UNIVERSITÉ ÉVRY – VAL D'ESSONNE

ECOLE DOCTORALE

DES GÉNOMES AUX ORGANISMES

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur en Sciences de l'Université Evry – Val d'Essonne

par

Delphine DEBOIS

Imagerie moléculaire d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse ToF-SIMS

Soutenue le 03 octobre 2008 devant la Commission d'Examen :

Mme Jeanine Tortajada	Présidente
Mr Michael Karas	Rapporteur
Mr Jean-Marie Schmitter	Rapporteur
Mr Gérard Bolbach	Examinateur
Mr Alain Brunelle	Examinateur
Mr Olivier Laprévote	Directeur de Thèse

À Noël Quinton…

Merci à…

Monsieur le Professeur Olivier Laprévote, pour ton accueil au laboratoire, pour avoir placé en moi une confiance dont j'espère être digne, à présent et dans l'avenir.

Monsieur le Docteur Alain Brunelle, pour le temps que tu as passé à me transmettre tout ce que je sais en imagerie, pour les expériences (pas que scientifiques) que nous avons partagées, pour ton humour du vendredi. Merci surtout pour ta disponibilité.

Madame la Professeur Jeanine Tortajada, pour avoir accepté de présider ce jury de thèse. La boucle est bouclée : vous étiez déjà là lorsque j'ai présenté mon projet de thèse pour obtenir une bourse et vous étiez encore là le jour de ma soutenance. En témoignage de ma grande reconnaissance.

Monsieur le Professeur Michael Karas, pour l'honneur que vous me faites d'avoir accepté de rapporter ces travaux, vous obligeant à lire 300 pages manuscrites en Français.

Monsieur le Professeur Jean-Marie Schmitter, pour votre regard sur ces travaux, en témoignage de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Gérard Bolbach, pour le plaisir que vous me faites d'avoir accepté d'examiner mon travail. Avec tous mes remerciements.

Nos collaborateurs,

Madame le Docteur Pascale Richardin, Monsieur le Docteur Vincent Mazel et Monsieur le Docteur Philippe Walter, pour notre travail commun sur les patines de statues Dogon. Chaque journée passée ensemble devant le ToF-SIMS ressemblait à une récréation.

Madame le Docteur Simone Séror, Monsieur le Docteur Barry Holland et Kassem Hamzé, pour notre collaboration fructueuse sur les surfactines et le swarming. Notre travail commun m'a beaucoup appris, sur le plan scientifique comme humain.

Monsieur le Docteur Jamal Ouazzani, Philippe Lopez et Emilie Adelin, pour votre expertise et votre efficacité sans lesquelles l'analyse quantitative des surfactines n'aurait pas connu ce succès !

Madame la Professeur Marie-Pierre Bralet et Monsieur le Docteur François Le Naour, pour notre collaboration sur l'étude lipidomique de pathologies hépatiques. Ce travail m'a ouvert l'esprit vers d'autres horizons.

Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin, à ce travail de thèse :

David Touboul, pour m'avoir formée au ToF-SIMS à mon arrivée en thèse, pour ton amitié et ton calme qui tempère souvent mon impulsivité,

Nora Tahallah, pour nos discussions sur les résultats en ToF-SIMS, pour être devenue une cocotte (en or) et avoir été là quand j'en avais besoin,

Nadège Lemahieu, pour ta personnalité unique, pour m'avoir aidée dans des moments où la solution la plus simple n'était sans doute pas la meilleure et pour ton humour incomparable,

Jean-Pierre Le Caër, pour ton humour et ton expérience dont tu nous fais bénéficier,

Vincent Guérineau, pour ces quatre années de boutades, de discussions pseudo sérieuses sur l'avenir du labo, et puis, aussi, pour notre travail commun sur l'analyse quantitative des surfactines.

Farida Messouaf, pour ton amitié et notre amour partagé des Bueno !. Je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse,

Alexandre Seyer, pour la complicité qui a fini par s'installer entre les disciples d'Alain, je te souhaite bonne chance et bon courage pour la suite,

Sylvain Ravier, pour cette année passée au labo ensemble, tes remarques de Marseillais déraciné et ton amour pour les programmes télévisés de M6. Avec toute mon affection,

Aïcha Bagag, pour avoir partagé ces trois années de galère, joie, déprime, stress… Nos caractères différents ont finalement su cohabiter dans notre bureau exigu ! Je te souhaite bonne chance pour la suite de ta carrière, et le meilleur pour ta vie personnelle,

Isabelle, Julie, Sylvie, pour votre bonne humeur et votre présence à mes côtés durant ces quatre années au laboratoire,

Enfin, de façon plus intime j'aimerais remercier :

Audrey et Nicolas, pour avoir servi de cobayes gastronomiques, pour leur amitié et leur soutien,

Arnaud et Aurélie, qui ont été présents à chaque instant de cette thèse, merci de votre amitié,

Ma belle-mère Danièle, mes belles-sœurs Gwenola, Gaëlle et Morgane, elles aussi ont participé à ce succès. Merci à vous toutes,

Mes parents, pour m'avoir laissée libre de mes choix, même s'ils ne les ont pas toujours compris, pour le profond plaisir que j'ai eu à les voir présents à ma soutenance,

Ma sœur Sophie et son compagnon Patrique, mon frère Fabrice et sa compagne Melinda, pour avoir suivi l'avancement de ces travaux bien étranges et trop complexes, pour tout ce temps passé ensemble, qui va me manquer à présent que je quitte la France,

Et bien sûr,

Merci à Loïc, sans qui je n'en serais pas là. Merci pour ton soutien, tes encouragements, ta patience à mon égard, ta tendresse et tes attentions quotidiennes. Ta présence à mes côtés rend la vie fabuleuse, merci pour tout cet amour.

Liste des abréviations

MS : Mass Spectrometry

ToF-SIMS : Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time-of-Flight

ESI: ElectroSpray Ionization

MS/MS: Tandem Mass Spectrometry

FAB: Fast Atom Bombardment

DESI: Desorption ElectroSpray Ionization

ESSI: ElectroSonic Spray Ionization

ICR: Ion Cyclotronic Resonance

LMIS/LMIG: Liquid Metal Ion Source / Liquid Metal Ion Gun

PSD: Post Source Decay

PDMS: Plasma Desorption Mass Spectrometry

PDMS: PolyDiMéthylSiloxane

LC: Liquid Chromatography

UV: Ultra-Violet

ROI: Regions of Interest

LA-ICP/MS: Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma/Mass spectrometry

TOF/TOF: Time-of-flight/Time-of-flight

CID: Collision Induced Dissociation

SORI-CAD: Sustained Off Resonance Irradiation-Collision Activated Dissociation

IRMPD: InfraRed MultiPhoton Dissociation

ECD: Electron Capture Dissociation

DHB: 2,5-Dihydroxybenzoic acid

HCCA: 4-α-cyanohydroxycinnamic acid

THAP: 2,4,6-trihydroxyacétophénone

SA: Sinapinic Acid

9AA: 9-aminoacridine

SRIM: Stopping Reaction Ion Monitoring

XANES: X-Ray Near Edge Spectroscopy

EXAFS: Extended X-Ray

SR-μ-FT-IR: Synchrotron Radiation-Fourier Transform InfraRed Micrsospectroscopy

Préambule 1

Introduction générale 7

I. Méthodes d'ionisation 10

1. SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry 10

1.1. Principe 10

1.2. Définitions 11

1.2.1. Rendement d'émission ionique secondaire 12

1.2.2. Fluence ou Densité de dose d'ions primaires 12

1.2.3. Section efficace d'endommagement 13

1.2.4. Efficacité 14

1.3. Types de projectiles 15

1.3.1. Les projectiles monoatomiques 15

1.3.1. Les projectiles polyatomiques 16

1.3.1.1. Agrégats à constituants « légers » 17

1.3.1.2. Agrégats à constituants « lourds » 17

1.3.1.3. Agrégats « exotiques » 19

2. MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation 20

2.1. Principe 20

2.2. Les matrices 21

3. ESI : ElectroSpray Ionisation 23

3.1. Principe 23

3.2. Le nanospray 25

II. Analyseurs de masse 25

1. L'analyseur par temps-de-vol (TOF) 26

1.1. Principe de fonctionnement 26

1.2. Deux progrès pour le TOF : le reflectron et l'extraction retardée 29

1.2. Décomposition Post-Source (« *Post Source Decay* », PSD) 31

2. L'Orbitrap 32

III. Description des instruments 33
1. Le ToF-SIMS IV 33
2. Le Voyager DE-STR 37
2. Le LTQ-Orbitrap 38

VI. Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse 39

V. Obtention d'images ToF-SIMS 41

VI. Traitement des données 41
1. Etalonnage des spectres 42
2. Reconnaissance des pics 42
3. Apport de l'analyse de molécules de référence 42
4. Sélection des pics d'intérêt 43
5. Comment lire une image ? 43
6. Compression des images 44
7. Lissage des images 45
8. Superposition des images et co-localisation 45
9. Extraction de spectres de zones d'intérêt 46
10. Normalisation 46

VI. Etat de l'art en imagerie par spectrométrie de masse 47
1. Le MALDI et le SIMS n'ont pas le monopole de l'imagerie ! 47
2. Développements récents de l'imagerie par spectrométrie de masse 49

Références bibliographiques 55

Chapitre I :
Profilage en profondeur d'une coupe de cerveau de rat 67
1. Introduction 67

2. Protocole mis en œuvre 72
2.1. Préparation des échantillons 72
2.2. Profilage 72
2.3. Traitement des données 74
3. Résultats et Discussion 74
3.1. Utilisation de la source d'ions de fullerène en imagerie 74
3.2. Utilisation de la source d'ions de fullerène comme faisceau de pulvérisation 75
3.3. Imagerie 3D d'une coupe de cerveau de rat 78
4. Conclusions et Perspectives 84
Références bibliographiques 86

Chapitre II :
Identification de sang rituel dans des objets d'art africains 91
1. Introduction 91
2. Protocole expérimental 97
2.1. Préparation des échantillons 97
2.1.1. Produits de référence 97
2.1.2. Description des échantillons archéologiques 98
2.1.3. De l'objet d'art à l'échantillon analysable 99
2.2. Stratégie analytique 101
2.3. Techniques analytiques mises en oeuvre 102
2.3.1. Microscopie infrarouge 102
2.1.2. Microfluorescence X et µXANES 102
3. Résultats et Discussion 103
3.1. Localisation des protéines 103
3.2. Étude de produits de référence 106
3.3. Étude des objets d'art par spectrométrie de masse ToF-SIMS 108
3.4. Étude des objets d'art par microfluorescence X et µXANES 111
4. Conclusions et Perspectives 114
Références bibliographiques 117

Chapitre III : Étude lipidomique de pathologies hépatiques : Stéatose non alcoolique, Adénome et Carcinome hépatocellulaires

1. Introduction ... 121
   1.1. Notions d'anatomie ... 121
   1.2. La stéatose hépatique non alcoolique ... 123
      1.2.1. Desciption de la pathologie et épidémiologie ... 123
      1.2.2. Facteurs de risque et syndrome métabolique ... 126
      1.2.3. Méthodes diagnostiques ... 129
      1.2.4. Thérapies ... 131
   1.3. L'adénome hépatocellulaire ... 132
   1.4. Le carcinome hépatocellulaire ... 133
   1.5. Problématique ... 135
2. Protocoles mis en œuvre ... 136
   2.1. Préparation des échantillons ... 136
   2.2. Examen histologique ... 137
   2.3. Analyse ToF-SIMS ... 137
3. Résultats ... 137
   3.1. Profil lipidique d'un foie contrôle ... 138
      3.1.1. Zone périportale ... 138
      3.1.2. Zone centro-lobulaire ... 142
   3.2. Profils lipidiques de foies pathologiques ... 145
      3.2.1. Foie stéatosique ... 145
         3.2.1.1. Zone périportale ... 146
         3.2.1.2. Zone centro-lobulaire ... 149
      3.2.2. Foie tumoral bénin : Adénome hépatocellulaire ... 156
      3.2.3. Foie tumoral malin : Carcinome hépatocellulaire ... 161
4. Discussion ... 164
   4.1. Comparaison du profil lipidique d'un foie stéatosique obtenu par imagerie ToF-SIMS et par extraction totale sur broyat ... 164

4.2. Comparaison du profil lipidique d'un foie stéatosique et d'un foie contrôle 165
4.3. Comparaison du profil lipidique d'un adénome et d'un foie contrôle ... 168
4.4. Comparaison du profil lipidique d'un carcinome et d'un foie contrôle . 169
4.5. Comparaison du profil lipidique d'un adénome et d'un carcinome 170
5. Conclusions et Perspectives..... 170
Références bibliographiques 172

Chapitre IV :
Analyse qualitative et quantitative des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* lors du processus de « *swarming* »..... 181
1. Introduction..... 181
1.1. Les biofilms 181
1.2. Le « *swarming* » de *Bacillus subtilis*..... 185
1.3. Les surfactines : structure et activités..... 186
1.4. Problématique..... 188
2. Protocoles expérimentaux 189
2.1. Colonies bactériennes 189
2.2. Protocole mis en œuvre pour les expériences d'imagerie ToF-SIMS 190
2.2.1. Préparation des échantillons 190
2.1.2. Analyse ToF-SIMS des motifs transférés..... 192
2.3. Protocole mis en œuvre pour l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF 192
2.3.1. Prélèvement des échantillons et extraction des surfactines 192
2.3.2. Synthèse et purification de l'étalon interne nécessaire à l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF 194
2.3.3. Choix de la matrice MALDI et du mode d'ionisation 194
2.3.4. Établissement de la droite d'étalonnage 196
2.3.5. Analyse quantitative des extraits de surfactines 196
2.4. Protocole mis en œuvre pour les expériences de spectrométrie de masse tandem 197
3. Résultats et Discussion 197
3.1. Analyse structurale des surfactines 197

3.2. Apport de l'imagerie ToF-SIMS 200
3.2.1. De l'utilisation réfléchie de l'« *electron floodgun* » 200
3.2.2. Étude de motifs de « *swarming* » de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* 206
3.2.3. Étude de motifs de « *swarming* » de la souche naturelle de *Bacillus subtilis* (3610) 215
3.2.4. Étude de motifs de « *swarming* » de diverses souches mutantes de *Bacillus subtilis* 219
3.2.4.1. Effets des mutations sur le processus d'essaimage ... 219
3.2.4.2. Imagerie ToF-SIMS de colonies de souches mutantes 220
3.3. Apport de l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF 224
4. Conclusions et Perspectives 226
Références bibliographiques 227

Chapitre V :

Miscellanées 233

I. Étude lipidomique de la régénération nerveuse de la sangsue médicinale 233
1. Introduction 233
2. Protocole expérimental 237
3. Résultats 238
4. Conclusion 240

II. Comparaison du contenu lipidique de cheveux anciens et modernes 241
1. Introduction 241
2. Protocole expérimental 245
3. Résultats 245
3.1. Analyse d'un cheveu moderne 245
3.2. Analyse de cheveux anciens 247

3.3. Comparaison du profil lipidique d'un cheveu moderne et d'un cheveu ancien 250

4. Conclusion 252

III. Faisabilité de l'imagerie ToF-SIMS d'une coupe de corps entier de souris 254

1. Introduction 254

2. Protocole expérimental 256

3. Résultats 257

4. Conclusion 261

Références bibliographiques 263

Conclusion générale 269

Liste des Figures 273

Liste des Tableaux 291

Annexes 295

Annexe 1: Delphine Debois, Alain Brunelle, Olivier Laprévote. Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain section using a fullerene and bismuth cluster ion beams. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**; 260, 115.

Annexe 2: Vincent Mazel, Pascale Richardin, Delphine Debois, David Touboul, Marine Cotte, Alain Brunelle, Philippe Walter and Olivier Laprévote. Identification of ritual blood in African artifacts using ToF-SIMS and synchrotron radiation microspectroscopies. *Anal. Chem*. **2007**; 79(24), 9253.

Annexe 3: Structures chimiques et principales fonctions biologiques des lipides chez l'homme

Annexe 4: Delphine Debois, Kassem Hamzé, Vincent Guérineau, Jean-Pierre Le Caër, I. Barry Holland, Philippe Lopez, Jamal Ouazzani, Simone J. Séror, Alain Brunelle and Olivier Laprévote. *In situ* localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry**.** *Proteomics*, **2008**; 8(18),3682.

Préambule

Le principe de toute technique d'imagerie moléculaire repose sur la collection à partir d'un échantillon de données localisées. La spectrométrie de masse ne fait pas exception à cette règle. Chaque technique possède ses avantages, celui de l'imagerie par spectrométrie de masse est sa capacité à fournir simultanément et sans *a priori*, des images de toutes les espèces détectées, des ions atomiques aux ions macromoléculaires. Ceci permet à l'utilisateur d'observer l'organisation moléculaire à la surface d'un échantillon et de corréler ces données avec des caractéristiques physiques, chimiques et biologiques de celui-ci.

L'imagerie par spectrométrie de masse est développée depuis dix ans et atteint maintenant une certaine maturité. Néanmoins, il est toujours possible d'apporter des progrès et c'est dans ce contexte que se situe ce travail de thèse dont l'objectif était de poursuivre le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS, débuté il y a cinq ans. Mon travail s'est focalisé sur la méthodologie et les applications de la technique afin d'en déterminer les capacités mais aussi les limites.

Après une introduction générale à caractère bibliographique, faisant notamment le point sur les techniques de spectrométrie de masse utilisées en imagerie, ce manuscrit est composé de cinq chapitres.

Le premier chapitre de ce manuscrit est dédié à des aspects fondamentaux, avec l'utilisation d'une source d'ions fullerènes comme faisceau d'ions primaires ou de pulvérisation. Nous avons évalué la capacité de cette source à être utilisée au cours d'expériences de profilage en profondeur sur de véritables échantillons biologiques, ouvrant la porte à l'imagerie 3D par spectrométrie de masse.

Les chapitres suivants sont consacrés à des applications de l'imagerie ToF-SIMS. Le premier de ces sujets concerne le domaine des sciences du patrimoine. L'analyse de coupes stratigraphiques de patines recouvrant des objets d'art africains représente une application des plus originales de l'imagerie moléculaire et fait l'objet du second chapitre de cette thèse.

Alors que l'imagerie MALDI-TOF a naturellement trouvé sa place dans la recherche médicale de biomarqueurs protéiques, la spectrométrie de masse ToF-SIMS qui est, quant à elle, particulièrement sensible à l'analyse de petites molécules comme les lipides, a été mise à profit lors de l'étude lipidomique de maladies hépatiques. La recherche à l'échelle cellulaire

de biomarqueurs de la stéatose non alcoolique notamment est détaillée dans le troisième chapitre.

Le quatrième chapitre est consacré à la localisation par imagerie ToF-SIMS et à l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF de lipopeptides cycliques sécrétés par la bactérie *Bacillus subtilis* lors d'une migration de surface appelée « *swarming* ».

Enfin, le cinquième chapitre de ce manuscrit regroupe trois autres applications qui n'ont pas connu le succès escompté ou qui restent à approfondir. Il s'agit d'abord de l'étude des lipides impliqués dans la régénération nerveuse de la sangsue médicinale, modèle d'étude du système nerveux des vertébrés. Le second sujet est la comparaison du contenu lipidique de cheveux anciens et modernes, dont l'objectif était d'aider à comprendre les mécanismes de dégradation de la matière organique. Enfin, le dernier sous-chapitre traitera de l'imagerie ToF-SIMS d'une coupe de corps entier de souris, ce qui représentait un défi du point de vue méthodologique.

Introduction générale

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant leur rapport masse-sur-charge, noté *m/z*, où m est la masse du composé et z sa charge.

La caractéristique fondamentale de la spectrométrie de masse est ici dévoilée : l'analyse en phase gazeuse d'entités chargées. Elles vont toutes deux fortement influencer les paramètres expérimentaux entourant une expérience de spectrométrie de masse. Pour étudier des espèces chargées, il faut au préalable former ces ions, puisque les molécules sont, dans leur grande majorité, neutres à l'état naturel. Cette étape d'ionisation est cruciale et le choix de la technique mise en œuvre pour sa réalisation dépend souvent des composés analysés. La spectrométrie de masse nécessite donc d'être capable de former ou de transférer des espèces chargées en phase gazeuse si possible en évitant de les détruire ou même de les détériorer.

L'objet analysé en spectrométrie de masse correspond par conséquent à un flux gazeux ionique généré à partir des molécules introduites dans le spectromètre. Il est à noter, comme conséquence de ce qui précède que la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse destructrice, l'échantillon ne pouvant (que très rarement) être recouvré après l'analyse.

Un spectromètre de masse peut être schématisé sous la forme d'un assemblage de trois modules, toujours présents quelque soit le type d'instrument considéré :

- ✓ Une source d'ions qui permet de créer des espèces chargées en phase gazeuse,
- ✓ Un analyseur (enceinte à très basse pression) dont le but est de séparer les ions selon leur rapport *m/z*,
- ✓ Un détecteur dont le but est de transformer le signal ionique en un signal électrique.

Un système informatique d'acquisition du signal vient compléter le spectromètre, en fournissant le résultat de l'analyse sous la forme d'un spectre de masse, c'est-à-dire une représentation graphique du type *intensité du signal = f(*m/z*).*

Limitée à la physique jusque dans les années 50, puis à la chimie organique jusqu'à la fin des années 70, la spectrométrie de masse s'est depuis ouverte aux domaines des sciences du vivant. L'essor que connaît actuellement la spectrométrie de masse est dû aux développements instrumentaux qui ont jalonné le 20ème siècle, repoussant toujours plus loin les limites de la technique. Les Figure 1 et Figure 2 résument les grandes avancées de l'histoire de la spectrométrie de masse au niveau des sources d'ionisation et des analyseurs de masse. Par ailleurs, il ne faut pas minimiser l'apport de l'informatique sans laquelle l'acquisition de spectres de masse (ou d'images !) mais aussi le retraitement des données seraient encore longs et fastidieux.

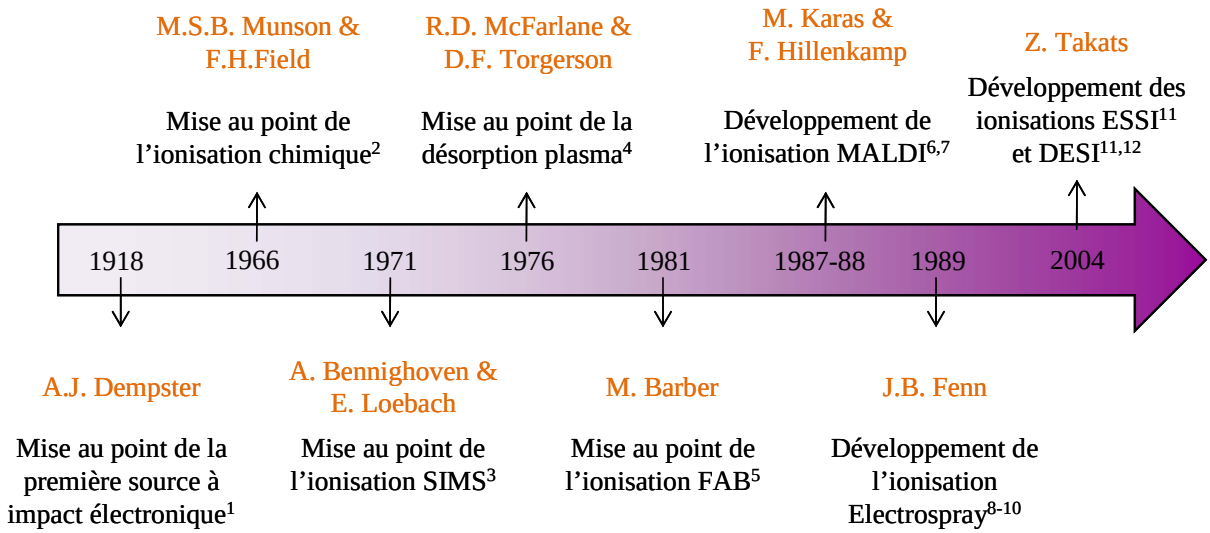


Figure 1: Historique du développement des méthodes d'ionisation depuis 1922.

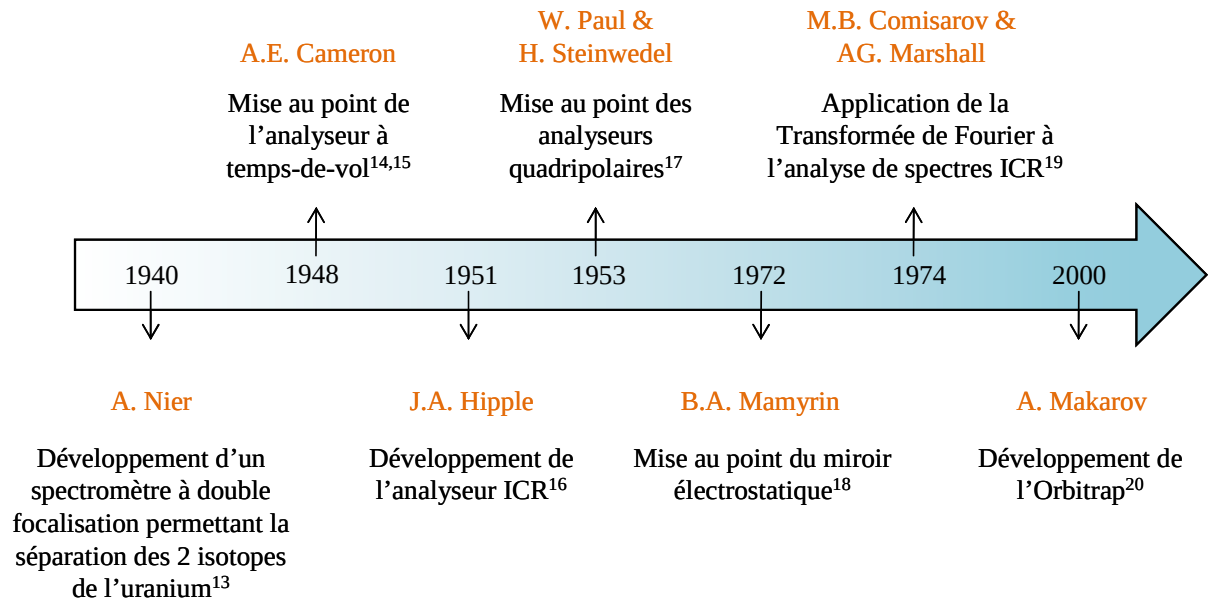


Figure 2: Historique du développement des analyseurs de masse depuis 1940.

La spectrométrie de masse est donc une science dynamique dont l'évolution est loin d'être achevée et qui couvre des domaines scientifiques aussi variés que la physique, la chimie, la biologie, la médecine, l'astronomie, l'étude d'œuvres d'art *etc.*… L'attribution du prix Nobel de chimie en 2002 à John Fenn et Koichi Tanaka pour le développement des méthodes d'ionisation électrospray et MALDI respectivement, a consacré cette science aux pouvoirs considérables aux yeux du grand public comme à l'échelle internationale.

La suite de cette introduction générale sera consacrée à la description des techniques d'ionisation et des analyseurs utilisés dans le cadre de cette thèse. La méthode employée pour le traitement des données SIMS sera détaillée avant de décrire l'état de l'art en imagerie par spectrométrie de masse.

I. Méthodes d'ionisation

La nécessité de volatiliser l'échantillon, par chauffage sous vide, avant de pouvoir l'ioniser a longtemps cantonné la spectrométrie de masse à l'étude de composés volatils (ou rendus volatilisables) excluant l'analyse de tous les composés de haut poids moléculaire ou thermolabiles. Les prémisses d'une révolution ont lieu au cours des années 70 avec le développement de la spectrométrie de masse par désorption plasma. Les étapes de transfert en phase gazeuse et d'ionisation de l'analyte ne sont plus dissociées mais simultanées. Les méthodes d'ionisation SIMS et MALDI, détaillées dans cette introduction, dérivent de la PDMS. L'ESI, abordée à la fin du paragraphe consacré aux méthodes d'ionisation, consiste en un phénomène couplé de désolvatation/ionisation des composés étudiés.

1. SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

1.1. Principe

La spectrométrie de masse d'ions secondaires est une technique utilisée pour l'analyse de la composition de surfaces solides ou de films fins en irradiant la surface de l'échantillon avec un faisceau d'ions *primaires* focalisé et en analysant les ions *secondaires* formés. La Figure 3 présente le principe de l'ionisation SIMS. Les ions primaires qui ont une énergie cinétique de quelques keV à quelques MeV pénètrent sur seulement quelques centaines d'Ångströms. Ils *endommagent* la matière sur toute cette profondeur, car ils se *ralentissent* par des successions de *collisions élastiques* avec des atomes de l'échantillon, lesquels sont *déplacés* et des molécules sont donc détruites. Les ions secondaires ne proviennent seulement que des premiers 50-100 Å.

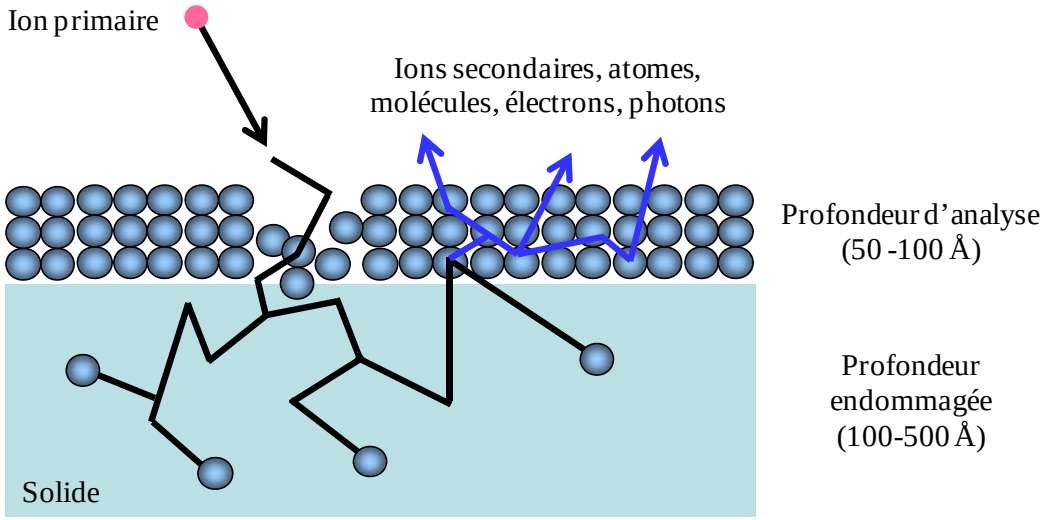


Figure 3: Schéma de principe de l'ionisation SIMS.

Si les développements les plus notables de l'ionisation SIMS ont eu lieu dans les années 70, le principe était en réalité connu depuis le début du siècle dernier, quand J.J. Thompson (considéré comme le « père » de la spectrométrie de masse) observa la libération d'ions positifs et d'atomes neutres induite par le bombardement ionique de la surface d'un solide. [22] Après le premier prototype construit en 1949 par Richard Herzog,[23] deux instruments ont été développés en parallèle, l'un aux USA sous l'égide de la NASA[24] et l'autre, en France, à l'Université d'Orsay.[25] Ces premiers instruments étaient équipés d'analyseurs à secteur magnétique et utilisaient des ions d'argon comme ions primaires. Des filtres de masse quadripolaires[26,27] ont ensuite été utilisés, permettant un profilage en profondeur de l'échantillon, puis des analyseurs de type temps-de-vol furent employés.[28] L'amélioration apportée au SIMS par les analyseurs par temps-de-vol (« TOF ») se situe au niveau de la gamme de masse théoriquement accessible. Les progrès les plus récents concernent les sources d'ions qui délivrent à présent des ions polyatomiques multichargés, permettant d'augmenter la sensibilité et la gamme de masse accessibles aux instruments ToF-SIMS, ainsi que l'électronique d'acquisition et de traitement du signal.

1.2. Définitions

Différents paramètres liés à l'ionisation SIMS vont à présent être définis. La connaissance de ces paramètres est essentielle, notamment lorsque l'on souhaite comparer deux types de sources, comme nous le verrons dans le chapitre I de ce manuscrit.

1.2.1. Rendement d'émission ionique secondaire

Comme nous l'avons vu, le SIMS est une technique basée sur la pulvérisation des molécules à la surface de l'échantillon. On appelle rendement de pulvérisation (Y_P) le rapport du nombre de particules émises sur le nombre d'ions primaires impactant la surface de l'échantillon :

$$Y_P = \frac{\text{Nombre de particules émises}}{\text{Nombre total d'ions primaires impactant l'échantillon}}$$

Néanmoins, toutes les particules émises ne sont pas des ions et il convient alors de distinguer le rendement d'émission ionique secondaire, correspondant au rapport du nombre d'ions secondaires (positifs ou négatifs) émis sur le nombre d'ions primaires arrivant à la surface de l'échantillon :

$$Y = \frac{\text{Nombre d'ions secondaires émis}}{\text{Nombre total d'ions primaires impactant l'échantillon}}$$

Par ailleurs, si ε est le facteur d'ionisation (nombte d'ions secondaires émis sur le nombre total de particules émises), Y peut être relié à Y_P tel que :

$$Y = Y_P \times \varepsilon$$

Quelle que soit la définition retenue, celle-ci reste théorique et en réalité, le rendement mesuré dépend également de l'efficacité de transmission et de détection du spectromètre :

$$Y_{mesuré} = Y \times (\text{Efficacité de transmission}) \times (\text{Efficacité de détection})$$

Le rendement d'émission ionique secondaire est dépendant du substrat analysé mais aussi du type de faisceau d'ions primaires utilisés, comme nous le verrons plus loin dans ce manuscrit.

1.2.2. Fluence ou Densité de dose d'ions primaires

La densité de dose d'ions primaires (« *Primary Ion Dose Density* », PIDD) ou, plus rigoureusement la fluence, est le nombre d'ions primaires qui atteignent l'échantillon au cours d'une analyse, par unité de surface.

Elle peut être définie comme suit :

$$\text{Fluence} = \frac{\text{Intensité du courant primaire x Durée d'analyse}}{\text{Charge élémentaire x Aire analysée}} = \frac{I \times t}{q \times A}$$

Il est capital de connaître ce paramètre puisqu'il est directement relié à l'endommagement de l'échantillon. C'est d'ailleurs par la fluence d'ions primaires que sont définis les deux régimes d'analyse existant en SIMS : le régime statique pour des valeurs de fluence inférieures à 10^{12}-10^{13} ions.cm^{-2} et le régime dynamique pour des valeurs supérieures à 10^{16} ions.cm^{-2}. La zone d'endommagement créée lors de l'impact d'agrégats lourds de haute énergie sur une surface d'or est de l'ordre de 100 nm^2.[29] Pour éviter le recouvrement des zones analysées par deux ions primaires différents, il faut que la probabilité pour que deux ions distincts atteignent le même endroit à la surface de l'échantillon soit négligeable. Ainsi, en limitant la fluence à 10^{12}-10^{13} ions.cm^{-2}, chaque ion primaire arrive sur une zone vierge de l'échantillon et l'endommagement reste très faible.[30] Le régime dynamique quant à lui, entraîne un endommagement important de l'échantillon, augmentant la fragmentation des molécules issues de l'échantillon. Le calcul de la fluence est donc indispensable pour l'acquisition de données dans des conditions optimales, c'est-à-dire avec la sensibilité la plus grande possible sans que des fragments puissent dégrader la qualité des spectres enregistrés.

Il est à noter que les limites données ci-dessus dépendent en fait beaucoup de la nature de la surface à analyser. Il est clair que le taux d'endommagement d'une surface métallique sera beaucoup plus faible que celui de polymères, de composés organiques ou de coupes de tissus biologiques. Cette variation du taux d'endommagement est directement reliée au paramètre suivant : la section efficace d'endommagement.

1.2.3. Section efficace d'endommagement

La section efficace d'endommagement, notée σ, peut être caractérisée comme la surface moyenne endommagée par un ion primaire et est définie par l'équation suivante :

$$N(t) = N(t_0) \cdot \exp(-\sigma I t / q A) = N(t_0) \cdot \exp(-\sigma \times \text{Fluence})$$

où $N(t)$ est le nombre d'ions (de rapport m/z donné) détectés au temps t, $N(t_0)$, le nombre d'ions détectés au temps 0, I l'intensité du courant d'ions primaires, t le temps, q la charge élémentaire et A la surface bombardée.

Comme nous l'avons vu, la section efficace d'endommagement est fortement dépendante de l'échantillon analysé mais aussi de l'ion étudié, ainsi que du projectile choisi.

1.2.4. Efficacité

L'efficacité d'ionisation secondaire représente le nombre d'ions secondaires d'une espèce donnée détectés par unité de surface endommagée. On la calcule comme le rapport du rendement d'émission ionique secondaire sur la section efficace d'endommagement :

$$E=\frac{Y}{\sigma}$$

Cette équation indique que plus le rendement d'émission ionique secondaire sera élevé ou plus la section efficace d'endommagement sera faible, et plus l'efficacité sera élevée. La Figure 4 montre l'influence de ces deux paramètres sur l'efficacité. En traçant le graphique de la fonction $\log(N(t)) = \log(N(t_0)) - \sigma \times \text{Fluence}$, nous obtenons une droite dont l'ordonnée à l'origine fournit le rendement d'émission ionique secondaire et dont la pente est égale à la section efficace d'endommagement et représente donc l'endommagement subi par l'échantillon. La figure 4a montre que si un échantillon présente un taux d'endommagement important (σ élevée) mais un rendement d'émission ionique secondaire (Y) élevé aussi, l'efficacité sera équivalente à celle d'un échantillon pour lequel σ et Y sont faibles. La Figure 4b montre qu'en augmentant Y plus vite que σ, l'efficacité et avec elle la sensibilité, s'en trouvent améliorées.

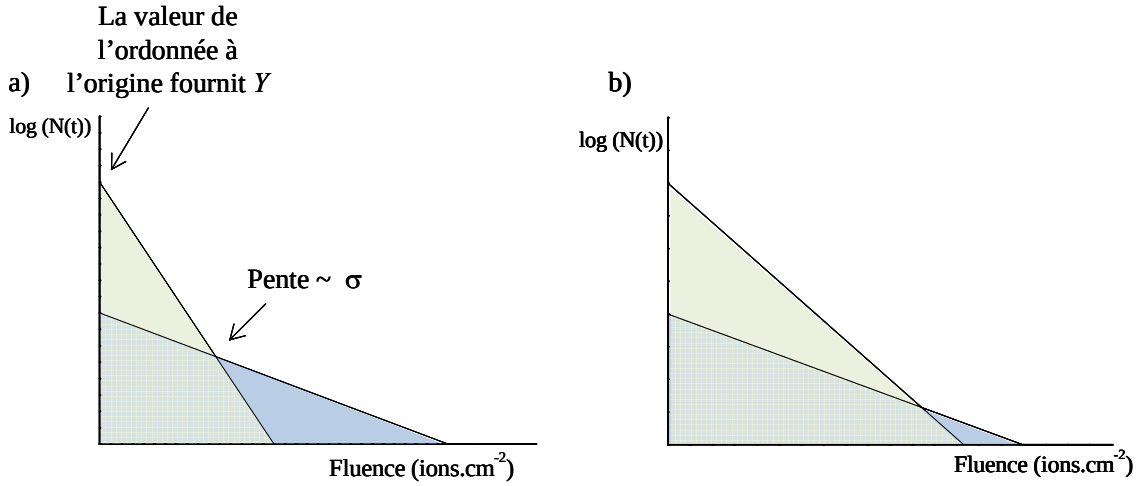


Figure 4: Influence du rendement d'ionisation secondaire et de la section efficace d'endommagement sur l'efficacité, d'après la référence 31.

Les mécanismes d'ionisation en SIMS sont complexes, notamment du fait que la désorption et l'ionisation sont simultanées et/ou conséquentes, et que la pulvérisation des premières monocouches de l'échantillon est également à prendre en compte. Néanmoins, les interactions ion/matière sont étudiées de longue date et certains points ont été clairement établis. De plus, les moyens informatiques actuels autorisent des simulations dynamiques des processus entrant en jeu.

Lorsqu'un ion atteint la surface d'un solide, il pénètre la matière jusqu'à une certaine profondeur, déposant son énergie tout au long de son parcours. La manière dont est déposée cette énergie dépend essentiellement de la vitesse de l'ion primaire. Dans la gamme d'énergie qui nous intéresse (de quelques keV à quelques dizaines de keV), l'énergie est déposée sous forme de collisions élastiques. La perte successive d'énergie par collisions va entraîner le ralentissement du projectile et finalement son arrêt dans le solide. Différents modèles de pulvérisation de la matière lors d'un bombardement ionique ont été proposés. Trois modèles sont particulièrement utilisés : le modèle de pointe thermique (« *thermal spike* »),[32] le modèle de recul direct (« *direct recoil* »)[33] et le modèle de cascade linéaire de collisions.[34]

Il est clair que l'intégralité des processus entrant en jeu n'est pas comprise, et que ces modèles restent souvent phénoménologiques, sont difficilement prédictifs et sont à l'heure actuelle toujours sujets à controverse.

1.3. Types de projectiles

Les projectiles utilisés comme ions primaires en spectrométrie de masse ToF-SIMS peuvent être de différents types : monoatomiques (Cs^+, Ga^+, O^-…) ou polyatomiques. Dans ce cas, trois sous-types peuvent encore être distingués : les agrégats faits de constituants « légers » (C_{60}^+, qui ne sont pas des agrégats à proprement parler), des agrégats faits de constituants « lourds » (Au_3^+, Bi_3^+) ou des agrégats exotiques, à très grand nombre de constituants (Au_{400}^+).

1.3.1. Projectiles monoatomiques

Les projectiles monoatomiques sont les ions primaires historiquement utilisés en spectrométrie de masse ToF-SIMS. Les ions Ga^+, In^+, Cs^+ ou O^- sont à classer dans cette

catégorie d'ions primaires pour lesquels la focalisation du faisceau est excellente, ce qui, dans le cadre d'une utilisation en imagerie, se traduirait par une résolution spatiale largement inférieure au micron. En revanche, l'efficacité de désorption et le rendement d'émission ionique secondaire sont faibles. De plus, l'endommagement causé par la pénétration de ces projectiles monoatomiques dans l'échantillon est très important. La conséquence est une efficacité de désorption et un rendement d'émission ionique secondaire au-delà de 100 à 200 Da très faible. Ces raisons font que ces sources sont de moins en moins utilisées pour l'analyse ToF-SIMS de composés organiques, et *a fortiori* en imagerie.

1.3.2. Projectiles polyatomiques

Afin d'augmenter la gamme de masse accessible et la sensibilité de la technique ToF-SIMS, de nouvelles sources d'ions primaires ont été conçues depuis près de 20 ans. L'idée est de déposer simultanément à la surface plusieurs ions primaires qui permettent de superposer plusieurs cascades de collisions conduisant à un effet de pointe thermique. Ces nouvelles sources sont toutes basées sur le principe suivant : le moyen le plus simple pour bombarder une petite surface par plusieurs atomes simultanément et de déposer une grande densité d'énergie près de la surface est d'utiliser des projectiles polyatomiques.

Dès les années 70, Andersen et ses collaborateurs ont démontré que lors de l'utilisation de projectiles polyatomiques en tant qu'ions primaires, l'augmentation du rendement de pulvérisation n'était pas linéaire, c'est-à-dire $Y_n > n\ Y_1$ où n est le nombre de constituants du projectile.[35,36] D'autres auteurs se sont intéressés à l'influence du nombre de constituants de l'agrégat sur le rendement d'émission ionique secondaire, et là encore, une augmentation non linéaire a été mise en évidence.[37,38,39] Le développement des nouvelles sources d'ions primaires polyatomiques a permis d'accéder à une gamme de masse plus large faisant de la spectrométrie de masse ToF-SIMS une analyse moléculaire et non plus uniquement atomique.

Une autre caractéristique des projectiles polyatomiques concerne la relation entre la profondeur à laquelle l'énergie est déposée et la profondeur d'émission des ions secondaires. Des mesures réalisées sur des empilements de Langmuir-Blodgett, ont montré que plus de 90% des ions secondaires sont émis depuis une profondeur d'environ 10 nm.[40] Un agrégat possédant plusieurs constituants présente une énergie par atome et une vitesse plus faibles qu'un projectile atomique ayant la même énergie totale. Par conséquent, cet agrégat dépose

une quantité de son énergie plus importante dans les premières couches du solide, juste en dessous de la surface où l'émission secondaire a lieu.

1.3.2.1. Agrégats à constituants « légers »

Dans cette catégorie sont classées les sources à impact électronique délivrant des ions fullerènes (C_{60}^{+} ou C_{60}^{++})[41] et les sources d'ions SF_5^{+} ou SF_6^{-}.[37,42,43,44] Lors de l'impact de ces ions à la surface de l'échantillon, le dépôt d'énergie dans les premières monocouches sera supérieur à celui d'un ion monoatomique, ce qui se traduit par une meilleure efficacité de désorption et d'ionisation des composés. Par ailleurs, un agrégat possède une énergie par constituant et une vitesse inférieures à un projectile monoatomique possédant la même énergie totale. De ce fait, la pénétration de ces ions primaires est faible et l'endommagement fortement amoindri en comparaison d'ions primaires monoatomiques. Néanmoins, la focalisation de ces faisceaux à des fins d'imagerie n'est pas encore optimale, conduisant à une résolution spatiale de plusieurs dizaines de microns dans le meilleur des cas. Les sources d'ions de fullerène sont toutefois utilisées pour des expériences de profilage en profondeur (*cf.* Chapitre I).

1.3.2.2. Agrégats à constituants « lourds »

Les agrégats composés de constituants « lourds » regroupent les agrégats d'or[39] et de bismuth[45,46] par exemple. Ils sont formés dans des sources à pointe liquide qui ont été initialement utilisées pour l'émission d'ions Ga^{+} ou In^{+}. Le principe d'une LMIS (« *Liquid Metal Ion Source* ») est détaillé à la Figure 5. Il s'agit du type de source dont notre spectromètre ToF-SIMS est équipé.

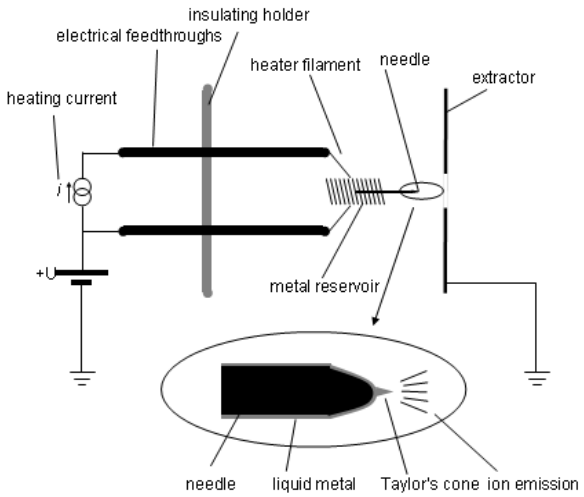


Figure 5: Schéma de principe de fonctionnement d'une source LMIS d'après la référence 47.

Le réservoir surmonté d'une pointe contenant un métal pur ou un alliage (permettant de diminuer la température de fusion) est chauffé. Le métal fond et mouille la pointe. L'application d'une haute tension sur un extracteur situé en face de la pointe va entraîner la formation d'un cône de Taylor et l'émission d'ions en phase gazeuse.

Ces sources bénéficient d'une très grande brillance (faible divergence et grande intensité) et il est possible de les focaliser jusqu'à 50 nm, ce qui en fait des outils parfaitement adaptés à l'imagerie. Néanmoins, dans le cône de Taylor formé en bout de pointe, toutes sortes d'agrégats sont présentes et une sélection en masse de l'ion primaire souhaité est nécessaire. Ceci peut être effectué avec un filtre de Wien ou des plaques de déflection, comme sur notre instrument (*cf.* paragraphe III.1).

Ces sources à pointe liquide représentent le compromis idéal entre d'une part une efficacité accrue (puisqu'il s'agit de projectiles polyatomiques) et d'autre part une excellente focalisation ainsi qu'un faible endommagement de l'échantillon (l'énergie est répartie sur un petit nombre d'atomes). Ces sources sont actuellement les plus utilisées pour les applications en imagerie ToF-SIMS. Au laboratoire, nous avons choisi de travailler avec une source délivrant des agrégats de bismuth. Par rapport à une source d'agrégats d'or, ce choix se justifie par un courant d'ions primaires supérieur, une durée d'acquisition réduite et la possibilité d'atteindre une focalisation du faisceau d'ions primaires de 400 nm, grâce aux ions doublements chargés.[46] La source d'agrégats de bismuth délivre des ions de type Bi_n^{q+}, n variant de 1 à 7 et q de 1 à 2. La Figure 6 montre des images enregistrées sur une coupe de cerveau de rat avec différents agrégats de bismuth. Le gain de contraste d'un facteur 5 à 8 pour les images obtenues avec les ions Bi_3^+ par rapport à celles acquises avec les ions Bi^+ est particulièrement saisissant.

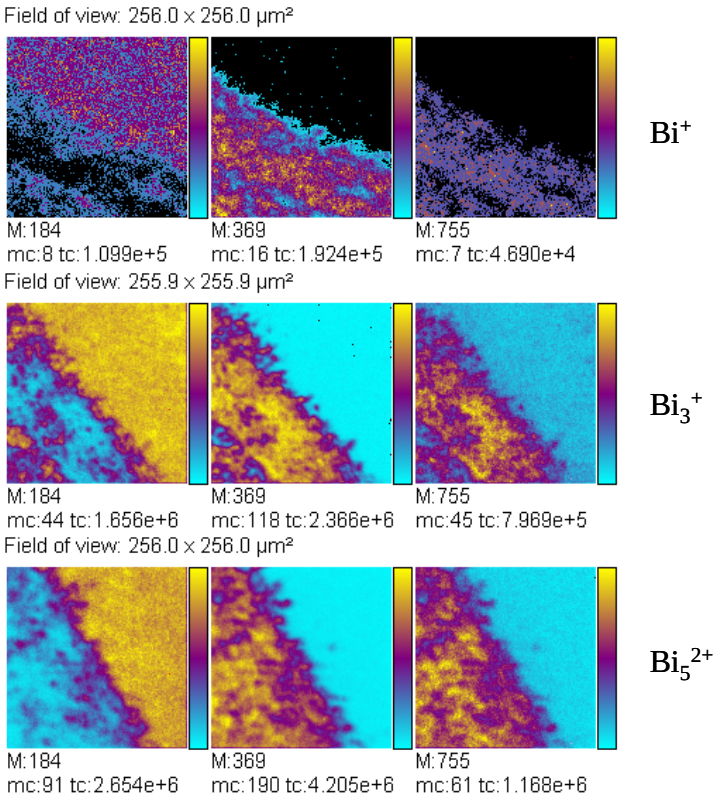


Figure 6: Images ToF-SIMS enregistrées en bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Images de 256 x 256 µm^2. (256 x 256 pixels, Fluence: 10^{12} ions.cm^{-2}), d'après la référence 46.

La durée d'acquisition de ces images était respectivement de 4, 10 et 100 minutes.[46] L'ion Bi_3^+ représente ainsi le meilleur compromis entre contraste et durée d'acquisition.

1.3.2.3. Agrégats « exotiques »

Une étude menée en 2004 par Tempez *et al.* a montré que les agrégats volumineux de type Au_{400}^{4+} possédant une énergie de 40 keV présentaient de nombreux avantages à être utilisés en tant que ions primaires en spectrométrie de masse ToF-SIMS.[48] Le rendement d'émission ionique secondaire est augmenté jusqu'à un facteur 1000 par rapport à un ion Au^+.[49] De plus, le signal rapport-sur-bruit est augmenté et la fragmentation diminuée par rapport aux agrégats de plus petite taille (Au_5^+ par exemple).[48] Néanmoins, ces sources sont difficiles à utiliser en « routine » en raison de leur relative instabilité et les difficultés à focaliser le faisceau dans des dimensions compatibles avec l'imagerie.

2. MALDI: Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation

La spectrométrie de masse MALDI est de nos jours utilisée en routine pour analyser des oligonucléotides, des protéines, des peptides ou encore des polymères. Néanmoins, cette méthode d'ionisation est également adaptée à l'analyse de « petites molécules » comme des pesticides, des médicaments ou des lipides. Cette polyvalence, alliée à une rapidité d'exécution et à une relative facilité de mise en œuvre font aujourd'hui du MALDI une technique incontournable en spectrométrie de masse.

2.1. Principe

L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (MALDI) a été décrite pour la première fois par Karas et Hillenkamp.[6,7] Son principe repose sur l'utilisation d'une matrice absorbant dans l'ultraviolet, co-cristallisée avec les analytes, et déposée sur une plaque métallique. L'ionisation/désorption est induite par un faisceau de photons issu d'un laser pulsé émettant dans l'ultraviolet (Figure 7).

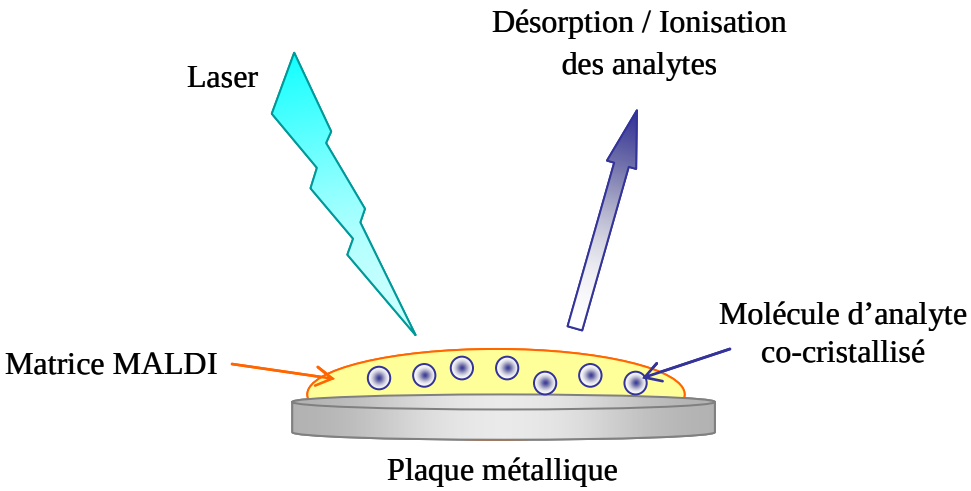


Figure 7: Schéma de principe de l'ionisation MALDI.

Le composé à analyser est simultanément transféré en phase gazeuse et ionisé. Les ions majoritairement formés en MALDI sont des ions monochargés, le plus souvent, en mode d'ionisation positif, il s'agit de molécules protonées ou cationisées et ce, quel que soit le poids moléculaire de l'analyte. Différentes hypothèses ont été formulées pour expliquer ce phénomène pourtant étonnant quand on considère le nombre de sites potentiels de protonation

d'une protéine. Une de ces hypothèses, émises par Knochenmuss *et al*. explique la provenance de ces ions par réaction ion/neutre dans le nuage formé par la désorption de l'échantillon.[50] Selon Karas et ses collaborateurs, les espèces multichargées seraient neutralisées en capturant les électrons issus de la photoionisation de la matrice.[51] Récemment, Zenobi *et al*. se sont rapprochés de cette hypothèse, en montrant cependant que les électrons pouvaient provenir non pas de la matrice photoionisée mais du support métallique de l'échantillon.[52]

2.2. Les matrices

La première matrice utilisée par Tanaka *et al*. était une poudre métallique en suspension dans le glycérol.[53] Dans le groupe de Franz Hillenkamp, le choix s'était porté sur une petite molécule possédant un caractère acide et absorbant fortement à la longueur d'onde du laser UV : l'acide nicotinique.[6] C'est finalement ce type de matrice organique qui est couramment utilisé à présent. Outre le fait d'absorber à la longueur d'onde du laser utilisé, une matrice MALDI doit répondre aux critères suivants :

- ✓ ne pas se sublimer sous vide,
- ✓ être capable de co-cristalliser avec l'analyte,
- ✓ être soluble dans le système de solvants utilisé pour solubiliser le composé à analyser.

Ces critères sont valables que l'on travaille en mode d'ionisation positif ou négatif. Dans ce cas, la matrice possèdera plutôt un caractère basique. Le Tableau 1 regroupe les caractéristiques des matrices les plus couramment utilisées en MALDI.

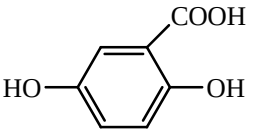
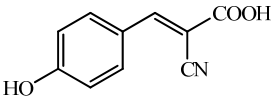
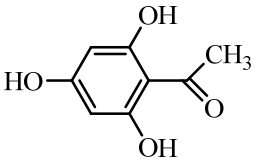
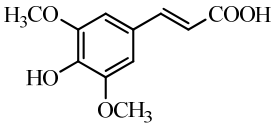
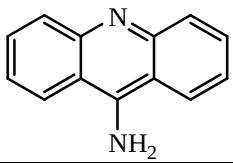
Abréviation	Nom	Structure	Applications	Réf.
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque		Peptides, protéines, lipides, glycoprotéines, oligosaccharides, petites molécules organiques	54
HCCA	Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique		Peptides, protéines, lipides	55
THAP	2,4,6-trihydroxyacétophénone		Oligonucléotides, peptides, oligosaccharides	56
SA	Acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique (Acide sinapinique)		Protéines, peptides, glycoprotéines	6
9AA	9-aminoacridine		Oligosaccharides, peptides, petites molécules organiques	57

Tableau 1: Matrices couramment utilisées pour l'analyse en MALDI.

D'autres types de matrices tendent à se développer, comme les liquides ioniques, introduits pour la première fois en 2001 par Armstrong *et al*.[58] Il s'agit en fait de faire réagir un acide et une base, afin d'obtenir un liquide ionique de formule générale [A^-, B^+]. Les avantages de ces matrices sont une homogénéité de dépôt accrue et par conséquent une meilleure reproductibilité tir à tir.

Une fois le choix de la matrice effectué, la dernière étape consiste à déposer le mélange analyte-matrice sur le support, qui est le plus souvent une plaque en acier inoxydable. Cette ultime manœuvre est capitale puisqu'elle va influencer la qualité de la co-cristallisation entre les deux partenaires et donc les interactions futures lors de l'impact du faisceau laser. Comme les matrices, les méthodes de dépôt de l'échantillon sont nombreuses.[59]

Les plus communément employées sont les suivantes :

- ✓ méthode de la « goutte séchée »[7] (« *dried droplet method* »). Elle consiste à mélanger l'échantillon à la matrice (en général en large excès) et à déposer le mélange sur la plaque. La co-cristallisation s'effectue par évaporation progressive du solvant.

- ✓ méthode de la « couche mince ».[60] Elle consiste à dissoudre la matrice dans un solvant volatile (acétone par exemple) et à la déposer sur la plaque. Une fois le dépôt sec, on obtient une fine couche de cristaux sur laquelle l'échantillon peut être déposé.

- ✓ méthode du « sandwich ».[55] Sur l'échantillon préparé par la méthode de la couche mince, est rajoutée une couche de matrice.

Enfin, certaines méthodes de dépôt sont spécifiques à l'échantillon analysé. C'est le cas lorsque l'on réalise une analyse *in situ* à la surface d'une coupe de tissu, en profilage ou en imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF. L'acquisition de spectres pour l'imagerie nécessite que le dépôt soit homogène, mais surtout que l'éventuelle délocalisation des composés à la surface de l'échantillon soit la plus minime possible. Pour cela, différentes méthodes, des plus artisanales (spray atmosphérique, électrospray, immersion de la coupe dans la solution de matrice)[61] aux plus sophistiquées (robot spotteur,[62] robot sprayeur[63,64,65]) sont développées depuis quelques années.

3. ESI : ElectroSpray Ionisation

3.1. Principe

L'ionisation Electrospray (en Français, électronébulisation) est la méthode d'ionisation, avec le MALDI, qui a fait de la spectrométrie de masse une des techniques analytiques de choix en biochimie, biologie structurale ou chimie organique. Elle a été mise au point par le groupe de John Fenn à la fin des années 80, sur la base de travaux plus anciens de M. Dole[66] et J. Zeleny.[10,67]

L'électrospray est une technique d'ionisation à pression atmosphérique qui permet de former des ions en phase gazeuse par des mécanismes de désolvatation peu énergétiques n'induisant quasiment pas de fragmentation. En cela elle diffère de l'ionisation MALDI où la désorption et l'ionisation sont simultanées et de l'ionisation SIMS où non seulement les

processus de transfert et d'ionisation sont concomitants mais où la fragmentation de l'analyte est fréquemment observée. Les étapes de formation des ions à partir de la solution en électrospray sont les suivantes :

- ✓ émission de gouttelettes chargées à l'extrémité du capillaire métallisé,
- ✓ évaporation du solvant et fission des gouttelettes par explosions coulombiennes successives,
- ✓ émission des ions en phase gazeuse à partir des gouttelettes.

Ces trois étapes sont représentées à la Figure 8 :

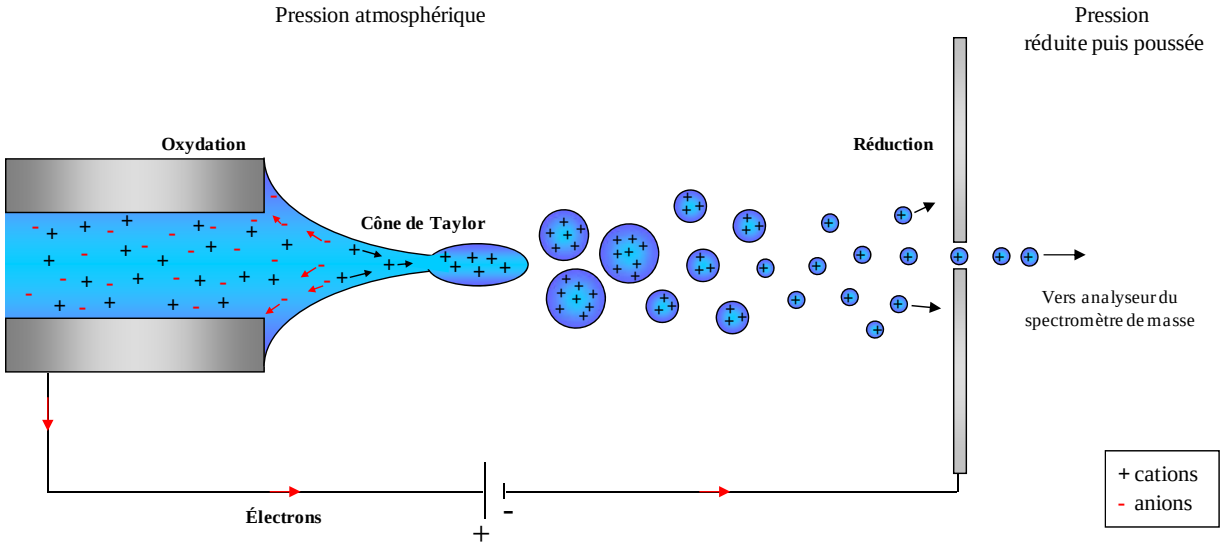


Figure 8: Schéma de principe de l'ionisation Electrospray, d'après la référence 68.

La dernière étape de formation des ions « nus » en phase gazeuse est sujette à controverse. Toutefois, deux théories se dégagent :

- ✓ la théorie des charges résiduelles proposée par Dole *et al.*[66] repose sur l'idée que les gouttelettes subissent des fissions successives jusqu'à ce que la dernière goutte ne contienne plus qu'un unique ion,
- ✓ la théorie de l'évaporation des ions avancée par Iribarne et Thompson[69] repose également sur une succession de fissions de type coulombiennes mais lorsque la goutte devient très petite (d'un diamètre de l'ordre de 10 nm) et la densité de charge très élevée ; le champ électrostatique à sa surface est assez fort pour expulser directement les ions en phase gazeuse.

Malgré ces divergences, un consensus semble avoir été trouvé dans le cas des macromolécules fortement chargées. Le modèle retenu est alors celui des charges résiduelles de Dole.[70,71,72]

3.2. Le nanospray

Les applications de l'électrospray sont nombreuses dans la biologie structurale et en protéomique. Or, il est rare de disposer d'une grande quantité d'échantillon lorsque l'on travaille sur des protéines. Des efforts de miniaturisation et d'augmentation de la sensibilité ont donc été consentis et la source nanospray a été mise au point par Wilm et Mann[73,74] dans le milieu des années 90. Cette technique consiste à introduire quelques microlitres de la solution à analyser dans une aiguille en verre recouverte d'un matériau conducteur. L'orifice de sortie de l'aiguille a un diamètre de l'ordre du micron. On applique ensuite une différence de potentiel d'environ 2 kV sur l'aiguille, ce qui crée un champ électrique intense entre celle-ci et la contre-électrode. Le processus de formation des ions est globalement le même que dans l'électrospray « classique ».

Le principal avantage de la technique nanospray est la faible quantité d'échantillon consommée (débit de l'ordre de 20 à 100 $nL.min^{-1}$). Sa tolérance aux sels est meilleure que celle de l'électrospray et sa sensibilité est supérieure d'un facteur 510, dans le cas étudié par Wilm et Mann,[74] par rapport à une source électrospray standard. L'inconvénient qui contrebalance ces avantages est la difficulté d'obtenir des spectres reproductibles, notamment parce qu'il est nécessaire d'« ouvrir » chaque aiguille mécaniquement (le plus souvent manuellement) avant l'analyse.

II. Analyseurs de masse

Après avoir formé des espèces chargées en phase gazeuse, le but est de les séparer selon leur rapport *m/z*. Pour cela, tous les types d'analyseurs utilisent les propriétés des particules chargées en mouvement en présence de champs électromagnétiques.

Les performances d'un analyseur peuvent être décrites en fonction de trois principaux facteurs :

- ✓ la gamme de masse accessible,
- ✓ la transmission, c'est-à-dire le nombre d'ions arrivant au détecteur par rapport au nombre d'ions formés dans la source,
- ✓ le pouvoir de résolution, c'est-à-dire la capacité de l'analyseur à séparer deux espèces de rapports *m/z* voisins.

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé presque exclusivement avec un analyseur par temps-de-vol, que la source soit une source SIMS ou MALDI. Ce type d'analyseur sera donc décrit en détail. J'ai également utilisé ponctuellement l'analyseur Orbitrap, couplé à une source nanospray. Une description succincte en sera faite dans la suite de ce paragraphe.

1. L'analyseur par temps-de-vol

1.1. Principe de fonctionnement

L'analyseur par temps-de-vol (« *Time-of-flight* », TOF) repose sur un principe relativement simple : la vitesse acquise par un ion accéléré à une énergie donnée dans un champ électrique est inversement proportionnelle à la racine carrée de son rapport *m/z*. De ce fait, des ions de même énergie cinétique mais de rapports *m/z* différents mettront un temps différent pour parcourir une même distance. La mesure précise de ce temps permet donc de remonter jusqu'au rapport *m/z* d'un ion donné.

Dans sa configuration la plus simple (Figure 9), l'analyseur par temps-de-vol est constitué de deux régions :

- ✓ une région d'une longueur x_{acc} très réduite, dite d'« accélération », où les ions sont soumis à un champ électrique uniforme E,
- ✓ une région « libre de champ » d'une longueur L variable (généralement 1 à 2 m) que les ions parcourent à vitesse constante.

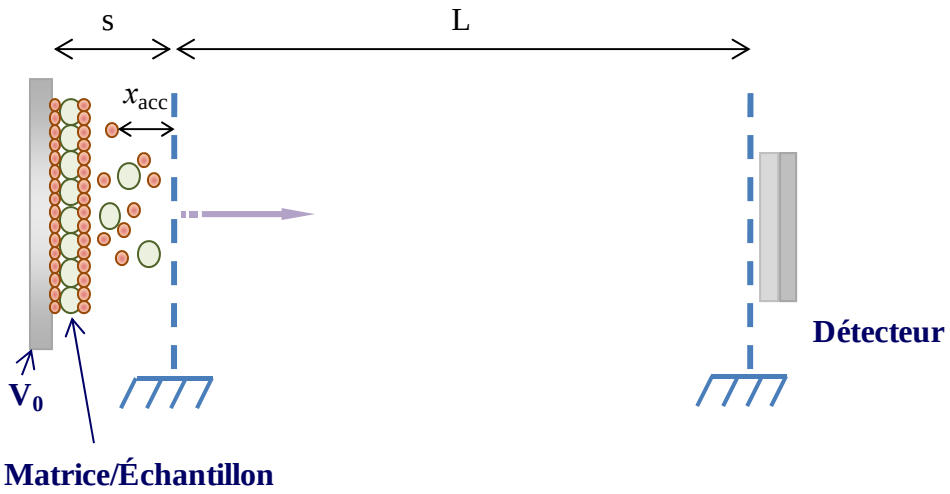


Figure 9: Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode linéaire.

Si la tension appliquée à la plaque est notée V_0, et que la distance de l'ion par rapport à la grille d'extraction (reliée à la masse) est notée x_{acc}, le champ électrique auquel est soumis cet ion s'écrit :

$$E=\frac{V_0}{x_{acc}}$$

La force découlant de ce champ électrique peut alors s'écrire :

$$F=zeV_0=m\frac{d^2x_{acc}}{dt^2}$$

On peut donc déduire des équations précédentes le temps d'accélération t_{acc} mis pour atteindre la grille d'extraction :

$$t_{acc}=2x_{acc}\sqrt{\frac{m}{2eV_0z}}$$

Dans le tube de vol, l'ion n'est plus soumis à aucun champ électrique, son énergie cinétique est celle qu'il a acquise dans la zone d'accélération et peut s'écrire :

$$E_C=\frac{1}{2}mv^2=zeV_0$$

d'où :

$$v=\sqrt{\frac{2zeV_0}{m}}$$

La longueur du tube de vol étant L, le temps mis par les ions pour le parcourir est :

$$t_L = \frac{L}{v} = L\sqrt{\frac{m}{2zeV_0}}$$

Le temps total mis par l'ion pour parcourir la distance comprise entre la zone d'accélération et le détecteur est donc :

$$t = (2x_{acc} + L)\sqrt{\frac{m}{2zeV_0}}$$

La mesure du temps-de-vol d'un ion permet donc bien de remonter à son rapport *m/z*.

La résolution en masse va être déterminée par la capacité du détecteur à distinguer deux impacts d'ions successifs. En mode linéaire, l'expression de la résolution en masse est déduite de la dérivée logarithmique de l'équation ci dessus :

$$t = (2x_{acc} + L)\sqrt{\frac{m}{2zeV_0}} = K\sqrt{m} \text{ et } \frac{dt}{t} = \frac{1}{2}\frac{dm}{m} \text{ d'où } R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Les limitations de la résolution en masse ne viennent pas toutes des performances du détecteur. Certains facteurs au cours de l'ionisation vont induire une distribution à différents niveaux :

- ✓ la durée de l'impulsion d'ionisation (les ions ne vont pas tous être émis au même instant),
- ✓ la distribution des ions dans l'espace (les ions ne vont pas tous ressentir la même accélération),
- ✓ la distribution en énergie cinétique initiale.

Ceci va entraîner un élargissement des pics observés sur le spectre de masse ainsi qu'une perte de linéarité entre le temps-de-vol et le rapport *m/z*, obligeant à étalonner les spectres grâce à au moins deux pics dont les rapports *m/z* sont connus.

Les deux premiers problèmes (distribution dans le temps et dans l'espace) peuvent être résolus en appliquant un retard à l'extraction. Quant à la distribution en énergie cinétique initiale, elle peut être corrigée par la présence d'un miroir électrostatique.

1.2. Deux progrès pour le TOF : le miroir électrostatique et l'extraction retardée

Le miroir électrostatique (ou reflectron) a été mis au point par le groupe de Mamyrin[18,19] dans les années 70. Il s'agit d'une série d'électrodes portées à des potentiels croissants formant un champ électrique uniforme qui va repousser les ions. La Figure 10 présente le principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode reflectron. Le principe n'est pas de modifier l'énergie cinétique des ions mais de refocaliser en temps le faisceau d'ions afin qu'ils atteignent le détecteur en même temps. Pour cela, un ion pénètrera d'autant plus profondément dans le miroir que son énergie cinétique est grande. Il parcourra un chemin plus grand. De ce fait, deux ions de même rapport *m/z* mais de vitesses initiales différentes seront réfléchis de façon différente de manière à arriver en même temps sur le détecteur. La résolution en masse est ainsi augmentée.

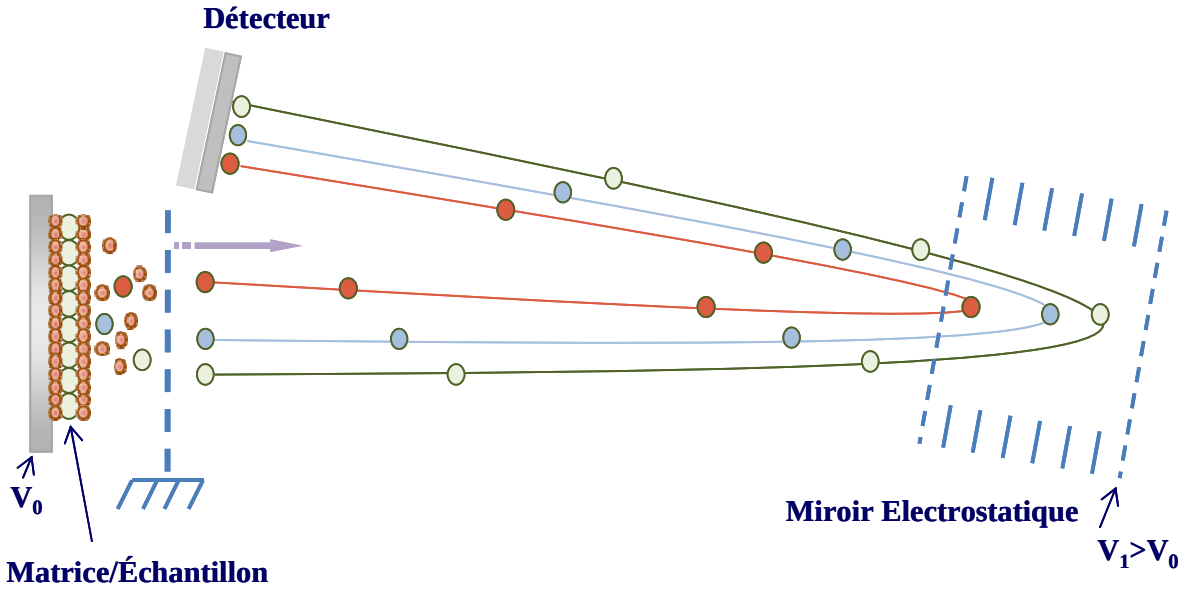


Figure 10: Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode reflectron. Les ions représentés ont le même rapport *m/z* mais des énergies cinétiques initiales différentes.

Il n'existe pas de limite en masse à l'utilisation du reflectron. Toutefois, son usage est généralement abandonné lors d'analyse de composés de haut poids moléculaire, car le spectre obtenu en mode linéaire est alors de meilleure qualité. De plus, s'il est vrai que ce dispositif améliore la résolution, il ne suffit pas toujours.

Un autre dispositif destiné à améliorer la résolution, concernant cette fois non plus l'analyseur mais la source d'ionisation a été développé quelques années après l'ionisation MALDI.[75,76] L'extraction retardée (« *Delayed Extraction* », DE), dont le principe est présenté à la Figure 11, a pour but de s'affranchir de la distribution en vitesse initiale.

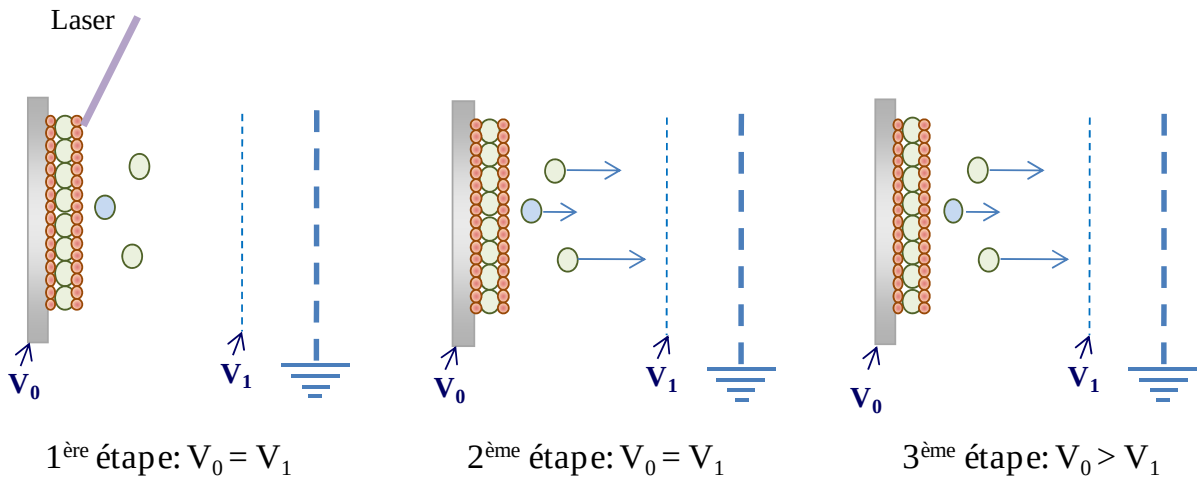


Figure 11: Principe de l'extraction retardée.

Dans les sources équipées de ce système, une grille supplémentaire est placée entre le support de l'échantillon et la grille d'extraction portée à la masse. Dans un premier temps, la plaque et la grille intermédiaire sont au même potentiel. Le tir laser est déclenché et les ions formés évoluent dans un espace libre de champ. Après un délai τ variant de 100 à 500 ns, la plaque est portée à un potentiel supérieur à celui de la grille. La différence de potentiel n'est cependant pas très élevée et les ions sont donc faiblement accélérés. Ils seront d'ailleurs d'autant plus faiblement accélérés qu'ils auront pénétré loin dans la région libre de champ. Ceci va déjà réduire la distribution en énergie cinétique initiale des ions. Enfin, la grille d'extraction étant maintenue à un potentiel nul, une fois que les ions ont passé la grille intermédiaire, l'accélération est beaucoup plus forte avant d'entrer dans le tube de vol.

Pour résumer, l'extraction retardée permet que les ions les moins rapides à leur formation soient fortement accélérés tandis que ceux qui étaient rapides le soient moins, ce qui entraîne un regroupement en temps et un rétrécissement de la distribution en énergie cinétique, afin que tous les ions parviennent au même instant au détecteur.

Ce dispositif, qui équipe de nos jours toutes les sources MALDI, permet d'augmenter la résolution en masse en facilitant le travail du reflectron, d'augmenter la précision de la mesure de masse tout en diminuant le bruit chimique, améliorant par conséquent la sensibilité.

1.3. Décomposition Post-Source (« *Post Source Decay* », PSD)

Parallèlement au développement de la source MALDI, une méthode de fragmentation des ions métastables nommée « *Post Source Decay* » (ou PSD), a été mise au point par l'équipe de Bernhard Spengler au début des années 90.[77] Le principe en est le suivant : les ions moléculaires intacts quittent la source en ayant acquis suffisamment d'énergie interne durant le processus de désorption (par photoactivation, collisions…) pour la libérer en subissant une fragmentation au cours de la traversée de la région libre de champ (Figure 12).

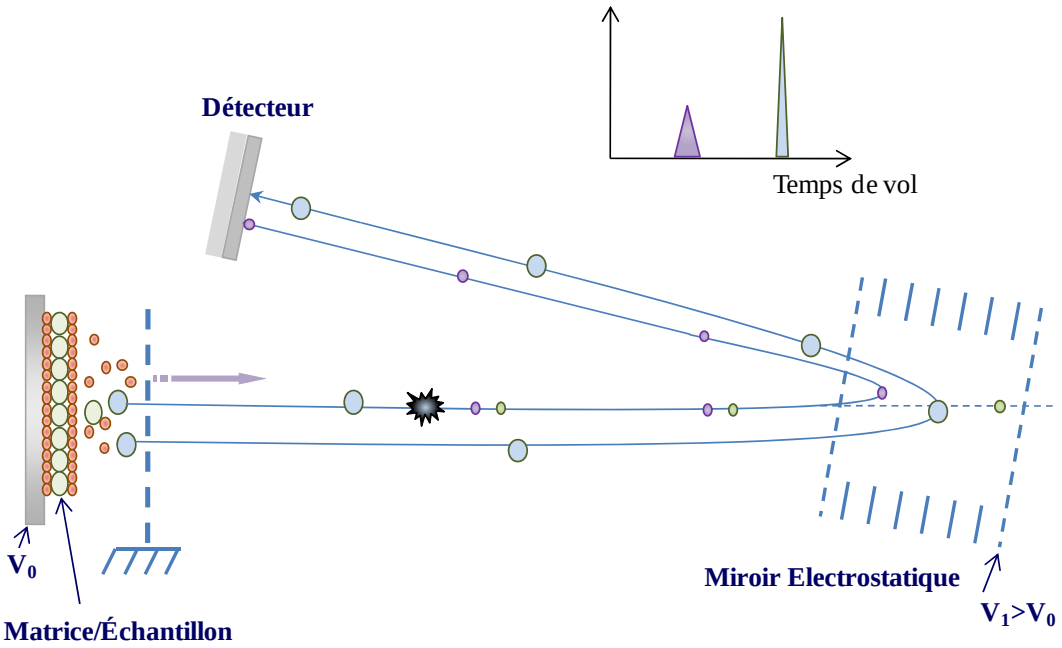


Figure 12: Principe de la fragmentation des ions métastables dans un analyseur par temps-de-vol équipé d'un reflectron. L'ion bleu représente l'ion précurseur. Les ions violets et verts représentent les ions issus de la fragmentation du précurseur.

L'étude des fragmentations d'ions métastables en spectrométrie de masse par temps de vol date véritablement des années 80 et était alors appliquée à la PDMS[78,79] et au SIMS.[80] La différence entre la technique utilisée en MALDI et en SIMS ou en PDMS vient du mode de sélection de l'ion précurseur. Pour la PDMS et le SIMS, la sélection se faisait par un système électronique de mesure des temps-de-vol par coïncidence, qui nécessite la détection simultanée des ions fragments et de l'ion précurseur en mode reflectron d'une part et des neutres en mode linéaire d'autre part. En MALDI, la sélection est assurée par une élimination physique des ions non désirés grâce à une porte électrostatique.

Après leur formation, les ions fragments évoluent à la même vitesse que les précurseurs mais leur énergie cinétique est inférieure du fait de leur masse plus faible. Ainsi, ils sont

réfléchis à une distance trop courte dans le reflectron et arrivent plus tôt qu'ils ne devraient sur le détecteur. Le reflectron agit alors comme un sélecteur d'énergie. Cependant, l'acquisition d'un spectre d'ions fragments ne peut être réalisée en une seule fois. En effet, le reflectron n'est capable d'analyser les ions avec une bonne résolution que sur une certaine gamme d'énergie. Dans la méthode mise au point par l'équipe de Della-Negra, la tension appliquée au reflectron était ajustée pour l'énergie du fragment, ce qui conférait une bonne résolution temporelle et par conséquent, une bonne résolution en masse au spectre obtenu.[79] Dans la méthode développée par Spengler *et al.* quelques années plus tard pour le MALDI, le potentiel appliqué au reflectron est progressivement diminué. Un spectre de fragment est enregistré pour chaque valeur de tension puis les acquisitions sont juxtaposées pour reconstruire le spectre de fragments complet.[77]

Cette méthode de fragmentation a été beaucoup utilisée pour le séquençage et l'identification de peptides[81,82] ou la localisation de modifications post-traductionnlles.[82] Plus récemment, une analyse basée sur la méthode développée par Della-Negra en 1985 a été adaptée à notre instrument ToF-SIMS. Cette méthode « *PSD-like* » a été appliquée à l'analyse structurale de composés présents à la surface d'une coupe de tissu.[83]

2. L'Orbitrap

L'Orbitrap est un analyseur de masse inventé par Alexander Makarov en 1999[84] dont le principe, le piègeage orbital, est connu depuis le début du siècle.[85] L'Orbitrap consiste en une électrode externe en forme de ballon de rugby et une électrode interne co-axiale en forme d'olive.

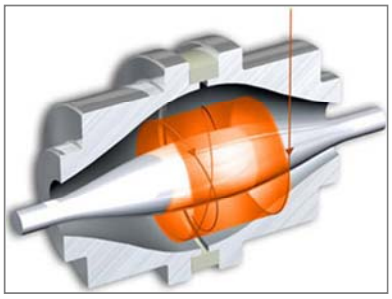


Figure 13: Schéma de principe de l'Orbitrap.

Les ions sont injectés dans le piège de façon tangentielle dans le champ électrique existant entre les électrodes et piégés parce que leur attraction électrostatique vers l'électrode

interne est contre-balancée par la force centrifuge. Ainsi, les ions ont des trajectoires circulaires autour de l'électrode centrale. De plus, les ions ont un mouvement de va et vient le long de celle-ci. Ainsi, un ion de rapport *m/z* donné décrit une trajectoire circulaire oscillante autour du fuseau central. La fréquence de ces harmoniques ne dépend pas de la vitesse de l'ion et est inversement proportionnelle à la racine carrée de son rapport masse-sur-charge. Ces mouvements induisent un courant qui est détecté et amplifié puis converti en spectre de masse grâce à un algorithme de transformée de Fourier. Les caractéristiques de l'Orbitrap sont une résolution en masse pouvant atteindre 150 000, une grande capacité de piégeage, une précision en masse comprise entre 2 ppm (en étalonnage interne) et 5 ppm (en étalonnage externe), une gamme de masse allant jusqu'à 6 000 et une gamme dynamique de 1 000.[86]

III. Description des instruments

1. Le ToF-SIMS IV

Le spectromètre ToF-SIMS IV, commercialisé par la société Ion Tof GmbH, est constitué d'une source d'ions primaires à pointe liquide, d'un analyseur par temps-de-vol équipé d'un miroir électrostatique et d'un détecteur hybride, comme indiqué à la Figure 14.

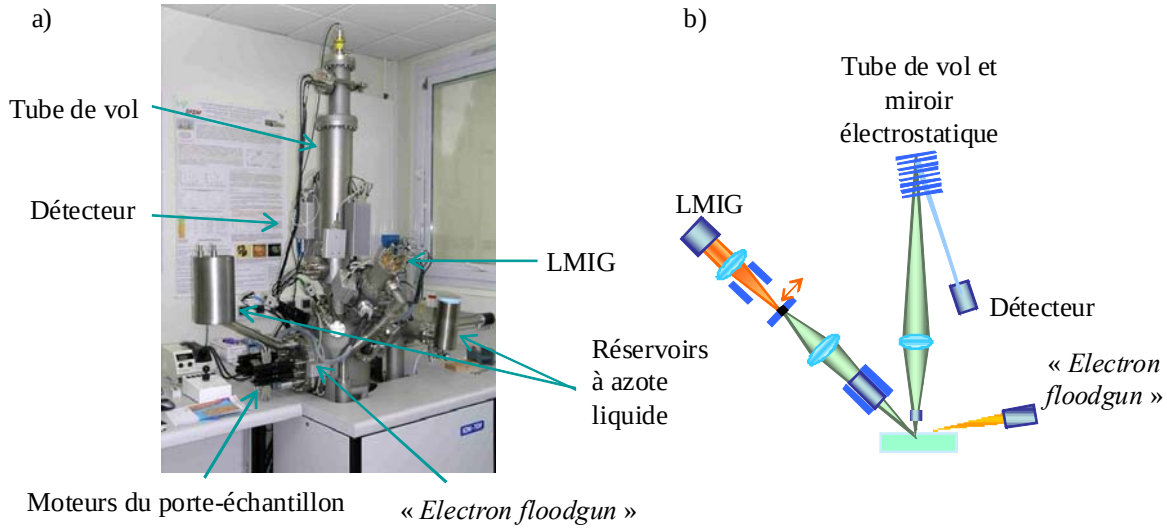


Figure 14: a) Photographie du ToF-SIMS IV présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN ; b) Schéma de principe du spectromètre ToF-SIMS IV.

L'émetteur de la source délivre des agrégats de bismuth de type Bi_n^{q+} (*cf.*paragraphe I.1.3.2.2). La sélection d'un unique type d'agrégat se fait grâce à des plaques de déflection qui « pulsent » le faisceau d'ions primaires (Figure 15).

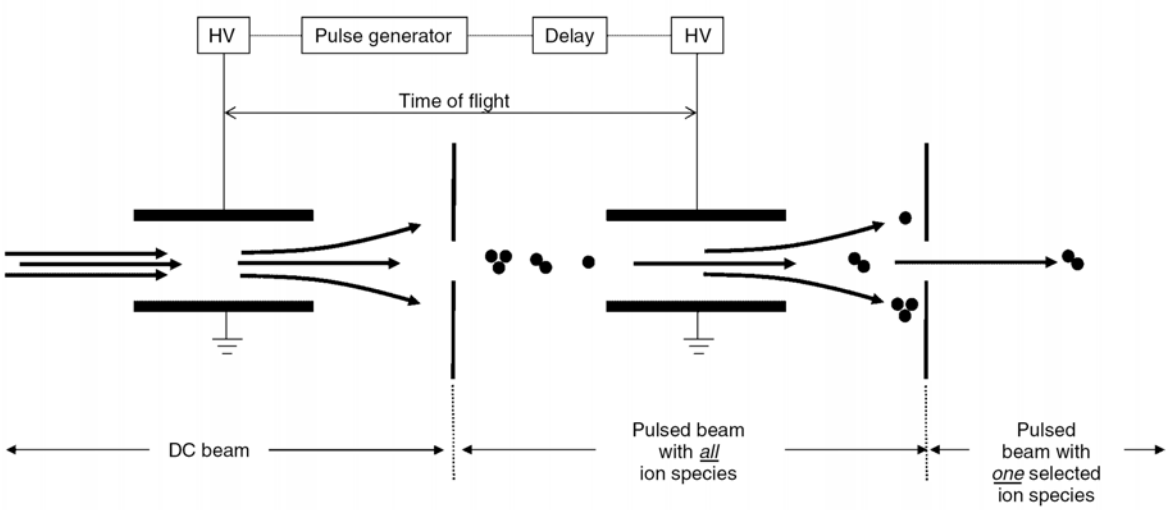


Figure 15: Principe de fonctionnement des plaques de déflection permettant la sélection de l'ion primaire dans la source du ToF-SIMS.[47]

Les plaques travaillent avec un délai contrôlé, ainsi, seuls les agrégats ayant la bonne vitesse peuvent traverser les plaques de déflection et continuer leur chemin vers l'échantillon. Pour assurer une bonne résolution en masse, la durée d'une impulsion d'ions primaires arrivant à la surface de l'échantillon doit être très courte, environ 1 ns ou moins. Malheureusement, ces impulsions très courtes mènent à des intensités de courant primaire très faibles et par conséquent une durée d'acquisition accrue. Néanmoins, ce mode de fonctionnement reste le plus adapté d'une part parce que, sans la seconde impulsion, la sélection en masse de l'ion primaire ne pourrait pas se faire et d'autre part parce l'analyseur TOF nécessite que les ions entrent dans le tube de vol par impulsions. De plus, la distribution en énergie des ions primaires, bien qu'étroite, provoque l'augmentation de la durée de l'impulsion pendant que les ions primaires volent des plaques de déflection vers l'échantillon. Par conséquent, le faisceau d'ions primaires doit être « ramené en paquet » (« *bunched* »), grâce à des champs électrostatiques variables de façon à obtenir des durées d'impulsion sur l'échantillon inférieur à 1 ns (sans cela, les durées de pulse peuvent atteindre plusieurs dizaines de ns). Pour un ion de rapport *m/z* et d'énergie donnés, la durée de la pulsation correspond directement à l'étendue spatiale de l'impulsion. Il est alors possible de raccourcir cette impulsion en temps en comprimant le paquet d'ions dans l'espace. Un dispositif de regroupement est constitué de deux plaques, chacune percée d'une ouverture dans l'axe du faisceau. Ces plaques sont séparées par une distance plus grande que l'étendue spatiale du

paquet d'ions. Tandis que le paquet d'ions vole entre les deux plaques, une tension est appliquée à la plaque arrière pour accélérer les ions. Les ions à l'arrière du paquet, c'est-à-dire ceux qui volent le plus lentement initialement, sont accélérés sur une plus grande distance que les ions à l'avant du paquet, qui volent donc initialement à une vitesse plus grande. Par conséquent, les ions à l'arrière du paquet acquièrent des vitesses légèrement supérieures à celles des ions à l'avant du paquet et ainsi, rattrapent ces derniers à une position en aval du « *buncher* ».

La source d'agrégats de bismuth possède deux modes de fonctionnements : le « *high current bunch mode* » et le « *burst alignment mode* » (Figure 16). Dans le premier mode de fonctionnement, la source délivre un courant pulsé en ions Bi_3^+ d'environ 0,50 pA pour une durée d'impulsion d'1 ns (courant mesuré sur une cage de Faraday incluse dans le porte-échantillon) et une fréquence de 10 kHz. La résolution spatiale est alors de l'ordre du micron pour une résolution en masse pouvant atteindre 10 000 pour des rapports *m/z* supérieurs à 500. Dans le second mode de fonctionnement, les ions ne sont pas « bunchés » et la durée de pulsation est d'environ 30 ns, ce qui permet d'atteindre une résolution spatiale d'environ 400 nm. Si ce chiffre paraît alléchant, la résolution en masse l'est beaucoup moins puisque l'on passe à une résolution unitaire. De plus, les valeurs des courants pulsés d'ions primaires chutent de manière importante, entraînant une augmentation de la durée d'acquisition. Néanmoins, il peut s'avérer fort intéressant de réaliser une première série d'images en mode « bunché » afin d'obtenir les informations moléculaires désirées, et de passer en mode « *burst alignment* » afin d'obtenir une seconde série d'images avec une résolution spatiale améliorée. Toutefois, au cours de mon travail de thèse, je n'ai travaillé qu'avec la source d'agrégats de bismuth fonctionnant en « *bunch mode* ».

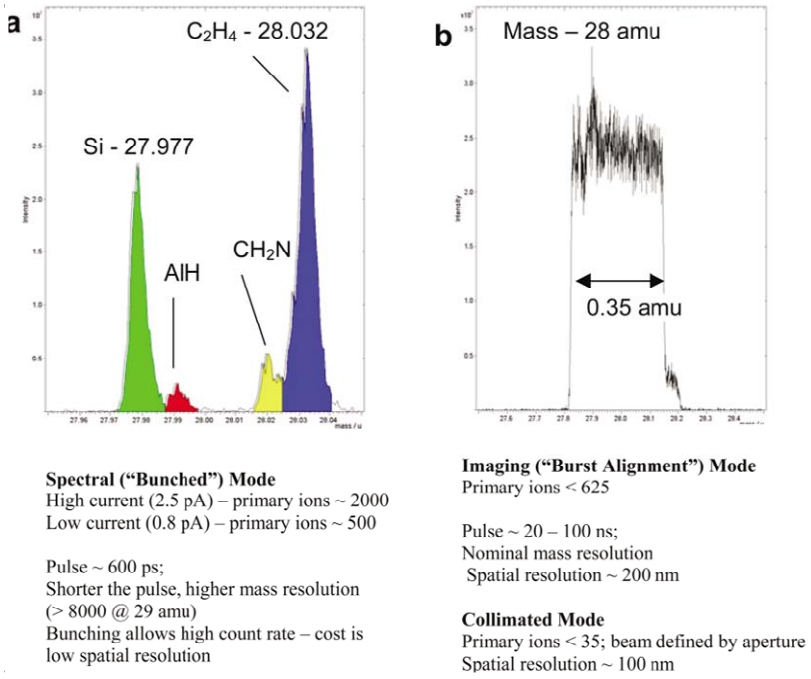


Figure 16: Modes de fonctionnement des sources d'agrégats équipant les instruments de type ToF-SIMS IV.[87]

Le canon à électrons (« *electron floodgun* ») est un dispositif qui est utilisé de façon pulsée, après chaque impact d'ions primaires et extraction des ions secondaires. Il délivre des électrons possédant une énergie de 18 eV qui vont balayer l'échantillon. Ces électrons servent à neutraliser les éventuelles charges résiduelles à la surface de l'échantillon. Néanmoins, le canon à électrons est utilisé en mode d'ionisation positif et négatif, lorsque l'échantillon est un isolant électrique.

L'analyseur de masse par temps-de-vol équipant le ToF-SIMS IV est décrit au paragraphe II.1.1, nous ne revenons donc pas sur sa description. La résolution en masse du ToF-SIMS IV est, comme nous l'avons déjà vu de l'ordre de 10 000 pour un rapport *m/z* 500. La précision en masse est de l'ordre de quelques ppm.[47]

Avant d'atteindre le détecteur, les ions, qui volent avec une énergie cinétique de 2 keV seulement, ont besoin d'être ré-accélérés à une énergie cinétique de 10 keV pour être détectés efficacement. Le détecteur du ToF-SIMS IV est de type hybride, composé en premier lieu d'une galette de micro-canaux puis d'un scintillateur et enfin d'un photomultiplicateur. Ce dispositif permet d'amplifier le signal d'un facteur 10^6 entre l'entrée du détecteur et sa sortie. Le dispositif est complété par un convertisseur temps-numérique précédé d'un discriminateur à fraction constante permettant d'obtenir une résolution en temps de 0,05 ns avec des temps

morts de 20 ns. Le traitement des données obtenues grâce à cet instrument se fait grâce aux logiciels IonSpec et IonImage.

2. Le Voyager DE-STR

Le spectromètre Voyager DE-STR, commercialisé par la société Applied Biosystems est un spectromètre de masse de type MALDI-TOF. Une photographie du spectromètre présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN est représentée à la Figure 17.

Le laser équipant la source MALDI de ce spectromètre de masse est un laser à azote, délivrant des photons de longueur d'onde 337 nm avec une fréquence maximale de 20 Hz. La source est également pourvue d'une grille d'extraction retardée, comme décrite au paragraphe II.1.2.

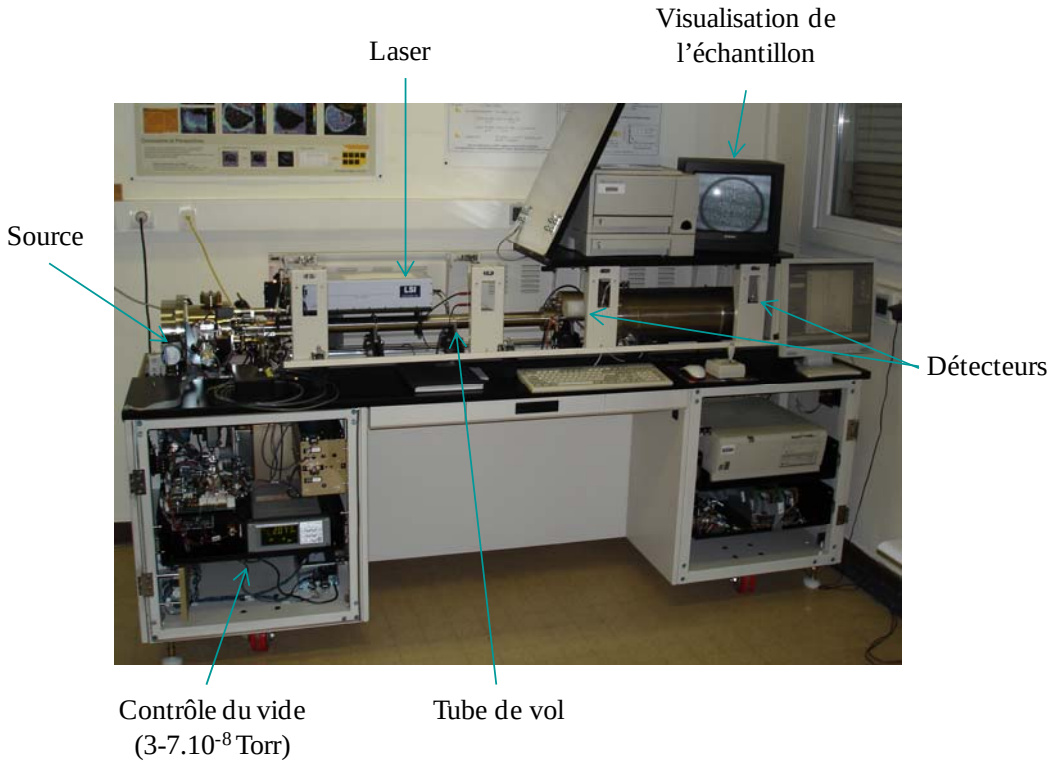


Figure 17: Photographie du spectromètre de masse Voyager DE-STR présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN.

L'analyseur de masse du Voyager DE-STR est un TOF équipé d'un miroir électrostatique. Un point important de ce spectromètre est la carte d'acquisition

(« Acquiris™ ») qui gère la totalité du traitement du signal. Cette carte électronique contient un convertisseur digital d'une fréquence de 2 GHz, qui numérise le signal analogique à la sortie du détecteur.

Le détecteur est composé de deux galettes de micro-canaux en chevrons. Le logiciel permettant de piloter l'instrument est Voyager Control Panel, celui permettant le traitement des données provenant de cet instrument est Data Explorer.

3. Le LTQ-Orbitrap

Le LTQ-Orbitrap est un spectromètre de masse hybride commercialisé par la société Thermo Fisher (Figure 18).

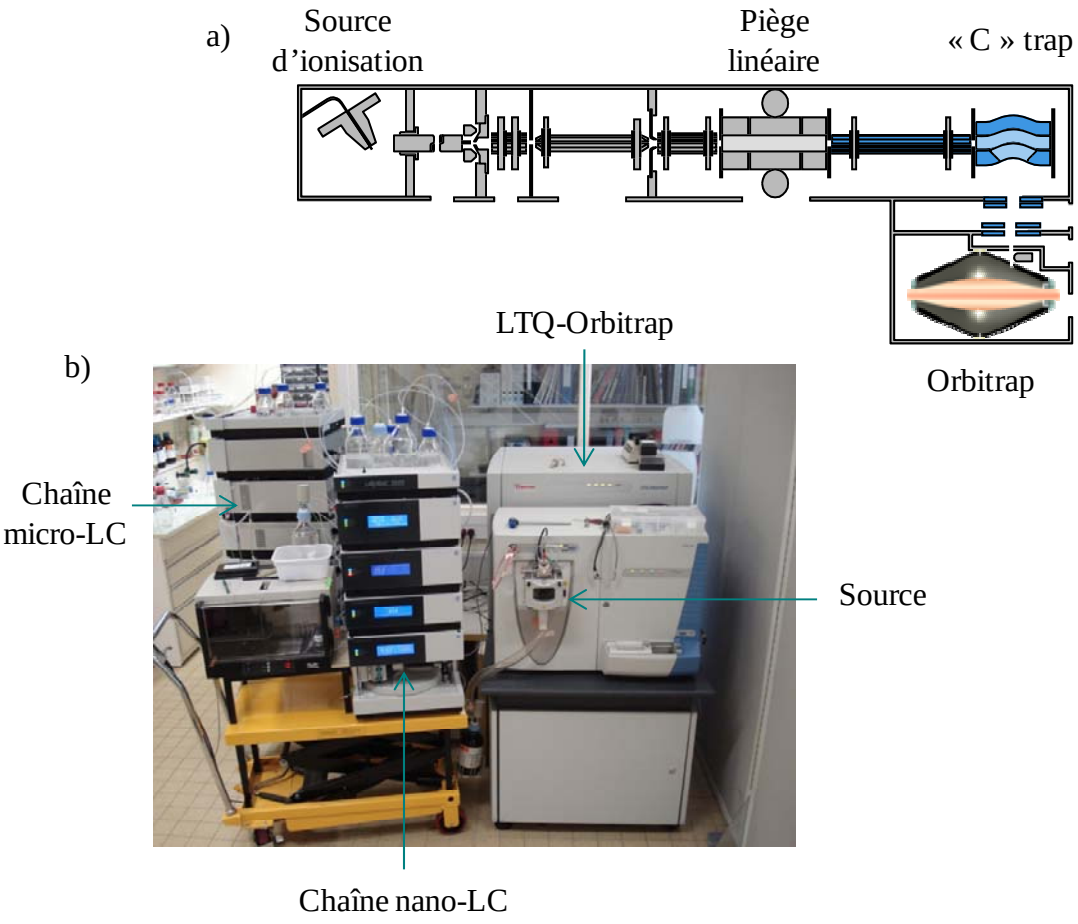


Figure 18: a) Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap ; b) Photographie de l'instrument présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN.

Les sources équipant cet instrument sont une source Electrospray et nanoelectrospray. Néanmoins, une source MALDI est également commercialisée. L'analyseur de masse est un Orbitrap, à classer parmi les pièges à ions, comme nous l'avons vu au paragraphe II.2. Les pièges à ions de ce spectromètre donnent accès à deux modes de fragmentation des ions : la dissociation induite par collision (« *Collision Induced Dissociation* », CID) et la dissociation par collision à plus haute énergie (« *Higher energy Collision Dissociation* », HCD).

Au laboratoire, notre LTQ-Orbitrap peut être couplé à deux types de chaînes chromatographiques, la première est une nano-LC dont la sortie peut être reliée à un robot spotteur pour plaque MALDI. La seconde chaîne chromatographique est une chaîne micro-LC. Toutes deux sont commercialisées par la société Dionex. Le logiciel d'acquisition et de retraitement des données est XCalibur.

IV. Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse

L'imagerie par spectrométrie de masse consiste à construire une cartographie des composés présents à la surface d'un échantillon. Deux approches peuvent être utilisées. La première consiste à diviser la surface à analyser en pixels. Un spectre de masse est enregistré par pixel ce qui fournit, pour un ion donné, son intensité en fonction des coordonnées du pixel. Un nouveau pixel est analysé et les données le concernant sont stockées. Ce processus est répété jusqu'à ce que la totalité de la surface de l'échantillon ait été analysée. Après traitement informatique, un spectre global est obtenu, et l'utilisateur peut reconstruire l'image de n'importe quel ion dont le signal est présent sur le spectre. Cette approche est appelée « microsonde » et est utilisée dans différentes techniques comme le ToF-SIMS, le Nano-Sims ou le MALDI-TOF. Dans ce cas, la résolution spatiale est dominée par la focalisation du faisceau. Une autre approche, appelée « microscope » utilise des éléments d'optique ionique pour projeter l'origine spatiale des ions générés à la surface de l'échantillon sur un détecteur sensible en position. Ici, la taille du faisceau d'ionisation importe peu sur la résolution spatiale qui est influencée par la qualité de l'optique ionique et la résolution du détecteur notamment. De ce fait, la meilleure résolution spatiale pouvant être atteinte est environ 4 µm. La Figure 19 présente le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS et MALDI-TOF.

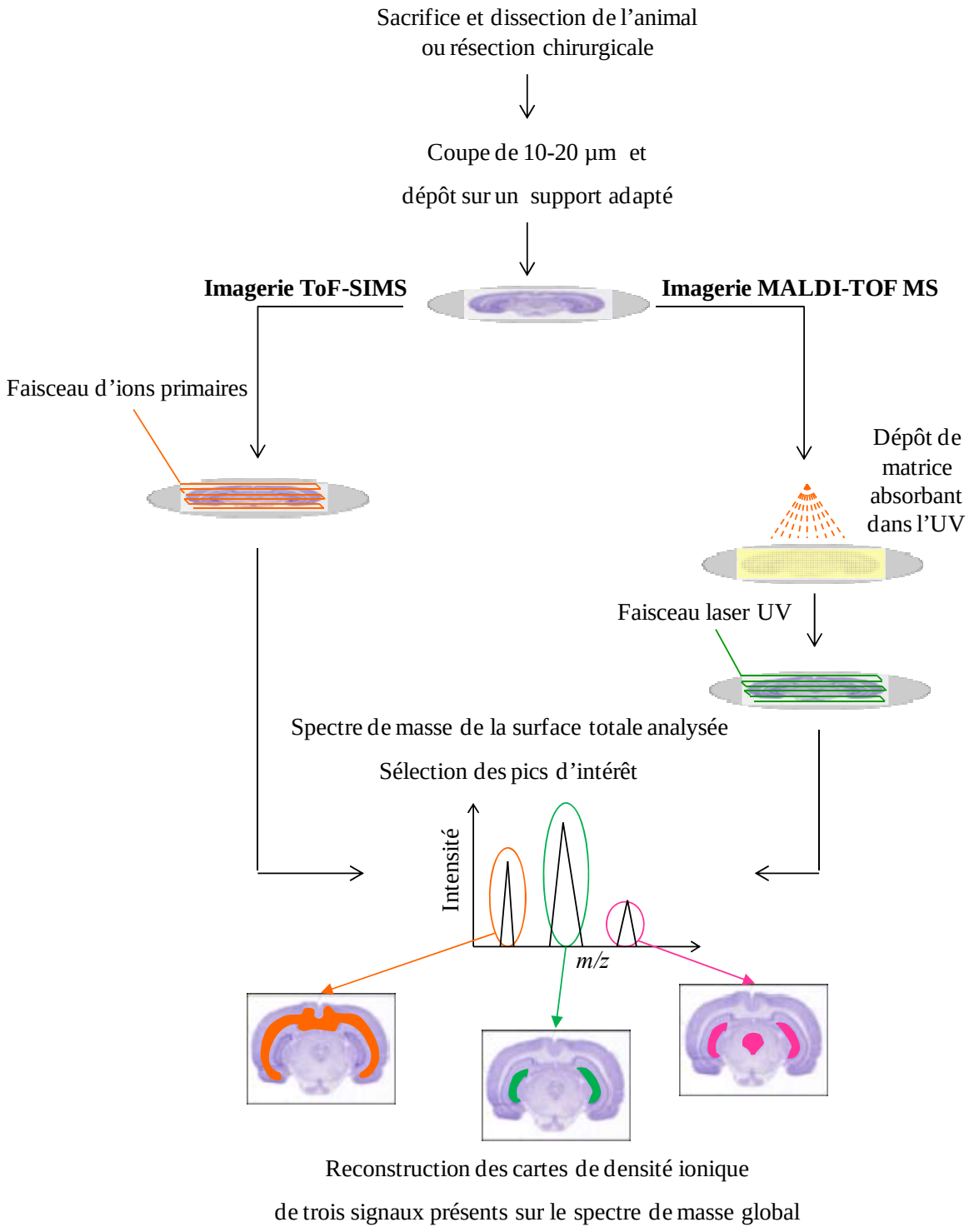


Figure 19: Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS et MALDI-TOF. L'échantillon choisi en exemple est un cerveau de souris.

V. Obtention d'images ToF-SIMS

Les paramètres expérimentaux liés à l'acquisition d'une image ToF-SIMS sont, pour certains, fixés par l'échantillon lui-même. C'est le cas pour le mode de déplacement de l'échantillon qui dépend directement de sa taille. Deux modes de déplacement sont disponibles sur le ToF-SIMS IV. Si l'échantillon est plus petit que 500 x 500 μm^2, le mode de déplacement sera « *Beam scan* ». Dans ce mode de fonctionnement, le porte-échantillon est immobile et le faisceau d'ions primaires balaie la surface de l'échantillon pixel par pixel. Pour des images dont la taille dépasse cette limite, c'est l'échantillon qui sera déplacé au fur et à mesure de l'analyse (mode « *Stage scan* ») et un spectre de masse sera enregistré par pixel.

Un autre paramètre dépend de l'aire analysée, il s'agit de la fluence d'ions primaires. Comme nous l'avons vu, il est essentiel de connaître ce paramètre afin de rester dans les limites du SIMS statique et ne pas endommager de façon déraisonnable l'échantillon. Cette fluence est calculée grâce à un petit logiciel appelé « *IT Calculator* » à qui l'utilisateur fournit la taille de l'image, le courant d'ions pulsé ainsi que le nombre de pixels dont sera composée l'image. Il est possible de modifier le nombre de scans (passages sur chaque pixel) afin d'atteindre la fluence désirée.

Enfin, un dernier paramètre, indépendant de la taille de l'échantillon celui-ci est le mode d'acquisition des données au cours de l'analyse. En mode « *stage scan* », un seul mode est utilisable, il s'agit du mode « *sawtooth* ». Dans ce mode, les données sont acquises ligne par ligne. En mode « *beam scan* », en plus du mode « *sawtooth* » également disponible, l'utilisateur a accès au mode « *random* », pour lequel les pixels analysés sont pris au hasard, jusqu'à ce que tous les pixels soient analysés.

VI. Traitement des données ToF-SIMS

L'acquisition d'une image en spectrométrie de masse ToF-SIMS débute toujours par l'enregistrement d'un spectre correspondant à quelques secondes d'accumulation du signal. Peu importe que ce spectre soit représentatif de la totalité de l'échantillon, car il ne sert qu'à sélectionner quelques pics d'intérêt afin de créer une « *peak list* ». Le logiciel Ion Image va afficher, durant l'acquisition, les cartes de densité ionique des pics sélectionnés. Le grand avantage du mode d'acquisition des données sur le ToF-SIMS est que toutes les données sont contenues dans le fichier brut, et il est possible de recalculer l'image correspondant à

n'importe quel signal, après l'acquisition. Il n'est par conséquent pas nécessaire d'être exhaustif lors de la sélection des composés à imager au moment de l'acquisition.

1. L'étalonnage des spectres

L'énergie cinétique initiale des ions secondaires est très faible[88] et permet de conserver une relation linéaire entre le temps de vol des ions et la racine carrée du rapport *m/z* sur toute la gamme de masse. Ainsi, un étalonnage interne des spectres est possible, en utilisant les signaux de fragments de faible rapport *m/z* tels que H^+, H_2^+, H_3^+, C^+, CH^+, CH_2^+ et CH_3^+ en mode d'ionisation positif. En mode d'ionisation négatif, les fragments choisis sont C^-, CH^-, CH_2^-, C_2^-. Un affinement de l'étalonnage est apporté par l'incorporation des signaux des ions carboxylate des acides gras, de la molécule déprotonée de la vitamine E en mode d'ionisation négatif et par l'ajout des signaux d'un fragment du cholestérol ($C_{27}H_{45}$, *m/z* 369,35) ainsi que des signaux de diacylglycérols en mode d'ionisation positif.

2. Reconnaissance des pics

Le spectromètre ToF-SIMS du laboratoire n'est pas équipé d'un dispositif permettant de réaliser des expériences de spectrométrie de masse tandem. De ce fait, l'identification des composés responsables des signaux observés sur les spectres de masse et l'attribution d'une structure correspondante sont faites en tenant compte de la résolution en masse de l'instrument, de sa précision en masse, de la règle de l'azote et de la pertinence biologique de l'attribution proposée. Certaines identifications sont également renforcées par ce qui est décrit dans la littérature.[89,90,91,92,93,94,95,96]

3. Apport de l'analyse de molécules de référence

En plus des critères énoncés plus haut pour l'identification d'un composé, nous avons analysé une variété de composés de référence de lipides (cholestérol, vitamine E, phospholipides, triglycérides…) afin de constituer une base de données des composés les plus souvent rencontrés sur une coupe de tissu en imagerie ToF-SIMS. L'ionisation SIMS n'est

pas une méthode d'ionisation douce, et conduit de ce fait à de nombreux ions fragments, parfois même le signal de la molécule intacte est difficilement observable au profit de ses fragments. La détection d'ions fragments caractéristiques d'une molécule ou d'une famille de composés peut suffire à conclure à sa présence. Sans une étude de molécules de référence commercialement disponibles, certaines informations seraient perdues puisque les ions fragments obtenus en SIMS ne sont pas toujours retrouvés lors d'analyse avec d'autres techniques de spectrométrie de masse.

4. Sélection des pics d'intérêt

Comme nous l'avons vu au début de ce paragraphe, la sélection des pics d'intérêt se fait le plus souvent après l'acquisition des données brutes. Deux cas peuvent se présenter lors de la sélection des pics d'intérêt :

- ✓ la ou les molécules d'intérêt sont connues. La sélection ne concernera que ces molécules. Pour exemple, l'étude sur les surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* (Chapitre IV) est à classer parmi ce type d'analyse où un seul type de molécules nous intéressait dans un premier temps ;

- ✓ aucune cible n'est définie et tout composé présent à la surface de la coupe est potentiellement intéressant. Dans ce cas, n'importe quel pic présentant un rapport signal-sur-bruit suffisant est sélectionné et l'image correspondante reconstruite. Ce type d'étude est illustré par le chapitre III de ce manuscrit où le but était d'obtenir une vue globale des modifications lipidiques survenant dans un foie atteint de stéatose non alcoolique.

5. Comment lire une image ?

Lorsqu'une image ionique est générée par le logiciel, différentes informations sont associées au simple « dessin » de la répartition de l'ion. La Figure 20 donne les significations des différents renseignements accompagnant une image ionique en ToF-SIMS.

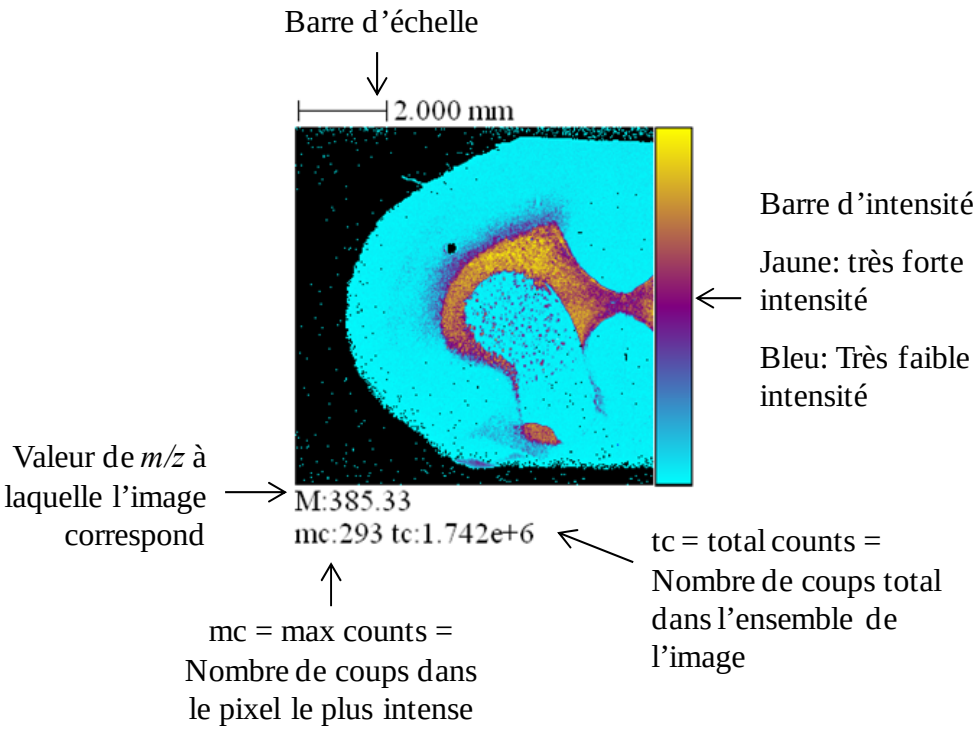


Figure 20: Signification des informations fournies avec une image ionique.

L'amplitude de la barre d'intensité correspond à la valeur *mc* indiquée au bas de l'image. Le paramètre « M : » peut être modifié pour ne plus laisser apparaître le rapport *m/z* mais directement le nom du composé dont l'image ionique est représentée. Ce sera presque systématiquement le cas dans la suite de ce manuscrit.

6. Compression des images

Avant l'acquisition d'images ToF-SIMS, l'utilisateur détermine le nombre de pixels dont sera composée l'image. Le nombre de pixels peut être de 128 x 128, 256 x 256, 512 x 512 etc… Il peut être parfois utile d'acquérir les images avec un nombre relativement faible de pixels, notamment pour des raisons de durée d'acquisition. Au cours de mon travail de thèse, j'ai essentiellement enregistré des images possédant 65536 pixels, soit 256 x 256. Ce choix se justifie par le fait que lorsque des images de faible taille sont enregistrées (500 x 500 μm^2) la taille de pixel est alors d'environ 2 x 2 μm^2, ce qui est nécessaire et suffisant pour la plupart des applications. Néanmoins et même si j'ai eu peu recours à cette procédure, il est possible de comprimer les images enregistrées avec un grand nombre de pixels à une taille de 128 x 128 pixels, ce qui améliore le contraste de l'image. De façon concrète, le logiciel effectue la somme des coups contenus dans les 4 pixels adjacents. La

résolution spatiale de l'image s'en trouve diminuée mais son contraste peut être amélioré, surtout dans le cas de faibles intensités, c'est-à-dire quand la valeur du nombre *mc* n'est que de quelques coups.

Il s'agit en fait d'un compromis entre durée d'acquisition et définition de l'image d'une part et contraste et facilité d'interprétation d'autre part.

7. Lissage des images

Le lissage des images se déroule en deux étapes. La première consiste à « filtrer » l'image. Pour une image ionique donnée, le logiciel de traitement va calculer une nouvelle valeur de pixel en utilisant les valeurs du pixel original et des huit pixels l'entourant. L'application de facteurs décrits dans une matrice de convolution (inaccessible à l'utilisateur) fournit la nouvelle valeur filtrée du pixel. La seconde étape du lissage consiste à établir une nouvelle échelle d'intensité de l'image sélectionnée. Le logiciel calcule la moyenne d'intensité du pixel original et des huit pixels l'entourant. Pour les images de très faible intensité, la nouvelle valeur peut être inférieure à 1 et conduire à une image noire. Pour éviter cela, l'échelle de l'image originale peut être modifiée pour aller de 0 à 10 000 coups.

Le lissage des images n'est pas utilisé systématiquement. Seules les images présentant un faible contraste (entre 3 et 5 coups) sont lissées.

8. Superposition des images et co-localisation

Un des outils indispensables en imagerie est la possibilité de superposer des images ioniques. Le logiciel du ToF-SIMS permet de superposer jusqu'à trois images. Elles perdent alors leur échelle d'intensité et une seule couleur est utilisée pour représenter chacune d'entre elles (vert, rouge ou bleu). Pour vérifier une co-localisation ou au contraire une anti-co-localisation de certains composés, la superposition s'avère une preuve indéniable.

9. Extraction de spectres de zones d'intérêt

L'extraction de spectres de zones d'intérêt est une fonctionnalité très importante lorsque l'on travaille en imagerie par spectrométrie de masse. Sur une image ionique, il se peut qu'une région présente un intérêt particulier (signal très intense, co-localisation de certains composés…) et qu'il faille obtenir une information sur le contenu moléculaire de cette zone. L'observation du spectre ainsi obtenu peut révéler des signaux peu visibles sur le spectre global, ou permettre une quantification relative de certaines espèces.

Les logiciels de traitement des données du ToF-SIMS permettent donc de dessiner des zones d'intérêt (« *Regions of Interest* », ROI). Deux options sont proposées pour les dessiner : manuellement, en suivant les contours de la zone désirée ou en utilisant des seuils d'intensité pour ne conserver que les zones les plus intenses de l'image. L'image servant à dessiner la ROI est laissée au choix de l'utilisateur.

Après extraction du spectre de la ROI, il est possible de sélectionner une nouvelle série de pics d'intérêt, notamment si certains signaux n'étaient pas ou peu visibles sur le spectre global, et d'enregistrer de nouvelles cartes de densité ionique pour ces signaux. Cet « aller-retour » entre les images et les spectres issus de ROIs est essentiel et constitue un excellent moyen de découvrir des signaux « perdus » dans le bruit de fond du spectre global reconstitué à partir de tous les pixels de l'image.

10. Normalisation des spectres

Pour pouvoir comparer entre eux des spectres extraits de ROIs, une normalisation est nécessaire. En effet, si nous comparons un spectre issu d'une ROI de 10 000 pixels à un autre issu d'une ROI de 2 000 pixels, une différence d'intensité non pas due à la concentration des composés dans l'échantillon mais à la taille de la surface analysée va être observée. Nous avons donc systématiquement normalisé les spectres issus de ROIs par rapport à la taille de la ROI la plus petite avant de comparer les intensités relatives des différents composés présents sur les spectres.

VII. État de l'art de l'imagerie par spectrométrie de masse

1. Le MALDI et le SIMS n'ont pas le monopole de l'imagerie par spectrométrie de masse !

S'il est vrai que le MALDI est la technique la plus utilisée pour imager des échantillons biologiques, le SIMS n'est pas en reste, comme nous le verrons plus loin. Ces deux techniques sont fortement complémentaires, tant au niveau de la gamme de masse que de la résolution spatiale accessible avec chacune d'elle. Néanmoins, il serait réducteur de ne pas considérer les autres techniques, parfois émergentes, qui trouvent des applications en imagerie. Ainsi, la LA-ICP/MS (« *Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma/Mass Spectrometry* ») est une technique utilisée depuis quelques années pour des analyses élémentaires *in situ*. En effet, en médecine ou en biologie, la détermination de la concentration d'éléments essentiels ainsi que leur distribution est extrêmement importante, fournissant des informations capitales au sujet de processus physiologiques ou physiopathologiques au sein du tissu analysé. Un déficit en phosphore, soufre, fer, cuivre ou zinc par exemple peut entraîner l'apparition de maladies mais une concentration trop élevée peut s'avérer toxique.[97] Il est donc capital de disposer d'une technique d'imagerie dédiée à la cartographie ainsi qu'à la quantification *in situ* de composés élémentaires.

Une autre technique dédiée à l'analyse élémentaire est le NanoSims. Ce type d'instrument a été mis au point à la fin des années 80 dans le but d'améliorer la résolution spatiale du SIMS et d'en augmenter la sensibilité.[98] Cependant, la fluence d'ions primaires (monoatomiques) envoyée sur l'échantillon dépasse largement la limite du SIMS statique (10^{13} ions.cm^{-2}), ce qui entraîne une fragmentation totale des composés organiques et réserve la technique à l'analyse élémentaire. L'atout principal du nano-SIMS 50 est sa résolution spatiale grâce à la focalisation du faisceau d'ions primaires pouvant atteindre 50 nm.

Enfin, la faisabilité de l'imagerie avec la technique émergente DESI (« *Desorption ElectroSpray Ionization* »), développée en 2004 par l'équipe de Graham Cooks,[12,13] vient juste d'être apportée.[99] L'intérêt majeur de cette technique est que l'analyse est réalisée à pression atmosphérique, mais de gros efforts sont à fournir pour améliorer la résolution spatiale (400 µm sur une coupe de cerveau de rat[99]).

Le Tableau 2 résume les caractéristiques ainsi que les avantages et inconvénients des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse citées ci-dessus :

	MALDI-TOF	ToF-SIMS	NanoSims	LA-ICP/MS
Résolution spatiale	50 µm	400 nm – 2 µm	50 – 150 nm	50 µm
Préparation d'échantillon	Déshydratation, Délipidification, Dépôt homogène de matrice	Déshydratation	Fixation , Déshydratation	
Gamme de *m/z* accessible	> 500	< 1200	< 250	< 250
Classes de composés analysables	Peptides, Protéines, Médicaments/ Métabolites	Lipides, Médicaments/ Métabolites	Éléments, fragments	Éléments
Analyseur	TOF	TOF	Secteurs EB	Secteurs EB
Avantages	✓ MS/MS accessible ✓ Sensibilité	✓ Endommagement de l'échantillon réduit ✓ Rapidité	✓ Résolution spatiale	✓ Quantification *in situ*
Inconvénients	✓ Endommagement de l'échantillon ✓ Dépôt de la matrice délicat à maîtriser	✓ Perte de sensibilité due à la fragmentation excessive des analytes	✓ Détection de 5 éléments à la fois seulement ✓ Préparation d'échantillon très lourde	✓ Endommagement dû à l'ablation laser

Tableau 2: Caractéristiques, avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie par spectrométrie de masse.

2. Développements récents de l'imagerie par spectrométrie de masse

Le premier article démontrant la faisabilité de l'imagerie par spectrométrie de masse a été publié en 1997 et avait pour titre : « *Molecular imaging of biological samples : localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS* » [100] La première application biomédicale fut décrite quelques années plus tard, en 2001, par Stoeckli *et al*. Leur travail sur du tissu tumoral humain a permis de localiser de façon rapide certaines protéines associées à une tumeur.[101] Le fait qu'une pathologie entraîne des modifications du protéome et de la distribution des protéines au sein du tissu atteint a alors été confirmé *in situ*. La technique est devenue à ce moment un outil formidable pour la recherche de biomarqueurs localisés. Ces premiers résultats ont encouragé différentes équipes à travers le monde à développer de nombreuses études sur diverses pathologies, sur le développement de médicaments ou encore sur des phénomènes biologiques peu ou mal compris.

Du côté de la spectrométrie de masse ToF-SIMS, Benninghoven *et al*. avaient depuis quelques années démontré la faisabilité d'une imagerie ToF-SIMS.[102] Néanmoins, un grand défi restait à relever : faire de l'imagerie d'échantillons biologiques avec des ions primaires polyatomiques. Grâce aux développements technologiques (et peut être motivés par les travaux pionniers de Caprioli) deux groupes y sont parvenus et en 2004, deux articles sur l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS appliquée à des tissus biologiques ont été publiés dans la revue *Analytical Chemistry.*[91,92]

Récemment, plusieurs revues ont été consacrées à l'imagerie par spectrométrie de masse, essentiellement MALDI-TOF et ToF-SIMS, et à son application dans le domaine biomédical.[103,104,105]

Applications pathologiques

La prévalence du cancer et la relative facilité avec laquelle les échantillons de biopsies peuvent être obtenus font que cette pathologie est sans nul doute la plus étudiée en imagerie par spectrométrie de masse, toutes techniques confondues. La recherche de biomarqueurs s'est développée ces dernières années employant une méthode de comparaison de profils et de localisations obtenues pour un tissu malade et pour un tissu contrôle.

Lemaire *et al*. ont ainsi utilisé une approche protéomique adossée à l'imagerie MALDI-TOF pour analyser des coupes de tumeurs ovariennes et valider un fragment de protéine appelé PA28 comme biomarqueur de ce type de cancer (Figure 21).[106]

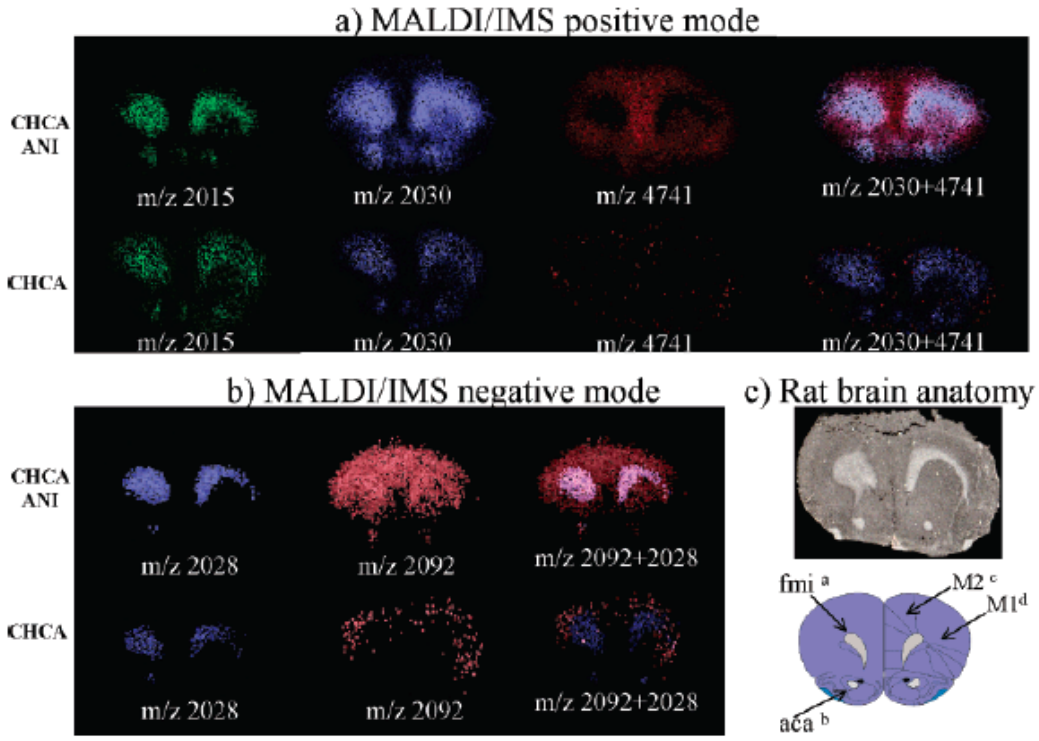


Figure 21: Images MALDI obtenues avec un MALDI-LIFT-TOF en mode reflectron avec un taux de répétition de 50 Hz avec les matrices CHCA/ANI (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique/Aniline) et CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique), a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif ; c) Anatomie du cerveau de rat, d'après la référence 106.

Cependant, les protéines ne sont pas les seuls composés à voir leur concentration et leur distribution varier dans un tissu pathologique. La corrélation entre le contenu en éléments et certaines maladies est établie, c'est le cas par exemple de la maladie de Wilson, liée à un trouble de la concentration en cuivre dans l'organisme. Zoriy *et al*. ont détecté grâce à l'imagerie quantitative par LA-ICP/MS, une augmentation de la concentration de cuivre et de zinc dans une tumeur cérébrale de rat alors que la concentration en phosphore, soufre et fer diminuait dans la même zone[97] (Figure 22). Des résultats similaires ont également été obtenus sur des gliobastomes humains.[107]

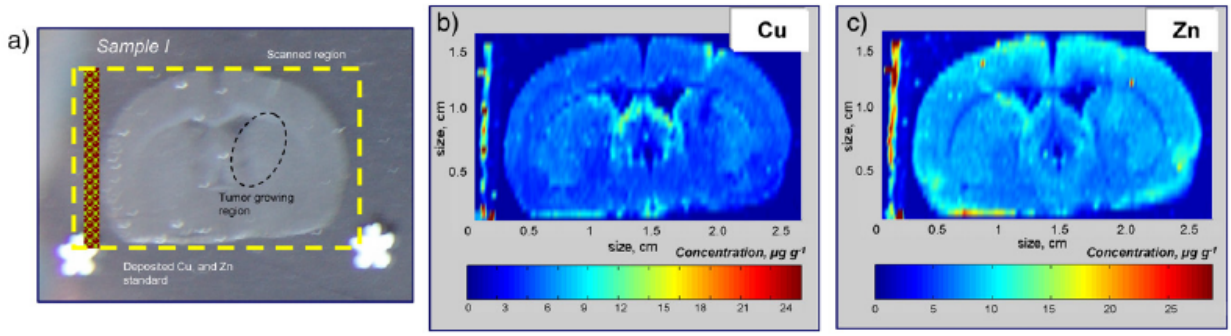


Figure 22: a) Photographie de la coupe de cerveau de rat analysée, b) Distribution latérale mesurée par LA-ICP/MS du cuivre, c) Distribution latérale mesurée par LA-ICP/MS du zinc ($m/\Delta m$=300), d'après la référence 97.

Par ailleurs, en NanoSims, une étude très récente a décrit la cinétique d'incorporation folliculaire de l'iode dans la thyroïde de rats nouveaux-nés.[108] Le but était de proposer un nouveau modèle dosimétrique dynamique afin d'affiner les recherches étiopathogéniques des cancers de la thyroïde des enfants de Tchernobyl.

D'autres pathologies comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (maladie génétique) ont fait l'objet de plusieurs publications. Notre équipe a notamment travaillé en imagerie ToF-SIMS, sur la modification du contenu lipidique de muscles de souris modèles de la maladie[90] et de muscles humains paravertébraux.[96] La maladie de Parkinson,[109,110] la maladie d'Alzheimer[111] ou encore l'obésité font également partie des pathologies très étudiées, en raison de leur prévalence et de leurs implications en santé publique.

Etudes protéomiques et lipidomiques

D'autres chercheurs se sont focalisés sur les modifications du protéome qui surviennent au cours du développement normal des tissus, sans relier leurs résultats à une quelconque pathologie. Des exemples récents peuvent être cités, comme l'imagerie MALDI-TOF de la peau de la grenouille *Phyllomedusa hyponchondrialis.*[112] Cette étude a permis à ses auteurs de caractériser et localiser au sein des glandes sécrétrices les peptides analogues de la bradykinine que sécrète cette grenouille pour sa protection contre les prédateurs. Han *et al.* ont travaillé sur les protéines présentes dans des yeux de bovins, examinant les modifications survenant au cours de la vie de ces animaux[113] tandis que Verhaert et ses collaborateurs se sont penchés sur les neuropeptides présents dans le système nerveux du criquet domestique.[114]

Les lipides sont quant à eux fort étudiés en imagerie ToF-SIMS,[115,116,117] leur implication dans de nombreux mécanismes biologiques faisant de ces composés

d'indispensables messagers intercellulaires. On peut à ce sujet citer deux études particulièrement intéressantes. Touboul *et al.* ont travaillé sur des biopsies de peau et de rein de patients atteints par une maladie génétique très rare, la maladie de Fabry. Ce travail est le seul en date sur les glycosphingolipides en imagerie ToF-SIMS (Figure 23).

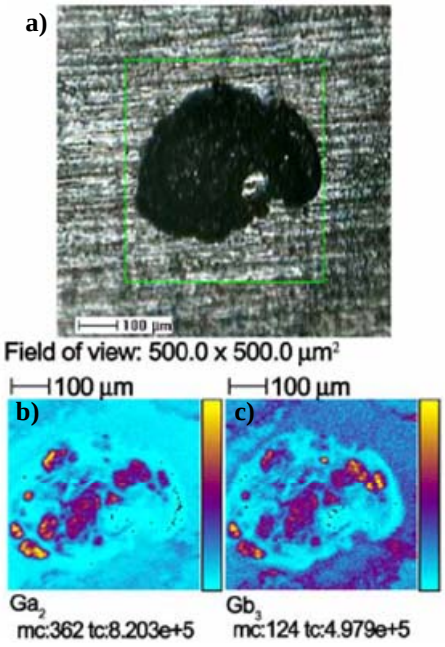


Figure 23: a) Image optique d'une biopsie de rein de patient atteint de la maladie de Fabry, b) Image ionique des digalactosylcéramide Ga_2 (*m/z* 880-1030) ; c) Image ionique des globotriaosylceramide Gb_3 (*m/z* 1040-1200) enregistrées en mode d'ionisation positif. Images de 500 x 500 μm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{12} ions.cm^{-2}), d'après la référence 103.

Magnusson *et al.* ont, pour leur part, démontré le caractère hétérogène du contenu lipidique d'un muscle squelettique d'adolescent.[118] Ce type de résultat est utile afin de mieux comprendre les maladies comme l'insulino-résistance ou le diabète de type 2. Des travaux sur les lipides s'accumulant dans les plaques d'athérome chez l'humain ont également été publiés, permettant d'obtenir de nouvelles informations sur les mécanismes d'une des principales causes de décès dans les pays industrialisés.[117,119]

Métabolomique

Les applications initiales de l'imagerie MALDI-TOF dans le domaine des « petites molécules » se sont focalisées sur des composés pharmaceutiques actifs et leur métabolites.[120,121] Néanmoins, les interférences entre les signaux des composés d'intérêt et de la matrice peuvent entraîner un biais dans les images obtenues et l'interprétation qui peut en

être faite. Pour pallier cet inconvénient, Reyzer *et al*. ont mis au point une méthode d'imagerie des fragments issus de la dissociation des ions précurseurs désorbés depuis l'échantillon.[122] Précisément, l'image reconstruite n'est plus celle de l'ion isobare mais d'un fragment caractéristique. L'ambiguïté entre le signal provenant de la matrice et celui du composé d'intérêt est ainsi levée. Plus récemment, l'équipe de Caprioli a mis à profit les excellentes résolution et précision en masse de la FT-ICR pour l'analyse de petites molécules. La précision en masse de l'ordre de quelques ppm en étalonnage externe permet de distinguer sans ambiguïté les métabolites de l'olanzapine dans le foie et le rein d'un rat.[123]

Cet état de l'art ne serait pas complet si les applications en sciences du patrimoine n'étaient pas citées, comme l'étude de la répartition d'arsenic dans des cheveux menée en NanoSims.[124] Audinot *et al.* ont comparé la distribution de l'arsenic dans un cheveu moderne incubé dans une solution d'arsenic à un cheveu ancien dont on soupçonnait le propriétaire d'avoir été empoisonné. Les images obtenues sont présentées à la Figure 24.

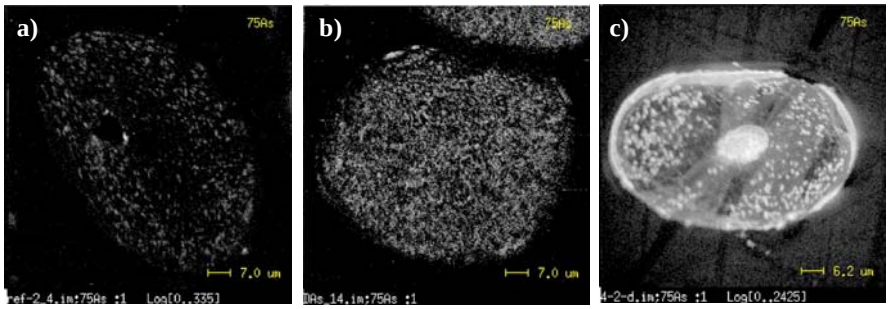


Figure 24: a) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain contrôle, b) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain volontairement exposé à l'arsenic, c) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain suspecté d'être contaminé. Images de 90 x 90 mm^2 (a et b), de 80 x 80 mm^2 (c). Échelle logarithmique, d'après la référence 124.

Le travail de Saito et de ses collaborateurs en dendochronologie mérite également d'être mentionné. Ces auteurs ont utilisé l'imagerie ToF-SIMS pour analyser la distribution de substances spécifiques dans des échantillons de bois, dans le but d'obtenir des critères de discrimination entre le bois de cœur et le bois externe.[125] Ces critères sont très importants pour la datation de constructions (comme des temples) lorsque celles ci ont été réalisées en bois.

Nous venons de voir que l'imagerie par spectrométrie de masse a su, en dix ans d'existence, trouver sa place dans différents domaines. Bien sûr, la liste présentée ici est loin d'être exhaustive. Les prochaines améliorations de cette technique, dont certaines sont déjà en

cours, devraient intervenir au niveau de la préparation des échantillons mais aussi à un niveau instrumental avec la possibilité de réaliser des expériences d'« imagerie tandem ». Comme nous l'avons vu, cette technique a été utilisée en imagerie MALDI, puisque avec l'apparition d'instruments de type TOF/TOF, la MS/MS sur coupe est devenue accessible. L'imagerie MALDI-FTICR est en plein essor, donnant accès à différents modes de collision : CID, IRMPD, SORI-CAD ou ECD. Néanmoins, l'acquisition de spectres de masse par FTICR est plus longue qu'avec un analyseur par temps-de-vol et certains auteurs préconisent de n'utiliser cette technique que sur de petites zones présélectionnées en imagerie « classique ».[126] La MS/MS fait cruellement défaut sur les instruments de type ToF-SIMS, et les informations obtenues par la fragmentation de certaines espèces seraient d'un grand secours pour l'attribution de nombreux signaux. Carado *et al.* ont par conséquent modifié la source (MALDI originellement) d'un instrument de type Qq-TOF pour accéder à des expériences de CID-MS/MS.[127,128] Du fait que l'analyseur ne soit pas un TOF, la source d'ions n'a plus besoin d'être pulsée. Ceci permet d'utiliser un faisceau d'ions primaires continu et d'augmenter la fluence sans endommagement excessif de l'échantillon grâce aux ions fullerènes choisis par les auteurs. L'inconvénient principal reste la focalisation du faisceau pouvant atteindre, au mieux, 40 µm. Du coté de la préparation d'échantillon, certaines méthodes de dépôt de matrice sans solvant[129,130] pourraient s'avérer intéressantes pour l'imagerie MALDI pour laquelle cette étape est toujours critique (même si elle est facilitée par l'utilisation de robots sprayeurs). Le lavage des coupes de tissu dans le but d'augmenter la sensibilité de la technique est également dans le collimateur des méthodologistes.[131]

Références bibliographiques :

[1] A.J. Dempster. A new method of positive ray analysis. *Phys. Rev.* **1918**; 11(14), 316.

[2] M.S.B. Munson and F.H. Field. Chemical Ionization Mass Spectrometry I. General introduction. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**; 88 (12), 2621.

[3] A. Benninghoven and E. Loebach. Tandem mass spectrometer for secondary ion studies. *Rev. Sci. Instrum.* **1971**; 42 (1), 49.

[4] R.D. MacFarlane and D.F. Torgerson. Californium-252 plasma desorption mass spectroscopy. *Science*. **1976**; 191(4230), 920.

[5] M. Barber, R.S. Bordoli, R.D. Sedgwick and A.N. Tyler. Fast atom bombardment of solids as an ion source in mass spectroscopy. *Nature.* **1981**; 293(5830), 270.

[6] M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr and F. Hillenkamp. Matrix-Assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* **1987**; 78, 53.

[7] M. Karas and F. Hillenkamp. Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 Daltons. *Anal. Chem.***1988**; 60(20), 2299.

[8] J.B. Fenn, M. Mann, C.K. Meng, S.F. Wong and C.M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. **1989**; 246(4926), 64.

[9] R.L. Dole, L.L. Mack, R.L. Hines, R.C. Mobley, L.D. Ferguson and M.B. Alice. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys.* **1968**; 49 (5), 2240.

[10] J. Zeleny. The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces. *Phys. Rev.* **1914**; 3(2), 69.

[11] Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan and R.G. Cooks. Electrosonic spray ionization. A gentle technique for generating folded proteins and protein complexes in the gas phase and for studying ion-molecule reactions at atmospheric pressure. *Anal. Chem*. **2004**; 76(14), 4050.

[12] Z. Takats, J.M. Wiseman and R.G. Cooks. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom*. **2005**; 40(10), 1261

[13] A.O. Nier. *National Bureau of Standards Circular (U.S)*, **1953**; 522, 29.

[14] A.E. Cameron and D.F. Eggers. An ion "velocitron". *Rev. Sci. Instrum*. **1948**; 19(9), 605.

[15] W.C. Wiley and I.H. McLaren. Time of Flight mass spectrometer with improved resolution. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**; 26 (12), 1150.

[16] J.A.Hipple, H. Sommer and H.A.Thomas. A precise method of determining the Faraday by magnetic resonance. *Phys. Rev*. **1949**; 76(12), 1877.

[17] W. Paul and H. Steinwedel. A new mass spectrometer without magnetic field. *Z. Naturforsch.* **1953**; 8A, 448.

[18] V.I. Karataev, B.A Mamyrin and D.V. Shmikk. New method for focusing ion bunches in time-of-flight mass spectrometers. *Sov. Phys.-Tech. Phys*. **1972**; 16(7), 1177.

[19] B.A. Mamyrin, V.I. Karataev, D.V. Shmikk and V.A. Zagulin. The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution. *Sov. Phys – JETP*. **1973**; 37, 45.

[20] M.B. Comisarow and A.G. Marshall. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectroscopy. *Chem. Phys. Lett.* **1974**; 25(2), 282.

[21] M. Hardman and A.A. Makarov. Interfacing the orbitrap mass analyzer to an electrospray ion source. *Anal. Chem*. **2003**; 75(7), 1699.

[22] J.J. Thompson. Rays of positive electricity. *Phil. Mag*. **1910**; 20, 752.

[23] R.F.K. Herzog and F. Viehlboeck. Ion source for mass spectrography. *Phys. Rev*. **1949**; 76(6), 855.

[24] H.J. Liebl. Ion microprobe mass analyzer. *J. Appl. Phys*. **1967**; 38(13), 5277.

[25] R. Castaing et G.J. Slodzian. Optique corpusculaire – premiers essais de microanalyse par émission ionique secondaire. *J. Microsc*. **1962**; 1, 395.

[26] K. Wittmaack. Pre-equilibrium variation of secondary ion yield. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys*. **1975**; 17(1), 39.

[27] C.W. Magee, W.L. Harrington and R.E. Honig. Secondary ion quadrupole mass spectrometer for depth profiling - design and performance evaluation. *Rev. Sci. Instrum*. **1978**; 49(4), 477.

[28] B.T. Chait and K.G.Standing. A time-of-flight mass spectrometer for measurement of secondary ion mass spectra. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys*. **1981**, 40(2), 185.

[29] S. Bouneau, A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, D. Jacquet, Y. Le Beyec, M. Pautrat, M. Fallavier, J.C. Pouzat and H.H. Andersen. Very large gold and silver sputtering yields induced by keV to MeV energy Au clusters (n=1-13). *Phys. Rev. B.* **2002**; 65(14), 144106.

[30] A. Benninghoven. Analysis of sub-monolayers on silver by secondary ion emission. *Phys. Status Solidi.* **1969**; 34, K169.

[31] D. Touboul. *Imagerie biologique par spectrométrie de masse. Aspects fondamentaux, méthodologies et applications*. Thèse de Doctorat. Université Evry-Val d'Essonne, **2006**.

[32] P. Simgund and C. Clausen. Sputtering from elastic-collision spikes in heavy-ions-bombarded surfaces. *J. Appl. Phys*. **1981**; 52(2), 990.

[33] J.W. Rabalais and J.W. Chen. Inelastic processes in ion/surface collision: Direct recoil ion fractions as a function of kinetic energy. *J. Chem. Phys*. **1986**; 85(6), 3615.

[34] P. Sigmund. Theory of sputtering. I. Sputtering yields of amorphous and polycrystalline targets. *Phys. Rev*. **1969**; 184(2), 383.

[35] H.H. Andersen and H.L. Bay. Nonlinear effects in heavy-ion sputtering. *J. Appl. Phys*. **1974**; 45(2), 953.

[36] H.H. Andersen and H.L. Bay. Heavy - ion sputtering yields of gold: further evidence of nonlinear effects. *J. Appl. Phys*. **1975**; 46(6), 2416.

[37] A.D. Appelhans and J.E. Delmore. Comparison of polyatomic and atomic primary beams for secondary ion mass spectrometry of organics. *Anal. Chem*. **1989**; 61(10), 1087.

[38] A. Wucher. Molecular secondary ion formation under cluster bombardment: A fundamental review. *Appl. Surf. Sci.* **2006**; 252(19), 6482.

[39] M. Benguerba, A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, H. Joret, Y. Le Beyec, M.G. Blain, E.A. Schweikert, G.B. Assayag and P. Sudraud. Impact of slow gold clusters on various solids: nonlinear effects in secondary ion emission. *Nucl. Instrum. Meth. B*. **1991**; 62(1), 8.

[40] G. Bolbach, A. Viari, R. Galera, A. Brunot and J.C. Blais. Organic film thickness effect in secondary ion mass spectrometry and plasma desorption mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. **1992**; 112(1), 93.

[41] D. Weibel, S. Wong, N. Lockyer, P. Blenkinsopp, R. Hill and J.C. Vickerman. A C_{60} primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics. *Anal. Chem*. **2003**; 75(7), 1754.

[42] F. Kotter and A. Benninghoven. Secondary ion emission from polymer surfaces under Ar^+, Xe^+ and SF_5^+ ion bombardment. *Appl. Surf. Sci.* **1998**; 133(1-2), 47.

[43] G. Gillen and S. Roberson. Preliminary evaluation of an SF_5^+ polyatomic primary ion beam for analysis of organic thin films by secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1998**; 12(19), 1303.

[44] W. Szymczak and K. Wittmaack. Evidence for strongly enhanced yields of negative molecular secondary ions due to bombardment with SF_n cluster ions. *Nucl. Instrum. Meth .B.* **1994**; 88(1-2), 149.

[45] F. Kollmer. Cluster primary ion bombardment of organic materials. *Appl. Surf. Sci.* **2004**; 231-232, 153.

[46] D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle and O. Laprévote. Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**; 16(10), 1608.

[47] A. Brunelle, D. Touboul and O. Laprévote. Biological tissue imaging with time-o-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *J. Mass Spectrom*. **2005**; 40(8), 985.

[48] A. Tempez, J.A. Schultz, S. Della-Negra, J. Depauw, D. Jacquet, A. Novikov, Y. Le Beyec, M. Pautrat, M. Caroff, M. Ugarov, H. Bensaoula, M. Gonin, K. Fuhrer and A. Woods. Orthogonal time-of-flight secondary ion mass spectrometric analysis of peptides using large gold clusters as primary ions. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2004**; 18(4), 371.

[49] A. Novikov, M. Caroff, S. Della-Negra, J. Depauw, M. Fallavier, Y. Le Beyec, M. Pautrat, J.A. Schultz, A. Tempez and A.S. Woods. The Au_n cluster probe in secondary ion mass spectrometry: influence of the projectile size and energy on the desorption/ionization rate from biomolecular solids. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2005**; 19(13), 1851.

[50] R. Knochenmuss, A. Stortelder, K. Breuker and R. Zenobi. Secondary ion-molecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization. *J. Mass Spectrom*. **2000**; 35(11), 1237.

[51] M. Karas, M. Gluckmann and J. Schafer. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *J. Mass Spectrom*. **2000**; 35(1), 1.

[52] V.E. Frankevich, J. Zhang, S.D. Friess, M. Dashtiev and R. Zenobi. Role of electrons in laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2003**; 75(22), 6063.

[53] K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida and T. Yoshida. Protein and polymer analysis up to *m/z* 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**; 2(8), 151.

[54] K. Strupat, M. Karas and F. Hillenkamp. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption - ionization mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. **1991**; 111, 89.

[55] R.C. Beavis and B.T. Chait. Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1989**; 3(12), 432.

[56] U. Pieles, W. Zurcher, M. Schar and H.E. Moser. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. **1993**; 21(14), 3191.

[57] R.L. Vermillion-Salsbury and D.M. Hercules. 9-Aminoacridine as a matrix for negative mode matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2002**; 16(16), 1575.

[58] D.W. Armstrong, L.K. Zhang, L. He and M.L. Gross. Ionic liquids as matrixes for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2001**; 73(15), 3679.

[59] M. Kussmann, E. Nordhoff, H. Rahbek-Nielsen, S. Haebel, M. Rossel-Larsen, L. Jakobsen, J. Gobom, E. Mirgorodskaya, A. Kroll-Kristensen, L. Palm and P. Roepstorff. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectromety sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.* 1997; 32(5), 593.

[60] F. Xiang and R.C. Beavis. A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1994**; 8(2), 199.

[61] S.A. Schwartz, M.L. Reyzer and R.M. Caprioli. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J. Mass Spectrom*. **2003**; 38(7), 699.

[62] H.R. Aerni, D.S.Cornett and R.M. Caprioli. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal.chem*. **2006**; 78(3), 827.

[63] M. Schuerenberg, C. Luebbert, S. O. Deininger, R. Mueller and D. Suckau. A new matrix application device for MALDI tissue imaging. **2007**, *Technical Note n° 018*, Bruker Daltonics.

[64] J. Franck, M. Wisztorski, J. Stauber, M. El Ayed, M. Salzet and I. Fournier. Schimadzu CHIP-1000 for clinical tissue application in MALDI imaging. **2007**, *Application note*. Schimadzu.

[65] Optimization of automated matrix spraying for MALDI imaging. **2007**, *Technical Note*. Leap Technologies.

[66] M. Dole, R.L Hines, R.C.Mack, R.C. Mobley, L.D. Ferguson and M.B. Alice. Molecular beams of macroions. *J. Chem. Phys*. **1968**; 49(5), 2240.

[67] J. Zeleny. Instability of electrified liquid surfaces. *Phys. Rev*. **1917**; 10(1), 1.

[68] P. Kebarle. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2000**; 35(7), 804.

[69] J.V. Iribarne and B.A. Thompson. On the evaporation of small ions from charged droplets. *J. Chem. Phys*. **1976**; 64(6), 2287.

[70] P. Kebarle and M. Peschke. On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Anal. Chim. Acta*. **2000**; 406(1), 11.

[71] J. Fernandez de la Mora. Electrospray ionization of large multiply charged species proceeds via Dole's charged residue mechanism. *Anal. Chim. Acta*. **2000**; 406(1), 93.

[72] J.B. Fenn. Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**; 4(7), 524.

[73] M.S. Wilm and M. Mann. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. **1994**; 136(2-3), 167.

[74] M. Wilm and M. Mann. Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal. Chem*. **1996**; 68(1), 1.

[75] R.S. Brown and J.J. Lennon. Mass resolution improvement by incorporation of pulsed ion extraction in a matrix-assisted laser desorption/ionization linear time-of-flight mass spectrometer. *Anal. Chem*. **1995**; 67(13), 1998.

[76] M.L. Vestal, P. Jushasz and S.A. Martin. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1995**; 9(9), 1044.

[77] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann and R.J. Cotter. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1991**; 5(4), 198.

[78] S. Della-Negra and Y. Le Beyec. New method for metastable ion studies with a time-of-flight mass spectrometer. Future applications for molecular structure determinations. *Anal. Chem*. **1985**; 57(11), 2035.

[79] A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, H. Joret and Y. Le Beyec. Time-of-flight mass spectrometry with a compact two-stage electrostatic mirror: metastable ion studies with high mass resolution and ion emission from thick insulators. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1991**; 5(1), 40.

[80] X.J. Tang, W. Ens, K.G. Standing and J.B. Westmore. Daughter ion mass spectra from cationized molecules of small oligopeptides in a reflecting time-of-flight mass spectrometer. *Anal Chem*. **1988**; 60(17), 1791.

[81] B. Spengler, D. Kirsch, R. Kaufmann and E. Jaeger. Peptide sequencing by matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1992**; 6(2), 105.

[82] P. Chaurand, F. Luetzenkirchen and B. Spengler. Peptide and protein identification by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) and MALDI-post-source decay time-of-flight mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**; 10(2), 91.

[83] D. Touboul, A. Brunelle and O. Laprévote. Structural analysis of secondary ions by post-source decay in time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20(4), 703.

[84] A. Makarov. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal. Chem*. **2000**; 72(6), 1156.

[85] K. Kingdon. A method for the neutralization of electron space charge by positive ionization at very low gas pressures. *Phys. Rev*. **1923**; 21(4), 408.

[86] Q. Hu, R.J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman and R.G. Cooks. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom*. **2005**; 40(4), 430.

[87] R.N. Sodhi. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS):—versatility in chemical and imaging surface analysis. *Analyst*. **2004**, 129(6), 483.

[88] I.V. Veryovkin, S.F. Belykh, A. Adriaens, A.V. Zinovev and F. Adams. On the trends in kinetic energies of secondary ions produced by polyatomic ion bombardment. *Appl. Surf. Sci.* **2004**; 231-232, 101.

[89] D. Touboul, A. Brunelle, F. Halgand, S. De La Porte, and O. Laprévote. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. *J. Lipid Res.* **2005**; 46(7), 1388.

[90] D. Touboul, H. Piednoël, V. Voisin, S. De La Porte, A. Brunelle, F. Halgand, and O. Laprévote. Changes of phospholipid composition within the dystrophic muscle by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and mass spectrometry imaging. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2004**; 10(5), 657.

[91] D. Touboul, F. Halgand, A. Brunelle, R. Kersting, E. Tallarek, B. Hagenhoff, and O. Laprévote. Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal. Chem.* **2004**; 76 (6), 1550.

[92] P. Sjövall, J. Lausmaa, and B. Johansson. Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Anal. Chem*. **2004**; 76(15), 4271.

[93] E.B. Monroe, J.C. Jurchen, J. Lee, S.S. Rubakhin, and J.V. Sweedler. Vitamin E imaging and localization in the neuronal membrane. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**; 127(35), 12152.

[94] K. Börner, H. Nygren, B. Hagenhoff, P. Malmberg, E. Tallarek, and J.E. Månsson. Distribution of cholesterol and galactosylceramide in rat cerebellar white matter. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**; 1761(3), 335.

[95] J.M. Wiseman, S.M. Puolitaival, Z. Takats, R.G. Cooks, and R.M. Caprioli. Mass spectrometric profiling of intact biological tissue by using desorption electrospray ionization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**; 44(43), 7094.

[96] N. Tahallah, A. Brunelle, S. De La Porte and O. Laprévote. Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *J. Lipid Res.* **2008**; 49(2), 438.

[97] M.V. Zoriy, M. Dehnhardt, A. Matusch and J.S. Becker. Comparative imaging of P, S, Fe, Cu, Zn and C in thin sections of rat brain tumor as well as control tissues by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta B*. **2008**; 63(3), 375.

[98] G. Slodzian, B. Daigne, F. Girard, F. Boust and F. Hillion. Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection. *Biol. Cell*. **1992**; 74(1), 43.

[99] D.R. Ifa, J.M. Wiseman, Q. Song and R.G. Cooks. Development of capabilities for imaging mass spectrometry under ambient conditions with desorption electrospray ionization (DESI). *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**; 259(1-3), 8.

[100] R.M. Caprioli, T.B. Farmer and J. Gile. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem*. **1997**; 69(23), 4751.

[101] M. Stoeckli, P. Chaurand, D.E. Hallahan and R.M. Caprioli. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med*. **2001**; 7(4), 493.

[102] A. Benninghoven, B. Hagenhoff and E. Niehuis. Surface MS: probing real world samples. *Anal. Chem*. **1993**; 65(14), 630A.

[103] A. Brunelle and O. Laprévote. Recent advances in biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry : polyatomic ion sources, sample preparation and applications. *Curr. Pharm. Des*. **2007**; 13(32), 3335.

[104] L.A. McDonnell and R.M.A. Heeren. Imaging mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev*. **2007**; 26(4), 606.

[105] J.L.Guerquin-Kern, T.D.Wu, C. Quintana and A. Croisy. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). *BBA. Gen. Subjects*. **2005**; 1724(3), 228.

[106] R. Lemaire, S.A. Menguellet, J. Stauber, V. Marchaudon, J.P. Lucot, P. Collinet, M.O. Farine, D. Vinatier, R. Day, P. Ducoroy, M. Salzet and I. Fournier. Specific MALDI imaging and profiling for biomarker hunting and validation: fragment of the 11S proteasome activator complex, Reg alpha fragment, is a new potential ovary cancer biomarker. *J. Proteome Res*. **2007**; 6(11), 4127.

[107] M. Dehnhardt, M.V. Zoriy, Z. Khan, G. Reifenberger, T.J. Ekström, J.S. Becker, K. Zilles and A. Bauer. Element distribution is altered in a zone surrounding human glioblastoma multiforme. *J. Trace Elements Med. Biol.* **2008**; 22(1), 17.

[108] M. Elbast, T.D. Wu, F. Guiraud-Vitaux, A. Petiet, E. Hindié, C. Champion, A. Croisy, J.L. Guerquin-Kern and N. Colas-Linhart. Cinétique intracolloïdale de l'iode dans la thyroïde de

rat nouveau-né. Imagerie directe par microscopie ionique analytique. *C. R. Biologies*. **2008** ; 331, 13.

[109] J. Pierson, J.L. Norris, H.R. Aerni, P. Svenningsson, R.M. Caprioli and P.E. Andren. Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry. *J. Proteome Res*. **2004**; 3(2), 289.

[110] K. Skold, M. Svensson, A. Nilsson, X. Zhang, K. Nydahl, R.M. Caprioli, P. Svenningsson and P.E. Andren. Decreased striatal levels of PEP-19 following MPTP lesion in the mouse. *J. Proteome Res*. **2006**; 5(2), 262.

[111] T.C. Rohner, D. Staab and M. Stoeckli. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech. Ageing Dev.* **2005**; 126(1), 177.

[112] G.D. Brand, F.C. Krause, L.P. Silva, J.R.S.A. Leite, J.A.T. Melo, M.V. Prates, J.B. Pesquero, E.L. Santos, C.R. Nakaie, C.M. Costa-Neto and J.C. Bloch. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*. **2006**; 27(9), 2137.

[113] J. Han and K.L. Schey. MALDI tissue imaging of ocular lens alpha-crystallin. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci*. **2006**; 47(7), 2990.

[114] P.D. Verhaert, M.C.P. Conaway, T.M. Pekar and K. Miller. Neuropeptide imaging on an LTQ with vMALDI source: The complete ‘all-in-one’ peptidome analysis. *Int. J. Mass Spectrom*. **2007**; 260(2-3), 177.

[115] H. Nygren, K. Börner, B. Hagenhoff, P. Malmberg and J.E. Månsson. Localization of cholesterol, phosphocholine and galactosylceramide in rat cerebellar cortex with imaging TOF-SIMS equipped with a bismuth cluster ion source. *BBA – Mol. Cell. Biol. L.* **2005**; 1737(2-3), 102.

[116] E.B. Monroe, J.C. Jurchen, J. Lee, S.S. Rubakhin and J.V. Sweedler. Vitamin E imaging and localization in the neuronal membrane. *J. Am. Chem. Soc*. **2005**; 127(35), 12152.

[117] P. Malmberg, K. Borner, Y. Chen, P. Friberg, B. Hagenhoff, J.E. Månsson and H. Nygren. Localization of lipids in the aortic wall with imaging TOF-SIMS. *BBA – Mol Cell. Biol. L.* **2007**; 1771(2), 185.

[118] Y. Magnusson, P. Friberg, P. Sjövall, F. Dangardt, P. Malmberg and Y. Chen. Lipid imaging of human skeletal muscle using TOF-SIMS with bismuth cluster ion as a primary ion source. *Clin. Physiol. Funct. Imaging*. **2008**; 28(3), 202.

[119] A. Mas, D. Touboul, A. Brunelle, P. Aragoncillo, J. Egido, O. Laprévote and F. Vivanco. Lipid cartography of atherosclerotic plaque by cluster-TOF-SIMS imaging. *Analyst*. **2007**; 132(1), 24.

[120] Y. Hsieh, R. Casale, E. Fukuda, J. Chen, I. Knemeyer, J. Wingate, R. Morrison and W. Korfmacher. Matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry for direct measurement of clozapine in rat brain tissue. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2006**; 20(6), 965.

[121] J. Bunch, M.R. Clench and D.S. Richards. Determination of pharmaceutical compounds in skin by imaging matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom*. **2004**; 18(24), 3051.

[122] M.L. Reyzer, Y. Hsieh, K. Ng, W.A. Korfmacher and R.M. Caprioli. Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J. Mass Spectrom*. **2003**; 38(10), 1081.

[123] D.S.Cornett, S.L.Frappier and R.M.Caprioli. MALDI-FTICR imaging mass spectrometry of drugs and metabolites in tissue. *Anal. Chem*. **2008**; DOI: 10.1021/ac800617s. http://dx.doi.org/10.1021%2Fac800617s

[124] J.N. Audinot, S. Schneider, M.Yegles, P. Hallégot, R. Wennig and H.N. Migeon. Imaging of arsenic traces in human hair by nano-SIMS 50. *Appl. Surf. Sci*. **2004**; 231-232, 490.

[125] K. Saito, T. Mitsutani, T. Imai, Y. Matsushita and K. Fukushima. Discriminating the indistinguishable sapwood from heartwood in discolored ancient wood by direct molecular mapping of specific extractives unsing time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2008**; 80(5), 1552.

[126] I.M. Taban, A.F.M. Altelaar, Y.E.M. van der Burgt, L.A. McDonnell, R.M.A. Heeren, J. Fuchser and G. Baykut. Imaging of peptides in the rat brain using MALDI-FTICR mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2007**; 18(1), 145.

[127] A. Carado, J. Kozole, M. Passarelli, N. Winograd, A. Loboda and J. Wingate. Cluster SIMS with a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Appl. Surf. Sci.* **2008**; In Press.

[128] A. Carado, J. Kozole, M. Passarelli, N. Winograd, A. Loboda, J. Bunch, J. Wingate, J. Hankin and R. Murphy. Biological tissue imaging with a hybrid cluster SIMS quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Appl. Surf. Sci.* **2008**; In Press.

[129] S.M. Puolitaival, K.E. Burnum, D.S. Cornett and R.M. Caprioli. Solvent-Free matrix dry-coating for MALDI imaging of phospholipids. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**; 19(6), 882.

[130] S.D. Hanton, T.M. McEvoy and J.R. Stets. Imaging the morphology of solvent-free prepared MALDI samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2008**; 19(6), 874.

[131] E.H. Seeley, S.R. Oppenheimer, D. Mi, P. Chaurand and R.M. Caprioli. Enhancement of protein sensitivity for MALDI imaging mass spectrometry after chemical treatment of tissue sections. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2008**; In Press.

Chapitre I

Profilage en profondeur d’une coupe de cerveau de rat

1. Introduction

Historiquement pourvus de sources d'ions primaires monoatomiques (O^-, Cs^+, Ga^+ ou In^+), les spectromètres de masse ToF-SIMS sont de nos jours équipés de sources d'ions polyatomiques. Il en existe de deux types. Le premier dérive des sources à pointe liquide (« *Liquid Metal Ion Gun* », LMIG) et produit des agrégats d'or[1] ou de bismuth.[2] Le second type correspond à des sources à impact électronique qui délivrent des ions SF_5^+ ou SF_6^- [3,4,5,6] ou des ions fullerènes C_{60}^{q+} (q = 1 ou 2).[7]

Ces différentes sources d'ions primaires ont été testées dans l'optique de les utiliser lors d'expériences d'imagerie ToF-SIMS. En effet, pour de telles expériences, une source d'ions doit répondre à certains critères, tels qu'une focalisation maixmale du faisceau d'ions primaires, une intensité du courant d'ions primaires suffisante pour permettre une acquisition avec une dose limitée et dans un temps raisonnable ou encore une bonne efficacité des particules incidentes à désorber les molécules d'analyte. Si les sources LMIG répondent parfaitement à ces critères, il n'en va pas de même pour la source d'ions fullerènes par exemple. La focalisation, ainsi que la brillance de cette source restent insuffisantes pour permettre son utilisation en imagerie par spectrométrie de masse, bien que de récents développements tentent de prouver le contraire.[8,9]

Néanmoins, les sources d'ions de fullerène présentent d'autres avantages. Comme nous l'avons déjà vu, l'un de ces avantages est leur efficacité, en comparaison avec les sources d'agrégats d'or ou de bismuth contenant 2 à 4 atomes.[2,10] Un autre avantage que présentent ces sources est la faible profondeur de pénétration de ces ions à la surface de l'échantillon. En effet, les ions C_{60}^+ se fragmentent lors de l'impact avec l'échantillon. Leur comportement est alors semblable à celui de 60 atomes de carbone arrivant simultanément et qui posséderaient chacun $1/60^{ème}$ de l'énergie totale. En résulte une éjection massive de matière depuis le cratère, et comme chaque atome a une énergie relativement faible, la profondeur de pénétration se trouve diminuée, se traduisant par un endommagement réduit.

De nombreuses études ont été menées pour mesurer et comparer à d'autres types de source l'endommagement engendré par l'utilisation d'une source d'ions de fullerène. Boussofiane *et al*. ont travaillé sur des empilements de Langmuir-Blodgett et ont mis en

évidence une augmentation non linéaire du rendement d'émission ionique secondaire,[10] en fonction du nombre de constituants de l'agrégat. Plus récemment, Fletcher *et al.*, en travaillant sur des échantillons aussi variés que de l'argent, un antioxydant (Irganox 1010), un biopolymère, un phospholipide et un peptide, ont montré que l'augmentation du rendement d'émission ionique secondaire et la réduction de l'endommagement ne dépendaient pas de la nature de l'échantillon étudié.[11] Enfin, des simulations de dynamique moléculaire, réalisées par l'équipe de Barbara Garrison, ont montré la différence de comportement entre un ion fullerène et un ion Ga^+, tous deux accélérés à 15 keV, impactant une surface d'argent.[12] La Figure 1 montre les résultats de cette simulation. A gauche est représenté l'impact d'un ion Ga^+ ; à droite, celui d'un ion C_{60}^+. Bien que ne disposant pas d'échelle de profondeur, on se rend bien compte que 1 ps après l'impact seulement, l'ion de fullerène a pénétré bien moins profondément que l'ion monoatomique. Ce dernier dépose son énergie tout au long de son parcours, engendrant une faible pulvérisation mais un endommagement considérable des différentes couches qu'il a traversées. Le C_{60}^+ se dissocie sous l'effet de l'impact en ne perturbant l'organisation que des couches supérieures et en ne déposant son énergie qu'à la surface, ce qui provoque une pulvérisation bien plus importante que pour l'ion Ga^+. Après 29 ps, l'ion Ga^+ (point noir entouré de rouge) se situe dans la couche grise de l'échantillon quand le C_{60}^+ s'est totalement dispersé (flèches rouges) et que l'endommagement subi par l'échantillon ne dépasse pas la couche orange.

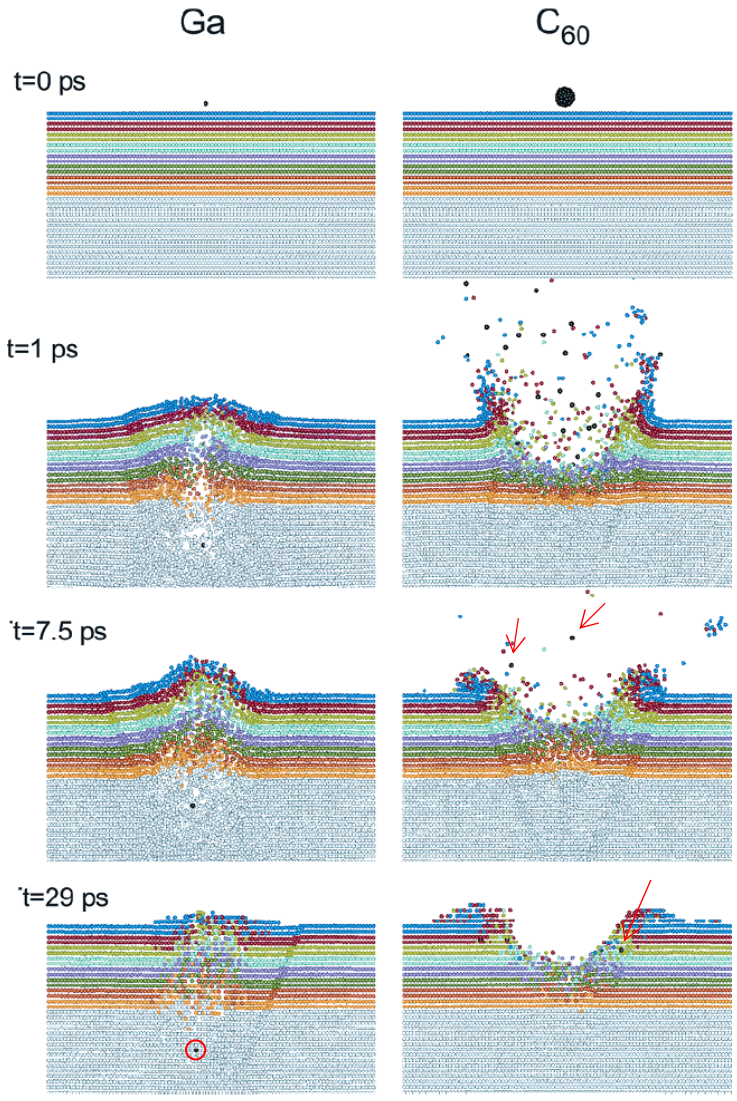


Figure 1: Résultats de dynamique moléculaire, d'après la référence 12.

Le profilage en profondeur, connu sous le nom « *dual beam depth profiling* »[13] a été utilisé avec succès depuis de nombreuses années, sur des échantillons tels que des métaux ou des minéraux, à l'aide de source d'ions oxygène par exemple. Cependant, jamais ce type d'analyse n'avait été conduit sur un échantillon biologique. Depuis l'apparition des sources d'ions de fullerène, leurs propriétés ont rapidement été mises à profit pour tenter de combler ce manque. La Figure 2 montre le principe de cette analyse.

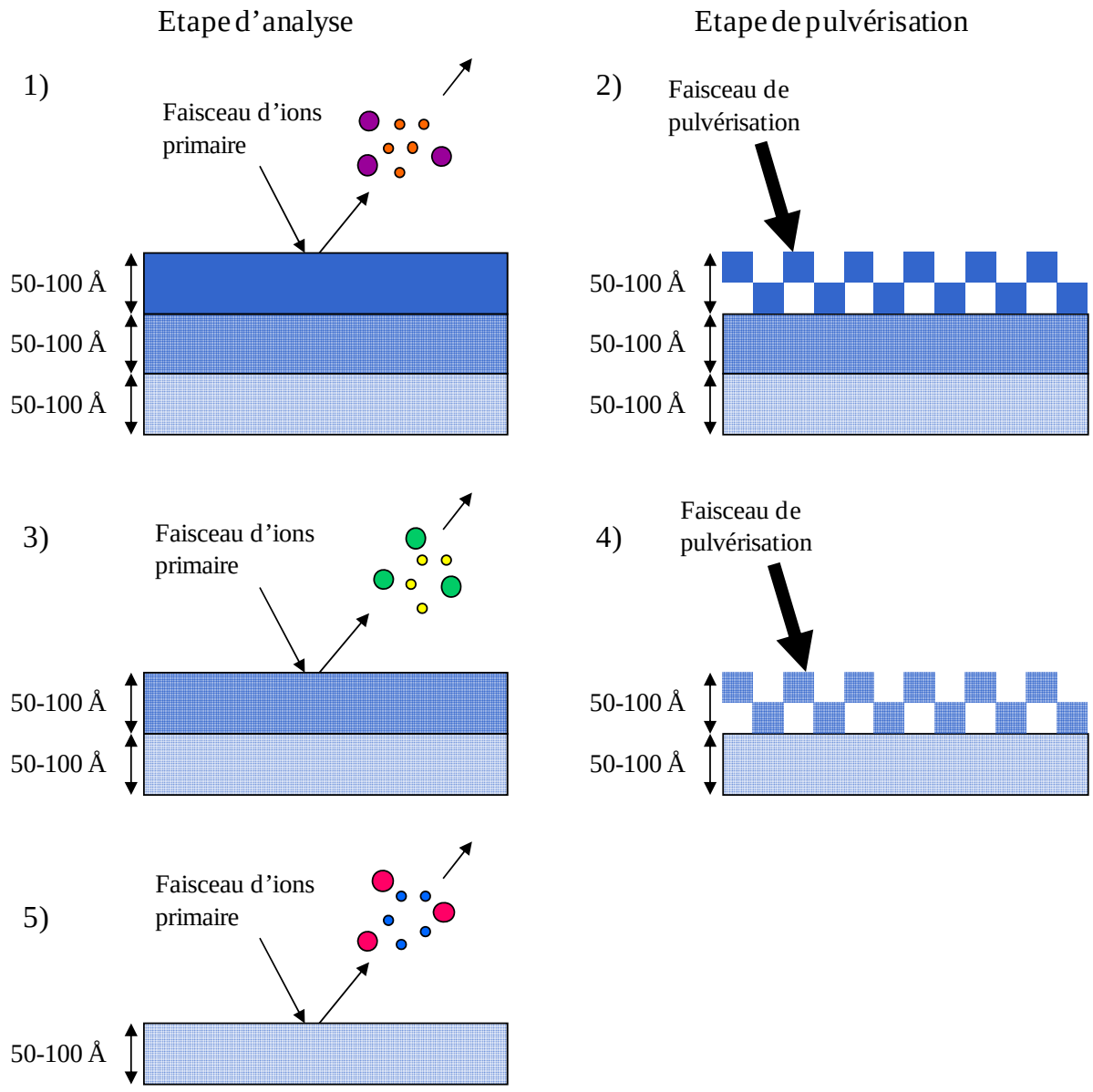


Figure 2: Principe du «*dual beam depth profiling*».

Cette méthode s'appuie sur la combinaison d'un faisceau d'ions primaires pulsé de haute énergie (faisceau d'analyse) et d'un faisceau de faible énergie (faisceau de pulvérisation) qui va éroder la surface de l'échantillon. La première étape consiste à analyser la surface de l'échantillon à l'aide du faisceau de haute énergie. Après cette acquisition, le faisceau primaire est éteint ou dévié, et le faisceau de pulvérisation est activé. L'étape d'analyse est répétée, puis celle pulvérisation, et ainsi de suite, jusqu'à ce que la profondeur désirée soit atteinte.

Les ions primaires délivrés par le faisceau d'analyse sont sélectionnés afin d'obtenir la meilleure intensité des faisceaux d'ions secondaires et une résolution spatiale optimale, tandis que le faisceau de pulvérisation est choisi pour ses qualités en termes de résolution en profondeur et de taux de pulvérisation. Les ions de fullerène sont donc apparus comme de bons candidats pour la pulvérisation puisqu'en raison de leurs qualités non destructrices, ils peuvent décaper la couche superficielle de l'échantillon sans endommager les couches inférieures, autorisant donc leur analyse par le faisceau focalisé. Depuis les cinq dernières années, et le développement des sources d'ions de fullerène, le profilage en profondeur a été appliqué à divers substrats comme des films de Langmuir-Blodgett,[14,15] qui représentent d'excellents modèles pour le profilage en profondeur. En effet, leur composition chimique est définie en fonction de leur épaisseur, ce qui permet une étude fondamentale des rendements de pulvérisation et d'ionisation secondaire. D'autres substrats comme de l'histamine dans une matrice de glace,[16] ou encore des peptides inclus dans des films de tréhalose[17] ont été étudiés. Enfin, si les échantillons analysés varient, il en est de même pour les particules utilisées comme faisceau de pulvérisation. On trouve notamment dans la littérature l'exemple de SF_5^+, que Mahoney *et al.* ont utilisé pour profiler des biopolymères utilisés comme support à la diffusion de médicaments.[18]

Dans ce cadre, notre travail a consisté, dans un premier temps, à évaluer la possibilité d'utiliser les ions de fullerène comme ions primaires en imagerie. Dans un second temps, nous avons testé la méthode d'analyse en profondeur sur une coupe de cerveau de rat, modèle d'échantillon biologique par excellence. Le but final était d'éprouver la possibilité de réaliser une imagerie 3D par spectrométrie de masse ToF-SIMS, sur un échantillon biologique réel.

2. Protocole mis en œuvre

2.1. Préparation des échantillons

Les coupes de cerveau de rat, d'une épaisseur de 15 µm, ont été réalisées grâce à un cryostat, à une température de -18°C. Elles ont été immédiatement déposées sur une plaque en acier inoxydable et conservées à -80°C. Peu de temps avant l'analyse, la plaque a été réchauffée à température ambiante et séchée dans un dessiccateur sous vide (quelques mbar) pendant une heure. Les expériences ont été effectuées en bordure du corps calleux. Ce choix se justifie par le fait que le corps calleux est une particularité anatomique qui se reconnaît facilement sur les coupes mais aussi par le fait que sa composition lipidique le distingue des structures anatomiques adjacentes.

2.2. Profilage

Le profilage a été mené à l'aide d'un spectromètre de masse ToF-SIMS IV, dans les locaux de la société Tascon GmbH, à Münster, en Allemagne. En effet, l'instrument disponible au laboratoire ne dispose pas des deux colonnes d'ions nécessaires à ce type d'analyse.

Le spectromètre était équipé d'une source d'agrégats de bismuth, délivrant des agrégats Bi_n^{q+} (n = 1-7 et q = 1-2), dont l'énergie cinétique est $25q$ keV, soit 25 keV pour les ions simplement chargés et 50 keV pour les ions doublement chargés. Les ions primaires sélectionnés sont les agrégats Bi_3^+, car ce sont ceux qui offrent le meilleur compromis entre efficacité et intensité du courant d'ions primaires.[19] La source est utilisée selon le mode *« high current bunch mode »*, qui offre une durée de pulsation de 1ns (pour les agrégats Bi_3^+) et assure donc une résolution en masse excédant $m/\Delta m = 10^4$ à m/z 500 (« *full width half maximum* », [FWHM]). Le courant d'ions primaires, mesuré à l'aide d'une cage de Faraday, est de 0.3 pA à 10 kHz.

La deuxième colonne d'ions équipant ce spectromètre est une source d'ions fullerènes (Figure 3). La source est composée d'un réservoir de fullerène en poudre, chauffé à une température de 475°C. Le fullerène s'évapore et est ionisé par impact électronique. Il en

résulte la formation d'ions C_{60}^{+} et C_{60}^{2+}. La pulsation du faisceau d'ions est assurée par un secteur électrostatique. Enfin, la sélection en masse de l'ion primaire se fait grâce à un filtre de Wien. Les ions C_{60}^{+} atteignent l'échantillon avec un angle d'incidence de 45° et une énergie cinétique de 10 keV (20 keV pour le C_{60}^{2+}).

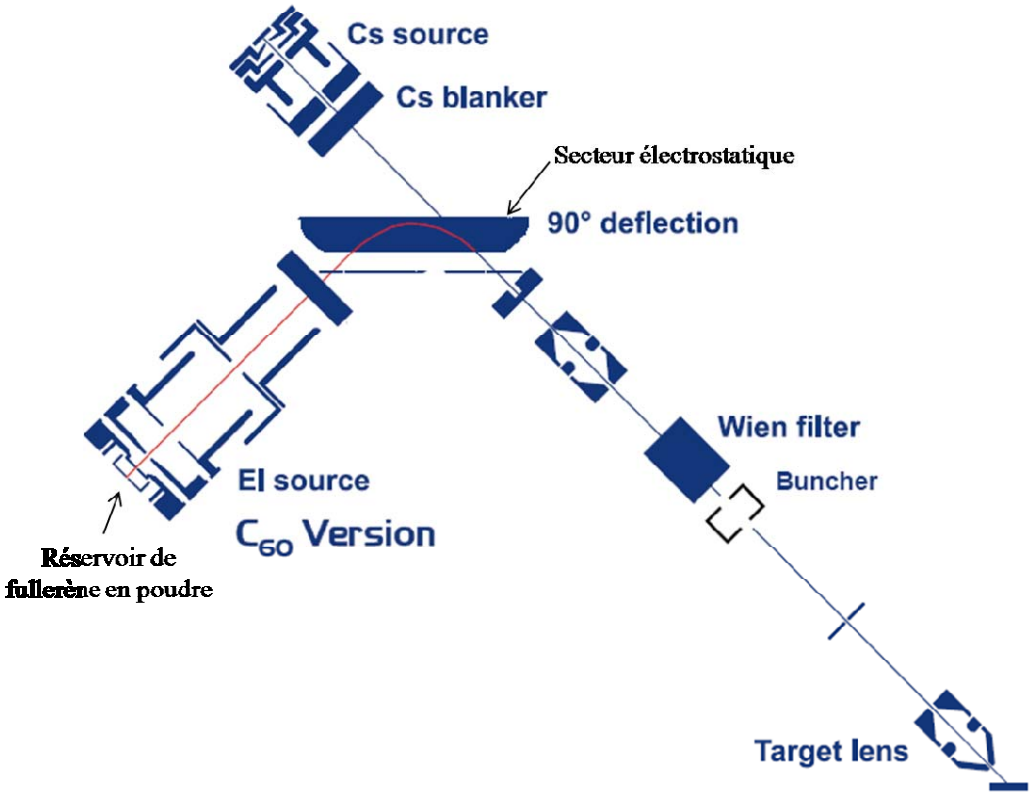


Figure 3: Schéma de principe du fonctionnement de la source d'ions fullerènes développée par Ion Tof GmbH, d'après la référence 20.

Les deux étapes de l'expérience (pulvérisation / analyse) ont été menées dans les conditions suivantes :

- ✓ Irradiation avec le faisceau de pulvérisation, avec un courant de 2 nA, durant 1 seconde, sur une surface de 300 x 300 µm^2. La fluence d'ions primaires était de 2,8 x 10^{13} ions.cm^{-2}.
- ✓ Analyse d'une surface de 110 x 110 µm^2, au centre de la zone pulvérisée, avec une fluence d'ions Bi_3^{+} de 1,5 x 10^{10} ions.cm^{-2}. Le nombre de pixels des images ainsi enregistrées est de 128 x 128.

La fluence totale d'ions primaires envoyés sur l'échantillon à la fin de l'expérience était comprise entre 1,7 x 10^{16} ions.cm^{-2} et 3,4 x 10^{16} ions.cm^{-2}.

Les profondeurs de pulvérisation ont été estimées à l'aide d'un profilomètre (KLA Tencor Surface Profilometer Alpha Step 500, Allemagne), avec une précision de 1,5%.

2.3. Traitements des données

Les données collectées (toutes enregistrées deux fois) lors des analyses ont permis de mesurer les rendements d'émission ionique secondaire *Y*, les sections efficaces d'endommagement σ et les efficacités $E = Y / \sigma$, pour les ions primaires C_{60}^+, C_{60}^{2+} et Bi_3^+. Ces valeurs ont été calculées pour l'ion $[M-H]^+$ du cholestérol, au rapport *m/z* 385, à l'intérieur du corps calleux. Les définitions du rendement d'émission ionique secondaire, de la section efficace d'endommagement et de l'efficacité sont données dans l'introduction générale de ce manuscrit (*cf.* paragraphe I.1.2).

3. Résultats et Discussion

3.1. Utilisation de la source d'ions fullerènes en imagerie

Les résultats obtenus pour les sections efficaces d'endommagement, les rendements d'émission ionique secondaire et les efficacités sous l'impact d'ions C_{60}^+ et C_{60}^{2+}, normalisés à ceux des ions Bi_3^+, sont résumés dans le Tableau 1 :

Ion primaire	$\sigma(C_{60}^{n+})/\sigma(Bi_3^+)$	$Y(C_{60}^{n+})/Y(Bi_3^+)$	$E(C_{60}^{n+})/E(Bi_3^+)$
C_{60}^+	0,061	0,53	8,8
C_{60}^{2+}	0,25	0,47	1,9

Tableau 1: Mesure des sections efficaces d'endommagement, des rendements d'émission ionique secondaire et des efficacités pour l'ion de rapport *m/z* 385, normalisés à ceux des ions Bi_3^+, à partir d'une coupe de cerveau de rat, d'après la référence 21.

Il apparaît clairement que les ions fullerènes induisent un endommagement moindre des couches superficielles que les agrégats de bismuth, et même si les rendements d'émission ionique secondaire sont plus faibles d'un facteur 2, les efficacités sont plus élevées. Si on regarde attentivement ces valeurs, les ions C_{60}^+, avec un endommagement 16 fois moins important et une efficacité presque 9 fois supérieure aux ions Bi_3^+, semblent le candidat idéal pour la spectroscopie et l'imagerie.

Malheureusement, avec les technologies actuelles, le faisceau ne peut être focalisé en deçà de 20 µm dans le *« high current bunch mode »* nécessaire à l'obtention d'une résolution en masse suffisante pour assurer une attribution sans ambiguïté des pics présents sur le spectre. La conséquence de ces limitations est une utilisation restreinte des ions C_{60}^+ en imagerie, en fonction de la taille de l'échantillon à analyser. La taille du pixel est déterminante dans ce choix. Pour une image réalisée avec 256 x 256 pixels, si l'échantillon mesure 2 mm de coté, la taille du pixel est inférieure à 10 µm, dans ce cas, la taille du faisceau d'ions est rédhibitoire. En revanche, si l'échantillon mesure 1 à 2 cm^2, la taille du pixel est de 40 à 80 µm, et dans ce cas, la focalisation du faisceau est suffisante pour acquérir une image de bonne qualité.

En ce qui concerne les ions C_{60}^{2+}, la section efficace d'endommagement est seulement 4 fois plus faible que celle des ions bismuth et l'efficacité ne s'en trouve augmentée que d'un facteur 2. Bien que l'énergie cinétique de ce faisceau soit le double de celle du faisceau de Bi_3^+, ces ions sont difficilement utilisables en imagerie par spectrométrie de masse.

3.2. Utilisation de la source d'ions fullerènes comme faisceau de pulvérisation

SRIM 2003.26 (« *Stopping and Range Ion in Matter* »)[22] est un logiciel qui permet de calculer les profondeurs de pénétration de projectiles dans un solide. En configurant la nature du projectile, son énergie, ainsi que la nature du solide impacté, le logiciel peut déterminer :

- ✓ le pouvoir d'arrêt nucléaire (perte d'énergie du projectile par collisions entre atomes et par unité de longueur),
- ✓ le pouvoir d'arrêt électronique (perte d'énergie du projectile par interactions avec le nuage électronique du solide et par unité de longueur) ,

- ✓ la profondeur de pénétration du projectile (*« Projected Range »*),
- ✓ la diffusion latérale du projectile dans le solide,
- ✓ la diffusion longitudinale du projectile dans le solide

Dans notre cas, le pouvoir d'arrêt nucléaire est largement supérieur au pouvoir d'arrêt électronique qui est par conséquent considéré comme négligeable dans les effets observés ici.

Le Tableau 2 présente les résultats de simulations SRIM de pénétration de carbone et de bismuth dans un tissu adipeux. Du point de vue de la perte d'énergie, de la profondeur de pénétration et de la diffusion, un agrégat est supposé se comporter comme la somme de ses composants individuels possédant la même vitesse.[23] Un projectile C_{60} possédant une énergie cinétique d'environ 10 keV perd environ 500 eV / Å, soit deux fois plus qu'un agrégat Bi_3^+ ayant une énergie de 25 keV. Sa profondeur de pénétration, c'est-à-dire la distance qu'il lui faut parcourir avant d'être stoppé dans le solide, est 10 fois plus faible.

	C	C_{60}	Bi	Bi_3
Energy/atom (keV)	0,16	0,16	8	8
Energy (keV)	0,16	9,6	8	24
$(dE/dx)_{ele}$ (eV/Å)	0,95	57	10,8	32,4
$(dE/dx)_{nuc}$ (eV/Å)	7,14	428	65,4	196,2
Projected range (Å)	22		212	
Longitudinal straggling (Å)	12		34	
Lateral Straggling (Å)	8		24	

Tableau 2: Résultats de simulation de pénétration de carbone et bismuth dans un modèle de tissu adipeux, calculé avec les tables SRIM.[21]

La Figure 4 renforce les valeurs numériques du Tableau 2. Elle montre la simulation, grâce au logiciel SRIM, des trajectoires d'agrégats de bismuth et de carbone, dans un tissu adipeux de 300 Å d'épaisseur. Dans le cas du projectile Bi_3, les atomes du solide déplacés, qui

peuvent être considérés comme une image de l'endommagement du solide, sont localisés jusqu'à une profondeur de l'ordre de 300 Å. Dans le cas du projectile C_{60}, la profondeur de pénétration n'est que d'environ 50 Å. Or la profondeur d'émission ionique secondaire a été déterminée comme étant du même ordre de grandeur (50Å).[24] On peut donc supposer que si on pulvérise un échantillon avec un faisceau d'ions C_{60}^{+} à 10 keV, les couches superficielles pourront être décapées sans endommagement excessif des couches suivantes, autorisant leur analyse par spectroscopie.

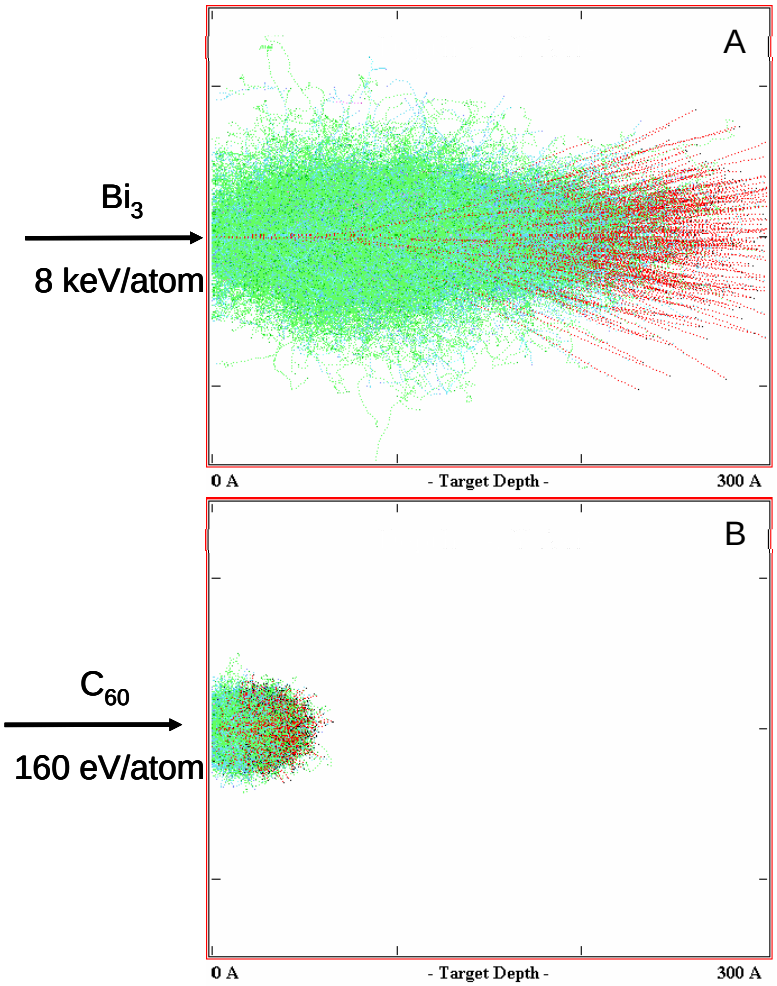


Figure 4: Simulation des trajectoires d'agrégats de bismuth et de carbone lors de l'impact sur un tissu adipeux de 300 Å d'épaisseur (densité supposée: 0.92 g/cm^3, composition élémentaire: H 11.97%, C 63.8%, N 0.8%, O 23.26%, Na 0.05%, Cl 0.12%). Les points rouges indiquent les trajectoires des projectiles, tandis que les verts et les bleus montrent les atomes du solide déplacés.

Forts de ces constatations nous sommes passés à l'étape suivante de notre travail, à savoir tester la possibilité d'une imagerie 3D par spectrométrie de masse ToF-SIMS, sur un échantillon biologique réel.

3.3. Imagerie 3D d'une coupe de cerveau de rat

La Figure 5 montre l'évolution de l'intensité de différents ions en fonction de la densité fluence d'ions primaires envoyés sur l'échantillon. Ces intensités ont été mesurées avec le faisceau d'agrégats de bismuth (deuxième étape de notre protocole). La profondeur pulvérisée a été estimée avec le profilomètre après la fin de l'expérience, et la valeur obtenue est de 2 à 3 µm. Les variations d'intensité des ions secondaires en fonction de la fluence d'ions de fullerène permettent de les répartir en deux groupes distincts. Nous pouvons regrouper d'une part les ions atomiques et les ions-fragments ; comme le sodium, la phosphocholine ou encore le chlorure et l'ion dihydrogénophosphate. Leurs intensités relatives restent relativement constantes durant la mesure, après une très brève et intense augmentation ou diminution, au tout début de l'irradiation. Ces ions peuvent donc être considérés comme répartis de façon homogène sur toute la profondeur sondée de la coupe, excepté au tout début de l'acquisition, ce qui peut être vu comme un nettoyage de la surface par le retrait des premières couches.

Les ions moléculaires (cholestérol, acides gras ou triacylglycéols), pour leur part, ont un comportement différent. Une diminution de l'intensité est observée au début de l'irradiation, pouvant atteindre un facteur 50 lorsque la fluence d'ions de fullerène atteint $2{,}8 \times 10^{15}$ ions.cm^{-2}. Cette valeur correspond à une profondeur estimée de 200 à 300 nm. Après cette première diminution, la pente de la courbe diminue soudainement et reste constante jusqu'à la fin de l'expérience.

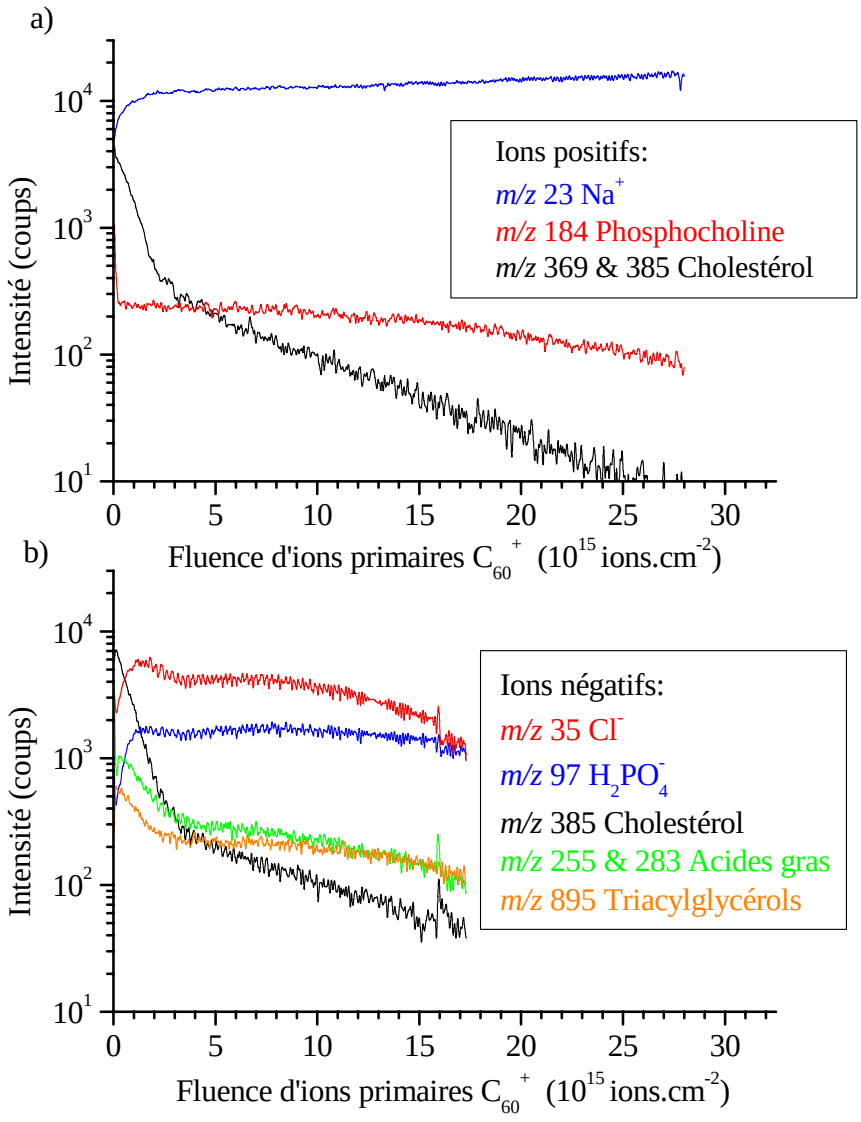


Figure 5: Intensités en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+, mesurées en bordure du corps calleux à la surface d'une coupe de cerveau de rat, a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif, d'après la référence 21.

A partir de ces courbes, nous avons pu calculer pour les ions positifs du cholestérol, les sections efficaces d'endommagement σ_1=3,3 x 10^{-15} cm^2 et σ_2=4,0 x 10^{-16} cm^2, correspondant respectivement à la première et à la seconde partie du tracé (Figure 6). Le tracé en pointillés sur la première partie de la courbe représente σ_1 de façon réelle, tandis que le tracé plein représente en réalité la somme $\sigma_1 + \sigma_2$.

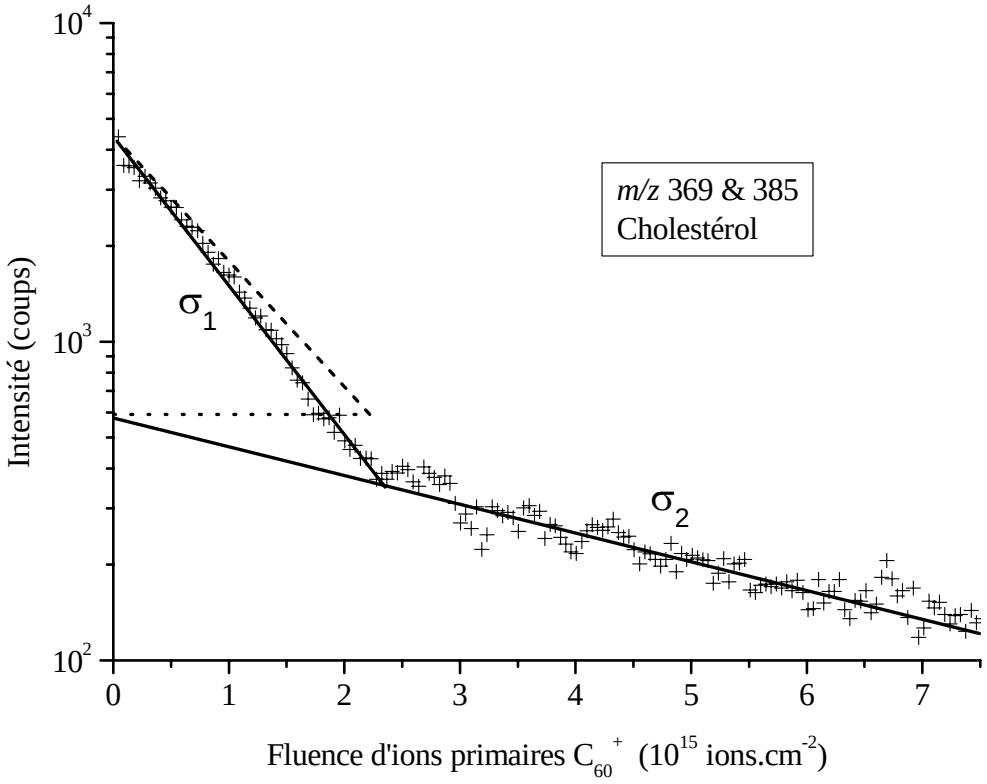


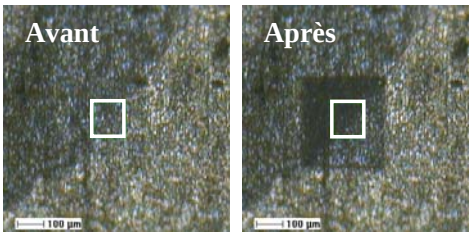
Figure 6: Somme des intensités des ions du cholestérol (mode positif, *m/z* 369 et 385) en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+, mesurée en bordure du corps calleux à la surface d'une coupe de cerveau de rat. Les données sont les mêmes que celles de la Figure 5 avec une échelle en abscisse élargie, d'après la référence 21.

Ces expériences ont été répétées plusieurs fois à différents endroits sur la coupe, en modes d'ionisation positif et négatif et des valeurs similaires ont toujours été obtenues.

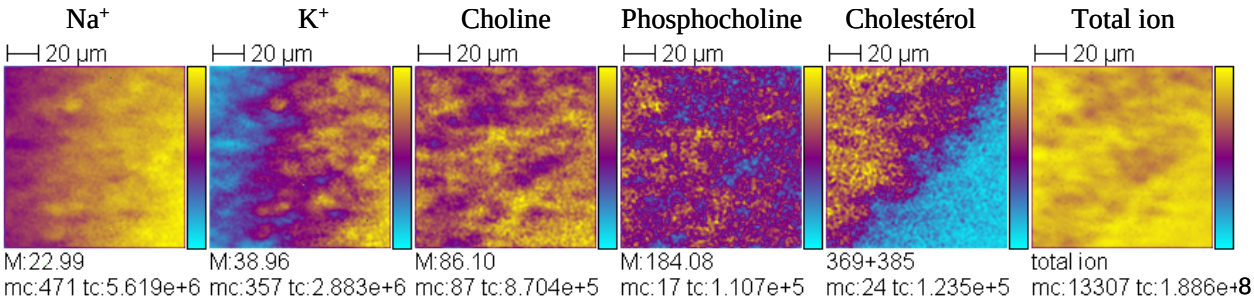
En 2006, Sjövall *et al*. ont étudié, par imagerie ToF-SIMS, la localisation et l'abondance de différents lipides en fonction de la température de l'échantillon, sur des coupes de cerveau de souris qui ont été séchées tout en étant maintenues congelées (méthode du « *freeze drying* »).[25] Un résultat intéressant est que l'intensité du cholestérol, qui est très faible pour des températures en dessous de 0°C, augmente brutalement au-delà de cette valeur. Ils ont expliqué ceci par la possible migration des lipides vers la surface du tissu au cours de la décongélation de l'échantillon. Lors de nos expériences, la coupe de tissu a été réchauffée à

température ambiante juste avant l'analyse. Il est possible que les lipides se soient concentrés à la surface de l'échantillon lors de son réchauffement.

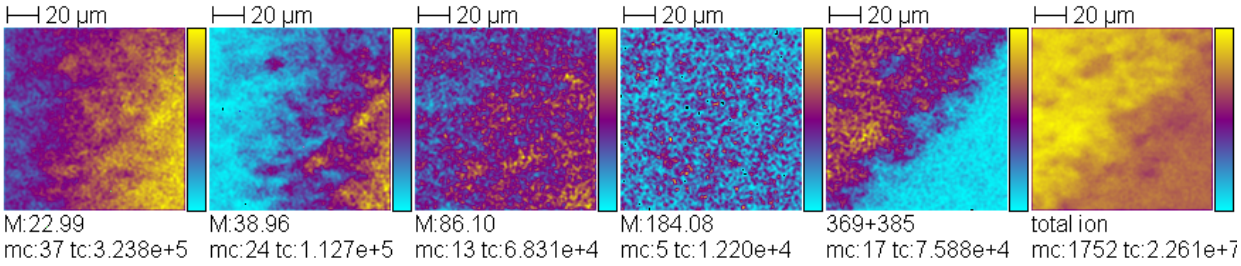
La forme des courbes des Figure 5 et 6 pourrait alors être interprétée comme suit : la véritable section efficace d'endommagement, due aux dommages causé à l'échantillon par la pénétration des constituants des ions de fullerène est en fait uniquement σ_2, qui est toujours de l'ordre de 10^{-16} cm^2. Malheureusement, la plupart des lipides sont concentrés à la surface, dans les premiers 200-300 nm, comme l'illustrent les images ToF-SIMS présentées en Figure 7. Sur les images vidéo enregistrées avant et après l'analyse, le corps calleux peut facilement être distingué dans le coin supérieur gauche des images. La zone (300 x 300 μm^2) pulvérisée est elle aussi clairement visible. Le carré blanc (110 x 110 μm^2) représente la surface sur laquelle les cartes de densité ionique présentées plus bas ont été enregistrées. Il s'agit des images de différents ions, enregistrées à différentes étapes du profilage. La première ligne (A) montre les images totales, c'est-à-dire la somme de toutes images enregistrées aux différentes profondeurs dans la coupe de cerveau de rat. La seconde ligne (B) présente les images enregistrées après la première irradiation par le faisceau d'ions C_{60}^+, jusqu'à atteindre une fluence de 2,8 x 10^{15} ions.cm^{-2} (σ_1). La troisième et la quatrième ligne (C et D) montrent les images réalisées après avoir atteint des paliers de fluence, entre 2,8 x 10^{15} et 1,5 x 10^{16} ions.cm^{-2} et 1,5 x 10^{16} et 2,8 x 10^{16} ions.cm^{-2}, respectivement. Nous pouvons voir que le meilleur contraste est obtenu pour les images enregistrées « en haut » de la coupe, pour des lipides comme le cholestérol alors que les intensités des images des ions sodium, potassium et phosphocholine restent interprétables durant toute l'expérience.



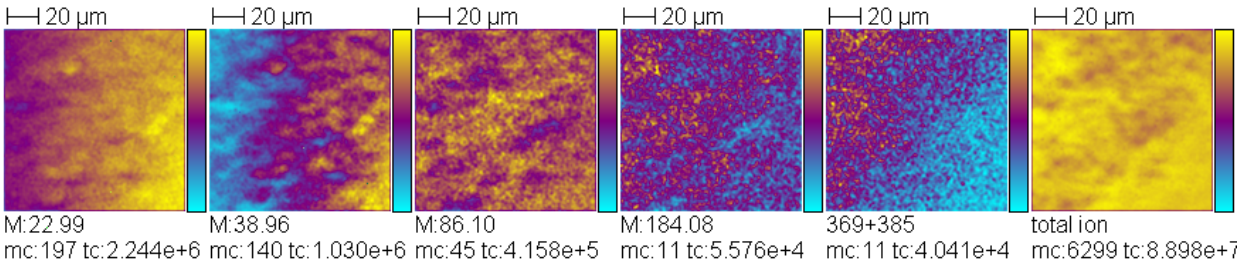
a) total



b) haut



c) milieu



d) bas

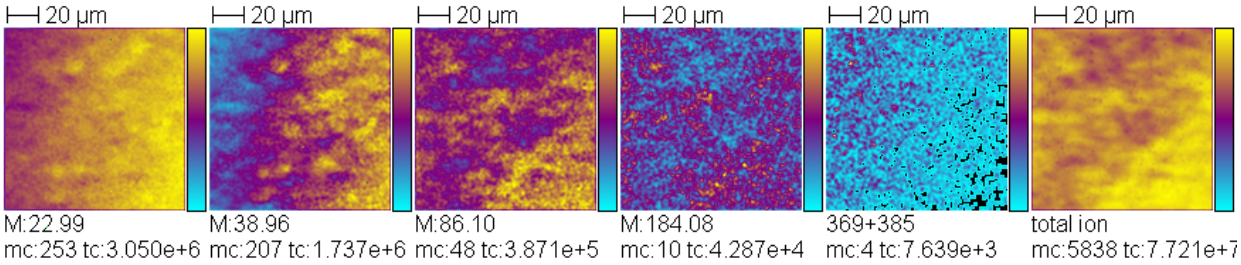


Figure 7: En haut : images vidéo enregistrées avant et après l'expérience de profilage. Les carrés blancs indiquent la zone qui a été imagée. En bas : cartes de densité ionique de différents ions enregistrés à différentes étapes du profilage en profondeur, d'après la référence 21.

Ces résultats montrent que le profilage en profondeur, bien qu'expérimentalement réalisable grâce aux caractéristiques du faisceau d'ions fullerènes, ne fournit pas de résultats satisfaisants lorsque l'échantillon est une coupe de cerveau de rat. Cette conclusion pourrait sembler en opposition avec les résultats présentés par de nombreux autres auteurs travaillant sur le *« dual beam depth profiling »*. Il convient néanmoins de rappeler que dans ces articles, les profondeurs pulvérisées ne dépassent jamais quelques centaines de nanomètres, ce qui est bien plus faible que les profondeurs présentées dans ce travail, et obtenues avec des fluences d'ions primaires C_{60}^+ de quelques 10^{13} ions.cm^{-2}, quand nous avons travaillé avec quelques 10^{16} ions.cm^{-2}. La Figure 8 montre un « zoom » de la Figure 4, avec une échelle en abscisse limitée à 4.0 x 10^{14} ions.cm^{-2}.

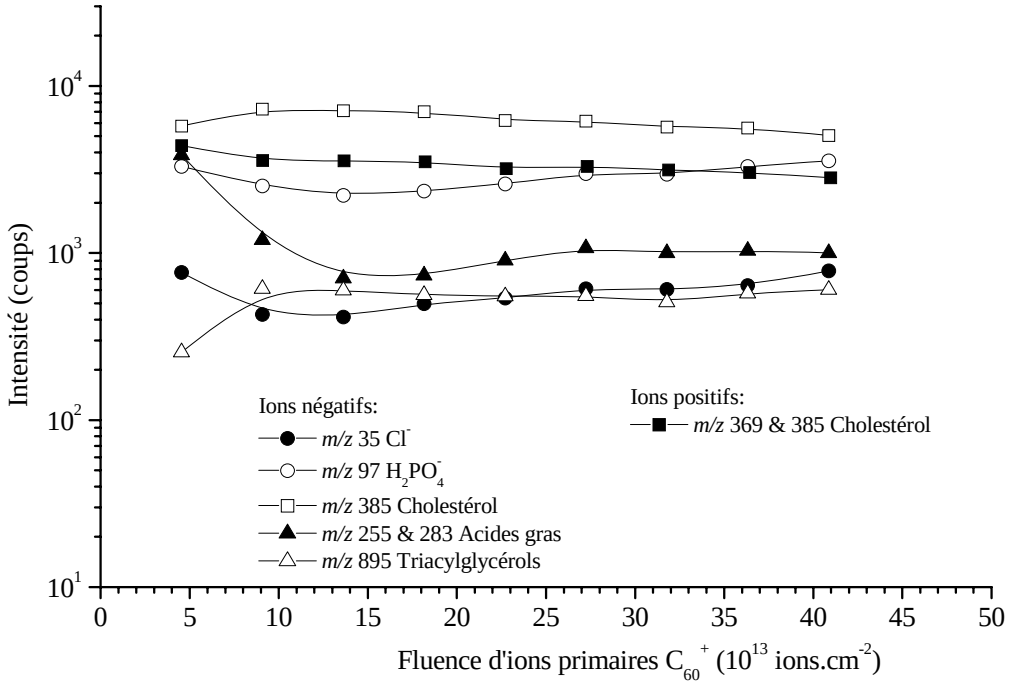


Figure 8: Evolution des intensités de différents ions, en mode positif et négatif, en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+. Les données sont les mêmes que celles de la Figure 4, mais l'échelle des abscisses a été élargie, d'après la référence 21.

La Figure 8 montre finalement que ce travail n'est pas en contradiction avec les études précédemment publiées puisque, dans la même gamme de fluence d'ions primaires, les intensités des ions secondaires restent quasiment constantes, quel que soit le type d'ion observé : fragment, ion atomique, ion moléculaire, positif ou négatif.

4. Conclusion et Perspectives

Les ions fullerènes ont été utilisés pour pulvériser une coupe de cerveau de rat, dans le but d'éprouver la possibilité de réaliser une imagerie 3D par spectrométrie de masse ToF-SIMS, sur un échantillon biologique réel. Bien que les résultats présentés dans cette étude ne soient pas totalement contradictoires avec ceux de la littérature, des fluences d'ions primaires plus élevées ont été utilisées ici, montrant que les lipides sont principalement concentrés à la surface, dans les 200 à 300 nm sous la surface de la coupe. Après avoir décapé ces premières couches, deux problèmes se posent. Le premier est la concentration des lipides encore présents : elle est insuffisante pour obtenir une image contrastée. Le second est l'endommagement induit par le faisceau de pulvérisation qui reste trop élevé, même s'il est bien plus faible qu'avec un faisceau d'ions métalliques. Ces limites montrent par conséquent que le profilage en profondeur d'une coupe de tissu, à une résolution de 1 µm ou moins, par les ions fullerènes à 10 keV, est un chemin semé d'embûches. Certains groupes de recherche sont néanmoins prêts à emprunter cette voie, comme le démontre l'article de Emrys Jones, paru début 2008 dans *Analytical Chemistry*.[26] Ils obtiennent des résultats intéressants en réalisant le profilage en profondeur d'une coupe de cerveau de rat, à l'aide d'ions fullerènes. Dans un premier temps sur des films de phospholipides ou d'albumine de sérum bovin puis dans second temps sur une coupe de cerveau de rat, ils montrent qu'avec des ions fullerènes accélérés non pas à 10 mais à 40 keV, une imagerie 3D est possible, moyennant une préparation d'échantillon alourdie. En effet, pour éviter que les signaux d'intérêt ne diminuent au cours de l'érosion de l'échantillon, les auteurs préconisent de laver la coupe. De cette façon, les ions sodium et potassium sont retirés en grande partie, et les rendements d'émission ionique secondaire des composés organiques s'en trouvent améliorés. Bien que ce lavage soit nécessaire, il n'est pas suffisant. Ainsi, pour éviter que les lipides ne migrent à la surface de l'échantillon (comme nous l'avons évoqué plus haut) l'échantillon ne doit pas être réchauffé entre le moment de la coupe et l'analyse. Ceci oblige donc à réaliser l'expérience à -120°C.

Le domaine du profilage en profondeur (*« depth profiling »*) de tissus biologiques est donc en plein essor, et la faisabilité de l'imagerie 3D par spectrométrie de masse ToF-SIMS sur un échantillon biologique réel a été démontrée. Cependant, Jones *et al.* concèdent eux mêmes que la technique est difficile à mettre en œuvre, tant les paramètres environnementaux et expérimentaux devant être pris en compte sont nombreux[26]. Néanmoins, les efforts

technologiques consacrés aux sources d’ions doivent être poursuivis, tout comme les progrès dans la méthodologie, notamment en ce qui concerne la préparation des échantillons.

Références bibliographiques :

[1] M. Benguerba, A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, H. Joret, Y. Le Beyec, M.G. Blain, E.A. Schweikert, G.B. Assayag and P. Sudraud. Impact of slow gold clusters on various solids: nonlinear effects in secondary ion emission. *Nucl. Instrum. Meth. B.* **1991**; 62(1), 8.

[2] F. Kollmer. Cluster primary ion bombardment of organic materials. *Appl. Surf. Sci*. **2004**; 231-232, 153.

[3] F. Kötter and A. Benninghoven. Secondary ion emission from polymer surfaces under Ar^+, Xe^+ and SF_5^+ ion bombardment. *Appl. Surf. Sci*. **1998**; 133(1-2), 47.

[4] G. Gillen and S. Roberson. Preliminary evaluation of an SF_5^+ polyatomic primary ion beam for analysis of organic thin films by secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **1998**; 12(19), 1303.

[5] A.D. Appelhans and J.E. Delmore. Comparison of polyatomic and atomic primary beams for secondary ion mass spectrometry of organics. *Anal. Chem*. **1989**; 61(10), 1087.

[6] W. Szymczak and K. Wittmaack. Evidence for strongly enhanced yields of negative molecular secondary ions due to bombardment with SF_n cluster ions. *Nucl. Instrum. Meth. B.* **1994**; 88(1-2), 149.

[7] D. Weibel, S. Wong, N. Lockyer, P. Blenkinsopp, R. Hill and J.C. Vickerman. A C_{60} primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics. *Anal. Chem.* **2003**; 75(7), 1754.

[8] E.A. Jones, N.P. Lockyer and J.C. Vickerman. Mass spectral analysis and imaging of tissue by ToF-SIMS - The role of buckminsterfullerene, C_{60}^+, primary ions. *Int. J. Mass Spectrom*. **2007**; 260(2-3), 146.

[9] J.S. Fletcher, N.P. Lockyer, S. Vaidyanathan and J.C. Vickerman. TOF-SIMS 3D biomolecular imaging of *Xenopus laevis* oocytes using buckminsterfullerene (C_{60}) primary ions. *Anal. Chem*. **2007**; 79(6), 2199.

[10] K. Boussofiane-Baudin, G. Bolbach, A. Brunelle, S. Della-Negra, P. Hakansson and Y. Le Beyec. Secondary ion emission under cluster impact at low energies (5-60 keV); influence of the number of atoms in the projectile. *Nucl. Instrum. Meth. B.* **1994**; 88(1-2), 160.

[11] J.S. Fletcher, X.A. Conlan, E.A. Jones, G. Biddulph, N.P. Lockyer and J.C. Vickerman. TOF-SIMS analysis using C_{60}. Effect of impact energy on yield and damage. *Anal. Chem*. **2006**; 78(6), 1827.

[12] Z. Postawa, B. Czerwinski, M. Szewczyk, E.J. Smiley, N. Winograd and B.J. Garrison. Microscopic insights into the sputtering of Ag{111} induced by C_{60} and Ga bombardment. *J. Phys. Chem. B.* **2004**; 108, 7831.

[13] E. Niehuis, T. Grehl, in: J.C. Vickerman, D. Briggs (Eds.). *TOF-SIMS – Surface Analysis by Mass Spectrometry*, Surface Spectra and IM Publications, Manchester and Chichester, **2001**; 757.

[14] A.G. Sostarecz, C.M. McQuaw, A. Wucher and N. Winograd. Depth profiling of Langmuir-Blodgett films with a buckminsterfullerene probe. *Anal. Chem*. **2004**; 76(22), 6651.

[15] L. Zheng, A. Wucher and N. Winograd. Chemically aternating Langmuir-Blodgett thin films as a model for molecular depth profiling by mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2008**; 19(1), 96.

[16] A. Wucher, S. Sun, C. Szakal and N. Winograd. Molecular depth profiling of histamine in ice using a buckminsterfullerene probe. *Anal. Chem.* **2004**; 76(24), 7234.

[17] J. Cheng and N. Winograd. Depth profiling of peptide films with TOF-SIMS and a C_{60} probe. *Anal. Chem*. **2005**; 77(11), 3651.

[18] C.M. Mahoney, S.V. Roberson and G. Gillen. Depth profiling of 4-acetamindophenol-doped poly(lactic acid) films using cluster secondary ion mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2004**; 76(11), 3199.

[19] D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle and O. Laprévote. Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. **2005**; 16(10), 1608.

[20] E. Niehuis. TOF-SIMS studies using a newly developed C_{60}^+ primary ion gun: fundamental aspects and applications. 17th SIMS Workshop, Westminster, Colorado, **2004**.

[21] D. Debois, A. Brunelle and O. Laprévote. Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams. *Int. J. Mass Spectrom*. **2007**; 260(2-3), 115.

[22] SRIM 2003.26, www.srim.org, J.F. Ziegler, J.P. Biersack, U. Littmark. *The Stopping and Ranges of Ions in Solids*, Pergamon Press, New York, **1985**.

[23] H.H. Andersen, A. Johansen, M. Olsen and V. Touboltsev. Gold-cluster ranges in aluminium, silicon and copper. *Nucl. Instrum. Meth. B*. **2003**; 212; 56.

[24] G. Bolbach, A. Viari, R. Galera, A. Brunot and J.C. Blais. Organic film thickness effect in secondary ion mass spectrometry and plasma desorption mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*. **1992**; 112(1), 93.

[25] P. Sjövall, B. Johansson and J. Lausmaa. Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS. *Appl. Surf. Sci.* **2006**; 252(19), 6966.

[26] E.A. Jones, N.P. Lockyer and J.C. Vickerman. Depth profiling brain tissue sections with a 40 keV C_{60}^+ primary ion beam. *Anal. Chem*. **2008**; 80(6), 2125.

Chapitre II

Identification de sang rituel dans des objets d’art africains

Ce travail, réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF / UMR 171) mise en place par Pascale Richardin et Philippe Walter, a fait l'objet d'une partie de la thèse de Vincent Mazel (Université Paris VI, soutenue le 9 octobre 2006) et a été publié dans un article récent.[1] Je n'ai néanmoins pris véritablement part qu'aux expériences menées en imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS et n'ai pas utilisé personnellement les techniques employant le rayonnement synchrotron. Les résultats obtenus grâce à celles-ci seront cependant décrits, car ils permettent une meilleure compréhension du travail effectué, ainsi que l'interprétation qui peut en être faite.

1. Introduction

Contexte archéologique

Les objets d'art africain collectés lors d'expéditions ethnologiques au cours du 20ème siècle représentent des témoignages uniques et précieux de valeurs et de pratiques, qui ont parfois totalement disparu aujourd'hui. Nombre de ces objets sont recouverts de ce que l'on appelle une « patine rituelle », c'est-à-dire une couche de matière appliquée sur l'objet au cours de cérémonies. Différents exemples existent dans la statuaire africaine, notamment chez les Boualé en Côte d'Ivoire, les Lobi du Burkina-Faso ou encore les Dogon et les Bambara au Mali. Au cours de cette étude, nous nous sommes consacrés aux objets de ces deux dernières ethnies.

Le pays Dogon est situé principalement au Mali, au sud-ouest de la boucle du Niger. Il est traversé par la falaise de Bandiagara, qui s'étend sur plus de deux cents kilomètres (Figure 1). Le peuple Dogon se serait installé dans cette zone à partir du 15ème siècle, prenant peu à peu la place d'une autre ethnie, les Tellem.[2]

De nombreuses études ethnologiques ont été menées en pays Dogon, notamment à partir des années 30, sous l'impulsion de Marcel Griaule.[3,4] Les différentes missions ethnologiques ont permis de rapporter en France un grand nombre d'objets rituels Dogon dont la majeure partie se trouve actuellement dans les collections du musée du quai Branly. Ces objets d'art sont souvent liés à une utilisation rituelle avec une iconographie reliée aux mythes et à la cosmogonie, comme cela a pu être démontré.[5] Parmi ces œuvres se trouvent des masques, des

portes sculptées, des peintures rupestres mais aussi des statuettes anthropomorphes qui sont l'objet de notre étude.

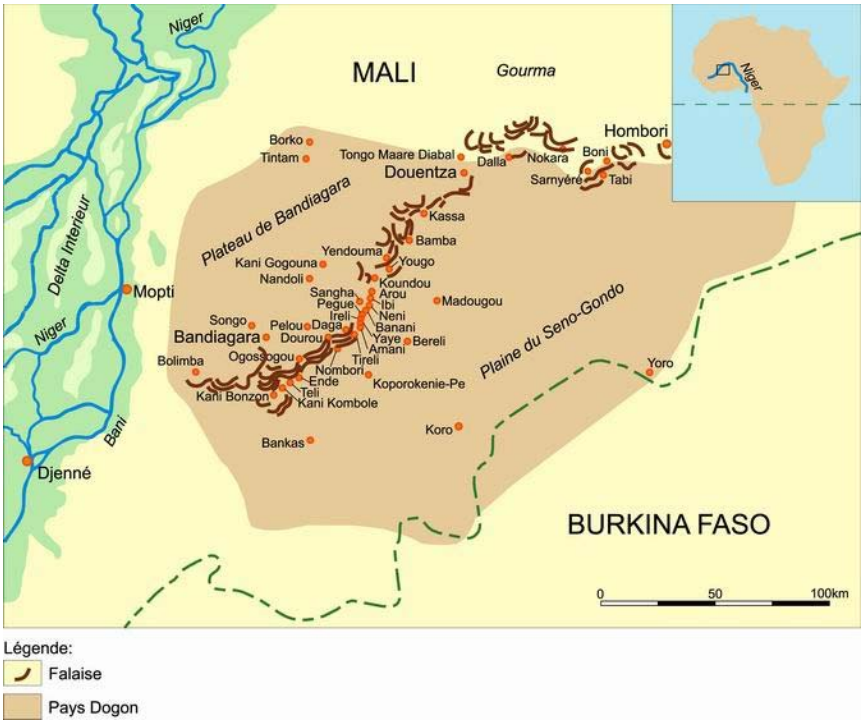


Figure 1: Carte du pays Dogon.

Ces statuettes, qui reçoivent en général le nom de *dege*, sont taillées dans le bois et ont la particularité d'être recouvertes d'une épaisse couche de matière, qui constitue une patine croûteuse. Deux exemples de ces *dege* sont présentés à la Figure 2 :

Figure 2: Statuettes anthropomorphes *dege*, Musée du quai Branly (n° d'inventaire 71.1935.105.159 et 71.1935.60.332).

Les Bambara (ou Bamana) constituent le groupe ethnique le plus important du Mali et se répartissent géographiquement du centre-est à l'ouest du pays. Leur population

représenterait quelques quatre millions de personnes. Les *boliw* (pluriel de boli) sont les objets les plus importants de la culture Bambara.[6] Il existe différentes formes de *boliw*, la plus connue étant la forme zoomorphe dont on peut voir un exemple à la Figure 3 :

Figure 3: *Boli* zoomorphe, Musée du quai Branly (n° d'inventaire 71.1931.74.1091).

Le caractère rituel des statuettes est clairement établi et l'iconographie de la statuaire est très liée aux mythes et au culte des ancêtres. Chez les Dogon, chaque individu possède un *nyama*, qui est la force vitale. Celui-ci ne disparaît pas après la mort, et doit trouver un réceptacle. Les *dege* joueraient ce rôle pour les personnalités importantes du groupe. Au cours des cérémonies, des sacrifices ont lieu, le sang est alors répandu sur les *dege*, transférant ainsi le *nyama* de l'animal sacrifié à la statuette, qui s'en trouve revigorée.[7]

Les *Boliw* représentent le système judiciaire, car ce sont eux qui écoutent les affaires et rendent les jugements, leurs paroles étant rendues par une personne initiée. Ils possèdent également le pouvoir d'empoisonner.[6]

Toutes les informations dont nous disposons sur la composition des patines se basent sur les témoignages collectés lors de missions ethnologiques. Comme nous l'avons déjà dit, ces objets seraient utilisés lors de cérémonies rituelles au cours desquelles ils seraient enduits, par libation, de sang d'animaux sacrifiés et de bouillie de mil.[8] Jusqu'à présent, aucune étude physico-chimique permettant de confirmer ou d'infirmer ces hypothèses, n'avait été publiée. Une première étude sur la composition chimique des patines a été menée au laboratoire, en collaboration avec Vincent Mazel et Pascale Richardin.[9] Outre la mise au point du protocole expérimental qui sera détaillé plus loin, ce travail a également montré que des matières minérales, des protéines, des lipides ainsi que de l'amidon entraient dans la recette des patines. Durant ces premiers travaux, des indices montrant la présence de sang ont été relevés

et une investigation approfondie nous a semblé nécessaire à la confirmation de cette observation.

Le sang – Composition, Analyse

Le sang est un mélange très complexe qui peut être divisé en deux principales fractions : le plasma et les éléments figurés. Le plasma, qui constitue 55% du volume sanguin, est constitué à plus de 90% d'eau, chargée de sels, de lipides et d'hormones. Il est également très riche en protéines, comme l'albumine ou les immunoglobulines.[10] La partie figurée contient trois éléments : les hématies, les leucocytes et les thrombocytes. Les hématies contiennent l'hémoglobine, protéine responsable du transport de l'oxygène dans l'organisme. Elle est constituée de quatre chaînes peptidiques, chacune d'elle contenant un noyau d'hème, soit une porphyrine avec un ion ferreux au centre, responsable de la coloration rouge du sang.

L'analyse de sang dans des résidus archéologiques ou sur des objets anciens est délicate, notamment à cause de l'état de conservation précaire des entités initialement présentes. L'identification du sang requiert toujours la mise en évidence de propriétés qui lui sont spécifiques. Deux catégories d'analyse peuvent alors être envisagées. La première catégorie d'analyse repose sur les propriétés immunologiques du sang, avec des tests anticorps / antigène.[11,12,13] Certains de ces tests, comme le test radio-immunologique (« *Radioimmunoassay* ») permettent même l'identification de l'espèce animale dont provient le sang.[14] Néanmoins, il existe une certaine controverse liée à ces résultats, et la validité des tests menés sur des produits anciens est discutée.[15,16] La seconde catégorie d'analyse du sang repose sur la détection d'hémoglobine, d'hème ou d'hématies, à l'aide de tests colorimétriques par exemple.[17,18] Bien sûr, l'arsenal des techniques de la chimie analytique peut également être mis en œuvre[19] ou encore des techniques cristallographiques.[20] La microscopie électronique à balayage a également été utilisée par Hortola *et al.* sur des roches volcaniques.[21]

De ces deux types d'approches analytiques, nous avons choisi la seconde, en cherchant à mettre en évidence la présence d'hémoglobine dans nos échantillons. Pour cela, un protocole d'analyse, reposant sur la combinaison de différentes techniques non destructives, a été mis au point. Trois techniques d'imagerie chimique ont été mises en œuvre : l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS, l'imagerie par microscopie infrarouge[†] à l'aide du

[†] Il ne s'agit pas ici d'expliquer en détail ces techniques mais d'en présenter les principes afin de mieux cerner l'intérêt de leur utilisation dans le cadre de notre étude.

rayonnement synchrotron, la microfluorescence X† (*XRF, « X-ray fluorescence »*) et le microXANES† *(« X-ray absorption near-edge microspectroscopy »*).

La spectroscopie infrarouge repose sur l'absorption par les molécules d'un échantillon d'une onde électromagnétique de longueur d'onde comprise entre 2,5 et 25 µm. Il est toutefois plus courant d'utiliser la fréquence (nombre d'onde) plutôt que la longueur d'onde en spectroscopie IR, et les spectres sont en général enregistrés pour un balayage du faisceau entre 400 et 4000 cm^{-1}. Lorsque la fréquence du rayonnement est égale à une fréquence de vibration d'une liaison chimique d'une molécule de l'échantillon, le rayonnement va être absorbé et exciter ce mode de vibration. La mesure de cette absorption sélective du rayonnement constitue la base de la spectroscopie infrarouge. Il existe différents modes de vibration, que l'on peut classer en deux catégories :

- ✓ les vibrations d'élongation au cours desquelles les longueurs des liaisons varient (*« streching »*),
- ✓ et les vibrations de déformation au cours desquelles les angles de liaisons varient (*« bending »*).

Un microscope peut être couplé à un spectroscope classique et permet alors de focaliser le faisceau sur une zone de l'échantillon à l'aide d'optiques adaptées. En fonction du mode de détection et de la source utilisée, il devient possible d'analyser à la surface de l'échantillon des zones de l'ordre d'une dizaine de microns. Néanmoins, l'acquisition de cartographies d'une taille de 500 x 500 μm^2 est difficilement réalisable compte tenu de la résolution spatiale qui entraîne une durée d'acquisition de plus de 10 heures. Pour pallier ce problème, il est possible de coupler le microscope infrarouge au rayonnement synchrotron.

L'avantage du rayonnement synchrotron réside dans le fait que l'on obtient une brillance plus importante de deux à trois ordres de grandeur par rapport à une source classique.[22] Les spectres sont ainsi acquis avec une taille de faisceau réduite et un temps d'acquisition plus court. Le bénéfice est double : la résolution spatiale est améliorée et le temps d'analyse diminué.

La fluorescence de rayons X repose quant à elle sur l'interaction entre un faisceau de rayons X et le nuage électronique des atomes composant la matière, ce qui en fait une technique d'analyse élémentaire. Un faisceau de rayons X peut, sous certaines conditions, éjecter un électron du nuage électronique d'un atome, ce qui conduit à l'ioniser. Ce

phénomène va créer une lacune électronique dans le nuage. Il s'en suit une réorganisation qui se traduit par l'émission de rayons X caractéristiques de l'atome en question. La section efficace d'ionisation de l'atome dépend de la longueur d'onde d'excitation. Si l'énergie des rayons X, notée E, est inférieure à l'énergie de liaison de l'électron considérée (E_1), il n'y a pas ionisation. L'ionisation devient possible dès lors que $E = E_1$. Néanmoins, au-delà de ce seuil, la section efficace d'ionisation diminue avec l'augmentation de l'énergie du faisceau incident. Ces variations de sections efficaces sont très importantes car elles montrent que, pour exciter correctement un élément, il faut que l'énergie du faisceau incident soit très légèrement supérieure à son seuil d'ionisation. Ceci justifie le fait que l'on utilise généralement des faisceaux de rayons X couvrant le domaine en énergie le plus large possible, ce qui permet d'exciter une large gamme d'atomes, rendant l'analyse sensible à un grand nombre d'éléments chimiques.

Enfin, le µXANES exploite lui aussi les propriétés d'un faisceau de rayons X. Chaque atome possède un coefficient d'absorption linéaire qui lui est propre, et une analyse µXANES consiste à mesurer les variations de ce coefficient, en fonction de l'énergie du faisceau de rayons X incident, au voisinage du seuil d'absorption de l'élément considéré. Un spectre d'absorption X peut être divisé en trois parties : l'avant seuil, le XANES qui s'étend de quelques eV avant le seuil à 50 eV après celui-ci, et enfin l'EXAFS (*« Extended X-ray Absorption Fine Structure »*), qui s'étend de 50 eV à 1000 eV après le seuil.

Pour un atome isolé, le coefficient d'absorption, nul avant le seuil, croît brusquement à l'énergie de seuil puis varie de façon monotone après le seuil. Cette situation change radicalement dans un solide, c'est-à-dire quand l'atome absorbeur possède un environnement particulier. En effet, les photoélectrons produits lors de l'absorption des rayons X ne seront plus libres, mais vont subir des collisions avec les atomes qui entourent l'élément absorbeur. Ce type d'interaction modifie l'état quantique final du photoélectron et donc le coefficient d'absorption. De plus, le degré d'oxydation de l'élément absorbeur va aussi jouer un rôle dans la valeur du coefficient. La Figure 4 montre l'aspect d'un spectre d'absorption X.

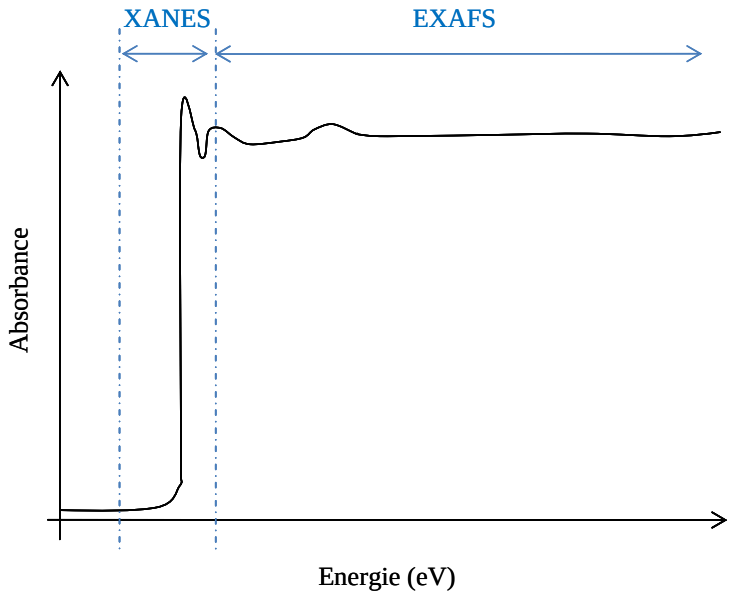


Figure 4: Exemple de spectre d'absorption X.

Ces différentes techniques ont été choisies pour leur complémentarité et leur capacité à travailler avec des échantillons de taille réduite, et ce, d'une façon non-invasive. Ce dernier point est essentiel lorsque l'on travaille sur des échantillons archéologiques. Leur utilisation combinée a pour but de mettre en évidence la présence de sang à la surface des échantillons et de cette façon, mieux analyser ces patines, notamment dans un but de datation ou de chronologie. Améliorer le niveau de connaissances actuelles sur les patines permettrait une meilleure compréhension de la statuaire du pays Dogon.

2. Protocole expérimental

2.1. Préparation des échantillons

2.1.1. Produits de référence

Des produits de références, que nous nous sommes procurés chez Sigma Aldrich, ont été préalablement analysés afin de disposer de points de comparaison avec les données obtenues à partir des échantillons archéologiques. Nous avons travaillé sur l'hémine, qui est la forme oxydée de l'hème (seule forme commercialement disponible de l'hème), mais aussi sur d'autres porphyrines comme la Zn(II)-protoporphyrine IX et la protoporphyrine IX. De

l'hémoglobine bovine a également été analysée. Les analyses ont été effectuées sur les produits purs, préalablement réduits en poudre fine et compactés sous forme de pastille.

2.1.2. Description des échantillons archéologiques

Les échantillons analysés ont été prélevés sur des objets appartenant aux collections du Musée du quai Branly à Paris. Les patines de huit objets provenant du Mali ont été analysées. Parmi eux, trois étaient des objets rituels de la culture Dogon. Les cinq autres étaient des *boliw*. Tous ces objets ont été collectés au cours de missions ethnologiques (première moitié du 20ème siècle), excepté un des *boliw* (n° d'inventaire 73.1967.6.1), qui a été acquis en 1967 par le Musée des Arts d'Afrique et d'Océanie de Paris. Ils pourraient avoir été fabriqués entre la fin du 19ème et le début du 20ème siècle, excepté une sculpture Dogon (n° d'inventaire 71.1935.105.156) qui pourrait être bien plus ancienne (du 12ème au 14ème siècle).

Les objets Dogon sont des statuettes anthropomorphes en bois. Deux d'entre elles sont recouvertes d'une couche hétérogène de patine (n° d'inventaire 71.1935.60.332 et 71.1935.105.169) tandis que la troisième (n° d'inventaire 71.1935.105.156) possède une surface homogène. Concernant les *boliw*, deux d'entre eux possèdent une forme zoomorphe faite d'une structure de bambou (n° d'inventaire 71.1931.74.1091 et 73.1967.6.1). Ils sont néanmoins tous recouverts d'une épaisse couche de patine noire.

La liste complète des échantillons, dénommés par leur numéro d'inventaire, ainsi qu'une description succincte est donnée dans le Tableau 1 :

Echantillon	Origine ethnique de l'objet	N° d'inventaire	Type d'objet
D1	Dogon	71.1935.105.169	Statuette anthropomorphe
D2	Dogon	71.1935.60.332	Statuette anthropomorphe
D3	Dogon	71.1935.105.156	Statuette anthropomorphe
B1	Bamana	71.1931.74.1091	Objet zoomorphe
B2	Bamana	73.1967.6.1	Objet zoomorphe
B3	Bamana	71.1902.12.10	Objet composite
B4	Bamana	71.1910.1.93	Objet composite
B5	Bamana	71.1902.10.15.1-2	Objet composite

Tableau 1: Description des échantillons étudiés.

2.1.3. De l’objet d’art à l’échantillon analysable

La préparation des échantillons débute, dans le cas d’étude d’objets d’art ou archéologiques, par un prélèvement direct sur l’œuvre. Celui-ci doit répondre à deux critères importants. Tout d’abord, il ne doit pas dégrader l’œuvre, c'est-à-dire qu’il ne doit pas altérer sa qualité visuelle, ni créer des défauts susceptibles d’accélérer sa dégradation. Le second point important, relié aux études physico-chimiques, est la représentativité de l’échantillon, qui est toujours un problème important lors d’études sur des œuvres d’art. C’est donc en tenant compte de ces deux critères que les prélèvements ont été effectués. Une lame neuve de bistouri en acier a été utilisée pour chaque objet, pour éviter les éventuelles contaminations (Figure 5).

Figure 5: Exemple de positionnement d’un prélèvement effectué sur la statuette 71.1935.60.332.

L’étude de la composition et de la structure interne d’un échantillon nécessite la préparation de coupes stratigraphiques. Le protocole de préparation des échantillons se déroule en trois étapes. Sa mise en œuvre est délicate et le temps nécessaire est de plusieurs heures. Les trois étapes sont :

- ✓ Inclusion de l’échantillon dans un bloc de résine. La résine utilisée est une résine thermodurcissable (H59, Sodemi). Une sous-couche est coulée dans un moule parallélépipédique et laissée à polymériser. Dans un second temps, l’échantillon

est déposé, sous loupe binoculaire, sur cette sous-couche et recouvert d'une seconde couche de résine.

- ✓ Taille du bloc de résine. Cette étape consiste à redimensionner le bloc de résine afin de le réduire en taille et à rapprocher l'échantillon de la surface. Le plus important dans cette étape est de le laisser affleurer sous la résine.

- ✓ Coupe par ultramicrotomie à l'aide d'un couteau en diamant pour obtenir une coupe transverse de l'échantillon. Cette étape a été réalisée au Centre Commun de Microscopie d'Orsay (UMR CNRS 8080), en collaboration avec Jéril Degrouard. Pour diminuer la surface de coupe, le bloc de résine est taillé en pyramide tronquée à l'aide d'une fraiseuse. Deux ultramicrotomes (Leica Ultracut UCT et Reichert-Jung Ultracut E) ont ensuite été utilisés, avec un couteau diamant Diatome. Les coupes mesurent 6 mm de large et 0.5 µm d'épaisseur. Néanmoins, dans notre cas, nous avons travaillé avec la pyramide tronquée et non les coupes.

La Figure 6 résume schématiquement les différentes étapes du protocole :

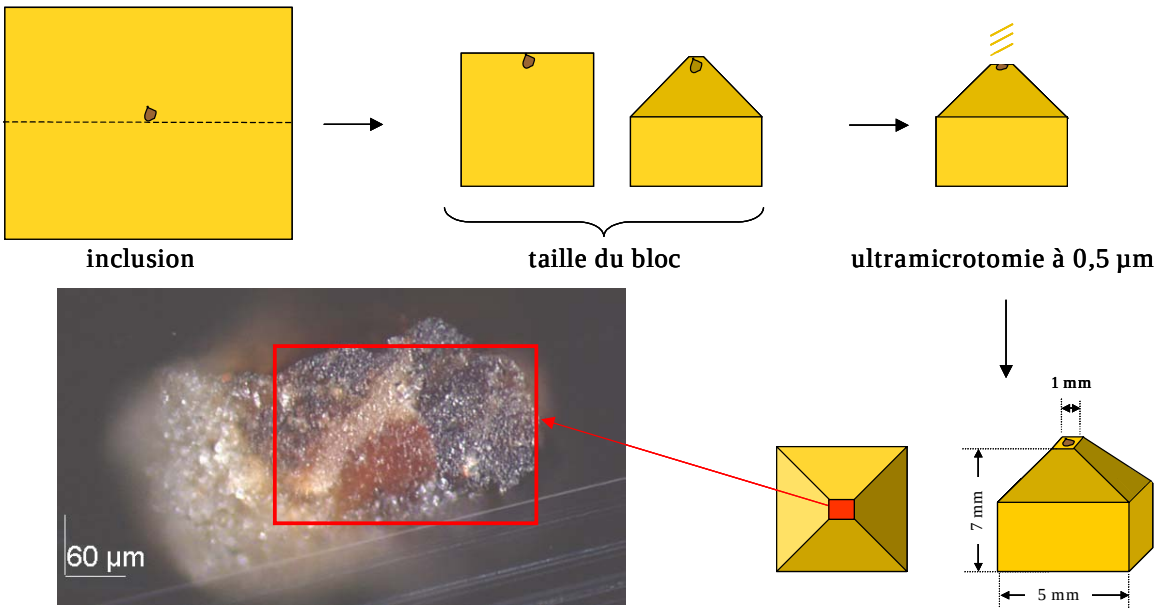


Figure 6: Résumé des différentes étapes de la préparation des échantillons pour l'imagerie chimique.[23]

Les échantillons obtenus sont plans et exempts de contaminations. Les plus classiques sont les poly(diméthyl)siloxanes (PDMS), très facilement détectés en spectrométrie de masse ToF-SIMS. Ces pollutions de surface conduisent, en mode d'ionisation positif, à des ions de

rapport *m/z* 73,05 ($(CH_3)_3Si^+$), 147,07 ($C_5H_{15}OSi_2^+$), 207,03 ($C_5H_{15}O_3Si_3^+$), 221,09 ($C_7H_{21}O_2Si_3^+$) et 281,05 ($C_7H_{21}O_4Si_4^+$), qui peuvent s'avérer très gênants.[24]

Reste alors à positionner correctement les pyramides tronquées sur le porte échantillon du spectromètre ToF-SIMS. Cette étape particulièrement délicate a nécessité la réalisation d'un adaptateur permettant de fixer les échantillons sur le support. Celui-ci a une forme de « V » avec un angle de 90°, ce qui permet d'y fixer correctement le sommet de la pyramide obtenue après ultramicrotomie (Figure 7) :

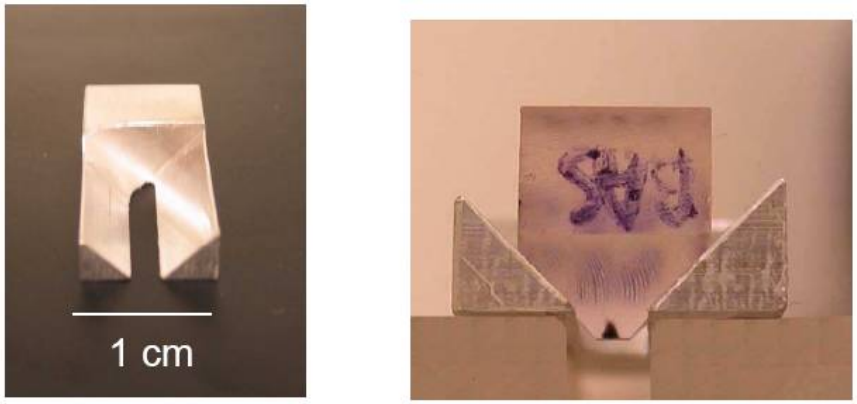


Figure 7: Adaptateur pour le support ToF-SIMS utilisé pour l'analyse des échantillons enrobés. Vue générale (gauche) et vue avec un échantillon (droite).[23]

2.2. Stratégie analytique

La stratégie est divisée en trois étapes. La première étape consiste à vérifier la présence de protéines par microscopie infrarouge et spectrométrie de masse ToF-SIMS. En effet, les protéines représentent la majeure partie du sang séché. Si les protéines ne sont pas détectées, cela signifie soit que le sang n'est pas présent, soit que les protéines sont totalement dégradées. Dans ce cas, une autre voie d'analyse doit être empruntée.

Pour les échantillons dans lesquels la présence de protéines a été révélée, la spectrométrie de masse ToF-SIMS est utilisée pour l'identification de l'hème. Si l'hème est présent, la présence de sang est avérée. Si l'hème n'est pas détecté, cela peut signifier soit que les protéines décelées précédemment ne proviennent pas du sang, soit que l'hème est trop dégradé pour être repéré. Cette dernière hypothèse mène à la troisième étape du protocole : la recherche du fer par microfluorescence X. La présence de fer combinée à celle de protéines

représenterait, dans le contexte rituel des objets, une solide preuve de l'utilisation du sang lors des cérémonies. Cependant, le fer pourrait provenir de minéraux entrant dans la composition des patines. Pour distinguer le fer minéral du fer engagé dans des molécules organiques (protéines), les mesures de microfluorescence X sont couplées à des analyses µXANES. De cette façon, nous obtenons l'empreinte de l'environnement du fer, et ceci permet de discriminer le fer provenant d'une phase minérale du fer provenant du sang.

2.3. Techniques analytiques mises en œuvre

Nous ne détaillerons dans cette partie que les techniques utilisant le rayonnement synchrotron. Les expériences de microscopie infrarouge et microfluorescence X et µXANES ont été réalisées par Pascale Richardin et Vincent Mazel.

2.3.1. Microscopie infrarouge

Les expériences ont été réalisées à l'ESRF (*« European Synchrotron Radiation Facility »*) à Grenoble sur la ligne ID21. L'appareil utilisé est un spectromètre Nexus couplé à un microscope Continuµm (Nicolet). Toutes les mesures ont été réalisées en mode de réflexion spéculaire, et les mesures de bruit de fond (*« backgrounds »*) ont été enregistrées sur un miroir en or. La taille du faisceau était de 12 x 12 μm^2, avec une accumulation de 40 scans par spectre. Les images ont été enregistrées avec un pas de 10 µm dans les deux directions.

2.3.2. Microfluorescence X et µXANES

Les images élémentaires ont été réalisées en utilisant la même ligne synchrotron que la microscopie infrarouge, à l'ESRF de Grenoble. Les caractéristiques techniques et les réglages de la ligne ont permis d'obtenir une taille de faisceau de 0,4 x 1,2 μm^2. De plus l'utilisation du rayonnement synchrotron a permis l'acquisition du spectre d'absorption X au seuil du fer, ce qui a fourni l'empreinte de l'environnement et de l'état d'oxydation du fer. L'énergie d'excitation utilisée était de 7,2 keV, juste supérieure à l'énergie d'ionisation du fer (7,11 keV) et donc parfaitement adaptée à la détection de cet élément. Des zones de 95 x 95 μm^2 ont pu être analysées avec un pas de 1 µm dans chaque direction. Il a donc été

possible de reconstruire la distribution spatiale du fer. Les cartographies en fluorescence X ont permis de choisir des points sur lesquels réaliser les spectres XANES, correspondant soit à des zones contenant visiblement du fer minéral, soit à des zones semblant uniquement contenir de la matière organique. Les spectres XANES ont ensuite été acquis pour une énergie comprise entre 7,1 et 7,3 keV, avec des pas de 0,2 eV. Les spectres ont été normalisés à 0 avant le seuil et à 1 loin après celui-ci afin d'en faciliter la comparaison. 30 spectres ont été enregistrés pour chaque point repéré par microfluorescence X.

3. Résultats et Discussion

3.1. Localisation des protéines

La présence de protéines est mise en évidence aussi bien par ToF-SIMS que par microspectroscopie infrarouge.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, seuls des ions de rapport masse-sur-charge inférieur à 1500 Da sont désorbés, ce qui rend la détection d'ions moléculaires de protéines impossible. Néanmoins, des fragments de basse masse sont observés (immoniums). Différentes études ont montré qu'il s'agit entre autres de fragments d'acides aminés.[25,26] L'interprétation de ces fragments est résumée dans le Tableau 2 :

Rapport *m/z*	Ion	Acide aminé
30,03	CH_4N^+	Glycine
44,05	$C_2H_6N^+$	Alanine
70,06	$C_4H_8N^+$	Proline
72,08	$C_4H_{10}N^+$	Valine
84,08	$C_5H_{10}N^+$	Lysine
86,09	$C_5H_{12}N^+$	Leucine/Isoleucine
110,07	$C_5H_8N_3^+$	Histidine
120,08	$C_8H_{10}N^+$	Phénylalanine
130,06	$C_9H_8N^+$	Tryptophane

Tableau 2: Liste des fragments d'acides aminés utilisés pour la caractérisation et la localisation des protéines en ToF-SIMS, d'après la référence 1.

Pour affirmer que l'échantillon contient bien des protéines, il faut que ces fragments d'acides aminés soient tous co-localisés sur l'image ionique (Figure 8).

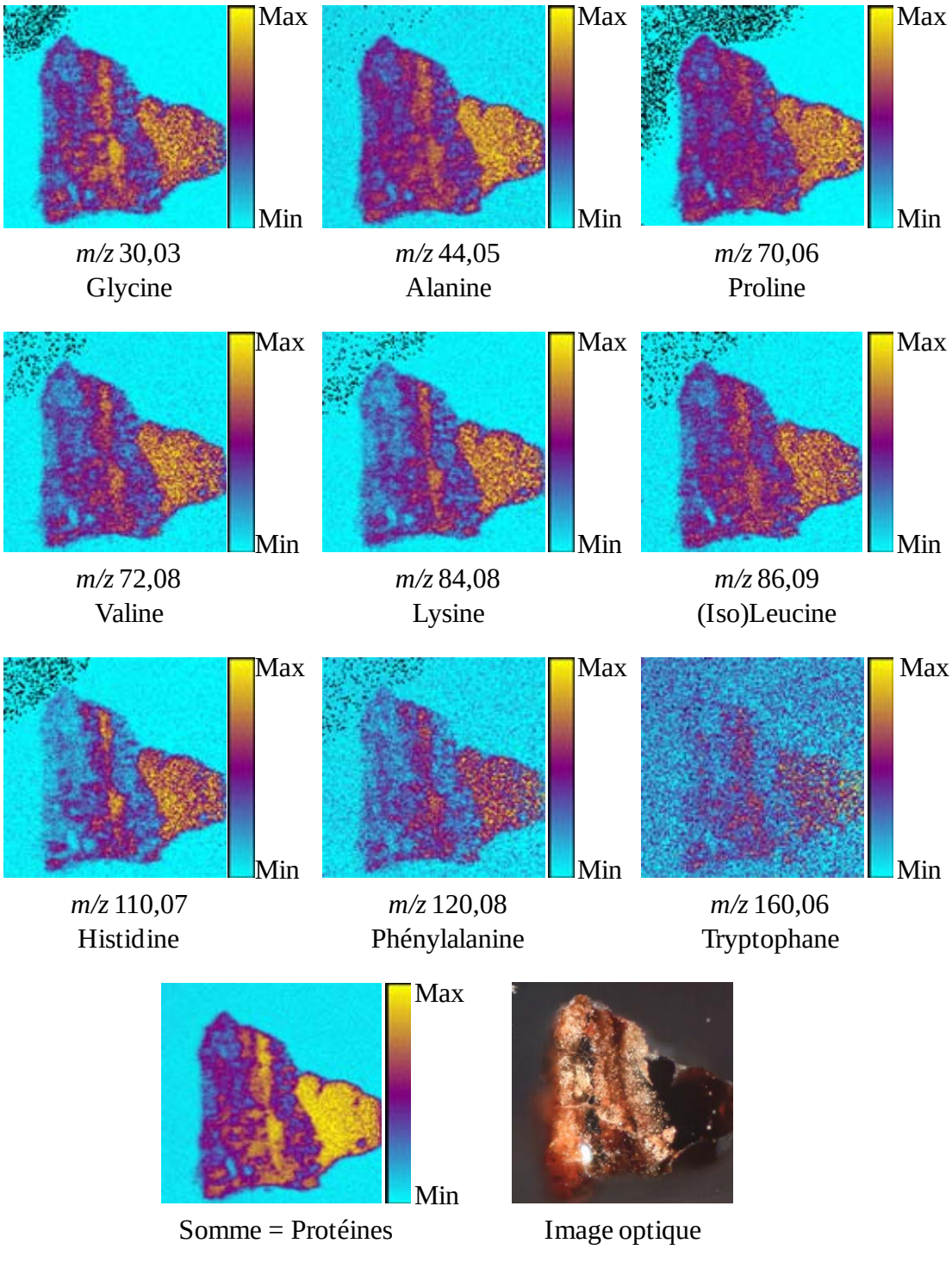


Figure 8: Étude en spectrométrie de masse ToF-SIMS d'un fragment de patine de la statuette 71.1931.105.169 (D1). Images correspondant à différents fragments d'acides aminés et image correspondant à leur somme, Images de 500 x 500 µm^2 (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,49 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

En spectroscopie infrarouge, l'image des protéines est obtenue en traçant l'intensité de la bande amide I, à un nombre d'onde de 1660 cm^{-1}.

La comparaison des images obtenues par les deux techniques permet de confirmer la localisation. Une illustration de cette corrélation ToF-SIMS / SR-µ-FT-IR est donnée à la Figure 9, pour les échantillons D1 et B2 :

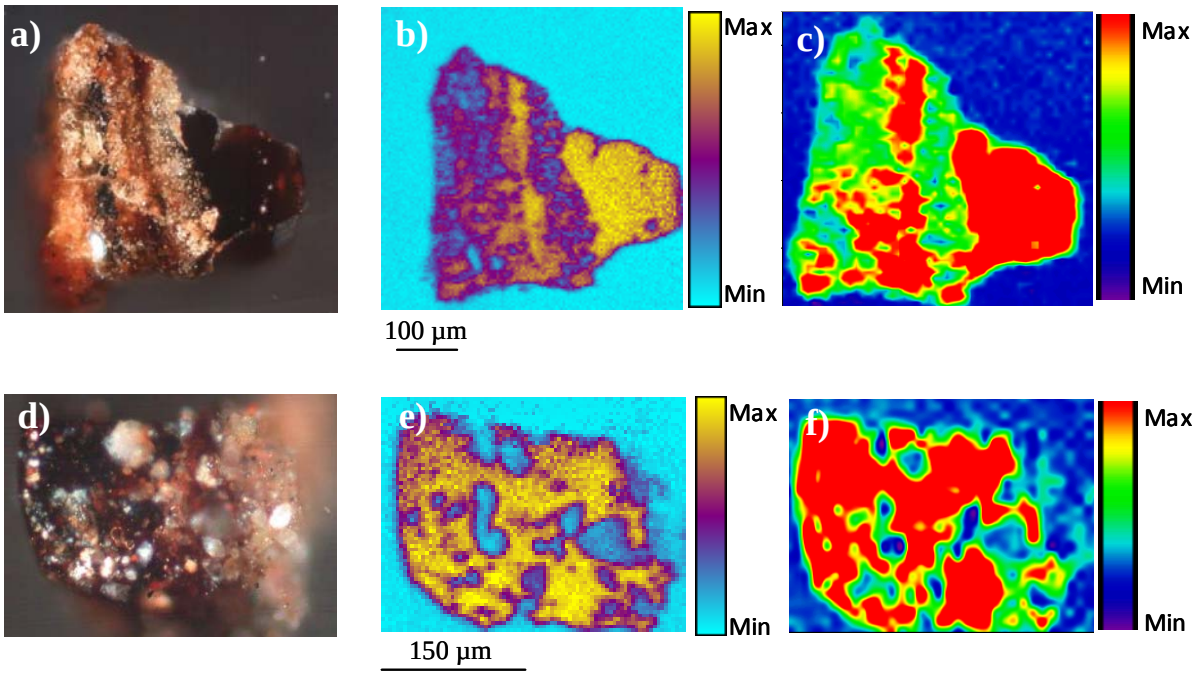


Figure 9: Localisation des protéines pour les échantillons D1 (a, b, c) et B2 (d, e, f) ; a), d) Images microscopiques des coupes ; b), e) Distributions spatiales des protéines en ToF-SIMS (somme des acides aminés), Images de 500 x 500 μm^2 (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}), c et f : Images infrarouge de la bande amide I des protéines.

L'utilisation combinée de ces deux techniques a permis de mettre en évidence que les huit échantillons étudiés possèdent, dans des proportions variables, des zones composées exclusivement de protéines. L'étude s'est poursuivie par la caractérisation de l'hème par spectrométrie de masse ToF-SIMS, tout d'abord sur des produits de référence, puis sur les échantillons archéologiques.

3.2. Étude des produits de référence

L'hème, de masse molaire 616,18 $g.mol^{-1}$, est un complexe entre une protoporphyrine et un ion fer II (Figure 10). C'est un des constituants de l'hémoglobine, responsable du transport de l'oxygène dans l'organisme.

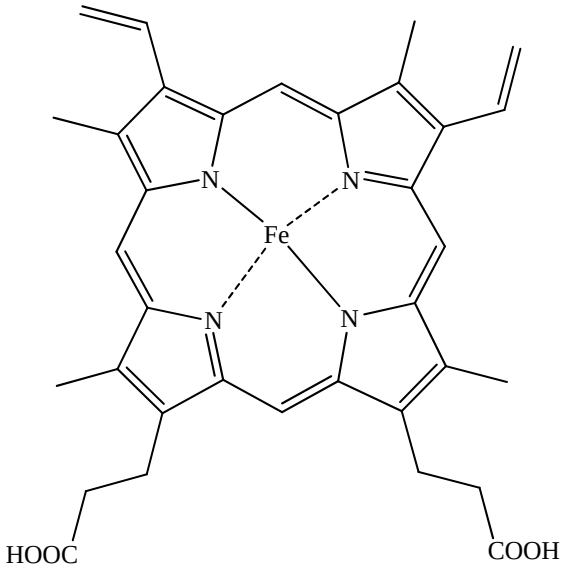


Figure 10: Structure de l'hème.

Avant d'analyser d'éventuelles traces de sang à la surface de nos échantillons, nous avons travaillé sur des produits de référence, afin de vérifier que l'hème était bien détectable en SIMS.

Nous avons tout d'abord étudié l'hémine (chlorure ferrique de protoporphyrine IX), pour laquelle le mode d'ionisation positif s'est révélé le plus adéquat. Le spectre de masse obtenu est présenté à la Figure 11a. Celui-ci montre deux caractéristiques. La première est le pic au rapport *m/z* 616,2, qui peut être attribué au complexe intact. Les massifs isotopiques des ions $[M]^+$ et $[M+H]^+$ se superposent sur le spectre, il est par conséquent difficile de trancher quant à l'attribution exacte de ce signal. La seconde caractéristique du spectre est un profil de répartition d'ions particulièrement intéressant, sous la forme d'un massif de pics compris entre *m/z* 350 et 600, et centré autour de *m/z* 480. Ce massif est complexe et composé de pics espacés de 14 Da, indiquant que le squelette de la molécule subit des fragmentations en source.

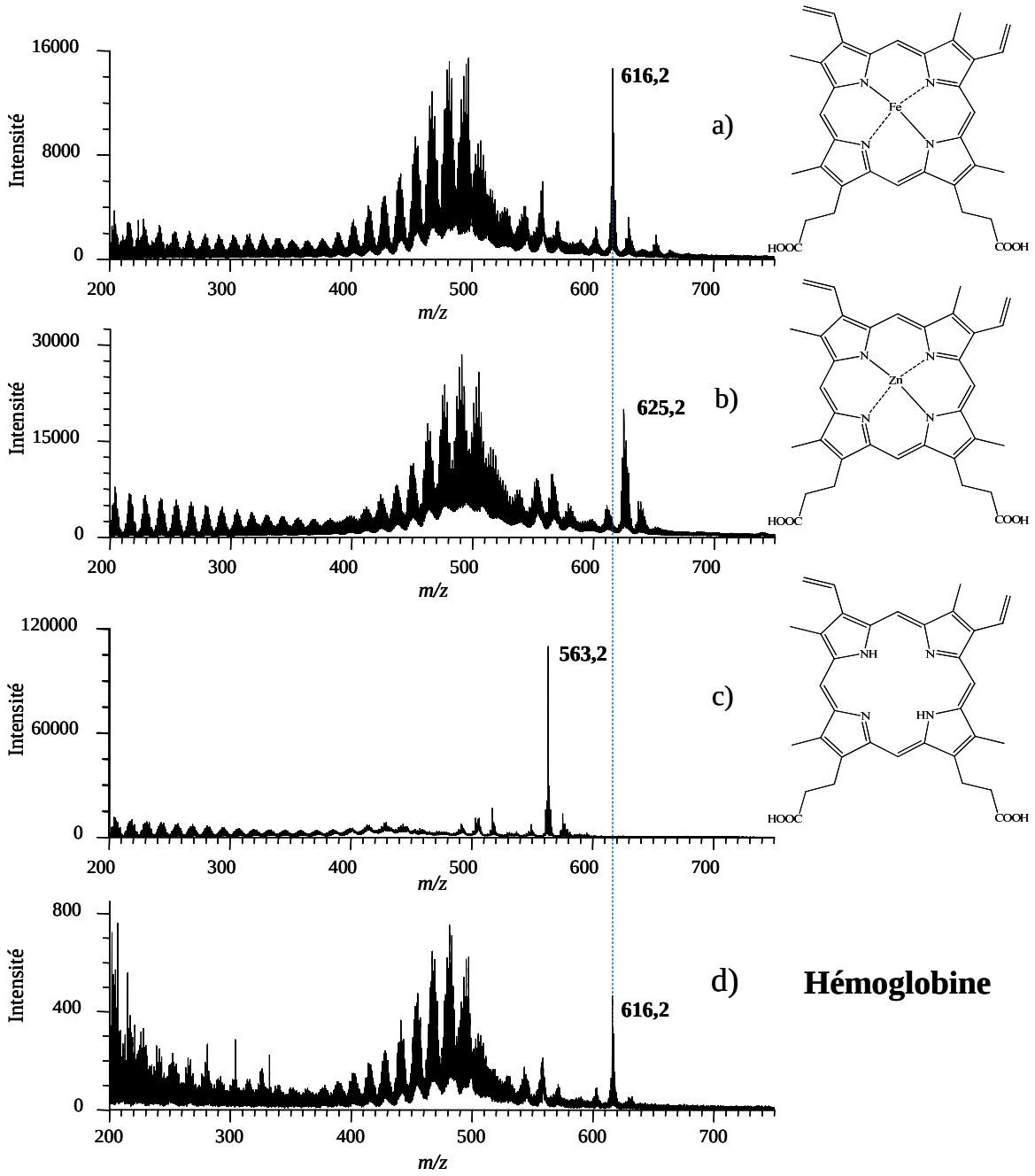


Figure 11: Spectres de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, de produits de référence de porphyrines et de l'hémoglobine. (a) Hémine, (b) Complexe Zn (II) – protoporphyrine IX, (c) Protoporphyrine IX, (d) Hémoglobine.

Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué des expériences de *« PSD-like »*[27] (*cf.* Introduction générale de ce manuscrit) sur les ions non fragmentés. Aucun de ces pics n'a pu être observé comme provenant de fragmentations en vol. Nous en avons donc conclu que ces fragmentations ont lieu uniquement en source, au cours d'un processus plus énergétique, que lors du vol des ions dans l'analyseur. De précédentes études en spectrométrie de masse par ionisation chimique ont montré que le macrocycle des porphyrines pouvait subir des

fragmentations conduisant à des fragments de type mono-, di- et tri-pyrroles.[28,29,30] Dans notre cas, la gamme de masse dans laquelle se trouvent les fragments nous indique que nous avons à faire à des ions de type tripyrroles. Pour vérifier ces interprétations, nous avons enregistré le spectre de masse du complexe au zinc (Figure 11b), et nous obtenons des ions non fragmentés et une large distribution de fragments. Néanmoins, deux différences méritent d'être relevées. Tout d'abord, le rapport *m/z* du principal ion non fragmenté est décalé de +9 uma, ce qui correspond à la différence de masse entre l'ion $[M]^+$ de l'hémine et l'ion $[M+H]^+$ du complexe Zn – protoporphyrine. La seconde différence réside dans le fait que les rapports *m/z* des ions fragments sont déplacés vers la droite du spectre. La seule différence chimique entre le complexe au zinc et l'hémine résidant dans la nature du métal impliqué dans le complexe, nous pouvons en conclure que le métal est toujours présent dans la structure des fragments. Un spectre de masse de la protoporphyrine IX seule a également été enregistré (Figure 11c). Là encore le macrocycle subit des fragmentations mais les ions en résultant montrent des rapports *m/z* plus faibles, en raison de l'absence de métal, et sont beaucoup moins intenses que les ions-fragments observés jusqu'alors. Nous en avons déduit que la fragmentation du squelette de la protoporphyrine était favorisée par la présence de métal.

L'analyse de ces produits de référence a démontré la possibilité de détecter l'hème par spectrométrie de masse ToF-SIMS, soit grâce à des ions intacts, soit grâce à une distribution d'ions-fragments contenant le métal. Ceci est confirmé sur le spectre ToF-SIMS de l'hémoglobine (Figure 11d).

3.3. Étude des objets d'art par spectrométrie de masse ToF-SIMS

Parmi les huit échantillons que nous avons analysés, trois cas de figure ont été observés. Le premier cas correspond à l'objet nommé B3. La Figure 12 montre le spectre de masse enregistré pour cet échantillon. On y retrouve le pic à *m/z* 616,2 et la série de fragments compris entre *m/z* 400 et 500, ce qui nous permet d'identifier indubitablement l'hème. De plus, si l'on trace la distribution spatiale des fragments, on obtient une image ionique parfaitement superposable à celle des protéines (Figure 13).

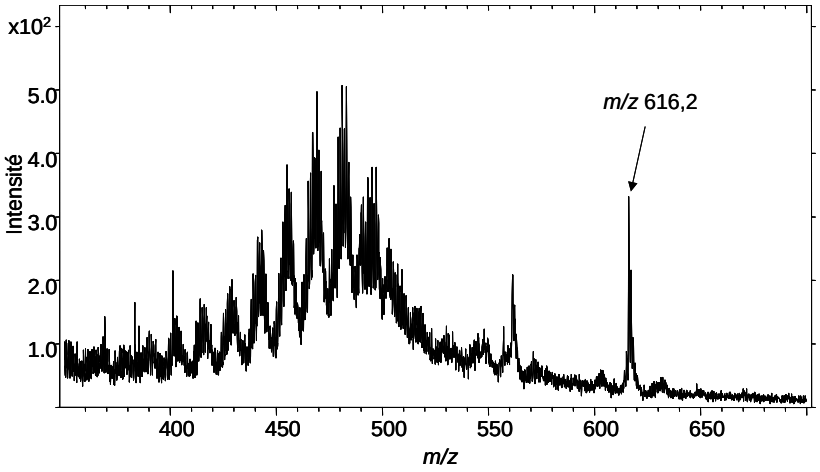


Figure 12: Spectre de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, d'un échantillon provenant de l'objet nommé B3, montrant la présence d'hème. (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

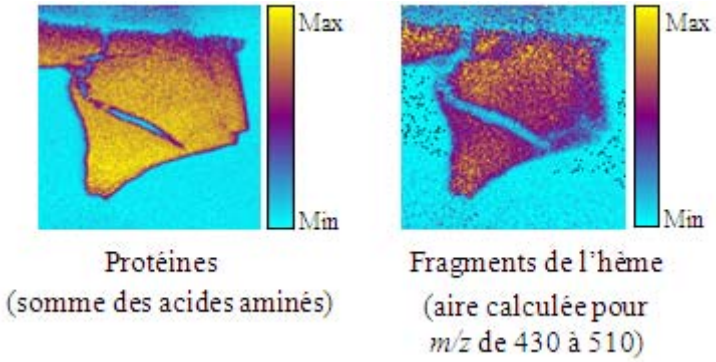


Figure 13: Distribution spatiale des protéines et des fragments de l'hème sur un échantillon provenant de l'objet nommé B3. Images de 500 x 500 µm^2 (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Nous pouvons donc conclure que cet échantillon et d'une façon plus globale la patine le recouvrant, est composée de sang séché. Cependant, cet échantillon représente le cas idéal.

Le second cas de figure rencontré concerne les échantillons issus des objets nommés B1, B2 et B5. Les spectres de masse ToF-SIMS obtenus pour ces échantillons montrent toujours les pics caractéristiques de l'hème, mais les intensités obtenues sont, de façon générale, plus faibles. La Figure 14 présente le spectre enregistré pour l'échantillon issu de l'objet nommé B1. Comme on peut le voir, le rapport signal-sur-bruit est nettement plus faible que pour l'échantillon nommé B3. Les informations apportées par ce spectre sont néanmoins suffisamment convaincantes pour affirmer qu'il y a ici aussi présence de sang. De plus, si on

trace la distribution spatiale des fragments de l'hème, nous obtenons là encore une image ionique superposable à celle des protéines (Figure 15).

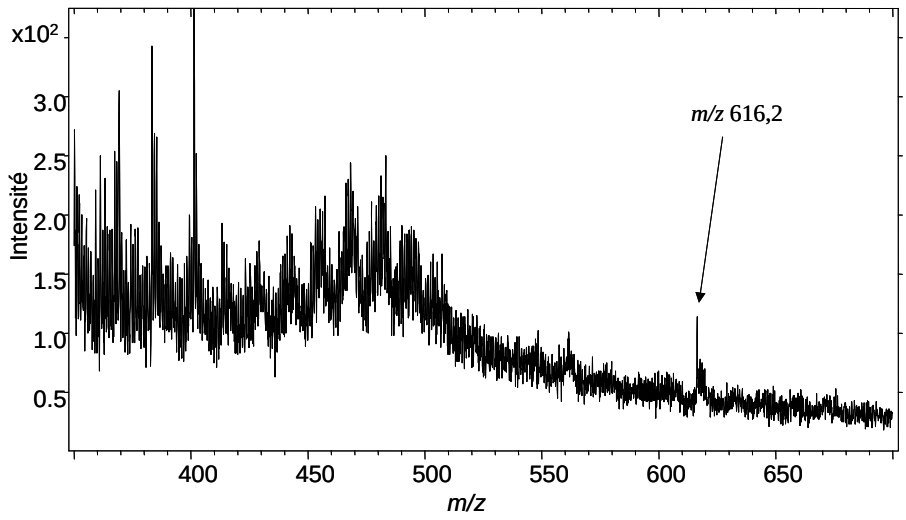


Figure 14: Spectre de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, d'un échantillon provenant de l'objet nommé B1.

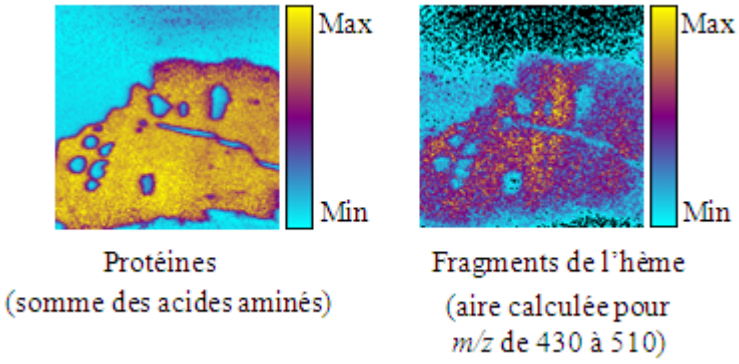


Figure 15: Distribution spatiale des protéines et des fragments de l'hème sur un échantillon provenant de l'objet B1. Images de 500 x 500 µm^2 (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,1 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

La concentration en hème semble donc moins importante, probablement à cause de dégradations subies par l'échantillon.

Enfin, pour les quatre objets restants (nommés D1, D2, D3 et B4), l'hème n'a pu être détecté par spectrométrie de masse ToF-SIMS. Il semble que pour ces prélèvements, les limites de l'identification du sang par ToF-SIMS aient été atteintes : soit les protéines détectées à la surface de ces échantillons ne proviennent pas de sang, soit l'hème est trop dégradé pour être détecté.

3.4. Étude des objets d'art par microfluorescence X et µXANES

L'étude de ces 4 échantillons s'est donc poursuivie en microfluorescence X et µXANES. Comme nous l'avons évoqué plus haut, la présence de fer dans les « zones de protéines » des échantillons constitue un indice supplémentaire dans la recherche de sang au sein de ces échantillons. De plus, l'utilisation du XANES permet de connaître l'environnement du fer (minéral ou organique) ainsi que le degré d'oxydation du fer détecté.

Pour chaque échantillon, une petite zone (où des protéines étaient détectées en ToF-SIMS et en spectroscopie FT-IR) a d'abord été analysée en microfluorescence X. Une attention particulière doit être portée aux résultats provenant de l'analyse par les rayons X. En effet, si on compare les résultats de fluorescence X à ceux obtenus en ToF-SIMS ou même en spectroscopie FT-IR, il faut tenir compte de la profondeur de pénétration des différents faisceaux. Si, en ToF-SIMS, l'émission ionique secondaire se fait depuis les toutes premières couches atomiques de l'échantillon (1 à 5 nm), le rayonnement IR ne pénètre que de quelques micromètres dans la matière et les rayons X vont aller au cœur de l'échantillon (plusieurs dizaines de microns). Il est donc tout à fait possible de détecter, par les rayons X, du fer contenu dans une partie minérale, invisible des deux autres techniques. Or, ces zones minérales ne nous intéressent pas dans le cadre de notre étude sur le sang.

Pour être sûrs d'analyser une partie organique de notre échantillon, nous nous sommes appuyés sur le raisonnement suivant. Si le fer détecté provient d'une métallo-protéine, sa répartition spatiale devrait être homogène. En revanche, si le fer détecté provient d'argiles, sa répartition spatiale sera hétérogène, car les argiles présentent souvent une répartition en grains.

La Figure 16b montre la cartographie du fer dans une zone riche en protéines, enregistrée pour l'échantillon issu de l'objet nommé D1. On y distingue des zones homogènes (au centre) et inhomogènes (notamment sur le côté gauche). La Figure 16c présente le spectre obtenu pour la zone centrale (délimitée en blanc sur la Figure 16b).

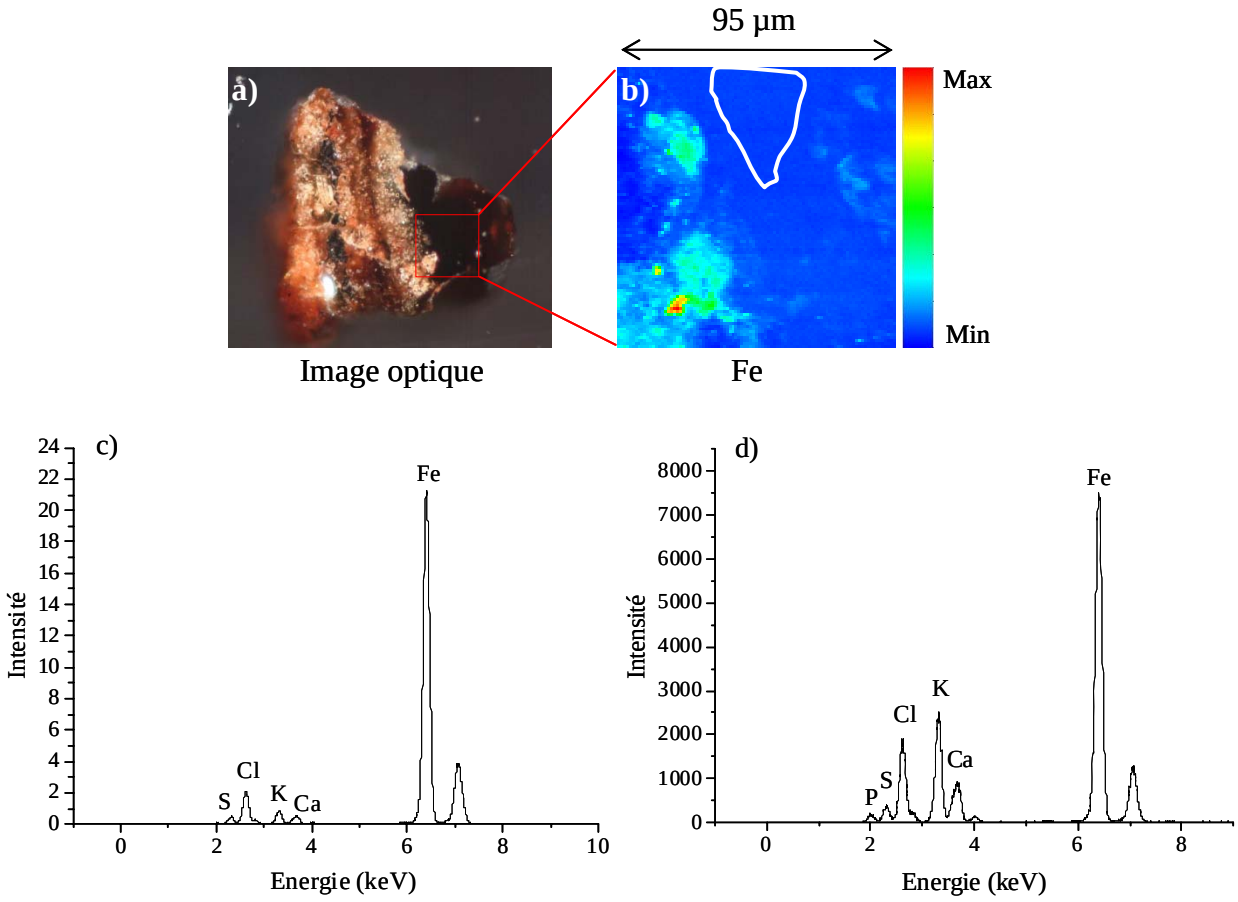


Figure 16: a) Image optique de l'échantillon issu de l'objet nommé D1 ; b) Cartographie du fer par fluorescence X, correspondant au carré rouge sur l'image optique (95 x 95 µm^2) ; c) Spectre de fluorescence X de la zone de protéines (délimitée en blanc) ; d) Spectre de fluorescence X d'une référence de sang séché de poule.

La comparaison avec un spectre obtenu sur une référence de sang séché (Figure 14d) montre que les mêmes ions sont obtenus dans les deux cas, nous pouvons donc affirmer que le fer détecté dans cette zone de l'échantillon provient bien des protéines. Des résultats similaires ont été obtenus pour les échantillons provenant des objets nommés D2 et B4. Concernant l'échantillon issu de l'objet nommé D3, aucune zone homogène n'a été observée sur la cartographie XRF du fer, ce qui implique que des matières minérales sont sans doute présentes sous la totalité de la surface de l'échantillon.

Les analyses par microfluorescence X nous permettent donc, pour l'instant, de dire que les protéines détectées contiennent du fer. Ceci est vrai pour les échantillons issus des objets nommés D1, D2 et B4. Néanmoins, pour obtenir une preuve irréfutable, des analyses XANES d'absorption au seuil K du fer ont été menées sur ces échantillons ainsi que sur l'échantillon issu de l'objet nommé D3, de façon à obtenir l'empreinte environnementale du fer. Différents

points ont été choisis à la surface, grâce aux cartographies en fluorescence X. Ces points correspondent soit à des zones contenant visiblement du minéral, soit des zones semblant contenir uniquement de la matière organique.

La Figure 17a présente le spectre enregistré sur un grain de minéral de l'échantillon issu de l'objet nommé D3. Ce spectre montre un léger épaulement à 7,147 keV. La Figure 17b montre que cette signature est retrouvée sur les spectres de produits de référence, comme la gœthite (FeOOH).

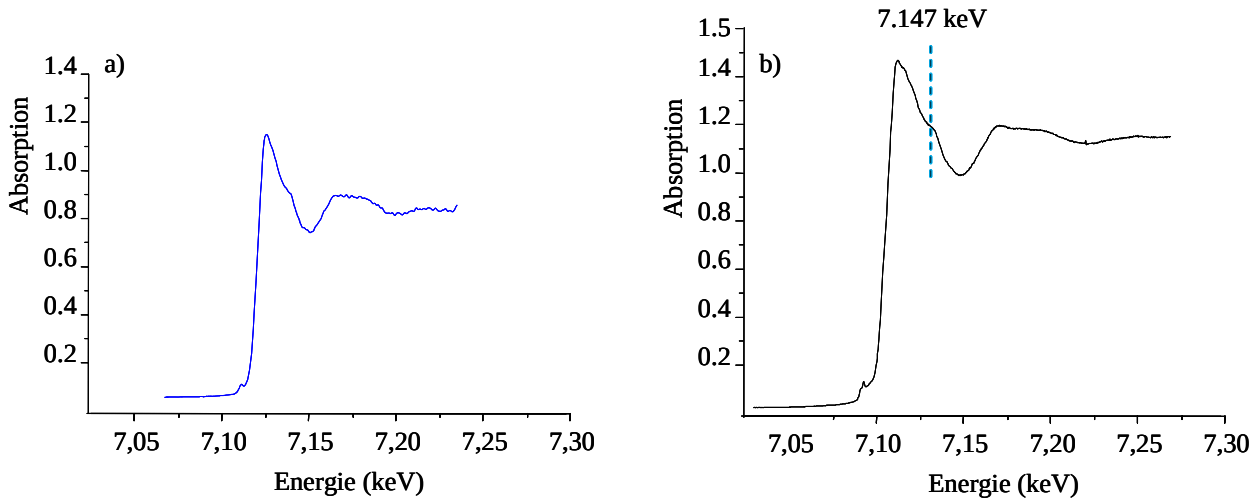


Figure 17: a) Spectre XANES d'un grain de minéral de l'échantillon issu de l'objet nommé D3 ; b) Spectre XANES de référence de la gœthite.

La Figure 18 montre la superposition des spectres XANES enregistrés sur les échantillons issus des objets nommés D1, D2, D3 et B4 ainsi que celui de l'hémoglobine.

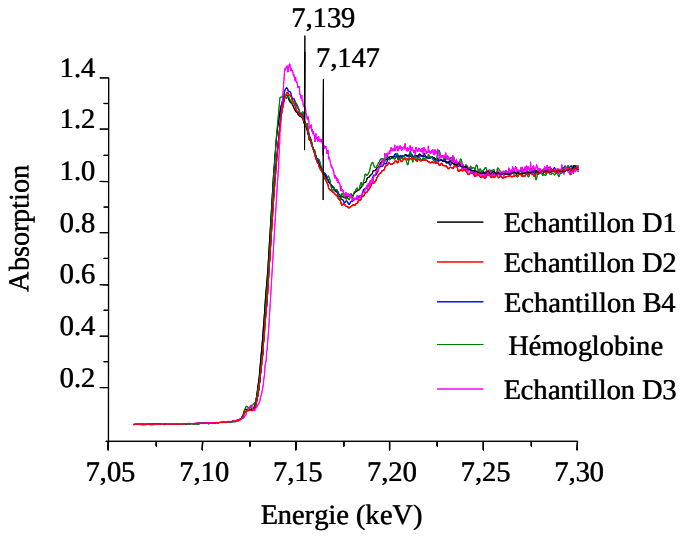


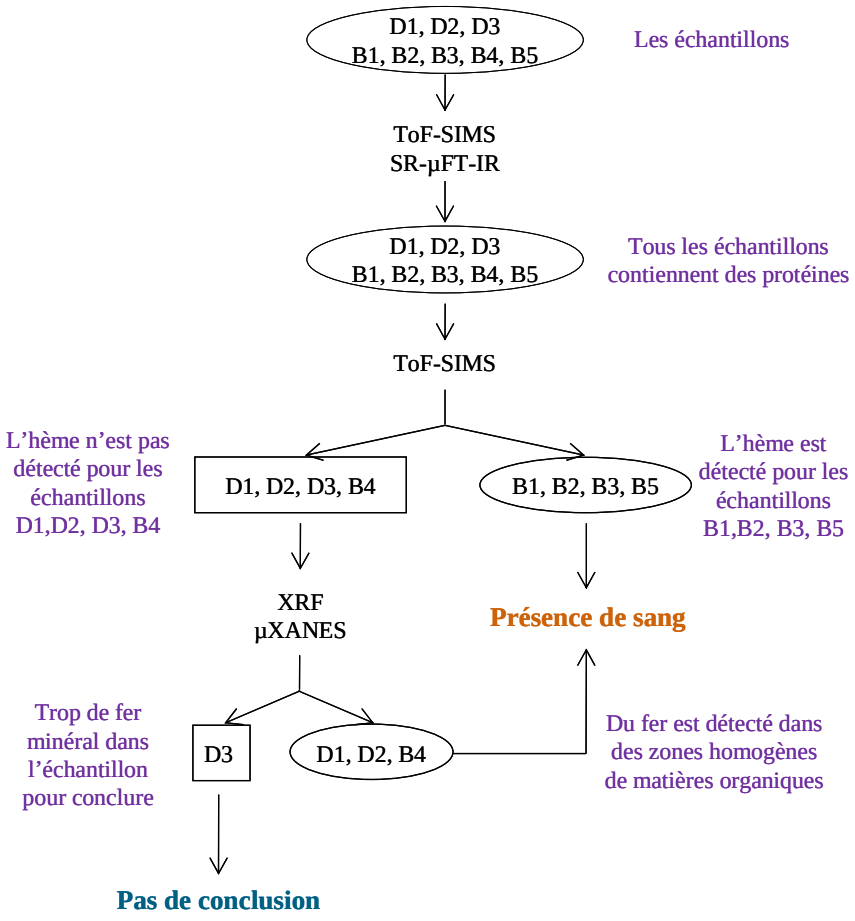
Figure 18: Superposition des spectres XANES obtenus sur différents échantillons.

Pour les échantillons D1, D2 et B4, on retrouve un profil semblable à celui de l’hémoglobine, avec un épaulement à la descente du pic à 7,139 keV. Ceci prouve que le fer est bien présent dans des zones de matière organique, comme nous l’avions vu lors de l’étude en microfluorescence X. Pour l’échantillon D3, comme nous l’avions déjà observé, le profil obtenu présente l’épaulement à 7,147 keV, ce qui tend à prouver que les mesures ont été faites dans une zone de matière minérale. Quel que soit le point choisi à la surface de cet échantillon, il n’a jamais été possible de retrouver un profil similaire à celui de l’hémoglobine.

4. Conclusions et Perspectives

En raison de la faible quantité d’échantillon disponible, l’identification de sang dans des objets du patrimoine africain demeure un défi. Ce type d’étude est pourtant fondamental si nous voulons approfondir notre connaissance de ces objets et notre compréhension de leurs significations culturelles. L’usage de sang est souvent mentionné dans les processus d’élaboration des objets d’art en Afrique. Cette étude a montré, pour la première fois, que le sang était effectivement utilisé dans la fabrication des patines de sept sculptures Dogon et Bamana.

Les résultats sont rassemblés dans le diagramme suivant :



Récapitulatif de la stratégie employée et des résultats obtenus

Cette approche en trois étapes nous permet d'identifier le sang en utilisant successivement la spectrométrie de masse ToF-SIMS, la microscopie FT-IR, la microfluorescence X et le µXANES. Grâce à une préparation d'échantillon spécifique et en évitant tout risque de contamination, toutes les analyses ont pu être conduites sur le même échantillon de façon non invasive, laissant la possibilité d'analyses ultérieures. Cette étude a démontré que notre approche convient à l'identification du sang dans des objets d'art mais elle pourrait également être utilisée dans d'autres champs d'application. Il est d'ailleurs important de noter que pour les objets les plus récents, dans lesquels l'hème n'est pas dégradé, l'analyse ToF-SIMS seule aurait été suffisante pour identifier la présence de sang. Si nous comparons notre stratégie analytique aux autres techniques d'identification du sang, comme les tests immunologiques, elle peut paraître moins efficace, puisque pour certains échantillons, comme celui issu de l'objet nommé D3, nous n'avons pu conclure quant à la présence ou à l'absence de sang. Cependant, cette approche en 3 étapes présente l'avantage majeur d'éviter les éventuels faux positifs.

Les techniques d'imagerie chimique représentent une méthode de choix pour l'analyse d'échantillons provenant du patrimoine. En effet, leur capacité à travailler sur des coupes stratigraphiques en font les techniques les plus adaptées aux besoins des archéologues, des historiens de l'art ou encore des conservateurs de musée. L'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS permet d'analyser des composés à la fois minéraux et organiques, et ce, sans *a priori*. On peut donc établir la composition d'un échantillon couche après couche, ce qui évite l'utilisation de méthodes extractives et séparatives. Cet avantage a été mis à profit par Keune *et al*. qui ont publié en 2004 une étude d'une couche picturale de « *La Descente de Croix* », tableau du peintre néerlandais Rogier van der Weyden, datant du 15ème siècle.[31] Une étude similaire est en cours au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN sur des couches picturales du Retable d'Issenheim (Matthias Grünewald, 16ème siècle). Le but de ce travail, en collaboration avec Pascale Richardin, est de localiser et d'identifier les pigments organométalliques utilisés par le peintre et qui sont responsables de la couleur verte sur la toile.

Références bibliographiques :

[1] .V Mazel, P. Richardin, D. Debois, D. Touboul, M. Cotte, A. Brunelle, P. Walter and O. Laprévote. Identification of ritual blood in African artifacts using TOF-SIMS and synchrotron radiation microspectroscopies. *Anal. Chem.* **2007**; 79(24), 9253.

[2] R. Bedaux. Les premiers Dogon de Sangha. *Regards sur les Dogon du Mali, Gand.* Editions Snoek, **2004**; 128.

[3] M. Griaule. La mission Dakar-Djibouti, rapport général (mai 1931 – mai 1932), *Journal de la société des Africanistes (Paris)*, II, **1932**; 113.

[4] M. Griaule. La mission Dakar-Djibouti, rapport général (juin à novembre 1932), *Journal de la société des Africanistes (Paris)*, II, **1932**; 229.

[5] M. Griaule. *Masques Dogons*. Paris, Institut d'Ethnologie, **1938** (réed. Museum d'Histoire Naturelle, 2004).

[6] S. Brett-Smith. The poisonous child. *Anthrop. Aesthetics*. **1983**; 6, 47.

[7] H. Leloup, W. Rubin, R. Serra and G. Baselitz. *Statuaire Dogon.* Danièle Amez, **1994**.

[8] S. Cornec. Approche des patines sur bois d'Afrique. *Technè*. **2000**; 11, 40.

[9] V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, P. Walter and O. Laprévote. Chemical imaging techniques for the analysis of complex mixtures: New application to the characterization of ritual matters on African wooden statuettes. *Anal. Chim. Acta*. **2006**; 570(1), 34.

[10] Nouveau Larousse Médical, Edition 1990, Librairie Larousse, Paris.

[11] N. Tuross and T. Dillehay. Mechanisms of organic preservation at Monte Verde and one use of biomolecules in archeological interpretation. *J. Field Archeol*. **1995**; 46, 573.

[12] N. Tuross, I. Barnes and R. Potts. Protein identification of blood residues on experimental stone tools. *J. Archaeol. Sci.* **1996**; 23(2), 289.

[13] M.E. Newman, G. Byrne, H. Ceri, L.S. Dimnik and P.J. Bridge. Immunological and DNA analysis of blood residues from a surgeon's kit used in the American Civil War. *J. Archaeol. Sci.* **1998**; 25(6), 553.

[14] J.M. Lowenstein, J.D. Reuther, D.G. Hood, G. Scheuenstuhl, S.C. Gerlach and D.H. Ubelaker. Identification of animal species by protein radioimmunoassay of bone fragments and bloodstained stone tools. *Forensic Sci. Int.* **2006**; 159(2-3), 182.

[15] S. Fiedel. Blood from stones? Some methodological and interpretive problems in blood residue analysis. *J. Archaeol. Sci.* **1996**; 23(1), 139.

[16] M.E. Newman, R.M. Yohe Ii, B. Kooyman and H. Ceri. "Blood" from stones? Probably: a response to Fiedel. *J. Archaeol. Sci.* **1997**; 24(11), 1023.

[17] D.M. Gurfinkel and U.M. Franklin. A study of the feasibility of detecting blood residue on artifacts. *J. Archaeol. Sci.* **1988**; 15(1), 83.

[18] B.S. Williamson. Direct testing of rock painting pigments for traces of haemoglobin at rose cottage cave, South Africa. *J. Archaeol. Sci.* **2000**; 27(9), 755.

[19] M.H. Schweitzer, M. Marshall, K. Carron, D.S. Bohle, S.C. Busse, E.V. Arnold, D. Barnard, J.R. Horner and J.R. Starkey. Heme compounds in dinosaur trabecular bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1997**; 94(12), 6291.

[20] T.H. Loy. Prehistoric blood residues: Detection on tool surfaces and identification of species of origin. *Science* **1983**; 220(4603), 1269.

[21] P. Hortola. Red blood cell haemotaphonomy of experimental human bloodstains on techno-prehistoric lithic raw materials. *J. Archaeol. Sci.* **2002**; 29(7), 733.

[22] G.L.Carr. Resolution limits for infrared microspectroscopy explored with synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instrum.***2001***;* 72(3), 1613.

[23] V. Mazel. Analyse par imagerie chimique de mélanges hybrides : les patines rituelles de la statuaire Dogon. Thèse de doctorat, Université Paris VI, **2006**.

[24] A. Delcorte, S. Befahy, C. Poleunis, M. Troosters and P. Bertrand. Improvement of metal adhesion to silicon films: a ToF-SIMS study. *Adhesion Aspects of Thin Films*. Ed. K. L. Mittal, VSP 2, **2004**; 155.

[25] O.D. Sanni, M.S. Wagner, D. Briggs, D.G. Castner and J.C. Vickerman. Classification of adsorbed protein static ToF-SIMS spectra by principal component analysis and neural networks. *Surf. Interface Anal*. **2002**; 33(9), 715.

[26] M.S. Wagner and D.G. Castner. Analysis of adsorbed proteins by static time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Appl. Surf. Sci*. **2004**; 231-232, 366.

[27] D. Touboul, A. Brunelle and O. Laprévote. Structural analysis of secondary ions by post-source decay in time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**; 20(4), 703.

[28] G.J. Shaw, G. Eglinton and J.M.E. Quirke. Structural analysis of tetrapyrroles by hydrogen chemical ionization mass spectrometry. *Anal. Chem*. **1981**; 53(13), 2014.

[29] B.R. Tolf, X.Y. Jiang, A. Wegmann-Szente, L.A. Kehres, E. Bunnenberg and C. Djerassi. Enhanced structural determination of substituted porphyrins by ammonia desorption chemical ionization mass spectrometry. *J. Am.Chem. Soc*. **1986**; 108(7), 1363.

[30] G.J. Van Berkel, G.L. Glish, S.A. McLuckey and A.A. Tuinman. Mechanism of porphyrin reduction and decomposition in a high-pressure chemical ionization plasma. *J. Am. Chem. Soc*. **1989**; 111(16), 6027.

[31] K. Keune and J.J. Boon. Imaging secondary ion mass spectrometry of a paint cross section taken from an early netherlandish painting by Rogier van der Weyden. *Anal. Chem*. **2004**; 76(5), 1374.

Chapitre III

Etude lipidomique de pathologies hépatiques :

Stéatose non alcoolique, Adénome et Carcinome hépatocellulaires

Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Pr Marie-Pierre Bralet, de l'Hôpital Paul Brousse (Villejuif) et François Le Naour, de l'INSERM U602 (Villejuif).

1. Introduction

1.1. Notions d'anatomie

Le foie est une glande abdominale, impaire et asymétrique. Situé dans l'hypochondre droit, c'est l'organe le plus volumineux du corps humain, représentant en moyenne 2% de la masse corporelle. Le foie joue un rôle majeur dans le métabolisme des glucides, des lipides, et des protéines et assure de nombreuses fonctions vitales pour l'organisme (biotransformation des métabolites endogènes et des xénobiotiques, synthèse et sécrétion de la bile…).

Le foie est composé d'un lobe gauche (1/3 du volume de l'organe) et d'un lobe droit, séparés par le ligament falciforme (Figure 1).

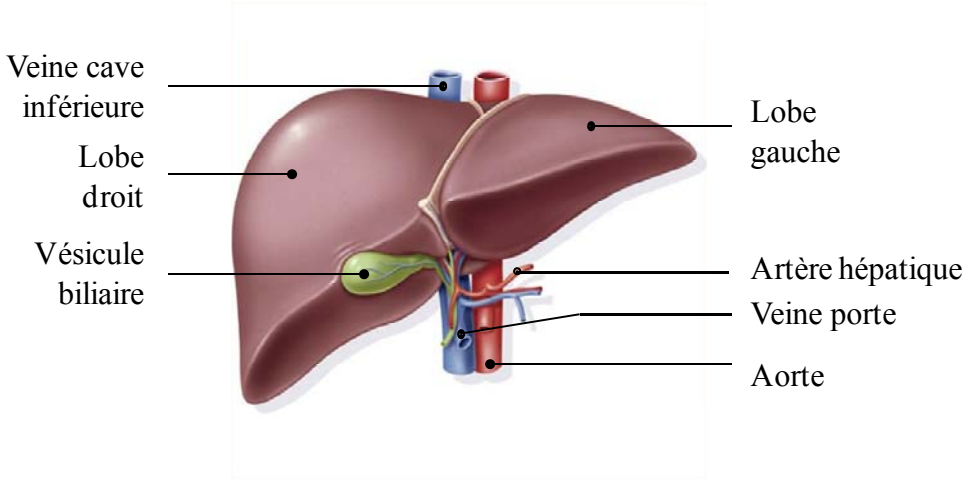


Figure 1: Schéma de l'anatomie du foie.

La vascularisation du foie est double. Il reçoit, par la veine porte, du sang veineux peu oxygéné (80% du sang afférant) provenant des veines ayant drainé l'intestin, véhiculant les produits de la digestion et par l'artère hépatique du sang bien oxygéné (20% du sang afférant). Dans le parenchyme hépatique, les branches de division de la veine porte et celles de l'artère

hépatique cheminent dans la même lame conjonctive ; elles fournissent aux sinusoïdes hépatiques le sang qui se draine de façon unidirectionnelle vers les veinules hépatiques terminales (ou veines centrolobulaires). Le retour du sang s'effectue par les veines hépatiques, également appelées veines sus-hépatiques, qui se jettent dans la veine cave inférieure.[1]

Le tissu hépatique adulte normal s'organise en unités structurales ou lobules hépatiques. En coupe histologique, le lobule hépatique épouse schématiquement la forme d'un hexagone de 2 mm sur 0,7, comme le montre la Figure 2 (l'échelle n'est pas respectée).

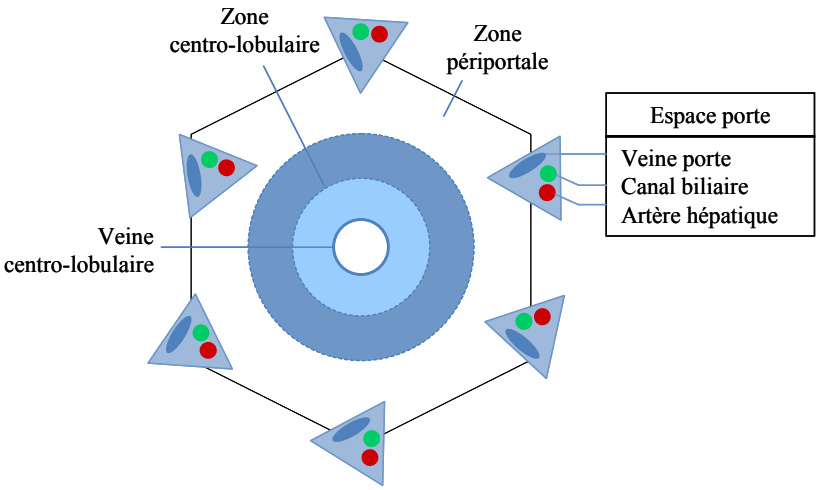


Figure 2: Schéma simplifié du lobule hépatique.

Le lobule hépatique est centré autour de la veine centro-lobulaire. On trouve, aux points de jonction des lobules, les espaces porte ou espaces de Kiernan. Les espaces porte sont définis par la « triade portale » qui comprend, dans un tissu conjonctif peu cellulaire, une branche terminale de la veine porte, une branche terminale de l'artère hépatique et le canal biliaire. Autour de la veine centro-lobulaire, se dessinent arbitrairement trois zones concentriques. La zone centro-lobulaire, de 5 à 10 hépatocytes de large, entoure la veine. Autour des espaces porte, se trouve la zone périportale et, entre les deux zones précitées, la zone médio-lobulaire.

D'un point de vue physiologique, le foie participe à presque tous les métabolismes. Il n'est pas question ici d'en dresser la liste exhaustive. Nous pouvons néanmoins citer quelques unes de ses fonctions. Le foie intervient dans le métabolisme des protéines, en synthétisant la serum-albumine, par exemple. Il joue également un rôle important dans le métabolisme des lipides, en produisant le cholestérol et des triglycérides. Son rôle est fondamental dans le métabolisme des glucides ainsi que dans la dégradation de l'insuline et d'autres hormones. Le

foie est responsable de la production et de l'excrétion de la bile, utilisée pour l'émulsification des lipides lors de la digestion. Enfin, remplissant sa fonction de détoxification, le foie dégrade les molécules toxiques ou les médicaments.[1] L'hétérogénéité fonctionnelle des hépatocytes est à l'origine de ces nombreuses activités, conduisant à ce qui est convenu d'appeler la « zonation métabolique ». Ces différentiations fonctionnelles sont basées sur l'oxygénation des différentes zones du foie, notamment pour les hépatocytes présents autour de la veine porte et ceux proches de la veine centro-lobulaire.[2,3] Une différence d'expression protéique est rapportée chez la souris au niveau de ces hépatocytes. En effet, les hépatocytes périportaux expriment préférentiellement la phosphoénolpyruvate carboxykinase et la glucose-6-phosphatase, ce qui se traduit par une forte implication dans la néoglucogenèse. Les hépatocytes péricentrolobulaires sont plus impliqués dans la glycolyse et la lipogenèse, car ils expriment l'ornithine aminotransférase et la glutamine synthétase.[4] Une différentiation au niveau du métabolisme des lipides a également été rapportée chez la souris. Les hépatocytes de la zone périportale seraient spécialisés dans l'oxydation des acides gras tandis que ceux de la zone centro-lobulaire agiraient préférentiellement sur les processus de lipogenèse.[5] Ainsi, la complexité et le nombre des fonctions assurées par le foie en font un organe indispensable et (actuellement) irremplaçable par quelque dispositif artificiel que ce soit.

Pour finir cette description anatomique, le foie fait partie des rares organes à posséder la capacité de régénérer : 25% de parenchyme restant suffisent au foie pour se reformer en totalité. L'hyperplasie compensatrice appelée abusivement régénération s'observe après une perte des cellules hépatiques secondaire à une hépatectomie partielle ou à une nécrose hépatique de quelque origine que ce soit, virale, chimique ou vasculaire.

1.2. La stéatose hépatique non alcoolique

1.2.1. Description de la pathologie et épidémiologie

Prévalence

Le terme « maladie du foie stéatosique non alcoolique » (« *Non-alcoholic fatty liver disease », NAFLD*) regroupe des pathologies survenant en l'absence de consommation alcoolique, et caractérisées par des anomalies histologiques qui vont d'une stéatose isolée réversible (« *non alcoholic fatty liver* », *NAFL*), à une stéatohépatite (« *non alcoholic steatohepatitis* », *NASH*,), plus ou moins associée à une fibrose de degrés variés pouvant

aboutir à une cirrhose.[6,7,8] Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la première de ces pathologies : la stéatose non alcoolique.

Depuis le milieu des années 90, l'intérêt porté aux stéatopathies connaît un grand essor, probablement à cause de leur fréquence, étroitement liée à l'incidence croissante de l'obésité et du diabète. Les chiffres de prévalence de la NAFLD dépendent beaucoup de la méthode diagnostique employée et de la population étudiée. Dans une étude japonaise récente, des individus d'âge moyen apparemment en bonne santé ont été soumis à une échographie et une stéatose a été diagnostiquée pour 29% d'entre eux.[9] Des chiffres similaires ont été publiés dans une étude menée en Italie.[10] Aux USA, la prévalence de la NAFLD dans la population générale est de 20%.[11] Chez les patients obèses, une stéatose est presque toujours diagnostiquée (par échographie).[12] La prévalence de la maladie augmente avec l'âge, puisque le risque de NAFLD est inférieur à 3% parmi les enfants en bonne santé.[13]

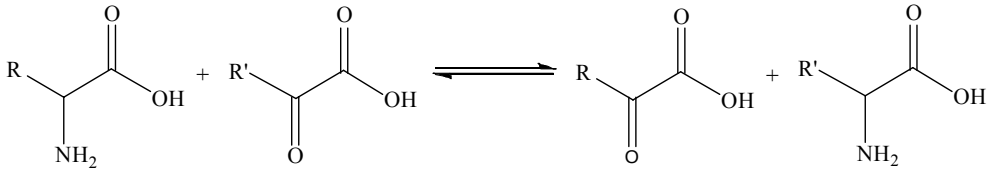
Deux études sur la prévalence inter-ethnie aux Etats-Unis ont également été menées, amenant à la conclusion que les Américains d'origine hispanique sont plus touchés que les Américains d'origine africaine, sans que la raison en soit connue.[14]

Manifestations cliniques

Le terme « *NASH* » fut pour la première fois énoncé par Ludwig *et al*. en 1980 pour décrire un syndrome clinico-pathologique, mimant les atteintes d'une stéatose hépatique alcoolique, mais survenant chez des patients ne consommant pas d'alcool.[15] La maladie, quasiment asymptomatique, n'est le plus souvent suspectée que sur une élévation légère de l'activité sérique des aminotransférases[†] (ASAT, ALAT).[8,16,17,18] Une ascension discrète de l'activité sérique de la gamma glutamyl transpeptidase (GGT) ou des phosphatases alcalines

[†]Tout au long de ce chapitre, les termes soulignés seront définis en bas de page

Aminotransférase : enzyme catalysant de façon réversible le transfert du groupement 2-amino d'un acide aminé sur un 2-oxo-acide selon la réaction générale suivante :



GGT : gamma-glutamyl transpeptidase, enzyme produite par certains organes (foie, pancréas, reins) participant au transfert des acides aminés entre cellules.

peut également être présente. La stéatose hépatique est définie sur des critères essentiellement histologiques. Elle se caractérise par une accumulation de graisses (principalement des triglycérides) dans le cytoplasme des hépatocytes (Figure 3). Deux types de stéatose sont décrits histologiquement : la stéatose macrovacuolaire où une grosse vacuole correspondant à l'accumulation lipidique refoule le noyau en périphérie de la cellule, et la stéatose microvacuolaire où le noyau reste en position centrale dans la cellule. Ce dernier type de stéatose est le plus souvent secondaire à des anomalies de la β-oxydation mitochondriale des lipides. Dans la NAFLD, la stéatose macrovacuolaire prédomine.

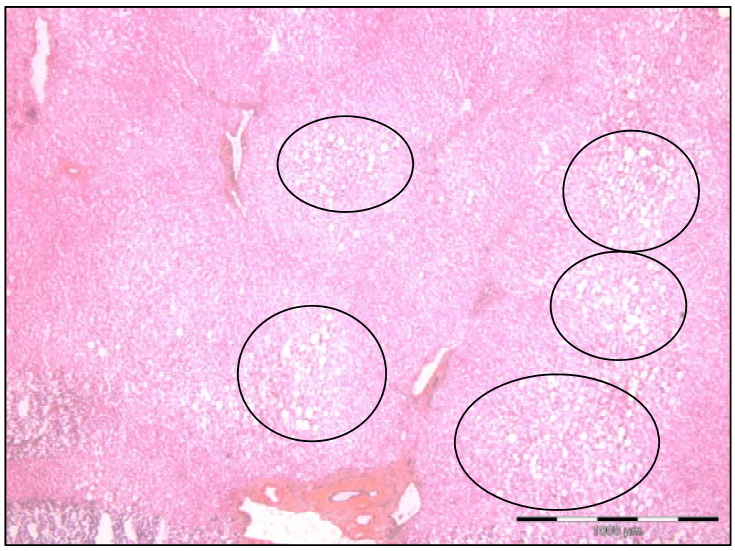


Figure 3: Image microscopique d'une coupe histologique de foie humain stéatosique congelé. Les zones de stéatose sont entourées en noir (10 µm, Hématéine Eosine Safran).

La stéatose peut être systématisée, c'est-à-dire prédominer dans une zone du lobule hépatique, comme par exemple la région centro-lobulaire dans la maladie alcoolique du foie ou la NASH.[15,17]

Origine de la pathologie

Peu de choses sont connues sur une éventuelle origine génétique de la maladie. De nombreuses études portent sur le polymorphisme de certains gènes qui pourraient représenter un génotype pour l'insulino-résistance et par voie de conséquence, la NAFLD.[18] Il semble néanmoins admis que l'insulino-résistance chez les patients atteints de NAFLD résulte d'une combinaison de polymorphismes génétiques multiples (influençant la sécrétion d'insuline) et de conditions environnementales.[13,16]

La stéatose hépatique peut également avoir une origine médicamenteuse, comme lors d'un traitement par œstrogènes. Le tamoxifène (utilisé dans le traitement des cancers du sein), les glucocorticoïdes ou l'amiodarone (utilisé comme antiarythmique) sont reconnus comme responsables de stéatose.[19] Une alimentation parentérale peut également engendrer le développement de la stéatose.[20] Enfin, certaines maladies métaboliques comme la glycogénose ou la maladie de Wilson peuvent provoquer une stéatose.

1.2.2. Facteurs de risque et syndrome métabolique

Bien que la pathogenèse de la NAFLD et sa progression de la stéatose vers la cirrhose restent mal comprises, toutes les recherches suggèrent qu'il existe une forte association entre NAFLD et insulino-résistance. Les conditions associées à une insulino-résistance comprennent : une adiposité centrale (obésité), une hypertension artérielle, une hyperglycémie, une hypertriglycéridémie et une baisse du HDL-Cholestérol.[7,18,19,21,22,23,24,25,26] Ces anomalies sont regroupées sous le terme de syndrome métabolique et on reconnait actuellement que les stéatopathies non alcooliques constituent son expression hépatique [27] (Figure 4).

Glycogénose : maladie génétique rare due à un déficit enzymatique dans le métabolisme du glycogène.

Maladie de Wilson : maladie génétique secondaire à une accumulation de cuivre dans l'organisme, provoquant des atteintes au foie et au système nerveux.

Insulino-résistance :chez un sujet sain, lors d'un apport important de glucose dans la circulation sanguine, le pancréas sécrète de l'insuline qui va se fixer sur les récepteurs cellulaires, afin de permettre le passage du glucose à travers la membrane cellulaire, et son utilisation par les tissus cibles (foie et muscles). Chez la personne atteinte d'insulino-résistance, les récepteurs cellulaires sont insensibles à l'insuline : le glucose ne passe plus la barrière cellulaire et s'accumule dans la circulation sanguine. Ceci augmente alors la glycémie, ce qui stimule la sécrétion d'insuline par le pancréas. Au fil des années, ce cercle vicieux épuise les cellules pancréatiques, une résistance au glucose apparait et un diabète de type 2 se développe.

HDL-Cholestérol : *High Density Lipoproteins* – Cholestérol. Il s'agit du cholestérol incorporé dans les lipoprotéines à haute densité.

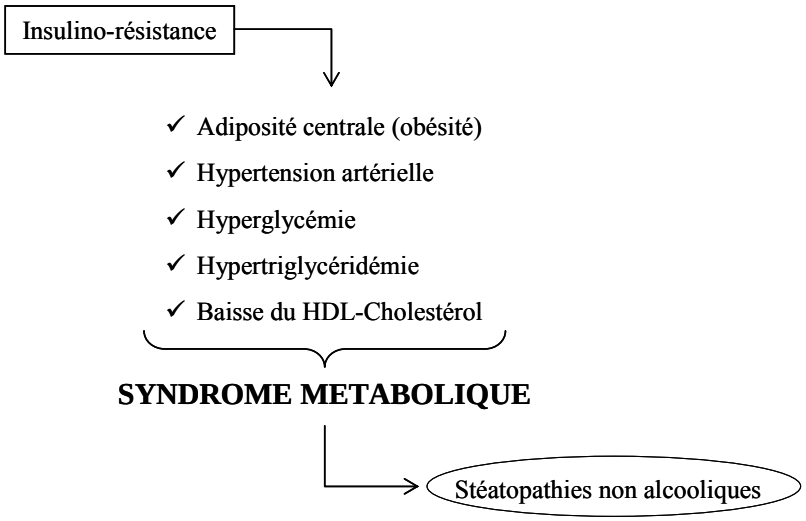


Figure 4: Relation étiologique entre l'insulino-résistance et les stéatopathies non alcooliques.

La Figure 5a montre le métabolisme des lipides dans un foie sain.

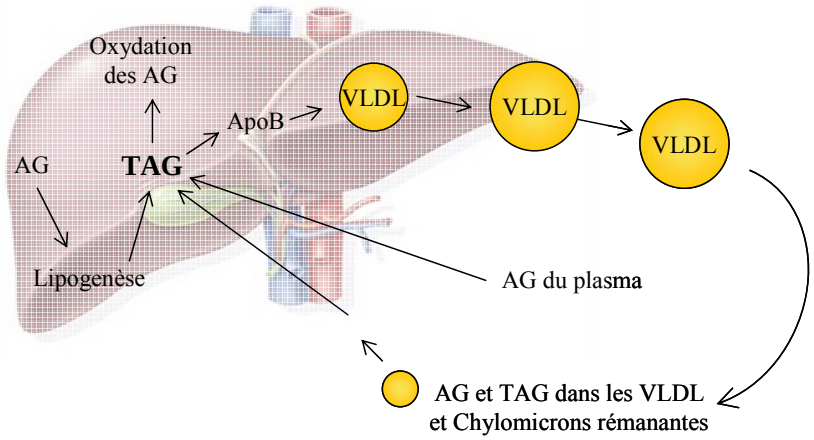
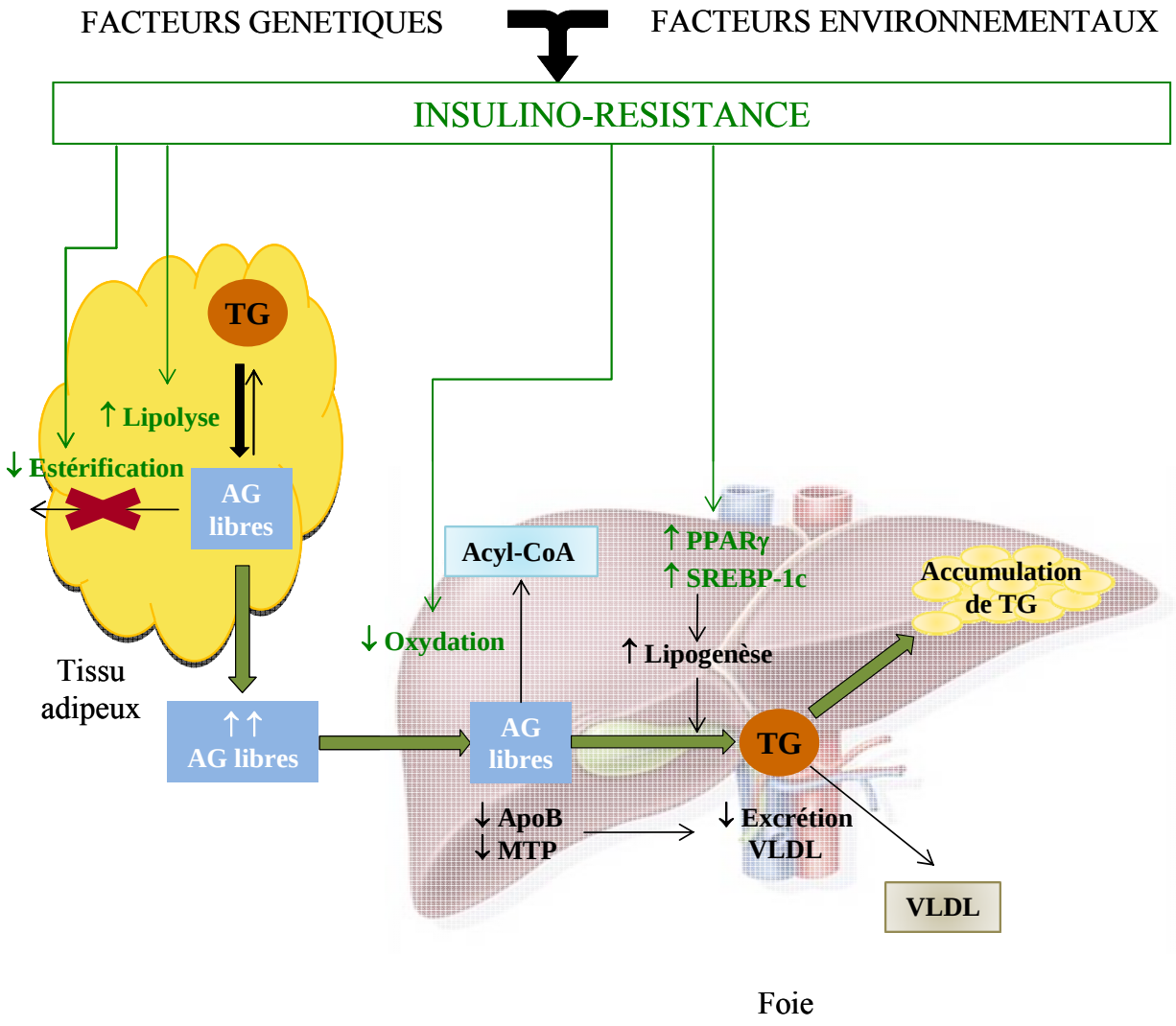


Figure 5a: Métabolisme lipidique dans un foie sain, d'après la référence 28.

L'homéostasie des triacylglycérols est maintenue par un équilibre entre l'apport d'acides gras en provenance du tissu adipeux, ceux apportés par les lipoprotéines rémanentes, la lipogenèse *de novo* à partir du glucose et l'oxydation des acides gras d'une part et l'assemblage et la sécrétion des triacylglycérols et de l'apolipoprotéine B sous forme de VLDL d'autre part.

VLDL : « *Very low density lipoproteins* » : protéines de très faible densité, elles sont formées par une association entre une protéine de transfert de triglycéride (MTP, « *microsomal triglyceride transfer protein* ») qui incorpore les triglycérides dans l'apolipoprotéine B. Le rôle des VLDL est d'exporter les triglycérides de leur lieu de synthèse (le foie) vers leur lieu d'utilisation (tissus périphériques).

L'accumulation des triacylglycérols dans le foie est un processus multifactoriel. La Figure 5b montre les différentes voies influencées par l'insulino-résistance.



AG: Acide gras, TG: Triglycérides, ApoB: Apolipoprotein B, Acyl-CoA: Acyl-CoEnzyme A, PPARγ: Proliferator-activated receptor gamma, SREBP-1c: Sterol regulatory element binding protein, MTP: microsomal triglyceride transfer protein, VLDL:very low density lipoprotein

Figure 5b: Développement de la stéatose hépatique non alcoolique, d'après la référence 13.

Au niveau des adipocytes, l'insulino-résistance, dite périphérique, va diminuer l'estérification des acides gras libres, ce qui va entraîner leur accumulation. Parallèlement à cela, l'hyperinsulinémie va également augmenter la lipolyse, c'est-à-dire la dégradation des triglycérides en acides gras libres.

Ces deux voies concourent à augmenter la quantité d'acides gras libres dans le tissu adipeux.[13] Ces acides gras libres vont passer dans la circulation sanguine et être absorbés par le foie. Normalement, ces espèces sont métabolisées par oxydation, en générant de l'ATP ou

par estérification, produisant des triglycérides, qui sont soit incorporés à des particules de VLDL pour être exportés soit stockés au sein de l'hépatocyte.[7] Chez les personnes atteintes de NAFLD, les acides gras libres, présents en trop grande quantité, s'accumulent dans le foie, ce qui va avoir pour conséquence le développement d'une insulino-résistance hépatique.[18] Cette dernière va provoquer une sur-production de l'acyl-coenzyme A, inhibant la protéine responsable du transport des acides gras dans la mitochondrie, réduisant la β-oxydation des acides gras. D'autre part, l'insulino-résistance va influer sur certains facteurs régulant la lipogenèse *de novo* comme le SREBP-1c [29,30] et le PPARγ.[31]

L'insulino-résistance est donc considérée comme jouant un rôle central dans le développement de la maladie, reliant entre eux tous les autres facteurs. C'est elle qui démarre la séquence d'évènements physiopathologiques par l'accumulation de lipides dans le foie, première étape de la maladie. Cette accumulation déclenche la seconde étape (stress oxydant, peroxydation des lipides, dysfonctionnement des mitochondries du foie, libération de cytokines et adipokines proinflammatoires), qui serait responsable de l'apparition d'une nécrose hépatocytaire associée à une inflammation, et, de ce fait, de la progression de la stéatose vers la NASH. Cette théorie a été énoncée pour la première fois par Day *et al.*, en 1998.[32]

1.2.3. Méthodes diagnostiques

Comme nous l'avons déjà vu, la stéatose hépatique non alcoolique est le plus souvent asymptomatique. Lorsque des symptômes cliniques apparaissent, il peut s'agir d'une hépatomégalie, ou très rarement, d'une douleur dans l'hypochondre droit. Il n'existe actuellement aucun examen non invasif spécifique du diagnostic de stéatose non alcoolique ou de NASH. Le diagnostic doit plutôt être posé par exclusion : une consommation d'alcool

SREBP-1c : « *sterol response element binding protein-1c* » membre de la famille des facteurs de transcription liés aux membranes, qui régule de multiples gènes impliqués dans la biosynthèse et l'assimilation du cholestérol.[30]

PPARγ : « *peroxisome proliferator-activated receptor* ») : membre de la superfamille des récepteurs nucléaires, le PPARγ augmente la sensibilité à l'insuline et régule le stockage des triglycérides dans le tissu adipeux. Les PPARs (PPARα et PPARδ) jouent un rôle clé dans la régulation de l'accumulation des triglycérides dans le foie.[31]

inférieure à 20 g / jour chez la femme, 30 g / jour chez l'homme, et l'absence d'autres hépatopathies connues (hépatites virales, autoimmunes *etc.*…).

On constate habituellement une augmentation modérée de l'activité des aminotransférases (environ 2 à 3 fois la limite supérieure de la normale), une discrète élévation des GGT et les patients présentent très souvent des conditions associées à l'insulino-résistance (obésité, hyperglycémie, ou diabète de type 2 par exemple).

Une stéatose hépatique non alcoolique peut être suspectée cliniquement ou à l'échographie, examen non invasif, lorsque le parenchyme hépatique est beaucoup plus hyperéchogène que le rein droit (aspect de foie « brillant »). D'autres méthodes d'imagerie sont utilisées pour le diagnostic de la stéatose, comme le scanner ou l'IRM.

A l'instar des dosages biochimiques, actuellement aucune méthode d'imagerie ne permet de distinguer la stéatose simple de la stéato-hépatite non alcoolique, ou encore d'évaluer précisément le degré de fibrose des NASH.[13,17] Une technique récente, le fibroscan, est en cours d'évaluation dans les NASH pour préciser le degré de fibrose.

Examen anatomo-pathologique

La biopsie du foie (obtenue par voie percutanée par ponction à l'aiguille, par voie trans-jugulaire ou par voie chirurgicale) suivie d'un examen anatomo-pathologique reste la méthode de choix pour le diagnostic de la stéatose hépatique et sa quantification.[7,13,16,17] C'est également la seule technique permettant de distinguer la stéatose pure de la stéato-hépatite, de déterminer le degré de fibrose et donc la sévérité de la maladie, et d'évaluer les pathologies

---

Diabète de type 2 : diabète non insulino-dépendant.

Echographie : technique d'exploration de l'intérieur du corps basée sur les ultra-sons. Une sonde envoie un faisceau d'ultrasons dans la zone du corps à explorer. Selon la nature des tissus, ces ondes sonores sont renvoyées sous la forme d'un écho, avec plus ou moins de puissance.

Fibroscan : technique mesurant l'élasticité du foie (malgré une contradiction apparente, plus un foie présente de fibrose, plus celui-ci est dur, plus son élasticité est forte).

Anatomo-pathologie : discipline médicale qui permet la reconnaissance des anomalies des cellules et des tissus d'un organisme, appelées lésions, pour effectuer le diagnostic des maladies, porter un pronostic et, plus généralement, en comprendre les causes et les mécanismes. Elle s'appuie sur des techniques morphologiques (c'est à dire l'analyse de la forme des objets) : examen macroscopique, microscopique, optique et électronique, immunohistochimie, hybridation *in situ*, parfois quantifiées (morphométrie) et sur d'autres méthodes utilisées parallèlement (PCR sur coupes ou cellules isolées...).

associées comme par exemple une surcharge en fer. Il s'agit d'une technique invasive dont les complications outre la douleur, hématome, hémopéritoine, exceptionnel décès, sont évaluées selon les séries entre 0,3 et 0,5%.[33,34] Un autre inconvénient est la représentativité de la biopsie : le prélèvement représente un cinquante millième du foie total, et des erreurs diagnostiques peuvent être dues à l'échantillonnage.[34,35]

1.2.4. Thérapies

Le traitement de la NAFLD vise à diminuer la stéatose et à prévenir ou freiner le développement d'une fibrose qui peut évoluer jusqu'à la cirrhose. Les stratégies thérapeutiques sont concentrées sur le contrôle et le traitement du syndrome métabolique, comme l'obésité, le diabète et l'hyperlipidémie.

Perte de poids

La perte de poids peut être obtenue de deux façons. Premièrement, pour perdre du poids, il est indispensable d'améliorer l'hygiène de vie des patients, en appliquant un régime hypocalorique et en pratiquant une activité physique régulière. Dans un second temps, et si malgré des règles hygiéno-diététiques bien appliquées, le surpoids ne peut être maîtrisé, une chirurgie peut être proposée. Deux alternatives peuvent être envisagées : soit la réduction de la taille de l'estomac pour diminuer la quantité d'aliments que le patient peut ingérer, soit la diminution de la taille de l'intestin pour amoindrir la quantité de calories absorbées.[18] La perte de poids ne doit pas être trop rapide afin d'éviter d'empirer l'inflammation ainsi que la fibrose.[36] Un objectif raisonnable devrait être fixé à 10% de perte de poids en six mois.[37]

Traitements pharmacologiques

Diverses approches ont été tentées pour diminuer les manifestations du syndrome métabolique. Des médicaments visant au contrôle de la glycémie (thiazolidinediones, antidiabétiques oraux),[16,38] du taux de triglycérides et de cholestérol (pentoxyfilline et atorvastatine)[13,39,40,41] ou de la pression artérielle entrent dans le cadre du traitement pharmacologique de la stéatose.

Des antioxydants (Vitamines C et E) et des agents hépato protecteurs (acide ursodésoxycholique, agent cholélitholytique) ont été testés, sans donner de meilleurs résultats que le placebo.[42,43] La bétaïne, qui aurait expérimentalement chez l'animal un rôle protecteur

de stéatose, ainsi que le losartan, utilisé pour son rôle anti-fibrosant, ont donné de bons résultats, appuyés par des preuves histologiques et biochimiques. Cependant, le nombre de participants aux essais était faible (inférieur à 10 personnes).[43]

Les résultats obtenus pour ces médicaments sont encourageants. Cependant les contrôles, notamment histologiques, sont difficilement réalisables pour des raisons éthiques évidentes. La pharmacologie pour la NAFLD n'est donc utilisable que dans le cadre d'essais cliniques.[13]

1.3. L'adénome hépatocellulaire

L'adénome hépatocellulaire (AHC) est une tumeur épithéliale bénigne du foie rare dans les pays occidentaux, qui se développe généralement chez les femmes jeunes (25-40 ans) sous contraception orale fortement dosée en œstrogènes. La relation entre pilule contraceptive et AHC a été suggérée pour la première fois par Baum *et al*. en 1973,[44] et a été confirmée depuis par de nombreuses études cliniques.[45] Les autres facteurs de risque sont certaines maladies de stockage du glycogène, la prise d'androgènes, de stéroïdes anabolisants. Les cas d'AHC chez les hommes sont rares, et sont souvent dus à la prise de stéroïdes anabolisants.[46] Les complications liées à cette tumeur sont les risques d'hémorragie et de transformation maligne, c'est pourquoi elle est traitée par résection chirurgicale.

Cette tumeur, souvent asymptomatique, peut être découverte sur une échographie hépatique, un scanner abdominal ou une IRM. Il s'agit le plus souvent d'un nodule unique du foie (2/3 des cas), mais deux ou trois nodules peuvent se développer simultanément.[45,47] Lorsque le nombre d'adénomes atteint 10, on parle d'adénomatose.[48]

Son diagnostic de certitude est établi par l'examen anatomo-pathologique d'une biopsie dirigée sur le nodule hépatique ou le plus souvent sur la pièce opératoire de la résection chirurgicale. Sur une biopsie à l'aiguille, le diagnostic différentiel avec un carcinome hépatocellulaire (CHC) est parfois très difficile à établir.

Epithélium : tissu recouvrant une surface externe (peau, muqueuses des orifices naturels) ou une surface interne (tube digestif, glande).

Microscopiquement, l'adénome hépatocellulaire se caractérise par une prolifération tumorale bénigne de cellules d'allure hépatocytaire sans atypie cytonucléaire dans un foie sans fibrose. L'architecture lobulaire a disparu et les cellules tumorales sont agencées en travées d'une à deux cellules en épaisseur, séparées par des sinusoïdes. Les cellules tumorales peuvent être stéatosiques surtout dans les adénomes hépatocellulaires où une inactivation bi-allélique du gène codant pour le facteur de transcription HNF1α a été mise en évidence.[49] La pathogenèse de l'adénome hépatocellulaire commence à être mieux élucidée grâce aux travaux de l'équipe de Zucman-Rossi, et une séquence d'évènements génétiques a été proposée pour expliquer la formation des adénomes.[50] L'évolution naturelle de l'adénome va le conduire à rester stable, à augmenter en taille, à se transformer ou, très exceptionnellement, à régresser.[51,52,53,54] Les complications sont plus fréquentes lorsque sa taille augmente. La transformation d'un adénome en tumeur maligne (CHC) est rare, même si elle représente un risque potentiel d'évolution.[55,56,57] Les raisons pour lesquelles un AHC subit une transformation maligne restent floues. Actuellement, la plupart des auteurs considèrent que l'augmentation de la taille de la tumeur (observée lors d'un examen par échographie ou scanner) et l'augmentation du taux d'α-fœtoprotéine sérique sont des signes de la transformation maligne d'un AHC.[46]

1.4. Le carcinome hépatocellulaire

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est une tumeur épithéliale maligne primitive, développée à partir des hépatocytes. Le CHC est une complication des maladies chroniques du foie. C'est le type histologique le plus fréquent des cancers primitifs hépatiques, représentant à lui seul 80 à 90% des cas. Il survient sur une cirrhose dans plus de 80% des cas. Il provoque de 600 000 à 1 000 000 de morts à travers le monde chaque année.[58] Si sa fréquence reste plus élevée dans le Sud et le Sud-Est asiatique ainsi qu'en Afrique Sub-Saharienne, son incidence augmente aux USA, au Canada mais aussi en Europe de l'Ouest. Les facteurs de risque majeurs sont les virus des hépatites B et C, l'alcoolisme, les carcinogènes chimiques (aflatoxines), l'hémochromatose génétique, la NASH, ou le diabète.[59]

Le CHC occupe actuellement le rang de troisième ou quatrième cause de décès par cancer, à travers le monde.

Le carcinome hépatocellulaire est souvent asymptomatique. Il est dépisté lors du suivi des patients atteints de cirrhose sur des dosages sériques d'α-fœtoprotéine et des échographies hépatiques régulières. Les premiers troubles surviennent de manière tardive, et le prognostic s'avère alors sévère. Des programmes de surveillance ont donc été mis en place, aux USA et en Europe, afin de détecter plus précocement les CHC, chez les patients atteints de cirrhose. De cette façon, les tumeurs détectées sont de plus petite, souvent uninodulaires et susceptibles de bénéficier d'un traitement curatif.[60] Le diagnostic peut être posé grâce aux techniques d'imagerie : échographie-doppler, scanner hélicoïdal avec injection de produit de contraste ou imagerie par résonance magnétique. L'α-fœtoprotéine est le seul marqueur sérologique communément utilisé pour le diagnostic. Néanmoins, son dosage est évocateur de CHC si la concentration est supérieure à 200 $ng.mL^{-1}$, et seul un faible nombre de patients présente un taux aussi élevé. Le CHC pourra être diagnostiqué avec certitude sur un foie cirrhotique si le dosage d'α-fœtoprotéine est élevé (supérieur à 400 $ng.mL^{-1}$) ou si la taille du nodule dépasse 3 cm et présente une hypervascularisation artérielle à l'imagerie. La biopsie de la tumeur n'est indiquée que lorsque le diagnostic n'est pas évident sur l'imagerie et la biologie et en fonction du projet thérapeutique. De plus, certaines atteintes contre-indiquent la biopsie, comme lorsque le patient souffre d'une cirrhose décompensée ou qu'il est candidat à la résection.[59]

Les stratégies de traitement sont élaborées sur la base de l'extension de la tumeur, de la fonction hépatique, du statut physique du malade (malade transplantable ou non, résécable ou non). Les options peuvent être de deux types : curatives, dont le but est de guérir le malade, ou palliatives, dont le but n'est pas de guérir, mais qui sont susceptibles d'obtenir une stabilisation de la maladie voire une réponse partielle et d'augmenter, même faiblement, la survie en améliorant la qualité de vie. Les méthodes curatives employées permettent d'obtenir une ablation complète chez un grand nombre de patients, et augmentent la survie. La résection chirurgicale de la tumeur est celle qui présente le meilleur taux de réussite, avec un taux de survie à cinq ans de 70%.[58] Néanmoins, la transplantation du foie est le seul traitement définitif à la fois du carcinome hépatocellulaire et de la maladie sous-jacente. Les méthodes palliatives sont proposées aux patients avec des carcinomes dont les traitements curatifs ne

Scanner hélicoïdal : technique d'imagerie utilisant les rayons X, caractérisée par la rotation continue du tube à rayons X, réalisant ainsi un déplacement en hélice, si on se place dans un repère lié à la table.

Cirrhose décompensée : cirrhose accompagnée soit d'une ascite (accumulation de lipides dans la cavité péritonéale) soit d'une rupture des varices oesophagiennes (hémorragie interne) soit d'une atteinte neurologique.

peuvent plus être réalisés, après une évaluation des fonctions hépatiques résiduelles et des co-morbidités. La radiothérapie et la chimiothérapie font partie de ces options. Actuellement, la chimiothérapie proposée est le sorafenib. Des essais cliniques sont en cours avec des anti-angiogéniques associés à des chimiothérapies classiques (gemcitabine par exemple). D'autres thérapies sont en cours d'étude, il s'agit notamment de développer des médicaments dirigés contre les molécules impliquées dans la pathogenèse du cancer.[58]

1.5. Problématique

Comme nous l'avons vu, la pathogenèse de ces maladies est mal comprise, qu'il s'agisse de la stéatose non alcoolique, de l'adénome ou du carcinome hépatocellulaire. La recherche de biomarqueurs constitue par conséquent un défi tant pour l'amélioration du diagnostic que pour le développement de cibles thérapeutiques. De nombreuses études protéomiques ont été menées sur le CHC,[61,62,63,64] mais peu d'équipes de recherche se sont consacrées aux éventuelles implications lipidiques de ces pathologies.[65,66,67] De plus, la plupart des travaux dans le domaine lipidomique est effectuée sur des extraits totaux. L'avantage de l'imagerie par spectrométrie de masse est d'être réalisée *in situ*, ce qui donne accès à la composition moléculaire lipidique du foie, comme une étude sur extrait, mais apporte surtout une information sur la localisation de ces composés. Dans ce contexte, notre travail a eu pour but de déceler d'éventuels marqueurs lipidiques de la stéatose, mais aussi de la transformation maligne d'un adénome hépatocellulaire en carcinome hépatocellulaire. Notre démarche s'est appuyée sur la comparaison de profils lipidiques, obtenus par imagerie ToF-SIMS, de foies contrôle, stéatosiques et tumoraux.

Co-morbidité : trouble ou maladie qui accompagne souvent une pathologie spécifique.

2. Protocole expérimental

2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons de foies humains conservés à -80°C ont été fournis par le Pr Marie-Pierre Bralet. Ils proviennent de la tumorothèque du Centre de Ressources Biologiques Paris-Sud localisée dans le Service d'Anatomo-pathologie de l'Hôpital Paul Brousse (Villejuif). Nous avons travaillé sur deux types de prélèvement : des pièces opératoires (obtenues lors de résections hépatiques chirurgicales) et des biopsies. La différence entre les deux réside essentiellement dans la taille du fragment et dans la façon dont le prélèvement a été effectué. Les caractéristiques cliniques et histopathologiques des patients dont proviennent nos échantillons sont résumées dans le Tableau 1 :

Identifiant	Sexe	Age	Observations histologiques
04B4318	M	36	Stéatose macrovacuolaire : 40%, prédominante en ZCL
06B1910	F	57	Stéatose macrovacuolaire : 30%, prédominante en ZCL
06B0435	M	57	Stéatose macrovacuolaire : 20%, prédominante en ZCL
06B2328	F	51	Stéatose macrovacuolaire : 20%, sans systématisation
06B4496	F	71	Stéatose macrovacuolaire : 10%, sans systématisation
07B452N1	F	22	Adénome hépatocellulaire
06B4398	F	63	Carcinome hépatocellulaire
04B2740	F	41	Foie contrôle
05B3257	F	55	Foie contrôle

Tableau 1: Caractéristiques cliniques des patients dont proviennent les échantillons (ZCL: zone centro-lobulaire).

Les échantillons nous ont été fournis déjà congelés et ont été conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Des coupes de 10 µm d'épaisseur sont réalisées extemporanément au cryostat puis déposées sur le support adapté en fonction de leur utilisation ultérieure. Si la coupe est destinée à une analyse histologique, le support est une lame de verre, si la coupe est destinée à l'imagerie ToF-SIMS, le support est un disque de silicium. Les coupes sont sériées, c'est-à-dire que si la coupe n est destinée à l'histologie, la coupe n+1 est destinée au SIMS, la n+2 à l'histologie, la n+3 au SIMS *etc*…

2.2. Examen histologique

Les coupes sont d'abord fixées par une solution de formol à 10% (pour conserver la morphologie des cellules) puis colorées par une coloration standard, l'HES (Hématéine Éosine Safran) ; l'hématéine colore le noyau des cellules en bleu, l'éosine colore le cytoplasme en rose et enfin le safran colore les fibres conjonctives en orange. Après la coloration, les coupes sont déshydratées (éthanol absolu puis toluène) avant de coller la lamelle grâce à un milieu de montage (Eukitt®).

Les coupes ainsi préparées sont observées au microscope optique (Olympus BX51). L'acquisition de photographies des coupes histologiques permet le repérage des zones d'intérêt à la surface de la coupe à analyser, ce qui facilite le positionnement de l'échantillon au moment d'acquérir les images ToF-SIMS.

2.3. Analyse ToF-SIMS

Toutes les images enregistrées sur les différentes coupes de foies, d'une taille de 500 x 500 μm^2 composées de 256 x 256 pixels (taille de pixel : 2 x 2 μm^2) ont été acquises en utilisant systématiquement l'« *electron floodgun* », avec une fluence d'ions primaires (Bi_3^+) de 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}.

3. Résultats

Pour chaque échantillon, nous avons enregistré des images dans une zone de stéatose et une zone de non stéatose, dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif). Pour comparaison, nous avons enregistré des images dans des zones histologiquement comparables (zone périportale et zone centro-lobulaire) pour les échantillons de foies sans anomalie histologique, dits « normaux », servant de contrôle. Le volume de données est par conséquent très grand et nous ne montrerons ici que les résultats les plus significatifs. L'identification des composés détectés a été réalisée par la méthode décrite dans l'introduction de ce manuscrit (paragraphes IV.2 et IV.3). La structure des lipides observés, accompagnée d'une brève description de leur(s) fonction(s) chez l'homme est détaillée en Annexe 3.

3.1. Profil lipidique d'un foie contrôle

Nous avons travaillé à trois reprises (c'est-à-dire coupes différentes et temps différents) sur ce foie contrôle (n°05B3257), et les résultats obtenus à chaque expérience sont comparables. De même, toutes les expériences menées sur le second foie contrôle (n°04B2740) ont conduit à des résultats tout à fait similaires.

La Figure 6 présente l'image microscopique d'une coupe histologique colorée du foie contrôle n°05B3257. Les deux carrés noirs représentent les zones choisies pour être analysées en imagerie ToF-SIMS. La zone périportale est la zone autour de l'espace porte (5 hépatocytes environ de large) et la zone centro-lobulaire est la zone bordant la veine centro-lobulaire.

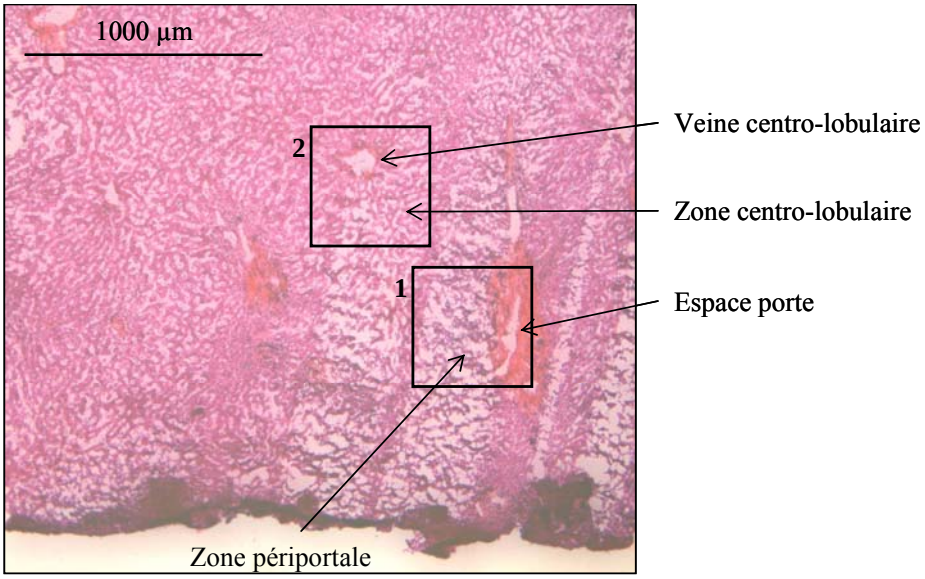


Figure 6: Image optique d'une coupe au cryostat (10 µm) colorée par l'HES du foie contrôle n°05B3257. Les carrés noirs montrent les zones de 500 x 500 μm^2 qui ont été imagées.

3.1.1. Zone périportale

L'espace porte est une « gaine » de tissu conjonctif dans laquelle passent deux vaisseaux sanguins et le canal biliaire. Nous ne nous sommes pas intéressés à l'espace porte car nous pensons, dans un premier temps, qu'il est peu probable de découvrir un marqueur lipidique d'intérêt dans cette région du foie. Nous avons préféré dessiner une ROI de la zone périportale (contenue dans la zone 1) et nous avons acquis le spectre correspondant, en mode

d'ionisation positif, présenté à la Figure 7. Les abscisses du spectre de masse sont comprises entre 250 et 1000 uma, car au-delà, aucun ion d'intérêt n'est détecté, et en deçà de *m/z* 250, les signaux correspondent à des fragments qui présentent un moindre intérêt dans le cadre de notre étude.

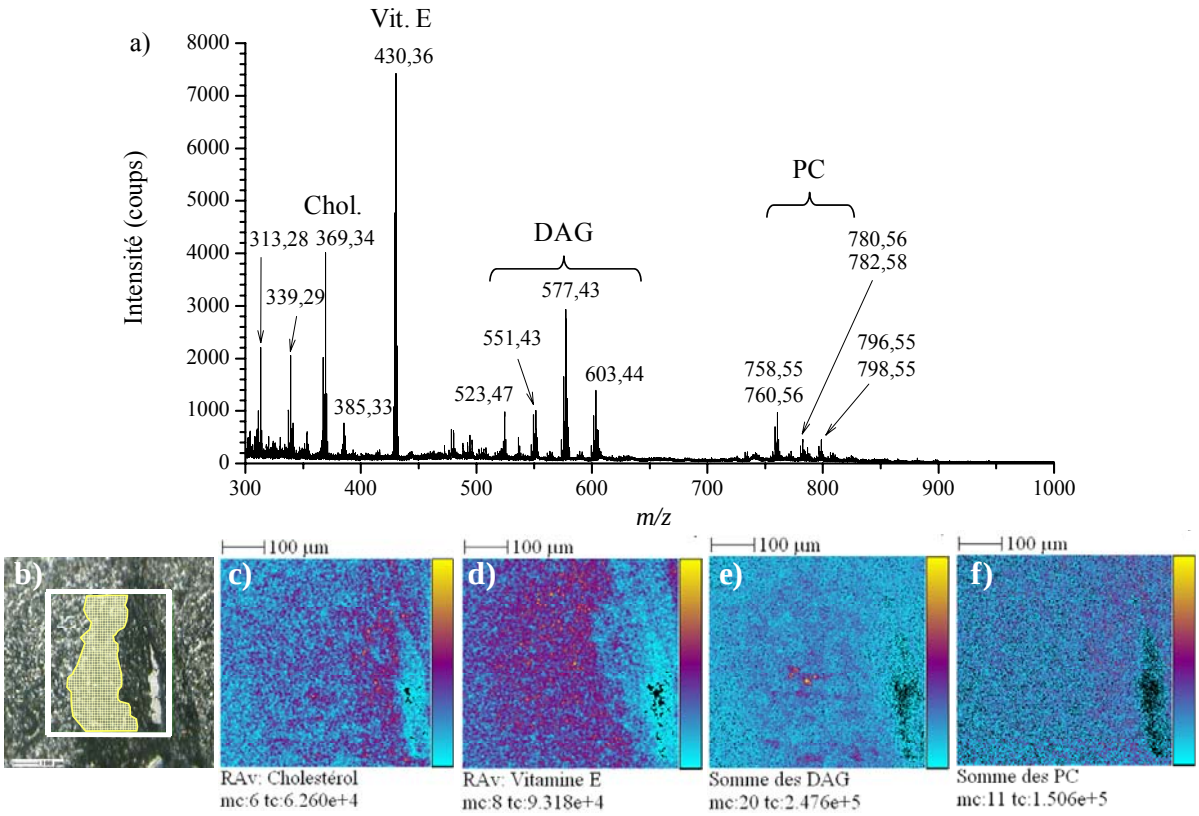


Figure 7: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone périportale d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence: 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les ions aux rapports *m/z* 313,28 et 339,29 correspondent aux fragments de type monoacylglycérols, ils sont issus de la fragmentation de lipides de poids moléculaires plus élevé. Ils partagent notamment la même localisation que les diacylglycérols. Les ions aux rapports *m/z* 369,34 et 385,33 correspondent respectivement aux ions $[M+H-H_2O]^+$ et $[M-H]^+$ du cholestérol. L'image ionique de la somme de ces ions (Figure 7c) est faiblement contrastée, mais le signal est plus intense dans la région qui borde immédiatement l'espace

porte. L'ion majoritaire du spectre est l'ion $M^{+\bullet}$ de la vitamine E, au rapport *m/z* 430,36. L'image ionique de ce composé (Figure 7d) montre une répartition dans la zone périportale. Les diacylglycérols (DAG) sont détectés entre *m/z* 523,47 et 603,44. Chaque massif correspond à un nombre total d'atomes de carbone différent sur les deux chaînes d'acides gras de la molécule. Ainsi, centrés sur le rapport *m/z* 523,47 sont détectés les DAG à 30 atomes de carbone, centrés sur le rapport *m/z* 551,43 sont détectés les DAG à 32 atomes de carbone, centrés sur le rapport *m/z* 577,43 sont détectés les DAG à 34 atomes de carbone et enfin, centrés sur le rapport *m/z* 603,44 sont détectés les DAG à 36 atomes de carbone au total. L'image de la somme de tous les ions de DAG fournit l'image e) de la Figure 7. Il est possible de voir que les DAG sont présents dans la zone périportale, sous forme de petites vésicules bien localisées par un signal très intense. Les dernières espèces détectées sur le spectre de la Figure 7 sont les phosphatidylcholines (PC). Deux types de PC sont particulièrement détectés, il s'agit des ions aux rapports *m/z* 758,55 et 760,56, correspondant aux ions $[M+H]^+$ des PC34:1 et PC 34:2. Les pics apparaissant aux rapports *m/z* 780,56 et 782,58 d'une part et 796,55 et 798,56 d'autre part correspondent respectivement aux adduits avec le sodium et le potassium de ces phosphatidylcholines. L'image associée à la somme de ces ions (molécules protonées, adduits sodium et adduits potassium) est faiblement contrastée mais suffisamment pour constater que ces ions sont localisés dans la zone jouxtant immédiatement l'espace porte.

Nous avons également travaillé sur la même zone, en mode d'ionisation négatif. Le spectre ToF-SIMS obtenu est présenté à la Figure 8, ainsi que les images ioniques de certains des composés détectés. De même que pour le mode positif, en mode négatif, aucun ion n'est détecté après *m/z* 1000, et les signaux présents en deçà de *m/z* 200 sont issus de fragments dont l'intérêt est moindre dans le cadre de notre étude. Les composés majoritairement présents à la surface de la coupe sont les acides gras (AG). Nous pouvons distinguer les acides gras possédant 16 et 18 atomes de carbone, ainsi que leurs divers degrés d'insaturation (C16:1, C16:0, C18:2, C18:1 et C18:0). La carte de densité ionique de la somme des acides gras (Figure 8c) donne une localisation homogène, avec une intensité plus importante dans la zone périportale. L'intensité des signaux dont le rapport *m/z* est compris entre 400 et 1000 a dû être multipliée sans quoi ces pics n'auraient pas été visibles sur le spectre. La vitamine E est détectée, et l'image correspondante confirme la localisation obtenue en mode d'ionisation positif. Des phospholipides, différents de ceux observés en mode d'ionisation positif, sont détectés. Aux rapports *m/z* 642,51 et 687,57 sont détectés des fragments de la

sphingomyéline 34:1. L'image de la somme de ces fragments est donnée à la Figure 8e), où l'on constate que ce phospholipide n'est présent qu'autour de l'espace porte.

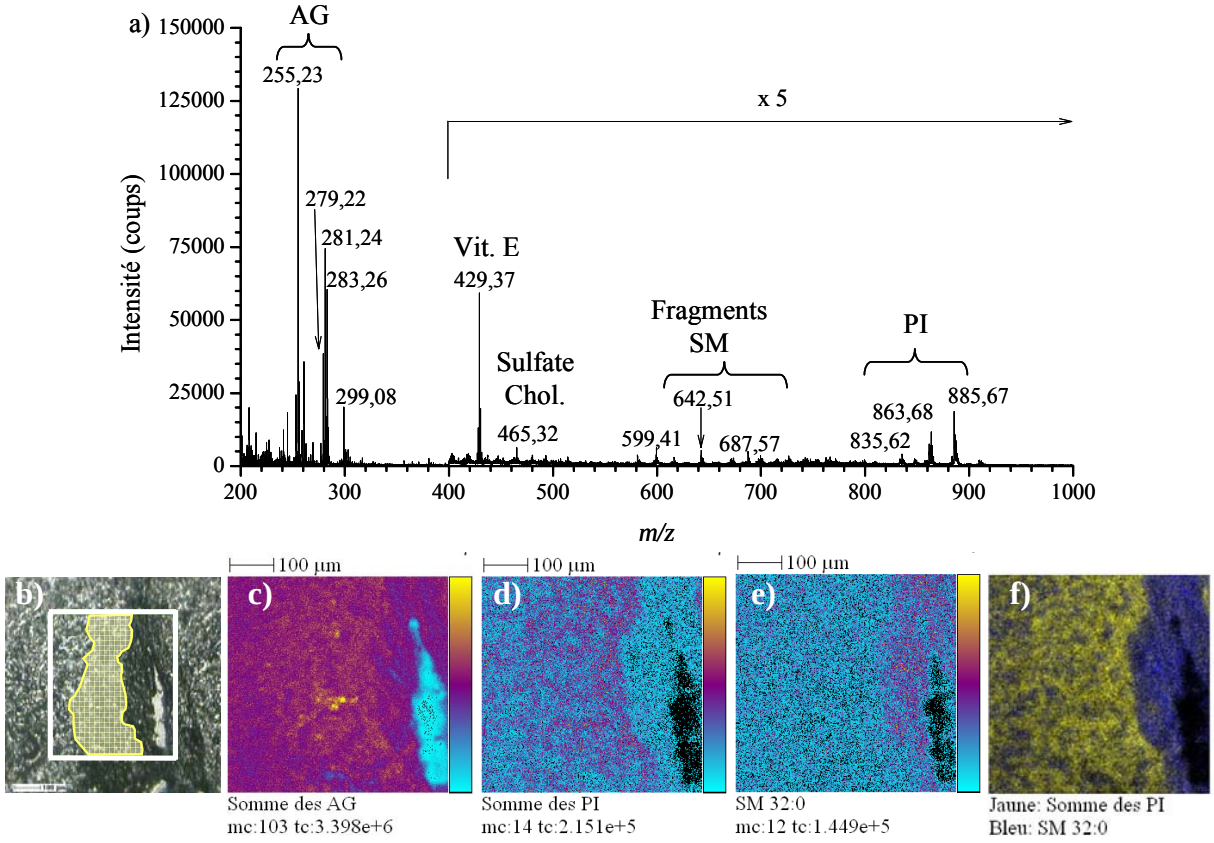


Figure 8: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone périportale d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Enfin, les derniers ions présents sur le spectre sont ceux correspondant aux ions $[M-H]^-$ des phosphatidylinositols (PI). Comme pour les DAG en mode d'ionisation positif, il est possible, en ToF-SIMS, de détecter des PI différant par le nombre total d'atomes de carbone sur les deux chaînes d'acide gras les composant. Il est également possible de détecter différents degrés d'insaturation. Dans le cas présent, nous détectons, au rapport *m/z* 885,67, le PI 38:4 (le plus abondant chez l'humain), au rapport *m/z* 863,68, le PI 36:1 et au rapport *m/z* 835,62, le PI 34:1. La carte de densité ionique de la somme de ces ions (Figure 8d) montre une répartition très nette de ces composés dans la zone périportale. La superposition en deux

couleurs des images des PI et de la SM 34:1 est montrée à la Figure 8f et l'anti-co-localisation est très claire sur cet exemple.

Cas particulier des acides gras

L'image des acides gras présentée à la Figure 8 est une image de la somme de tous les AG détectés à la surface de la coupe. Néanmoins, leur répartition n'est pas aussi homogène qu'il y paraît et certaines différences de localisation apparaissent. La Figure 9 montre les cartes de densité ionique des AG en C16:0, C18:2 et C18:1.

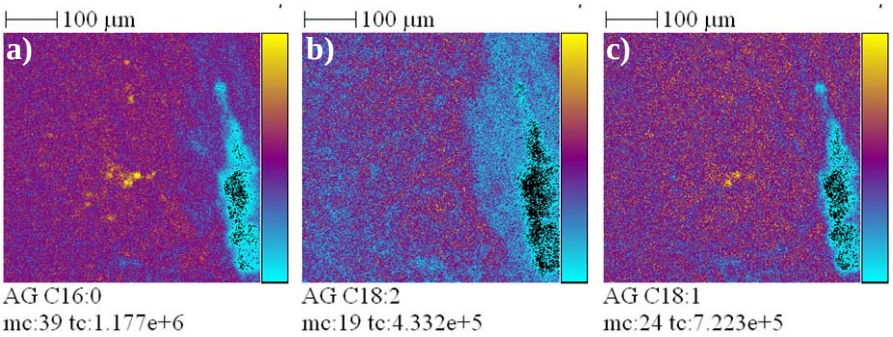


Figure 9: Cartes de densité ionique des AG, a) C16:0, b) C18:2 ; c) C18:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Il est possible de voir que l'acide palmitique (C16:0) est présent de façon homogène sur la coupe, avec néanmoins une intensité plus importante au centre de l'image et moindre dans la zone qui borde l'espace porte. En ce qui concerne l'acide linoléique (C18:2), il est localisé très nettement au contact de l'espace porte, au niveau de la lame bordante. Enfin, l'acide oléique (C18:1) est présent de façon très homogène sur toute la coupe, que ce soit dans la zone qui borde immédiatement l'espace porte ou un peu plus à distance.

3.1.2. Zone centro-lobulaire

La zone 2 (*cf.* Figure 6) comprend la veine centro-lobulaire et sa lumière (dont le contenu lipidique ne nous intéresse pas) et la zone hépatocytaire centro-lobulaire, dont nous cherchons à établir le profil lipidique. Comme précédemment, nous avons dessiné une ROI de la zone centro-lobulaire (contenue dans la zone 2), et nous avons extrait le spectre de masse correspondant.

Le spectre enregistré en mode d'ionisation positif, est présenté à la Figure 10 ainsi que les images ioniques de quelques composés détectés à la surface de la coupe. Tous les signaux

détectés sur le spectre de la zone périportale le sont également sur le spectre de la zone centro-lobulaire. L'ion $M^{+\bullet}$ de la vitamine E est toujours le plus abondant. La différence vient de l'intensité relative des phosphatidylcholines, qui a augmenté par rapport au spectre acquis dans la zone périportale. Le cholestérol et la vitamine E ont des localisations identiques : ils sont présents sur l'ensemble de la zone analysée, mais sont plus abondants dans la lumière de la veine centro-lobulaire.

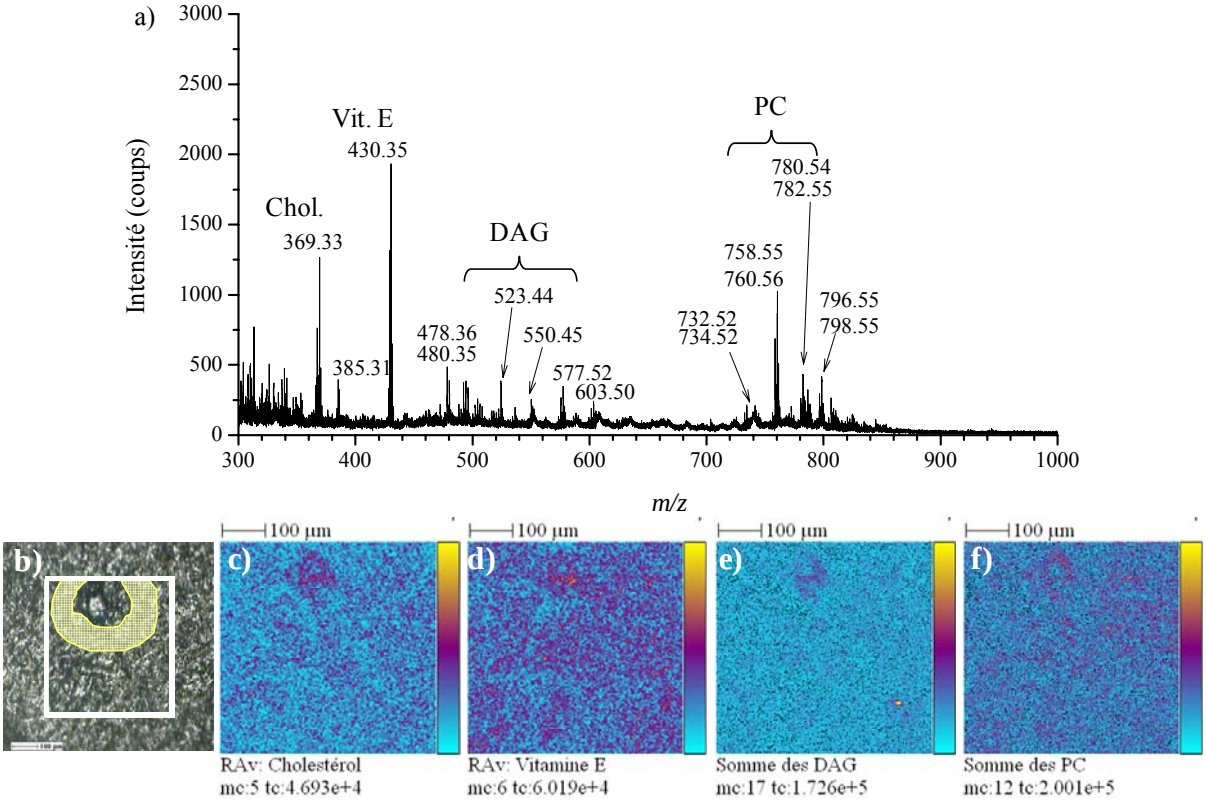


Figure 10: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les diacylglycérols sont très faiblement détectés sur le spectre et l'image de leur somme (Figure 10e) montre un faible signal, sauf dans la veine centro-lobulaire et un point très intense en bas à droite de l'image. Ce point ne correspond cependant à aucune particularité

histologique. Les phosphatidylcholines sont également réparties de façon homogène sur toute la zone analysée, y compris dans la veine, où leur signal semble plus intense.

Le spectre ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif dans la zone centro-lobulaire est présenté à la Figure 11, accompagné des images ioniques des composés les plus abondants du spectre.

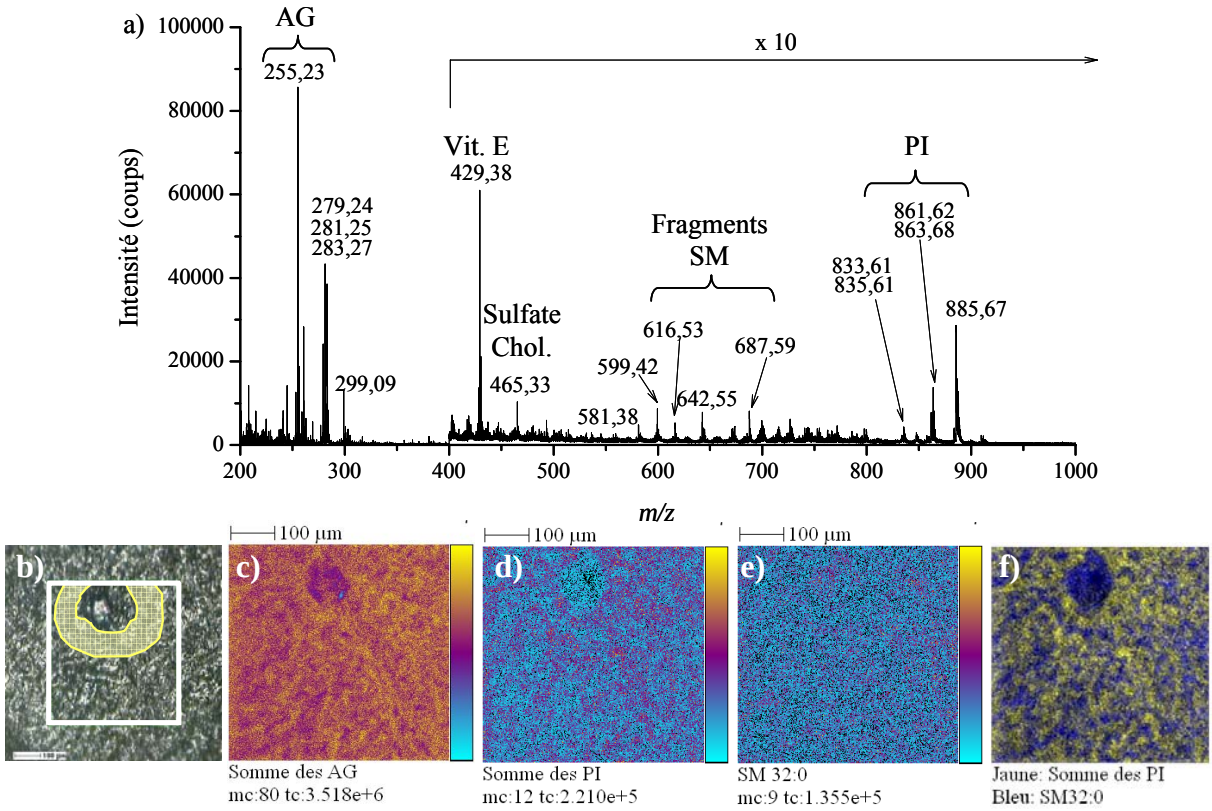


Figure 11: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG); d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI); e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Comme dans le cas de la zone périportale, le spectre de masse est dominé par les signaux des acides gras. On retrouve les mêmes espèces à 16 et 18 atomes de carbone, avec les mêmes degrés d'insaturation. Leur localisation est homogène, dans la zone centro-lobulaire et dans la veine, avec une intensité plus faible dans cette dernière. Cette fois-ci,

aucune différence de répartition n'a été observée entre les différentes espèces d'acides gras. Nous détectons, en plus des phosphatidylinositols déjà vus dans la zone périportale, les PI 36:2 (*m/z* 861, 62) et PI 34:2 (*m/z* 833,61). L'image de la somme de ces ions montre que les PI sont présents dans la zone centro-lobulaire et sont absents de la veine, contrairement aux fragments de la sphingomyéline 34:1. Leur anti-co-localisation est très visible sur la superposition en deux couleurs (Figure 11f).

Nous pouvons donc établir que le profil lipidique du foie contrôle, obtenu par imagerie ToF-SIMS, contient :

- ✓ des acides gras, détectés en tant que fragments de lipides de plus grande taille ;
- ✓ du cholestérol et du sulfate de cholestéryle ;
- ✓ de la vitamine E ;
- ✓ des diacylglycérols, qui peuvent être libres ou être issus de la fragmentation de lipides plus lourds ;
- ✓ des glycérophospholipides tels que les phosphatidylcholines ou les phosphatidylinositols ;
- ✓ et de la sphingomyéline, et plus précisément celle ayant 34 atomes de carbone sur ses deux chaînes d'acides gras et une insaturation.

Les spectres de masse extraits des zones périportale et centro-lobulaire montrent que la composition lipidique d'un foie contrôle est homogène, et que dans le cas des lipides, aucune zonation métabolique n'a pu être distinguée par imagerie ToF-SIMS.

3.2. Profils lipidiques de foies pathologiques

3.2.1. Foie stéatosique

Nous avons travaillé à trois reprises (sur des coupes différentes à des temps différents) sur ce foie stéatosique, et les résultats obtenus à chaque expérience sont comparables. Dans ce paragraphe, nous décrirons le contenu lipidique d'un foie stéatosique, qui s'est révélé être une caractéristique constante quel que soit le degré de stéatose du foie étudié.

La Figure 12 présente l'image microscopique d'une coupe histologique colorée du foie stéatosique n°06B1910. Les deux carrés noirs représentent les zones choisies pour être analysées en imagerie ToF-SIMS. La zone périportale est la zone autour de l'espace porte (5 hépatocytes environ de large) qui est histologiquement normale et la zone centro-lobulaire est la zone bordant la veine centro-lobulaire qui est histologiquement pathologique (présence d'une stéatose) sur cette coupe.

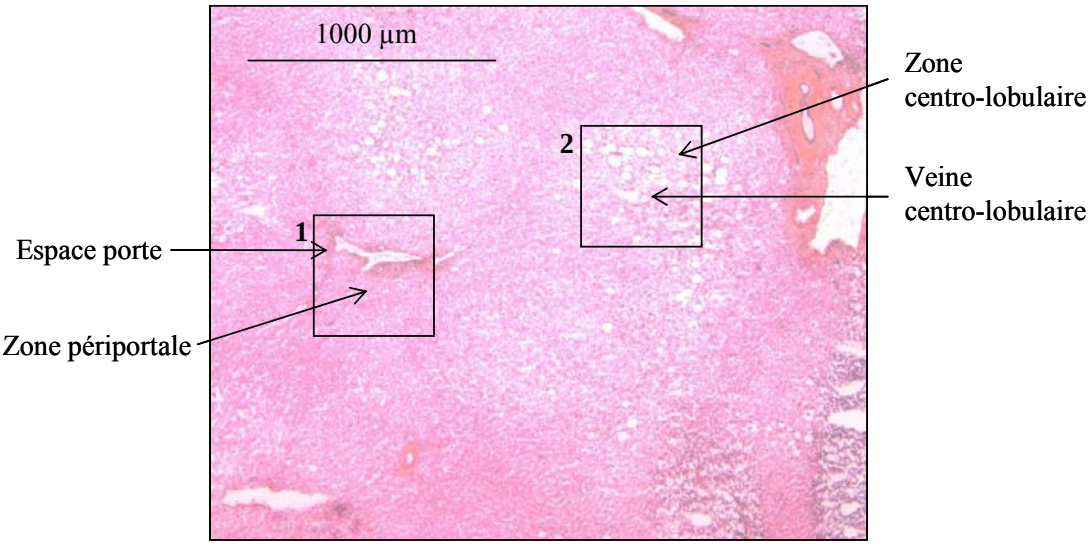


Figure 12: Image optique d'une coupe au cryostat (10 µm) colorée par l'HES du foie stéatosique n°06B1910. Les carrés noirs montrent les zones de 500 x 500 μm^2 qui ont été imagées.

3.2.1.1. Zone périportale

Pour le foie stéatosique, nous avons procédé comme pour le foie contrôle. Nous avons dessiné une ROI de la zone périportale (contenue dans la zone 1). Le spectre de masse présenté à la Figure 13 est le spectre enregistré en mode d'ionisation positif, dans la zone périportale de la zone 1.

Les pics aux rapports *m/z* 313,23 et 339,25 sont ceux des fragments de type monoacylglycérols, issus de la fragmentation d'espèces de plus haut poids moléculaire. Leur localisation est la même que celle des diacylglycérols. Le cholestérol est détecté, au travers du fragment $[M+H-H_2O]^+$ au rapport *m/z* 369,34. L'ion $[M-H]^+$ n'est que très faiblement détecté. Néanmoins, nous obtenons tout de même une image ionique exploitable (Figure 13c) sur laquelle la localisation du cholestérol est homogène, avec une intensité augmentée dans l'espace porte. L'ion $M^{+\bullet}$ de la vitamine E est détecté, au rapport *m/z* 430,27, l'image ionique

correspondante (Figure 13d) montre la même localisation que le cholestérol. Les ions majoritaires sur le spectre sont ceux des diacylglycérols, avec 30, 32, 34 et 36 atomes de carbone au total sur les deux chaînes d'acide gras. L'image de la somme de ces ions (Figure13e) montre qu'ils sont essentiellement répartis dans la zone périportale, sous forme de petites vésicules.

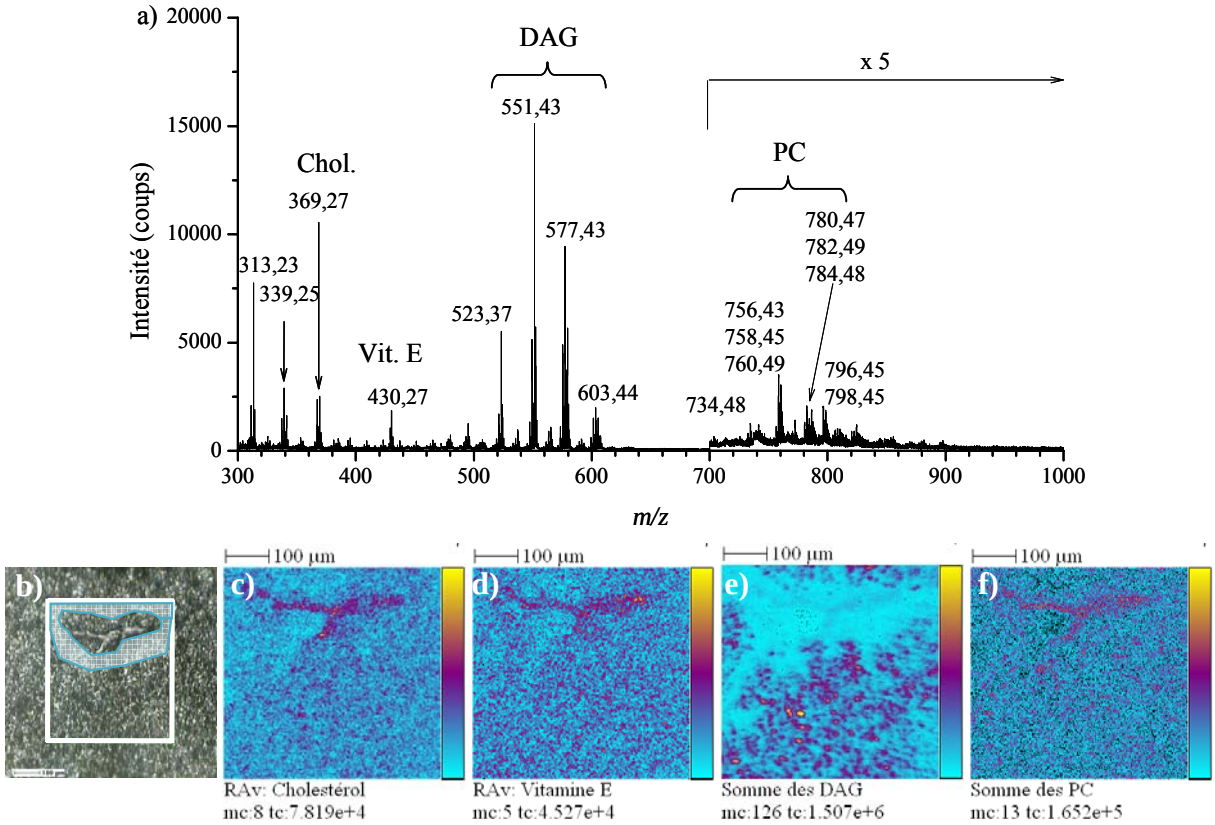


Figure 13: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone périportale d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacyglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Enfin, les phosphatidylcholines sont les espèces de plus hauts rapports *m/z* détectées sur le spectre. L'ion $[M+H]^+$ de la PC 32:0 est détecté au rapport *m/z* 734,48, l'adduit avec le sodium de celle-ci est présent également, au rapport *m/z* 756,43. Les PC 34:2 et 34:1 sont présentes, ainsi que leurs adduits avec le sodium et le potassium. L'image ionique de la

somme de ces ions (Figure13f) montre que les PC sont essentiellement présentes à l'intérieur de l'espace porte.

Le spectre de masse enregistré en mode d'ionisation négatif est présenté à la Figure 14, ainsi que les images ioniques de la somme des acides gras (Figure 14c), celle de la somme des phosphatidylinositols (Figure 14 d) et celle de la somme des fragments de la SM 34:1 (Figure 14e).

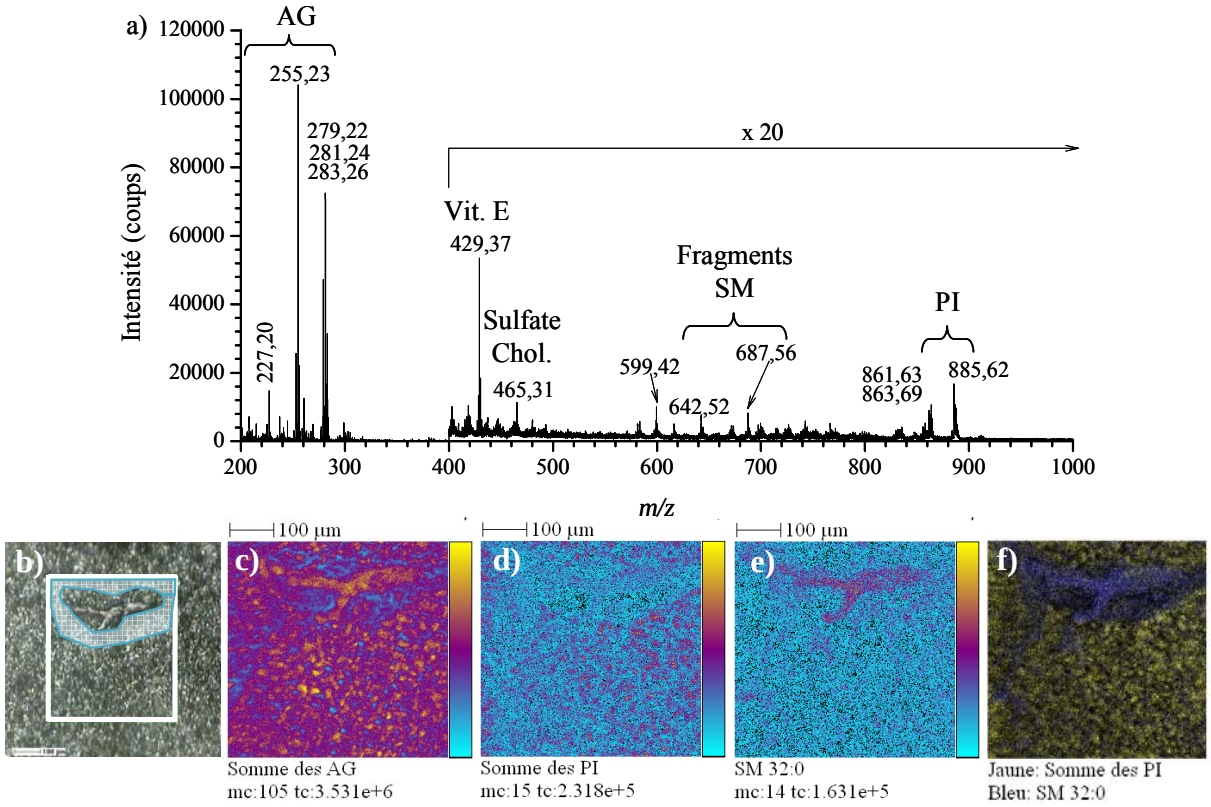


Figure 14: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif, d'une zone périportale d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les acides gras sont très largement majoritaires sur le spectre de la Figure 14. Nous observons des signaux correspondant à des acides gras à 14, 16 et 18 atomes de carbone. L'image associée à la somme de ces ions montre une localisation homogène (sans disparité selon la longueur de la chaîne ou le degré d'insaturation), dans l'espace porte comme dans la

zone l'entourant, sous forme de vésicules dans cette dernière. Cette répartition n'est pas sans rappeler celle des DAG observée en mode d'ionisation positif. Il est d'ailleurs très probable que les AG détectés ici soient issus de la fragmentation de DAG ou de phospholipides plus lourds. La vitamine E est détectée, mais son signal est faible, et l'image associée ne montre pas un contraste suffisant pour être exploitable. Des phosphatidylinositols sont détectés, néanmoins, les PI à 34 atomes de carbone n'apparaissent plus sur le spectre. Comme précédemment, la somme des ions de PI et la somme des fragments de sphingomyéline 34:1 ont des répartitions opposées, comme le montre la superposition en deux couleurs à la Figure 14f.

3.2.1.2. Zone centro-lobulaire

La zone choisie sur la coupe (zone 2, *cf*. Figure 12) contient la veine centro-lobulaire donc nous avons cette fois encore dessiné une ROI, en excluant la veine et sa lumière. Le spectre de masse acquis en mode d'ionisation positif, dans la zone centro-lobulaire d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 est présenté à la Figure 15.

Comme pour la zone périportale, le cholestérol n'est détecté que sous la forme de l'ion fragment $[M+H-H_2O]^+$ au rapport *m/z* 369, 33. L'image ionique correspondante (Figure 15c) montre une répartition en grosses vésicules, dans la zone centro-lobulaire exclusivement. La vitamine E est détectée mais l'intensité du pic de l'ion $M^{+\bullet}$ est trop faible pour donner une image contrastée. Les diacylglycérols sont les ions les plus abondants du spectre et l'image de leur somme donne la même répartition que celle du cholestérol (et des monoacylglycérols). De légères variations de localisation, en fonction du nombre total d'atomes de carbone des deux chaînes acyles, ont été observées ; elles seront détaillées plus loin. Les phosphatidylcholines sont détectées et leur signal est faible. La carte de densité ionique associée à la somme de tous les ions de PC donne la Figure 15e et montre une répartition homogène de ces composés à la surface de la zone analysée. Les composés de plus hauts poids moléculaires détectés sur ce spectre sont des triacylglycérols (TAG). Aux rapports *m/z* 853,69 ; 855,73 et 857,74 sont détectés les ions $[M+Na]^+$ des TAG C50:2, C50:1 et C50:0 respectivement. Des TAG de plus haut poids moléculaire sont également détectés, aux rapports *m/z* 879,67, 881,71 et 883,74 ; correspondant aux adduits avec le sodium des TAG C52:3, C52:2 et C52:1, respectivement. Ces espèces ne sont détectées que dans la zone

centro-lobulaire d'un foie stéatosique. Leur répartition suit celle des DAG, qui résultent, au moins en partie, de la fragmentation des TAG (*cf* paragraphe 4.2).

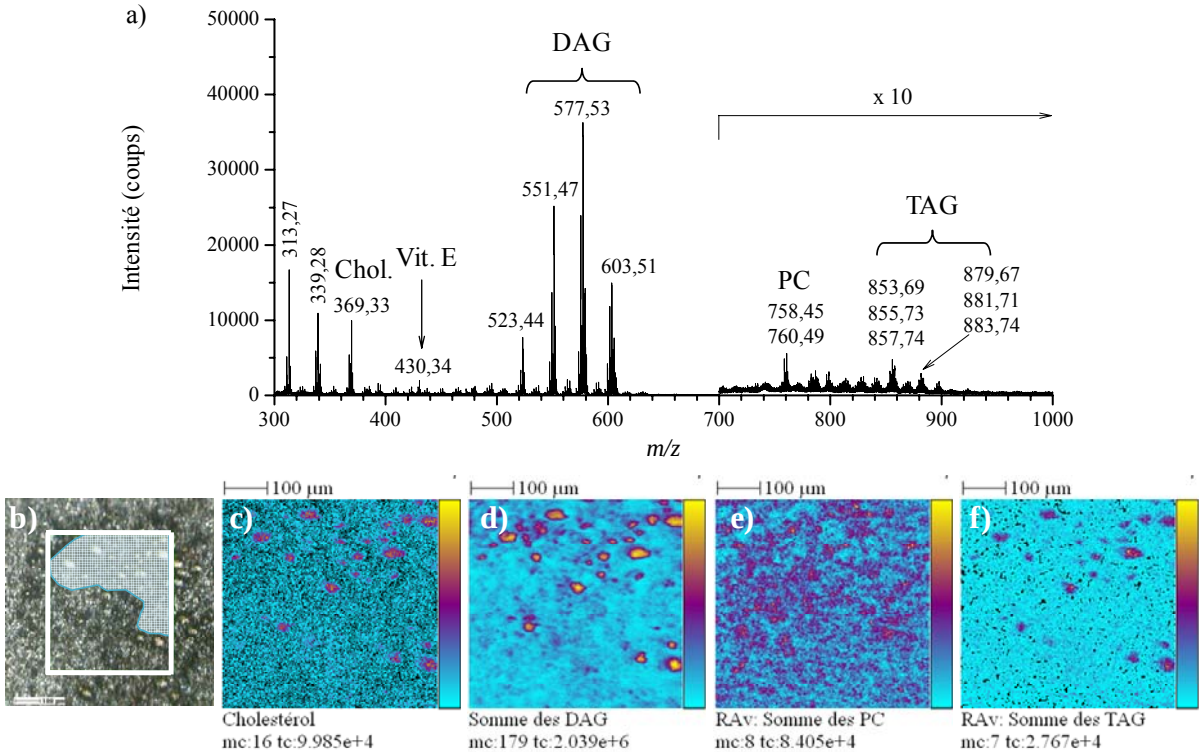


Figure 15: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; e) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) ; f) Image ionique de la somme des triacylglycérols (TAG) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Par ailleurs, la co-localisation observée pour le cholestérol, les DAG et les TAG nous renseigne sur la nature du cholestérol que nous détectons ici. Si ces espèces sont co-localisées, c'est qu'elles ont des propriétés physico-chimiques proches. Il s'agit donc probablement d'un fragment de la forme estérifiée du cholestérol qui est détectée, car, une fois estérifié, le cholestérol perd son caractère amphiphile pour devenir un lipide neutre, comme les DAG et les TAG.

Cas particulier des diacylglycérols

Il est intéressant de détailler l'étude de ces composés. A la Figure 16a, l'espèce représentée en jaune correspond aux DAG à 30 atomes de carbone ; à la Figure 16b, l'espèce représentée en bleu correspond aux DAG à 36 atomes de carbone, à la Figure 16c, ce sont les DAG à 34 atomes de carbone et enfin, à la Figure 16d, ce sont les DAG C32 qui sont représentés en bleu. Si les deux espèces sont anti-co-localisées, les deux signaux apparaîtront jaune et bleu respectivement. Toute modification de la couleur traduit une co-localisation, au moins partielle.

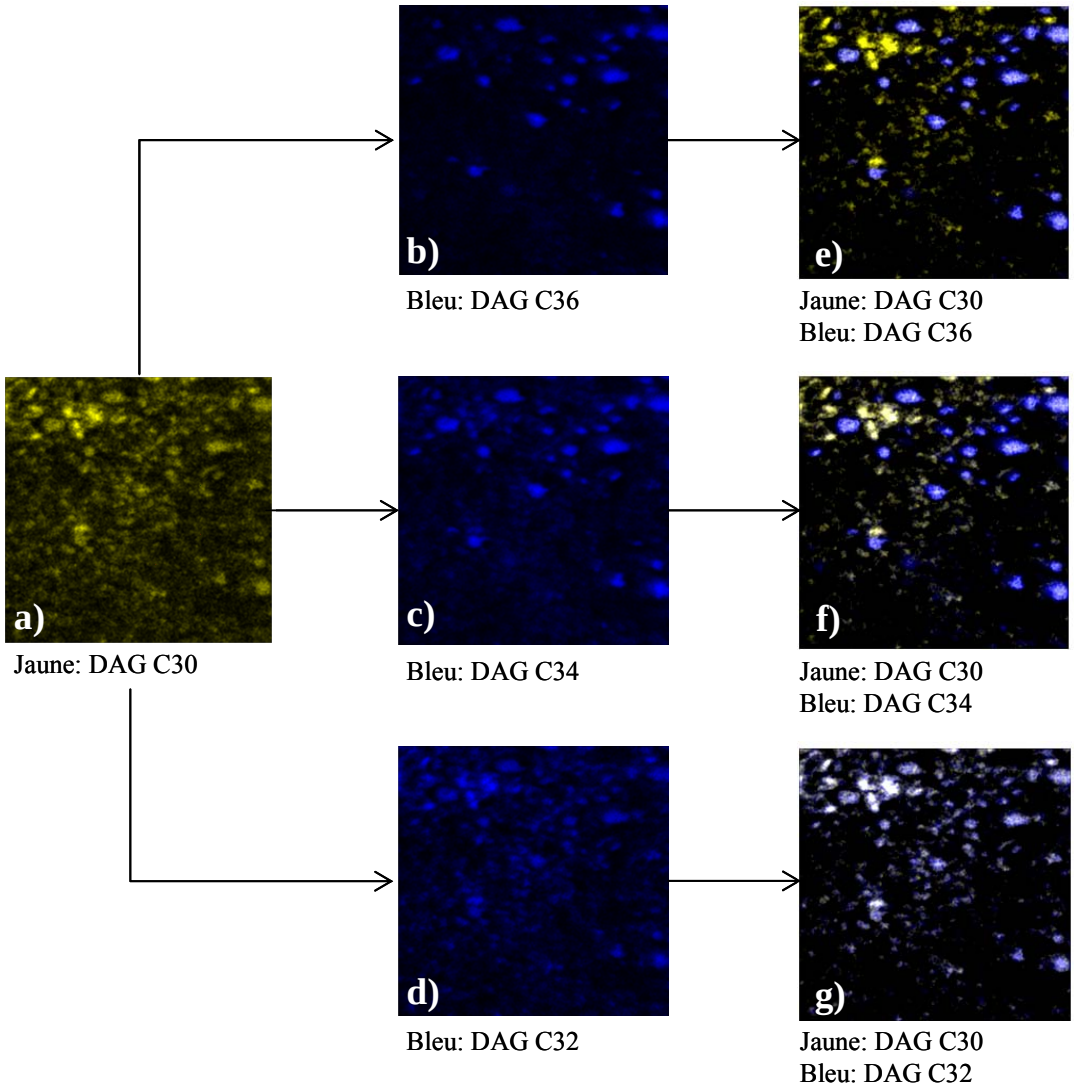


Figure 16: a) Image des DAG C30 ; b) Image des DAG C36 ; c) Image des DAG C 34 ; d) Image des DAG C32 ; e) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C36 : f) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C34 ; g) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C32. Images de 500 x 500 μm^2.

La Figure 16e montre que les signaux de DAG C30 et C36 sont respectivement jaunes et bleus, ce qui traduit une anti-co-localisation complète. Sur la Figure 16f, une zone en haut à gauche de l'image n'apparaît plus jaune comme sur la Figure 16e, mais jaune pâle, ce qui traduit qu'à cet endroit, les DAG C30 et C34 sont présents. D'autre part, les gouttelettes bleues sont toujours détectées, traduisant une co-localisation partielle seulement. Enfin, la Figure 16g, représentant la superposition des DAG C30 et C32, montre que la même zone en haut à gauche de l'image est de couleur blanche signifiant une co-localisation de ces espèces.

Il n'est cependant pas aisé de déterminer, à partir de ces images superposées, quelle espèce de diacylglycérols est la plus abondante, d'autant que celle ci semble varier en fonction de la zone considérée. Nous avons donc extrait les spectres des trois zones dans lesquelles les diacylglycérols sont détectés. La Figure 17 présente les ROIs dessinées ainsi que les histogrammes représentant l'intensité des signaux de DAG en fonction de l'espèce considérée. Contrairement aux superpositions en deux couleurs de la Figure 16, les histogrammes de la Figure 17 montrent que quelle que soit la zone considérée, toutes les espèces de diacylglycérols sont présentes. Leurs abondances relatives varient d'une zone à l'autre, bien que les espèces majoritaire et minoritaire soient les mêmes pour les trois zones considérées. Il s'agit des DAG à 34 et 30 atomes de carbone, respectivement. Nous pouvons donc déduire que les DAG les plus abondants dans la zone centro-lobulaire du foie stéatosique sont, par ordre d'abondance décroissante les DAG à 34 atomes de carbone, puis à 32, puis à 36 et les moins abondants sont les DAG portant 30 atomes de carbone sur leur deux chaînes acyles.

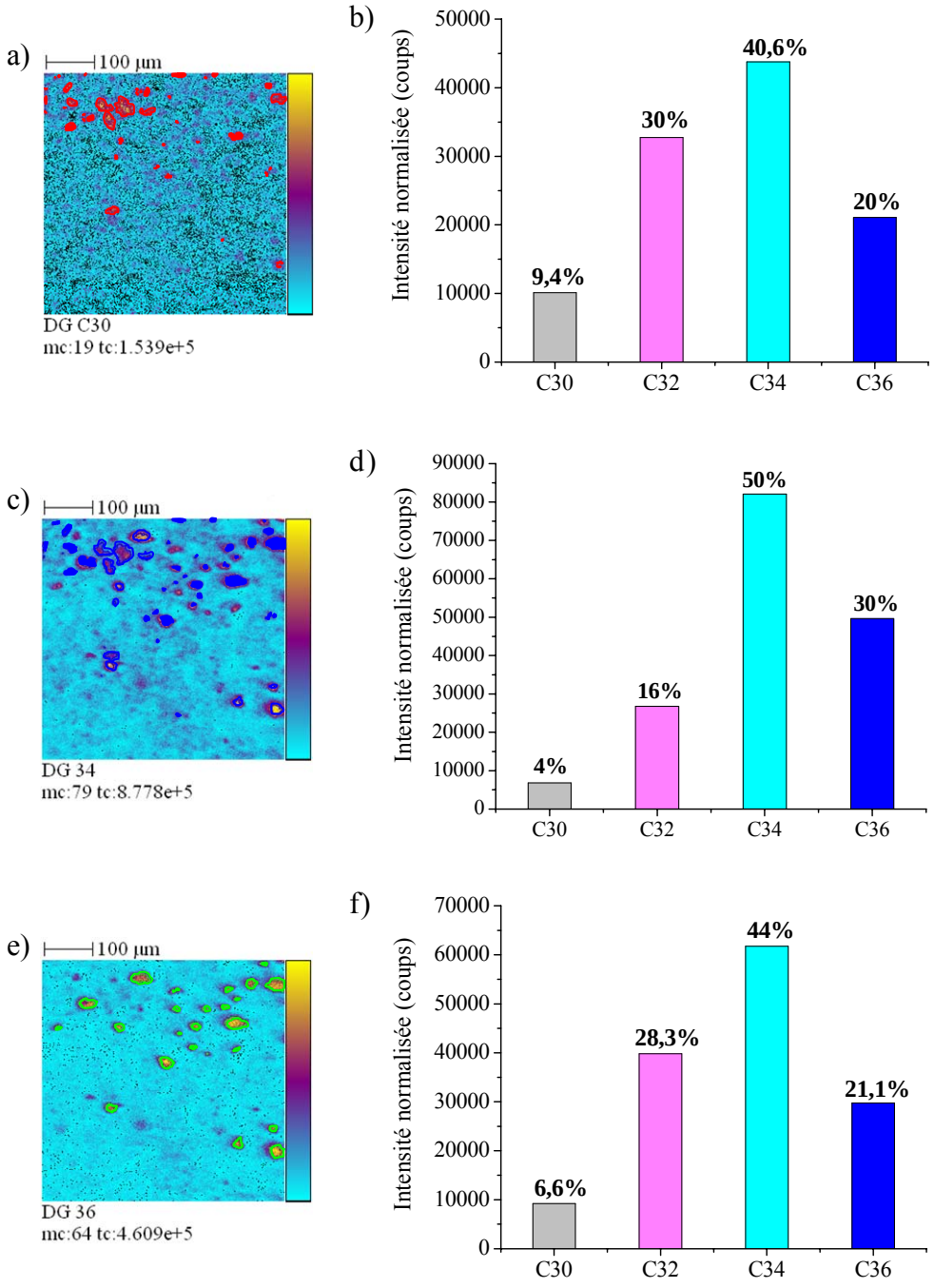


Figure 17: a) Image présentant la ROI correspondant à la zone de DAG C30 ; b) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette ROI ; c) Image montrant la ROI correspondant à la zone de DAG C32/C34 ; d) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette zone ; e) Image présentant la ROI correspondant à la zone de DAG C36 ; f) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette ROI. L'intensité des signaux de DAG a été normalisée par rapport à l'aire de la ROI la plus petite (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Le spectre de masse enregistré dans la zone centro-lobulaire, en mode d'ionisation négatif, est représenté à la Figure 18, accompagné des images ioniques des acides gras, des triacylglycérols et de la superposition des images ioniques des phosphatidylinositols et de la somme des fragments de la sphingomyéline 34:1.

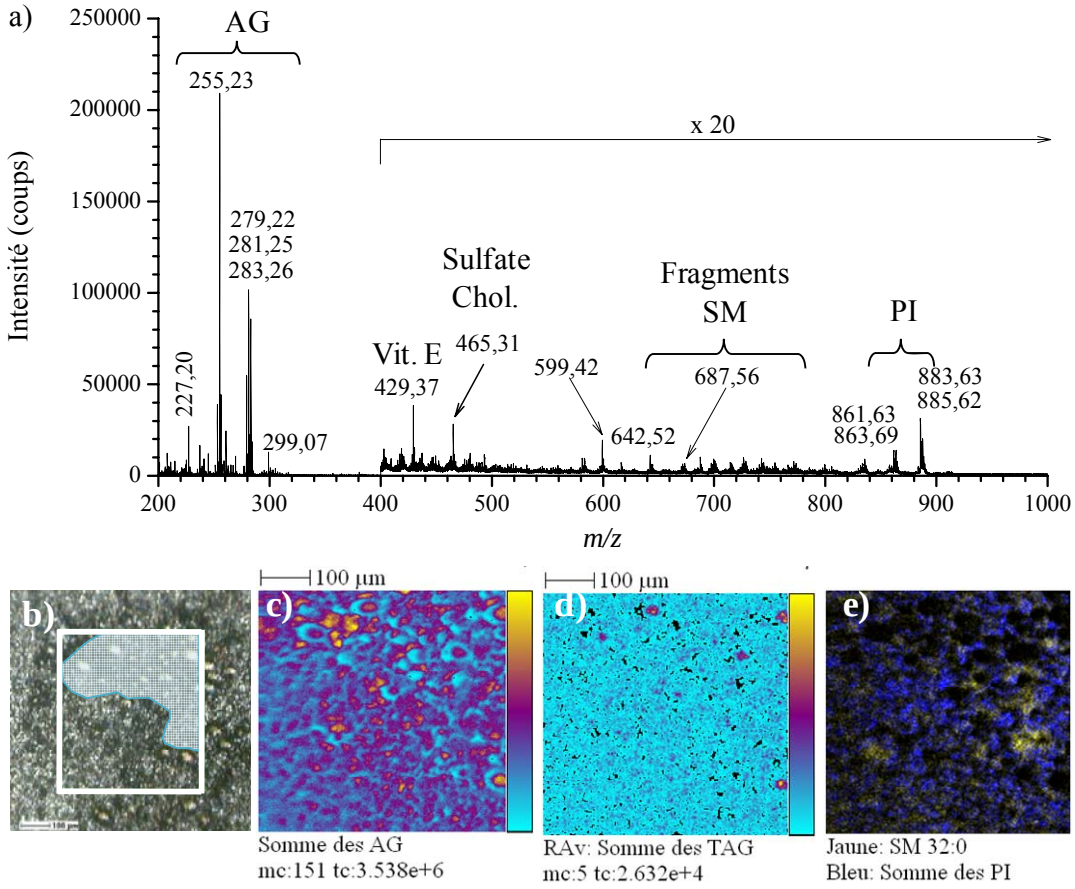


Figure 18: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des triacylglycérols (TAG) ; e) Superposition en deux couleurs des images des phosphatidylinositols (PI) et de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les signaux des acides gras sont les plus abondants du spectre. Ils sont détectés sur toute la surface analysée et forment de grosses gouttelettes, comme les diacylglycérols en mode d'ionisation positif. Des triacylglycérols sont détectés, bien qu'ils ne soient pas annotés

sur le spectre car l'intensité des pics correspondants est très faible. L'image ionique de ces composés donne une répartition en vésicules mais cette cartographie est difficilement exploitable, étant donné son faible contraste. La Figure 18e montre la superposition des images des phosphatidylinositols (PI 38:4, PI 36:2 et PI 36:1) et de la somme des fragments de sphingomyéline 34:1. Comme pour les trois autres zones analysées (foie contrôle et stéatosique confondus), une anti-co-localisation se dessine, mais cette fois ci, les deux images ne sont pas véritablement complémentaires.

Cas particulier des acides gras

Comme dans le cas de la zone périportale du foie contrôle, nous avons constaté que tous les acides gras n'avaient pas la même répartition au sein de la région analysée. Ce partage est illustré à la Figure 19 où les images des acides gras sont comparées à celles des DAG enregistrées en mode d'ionisation positif :

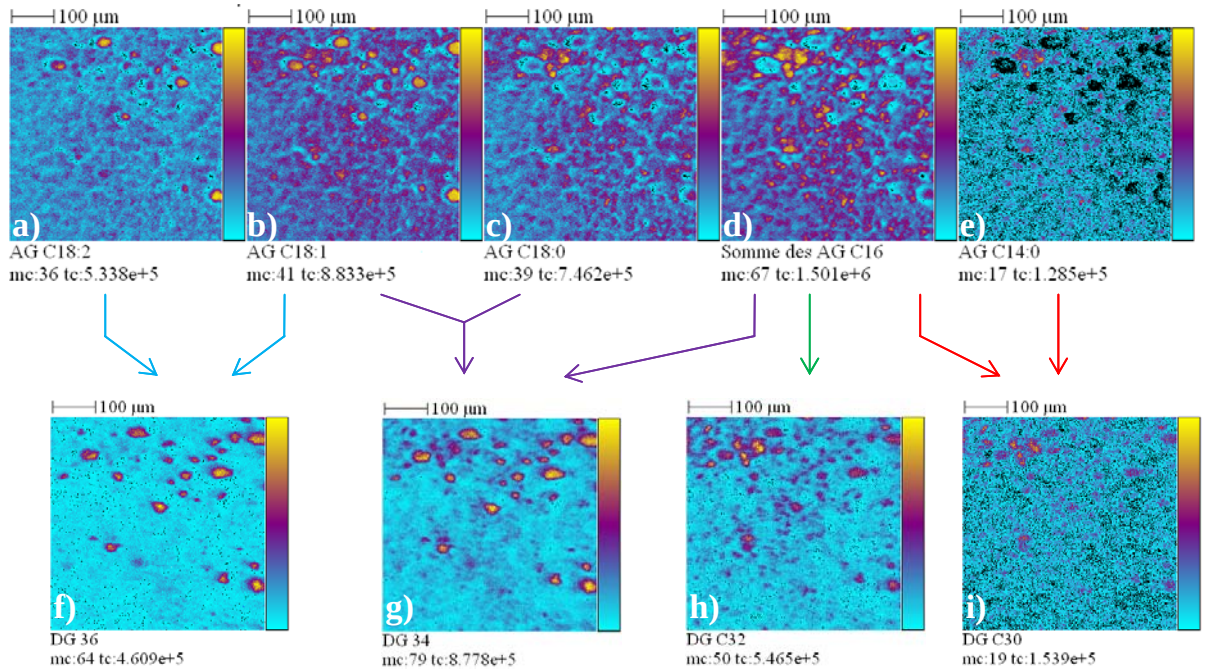


Figure 19: a) Image ionique de l'acide oléique ; b) Image ionique de l'acide linoléique ; c) Image ionique de l'acide stéarique ; d) Image ionique de la somme des acides palmitoléique et palmitique ; e) Image ionique de l'acide myristique ; f) Image ionique de la somme des DAG C36 ; g) Image ionique de la somme des DAG C34 ; h) Image ionique de la somme des DAG C32 ; i) Image ionique de la somme des DAG C30, enregistrées sur une zone centro-lobulaire du foie stéatosique n°06B1910 (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

L'acide linoléique est le seul à présenter une localisation en gouttelettes (Figure 19a). Cette localisation particulière est retrouvée pour les DAG C36 (Figure 19f), ce qui est logique puisque les acides gras constitutifs des DAG C36 portent 18 atomes de carbone. La Figure 19b montre que l'acide oléique est présent dans les gouttelettes mais aussi de façon beaucoup plus homogène. Cette répartition est semblable à celle des DAG C34, qui sont constitués de chaînes d'acides gras possédant 16 et 18 atomes de carbone. Il n'est donc pas étonnant d'observer une co-localisation d'une espèce d'acide gras à 18 atomes de carbone et des DAG C34. Enfin, les Figures 19c à 19e montrent les images ioniques des acides stéarique, de la somme des acides palmitique et palmitoléique et de l'acide myristique. Tous sont présents en dehors des gouttelettes uniquement. Ceci est cohérent avec l'image des DAG C30 (Figure 19i) qui sont composés de chaînes acyles à 14 et 16 atomes de carbone. Enfin, la Figure 19h montre l'image des DAG C32, composés majoritairement de deux chaînes d'acide gras à 16 atomes de carbone. Cette image présente une répartition très proche de celle de la somme des acides gras à 16 atomes de carbone. Pour appuyer ces constatations, une superposition des images des acides gras en mode d'ionisation négatif et des diacylglycérols en mode d'ionisation positif se serait révélée judicieuse pour comparer les différentes répartitions de ces espèces. Malheureusement, quand ces expériences ont été réalisées, il existait un décalage horizontal que nous ne savions pas corriger entre les images ioniques acquises en mode négatif et en mode positif. Les superpositions, bien que fortement suggestives, ne sont pas assez rigoureuses pour être présentées ici.

3.2.2. Foie tumoral bénin : Adénome hépatocellulaire

Nous n'avons réalisé qu'une expérience sur ce foie, et les résultats obtenus sont préliminaires. La Figure 20 présente l'image microscopique d'une coupe du foie tumoral n°07B452N1 (AHC), colorée par histologie. Le carré noir représente la zone choisie pour être analysée en imagerie ToF-SIMS. Dans cette tumeur, l'architecture lobulaire a disparu et nous avons travaillé sur une unique zone de tissu tumoral.

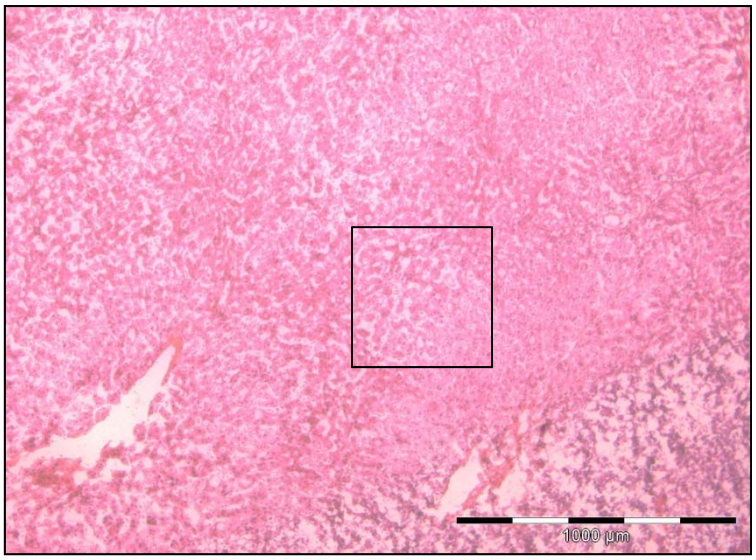


Figure 20: Image optique d'une coupe congelée d'adénome hépatocellulaire (10 µm) n°07B452N1 (AHC) colorée par l'HES. Le carré noir montre la zone de 500 x 500 μm^2 qui a été imagée.

La zone sélectionnée étant homogène, il n'a pas été nécessaire de procéder au dessin d'une ROI. Le spectre ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif est présenté à la Figure 21, ainsi que les images ioniques des composés les plus abondants du spectre.

Aux rapports *m/z* 313,30 et 339,31 sont détectés les ions des monoacylglyérols. Le cholestérol est détecté sous la forme de son fragment $[M+H-H_2O]^+$ au rapport *m/z* 369,35, tandis que la vitamine E est détectée sous sa forme radicalaire au rapport *m/z* 430,38. Ces deux composés présentent la même localisation. Les diacylglycérols sont les ions majoritaires du spectre. Nous détectons les mêmes espèces que précédemment, c'est-à-dire les espèces à 30, 32, 34 et 36 atomes de carbone. Au sein de la zone imagée, ces espèces se répartissent dans de petites gouttelettes (Figure 22d). Enfin, les espèces de plus haut poids moléculaire observées sur le spectre sont les phosphatidylcholines et plus précisément les PC34:1 et 34:2. L'image de la somme des ions de PC montre que ces espèces sont co-localisées avec le cholestérol et la vitamine E. Les composés annotés aux rapports *m/z* 478,40 et 480,39 correspondent à des fragments de lipides de plus haut poids moléculaire, spécifiques à l'analyse par ToF-SIMS. L'ion au rapport *m/z* 495,48 n'a pu être identifié et son image ionique est faiblement contrastée, donc difficilement exploitable. Il est cependant probable qu'il s'agisse aussi d'un fragment de lipide.

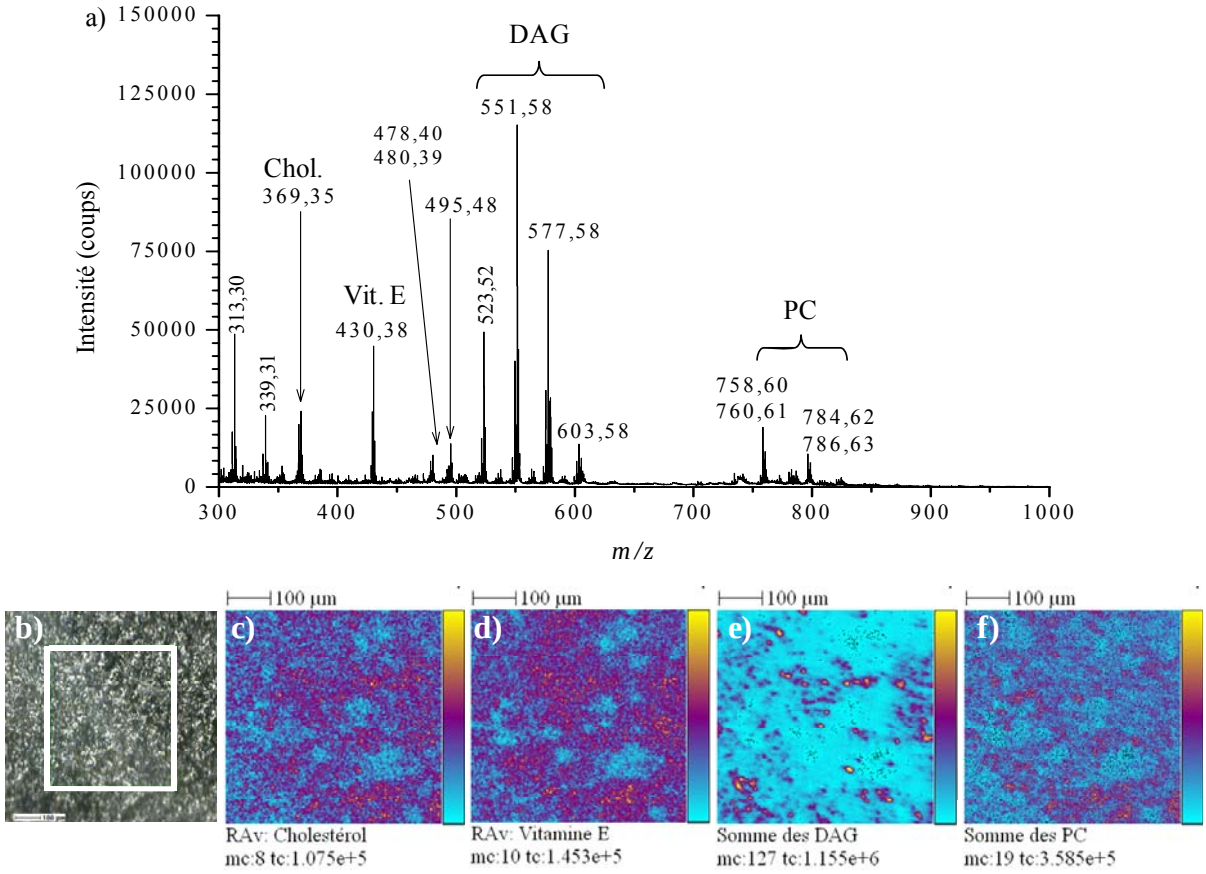


Figure 21: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Le spectre de masse enregistré dans la même zone, en mode d'ionisation négatif, est représenté à la Figure 22, accompagné des images ioniques de la somme des acides gras, d'un composé détecté au rapport *m/z* 514,36 et de la superposition des images ioniques des phosphatidylinositols et de la somme des fragments de la sphingomyéline 34 :1.

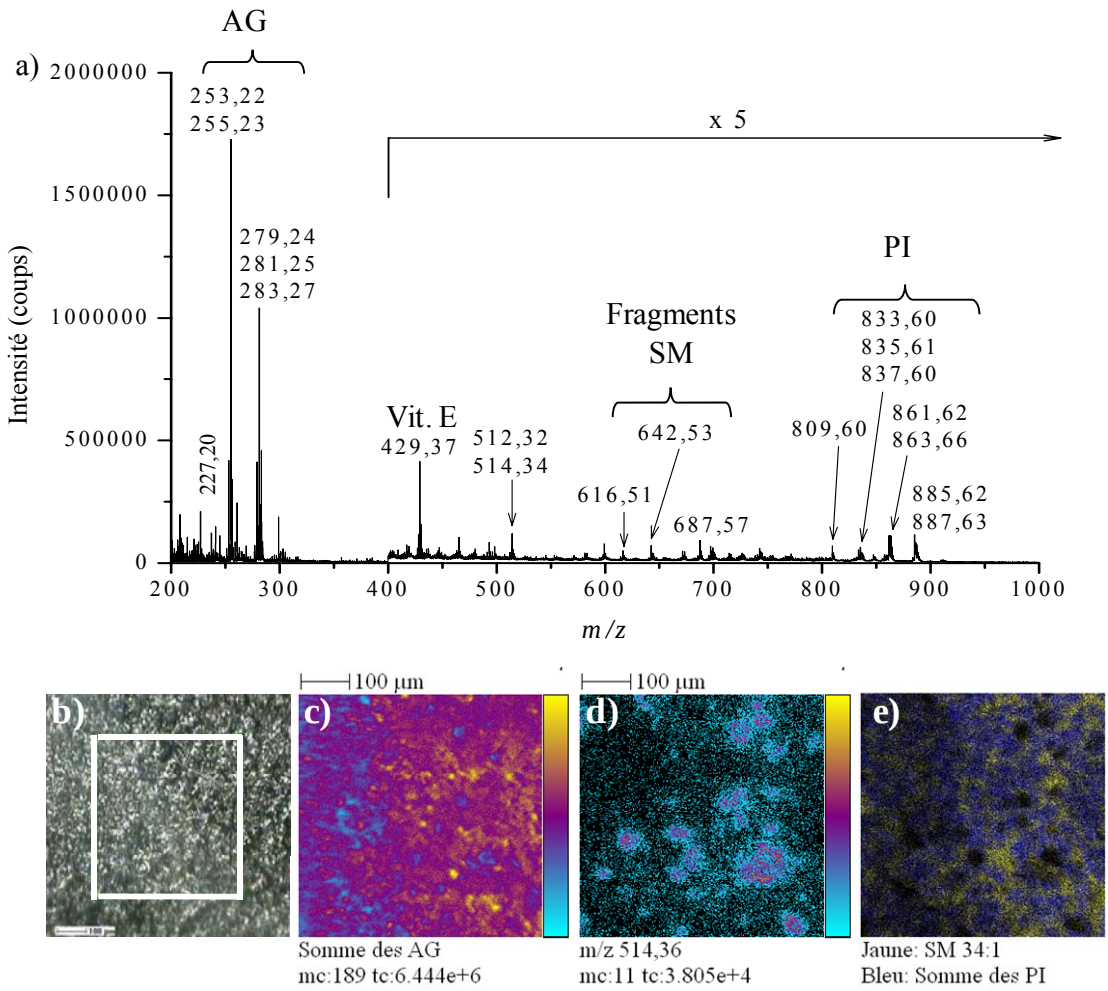


Figure 22 : a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée, c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique d'un composé détecté au rapport *m/z* 514,36; e) Superposition en deux couleurs des images des phosphatidylinositols (PI) et de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les pics les plus intenses du spectre correspondent aux acides gras, nous en détectons à 14, 16 et 18 atomes de carbone. L'image de la somme de ces ions fournit une localisation en fines gouttelettes, rappelant celle des DAG en mode d'ionisation positif. Le détail des localisations de chaque acide gras sera décrit plus loin. Comme en mode d'ionisation positif, la vitamine E est détectée et l'image ionique obtenue pour l'ion $[M-H]^-$ confirme la localisation observée pour ce composé en mode d'ionisation positif. Les composés de plus haut poids moléculaire détectés sont les fragments de la sphingomyéline 34:1 et différentes espèces de phosphatidylinositols. Nous observons d'ailleurs des ions que nous n'avions

encore jamais détectés à la surface d'une coupe de foie, qu'il soit contrôle ou stéatosique. C'est le cas de l'ion au rapport *m/z* 809,60 qui pourrait correspondre à la forme déprotonée d'un phosphatidylinositol portant 32 atomes de carbone sur les deux chaines acyles. Les autres ions nouvellement détectés sont attribués aux PI 34:0 (*m/z* 837, 60) et PI 38:3 (*m/z* 887,63). La Figure 23e présente la superposition des images de la somme des fragments de la SM34:1 et de la somme des PI. Une fois encore, nous obtenons une anti-co-localisation de ces deux espèces. La Figure 23d montre l'image ionique d'un composé que nous n'avons encore jamais détecté sur une coupe de foie, au rapport *m/z* 514,36. Cet ion pourrait être attribué à la forme déprotonée de l'acide taurocholique, soit l'ion taurocholate. Il s'agit d'un acide biliaire sécrété par le foie pour aider à la digestion. Sa localisation est particulière et ne saurait être expliquée ici. Nous pouvons tout de même préciser que ce composé ne partage cette localisation avec aucun des autres principaux ions du spectre, comme le montre la Figure 23 :

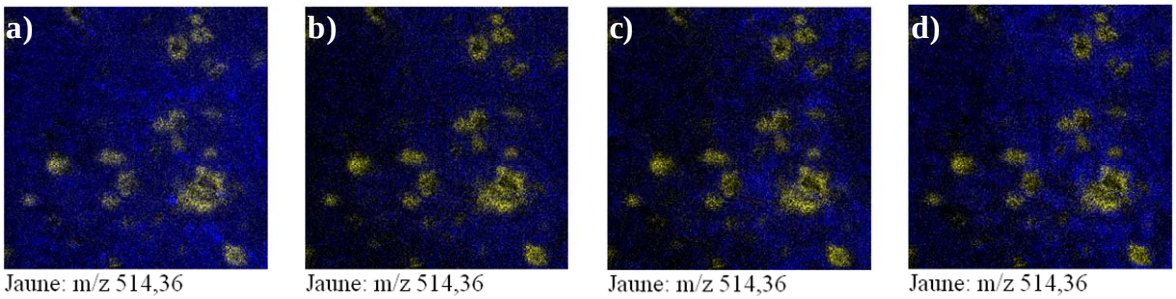


Figure 23: Superposition en deux couleurs de l'image ionique du composé au rapport *m/z* 514,6 et de, a)l'acide palmitoléique ; b) la vitamine E ; c) la somme des fragments de la sphingomyéline C34:1 ; d) la somme des phosphatidylinositols. Images de 500 x 500 μm^2.

Cas particulier des acides gras

Comme nous l'avons observé précédemment pour le foie contrôle et stéatosique, la répartition des acides gras n'est pas homogène sur la zone imagée. La Figure 24 montre les répartitions des différents acides gras dont l'acide myristique (Figure 24a). Il est le seul à posséder cette répartition en fines gouttelettes. La Figure 24b montre la répartition de l'acide linoléique. Les acides oléique et stéarique présentent la même répartition homogène sur la zone imagée. La Figure 24c présente la répartition de l'acide palmitique, commune à l'acide palmitoléique. Comme pour les exemples précédents (AG ou DAG) nous obtenons deux localisations très différentes et une troisième, intermédiaire aux deux autres.

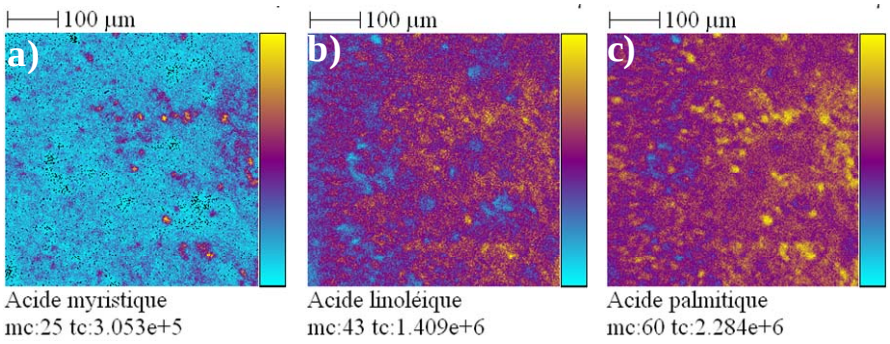


Figure 24: a) Image ionique de l'acide myristique ; b) Image ionique de l'acide linoléique ; c) Image ionique de l'acide palmitique, enregistrées sur une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions).

3.2.3. Foie tumoral malin : Carcinome hépatocellulaire

Comme pour la tumeur bénigne du foie, nous n'avons réalisé qu'une expérience sur cette tumeur hépatique maligne, et les résultats obtenus sont là encore préliminaires. La Figure 25 présente l'image microscopique d'une coupe du foie tumoral n°07B4398 (CHC), colorée par histologie. Le carré noir représente la zone choisie pour être analysée en imagerie ToF-SIMS. Dans cette tumeur, la structure lobulaire a disparu et nous avons travaillé sur une unique zone de tissu tumoral.

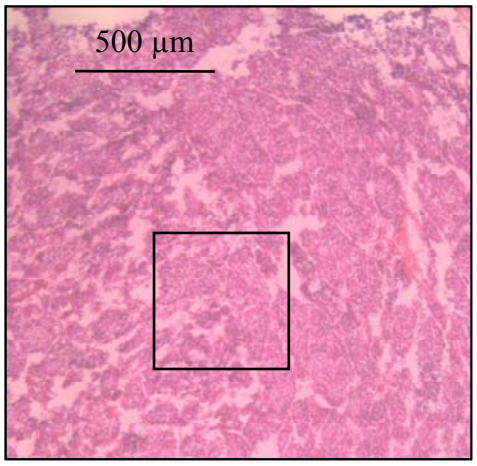


Figure 25: Image optique d'une coupe congelée (10 µm) de la tumeur n° 07B4398 (CHC) colorée par l'HES. Le carré noir montre la zone de 500 x 500 μm^2 qui a été imagée.

Le carré noir délimite une zone de tissu tumoral. La Figure 26 montre le spectre enregistré, en mode d'ionisation positif. Les images ioniques qui l'accompagnent sont celles

du cholestérol, de la vitamine E, de la somme des diacylglycérols et de la somme des phosphatidylcholines.

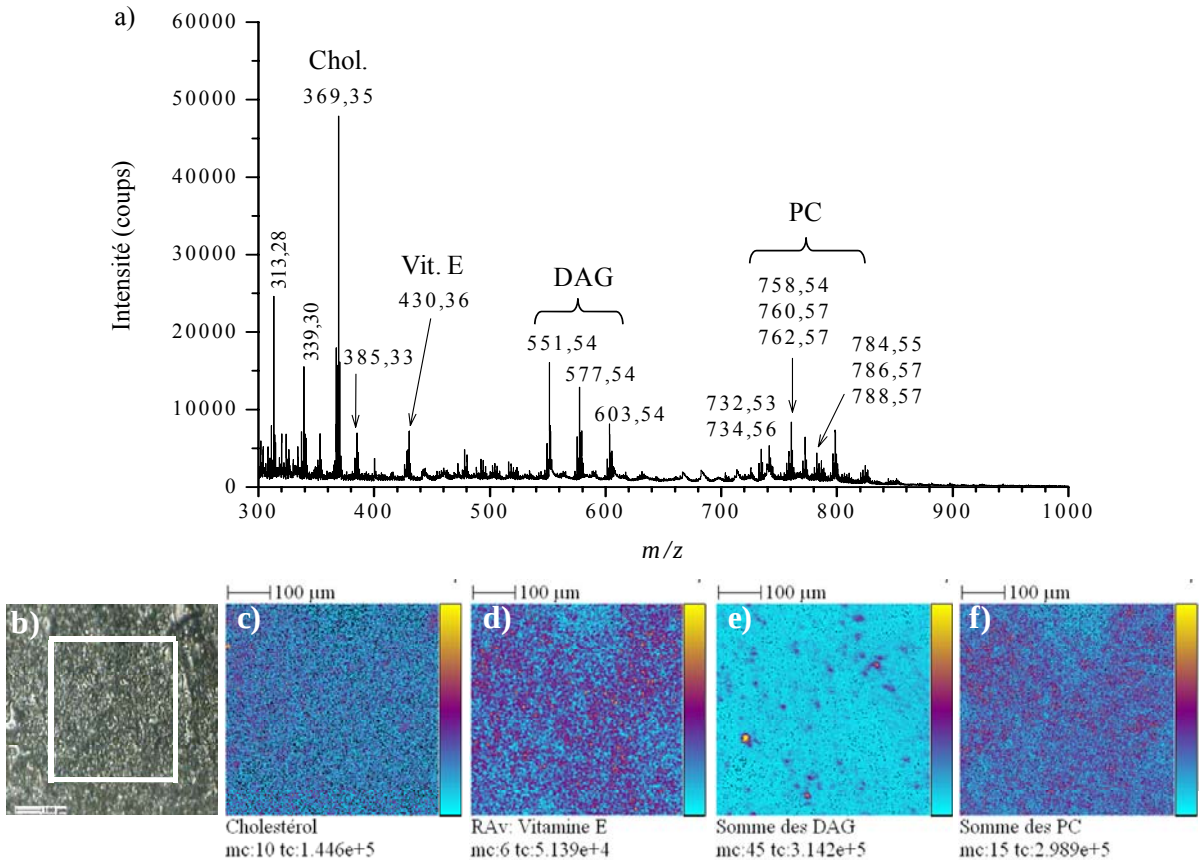


Figure 26: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B4398 (CHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les monoacyglycérols sont détectés aux rapports *m/z* 313,28 et 339,30 et ont la même localisation que les diacylglycérols. Le cholestérol, détecté sous la forme du fragment $[M+H-H_2O]^+$ est l'ion prédominant du spectre. L'image qui lui est associée est cependant peu contrastée, et la répartition de ce composé est homogène sur l'ensemble de la zone analysée. La vitamine E est détectée sous forme radicalaire, et sa répartition est homogène sur toute la surface analysée. L'image de la somme des DAG montre qu'ils ne s'accumulent pas dans la zone analysée, sauf en quelques points, sans correspondance avec une particularité histologique. Il est intéressant de constater que les DAG à 30 atomes de carbone ne sont pas présents sur le spectre. Comme précédemment, les espèces de plus haut poids moléculaire

détectées sont les phosphatidylcholines. En plus des PC 34:2 et 34:1 que nous avons détectées jusque maintenant, nous observons également ici des pics correspondant aux PC 34:0, 36:2 et 36:1. Leur répartition sur la coupe suit celle de la vitamine E.

Nous avons également enregistré une image en mode d'ionisation négatif. Le spectre obtenu ainsi que les images de quelques ions d'intérêt sont présentés à la Figure 27.

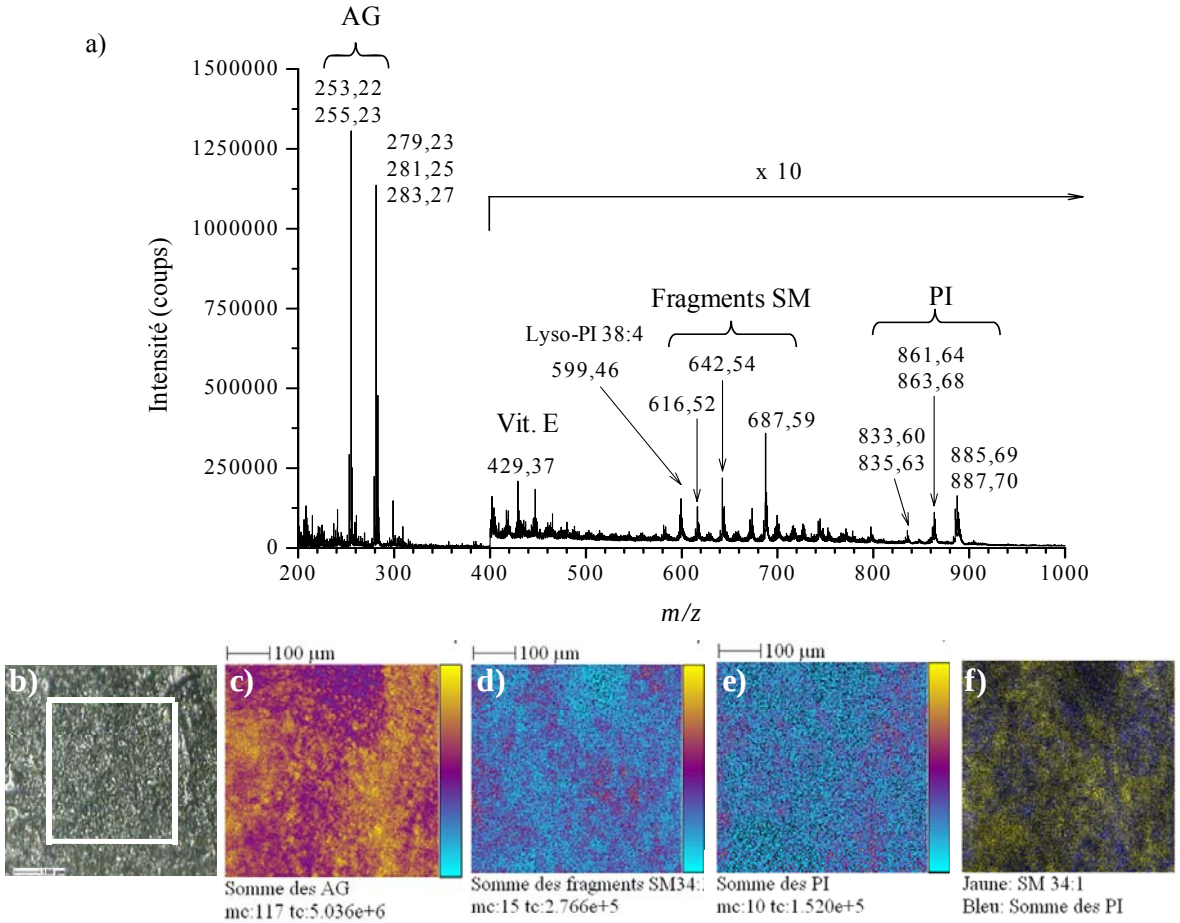


Figure 27: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B4398 (CHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1; e) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les ions les plus abondants du spectre sont ceux des acides gras. Contrairement à l'adénome hépatocellulaire analysé, l'acide myristique n'est pas détecté ici. L'image de la somme des acides gras donne une répartition relativement homogène. Aucune disparité n'est

observée lorsque l'image ionique de chaque acide gras est observée individuellement. La vitamine E est faiblement détectée. Les fragments de sphingomyéline 34:1 sont très abondants dans ce spectre. L'image de la somme de ces fragments montre qu'ils sont co-localisés avec les acides gras. Les phosphatidylinositols détectés correspondent aux PI 38:4, 38:3 ; 36:2, 36:1 ; 34:2 et 34:1. L'image de la somme de ces ions montre une répartition moins homogène que les acides gras ou la SM 34:1. A la Figure 28f, la superposition en deux couleurs des images de la somme des fragments de la SM 34 :1 et de la somme des PI montre des localisations différentes.

4. Discussion

4.1. Comparaison du profil lipidique d'un foie stéatosique obtenu par imagerie ToF-SIMS et par extraction totale sur broyat

Dans un article publié en 2007, Puri *et al.* rapportent les résultats d'une étude lipidomique menée sur des foies stéatosiques (NAFLD et NASH), comparativement à des foies contrôles[67]. Leur méthode consiste à broyer un fragment de foie de 5 à 10 mg, à en extraire les lipides par la méthode de Folch, puis à séparer les différentes classes lipidiques par chromatographie sur couche mince. Chaque classe lipidique ainsi isolée est ensuite transestérifiée pour être quantifiée par chromatographie en phase gazeuse. La comparaison des compositions lipidiques de foies stéatosiques, en CPG sur un extrait issu de broyat et en SIMS sur une coupe de 10 µm est présentée dans le Tableau 2 :

	Extraction sur broyat et analyse par chromatographie	Analyse ToF-SIMS sur coupe de 10 µm
Acides gras	✓	✓
DAG / TAG	✓	✓
Cholestérol	✓	✓
Phosphatidylcholines	✓	✓
Phosphatildylsérine	✓	-
Phosphatidyléthanolamine	✓	-
Phosphatidylinositols	-	✓
Sphingomyéline	✓	✓
Cardiolipine / Lysocardiolipine	✓	-
Vitamine E	-	✓

Tableau 2: Composition lipidique détectée sur extrait issu de broyat et analyse par chromatographie et par analyse ToF-SIMS sur coupe de 10 µm d'épaisseur.

Une majorité des espèces est détectée par les deux techniques. Néanmoins certains lipides ne sont détectés que par l'une des deux. C'est notamment le cas des phosphatidylsérines, des phosphatidyléthanolamines et de la cardiolipine (et de son dérivé la lyso-cardiolipine), qui ne sont pas détectées en ToF-SIMS sur une coupe de foie. Au contraire, les phosphatidylinositols et la vitamine E ne sont pas détectés par Puri et ses collaborateurs.

La méthode d'extraction et d'analyse par chromatographie permet une quantification impossible par l'approche ToF-SIMS. D'un autre coté, l'analyse par ToF-SIMS fournit la localisation de ces lipides au sein du foie, information capitale pour l'interprétation et l'éventuel diagnostic, comme nous le verrons plus loin. Ces deux approches lipidomiques sont donc complémentaires, chacune d'elle apportant des renseignements inaccessibles par l'autre.

4.2. Comparaison du profil lipidique d'un foie stéatosique et d'un foie contrôle

Les espèces lipidiques détectées dans le foie stéatosique n°06B1910 sont quasiment les mêmes que celles détectées pour le foie contrôle n°05B3257. Deux différences interviennent, d'une part au niveau des triacylglycérols qui sont détectés dans la zone centro-lobulaire du foie stéatosique uniquement et d'autre part au niveau de l'acide myristique détecté dans les deux zones du foie stéatosique.

D'un point de vue « quantitatif », le constat est quelque peu différent. Les intensités relatives de certaines espèces subissent de fortes variations entre le profil lipidique du foie contrôle et celui du foie stéatosique.

Une des différences les plus caractéristiques est observée pour les diacylglycérols et les triacylglycérols en mode positif. En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les TAG sont difficilement détectés sous forme de molécules intactes, même lorsque des produits de référence sont analysés, et les principaux ions alors observés sont ceux des diacylglycérols et des monoacylglycérols, comme le montre la Figure 28.

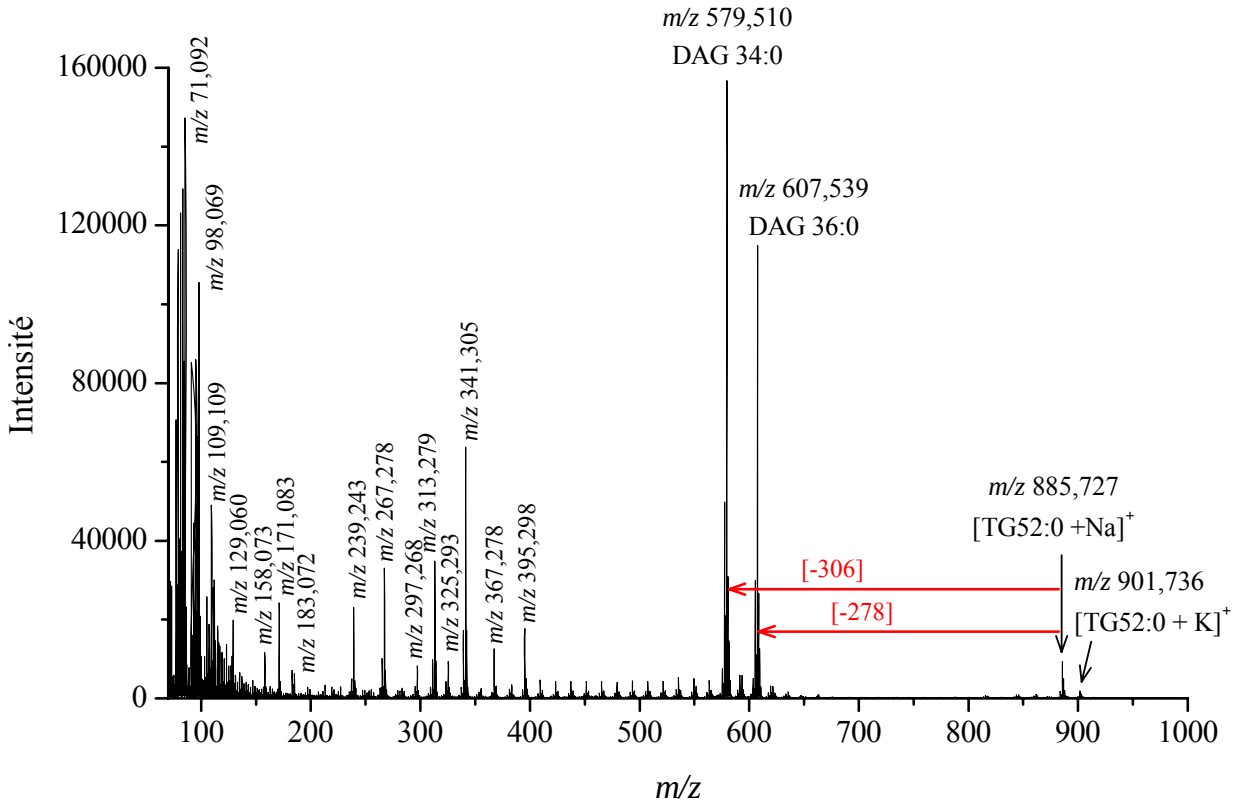


Figure 28: Spectre ToF-SIMS enregistré sur un dépôt d'une solution de triacylglycérol de référence (Sigma-Aldrich) en mode d'ionisation positif. (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence: 1,26 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

La stéatose se caractérise par une accumulation de lipides et notamment de TAG dans le foie. Il est donc logique de voir augmenter l'intensité des signaux de DAG. Cette augmentation reflète parfaitement le processus biologique lié à la maladie. Il est intéressant de se pencher sur la localisation de ces DAG. Dans la zone centro-lobulaire, nous les trouvons dans des vésicules, ce qui concorde avec la description histologique de la stéatose pour ce patient (macrovacuolaire : 30%, prédominante en ZCL). Il est plus inattendu de les détecter dans la zone périportale. En effet, l'examen histologique sur une coloration standard n'a révélé aucune accumulation de graisse dans cette région du foie. L'accumulation est cependant réelle dans cette zone, puisque, au lieu d'observer de grosses vésicules, il se forme de petites « taches ». Ceci pourrait être le signe précoce d'une stéatose non encore objectivée par l'examen histologique.

L'autre différence majeure qui apparaît lorsque l'on compare les profils lipidiques de foie contrôle et stéatosique est la forte déplétion en vitamine E. Cette diminution du signal est observée dans les deux modes d'ionisation. Le terme « vitamine E » regroupe en réalité pas

moins de huit isomères de tocophérols et tocotriénols (quatre de chaque). L'α-tocophérol est le plus abondant et le plus actif de tous, c'est également l'isomère spécifiquement incorporé dans les lipoprotéines à très faible densité (VLDL), pour être excrété du foie vers la circulation sanguine.[68] La principale activité de la vitamine E est anti-oxydante. Elle intervient pour neutraliser les radicaux libres, encore appelés espèces réactives de l'oxygène (*« reactive oxygen species »*, ROS) produites par les mitochondries notamment, afin d'éviter un endommagement des composants cellulaires tels que les protéines, l'ADN ou les lipides. On parle de stress oxydant lorsque la cellule est submergée par ces espèces radicalaires, qui peuvent avoir diverses origines.[69,70] Dans le cas de la stéatose, le stress oxydant est considéré comme la deuxième étape de la maladie, expliquant sa progression vers la fibrose puis la cirrhose.[7,71,72] Le stress oxydant engendrerait une augmentation de l'activité du cytochrome P450, qui est impliqué dans la première étape du catabolisme de l'α-tocophérol (une ω-hydroxylation). Cette activité accrue de l'enzyme transformerait plus rapidement la vitamine E que l'organisme n'en absorbe, ce qui engendrerait le déséquilibre observé. Ainsi, la peroxydation des lipides pourrait s'accomplir sans entrave, pour mener à son produit final : le malonylaldéhyde, qui stimule la production de collagène et la fibrogenèse. Il convient de rappeler que des essais thérapeutiques utilisant la vitamine E ont été conduits chez l'homme atteint de NASH dont nos résultats confortent ici le rationnel.

D'autres variations d'intensité relative, de plus faible amplitude, entre le profil lipidique du foie contrôle et celui du foie stéatosique, sont observées. La plus intéressante concerne le cholestérol dont l'intensité augmente, dans la zone centro-lobulaire du foie stéatosique notamment. Ceci est cohérent avec le fait que certaines stéatoses s'observent dans le cadre d'un syndrome métabolique, dont une des manifestations est une baisse du HDL-cholestérol dans le sang. Les lipoprotéines à haute densité *(« High Density Lipoproteins »)* sont des assemblages lipoprotéiques impliqués dans le transport du cholestérol et de ses esters entre le foie et la circulation sanguine. Une baisse du taux de HDL dans le sérum pourrait se traduire par une diminution des échanges entre le foie et les organes cibles (*via* le sang) et donc une accumulation de cholestérol dans le foie, lieu de sa biosynthèse.

La comparaison des profils lipidiques du foie contrôle et du foie stéatosique a permis de mettre en évidence que trois espèces lipidiques subissent de fortes variations. Ces composés pourraient alors être considérés comme des biomarqueurs de la stéatose hépatique. Les di- et triacylglycérols augmentent fortement dans le foie stéatosique. Il s'agit là, bien évidemment, de la caractéristique biochimique principale de la stéatose ; détecter cette augmentation nous

permet de valider notre technique d'imagerie par spectrométrie de masse. Nous détectons, tout comme l'examen histologique, la stéatose macrovacuolaire, caractérisée par l'accumulation de TAG dans la zone centro-lobulaire du foie stéatosique. Néanmoins, l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS permet d'aller plus loin, en décelant une accumulation de DAG, sous forme microvacuolaire cette fois-ci, dans la zone périportale du foie stéatosique. Cette zone est considérée comme non pathologique par l'examen histologique standard, référence en matière de diagnostic. Il est donc possible que nous parvenions à détecter la maladie à un stade plus précoce que l'anatomo-pathologiste.

La vitamine E pourrait également devenir un biomarqueur de la stéatose hépatique non alcoolique, lors d'une étude en imagerie ToF-SIMS, puisque la déplétion en vitamine E semble être une caractéristique des spectres et des images enregistrés à la surface d'une coupe de foie stéatosique, dans les deux modes d'ionisation.

L'augmentation du signal du cholestérol semble également être une constante dans l'analyse de coupes de foie stéatosique par imagerie ToF-SIMS. Néanmoins, la spécificité d'un tel composé pourrait être discutée et son utilisation en tant que biomarqueur de la maladie remise en cause.

4.3. Comparaison du profil lipidique d'un adénome et d'un foie contrôle

D'un point de vue qualitatif, deux composés sont détectés dans le tissu tumoral bénin uniquement. Il s'agit du phosphatidylinositol à 32 atomes de carbone dont l'apparition est particulièrement étonnante. En effet, dans le foie de rat, la composition en acide gras des PI renferme essentiellement les acides stéarique (C18:0) et arachidonique (C20:4) formant le PI 38:4, que nous détectons à *m/z* 885,62. Des PIs de plus faible poids moléculaire sont détectés, y compris dans le foie contrôle, mais jamais à un rapport *m/z* 809,62. La seconde différence majeure existant entre les deux profils lipidiques est la détection de l'acide taurocholique, ainsi que sa localisation unique.

D'autre part, la répartition en fines gouttelettes de certains composés comme les diacylglycérols ainsi que les acides myristique, palmitoléique et palmitique rappelle la localisation des DAG dans la zone périportale du foie stéatosique. Ceci est cohérent avec

l'examen histologique qui montre au sein de cet adénome hépatocellulaire une stéatose macrovacuolaire hétérogène évaluée à 10%.

Comme nous l'avons mentionné au début de ce paragraphe, ces expériences n'ont été menées qu'une seule fois. Une voie est donc ouverte concernant la recherche de biomarqueurs lipidiques de l'adénome hépatocellulaire par imagerie ToF-SIMS. Le phosphatidylinositol 32:0 et l'acide taurocholique, dont les attributions restent à confirmer, pourraient s'avérer des marqueurs prometteurs. Toutefois, avant de pouvoir donner une interprétation biologique de ces variations, une validation des résultats obtenus est nécessaire.

4.4. Comparaison du profil lipidique d'un carcinome et d'un foie contrôle

Nous pouvons déduire que les profils lipidiques d'un foie tumoral (CHC) et d'un foie contrôle, obtenus par imagerie ToF-SIMS, sont très ressemblants. Les mêmes espèces sont détectées dans les deux cas : du cholestérol, de la vitamine E, des phosphatidylcholines, des phosphatidylinositols et la sphingomyéline 34:1. Les différences apparaissent, comme pour le foie stéatosique et le foie tumoral bénin, au niveau de l'intensité relative de certains composés. C'est le cas de la sphingomyéline, dont l'abondance est augmentée dans le foie tumoral. Le catabolisme de la sphingomyéline, par l'action d'enzymes comme les sphingomyélinases ou la phospholipase C, mène à la production de céramides. Ceux-ci possèdent un rôle clé dans la signalisation cellulaire, mais aussi dans la régulation de l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire. De récentes études ont montré que lors du développement d'un cancer, l'action de certaines enzymes des sphingolipides, comme les sphingomyélinases, est perturbée.[73] Cheng *et al*. ont par ailleurs démontré que, consécutivement à des mutations géniques, l'activité de la sphingomyélinase alcaline était réduite dans la carcinogenèse hépatique.[74] De ce fait, si l'enzyme responsable de la dégradation de la sphingomyéline n'est plus (ou moins) opérante, il pourrait être logique d'observer une accumulation de sphingomyéline dans un tissu tumoral.

Une autre différence, de moindre importance toutefois, peut être notée concernant la vitamine E, qui est moins abondante dans le tissu tumoral que dans le tissu contrôle même s'il convient de rester prudent dans la mesure où les deux échantillons ne proviennent pas du même patient. Comme dans le cas de la stéatose hépatique, cette déplétion peut être

consécutive au stress oxydant se produisant lors du développement ou de la progression d'un cancer.[75,76]

Les résultats obtenus sont prometteurs et nécessitent d'être confirmés lors de nouvelles expériences

4.5. Comparaison du profil lipidique d'un adénome et d'un carcinome

Les profils lipidiques des deux tumeurs peuvent être comparés au niveau des espèces détectées ou de leur différence d'intensité d'un profil à l'autre. En mode d'ionisation positif, les mêmes classes lipidiques sont détectées pour les deux tumeurs et la seule différence réside dans le fait que certaines espèces de phosphatidylcholines sont détectées uniquement dans le carcinome. Le même constat peut être fait en mode d'ionisation négatif. Pour le CHC, des acides gras à 16 et 18 atomes de carbone, de la vitamine E, des fragments de sphingomyéline et des phosphatidylinositols sont détectés. Pour l'adénome, les mêmes espèces sont présentes sur le spectre, mais nous détectons en supplément l'acide gras portant 14 atomes de carbone, l'acide taurocholique et certains phosphatidylinositols. Dans la pratique courante, l'un des problèmes diagnostiques de l'adénome hépatocellulaire est d'avoir la certitude qu'il est effectivement bénin et qu'il ne s'agit pas d'un CHC très bien différencié. Ces molécules pourraient donc permettre de discriminer les deux tumeurs. En termes de différences d'intensité d'un profil à l'autre, les plus marquées concernent les diacylglycérols et le cholestérol en mode d'ionisation positif et la vitamine E et les fragments de sphingomyéline en mode d'ionisation négatif. Ces différences pourraient également permettre de distinguer une tumeur bénigne d'une tumeur maligne. Néanmoins, comme nous l'avons déjà dit, ces résultats sont préliminaires et les deux tumeurs analysées proviennent de patients distincts. Une étude élargie à d'autres patients est nécessaire avant de pouvoir conclure à la découverte de nouveaux biomarqueurs de l'adénome et du carcinome hépatocellulaires.

5. Conclusions et Perspectives

L'application de l'imagerie ToF-SIMS à l'étude de différentes pathologies hépatiques nous a permis d'observer les modifications lipidiques, à l'échelle cellulaire, survenant au

cours de la maladie. Notre but était de déceler d'éventuels biomarqueurs de la stéatose hépatique non alcoolique, de l'adénome et du carcinome hépatocellulaires.

Pour chacune de ces pathologies, la spectrométrie de masse ToF-SIMS s'est révélée efficace pour déceler des différences de profils lipidiques entre le foie contrôle et les foies malades. Pour la stéatose non alcoolique, la déplétion en vitamine E s'avère prometteuse. Son occurrence a été vérifiée sur des coupes de foies provenant de patients atteints par divers degrés de stéatose. Certains composés détectés à la surface des coupes sont particulièrement spécifiques. C'est le cas de l'acide taurocholique et du phosphatidylinositol 32:0 détectés uniquement sur la coupe d'adénome hépatocellulaire. Notre technique a également révélé une modification du contenu lipidique d'un CHC, avec l'accumulation de sphingomyéline 34:1.

D'autre part, la complémentarité de l'imagerie par spectrométrie de masse et de l'histologie n'est plus à établir.[77,78] Notre travail a permis d'approfondir cette complémentarité, en montrant qu'il est possible de détecter certaines manifestations cliniques, comme l'accumulation de diacylglycérols, dans des zones jugées saines au cours de l'examen histologique.

Ce dernier point est très encourageant, signifiant qu'un diagnostic plus précoce pourrait être réalisé par imagerie ToF-SIMS, dans la mesure où une accumulation de lipides peut être décelée alors que l'examen histologique standard n'est pas encore contributif. Dans un avenir plus proche, les perspectives de ce travail sont de réitérer les expériences décrites ici, notamment pour les foies tumoraux dont les coupes n'ont été analysées qu'une seule fois.

Références bibliographiques :

[1] Nouveau Larousse Médical, Edition 1990, Librairie Larousse, Paris.

[2] K. Jungermann and N. Katz. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol. Rev*. **1989**; 69(3), 708.

[3] K. Jungermann and T. Kietzmann. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology*. **2000**; 31(2), 255.

[4] A. Braeuning, C. Ittrich, C. Kohle, S. Hailfinger, M. Bonin, A. Buchmann and M. Schwarz. Differential gene expression in periportal and perivenous mouse hepatocytes. *FEBS J*. **2006**; 273(22), 5051.

[5] M. Guzman and J. Castro. Zonation of fatty acid metabolism in rat liver. *Biochem. J*. **1989**; 264(1), 107.

[6] K.M. Utzschneider and S.E. Kahn. Review: The role of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2006**; 91(12), 4753.

[7] L.A. Streba, D. Carstea, P. Mitrut, C.C. Vere, N. Dragomir and C.T. Streba. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: a concise review. *Rom. J. Morphol. Embryol*. **2008**; 49(1), 13.

[8] A.R. Turkish. Nonalcoholic fatty liver disease: emerging mechanisms and consequences. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. **2008**; 11(2), 128.

[9] S. Jimba, T. Nakagami, M. Takahashi, T. Wakamatsu, Y. Hirota, Y. Iwamoto and T. Wasada. Prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and its association with impaired glucose metabolism in Japanese adults. *Diabet. Med*. **2005**; 22(9), 1141.

[10] G. Bedogni, L. Miglioli, F. Masutti, C. Tiribelli, G. Marchesini and S. Bellentani. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study. *Hepatology*. **2005**; 42(1), 44.

[11] C. E. Ruhl and J. E. Everhart. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver. *Clin. Liver Dis*. **2004**; 8(3), 501.

[12] P. Colicchio, G. Tarantino, F. del Genio, P. Sorrentino, G. Saldalamacchia, C. Finelli, P. Conca, F. Contaldo and F. Pasanisi. Non-alcoholic fatty liver disease in young adult severely obese non-diabetic patients in South Italy. *Ann. Nutr. Metab*. **2005**; 49(5), 289.

[13] L.A. Adams, P. Angulo and K.D. Lindor. Nonalcoholic fatty liver disease. *Can. Med. Assoc. J*. **2005** ; 172(7), 899.

[14] B.A. Neuschwander-Tetri. Fatty liver and the metabolic syndrome. *Curr. Opin. Gastroenterol*. **2007**; 23(2), 193.

[15] J. Ludwig, T.R. Viggiano, D.B. McGill and B.J. Oh. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc*. **1980**; 55(7), 434.

[16] B.A. Neuschwander-Tetri and S.H. Caldwell. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology.* **2003**; 37(5), 1202.

[17] D. Larrey. Stéato-hépatite non alcoolique: histoire naturelle et diagnostic. *Gastroen. Clin. Biol.* **2003**; 27,793.

[18] N.C. McAvoy, J.C. Ferguson, I.W. Campbell and P.C. Hayes. Non alcoholic fatty liver disease: natural history, pathogenesis and treatment. *Br. J. Diabetes Vasc. Dis*. **2006**; 6(6), 251.

[19] V. Ratziu and T. Poynard. Stéatopathies non alcooliques: limites de nos connaissances et leçons pour l'hépatologue d'aujourd'hui. *Gastroen. Clin. Biol.* **2003**; 27, 715.

[20] M. Raman and J.P. Allard. Parenteral nutrition related hepato-biliary disease in adults. *Appl. Physiol. Nutr. Metab*. **2007**; 32(4), 646.

[21] P. Marceau, S. Biron, F.S. Hould, S. Marceau, S. Simard, S.N. Thung and J.G. Kral. Liver Pathology and the metabolic syndrome X in severe obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **1999**; 84, 1513.

[22] G.C. Farrell and C.Z. Larter. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. **2006**; 43(2 Suppl 1), S99.

[23] G. Marchesini, E. Bugianesi, G. Forlani, F. Cerrelli, M. Lenzi, R. Manini, S. Natale, E. Vanni, N. Villanova, N. Melchionda and M. Rizzetto. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. **2003**; 37(4), 917.

[24] V.T. Samuel, Z-X. Liu, X. Qu, B.D. Elder, S. Bilz, D. Befroy, A.J. Romanelli and G.I. Shulman. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J. Biol. Chem*. **2004**; 279(31), 32245.

[25] F. Angelico, M. Del Ben, R. Conti, S. Francioso, K. Feole, S. Fiorello, M.G. Cavallo, B. Zalunardo, F. Lirussi, C. Alessandri and F. Violi. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. **2005**; 90(3), 1578.

[26] G. Pagano, G. Pacini, G. Musso, R. Gambino, F. Mecca, N. Depetris, M. Cassader, E. David, P. Cavallo-Perin and M. Rizzetto. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology*. **2002**; 35(2), 367.

[27] G. Marchesini, M. Brizi, G. Bianchi, S. Tomassetti, E. Bugianesi, M. Lenzi, A. J. McCullough, S. Natale, G. Forlani and N. Melchionda. Nonacoholic fatty liver disease. *Diabetes*. **2001**; 50, 1844.

[28] H.N. Ginsberg. Is the slippery slope from steatosis to steatohepatitis paved with triglyceride or cholesterol? *Cell. Metab*. **2006**; 4(3), 179.

[29] M.H. Ahmed and C.D. Byrne. Modulation of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) as potential treatments for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Drug Discov. Today*. **2007**; 12(17-18), 740.

[30] M.S. Brown and J.L. Goldstein. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*. **1997**; 89(3), 331.

[31] E.R. Kallwitz, A. McLachlan and S.J. Cotler. Role of peroxisome proliferators-activated receptors in the pathogenesis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol*. **2008**; 14(1), 22.

[32] C.P. Day and O.F. James. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. **1998**; 114(4), 842.

[33] T. Poynard, V. Ratziu, S. Naveau, D. Thabut, F. Charlotte, D. Messous, D. Capron, A. Abella, J. Massard, Y. Ngo, M. Munteanu, A. Mercadier, M. Manns and J. Albrecht. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comp. Hepatol*. **2005**; 4,10.

[34] I.N. Guha, J. Parkes, P.R. Roderick, S. Harris and W.M. Rosenberg. Non-invasive markers associated with liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut*. **2006**; 55(11), 1650.

[35] V. Ratziu, F. Charlotte, A. Heurtier, S. Gombert, P. Giral, E. Bruckert, A. Grimaldi, F. Capron and T. Poynard. Sampling variability of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. **2005**; 128(7), 1898.

[36] T. Andersen, C. Gluud, M.B. Franzmann and P. Christoffersen. Hepatic effects of dietary weight loss in morbidly obese subjects. *J. Hepatol*. **1991**; 12(2), 224.

[37] P. Angulo. Current best treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Expert Opin. Pharmacother*. **2003**; 4(5), 611.

[38] K. Promrat, G. Lutchman, G.I. Uwaifo, R.J. Freedman, A. Soza, T. Heller, E. Doo, M. Ghany, A. Premkumar, Y. Park, T.J. Liang, J.A. Yanovski, D.E. Kleiner and J.H. Hoofnagle. A pilot study of pioglitazone treatment for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. **2004**; 39(1), 188.

[39] M. Kiyici, M. Gulten, S. Gurel, S.G. Nak, E. Dolar, G. Savci, S.B. Adim, O. Yerci and F. Memik. Ursodeoxycholic acid and atorvastatin in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Can. J. Gastroenterol*. **2003**; 17(12), 713.

[40] S.K. Satapathy, S. Garg, R. Chauhan, P. Sakhuja, V. Malhotra, B.C. Sharma and S.K. Sarin. Beneficial effects of tumor necrosis factor-alpha inhibition by pentoxifylline on clinical, biochemical, and metabolic parameters of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol*. **2004**; 99(10), 1946.

[41] A. Hatzitolios, C. Savopoulos, G. Lazaraki, I. Sidiropoulos, P. Haritanti, A. Lefkopoulos, G. Karagiannopoulou, V. Tzioufa and K. Dimitrios. Efficacy of omega-3 fatty acids, atorvastatin and orlistat in non-alcoholic fatty liver disease with dyslipidemia. *Indian J. Gastroenterol*. **2004**; 23(4), 131.

[42] S.A. Harrison, S. Torgerson, P. Hayashi, J. Ward and S. Schenker. Vitamin E and vitamin C treatment improves fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am. J. Gastroenterol*. **2003**; 98(11), 2485.

[43] K.D. Lindor, K.V. Kowdley, E.J. Heathcote, M.E. Harrison, R. Jorgensen, P. Angulo, J.F. Lymp, L. Burgart and P. Colin. Ursodeoxycholic acid for treatment of nonalcoholic steatohepatitis: results of a randomized trial. *Hepatology*. **2004**; 39(3), 770.

[44] J.K. Baum, J.J. Bookstein, F. Holtz and E.W. Klein. Possible association between benign hepatomas and oral contraceptives. *Lancet*. **1973**; 2(7835), 926.

[45] S. Rebouissou, P. Bioulac-Sage and J. Zucman-Rossi. Molecular pathogenesis of focal nodular hyperplasia and hepatocellular adenoma. *J. Hepatol*. **2008**; 48(1), 163.

[46] S.M. Hussain, I.C. van den Bos, R.S. Dwarkasing, J.W. Kuiper and J. den Hollander. Hepatocellular adenoma: findings at state-of-the-art magnetic resonance imaging, ultrasound, computed tomography and pathologic analysis. *Eur. Radiol*. **2006**; 16(9), 1873.

[47] J. Belghiti. Adénomes hépatiques. Les risques et comment les prévenir? Journée d'Hépatologie de l'Hôpital Beaujon. Paris, 7 janvier 2006.

[48] J.F. Flejou, J. Barge, Y. Menu, C. Degott, H. Bismuth, F. Potet and J.P. Benhamou. Liver adenomatosis. An entity distinct from liver adenoma? *Gastroenterology*. **1985**; 89(5), 1132.

[49] O. Bluteau, E. Jeannot, P. Bioulac-Sage, J.M. Marques, J.F. Blanc, H. Bui, J.C. Beaudoin, D. Franco, C. Balabaud, P. Laurent-Puig and J. Zucman-Rossi. Bi-allelic inactivation of TCF1 in hepatic adenomas. *Nat. Genet*. **2002**; 32(2), 312.

[50] S. Lepreux, C. Laurent, J.F. Blanc, H. Trillaud, B. Le Bail, H. Trouette, J. Saric, J. Zucman-Rossi, C. Balabaud and P. Bioulac-Sage. The identification of small nodules in liver adenomatosis. *J. Hepatol*. **2003**; 39(1), 77.

[51] H. Buhler, M. Pirovino, A. Akobiantz, J. Altorfer, M. Weitzel, E. Maranta and M. Schmid. Regression of liver cell adenoma. A follow-up study of three consecutive patients after discontinuation of oral contraceptive use. *Gastroenterology*. **1982**; 82(4), 775.

[52] U.P. Steinbrecher, R. Lisbona, S.N. Huang and S. Mishkin. Complete regression of hepatocellular adenoma after withdrawal of oral contraceptives. *Dig. Dis. Sci*. **1981**; 26(11), 1045.

[53] A.F. Mariani, A.S. Livingstone, R.V. Pereiras, P.E. van Zuiden and E.R. Schiff. Progressive enlargement of an hepatic cell adenoma. *Gastroenterology*. **1979**; 77(6), 1319.

[54] M. Svrcek, E. Jeannot, L. Arrive, R. Poupon, G. Fromont, J.F. Flejou, J. Zucman-Rossi, P. Bouchard and D. Wendum. Regressive liver adenomatosis following androgenic progestin therapy withdrawal: a case report with a 10-year follow-up and a molecular analysis. *Eur. J. Endocrinol*. **2007**; 156(6), 617.

[55] L.C. Tao. Oral contraceptive-associated liver cell adenoma and hepatocellular carcinoma. Cytomorphology and mechanism of malignant transformation. *Cancer*. **1991**; 68(2), 341.

[56] J.H. Foster and M.M. Berman. The malignant transformation of liver cell adenomas. *Arch. Surg*. **1994**; 129(7), 712.

[57] E.J. Gyorffy, J.E. Bredfeldt and W.C. Black. Transformation of hepatic cell adenoma to hepatocellular carcinoma due to oral contraceptive use. *Ann. Intern. Med*. **1989**; 110(6), 489.

[58] R. Mazzanti, L. Gramantieri and L. Bolondi. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and clinical aspects. *Mol. Aspects Med*. **2008**; 29(1-2), 130.

[59] C. Verslype and L. Libbrecht. The diagnostic and therapeutic approach for primary solid liver tumours in adults. *Best Pract. Res. Cl. Ga.* **2007**; 21(6), 983.

[60] J. Thompson Coon, G. Rogers, P. Hewson, D. Wright, R. Anderson, S. Jackson, S. Ryder, M. Cramp and K. Stein. Surveillance of cirrhosis for hepatocellular carcinoma: a cost-utility analysis. *Br. J. Cancer*. **2008**; 98(7), 1166.

[61] J. Kim, S.H. Kim, S.U. Lee, G.H. Ha, D.G. Kang, N.Y. Ha, J.S. Ahn, H.Y. Cho, S.J. Kang, Y.J. Lee, S.C. Hong, W.S. Ha, J.M. Bae, C.W. Lee and J.W. Kim. Proteome analysis of human liver tumor tissue by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of disease-related proteins. *Electrophoresis*. **2002**; 23(24), 4142.

[62] I.N. Lee, C.H. Chen, J.C. Sheu, H.S. Lee, G.T. Huang, C.Y. Yu, F.J. Lu and L.P. Chow. Identification of human hepatocellular carcinoma-related biomarkers by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Proteome Res*. **2005**; 4(6), 2062.

[63] S. Kanmura, H. Uto, K. Kusumoto, Y. Ishida, S. Hasuike, K. Nagata, K. Hayashi, A. Ido, S.O. Stuver and H. Tsubouchi. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology*. **2007**; 45(4), 948.

[64] C. Melle, G. Ernst, O. Scheibner, R. Kaufmann, B. Schimmel, A. Bleul, U. Settmacher, M. Hommann, U. Claussen and F. von Eggeling. Identification of specific protein markers in microdissected hepatocellular carcinoma. *J. Proteome Res*. **2007**; 6(1), 306.

[65] K. Nagao and T. Yanagita. Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progr. Lipid Res*. **2008**; 47(2), 127.

[66] J.T. Jiang, N. Xu, X.Y. Zhang and C.P. Wu. Lipids changes in liver cancer. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* **2007**; 8(6), 398.

[67] P. Puri, R.A. Baillie, M.M. Wiest, F. Mirshahi, J. Choudhury, O. Cheung, C. Sargeant, M.J. Contos and A.J. Sanyal. A lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* **2007**; 46(4), 1081.

[68] R. Brigelius-Flohe, F.J. Kelly, J.T. Salonen, J. Neuzil, J.M. Zingg and A. Azzi. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr*. **2002**; 76(4), 703.

[69] A. Favier. Le stress oxydant. *Actual. Chim*. **2003**; 269-270, 108.

[70] M. Valko, H. Morris and M.T. Cronin. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem*. **2005**; 12(10), 1161.

[71] C.P. Day. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol*. **2002**; 16(5), 663.

[72] S. Seki, T. Kitada, T. Yamada, H. Sakaguchi, K. Nakatani and K. Wakasa. *In situ* detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver diseases. *J. Hepatol*. **2002**; 37(1), 56.

[73] B. Ogretmen and Y.A. Hannun. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**; 4(8), 604.

[74] Y. Cheng, J. Wu, E. Hertervig, S. Lindgren, D. Duan, A. Nilsson and R.D. Duan. Identification of aberrant forms of alkaline sphingomyelinase (NPP7) associated with human liver tumorigenesis. *Br. J. Cancer*. **2007**; 97(10), 1441.

[75] Y. Sasaki. Does oxidative stress participate in the development of hepatocellular carcinoma? *J. Gastroenterol*. **2006**; 41(12), 1135.

[76] X.W. Wang, S.P. Hussain, T.I. Huo, C.G. Wu, M. Forgues, L.J. Hofseth, C. Brechot and C.C. Harris. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*. **2002**; 181-182, 43.

[77] P. Chaurand, S.A. Schwartz, D. Billheimer, B.J. Xu, A. Crecelius and R.M. Caprioli. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2004**; 76(4), 1145.

[78] K.D. Herring, S.R. Oppenheimer and R.M. Caprioli. Direct tissue analysis by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: application to kidney biology. *Semin. Nephrol*. **2007**; 27(6), 597.

Chapitre IV

Analyse qualitative et quantitative des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* lors du processus de « *swarming* »

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec Simone Séror, Kassem Hamzé et Barry Holland, de l'Institut de Génétique et Microbiologie (Université Paris-Sud, Orsay). Il s'inscrit dans le projet « Analyse multidisciplinaire du processus de colonisation de surface par les bactéries : surfactine, migration, formation de profils » financé par l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR-05-blan-0138-02, MACBAC). Au cours de cette étude, une collaboration a également été mise en place avec l'équipe de Jamal Ouazzani de l'ICSN.

1. Introduction

1.1. Les biofilms

Un biofilm peut être décrit comme une communauté bactérienne caractérisée par des cellules qui s'attachent à un substrat ou qui interagissent ensemble, enrobée dans une matrice extracellulaire polymérique. En comparaison de cultures planctoniques (en milieu liquide), une telle communauté possède un phénotype altéré vis-à-vis de la croissance, de l'expression génique et de la production de protéines.[1] Un biofilm peut être hétérogène du point de vue des espèces microbiennes le composant et peut se développer sur divers supports biotiques ou abiotiques.[2] On les trouve dans la majorité des environnements, naturels ou artificiels, tant que la surface est exposée à une humidité adéquate.

Mécanisme de formation d'un biofilm

Le mécanisme de formation d'un biofilm peut être divisé en quatre étapes, formant un cycle qui peut se répéter indéfiniment (Figure 1). La première étape est l'adhésion qui, dans un premier temps, est réversible puisqu'un simple rinçage du support suffit à détacher les bactéries de ce dernier. Dans un second temps, l'adhésion devient permanente (« *locking* » ou « *anchoring* ») lorsque les bactéries commencent à produire les exopolysaccharides et/ou les ligands spécifiques, qui vont former un complexe avec la surface colonisée. A ce stade, il faut mettre en œuvre des forces physiques et chimiques assez fortes pour dissocier cette monocouche.[3]

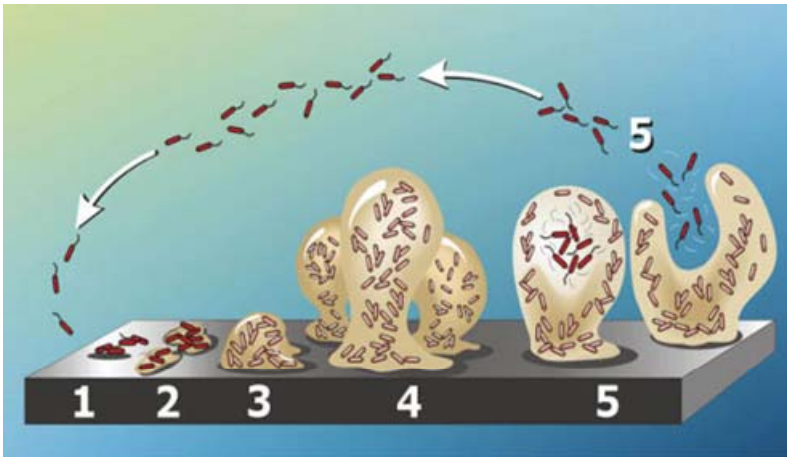


Figure 1: Mécanisme de formation d'un biofilm, 1-2 : Etape d'adhésion, 3 : Maturation, 4 : Entretien, 5 : Détachement, d'après la référence 4.

La deuxième étape de formation d'un biofilm est la maturation, au cours de laquelle un changement phénotypique va notamment conduire à la surexpression des gènes responsables de la synthèse des exopolysacharides (EPS).[2] La croissance et la division des cellules, couplées à l'augmentation de la production d'EPS conduit au développement de microcolonies (en forme de champignons), enfermées dans une matrice dense et séparées les unes des autres par des vides interstitiels.[5] La troisième étape de la formation d'un biofilm est son entretien. L'architecture d'un biofilm est hétérogène, dans l'espace et le temps, et est en constante évolution, pour des raisons internes et externes. Pour garder la communauté dans un état stable, les bactéries répondent à toutes sortes de changements, communicant et coopérant apparemment les unes avec les autres. La dernière étape est celle du détachement. Elle peut survenir de façon programmée ou non. Peu de choses sont connues sur les fonctions ou les voies de régulation impliquées dans la libération de bactéries depuis le biofilm. Un des signaux plausibles serait le manque de nutriments, bien que cette hypothèse n'ait pas été étudiée en détail.[2] De façon non programmée, le détachement peut survenir simplement après l'intervention de forces physiques comme l'érosion ou l'abrasion du biofilm.

Pourquoi former un biofilm ?

La prolifération de l'espèce est un des buts de tout organisme sur Terre. De ce fait, il pourrait paraître tout à fait illogique pour des bactéries de former un biofilm puisque leur taux de croissance dans ce type de communauté est diminué par rapport à une croissance planctonique. Pourtant, il s'agit de la forme la plus souvent adoptée par les bactéries dans leur milieu naturel.

Ce mode de croissance présente différents avantages :

- ✓ Les biofilms sont résistants à certaines forces physiques comme le drainage engendré par la circulation sanguine ou l'action nettoyante de la salive par exemple. Les organismes regroupés en biofilms peuvent supporter une privation de nourriture, des changements de pH, être protégés contre les radicaux oxygénés, les désinfectants ou les antibiotiques, de façon beaucoup plus efficace que lors de croissance en milieu liquide.[6] La formation de biofilm peut donc être considérée comme un moyen de défense des bactéries.

- ✓ Au cours de l'évolution, l'homme et les animaux ont développé un système immunitaire pour combattre les tentatives d'intrusion sans cesse répétées des micro-organismes. Dans cette lutte, certains compromis ont été trouvés et de nombreux cas illustrent le développement de bactéries commensales (notamment au niveau de la peau et des muqueuses).[6] Une autre bonne raison de choisir un mode de croissance par biofilm serait de conserver un habitat confortable.

- ✓ Un biofilm est une communauté hétérogène. Du fait que les bactéries n'ont pas accès aux mêmes ressources (eau, oxygène, nutriments…), toutes n'expriment pas le même génotype et n'ont pas toutes les mêmes capacités de travail. Bien que cela n'ait pas encore été prouvé, l'hétérogénéité d'un biofilm pourrait résulter en la division du travail pour augmenter l'efficacité métabolique de la population dans son ensemble.[6]

- ✓ Enfin, le biofilm peut également représenter la seule façon de survivre. L'exemple des bactéries présentes dans la bouche humaine montre que si lors de la colonisation initiale, elles avaient choisi une croissance planctonique, l'action de la salive les aurait rapidement retirées de la muqueuse, les entraînant vers l'estomac où les sucs gastriques les auraient détruites en très peu de temps.[6]

La Figure 2 résume les quatre raisons pour lesquelles une communauté bactérienne est susceptible de choisir une croissance en biofilm, plutôt que planctonique :

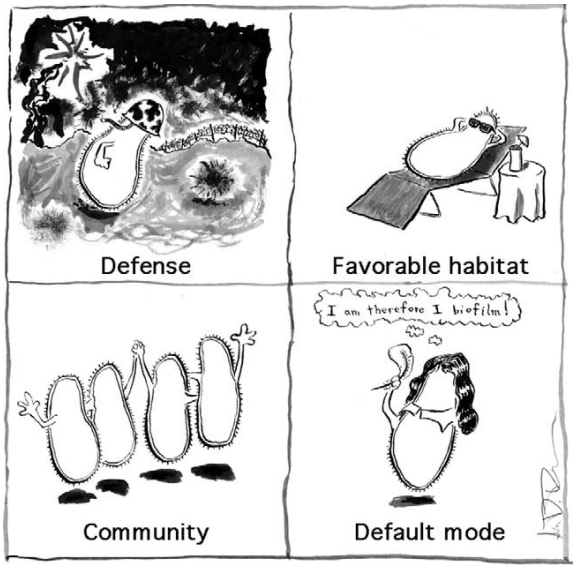


Figure 2: Forces gouvernant le choix de former un biofilm, d'après la référence 6 .

Implications médicales et industrielles des biofilms

Les micro-organismes sont capables de former des biofilms dans des environnements extrêmes, pour le bénéfice de l'homme ou au contraire à son détriment. Certaines propriétés des biofilms ont donc trouvé des applications dans l'industrie pour diminuer le risque de corrosion des métaux, soit en formant une barrière physique entre le métal et l'agent corrodant soit en sécrétant (de façon naturelle ou génétiquement induite) des agents anti-corrosion.[7] D'un autre côté, les conséquences de la formation de biofilms peuvent être dramatiques. Comme nous l'avons déjà dit, ce mode de croissance confère aux bactéries une résistance accrue aux agents de lutte anti-microbiens ou anti-fongiques. De ce fait, la formation de biofilms de bactéries pathogènes peut être la cause de graves infections. La colonisation des poumons de jeunes patients atteints de mucoviscidose par *Pseudomonas aeruginosa* a déjà été très largement démontrée.[8,9] La virulence du pathogène ainsi que sa résistance à tout traitement antibiotique entraînent, chez les enfants infectés par cette bactérie avant l'âge de 5 ans, une augmentation d'un facteur deux à trois de la probabilité de décès entre 8 et 13 ans.[10] Les biofilms peuvent également être à l'origine de contaminations de matériel médical comme des implants cochléaires, des broches orthopédiques, des « *stents* » coronaires ou encore des systèmes de dérivation ventriculaire cérébrale.[11,12] Non seulement responsables d'une réaction du système immunitaire du patient face à l'infection, les biofilms peuvent altérer le bon fonctionnement de l'implant contaminé. L'unique solution est alors le remplacement du système défectueux, accompagné d'une antibiothérapie à long terme.[12]

1.2. Le « *swarming* » de *Bacillus subtilis*

Les bactéries sont des créatures sociales, capables de montrer un comportement coopératif et de développer une signalisation intercellulaire. Comme nous l'avons vu, à l'état naturel, les bactéries sont capables de coloniser de vastes surfaces, artificielles ou naturelles. Les meilleurs exemples de colonisation de surface observables en laboratoire sont la formation de biofilm et le phénomène de « *swarming* », traductible par « essaimage » en Français. Le « *swarming* » est défini comme une migration rapide et massive de groupes de bactéries sur une surface nutritive démontrant un comportement solidaire.[13] La bactérie Gram négative *Proteus mirabilis* constitue un des exemples de « *swarming* » les plus étudiés,[14,15,16,17] sa capacité à coloniser de larges surfaces d'un milieu nutritif ayant interpellé les microbiologistes depuis plusieurs décennies.[18]

Néanmoins, le « *swarming* » des bactéries Gram positives, dont *Bacillus subtilis* est considéré comme le modèle, est peu étudié. Cultivé à la surface d'un milieu synthétique (agar 0,7%), *Bacillus subtilis* forme des motifs de migration hautement ramifiés (Figure 3c).[19,20,21,22] La colonie se développe au cours d'étapes spécifiques. Après 12 à 13 heures d'incubation, des groupes de cellules forment des bourgeons (« *buds* ») en périphérie de la colonie mère qui sont brutalement libérés pour former les dendrites monocouche initiales. L'expansion des dendrites se poursuit à une vitesse approximative de 3,5 $mm.h^{-1}$, restant à l'état de croissance monocouche pendant encore 5 à 6 heures. Au bout de 19 heures d'incubation, la première vague de « *swarming* » est achevée et il se produit alors une phase de croissance multicouche (étape de consolidation) démarrant de la base et se dispersant vers l'extérieur.[23,24] La Figure 3 présente les différentes étapes de formation d'un motif de « *swarming* » chez *Bacillus subtilis.* Les flèches noires montrent un « anneau » qui précède systématiquement les dendrites et qui est essentiellement composé de surfactines (*cf* paragraphe 1.3. pour leur description). Les motifs obtenus diffèrent selon la souche et le milieu utilisés notamment, mais la présence de cet « anneau » est toujours observée.

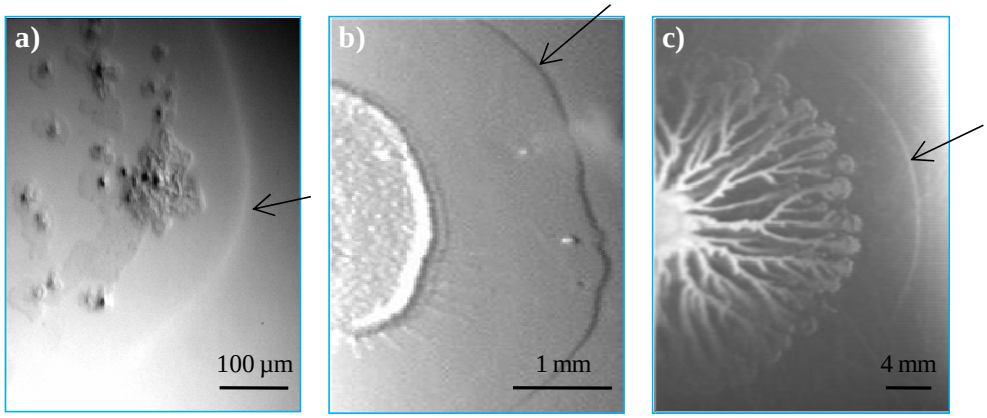


Figure 3: Image microscopique d'une croissance de la souche naturelle de *Bacillus subtilis* au bout de a) 11 heures d'incubation ; b) 13 heures d'incubation ; c) 19 heures d'incubation. Les flèches indiquent l'« anneau » de surfactines (d'après Simone Séror, communication privée).

Le mécanisme impliqué dans cette migration de surface est cependant mal compris. Néanmoins, au cours des dernières années, les microbiologistes ont acquis certaines certitudes. Les conditions environnementales, la sécrétion de surfactants, la présence de flagelles, de nombreux gènes liés au « *swarming* » et des systèmes de détection d'un seuil (« *quorum sensing* ») sont tous requis pour que le processus d'essaimage ait lieu.[1,20,25,26,27,28,29,30]

1.3. Les surfactines : structure et activités

Au cours de la croissance, les bactéries sécrètent dans le milieu de nombreuses molécules, incluant des biosurfactants de faible poids moléculaire. Il s'agit le plus fréquemment de glycolipides ou lipopeptides. Le plus connu est le rhamnolipide, produit par la famille des *Pseudomonas* et constitué d'une unité rhamnose et d'un acide décanoïque.[31] La famille des *Bacilli* sécrète pour sa part une variété de métabolites secondaires possédant tous des propriétés surfactantes : les iturines, les lichenysines et les surfactines[32] auxquelles nous allons plus particulièrement nous intéresser.

Les surfactines sont une famille de lipopeptides isolée pour la première fois en 1968 par Arima *et al.*[33] Elles constituent une famille d'heptacyclodepsipeptides liés par une fonction lactone à un β-hydroxyacide à longue chaîne comptant de 13 à 15 atomes de carbone[32,34] (Figure 4).

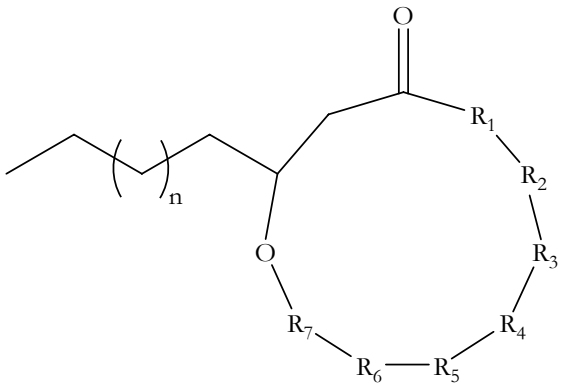


Figure 4: Structure générale des surfactines. n varie de 6 à 10.

Le cycle peptidique des surfactines est composé d'un acide glutamique en position R_1, d'une leucine en position R_2, R_3, R_6 et R_7, d'une valine en position R_4 et enfin d'un acide aspartique en position R_5. Néanmoins, la séquence ELLVDLL peut connaître des variations. Les acides aminés aux positions 2, 4 et 7 peuvent être remplacés par d'autres résidus hydrophobes. Il existe donc une grande diversité de surfactines naturelles auxquelles viennent s'ajouter les molécules dont la biosynthèse a été spécifiquement orientée.[32,35,36,37]

Les surfactines possèdent de nombreuses activités biologiques dont une action antitumorale observée dès la fin des années soixante sur des cellules de carcinome d'Ehrlich (tumeur du sein)[38,39,40] et une activité antibiotique sur des bactéries de la classe des mollicutes comme *Mycoplasma hyorhinis (*parasite du porc).[41,42] La nature amphiphile des surfactines leur confère d'autres propriétés comme une action antivirale dirigée contre différents virus comme le virus de l'herpès, les retrovirus[43] ou encore le VIH-1.[44] Grâce à leur action détergente, les surfactines agiraient en perturbant puis en lysant la membrane lipidique de l'enveloppe du virus, inhibant ainsi sa prolifération. La littérature mentionne que les surfactines fonctionnent également comme inhibiteurs enzymatiques[45] ou agents chélatants des ions Ca^{2+}.[32] Malgré cette liste (non exhaustive) des activités des surfactines, ces molécules sont essentiellement connues pour leur puissant pouvoir surfactant.[34,46] Dans le cadre du processus d'essaimage, les bactéries peuvent trouver avantage à sécréter ces composés, dans le but de modifier certaines propriétés physiques de la surface d'agar, comme la tension de surface ou la mouillabilité, afin de faciliter la migration et la colonisation du milieu.[46]

1.4. Problématique

En 2005, l'équipe de Simone Séror (IGM Orsay) a démontré que les surfactines sont nécessaires au « *swarming* » de *Bacillus subtilis,*[24] néanmoins certaines questions sont restées en suspens. Il s'agissait notamment de déterminer quelles espèces de surfactines sont produites, où elles se trouvent au sein du profil de migration et quelle quantité de surfactines est sécrétée par les bactéries lors de la colonisation. Notre travail, en collaboration avec les microbiologistes de l'IGM d'Orsay, a consisté à répondre à ces questions.

Nous avons vu que la nature des surfactines pouvait varier soit en fonction de la longueur de la chaîne acyle, soit en fonction de la séquence peptidique, soit en fonction des deux. La distribution entre ces isomères au sein du motif de « *swarming* » n'a jamais été étudiée. Nous avons donc mis à profit l'excellente résolution spatiale de l'imagerie ToF-SIMS pour cartographier les différentes espèces de surfactines sécrétées directement au sein de motifs migratoires. Grâce à cette approche, nous avons pu répondre aux deux premières questions. De plus, l'étude de différentes souches de *B. subtilis* a permis de corréler la localisation des surfactines au sein du motif au comportement migratoire des bactéries. Répondre à la troisième question a nécessité de mettre en place une autre stratégie et nous avons choisi de développer une méthode d'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Le but de cette analyse quantitative était de montrer *in situ* l'éventuelle existence d'un gradient de surfactines au sein du motif. Ces approches ont toutes deux nécessité de mettre au point des méthodes de préparation d'échantillon originales et ce fut un des principaux défis de ce projet. Un autre but de cette étude était la détection d'autres composés, peptidiques ou non, associés à l'essaimage.

Par ailleurs, la méthodologie de l'imagerie ToF-SIMS n'avait jamais été appliquée à des substances peptidiques. Cette étude constituait donc en soi un enjeu, tant en biologie structurale que pour la communauté de spectrométrie de masse et l'imagerie biomédicale.

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Colonies bactériennes

Les profils de migration de *B. subtilis* ont été fournis par l'équipe de Simone Séror. Les différentes souches utilisées sont décrites dans le Tableau 1:

Nom de la souche	Description
168 *sfp*$^+$	Souche domestique (ou de laboratoire).
36 10	Souche sauvage.
168 *sfp*$^+$ *ΔphrC*	Souche de laboratoire génétiquement modifiée dont la production de surfactines est régulée négativement.
168 *sfp*$^+$ *Δcom*A	Souche de laboratoire génétiquement modifiée dont la production de surfactines est régulée négativement.
168 *sfp*$^+$ *ΔabrB*	Souche de laboratoire génétiquement modifiée dont la production de surfactines est régulée négativement.
168 *sfp*$^+$ *Δhag*	Souche de laboratoire génétiquement modifiée dont la synthèse de la flagelline (protéine essentielle pour le swarming) est régulée négativement.
168 *sfp*$^+$ *ΔswrB*	Souche de laboratoire génétiquement modifiée dont la synthèse des flagelles (organelles moteur) est régulée négativement.

Tableau 1: Description des différentes souches de *B. subtilis* dont le motif de « *swarming* » a été analysé en imagerie ToF-SIMS.

Nous ne détaillerons pas ici le protocole microbiologique de préparation des colonies bactériennes puisque cette étape a été réalisée par Kassem Hamzé, à l'IGM Orsay. Le protocole suivi est décrit dans un article de Daria Julkowska.[24] Une fois le milieu nutritif inoculé avec la souche choisie, les bactéries étaient cultivées à 30°C, pendant 16 à 17 heures, dans une ambiance dont l'humidité était contrôlée entre 50 et 70%. Les boîtes de Petri étaient retirées de l'incubateur quand les dendrites mesuraient approximativement 1,5 cm de long, juste avant leur transfert vers le laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN. Nos collaborateurs nous apportaient donc plusieurs boîtes de Petri, chacune renfermant un motif de migration développé à la surface du gel d'agar. Le motif est parfaitement visible à l'œil nu, par transparence, face à une source de lumière.

2.2. Protocole mis en œuvre pour les expériences d'imagerie ToF-SIMS

2.2.1. Préparation des échantillons

La technique que nous avons employée consiste à « décalquer » le motif de « *swarming* » et les molécules présentes à la surface de la gélose directement sur un disque de silicium. Le choix de ce support s'est imposé au fil de mon travail de thèse car il présente de nombreux avantages vis à vis des autres supports utilisés jusqu'alors que sont les plaques conductrices « ITO » (« *indium tin oxide* »), les plaques inox sans revêtement, les plaques d'or… Le premier avantage du disque de silicium est sa planéité (supérieure à 1 µm sur toute la surface du disque). Une telle planéité est indispensable pour garantir des différences de temps-de-vol des ions primaires et secondaires négligeables, assurant une résolution en masse plus élevée et une attribution des pics facilitée. Le deuxième avantage est la propreté et la pureté de ce matériau, ce qui limite les interférences en spectrométrie de masse ToF-SIMS. Troisièmement, les disques de silicium sont conducteurs de l'électricité ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation de l'« *electron floodgun* ». Nous verrons que cette propriété s'est avérée cruciale dans notre travail. Enfin, ces supports sont relativement peu chers ce qui autorise à les jeter après seulement une utilisation, évitant les contaminations éventuelles d'une expérience à l'autre.

Avant de procéder au transfert sur le disque de silicium, les boîtes de Petri sont laissées à sécher à l'air ambiant pendant 10 minutes. En effet, la surface de la gélose est toujours couverte d'une fine pellicule d'eau, qui, si le transfert est réalisé sans délai, est à l'origine d'irisations recouvrant le motif transféré, empêchant ainsi son analyse. Passées ces 10 minutes, le transfert peut avoir lieu. Le disque de silicium est déposé le plus délicatement possible sur la gélose, à l'aide d'une pince, pour éviter toute formation de bulle entre la gélose et le disque. Il a ensuite fallu trouver la juste pression à exercer sur le disque afin d'obtenir un transfert satisfaisant du motif de « *swarming* ». Il faut appuyer suffisamment pour décalquer le motif sans pour autant écraser le milieu, ce qui détruirait la colonie. Nous avons donc testé des presses faites de différentes masses et finalement nous avons fait fabriquer une presse manuelle pesant 620 g, qui semblait le poids idéal pour réaliser des transferts de bonne qualité. Le temps de contact entre le disque de silicium et le motif a dû être ajusté également. Après différents essais, nous avons conclu qu'une durée de 30 secondes était nécessaire au bon transfert du motif et des surfactines. Enfin, la dernière étape du protocole consiste à retirer le disque, tout aussi délicatement que lors de son dépôt, et à observer le transfert au

microscope afin de repérer les zones les mieux transférées et déterminer les régions du motif qui doivent être analysées.

La préparation des échantillons pour l'analyse ToF-SIMS a nécessité ingéniosité et pugnacité, tant les conditions environnementales, difficiles à contrôler, peuvent influencer sur la qualité des échantillons. Il est arrivé que la météorologie du jour assèche ou au contraire humidifie trop les boîtes de Pétri, rendant difficile le transfert sur le disque de silicium, ou même qu'aucun transfert ne soit satisfaisant, nous obligeant à reporter les expériences à la semaine suivante.

La Figure 5 montre différents motifs de « *swarming* » dont certaines zones ont été mal transférées, ainsi que deux exemples de motifs parfaitement décalqués :

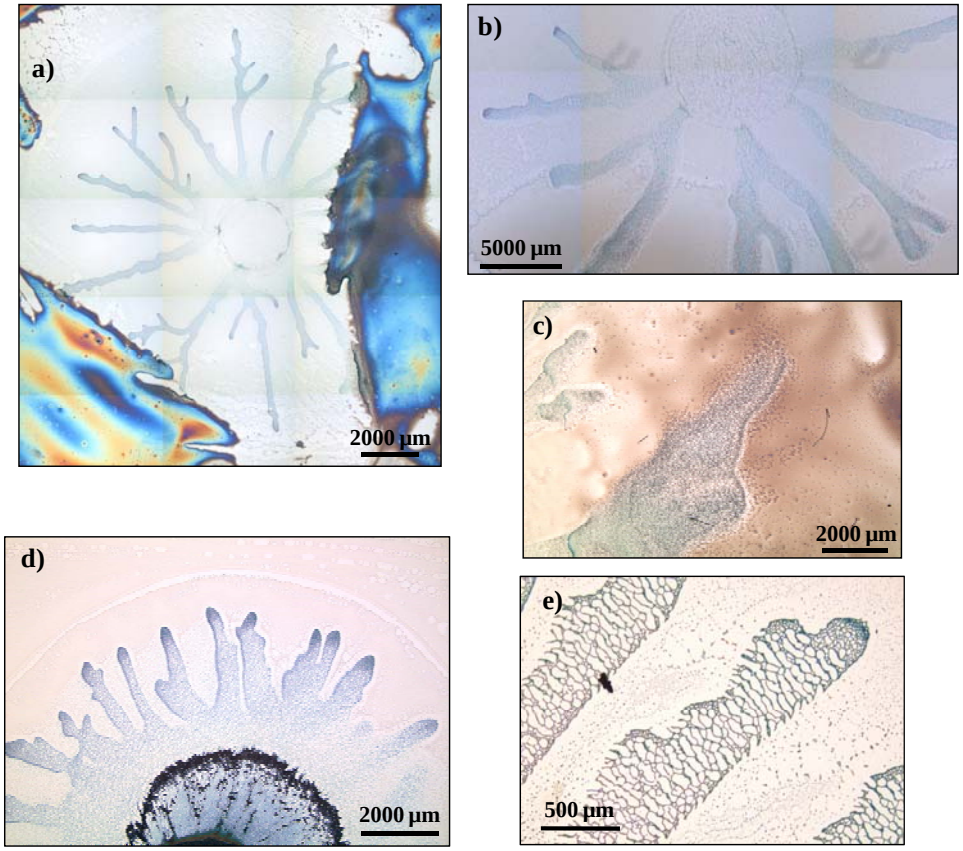


Figure 5: Images microscopiques de transferts de motifs de « *swarming* », a) Motif de la souche 168 *sfp*$^+$: certaines régions du transfert sont inexploitables du fait des irisations qui se sont produites lors du transfert ; b) Motif de la souche 168 *sfp*$^+$: les dendrites visibles en bas de l'image ont été écrasées lors du transfert ; c) Extrémité d'une dendrite formée par la souche 168 *sfp*$^+$ dont la structure a été détruite ; d) Motif de la souche 36 10 (naturelle) parfaitement transféré ; e) Extrémité d'une dendrite formée par la souche 36 10 parfaitement transférée.

Les derniers échantillons ont été obtenus avec le même protocole, mais à Orsay, car après plus d'un an de collaboration, nous nous sommes aperçus que les motifs transférés sur disque de silicium supportaient mieux le voyage Orsay-Gif que les boîtes de Petri.

2.2.2. Analyse ToF-SIMS des motifs transférés

Les deux modes de fonctionnement disponibles sur le spectromètre ToF-SIMS du laboratoire ont été utilisés pour enregistrer les images de profils de migration. Les images dont la surface était supérieure à 500 x 500 μm^2 ont été acquises en faisant bouger le porte-échantillon à l'intérieur du spectromètre (acquisition en « *stage scan* »). Nous avons ainsi pu enregistrer des images pour des quarts, voire des moitiés de motif. Pour ces images, la fluence d'ions primaires utilisée a toujours été de l'ordre de 10^9 ions.cm^{-2}. Nous avons également enregistré des images de plus petite taille (500 x 500 μm^2) sur des zones précises des motifs, notamment les dendrites et l'anneau de surfactines. Dans ce cas, le porte-échantillon du spectromètre était immobile et le faisceau d'ions primaires balayait la surface à analyser (« *beam scan* »). La fluence d'ions primaires était de l'ordre de 5 x 10^{11} ions.cm^{-2}. Après les premiers tests de faisabilité de l'expérience, nous avons travaillé exclusivement en mode d'ionisation négatif. En effet, en mode d'ionisation positif, la détection d'adduits avec le sodium et le potassium complique les spectres en multipliant les pics dans la gamme de masse d'intérêt. Les surfactines sont donc détectées sous la forme de molécules déprotonées $[M-H]^-$.

2.3. Protocole mis en œuvre pour l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF

2.3.1. Prélèvement des échantillons et extraction des surfactines

Développer l'approche par spectrométrie de masse MALDI-TOF a également nécessité la mise au point d'un protocole spécifique de préparation d'échantillon. Nous disposions du même type d'échantillons que pour l'imagerie, c'est-à-dire des boîtes de Petri avec des colonies de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* développées à la surface de la gélose après 16 à 17 heures d'incubation. Pour quantifier les surfactines, il nous a tout d'abord fallu les extraire de la communauté bactérienne. Racler la surface de la gélose aurait été une solution, si nous n'avions pas souhaité mettre en évidence un éventuel gradient de surfactines au sein de la colonie. Pour cela, nous devions absolument pouvoir corréler la quantification de

surfactines à la localisation du prélèvement. Nous avons donc mis au point une méthode de carottage de la gélose. Le but était de réaliser des prélèvements de faible volume, avec un maximum de précision afin de refléter le plus fidèlement possible le gradient éventuellement présent. La première étape a consisté à repérer les régions du motif où nous allions réaliser les prélèvements. Pour cela, nous avons observé les boîtes de Petri et nous avons choisi le « *swarming* » avec les caractéristiques les plus adaptées à nos besoins (dendrites longues, bien espacées, anneau visible…). Nous avons réalisé des prélèvements dans six zones différentes : la colonie mère (ou *inoculum*), à l'intérieur d'une dendrite, à droite d'une dendrite, à gauche d'une dendrite, entre deux dendrites et enfin sur l'anneau de surfactines.

Nous avons utilisé un capillaire en verre de 50 µL que nous avons planté dans la gélose, jusqu'au fond de la boîte et, à l'aide d'un petite poire, nous avons aspiré un cylindre de gélose. Un capillaire neuf a été utilisé pour chaque prélèvement. Nous avons réalisé plus d'une centaine de prélèvements, répartis comme suit :

- ✓ 60 échantillons provenant de l'intérieur de douze dendrites,
- ✓ 12 échantillons provenant de l'espace entre deux dendrites,
- ✓ 12 échantillons provenant du coté droit de deux dendrites,
- ✓ 12 échantillons provenant du coté gauche de deux dendrites,
- ✓ 18 échantillons provenant de deux anneaux de surfactines,
- ✓ 10 échantillons provenant de deux colonies mères.

Les surfactines ont été extraites par l'ajout de 50 µL d'éthanol. L'étape d'extraction débute par une agitation de 30 minutes à température ambiante puis une conservation d'une nuit à -20°C. L'extrait est ensuite lyophilisé pendant 20 minutes.

Afin de nous assurer que nous avions récupéré la totalité des surfactines présentes dans les échantillons, une nouvelle extraction a été pratiquée sur différents résidus d'extraction. Après le prélèvement du premier extrait, nous avons ajouté de nouveau 50 µL d'éthanol à ces échantillons et répété le protocole d'extraction. L'analyse de ces extraits en spectrométrie de masse MALDI-TOF n'a révélé la présence d'aucune espèce de surfactines ou d'autres composés d'intérêt.

2.3.2. Synthèse et purification de l'étalon interne nécessaire à l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La quantification par spectrométrie de masse MALDI-TOF nécessite l'utilisation d'un étalon interne. La molécule choisie comme étalon doit avoir des propriétés chimiques et physiques identiques à celles du composé à identifier, afin de répondre de façon identique à la désorption, à l'ionisation et à la détection. Pour cela, le choix peut se porter sur une molécule structuralement proche du composé à doser ou mieux, sur un isotopomère de l'analyte. Nous avons opté pour la seconde stratégie, et des surfactines marquées à l'azote 15 ont été synthétisées par l'équipe de Jamal Ouazzani de l'ICSN. Les surfactines ont été synthétisées par la souche 168 sfp^+ de *Bacillus subtilis*, cultivée en milieu liquide. Lorsque le maximum de la production de surfactines a été atteint, le milieu de culture a été centrifugé et évaporé sous pression et température réduites jusqu'à un volume 2,5 L. Le milieu ainsi concentré a été lyophilisé pour donner 96 g d'une poudre rose, reprise dans l'éthanol et filtrée. Cet extrait brut, contenant toutes les espèces de surfactines, toutes totalement marquées par sept atomes de ^{15}N, a été purifié afin de ne récupérer que la surfactine marquée possédant 15 atomes de carbone sur la chaîne acyle. Nous avons utilisé la chromatographie liquide préparative, avec une colonne SunFire C_{18} (5 µm, 19 x 150 mm). La phase mobile était un mélange 80/20 d'acétonitrile et d'eau, acidifiée par 0,1% en volume d'acide formique. Le débit utilisé était de 28 $mL.min^{-1}$, en mode isocratique. 4,34 mg de surfactine-$^{15}N_7$-C_{15} ont été obtenus à partir des 11 L de bouillon initiaux. Un mélange commercial de surfactines a également été purifié, afin d'isoler la surfactine portant 15 atomes de carbone sur la chaîne acyle. En effet, pour l'établissement de la droite d'étalonnage, il faut connaître exactement la concentration de l'analyte, ce qui est impossible avec le mélange commercial de surfactines. Le système chromatographique utilisé pour la purification est le même que précédemment, néanmoins, compte tenu de la quantité de matériel à traiter, un format analytique a été préféré.

2.3.3. Choix de la matrice MALDI et du mode d'ionisation

Les matrices MALDI usuelles que sont l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque, la 2,4,6-trihydroxyacétophénone et la 9-aminoacridine ont été testées en mode d'ionisation positif et négatif, pour déterminer les conditions les plus adaptées à l'analyse des surfactines par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les critères de choix se sont portés sur le rapport signal-sur-bruit obtenu pour chaque matrice, ainsi que la

sensibilité avec laquelle les surfactines sont détectées. La 9-aminoacridine (utilisée en mode négatif) s'est révélée être la matrice MALDI la plus efficace, offrant une limite de détection de 10 fmol. Par ailleurs, nous avons cherché à déterminer quel mode d'ionisation était le plus adapté pour l'analyse des surfactines. Sur un spectre de masse, les signaux des différentes espèces de surfactines sont espacés de 14 Da, comme le montre la Figure 6. En mode positif, les ions des surfactines sont détectés sous forme d'adduits avec le sodium et le potassium. La surfactine à 15 atomes de carbone apparaît au rapport *m/z* 1058,65 sous forme $[M+Na]^+$ et le massif isotopique de cet ion chevauche celui de l'ion au rapport *m/z* 1060,61, correspondant à l'adduit potassium de la surfactine à 14 atomes de carbone (Figure 6a). L'étalon interne choisi pour l'analyse quantitative est la surfactine à 15 atomes de carbone marquée à l'azote 15. Possédant sept atomes d'azote dans sa structure et le marquage étant total, l'étalon possède un poids moléculaire de 1042,66 uma et l'ion $[M+Na]^+$ correspondant apparaîtrait au rapport *m/z* 1064,64, ou sous forme d'adduit avec le potassium au rapport *m/z* 1080,62. Dans les deux cas, le massif isotopique de l'ion de l'étalon se superposerait avec celui d'un ion déjà présent sur le spectre ce qui deviendrait gênant pour la mesure de l'aire des pics d'intérêt dans le cadre de l'analyse quantitative.

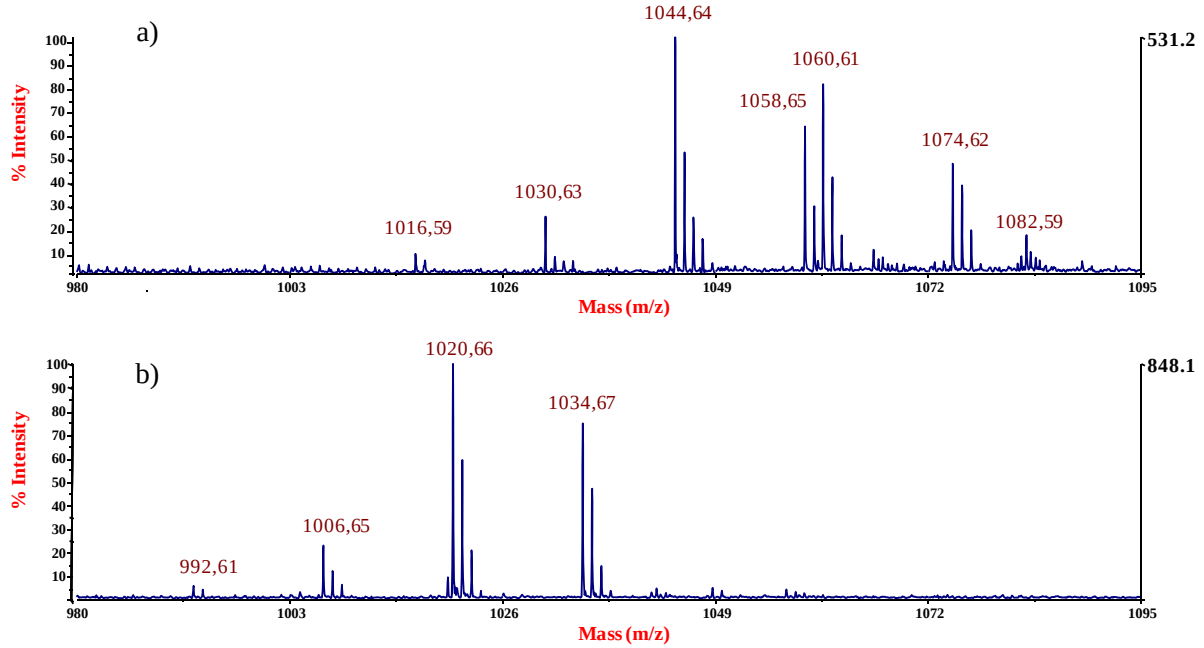


Figure 6: Spectres MALDI-TOF d'une solution de surfactines commerciales (800 µg.mL^{-1} dans l'éthanol), a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif.

En mode d'ionisation négatif, les surfactines sont détectées sous la forme de molécules déprotonées (Figure 6b). Pour le cas de la surfactine à 15 atomes de carbone, l'ion $[M-H]^-$ apparaît au rapport *m/z* 1034,67. L'ion $[M-H]^-$ de la surfactine à 16 atomes de carbone

apparaît au rapport *m/z* 1048,69. L'étalon interne est donc détecté sous sa forme $[M-H]^-$ au rapport *m/z* 1041,65 et s'intercale parfaitement entre les deux ions précédents. Aucun chevauchement n'est visible et la mesure de l'aire des pics peut se faire sans biais. C'est pourquoi nous avons préféré travailler en mode d'ionisation négatif, avec la 9-aminoacridine comme matrice.

2.3.4. Établissement de la droite d'étalonnage

Nous avons préparé en solution des mélanges d'étalon interne et de surfactine-C_{15}. La concentration de l'étalon est fixée à 19,4 µmol.L^{-1}. La concentration de la surfactine-C_{15} varie de 0,96 à 96 µmol.L^{-1}. Le rapport des aires de pics (surfactine-C_{15}/surfactine-$^{15}N_7$-C_{15}) a été calculé à partir des aires mesurées sur chaque spectre. Les rapports d'aires de pics varient linéairement en fonction de la concentration, conduisant à une droite d'étalonnage dont le coefficient de corrélation $R^2 = 0,991$ démontre la fiabilité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour la quantification de la surfactine-C_{15}.

2.3.5. Analyse quantitative des extraits de surfactines

4,5 µL d'une solution de 9-aminoacridine à 10 mg.mL^{-1} dans l'éthanol ont été ajoutés à chaque extrait de surfactines sec. 0,5 µL d'une solution d'étalon interne à 19,4 pmol.mL^{-1} dans l'éthanol ont également été ajoutés. La concentration de la solution étalon a été déterminée après la construction de la droite d'étalonnage de façon à ce que les signaux de l'étalon et de l'analyte soient toujours visibles sur le spectre. 0,6 µL de l'échantillon ont été déposés à trois reprises sur une plaque MALDI recouverte de matériau Teflon. Les échantillons ont été laissés à sécher à l'air ambiant pendant 5 minutes avant l'analyse. Les paramètres instrumentaux du spectromètre Voyager DE-STR utilisé ont été ajustés de façon à obtenir le meilleur rapport signal-sur-bruit sans élargissement excessif des pics. Tous les spectres de masse ont été étalonnés avec les pics des ions $(NaI)_nI^-$ (n variant de 5 à 7) produits lors de l'irradiation d' un dépôt d'iodure de sodium.

2.4. Protocole mis en œuvre pour les expériences de spectrométrie de masse tandem

Une solution de surfactines commerciales (Sigma Aldrich), de concentration 1 $mg.mL^{-1}$ dans l'éthanol a été utilisée pour mettre au point les conditions d'analyse sur un spectromètre de type LTQ-Orbitrap équipé d'une source nano-electrospray. Le solvant de nébulisation était un mélange composé d'acétonitrile et d'eau (50/50), acidifié par de l'acide formique à 1%. Les expériences de spectrométrie de masse tandem ont été réalisées avec des échantillons issus de carottages (souche 168 sfp^+), dont les surfactines ont été extraites selon le protocole décrit plus haut. Les extraits secs ont été dissous dans 10 µL du solvant de nébulisation. Les spectres MS/MS ont été acquis en mode d'ionisation positif avec une résolution en masse $m/\Delta m$ de 12500 au rapport *m/z* 400. Les ions d'intérêt ont été isolés dans le piège linéaire avant d'être soumis à une activation par CID (« *Collision induced dissociation* »). Le gaz de collision utilisé était de l'hélium.

3. Résultats et Discussion

3.1. Analyse structurale des surfactines

Comme nous l'avons déjà vu, les surfactines connaissent des variations dans la séquence d'acides aminés du cycle peptidique. Sur les spectres de masse des extraits de surfactines, deux ions, aux rapports *m/z* 992,68 et 1048,70, ont particulièrement retenu notre attention. Si la séquence ELLVDLL est conservée dans ces espèces, cela implique que les longueurs de chaînes acyles sont de 12 et de 16 atomes de carbone respectivement. Si la longueur de chaîne acyle est comprise entre 13 et 15 atomes de carbone (comme ce qui est décrit dans la littérature), cela implique que la séquence peptidique est modifiée.

Nous avons mené des expériences de spectrométrie de masse tandem afin de déterminer la séquence en acides aminés des surfactines sécrétées lors du processus de « *swarming* ». La Figure 7 montre le spectre MS/MS obtenu en mode d'ionisation positif en sélectionnant l'ion au rapport *m/z* 994,6301.

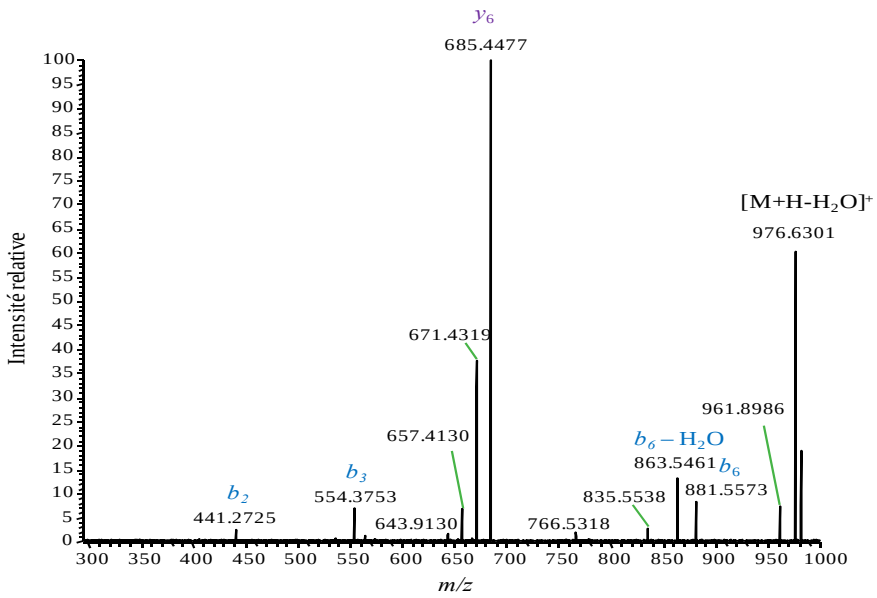


Figure 7: Spectre nano-ESI-MS/MS de l'ion à *m/z* 994,6301 (mode d'ionisation positif).

Les ions obtenus correspondent à des ions de type *b* et *y* de la nomenclature générale des fragments peptidiques définie par Roepstorff et Fohlman[47] et complétée par Biemann.[48] Cette nomenclature sera utilisée pour décrire nos résultats mais ne sera pas détaillée ici. Nous observons les ions b_6, b_3 et b_2, ainsi qu'un ion au rapport *m/z* 685,4477, attribué à l'ion y_6 d'une surfactine dont la séquence peptidique serait ELLVDLL.[49] Nous avons tout de même vérifié qu'aucune autre combinaison (séquence + longueur de chaîne acyle) ne pouvait conduire à la formation d'ions de même rapport *m/z*. Les différentes séquences naturelles menant à un poids moléculaire de 993,64 uma, d'après Bonmatin *et al.*[32] ainsi que les rapports *m/z* des ions b_2, b_3, b_6 et y_6 associés sont regroupés dans le Tableau 2 :

Séquence peptidique	Longueur de la chaîne (atomes de carbone)	*m/z* b_2	*m/z* b_3	*m/z* b_6	*m/z* y_6
ELLVDLL	12	441,27	554,38	881,56	685,45
ELLADLL	14	469,33	528,41	881,56	657,419
ELLVDLV / EILVDLV	13	455,31	568,15	895,58	671,434
EVLVDLV	14	455,31	568,15	895,57	657,42
EVLVDLI	13	441,30	554,38	881,56	671,43

Tableau 2: Structures (séquence peptidique et longueur de la chaîne acyle) possibles pour la surfactine de poids moléculaire 993,64 uma et rapports *m/z* des ions fragments b_2, b_3, b_6 et y_6.

Chaque séquence peptidique, associée au nombre de carbone adéquat, mène à une molécule de surfactine de poids moléculaire 993,64 uma, mais aucune d'entre elles, exceptée

ELLVDLL ne fournit la combinaison d'ions b_2, b_3, b_6 et y_6 observée sur le spectre MS/MS de l'extrait de surfactines issues d'un motif de « *swarming* ». Nous avons également vérifié qu'aucun fragment de type *y* ou *b*, quel qu'il soit, ne conduisait à un des rapports *m/z* des ions détectés. La séquence de la surfactine de poids moléculaire 993,64 uma que nous détectons dans nos échantillons issus de colonies bactériennes est donc bien ELLVDLL, avec une chaîne acyle de 12 atomes de carbone. En revanche, nous sommes dans l'impossibilité de discerner une leucine d'une isoleucine, lorsque celle-ci est placée en position 2 ou 7.

Nous avons réalisé la même expérience, en sélectionnant cette fois l'ion au rapport *m/z* 1072,70, que nous supposions correspondre à l'adduit avec le sodium de la surfactine portant 16 atomes de carbone sur la chaîne acyle. La Figure 8 montre le spectre nanoESI-MS/MS obtenu en mode d'ionisation positif. Comme précédemment, des ions des séries *b* et *y* sont obtenus, ainsi qu'un ion attribué à un fragment interne y_6b_5. Les seules autres séquences peptidiques pouvant mener à une molécule de surfactine de poids moléculaire 1049,70 uma sont issues du remplacement en position 3 et/ou 4 de la leucine par une isoleucine d'une part, et de la valine par une leucine ou une isoleucine d'autre part. La fragmentation de ces isomères conduirait à des ions de rapports *m/z* décalés de 14,02 Da par rapport aux valeurs affichées sur le spectre de la Figure 8.

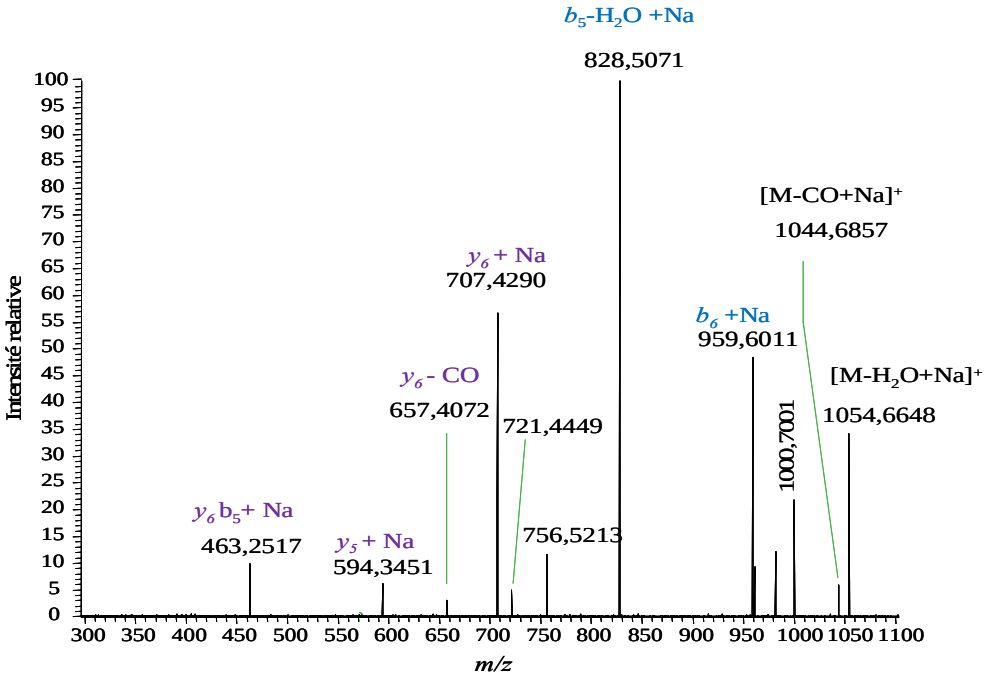


Figure 8: Spectre nanoESI-MS/MS de l'ion au rapport *m/z* 1072,70 (mode d'ionisation positif).

Nous pouvons donc conclure que la surfactine de poids moléculaire 1049,70 uma possède une séquence peptidique ELLVDLL et une longueur de chaîne acyle de 16 atomes de carbone.

3.2. Apport de l'imagerie ToF-SIMS

3.2.1. De l'utilisation réfléchie de l'« *electron floodgun* »

Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, le canon à électrons qui équipe le spectromètre ToF-SIMS du laboratoire a pour but de neutraliser les charges positives résiduelles à la surface de l'échantillon entre deux pulsations du faisceau d'ions primaires. Travaillant avec des échnatillons sur des disques de silicium conducteurs, nous avions pris l'habitude de ne pas utiliser ce système. Néanmoins, au cours d'une expérience, le canon à électrons a été fortuitement utilisé. Nous avons enregistré un spectre sur l'anneau de surfactines le matin, et nous avons recommencé en fin de journée. Les spectres obtenus sont présentés à la Figure 9. Sur le spectre enregistré en début de journée (Figure 9a), les pics majoritaires sont ceux des surfactines, aux rapports *m/z* 1020,56 ($[M_{14}\text{-H}]^-$), 1034,58 ($[M_{15}\text{-H}]^-$) et 1048,59 ($[M_{16}\text{-H}]^-$), M_n se rapportant à l'espèce possédant une chaîne acyle de *n* atomes de carbone. Les pics des ions aux rapports *m/z* 1056,55 et 1072,53 correspondent aux adduits avec le sodium et le potassium de la surfactine à 15 atomes de carbone. Les pics détectés aux rapports *m/z* inférieurs correspondent probablement à des ions issus de la fragmentation des surfactines à 14 et 15 atomes de carbone. Il s'agirait de la perte d'une molécule de dioxyde de carbone (perte de 44 uma), menant respectivement aux signaux détectés aux rapports *m/z* 976,56 et 990,59. Enfin, le signal au rapport *m/z* 555,27 correspond à un ion dont la structure est inconnue pour l'instant. Sur le spectre acquis en fin de journée les ions de type $[M\text{-H}]^-$ des surfactines ont presque tous disparu, excepté celui de la surfactine à 15 atomes de carbone. Les pics majoritaires du spectre sont maintenant ceux des ions fragments.

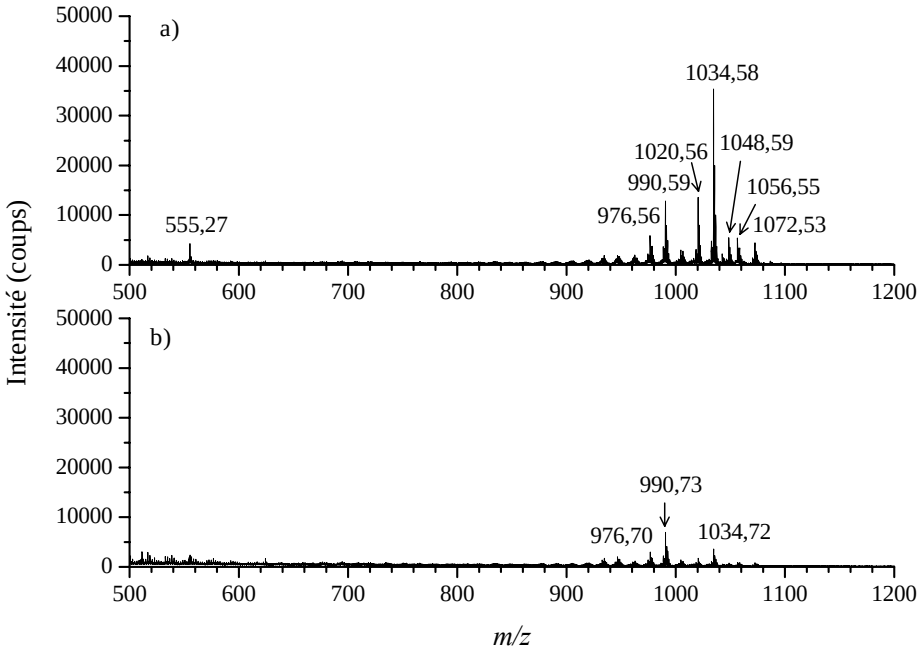


Figure 9: Spectres enregistrés en début (a) et en fin de journée (b), sur l'anneau de surfactines d'un motif de migration de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Ce constat nous a mené à conclure qu'au cours de cette expérience, un phénomène a fait diminuer l'intensité du signal de nos composés d'intérêt. Nous avons formulé deux hypothèses :

- ✓ soit les surfactines se sont évaporées dans la chambre d'analyse (dont le vide est de l'ordre de 10^{-9} hPa),
- ✓ soit l'utilisation exceptionnelle et non volontaire du « *floodgun* » a causé un endommagement de l'échantillon.

Ces deux hypothèses devaient être vérifiées car si la première s'avérait juste, les conséquences pour nos expériences d'imagerie, notamment celles durant plusieurs heures, engendreraient de nouvelles contraintes. Nous avons donc mis au point deux expériences permettant de vérifier quel phénomène était à l'origine de cette observation. Le principe est le suivant: sur un motif, nous avons repéré quatre positions suffisamment éloignées les unes des autres. De cette façon, chaque position est protégée de l'endommagement éventuellement causé par le « *floodgun* » lorsqu'il est utilisé sur la position voisine. Nous avons choisi deux positions sur l'anneau et deux autres à l'extrémité de dendrites. Pour vérifier notre première hypothèse, nous avons enregistré un spectre, sans « *floodgun* », sur une extrémité de dendrite

et une position sur l'anneau, toutes les heures pendant 5 heures suivant le transfert. Pour vérifier si la seconde hypothèse était juste, nous avons enregistré un spectre, en utilisant le « *floodgun* », sur la deuxième extrémité de dendrite et la deuxième position sur l'anneau, à cinq reprises. La Figure 10 résume le principe de l'expérience décrite ci-dessus :

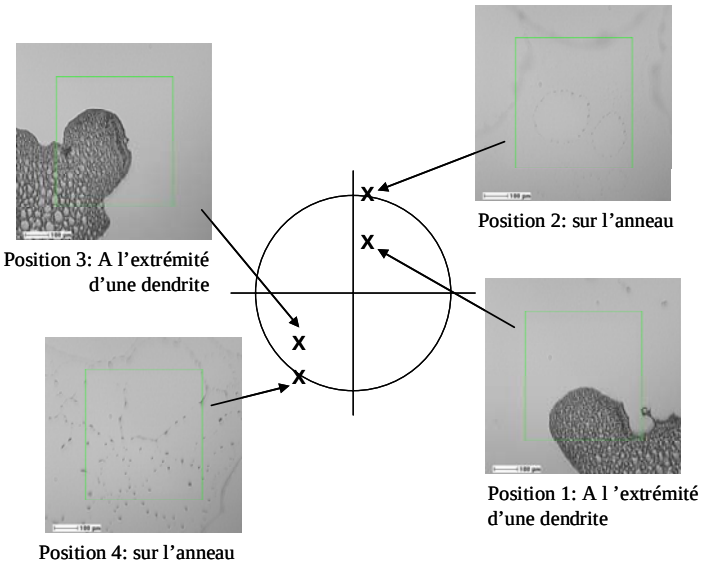


Figure 10: Schéma résumant le principe de l'expérience proposée pour déterminer la cause de la diminution du signal des surfactines. Le cercle symbolise l'anneau de surfactines entourant le motif.

La Figure 11 présente les spectres enregistrés aux positions 1 et 2, sans « *floodgun* ». Pour chaque position, les quatre spectres ont été enregistrés à une heure d'intervalle (sauf le deuxième qui a été enregistré deux heures après le premier) pour vérifier si un phénomène d'évaporation était la cause de la diminution du signal des surfactines. Nous pouvons remarquer que l'intensité des signaux de surfactines est beaucoup plus faible à l'extrémité de la dendrite que dans l'anneau. Nous reviendrons sur ce point plus loin dans ce chapitre. Les spectres montrent que les signaux des surfactines sont toujours détectables, même si l'analyse a lieu cinq heures après le transfert du motif sur le disque de silicium.

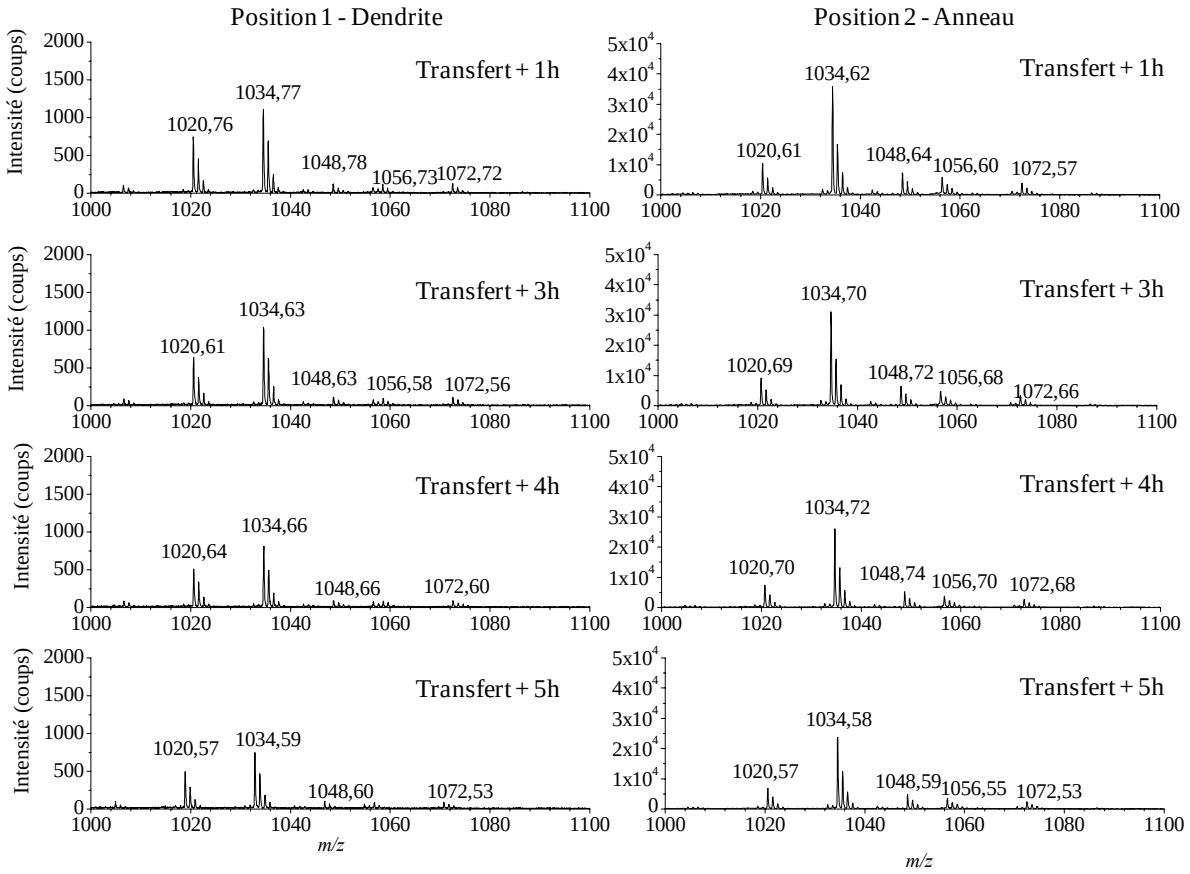


Figure 11: Spectres enregistrés après différents délais suivant le transfert. Colonne de gauche : à la position 1 (extrémité de la dendrite) ; colonne de droite, à la position 2 (anneau de surfactines) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{11} ions.cm^{-2}).

La Figure 12 montre les spectres enregistrés aux positions 3 et 4 avec le « *floodgun* ». Pour chaque position, les spectres ont été enregistrés sans délai, pour ne pas superposer un éventuel phénomène d'évaporation à l'endommagement causé par l'impact des électrons. Les spectres enregistrés à la position 3, soit à l'extrémité d'une dendrite, montrent que dès la troisième acquisition, les surfactines ne sont plus détectées. Sur les spectres enregistrés à la position 4, c'est-à-dire sur l'anneau, les surfactines sont toujours détectées, même à la cinquième acquisition, mais l'intensité des signaux diminue fortement au cours de l'expérience.

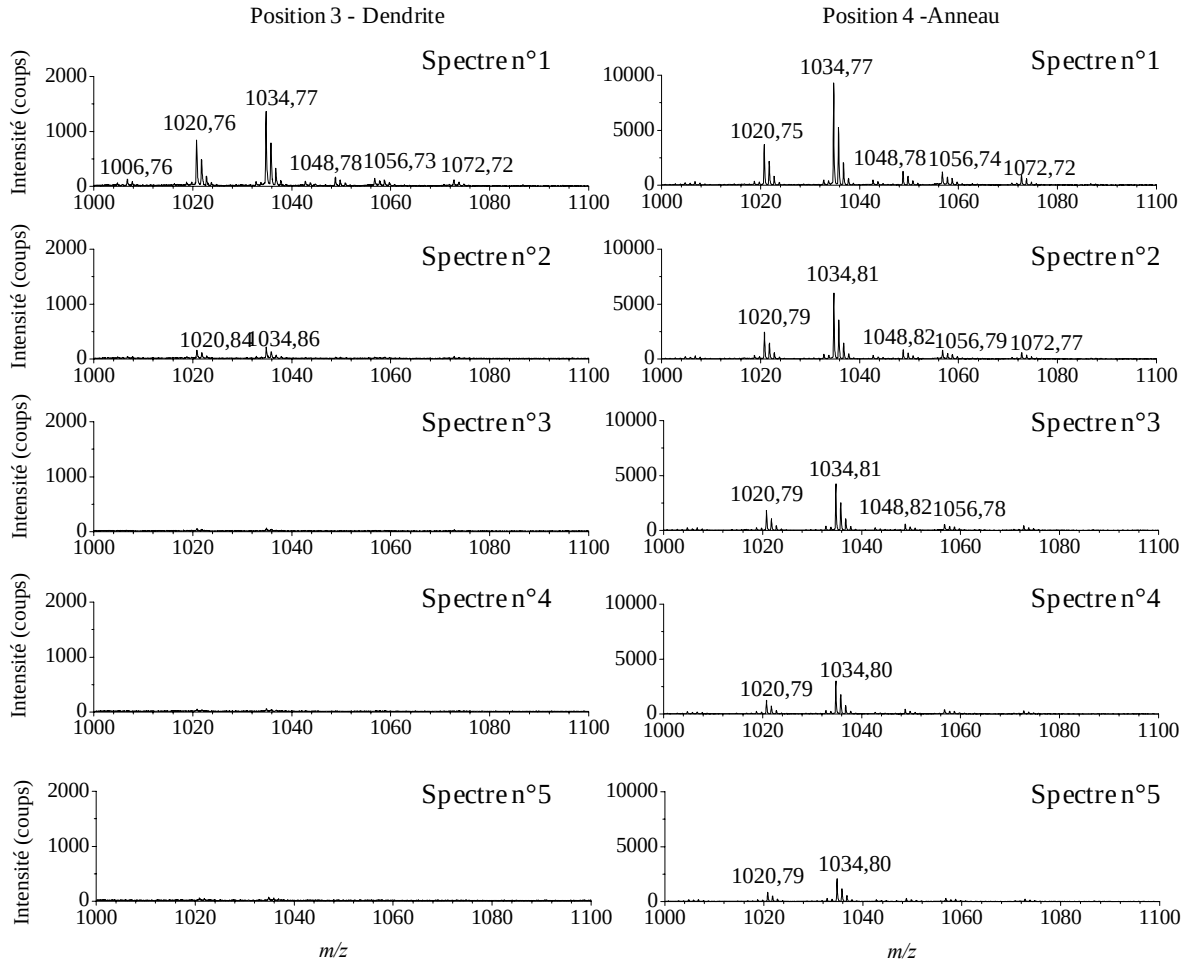


Figure 12: Spectres enregistrés en utilisant le «*floodgun*». Colonne de gauche : à la position 3 (extrémité de la dendrite) ; colonne de droite : à la position 4 (anneau de surfactines) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{11} ions.cm^{-2}).

Pour pouvoir comparer ces résultats, nous avons cherché à les exprimer en fonction de la fluence d'ions primaires et de la fluence d'électrons, respectivement. Si la fluence d'ions primaires est un paramètre essentiel à connaître et facile à obtenir, il n'en va pas de même pour la dose d'électrons. En effet, sur le type d'appareil qui équipe le laboratoire, il est très difficile d'accéder à la mesure du courant d'électrons. Néanmoins, des études sur l'endommagement causé par l'« *electron floodgun* » pendant l'analyse de composés organiques ou de polymères permettent d'évaluer la quantité d'électrons envoyés sur l'échantillon.[50,51] Nous estimons que pour chaque ion primaire qui atteint la surface de l'échantillon, dix millions d'électrons viendront impacter la surface. Cependant, il faut tenir compte de la surface irradiée par les deux types de particules. Les électrons vont irradier une surface 1 000 fois plus importante que les ions primaires, par conséquent pour un ion primaire et à surfaces équivalentes, c'est en fait dix mille électrons qui viendront frapper l'échantillon.

Pour chaque expérience, la fluence d'ions primaires que nous avons utilisée est de 10^{11} ions.cm^{-2}. Par conséquent, pour chaque expérience où le « *floodgun* » a été utilisé, l'échantillon a reçu 10^{15} électrons.cm^{-2}.

La Figure 13 montre l'évolution de la somme des aires des signaux des surfactines en fonction de la fluence d'ions primaires (Figure 13a et 13b) et en fonction de la fluence d'électrons envoyés sur l'échantillon (Figure 13c et 13d).

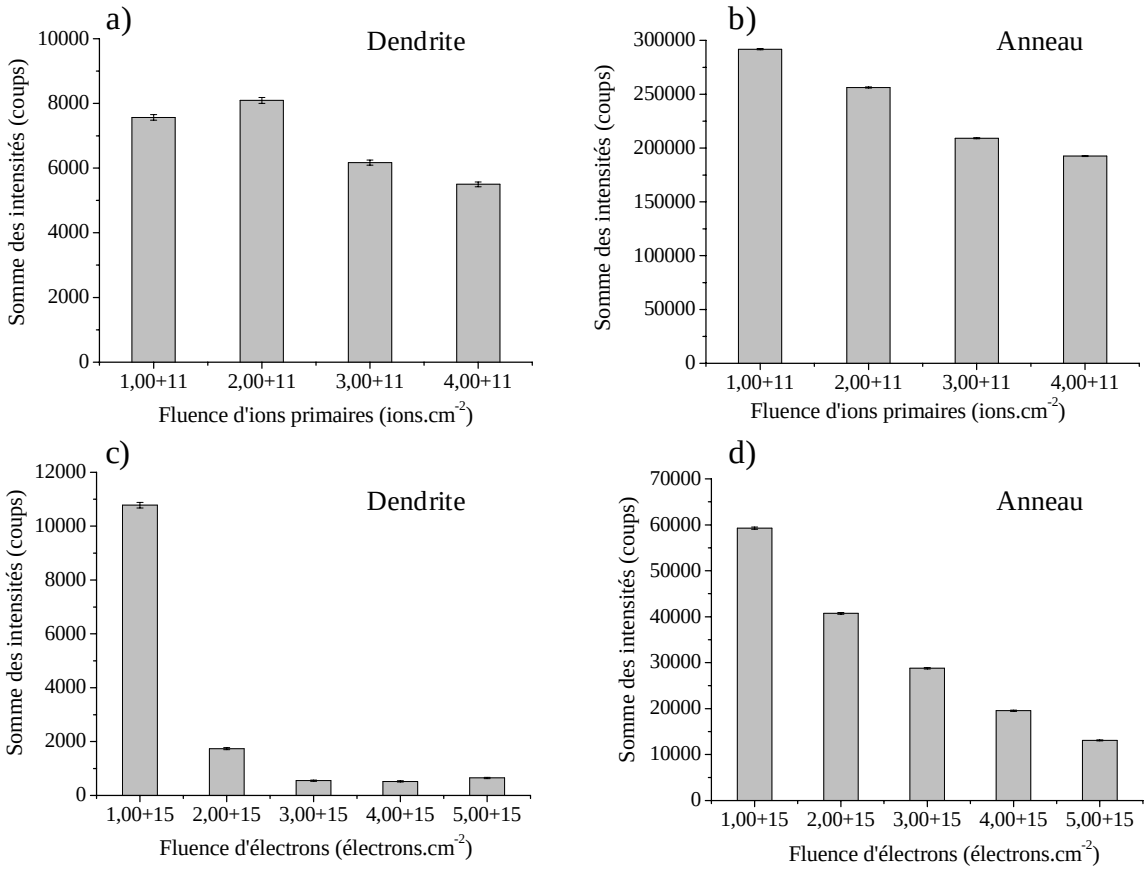


Figure 13: Histogrammes montrant l'évolution de la somme des aires des signaux de surfactines en fonction de la fluence d'ions primaires envoyés sur l'échantillon (a et b) et en fonction de la fluence d'électrons envoyés sur l'échantillon (c et d).

Les Figures 13a et 13b montrent que l'intensité des signaux de surfactines diminue légèrement avec la fluence d'ions primaires. La diminution des signaux est moins marquée quand l'expérience est réalisée à l'extrémité d'une dendrite, puisque après avoir envoyé 4×10^{11} ions.cm^{-2} sur l'échantillon, la perte d'intensité n'est que de 27%. Dans le cas où l'analyse est faite sur l'anneau de surfactines, la perte atteint 34%. Cette diminution est probablement imputable à l'endommagement de l'échantillon par l'impact répété des ions

primaires. Les Figures 13c et 13d montrent que l'intensité des signaux de surfactines diminue fortement avec la fluence d'électrons envoyés sur l'échantillon, notamment lorsque l'expérience est menée à l'extrémité d'une dendrite. La perte d'intensité est rapide et importante puisque dès la troisième acquisition, 95% de l'intensité initiale est perdue. Lorsque l'expérience est menée sur l'anneau de surfactines, la décroissance est moins rapide, peut-être parce que les surfactines sont plus abondantes dans l'anneau que dans la dendrite. Néanmoins, la perte d'intensité est tout de même très importante, après l'impact de 5×10^{15} électrons.cm^{-2}, le signal a perdu 78% de son intensité.

Ces expériences ont donc permis de mettre en évidence que le phénomène concourant principalement à la diminution des signaux de surfactines est l'utilisation de l'« *electron floodgun* », et que si une évaporation des composés à la surface de l'échantillon se produit, elle reste largement minoritaire. Le canon à électrons est donc non seulement inutile lorsque l'on analyse des transferts de motifs de « *swarming* » puisque l'échantillon n'est pas isolant, mais également dommageable, puisqu'il engendre une diminution des signaux des composés d'intérêt.

A l'avenir, lors d'une étude portant sur des composés inconnus, la stratégie à adopter vis-à-vis du « *floodgun* » devrait être déterminée par la conductivité de l'échantillon : si celui-ci est isolant, le canon à électrons sera utilisé car dans le cas contraire, les images obtenues seront inexploitables, l'accumulation de charges à la surface de l'échantillon compliquant l'extraction des ions secondaires. Si au contraire, l'échantillon n'est pas isolant, l'analyse sera conduite sans « *floodgun* » pour éviter l'éventuelle dégradation de composés fragiles à la surface de celui-ci.

3.2.2. Étude de motifs de « *swarming* » de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis*

Les résultats présentés dans ce paragraphe ont tous été obtenus à partir de colonies de la souche de laboratoire 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis*, après 16 à 17 heures d'incubation.

La Figure 14 montre l'image microscopique du transfert du motif de « *swarming* » sur le disque de silicium. Le transfert est particulièrement réussi ici puisque les irisations présentes ne masquent que l'extrémité d'une seule dendrite. La colonie mère est visible au

centre du motif et les dendrites se sont bien développées à partir de celle-ci. Contrairement à d'autres transferts de motif, l'anneau de surfactines n'est pas visible sur cette image.

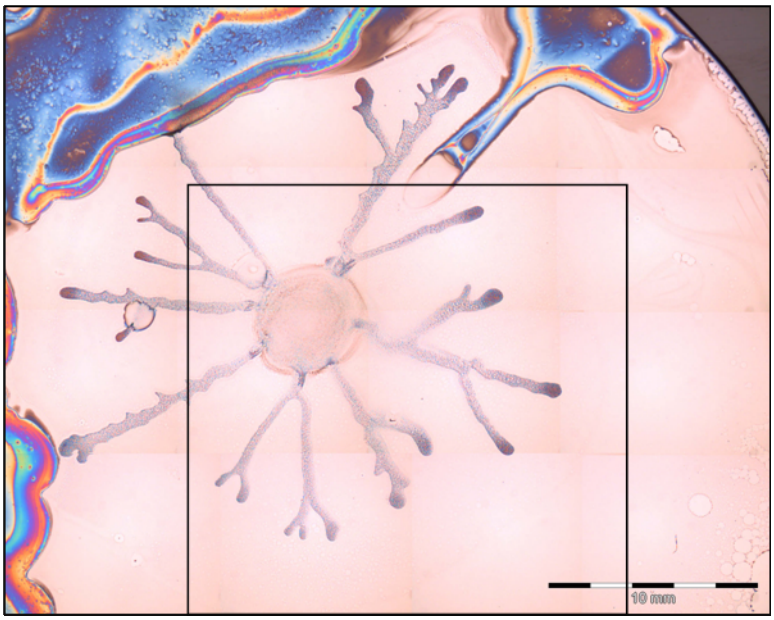


Figure 14: Image microscopique du transfert d'un motif de « *swarming* » de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Le carré noir représente la zone analysée en imagerie ToF-SIMS.

Le carré noir représente la zone de 23 x 23 mm^2 qui a été analysée en imagerie ToF-SIMS. Le spectre de masse de la région analysée ainsi que l'image ionique correspondant à la somme des surfactines sont présentés à la Figure 15 :

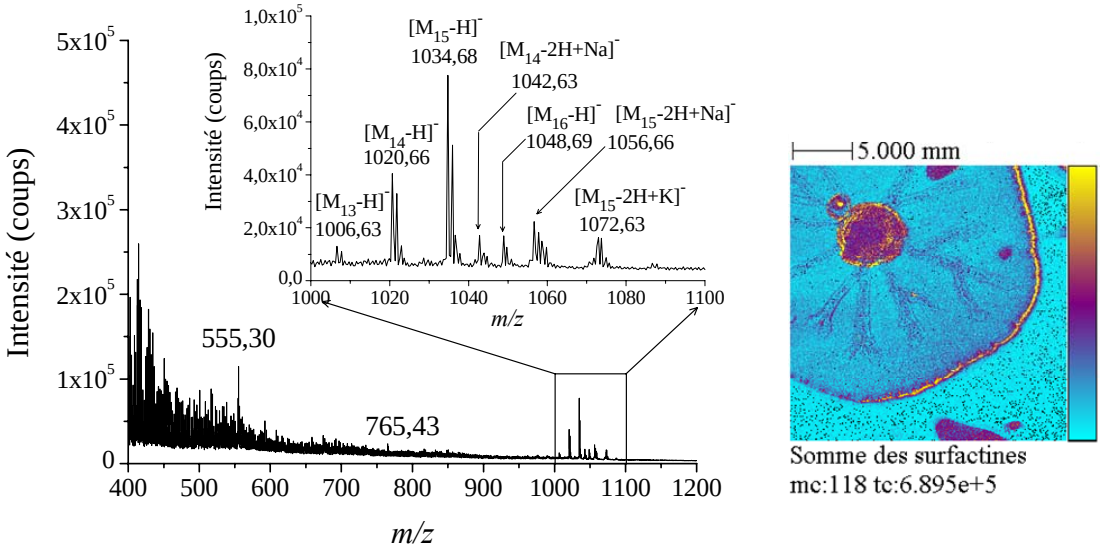


Figure 15: Spectre ToF-SIMS de la région analysée et image ionique de la somme des surfactines, enregistrés en mode d'ionisation négatif (256 x 256 pixels, taille du pixel 90 x 90 µm^2, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^9 ions.cm^{-2}), d'après la référence 52.

Cette image a été obtenue en sélectionnant, sur le spectre total, les massifs isotopiques des ions correspondant aux molécules déprotonées (signaux aux rapports *m/z* 1006,63 ; 1020, 66 ; 1034,68 ; 1048,69), ainsi que les adduits avec le sodium (ions aux rapports *m/z* 1042,63, 1056,66) et avec le potassium (ion au rapport *m/z* 1072,63). Une image ionique a été obtenue pour chaque ion sélectionné et la somme de ces images donne la carte de densité ionique présentée à la Figure 15. Nous pouvons déduire de cette image les quantités relatives de surfactines présentes dans les différentes régions du motif. Les surfactines sont essentiellement présentes dans la colonie mère et dans l'anneau qui entoure le motif. Les ions des surfactines sont également détectés au niveau des dendrites, avec une intensité moindre que dans les deux zones précédentes. Enfin, entre les dendrites, l'intensité des signaux de surfactines est encore plus faible.

Grâce à cette image, montrant une grande partie de la colonie, nous avons démontré que les surfactines n'étaient pas réparties de façon homogène au sein du motif. Pour étudier cette distribution, nous avons extrait les spectres correspondant à différents points du motif à l'aide de ROIs (Figure 16). Afin de pouvoir comparer la quantité relative de surfactines présentes à la surface du motif de migration transféré, l'intensité des spectres a été normalisée par rapport à l'aire de la ROI la plus petite. Nous avons extrait les spectres correspondant à la colonie mère (contour rouge), à l'anneau (contour vert), à une dendrite (contour jaune) et à un espace entre les dendrites (contour bleu). Une ROI a également été dessinée en dehors du motif (contour rose), pour vérifier qu'aucun signal lié aux surfactines n'était détecté au-delà de l'anneau. Les spectres de masse correspondant aux quatre zones d'intérêt sont présentés aux Figures 16b à 16e. Dans la colonie mère (Figure 16b) et dans la dendrite (Figure 16c), des surfactines portant de courtes chaînes acyles (13 atomes de carbone) sont détectées. Inversement, dans l'anneau (Figure 16d) et dans l'espace entre l'extrémité des dendrites et l'anneau (Figure 16e), des surfactines portant de plus longues chaînes acyles (jusqu'à 16 atomes de carbone) sont observées. Les surfactines les plus hydrophobes sont celles portant les chaînes d'acide gras les plus longues (14 à 16 atomes de carbone). Ces molécules pourraient être libérées de façon préférentielle par la colonie mère, leur permettant de se disperser plus loin que les surfactines portant des chaînes plus courtes. Nous avons déposé une goutte d'une solution de surfactines commerciales sur un milieu gélosé identique à celui utilisé pour les cultures, et nous avons observé que les surfactines à plus longues chaînes se propageaient le plus loin. Lors de la migration, les surfactines à plus courtes chaînes (13 à 15

atomes de carbone) pourraient rester associées aux bactéries, s'accumulant dans la colonie mère ou avec les cellules migrantes.

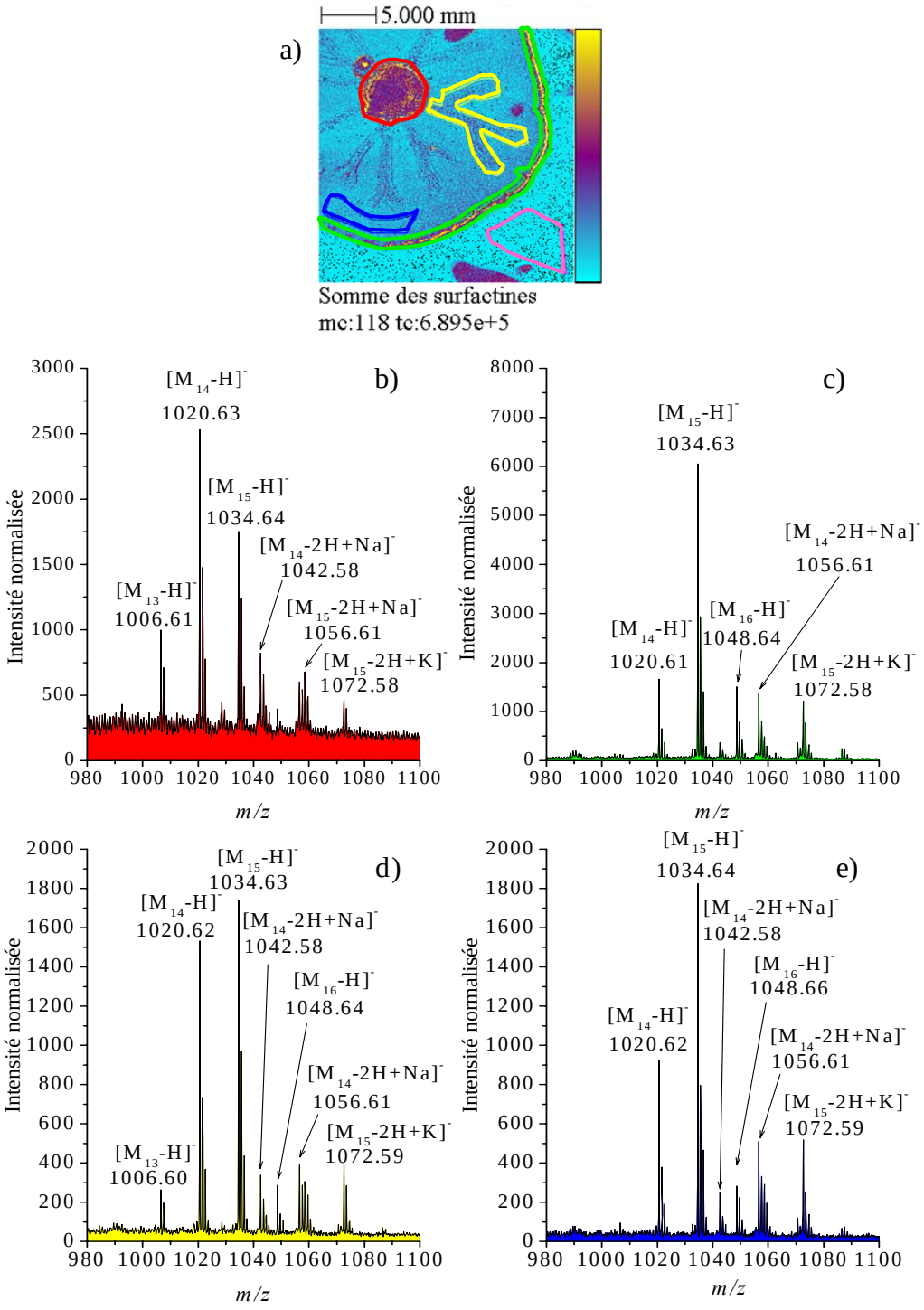


Figure 16: Spectres extraits des différentes ROIs, a) Image ionique de la somme des surfactines présentant l'emplacement des ROIs ; b) Spectre extrait de la ROI correspondant à la colonie mère ; c) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'anneau ; d) Spectre extrait de la ROI correspondant à une dendrite ; e) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'espace entre les dendrites (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^9 ions.cm^{-2}), d'après la référence 52.

La distribution des espèces de surfactines est donc inhomogène au sein du profil de migration de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis*. Une différence au niveau de l'intensité des signaux apparaît clairement sur l'image de la Figure 15, et a été confirmée avec les spectres extraits des différentes ROIs. Le signal le plus intense est obtenu pour l'anneau, le plus faible est obtenu pour l'intérieur de la dendrite d'une part et pour l'espace entre l'extrémité des dendrites et l'anneau d'autre part. Enfin, un niveau de surfactines intermédiaire est observé dans la colonie mère. Nous avons voulu obtenir une analyse semi-quantitative plus fine et pour cela, nous avons tracé des profils, qui sont la représentation de l'intensité des surfactines en fonction de la distance, en suivant différents axes sur le motif transféré (Figure 17).

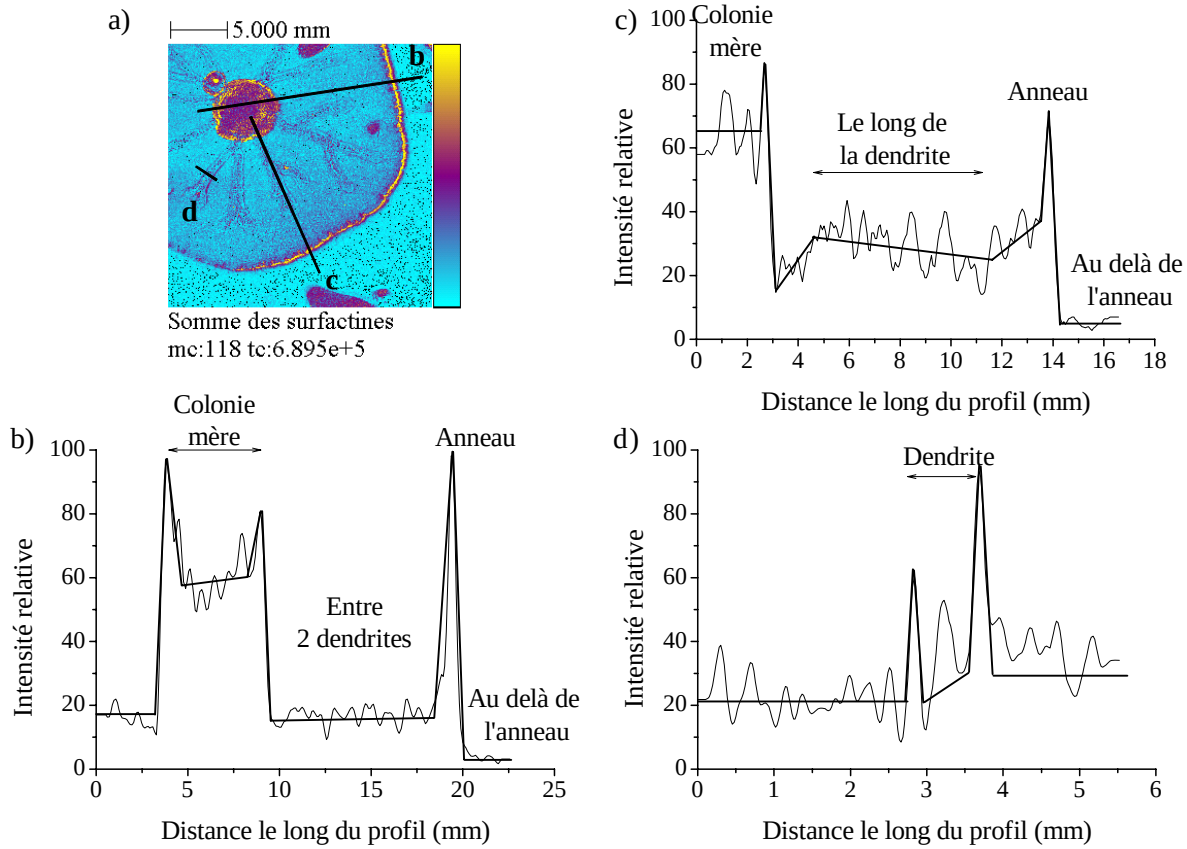


Figure 17: Profils de surfactines selon trois axes, a) Image de la somme des surfactines sur laquelle sont dessinés les axes utilisés pour déterminer les profils présentés en b, c et d ; b) de la colonie mère à l'anneau entre deux dendrites ; c) de la colonie mère à l'anneau, en passant par une dendrite ; d) coupe transversale d'une dendrite., d'après la référence 52.

Bien que les intensités des profils ne puissent être comparées entre elles, nous pouvons tout de même déduire de ces profils que les quantités les plus importantes de surfactines sont détectées en bordure de la colonie mère et dans l'anneau (Figures 17b et 17c). En revanche,

au niveau des dendrites, l'intensité chute fortement. À la Figure 17b, nous voyons que l'intensité des surfactines est quasiment constante entre deux dendrites jusqu'à atteindre l'anneau. De plus, l'intensité des surfactines en bordure de la colonie mère est comparable à celle dans l'anneau. A la Figure 17c, qui correspond à un profil établi en passant par l'intérieur d'une dendrite, l'intensité des ions de surfactines est inférieure à celle de la colonie mère ou de l'anneau et apparaît comme décroissante, de la base de la dendrite vers son extrémité. Le troisième profil (Figure 17d) est une coupe transversale d'une dendrite et confirme que les surfactines sont plus abondantes en bordure de la dendrite qu'à l'intérieur de celle-ci.

Nous pouvons donc conclure que la localisation des surfactines n'est pas homogène dans l'ensemble de la colonie (Figure 15), que la distribution des espèces de surfactines n'est pas homogène non plus (Figure 16) et que les quantités de surfactines ne sont pas identiques en fonction des régions du motif (Figure 17). Nous avons voulu approfondir ces résultats en enregistrant des images à plus haute définition, c'est-à-dire avec une taille de pixel plus faible, afin d'étudier la localisation exacte des surfactines à l'intérieur et autour des dendrites. Nous avons donc acquis des images de 500 x 500 μm^2, composées de 256 x 256 pixels, donnant une taille de pixel de 2 x 2 μm^2, le long d'une dendrite. La Figure 18 montre l'image microscopique de la dendrite analysée. Bien que peu visible, l'anneau de surfactines est présent et est indiqué par les flèches :

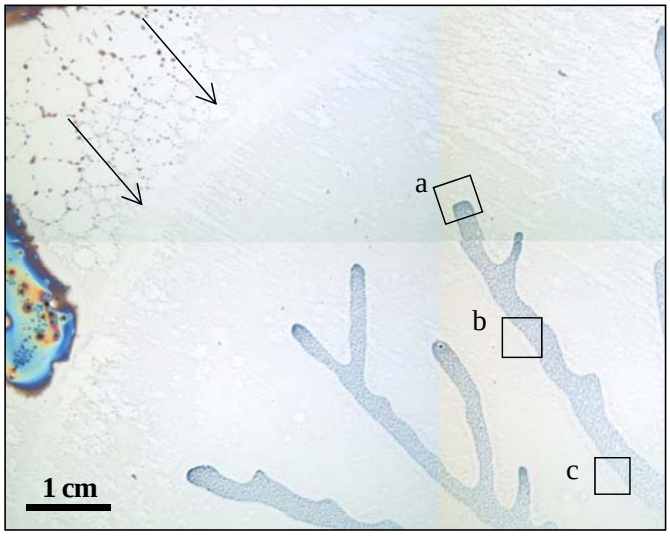


Figure 18: Image microscopique de la dendrite choisie, issue d'une colonie de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Les carrés noirs indiquent les régions analysées en imagerie. Les flèches désignent l'anneau de surfactines.

Les carrés noirs, notés a, b et c représentent les zones de 500 x 500 µm^2 à l'intérieur desquelles des images ont été acquises, de l'extrémité de la dendrite jusqu'à sa base. Les images de la somme des surfactines correspondant à ces zones sont présentées à la Figure 19 :

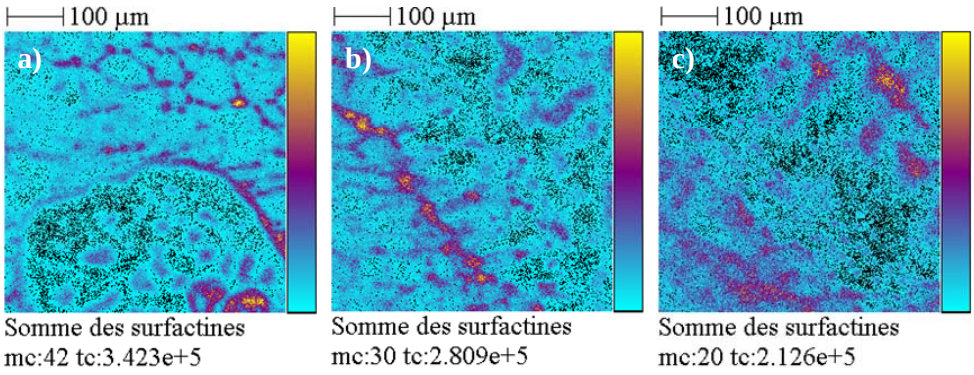


Figure 19: Images ioniques de la somme des surfactines enregistrées à l'extrémité de la dendrite (a) ; à mi-chemin entre la base et son extrémité (b) ; à sa base (c) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

La Figure 19a confirme que les surfactines sont présentes en bordure de la dendrite, comme le laissait supposer la Figure 17d. A l'intérieur de la dendrite, le signal des ions des surfactines est moins intense (certaines zones sont noires) bien que des « spots » de surfactines soient clairement distingués. A la Figure 19b, la « bordure de surfactines » est toujours visible, mais le signal des surfactines à l'intérieur de la dendrite (partie droite de l'image) est moins intense. Enfin, à la Figure 19c, il devient difficile de distinguer la limite entre l'intérieur et l'extérieur de la dendrite et la bordure visible sur les deux précédentes images a disparu. Il semble que les surfactines soient présentes à l'intérieur et à l'extérieur de la dendrite. Ceci est cohérent avec la structure de la dendrite à sa base, que l'on peut voir à la Figure 20:

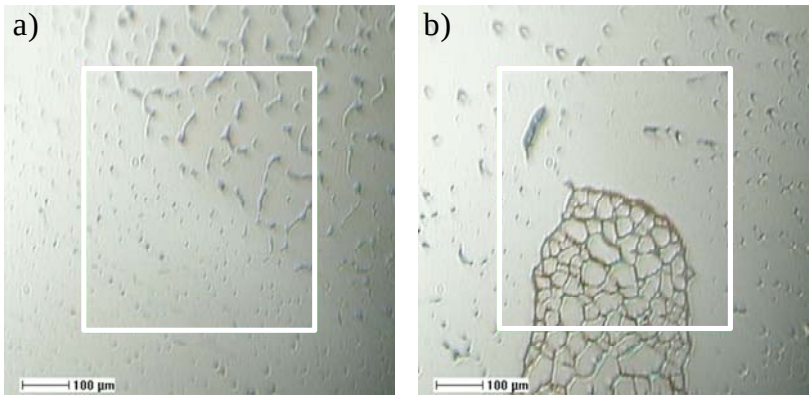


Figure 20: Images enregistrées avec la caméra du spectromètre, a) à la base de la dendrite ; b) à son extrémité. Les carrés blancs indiquent la zone qui a été analysée.

Les expériences d'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS sur des motifs de migration de la souche domestique 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* nous permettent d'apporter de nouvelles informations. Nous avons localisé les surfactines au sein d'une colonie. Nous savons à présent qu'elles sont présentes non seulement dans l'anneau, ce que nous savions avant le début de l'étude en ToF-SIMS, mais aussi dans la colonie mère, et dans les dendrites. Par ailleurs, les résultats obtenus sur le motif entier, comme sur la dendrite ou encore les profils confirment que les surfactines sont situées sur le pourtour des dendrites. Nous avons également démontré que la distribution des différentes espèces de surfactines n'est pas homogène au sein du motif, et que les surfactines à plus longues chaînes sont retrouvées préférentiellement dans l'anneau tandis que celles à courtes chaînes sont situées dans la colonie mère ou les dendrites. La quantité de surfactines varie également d'une région à une autre du motif. En effet, les surfactines sont plus abondantes dans l'anneau et la colonie mère que partout ailleurs.

Bien que les surfactines représentaient la cible principale de notre travail, nous avons détecté au cours de ces expériences deux autres composés, minoritaires par rapport aux surfactines, aux rapports *m/z* 555,30 et 765,43. Leurs localisations sont particulièrement intéressantes, puisque ces composés sont essentiellement détectés dans deux anneaux concentriques à celui des surfactines, comme le montre la Figure 21 :

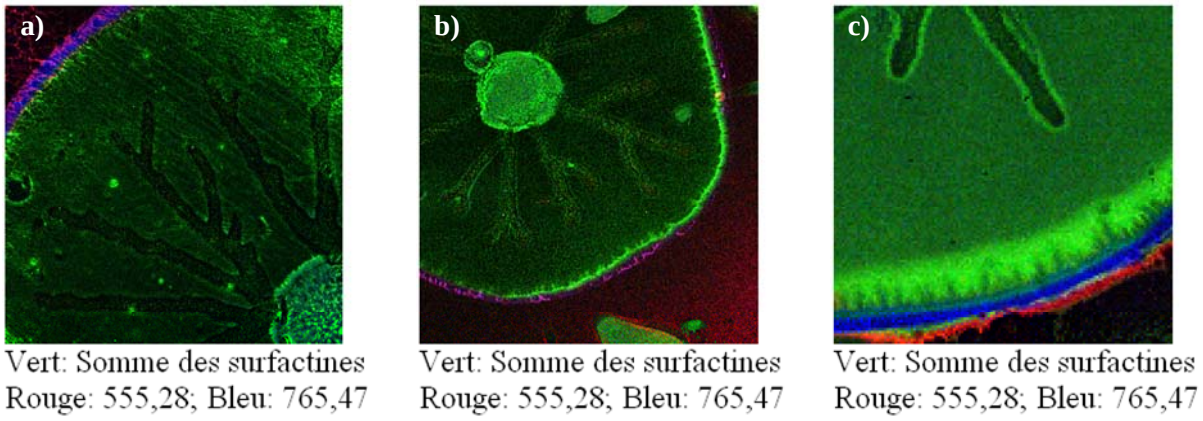


Figure 21: Superpositions en trois couleurs des images ioniques de la somme des surfactines (en vert), de l'ion au rapport *m/z* 555,28 (en rouge) et de l'ion au rapport *m/z* 765 (en bleu) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) et c) 2 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 10^9 ions.cm^{-2}).

Ces deux composés peuvent être co-localisés, c'est le cas à la Figure 21b, ou présents dans deux anneaux absolument distincts, comme à la Figure 21c. Dans ce cas, nous avons toujours observé que l'anneau formé par les surfactines est celui de plus petit diamètre, suivi de

l'anneau formé par l'ion au rapport *m/z* 765,43 et enfin, celui le plus à l'extérieur du motif est celui formé par l'ion au rapport *m/z* 555,28. Néanmoins, les images de ces deux composés ne se superposent jamais avec celle de la somme des surfactines. Ces composés, s'ils sont détectés sous forme d'ions $[M-H]^-$, ont des poids moléculaires de 556,2 uma et 766,48 uma respectivement mais n'ont pas encore été identifiés.

Par ailleurs, aucun de ces composés n'est détecté sur le spectre de masse d'une solution commerciale de surfactines (Figure 22a). Ceci est vrai quelle que soit la technique employée (ToF-SIMS, MALDI-TOF ou nanoESI-LTQ Orbitrap).

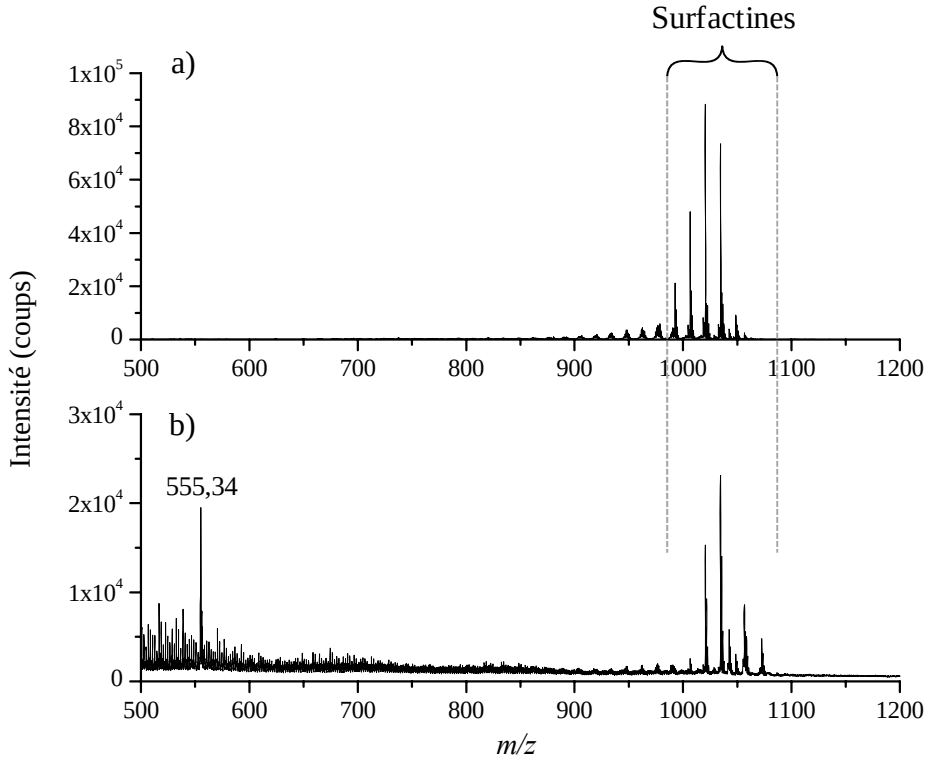


Figure 22: Spectres de masse ToF-SIMS, enregistrés en mode d'ionisation négatif, a) sur une goutte de solution de surfactines commerciales déposée sur un disque de silicium ; b) sur un transfert d'une goutte de solution de surfactines commerciales déposée à la surface de la gélose vierge (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 4,1 x 10^{10} ions.cm^{-2}, b) 4,9 x 10^9 ions.cm^{-2}).

Lorsqu'une goutte de solution de surfactines commerciales est déposée sur de la gélose vierge, laissée à s'étaler pendant une heure et qu'un transfert sur disque de silicium est effectué, l'ion à m/z 555,34 est détecté (Figure 22b). Par conséquent, cet ion n'est peut être pas directement impliqué dans la migration des bactéries à la surface de la gélose. En revanche, l'ion de rapport *m/z* 765,4 n'est détecté dans aucune de ces expériences. Sa relation directe avec le processus d'essaimage semble par conséquent plus certaine.

3.2.3 Étude de motifs de « *swarming* » de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* (3610)

Les résultats présentés dans ce paragraphe ont tous été obtenus à partir de colonies de la souche sauvage (3610) de *Bacillus subtilis*, après 16 à 17 heures d'incubation. Nous avons tout d'abord réalisé une image à grande échelle, pour déterminer la localisation des surfactines dans le motif de migration de cette souche puis nous avons acquis des images de plus petite taille pour étudier plus en détails la répartition des surfactines, notamment au niveau des dendrites.

La Figure 23 montre l'image microscopique du transfert du motif de « *swarming* » sur un disque de silicium. La migration de la souche naturelle est très différente de celle de la souche mutante 168 *sfp*$^+$. Les dendrites formées sont de plus petite taille et se détachent moins nettement de la colonie mère. Sur cette image, l'anneau entourant la colonie est clairement visible.

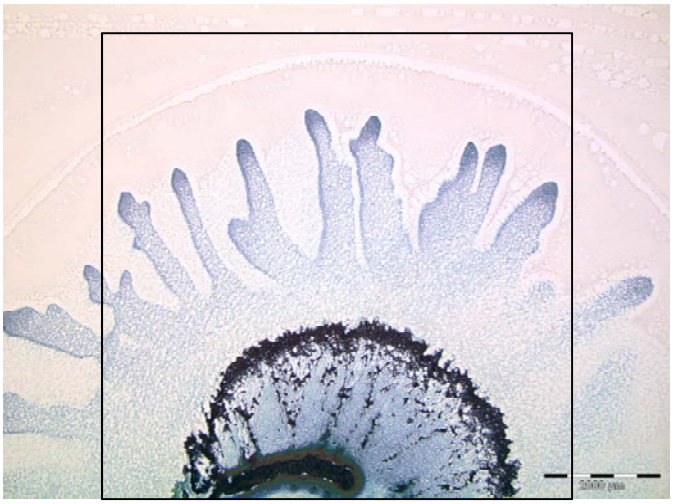


Figure 23: Image microscopique du transfert d'un motif de swarming de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Le carré noir de 8,5 x 8,5 mm^2 représente la zone analysée en imagerie ToF-SIMS.

La Figure 24 présente l'image ionique des surfactines enregistrée sur le transfert de motif de la Figure 23 :

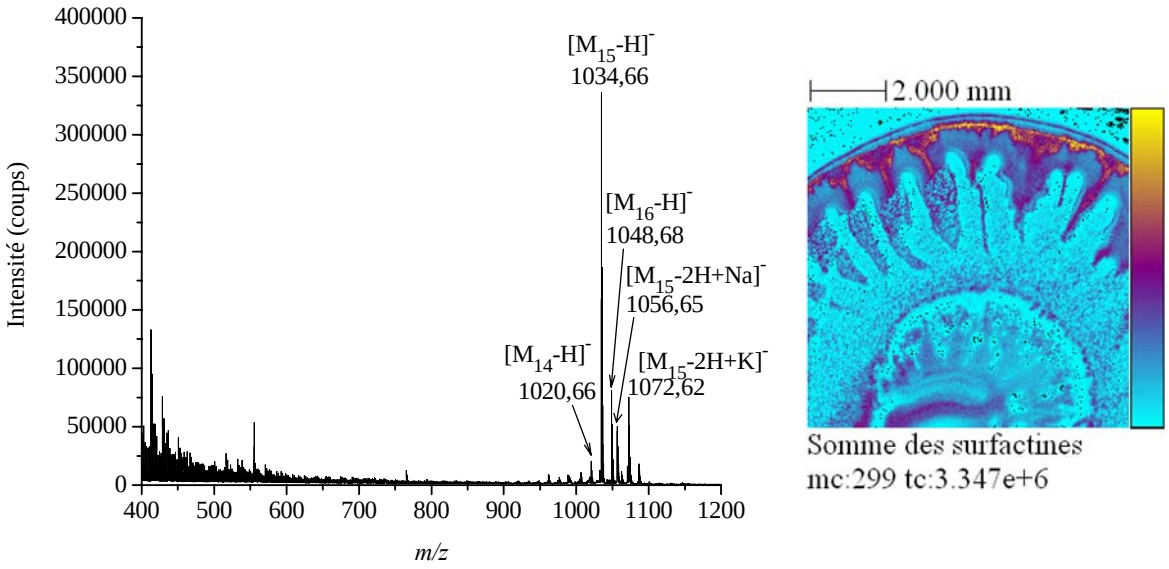


Figure 24: Spectre ToF-SIMS de la région analysée et image ionique de la somme des ions des surfactines enregistrés en mode d'ionisation négatif (256 x 256 pixels, taille du pixel 33 x 33 µm^2, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,57 x 109 ions.cm^{-2}).

La localisation des surfactines obtenue pour la souche naturelle est comparable à celle de la souche domestique puisqu'elles sont localisées dans la colonie mère et dans l'anneau entourant la colonie et que leur signal délimite la forme des dendrites. Afin de vérifier s'il existe une disparité dans la nature des espèces de surfactines détectées en fonction de la zone du motif analysée, nous avons extrait les spectres de ROIs correspondant à l'anneau et à la colonie mère de ce motif de migration (Figure 25) :

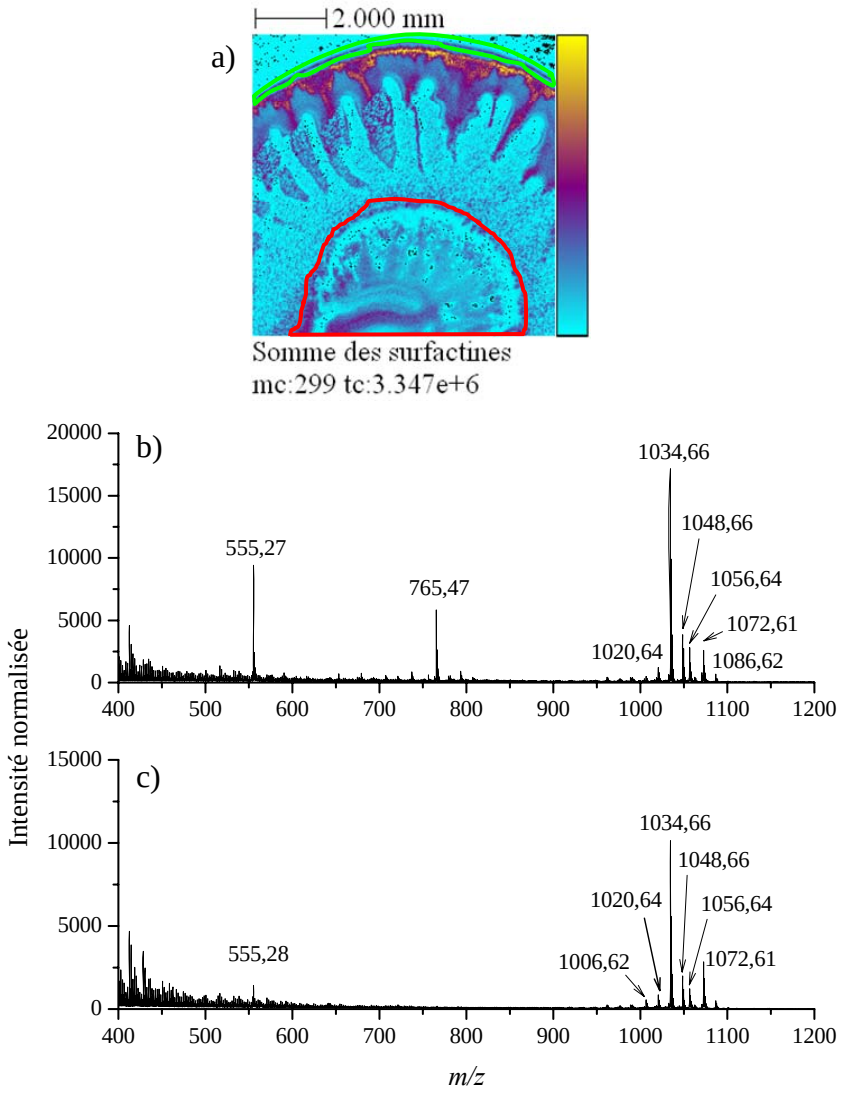


Figure 25: a) Image ionique de la somme des ions des surfactines présentant l'emplacement des ROIs ; b) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'anneau ; c) Spectre extrait de la ROI correspondant à la colonie mère (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,57 x 10^9 ions.cm^{-2}).

Les spectres de masse de la Figure 25 nous informent que les espèces de surfactines détectées dans les deux zones du motif sont les mêmes, la surfactine majoritaire étant celle portant 15 atomes de carbone sur la chaîne acyle. Par ailleurs, ces spectres montrent que les surfactines sont plus abondantes dans l'anneau que dans la colonie mère. Ce résultat est en accord avec ce que nous avions déjà observé pour la souche de laboratoire. De plus, les composés aux rapports *m/z* 555,27 et 765,47 sont détectés de façon non négligeable sur le spectre de l'anneau.

La Figure 26 présente les images superposées en trois couleurs, de ces composés et de la somme des surfactines :

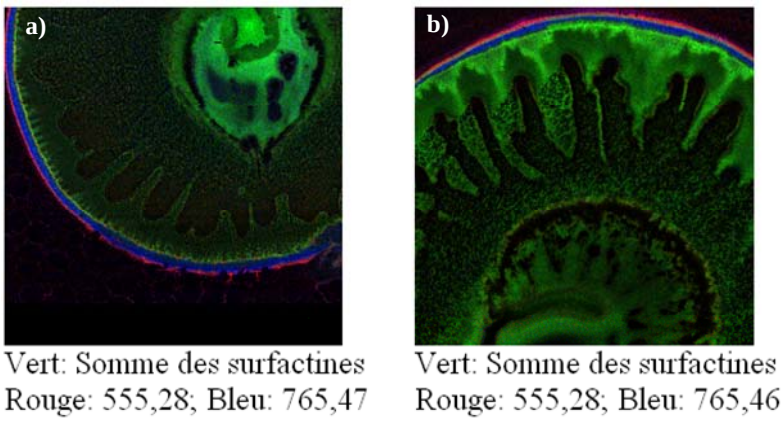


Figure 26: Superpositions en trois couleurs des images ioniques de la somme des surfactines (en vert), de l'ion au rapport *m/z* 555,28 (en rouge) et de l'ion au rapport *m/z* 765,47 (en bleu) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 2,6 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 6,57 x 10^9 ions.cm^{-2}).

Comme pour la souche de laboratoire, nous observons une répartition de ces composés dans deux anneaux concentriques à celui des surfactines.

Nous avons poursuivi l'étude de la souche naturelle de *Bacillus subtilis* par l'analyse détaillée d'une dendrite. La Figure 27 montre la répartition des surfactines le long de la dendrite analysée :

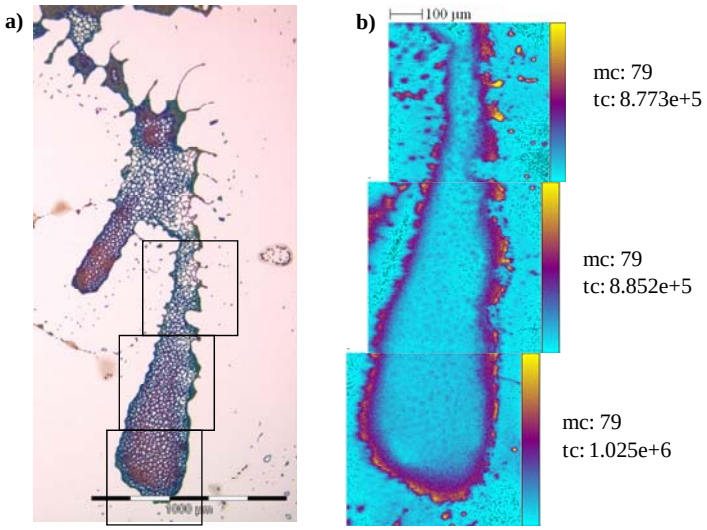


Figure 27: a) Image microscopique de la dendrite analysée issue d'une colonie de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Les carrés noirs indiquent les zones analysées en imagerie ToF-SIMS ; b) Images ioniques de la somme des ions des surfactines enregistrées le long de la dendrite en mode d'ionisation négatif. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5,1 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les surfactines sont localisées dans le pourtour de la dendrite. Cette bordure est « continue » tout au long de la dendrite, ce qui n'était pas le cas pour la souche 168 *sfp*$^+$. Il apparaît également que cette « bordure de surfactines » est plus épaisse pour la souche naturelle que pour la souche de laboratoire.

3.2.4. Étude de motifs de « *swarming* » de diverses souches mutantes de *Bacillus subtilis*

L'étude par imagerie ToF-SIMS de motifs de migration des souches domestique et sauvage de *Bacillus subtilis* a montré que la sécrétion des surfactines est similaire pour les deux souches, du point de vue de la localisation des surfactines, de la distribution des espèces observées et des quantités relatives au sein de la colonie. Ces expériences ont également permis de détecter deux composés de plus faible poids moléculaire dont les localisations sont particulièrement intéressantes. Nos collaborateurs microbiologistes disposent de souches génétiquement modifiées et nous avons cherché à savoir si certains gènes mutés, impliqués dans des altérations des capacités à produire un phénomène d'essaimage, pouvaient également être impliqués dans la synthèse de ces composés.

3.2.4.1. Effets des mutations sur le processus d'essaimage

La Figure 28 montre les différentes étapes du « *swarming* » et à quel moment les différentes mutations interrompent le processus :

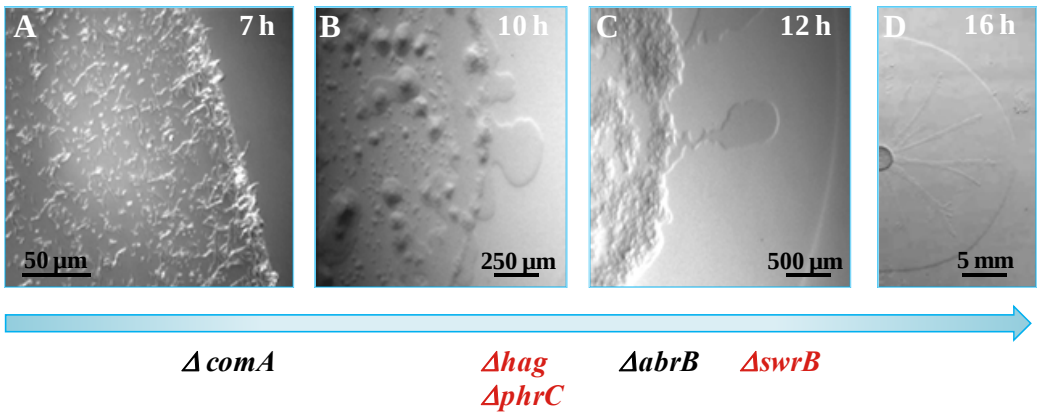


Figure 28: Évolution du processus de « *swarming* » au cours du temps. Les noms des souches sous les photographies précisent les moments auxquels les différentes mutations de la souche *168 sfp*$^+$ interrompent la migration (d'après Simone Séror, communication privée).

Les différentes étapes du processus de migration ont été détaillées au paragraphe 1.1.2 de ce chapitre et nous ne les rappellerons pas ici. Les souches mutantes présentées dans le Tableau 1 présentent toutes des comportements différents. La production de surfactines de la souche 168 *sfp*$^+$ *Δcom*A est fortement réduite et aucun bourgeon ni aucune dendrite ne se forme. La migration se fait selon un front uniforme pendant quelques temps puis s'arrête. La souche 168 *sfp*$^+$ *Δhag* ne synthétise pas la flagelline, protéine essentielle pour l'essaimage. Néanmoins, les surfactines sont synthétisées et s'étalent loin devant la colonie mère. La migration est arrêtée tôt dans sa progression et aucune dendrite n'est formée. La souche 168 *sfp*$^+$ *ΔphrC* dépasse la formation des bourgeons avec des dendrites commençant profondément à l'intérieur de la colonie mère. Le « *swarming* » de la souche 168 *sfp*$^+$ *ΔabrB* est bloqué très précocement mais forme les bourgeons. Enfin, pour la souche 168 *sfp*$^+$ *ΔswrB*, la formation des bourgeons est normale mais les dendrites formées sont courbées et leur croissance stoppe rapidement.

3.2.4.2. Imagerie ToF-SIMS de colonies de souches mutantes

Nous avons enregistré des spectres en mode d'ionisation négatif sur des colonies des souches mutantes de *Bacillus subtilis* après transfert sur disque de silicium (Figure 29) :

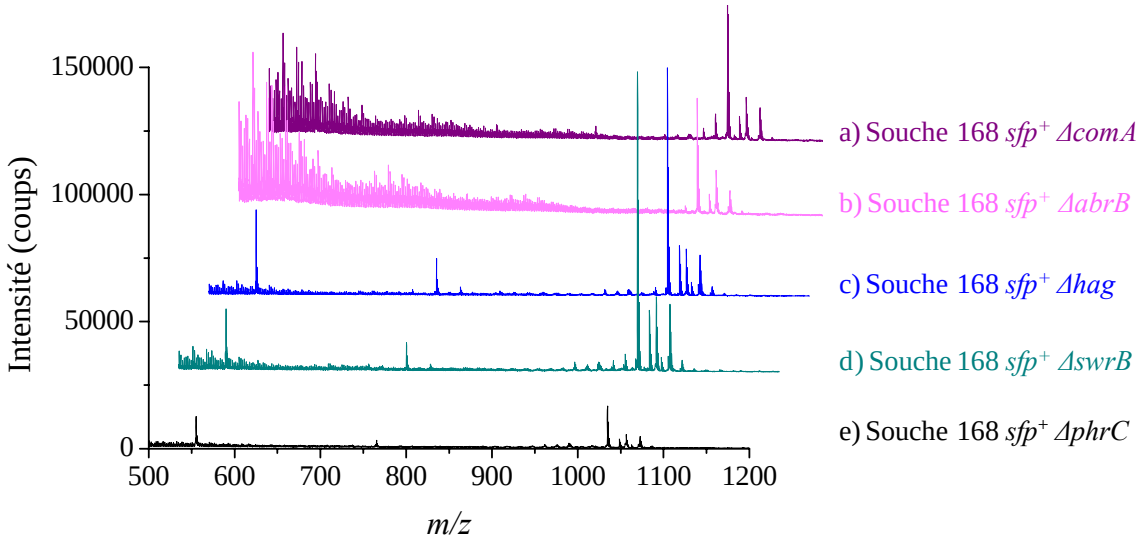


Figure 29: Spectres enregistrés en mode d'ionisation négatif sur différents transferts de colonies de souches mutantes de *Bacillus subtilis* (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 2 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 3,5 x 10^9 ions.cm^{-2}, c) et d) 1,7 x 10^{10} ions.cm^{-2}, e) 3 x 10^9 ions.cm^{-2}).

Les spectres de masse de la Figure 29 montrent que quelle que soit la souche mutante étudiée, les signaux des surfactines sont présents ce qui signifie que toutes les souches les sécrètent. Les différences apparaissent au niveau des composés aux rapports *m/z* 555,3 et 765,4 qui ne sont pas détectés sur les spectres des souches 168 *sfp*$^+$ *Δcom*A et 168 *sfp*$^+$ *ΔabrB.* Par conséquent, soit ces souches ne sécrètent pas ces composés soit elles ne les sécrètent pas suffisamment pour être observables sur un spectre de massse ToF-SIMS. De plus, le bruit de fond présent dans la gamme de rapports *m/z* qui nous intéresse est très important et gène leur observation. Il est donc possible que les mutations génétiques des souches 168 *sfp*$^+$ *Δcom*A et 168 *sfp*$^+$ *ΔabrB* soient responsables de l'absence de ces composés.

Pour les souches dont le spectre présente les signaux aux rapports *m/z* 555,3 et 765,4, les intensités relatives des trois types de composés (555,2 ; 765,4 et surfactines) sont les mêmes quelle que soit la souche considérée. Les surfactines sont les composés majoritaires, puis le composé au rapport *m/z* 555,3 puis celui au rapport *m/z* 765,4.

Nous avons également enregistré des images ioniques des transferts de colonies de ces souches mutantes. La Figure 30 présente les images enregistrées pour les souches sécrétant les composés non identifiés.

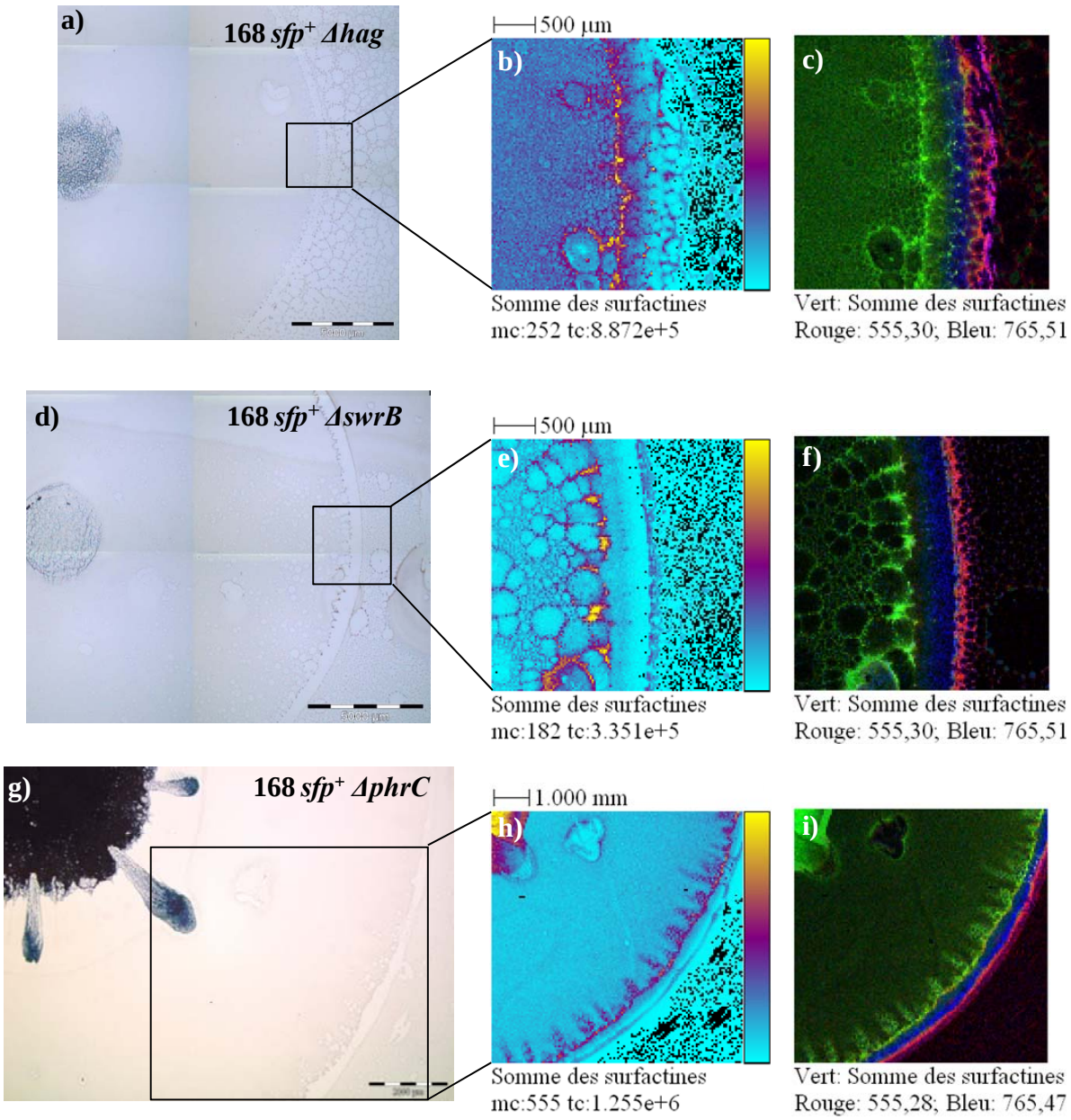


Figure 30: a), d) et g) Images microscopiques des transferts des colonies des souches 168 *sfp*$^+$ *Δhag*, 168 *sfp*$^+$ *ΔswrB* et 168 *sfp*$^+$ *ΔphrC* respectivement ; b), e) et f) Images ioniques de la somme des ions des surfactines pour les mêmes souches ; c), f) et i) Superpositions en trois couleurs de la somme des surfactines et des signaux aux rapports *m/z* 555,3 et 765,4 pour les mêmes souches (Taille des images : b) et e) 3 x 3 mm^2, h) 7 x 7 mm^2, 128 x 128 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : b) et e) 1,7 x 10^{10} ions.cm^{-2}, h) 3 x 10^9 ions.cm^{-2}).

Comme nous l'avions observé pour les souches domestique et sauvage, les composés aux rapports *m/z* 555,3 et 765,4 sont localisés dans deux anneaux concentriques à celui des surfactines. L'ordre dans lequel les anneaux sont observés est également le même : les surfactines forment l'anneau de plus petit diamètre et l'ion au rapport *m/z* 555,3 forme

l'anneau de plus grand diamètre. Il n'y a pas superposition de l'anneau de surfactines avec celui de l'ion au rapport *m/z* 765,4. En revanche, une superposition est systématiquement observée pour les deux autres anneaux.

Ces résultats montrent que pour deux souches mutantes, les pics des composés non identifiés ne sont pas retrouvés sur les spectres enregistrés sur le transfert de la colonie bactérienne sur disque de silicium. Ceci pourrait être interprété comme un effet des mutations subies par ces souches. Néanmoins, ces expériences, contrairement à celles réalisées sur les souches de laboratoire et sauvage, n'ont été menées qu'une seule fois. Ces résultats doivent par conséquent être vérifiés et les expériences répétées avant de pouvoir conclure définitivement.

Si l'identification des éventuels gènes impliqués dans la synthèse de ces composés est importante, leur identification structurale l'est également. Pour cela, il est nécessaire de disposer de ces molécules dans des quantités suffisantes pour permettre leur purification et leur analyse par des techniques analytiques comme la RMN et la spectrométrie de masse tandem. L'équipe de Jamal Ouazzani a donc entrepris une synthèse de ces composés en cultivant en milieu liquide, les souches domestique et sauvage de *Bacillus subtilis*. Malheureusement, les composés inconnus n'ont pas été, contrairement aux surfactines, détectés dans le milieu de culture des bactéries. Une autre stratégie a alors été mise en place. Il s'agit de réaliser les migrations non plus dans des boites de Petri de 9 cm de diamètre, mais sur des boites carrées de 25 cm de côté. Ainsi, après une étape d'adaptation du protocole au nouveau support menée en collaboration avec l'équipe de Simone Séror, il est possible de faire migrer des bactéries sur des surfaces plus grandes. L'hypothèse est qu'en augmentant la surface disponible pour les bactéries, celles-ci sécrètent une quantité plus importante de ces composés inconnus. Pour l'instant, ces migrations sur plaque de 25 x 25 cm^2 n'ont pas encore permis l'identification de ces composés, mais ces travaux sont toujours en cours à l'heure actuelle.

3.3. Apport de l'analyse quantitative par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La Figure 31 montre les positions auxquelles les carottages ont été effectués sur un motif migratoire schématisé ci-dessous :

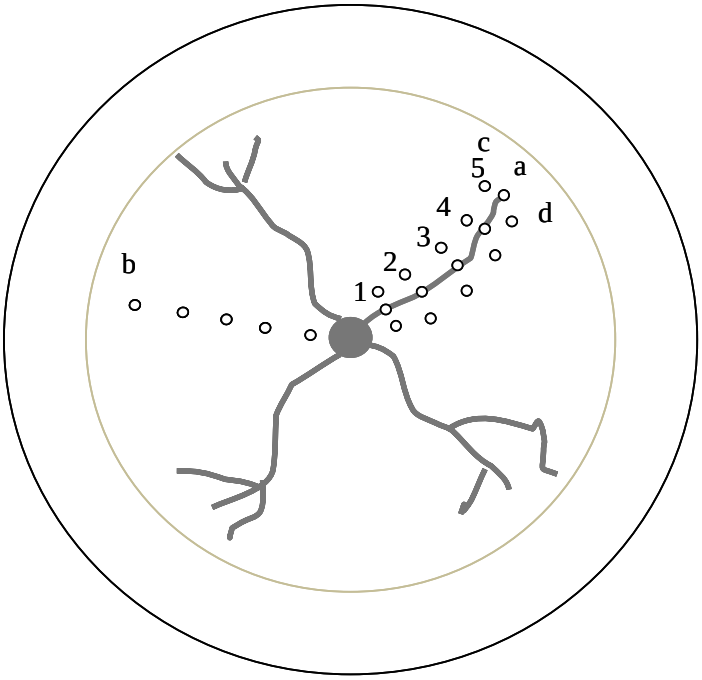


Figure 31: Schéma d'un motif migratoire montrant les positions auxquelles ont été effectués les carottages, d'après la référence 52.

La Figure 32 présente les valeurs moyennes de concentration en surfactine avec une chaîne acyle à 15 atomes de carbone, pour les échantillons prélevés à l'intérieur d'une dendrite, entre deux dendrites et de part et d'autre d'une dendrite.

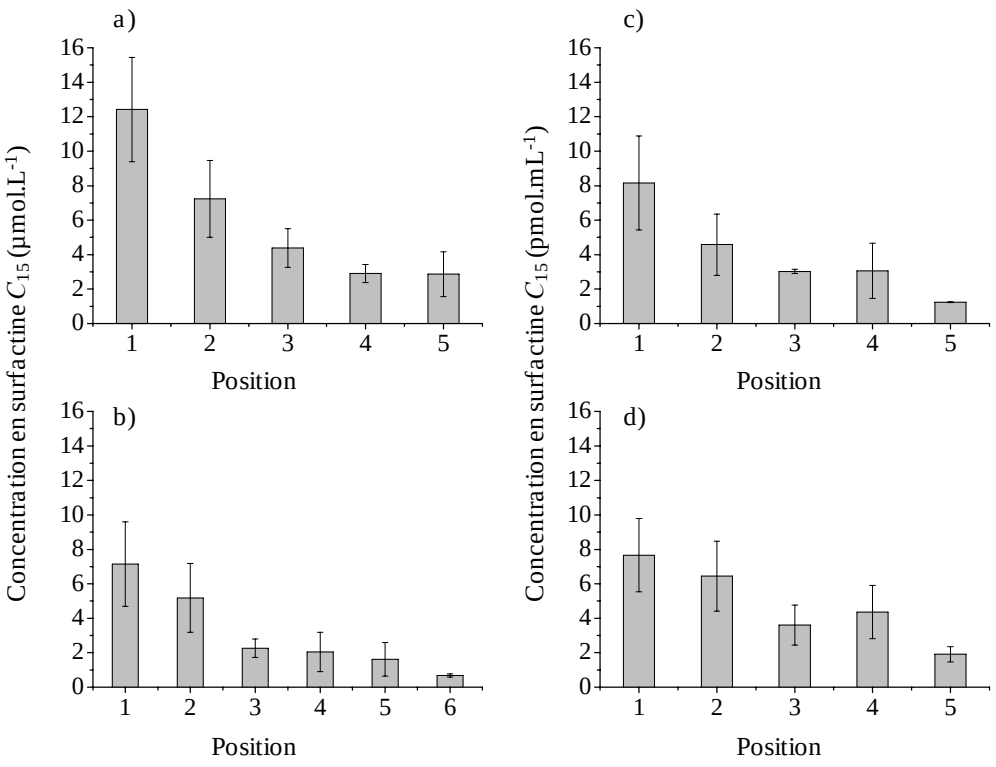


Figure 32: Valeurs moyennes de concentration en surfactine avec une chaîne acyle à 15 atomes de carbone, pour les échantillons prélevés à l'intérieur d'une dendrite (a) ; entre deux dendrites (b) ; à gauche d'une dendrite (c) ; à droite d'une dendrite (d). Les positions vont du centre du motif (1) jusqu'à l'extrémité de la boîte (n), d'après la référence 52.

Les valeurs d'écart type sont importantes, probablement à cause de la méthode manuelle de prélèvement des échantillons. Ces résultats montrent que la quantité de surfactine-C_{15} diminue d'un facteur 4 à 10 selon les différents axes, du centre vers l'extérieur de la colonie. La quantité la plus importante de surfactine-C_{15} est trouvée, comme le laissait supposer les résultats d'imagerie, dans la colonie mère, avec une concentration d'environ 400 µmol.L^{-1} dans les échantillons prélevés. Dans les dendrites, la concentration est de 10 µmol.L^{-1} à leurs bases, chutant à 2 µmol.L^{-1} à leurs extrémités. Notre analyse quantitative apporte la preuve qu'il existe un gradient de surfactine-C_{15} (qui peut probablement être extrapolé aux autres espèces de surfactines), diminuant de la colonie mère vers la périphérie de la communauté.

De façon surprenante, de larges fluctuations ont été observées dans les résultats obtenus pour les échantillons provenant de l'anneau, rendant la quantification difficile. En effet, la quantité de surfactine détectée était toujours très faible, autour de 2 µmol.L^{-1}. Cette valeur est inattendue aux vues des résultats obtenus en imagerie ToF-SIMS, ce qui suggère que l'extraction des surfactines pourrait être inefficace sur les échantillons prélevés dans cette région. Une explication plausible peut être donnée en ces termes : les surfactines pourraient

être présentes dans l'anneau sous forme d'un complexe non soluble dans l'éthanol, mais qui se trouverait dissocié lors du processus d'ionisation SIMS, expliquant la grande quantité de surfactines détectées par cette technique dans l'anneau. Une autre hypothèse peut être avancée : le transfert sur disque de silicium représente un type d'extraction totalement différent de celle pratiquée avec l'éthanol, il se pourrait donc que le transfert sur disque de silicium soit plus efficace à extraire les surfactines dans cette zone que ne l'est l'éthanol sur des échantillons issus de carottages.

4. Conclusions et Perspectives

Dans cette étude des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* lors du processus d'essaimage, les qualités de la spectrométrie de masse et de l'imagerie ToF-SIMS ont été mises à profit. En effet, le but de l'étude qualitative était de localiser les différentes espèces de surfactines au sein d'un motif de « *swarming* » La spectrométrie de masse ToF-SIMS nous a permis de déterminer la distribution des espèces de surfactines et l'imagerie, grâce à l'excellente résolution spatiale du ToF-SIMS, a permis de localiser ces différentes espèces au sein d'un motif de migration, après transfert de celui-ci sur un disque de silicium.

Ce travail, réalisé sur les souches domestique et sauvage de *Bacillus subtilis* a fourni des informations nouvelles sur les composés sécrétés par les bactéries durant une migration de surface. Deux composés, dont les poids moléculaires supposés ne correspondent à aucun métabolite secondaire de la famille des *Bacilli*, ont été détectés et semblent liés au processus de migration. Pour s'en assurer, nous avons travaillé sur des souches mutantes afin d'observer d'éventuelles différences de sécrétion de ces composés par des bactéries dont le génome a été volontairement modifié. Deux d'entre elles semblent ne pas sécréter ces composés. Cette observation devra cependant être confirmée lors de nouvelles expériences.

Par ailleurs, et ceci constitue les perspectives de ce travail, une biosynthèse à grande échelle de ces composés est en cours afin d'obtenir suffisamment de matériel pour mener une caractérisation structurale complète. Une fois identifiés, et si ces composés n'ont effectivement jamais été décrits, leurs activités biologiques seront testées afin, dans un premier temps, de comprendre leur implication dans le processus d'essaimage puis éventuellement, d'en faire des molécules d'intérêt pharmaceutique par exemple.

Références bibliographiques :

[1] M.E. Shirtliff, J.T. Mader and A.K. Camper. Molecular Interactions in Biofilms. *Chem. Biol*. **2002**; 9(8), 859.

[2] G. O'Toole, H.B. Kaplan and R. Kolter. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol*. **2000**; 54, 49.

[3] J. Palmer, S. Flint and J. Brooks. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. **2007**; 34(9), 577.

[4] P. Stoodley, K. Sauer, D.G. Davies and J.W. Costerton. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*. **2002**; 56, 187.

[5] J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol*. **1995**; 49, 711.

[6] K.K. Jefferson. What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett*. **2004**; 236(2), 163.

[7] R. Zuo. Biofilms: strategies for metal corrosion inhibition employing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. **2007**; 76(6), 1245.

[8] J.W. Costerton, P.S. Stewart and E.P. Greenberg. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* **1999**; 284(5418), 1318.

[9] P.K. Singh, A.L. Schaefer, M.R. Parsek, T.O. Moninger, M.J. Welsh and E.P. Greenberg. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*. **2000**; 407(6805), 762.

[10] T.S. Murray, M. Egan and B.I. Kazmierczak. *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr. Opin. Pediatr*. **2007**; 19(1), 83.

[11] R.M. Donlan. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis*. **2001**; 7(2), 277.

[12] A.S. Lynch and G.T. Robertson. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu. Rev. Med*. **2008**; 59, 415.

[13] R.M. Harshey and T. Matsuyama. Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **1994**; 91(18), 8631.

[14] O. Rauprich, M. Matsushita, C.J. Weijer, F. Siegert, S.E. Esipov and J.A. Shapiro. Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *J. Bacteriol*. **1996**; 178(22), 6525.

[15] T. Matsuyama, Y. Takagi, Y. Nakagawa, H. Itoh, J. Wakita and M. Matsushita. Dynamic aspects of the structured cell population in a swarming colony of *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol*. **2000**; 182(2), 385.

[16] R. Belas, R. Schneider and M. Melch. Characterization of *Proteus mirabilis* precocious swarming mutants: identification of rsbA, encoding a regulator of swarming behavior. *J. Bacteriol*. **1998**; 180(23), 6126.

[17] B.V. Jones, E. Mahenthiralingam, N.A. Sabbuba and D.J. Stickler. Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *J. Med. Microbiol*. **2005**; 54(9), 807.

[18] K.A. Bisset. The zonation phenomenon and structure of the swarm colony in *Proteus mirabilis*. *J. Med. Microbiol*. **1973**; 6(4), 429.

[19] M. Matsushita. *Formation of colony patterns by a bacterial cell population*. in: J. Shapiro, M. Dwarkin. *Bacteria as Multicellular Organisms*, Oxford University, New York, **1997**; 367.

[20] N.H. Mendelson and B. Salhi. Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *J. Bacteriol.* **1996**; 178(7), 1980.

[21] R. Rudner, O. Martsinkevich, W. Leung and E.D. Jarvis. Classification and genetic characterization of pattern-forming *Bacilli*. *Mol. Microbiol.* **1998**; 27(4), 687.

[22] D. Julkowska, M. Obuchowski, I.B. Holland and S.J. Séror. Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: detection of cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology*. **2004**; 150(6), 1839.

[23] D.B. Kearns and R. Losick. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2003**; 49(3), 581.

[24] D. Julkowska, M. Obuchowski, B.I. Holland and S.J. Séror. Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J. Bacteriol.* **2005**; 187(1), 65.

[25] Y. Sakuragi and R. Kolter. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **2007**; 189(14), 5383.

[26] M.J. Kirisits and M.R. Parsek. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities? *Cell. Microbiol*. **2006**; 8(12), 1841.

[27] M.R. Parsek and E.P. Greenberg. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol*. **2005**; 13(1), 27.

[28] V. Norris, T.D. Blaauwen, R.H. Doi, R.M. Harshey, L. Janniere, A. Jimenez-Sanchez, D.J Jin, P.A. Levin, E. Mileykovskaya, A. Minsky, G. Misevic, C. Ripoll, M. Saier, J.K. Skarstad and M. Thellier. Toward a Hyperstructure Taxonomy. *Annu. Rev. Microbiol*. **2007**; 61, 309.

[29] E. Lahaye, T. Aubry, N. Kervarec, P. Douzenel and O. Sire. Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? I. Biochemical and functional properties of the extracellular matrix. *Biomacromolecules*. **2007**; 8(4), 1218.

[30] E. Lahaye, T. Aubry, V. Fleury and O. Sire. Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? II. Viscoelasticity and water balance during swarming. *Biomacromolecules.* **2007**; 8(4), 1228.

[31] G. Hauser and M.L. Karnovsky. Studies on the production of glycolipide by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*. **1954**; 68(6), 645.

[32] J.M. Bonmatin, O. Laprévote and F. Peypoux. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **2003**; 6(6), 541.

[33] K. Arima, A. Kakinuma and G. Tamura. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1968**; 31(3), 488.

[34] F. Peypoux, J.M. Bonmatin and J. Wallach. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**; 51(5), 553.

[35] F. Peypoux, J.M. Bonmatin, H. Labbe, B.C. Das, M. Ptak and G. Michel. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7]surfactin. *Eur. J. Biochem*. **1991**; 202(1), 101.

[36] H. Itokawa, T. Miyashita, H. Morita, K. Takeya, T. Hirano, M. Homma and K. Oka. Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis natto*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1994**; 42(3), 604.

[37] M. Kowall, J. Vater, B. Kluge, T. Stein, P. Franke and D. Ziessow. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. *J. Colloid. Interface Sci*. **1998**; 204(1), 1.

[38] Y. Kameda, S. Kanatomo and Y. Saito. A contact antitumor activity of *Bacillus natto* on solid type Ehrlich carcinoma cells. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1968**; 16(1), 186.

[39] Y. Kameda, K. Matsui, H. Kato, T. Yamada and H. Sagai. Antitumor activity of *Bacillus natto*. 3. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1972**; 20(7), 1551.

[40] Y. Kameda, S. Oira, K. Matsui, S. Kanatomo and T. Hase. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1974**; 22(4), 938.

[41] D. Vollenbroich, G. Pauli, M. Ozel and J. Vater. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **1997**; 63(1), 44.

[42] L. Beven and H. Wroblewski. Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Res. Microbiol*. **1997**; 148(2), 163.

[43] D. Vollenbroich, M. Ozel, J. Vater, R.M. Kamp and G. Pauli. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*. **1997**; 25(3), 289.

[44] O.S. Weislow, R. Kiser, D.L. Fine, J. Bader, R.H. Shoemaker and M.R. Boyd. New soluble-formazan assay for HIV-1 cytopathic effects: application to high-flux screening of synthetic and natural products for AIDS-antiviral activity. *J. Natl. Cancer Inst*. **1989**; 81(8), 577.

[45] K. Hosono and H. Suzuki. Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1983**; 36(6), 679.

[46] V. Leclère, R. Marti, M. Béchet, P. Fickers and P. Jacques. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* **2006**; 186(5), 475.

[47] P. Roepstorff and J. Fohlman. Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass-spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom*. **1984**; 11(11), 601.

[48] K. Biemann. *In* "Methods in Enzymology". J.A. McCloskey Ed. Academic Press, London, **1990**; 455.

[49] N. Hue, L. Serani and O. Laprévote. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high-energy tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. **2001**; 15(3), 203.

[50] I.S. Gilmore and M.P. Seah. Electron flood gun damage in the analysis of polymers and organics in time-of-flight SIMS. *Appl. Surf. Sci.* **2002**; 187(1-2), 89.

[51] I.S. Gilmore and M.P. Seah. Investigating the difficulty of eliminating flood gun damage in TOF-SIMS. *Appl. Surf. Sci.* **2003**; 203-204, 600.

[52] D. Debois, K. Hamzé, V. Guérineau, J.P. Le Caër, I.B. Holland, P. Lopez, J. Ouazzani, S.J. Séror, A. Brunelle and O.Laprévote. *In situ* localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry. *Proteomics*, **2008**, 8(18), 3682.

Chapitre V

Miscellanées

Le dernier chapitre de ce manuscrit décrit les résultats de trois sujets dont les résultats n'ont pas répondu à toutes nos attentes ou dont l'interprétation biologique n'a pu être effectuée. Le premier sous-chapitre traite d'une étude lipidomique par imagerie ToF-SIMS du système nerveux de la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis*. Le deuxième sous-chapitre sera consacré à l'analyse de cheveux de momies chinoises, retrouvées après un enfouissement de 2 500 ans dans le désert du Taklamakan (Chine). Enfin, ce dernier chapitre sera clôturé par les résultats obtenus lors de l'analyse par imagerie ToF-SIMS d'une coupe de corps entier de souris.

I. Etude lipidomique de la régénération nerveuse de la sangsue médicinale

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec Karim Arafah et Maxence Wisztorski, de l'équipe de Michel Salzet (Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Université des Sciences et Technologies de Lille). Les expériences d'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS n'ont été réalisées qu'une fois, les résultats sont par conséquent préliminaires et nécessitent d'être approfondis lors d'une nouvelle série d'expériences.

1. Introduction

Les troubles de la mémoire, qui touchent à divers degrés de sévérité de 1 à 2% de la population, peuvent être très invalidants pour les personnes qui en souffrent. En France, près de 800 000 personnes sont atteints de la maladie d'Alzheimer et 100 000 de la maladie de Parkinson. La maladie d'Alzheimer est la première cause des démences après 75 ans. C'est une pathologie qui va de pair avec le vieillissement de la population et qui pose un problème majeur de santé publique. Les signes histopathologiques de la maladie sont l'accumulation extracellulaire de plaques séniles dont le cœur est composé du peptide β-amyloïde et un enchevêtrement intracellulaire de neurofibrilles composées d'une forme anormalement

phosphorylée de la protéine tau. A l'heure actuelle, les possibilités de traitement restent très limitées, même si certain d'entre eux (mémantine) permettent une véritable amélioration de la qualité de vie des patients, notamment dans les activités quotidiennes. Une des difficultés vient du diagnostic de la maladie. Actuellement, celui-ci est d'abord clinique et posé à l'aide d'un ensemble de critères (qui font l'objet d'un consensus international) identifiés à l'issue d'un entretien et d'un examen clinique et neuropsychologique. L'imagerie peut éventuellement être utilisée pour mettre en évidence une atrophie hippocampale ou globale et surtout éliminer les autres causes de démence. Ces critères ne sont cependant pas applicables aux stades précoces de la maladie, dits pré-démentiels. Or l'enjeu du diagnostic se situe au stade précoce et ce, pour au moins 3 raisons :

- ✓ inscrire les patients dans une filière de prise en charge adaptée,
- ✓ débuter le plus tôt possible un traitement par des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase dont l'effet bénéfique est d'autant plus marqué qu'il est mis en place précocement,
- ✓ anticiper les futurs enjeux thérapeutiques.

De plus, quel que soit le traitement, celui-ci doit être administré le plus tôt possible. Or, les médecins savent que les lésions spécifiques de la maladie d'Alzheimer apparaissent en grande quantité bien avant les symptômes cliniques. La mise en évidence d'un marqueur diagnostique, facilement détectable et qui refléterait les lésions spécifiques de la maladie avant que n'apparaissent les destructions sévères et irréversibles, paraît particulièrement importante.

Dans ce cadre, une des pistes intéressantes est celle des lipides dont l'implication dans la pathogenèse de la maladie a clairement été établie.[1,2] Le cerveau étant l'organe où le cholestérol est le plus abondant, de nombreuses équipes ont travaillé sur la relation entre cholestérol et maladie d'Alzheimer. Il a ainsi été démontré que l'hypercholestérolémie est un facteur de risque,[3] que le cholestérol augmentait la production de certaines enzymes en rapport avec le peptide β-amyloïde[4] et que le taux de cholestérol dans le cerveau augmentait dans les premiers stades de la maladie.[5] Une autre classe lipidique semble intimement liée à la progression de la maladie : les sphingolipides (*cf.* Annexe 3). Contrairement au cholestérol, la sphingomyéline diminue la production de peptide β-amyloïde en inhibant son enzyme de sécrétion.[6] Malgré cela, certaines études ont montré que le profil des gangliosides (une sous-

classe des sphingolipides) est fortement altéré dans des cerveaux atteints par la maladie.[7] Par exemple, le monosialo-ganglioside (GM1) est le composé naturel le plus efficace pour augmenter la production de peptide β-amyloïde[8] et il formerait un complexe avec ce dernier qui servirait de base pour la formation des fibrilles.[9] D'autres changements dans la concentration relative de certains lipides comme les éthanolamines plasmalogènes, les sulfatides (cérébrosides sulfatés) ou les céramides ont également été rapportés.[1,10]

Nombre de ces études ont été menées sur des cerveaux humains *post mortem*, par conséquent la définition d'un modèle permettant l'étude de la pathogenèse *in vivo* est fondamentale. Le modèle choisi par nos collaborateurs est la sangsue médicinale *Hirudo medicinalis.* Son système nerveux constitue un modèle privilégié en neurobiologie et de nombreuses études portant sur le comportement, les connexions synaptiques[11,12] ou les fonctions des canaux ioniques[13,14,15] ont été menées. Ces travaux ont abouti à une connaissance très précise de la structure du système nerveux de la sangsue.

Le système nerveux d'*H.medicinalis* est segmenté. Il est composé d'une chaîne de 21 ganglions reliés entre eux par deux connectifs inter-ganglionnaires formés de fibres nerveuses. La chaîne nerveuse est ventrale et enfermée dans un sinus sanguin couvert par une capsule fibreuse contenant, au niveau des connectifs, des fibres musculaires contractiles.

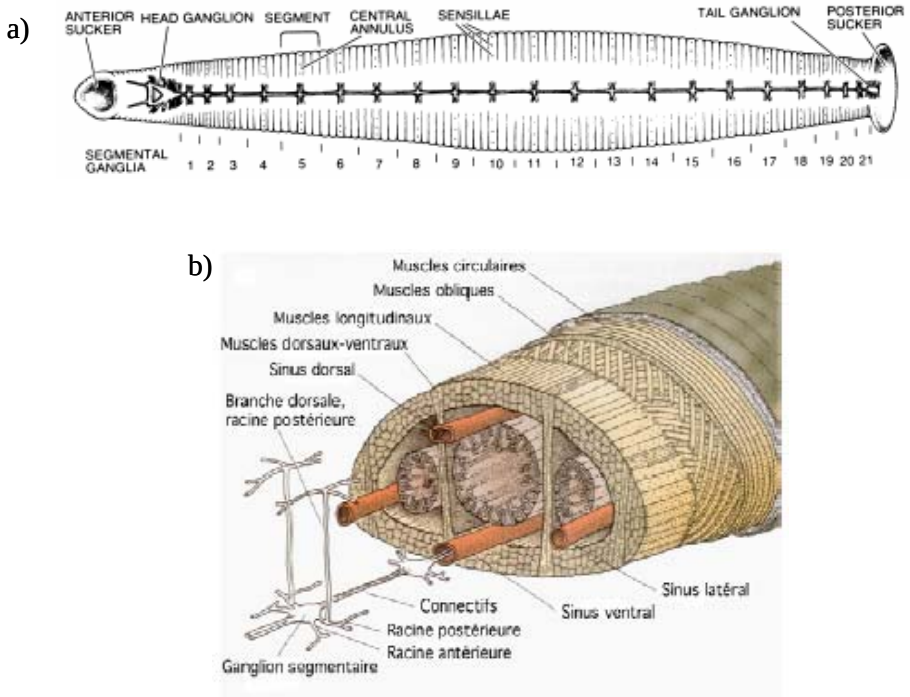


Figure 1: a) Anatomie de la chaîne nerveuse (face ventrale) ; b) Coupe transversale d'*Hirudo medicinalis.*

Chaque ganglion contient six paquets cellulaires renfermant différents types de neurones. La chaîne nerveuse est également riche en cellules microgliales dont l'action est encore mal connue chez la sangsue mais qui sembleraient jouer le rôle de cellules immunitaires.

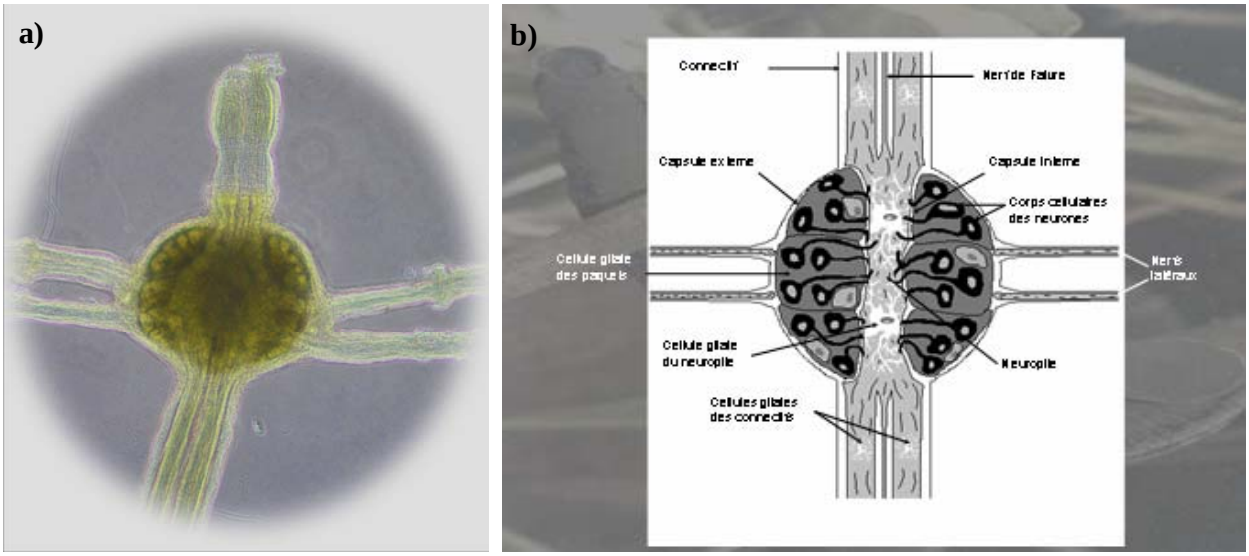


Figure 2: a) Photographie d'un ganglion segmentaire prélevé et mis en culture, b) Schéma d'un ganglion segmentaire.

Le système nerveux de la sangsue présente l'avantage d'être facilement accessible. En outre, il possède la capacité de se régénérer suite à une blessure, ce qui n'est pas le cas des cellules nerveuses du système nerveux central (SNC) de mammifères.[16,17] Cette propriété est particulièrement intéressante et permet l'étude des mécanismes de régénération, dans lesquels le système cannabinoïde serait impliqué. En effet, des résultats récents obtenus chez l'homme montrent que le système cannabinoïde est activé au cours d'une inflammation du SNC et que l'anandamide (*N*-arachidonoyléthanolamine, neurotransmetteur dérivé de l'acide arachidonique) protège les neurones de dommages inflammatoires. Il limiterait ainsi les dégâts liés à une stimulation trop forte des cellules microgliales lors d'une blessure induite par incubation de N-méthyl-D-aspartate (NMDA).[18] Or chez la sangsue, les composés du système cannabinoïde (anandamide, 2-arachidonoyl-glycérol, *N*-arachidonylphosphatidyléthanolamine, *N*-palmitoyléthanolamine et *N*-linolenoyléthanolamine) ont été retrouvés dans le système nerveux.[19] De plus, de précédentes études ont montré que l'injection de lipopolysaccharides (potentiels agents immunologiques et neuronaux) à des sangsues provoque la synthèse d'anandamide au bout de 24 à 48 heures après l'injection.[20] Ce résultat suggère que l'anandamide joue un rôle dans les mécanismes de modulation de la réponse inflammatoire chez cet animal. Ce modèle semble donc approprié

pour entreprendre des recherches sur les mécanismes de régénération neuronale afin d'en tirer bénéfice pour la lutte contre les maladies neurodégénératives chez l'homme.

Le manque de marqueur diagnostique pour la maladie d'Alzheimer rend capitale la recherche sur les mécanismes de dégénérescence et de régénération neuronale. Il apparaît donc important de fournir à la communauté médicale des critères de diagnostic de la maladie applicables au début de celle-ci, avant que n'apparaissent la perte d'autonomie et le syndrome démentiel. Dans ce contexte, différentes voies de recherche sont possibles. Nos collaborateurs ont opté pour la recherche et l'identification de lipides impliqués dans les mécanismes de régénération du système nerveux chez la sangsue suite à une lésion. Dans un second temps, les molécules identifiées seraient testées sur des modèles cellulaires et animaux afin de déterminer le potentiel thérapeutique de ceux-ci. L'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS a permis d'obtenir un aperçu global du contenu lipidique de la chaîne nerveuse d'une sangsue ayant subi une lésion. Une étude cinétique a été menée pour suivre l'évolution de ce contenu lipidique au cours de la régénération nerveuse de la sangsue.

2. Protocole expérimental

Les échantillons de sangsues ont été préparés par nos collaborateurs. En quelques mots, les sangsues sont anesthésiées dans de l'éthanol dilué puis lésées localement au niveau de leur chaîne nerveuse. Les animaux sont ensuite sacrifiés au cours du processus de régénération. Les chaînes nerveuses sont alors récupérées et congelées. Des coupes de 12 µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat et déposées sur un support en acier inox.

Toutes les images enregistrées sur les différentes coupes de ganglions, d'une taille de 500 x 500 μm^2 et composées de 256 x 256 pixels, ont été acquises en mode négatif et en utilisant systématiquement l'« *electron floodgun* », avec une fluence d'ions primaires (Bi_3^+) de 1,5 x 10^{11} ions.cm^{-2}.

Pour améliorer leur contraste, les images ont été comprimées à un nombre de pixels de 128 x 128 pixels et filtrées selon la procédure décrite aux paragraphes VI.6 et VI.7. de l'introduction générale de ce manuscrit.

3. Résultats

Des images ont été enregistrées sur des ganglions de sangsues après différents temps de régénération. Le ganglion témoin est un ganglion qui a été disséqué et congelé tout de suite après avoir lésé la chaine nerveuse. Le temps de régénération est donc nul. Deux autres ganglions ont été analysés, l'un ayant été disséqué et congelé après 6 heures de régénération et l'autre après 24 heures.

Grâce à l'imagerie ToF-SIMS, nous avons pu obtenir le profil lipidique global de chaque ganglion et les comparer afin d'observer quels lipides étaient concernés par une modification de concentration relative au cours du processus de régénération. Nous nous sommes pour l'instant intéressés aux variations les plus significatives, et nous avons reconstruit les images ioniques correspondant à ces composés. Il s'agit de l'acide oléique (*m/z* 281), de l'acide stéarique (*m/z* 283) et du phosphatidylinositol 38 :4 (*m/z* 885). La Figure 3 présente les images ioniques de ces composés.

Dans le ganglion témoin, l'acide oléique et l'acide stéarique ne présentent pas tout à fait la même localisation, l'acide stéarique présentant une répartition plus homogène dans les paquets cellulaires. Après 6 heures de régénération, ces acides gras sont faiblement détectés au sein des paquets cellulaires. Après 24 heures de régénération, l'acide stéarique est essentiellement présent dans les neurones et les connectifs inter-ganglionnaires, alors que l'acide oléique s'accumule dans les paquets cellulaires et peu dans les connectifs.

L'image du phosphatidylinositol 38 :4 (PI38 :4) enregistrée sur le ganglion témoin est faiblement contrastée, d'autant plus que l'amplitude de l'échelle de couleur (*mc*) est faible, et il ne semble pas que ce composé possède une localisation particulière. Après 6h de régénération, il est détecté au niveau de certaines cellules proches du connectif qui relie le ganglion au ganglion antérieur à la zone de coupure. Après 24 heures de régénération, le PI38 :4 ne se localise plus que dans les cellules du paquet. On observe également que l'intensité des images associées à cet ion augmente au cours du processus de régénération, puisque d'un nombre de coups maximum de 3 pour le ganglion témoin, on passe à 7 pour le ganglion en régénération depuis 24 heures, et que la valeur de *tc*, le nombre total de coups pour cet ion dans l'image, est plus que doublée.

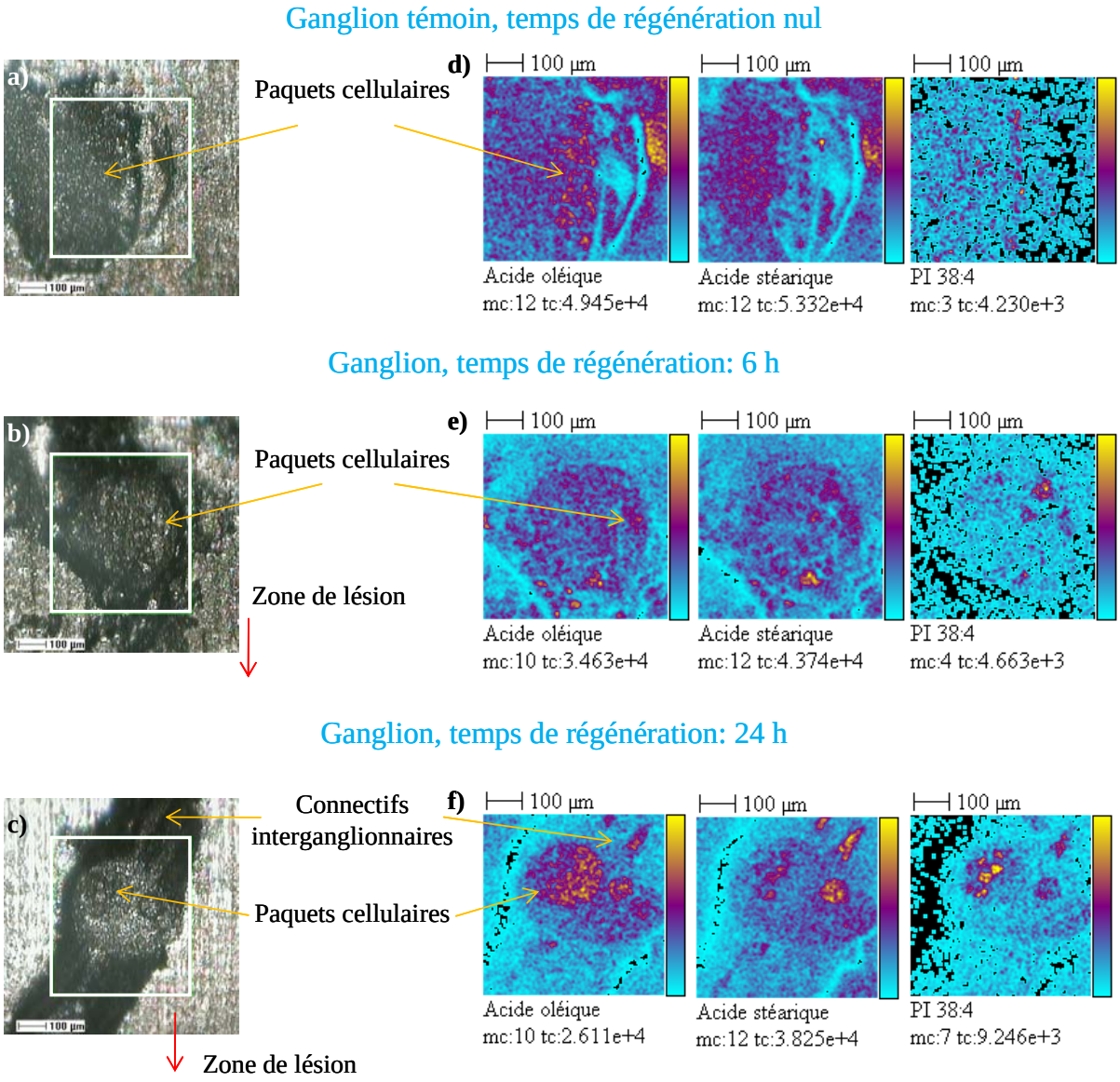


Figure 3: Images vidéo enregistrées avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée : a) pour le ganglion témoin , b) pour le ganglion après 6 heures de régénération ; c) pour le ganglion après 24 heures de régénérations ; Images ioniques de l'acide oléique, de l'acide stéarique et du phosphatidylinositol 38:4 ; d) pour le ganglion témoin ; e) pour le ganglion après 6 heures de régénération ; f) pour le ganglion après 24 heures de régénération (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,5 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Pour appuyer ces constatations, des superpositions en trois couleurs ont été réalisées et sont présentées à la Figure 4. L'acide oléique est représenté en rouge, l'acide stéarique en vert et le PI38 :4 en bleu. Il apparaît clairement que le PI38 :4 est rarement co-localisé avec les deux autres espèces lipidiques.

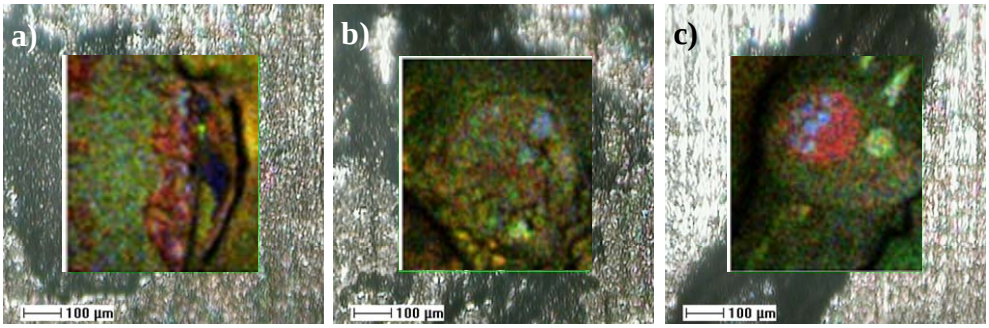


Figure 4: Superpositions en trois couleurs de l'acide oléique (en rouge), de l'acide stéarique (en vert) et du PI38:4 (en bleu), a) pour le ganglion témoin, b) pour le ganglion après 6 heures de régénération et c) pour le ganglion après 24 heures de régénération. Images de 500 x 500 μm^2.

Contrairement à ce qui aurait être pu être attendu, nous n'avons pas observé sur les spectres de masse ToF-SIMS, les signaux correspondant aux composés du système cannabinoïde. Peut être ceux-ci ne sont-ils pas encore produits par l'animal ou le sont-ils en trop faible quantité pour être détectés par notre technique d'imagerie.

Pour l'instant l'interprétation biologique de ces résultats n'est pas claire. Il a été démontré que les lipides et en particulier certains acides gras ont un rôle neuroprotecteur.[21,22] Leur détection au cours d'un processus de régénération nerveuse chez la sangsue semble donc logique. Néanmoins, ces expériences devront être reproduites avant de pouvoir réellement conclure sur la signification de ces résultats.

4. Conclusion

L'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS a permis de mettre en évidence des différences de profil lipidique dans des chaînes nerveuses en cours de régénération chez la sangsue *Hirudo medicinalis*. Les modifications d'intensité relative les plus significatives sont observées pour l'acide oléique, l'acide stéarique et un phosphatidylinositol. Ces expériences devront être renouvelées pour valider les différences de localisations observées pour ces trois espèces. De plus, il serait utile de s'intéresser aux modifications moins évidentes du profil lipidique afin d'être le plus exhaustif possible et de comprendre au mieux les implications moléculaires (même minimes) de la régénération nerveuse chez la sangsue.

II. Comparaison du contenu lipidique de cheveux anciens et modernes

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration conjointe avec le Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF / UMR 171) et la société L'Oréal. Ce partenariat a été mis en place avec Philippe Walter et Pascale Richardin pour le C2RMF et Philippe Hallégot pour la société L'Oréal.

1. Introduction

Contexte archéologique de l'étude

En 2001, la mission archéologique franco-chinoise du Xinjiang a découvert dans le désert du Taklamakan de nombreux vestiges qui fournissent une vision inédite des habitudes funéraires et des usages de produits cosmétiques à une période antérieure aux Han (-206 av. J.C. / 220 ap. J.C.) et à la colonisation chinoise, dans une région aride de montagnes et de déserts aux portes de l'Asie Centrale (Figure 1).

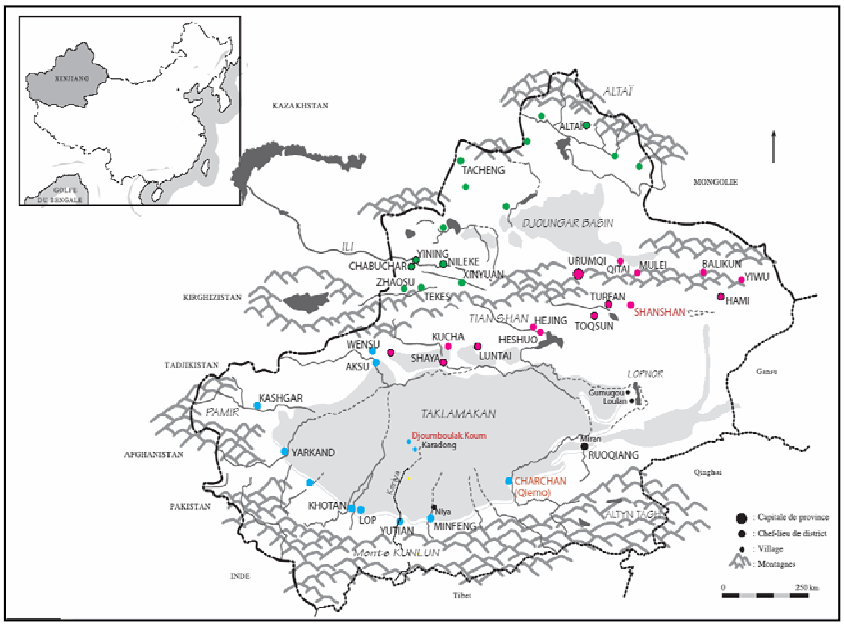


Figure 1: Carte représentant le désert du Taklamakan.

Cette mission, co-dirigée par Corinne Debaine-Francfort (« Laboratoire de l'Asie Centrale », CNRS, UMR 7041) et Abdouressoul Idriss (Institut d'Archéologie et du Patrimoine du Xinjiang – Urumqui) a ainsi retrouvé dans la vallée de la Keriya, sur plus de

15 kilomètres, les restes d'une occupation humaine vieille de 2 500 ans. Une cinquantaine de tombes, plus ou moins perturbées par le mouvement des dunes, a été dégagée. Certaines d'entre elles étaient de simples fosses de terre. D'autres, plus élaborées, étaient construites à l'image des maisons. Un cercueil ou un couvercle de bois constitué d'un tronc de peuplier évidé complétaient parfois l'ouvrage. La plupart des défunts, de type caucasien, reposait sur le dos, les genoux fléchis (Figure 2).

Figure 2: Photographies de deux tombes dégagées.

Huit tombes renfermaient des corps naturellement momifiés par le désert et dont les vêtements, la coiffure, les offrandes alimentaires et le mobilier funéraire étaient remarquablement conservés. Sous leur suaire, certaines de ces momies portaient encore des perruques, des maquillages complexes sur le visage, des tatouages et des traces de toilette et de préparation funéraire (emplâtres sur les yeux, obturation des narines, cache-bouche…), comme le montre la Figure 3 :

Figure 3: Photographie d'une momie présentant un maquillage funéraire et dont les cheveux naturels sont remarquablement conservés.

Du fait que les cheveux sont, avec les os, le seul vestige humain résistant au temps, les cheveux anciens permettent de répondre à de nombreuses questions. Par exemple, des indices concernant la mort de Napoléon ont été obtenus grâce à l'analyse de ses cheveux.[23,24] Kempson *et al.* ont travaillé pour leur part sur des cheveux de momies péruviennes âgées de 900 à 1 550 ans.[25] Ces études ont pour but de mieux comprendre les habitudes des peuples de l'époque, mais également d'augmenter nos connaissances et notre compréhension des phénomènes de dégradation au cours du temps.

Structure d'un cheveu

Le cheveu est une fibre kératinisée, possédant un diamètre allant de 50 à 100 µm et structurée en trois zones concentriques (Figure 4). Au cœur du cheveu se trouve le canal médullaire (ou *medulla*) qui est entouré du cortex lequel représente 90% de la masse du cheveu. Il est constitué de filaments protéiques organisés englobés dans une matrice amorphe. Ces filaments sont eux-mêmes constitués de fibrilles de kératine qui s'enroulent les unes autour des autres. Enfin, le cortex est protégé par la cuticule. D'une épaisseur de 5 µm, elle représente la dernière barrière entre la fibre et l'environnement extérieur. Dans le cas du cheveu humain, elle est formée d'écailles de forme rectangulaire de 50 à 70 µm de long et de 5 à 10 µm de large.

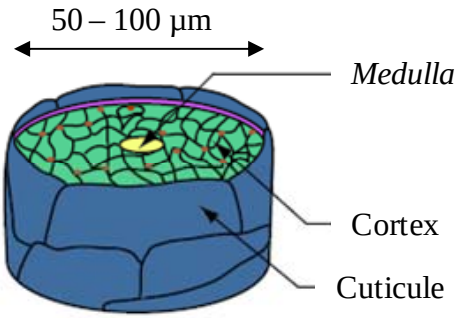


Figure 4: Zones histologiques d'un cheveu humain, d'après la référence 26.

Le cheveu est très utilisé en analyse toxicologique car il permet d'obtenir une information à long terme (quelques semaines à plusieurs mois) sur la consommation ou l'exposition d'un individu à un xénobiotique. Des études ont été menées pour rechercher des traces de consommation de drogues,[27] d'une exposition aux pesticides,[28,29] d'une contamination par les métaux lourds[24,30] ou encore pour découvrir des biomarqueurs plus spécifiques que ceux existants dans le serum par exemple.[31] Dans la grande majorité des cas, l'analyse d'un cheveu commence par l'extraction des composés d'intérêt puis une technique séparative (très souvent) couplée à un spectromètre de masse est mise en œuvre. Cette

méthode présente l'avantage de permettre la quantification des espèces extraites. Néanmoins, elle possède aussi l'inconvénient de perdre totalement l'information spatiale et l'organisation structurale potentielle de ces composés. De nombreux auteurs ont par conséquent mis à profit les techniques d'imagerie pour analyser des cheveux, anciens ou non. La spectrométrie de masse ToF-SIMS, grâce à son excellente résolution spatiale, est tout à fait adaptée à ce type d'analyse. Toutefois, presque toutes les études publiées se sont intéressées à la distribution d'espèces élémentaires.[25,32,33] *A contrario*, notre travail a porté sur l'imagerie ToF-SIMS des espèces moléculaires contenues dans le cheveu et plus particulièrement, sur les lipides.

La composition lipidique du cheveu est connue depuis longtemps et présente beaucoup de similarités avec celle de la couche cornée de la peau, le *stratum corneum*. Il s'agit principalement de triglycérides, d'acides gras saturés ou non, de céramides, de cholestérol et de sulfate de cholestéryle.[34,35] La présence d'alcools à longue chaîne hydrocarbonée est également rapportée. Qualitativement, leur teneur fluctue d'un individu à l'autre et au cours de la vie pour une même personne.

Le but de notre étude était de caractériser par imagerie ToF-SIMS la répartition des différentes classes lipidiques dans un cheveu moderne et de comparer cette distribution avec celle observée pour les cheveux de momies. Les éventuelles différences pourraient être caractéristiques de phénomènes de minéralisation ou d'altération. Il est en effet très probable que le séjour des corps dans le désert soit à l'origine de dégradation des chaînes grasse mais aussi d'apport de composés issus de l'environnement. Une bonne compréhension de ces données est particulièrement importante pour expliquer la conservation des matériaux organiques dans le site. Il est à noter qu'une autre étude employant plusieurs techniques d'imagerie a été menée sur ces cheveux de momies, par Philippe Hallégot (L'Oréal), en collaboration avec Philippe Walter (C2RMF). L'imagerie ToF-SIMS a été employée, parmi d'autres techniques d'imagerie, pour analyser les ions du phosphore encore présents dans les cheveux anciens. La Figure 5 présente les images obtenues :

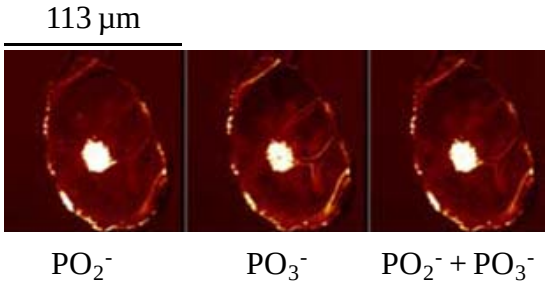


Figure 5: Images ioniques des ions PO_2^-, PO_3^- et de la somme de ces deux ions.

2. Protocole expérimental

Les échantillons de cheveux anciens provenaient de la momie d'un homme d'âge adulte. Pour les échantillons de cheveux modernes, nous avons choisi un donneur de la même ethnie supposée que les momies (caucasienne) et qui n'utilise pas de shampoing industriel de façon à minimiser les risques de contamination extérieure.

Les cheveux, disposés en fagots, sont placés dans un moule et une résine époxy à durcissement rapide est ajoutée. La résine est laissée à polymériser et les « gélules » de résine obtenues après durcissement et contenant les cheveux sont sectionnées à l'aide d'une lame diamant afin de ne conserver que des plots de quelques millimètres d'épaisseur.

Toutes les images enregistrées sur les différentes coupes de cheveux, composées de 256 x 256 pixels, ont été acquises en utilisant systématiquement l'« *electron floodgun* », avec des agrégats Bi_3^+ comme ions primaires.

Pour améliorer leur contraste, les images ont été comprimées à 128 x 128 pixels et filtrées selon la procédure décrite aux paragraphes VI.6 et VI.7 de l'introduction générale de ce manuscrit.

3. Résultats

3.1. Analyse d'un cheveu moderne

Nous avons enregistré des images en modes d'ionisation positif et négatif. Les spectres en mode d'ionisation positif enregistrés sur le cheveu moderne sont de très mauvaise qualité et les images associées présentent un contraste très faible, rendant ces expériences inexploitables. C'est pourquoi seuls les spectres et les images enregistrés en mode d'ionisation négatif seront présentés ici.

La Figure 6 présente le spectre de masse et les images ioniques d'intérêt enregistrés en mode d'ionisation négatif sur un cheveu moderne. Différentes espèces d'acides gras ont été détectées à la surface du cheveu et toutes n'ont pas la même localisation. C'est le cas de l'acide oléique (C18 :1) et de l'acide éicosénoïque (C20 :1). Le premier est présent dans le

cortex et dans le canal médullaire (de façon plus intense dans ce dernier) tandis que le second est présent uniquement dans la cuticule. Les autres acides gras présentent soit l'une soit l'autre distribution. Les acides gras en C16 :1, C16 :0 et C18 :0 ont la même localisation que l'acide oléique. L'acide linoléique a la même répartition que l'acide éicosénoïque.

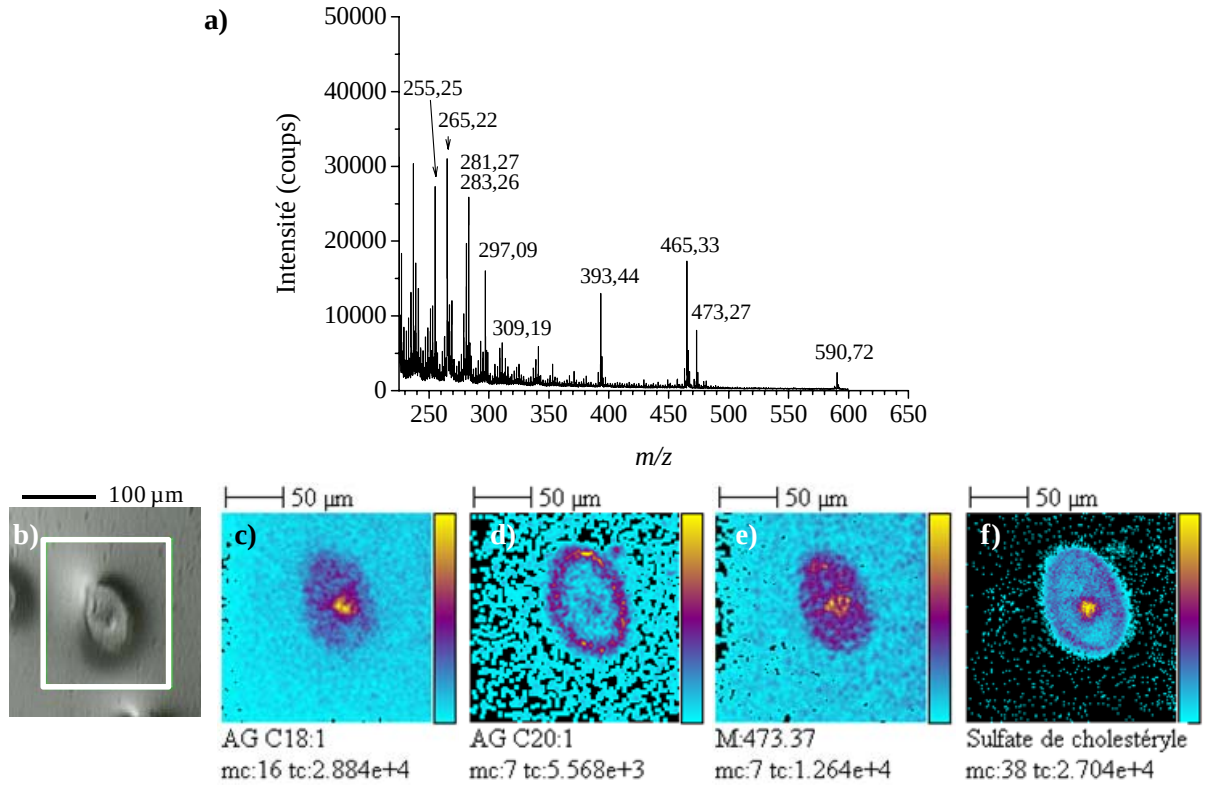


Figure 6: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation négatif, sur un cheveu moderne ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 180 x 180 µm^2 représente la zone imagée; c) Image ionique de l'acide oléique; d) Image ionique de l'acide éicosénoïque; e) Image ionique de l'ion au rapport *m/z* 473,37; f) Image ionique du sulfate de cholestéryle (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 2,7 x 10^{12} ions.cm^{-2}).

L'image de la Figure 5e est celle d'un ion qui n'a pas été identifié mais qui est très bien localisé dans le cortex et dans le canal médullaire. Enfin, la dernière image est celle du sulfate de cholestéryle, qui est présent dans la totalité du cheveu, mais de façon très abondante dans la *medulla*. Ces résultats sont en accord avec la composition lipidique d'un cheveu. Nous retrouvons des acides gras et du sulfate de cholestéryle.

D'autres signaux sont observés sur le spectre, comme l'ion au rapport *m/z* 265,22 ou celui au rapport *m/z* 393,44. Les images correspondant à ces ions sont présentées à la Figure **7**. L'ion de la Figure 7a est présent dans la cuticule du cheveu, mais pas seulement. Le fait

qu'il soit totalement absent de l'intérieur du cheveu et qu'en plus, il soit présent à l'extérieur du cheveu pourrait signifier qu'il s'agit d'une pollution de l'échantillon.

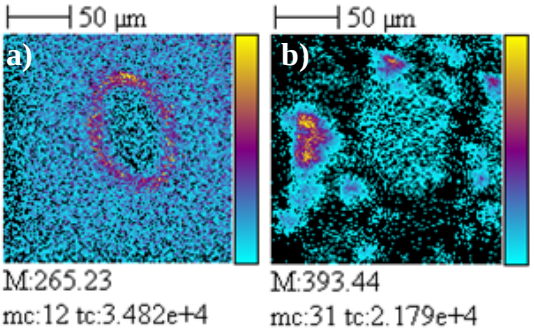


Figure 7: a) Image ionique de l'ion de rapport *m/z* 265,22; b) Image ionique de l'ion de rapport *m/z* 393,44. Images de 180 x 180 µm^2 (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence: 2,7 x 10^{12} ions.cm^{-2}).

En ce qui concerne l'ion de rapport *m/z* 393,44, celui-ci est clairement localisé à l'extérieur du cheveu. Il partage cette localisation avec l'ion de rapport *m/z* 590,72. Il ne s'agit pourtant pas d'un ion de la résine, car il devrait être présent uniformément autour du cheveu. Il se peut que lors de la manipulation de la pastille de résine (pourtant effectuée avec une pince en portant une paire de gants) un contaminant se soit déposé à sa surface.

3.2. Analyse de cheveux anciens

Les spectres de masse ToF-SIMS enregistrés sur les cheveux anciens sont d'une qualité suffisante pour être présentés et pour que les images ioniques associées soient interprétables.

La Figure 8 présente le spectre ToF-SIMS et quelques images ioniques d'intérêt enregistrés en mode d'ionisation négatif sur deux cheveux anciens. La Figure 8c représente l'image ionique de la somme des acides gras détectés à la surface des cheveux. Les acides gras à longue chaîne (C20 :1 et C20 :0) observés pour le cheveu moderne ne sont pas retrouvés sur le spectre de masse enregistré sur les cheveux anciens. De même, l'intensité relative de l'acide stéarique diminue fortement au profit de l'acide myristique qui n'était pas détecté dans le cheveu moderne. La localisation des acides gras dans le cheveu est identique quelle que soit l'espèce considérée. Les signaux de ces espèces sont également détectés en dehors des cheveux, ce qui semble traduire une contamination de la pastille de résine qui aurait eu lieu lors de la manipulation de l'échantillon. Le sulfate de cholestéryle est détecté dans les deux cheveux, mais sa localisation est différente de celle du cheveu moderne. Au lieu d'être présent dans la *medulla* et la cuticule, on le retrouve plutôt dans le cortex.

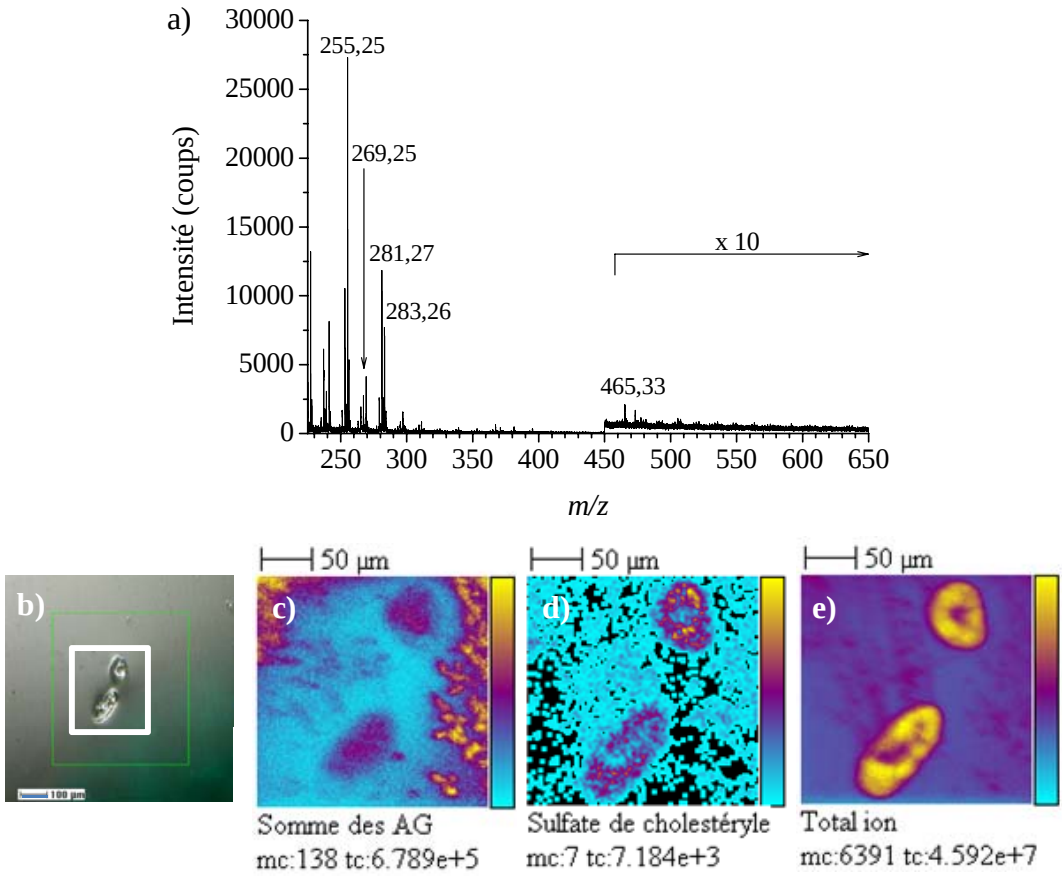


Figure 8: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation négatif, sur deux cheveux anciens; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 220 x 220 µm^2 représente la zone imagée; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique du sulfate de cholestéryle; e) Image du courant ionique total (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

L'ion au rapport *m/z* 269,25 présente la même localisation que la somme des acides gras, c'est-à-dire dans le cheveu mais aussi à l'extérieur. D'après l'analyse de molécules de référence, cet ion pourrait être issu de la fragmentation de diacylglycérols. La présence de triacylglycérols est rapportée dans le contenu lipidique du cheveu. Or, nous avons déjà vu que ces espèces ne supportent pas bien l'ionisation SIMS et qu'elles se fragmentent pour donner des diacylglycérols. Ces diacylglycérols peuvent à leur tour subir des fragmentations pour donner l'ion au rapport *m/z* 269,22. Nos résultats sont donc cohérents avec la composition lipidique d'un cheveu telle qu'elle est décrite dans la littérature.

La Figure 8e présente l'image du courant ionique total et permet de bien distinguer les différentes parties du cheveu : la cuticule, le canal médullaire et entre les deux, le cortex.

L'organisation du cheveu est remarquablement conservée dans ces cheveux vieux de 2 500 ans.

La Figure 9 présente le spectre ToF-SIMS et quelques images ioniques d'intérêt enregistrés en mode d'ionisation positif sur deux cheveux anciens.

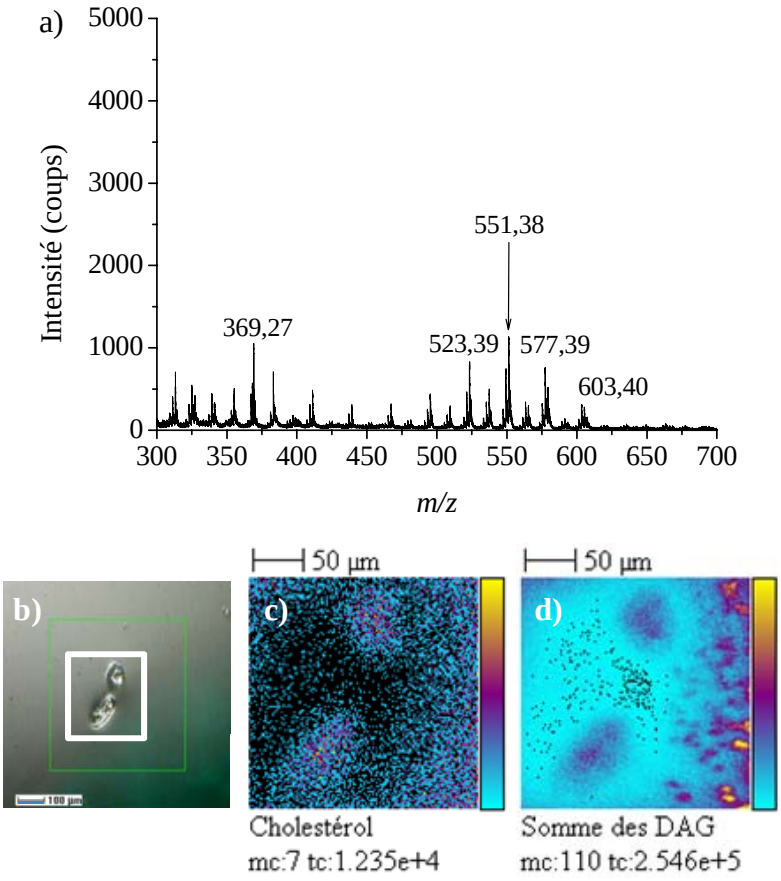


Figure 9: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation positif, sur deux cheveux anciens; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 220 x 220 µm^2 représente la zone imagée; c) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; d) Image ionique d'un fragment de cholestérol (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence :6,3 x 10^{11} ions.cm^{-2}).

Les signaux présents entre *m/z* 300 et *m/z* 350 correspondent à des monoacylglycérols. Au rapport *m/z* 369,27 est détecté le fragment $[M+H-H_2O]^+$ du cholestérol. Il est présent dans les cheveux mais aussi à l'extérieur de ceux-ci, tout comme les diacylglycérols (DAG) qui sont détectés sur le spectre. Leur localisation est en partie interne au cheveu et semble diffuse. Contrairement à certains ions, la localisation des DAG ne délimite pas précisément le contour du cheveu.

Ces observations sont donc en accord avec la description du contenu lipidique d'un cheveu : nous observons du cholestérol et des diacylglycérols. Ceci va par ailleurs dans le sens de notre hypothèse selon laquelle l'ion au rapport *m/z* 269,22 détecté en mode d'ionisation négatif pouvait signer la présence de DAG et par conséquent de TAG.

3.3. Comparaison des profils lipidiques d'un cheveu moderne et d'un cheveu ancien

Pour comparer les profils lipidiques d'un cheveu moderne à celui d'un cheveu ancien, nous avons extrait les spectres correspondant à la cuticule, au cortex et à la *medulla* pour chacun. La Figure 10 montre le dessin des ROIs de ces trois zones, pour le cheveu moderne et un cheveu ancien :

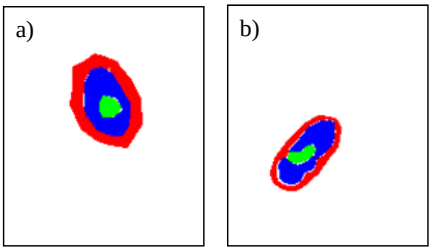


Figure 10: a) Dessin des ROIs pour le cheveu moderne; b) Dessin des ROIs pour un cheveu ancien. La zone rouge représente la cuticule, la zone bleue le cortex et la zone verte, la *medulla*.

Les Figure 11, Figure 12 etFigure 13 montrent les spectres extraits de la cuticule, du cortex et de la *medulla*, du cheveu moderne et d'un cheveu ancien. Les spectres ont été normalisés par rapport à l'aire de la ROI la plus petite. La première observation qui peut être faite sur ces spectres est la faible intensité des signaux, quels qu'ils soient. En comparant les spectres zone par zone, la première différence observable est l'absence du signal du sulfate de cholestéryle sur les trois spectres du cheveu ancien. Pourtant, une image du sulfate de cholestéryle a pu être obtenue (Figure 8d). Sur l'image ionique, le sulfate de cholestéryle est absent de la *medulla* et ne semble pas présent dans la cuticule (il est difficile d'évaluer le contour du cheveu ancien). Il serait donc logique de ne pas retrouver son signal sur les spectres correspondant à ces deux ROIs mais de le détecter sur le spectre associé au cortex. Cette absence peut être justifiée par le fait que l'intensité globale du spectre est trop faible pour que le pic dépasse du bruit de fond lors d'une représentation globale. Une autre différence se situe au niveau des espèces d'acides gras détectées. Dans le cheveu moderne, des acides gras

possédant de 16 à 20 atomes de carbone sont détectés ; dans le cheveu ancien, des acides gras à chaîne plus courte sont observés, de 14 à 18 atomes de carbone.

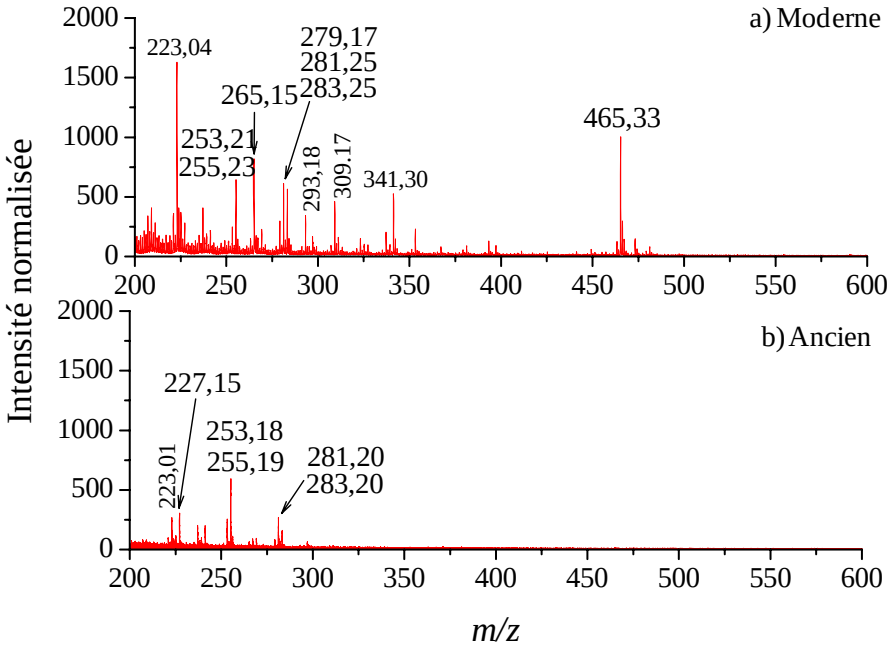


Figure 11: Spectres extraits des ROIs correspondant à la cuticule d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b).

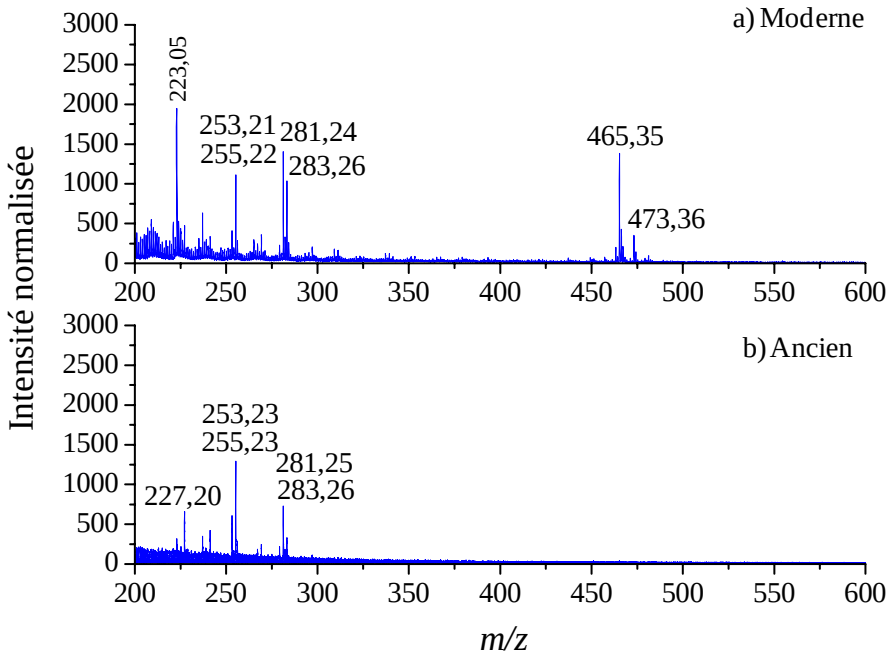


Figure 12: Spectres extraits des ROIs correspondant au cortex d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b).

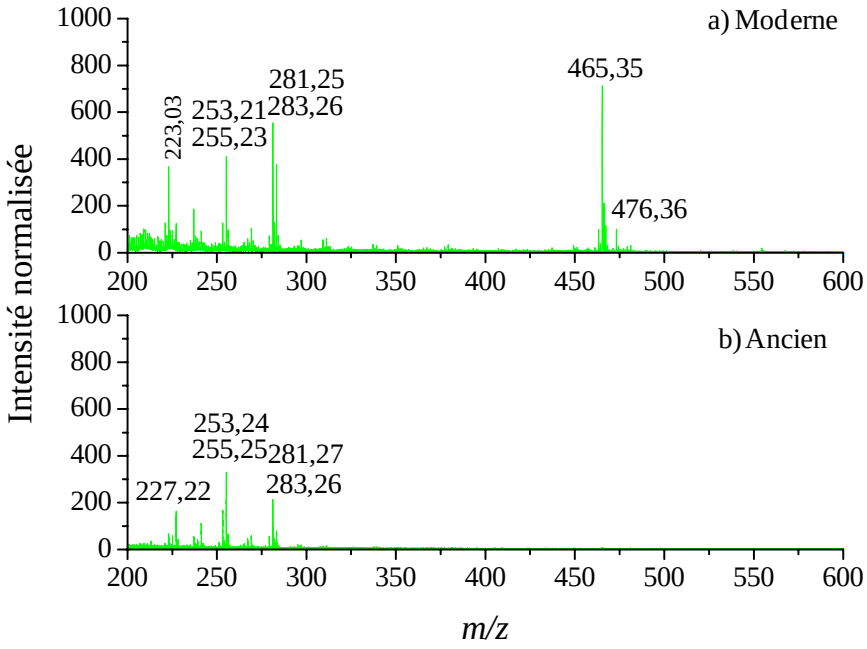


Figure 13: Spectres extraits des ROIs correspondant à la medulla d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b).

Nous remarquons également que le spectre du cheveu moderne semble présenter un bruit de fond supérieur ainsi que de plus nombreux signaux ne correspondant à aucune espèce lipidique, probablement liés à une pollution extérieure du cheveu, malgré les précautions prises lors du choix du donneur de cheveux modernes.

4. Conclusion

L'analyse de composés organiques au sein de cheveux, par imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS n'avait jamais été rapportée. Nos résultats sont cohérents avec la composition lipidique d'un cheveu décrite dans la littérature, et grâce à la spécificité de l'imagerie, nous avons montré que toutes les espèces d'une même classe lipidique n'étaient pas forcément réparties dans les mêmes zones du cheveu (acide oléique et acide éicosénoïque dans le cheveu moderne). Nous pouvons également dire que le sulfate de cholestéryle semble se concentrer dans le canal médullaire. En ce qui concerne le cheveu de momie, il est déjà remarquable de pouvoir analyser de tels échantillons. La possibilité qui nous a été donnée de travailler sur des restes datant de 2 500 ans est unique. D'un autre côté, les performances de

l'instrument sont également à mettre en avant, puisque sans la résolution spatiale du ToF-SIMS, il n'aurait pas été possible d'étudier des échantillons d'aussi petite taille. La comparaison du contenu lipidique d'un cheveu moderne et d'un cheveu ancien montre une dégradation des espèces moléculaires visible au niveau des espèces d'acides gras détectées dans chaque type de cheveux. En effet, dans le cheveu moderne, des chaînes longues sont détectées alors que dans le cheveu de momie, ces espèces se sont décomposées pour conduire à des acides gras à chaîne carbonée plus courte. Par ailleurs, le fait de ne plus détecter que des acides gras constitue un autre indice de la dégradation moléculaire que les cheveux ont subi au cours de leur enfouissement. Enfin, contrairement à ce que nous aurions pu croire, au cours de ces 2 500 ans, aucun composé provenant de l'environnement extérieur de la momie observable en spectrométrie de masse ToF-SIMS n'a été détecté.

Les expériences mériteraient d'être renouvelées en améliorant la préparation des échantillons, qui, comme nous l'avons vu, ne permet pas d'éviter les contaminations. Au lieu de travailler sur le plot de résine directement, nous pourrions réaliser des coupes de quelques dizaines de nm d'épaisseur par ultramicrotomie une fois le plot obtenu. La qualité des images serait probablement améliorée car l'échantillon gagnerait en conductivité. Enfin et surtout, nous avons, depuis que ces expériences ont été réalisées, progressé dans la compréhension des paramètres du spectromètre TOF-SIMS. Pour des échantillons isolants tels que des coupes de cheveu, nous serions maintenant capables d'obtenir une bien meilleure transmission des ions avec une bien meilleure résolution en masse.

III. Faisabilité de l'imagerie ToF-SIMS d'une coupe de corps entier de souris

1. Introduction

Si, depuis le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse il y a dix ans,[36] la nature des échantillons étudiés, les familles moléculaires analysées ou encore les instruments mis en œuvre ont évolué, la taille des échantillons, elle, est restée du même ordre de grandeur. Pourtant, en théorie, aucun paramètre ne vient limiter la taille de l'échantillon (si ce n'est la taille de la source d'ionisation du spectromètre !). Malgré cela, le premier article traitant de l'analyse par imagerie MALDI-TOF d'un corps entier d'animal n'a été publié qu'en 2006, par l'équipe de Richard Caprioli.[37] Dans cette étude, Khatib-Shahidi *et al.* se sont focalisés sur le développement d'une méthode capable de détecter à la fois les protéines et les composés exogènes comme les médicaments à partir de tissus de morphologies différentes dans des sections d'animaux entiers. Dans la première partie de cet article, les auteurs se sont intéressés aux protéines et ont réussi à mettre en évidence les différents organes d'un rat entier en détectant un signal spécifique pour chacun, comme le montre la Figure 1 :

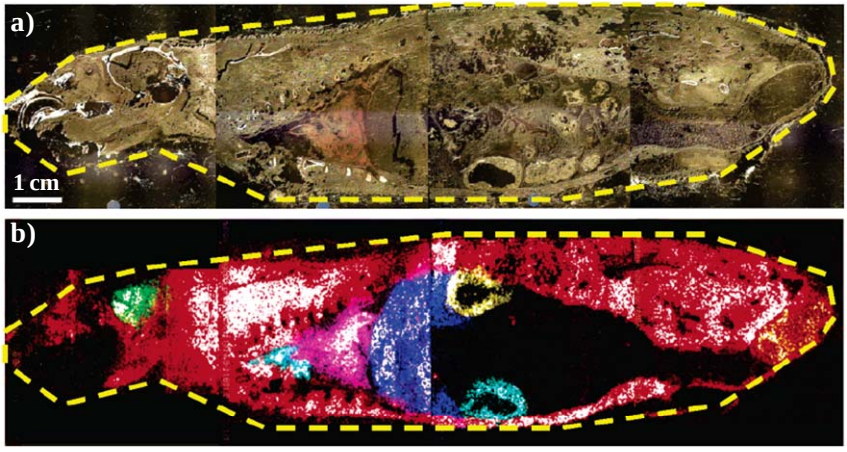


Figure 1: a) Image optique de la section sagittale du rat déposée sur quatre plaques MALDI ; b) Superposition des images ioniques appartenant à un unique organe : le cerveau en vert (*m/z* 21952), le thymus en bleu clair (*m/z* 6893), la cavité thoracique en rose (*m/z* 7921), le foie en bleu (*m/z* 14321), le cortex rénal en jaune (*m/z* 4643), le *caecum* en cyan (*m/z* 5155), les testicules en orange (*m/z* 14400) et les muscles en rouge (*m/z* 11836), d'après la référence 37.

Dans la seconde partie de cet article, les auteurs se sont intéressés à la distribution d'un médicament dans les différents organes au cours de son assimilation par l'animal. De manière générale, la méthode de choix pour ce type d'analyse est l'autoradiographie du corps entier (« *Whole-Body Autoradiography* », WBA).[38] Un composé marqué par un isotope radioactif (par exemple au tritium ^{3}H) est administré à l'animal qui est sacrifié après différents temps post-injection. Des sections du corps entier de l'animal sont ensuite exposées à un détecteur sensible aux rayonnements émis par le radioélément (β^- dans le cas du tritium), ou bien vont simplement impressionner un film photographique spécial, ce qui permet de localiser la molécule administrée. Cette technique présente de nombreux avantages, dont une sensibilité élevée et une possible quantification de la molécule marquée. De plus, cette méthode fait l'objet de procédures standardisées car il s'agit d'une des techniques recommandées par la « *Food and Drug Administration* » pour l'acceptation d'un nouveau médicament.[37] Cependant, la technique présente un inconvénient majeur en cela qu'elle ne permet pas de distinguer la molécule initiale de ses métabolites (qu'ils conservent ou non l'isotope radioactif au cours du métabolisme). L'imagerie par spectrométrie de masse est donc tout à fait adaptée à ce type d'analyse puisqu'elle permet l'étude simultanée d'un grand nombre de composés. La détection de la molécule initiale (qui n'a plus besoin d'être marquée) et de ses métabolites autorise non seulement à suivre le devenir du composé injecté mais aussi à obtenir (potentiellement) des informations sur la réponse de l'organisme au traitement pharmaceutique. Néanmoins, il existe un inconvénient à l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Les composés pharmaceutiques sont en général classés parmi les « petites molécules », ce qui, comme nous l'avons vu dans l'introduction générale de ce manuscrit, peut poser des problèmes d'interférences avec les signaux de la matrice. Pour surmonter cette difficulté, une analyse MS/MS directement sur la coupe est souvent nécessaire.[37,39,40]

L'alternative à l'utilisation de la MS/MS en MALDI-TOF est l'imagerie ToF-SIMS, puisque, de par la gamme de masse accessible, cette technique est parfaitement adaptée à l'analyse de métabolites. Pourtant, aucune étude de ce type n'a été publiée à ce jour.

Notre travail a donc consisté à démontrer la faisabilité de l'imagerie ToF-SIMS appliquée à une coupe de corps entier de souris. Dans un premier temps, et comme il s'agit d'une étude de faisabilité, il n'a été administré aucun médicament à la souris.

2. Protocole expérimental

Les échantillons ont été fournis par l'équipe de Richard Caprioli. Une souris contrôle a été sacrifiée et congelée dans un bloc de glace. Des coupes du corps entier de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées dans un cryostat.

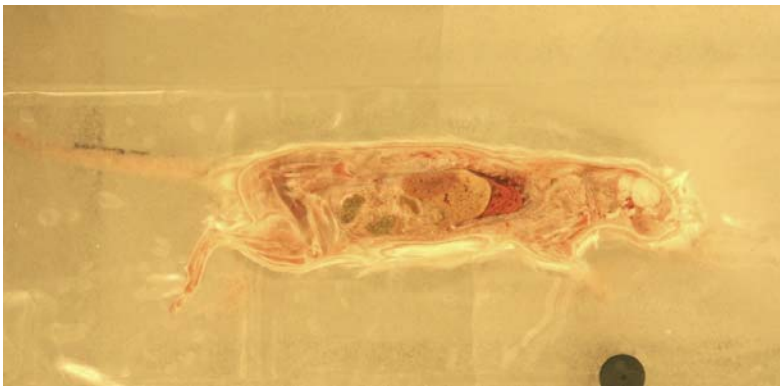


Figure 2: Photographie du corps de la souris pris dans le bloc de glace (un peu moins de la moitié du corps a déjà été coupé).

Les coupes ont ensuite été transférées sur un disque de silicium. Pour leur transport entre les USA et la France, les disques de silicium ont été placés dans des boites de Petri en polystyrène sans plus de précautions. Avant l'analyse ToF-SIMS, le disque de silicium a été sectionné de façon à ce qu'il tienne sur le support du porte-échantillon du ToF-SIMS (Figure **3**).

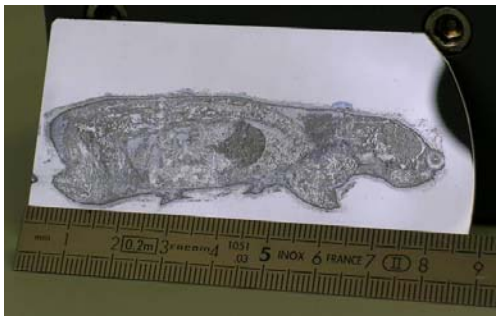


Figure 3: Photographie d'une coupe de corps entier de souris déposée sur un disque de silicium sectionné.

Les images ToF-SIMS de l'intégralité du corps de la souris ont été enregistrées en trois morceaux : la tête, le corps et l'arrière. Chaque image possède une taille de 28 x 28 mm^2 et est composée de 256 x 256 pixels, conduisant à une taille de pixel de 109 x 109 μm^2. Après reconstruction de l'image du corps entier, l'image a donc une taille de 28 x 84 mm^2 et

768 x 256 pixels (196 608 pixels). La fluence en ions primaires (Bi_3^+) utilisée est de 6 x 10^8 ions.cm^{-2}. La durée d'acquisition d'une image du corps entier est de 12 heures par mode d'ionisation.

3. Résultats

La Figure 4 montre une image d'une coupe de corps entier de souris. Les flèches indiquent les emplacements des différents organes.

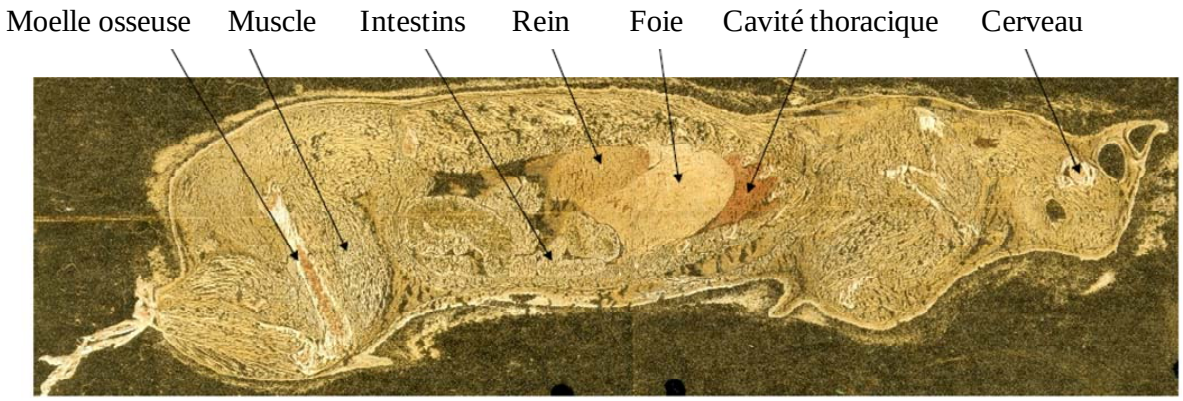


Figure 4: Image d'une coupe de corps entier de souris.

Sur les images ToF-SIMS, ces organes sont aisément localisables, grâce à certains signaux. C'est le cas notamment de l'image ionique du sulfate de cholestéryle (Figure 5) :

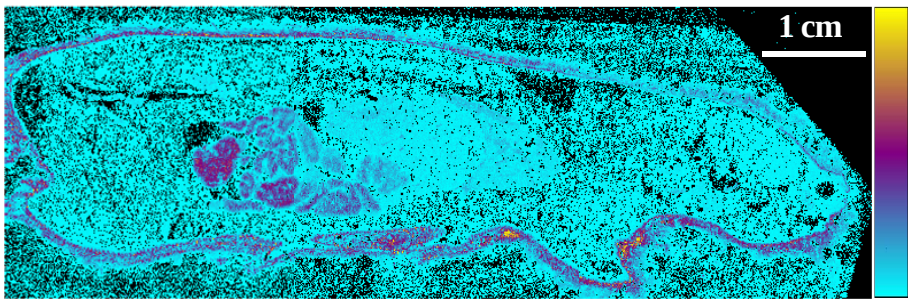


Figure 5: Image ionique du sulfate de cholestéryle, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}).

Le sulfate de cholestéryle est présent dans la peau de la souris, ce qui est cohérent avec le fait que le sulfate de cholestéryle entre dans la composition du *stratum corneum*[41,42] (couche cornée de la peau). Son signal dessine également très précisément les intestins de la souris

puisque le sulfate de cholestéryle est caractéristique des cellules épithéliales. On retrouve par ailleurs dans la cavité abdominale l'acide taurocholique, comme le montre la Figure 6 :

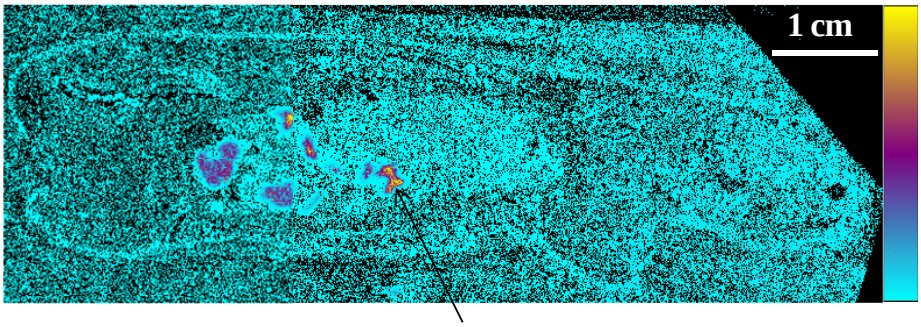


Figure 6: Image ionique de l'acide taurocholique, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}).

Une des zones les plus intenses correspond probablement à la vésicule biliaire, lieu de stockage des acides biliaires en attente de leur utilisation lors de la digestion.

D'autres composés issus de classes lipidiques différentes sont détectés. La Figure 7 présente la répartition de la somme des sulfatides présents à la surface de la coupe :

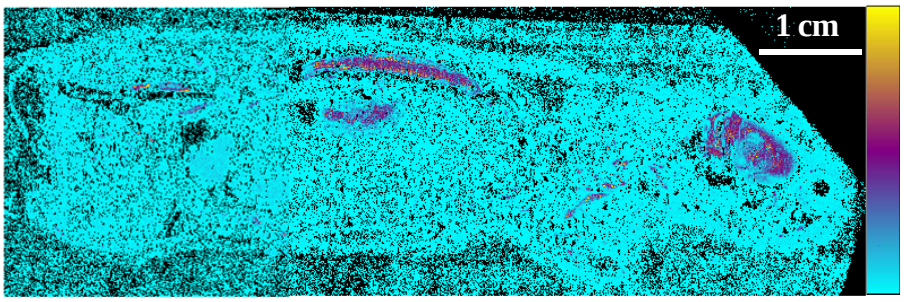


Figure 7: Image ionique de la somme des sulfatides, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris. (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}).

Les sulfatides sont des glycosphingolipides portant un groupe ester sulfaté sur l'unité galactose (*cf.* Annexe 3). Bien que les sulfoglycospingolipides tendent à être des composants mineurs des tissus, leur abondance est plus importante dans le système nerveux central et dans le rein. Cette répartition est exactement celle observée sur l'image ionique de la somme de ces composés puisque nous les observons dans le cerveau, la moëlle épinière et le rein de la souris.

Les superpositions en deux ou trois couleurs de certains signaux détectés à la surface de la coupe montrent des anti-co-localisations très nettes. C'est le cas pour l'acide linoléique et le sulfate de cholestéryle (Figure 8a) ou pour la sphingomyéline 34 :1 et la somme des sulfatides (Figure 8b). La Figure 8c reprend la superposition précédente, en y ajoutant le phosphatidylinositol 38 :4.

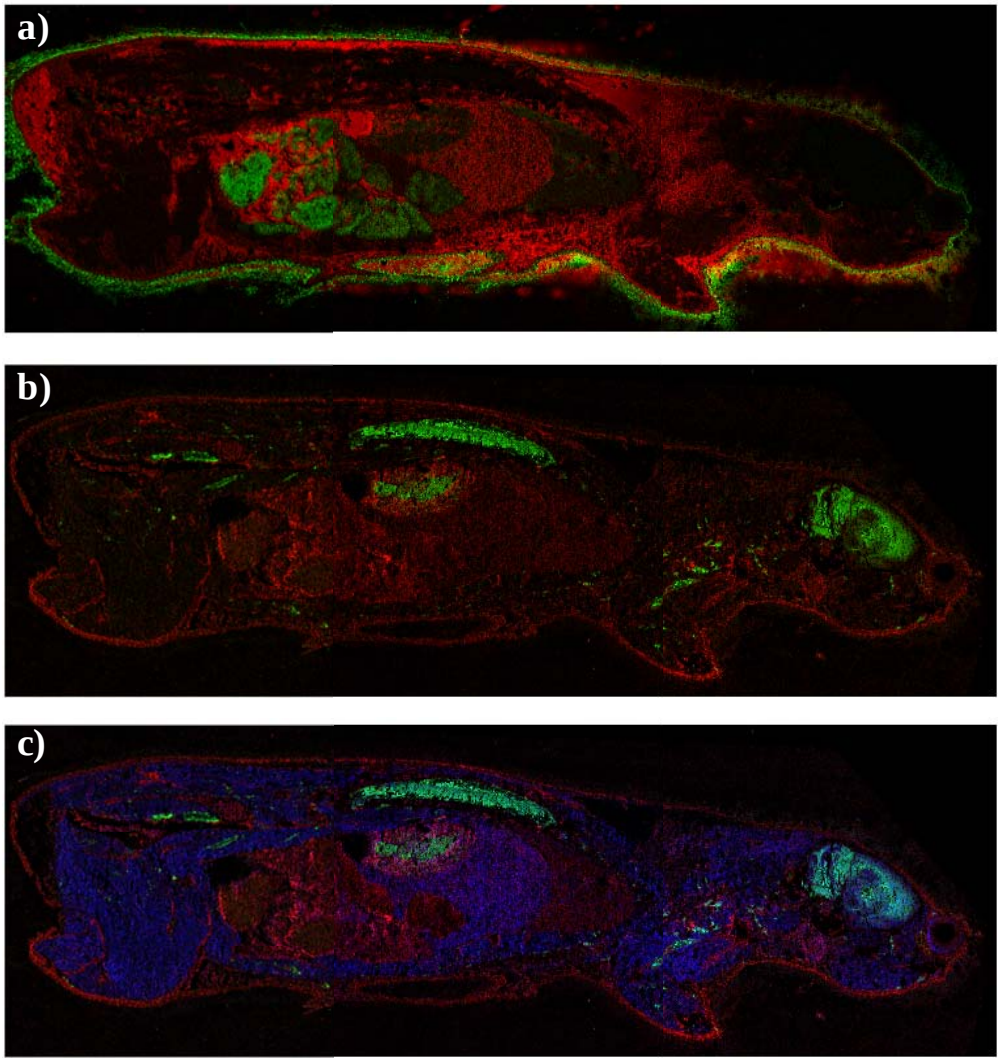


Figure 8: a) Superposition en deux couleurs des images ioniques de l'acide linoléique (en rouge) et du sulfate de cholestéryle (en vert) ; b) Superposition en deux couleurs des images ioniques de sphingomyéline 34 :1 (en rouge) et de la somme des sulfatides (en vert) ; c) Superposition en trois couleurs des images ioniques de la sphingomyéline 34 :1 (en rouge), de la somme des sulfatides (en vert) et du phosphatidylinositol 38 :4 (en bleu).

Les images ioniques du cholestérol sont présentées à la Figure 9. La distribution obtenue pour la somme des signaux du cholestérol est la même en mode d'ionisation négatif (Figure 9a) qu'en mode d'ionisation positif (Figure 9b).

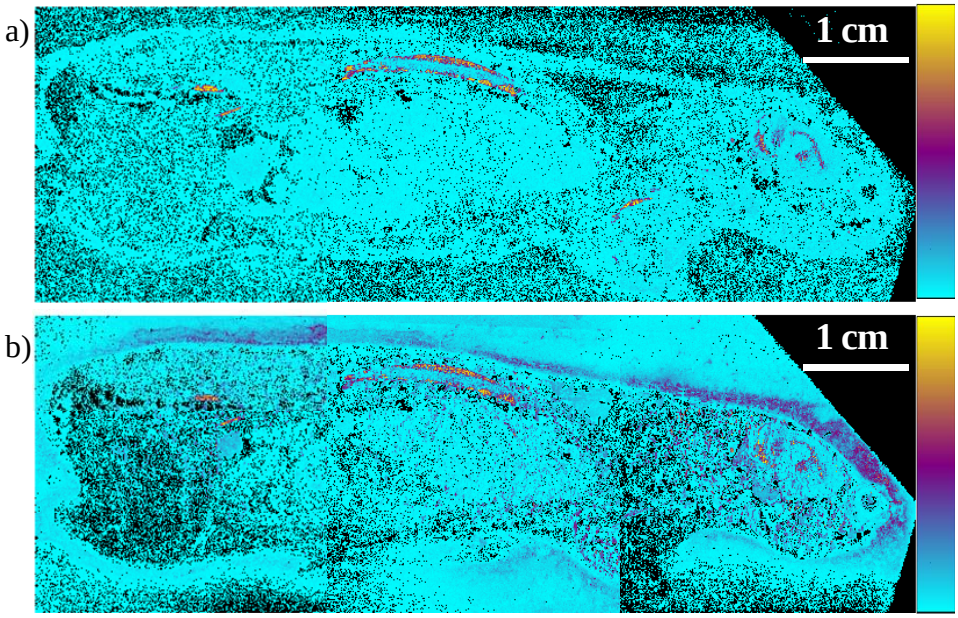
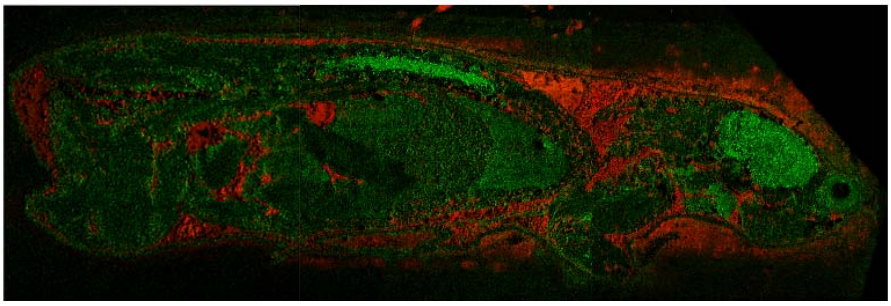


Figure 9: Images ioniques du cholestérol enregistrées sur une coupe du corps entier d'une souris ; a) en mode d'ionisation négatif ; b) en mode d'ionisation positif (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence :6 x 10^8 ions.cm^{-2}).

Sa localisation dans le système nerveux central (cerveau et le pourtour de la moëlle épinière) est cohérente avec le fait que le cholestérol est le stérol le plus abondant dans le système nerveux central, atteignant chez l'homme près d'un quart de la quantité totale de stérols contenue dans le corps[43]. De plus, ces deux images montrent que quel que soit le mode d'ionisation utilisé, la localisation obtenue est la même, démontrant que les effets de matrice, souvent évoqués pour mettre en doute des localisations de composés sur des coupes de tissu, ne sont pas responsables de ces localisations.

La Figure 10a montre les superpositions en deux couleurs des images ioniques de la somme des diacylglycérols (DAG) et de la somme des phosphatidylcholines. Ces dernières sont présentes dans la plupart des organes, en effet, les phosphatidylcholines sont des composants essentiels des membranes et ils représentent plus de 50% des phospholipides du corps[44]. L'anti-co-localisation avec les DAG est nette sur la Figure 10a. L'anti-co-localisation des DAG avec le cholestérol est également très visible sur la Figure 10b.

a)



b)

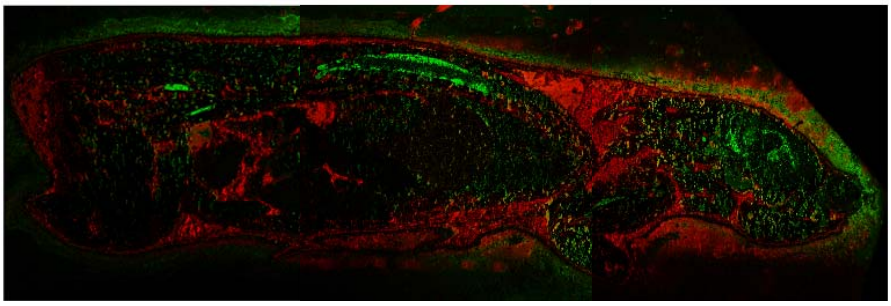


Figure 10: a) Superposition en deux couleurs de la somme des diacylglycérols (en rouge) et de la somme des phospatidylcholines (en vert) ; b) Superposition en deux couleurs de la somme des diacylglycérols (en rouge) et du cholestérol (en vert).

4. Conclusions

Le but de cette analyse était de démontrer la faisabilité de l'imagerie d'une coupe de corps entier de souris. D'un point de vue technique, cette faisabilité est démontrée. Les images du corps entier nécessitent certes d'être enregistrées une par une puis collées les unes aux autres manuellement, mais ceci reste dans le domaine du « facilement réalisable ». Un problème pourrait cependant survenir lors de la reconstruction de l'image globale, si, pour un ion donné, les intensités des images des différentes parties du corps n'étaient pas comparables. Ce phénomène est légèrement visible sur les images de l'acide taurocholique (Figure 6), de la somme des sulfatides (Figure 7) ou sur celles du cholestérol (Figure 9). Néanmoins, nos images ont des intensités suffisamment comparables et aucune normalisation n'a été nécessaire pour reconstruire l'image globale de chaque ion.

D'un point de vue plus applicatif, l'analyse d'un corps entier de souris contrôle, n'a en soi, que peu d'intérêt. Cette technique, dont la faisabilité vient d'être prouvée, devrait être appliquée à des souris auxquelles un médicament a été injecté. Le suivi du métabolisme de la

molécule active présente en revanche un intérêt non négligeable, comme il a été montré dans le paragaphe III.1 de ce chapitre.

Références bibliographiques :

[1] T. Hartmann, J. Kuchenbecker and M.O. Grimm. Alzheimer's disease: the lipid connection. *J. Neurochem*. **2007**; 103(S1), 159.

[2] D.R. Taylor and N.M. Hooper. Role of lipid rafts in the processing of the pathogenic prion and Alzheimer's amyloid-β proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2007**; 18(5), 638.

[3] M. Kivipelto, E.L. Helkala, M.P. Laakso, T. Hanninen, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto and A. Nissinen. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *Bmj*. **2001**; 322(7300), 1447.

[4] S. Wahrle, P. Das, A.C. Nyborg, C. McLendon, M. Shoji, T. Kawarabayashi, L.H. Younkin, S.G. Younkin and T.E. Golde. Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiol. Dis*. **2002**; 9(1), 11.

[5] R.G. Cutler, J. Kelly, K. Storie, W. A. Pedersen, A. Tammara, K. Hatanpaa, J.C. Troncoso and M.P. Mattson. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2004**; 101(7), 2070.

[6] M.O. Grimm, H.S. Grimm, A.J. Patzold, E.G. Zinser, R. Halonen, M. Duering, J.A. Tschape, B. De Strooper, U. Muller, J. Shen and T. Hartmann. Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat. Cell. Biol*. **2005**; 7(11), 1118.

[7] I. Kracun, S. Kalanj, C. Cosovic and J. Talan-Hranilovic. Brain gangliosides in Alzheimer's disease. *J. Hirnforsch*. **1990**; 31(6), 789.

[8] Q. Zha, Y. Ruan, T. Hartmann, K. Beyreuther and D. Zhang. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein. *Mol. Psychiatry*. **2004**; 9(10), 946.

[9] K. Yanagisawa. Role of gangliosides in Alzheimer's disease. *BBA - Biomembranes*. **2007**; 1768(8), 1943.

[10] X. Han. Lipid alterations in the earliest clinically recognizable stage of Alzheimer's disease: implication of the role of lipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res*. **2005**; 2(1), 65.

[11] E.R. Macagno, K.J. Muller and S.A. DeRiemer. Regeneration of axons and synaptic connections by touch sensory neurons in the leech central nervous system. *J. Neurosci*. **1985**; 5(9), 2510.

[12] J.G. Nicholls and U.G. Hernandez. Growth and synapse formation by identified leech neurones in culture: a review. *Q J Exp Physiol*. **1989**; 74(6), 965.

[13] H. Wang and E.R. Macagno. The establishment of peripheral sensory arbors in the leech: *in vivo* time-lapse studies reveal a highly dynamic process. *J. Neurosci*. **1997**; 17(7), 2408.

[14] D.P. Kuffler and K.J. Muller. The properties and connections of supernumerary sensory and motor nerve cells in the central nervous system of an abnormal leech. *J. Neurobiol*. **1974**; 5(4), 331.

[15] W. Walz and W.R. Schlue. Ionic mechanism of a hyperpolarizing 5-hydroxytryptamine effect on leech neuropile glial cells. *Brain Res.* **1982**; 250(1), 111.

[16] S.E. Blackshaw, S. Arkison, C. Cameron and J.A. Davies. Promotion of regeneration and axon growth following injury in an invertebrate nervous system by the use of three-dimensional collagen gels. *Proc. Biol. Sci.* **1997**; 264(1382), 657.

[17] B.D. Burrell, C.L. Sahley and K.J. Muller. Progressive recovery of learning during regeneration of a single synapse in the medicinal leech. *J. Comp. Neurol.* **2003**; 457(1), 67.

[18] E. Eljaschewitsch, A. Witting, C. Mawrin, T. Lee, P.M. Schmidt, S. Wolf, H. Hoertnagl, C.S. Raine, R. Schneider-Stock, R. Nitsch and O. Ullrich. The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron.* **2006**; 49(1), 67.

[19] I. Matias, T. Bisogno, D. Melck, F. Vandenbulcke, M. Verger-Bocquet, L. De Petrocellis, C. Sergheraert, C. Breton, V. Di Marzo and M. Salzet. Evidence for an endocannabinoid system in the central nervous system of the leech *Hirudo medicinalis*. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2001**; 87(2), 145.

[20] M. Salzet. Invertebrate molecular neuroimmune processes. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **2000**; 34(1-2), 69.

[21] F. Calon and G. Cole. Neuroprotective action of omega-3 polyunsaturated fatty acids against neurodegenerative diseases: Evidence from animal studies. *Prostag. Leukot. Ess.* **2007**; 77(5-6), 287.

[22] A.T. Michael-Titus. Omega-3 fatty acids and neurological injury. *Prostag. Leukot. Ess.* **2007**; 77(5-6), 295.

[23] J.N. Audinot, S. Schneider, M. Yegles, P. Hallégot, R. Wennig and H. N. Migeon. Imaging of arsenic traces in human hair by nano-SIMS 50. *Appl. Surf. Sci.* **2004**; 231-232(490-496.

[24] P. Kintz, M. Ginet, N. Marques and V. Cirimele. Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair. *Forensic Sci. Int.* **2007**; 170(2-3), 204.

[25] I.M. Kempson, W.M. Skinner, P. K. Kirkbride, A.J. Nelson and R.R. Martin. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry analysis of hair from archaeological remains. *Eur. J. Mass Spectrom. (Chichester, Eng).* **2003**; 9(6), 589.

[26] L. Bertrand. *Approche structurale et bioinorganique de la conservation de fibres kératinisées archéologiques*. Thèse de doctorat. Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), **2002**.

[27] C. Moore, L. Marinetti, C. Coulter and K. Crompton. Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: Application to forensic specimens. *Forensic Sci. Int.* **2008**; 176(1), 47.

[28] A.M. Tsatsakis, M.N. Tzatzarakis and M. Tutudaki. Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure. *Forensic Sci. Int.* **2008**; 176(1), 67.

[29] S. Dulaurent, J.M. Gaulier, J.L. Baudel, L. Fardet, E. Maury and G. Lachâtre. Hair analysis to document non-fatal pesticide intoxication cases. *Forensic Sci. Int.* **2008**; 176(1), 72.

[30] P. Montuori, E. Jover, S. Díez, N. Ribas-Fitó, J. Sunyer, M. Triassi and J.M. Bayona. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Sci. Total Environ.* **2006**; 369(1-3), 51.

[31] M. Berglund, B. Lind, K. A. Bjornberg, B. Palm, O. Einarsson and M. Vahter. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ. Health.* **2005**; 4, 20.

[32] I.M. Kempson and W. M.Skinner. ToF-SIMS analysis of elemental distributions in human hair. *Sci. Total Environ.* **2005**; 338(3), 213.

[33] I.M. Kempson, W.M. Skinner and P. K. Kirkbride. Calcium distributions in human hair by ToF-SIMS. *BBA – Gen. Subjects*. **2003**; 1624(1-3), 1.

[34] P.W. Wertz and D.T. Downing. Integral lipids of human hair. *Lipids*. **1988**; 23(9), 878.

[35] M.A. Wix, P.W. Wertz and D.T. Downing. Polar lipid composition of mammalian hair. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **1987**; 86(4), 671.

[36] R.M. Caprioli, T.B. Farmer and J. Gile. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal. Chem.* **1997**; 69(23), 4751.

[37] S. Khatib-Shahidi, M. Andersson, J.L. Herman, T.A. Gillespie and R.M. Caprioli. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Anal. Chem*. **2006**; 78(18), 6448.

[38] S. Ullberg. Studies on the distribution and fate of S35-labelled benzylpenicillin in the body. *Acta Radiol. Suppl*. **1954**; 118, 1.

[39] M. Stoeckli, D. Staab and A. Schweitzer. Compound and metabolite distribution measured by MALDI mass spectrometric imaging in whole-body tissue sections. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**; 260(2-3), 195.

[40] V. Kertesz, G.J. Van Berkel, M. Vavrek, K.A. Koeplinger, B.B. Schneider and T.R. Covey. Comparison of drug distribution images from whole-body thin tissue sections obtained using desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry and autoradiography. *Anal. Chem*. **2008**; 80(13), 5168.

[41] M. Kagehara, M. Tachi, K. Harii and M. Iwamori. Programmed expression of cholesterol sulfotransferase and transglutaminase during epidermal differentiation of murine skin development. *BBA - Lipid Met.* **1994**; 1215(1-2), 183.

[42] M.F. Denning, M.G. Kazanietz, P.M. Blumberg and S.H. Yuspa. Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes. *Cell. Growth Differ*. **1995**; 6(12), 1619.

[43] J.M. Dietschy and S.D. Turley. Thematic review series: brain lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res*. **2004**; 45(8), 1375.

[44] G. van Meer, D.R. Voelker and G.W. Feigenson. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. **2008**; 9(2), 112.

Conclusion générale

Lorsque j'ai débuté mon doctorat, les lipides se limitaient pour moi aux acides gras et notre spectromètre ToF-SIMS était un instrument impressionnant que je ne serais jamais capable de comprendre et de faire fonctionner.

Au terme de ces 3 années de recherche et de travail avec le ToF-SIMS, les choses sont différentes pour moi. Bien sûr, elles ont également évolué pour l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS. Initiée il y a cinq ans au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN, cette technique a trouvé aujourd'hui des domaines d'application où ses caractéristiques principales, dont une excellente résolution spatiale, sont mises à profit pour des études diverses.

Au cours de ce travail de thèse, des collaborations fructueuses ont été mises en place, chacune dans un domaine différent, chacune apportant de nouvelles avancées à l'imagerie ToF-SIMS.

Notre travail conjoint avec le Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France a permis d'apporter des preuves de l'utilisation de sang dans les cérémonies rituelles du peuple Dogon. En plus de ces preuves inédites fournies aux archéologues, cette étude a permis de faire avancer notre méthodologie en préparation des échantillons. L'importation de méthodes de préparation d'échantillon (ultramicrotomie) déjà utilisées pour d'autres techniques d'imagerie n'aurait pas été aussi rapide et aussi réussie sans cette mise en commun de nos connaissances.

La collaboration avec le Professeur Marie-Pierre Bralet et François Le Naour a permis de montrer que les lipides peuvent être plus que de simples messagers cellulaires et d'établir leur implication dans des pathologies hépatiques. Le fait de travailler la main dans la main avec un médecin, anatomopathologiste de surcroît, m'a montré à quel point l'histologie pouvait être complémentaire de l'imagerie par spectrométrie de masse. Il me semble à présent que dissocier ces deux techniques serait se priver d'un grand nombre d'informations facilitant l'acquisition des images ioniques mais aussi leur interprétation.

Enfin, l'étude des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* a été celle qui m'a demandée le plus d'adaptation et de créativité. La mise au point des protocoles de préparation d'échantillon représente une grande partie du travail accompli. De plus, il s'agit du travail le

plus complet que j'ai mené au cours de ma thèse, puisque j'ai eu à utiliser différents instruments, comme le MALDI-TOF, le LTQ-Orbitrap et évidemment, le ToF-SIMS.

Cela dit, ces trois années de thèse n'ont pas suffi à faire le tour de la question. De nombreuses autres applications sont en cours d'étude. L'une d'entre elles concerne l'analyse de végétaux, et de graines de plantes plus précisément. Ce travail est mené par Alexandre Seyer, étudiant en doctorat. Cette nouvelle thématique demande à son tour des développements méthodologiques, notamment dans la préparation des échantillons. Les avancées technologiques dont pourrait bénéficier l'imagerie ToF-SIMS, en plus de la préparation des échantillons, serait la mise au point d'une spectrométrie de masse tandem, avec un instrument ToF/ToF-SIMS par exemple. L'identification de certains composés s'en trouverait facilitée. Du point de vue des sources d'ions primaires, si les sources d'agrégats exotiques (comme celles délivrant des agrégats d'or Au_{400}^{4+}) pouvaient être focalisées, la gamme de masse accessible augmenterait encore mais aussi la sensibilité de part la fluence qui pourrait être envoyée sur l'échantillon sans pour autant entraîner un endommagement excessif de l'échantillon.

Quoi qu'il en soit, il semble évident que l'imagerie par spectrométrie de masse a un bel avenir devant elle, et qu'il est important de la faire connaitre des autres communautés scientifiques afin qu'elle puisse prendre toute son ampleur dans les années à venir.

Liste des Figures

Introduction générale

Figure 1: Historique du développement des méthodes d'ionisation depuis 1922. 8

Figure 2: Historique du développement des analyseurs de masse depuis 1940. 8

Figure 3: Schéma de principe de l'ionisation SIMS. 11

Figure 4: Influence du rendement d'ionisation secondaire et de la section efficace d'endommagement sur l'efficacité, d'après la référence 14

Figure 5: Schéma de principe de fonctionnement d'une source LMIS d'après la référence 18

Figure 6: Images ToF-SIMS enregistrées en bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Images de 256 x 256 μm^2. (256 x 256 pixels, Fluence: 10^{12} $ions.cm^{-2}$), d'après la référence 46. 19

Figure 7: Schéma de principe de l'ionisation MALDI..... 20

Figure 8: Schéma de principe de l'ionisation Electrospray d'après la référence 24

Figure 9: Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode linéaire 27

Figure 10: Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode reflectron. Les ions représentés ont le même rapport *m/z* mais des énergies cinétiques initiales différentes. 29

Figure 11: Principe de l'extraction retardée. 30

Figure 12: Principe de la fragmentation des ions métastables dans un analyseur par temps de vol équipé d'un reflectron. L'ion bleu représente l'ion précurseur. Les ions violets et verts représentent les ions issus de la fragmentation du précurseur. 31

Figure 13: Schéma de principe de l'Orbitrap. 32

Figure 14: a) Photographie du ToF-SIMS IV présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN ; b) Schéma de principe du spectromètre ToF-SIMS IV. 33

Figure 15: Principe de fonctionnement des plaques de déflection permettant la sélection de l'ion primaire dans la source du ToF-SIMS.[47] 34

Figure 16: Modes de fonctionnement des sources d'agrégats équipant les instruments de type ToF-SIMS IV. 36

Figure 17: Photographie du spectromètre de masse Voyager DE-STR présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN. 37

Figure 18: a) Schéma de principe d'un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap, b) Photographie de l'instrument présent au laboratoire de spectrométrie de masse de l'ICSN. 38

Figure 19: Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS et MALDI-TOF. L'échantillon choisi en exemple est un cerveau de souris. 40

Figure 20: Signification des informations fournies avec une image ionique. 44

Figure 21: Images MALDI obtenues avec un MALDI-LIFT-TOF en mode reflectron avec un taux de répétition de 50 Hz avec les matrices CHCA/ANI (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique/Aniline) et CHCA (acide α-cyano-4-hydroxycinnamique), a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif ; c) Anatomie du cerveau de rat, d'après la référence 106. 50

Figure 22: a) Photographie de la coupe de cerveau de rat analysée, b) Distribution latérale mesurée par LA-ICP/MS du cuivre, c) Distribution latérale mesurée par LA-ICP/MS du zinc. ($m/\Delta m$=300), d'après la référence 97. 51

Figure 23: a) Image optique d'une biopsie de rein de patient atteint de la maladie de Fabry, b) Image ionique des digalactosylcéramide Ga_2 (*m/z* 880-1030) et c) Image ionique des globotriaosylceramide Gb_3 (*m/z* 1040-1200) enregistrées en mode d'ionisation positif. Images de 500 x 500 µm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{12} ions.cm^{-2}), d'après la référence 103..... 52

Figure 24: a) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain contrôle, b) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain volontairement exposé à l'arsenic, c) Distribution de l'arsenic (^{75}As) dans un cheveu humain suspecté d'être contaminé. Images de 90 x 90 mm^2 (a et b), de 80 x 80 mm^2 (c). Échelle logarithmique, d'après la référence 124. .....

Chapitre I

Profilage en profondeur d'une coupe de cerveau de rat

Figure 1: Résultats de dynamique moléculaire, d'après la référence 12. 69

Figure 2: Principe du «*dual beam depth profiling*»..... 70

Figure 3: Schéma de principe du fonctionnement de la source d'ions fullerènes développée par Ion Tof GmbH, d'après la référence 73

Figure 4: Simulation des trajectoires d'agrégats de bismuth et de carbone lors de l'impact sur un tissu adipeux de 300 Å d'épaisseur (densité supposée: 0.92 g/cm^3, composition élémentaire: H 11.97%, C 63.8%, N 0.8%, O 23.26%, Na 0.05%, Cl 0.12%). Les points rouges indiquent les trajectoires des projectiles, tandis que les verts et les bleus montrent les atomes du solide déplacés. 77

Figure 5: Intensités en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+, mesurées en bordure du corps calleux à la surface d'une coupe de cerveau de rat, a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif, d'après la référence 21. 79

Figure 6: Somme des intensités des ions du cholestérol (mode positif, *m/z* 369 et 385) en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+, mesuré en bordure du corps calleux à la surface d'une coupe de cerveau de rat. Les données sont les mêmes que celles de la Figure 5 avec une échelle en abscisse élargie, d'après la référence 21. 80

Figure 7: En haut : images vidéo enregistrées avant et après l'expérience de profilage. Les carrés blancs indiquent la zone qui a été imagée. En bas : cartes de densité ionique de différents ions enregistrés à différentes étapes du profilage en profondeur d'après la référence 21. 82

Figure 8: Evolution des intensités de différents ions, en mode positif et négatif, en fonction de la fluence d'ions primaires C_{60}^+. Les données sont les mêmes que celles de la Figure 4, mais l'échelle deabscisses a été élargie, d'après la référence 21. 83

Chapitre II

Identification de sang rituel dans des objets d'art africains

Figure 1: Carte du pays Dogon..... 92

Figure 2: Statuettes anthropomorphiques *dege,* Musée du quai Branly (n° d'inventaire 71.1935.105.159 et 71.1935.60.332)..... 92

Figure 3: *Boli* zoomorphe, Musée du quai Branly (n° d'inventaire 71.1931.74.1091). 93

Figure 4: Exemple de spectre d'absorption X. 97

Figure 5: Exemple de positionnement d'un prélèvement effectué sur la statuette 71.1935.60.332. 99

Figure 6: Résumé des différentes étapes de la préparation des échantillons pour l'imagerie chimique. 100

Figure 7: Adaptateur pour le support ToF-SIMS utilisé pour l'analyse des échantillons enrobés. Vue générale (gauche) et vue avec un échantillon (droite)[23]. 101

Figure 8: Etude en ToF-SIMS d'un fragment de patine de la statuette 71.1931.105.169 (D1). Images correspondant à différents fragments d'acides aminés et image correspondant à leur somme. Images de 500 x 500 µm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,49 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 104

Figure 9: Localisation des protéines pour les échantillons D1 (a, b, c) et B2 (d, e, f) ; a), d) Images microscopiques des coupes ; b), e) Distributions spatiales des protéines en ToF-SIMS (somme des acides aminés). Images de 500 x 500 µm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}), c et f : Images infrarouge de la bande amide I des protéines..... 105

Figure 10: Structure de l'hème. 106

Figure 11: Spectres de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, de produits de référence de porphyrines et de l'hémoglobine. (a) Hémine, (b) Complexe Zn (II) – protoporphyrine IX, (c) Protoporphyrine IX, (d) Hémoglobine. 107

Figure 12: Spectre de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, d'un échantillon provenant de l'objet nommé B3, montrant la présence d'hème. (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 109

Figure 13: Distribution spatiale des protéines et des fragments de l'hème sur un échantillon provenant de l'objet nommé B3. Images de 500 x 500 µm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,2 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 109

Figure 14: Spectre de masse ToF-SIMS, en mode d'ionisation positif, d'un échantillon provenant de l'objet nommé B1. 110

Figure 15: Distribution spatiale des protéines et des fragments de l'hème sur un échantillon provenant de l'objet B1. Images de 500 x 500 µm^2. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,1 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 110

Figure 16: a) Image optique de l'échantillon issu de l'objet nommé D1 ; b) Cartographie du fer par fluorescence X, correspondant au carré rouge sur l'image optique (95 x 95 µm2) ; c) Spectre de fluorescence X de la zone de protéines (délimitée en blanc) ; d) Spectre de fluorescence X d'une référence de sang séché de poule..... 112

Figure 17: a) Spectre XANES d'un grain de minéral de l'échantillon issu de l'objet nommé D3 ; b) Spectre XANES de référence de la gœthite. 113

Figure 18: Superposition des spectres XANES obtenus sur différents échantillons. 113

Chapitre III

Analyse lipidomique de pathologies hépatiques : Stéatose non alcoolique, Adénome et Carcinome hépatocellulaires

Figure 1: Schéma de l'anatomie du foie. 121

Figure 2: Schéma simplifié du lobule hépatique. 122

Figure 3: Image microscopique d'une coupe histologique de foie humain stéatosique congelé. Les zones de stéatose sont entourées en noir (10 µm, Hématéine Eosine Safran). 125

Figure 4: Relation étiologique entre l'insulino-résistance et les stéatopathies non alcooliques. 127

Figure 5a: Métabolisme lipidique dans un foie sain, d'après la référence 127

Figure 5b: Développement de la stéatose hépatique non alcoolique, d'après la référence **Erreur ! Signet non défini.** 128

Figure 6: Image microscoipique d'une coupe au cryostat (10 µm) colorée par l'HES du foie contrôle n°05B3257. Les carrés noirs montrent les zones de 500 x 500 μm^2 qui ont été imagées. 138

Figure 7: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone périportale d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 μm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence: 3 x 10^{11} ions.cm-^{2}). 139

Figure 8: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone périportale d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 μm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 141

Figure 9: Cartes de densité ionique des AG, a) C16:0, b) C18:2 ; c) C18:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 142

Figure 10: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 143

Figure 11: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie contrôle n°05B3257 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en jaune, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG); d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI); e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 144

Figure 12: Image optique d'une coupe au cryostat (10 µm) colorée par l'HES du foie stéatosique n°06B1910. Les carrés noirs montrent les zones de 500 x 500 µm^2 qui ont été imagées. 146

Figure 13: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone périportale d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacyglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 147

Figure 14: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif, d'une zone périportale d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone périportale ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; e) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 148

Figure 15: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la somme

des diacylglycérols (DAG) ; e) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) ; f) Image ionique de la somme des triacylglycérols (TAG) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 150

Figure 16: a) Image des DAG C30 ; b) Image des DAG C36 ; c) Image des DAG C 34 ; d) Image des DAG C32 ; e) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C36 : f) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C34 ; g) Superposition en deux couleurs des DAG C30 et C32. Images de 500 x 500 µm^2. 151

Figure 17: a) Image présentant la ROI correspondant à la zone de DAG C30 ; b) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette ROI ; c) Image montrant la ROI correspondant à la zone de DAG C32/C34 ; d) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette zone ; e) Image présentant la ROI correspondant à la zone de DAG C36 ; f) Histogramme représentant l'intensité de chaque espèce de DAG pour cette ROI. L'intensité des signaux de DAG a été normalisée par rapport à l'aire de la ROI la plus petite (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 153

Figure 18: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une zone centro-lobulaire d'une coupe de foie stéatosique n°06B1910 ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée et la zone entourée en bleu, la ROI de la zone centro-lobulaire ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des triacylglycérols (TAG) ; e) Superposition en deux couleurs des images des phosphatidylinositols (PI) et de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 154

Figure 19: a) Image ionique de l'acide oléique ; b) Image ionique de l'acide linoléique ; c) Image ionique de l'acide stéarique ; d) Image ionique de la somme des acides palmitoléique et palmitique ; e) Image ionique de l'acide myristique ; f) Image ionique de la somme des DAG C36 ; g) Image ionique de la somme des DAG C34 ; h) Image ionique de la somme des DAG C32 ; i) Image ionique de la somme des DAG C30, enregistrées sur une zone centro-lobulaire du foie stéatosique n°06B1910 (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 155

Figure 20: Image microscopique d'une coupe congelée d'adénome hépatocellulaire (10 µm) n°07B452N1 (AHC) colorée par l'HES. Le carré noir montre la zone de 500 x 500 µm^2 qui a été imagée. 157

Figure 21: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique du

cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 158

Figure 22 : a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée, c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique d'un composé détecté au rapport *m/z* 514,36; e) Superposition en deux couleurs des images des phosphatidylinositols (PI) et de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1 (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 159

Figure 23: Superposition en deux couleurs de l'image ionique du composé au rapport *m/z* 514,6 et de, a)l'acide palmitoléique ; b) la vitamine E ; c) la somme des fragments de la sphingomyéline C34:1 ; d) la somme des phosphatidylinositols. Images de 500 x 500 µm^2. 160

Figure 24: a) Image ionique de l'acide myristique ; b) Image ionique de l'acide linoléique ; c) Image ionique de l'acide palmitique, enregistrées sur une coupe de foie tumoral n°07B452N1 (AHC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions)..... 161

Figure 25: Image microscopique d'une coupe congelée (10 µm) de la tumeur n° 07B4398 (CHC) colorée par l'HES. Le carré noir montre la zone de 500 x 500 µm^2 qui a été imagée. 161

Figure 26: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B4398 (CHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique du cholestérol ; d) Image ionique de la vitamine E ; e) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; f) Image ionique de la somme des phosphatidylcholines (PC) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 162

Figure 27: a) Spectre de masse ToF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de foie tumoral n°07B4398 (CHC) ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre : le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée ; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique de la somme des fragments de la sphingomyéline (SM) 34:1; e) Image ionique de la somme des phosphatidylinositols (PI) ; f) Superposition en deux couleurs des images d et e (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 163

Figure 28: Spectre ToF-SIMS enregistré sur un dépôt d'une solution de triacylglycérol de référence (Sigma-Aldrich) en mode d'ionisation positif. (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence: 1,26 x 10^{11} ions.cm^{-2}).. 166

Chapitre IV

Analyse qualitative et quantitative des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* lors du processus de swarming

Figure 1: Mécanisme de formation d'un biofilm, 1-2 : Etape d'adhésion, 3 : Maturation, 4 : Entretien, 5 : Détachement, d'après la référence 182

Figure 2: Forces gouvernant le choix de former un biofilm, d'après la référence 184

Figure 3: Image microscopique d'une croissance de la souche naturelle de *Bacillus subtilis* au bout de a) 11 heures d'incubation ; b) 13 heures d'incubation ; c) 19 heures d'incubation. Les flèches indiquent l'« anneau » de surfactines (d'après Simone Séror, communication privée). 186

Figure 4: Structure générale des surfactines. n varie de 6 à 10. 187

Figure 5: Images microscopiques de transferts de motifs de « *swarming* », a) Motif de la souche 168 sfp^+ : certaines régions du transfert sont inexploitables du fait des irisations qui se sont produites lors du transfert ; b) Motif de la souche 168 sfp^+ : les dendrites visibles en bas de l'image ont été écrasées lors du transfert ; c) Extrémité d'une dendrite formée par la souche 168 sfp^+ dont la structure a été détruite ; d) Motif de la souche 36 10 (naturelle) parfaitement transféré ; e) Extrémité d'une dendrite formée par la souche 36 10 parfaitement transférée. 191

Figure 6: Spectres MALDI-TOF d'une solution de surfactines commerciales (800 $\mu g.\mu L^{-1}$ dans l'éthanol), a) en mode d'ionisation positif ; b) en mode d'ionisation négatif. 195

Figure 7: Spectre nano-ESI-MS/MS de l'ion à *m/z* 994,6301 (mode d'ionisation positif). 198

Figure 8: Spectre nanoESI-MS/MS de l'ion au rapport *m/z* 1072,70 (mode d'ionisation positif). 199

Figure 9: Spectres enregistrés en début (a) et en fin de journée (b), sur l'anneau de surfactines d'un motif de migration de la souche 168 sfp^+ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 201

Figure 10: Schéma résumant le principe de l'expérience proposée pour déterminer la cause de la diminution du signal des surfactines. Le cercle symbolise l'anneau de surfactines entourant le motif. 202

Figure 11: Spectres enregistrés après différents délais suivant le transfert. Colonne de gauche : à la position 1 (extrémité de la dendrite) ; colonne de droite, à la position 2 (anneau de surfactines) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{11} ions.cm^{-2})..... 203

Figure 12: Spectres enregistrés en utilisant le «*floodgun*». Colonne de gauche : à la position 3 (extrémité de la dendrite) ; colonne de droite : à la position 4 (anneau de surfactines) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^{11} ions.cm^{-2}). 204

Figure 13: Histogrammes montrant l'évolution de la somme des aires des signaux de surfactines en fonction de la fluence d'ions primaires envoyés sur l'échantillon (a et b) et en fonction de la fluence d'électrons envoyés sur l'échantillon (c et d)..... 205

Figure 14: Image microscopique du transfert d'un motif de « *swarming* » de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Le carré noir représente la zone analysée en imagerie ToF-SIMS..... 207

Figure 15: Spectre ToF-SIMS de la région analysée et image ionique de la somme des surfactines, enregistrés en mode d'ionisation négatif (256 x 256 pixels, taille du pixel 90 x 90 µm^2, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^9 ions.cm^{-2}). 207

Figure 16: Spectres extraits des différentes ROIs, a) Image ionique de la somme des surfactines présentant l'emplacement des ROIs ; b) Spectre extrait de la ROI correspondant à la colonie mère ; c) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'anneau ; d) Spectre extrait de la ROI correspondant à une dendrite ; e) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'espace entre les dendrites (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 10^9 ions.cm^{-2})..... 209

Figure 17: Profils de surfactines selon trois axes, a) Image de la somme des surfactines sur laquelle sont dessinés les axes utilisés pour déterminer les profils présentés en b, c et d ; b) de la colonie mère à l'anneau entre deux dendrites ; c) de la colonie mère à l'anneau, en passant par une dendrite ; d) coupe transversale d'une dendrite..... 210

Figure 18: Image microscopique de la dendrite choisie, issue d'une colonie de la souche 168 *sfp*$^+$ de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Les carrés noirs indiquent les régions analysées en imagerie. Les flèches désignent l'anneau de surfactines..... 211

Figure 19: Images ioniques de la somme des surfactines enregistrées à l'extrémité de la dendrite (a) ; à mi-chemin entre la base et son extrémité (b) ; à sa base (c) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5 x 10^{11} ions.cm^{-2})..... 212

Figure 20: Images enregistrées avec la caméra du spectromètre, a) à la base de la dendrite ; b) à son extrémité. Les carrés blancs indiquent la zone qui a été analysée. 212

Figure 21: Superpositions en trois couleurs des images ioniques de la somme des surfactines (en vert), de l'ion au rapport *m/z* 555,28 (en rouge) et de l'ion au rapport *m/z* 765 (en bleu) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) et c) 2 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 10^9 ions.cm^{-2}). 213

Figure 22: Spectres de masse ToF-SIMS, enregistrés en mode d'ionisation négatif, a) sur une goutte de solution de surfactines commerciales déposée sur un disque de silicium ; b) sur un transfert d'une goutte de solution de surfactines commerciales déposée à la surface de la gélose vierge (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 4,1 x 10^{10} ions.cm^{-2}, b) 4,9 x 10^9 ions.cm^{-2}). 214

Figure 23: Image microscopique du transfert d'un motif de swarming de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Le carré noir de 8,5 x 8,5 mm^2 représente la zone analysée en imagerie ToF-SIMS. 215

Figure 24: Spectre ToF-SIMS de la région analysée et image ionique de la somme des ions des surfactines enregistrés en mode d'ionisation négatif (256 x 256 pixels, taille du pixel 33 x 33 μm^2, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,57 x 109 ions.cm^{-2}). 216

Figure 25: a) Image ionique de la somme des ions des surfactines présentant l'emplacement des ROIs ; b) Spectre extrait de la ROI correspondant à l'anneau ; c) Spectre extrait de la ROI correspondant à la colonie mère (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,57 x 10^9 ions.cm^{-2}). 217

Figure 26: Superpositions en trois couleurs des images ioniques de la somme des surfactines (en vert), de l'ion au rapport *m/z* 555,28 (en rouge) et de l'ion au rapport *m/z* 765,47 (en bleu) (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 2,6 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 6,57 x 10^9 ions.cm^{-2}). 218

Figure 27: a) Image microscopique de la dendrite analysée issue d'une colonie de la souche sauvage de *Bacillus subtilis* après 16 à 17 heures d'incubation. Les carrés noirs indiquent les zones analysées en imagerie ToF-SIMS ; b) Images ioniques de la somme des ions des surfactines enregistrées le long de la dendrite en mode d'ionisation négatif. (256 x 256 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 5,1 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 218

Figure 28: Évolution du processus de « *swarming* » au cours du temps. Les noms des souches sous les photographies précisent les moments auxquels les différentes mutations de la souche *168 sfp*$^+$ interrompent la migration (d'après Simone Séror, communication privée). 219

Figure 29: Spectres enregistrés en mode d'ionisation négatif sur différents transferts de colonies de souches mutantes de *Bacillus subtilis* (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : a) 2 x 10^9 ions.cm^{-2}, b) 3,5 x 10^9 ions.cm^{-2}, c) et d) 1,7 x 10^{10} ions.cm^{-2}, e) 3 x 10^9 ions.cm^{-2}). 220

Figure 30: a), d) et g) Images microscopiques des transferts des colonies des souches 168 *sfp*$^+$ *Δhag*, 168 *sfp*$^+$ *ΔswrB* et 168 *sfp*$^+$ *ΔphrC* respectivement ; b), e) et f) Images ioniques de la somme des ions des surfactines pour les mêmes souches ; c), f) et i) Superpositions en trois couleurs de la somme des surfactines et des signaux aux rapports *m/z* 555,3 et 765,4 pour les mêmes souches (Taille des images : b) et e) 3 x 3 mm^2, h) 7 x 7 mm^2, 128 x 128 pixels, Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : b) et e) 1,7 x 10^{10} ions.cm^{-2}, h) 3 x 10^9 ions.cm^{-2}). 222

Figure 31: Schéma d'un motif migratoire montrant les positions auxquelles ont été effectués les carottages. 224

Figure 32: Valeurs moyennes de concentration en surfactine avec une chaîne acyle à 15 atomes de carbone, pour les échantillons prélevés à l'intérieur d'une dendrite (a) ; entre deux dendrites (b) ; à gauche d'une dendrite (c) ; à droite d'une dendrite (d). Les positions vont du centre du motif (1) jusqu'à l'extrémité de la boîte (n). 225

Chapitre V

Miscellanées

Etude lipidomique de la régénération nerveuse de la sangsue médicinale

Figure 1: a) Anatomie de la chaîne nerveuse (face ventrale) ; b) Coupe transversale d'*Hirudo medicinalis*. 235

Figure 2: a) Photographie d'un ganglion segmentaire prélevé et mis en culture, b) Schéma d'un ganglion segmentaire. 236

Figure 3: Images vidéo enregistrées avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 500 x 500 µm^2 représente la zone imagée : a) pour le ganglion témoin , b) pour le ganglion après 6 heures de régénération ; c) pour le ganglion après 24 heures de régénérations ; Images ioniques de l'acide oléique, de l'acide stéarique et du phosphatidylinositol 38:4 ; d) pour le ganglion témoin ; e) pour le ganglion après 6 heures de régénération ; f) pour le ganglion après 24 heures de régénération (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 1,5 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 239

Figure 4: Superpositions en trois couleurs de l'acide oléique (en rouge), de l'acide stéarique (en vert) et du PI38:4 (en bleu), a) pour le ganglion témoin, b) pour le ganglion après 6 heures de régénération et c) pour le ganglion après 24 heures de régénération. Images de 500 x 500 µm^2. 240

Comparaison du contenu lipidique de cheveux anciens et modernes

Figure 1: Carte représentant le désert du Taklamakan. 241

Figure 2: Photographies de deux tombes dégagées. 242

Figure 3: Photographie d'une momie présentant un maquillage funéraire et dont les cheveux naturels sont remarquablement conservés. 242

Figure 4: Zones histologiques d'un cheveu humain, d'après la référence 243

Figure 5: Images ioniques des ions PO_2^-, PO_3^- et de la somme de ces deux ions. 244

Figure 6: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation négatif, sur un cheveu moderne ; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 180 x 180 µm^2

représente la zone imagée; c) Image ionique de l'acide oléique; d) Image ionique de l'acide éicosénoïque; e) Image ionique de l'ion au rapport *m/z* 473,37; f) Image ionique du sulfate de cholestéryle (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 2,7 x 10^{12} ions.cm^{-2}). 246

Figure 7: a) Image ionique de l'ion de rapport *m/z* 265,22; b) Image ionique de l'ion de rapport *m/z* 393,44. Images de 180 x 180 μm^2 (Ion primaire: Bi_3^+, Fluence: 2,7 x 10^{12} ions.cm^{-2}). 247

Figure 8: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation négatif, sur deux cheveux anciens; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 220 x 220 μm^2 représente la zone imagée; c) Image ionique de la somme des acides gras (AG) ; d) Image ionique du sulfate de cholestéryle; e) Image du courant ionique total (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6,3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 248

Figure 9: a) Spectre de masse ToF-SIMS, enregistré en mode d'ionisation positif, sur deux cheveux anciens; b) Image vidéo enregistrée avec la caméra du spectromètre: le carré blanc de 220 x 220 μm^2 représente la zone imagée; c) Image ionique de la somme des diacylglycérols (DAG) ; d) Image ionique d'un fragment de cholestérol (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence :6,3 x 10^{11} ions.cm^{-2}). 249

Figure 10: a) Dessin des ROIs pour le cheveu moderne; b) Dessin des ROIs pour un cheveu ancien. La zone rouge représente la cuticule, la zone bleue le cortex et la zone verte, la *medulla*..... 250

Figure 11: Spectres extraits des ROIs correspondant à la cuticule d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b)..... 251

Figure 12: Spectres extraits des ROIs correspondant au cortex d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b). 251

Figure 13: Spectres extraits des ROIs correspondant à la medulla d'un cheveu moderne (a) et d'un cheveu ancien (b)..... 252

Faisabilité de l'imagerie ToF-SIMS d'un coupe de corps entier de souris

Figure 1: a) Image optique de la section sagittale du rat déposée sur quatre plaques MALDI ; b) Superposition des images ioniques appartenant à un unique organe : le cerveau en vert (*m/z* 21952), le thymus en bleu clair (*m/z* 6893), la cavité thoracique en rose (*m/z* 7921), le foie en bleu (*m/z* 14321), le cortex rénal en jaune (*m/z* 4643), le *caecum* en cyan (*m/z* 5155), les testicules en orange (*m/z* 14400) et les muscles en rouge (*m/z* 11836), d'après la référence 37. 254

Figure 2: Photographie du corps de la souris pris dans le bloc de glace (un peu moins de la moitié du corps a déjà été coupé). 256

Figure 3: Photographie d'une coupe de corps entier de souris déposée sur un disque de silicium sectionné. 256

Figure 4: Image d'une coupe de corps entier de souris. 257

Figure 5: Image ionique du sulfate de cholestéryle, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}). 257

Figure 6: Image ionique de l'acide taurocholique, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}). 258

Figure 7: Image ionique de la somme des sulfatides, enregistrée en mode d'ionisation négatif, sur une coupe de corps entier de souris. (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence : 6 x 10^8 ions.cm^{-2}). 258

Figure 8: a) Superposition en deux couleurs des images ioniques de l'acide linoléique (en rouge) et du sulfate de cholestéryle (en vert) ; b) Superposition en deux couleurs des images ioniques de sphingomyéline 34 :1 (en rouge) et de la somme des sulfatides (en vert) ; c) Superposition en trois couleurs des images ioniques de la sphingomyéline 34 :1 (en rouge), de la somme des sulfatides (en vert) et du phosphatidylinositol 38 :4 (en bleu)..... 259

Figure 9: Images ioniques du cholestérol enregistrées sur une coupe du corps entier d'une souris ; a) en mode d'ionisation négatif ; b) en mode d'ionisation positif (Ion primaire : Bi_3^+, Fluence :6 x 10^8 ions.cm^{-2}). 260

Figure 10: a) Superposition en deux couleurs de la somme des diacylglycérols (en rouge) et de la somme des phospatidylcholines (en vert) ; b) Superposition en deux couleurs de la somme des diacylglycérols (en rouge) et du cholestérol (en vert). 261

Liste des Tableaux

Introduction générale

Tableau 1: Matrices couramment utilisées pour l'analyse en MALDI. 22

Tableau 2: Caractéristiques, avantages et inconvénients des différentes techniques d'imagerie par spectrométrie de masse. 48

Chapitre I

Profilage en profondeur d'une coupe de cerveau de rat

Tableau 1: Mesure des sections efficaces d'endommagement, des rendements d'émission ionique secondaire et des efficacités pour l'ion au rapport *m/z* 385, normalisés à ceux des ions Bi_3^+, à partir d'une coupe de cerveau de rat. 74

Tableau 2: Résultats de pénétration de carbone et bismuth dans un tissu adipeux, calculé avec les tables SRIM.[21] 76

Chapitre II

Identification de sang rituel dans des objets d'art africains

Tableau 1: Description des échantillons étudiés. 98

Tableau 2: Liste des fragments d'acides aminés utilisés pour la caractérisation et la localisation des protéines en ToF-SIMS, d'après la référence 1. 103

Chapitre III

Etude lipidomique de pathologies hépatiques : Stéatose non alcoolique, Adénome et Carcinome hépatocellulaires

Tableau 1: Caractéristiques cliniques des patients dont proviennent les échantillons (ZCL: zone centro-lobulaire). 136

Tableau 2: Composition lipidique détectée sur extrait issu de broyat et analyse par chromatographie et par analyse ToF-SIMS sur coupe de 10 µm d'épaisseur. 165

Chapitre IV

Analyse qualitative et quantitative des surfactines sécrétées par *Bacillus subtilis* lors du processus de « *swarming* »

Tableau 1: Description des différentes souches de *B. subtilis* dont le motif de « *swarming* » a été analysé en imagerie ToF-SIMS. 189

Tableau 2: Structures (séquence peptidique et longueur de la chaîne acyle) possibles pour la surfactine de poids moléculaire 993,64 uma et rapports *m/z* des ions fragments b_2, b_3, b_6 et y_6. 198

Annexes

Annexe I

Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams

International Journal of Mass Spectrometry, **2007**,260, 115

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
International Journal of Mass Spectrometry 260 (2007) 115–120
International Journal of Mass Spectrometry
www.elsevier.com/locate/ijms

Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams

Delphine Debois, Alain Brunelle *, Olivier Laprévote

Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, Av. de la Terrasse, F91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

Received 24 August 2006; received in revised form 19 September 2006; accepted 20 September 2006
Available online 25 October 2006

Abstract

The capabilities of time of flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) have been recently greatly improved with the arrival in this field of polyatomic ion sources. This technique is now able to map at the micron scale intact organic molecules in a range of a thousand Daltons or more, at the surface of tissue samples. Nevertheless, this remains a surface analysis technique, and three-dimensional information on the molecular composition of the sample could not be obtained due to the damage undergone by the organic molecules during their irradiation. The situation changed slightly with the low damage and low penetration depth of the C_{60} fullerene ion beams. Recent promising studies have shown the possibility of organic molecular depth profiling using this kind of beams onto model samples. This possibility has been tried out directly onto a rat brain tissue section, which is the most commonly used biological tissue model in TOF-SIMS imaging method developments. The tissue surface has been sputtered with a 10 keV energy fullerene ion beam, and surface analyses were done with a 25 keV Bi_3^+ ion beam at regular time intervals. The total depth which was analysed was more than two microns, with total primary ion doses of more than 10^{16} ions cm^{-2}. Although not in contradiction with results previously published but with much lower doses, it is found that the molecular damage remains too large, thus making molecular imaging very difficult. In addition, most of the lipids, which are usually the main observable molecules in TOF-SIMS, are concentrated close to the sample surface in the first hundreds of nanometers.
© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Imaging mass spectrometry; Depth profiling; Fullerene; Biological tissue; Time-of-flight; Secondary ion mass spectrometry

1. Introduction

Polyatomic ion sources have recently greatly improved the capabilities of TOF-SIMS imaging in the field of biological analysis. Mass spectrometric images can be routinely obtained from tissue samples with ions having mass to charge ratio well above several hundreds of mass units, up to one thousand or more. These images usually have a resolution of a few microns or less, together with a mass resolution of several thousands, thus enabling essential precise mass assignments. The most commonly used cluster ion beams are made of gold or bismuth [1–4], while C_{60} fullerene ions are also very efficient [5]. This method is now considered to be complementary to other mass spectrometry imaging techniques [6]. On the one hand, the Nano-SIMS method, with extreme spatial resolution of a few tens of nanometers, but allowing only elemental analysis [7], and on the other hand the matrix assisted laser desorption-ionization (MALDI) imaging, with the capability to map peptides and proteins of several tens of thousands of Daltons, but with a spatial resolution of a few tens of microns only [8].

In SIMS analysis of non-organic samples, three-dimensional analyses are usually achieved using the so-called dual beam depth profiling method [9]. A first low energy beam sputters the sample surface, causing the minimum atomic displacements, while a second ion beam, with the highest sensitivity, is used to analyze layer after layer of the sputtered sample surface. Such measurements are extremely difficult to achieve with organic samples. Indeed, the energy deposited by the sputtering beam in the layers below those which are removed causes too much damage to the fragile organic molecules. It is therefore hopeless to expect non-fragmented molecular ions to be desorbed. Fullerene and SF_5^+ cluster ion beams have recently been tested for molecular depth profiling onto model samples and are expected to circumvent the severe drawback of excessive molecular damage [10–16]. In most of these papers, C_{60}^+ ion

* Corresponding author. Tel.: +33 169 824 575; fax: +33 169 077 247.
E-mail address: Alain.Brunelle@icsn.cnrs-gif.fr (A. Brunelle).

1387-3806/$ – see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijms.2006.09.026

doses of several 10^{14} ions cm^{-2} are sufficient to completely remove Langmuir–Blodgett films, trehalose films, histamine in ice, or polymers. These films have been chosen for capability of being uniformly deposited onto silicon substrates with thicknesses of several hundreds of nanometers. It is shown that with a C_{60} probe the sputtering, or removal rate, can exceed the molecular damage and that the molecular ion emission remains quasi uniform layer after layer over a depth of several hundreds nanometers. This is due to both the very high sputtering rate induced by such projectiles, and also because of their very low penetration depth [17]. Then the authors of Refs. [10–16] explain that a fullerene ion beam could be an efficient sputtering probe for molecular depth profiling into organic layers.

The objective of the present work is to test the capabilities of a 10 keV fullerene ion beam to sputter the surface of a rat brain section, which is commonly used as a biological standard in TOF-SIMS imaging [6], coupled with a 25 keV Bi_3^+ beam for the analysis.

2. Experimental

The experiments described in the present paper have been performed using a TOF-SIMS IV (ION-TOF GmbH, Münster, Germany) [18] reflectron-type mass spectrometer located at Tascon GmbH company (Münster, Germany). This machine is fitted with two different primary ions sources and columns. The primary ion source is a bismuth liquid metal ion source (LMIG) which delivers Bi_n^{q+} bismuth cluster ions, with $n = 1$–7 and $q = 1$–2. The kinetic energy of these ions is $25q$ keV (25 keV for singly charged ions and 50 keV for doubly charged ions). The angle of incidence is 45°. Bi_3^+ ions were always selected as it is known that, among all the different bismuth clusters produced by the ion source, these ions offer the best compromise between efficiency and intensity (called "relative specific data rate" in Ref. [4]). The setting of this primary ion column, which was used in the present experiments, ensures the three following features, a good spot size, excellent pulse duration, and high currents. This setting is usually called "high current bunch mode" by the manufacturer [19]. A three-lens ion column focuses the ion beam on the target surface to a spot having a typical size of ~1–2 μm. A double blanking plate system gives primary ion mass selection with repetition rates up to 50 kHz. The primary ion current, which is measured on the grounded sample holder, is ~0.3 pA at 10 kHz. The bunching system gives pulse durations of ~1 ns for Bi_3^+ ions, which ensures a mass resolution exceeding $M/\Delta M = 10^4$ (full width at half maximum [FWHM]) at $m/z > 500$. This spectrometer is able to perform dual beam depth profiling, with the help of a fullerene ion source acting as a sputter gun. The ion column of this gas ion source is equipped with a dynamic 90° deflection unit which ensures the ion species selection (q/m ratio). C_{60}^+ ions with a kinetic energy of 10 keV hit the sample surface with an angle of incidence of 45°. A dual beam depth profiling experiment is performed by the repetition of the following two step sequence:

(i) *Step A*. Irradiation with the C_{60}^+ sputtering beam, with a current of 2 nA, during 1 s, and over an area of 300 μm × 300 μm. The fullerene ion dose density is for each step 2.8×10^{13} ions cm^{-2}.
(ii) *Step B*. A surface analysis with Bi_3^+ primary ions, with a pulsed primary ion current of 0.1 pA at 200 μs, over an area of 110 μm × 110 μm, inside and at the center of the previous sputtered area. The primary ion dose density is for each analysis point 1.5×10^{10} ions cm^{-2}. In that case the bismuth cluster ion beam, which has a focus of ~1–2 μm, is rastered over the surface. Images of each Step B, or of a sum of several Steps B can be obtained, with an area of 110 μm × 110 μm, and 128 × 128 individual pixels.

The overall fullerene ion dose density, obtained by repeating Steps A and B, was in the range $(1.7–3.4) \times 10^{16}$ ions cm^{-2}.

A rat brain was cut at a temperature of −18 °C in a cryostat. Secondary ion emission yields Y, disappearance cross sections σ and efficiencies $E = Y/\sigma$ have been measured, under the impacts of C_{60}^+ and C_{60}^{2+} primary ions, and for the $[M - H]^+$ (m/z 385) ion of cholesterol, inside the *corpus callosum* of a rat brain section, according to the following definitions:

(i) Secondary ion emission yields Y are calculated as the area of the peak of interest (number of detected ions) divided by the number of primary ions having impinged the surface during the acquisition of the spectrum.
(ii) Disappearance cross section σ: $N(t) = N(t=0)\exp(-\sigma It/Ae)$ $N(t)$ is the number of detected particles at time t, $N(t=0)$ the number of detected particles at time 0, I the primary ion current, A the bombarded area, e the elemental charge and σ is the mean area damaged by one primary ion and is a parameter depending on the respective secondary ion species under consideration.
(iii) Secondary ion efficiency E: $E = Y/\sigma$; E is the number of detected secondary ions of a given species per damaged area. This value accounts for the entire analysis process, also including the analyzer transmission and the detector efficiency.

The values have been always measured twice and then compared to those already published under the same experimental conditions with Bi_3^+ primary ion impacts [4]. During these measurements, the fullerene ion source delivers pulsed currents of 0.45 pA for C_{60}^+ ions and 0.13 pA for C_{60}^{2+} ions at 100 μs. The fullerene beam diameter on the sample is 20 μm and the pulse duration of 2 ns. These values need to be compared with those of a Bi_3^+ ion beam, which are, under the same conditions (high current bunched mode), an intensity of 0.45 pA, a focus of less than 2 μm and a pulse duration of less than 1 ns.

The tissue sections, which have a thickness of 15 μm, were immediately deposited onto a stainless steel plate and kept at −80 °C. Just before analysis the plates were warmed to room temperature and dried under a pressure of a few mbar for ~1 h. The experiments were always performed at the edge or inside the *corpus callosum* which is an area easy to recognize on the brain section and at the border of which a lot of lipids are known to vary in concentration [4].

Table 1
Disappearance cross sections σ, secondary ion yields Y and ion bombardment efficiencies E, measured under the impacts of C_{60}^{n+} ions, relative to those measured under the impacts of Bi_3^+ ions [4], and measured for the $[M-H]^+$ ion (m/z 385) of cholesterol in the *corpus callosum* of a rat brain section

Primary ion	$\sigma(C_{60}^{n+})/\sigma(Bi_3^+)$	$Y(C_{60}^{n+})/Y(Bi_3^+)$	$E(C_{60}^{n+})/E(Bi_3^+)$
C_{60}^+	0.061	0.53	8.8
C_{60}^{2+}	0.25	0.47	1.9

The sputtered depths were estimated after the irradiations with the help of a profilometer (KLA Tencor Surface Profilometer Alpha Step 500, Germany) with a precision of ~1.5%.

Stopping powers and projected ranges have been obtained using tables from SRIM 2003, as well as simulations of trajectories and displacements inside matter [20].

3. Results and discussion

Table 1 shows the disappearance cross sections σ, secondary ion yields Y and ion bombardment efficiencies E, measured under the impacts of C_{60}^{n+} ions, relative to those measured under the impacts of 25 keV Bi_3^+ ions [4]. These values have been measured for the $[M-H]^+$ ion (m/z 385) of cholesterol in the *corpus callosum* of a rat brain section. It is clear that the fullerene ions induce much less damage in the organic layers than the bismuth cluster ions, and while the secondary ion emission yields are lower by a factor of ~2 to those of Bi_3^+ ions, the efficiencies are higher. Here C_{60}^+ and C_{60}^{2+} ions, having respectively kinetic energies of 10 and 20 keV, need to be differentiated. C_{60}^+ ions induce a disappearance cross section which is ~16 times lower than for Bi_3^+, and an efficiency which is 8.8 times higher than for Bi_3^+. This ion looks therefore very interesting for spectroscopy and imaging purposes. Nevertheless, it cannot be focused, with the present know-how, to spot sizes smaller than 20 μm under bunched conditions which are necessary for precise mass assignments. This C_{60}^+ ion beam can meanwhile be useful for large area (several square centimetres) imaging, such as a whole rat brain section, where the pixel size is in the range of 50–100 μm. The usefulness of such an ion beam for small area imaging, with a pixel size in the range of 1 μm, is much less convincing if compared to the focused beams delivered by LMIGs. The C_{60}^{2+} ion beam has a disappearance cross section which is only four times lower than that of the bismuth cluster ion beam, and the efficiency is therefore only two times better than for the liquid metal ion gun. Although its kinetic energy is twice the one of the singly charged fullerenes, this ion beam has consequently a poor usability.

The situation is different when aiming at using a fullerene ion beam for sputtering organic layers. Table 2 and Fig. 1 show the results of the SRIM simulations of the penetration of carbon and bismuth in adipose tissue. It is assumed that a cluster behaves, with regards to its energy loss, range and straggling, as the sum of individual components having the same velocity [21]. A C_{60} projectile having a kinetic energy of ~10 keV loses ~500 eV/Å, more than twice the value of a 25 keV energy Bi_3 cluster, and its projected range (*i.e.*, the stopping distance) is ~10 time lower. Fig. 1 reinforces the numerical values of Table 2, showing that the displaced target atoms, which can be more or less considered as an image of the damage in the solid, are localised in a depth of ~50 Å. One can then assume that if a target is sputtered by such a 10 keV C_{60}^+ beam, the top layers can be removed with limited damage to the underlying ones, thus enabling their subsequent analysis by spectroscopy. These considerations are the starting point of all

Table 2
Nuclear and electronic stopping powers, projected ranges, longitudinal and lateral straggling, calculated with the SRIM tables [20], for carbon and bismuth penetrating adipose tissue (assumed density = 0.92 g/cm^3, composition in mass percentage H 11.97%, C 63.8%, N 0.8%, O 23.26%, Na 0.05%, Cl 0.12%)

	C	C_{60}	Bi	Bi_3
Energy/atom (keV)	0.16	0.16	8	8
Energy (keV)	0.16	9.6	8	24
$(dE/dx)_{ele}$ (eV/Å)	0.95	57	10.8	32.4
$(dE/dx)_{nuc}$ (eV/Å)	7.14	428	65.4	196.2
Projected range (Å)	22		212	
Longitudinal straggling (Å)	12		34	
Lateral straggling (Å)	8		24	

The energies of carbon and bismuth atomic projectiles are derived from those of C_{60} and Bi_3, respectively.

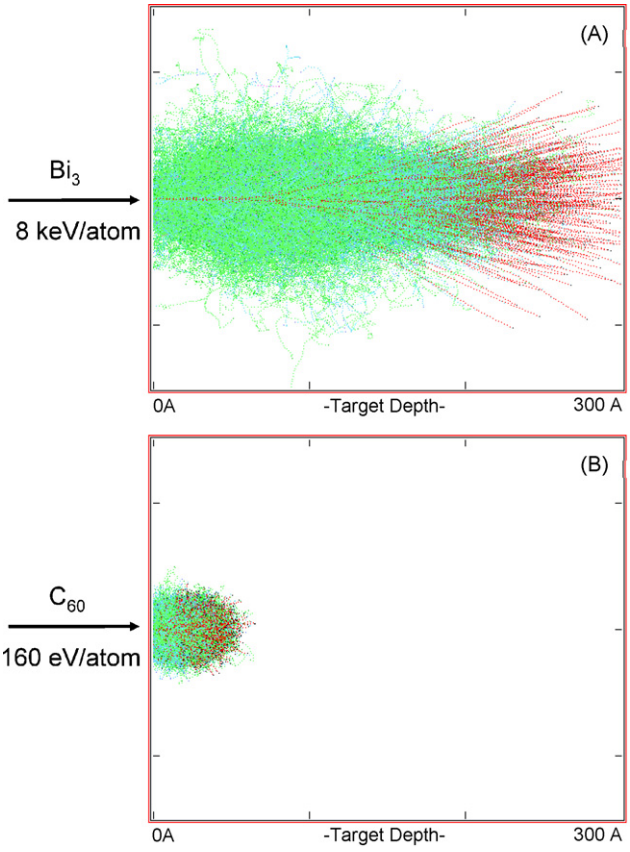


Fig. 1. Simulation made with SRIM [20] of the trajectories of bismuth and carbon clusters in a 300 Å depth target of adipose tissue (assumed density = 0.92 g/cm^3, composition in mass percentage H 11.97%, C 63.8%, N 0.8%, O 23.26%, Na 0.05%, Cl 0.12%). The red points indicate the projectile trajectories and the blue and green ones the displaced target atoms.

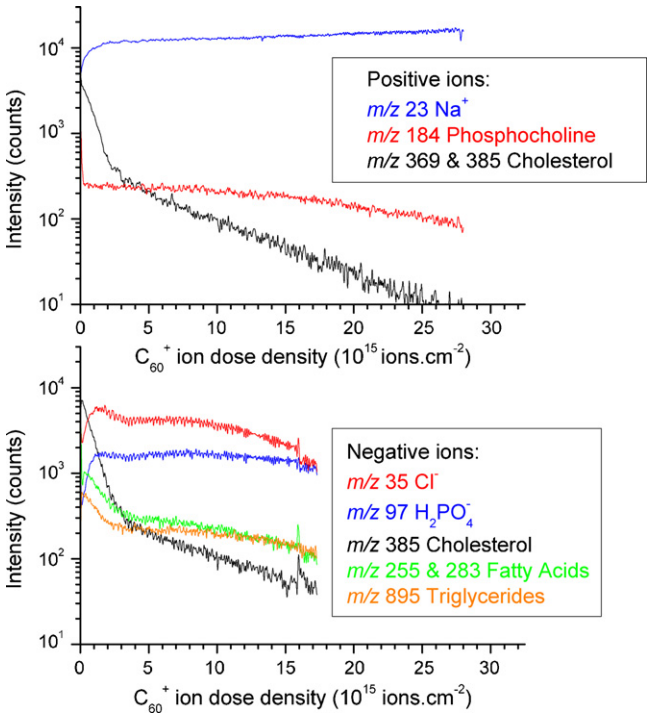


Fig. 2. Intensities as functions of the C_{60}^+ ion dose density, measured at the edge of the *corpus callosum* at the surface of a rat brain tissue section. Top: positive secondary ions Na^+ (*m/z* 23), phosphocholine (*m/z* 184) and cholesterol (sum of *m/z* 369 and *m/z* 385). Bottom: negative secondary ions Cl^- (*m/z* 35), $H_2PO_4^-$ (*m/z* 97), cholesterol (*m/z* 385), fatty acid carboxylate (sum of *m/z* 255 and *m/z* 283) and triglycerides (*m/z* 895).

the previously published depth profiling experiments using C_{60} beams [10–16], as well as for the following experiments.

Fig. 2 shows the intensities of different positive and negative secondary ions as functions of the C_{60}^+ ion dose density. These intensities are measured with Bi_3^+ primary ions (Step B, see above). The sputtered depth has been estimated with the profilometer after the experiment in which the positive secondary ions were measured (top of Fig. 2) and the value was 2–3 μm. The variations of the secondary ion intensities as functions of the fullerene ion dose density enable to distinguish two different groups of secondary ions. On the one hand are the atomic ions and the fragment ions, such as Na^+, Phosphocholine, Cl^- and $H_2PO_4^-$, for which the intensities are relatively constant over the measurement, after brief and very steep increases, or decreases, at the beginning of the irradiation. Then these ions can be considered to be homogeneously distributed over the entire investigated depth, except just at the beginning, which can be considered as a surface cleaning by removal of the first layers. On the other hand, the situation is rather different for molecular ions, such as those of cholesterol, fatty acids and triglycerides. A decrease of the intensity is observed at the beginning of the irradiation, leading to a loss of count rate by a factor of ∼50 when the fullerene ion dose reaches the value of 2.8×10^{15} ions cm^{-2}. This value is estimated to correspond to a sputtered depth of 200–300 nm. Then the slope of the curves suddenly decreases and remains constant until the end of the irradiation. From the slope of the curves during the two regimes, the disappearance cross sections σ_1 and σ_2 (first and second part of the curves, respectively) have been estimated for the positive cholesterol ions to be $\sigma_1 = 3.3 \times 10^{-15}$ cm^2 and $\sigma_2 = 4.0 \times 10^{-16}$ cm^2 (Fig. 3). The experiment has been repeated several times over different areas, with both secondary ion polarities, and similar values are always measured. Sjövall et al. have recently measured the localization and the intensity as a function of sample temperature of lipids in freeze-dried mouse brain sections by TOF-SIMS [22]. An interesting result is that the cholesterol intensity, which is very low for temperatures below freezing, suddenly drops when the temperature is above zero. This was explained by a possible migration of lipids to the tissue surface during the defrosting of the sample. In the present experiments, the tissue section is warmed at room temperature just before the analysis. It is thus possible that lipids concentrate at the tissue surface during this warming. The shape of the curves in Figs. 2 and 3 could then be explained as follows: the true disappearance cross section, due to the damage of the tissue induced by the penetration of the fullerene cluster constituents in the bulk is in fact only σ_2, which has always a relatively low value in the 10^{-16} cm^2 range, thus enabling depth profiling. Unfortunately, most of the lipids are concentrated close to the surface, in the first 200–300 nm. This is also illustrated with the ion images of Fig. 4. Ion images of 110 μm × 110 μm surface have been recorded with Bi_3^+ primary ions. The four rows in Fig. 4 shows the total image (sum of all the Step B measurements), the "top" images (accumulation of the Step B measurements over the first part of the irradiation, *i.e.*, during the steep σ_1 slope, from the beginning to a dose density of 2.8×10^{15} cm^{-2}), and the "middle" and "bottom" images (sum of the Step B measurements during the σ_2 slope, for dose densities ranges of 2.8×10^{15} to 1.5×10^{16} cm^{-2}, and 1.5×10^{16} to 2.8×10^{16} cm^{-2}, respectively). It can be seen that most of the intensity is concentrated in the "top" images for lipids such as cholesterol, while the intensity of the images remains readable until the end of the irradiation for sodium, potassium and phosphocholine ions.

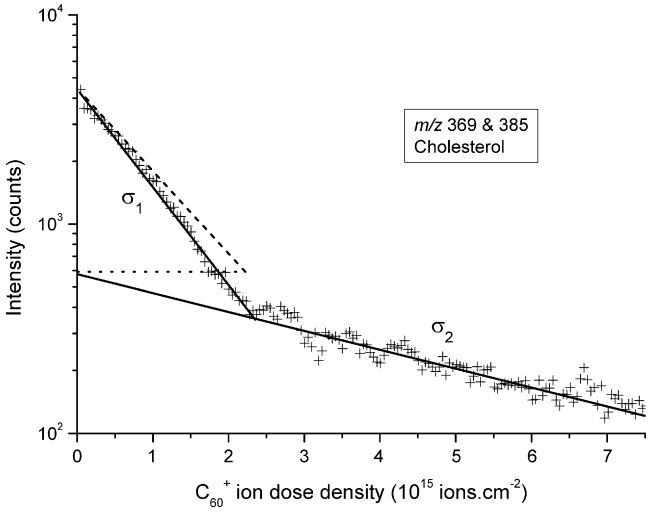


Fig. 3. Intensity as a function of the C_{60}^+ ion dose density, measured at the edge of the *corpus callosum* at the surface of a rat brain tissue section, and for positive cholesterol ions (sum of *m/z* 369 and *m/z* 385). The data are the same as for Fig. 2, but with an enlarged *x*-axis scale.

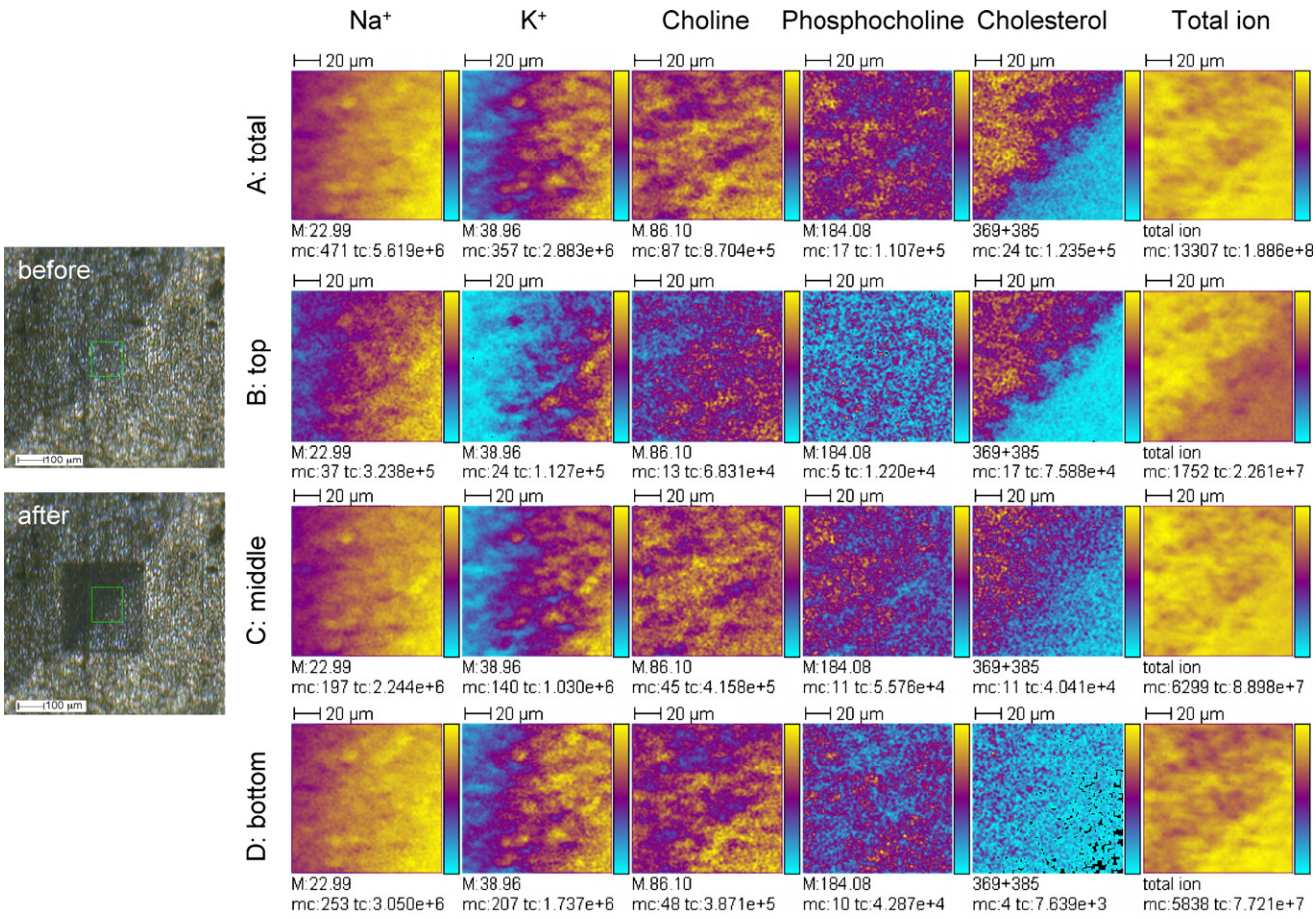


Fig. 4. Left: video images recorded before and after the depth profiling experiment. The *corpus callosum* can clearly be distinguished (dark area on top left). The 300 μm × 300 μm sputtered area is clearly visible. The green rectangle (110 μm × 110 μm) shows the area were the ion images are recorded. Right: secondary ion images of different ions recorded at the edge of the *corpus callosum* at the surface of a rat brain tissue section, at different stages of the depth profiling measurements (resp. total, top = top layers, middle = middle layers, bottom = bottom layers). The *m/z* value of the peak centroid, the maximal number of counts in a pixel (mc) and the total number of counts (tc) are written below each image. The color scales correspond to the interval [0,mc].

Several authors have published depth profiling experiments using a fullerene ion source to sputter the surface of model molecules. In these papers, the sputtered depth was always in the range of several hundreds of nanometers, much less than in the present work, obtained with C_{60} ion dose densities of only several 10^{13} ions cm^{-2}. As an example, Fletcher et al have observed that the variation of cellulose fragments was very weak during the irradiation by a dose of 10^{14} C_{60}^+ ions cm^{-2}. The present work in fact does not contradict the literature if one looks carefully at the irradiation dose densities. In the present work, the *x*-axis scale of the Fig. 2 is much larger. Fig. 5 is a re-drawing of Fig. 2 with an *x*-axis scale limited to 4.0×10^{14} ions cm^{-2}. It is observed in this figure that all the secondary ion intensities remain *quasi* constant in this range, whatever the type of ion, fragment, atomic ion, molecular ion of lipid, positive or negative ion.

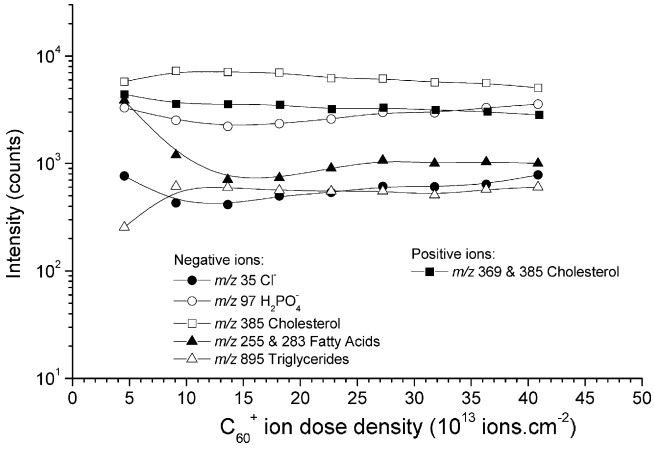


Fig. 5. Intensities as functions of the C_{60}^+ ion dose density, measured at the edge of the *corpus callosum* at the surface of a rat brain tissue section, and for different positive and negative secondary ions. The data are the same as for Fig. 2, but with an enlarged *x*-axis scale.

4. Conclusion

Fullerene ion beams have been used to sputter the surface of a rat brain tissue section, in order to test the possibility of depth profiling into a true biological sample. Although the present results are not in contradiction with the literature, larger ion doses have been reached in the present experiments, showing that the lipids are mainly concentrated in the first 200–300 nm below the sample surface. After having removed these layers,

the concentration of the various lipids is not high enough and the damage induced by the sputter gun remains still too high, although much lower than with metallic heavy ions, to consider dual beam depth profiling experiments in biological samples with a good depth resolution of 1 μm or less. The success of depth profiling in tissue sections remains challenging.

Acknowledgements

Colin Helliwell (ION-TOF GmbH, Muenster, Germany), Birgit Hagenhoff and Elke Tallarek (Tascon GmbH, Muenster, Germany) are gratefully acknowledged for their help and welcome when performing the experiment in Muenster. This work was supported by the European Union (grant LSHG-CT-2005-518194 COMPUTIS).

References

[1] D. Touboul, F. Halgand, A. Brunelle, R. Kersting, E. Tallarek, B. Hagenhoff, O. Laprévote, Anal. Chem. 76 (2004) 1550.
[2] F. Kollmer, Appl. Surf. Sci. 231/232 (2004) 153.
[3] N. Davies, D.E. Weibel, P. Blenkinsopp, N. Lockyer, R. Hill, J.C. Vickerman, Appl. Surf. Sci. 231/232 (2004) 223.
[4] D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, O. Laprévote, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16 (2005) 1608.
[5] D. Weibel, S. Wong, N. Lockyer, P. Blenkinsopp, R. Hill, J.C. Vickerman, Anal. Chem. 75 (2003) 1754.
[6] A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote, J. Mass Spectrom. 40 (2005) 985.
[7] J.L. Guerquin-Kern, T.D. Wu, C. Quintana, A. Croisy, Biochim. Biophys. Acta 1724 (2005) 228.
[8] M. Stoeckli, P. Chaurand, D.E. Hallahan, R.M. Caprioli, Nat. Med. 7 (2001) 493.
[9] E. Niehuis, T. Grehl, in: J.C. Vickerman, D. Briggs (Eds.), TOF-SIMS—Surface Analysis by Mass Spectrometry, Surface Spectra and IM Publications, Manchester and Chichester, 2001, p. 753.
[10] C.M. Mahoney, S.V. Roberson, G. Gillen, Anal. Chem. 76 (2004) 3199.
[11] A.G. Sostarecz, C.M. McQuaw, A. Wucher, N. Winograd, Anal. Chem. 76 (2004) 6651.
[12] A. Wucher, S. Sun, C. Szakal, N. Winograd, Anal. Chem. 76 (2004) 7234.
[13] J. Cheng, N. Winograd, Anal. Chem. 77 (2005) 3651.
[14] J. Cheng, A. Wucher, N. Winograd, J. Phys. Chem. B 110 (2006) 8329.
[15] J.S. Fletcher, X.A. Conlan, N.P. Lockyer, J.C. Vickerman, Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 6513.
[16] G. Gillen, J. Batteas, C.A. Michaels, P. Chi, J. Small, E. Windsor, A. Fahey, J. Verkouteren, K.J. Kim, Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 6521.
[17] K. Boussofiane-Baudin, A. Brunelle, G. Bolbach, S. Della-Negra, P. Håkansson, Y. Le Beyec, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B 88 (1994) 160.
[18] TOF-SIMS IV product description—September 2002. ION-TOF GmbH, Mendelstr. 11, 48149 Muenster, Germany.
[19] R.N.S. Sodhi, Analyst 129 (2004) 483.
[20] SRIM 2003.26, http://www.srim.org/, J.F. Ziegler, J.P. Biersack, U. Littmark, The Stopping and Ranges of Ions in Solids, Pergamon Press, New York (1985).
[21] H.H. Andersen, A. Johansen, M. Olsen, V. Touboltsev, Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. B 212 (2003) 56.
[22] P. Sjövall, B. Johansson, J. Lausmaa, Appl. Surf. Sci. 252 (2006) 6966.

Annexe II

Identification of ritual blood in African artifacts using ToF-SIMS and synchrotron radiation microspectroscopies

Analytical Chemistry, **2007**, 79(24), 9253.

Identification of Ritual Blood in African Artifacts Using TOF-SIMS and Synchrotron Radiation Microspectroscopies

Vincent Mazel,[†,#] Pascale Richardin,[*,†] Delphine Debois,[‡] David Touboul,[‡,⊥] Marine Cotte,[†,§] Alain Brunelle,[‡] Philippe Walter,[†] and Olivier Laprévote[‡]

Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF), CNRS UMR 171, Palais du Louvre, Porte des Lions, 14, quai François Mitterrand, 75001 Paris, France, Laboratoire de Spectrométrie de Masse, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France, and European Synchrotron Research Facility, 6 rue Jules Horowitz, BP220, 38043 Grenoble cedex, France

A new protocol is implemented to demonstrate the presence of blood in the patina of African art objects from Mali. Divided into three steps, the protocol first consists in demonstrating the presence of proteins and localizing them in the sample's cross sections using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) and synchrotron-based infrared microspectrometry (μFT-IR). In a second time, TOF-SIMS is used to investigate heme, which is a blood marker. If heme is missing, which could mean that it is too degraded to be detected, X-ray microfluorescence (μXRF) and X-ray absorption near-edge microspectroscopy (μXANES) are used to prove the presence of iron in the protein area and to get a fingerprint of its chemical environment. This permits us thus to demonstrate that iron is indeed linked with proteins and not with mineral phases of the sample. Coupled with the ritual context of the objects, this constitutes a proof of the use of blood. Thanks to this protocol, which has the major advantage of avoiding false positive results, the presence of blood has been demonstrated in seven out of the eight studied samples.

African art objects collected in the course of colonial or ethnological expeditions during the 20th century represent unique and very precious material testimony of values and practices, which have in some cases totally disappeared today. Numbers of these objects, which are now parts of the collections of art or ethnologic museums, are partially or completely covered with a so-called "patina". Indeed, different substances were spread out on the objects during religious and ritual ceremonies.[1] Various examples of such patinas in African statuary come from different ethnic groups like the Baoule in Ivory Coast,[1] Lobi in Burkina-Faso,[2] Fang in Gabon, but also Bambara and Dogon in Mali.[3,4] Some of these patinas are constituted by materials which have become solid on the object's surface, like a more or less thick crust.

The bibliographic references come from ethnologic studies, such as the very important work of Marcel Griaule[5,6] who has collected a large number of ritual objects associated with very precious accounts about traditional beliefs of the Dogon. A better understanding of these patinas could explain details of the practices used during centuries throughout ceremonies. An important challenge is to extract unequivocal information about the original constituents of these patinas and the techniques used for their applications on ritual objects. Many substances are used, each product having its religious meaning and importance. Among these, blood is often reported in different religious contexts,[7,8] linked to animal sacrifices. Confirmation of the presence of blood would be very meaningful.

In a previous paper, we described an original analytical protocol based on chemical imaging techniques to study patinas from African statues.[9] The protocol permitted us to study both the mineral and the organic parts of a sample without extraction of the compounds. This approach has the great advantage of being nondestructive for the sample, allowing further analyses to be performed. This feature is very important in the field of cultural heritage because of restricted sampling. The present research follows a similar approach[9] but focuses on the detection of blood in patinas. It aims at showing the possibility, via multitechnical

* Corresponding author. Phone: +33 (0) 1 40 20 24 65. E-mail: pascale.richardin@culture.gouv.fr.

† Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France.

‡ Institut de Chimie des Substances Naturelles.

§ European Synchrotron Research Facility.

Present address: Laboratoire Matériaux et Santé (EA 401), Faculté de pharmacie de Châtenay Malabry, 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry.

⊥ Present address: Department of Chemistry and Applied Biosciences, ETH Zürich, CH-8093 Zürich, Switzerland.

(1) Cornec, S. *Technè* **2000**, *11*, 40−45.

(2) Bogniolo, D. In *Images d'Afrique Noire et Sciences Sociales: les pays Lobi, Birifor et Dagara* (*Burkina Faso, Côte-d'Ivoire et Ghana*); Fiéloux, M., Lombard, J., Kambou-Ferrand, J.-M., Eds.; Karthala-Orstom: Paris, 1993; pp 379−396.

(3) Leloup, H.; Rubin, W.; Serra, R.; BASELITZ, G. *Statuaire Dogon*; Danièle Amez: Strasbourg, 1994.

(4) Bedaux; R.; Person, A. In *Regards sur les Dogon du Mal*; Bedaux, R., Van der Waals, J. D. Eds.; Editions Snoeck: Gent, Belgium, 2003; pp 128−133.

(5) Griaule, M. *Journal de la Société des Africanistes* (*Paris*) **1932**, *II*, 113−122.

(6) Griaule, M., *Journal de la Société des Africanistes* (*Paris*) **1932**, *II*, 229−236.

(7) Brett-Smith, S. *Anthrop. Aesthetics* **1983**, *6*, 47−63.

(8) Ndiaye, F.; Calame-Griaule, G.; Martinelli, B. *L'art Dogon dans les Collections du Musée de l'Homme*; Museum Rietberg: Zürich, Switzerland, 1995.

(9) Mazel, V.; Richardin, P.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Walter, P.; Laprévote, O. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 34−40.

10.1021/ac070993k CCC: $37.00 © xxxx American Chemical Society
Published on Web 11/09/2007

and nondestructive analyses, to demonstrate the presence of blood.

Since the beginning of the 1980s, a large number of articles have been published about blood identification in cultural heritage artifacts. In most cases, they concern the analysis of prehistoric objects, e.g., stone tools or prehistoric paintings. In these studies we can distinguish two kinds of approaches. The first is based on various immunological tests, in which blood immunological properties are involved.[10−13] This process is very powerful, because it can lead to the identification of the species at the origin of the blood. However, its reliability is still controversial.[14−18] In a second approach, blood is identified by showing the presence of hemoglobin or hemoglobin markers such as heme or red blood cells. For that purpose, a lot of different techniques are used, like optical microscopy,[19] electron microscopy,[20] liquid chromatography,[21,22] and colorimetric tests.[12,23] With these kinds of tests, it is not possible to identify the origin of the blood.

Each sample has been first examined by scanning electron microscopy coupled with elemental analysis. Results have shown that they are mostly composed of organic matter with some inorganic phases, consisting of alumino−silicates and calcium carbonates.[24] In only one case out of more than 10 samples, red blood cells have been observed,[25] demonstrating the presence of blood in this patina without ambiguity. These structures are nevertheless not always well preserved, and the observation of red blood cells in a unique sample does not mean that blood is missing in other samples. We therefore decided to develop a new protocol for the identification of blood.

ANALYTICAL STRATEGY

The following protocol, based on the combination of several techniques, has been developed, on the basis of the existing literature and keeping in mind the choice of working without any extractive method: time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) together with techniques based on synchrotron radiation, infrared microscopy (SR-μFT-IR), X-ray microfluorescence (μXRF), and X-ray absorption near-edge microspectroscopy (μXANES). Using these methods, we investigated hemoglobin features and more precisely the occurrence of heme and iron bound with proteins. These three different techniques have been chosen because they are complementary and because of their ability to work on microsamples in a noninvasive way. This last point is essential when working on cultural heritage artifacts.

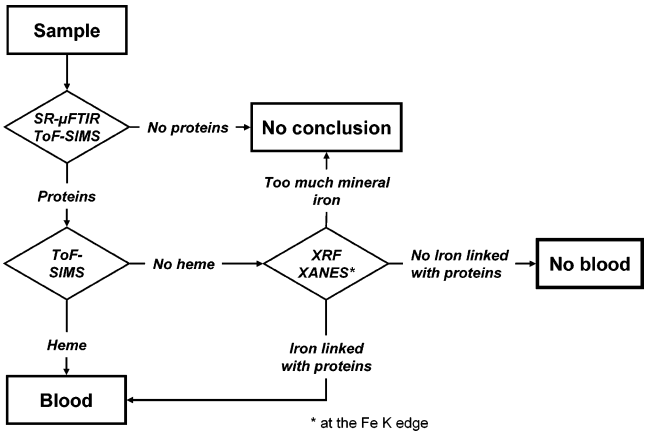


Figure 1. Schematic view of the analytical strategy developed for blood identification.

The strategy is divided into three steps. The first step consists of probing the presence of proteins using both SR-μFT-IR and TOF-SIMS. Indeed, proteins constitute the main part of dried blood. If they are not detected, it means that either blood is not present or blood proteins are fully degraded. Consequently, another analytical strategy has to be implemented.

At the opposite, if proteins are present, TOF-SIMS is used for the identification of the heme group, which is a blood marker. It is well-known that heme can undergo degradation phenomena due to its environmental conditions.[26] So a lack of heme could mean either that proteins do not come from blood or that heme is degraded. This case leads to the third step: iron is probed by μXRF, particularly in regions containing proteins. The occurrence of iron within proteins, coupled with the ritual context of the objects, would constitute a solid proof.

As iron-containing minerals may also be present in the patina, μXRF measurements are coupled with μXANES analyses in order to get a fingerprint of the iron environment in the sample. This will help us distinguishing between iron coming from a mineral phase and iron coming from blood.

This entire approach is summarized in Figure 1.

EXPERIMENTAL SECTION

Samples. The objects studied belong to the collections of the Musée du Quai Branly, Paris, France. The patinas of eight objects from Mali have been analyzed. Among them, three are ritual objects from the Dogon culture. The five other artifacts are *boliw* (in the singular: *boli*), which are among the most important sacred objects from the Bamana culture.[7] All these artifacts have been collected in the first half of the 20th century during ethnological missions, except one of the boliw (inventory no. 73.1967.6.1) which was bought in 1967 by the former Musée des Arts d'Afrique et d'Océanie, Paris. These objects can be dated from the end of the 19th century or the beginning of the 20th century, except the Dogon sculpture (inventory no. 71.1935.105.156) which could be much older (12th to 14th century).

The Dogon artifacts are anthropomorphic wooden statuettes. Two of them are covered with a heterogeneous layer of patina

(10) Newman, M. E.; Yohe, R. M., II; Ceri, H.; Sutton, M. Q. *J. Archaeol. Sci.* **1993**, *20*, 93−100.
(11) Tuross, N.; Barnes, I.; Potts, R. *J. Archaeol. Sci.* **1996**, *23*, 289−296.
(12) Williamson, B. S. *J. Archaeol. Sci.* **2000**, *27*, 755−762.
(13) Lowenstein, J. M.; Reuther, J. D.; Hodd, D. G.; Scheuenstuhl, G.; Gerlach, S. C.; Ubelaker, D. H. *Forensic Sci. Int.* **2006**, *159*, 182−188.
(14) Eisele, J. A.; Fowler, D. D.; Haynes, G.; Lewis, R. A. *Antiquity* **1995**, *69*, 36−46.
(15) Leach, J. D.; Mauldin, R. P. *Antiquity* **1995**, *69*, 1020−22.
(16) Fiedel, S. J. *J. Archaeol. Sci.* **1996**, *23*, 139−147.
(17) Newman, M. E.; Ceri, H.; Kooyman, B. *Antiquity* **1996**, *70*, 677−82.
(18) Newman, M. E.; Yohe, R. M., II; Kooyman, B.; Ceri, H. *J. Archaeol. Sci.* **1997**, *24*, 1023−1027.
(19) Loy, T. H. *Science* **1983**, *220*, 1269−1271.
(20) Hortola, P. *J. Archaeol. Sci.* **2002**, *29*, 733−739.
(21) Loy, T. H.; Hardy, B. L. *Antiquity* **1992**, *66*, 24−35.
(22) Schweitzer, M. H.; Marshall, M.; Carron, K.; Bohle, D. S.; Busse, S. C.; Arnold, E. V.; Barnard, D.; Horner, J. R.; Starkey, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 6291−6296.
(23) Gurfinkel, D. M.; Franklin, U. M. *J. Archaeol. Sci.* **1988**, *15*, 83−97.
(24) Mazel, V.; Richardin, P. *Technè* **2006**, *23*, 69−73.
(25) Mazel, V.; Richardin, P.; Charlier, P. *Actes du 1er Colloque International de Pathographie*, 2005, pp 131−144.
(26) Hiroyuki, I.; Fukutaro, T.; Mineo, I.; Yoshitaka, M.; Yoshimi, S. *Forensic Sci. Int.* **1992**, *57*, 17−27.

Table 1. List of the Samples

sample	ethnic origin of the object	object inventory no.	object type
D1	Dogon	71.1935.105.169	anthropomorphic statuette
D2	Dogon	71.1935.60.332	anthropomorphic statuette
D3	Dogon	71.1935.01.156	anthropomorphic statuette
B1	Bamana	71.1931.74.1091	zoomorphic object (boli)
B2	Bamana	73.1967.6.1	zoomorphic object (boli)
B3	Bamana	71.1902.12.10	composite object (boli)
B4	Bamana	71.1910.1.93	composite object (boli)
B5	Bamana	71.1902.10.15.1-2	composite object (boli)

(inventory no. 71.1935.60.332; inventory no. 71.1935.105.169), whereas the third one (inventory no. 71.1935.105.156) is more homogeneous. Concerning the boliw, two artifacts have a zoomorphic shape made of a structure of bamboo (inventory no. 71.1931.74.1091; inventory no. 73.1967.6.1), whereas the others are made of wood with different shapes (inventory no. 71.1902.12.10; inventory no. 71.1910.1.93; inventory no. 71.1902.10.15.1-2). All of them are covered with a very thick black layer of patina.

Microsamples were removed from the surface of the objects with a clean scalpel blade. In the text the eight studied samples will be named as described in Table 1.

Standard samples of hemin, Zn (II)−protoporphyrin IX, protoporphyrin IX, and bovine hemoglobin were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

Sample Preparation. Preparation of cross sections of the samples has already been described elsewhere.[9] The sample is embedded in a polyester resin (H59 Sodemi, France). The block is then cut by ultramicrotomy using a Diatome diamond knife (Leica Microsystèmes, France) until reaching the core of the sample. All the measurements are then performed on the flat and clean exposed surface.

Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. TOF-SIMS analyses were performed on a TOF-SIMS IV (ION-TOF GmbH, Münster, Germany) reflectron-type TOF mass spectrometer. The primary ion source was a bismuth liquid metal ion gun. A 25 keV Bi_3^+ ion beam was selected with an incidence angle of 45° in the so-called high-current bunched mode.[27,28] This ion source operating mode ensures both a 1−2 μm primary ion beam focus and a high mass resolution ($M/\Delta M = 10^4$ [full width at half-maximum, fwhm] at m/z 500), which is a prerequisite for accurate mass measurements and assignments. Each image was acquired with a primary ion dose density (= fluence) of 10^{11} ions·cm^{-2} and a lateral resolution of 2 μm. Secondary ions are extracted with 2 kV voltage and are postaccelerated to 10 keV kinetic energy just before hitting the detector surface.

During the measurement, the TOF mass spectrum was recorded over the area of each pixel. This allows, on the one hand, drawing the spatial distribution of any compound detected at the surface of the sample and, on the other hand, reconstructing the spectrum of any area of the image. All images shown in this paper are normalized to the total ion current.

Techniques Using Synchrotron Radiation. All the experiments based on synchrotron radiation were performed at the FT-IR and X-ray microscopes of the ID21 beam line, ESRF, Grenoble, France.

FT-IR Microscopy. FT-IR microscopy was performed on the ID21-infrared end station.[29] The instrument is a Nexus spectrometer coupled with a confocal Continuμm microscope, from Nicolet. All measurements were performed in specular reflectance mode, with backgrounds acquired on a gold mirror. Thanks to the high brightness of the synchrotron source, the spot size could be reduced to 12 μm × 12 μm, which was a good tradeoff between lateral resolution and flux. An accumulation of 40 scans was enough to obtain a signal-to-noise ratio of about 2×10^5. Two-dimensional (2D) mapping was performed with a step of 10 μm in each direction, in order to draw chemical image of the vibration bands detected.

Micro-X-ray Fluorescence and XANES. Elemental maps were obtained using the ID21 scanning X-ray microscope. Briefly, the fluorescence excitation is stimulated with a highly monochromatic beam by means of a fixed-exit double-crystal Si (111) monochromator, with a tunable energy ranging from 2.1 to 7.2 keV. For the micro-X-ray fluorescence mapping, the excitation energy was set to 7.2 keV, which is just above the first ionization energy of iron and is very suitable for its detection. Experiments were done under vacuum to improve sensitivity by minimizing absorption and scattering from air. Analyses were performed with a spot size of approximately 0.4 μm × 1.2 μm, obtained thanks to Fresnel zone plates. The microfluorescence signal was collected in the horizontal plane perpendicular to the incident beam direction by using a HPGe solid-state energy-dispersive detector. The detailed setup is described elsewhere.[30]

Areas of 95 μm × 95 μm were mapped on the samples with a step size of 1 μm in each direction. It is then possible to draw the elemental maps, i.e., the spatial distribution of each detected element.

In order to characterize the iron molecular environment, the absorption was measured while tuning the energy of the probing X-ray photons across the Fe K edge. The spectral features observed, namely, the XANES, offer information on iron speciation (oxidation state and coordination).

Measurements were performed in fluorescence mode with an incident energy ranging from 7.1 to 7.3 keV in steps of 0.2 eV and a dwell time of 2 s. The resolution of the monochromator is 0.7 eV and the calibration was performed on an iron foil. Thirty spectra were accumulated for each of the points chosen on the chemical image of iron obtained by XRF.

RESULTS AND DISCUSSION

Localization of Proteins. Intact proteins cannot be detected by TOF-SIMS, but low m/z characteristic fragments can be observed[31,32] (Table 2). The presence of proteins is assessed thanks to the correlation between all the 2D images of these various fragments.[9] Images of the different ions are then added up to increase the signal-to-noise ratio, and the resulting image gives the distribution of the proteins in the sample. Examples of samples D1 and B2 are shown on Figure 2, parts b and e.

(27) Sodhi, R. N. S. *Analyst* **2004**, *129*, 483−487.
(28) Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprévote, O. *J. Mass Spectom.* **2005**, *40*, 985−999.
(29) Susini, J.; Cotte, M.; Scheidt, K.; Chubar, O.; Polack, F.; Dumas, P. *Synchrotron Radiat. News* **2007**, in press.
(30) Susini, J.; Salomé, M.; Fayard, B.; Ortega, R.; Kaulich, B. *Surf. Rev. Lett.* **2002**, *9*, 203−211.
(31) Sanni, O. D.; Wagner, M. S.; Briggs, D. G.; Castner, D. G.; Vickerman, J. C. *Surf. Interface Anal.* **2002**, *33*, 715−728.
(32) Wagner, M. S.; Castner, D. G. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, *231−232*, 366−376.

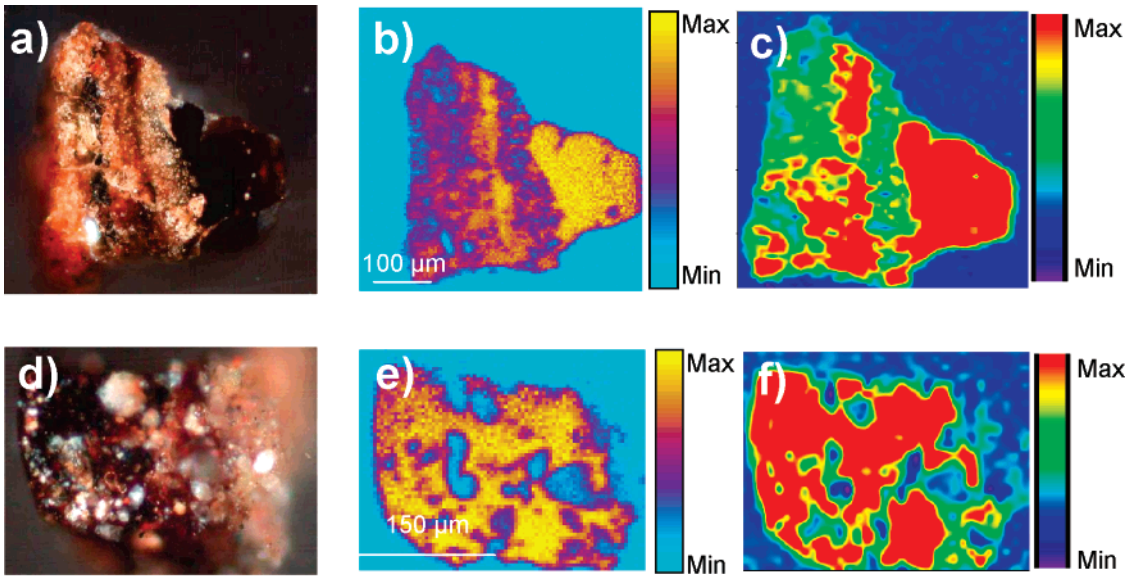


Figure 2. Localization of proteins. Sample D1: (a) microscopic view of the cross section, (b) TOF-SIMS spatial distribution of the proteins (sum of amino acids fragments), and (c) infrared image of the amide I band of proteins. Sample B2: (d) microscopic view of the cross section, (e) TOF-SIMS spatial distribution of the proteins (sum of amino acids fragments), and (f) infrared image of the amide I band of proteins.

Table 2. *m/z* Values Attribution of the Principal Amino Acid Fragments Used for Proteins Characterization and Localization

m/z	ion	amino acid
30.03	CH_4N^+	glycine
44.05	$C_2H_6N^+$	alanine
70.06	$C_4H_8N^+$	proline
72.08	$C_4H_{10}N^+$	valine
84.08	$C_5H_{10}N^+$	lysine
86.09	$C_5H_{12}N^+$	leucine/isoleucine
110.07	$C_5H_8N_3^+$	histidine
120.08	$C_8H_{10}N^+$	phenylalanine
130.06	$C_9H_8N^+$	tryptophan

To confirm this attribution and localization, the image obtained with SR-μFT-IR is correlated with the TOF-SIMS one. The amide I band is chosen to draw the protein image (Figure 2, parts c and f). If the two techniques lead to the same distribution, the presence of proteins as well as their spatial distribution are definitively confirmed.

In all the eight samples, proteins were attributed and located by this way. The investigation process was followed by the characterization of heme by TOF-SIMS.

Characterization of Heme by TOF-SIMS. Heme (MW 616.18) is a complex between an iron ion and a protoporphyrin IX. It is bound to hemoglobin and is responsible of oxygen carriage in organism.

We first studied hemin, Fe(III)−protoporphyrin IX chloride, which is the only commercially available form of heme. Positive ionization mode was found to be the most suitable to analyze this product. The spectrum displayed in Figure 3b shows two main features. First, peaks around *m/z* 616, with a major peak at *m/z* 616.2, can be identified as unfragmented heme ions. The isotopic patterns of $[M]^+$ and $[M + H]^+$ ions are overlapping in the spectra. As hemin is a heme chloride, iron should be present as Fe(III), leading to $[M]^+$ ion, which is indeed the predominant ion. $[M + H]^+$ ion comes from Fe(II)[33] which can be present as an impurity in the sample or also produced during the ionization process.

Between *m/z* 350 and *m/z* 550 a large distribution of peaks centered at *m/z* 480 with a Gaussian-like shape is detected. This distribution is complex and composed of smaller peak distributions separated by 14 amu, which indicates that they arise from the fragmentation of the porphyrin. A test made using the PSD-like mode[34] on the unfragmented ions does not show these kinds of fragments, which means that they are formed in the source, where the processes are more energetic than in the analyzer part. Previous studies in chemical ionization mass spectrometry have shown that the fragmentation of the porphyrin macrocycle was possible and leads to mono-, di-, and tripyrroles fragments.[35−37] According to the mass range, the fragments observed in the spectra of Figure 3 could be assigned to tripyrroles ions.

To ensure these interpretations, spectra of Zn(II)−protoporphyrin IX and metal-free protoporphyrin IX were acquired. For the Zn(II)−protoporphyrin IX, a similar spectrum is obtained (Figure 3c) with the unfragmented ions and the large distribution of fragments. Yet, two differences can be noted. First, the major unfragmented ion is $[M + H]^+$ at *m/z* 625.2, corresponding to Zn(II), as expected for this product. Then, the *m/z* ratio of the fragments is shifted to higher *m/z* values. The only chemical difference between this product and hemin being the metal ion, we can conclude that metal ions are present in the fragments. Nevertheless, the mass shift is approximately 10 amu instead of 8 or 9 amu as expected. This difference could be due to isotopic

(33) Chiavarino, B.; Crestoni, M. E.; Fornarini, S.; Rovira, C. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13* (3), 776−785.
(34) Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O. *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 703−709.
(35) Shaw, G. J.; Eglinton, G.; Quirke, J. M. E. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (13), 2014−2020.
(36) Tolf, B. R.; Jiang, X. Y.; Wegmann-Szente, A.; Kehres, L. A.; Bunnenberg, E.; Djerassi, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108* (7), 1363−1374.
(37) Van Berkel, G. J.; Glish, G. L.; McLuckey, S. A.; Tuinman, A. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111* (16), 6027−6035.

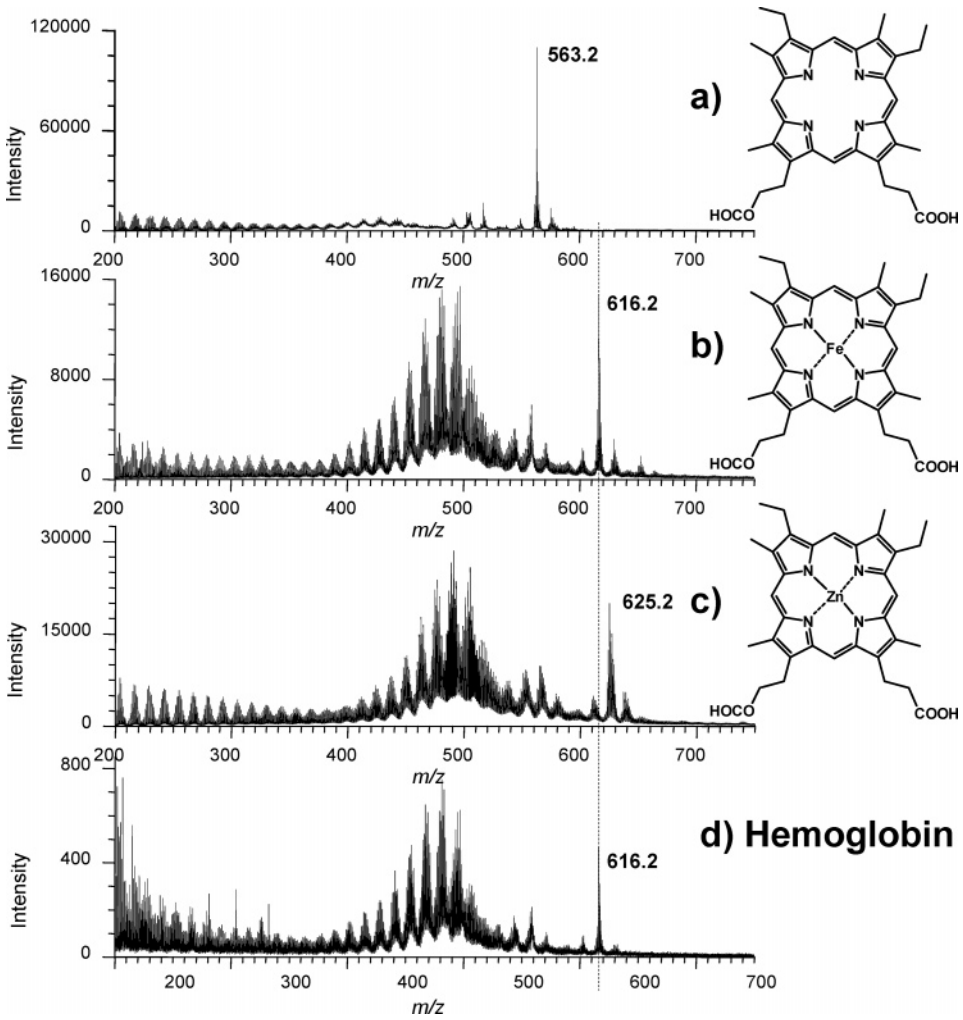


Figure 3. TOF-SIMS spectra of porphyrin standards and hemoglobin: (a) protoporphyrin IX, (b) hemin, (c) Zn(II)−protoporphyrin IX, and (d) hemoglobin.

pattern of Zn and Fe but the complexity of the peaks distribution makes it difficult to verify.

The fragment distribution of the metal-free protoporphyrin IX was also obtained (Figure 3a) but is much less intense and shifted to lower mass values due to the absence of the metal ion. This means that the fragmentation of the porphyrin macrocycle is favored by the presence of the metal ion.

This analysis of standards has demonstrated that TOF-SIMS allows detecting heme thanks to the unfragmented peaks and the distribution of metal-containing fragments, which is confirmed in the spectrum of hemoglobin (Figure 3d). It is thus well-known that heme undergoes degradation due to environmental conditions.[26] We cannot therefore ensure that, even if blood is present, the remaining amount of heme in our samples is sufficient to be detected. Within the eight samples, three different cases were observed.

The first case corresponds to sample B3 (Figure 4a). The recorded spectrum clearly shows all the features of heme, which can be identified with no doubt. Moreover, Figure 4a shows that the spatial distribution of heme corresponds to the one of proteins. We can conclude that this sample, and most generally the patina of the object inventory no. 71.1902.12.10, is composed, at least for a part, of blood.

The second case concerns samples B1, B2, and B5. Spectra obtained by TOF-SIMS still show the characteristic peaks of heme, and heme displays the same spatial distribution as proteins (Figure 4b). Nevertheless, we obtain a much lower signal-to-noise ratio which means that the amount of heme is much lower than in the previous case. Heme is probably more degraded. However, the quantity is still sufficient to be detected by TOF-SIMS and the conclusion is, here also, that blood is present in these samples.

Finally no heme is detected for samples D1, D2, D3, and B4. The limits of blood identification by TOF-SIMS may have been reached; either proteins do not belong to blood, or degradation of heme is too important. Another approach is necessary to confirm or not the lack of blood. Of course, if there is blood, and heme is no longer present, iron should still be detectable in the proteins.

Iron in the Proteins: μ-XRF and μ-XANES Study. On each sample, an area where proteins were detected by μ-FT-IR and by TOF-SIMS was first analyzed by XRF.

Contrary to ion beams or infrared radiations, which only probe the surface of the sample (secondary ions are emitted from a depth of less than 10 nm for TOF-SIMS, and a depth of a few micrometers is analyzed for SR-FT-IR), X-rays collect deeper information in the matter, reaching the core of the sample. Care

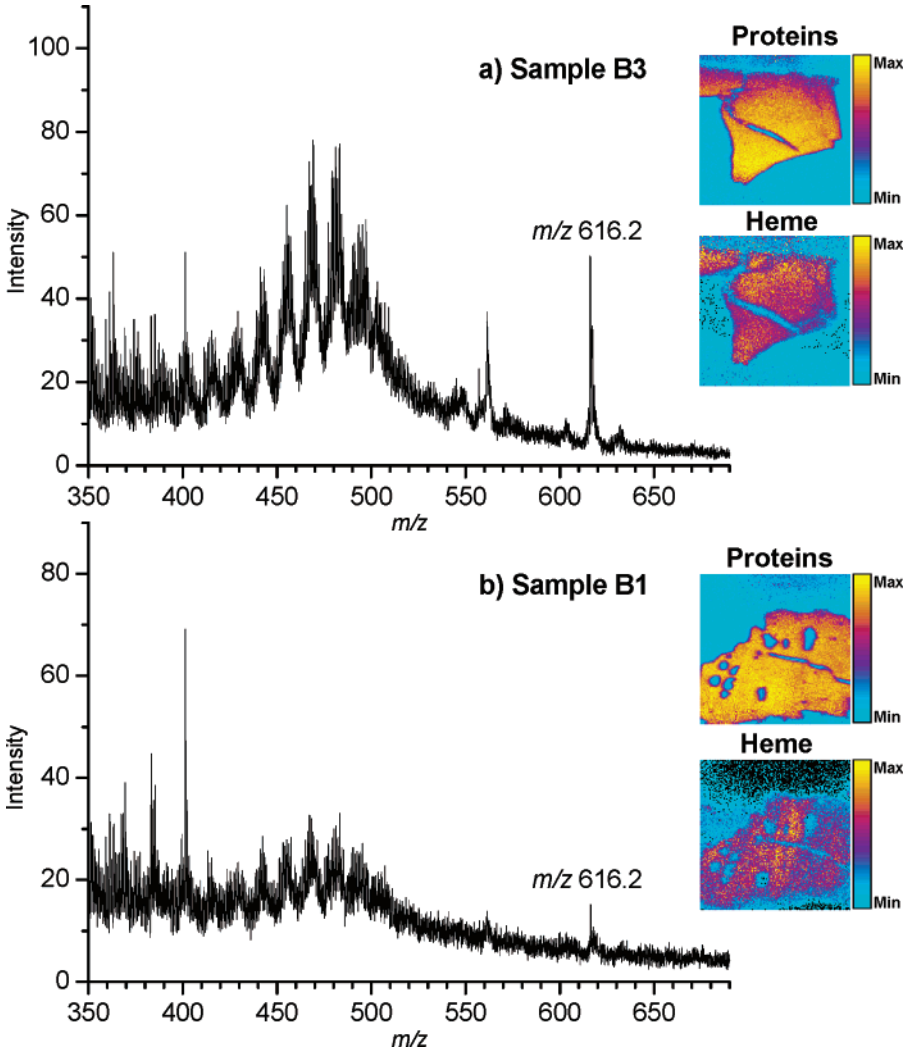


Figure 4. TOF-SIMS study of two samples: detail of spectrum and spatial distribution of proteins (sum of amino acids fragments) and heme (tripyrrole fragments) for (a) sample B3 and (b) sample B1.

must thus be taken when comparing results from these different techniques. Samples may be also composed of a mineral part, consisting mainly of clays, which may contain iron, at least as an impurity. If iron is detected, it can therefore belong to clays underlying the proteins located at the surface. As the energy used provides a low efficiency of fluorescence for low *Z* elements, silicon and aluminum from the clay may not be detected if located in deep layers far below the surface.

The discrimination between iron from mineral and organic matter can first be done with a simple argument. In iron-containing proteins, the spatial distribution of this metal should be homogeneous. To the contrary the distribution of iron in clays underneath the surface should be inhomogeneous when observed by XRF, because clays generally exhibit a shape of microscopic grains.

Figure 5b shows the chemical image of iron in a protein-rich area for sample D1. Both homogeneous (center) and heterogeneous areas (sides) can be distinguished in the image. This proves that the iron signal detected in the central part of the image (Figure 5c) comes from the proteins. Similar results have been obtained for samples D2 and B4. On the contrary, for sample D3, no homogeneous areas can be observed, which means that inorganic compounds may be present beneath the whole surface protein layer.

In order to confirm this interpretation, XANES experiments at the Fe K edge were performed to obtain a fingerprint of iron environment in the sample. Several measurements were done at different points corresponding to the different areas of the image. All the spectra were normalized to 1, far after the edge, to facilitate the comparison. Two different cases were observed.

In the proteins area, a photoreduction phenomenon occurs under the X-ray beam, and the absorption threshold moves to a lower energy during the experiment (Figure 5d). This phenomenon is already well-known for organic materials and more precisely for the analysis of blood by EXAFS (extended X-ray absorption fine structure) and XANES.[38,39] Moreover, all these spectra present a little hump at approximately 7.139 keV which can also be observed on hemoglobin reference spectrum (Figure 5f).

(38) Della Longa, S.; Arcovito, A.; Benfatto, M.; Congiu-Castellano, A.; Girasole, M.; Hazeman, J. L.; Lo Bosco, A. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 549−558.
(39) Carugo, O.; Djinovic Carugo, K. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30* (4), 213−219.

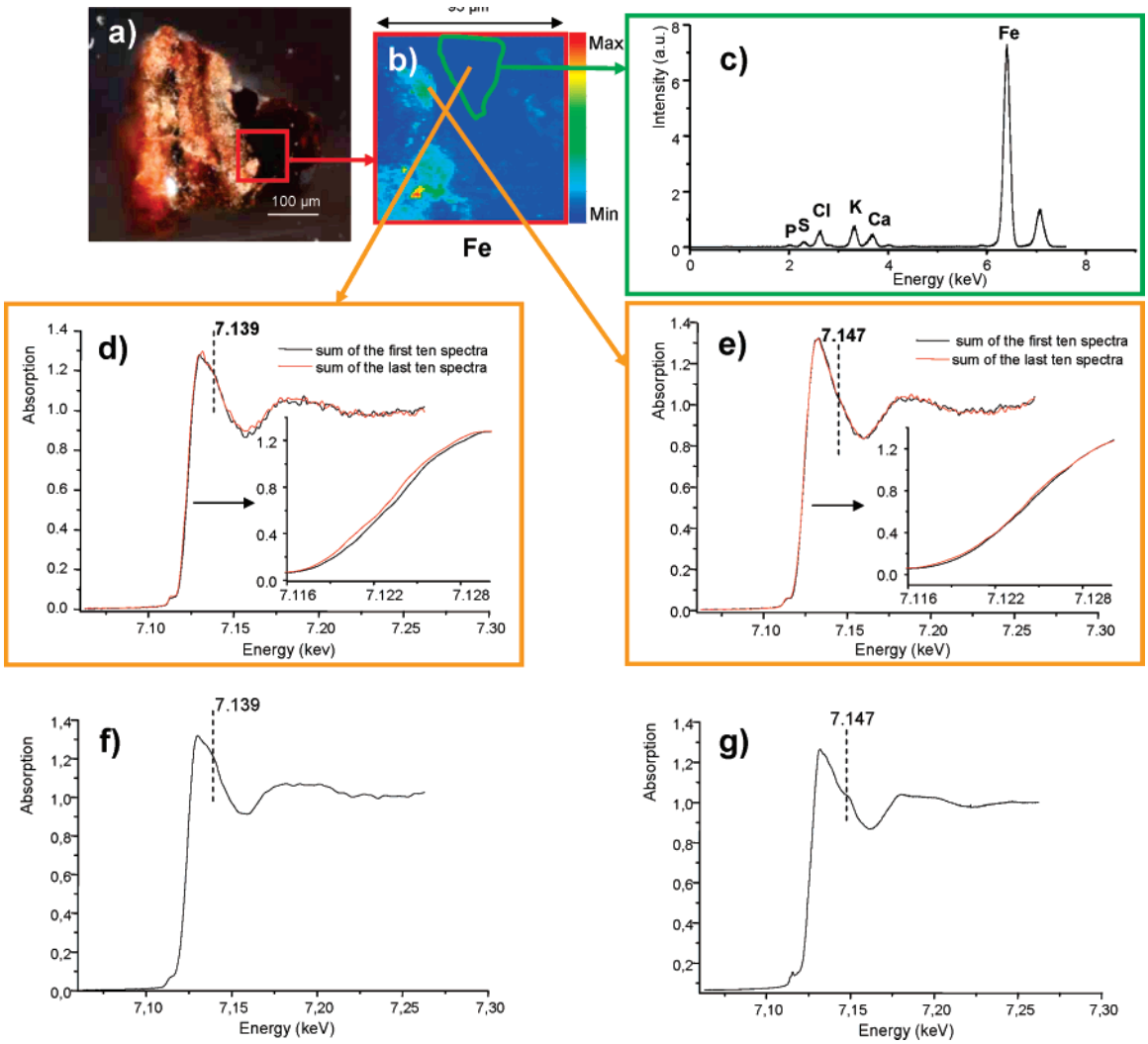


Figure 5. XRF and XANES analysis of sample D1: (a) microscopic view of the sample. The analyzed area is surrounded in red; (b) XRF image of iron; (c) spectrum of the central area; (d) evolution of XANES spectrum for so-supposed organic area; (e) evolution of XANES spectrum for inorganic area; (f) reference spectrum of hemoglobin; (g) reference spectrum of goethite.

For the area where mineral compounds are supposed to be predominant, this evolution is not observed (Figure 5e). All the recorded spectra present the same shape, with in particular a slight hump at approximately 7.147 keV. Similar shapes were obtained for standards of iron oxides like hematite or goethite (Figure 5g) and can be found in the literature for different clays.[40,41]

These results confirm that, in the areas where photoreduction occurs, iron is involved in organic environment, presumably proteins. Such organic iron has been found in samples D1, D2, and B4, confirming the presence of blood in these samples. At the opposite, only mineral-type XANES spectra have been obtained for sample D3. In this sample, the mineral part is too important to allow unambiguous blood identification with our protocol.

CONCLUSIONS

Blood identification on cultural heritage artifact is always a challenge due to the small amounts of sample available. However, this kind of study is fundamental for a better understanding of the objects studied and their meaning. In African art, blood is often reported in the elaboration process of artifacts. The results presented in this paper demonstrate, for the first time, that blood was actually used for the making of patina from seven Dogon and Bamana sculptures.

With the use of a three-step approach, the protocol allows us to identify blood using successively TOF-SIMS, SR-μFT-IR, μXRF, and μXANES. Thanks to a proper and adequate sample preparation, all analyses can be conducted on the same sample in a noninvasive way, enabling the sample to be used for further analyses.

This study has demonstrated our approach being suitable for blood identification in cultural heritage objects, but of course it could also be used in other fields of research. It is important to note that TOF-SIMS could be sufficient for the most recent samples and in which heme is not degraded.

In comparison to other identification techniques such as immunological tests, our approach could appear to be less efficient because some samples, such as D3, could be pointed out as not

(40) Pokrovski, G. S.; Schott, J.; Farges, F.; Hazemann, J.-L. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2003**, *67* (19), 3559−3573.
(41) Giuli, G.; Pratesi, G.; Cipriani, C.; Paris, E. *Geochim. Cosmochim. Acta* **2002**, *66* (24), 4347−4353.

suitable for analysis. Nevertheless, this three-step approach presents the major advantage to avoid false positive results.

ACKNOWLEDGMENT

Part of this study was realized at ESRF, Grenoble, France (experiment CH-1777). The authors thank C. Naffah, director of the Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (C2RMF) and J.-P. Mohen, director of the collections at the Musée du Quai Branly, Paris, for their collaboration and support during this project. We also express our gratitude to A. Gaborit and Y. Allain-Nardone, assistant-curator and conservator, respectively, from the Musée du Quai Branly, for their help during the sampling on a great number of precious objects. We are very grateful to J. Castaing from the C2RMF for his support and advice during this project and to J. Degrouard from the Centre Commun de Microscopie Electronique (UMR CNRS 8080) for his assistance in ultramicrotomy preparation. David Touboul is indebted to the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS) for a Ph.D. research fellowship.

Received for review May 16, 2007. Accepted September 25, 2007.

AC070993K

Annexe III

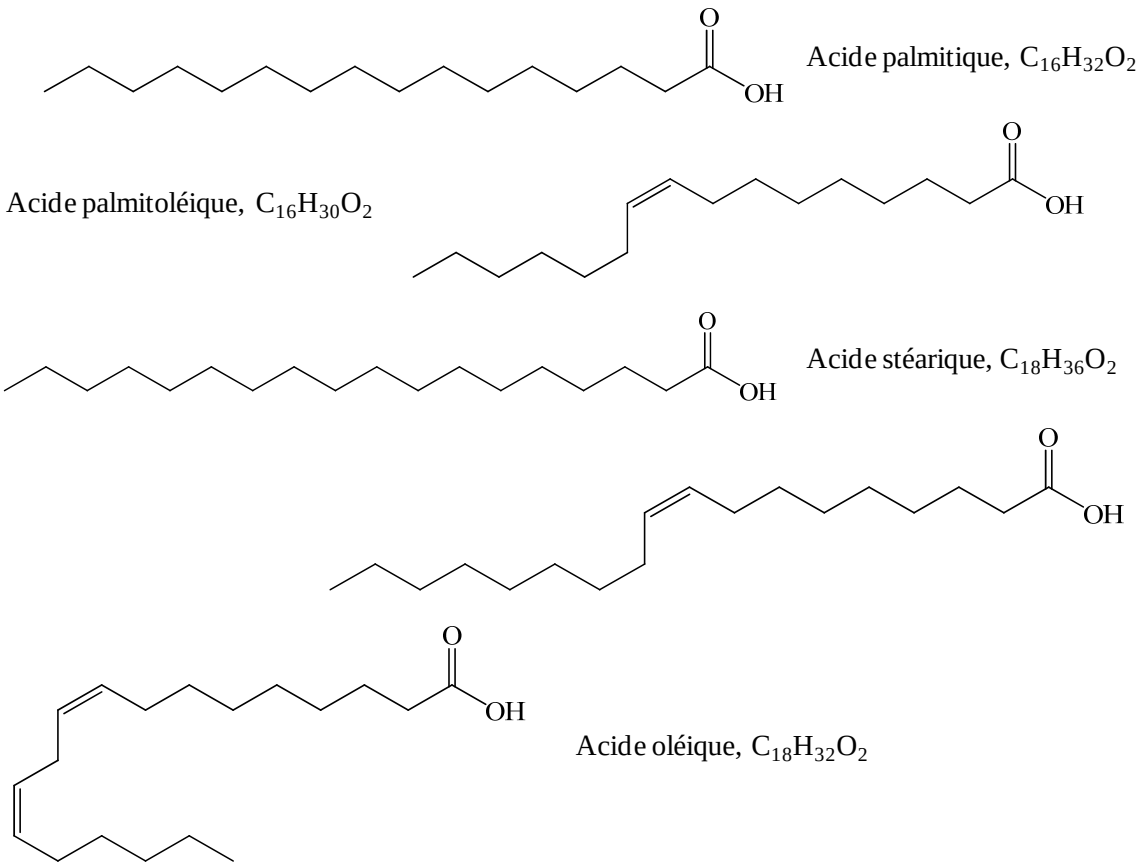
Structures chimiques et principales fonctions biologiques des lipides chez l’homme

Pendant de nombreuses années, les lipides ont été considérés comme de simples entités grasses possédant tout de même deux fonctions : servir de réserve énergétique et de matériau de construction aux membranes cellulaires. Pourtant, les lipides sont de formidables messagers cellulaires essentiels au bon fonctionnement de tout organisme multi-cellulaire. Qu'ils soient à l'état naturel ou estérifié, les lipides sont extrêmement bien structurés, ce qui leur confère la possibilité de se lier à un récepteur unique, d'infiltrer les membranes cellulaires ou d'être transportés à travers ces dernières pour porter une information à d'autres cellules. De plus, les lipides sont souvent impliqués dans la pathogenèse de diverses maladies, comme le cancer ou les maladies cardio-vasculaires, ce qui en fait des cibles thérapeutiques de choix pour les médecins et les biologistes. Depuis la fin des années 70, les lipides ne sont plus relégués au rang de « matière grasse » et sont étudiés de façon très approfondie. Une science a même été inventée pour eux : la lipidomique.

Les lipides sont réparties en différentes classes : les acides gras et éicosanoïdes, les glycérolipides et les sphingolipides. Nous verrons ici quelques exemples de ces lipides, leur structure chimique et leurs principales fonctions biologiques chez l'homme. Nous nous limiterons néanmoins aux lipides rencontrés au cours de ce travail de thèse car les lipides sont une classe moléculaire extrêmement complexe qui ne saurait être résumée en quelques pages.

Les acides gras et éicosanoïdes

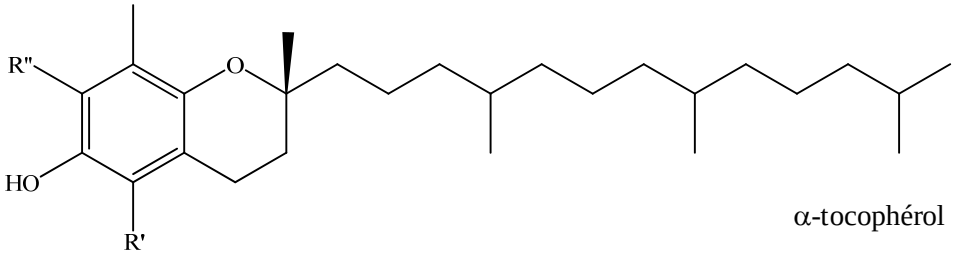
Les acides gras sont les constituants de base des lipides et sont largement responsables de leurs diverses propriétés physiques et métaboliques. Cependant, leur forme non estérifiée (ce que l'on appelle les acides gras libres) sont également d'une grande importance. Ils sont relargués à partir des triacylglycérols au cours de la digestion pour fournir une réserve d'énergie notamment. Néanmoins, il semble de plus en plus évident que les acides gras libres ont d'autres fonctions. C'est le cas de les acides linoléique et linolénique, car ils ne peuvent être synthétisés par les animaux et qui doivent provenir de l'alimentation.



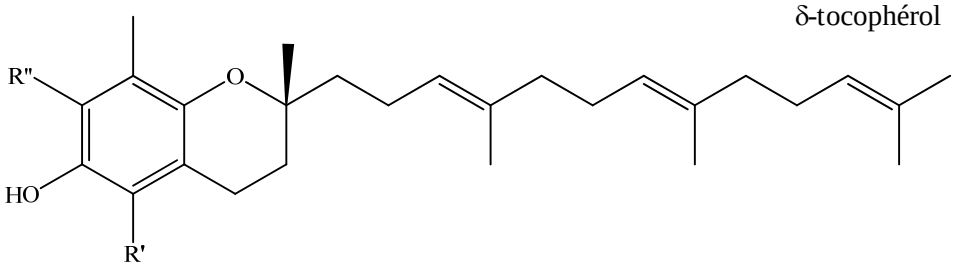
En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les ions des acides gras sont détectés en mode d'ionisation négatif, sous la forme de molécules déprotonées, correspondant aux ions carboxylates de ces espèces.

Les tocochromanols

Le terme « tocochromanol » définit deux groupes de lipides : les tocophérols et les tocotriénols, que l'on retrouve dans les tissus végétaux et les huiles végétales. Bien que ces deux types de lipides soient assimilés d'une façon similaire par les intestins pour être transportés vers le foie, l'α-tocophérol est préférentiellement utilisé et ré-exporté. Ce processus se fait par l'intermédiaire d'une protéine se liant spécifiquement à ce composé, le transférant aux lipoprotéines à basse densité pour le transport vers les tissus périphériques. L'α-tocophérol et, dans un moindre mesure le γ-tocophérol, sont des composants essentiels des mécanismes de défense cellulaire contre les espèces oxydantes endo- et exogènes. Grâce à leur caractère lipophile, ils sont localisés dans les membranes et sont donc immédiatement disponibles pour neutraliser les réactions de péroxydation des lipides.



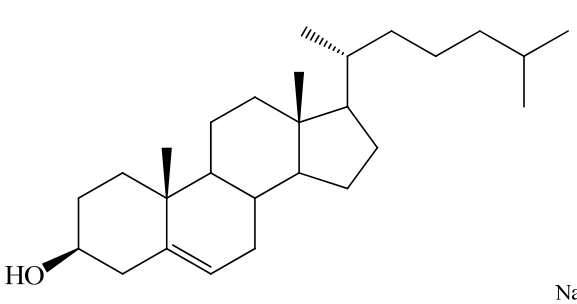
	R'	R''
α-tocophérol	CH_3	CH_3
β-tocophérol	CH_3	H
γ-tocophérol	H	CH_3
δ-tocophérol	H	H



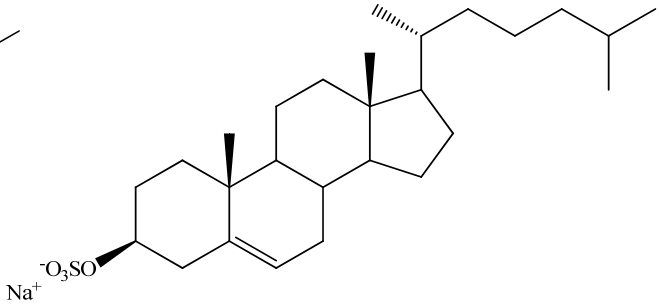
En spectrométrie de masse ToF-SIMS, l'α-tocophérol, aussi appelé (abusivement) Vitamine E, est détecté dans les deux modes d'ionisation. En mode d'ionisation positif, c'est l'ion $M^{+\bullet}$ qui est détecté (*m/z* 430), et en mode d'ionisation négatif, c'est la molécule déprotonée $[M-H]^-$ qui est détectée (*m/z* 429).

Les stérols

Le principal stérol présent dans le corps humain est le cholestérol (cholest-5-ène-3β-ol). Si son existence a été mise en évidence dès 1770, le cholestérol fut pour la première fois isolé à partir de graisses animales en 1815 par le chimiste français Eugène Chevreul. Sa structure chimique ne fut élucidée qu'au cours du 20ème siècle. Le cholestérol peut être décrit comme un polyisoprénoïde ou comme un triterpène :



Cholestérol, $C_{27}H_{46}O$



Sulfate de Cholestéryle, $C_{27}H_{45}O_4SNa$

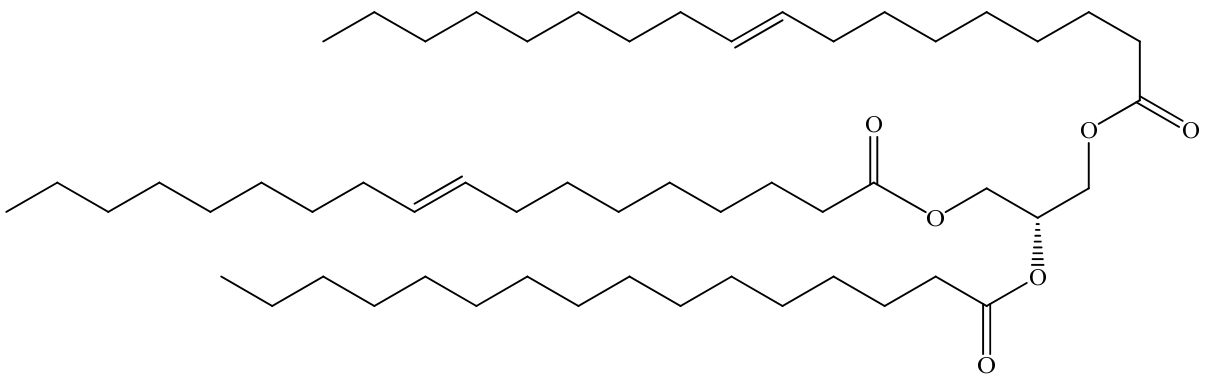
Le cholestérol est présent dans tous les tissus animaux, où il est essentiellement présent dans les membranes. Dans le corps humain, il est principalement localisé dans le cerveau, dans lequel se concentrent 25% de la quantité totale présente dans le corps humain. La fonction principale du cholestérol est de moduler la fluidité des membranes cellulaires en interagissant avec les composants lipidiques de celles ci, tels que les phosphatidylcholines et la sphingomyéline. Sa biosynthèse a lieu dans le foie et est hautement complexe, impliquant pas moins de 25 réactions enzymatiques différentes.

Le sulfate de cholestéryle quant à lui est présent dans toutes les cellules des mammifères, avec une abondance accrue dans la peau. Ses fonctions ne sont encore que partiellement comprises mais il pourrait avoir un rôle dans l'adhésion des cellules, dans leur différenciation et la transduction de signaux intercellulaires.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, le cholestérol est détecté dans les deux modes d'ionisation. En mode d'ionisation positif, deux ions caractéristiques sont détectés. Le premier ($[M-H]^+$) correspond à la molécule ayant subi une perte d'hydrure (*m/z* 385)et le second, un fragment de type $[M+H-H_2O]^+$, correspondant à la molécule protonée ayant perdu une molécule d'eau (*m/z* 369). Le sulfate de cholestéryle n'est pour sa part détecté qu'en mode d'ionisation négatif, sous sa forme M^-, c'est à dire sans son contre ion (*m/z* 465).

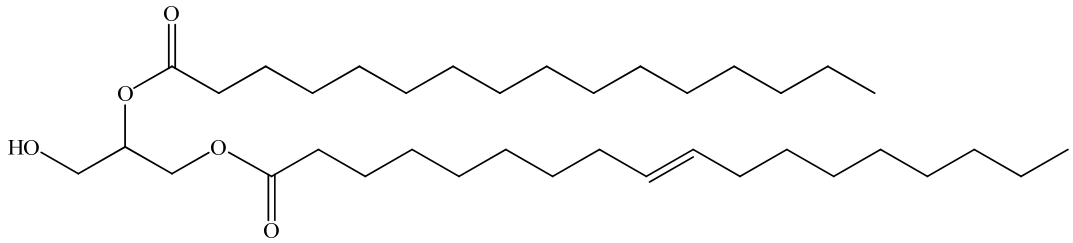
Les mono-, di- et triacylglycérols

Les triacylglycérols représentent la principale ressource énergétique des animaux et des végétaux. Des acides gras sont relargués quand nécessaire par des réactions d'hydrolyse catalysées par des lipases sous contrôle hormonal.



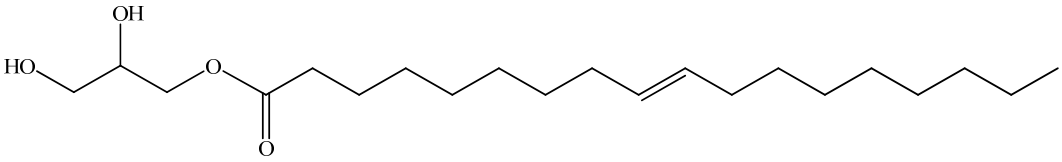
(9E,9'E)-2-(palmitoyloxy)propane-1,3-diyl dioctadec-9-enoate
Triacylglycérol (C52:2), $C_{55}H_{102}O_6$

Les diacylglycérols sont formés en tant qu'intermédiaires de synthèse des triacylglycérols et des phospholipides. Ils sont utilisés comme messagers cellulaires secondaires dans de nombreux processus, modulant des mécanismes biochimiques en activant des membres de la famille des « *protein kinase C* ». Leur implication dans la pathophysiology du cancer et d'autres maladies est fortement suspectée.



(E)-3-hydroxy-2-(palmitoyloxy)propyl octadec-9-enoate
Diacylglycérol (C34:1) $C_{37}H_{70}O_5$

Enfin, les monoacylglycérols sont produits lorsque des triacylglycérols sont digérés dans les intestins mais ils sont ré-estérifiés bien avant qu'ils ne soient transportés ailleurs dans l'organisme. En général, ces composés sont faiblement représentés dans les tissus. S'ils s'y accumulaient, leur fort pouvoir détergent aurait un effet destructeur sur les membranes.

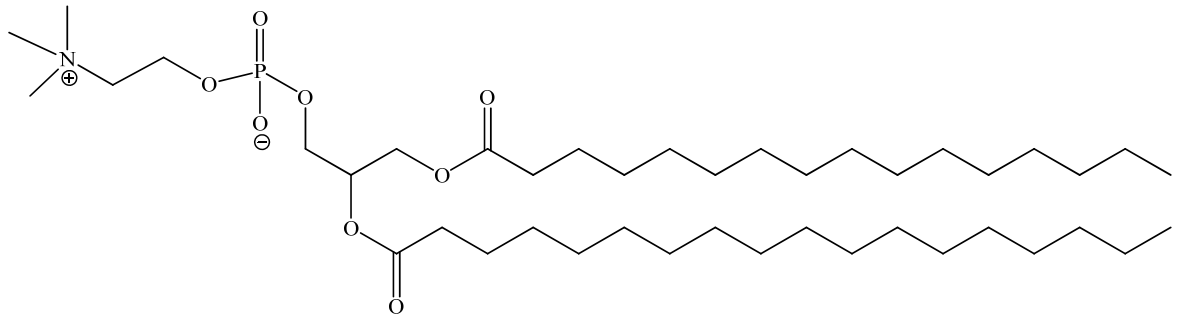


(E)-2,3-dihydroxypropyl octadec-9-enoate
Monoacylglycérol, $C_{21}H_{40}O_4$

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les triacylglycérols sont difficilement analysables, que ce soit en mode d'ionisation positif ou négatif. Lorsqu'ils sont détectés en mode d'ionisation positif, ils le sont sous forme d'adduit sodium ou potassium. En mode d'ionisation négatif, ils sont détectés sous la forme de molécule déprotonée $[M-H]^-$. L'analyse de molécule de référence a montré que ces molécules se fragmentaient sous forme de diacylglycérols qui sont détectés uniquement en mode d'ionisation positif, sous la forme d'une molécule protonée ayant subi une perte d'une molécule d'eau $[M+H-H_20]^+$. Enfin, les monoacylglycérols sont détectés en mode d'ionisation positif uniquement, sous la forme de molécules protonées $[M+H]^+$.

Les phosphatidylcholines

Les phosphatidylcholines, dont le nom usuel est lécithine, sont les phospholipides les plus abondants dans les tissus animaux et chez les plantes. Elles peuvent à elles seules représenter jusqu'à 50% de la quantité totale de phospholipides. Ceci s'explique par le fait que ces composés sont les composants majoritaires des membranes cellulaires. Ce sont également les principaux phospholipides circulant dans le plasma en tant que composant à part entière des lipoprotéines à haute densité. Du point de vue chimique, il s'agit de phospholipides neutres ou zwitterioniques sur une gamme de pH allant de très acide à très basique. Certaines de leurs fonctions membranaires semblent partagées avec la sphingomyéline.

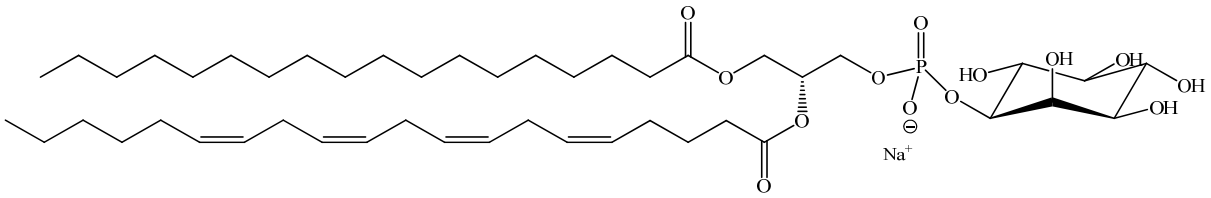


3-(palmitoyloxy)-2-(stearoyloxy)propyl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate
Phospatidylcholine 34:0, $C_{42}H_{84}NO_8P$

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les phosphatidylcholines sont détectées en mode d'ionisation positif uniquement, sous forme de molécule protonée, d'adduit sodium et potassium.

Les phosphatidylinositols

Les phosphatidylinositols sont une classe importante de lipides car ils prennent part à la fois à la structure des membranes cellulaires et à de nombreux métabolismes. Il s'agit de phospholipides anionique composé d'un squelette d'acide phosphatidique lié via un groupe phosphate à une unité inositol (hexahydroxycyclohexane).



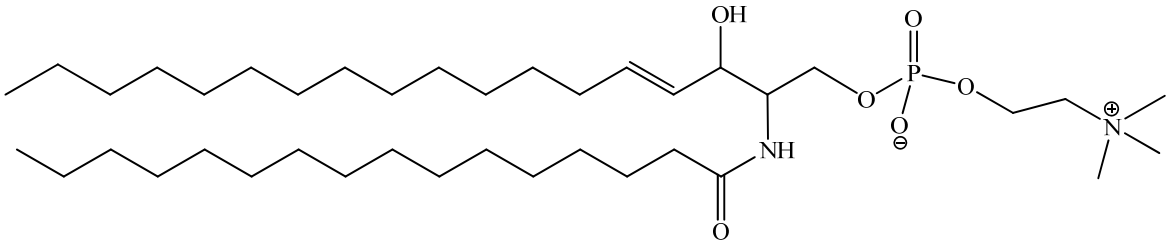
(R)-2-((5Z,8Z,11Z,14Z)-icosa-5,8,11,14-tetraenoyloxy)-3-(stearoyloxy)propyl (1S,2R,3R,4S,5S,6R)-2,3,4,5,6-pentahydroxycyclohexyl phosphate
Phosphatidylinositol (C38:4), $C_{47}H_{82}O_{13}P^-$

Bien qu'ils soient présents dans tous les types de tissus et de cellules, les phosphatidylinositols sont particulièrement abondants dans le cerveau, où ils représentent 10% des phospholipides totaux. Chez les animaux, les phosphatidylinositols sont la première source d'acide arachidonique (acide gras à 20 atomes de carbone et 4insaturations) requis pour la biosynthèse des éicosanoïdes. De par leur caractère anionique, ils peuvent développer des interactions électrostatiques avec les protéines et en régulent la présence à la surface de la cellule. Enfin, les phosphatidylinositols sont également la principale source de diacylglycérols grâce à l'action de la phospholipase C.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les phosphatidylinositols sont détectés uniquement en mode d'ionisation négatif, sous forme anionique, débarassée du contre ion.

Les sphingomyélines

Les sphingomyélines sont constituées d'une unité céramide et d'un groupe phosphorylcholine attaché en position 1, ce qui en fait des analogues des phosphatidylcholines.



(E)-3-hydroxy-2-palmitamidooctadec-4-enyl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate
Sphingomyéline 34:1, $C_{39}H_{79}N_2O_6P$

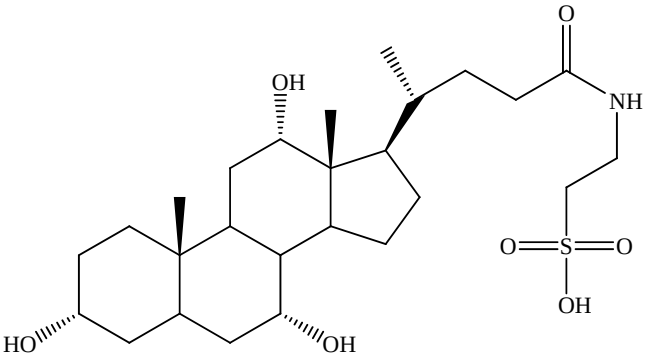
Ce sont des composants ubiquitaires des membranes cellulaires animales où elles sont de loin les sphingolipides les plus abondants. En effet, elles peuvent représenter jusqu'à 50% des lipides totaux dans certains tissus, même si leur concentration est généralement plus faible que celle des phosphatidylcholines. Les sphingomyélines servent également de précurseur aux céramides grâce à l'action d'une enzyme de dégradation appelée sphingomyélinase, ayant une

fonction similaire à phospholipase C. Les céramides ainsi produits ont des fonctions capitales dans l'organisme comme la régulation de l'apoptose ainsi que de la différenciation, la transformation et la prolifération cellulaires.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, une unique espèce de sphingomyéline a été détectée au cours de ce travail de thèse. Il s'agit de la sphingomyéline 34 :1. En mode d'ionisation positif, la sphingomyéline est détectée sous forme de molécule protonée (*m/z* 703), d'adduit sodium (*m/z* 725) et potassium (*m/z* 741). En mode négatif, la sphingomyéline 34 :1 est détectée sous la forme de fragments caractéristiques, aux rapports *m/z* 687 (perte d'un groupe méthyle), *m/z* 642 (perte d'une molécule de triméthylamine) et *m/z* 616 (perte de la tête choline).

Les acides biliaires

Il s'agit de métabolites possédant 24 atomes de carbone, dérivés du cholestérol et agissent en tant qu'agents détergents et émulsifiants des graisses au cours de la digestion. Leur biosynthèse est effectuée exclusivement dans le foie, en quatre étapes. Avant la sécrétion de la bile, une proportion élevée d'acides biliaires est convertie dans les péroxisomes en congugués avec les acides aminés glycine ou taurine, donnant dans ce dernier cas l'acide taurocholique.



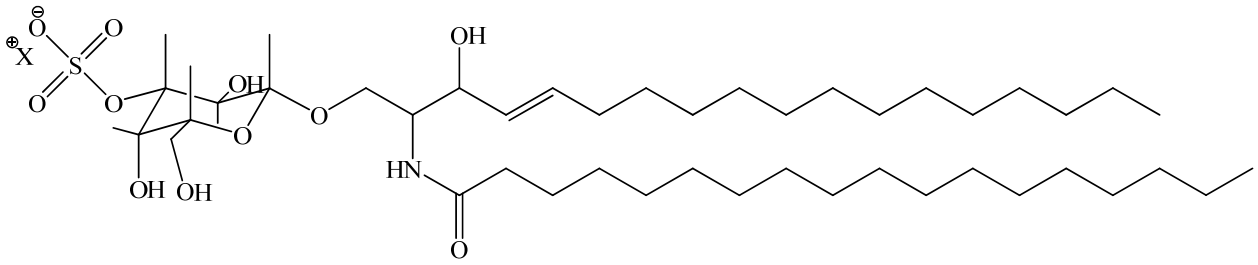
Acide taurocholique, $C_{26}H_{45}NO_7S$

Cette transformation augmente considérablement le caractère acide de ces molécules, améliorant de ce fait leur solubilité dans l'eau. Dans les conditions physiologiques de pH dans les intestins, l'équilibre entre forme neutre et ionique est déplacée, et ces molécules sont présentes à l'état de sel.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, l'acide taurocholique est détecté en mode d'ionisation négatif, sous sa forme ionique privée de son contre ion (*m/z* 514).

Les sulfates de glycosphingolipides

Les sulfates de glycosphingolipides (parfois appelés "sulfatides" ou "sulfoglycosphingolipides") sont des glycosphingolipides portant une fonction "ester sulfaté" sur l'entité galactose. Ils ont été pour la première fois identifiés dans le cerveau par le chimiste pionnier Johann Ludwig Wilhelm Thudichum en 1884, bien que leur caractérisation ne fut achevée que bien plus tard.



(2R,3R,4S,5S,6R)-3,5-dihydroxy-2-((E)-3-hydroxy-2-stearamidooctadec-4-enyloxy)-6-(hydroxymethyl)-2,3,4,5,6-pentamethyltetrahydro-2H-pyran-4-yl sulfate, $C_{47}H_{90}NO_{11}S^-$

La synthèse du sulfate de galactosylcéramide-I^3 est catalysée par une galactosylcéramide sulfotransférase dans le lumen de l'appareil de Golgi, avec la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate comme donneur activé de sulfate. Les sulfoglycosphingolipides possèdent un caractère acide et sont relativement solubles dans les systèmes aqueux, ce qui leur confère leurs propriétés, notamment celle du transport des ions.

En spectrométrie de masse ToF-SIMS, les sulfatides sont détectés dans les deux modes d'ionisation. En mode d'ionisation négatif, ils sont observés sous leur forme ionique privée du contre ion, ou sous une forme $[M(OH)-H]^-$. En mode d'ionisation positif, ils sont détectés sous forme d'ions $[M+2Na-H]^+$.

Annexe IV

In situ localization and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry

Proteomics, sous presse.

DOI 10.1002/pmic.200701025

RESEARCH ARTICLE

In situ localisation and quantification of surfactins in a *Bacillus subtilis* swarming community by imaging mass spectrometry

Delphine Debois[1], Kassem Hamze[2], Vincent Guérineau[1], Jean-Pierre Le Caër[1], I. Barry Holland[2], Philippe Lopes[1], Jamal Ouazzani[1], Simone J. Séror[2], Alain Brunelle[1] and Olivier Laprévote[1]

[1] Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, UPR 2301, Av. de la Terrasse, Gif-sur-Yvette, France
[2] Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, CNRS UMR 8621, Orsay, France

Surfactins are a family of heptacyclopeptides in which the C-terminal carbonyl is linked with the β-hydroxy group of a fatty acid acylating the N-terminal function of a glutamic acid residue. The fatty acyl chain is 12–16 carbon atoms long. These compounds, which are secreted by the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* in stationary phase in liquid cultures, play an important role in swarming communities on the surface of agar media in the formation of dendritic patterns. TOF secondary ion MS (TOF-SIMS) imaging was used to map surfactins within 16–17 h swarming patterns, with a 2 μm spatial resolution. Surfactins were mainly located in the central mother colony (the site of initial inoculation), in a 'ring' surrounding the pattern and along the edges of the dendrites. In the mother colony and the interior of the dendrites, surfactins with shorter chain lengths are present, whereas in the ring surrounding the swarm community and between dendrites, surfactins with longer fatty acyl chain lengths were found. A quantitative analysis by MALDI-TOF MS showed a concentration gradient of surfactin from the mother colony to the periphery. The concentration of surfactin was ~400 pmol/mL in the mother colony and ~10 pmol/mL at the base of the dendrites, decreasing to 2 pmol/mL at their tips.

Received: November 8, 2007
Revised: March 14, 2008
Accepted: April 3, 2008

Keywords:
MALDI-TOF MS / Surfactins / Swarming / TOF-SIMS imaging

1 Introduction

Bacillus subtilis is a soil bacterium, considered as the model for Gram-positive bacteria. When growing on the surface of a synthetic medium (0.7% agar), *B. subtilis* forms highly branched patterns in a process called swarming [1–4]. The swarming process is a rapid and massive migration of cooperating groups of bacteria. The swarm develops in a series of specific steps including the secretion of surfactins at 11–12 h, following inoculation and several generations of growth. After 12–13 h, groups of cells form 'buds' at the edge of the mother colony, which are abruptly released to form the initial monolayered dendrites. Extension of dendrites continues at approximately 3.5 mm/h, remaining as a monolayer for up to 18 h until multilayered growth (consolidation) commences from the base and spreads outwards [5, 6]. Swarming is likely to play an important role in the early development of biofilms [7], which are involved in the formation of the rhizosphere of plants roots, and with patho-

Correspondence: Dr. Alain Brunelle, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS Av. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
E-mail: alain.brunelle@icsn.cnrs-gif.fr
Fax: +33-169-077-247

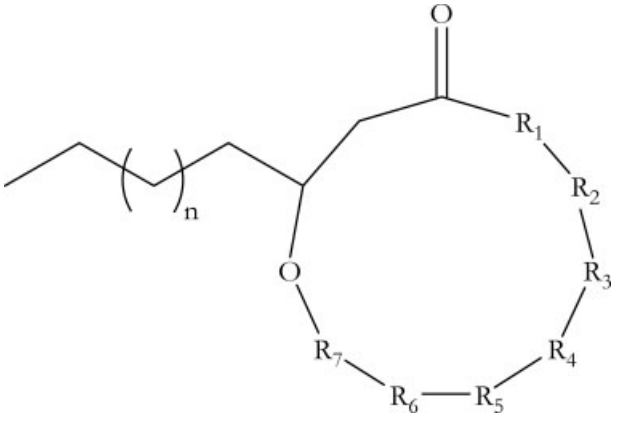
Abbreviations: 2,5-DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; **LMIG,** liquid metal ion gun; **ROI**, region of interest; **TOF-SIMS,** TOF secondary ion MS; **THAP,** 2,4,6-trihydroxyacetophenone

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

genic bacteria in serious infections like cystic fibrosis [8, 9] or medical equipment contamination [10]. The mechanism involved in the surface migration of swarming communities is, however, poorly understood. Nevertheless, it is generally agreed that environmental conditions, surfactant secretion, flagella, several swarming genes and quorum sensing systems are all required for the swarming process [2, 7, 11–16].

During growth, bacteria secrete numerous molecules into the medium including, in the case of *B. subtilis*, low molecular weight biosurfactants. Among these compounds, surfactins are essential for swarming [6] and are synthesised in a nonribosomal process, involving a large multi-enzyme complex [17, 18]. Surfactin is a cyclic heptapeptide linked to a fatty acid tail with a chain length of 12–16 carbon atoms (Scheme 1) [18, 19]. Surfactins are known to have diverse activities such as antiviral or antitumoural properties, as enzyme inhibitors or chelating agents [18, 19]. However, the most powerful activity of surfactins is their ability to lower surface tension [19, 20]. Bacteria may therefore secrete surfactins in order to modulate some physical properties of the agar surface such as surface tension or wettability and to facilitate migration [20].

Different imaging techniques, optical [21, 22] or microscopic [22], have already been used for the study of the structure and development of biofilms. Magnetic resonance imaging experiments have also been performed to monitor the formation of *Aureobasidium pullulans* biofilms in bead-packed reactors [23] and ATR-FTIR spectroscopy for the analysis of exopolysaccharides in swarms of *Proteus mirabilis* [15]. However, none of these techniques are capable of determining the surfactin distribution within a swarming pattern. The advantage of MS imaging is the capacity to detect any compound present on the surface of the sample, provided they survive the ionisation step. Recent improvements in TOF secondary ion MS (TOF-SIMS) imaging now permits a much wider application to biological samples than in the past. Indeed, the high efficiency of polyatomic ion sources allows the detection of intact molecules in a mass range up to 1000 Da or more [24, 25]. TOF-SIMS imaging has been shown to be suitable for the localisation of lipids in human atherosclerotic plaque [26], as well as in different tissues for the study of inherited diseases such as Duchenne Muscular Dystrophy or Fabry disease, as reviewed recently by Brunelle and Laprévote [27]. A few studies have, however, employed surface analysis by MS to biofilms. Tyler *et al.* [28] have used TOF-SIMS imaging to study the distribution and transport of an anti-microbial agent in *Candida albicans* biofilms. In the TOF-SIMS imaging studies reported here, we have investigated the possibility to localise surfactins and this revealed the distribution of different forms and their relative quantity within the swarming pattern.



Scheme 1. Generic chemical structure of surfactins. R_1 = glutamic acid, R_2, R_3, R_6, R_7 = leucine, R_4 = valine, R_5 = aspartic acid. *n* varies from 6 to 10

The precise quantification of surfactins secreted by *B. subtilis* at different times during the swarming process must also be measured in order to better understand the surface migration phenomenon. Quantitative analysis, using MALDI-MS [29, 30], of various biomolecules in tissues [31], as well as drugs and proteins [32] or peptidic toxins [33] has been extensively reported. MALDI-MS quantification has also been used to monitor the enzyme-catalysed production of glucosamine-6P synthase by Maillard *et al.* [34]. The use of an internal standard is always necessary for this kind of analysis [35], the best being an isotopomer of the molecule to be quantified [31, 36]. Using such a ^{15}N-labelled surfactin molecule as an internal standard, together with core sampling from different regions of the swarming pattern, a surfactin concentration gradient has been measured.

2 Experimental procedures

2.1 Swarming experiments

Swarming experiments were carried out with the 168 *sfp*$^+$ laboratory strain of *B. subtilis* on the synthetic B-medium (0.7% agar) as described previously [6]. Swarms were allowed to develop for 16–17 h at 30°C, relative humidity 50–70%, when the dendrites are approximately 1.5 cm in length.

2.2 Preparation and purification of ^{15}N-labelled surfactin

Strain 168 *sfp*$^+$ was grown in a culture medium consisting of, per litre of distilled water: 6 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0.5 g NaCl, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.011 g $CaCl_2$, 4 g glucose and 1 g $^{15}NH_4Cl$. An overnight 1 L preculture was used to inoculate a 15 L fermentor containing 10 L of medium and set at 37°C, pH 7.2, 150 rpm, 0.4 vvm oxygen. The preculture OD was 0.2 and the initial culture OD was 0.01. Surfactin production was monitored by HPLC analysis of samples taken at regular time intervals. Maximum production of surfactin was obtained at a late phase of growth corresponding to the stationary phase. Eleven litres of medium were centrifuged, then evaporated under reduced pressure and temperature to 2.5 L. The concentrated medium was lyophilised to give 96 g

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

of a pink coloured powder, which was resuspended in ethanol and filtered. This crude extract was purified by LC. HPLC analyses were performed with an instrument (Waters, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) equipped with a quaternary pump, a diode array detector (DAD) and a column compartment. Samples were separated on a preparative SunFire C_{18} column (5 μm, 19 × 150 mm). The mobile phase consisted of a 80:20 v/v mixture of ACN (CH_3CN) and water, both containing 0.1% v/v formic acid (HCOOH). The flow rate was 28 mL/min, in the isocratic mode. The DAD was monitored at 'Max Plot', in order to optimise the chromatogram quality. $^{15}N_7$-C_{15}-surfactin (4.34 mg) were obtained from 11 L of culture.

2.3 Surfactin sample preparation from the swarming community

A stock solution of commercial surfactins (Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was prepared at 1 mg/mL in ethanol (SDS, Aix-en-Provence, France) to optimise the MALDI-TOF MS conditions.

Core sampling experiments from 16 to 17 h swarms on 0.7% agar were performed with a 50 μL glass capillary tube (id: 1.0 mm, od: 1.5 mm), driven into the medium, until reaching the bottom of the Petri plate. Surfactins were then extracted from the agar by adding 50 μL of ethanol, followed by stirring for 30 min and overnight storage at −18°C. The supernatant was lyophilised, 20 min, then the dried samples were mixed with 4.5 μL of matrix solution (9-aminoacridine, 10 mg/mL in ethanol) and 0.5 μL of the internal standard solution (19.4 nmol/mL in ethanol). A 0.6 μL volume of the final solution was spotted three times on a Teflon-coated plate (Applied Biosystems, Les Ulis, France). Sample spots were allowed to dry for 5 min in ambient air, according to the so-called dried-droplet method [37]. A second extraction performed on the residue remaining from the first extraction led to a mass spectrum without any signal of surfactins.

For tandem MS experiments, stock solution was diluted in the spray solvent (50:50 v/v mixture of ACN and 1% formic acid) to obtain a concentration of 10 μg/mL. Dried extracts obtained by core sampling were diluted in 10 μL of the spray solvent. Nanocapillary needles (Proxeon, Odense, Denmark) were fitted with 4 μL of the sample solution.

For TOF-SIMS imaging experiments, swarming patterns were directly transferred onto 2 in. diameter polished silicon wafers (ACM, Villiers Saint Frédéric, France). Swarm plates (16–17 h) were allowed to dry for 10 min in ambient air without lids, the silicon wafer was deposited as delicately as possible on the agar surface and a manual press was applied. After 30 s, the press was removed and the pattern was transferred to the wafer. The use of silicon wafers as a sample support in TOF-SIMS imaging has several advantages. The first one is the flatness (better than 1 μm over the whole surface of the wafer). A flat surface guarantees few TOF differences for primary and secondary ions, meaning a higher mass resolution and an easier peak attribution. The second advantage is the cleanliness and purity of the surface (compared to stainless steel or glass coated with indium tin oxide) which avoids mass interferences in TOF-SIMS. Third, the silicon wafers are conductive, which allows in most cases to avoid the use of the electron floodgun. This optional device generates a low-energy electron beam activated between two pulses of the primary ion beam to help the neutralisation of any charge in excess on the surface of the samples. In the present case, the possibility to dispense with the floodgun is of prime interest because it was observed that the electron irradiation damages the surfactins and consequently lowers their emission as secondary ions. Finally, silicon wafers are relatively cheap and disposable, after a single use, avoiding potential contaminations from one experiment to another.

2.4 Video image acquisitions

Before introducing the sample in the mass spectrometer, reference images of the transferred swarming pattern were taken with an Olympus BX51 microscope (Rungis, France), equipped with 1.25 × to 50 × lenses and a Color View I camera, monitored by Cell^B software (Soft Imaging System, Münster, Germany). Inside the TOF-SIMS mass spectrometer, video images with small field of view of 1 × 1 mm^2 were recorded with an integrated camera.

2.5 TOF-SIMS imaging

A standard commercial TOF-SIMS IV (Ion-Tof, Münster, Germany) reflectron-type TOF mass spectrometer was used for the MS imaging experiments. The primary ion source is a bismuth LMIG which delivers Bi_3^+ cluster ions at a kinetic energy of 25 keV, with an angle of incidence of 45°. The ion column focusing mode ensured both a 1–2 μm beam focus and a short pulse duration of less than 1 ns, which is a prerequisite for high mass resolution and then accurate mass measurements and assignments. The secondary ions are accelerated to a kinetic energy of 2 keV and are post-accelerated to 10 keV before hitting a hybrid detector made of a single microchannel plate, followed by a scintillator and a photomultiplier. The effective ion flight path is about 2 m (reflector mode) and the mass resolution is $M/\Delta M = 10^4$ (full width half maximum [FWHM]) at m/z 500. Because of the very low initial kinetic energy distribution of the secondary ions, the relationship between the TOF and the square root of m/z is always linear over the whole mass range. Consequently, the mass calibration was always internal, using H^-, C^-, CH^-, C_2^- and C_2H^- ion peaks in the negative ion mode.

Two modes of image acquisition were used:

(i) Large area analyses (squares of more than 500 μm size) were performed by moving continuously the sample stage. The repeatability of the movement is better than 5 μm and therefore does not limit the lateral resolution. To scan the whole surface area, the primary ion beam is rastered over

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

the area of each individual pixel. The number of pixels was 256×256. The primary ion dose density (fluence) was 10^9 ions/cm^2.

(ii) Local images of specific dendrite regions with a field of view of 500×500 μm^2, were performed without sample stage movement just by rastering the primary ion beam. The number of pixels was 256×256, giving a pixel size of 2×2 μm^2. The primary ion dose density (fluence) was 5×10^{11} ions/cm^2.

2.6 MALDI-TOF MS

A Voyager DE-STR MALDI-TOF mass spectrometer (Applied Biosystems), equipped with a 337 nm pulsed nitrogen laser (20 Hz) and an Acqiris 2 GHz digitiser board, was used for the quantitative analysis experiments. Mass spectra were obtained in the reflectron negative ion mode with the following parameters: accelerating voltage −20 kV, grid voltage 63% of accelerating voltage, extraction delay time of 150 ns and low mass ion gate set to m/z 450. The laser intensity was set just above the ion generation threshold to obtain peaks with the highest possible S/N without significant peak broadening. All mass spectra were internally calibrated with $(NaI)_nI^-$ (n = 5–7) cluster ions. CHCA, 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB), 2,4,6-trihydroxyacetophenone (THAP) and 9-aminoacridine matrices were purchased from Sigma–Aldrich.

2.7 Nano-spray – oribtrap MS

A LTQ Orbitrap mass spectrometer (Thermo-Fischer, Courtabœuf, France) was used for the tandem MS experiments in the positive ion mode. Ions of interest were isolated on the linear trap and were submitted to CID with helium as collision gas. Spectra were acquired with a fixed mass resolution of 15 000 (at m/z 400).

3 Results and discussion

A typical, 16–17 h swarm community of strain 168 *sfp*$^+$ on the synthetic B-medium is shown in Fig. 1. The optimal conditions for the analysis of the different forms of surfactins were investigated using the stock solution detailed above. The partial MALDI mass spectrum (in the negative ion mode) of a mixture of commercial surfactins is shown in Fig. 2. The isotopic patterns are spaced by 14 Da, each one corresponding to a surfactin with a different fatty acyl chain length, from 12 (m/z 992.56) to 16 carbon atoms (m/z 1048.62). These attributions were confirmed with tandem MS experiments in the positive ion mode. Each surfactin ion, in particular at m/z 994.64 (protonated molecule) and 1072.68 (sodium adduct) were selectively isolated. The MS/MS spectra of these two ions showed both an ion at m/z 685.447, characteristic of the peptide moiety. This ion was

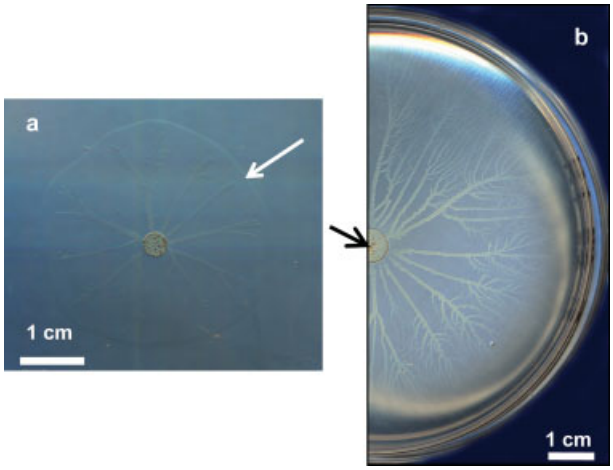


Figure 1. Swarming patterns of *B. Subtilis.* (a) Picture of a swarming pattern of *Bacillus subtilis* 168 *sfp*$^+$ after 16–17 h of incubation at 30°C on the synthetic B-medium (0.7% agar). (b) Picture of a swarming pattern for the same strain after 30 h of incubation at 30°C. The white arrow in (a) indicates the surfactin 'ring' at the periphery of the swarm, and the black arrow in (b) indicates the mother colony – the site of the initial inoculation.

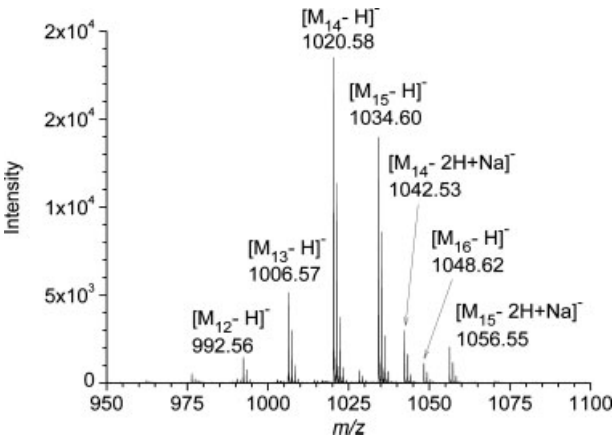


Figure 2. Partial mass spectrum of surfactin. Partial MALDI-TOF mass spectrum in the negative ion mode of a commercial mixture of surfactins.

then fragmented during an MS^3 experiment, leading to the complete b-type ions series [38, 39], confirming the amino acid sequence as ELLVDLL.

3.1 TOF-SIMS imaging

Figure 3a shows the microscope image recorded after the transfer of the swarming pattern onto a silicon wafer. The mother colony is clearly visible in the centre of the pattern and dendrites are well developed. The black square represents the 23×23 mm^2 area which was analysed by TOF-SIMS imaging. The corresponding ion image (Fig. 3b) is composed of 256×256 pixels, giving a pixel size of

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

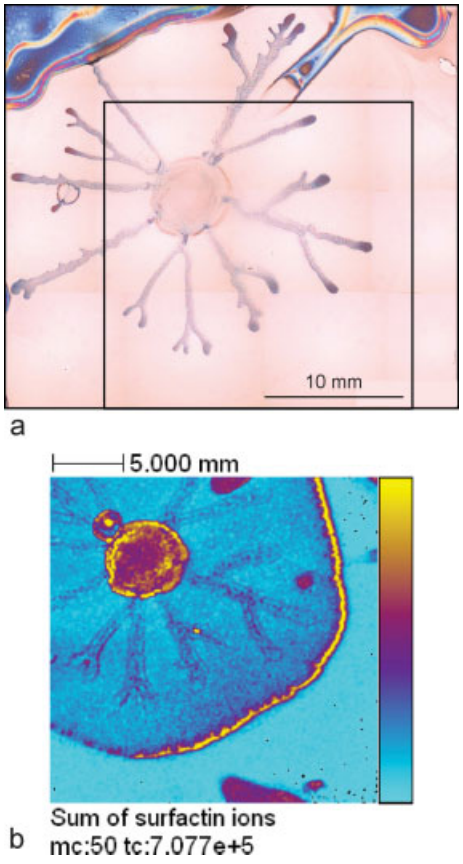


Figure 3. Low-definition scan of the surfactin distribution in a *B. subtilis* swarm community. (a) Microscope image of a part of the swarming pattern (16 h) transferred onto a silicon wafer as described in Section 2. (b) TOF-SIMS image of the sum of surfactin ions. The maximal number of counts in a pixel (*mc*) and the total number of counts (*tc*) are indicated below the image. The colour scale corresponds to the interval [0, *mc*], and indicates the relative amounts of total surfactin ions detected.

$90 \times 90\ \mu m^2$. This image was obtained by selecting, in the total spectrum, the isotopic patterns of deprotonated molecules ($[M - H]^-$) and sodium/potassium adducts ($[M - 2H + Na]^-$ and $[M - 2H + K]^-$) of surfactins. The IonImage software (Ion-Tof) provided an image for each of these ions and the sum of these images gave the image presented in Fig. 3b. One can then deduce the relative amounts of surfactins localised in different regions within a swarming pattern. Surfactins were essentially localised in the mother colony and in a 'ring' surrounding the pattern. Low levels of surfactins were also detected associated with dendrites but much reduced levels of surfactins were detected between dendrites.

To study the distribution of the surfactin species, some areas (called regions of interest, ROI) were manually selected in order to extract the corresponding mass spectrum from specific local areas. Since these ROIs did not have the same area, the intensity of each spectrum was normalised against the area of the smallest ROI. Figure 4 shows the partial mass spectra obtained from four selected ROIs. In the mother colony (Fig. 4b) and in a region occupied by a dendrite (Fig. 4c), surfactins with shorter fatty acyl chain lengths were detected, in contrast in the ring (Fig. 4d) and the area between the ring and the tips of dendrites (Fig. 4e), the longest acyl chain lengths were found. Surfactins were not detected outside the swarming pattern, beyond the 'ring' (data not shown).

The most hydrophobic surfactins are those bearing the longest fatty acyl chain lengths (14–16 carbon atoms). These surfactins may also be released preferentially from the mother colony allowing them to spread further than the surfactins with shorter fatty acyl chains. With purified preparations of surfactins, we found that surfactins with longer fatty acyl chains spread the fastest (data not shown). The latter surfactins, with 13–15 carbon atom fatty acyl chains, may in fact remain associated in some way with the bacteria, accumulating in the multilayered mother colony or with the cells as they migrate.

The low definition raster shown in Fig. 3, clearly shows large amounts of surfactins in the multilayered central mother colony but also smaller amounts associated with the monolayer of cells forming the dendrites. In order to obtain more information on the precise locations of surfactins in and around the dendrites, a higher definition scan was necessary. Therefore, images of smaller areas ($500 \times 500\ \mu m^2$) were recorded along a dendrite, at a pixel size of 2 μm only. The black squares in Fig. 5a show where these ion images were recorded, along the edge of a dendrite, up to the tip. The corresponding images of the sum of the surfactins are shown in Figs. 5b–e, for each position along the dendrite. All these ion images show that surfactins are in fact primarily localised in a wide zone (at least 250 μm) apparently immediately outside the dendrite. Inside the dendrite, the signal of surfactins is much less intense, although some surfactin 'spots' are clearly visible in Figs. 5b and c. Interestingly, these 'spots' become less intense closer to the tip of the dendrite. Analysis of these 'spots' gave mass spectra for surfactins with 14, 15 and 16 carbon atoms on the fatty acyl chain, with the C_{14}-surfactin more abundant inside the dendrite than outside (data not shown), consistent with the results obtained for the experiment on the whole swarming pattern.

A semi-quantitative analysis of the surfactins was also obtained from the ion image profiles along different axes through the swarming pattern (Fig. 6a). These profiles simply represent the variation of the relative intensity of the sum of surfactins *versus* the distance, and we emphasise that absolute values cannot be compared between axes. Figs. 6b and c show that the greatest amount of surfactin ions is detected at the edges of the mother colony and in the external 'ring', with a sharp decrease throughout the region between dendrites. In Fig. 6b, the intensity is almost constant between two dendrites until reaching the 'ring'. In Fig. 6c, which corresponds to a profile taken

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

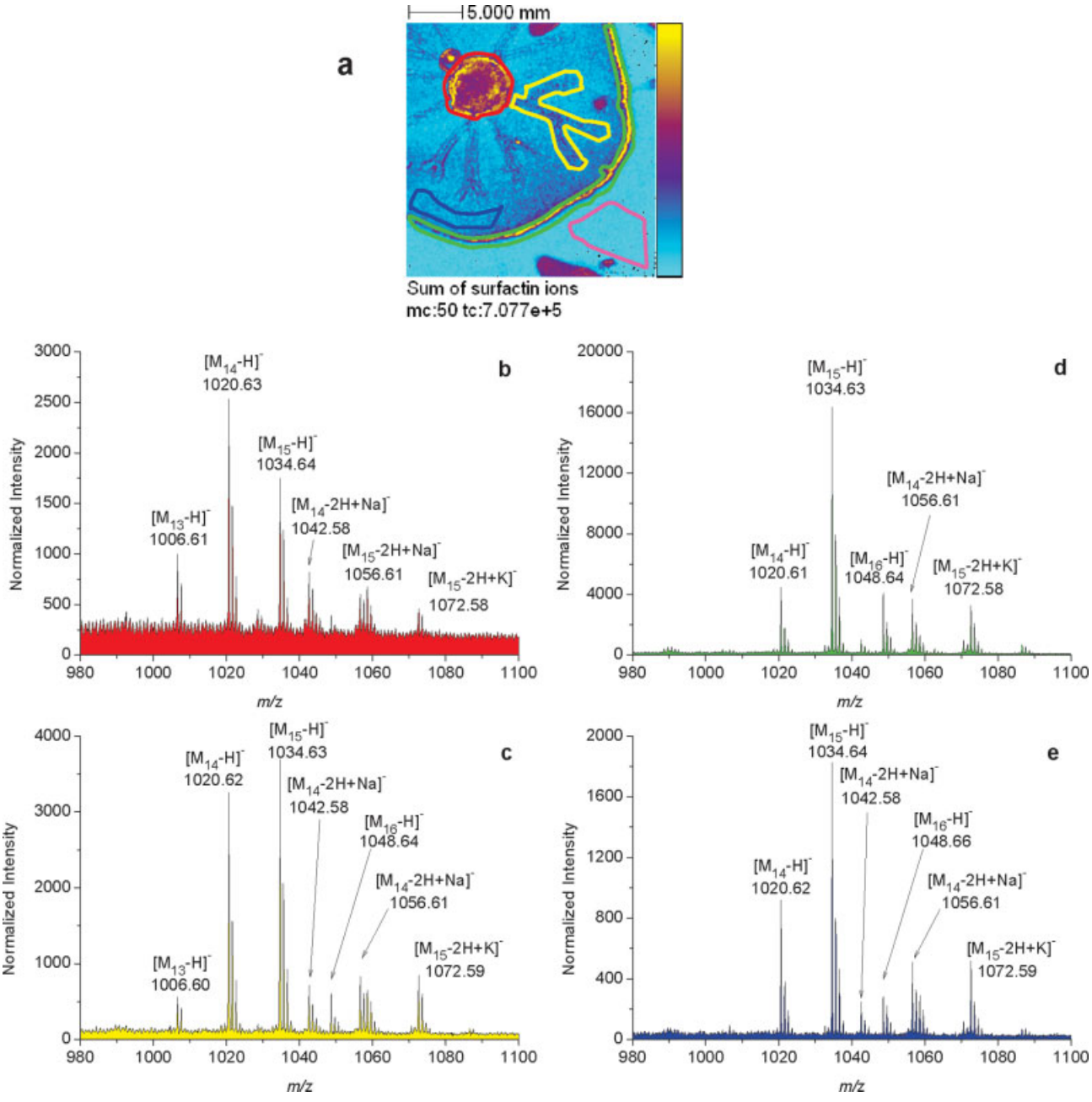


Figure 4. Distribution of the different surfactin species in the swarming community (a) Ion image of the sum of surfactin ions shown in Fig. 3, with regions of interest (ROI) surrounded by red, yellow, green and blue lines. The maximal number of counts in a pixel (*mc*) and the total number of counts (*tc*) are indicated below the image. The colour scale corresponds to the interval [0, *mc*]. (b) Partial mass spectrum obtained from the ROI 'Mother colony' (red), (c) partial mass spectrum obtained from the ROI 'Dendrite' (yellow), (d) partial mass spectrum obtained from the ROI 'Ring' (green), (e) partial mass spectrum obtained from the ROI 'beyond the tip of dendrites' (blue). The ROI delimited by the pink zone contained no detectable surfactin.

throughout the interior of a dendrite, the intensity of surfactin ions is much less than in the mother colony or the 'ring' and appears to decrease from the base of the dendrite to its tip. The third profile (Fig. 6d) is a transverse section of a dendrite and confirmed that surfactins are more abundant close to the edges of the dendrite than inside.

These analyses also indicated that the levels of surfactins are approximately the same at the edges of the mother colony and in the 'ring'. These results also confirm that the quantity of surfactins is much less inside a dendrite or between two dendrites than in the 'ring' or in the mother colony. Interestingly, Fig. 6c also confirms the results of Figs. 5b–e that

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

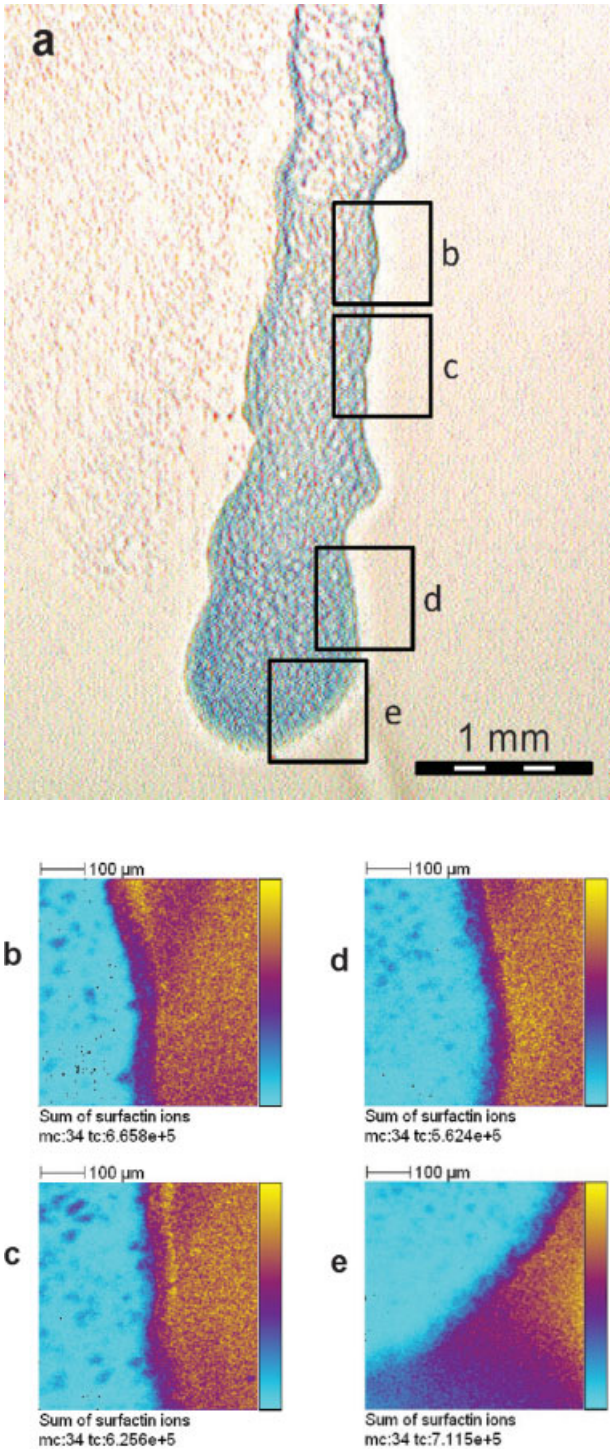


Figure 5. High-definition scan of the terminal region of a single dendrite. A 16 h swarming community was transferred onto a silicon wafer as in Fig. 1. A microscope image of the terminal region of a dendrite and the four areas specifically selected for analysis is shown in a. Corresponding TOF-SIMS images of the sum of surfactin ions along the dendrite towards the tip are shown (b–e). The maximal number of counts in a pixel (*mc*) and the total number of counts (*tc*) are indicated below each image. The colour scales correspond to the interval [0, *mc*].

the quantity of surfactins decreases from the base to the tip of the dendrite. Finally, Fig. 6d demonstrates that surfactins are more abundant around the edges of the dendrite, which is consistent with the results of Figs. 5b–e.

3.2 Quantitative analysis of C_{15}-surfactin using MALDI-TOF MS

The choice of the MALDI matrix is of prime importance in obtaining good crystal homogeneity [40]. CHCA, 2,5-DHB and THAP matrices, in the positive ion mode, and 9-aminoacridine, in the negative ion mode were first tested. The 9-aminocridine proved to be the best suited matrix for surfactin analysis, leading to mass spectra with much less sodium and potassium adduct ions than in the positive ion mode. Furthermore, this matrix led to the highest sensitivity with commercial solutions of surfactins, with a detection limit of 10 fmol.

Quantification of the surfactin with 15 carbon atoms on the fatty acyl chain (C_{15}-surfactin) was performed using $^{15}N_7$-labelled-C_{15}-surfactin as the standard. Mass spectra of mixtures containing C_{15}-surfactin (purified from commercial stock solution) at different concentrations (from 0.96 to 96 pmol/mL) and the internal standard at a fixed concentration of 19.4 pmol/mL were obtained. Each mass spectrum was used to calculate the peak area ratio C_{15}-surfactin/$^{15}N_7$-C_{15}-surfactin. The peak area ratios varied linearly with the concentration (data not shown), thus providing a concentration calibration straight line, with a linear correlation coefficient (R^2) value of 0.991, demonstrating the reliability of MALDI-TOF MS for the quantification of the C_{15}-surfactin.

Samples for analysis were obtained by core sampling of agar cylinders (1 mm diameter) at different locations within the area of the swarm pattern (Fig. 7). The extracted, lyophilised samples were mixed with a fixed amount of the internal $^{15}N_7$-C_{15}-surfactin standard (see Section 2).

Figure 8 shows the average values for samples extracted from an entire cross-section of a dendrite (which is approximately 1 mm wide), between two dendrites, and close to the edges of a dendrite (right and left sides, taking care to be clearly outside). SD values are important, because of the manual and therefore relatively subjective method of collection of the samples. Therefore, we took replicates of samples (see Fig. 8 legend). The main conclusion from this analysis was that the quantity of C_{15}-surfactin decreases by a factor of 4–10, along all the axes from inside to the edge of the swarm. The greatest amount of C_{15}-surfactin, as expected from the TOF-SIMS analysis (Figs. 4–6), was found in the mother colony, with a value of about 400 pmol/mL in the agar cores. In dendrites, the concentration was found to be 10 pmol/mL at the base, decreasing to 2 pmol/mL at their tips. Importantly, all these results reveal the presence of a gradient of C_{15}-surfactin (which may probably be extrapolated to the other surfactin species), decreasing from the mother colony to the periphery of the swarm community.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

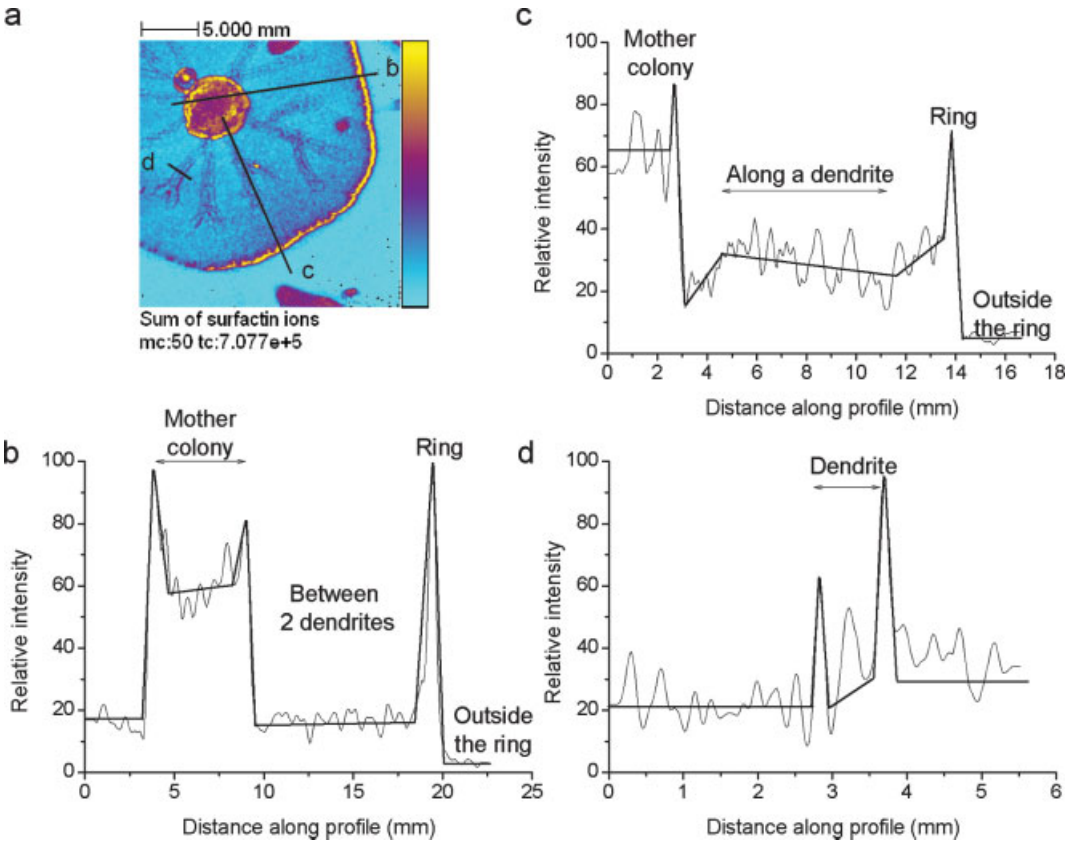


Figure 6. Relative amounts of surfactins along defined axes in the swarm community determined by TOF-SIMS analysis. (a) TOF-SIMS image of the sum of surfactin ions shown in Fig. 3 indicating the axes used to determine the surfactin profiles presented in b, c and d. The maximal number of counts in a pixel (*mc*) and the total number of counts (*tc*) are indicated below the image. The colour scale corresponds to the interval [0, *mc*]. (b) Intensity profile of the sum of surfactin ions, through the mother colony to the 'ring', between two dendrites. (c) Intensity profile from the mother colony to the 'ring', through a dendrite. (d) Intensity profile as a transverse section of a dendrite.

Surprisingly, large fluctuations were found for the values obtained from the core sampling in or around the ring, making quantification difficult. Nevertheless, the amount of surfactins detected by this method was always very low, with a value in the range of ~2 pmol/mL. This result is in complete contrast to that expected from the TOF-SIMS imaging analysis, suggesting that the extraction of surfactins may be inefficient in this region. Thus, the surfactins may be present in the 'ring', for example, in the form of a novel complex, not soluble in ethanol, which is nevertheless able to be broken to a single surfactin ion during the SIMS desorption process.

4 Concluding remarks

Here we report for the first time the precise localisation of surfactins secreted by a bacterial community. Results obtained with TOF-SIMS imaging allowed us to demonstrate the distribution of surfactins and their precise localisation within a swarming pattern at the micrometer scale. Additionally, a quantitative analysis of these compounds was performed by MALDI-TOF MS with an internal ^{15}N-labelled standard, which revealed the presence of a gradient of surfactins from the mother colony to the periphery of the swarm. However, the findings of high concentrations of surfactins associated with the mother colony, the edges of the dendrites and in particular in the ring structure, are surprising. These results will necessitate a re-evaluation of simple models that surfactin diffuses freely from the secreting cells to create a field of surfactins, minimal concentration at the exterior. The evidence in this study clearly indicates that secreted surfactins in fact rapidly form a complex that diffuses faster than monomer molecules. It is not clear what effect this will have on surfactin as a wetting agent or its role in swarming. However, the additional important finding that significant amounts of surfactins associate with the bacteria, suggests that this may facilitate migration in some novel way.

In addition, thanks to the absolute values obtained by the MALDI-TOF MS quantification, it is possible to deduce that the quantity of the C_{15}-surfactin detected by TOF-SIMS imaging in a 90×90 µm^2 area pixel is less than 21 fmol (only

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

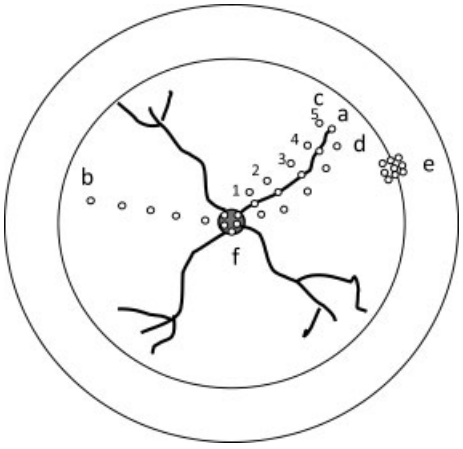


Figure 7. Schematic view (not to scale) of the core sampling locations for MALDI-TOF MS quantitative analysis of C_{15}-surfactin. One millimetre diameter samples (cores) were taken from regions indicated, surfactins extracted and mixed with a constant quantity of $^{15}N_7$-C_{15}-surfactin. (a) A total of 60 samples were extracted inside 12 dendrites, (b) 12 samples were extracted between two dendrites, (c) 12 samples were extracted along the right edge of two dendrites, (d) 12 samples were extracted along the left edge of two dendrites, (e) 18 samples were extracted inside the 'ring', (f) 10 samples were extracted in the mother colony. All samples were annotated with numbers from the centre of the plate (1) to the edge of the plate (*n*)

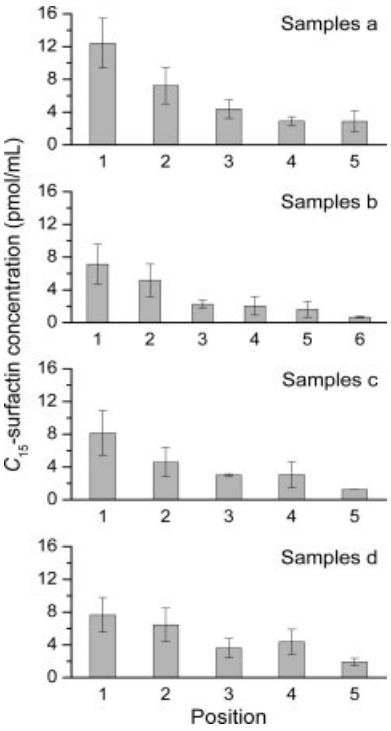


Figure 8. Surfactin concentration determined at different locations in a swarm pattern. Average C_{15}-surfactin concentrations obtained from the samples described in Fig. 7. (a) Inside a dendrite, (b) between two dendrites, (c) outside a dendrite (right side) and (d) outside a dendrite (left side).

the molecules present at the surface are analysed by TOF-SIMS). Undoubtedly, the TOF-SIMS imaging technique is a very sensitive method to study *in situ* this kind of compound.

All these results clearly demonstrate the possibility for the TOF-SIMS imaging technique to be used for biologically relevant molecules distinct from lipids that have been detected in previous studies.

This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (MAC BAC, Grant no. ANR-05-blan-0138), CNRS and the Université Paris-Sud. Delphine Debois is endebted to the French Ministère de l'Education Nationale for a Ph.D. research fellowship. Kassem Hamze also wishes to acknowledge gratefully the support of the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

[1] Matsushita, M.,Formation of colony patterns by a bacterial cell population, in: Shapiro, J., Dwarkin, M. (Eds.), *Bacteria as Multicellular Organisms*, Oxford University, New York 1997, pp. 367–393.

[2] Mendelson, N. H., Salhi, B., Patterns of reporter gene expression in the phase diagram of *Bacillus subtilis* colony forms. *J. Bacteriol.* 1996, *178*, 1980–1989.

[3] Rudner, R., Martsinkevich, O., Leung, W., Jarvis, E. D., Classification and genetic characterization of pattern-forming *Bacilli*. *Mol. Microbiol.* 1998, *27*, 687–703.

[4] Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, I. B., Séror, S. J., Branched swarming patterns on a synthetic medium formed by wild-type *Bacillus subtilis* strain 3610: Detection of cellular morphologies and constellations of cells as the complex architecture develops. *Microbiology* 2004, *150*, 1839–1849.

[5] Kearns, D. B., Losick, R., Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2003, *49*, 581–590.

[6] Julkowska, D., Obuchowski, M., Holland, B. I., Séror, S. J., Comparative analysis of the development of swarming communities of *Bacillus subtilis* 168 and a natural wild type: Critical effects of surfactin and the composition of the medium. *J. Bacteriol.* 2005, *187*, 65–76.

[7] Shirtliff, M. E., Mader, J. T., Camper, A. K., Molecular Interactions in Biofilms. *Chem. Biol.* 2002, *9*, 859–871.

[8] Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R., Moninger, T. O. *et al.*, Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000, *407*, 762–764.

[9] Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P., Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, *284*, 1318–1322.

[10] Donlan, R. M., Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 2001, *7*, 277–281.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[11] Sakuragi, Y., Kolter, R., Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*2007, *189*, 5383–5386.

[12] Kirisits, M. J., Parsek, M. R., Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communitie? *Cell Microbiol.* 2006, *8*, 1841–1849.

[13] Parsek, M. R., Greenberg, E. P., Sociomicrobiology: The connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol.* 2005, *13*, 27–33.

[14] Norris, V., den Blaauwen, T., Doi, H. R.,Harshey, R. M. *et al.*, Toward a hyperstructure taxonomy. *Annu. Rev. Microbiol.* 2007, *61*, 309–329.

[15] Lahaye, E., Aubry, T., Kervarec, N., Douzenel, P., Sire, O., Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? I. Biochemical and functional properties of the extracellular matrix. *Biomacromolecules* 2007, *8*, 1218–1227.

[16] Lahaye, E., Aubry, T., Kervarec, N., Douzenel, P., Sire, O., Does water activity rule *P. mirabilis* periodic swarming? II. Viscoelasticity and water balance during swarming. *Biomacromolecules* 2007, *8*, 1228–1235.

[17] Stein, T., *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.* 2005, *56*, 845–857.

[18] Bonmatin, J. M., Laprévote, O., Peypoux, F., Diversity among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High T. Scr.* 2003, *6*, 541–556.

[19] Peypoux, F., Bonmatin, J. M., Wallach, J., Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999, *51*, 553–563.

[20] Leclère, V., Marti, R., Béchet, M., Fickers, P., Jacques, P., The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch. Microbiol.* 2006, *186*, 475–483.

[21] Haisch, C., Niessner, R., Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Res.* 2007, *41*, 2467–2472.

[22] Lawrence, J. R., Swerhone, G. D., Leppard, G. G., Araki, T. *et al.*, Scanning transmission X-ray, laser scanning, and transmission electron microscopy mapping of the exopolymeric matrix of microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, *69*, 5543–5554.

[23] Metzger, U., Lankes, U., Hardy, E. H., Gordalla, B. C., Frimmel, F. H., Monitoring the formation of an *Aureobasidium pullulans* biofilm in a bead-packed reactor via flow-weighted magnetic resonance imaging. *Biotechnol. Lett.* 2006, *28*, 1305–1311.

[24] Brunelle, A., Touboul, D., Laprévote, O., Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *J. Mass Spectrom.* 2005, *40*, 985–999.

[25] Touboul, D., Kollmer, F., Niehuis, E., Brunelle, A., Laprévote, O., Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2005, *16*, 1608–1618.

[26] Malmberg, P., Börner, K., Chen, Y., Friberg, P. *et al.*, Localization of lipids in the aortic wall with imaging TOF-SIMS. *BBA-Mol Cell Biol. L.* 2007, *1771*, 185–195.

[27] Brunelle, A., Laprévote, O., Recent advances in biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry: Polyatomic ion sources, sample preparation and applications. *Curr. Pharm. Des.* 2007, *13*, 3335–3343.

[28] Tyler, B. J., Rangaranjan, S., Möller, J., Beumer, A., Arlinghaus, H. F., TOF-SIMS imaging of chlorhexidine-digluconate transport in frozen hydrated biofilms of the fungus *Candida albicans*. *Appl. Surf. Sci.* 2006, *252*, 6712–6715.

[29] Karas, M., Bachmann, D., Bahr, U., Hillenkamp, F., Matrix-assisted laser desorption of nonvolatile compounds. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 1987, *78*, 53–68.

[30] Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S. *et al.*, Protein and polymer analyses up to *m/z* 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1988, *2*, 151–153.

[31] Bucknall, M., Fung, K. Y. C., Duncan, M. W., Practical quantitative biomedical applications of MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2002, *13*, 1015–1027.

[32] Sleno, L., Volmer, D. A., Some fundamental and technical aspects of the quantitative analysis of pharmaceutical drugs by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, *19*, 1928–1936.

[33] Howard, K. L., Boyer, G. L., Quantitative Analysis of cyanobacterial toxins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2007, *79*, 5980–5986.

[34] Maillard, L. T., Guérineau, V., Badet-Denisot, M. A., Badet, B. *et al.*, Monitoring enzyme-catalyzed production of glucosamine-6P by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: A new enzymatic assay for glucosamine-6P synthase. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20*, 666–672.

[35] Sleno, L., Volmer, D. A., Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006, *20*, 1517–1524.

[36] Bungert, D., Heinzle, E., Tholey, A., Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the determination of enzyme activities. *Anal. Biochem.* 2004, *326*, 167–175.

[37] Karas, M., Hillenkamp, F., Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 1988, *60*, 2299–2301.

[38] Roepstorff, P., Fohlman, J., Proposal for a common nomenclature for sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.* 1984, *11*, 601.

[39] Biemann, K., in: Mc Closkey, J. A. (Ed.), *Methods in Enzymology, Vol. 193*, Academic Press, London 1990, pp. 455–479.

[40] Kussmann, M., Nordhoff, E., Rahbek-Nielsen, H., Haebel, S. *et al.*, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectromety sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *J. Mass Spectrom.* 1997, *32*, 593–601.

© 2008 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim