour l'Ultraflexreme™

Dans le cadre de la norme ISO 9001, les appareils du laboratoire sont soumis à des qualifications de performance. Ce procédé a pour but de vérifier la conformité de l'appareil vis-à-vis des paramètres arrêtés à partir des conditions réelles d'utilisation et de maintenance établies par les spécifications utilisateur. Les documents de sortie sont constitués de fiches de résultats avec relevés et enregistrements des paramètres autorisant l'exploitation en routine. Ces tests incluent un ensemble de conditions regroupant les limites supérieures et inférieures d'exploitation. La mise en place de la qualification de l'Ultraflexreme™ a donc fait partie des premiers mois de cette thèse. Connaissant les utilisations du MALDI-TOF/TOF Ultraflexreme™ au sein du laboratoire du LEMM, des développements analytiques ont été effectués dans le but de mettre en place un test de calibration en mode d'ionisation positif et négatif, un test de performance et un test de sensibilité en MS et MS<sup>2</sup> ont donc été développés et mis en place.

Les conditions utilisateur choisies pour la réalisation de la qualification de performance suite aux optimisations réalisées sont les suivants :

- **Detector check** : Optimisation du gain du détecteur pour le mode d'acquisition linéaire et reflectron. Changement des voltages pour chaque méthode si  $\Delta > 30V$ .
- **Test de calibration** : Calibration à l'aide de tous les pics du Pepmix 2 puis évaluation de la calibration sur quatre pics en mode négatif et positif ( $\Delta < 0,5Da$ ).
- **Test de performance MS** réalisé sur le Pepmix 2 : Reproductibilité sur 5 réplicas et sur 5 pics en mode d'ionisation négatif et positif ( $CV < 30\%$ ). Résolution évaluée selon la gamme de masses analysée.
- **Test de performance MS<sup>2</sup>** réaliser sur la spermine : Reproductibilité de la MS<sup>2</sup> sur un 1 ion fragment et sur 5 réplicas ( $CV < 30\%$ ).
- **Test de sensibilité** réaliser sur la spermine :  $S/N > 200$  sur 3 réplicas.

La procédure de cette qualification est présentée ci-après. Elle comporte :

- le protocole expérimental et des explications concernant la réalisation de chaque test,
- la procédure de retraitement des résultats à partir des logiciels FlexControl et FlexAnalysis,
- les valeurs limites à obtenir,
- et le mode opératoire pour la créations des rapports de résultats dans Flexanalysis.



Informations générales			
Nom de l'appareil			
Date de début des tests	jj/mm/aaaa	Date de fin des tests	jj/mm/aaaa
Conclusions			
Conformité	<input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Partiellement conforme <input type="checkbox"/> Non conforme		
Remarques / Restrictions d'utilisation			
Opérateur	Responsable du système	Responsable de pôle	
Date : ___ / ___ / _____	Date : ___ / ___ / _____	Date : ___ / ___ / _____	
Nom :	Nom :	Nom :	
Visa :	Visa :	Visa :	

**1. ACTIONS ANNEXES A LA QP**

- Scan antivirus :  réalisé  non réalisé

(Le mode opératoire et la clef USB sont localisés auprès d'Alain Pruvost)

- Nettoyage des filtres des aérations accessibles :  réalisé  non réalisé

(Uniquement les filtres accessibles par les utilisateurs)



## 2. MATERIEL & REACTIFS (ou équivalent)

### Matériel :

- 1 plaque MALDI : MTP 384 target plate ground steel BC

Matériel	Référence interne	Calibration valide jusqu'au :
Pipette P2		
Pipette P20		
Pipette P100		
Pipette P200		
Pipette P1000		

### Réactifs :

- Acétone (AcO)
- Ethanol (EtOH)
- Eau ultrapure (18.2 MΩ)
- Matrice  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) : salle haute résolution, F25
- Spermine et Pepmix 2 : Laboratoire A, Congélateur C16, tiroir SC, Boite calibrant peptide standard 2

## 3. PREPARATION DES SOLUTIONS STOCKS (SS)

Solution Stock	Préparation
SS A : Spermine (1mg/mL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Peser environ exactement 5 mg de Spermine (réf. Interne : 258)</li> <li>- Dissoudre dans 5mL d'eau</li> </ul> Date de préparation : _____
SS B : Pepmix 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reprendre la préparation Bruker du Pepmix 2 avec 125 <math>\mu</math>L d'H<sub>2</sub>O TFA à 0.1%</li> </ul> Date de préparation : _____

***Mettre les solutions quelques minutes aux ultrasons si nécessaire***

#### 4. PREPARATION DE LA MATRICE

***Solutions à préparer extemporanément***

**Préparation de la matrice :**

- Peser 10mg de la matrice HCCA.
- Dissoudre dans 1mL de solution EtOH/AcO, 70/30, v/v.
- Vortexer afin d'obtenir une solution limpide et homogène.

***Mettre la solution quelques minutes aux ultrasons si nécessaire***

#### 5. PREPARATION DES SOLUTIONS DE TRAVAIL

***Solutions à préparer extemporanément***

**Préparation du Pepmix 2**

Reprendre la solution mère du Pepmix 2 (solution B) contenant 5µL en proportion 1/1 avec la matrice HCCA (EtOH/AcO, 70/30). On obtient la solution **B1**.

**Préparation des solutions de Spermine**

Reprendre la solution A (Spermine) selon le tableau ci-dessous (Dilution sériée) :

N°	Solution	Volume à prélever (µL)	Qsp (H <sub>2</sub> O) (µL)
A1	20 µg/mL	20 µL de la solution mère	980
A2	1 µg/mL	50 µL de A1	950

Mélanger respectivement les solutions A1 et A2 avec la matrice HCCA (EtOH/AcO, 70/30) en proportion 1/1 sachant qu'il faudra déposer 5 dépôts de 0.5µL, soit 2.5µL minimum pour chacune des solutions. On obtient respectivement les solutions **A'1** et **A'2**.

## 6. PREPARATION DE LA PLAQUE MALDI

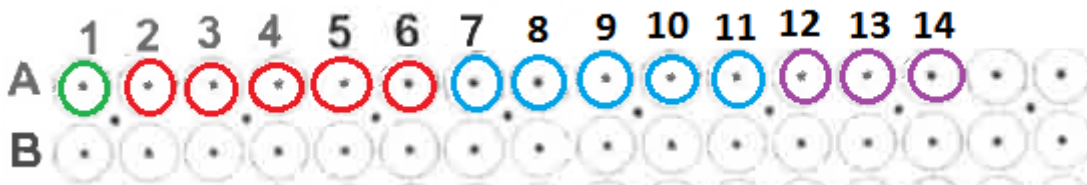
### Dépôt de la matrice

Appliquer sur une ligne entière de la plaque MTP 384 target plate ground steel BC des dépôts de 0.5µL de la solution de matrice HCCA (EtOH/AcO, 70/30). Afin de remplir entièrement le dépôt de façon homogène, appliquer la matrice avec un mouvement circulaire.

**Remarques :** Attention lors du dépôt car il est possible que la matrice déborde des cibles !  
Le temps de séchage du dépôt doit être très court : 5 à 10 secondes.  
Le dépôt de **matrice seul** sert à réaliser le detector check.

### Dépôt des molécules cibles

1. Déposer au minimum 5 réplias (0.5µL) la solution **B1** pour le test de performance sur la gamme 700 – 3500 Da.
2. Déposer au minimum 5 (0.5µL) réplias la solution **A'1** pour le test de performance en MS<sup>2</sup>.
3. Déposer au minimum 3 réplias la solution **A'2** pour le test de sensibilité.



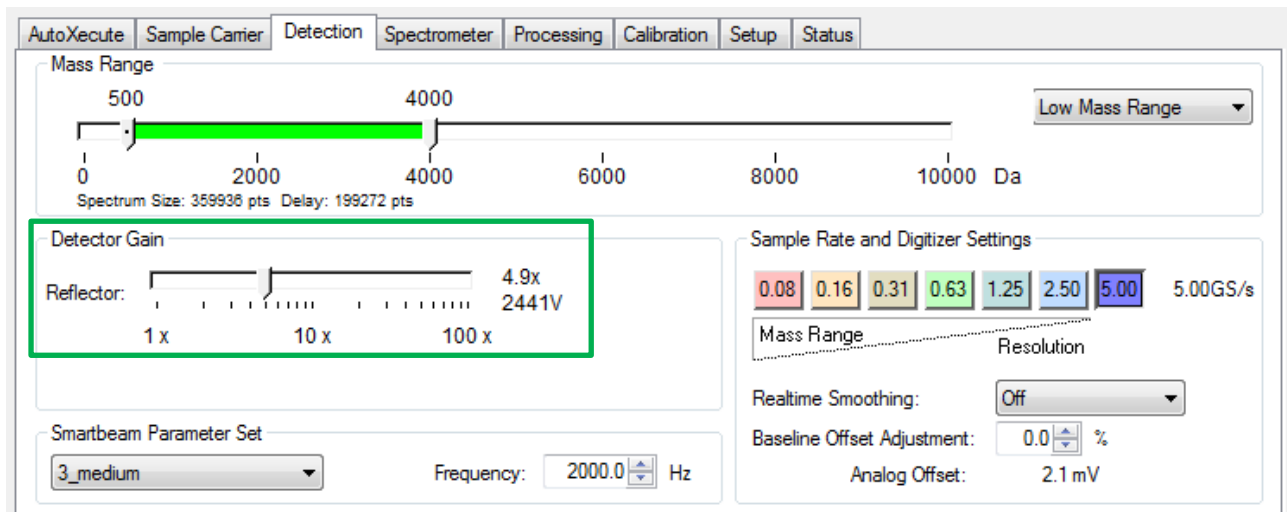
Remplir le plan de plaque MTP 384 target plate ground steel BC en y indiquant vos dépôts non conformes pour la QP.

## 7. DETECTOR CHECK **A FAIRE EN PREMIER**

Utiliser l'option de vérification du détecteur afin d'avoir une détection optimale pour la réalisation de la qualification de performance. Cette vérification automatique prend environ 20 minutes.

- Aller dans l'onglet « Status » de Flexcontrol pour lancer l'analyse en utilisant le dépôt de **matrice seule**.

**Résultats attendus :** Si les voltages diffèrent de plus de 30V par rapport à la vérification précédente, penser à modifier ces voltages pour chaque méthode nécessaire à la réalisation de cette QP. Cette modification s'effectue dans l'onglet « Detection » au niveau du « detector gain ».



**Imprimer le rapport indiquant la différence de voltage avec la précédente vérification**

## 8. TEST DE CALIBRATION

**Les méthodes sont préenregistrées dans le fichier :  
(D:) Data-Methods\FlexControlMethods\Qualification de performance**

**Tous les spectres sont à imprimer grâce à l'option « report » de FlexAnalysis**

### a) ANALYSES MS



#### Acquisitions dans FlexControl

Utiliser un dépôt de Pepmix 2 (Solution **B1**) pour réaliser le test de calibration sur la gamme de masse 700 -3500 Da :

1. Penser à modifier le gain du détecteur.
2. A l'aide d'une première analyse du Pepmix 2, calibrer la méthode **QP\_RP\_pepmix** avec la liste de calibration **PeptideCalibStandard mono**
3. Prendre un second spectre et relever les masses des peptides suivants présents dans le tableau ci-dessous.
4. Enregistrer les spectres ayant servis à relever les masses.
5. Répéter l'opération en mode négatif avec la méthode **QP\_RN\_pepmix** et la liste de calibration **NegPeptideCalibStandard mono**

**Résultats attendus** : écart entre la masse monoisotopique théorique  $[M\pm H]$  du produit et la masse observée  $\leq 0.5$  m/z

### Traitement dans FlexAnalysis

1. Charger les spectres.
2. Pour le premier spectre, cliquer sur « Edit method parameters  », choisir dans « Process » la méthode **QP\_pepmix\_pos** en mode positif et **QP\_pepmix\_neg** en mode négatif.
3. Dans « Mass List layout », choisir uniquement : m/z, S/N et résolution.
4. Cliquer sur « Find List  » afin d'obtenir les listes de pics pour chaque spectre.
6. Sélectionner tous les fichiers et leur appliquer la couleur noire.
7. Réaliser un clic droit sur le fichier d'intérêt et aller dans « Properties ». Veiller à donner un titre pour chaque réplica et à indiquer la « Processing method » utilisée dans le « comment 2 ».
8. Cocher uniquement le spectre et l'imprimer avec l'option : **Report\Preview report\layout\QP\_RP\_pepmix2\_calibration.**
9. Sélectionner la mise en page « Landscape »

	IONISATION POSITIVE		
	m/z théorique	m/z mesuré	$\Delta$ Da
<b>Bradykinine</b>	<b>757.399</b>		
<b>Substance P</b>	<b>1347.735</b>		
<b>ACTH clip</b>	<b>2093.086</b>		
<b>Somatostatine</b>	<b>3147.471</b>		
<b>Résultats</b>	<input type="checkbox"/> <b>Conforme</b> <input type="checkbox"/> <b>Non conforme</b>		
<b>Commentaires</b>			

	Ionisation Négative		
	m/z théorique	m/z mesuré	$\Delta$ Da
Angiotensine II	1044.527		
Substance P	1345.721		
ACTH clip	2091.072		
Somatostatine	3145.456		
Résultats	<input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Non conforme		
Commentaires			

## 9. TEST DE PERFORMANCES


### a) ANALYSES MS


#### Acquisitions dans FlexControl

**Remarque :** Calibrer chaque méthode avant d'acquérir les spectres.

1. Charger la méthode « **QP\_RP\_pepmix** ». Penser à modifier le gain du détecteur.
2. Acquérir les 5 dépôts réalisés avec le Pepmix 2 (Solution **B1**) en mode positif.
3. Faire de même en mode négatif avec la méthode « **QP\_RN\_pepmix** ». Penser à modifier le gain du détecteur.

#### Traitement dans FlexAnalysis

4. Charger les spectres du test de performance.
5. Pour le premier spectre, cliquer sur « Edit method parameters  », choisir dans « Process » la méthode **QP\_pepmix\_pos** en mode positif et **QP\_pepmix\_neg** en mode négatif.
6. Dans « Mass List layout », choisir uniquement : m/z, S/N et résolution.
7. Afin d'appliquer la méthode aux 4 autres spectres réaliser un copier/coller de la méthode.

8. Cliquer sur « Find List  » afin d'obtenir les listes de pics pour chaque spectre.

**Résultats attendus :** Le CV sur les S/N doit être  $\leq 30\%$  pour chacun des pics ciblés

Les résolutions doivent être

- $> \text{à } 10\ 000$  si la masse est  $< \text{à } 1000$
- $> \text{à } 12\ 000$  si la masse est comprise entre 1000 et 1500
- $> \text{à } 15\ 000$  si la masse est comprise entre 1500 et 3000
- $> \text{à } 18\ 000$  si la masse est  $> \text{à } 3000$

Une fois le traitement de données effectué, mettre en forme les données :

9. Sélectionner tous les fichiers et leur appliquer la couleur noire.
10. Réaliser un clic droit sur le fichier d'intérêt et aller dans « Properties ». Veiller à donner un titre pour chaque réplica et à indiquer la « Processing method » utilisée dans le « comment 2 ».
11. Cocher uniquement le spectre à imprimer avec l'option : **Report\Preview report\layout\QP\_RP\_pepmix2\_performance.**
12. Sélectionner la mise en page « Landscape »

**Remarque :** Penser à bien sélectionner le spectre ciblé pour l'impression afin d'afficher dans le rapport le tableau avec la valeur lui correspondant.

**IONISATION POSITIVE**

Reproductibilité							
Molécules	Masses	S/N 1	S/N 2	S/N 3	S/N 4	S/N 5	CV %
Bradykinine	757.399						
Angiotensine II	1046.542						
Substance P	1347.735						
ACTH clip	2094.121						
Somatostatine	3149.493						
Résolution							
Molécules	Masses	1	2	3	4	5	Moyenne
Bradykinine	757.399						
Angiotensine II	1046.542						
Substance P	1347.735						
ACTH clip	2094.121						
Somatostatine	3149.493						
<b>Résultats</b>	<input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Non conforme						
<b>Commentaires</b>							



IONISATION NEGATIVE							
Reproductibilité							
Molécules	Masses	1	2	3	4	5	CV %
HCCA	779.122						
Angiotensine II	1044.527						
Substance P	1345.731						
ACTH clip	2092.051						
Somatostatine	3147.461						
Résolution							
Molécules	Masses	1	2	3	4	5	Moyenne
HCCA	779.122						
Angiotensine II	1044.527						
Substance P	1346.731						
ACTH clip	2092.051						
Somatostatine	3147.461						
<b>Résultats</b>	<input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Non conforme						
<b>Commentaires</b>							

## b) ANALYSES MS<sup>2</sup>

### *La spermine s'ionise en positif*



#### Acquisitions dans FlexControl

1. Charger la méthode **QP\_LIFT\_LM\_pos** Penser à modifier le gain du détecteur.
2. Acquérir les 5 dépôts réalisés pour la MS<sup>2</sup> de la spermine (solution **A'1**).
3. Indiquer la masse de l'ion parent soit 203.224 et acquérir un spectre sur le dépôt cible. Sélectionner l'ion sur le spectre puis cliquer sur « Add » et « Fragmentation » pour que lors de l'acquisition suivante l'ion parent soit calibré.
4. Une fois en en mode fragment, enregistrer le spectre MS<sup>2</sup>. On attend la transition 203.224 → 129.1. Afin de pouvoir enregistrer le spectre il faut obligatoirement avoir cliquer sur « Add ».
5. Retourner en mode « parent » afin d'acquérir le spectre de l'ion parent calibré.

**Remarque** : Si le spectre de l'ion fils est toujours dans la somme, le spectre de l'ion parent ne sera pas enregistré : Cliquer alors sur « Clear sum ».

7. Acquérir le spectre puis afin de l'enregistrer, cliquer sur « Add ».
6. Reproduire cette démarche sur les 4 autres dépôts.

#### Traitement dans FlexAnalysis

1. Charger les spectres MS et MS<sup>2</sup> et utiliser les processing methods () suivantes : **QP\_spermine\_sensibilité** en mode MS et **QP\_spermine\_MS<sup>2</sup>** en mode MS<sup>2</sup>.
2. Dans « Mass list layout », choisir uniquement : m/z, S/N et résolution.
3. Afin d'appliquer la méthode aux 4 autres spectres réaliser un copier/coller de la méthode.
4. Cliquer sur « Find List  » afin d'obtenir les listes de pics pour chaque spectre.

Une fois le traitement de données effectué, mettre en forme les données :

6. Sélectionner tous les fichiers et leur appliquer la couleur noire.
7. Réaliser un clic droit sur le fichier d'intérêt et aller dans « Properties ». Veiller à donner un titre pour chaque réplica et à indiquer la « Processing method » utilisée dans le « comment 2 ».
8. Afin d'imprimer les spectres, afficher les spectres en mode « List » avec uniquement le spectre MS et le spectre MS<sup>2</sup> correspondant coché.

**Remarque** : Penser à bien sélectionner le spectre MS<sup>2</sup> avant la création du rapport afin que les valeurs affichées dans celui-ci correspondent à l'ion fils.

9. Imprimer : **Report\Previewreport\layout\QP\_spermine\_performance\_MS<sup>2</sup>**.
10. Sélectionner la mise en page « Landscape »

**Résultat attendu :** Le CV sur les S/N doit être  $\leq 30\%$ .

IONISATION POSITIVE							
Reproductibilité							
Molécules	Masse	S/N 1	S/N 2	S/N 3	S/N 4	S/N 5	CV %
Spermine	129.1						
Résultats	<input type="checkbox"/> Conforme <input type="checkbox"/> Non conforme						
Commentaires							



## 10. TEST DE SENSIBILITE

*La spermine s'ionise en positif*



### Acquisition dans FlexControl

Charger la méthode **QP\_RP\_LM\_spermine** afin d'acquérir les 3 dépôts réalisés avec la solution **A'2** en mode positif. Penser à modifier le gain du détecteur. Si nécessaire, optimiser le signal en ajustant la puissance du laser.

**Remarques :** Il existe une fonction dans FlexControl pour connaître le S/N du pic d'intérêt à 203.224 *m/z* :

- Cliquer sur « Max cursor left  » puis sur « Show peaks information  ».
- Une fois ces fonctions activées, un tableau apparaît permettant la lecture du S/N.

### Traitement dans FlexAnalysis

1. Charger les spectres MS et utiliser la « Processing method (  ) » suivante : **QP\_spermine\_sensibilité**.
2. Dans « Mass list layout », choisir uniquement : *m/z*, S/N et résolution.
3. Afin d'appliquer la méthode aux 2 autres spectres, réaliser un copier/coller de la méthode.
4. Cliquer sur « Find List  » afin d'obtenir les listes de pics pour chaque spectre.

**Résultat attendu** : Le rapport S/N mesuré doit être  $\geq$  à 200

Une fois le traitement de données effectué, mettre en forme les données :

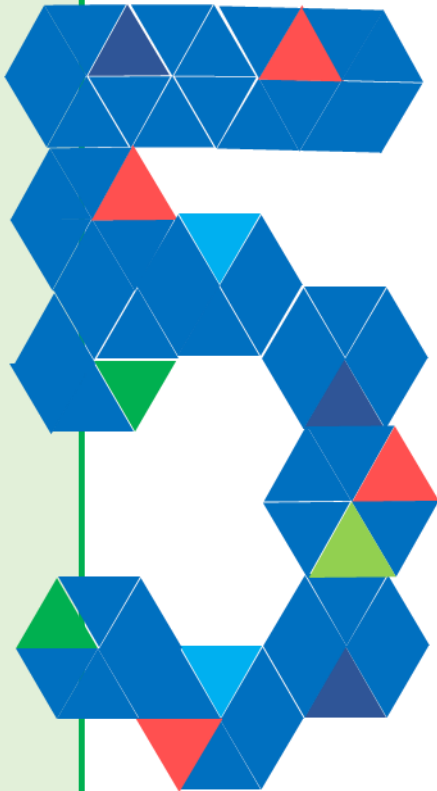
6. Sélectionner tous les fichiers et leur appliquer la couleur noire.
7. Réaliser un clic droit sur le fichier d'intérêt et aller dans « Properties ». Veiller à donner un titre pour chaque réplica et à indiquer la « Processing method » utilisée dans le « comment 2 ».

**Remarque** : Penser à bien sélectionner le spectre ciblé pour l'impression afin d'afficher dans le rapport le tableau avec la valeur lui correspondant.

8. Cocher uniquement le spectre à imprimer avec l'option : **Report\Preview report\layout\QPspemine\_sensibilité.**
9. Sélectionner la mise en page « Landscape »

IONISATION POSITIVE				
Sensibilité				
Molécules	Masse	S/N 1	S/N 2	S/N 3
Spermine	203.224			
<b>Résultats</b>	<input type="checkbox"/> <b>Conforme</b> <input type="checkbox"/> <b>Non conforme</b>			
<b>Commentaires</b>				





## ANNEXE 5 : POSTER

---

DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR  
SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES



## Context and strategies

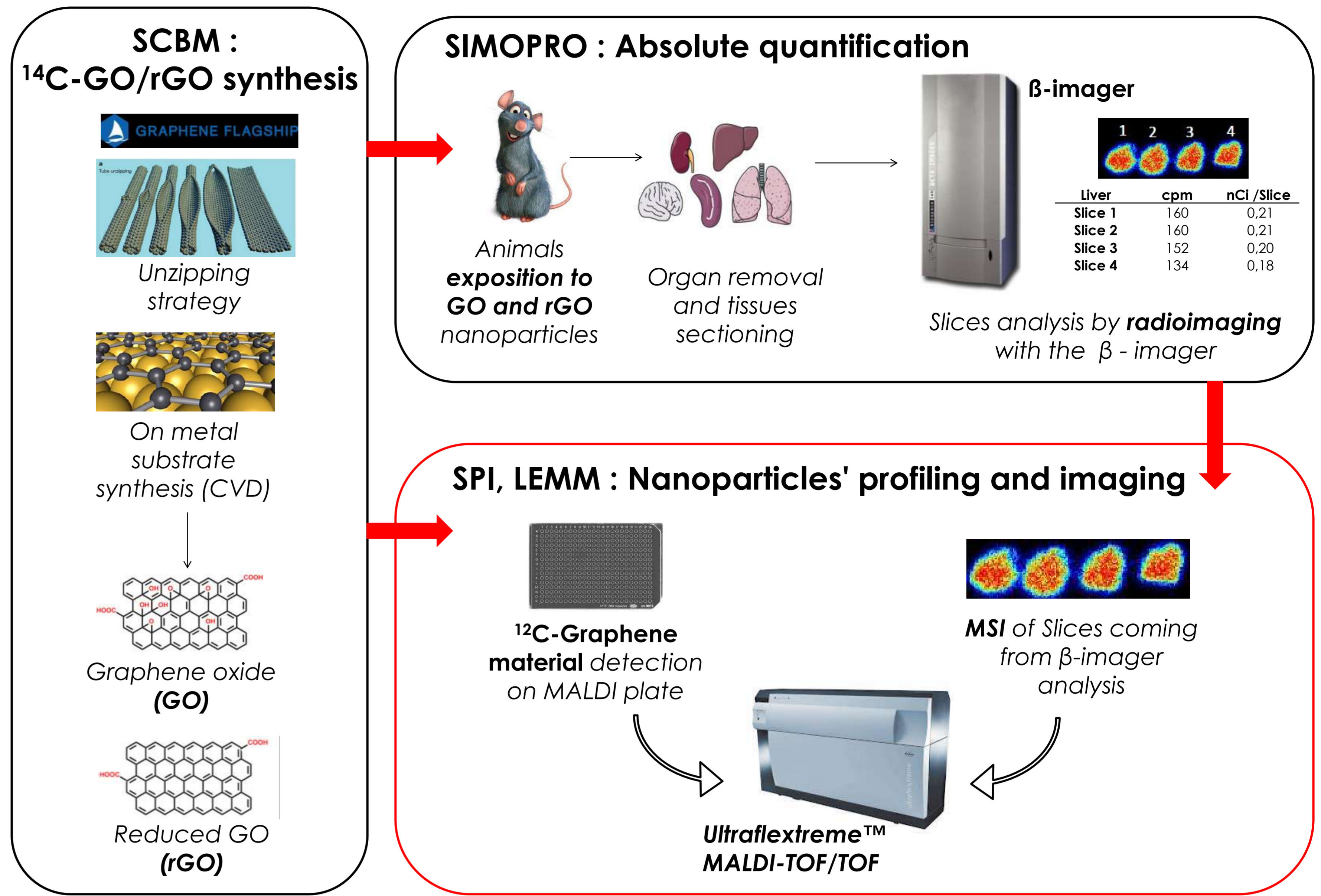
Graphene success results from its versatile physicochemical and biological properties making it an attractive nanomaterial. Indeed, those nanoparticles such as carbon-nanotubes, nanodots or **graphene oxide (GO) sheets** can be used in multiple areas including therapeutics using bioengineering or drug delivery. Despite its great potential, special attention has to be paid concerning its bioactivity and safety.

To this end, our approach aims to provide complementary analytical information on biodistribution of <sup>14</sup>C-radiolabeled graphene in mouse tissue (CZARNY *et al.*, ACS nano, 2014) by combining **radioimaging** and **mass spectrometry imaging** (MSI). Indeed, **absolute quantification** provided by radioimaging needs to be supplemented with **structural analyzes** to confirm specificity of the graphene signature.

### Objectives :

**Acquisition of a graphene based material signature using mass spectrometry and imaging mass spectrometry (IMS) combining to radioimaging for absolute quantification.**

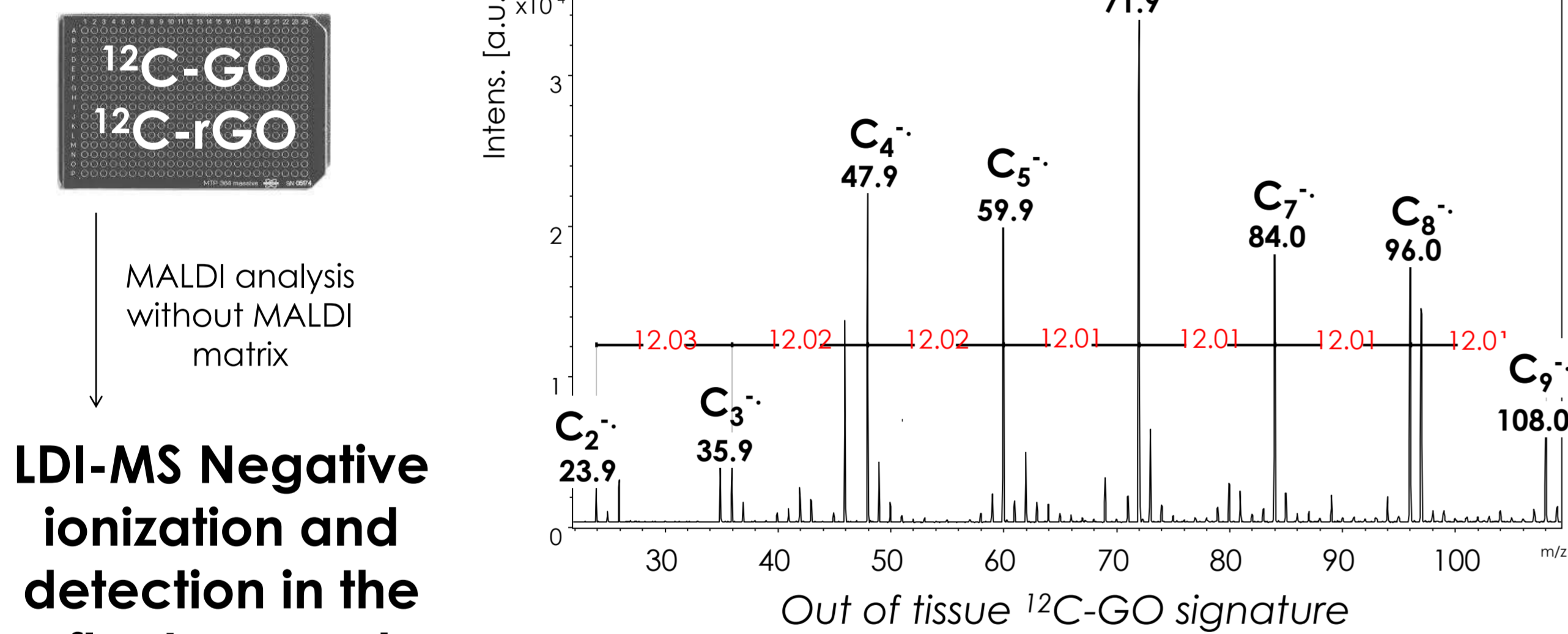
## Workflow



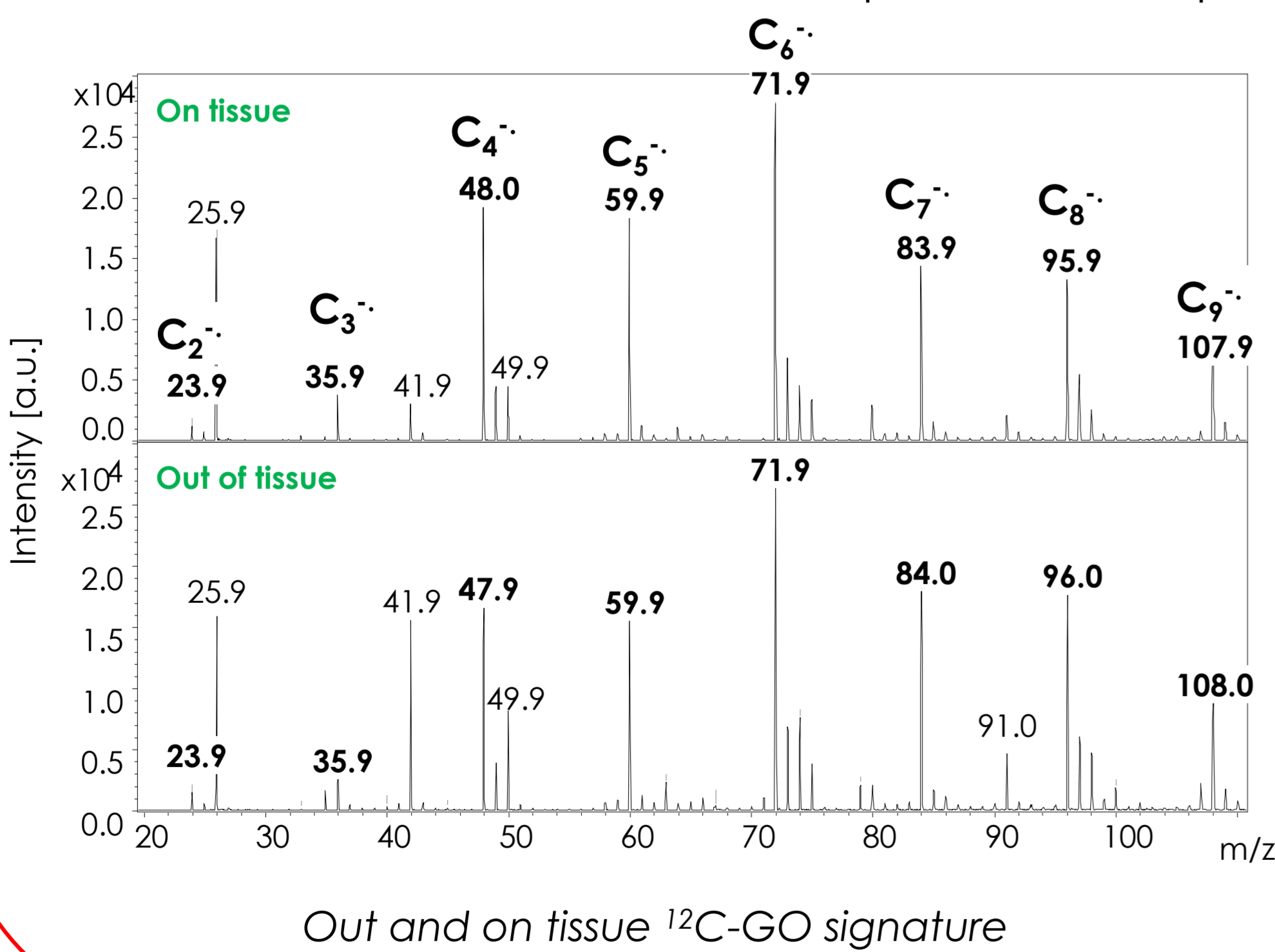
## 1. MS profiling of GO

Development of the MSI approach started by unlabeled (<sup>12</sup>C) and (<sup>14</sup>C) labeled GO species profiling on an UltraFlexextreme™ MALDI-TOF/TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – tandem Time Of Flight) mass spectrometer out and on tissue.

Specific signature was reproducibly observed for both GOs, with carbon cluster distributions ranging from C<sub>2</sub><sup>-</sup> (*m/z* 23.9) to C<sub>9</sub><sup>-</sup> (*m/z* 108.0) and a base peak at *m/z* 71.9 corresponding to C<sub>6</sub><sup>-</sup> (CHEN *et al.*, Nature nanotech, 2015).



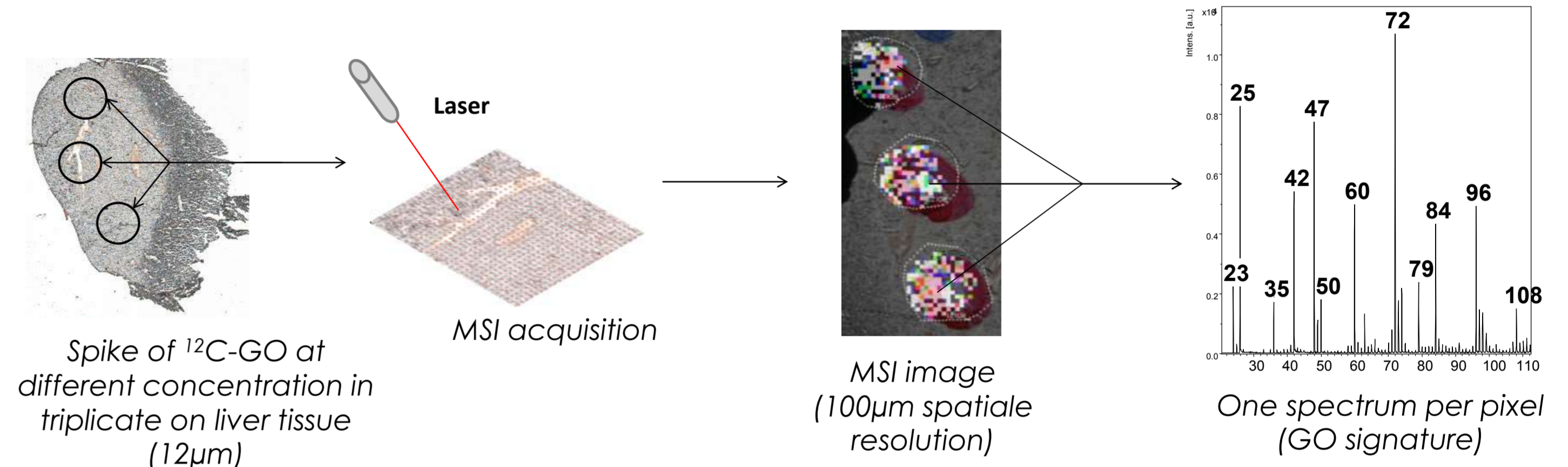
Graphene oxide was spotted on tissue to validate the MS analysis and confirm the MS profile of GO materials. Because of too high concentration, no matrix effect was observed with spiked GO droplet on liver tissue.



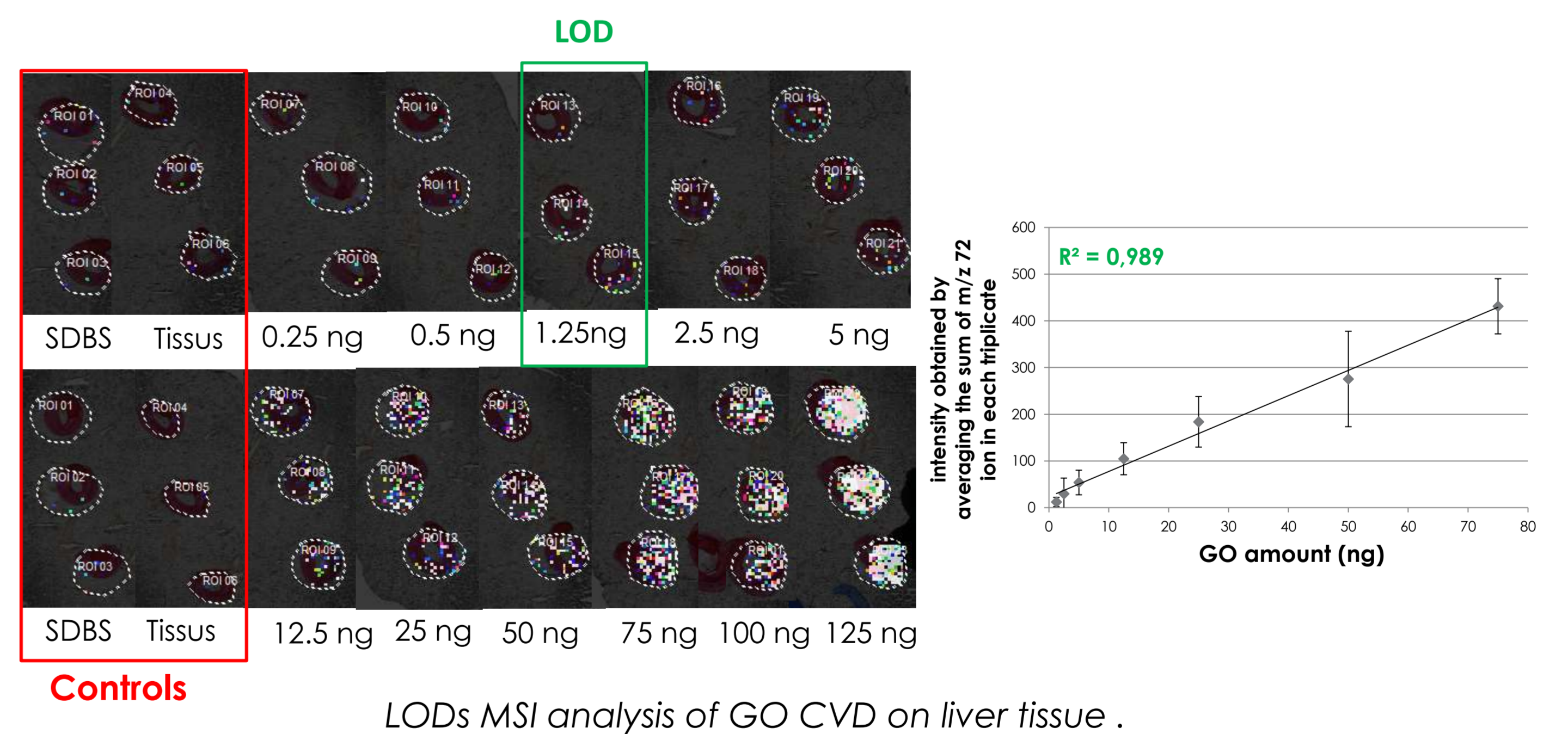
**No difference were observed between on and out of tissue profile of GO.**

## 2. Mass Spectrometry Imaging of GO

MSI method was optimized on liver tissue with following parameters : laser power set up at 90%, 1000 spectra accumulation, spatial resolution of 100 μm.



Then, sensitivity and matrix effect evaluation were performed by spotting dilution series of <sup>12</sup>C-GO suspension (0.05% SDBS (DodecylBenzeneSulfonate)) on liver tissue. LOD was evaluated by monitoring the intensity of the base peak *m/z* 71.9 obtained with the previous MSI method. Analysis were performed on liver tissue and on Indium Tin Oxide (ITO) slide.



Limit of detection of unlabeled CVD graphene oxide was determined at **0.83 ng/mm<sup>2</sup> on tissue and at 0.33 ng/mm<sup>2</sup> on ITO slide**. So, only a two-fold lower signal was induced due to matrix effect.

**A 10 fold signal difference was estimated between β-imager and MALDI-TOF techniques for on tissue GO analysis.**

## Conclusions

- ✓ **- Robust signature of GO**
- ✓ **- Effective MSI analysis method**
- ✓ **- LOD determination on tissue**
- ✓ **- Linear standard curve**

## Perspectives

After confirmation of ITO slides compatibility with both imaging techniques, future objectives aim to successively analyze <sup>14</sup>C-GO in an animal model by the implemented dual imaging approach. Knowing that on the basis of GO materials were dosed at 0.1 ng/mm<sup>2</sup> in liver tissue with β-imager, MSI results will be further exploited to potentially performed on tissue structural analysis of to study carbon nanomaterials biodistribution .

The combination of these two imaging techniques will be applied in the framework of drug delivery systems in order to localize and quantify simultaneously an active compound and its carrier





**DEVELOPPEMENT D'UNE NOUVELLE APPROCHE COMBINANT LA RADIOIMAGERIE ET L'IMAGERIE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE POUR L'ANALYSE DE NANOPARTICULES.**

**MSI – Radioimagerie – Nanoparticules – Graphène – Biodistribution - Quantification.**

La vectorisation de médicaments, qui permet de les acheminer sur les tissus cibles pour accroître leur activité pharmacologique tout en limitant leur toxicité et effets indésirables, est un axe de recherche en forte expansion dans lequel les nanotechnologies sont un des facteurs clés. L'un des enjeux dans cette thèse a donc été de développer une méthode d'imagerie combinée entre la MSI et l'imagerie  $\beta$  pour l'étude de la biodistribution de nanoparticules de type graphène. Malgré l'étude de nanoparticules hétérogènes, les analyses ont permis de déterminer une signature carbonée répétable de l'oxyde de graphène en analyse LDI-MS et ainsi que des analyses reproductibles de MSI avec de CV inférieur à 30 %. De plus, la combinaison des deux techniques a permis d'obtenir la quantification absolue du GO en radioimagerie après exposition de souris à trois doses d'injection ainsi que la biodistribution à 25  $\mu\text{m}$  de résolution spatiale de ces nanoparticules au sein des tissus grâce à l'apport de la MSI. Lors d'un second projet concernant l'étude de vecteurs micellaires polymériques encapsulant un médicament, une méthode MALDI-TOF a également été développée afin de détecter ces deux molécules simultanément. Cependant, les expérimentations réalisées ont montré le besoin de développer des protocoles de traitements tissulaire compatibles avec la MSI et permettant d'améliorer le seuil de sensibilité de cette technique analytique.

**DEVELOPMENT OF A DUAL IMAGING STRATEGY COMBINING RADIO- AND MASS SPECTROMETRY-IMAGING TO STUDY THE BIODISTRIBUTION OF NANOPARTICLES.**

**MSI – Radioimaging – Nanoparticles – Graphene – Biodistribution - Quantification.**

The vectorization of drugs, which allows them to be transported to target tissues to increase their pharmacological activity while limiting their toxicity and adverse effects, is a rapidly expanding research area in which nanotechnologies are one of the key factors. One of the challenges in this thesis was therefore to develop a combined imaging method between MSI and imaging  $\beta$  for the study of the biodistribution of graphene-type nanoparticles. Despite the study of heterogeneous nanoparticles, the analyses determined a repeatable carbon signature of graphene oxide in LDI-MS analysis and reproducible MSI analyses with CVs below 30%. In addition, the combination of the two techniques made it possible to obtain the absolute quantification of GO in radioimaging after exposure of mice to three injection doses as well as the biodistribution at 25  $\mu\text{m}$  of spatial resolution of these nanoparticles within tissues thanks to the contribution of MSI. In a second project to study polymeric micellar vectors encapsulating a drug, a MALDI-TOF method was also developed to detect these two molecules simultaneously. However, the experiments carried out have shown the need to develop tissue treatment protocols compatible with MSI and making it possible to improve the sensitivity threshold of this analytical technique.

