

UNIVERSITÉ D'ÉVRY – VAL D'ESSONNE

ÉCOLE DOCTORALE DES GÉNOMES AUX ORGANISMES

THÈSE

Présentée au vue de l'obtention du grade de

Docteur en Science de L'Université d'Evry – Val d'Essonne

par

Alexandre Seyer

IMAGERIE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE : DÉVELOPPEMENTS
MÉTHODOLOGIQUES ET APPLICATIONS BIOLOGIQUES

Soutenance prévue le 12 Octobre 2010 devant la Commission d'Examen :

Mr Arnaud Delcorte	Rapporteur
Mr Michel Salzet	Rapporteur
Mme Florence Gonnet	Examinatrice
Mr Pierre Le Maréchal	Examineur
Mr Olivier Laprévote	Examineur
Mr Alain Brunelle	Directeur de Thèse

Liste des Abréviations

MS : *Mass Spectrometry*

MS/MS : *Tandem Mass Spectrometry*

SIMS : *Secondary Ion Mass Spectrometry*

MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

Laser : *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LDI : *Laser Desorption Ionization*

ESI : *ElectroSpray Ionization*

PDMS : *Plasma Desorption Mass Spectrometry*

FAB : *Fast Atom Bombardment*

TOF : *Time-Of-Flight*

TIS : *Time Ion Selector*

DE : *Delayed Extraction*

ICR : *Ion Cyclotron Resonance*

FWHM : *Full Width at Half Maximum*

MCP : *MicroChanel Plate*

LMIG : *Liquid Metal Ion Gun*

PIDD : *Primary Ion Dose Density*

ROI : *Region Of Interest*

OCT : *Optimized Cutting Temperature*

CID : *Collision Induced Dissociation*

PSD : *Post Source Decay*

UV : *Ultra-Violet*

GC : *Gas Chromatography*

HPLC : *High Pressure Liquid Chromatography*

LC-MS : *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*

GC-MS : *Gas Chromatography - Mass Spectrometry*

ESI-LC-MS : *ElectroSpray Ionization - Liquid Chromatography - Mass Spectrometry*

AP-IR-MALDI : *Atmospheric Pressure - InfraRed - Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*

RFB : *Retardateur de Flamme Bromé*

PBDE : *PolyBromoDiphényles Ethers*

CF : *Cystic Fibrosis*

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance*

Table des Matières

Préambule	1
Introduction Générale	3
1. La spectrométrie de masse	3
1.1. Définition	3
1.2. Un bref historique de la spectrométrie de masse	3
2. Les sources d'ions	8
2.1. La source SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry	8
2.1.1. Le principe	8
2.1.2. Définitions	9
2.1.2.1. Rendements d'émission ionique	9
2.1.2.2. Densité de dose d'ions primaires	9
2.1.2.3. Section efficace d'endommagement	11
2.1.2.4. Efficacité	11
2.1.3. Les cascades de collisions et la pulvérisation des solides	12
2.1.4. Le choix du projectile	15
2.1.4.1. Les sources d'ions monoatomiques	15
2.1.4.1. Les sources d'ions polyatomiques ou agrégats	15
2.2. La source MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization	18
2.2.1. Le principe	18
2.2.1. Le choix de la matrice et son mode de dépôt	19
3. L'analyseur par temps de vol	21
3.1. Principe	21
3.2. Les améliorations	24
3.2.1. L'extraction retardée	24
3.2.2. Le miroir électrostatique, ou reflectron	25
3.3. Les analyseurs TOF-TOF	26
4. Détection du signal	28
5. Les instruments	30

5.1. Le TOF-SIMS IV	30
5.2. Le 4800 MALDI TOF-TOF	34
6. Imagerie par spectrométrie de masse	35
6.1. Principe	35
6.2. Imagerie TOF-SIMS	36
6.3. Imagerie MALDI TOF	39
7. Les lipides	41
8. Imagerie SIMS vs MALDI	50
8.1. Imagerie à une résolution spatiale de plusieurs dizaines de microns	50
8.2. Méthodes d'identification	54
8.3. Imagerie à une résolution spatiale inférieure au micron	56
8.4. Conclusion	58
Références bibliographiques	59

CHAPITRE I

Développement méthodologique : Localisation de flavonoïdes dans des graines végétales

1. Introduction	67
1.1 Les flavonoïdes	67
1.2. Préparation des échantillons	69
1.3. Objectifs de l'étude	69
2. Protocole expérimental	70
2.1 <i>Pisum sativum</i>	70
2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3. Résultats et discussion	73
3.1 Analyse de composés de référence	73
3.2 <i>Pisum Sativum</i>	76
3.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	81
4. Conclusion	91
Références bibliographiques	93

CHAPITRE II

Localisation de molécules exogènes

1. Localisation d'un retardateur de flamme bromé	95
1.1 Introduction	95
1.1.1. Présentation	95
1.1.2. Les retardateurs de flammes bromés (RFB)	96
1.1.3. Niveau de contamination et risques pour la santé	97
1.2. Objectifs de l'étude	99
1.3. Protocole Opératoire	99
1.3.1 Préparation des échantillons	99
1.3.2. Analyse histologique	100
1.3.3. Analyse TOF-SIMS	101
1.4. Résultats	101
1.4.1 Analyse TOF-SIMS du DBDE	101
1.4.2. Validation et Optimisation de la méthode	103
1.4.3. Localisation du DBDE dans les organes de rats dosés	105
1.5. Discussion	110
2. Localisation d'un composé anti-acné	112
2.1. Introduction	112
2.1.1. Présentation	112
2.1.2. Les traitements	113
2.2. Objectifs de l'étude	115
2.3. Protocole opératoire	115
2.3.1. Préparation des échantillons	115
2.3.2. Analyses MALDI	115
2.3.3. Analyses TOF-SIMS	116
2.4. Résultats	116
2.4.1 Analyse TOF-SIMS du composé pur	116
2.4.2 Imagerie MALDI-MS et MS/MS	117
2.4.3. Imagerie TOF-SIMS	118
2.4.4. Évaluation des formulations du composé anti-acné	122
2.5. Discussion	124
Références bibliographiques	125

CHAPITRE III

Analyse lipidique pour l'étude de maladies et du métabolisme

1. Recherche de marqueurs lipidiques de la Mucoviscidose	129
1.1. Introduction	129
1.1.1. Présentation	129
1.1.2. La Protéine CFTR	130
1.1.3. Physiopathologie humaine	131
1.2. Objectif de l'étude	132
1.2.1. Le pancréas	133
1.2.2. Le côlon	134
1.3. Protocole opératoire	135
1.3.1. Le pancréas	135
1.3.2. Le côlon	136
1.4. Résultats obtenus sur le pancréas	137
1.5. Résultats obtenus sur le côlon	141
1.5.1. Résultats TOF-SIMS	141
1.5.2. Résultats MALDI-TOF	145
1.5.3. Résultats des analyses statistiques	149
1.6. Discussion	152
2. Etude de l'absorption intestinale des lipides	155
2.1. Introduction	155
2.1.1. Emulsification, hydrolyse et formation des micelles	156
2.1.2. Sort des monoacylglycérols et des acides gras libres	157
2.2. Objectif de l'étude	160
2.3. Protocole opératoire	160
2.3.1. Préparation des échantillons	160
2.3.2. Analyses TOF-SIMS	160
2.3.3. Analyse histologique	161
2.4. Résultats	161
2.4.1. Analyses histologiques	162
2.4.2. Profil lipidique de l'huile de tournesol	162
2.4.3. Analyse TOF-SIMS à une résolution de 2 μm	164
2.4.4. Identification du pic à m/z 514,28	172
2.4.5. Analyse TOF-SIMS à une résolution de 390 nm	173

2.5. Discussion	178
Références bibliographiques	181
Conclusion Générale	185
Liste des illustrations	187
Annexes	205

Annexe 1 :

Benabdellah*, F.; Seyer*, A.; Quinton, L.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O. Mass spectrometry imaging of rats brain sections : nanomolar sensitivity with MALDI versus nanometer resolution by TOF-SIMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396,151.

* Ces deux auteurs ont autant contribué à ce travail.

Annexe 2 :

Seyer, A.; Einhorn, J.; Brunelle, A.; Laprévote, O. Localization of flavonoids in seeds by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 2326.

Annexe 3 :

Seyer, A.; Riu, A.; Debrauwer, L.; Bourgès-Abella, N.; Brunelle, A.; Laprévote, O.; Zalko, D. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry imaging demonstrates the specific localization of Deca-Bromo-Diphenyl-Ether residues in the ovaries and adrenal glands of exposed rats. *J Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, in press, doi: 10.1016/j.jasms.2010.06.019.

Annexe 4 :

Brulet*, M.; Seyer*, A.; Edelman A.; Brunelle, A.; Laprévote, O. Lipid mapping of colonic mucosa by cluster TOF-SIMS imaging and multivariate analysis in cfr knockout mice. *J. Lipid Res.* accepté juillet 2010, doi: 10.1194/jlr.M008870.

* Ces deux auteurs ont autant contribué à ce travail.

Préambule

De nos jours, les biologistes portent un intérêt croissant pour les outils d'imagerie. Il existe de nombreuses techniques d'imagerie chimique qui permettent aux scientifiques de détecter et de localiser des composés biologiques au niveau cellulaire, à savoir une dizaine de micromètres de résolution. Néanmoins, plusieurs inconvénients sont à considérer pour la plupart de ces méthodes.

Tout d'abord le marquage chimique est souvent nécessaire pour amplifier un signal. Par exemple l'imagerie par fluorescence nécessite généralement un fluorophore qui peut induire des modifications de la fonction biologique et ainsi fausser la localisation du composé d'intérêt. En outre, seuls des cibles présélectionnées peuvent être étudiées, au détriment de l'information sur la métabolisation ou des interactions avec d'autres molécules d'intérêt qui peuvent être présentes dans la même zone. Ensuite, seulement une infime partie des composés peuvent être détectés simultanément, soit en raison d'un faible pouvoir de résolution, soit parce que des molécules différentes donnent lieu à des chevauchements de signaux. Cela peut être le cas de la spectroscopie UV ou Raman. Ces inconvénients sont très souvent limitants lorsque l'on étudie les lipides, seulement très peu d'entre eux peuvent être marqués sans perdre leurs fonctions biologiques. Enfin, aucune coloration immunohistochimique spécifique à un type de lipide, à part le lipide A, n'est disponible.

L'imagerie par spectrométrie de masse (MS) possède, elle, la capacité de fournir la localisation précise de toutes les espèces moléculaires détectées sans aucun *a priori*. Depuis plusieurs années, cette technique analytique n'a cessé d'évoluer à travers des développements instrumentaux et méthodologiques et connaît maintenant de nombreuses applications dans des domaines aussi variés que la biologie, la médecine, ou encore l'archéologie. C'est dans ce contexte que se situe mon travail de thèse dont l'objectif était de continuer le développement de l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS et MALDI-TOF à travers différentes applications.

Après une introduction où sera présenté un bref historique de la spectrométrie de masse ainsi que le principe des différentes techniques employées, ce manuscrit sera composé de trois principaux chapitres.

Dans le premier chapitre, nous aborderons les développements méthodologiques nécessaires pour acquérir des images de très petits objets en imagerie TOF-SIMS, en particulier dans la phase de préparation des échantillons. Ces développements seront ensuite évalués à travers une application qui consistait à détecter et localiser des molécules de la famille des flavonoïdes dans des graines d'*Arabidopsis thaliana* de différents types.

La localisation de composés exogènes, tels que des médicaments ou des polluants chimiques dans des tissus biologiques, est une des possibilités qu'offre l'imagerie MS. Dans le second chapitre, seront présentées deux applications. La première avait pour objectif de détecter et de localiser un polluant chimique couramment utilisé dans l'industrie, un retardateur de flammes bromé, dans différents organes de souris qui ont été exposées à ce composé. Dans la seconde, il a été question de savoir si le composé actif d'une crème anti-acné, appliquée de manière topique, pouvait s'accumuler au niveau des glandes sébacées.

Enfin, le troisième chapitre regroupe lui aussi deux applications biologiques : la recherche de marqueurs lipidiques de la mucoviscidose, et particulièrement dans le colon de souris, l'organe le plus atteint, et l'étude de l'absorption intestinale des lipides durant la digestion.

Introduction Générale

1. La spectrométrie de masse

1.1. Définition

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant de mesurer le rapport masse sur charge de molécules chargées en phase gazeuse. Le principe consiste donc à ioniser des espèces, généralement neutres à l'état naturel, de les transférer en phase gazeuse et de mesurer leurs rapports m/z , où m est la masse du composé et z sa charge.

Un spectromètre de masse se compose de trois modules :

- Une source d'ions, au sein de laquelle les composés à analyser sont ionisés et transférés en phase gazeuse. Le choix de la technique d'ionisation à utiliser est crucial et dépend de la nature du composé à analyser. De plus, il est nécessaire de contrôler l'énergie mise en œuvre lors de cette étape afin d'éviter de détruire ou de détériorer les ions d'intérêt.
- Un analyseur de masse, porté à très basse pression (10^{-5} à 10^{-10} hPa). Son rôle est de mesurer le rapport m/z des ions formés en les séparant en fonction de celui-ci lorsqu'elles sont soumises à des champs électriques ou magnétiques.
- Enfin, d'un détecteur dont le rôle est de transformer le signal ionique en signal électrique pouvant être amplifié. Le signal ainsi amplifié peut ensuite être traité par un système informatique donnant le résultat de l'analyse sous la forme d'un spectre de masse.

1.2. Un bref historique de la spectrométrie de masse

Aujourd'hui, la spectrométrie de masse est principalement un outil de chimie analytique, néanmoins, cette science est née dans le domaine de la physique. En 1886, le physicien Allemand Eugen Goldstein identifie un nouveau type de radiation, qu'il appela « *Kanalstrahlen* ». ¹ Il produisait ces raies en faisant passer une décharge électrique à travers un gaz à basse pression dans un tube de verre équipé d'une cathode perforée. Dans les tubes à décharge conventionnels, les particules négativement chargées partent de la cathode et atteignent l'anode. Néanmoins, les raies observées par Goldstein voyagent dans la direction opposée. Il conclut que ces raies sont composées de particules chargées positivement.

Comme beaucoup de grandes découvertes scientifiques, la spectrométrie de masse a été « inventée » tandis que son découvreur, Sir Joseph Thomson (Prix Nobel de Physique en 1906), cherchait tout autre chose. En effet, à partir du montage expérimental qui lui permit de découvrir l'électron en 1897 et inspiré par les découvertes de Goldstein, il s'intéressa à ses raies positives. Les particules chargées étaient alors séparées grâce à des champs magnétiques, puis détectées par une plaque photographique.^{2,3} Le premier spectromètre de masse était donc né.

En 1919, Francis Aston (Prix Nobel de Chimie en 1922), améliora l'analyseur de masse mis au point par Thomson et put ainsi atteindre un pouvoir résolutif de 130, valeur dix fois supérieure à celle autrefois accessible. Ceci lui permit de séparer et de prouver l'existence des isotopes.^{4,5} Ces recherches furent suivies de près par un physicien de l'Université de Chicago, A. Dempster. En effet, il introduisit de nombreuses innovations, en particulier une nouvelle méthode de séparation des ions dans un champ magnétique, qui permit aux études sur les atomes et leurs isotopes de faire un bond en avant.⁶ D'autres innovations furent ensuite introduites, comme l'utilisation de champs électrostatiques comme « filtre » à énergie par Josef Mattauch et Richard Herzog en 1934.⁷

Après la découverte de la fission de l'Uranium par Otto Hahn, Fritz Strassman et Lise Meitner en 1938, une question restait en suspens : lequel des deux isotopes, ^{235}U et ^{238}U est responsable de cette réaction ? Cette question fut résolue en 1940 par Alfred Nier, de l'Université du Minnesota, qui put séparer et collecter les deux isotopes avec son spectromètre de masse à double focalisation.^{8,9} Ceci permit de démontrer que c'était l'isotope ^{235}U de l'Uranium qui produisait des fragments de fission après bombardement de neutrons. Ce type d'instrument a ensuite été mis à contribution pour purifier de grandes quantités d' ^{235}U nécessaire à la conception des bombes nucléaires. Ainsi, en 1945, Ernest Lawrence avec son « Calutron », fut capable de produire de manière journalière, près de 200 grammes d' ^{235}U pur à 80%.⁹

Jusqu'aux années 1940, la spectrométrie de masse était donc principalement utilisée par les physiciens comme un outil pour résoudre des questions fondamentales sur la nature de l'atome. Néanmoins, après cette période, de nouvelles techniques furent développées, multipliant ces domaines d'applications.

Ainsi, en 1946, la première description de l'analyseur de masse par temps de vol est publiée dans le journal *Physical Review* par William E. Stephens.¹⁰ Cette technique, beaucoup plus simple que les analyseurs magnétiques, permet un gain important en résolution, de plus, la gamme de masse accessible avec cet instrument n'est, en principe, pas limitée. En 1955, W.C. Wiley et I.H. McLaren améliorèrent la technique en introduisant le « time-lag focusing » ou extraction retardée.¹¹ Et c'est en 1972 et 1973 que les scientifiques soviétiques B.A. Mamyrin et V.A. Karataev publièrent les calculs et les premières expériences utilisant un miroir électrostatique, ou « reflectron », permettant à l'analyseur par temps de vol de gagner encore un ordre de grandeur en résolution.^{12,13}

Le concept de l'analyseur quadripolaire, qui utilise des champs électrostatiques pour séparer des ions en fonction de leurs rapports masse-sur-charge (m/z), fut introduit par le physicien Wolfgang Paul (Prix Nobel de Physique en 1989) en 1953.¹⁴ Cet instrument est devenu très populaire en combinaison avec la chromatographie grâce à sa gamme de masse allant de 10 à plus de 1000 Daltons et sa vitesse de balayage très élevée, même si sa résolution en masse n'est qu'unitaire.

En 1974, Alan G. Marshall et Melvin B. Comisarow, de l'Université de Colombie-Britannique, ont été les premiers à appliquer la transformée de Fourier à la résonance cyclotronique ionique (ICR) développé par J.A. Hipple en 1949.¹⁵ Dans un instrument ICR, les particules chargées tournent sous l'influence d'un champ magnétique. Les ions sont irradiés par un champ oscillant, qui pousse les particules dans un plus grand rayon de rotation en cohérence de phase (tous les ions d'un même rapport m/z se déplacent de manière synchronisés). Lorsque les ions passent devant les plaques du détecteur, le courant induit est mesuré. Pour obtenir un spectre complet sans transformée de Fourier, la fréquence de l'irradiation doit donc être maintenue constante tandis que le champ magnétique balaye une plage de valeur, ce qui conduit à des temps d'acquisition très long. Avec l'introduction de la transformée de Fourier, tous les ions peuvent être mesurés en même temps. Sur ce type d'instrument, il est maintenant possible de mesurer la masse des ions avec une précision de l'ordre du ppm voire moins et une résolution en masse de plusieurs centaines de milliers.¹⁶

Jusqu'aux années 1960, peu d'innovations ont été faites dans le domaine des sources d'ionisation. En effet l'impact électronique, développée par Arthur Dempster en 1918 puis améliorée par Walker Bleakney en 1929,^{17,18} restait la principale technique permettant de former des ions utilisée jusque là. C'est en 1966, qu'une nouvelle source d'ion fut introduite,

l'ionisation chimique, par M.S.D. Munson et F.H. Field.¹⁹ L'ionisation chimique est un processus moins énergétique que l'impact électronique, moins de fragments sont donc produits. L'innovation majeure suivante fut développée en 1968 par Malcolm Dole, qui décrivit pour la première fois la source d'ion ESI (ElectroSpray Ionization). Cette nouvelle source permit l'étude de macromolécules à l'Université de North-Western.²⁰

L'introduction de la source PDMS (*Plasma Desorption Mass Spectrometry*) par Ronald MacFarlane en 1976 permit d'analyser des molécules polaires et non-volatiles sur une matrice solide sans l'aide de dérivations chimiques.²¹ Cette source utilise l'énergie des fragments de fission formés à partir du californium (²⁵⁵Cf). Lorsqu'elle est couplée à un analyseur de masse par temps de vol, des spectres de molécules ayant une masse de plus de 10 000 Daltons peuvent être analysées. Elle a d'ailleurs permis de désorber pour la première fois des peptides.²¹ Parallèlement le SIMS était développé, il fera l'objet de paragraphes spécifiques plus loin dans ce chapitre. En 1981, le *Fast Atom Bombardement* (FAB) fut introduit, permettant d'analyser des molécules très polaires à partir d'une matrice liquide.²² L'ionisation FAB est aussi efficace pour l'analyse d'une grande variété de molécules biologiques, comme les peptides, les protéines, les petits oligonucléotides, les oligosaccharides ou encore les lipides.

Un peu plus tard, l'idée de Malcolm Dole fut développée par John Fenn (Prix Nobel de Chimie en 2002). En effet, il démontra en 1988 qu'il était possible d'ioniser avec une source ESI une large gamme de molécules, comme des métabolites, des lipides, des xénobiotiques ou encore des protéines de haut poids moléculaire.²³ Cette technique est extrêmement sensible (quelques femtomoles) et permet d'analyser des protéines avec une précision de l'ordre de quelques dizaines de ppm. Plus récemment, les sources microelectrospray ou nanospray, permettant un plus faible débit, se sont révélées capables d'excellentes performances avec une sensibilité remarquablement élevée.

Peu après, une nouvelle source d'ionisation fut développée parallèlement par le japonais K. Tanaka (Prix Nobel de Chimie en 2002) en 1988 et les allemands M. Karas et F. Hillenkamp en 1987,^{24,25} la source MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*). Cette source d'ion présente d'excellentes performances puisqu'il est possible d'analyser toute sortes de molécules allant du métabolite de faible poids moléculaire à des protéines de haut poids, avec une très bonne sensibilité.

Une des dernières grandes innovations dans ce domaine est due à Alexander Makarov qui publia en 2000 un article dans le journal *Analytical Chemistry* détaillant un nouvel analyseur de masse: l'Orbitrap.^{26,27} Ces dernières innovations montrent que cette science est toujours en mouvement et que son évolution est loin d'être achevée.



Joseph John Thomson



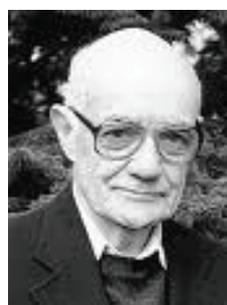
Francis William Aston



Wolfgang Paul



Koichi Tanaka



John Bennet Fenn

Figure 1 : Les prix Nobel liés à la Spectrométrie de masse.

La suite de cette introduction générale sera consacrée aux principes des deux sources d'ionisation utilisées durant ma thèse : la source SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*) et MALDI, à l'analyseur par temps de vol et aux systèmes de détection du signal. Dans les deux parties suivantes seront détaillés le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse et la famille de molécules la plus souvent rencontrée dans ce domaine, les lipides. Et enfin, nous

détaillerons les avantages et les inconvénients propres aux deux techniques d'imagerie utilisées : SIMS et MALDI.

2. Les sources d'ions

Comme nous l'avons décrit dans la partie précédente, les sources d'ions ont pour objectif d'ioniser les composés d'intérêt et de les transférer en phase gazeuse. Après le développement de la source d'ions par désorption plasma à la fin des années 70, plusieurs procédés basés sur le même concept ont été mis au point. C'est le cas des sources SIMS et MALDI, qui seront détaillées dans cette section. Le principe est de déposer de manière focalisée à la surface de l'échantillon une quantité d'énergie contrôlée. L'ionisation et le transfert en phase gazeuse des analytes se fait ainsi simultanément.

2.1. La source SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

2.1.1. Le 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 basée sur le principe de la pulvérisation ionique mise en évidence par J.J. Thomson en 1910.²⁸ La surface de l'échantillon est irradiée par un faisceau d'ions primaires focalisés possédant une énergie cinétique allant de quelques keV à plusieurs MeV et ce sont les ions secondaires émis qui sont analysés. L'endommagement de la matière causé par la pénétration des ions secondaires sur une distance de quelques centaines d'Ångströms (Å) entraîne la destruction de la majorité des molécules. La désorption/ionisation des espèces moléculaires ne se produit que sur les premiers 50-100 Å. Ceci a été mesuré expérimentalement en utilisant des empilements de bicouches de Langmuir-Blodgett par G. Bolbach.²⁹

Les premiers appareils construits étaient pourvus de sources monoatomique (Cs^+ , In^+ , O^- ou Ga^+) et étaient équipés d'analyseurs à secteur magnétique, ou plus tard, de filtres quadripolaires.^{30,31} L'utilisation de l'analyseur de type temps de vol est due à B. Chait et K. Standing en 1981.³² Plus récemment, la mise au point de sources capables de délivrer des ions

polyatomiques multichargés a permis d'augmenter la sensibilité et la gamme de masse accessible aux spectromètres de masse TOF-SIMS.

2.1.2. Définitions

2.1.2.1. Rendements d'émission ionique

Il existe différents paramètres liés à l'ionisation SIMS. L'un des plus importants est le rendement de pulvérisation Y_p . Il est défini comme étant le rapport du nombre de particules émises sur le nombre d'ions primaires bombardant la surface de l'échantillon :

$$Y_p = \frac{\text{Nombre de particules émises}}{\text{Nombre total d'ions primaires}}$$

Toutefois, toutes les particules émises ne sont pas des ions, il existe donc un second paramètre appelé rendement d'émission ionique secondaire qui correspond au nombre d'ions secondaires émis, positifs ou négatifs, en fonction du nombre d'ions primaires bombardant la surface.

$$Y = \frac{\text{Nombre d'ions secondaires émis}}{\text{Nombre total d'ions primaires bombardant la surface}}$$

Ce dernier paramètre dépend aussi de l'efficacité de transmission des ions secondaires dans l'analyseur et de l'efficacité de détection du détecteur :

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

Ainsi, on peut lier Y_p , Y et le facteur d'ionisation ϵ (égal au nombre d'ions secondaires émis sur le nombre total de particules émises) en écrivant la relation :

$$Y = Y_p \times \epsilon$$

Finalement, le rendement d'émission ionique secondaire Y dépendra du type de projectile utilisé et de la nature chimique de l'échantillon analysé ainsi que de son environnement.

2.1.2.2. Densité de dose d'ions primaires

Un second paramètre à prendre en compte lors de toute analyse est la fluence, aussi appelé densité de dose d'ions primaires, PIDD (*Primary Ion Dose Density*). Elle correspond au nombre d'ions primaires bombardant l'échantillon par unité de surface et est directement liée à l'endommagement de l'échantillon. Elle peut être définie comme étant :

$$PIDD = \frac{i \times t}{q \times A}$$

où i est l'intensité du courant d'ions primaires, t la durée de l'analyse, q la charge élémentaire et A l'aire analysée.

Les deux régimes d'analyse existant en SIMS peuvent être définis par la PIDD. En effet, pour une dose d'ions primaires inférieure à 10^{13} ions.cm⁻², on parlera de régime statique, alors que pour une dose supérieure à 10^{16} ions.cm⁻², on parlera de régime dynamique.

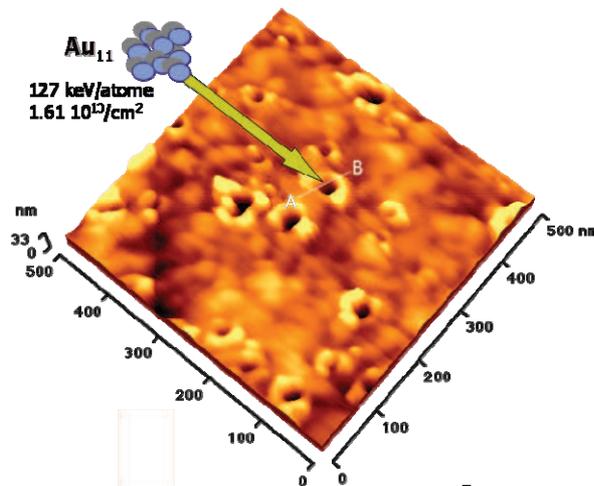


Figure 2 : Image obtenue en microscopie à force atomique d'une surface d'or (5000x5000 Å) bombardée par des ions primaires Au₁₁⁺ possédant une énergie de 1,4 MeV. PIDD= 1,61x10¹⁰ ions.cm⁻². Extrait de la référence 33.

Ces deux régimes se distinguent par le degré d'endommagement de l'échantillon. Ainsi dans le cas du régime statique, la probabilité que deux ions distincts atteignent le même endroit de l'échantillon doit être négligeable. La zone d'endommagement créée lors d'un impact d'un agrégat lourd à haute énergie est de l'ordre de 100 nm² (Figure 2).³³ Ainsi, en se

plaçant sous la limite des 10^{13} ions.cm⁻², la probabilité que chaque ion primaire arrive sur une surface vierge est très élevée, l'endommagement est alors faible. A l'inverse, le régime dynamique provoque un endommagement très important de la surface de l'échantillon entraînant la fragmentation de toutes les molécules. Ce mode, accessible avec des sources d'ions primaires spécifiques est utilisé lors d'expériences d'analyse en profondeur ou pour des analyses élémentaires, notamment dans le secteur des semi-conducteurs.

Ces limites dépendent en réalité beaucoup de la nature de l'échantillon à analyser et du type de projectile. Le taux d'endommagement d'une surface est directement caractérisé par le paramètre suivant : la section efficace d'endommagement.

2.1.2.3. Section efficace d'endommagement

La section efficace d'endommagement σ est définie comme étant l'aire endommagée par le bombardement d'un ion primaire à la surface de l'échantillon. Il peut être calculé grâce à la relation suivante :

$$N(t) = N(t_0) \cdot \exp\left(\frac{-\sigma I t}{q A}\right) = N(t_0) \cdot \exp(-\sigma \times FIDD)$$

où $N(t)$ est le nombre d'ions de rapport m/z donnés détectés au temps t , $N(t_0)$, le nombre d'ions détectés au temps initial, i l'intensité du courant d'ions primaires, t la durée d'analyse, q la charge élémentaire et A l'aire analysée.

La section efficace d'endommagement σ est alors fortement dépendante de l'espèce analysée, de l'état de la surface et du type de projectile choisi.

2.1.2.4. Efficacité

L'efficacité E correspond au nombre d'ions secondaires détectés pour une espèce donnée par unité de surface. On peut ainsi la définir comme étant le rapport du rendement d'émission ionique secondaire sur la section efficace d'endommagement :

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

A la vue de cette équation, on peut remarquer que pour augmenter l'efficacité E , le rendement d'émission ionique secondaire Y doit être élevé, ou/et la section efficace d'endommagement σ doit être faible. Ainsi on peut en déduire logiquement que si un échantillon présente un taux d'endommagement σ important et un rendement d'émission ionique secondaire Y élevée, l'efficacité sera la même que pour des valeurs de σ et Y faibles.

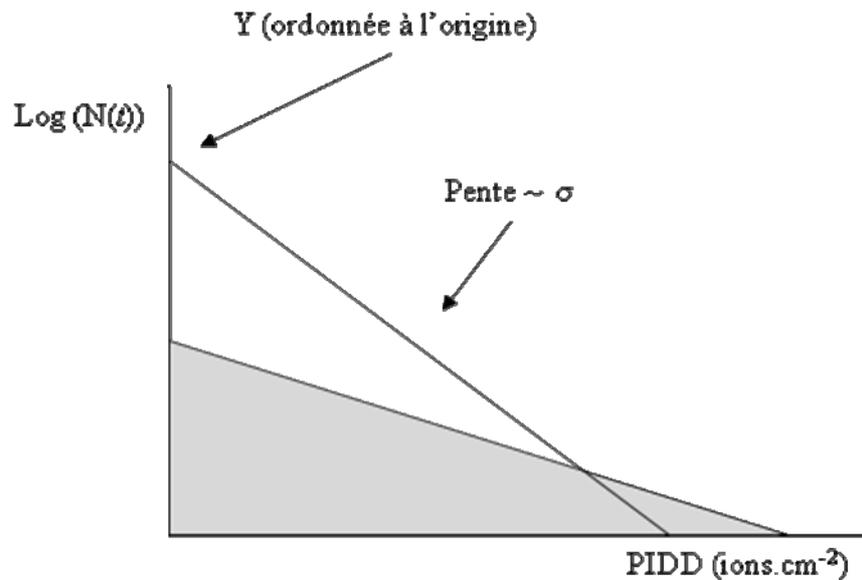


Figure 3 : Schéma illustrant l'influence du rendement d'émission ionique secondaire Y et de la section efficace d'endommagement σ sur l'efficacité. Extrait de la référence 34.

Comme l'indique la figure 3, si Y augmente plus vite que σ , alors l'efficacité et avec elle la sensibilité de l'analyse SIMS s'en trouve augmentée.

2.1.3. Les cascades de collisions et la pulvérisation des solides

Les collisions ions primaires - atomes de surfaces provoquent de forts transferts de quantité de mouvements, la trajectoire de l'ion primaire est alors constituée de brusques changements de direction, entre lesquels il perd de l'énergie dans deux types d'interactions. Les interactions inélastiques avec les électrons correspondent à une perte d'énergie électronique, et les interactions élastiques dans lesquels l'ion transfère une partie de son énergie cinétique à l'atome cible. On peut définir une énergie seuil de déplacement E_d comme l'énergie minimum nécessaire pour déplacer un atome de son site. Un atome de recul primaire (énergie cinétique transférée après un choc) d'énergie plus élevée que E_d peut induire tout un

ensemble de déplacements atomiques formant une cascade de collisions. Quand la cascade cesse, un certain nombre d'atomes ont été déplacés de leur site, laissant des lacunes dans le solide. Près de la surface, des atomes de la cascade peuvent franchir la surface et passer dans le vide : c'est le phénomène de pulvérisation. Parmi les entités pulvérisées, on distingue les atomes, les molécules et agrégats neutres et les ions négativement ou positivement chargés. Les entités émises à l'état de neutre sont les plus abondantes.

Ce phénomène fut observé pour la première fois au milieu du 19^{ème} siècle dans des investigations des décharges électriques dans les gaz où le bombardement de la cathode par les ions énergétiques du plasma provoquaient son érosion.^{35,36} Il fallut environ 50 ans pour que le processus physique provoquant la pulvérisation soit reconnu et c'est seulement environ 50 ans plus tard qu'une description plus claire a été développée.³⁷ Plus récemment, les moyens informatiques autorisent des simulations dynamiques des processus mis en jeu lors de ce phénomène. Ainsi, une modélisation moléculaire d'un bombardement d'une surface d'oligomères de polystyrène par de l'argon à 5 keV a montré qu'après 2 ps, l'énergie cinétique par atome est inférieure à 1 eV, même dans les zones les plus « chaudes » de l'échantillon.³⁸

Différents modèles de pulvérisation de matière lors d'un bombardement ionique ont été proposés. Trois modèles sont particulièrement utilisés : le modèle de collision frontale unique,³⁹ le modèle de cascades linéaires³⁷ et le modèle des pointes de collisions.⁴⁰ Les trois modèles sont illustrés dans la figure 4 :

- Le modèle de collisions frontales uniques, ou régime de faible rendement, se rencontre par exemple dans le cas de bombardement d'une cible par des ions incidents de faible masse, comme les ions H^+ , ayant une énergie inférieure au keV. L'énergie transférée aux atomes cible est si faible (quelques eV) que la production d'une cascade de collisions est improbable. L'émission dépend de l'angle d'incidence et est plus élevée pour les angles d'éjection rasants. Le projectile possède également une probabilité de déflexion élevée. Un ion incident rétrodiffusé peut transférer à un atome de surface une quantité d'énergie suffisante pour être éjecté de la surface. Le rendement de pulvérisation Y_p type dans ce modèle est très inférieur à l'unité.

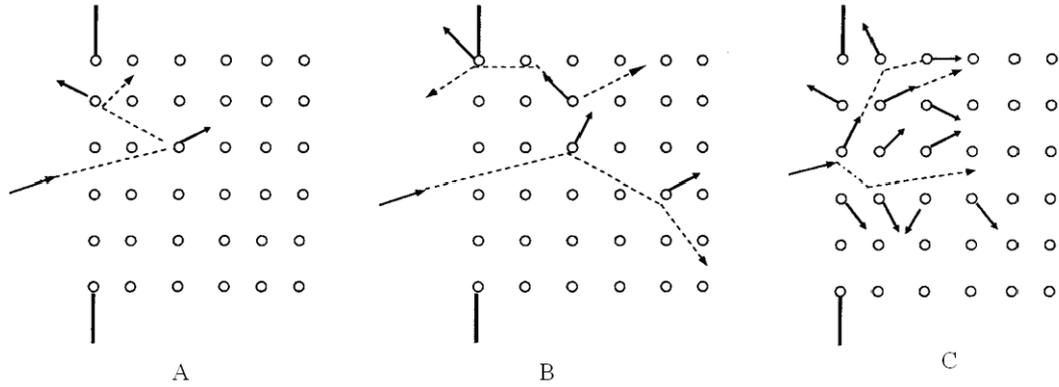


Figure 4 : Les trois modèles de pulvérisation par collisions élastiques. A : le modèle de collisions frontales unique, B : le modèle de cascades linéaires, C : le modèle des pointes de collisions. Extrait de la référence 41.

- Le modèle de cascades linéaires : une cascade de collision est dite linéaire si le nombre d'atomes mis en mouvement est petit devant le nombre total d'atomes cibles dans le volume de cascade. La densité d'atomes de recul est suffisamment faible de sorte que les collisions avec les atomes du solide au repos prédominent et que les collisions entre atomes de recul en mouvement sont rares. La densité d'énergie déposée dans le solide est peu élevée et cela implique que le rendement de pulvérisation Y_p soit faible devant le nombre total d'atomes cibles dans la zone de surface affectée par l'ion primaire.
- Le modèle des pointes de collisions : le terme « pointe » est utilisé pour décrire le volume d'une cascade de collisions dans lequel un grand nombre d'atomes sont en mouvement. On a des recouvrements de cascades de collisions, la probabilité de collision entre atomes en mouvement n'est plus négligeable, et la densité d'énergie déposée devient importante. Les énergies moyennes par atomes sont de l'ordre de l'énergie de sublimation. Ainsi, dans un tel régime, les atomes sont émis par évaporation de la surface « chauffée » par la cascade dense plutôt que par des collisions binaires entre un atome de recul et un autre fixe. D'autres modèles ont également été proposés pour décrire le phénomène de pulvérisation dans le régime de la pointe. On peut citer des mécanismes collectifs comme le modèle du flux gazeux,⁴² ou le modèle de l'onde de choc.⁴³

Le modèle de cascades linéaires prend en compte la nature, la masse et l'énergie de l'ion primaire aussi bien que la structure chimique et la densité du solide analysé. De plus il est en

bon accord avec les mesures expérimentales et a été confirmé par des modélisations moléculaires.

2.1.4. Le choix du projectile

2.1.4.1. Les sources d'ions monoatomiques

Historiquement, les premières sources d'ions primaires utilisées en spectrométrie de masse TOF-SIMS sont des sources d'ions monoatomiques, plus précisément, les ions Ga^+ , In^+ , Cs^+ et O^- . Ces sources étaient particulièrement efficaces en SIMS dynamique, pour l'analyse de composés de faibles poids moléculaires. De plus, elles permettent une excellente focalisation améliorant la résolution spatiale accessible. Néanmoins, l'endommagement causé par la pénétration de ces projectiles dans l'échantillon est très important, ce qui ne permet pas d'analyser des composés au delà de 100 à 200 Da.

Afin d'augmenter la gamme de masse accessible, il était donc nécessaire de mettre au point de nouvelles source d'ions primaires capables de déposer aux premières monocouches de l'échantillon une grande quantité d'énergie. Ceci pourrait être possible en déposant simultanément plusieurs ions primaires à la surface ce qui entrainerait une superposition de plusieurs cascades de collisions conduisant un effet de pointe thermique. Le seul moyen de bombarder une petite surface simultanément par plusieurs atomes et de déposer une grande densité d'énergie près de la surface est d'utiliser des projectiles polyatomiques.

2.1.4.1. Les sources d'ions polyatomiques ou agrégats

Le rendement de pulvérisation d'un solide à l'impact d'une molécule ou d'un agrégat dévie nettement de la somme des rendements des atomes individuels constituant le projectile. Ces effets non linéaires se traduisent par un accroissement des rendements de pulvérisation. Ils ont fait l'objet d'une revue détaillée dès 1981 par D.A. Thompson,⁴⁴ puis plus récemment en 1993, par H.H. Andersen.⁴⁵ Avec les agrégats, on se situe dans le régime des cascades de collisions non linéaires et de pointes de collisions, car la densité d'énergie déposée dans le volume des cascades est très élevée.

La preuve de l'existence des effets non linéaires a été apportée par les premières expériences réalisées avec les dimères et trimères Se_2 , Te_2 et Sb_2 , Sb_3 et Bi_2 incidents sur des cibles d'or et d'argent.^{46,47,48} Une augmentation du rendement de pulvérisation par atome incident, d'environ 60%, a été observée pour des énergies comprises entre 30 et 200 keV/atome. Ces effets non linéaires ont aussi été observés pour le rendement d'émission ionique secondaire.⁴⁹ L'ensemble de ces résultats expérimentaux a suscité des travaux de simulation de dynamiques moléculaires. Les simulations d'impacts de projectiles Au_1 et d'agrégats et Au_4 d'énergie 16 keV montrent que d'important effets non linéaires interviennent pendant la phase des collisions primaires ($t \sim 1000$ fs) et pendant la phase de pointe thermique de la cascade de collisions (figure 5).⁵⁰ Ainsi, l'agrégat va pouvoir déposer une plus grande quantité d'énergie dans les premières monocouches de l'échantillon où se produit la désorption/ionisation des espèces moléculaires.

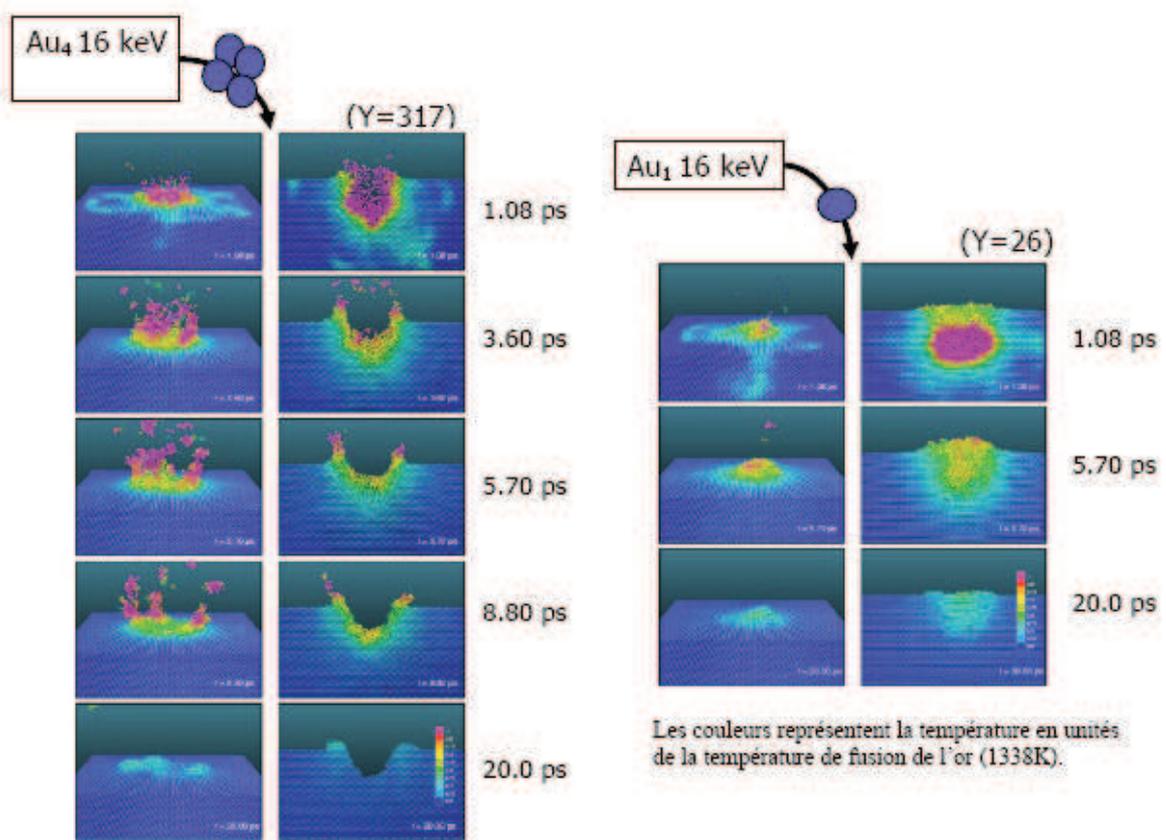


Figure 5 : Résultats de dynamiques moléculaires d'après la référence 50. Une surface d'or est bombardée par des agrégats Au_4 ou un projectile monoatomique Au_1 possédant une énergie totale de 16 keV.

Une autre caractéristique importante des projectiles polyatomiques est la relation entre la profondeur dans laquelle l'énergie incidente est déposée et la profondeur à partir de laquelle l'émission ionique secondaire peut se produire. A partir de mesures sur des monocouches successives de Langmuir-Blodgett, il a été constaté qu'au moins 90% de l'émission ionique secondaire provient d'une profondeur de 10 nm.²⁹ Par conséquent, les ions primaires polyatomiques déposent une plus grande quantité d'énergie dans les premières couches du solide, justement d'où provient l'émission secondaire.

De nos jours, il existe des sources d'ions primaires capables de délivrer des agrégats d'or (Au_n),⁵¹ de bismuth (Bi_n),⁵² ou encore de fullerène (C_{60}).^{53,54} La source qui équipe notre spectromètre de masse TOF-SIMS est une source LMIG (*Liquid Metal Ion Gun*), ou source à pointe liquide, capable de délivrer des agrégats d'ion bismuth.

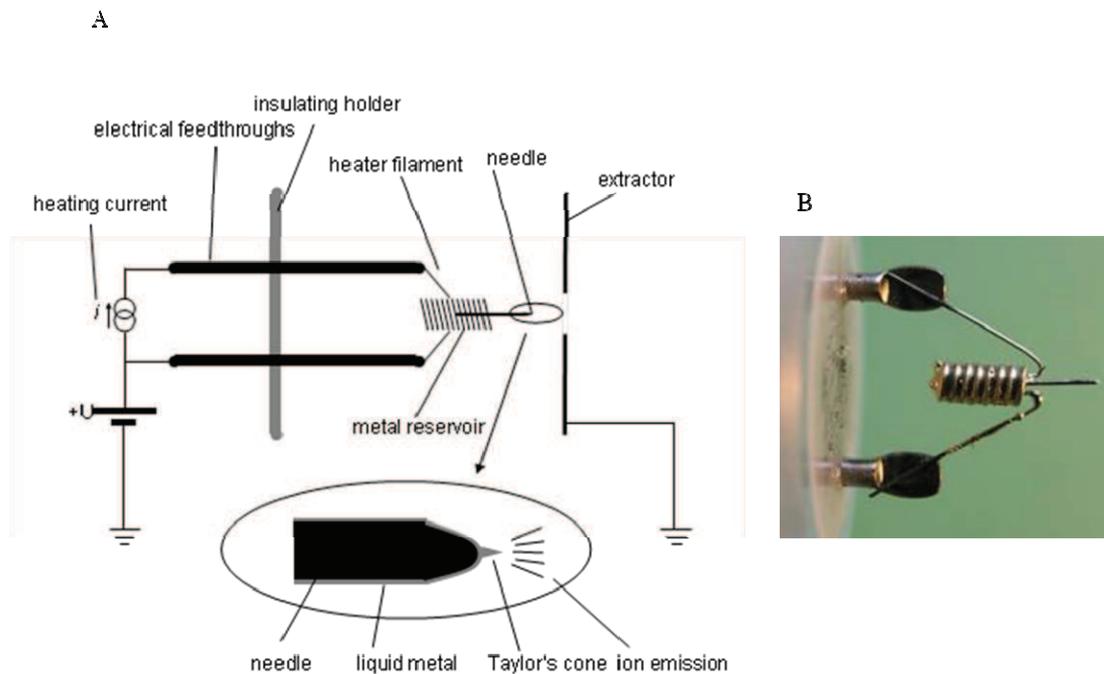


Figure 6 : Schéma de principe (A) et photographie (B) d'une source à pointe liquide. Extrait de la référence 55.

Le principe de fonctionnement de cette source est illustré dans la figure 6. Le réservoir surmonté d'une pointe contenant un métal pur ou un alliage, ce qui permet d'abaisser la température de fusion, est chauffé par un courant de quelques ampères. Le métal fond et vient mouiller 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 avec une très grande brillance d'ions en phase gazeuse.

2.2. La source MALDI : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

Depuis que Karas et Hillenkamp ont décrit l'ionisation par désorption laser assistée par matrice, qui permet d'analyser des protéines de plus de 100 kDa, cette technique s'est répandue dans les laboratoires de recherche en spectrométrie de masse et en biochimie. Le MALDI peut être appliqué à une large gamme de biomolécules et permet de travailler sur une grande gamme de masse avec une bonne précision de mesure et une relative tolérance vis-à-vis des tampons, sels et tensioactifs.

2.2.1. Le principe

La technique MALDI utilise généralement un faisceau laser pulsé travaillant dans l'UV pour désorber et ioniser un mélange de matrice/échantillon co-cristallisé sur une surface métallique. La matrice permet de minimiser la dégradation de l'échantillon provoquée par l'absorption de l'énergie du faisceau laser incident. L'énergie transmise par le laser est ainsi absorbée par la matrice et cet apport provoque son expansion en phase gazeuse entraînant les molécules d'échantillon qui sont alors ionisées.

L'échantillon est ionisé majoritairement par transfert de protons, soit avant désorption dans la phase solide, soit par collision après désorption avec la matrice excitée ou avec d'autres molécules du plasma ce qui formerait des ions mono- ou multichargés du type $[M+nH]^{n+}$. Néanmoins, la majorité des ions observés en MALDI sont des ions mono-chargés du type $[M+H]^+$. Plusieurs hypothèses tendent à expliquer ce phénomène :

- D'après le groupe de Zenobi, les ions mono-chargés proviennent de la neutralisation des multichargés par collision ion/neutre dans le nuage formé lors de la désorption de l'échantillon.⁵⁶

- Selon le groupe de Karas, les ions mono-chargés proviendraient d'une réduction de charge des ions multichargés après capture d'électrons. Ces électrons proviendraient soit de la photo-ionisation directe de la matrice, soit de la surface métallique de la plaque.⁵⁷

Bien que le mécanisme exact du processus MALDI ne soit pas bien connu, il peut être décomposé en trois étapes majeures : tir et impact de photons laser, ablation des ions et molécules de matrices sur la surface métallique de la cible, expansion du nuage éjecté dans la source et ionisation des neutres. Ces différentes étapes sont illustrées dans la figure 7.

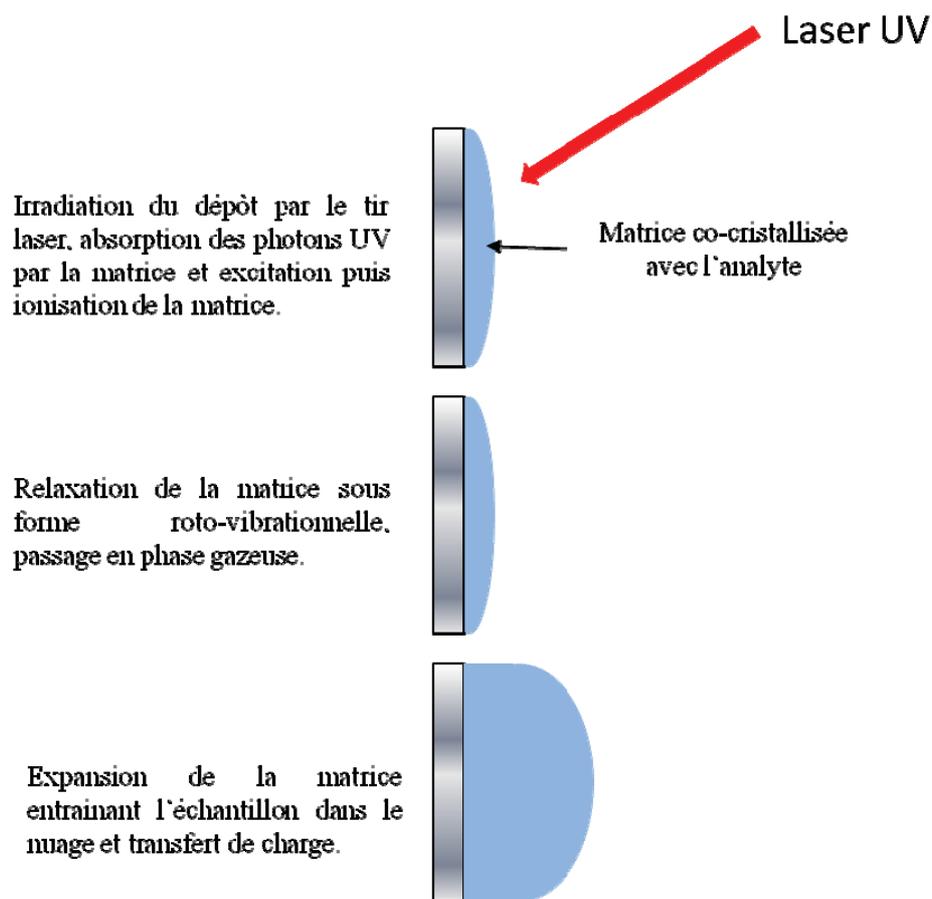


Figure 7 : Schéma de principe de l'ionisation MALDI.

2.2.1. Le choix de la matrice et son mode de dépôt

Le choix de la matrice est une étape cruciale pour observer une bonne ionisation/désorption du composé à analyser. En effet, la matrice doit être soluble dans le solvant utilisé pour l'analyte, elle doit absorber à la longueur du laser (son coefficient

d'extinction molaire doit y être maximum) et elle doit avoir une durée de vie dans la phase gazeuse suffisamment longue pour permettre l'enregistrement d'un spectre.

La première matrice utilisée était en fait une poudre métallique suspendue dans du glycérol.²⁴ Mais c'est dans l'équipe de Karas et Hillenkamp que la première matrice absorbant à la longueur d'onde du laser (266 nm dans ce cas) fut utilisée : l'acide nicotinique.²⁵

Les matrices les plus couramment utilisées pour des analyses MALDI sont présentées dans le Tableau 1.

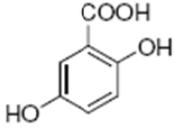
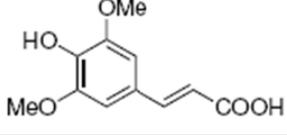
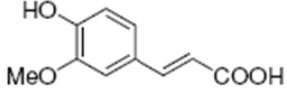
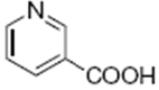
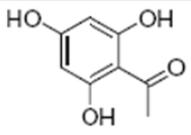
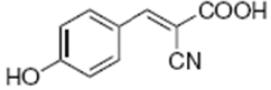
Abréviation	Nom	Structure
DHB	acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou acide gentisique	
SA	acide 3,5-dimethoxy,4-hydroxycinnamique ou acide sinapinique	
FA	acide 4-hydroxy-3-methoxycinnamique, ou acide férulique	
NA	acide 3-pyridinecarboxylique, ou acide nicotinique	
THAP	2,4,6-trihydroxyacétophénone	
α -CHCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique	

Tableau 1 : Quelques matrices utilisées en MALDI.

La dernière étape est le mode de dépôt de la matrice. Il existe différentes techniques pour obtenir un dépôt. Parmi les plus courantes : la méthode dite de « *dried droplet* » consiste à mélanger en phase liquide l'analyte et la matrice, à déposer ce mélange sur le support métallique et d'attendre la co-cristallisation des deux partenaires.⁵⁸ La méthode appelée « méthode sandwich », quant à elle, consiste à déposer la matrice seule sur le support, à attendre sa cristallisation puis à déposer l'analyte. Après séchage, une petite quantité de

matrice est de nouveau ajoutée.⁵⁹ Enfin, la méthode de la « couche mince » consiste à dissoudre la matrice dans un solvant volatil et de la déposer sur la plaque. L'analyte est ensuite déposé sur cette fine couche de matrice cristallisée.⁶⁰

Cette étape est la plus importante pour l'imagerie MALDI. En effet pour ce type d'analyse, la matrice doit être appliquée de manière homogène sur toute la surface de la zone analysée, tout en évitant d'éventuelles délocalisations des composés à la surface. C'est pourquoi il existe différentes méthodes, le plus souvent robotisées, comme les sprays atmosphériques, l'électrospray, ou encore le dépôt par nébulisation de la matrice.

3. L'analyseur par temps de vol

Maintenant que les ions ont été formés et transférés en phase gazeuse, il est nécessaire de les analyser, c'est-à-dire de les séparer en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z). Tous les analyseurs de masse sont basés sur les propriétés physiques des ions soumis à des champs électromagnétiques.

Différents paramètres caractérisent les performances d'un analyseur :

- la gamme de masse accessible,
- la transmission, c'est-à-dire, le nombre d'ions arrivant au détecteur par rapport au nombre d'ions initialement formés dans la source,
- le pouvoir résolutif, correspondant à la capacité de l'analyseur à séparer des ions de rapport m/z très proche. Ce paramètre est calculé à l'aide la formule suivante :

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

où R est le pouvoir résolutif (ou résolution), M est la masse correspondant au pic de l'ion détecté, et ΔM la largeur à mi-hauteur de ce même pic.

3.1. Principe

L'analyseur de masse par temps-de-vol a été décrit pour la première fois par William E. Stephens en 1946.¹⁰ Il est basé sur un principe assez simple, des ions de rapport m/z différents,

accélérés par un même champ électrique possèdent une énergie cinétique identique, mais des vitesses différentes. Il suffit donc de mesurer avec précision le temps mis par un ion donné pour parcourir une distance donnée pour remonter à son rapport m/z . Cet analyseur de masse nécessite une impulsion de départ afin de mesurer un temps de vol. Il est donc tout à fait adapté à des sources pulsées telle que la source MALDI ou la source SIMS.

Dans sa version la plus simple, le TOF en mode linéaire, les ions sont accélérés par une différence de potentiel puis entrent dans une région libre de champs, le tube de vol, et sont détectés au niveau du détecteur (figure 8). Leur temps-de-vol à travers le tube peut donc être calculé.

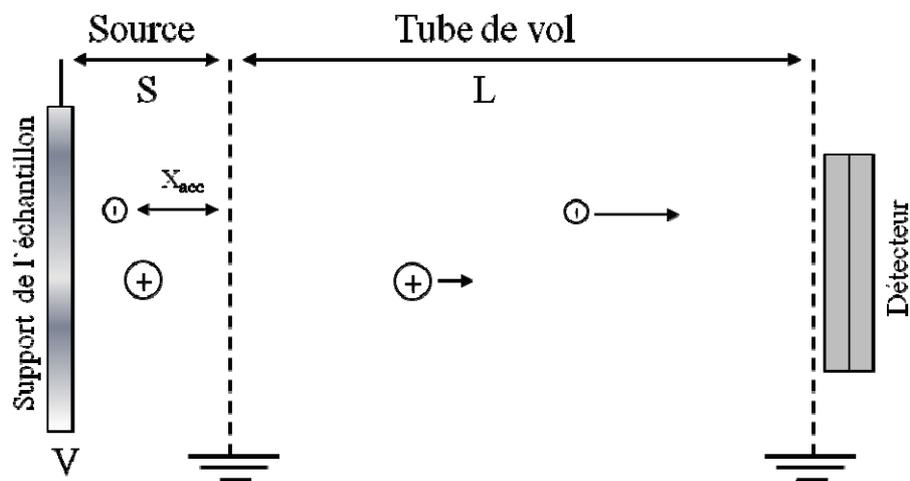


Figure 8 : Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode linéaire.

Un potentiel V de quelques kilovolts est appliqué sur le support de l'échantillon. Une grille d'extraction, reliée à la masse, est placée à une distance S . Ainsi, un ion situé à une distance X_{acc} de la grille est soumis au champ électrique :

$$E = \frac{V}{X_{acc}}$$

Il en résulte une force qui peut s'écrire :

$$F = zeV = m \frac{d^2X_{acc}}{dt^2}$$

On peut en déduire le temps t_{acc} , ou temps d'accélération, que l'ion mettra pour atteindre la grille d'extraction :

$$t_{acc} = 2X_{acc} \sqrt{\frac{1}{2eV} \frac{m}{z}}$$

Après la grille d'extraction, l'ion pénètre dans le tube de vol où il n'est soumis à aucun champ et conserve donc l'énergie acquise durant la phase d'accélération. Son énergie cinétique correspond donc à :

$$E_0 = \frac{mv^2}{2} = zeV$$

Ainsi :

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

En introduisant la longueur du tube de vol L, on peut calculer le temps t_L mis par un ion pour le traverser :

$$t_L = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times L$$

Le temps total mis par l'ion pour parcourir la zone d'accélération et la région libre de champs étant égal à $t = t_{acc} + t_L$, on aura :

$$t = \sqrt{\frac{m}{2zeV}} \times L + 2X_{acc} \sqrt{\frac{1}{2eV} \frac{m}{z}} = (2X_{acc} + L) \sqrt{\frac{m}{2zeV}}$$

Avec cette relation, il est donc possible de calculer le rapport m/z d'un ion. Ainsi, après accélération, les ions « volent » d'autant plus vite qu'ils sont plus légers.

La résolution en masse de ce type d'appareil peut s'écrire comme suit :

$$\left. \begin{aligned} m &= \left(\frac{2ze}{L^2}\right) \times t^2 \\ dm &= \left(\frac{2zeV}{L^2}\right) \times 2tdt \end{aligned} \right\} \frac{m}{dm} = \frac{t}{2dt}$$

donc :

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t}$$

Certains facteurs, intervenant lors du processus d'ionisation ou durant l'analyse, peuvent limiter la résolution en masse. Ces facteurs sont : la durée de l'impulsion d'ionisation (t_0), la distribution en énergie cinétique initiale et la distribution dans l'espace des ions. Des ions de même rapport m/z vont donc atteindre le détecteur à des temps légèrement différents, ce qui va élargir les pics sur le spectre de masse. Pour palier à ces limitations, deux innovations majeures ont été mises au point : l'extraction retardée (*Delayed Extraction*, ED) et le miroir électrostatique (Reflectron).

3.2. Les améliorations

3.2.1. L'extraction retardée

Certaines techniques d'ionisation et particulièrement l'ionisation MALDI, entraînent une forte dispersion en énergie initiale. Ceci a pour conséquence une dispersion du temps de départ des ions au niveau de la source et donc une diminution de la résolution en masse. Pour compenser cette dispersion, il a été imaginé de retarder l'extraction des ions de la source vers l'analyseur de quelques centaines de nanosecondes à quelques microsecondes.^{61,62,63} Le schéma de principe de cette technique est présenté en figure 9.

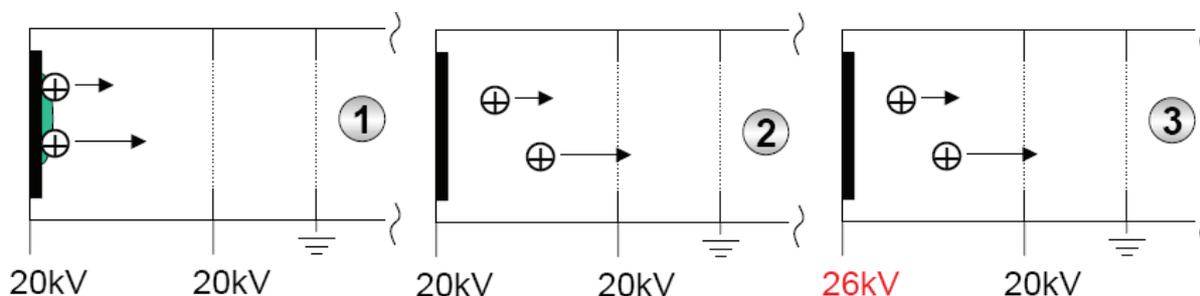


Figure 9 : Schéma de principe de l'extraction retardée. Extrait de la référence 64.

Au temps t_0 , on déclenche le tir laser, une grille supplémentaire placée avant la grille d'extraction est portée au même potentiel que le support de l'échantillon, dans la figure 9, 20

kV (étape 1). Lorsque les ions sont formés, ils ne subissent donc aucun champ électrique. Cette situation est maintenue durant une période τ (étape2), typiquement 100 à 500 ns.

Après cette période τ , un potentiel supérieur est appliqué au support de l'échantillon, ici 26 kV, les ions seront donc accélérés en deux temps (étape 3) : ils le seront d'abord faiblement (ici 6 kV), entre le support et la grille supplémentaire, ce qui va réduire la dispersion spatiale, puis ils seront fortement accélérés entre les deux grilles avant d'être éjectés dans la région libre de champs. Plus cette vitesse d'éjection sera élevée, moins ils seront soumis à un fort potentiel. Ainsi, plus les ions auront une vitesse initiale élevée, moins ils seront accélérés, d'où un regroupement en temps à l'arrivée au détecteur.

Ce procédé permet une augmentation très importante de la sensibilité, de la précision de la mesure de masse et de la résolution et équipe la plupart des instruments de type MALDI-TOF.

3.2.2. Le miroir électrostatique, ou reflectron

Le miroir électrostatique a été mis au point par le groupe de Mamyrin en 1972. Il s'agit d'un autre procédé capable de compenser les dispersions en énergie cinétique initiale. En pratique, ce dispositif, placé à la sortie du tube de vol, se présente sous la forme d'électrodes portées à des potentiels croissants formant ainsi un champ électrostatique uniforme. Ce champ va permettre de réfléchir les ions et de les refocaliser. En effet, les ions les plus rapides vont pénétrer plus profondément dans le miroir, la distance parcourue au total sera plus grande, ainsi deux ions de même rapport m/z mais ayant des vitesses initiales différentes vont être réfléchis différemment de sorte qu'ils arrivent en même temps sur le détecteur (figure 10).

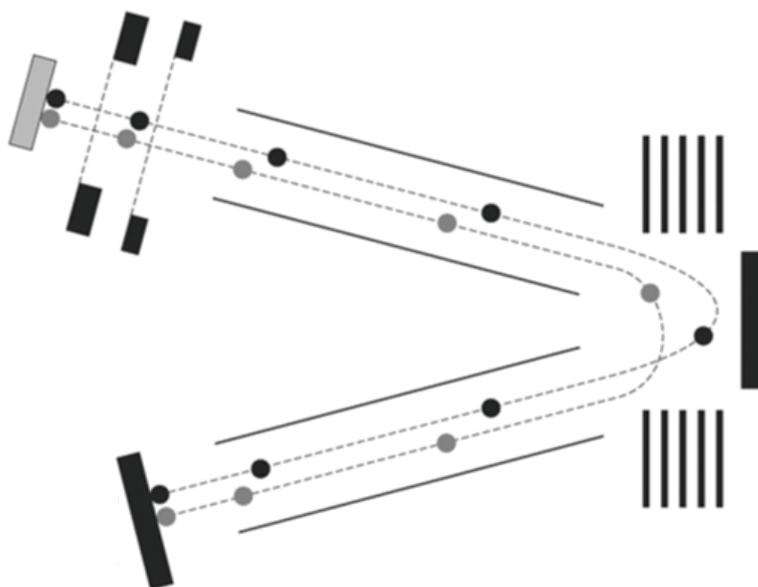


Figure 10 : Schéma de principe d'un miroir électrostatique, ou reflectron. Deux ions ont les mêmes rapports m/z , mais des vitesses initiales différentes.

En plus de refocaliser en temps, le reflectron permet d'allonger le temps de vol des ions et par conséquent d'augmenter encore la résolution en masse. Néanmoins, il n'est pas efficace sur toute la gamme de masse, au delà d'une valeur de m/z d'environ 5000, il n'apporte pas d'avantage par rapport au mode linéaire. C'est pourquoi, sur les spectromètres de masse équipés de reflectron, il est possible de le désactiver et d'utiliser le mode linéaire.

3.3. Les analyseurs TOF-TOF

Récemment, de nouveaux analyseurs de masse permettant des analyses en MS/MS à haute énergie (> 1 keV) ont été développés. Ils ont rapidement remplacé les analyseurs de masse de type magnétique pour cet usage. La MS/MS, ou spectrométrie de masse en tandem, consiste à induire un phénomène de fragmentation à des ions qui sont à l'origine stables (temps de vie $> 10^{-4}$ s).

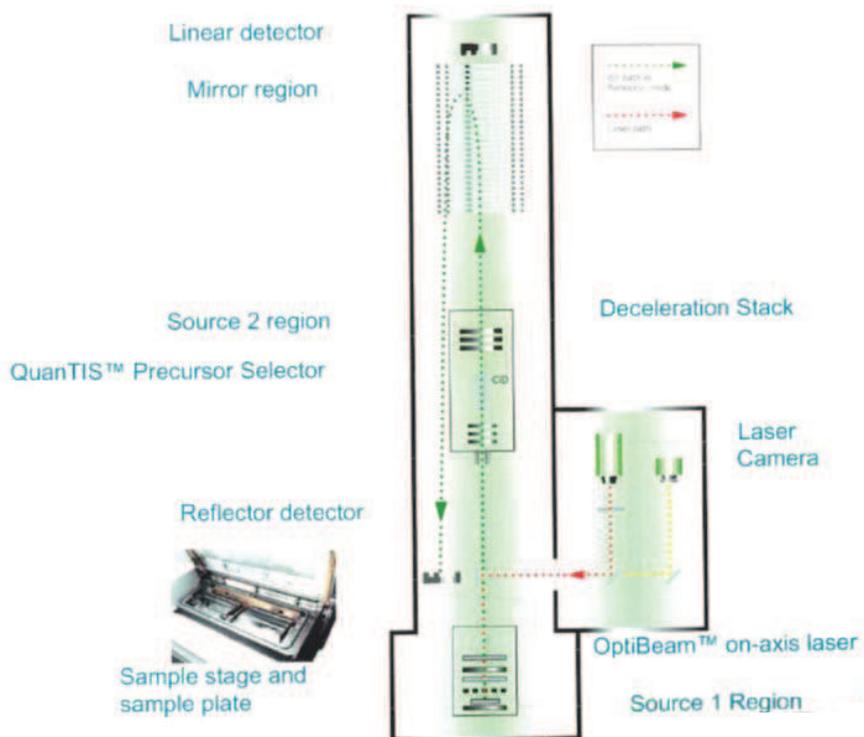


Figure 11 : Schéma de principe du spectromètre de masse 4800 MALDI TOF-TOF de la société Applied Biosystems.

En pratique, les analyseurs de type TOF-TOF sont le plus souvent constitués d'un premier temps-de-vol permettant de sélectionner une valeur unique de m/z , d'une cellule de collision contenant une certaine pression d'un gaz de collision inerte et d'un second temps-de-vol permettant d'analyser les ions fragments (Figure 11). Dans la théorie, lors de la collision, une partie de l'énergie cinétique du gaz de collision E_{lab} (de masse m_G) peut être transférée à l'ion précurseur (de masse m). La quantité maximale d'énergie qui peut être convertie est appelée énergie au centre de masse E_{CM} et peut être calculée avec la relation suivante :

$$E_{CM} = E_{lab} \times \frac{m_G}{m_G + m}$$

Il est alors évident que plus la masse de l'ion précurseur est grande, moins la collision sera efficace. La manière la plus simple d'augmenter l'efficacité de la collision est alors d'augmenter la masse du gaz de collision, en utilisant par exemple de l'Argon à la place de l'air souvent utilisé.

4. Détection du signal

Cette partie sera consacrée au dernier maillon constituant un spectromètre de masse, les systèmes de détection du signal. Ou comment un signal ionique sortant de l'analyseur peut être converti en signal électrique, et comment ce signal électrique peut être traité par un système informatique. Seuls les systèmes équipant les modèles de TOF-SIMS et de MALDI TOF-TOF, que j'ai utilisés durant ma thèse, seront présentés.

Le système de détection équipant le spectromètre de masse de type TOF-SIMS est composé d'une galette de microcanaux, suivi d'un scintillateur et d'un photomultiplicateur. Ce dispositif est moins sensible aux effets de saturations que le montage de deux galettes de microcanaux disposées en chevron qui équipe le MALDI TOF-TOF.

Une galette de microcanaux, aussi appelé MCP (*MicroChannel Plate*) permet de convertir des ions en électrons (figure 12). Ce dispositif est constitué d'un disque en verre d'environ 0,5 mm d'épaisseur recouvert d'un alliage de nickel capable d'émettre un électron à l'impact d'un ion. Le disque est percé d'une multitude de microcanaux, d'environ 10 μm de diamètre (6 μm sur un MCP haute résolution), dont l'axe est incliné d'environ 8° et espacés de 15 μm . Lorsqu'ils sont soumis à une forte différence de potentiel (1 kilovolt entre les deux faces), chaque canal se comporte comme une dynode de conversion continue. Chaque ion venant frapper la surface intérieure d'un canal entraîne l'émission d'un ou plusieurs électrons. À partir de cet impact commence une cascade d'impacts électroniques amplifiant le signal original de l'ordre de 10^3 pour un montage simple et jusqu'à 10^6 pour un montage de deux galettes en chevron.

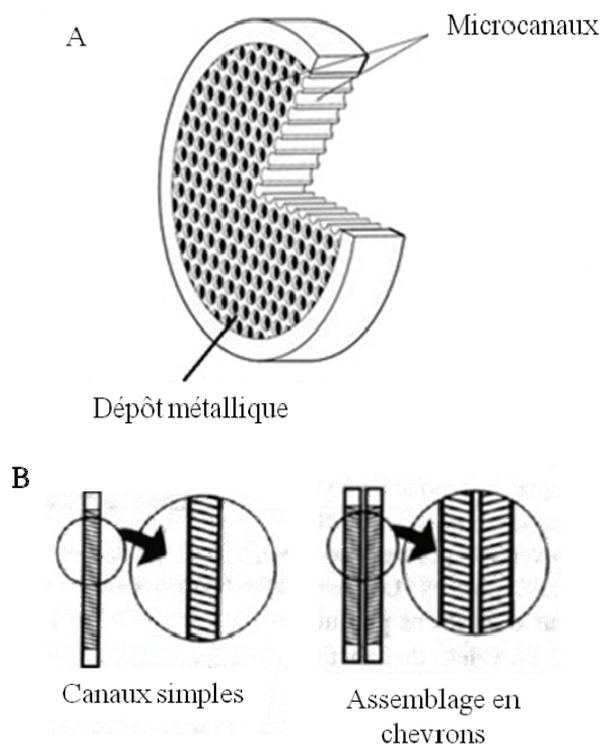


Figure 12 : A. Schéma représentant une galette de microcanaux. B. Deux types de montage : canaux simples et assemblage en chevrons.

Une étude menée à la fin des années 90 a montré que l'efficacité de ces systèmes est très dépendante de la masse et de la vitesse des ions,⁶⁵ ils ne peuvent donc pas être utilisés seuls lors d'études quantitatives sur de grandes gammes de masses. Un autre inconvénient mis en évidence, est qu'ils présentent un effet de saturation important. Ce dernier point a été contourné dans le cas du TOF-SIMS en utilisant un système de détection hybride. Dans ce système, les électrons émis par la galette de microcanaux sont convertis par un scintillateur en photons, qui sont à leurs tours convertis en électrons par un photomultiplicateur. Le gain d'un tel montage est supérieur au gain obtenu avec une simple galette de microcanaux et atteint 10^6 .

Dans le cas du spectromètre de masse TOF-SIMS, le système de détection est complété par un convertisseur temps-numérique précédé d'un discriminateur à fraction constante permettant d'obtenir une résolution en temps de 400 ps avec des temps morts d'environ 20 ns. Dans le cas du MALDI TOF-TOF, le signal analogique à la sortie du détecteur est converti par un digitaliseur, système s'apparentant à un oscilloscope numérique, dont la fréquence d'échantillonnage est de l'ordre de 2 GHz (500 ps).

5. Les instruments

5.1. Le TOF-SIMS IV

Ce spectromètre de masse est celui que j'ai le plus utilisé durant ma thèse. Il s'agit d'un modèle de TOF-SIMS vendu par la société Ion ToF GmbH. La photo du spectromètre est présentée en figure 13.

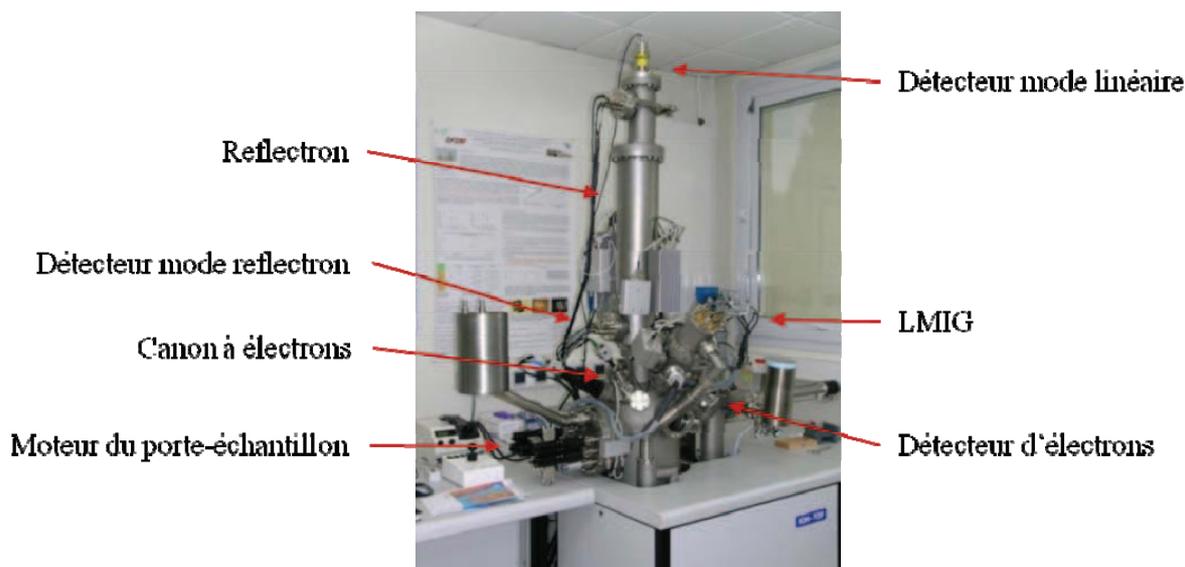


Figure 13 : Photographie du spectromètre de masse TOF-SIMS IV (Ion ToF GmbH).

Il est constitué :

- D'une source à pointe liquide LMIG délivrant des agrégats d'ions Bismuth
- D'un analyseur à temps-de-vol équipé d'un reflectron (trajet des ions = 2m)
- D'un détecteur de type MCP couplé à un scintillateur et un photomultiplicateur en mode linéaire et reflectron
- D'un canon à électrons (*Electron Floodgun*)
- D'un détecteur à électrons secondaires

La source d'ions primaires émet simultanément des agrégats du type $\text{Bi}_n^{\text{q}+}$, le spectromètre est donc équipé d'un double système de pulsation/sélection capable de sélectionner un type d'ion primaire et de transformer le faisceau d'ions continu en faisceau pulsé (Figure 14). Le faisceau d'ions primaires continu émis à une énergie de 25 keV par la source est dans un premier temps pulsé par un système de plaque de déflexion. Les ions sont alors séparés en fonction de leur rapport m/z dans un petit temps-de-vol. Les ions primaires

peuvent ensuite être sélectionnés grâce à un second système de plaque de déflexion. À la sortie de ce dispositif, le faisceau d'ions primaires est pulsé à une durée de quelques nanosecondes et ne contient plus qu'une seule espèce d'ion.

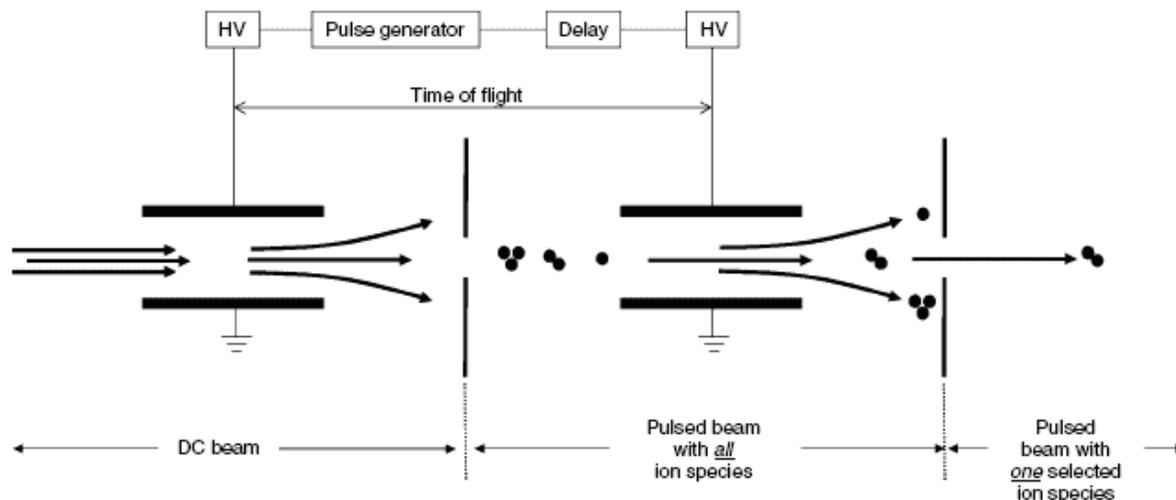


Figure 14 : Schéma de principe du dispositif de pulsation/sélection équipant le TOF-SIMS IV (Ion ToF GmbH). Extrait de la référence 55.

L'analyseur étant un TOF, il est nécessaire que les ions secondaires soient émis de manière pulsés. Plus l'impulsion d'ion primaire est longue, plus la durée d'émission des ions secondaires est longue. Ceci ayant pour conséquence de diminuer la résolution en masse. Pour palier à ce problème, le paquet d'ion constituant le faisceau d'ions primaires est « rassemblé » par un système de « *bunching* ». Ce système est composé de deux plaques électrostatiques séparées par une distance supérieure à la longueur du paquet d'ions. Lorsqu'une impulsion d'ions pénètre dans ce dispositif, une différence de potentiel est appliquée entre ces deux plaques. Les ions les plus rapides, à l'avant du paquet, seront ralentis, et les ions les plus lents, à l'arrière du paquet, seront accélérés. On obtient ainsi des paquets d'ions plus compacts possédant une durée d'environ une nanoseconde.

La source d'agrégat de bismuth qui équipe le spectromètre de masse possède trois modes de fonctionnement (figure 15) :

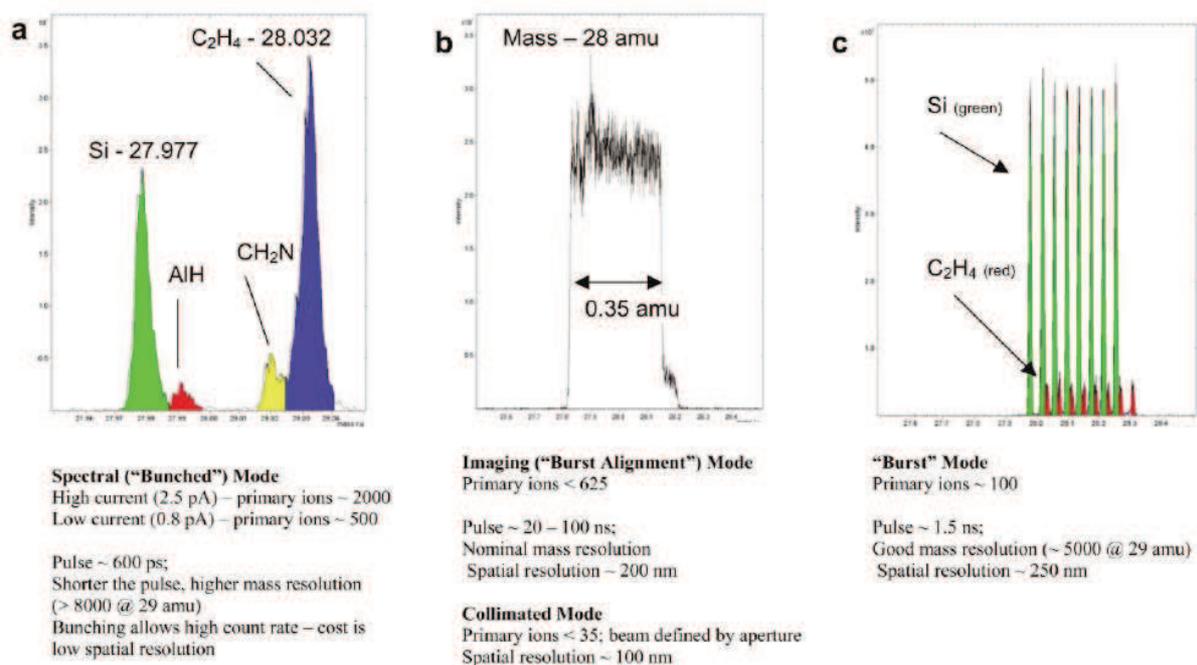


Figure 15 : Les trois principaux modes de fonctionnement de la source d'ions primaires équipant le spectromètre de masse. Extrait de la référence 66.

Dans le mode dit « *high current bunched mode* » (fig. 15A), le courant d'ions primaires est pulsé à environ 10 kHz et le courant, mesuré avec une cage de Faraday placée sur le porte-échantillon, est d'environ 1,5 pA pour Bi_1^+ et 0,5 pA pour les agrégats Bi_3^+ , avec une durée d'impulsion d'environ 1 ns. Ce mode garantit une résolution spatiale de l'ordre de 2 μm et une excellente résolution en masse, environ 6000 au rapport m/z 500 (FWHM).

Dans le mode dit « *burst alignment* » (fig. 15B), le faisceau d'ions primaires n'est pas « bunched » en sortie du système de pulsation/sélection. Les impulsions sont donc très longues (environ 30 ns), ce qui entraîne une perte de résolution en masse (la résolution n'est plus qu'unitaire). En contrepartie, le faisceau devient plus fin ce qui rend accessible des résolutions spatiales de l'ordre de quelques centaines de nanomètres (couramment 400 nm). De plus, le courant d'ions primaires pulsé mesuré n'est plus que de 0,05 pA à 10 kHz, ce qui a pour conséquence d'allonger la durée d'analyse.

Enfin, le dernier mode, appelé « *burst mode* » (fig. 15C), permet une résolution spatiale de quelques centaines de nanomètres et une résolution en masse de plusieurs milliers. Ceci peut être obtenu en divisant un pulse d'ions primaires non « bunched » en plusieurs impulsions d'une durée d'environ 1 nanoseconde. Le courant d'ions primaires est alors extrêmement faible, ce qui conduit à des temps d'analyse très longs.

Après une impulsion d'ions primaires, les ions secondaires émis (positifs ou négatifs) sont extraits avec une différence de potentiel de 2 kV, traversent la région libre de champ, le reflectron et sont post-accélérés à une énergie de 10 keV avant de frapper la surface du détecteur. Pour plus de détails sur le système de détection équipant le TOF-SIMS IV, se référer au paragraphe 4 (Détection du signal).

Afin de neutraliser les charges qui pourraient s'accumuler à la surface des échantillons après une impulsion d'ions primaires et extraction des ions secondaires, un faisceau d'électrons de faible énergie (18 eV) émis par un canon à électrons, ou « *electron floodgun* », balaye la surface. Ce dispositif est particulièrement efficace sur les échantillons peu conducteurs. Des études ont montré que ce flux d'électrons modifie la composition chimique de la surface de l'échantillon. Plus de fragments de basse masse ont été observés, sûrement résultant d'un mécanisme d'impact électronique à la surface. Néanmoins, une zone de bon fonctionnement du canon à électron a été définie par l'équipe de Gilmore (figure 16).⁶⁷

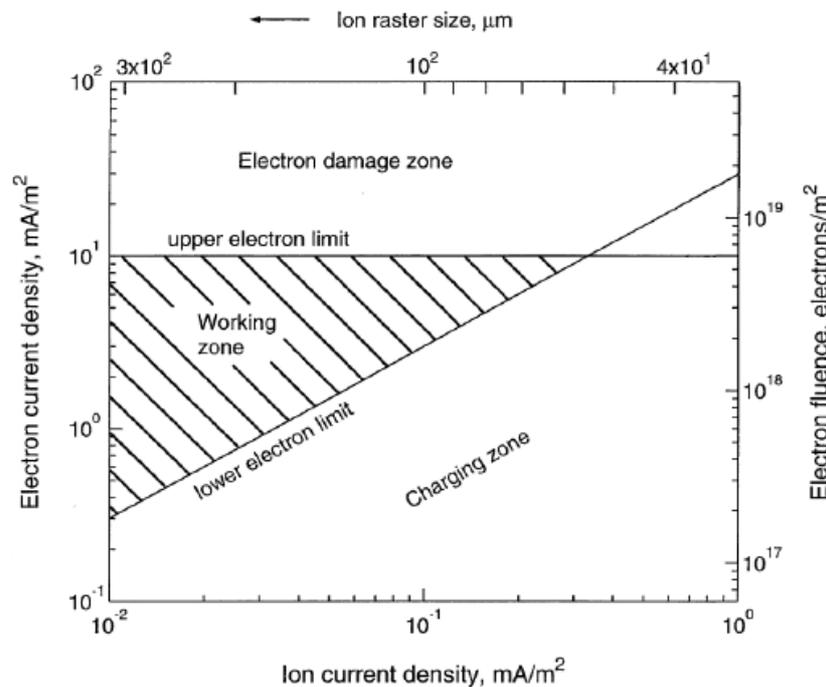


Figure 16 : Zone de fonctionnement d'un canon à électrons utilisé sur un spectromètre de masse TOF-SIMS. Extrait de la référence 67.

5.2. Le 4800 MALDI TOF-TOF

Ce spectromètre de masse de type MALDI TOF/TOF est commercialisé par la société Applied Biosystems / MDS Sciex (figure 17). Il est équipé d'un laser OptiBeam™ Nd:YAG délivrant des impulsions de photons de longueur d'onde 355 nm (3^{ème} harmonique) à une fréquence de 200 Hz. Le diamètre du faisceau laser est d'environ 50 µm. La source est également équipée d'un dispositif d'extraction retardée.



Figure 17 : Photographie du spectromètre de masse MALDI TOF-TOF 4800 Applied Biosystems / MDS Sciex.

L'analyseur est composé d'un premier temps-de-vol linéaire, suivie d'une cellule de collision et d'un second temps-de-vol équipé d'un miroir électrostatique. En mode MS simple (avec reflectron), cet instrument présente une excellente sensibilité, de l'ordre de l'attomole pour des petits peptides, et une résolution d'environ 15 000 (FWHM) à m/z 1500. En mode MS/MS, l'ion précurseur, après avoir été séparé par le premier temps-de-vol, est sélectionné par un dispositif appelé « *Time Ion Selector (TIS)* » composé d'une série de plaques de déflexion. Une fois dans la cellule de collision, qui est à une pression en air de 3×10^{-4} hPa au lieu de 10^{-7} hPa dans le reste de l'instrument, les ions décélérés à une énergie cinétique de un ou deux keV se fragmentent par collision avec le gaz. Les ions fragments sont ensuite accélérés à 20 keV et analysés par le second temps-de-vol. Pour plus de détails sur le détecteur équipant le 4800 MALDI TOF-TOF, se référer au paragraphe 4 (Détection du signal).

6. Imagerie par spectrométrie de masse

6.1. Principe

Le principe de l'imagerie par spectrométrie de masse est d'utiliser le pouvoir analytique de cette technique afin de cartographier des composés à la surface d'un échantillon. Il existe plusieurs modes d'acquisition des images.

Dans le premier mode, appelé mode « microsonde », la surface de l'échantillon est divisée en pixels. Chaque pixel sera ensuite analysé par spectrométrie de masse, on obtiendra donc un spectre par pixel composant l'image. A la fin de l'acquisition, un fichier est créé regroupant tous les spectres de masse avec leurs coordonnées, ainsi qu'un spectre total correspondant à la somme de tous les spectres. Il suffira de sélectionner un ion dans le spectre total pour que sa carte de densité soit calculée. Ainsi autant d'images qu'il y a d'ions dans le spectre peuvent être calculées. Ce mode nécessite que la source d'ion soit focalisée, il est donc utilisé avec des techniques comme le TOF-SIMS, le NanoSIMS ou le MALDI-TOF. Dans ce mode, les images sont donc caractérisées par la taille des pixels et la résolution spatiale. La résolution spatiale est définie comme étant la distance séparant deux pixels, elle est donc très dépendante de la focalisation du faisceau.

Le second mode, appelé mode « microscope », nécessite, quant à lui, que le faisceau d'ions primaires ou laser soit défocalisé. Les analyseurs utilisés projettent alors l'information spatiale à un détecteur sensible à la position à l'aide d'optiques ioniques spécifiques (secteurs électrostatiques dans le cas du spectromètre de masse TRIFT). Les images sont donc enregistrées dans l'ordre d'arrivée des ions. La résolution spatiale n'est pas dépendante de la source mais de la résolution du détecteur ($\sim 4 \mu\text{m}$).

La figure 18 présente le principe général de l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS et MALDI-TOF (donc en mode « microsonde »). Avant l'analyse, les échantillons doivent d'abord être préparés. Des coupes de quelques micromètres d'épaisseur sont réalisées et déposées sur des supports spécifiques. Pour l'imagerie MALDI-TOF, un dépôt de matrice est nécessaire.

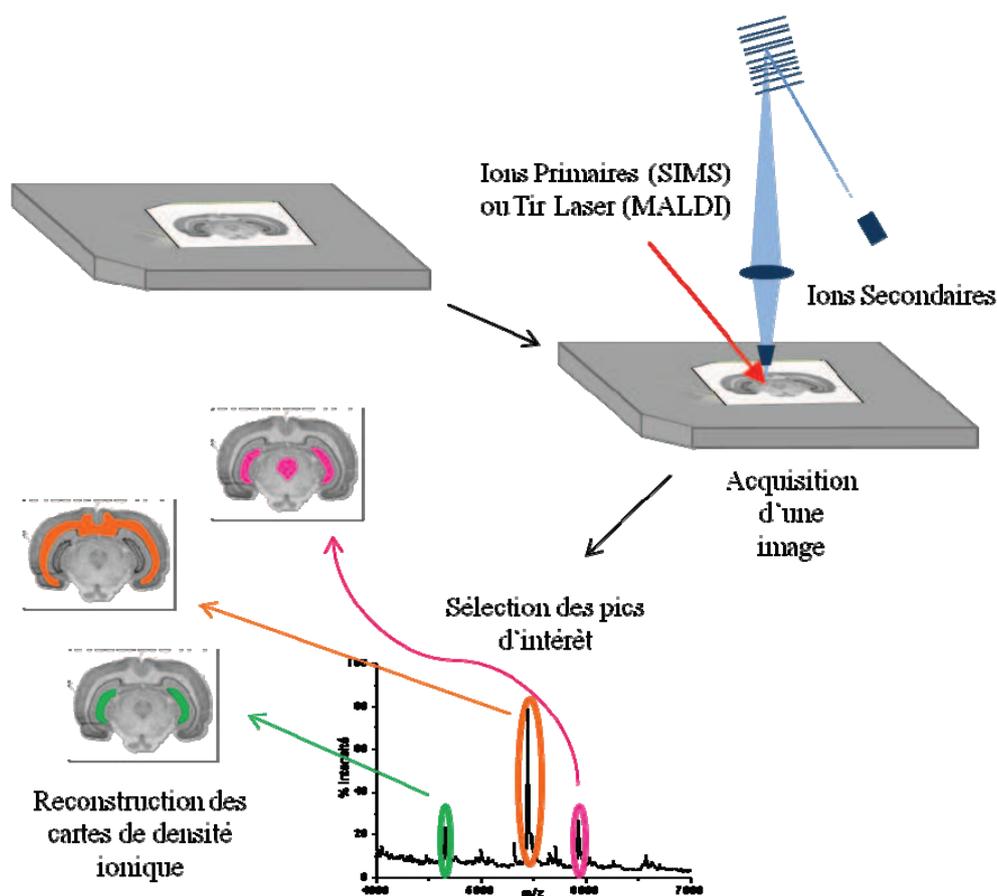


Figure 18 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF et TOF-SIMS.

6.2. Imagerie TOF-SIMS

L'imagerie SIMS a été utilisée pour la première fois par Benninghoven en 1971.⁶⁸ À l'époque, sa principale utilisation était l'imagerie d'éléments présents sur des surfaces métalliques avec des sources d'ions primaires peu efficaces au delà de 200 Daltons. C'est depuis l'avènement des sources polyatomiques que l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS a pu être utilisée afin de détecter et de localiser des molécules biologiques de plus haut poids moléculaire.^{69,70} De nos jours, beaucoup d'applications de l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS ont été publiées dans le domaine de la biologie ou de la médecine.^{71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81}

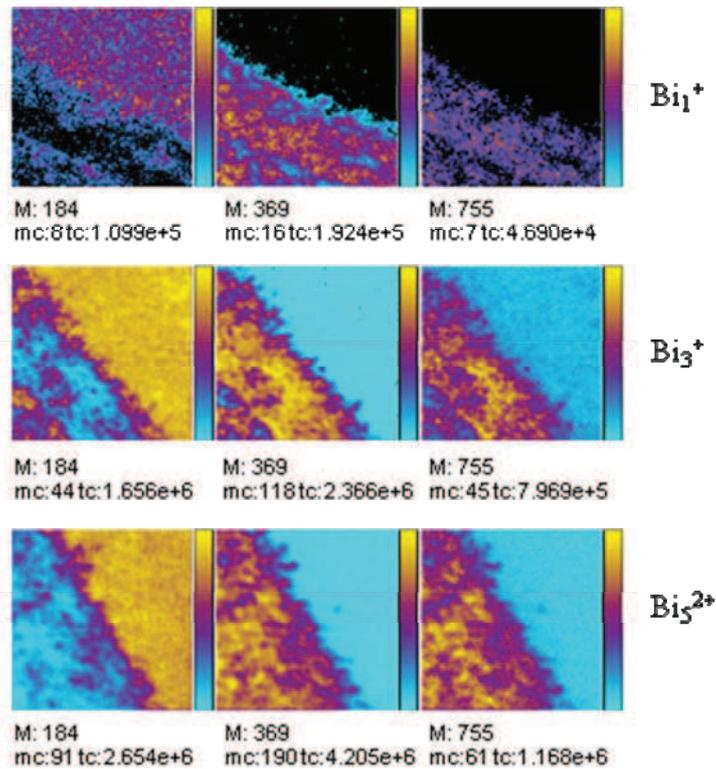


Figure 19 : Images TOF-SIMS en bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Taille de $256 \times 256 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels (taille de pixels de $1 \mu\text{m}$). La PIDD a été fixée à 10^{12} ions. cm^{-2} . Extrait de la référence 82.

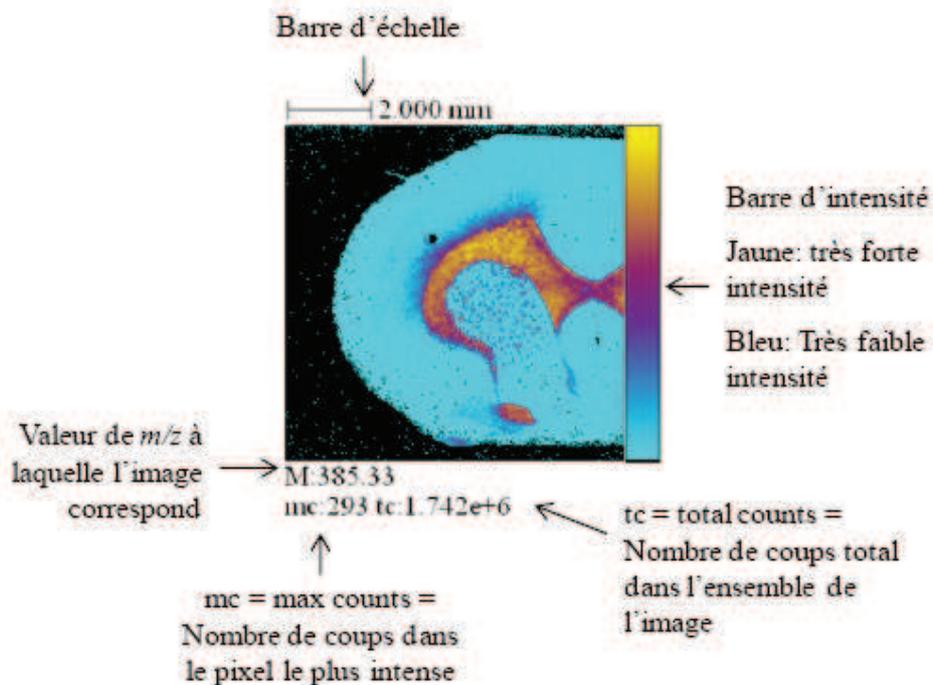


Figure 20 : Signification des informations fournies par une image. Extrait de la référence 83.

Comme nous l'avons vu précédemment, le choix de l'ion primaire est primordial. La figure 19 présente les images enregistrées avec trois différents ions primaires émis par la source qui équipe le TOF-SIMS IV : Bi_1^+ , Bi_3^+ et Bi_5^{2+} à la bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat. Ces images contiennent différentes informations qu'il est nécessaire de savoir déchiffrer (Figure 20). L'amplitude de la barre d'intensité correspond à la valeur mc indiquée au bas de l'image. Ainsi, on peut voir sur ces images qu'il y a un gain de contraste (valeur mc) d'un facteur 8 à 10 entre les images obtenues sous bombardement d'ions primaires Bi_1^+ et les images obtenues sous bombardement d'ions primaires Bi_3^+ ou Bi_5^{2+} . Néanmoins, la durée d'acquisition va en augmentant, elle est de 4 minutes pour le premier, 10 minutes pour le second et 100 minutes pour le dernier. Le choix de l'ion primaire Bi_3^+ semble donc être un bon compromis entre contraste des images et temps d'acquisition.

Un autre paramètre expérimental important est le choix du mode de balayage de l'échantillon. Sur le spectromètre de masse TOF-SIMS IV, deux modes sont disponibles, le mode « *Beam scan* » et le mode « *Stage scan* ». Si la taille de l'échantillon est inférieure à $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, le mode utilisé sera le mode « *Beam scan* ». Dans ce mode, le porte-échantillon est immobile et c'est le faisceau d'ions primaires qui balaie la surface de l'échantillon pixel par pixel. Au contraire, si l'échantillon est plus grand, c'est alors le porte-échantillon qui se déplace position par position (mode « *Stage scan* »). Le faisceau d'ions primaires balaie alors à l'intérieur de chaque pixel. Le premier mode de balayage est évidemment celui qui permet d'acquérir des images le plus rapidement (environ 30 minutes), la vitesse de déplacement du porte-échantillon étant un facteur limitant dans le second mode (acquisition en environ 6 heures).

Un étalonnage en masse interne est possible en utilisant des ions de faible masse : l'énergie cinétique initiale des ions secondaires étant très faible, cela permet de conserver une relation linéaire entre le temps de vol et la racine carrée du rapport m/z sur toute la gamme de masse. Nous utilisons donc les pics correspondant à H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ et CH_3^+ en mode d'ionisation positif, et H^- , C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_2H^- , C_3^- et C_4H^- , en mode d'ionisation négatif.

Pour l'acquisition et l'analyse des données générées en imagerie TOF-SIMS, nous utilisons les logiciels propriétaires Ion Tof : IonSpec et IonImage.

6.3. Imagerie MALDI TOF

Avant la mise au point de l'imagerie, l'ionisation MALDI était déjà utilisée pour l'analyse directe de tissus. Cette méthode s'est révélée être un outil efficace pour l'analyse de cellule unique, notamment l'analyse de neurones de *Lymnaea stagnalis* en 1993 (limnée des étangs, escargot d'eau douce).⁸⁴ Par la suite, de nombreuses études ont permis l'analyse de tissus d'origine variée ainsi que des études différentielles.^{85,86,87,88,89,90,91,92}

Les premiers travaux en imagerie par spectrométrie de masse MALDI sont à l'initiative d'abord du groupe de Kaufmann et Spengler en 1994,⁹³ puis du groupe du Pr. R.M. Caprioli en 1997,^{94,95,96} et la première application biologique fut publiée en 2001 par Stoeckli *et al.*⁹⁷ Depuis, l'imagerie MALDI a sans cesse progressé, notamment au travers du développement de programmes informatiques spécifiques permettant l'acquisition automatique et la réalisation d'images.⁹⁸

En imagerie MALDI, le dépôt de la matrice est une étape essentielle. En effet, l'objectif est de recouvrir de manière uniforme toute la surface d'une coupe de matrice sans qu'aucune délocalisation n'apparaisse. La méthode que nous utilisons au laboratoire consiste à nébuliser la matrice à l'aide d'un appareil robotisé qui a été mis au point par la société Leap technologies (Carrboro, USA) (Figure 21). Dans ce système, la solution de matrice est aspirée par une pompe isocratique et passe dans un bloc chauffé (jusqu'à 150°C) pour être enfin nébulisée sous pression d'azote (~700 mbar).



Figure 21 : Photographie du nébuliseur Leap Technologies utilisé au laboratoire.

Après que la matrice ait été nébulisée à la surface de l'échantillon, une goutte de la solution de calibration PepMix5 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France) est déposée à côté de la coupe. La composition de ce mélange est présentée dans le tableau 2.

	Masse monoisotopique de l'espèce protoné (Da)
Bradykinin 1-5	573,3150
Bradykinin 1-7	757,3998
Bradykinin	1060,5693
Angiotensin I humaine	1296,6854
Neurotensin	1672,9176

Tableau 2 : Composition de la solution de calibration PepMix5 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France).

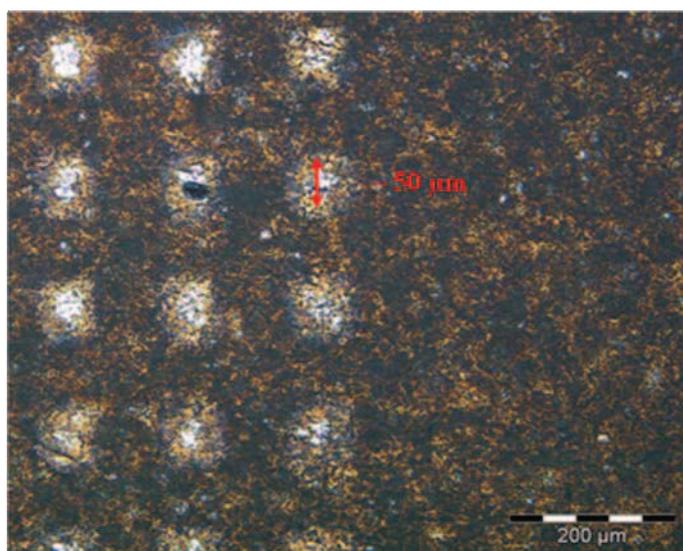


Figure 22 : Photographie d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice α -CHCA à 10 mg.mL⁻¹ et 100 tirs laser.

Pour l'acquisition des images sur le 4800 MALDI TOF/TOF, nous utilisons le logiciel « 4800 Imaging Tool v3.2 » (<http://www.maldi-msi.org>). Celui-ci permet de définir avec précision la taille et le nombre de pixel des axes x et y de l'image. Le diamètre du faisceau laser étant d'environ 50 μm (Figure 22), nous avons limité la taille des pixels à cette valeur. Enfin, le retraitement se fait avec le logiciel « TissueView » (Applied Biosystems).

7. Les lipides

Les lipides forment un groupe hétérogène de composés ayant des structures très différentes qui sont réunis pour leurs propriétés de solubilité : ils sont tous insolubles dans l'eau (ou très faiblement solubles) mais solubles dans les solvants organiques apolaires (Benzène, éther, cyclohexane, isobutanol/éthanol, chloroforme,...). Ils sont caractérisés par la présence dans leurs structures d'au moins un acide gras ou chaîne grasse.

Alors que le métabolisme des glucides et des protéines était l'objet de multiples recherches, celui des lipides fut longtemps considéré, à tort, comme secondaire dans l'ensemble du métabolisme intermédiaire. Pourtant les lipides possèdent de nombreux rôles importants dans divers domaines. Ils ont pour rôle tout d'abord d'être les principaux constituants des membranes cellulaires de l'organisme, ce qui représente environ 20% du poids du corps des mammifères. Ils servent également de réserve énergétique. Mais également, de part leurs propriétés chimiques les lipides servent pour le transport de vitamines liposolubles: A, D, E et K. Ils ont également un rôle dans la synthèse de médiateurs bioactifs (éicosanoïdes, docosanoïdes...), responsables de la régulation des fonctions physiologiques aussi fondamentales que la contraction des muscles lisses, la coagulation sanguine, l'inflammation, l'activité neuronale.

Bien que les lipides jouent un rôle essentiel dans le métabolisme humain, ils sont souvent impliqués dans de nombreuses pathologies comme le cancer ou encore les maladies cardiovasculaires (plaques d'athérome). Ces nombreuses pathologies en rapport avec les molécules lipidiques en font des cibles thérapeutiques d'intérêt grandissant pour les biologistes et les chimistes. Une science leur est donc entièrement consacrée et est de plus en plus développée : la lipidomique.

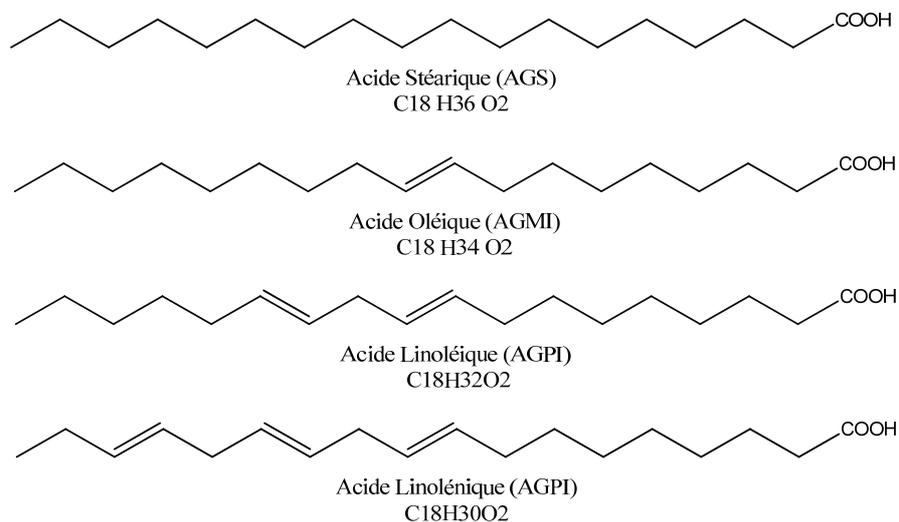
Les lipides sont répertoriés en deux grandes classes : les lipides simples constitués uniquement de carbone, d'oxygène et d'hydrogène et les lipides complexes qui sont des lipides simples liés à des molécules de sucre, d'acides aminés ou des radicaux contenant du phosphore ou du soufre.

Je décrirai ici quelques grandes familles de composés appartenant à ces deux classes, leurs structures chimiques, ainsi que leurs applications dans le système biologique chez

l'homme. La diversité moléculaire des lipides étant immense, je me limiterai à ceux que j'ai pu rencontrer lors de ce travail de thèse.

– Les acides gras et éicosanoïdes

Les acides gras sont des lipides simples et les éléments de base des lipides. Ils sont composés d'un acide carboxylique et d'une chaîne aliphatique allant de 4 à 28 carbones. Trois classes d'acides gras se distinguent : les acides gras simples (AGS), les acides gras mono-insaturés (AGMI) et les acides gras polyinsaturés (AGPI).



Leurs rôles sont multiples :

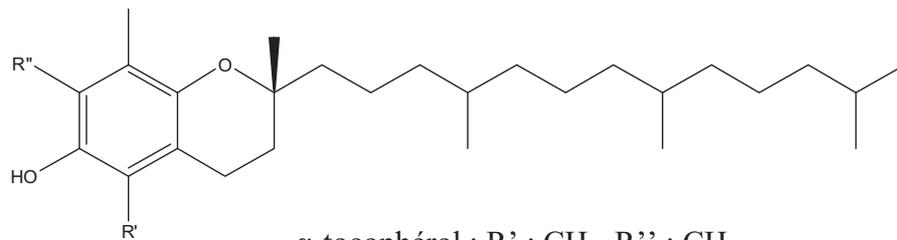
Les acides gras sont une source d'énergie importante pour l'organisme et sont stockés sous forme de triacylglycérol dans les tissus adipeux. Lors d'un effort de longue durée, l'organisme va puiser dans ces stocks et dégrader les acides gras afin de produire de l'énergie sous forme d'ATP.

Les acides gras servent également à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides qui forment les membranes cellulaires. Enfin, les acides gras sont les précurseurs de plusieurs messagers intra- et extracellulaires. Par exemple, l'acide

arachidonique est le précurseur des eïcosanoïdes, hormones intervenant dans l'inflammation, la coagulation sanguine.

– Les tocotriénols et les tocophérols

Les tocotriénols et les tocophérols font partie de la famille des tocochromanols (ou vitamine E). Elles sont présentes en grande quantité dans les huiles végétales, et possèdent une activité antioxydante, en conjugaison avec la vitamine C et le glutathion. On ne dénombre pas moins de huit formes de vitamine E (soit quatre tocophérols et quatre tocotriénols), dont la plus active est l' α -tocophérol. Leurs caractères lipophiles leur permettent d'être localisées dans les membranes cellulaires et donc d'être rapidement efficaces contre l'oxydation des lipides.

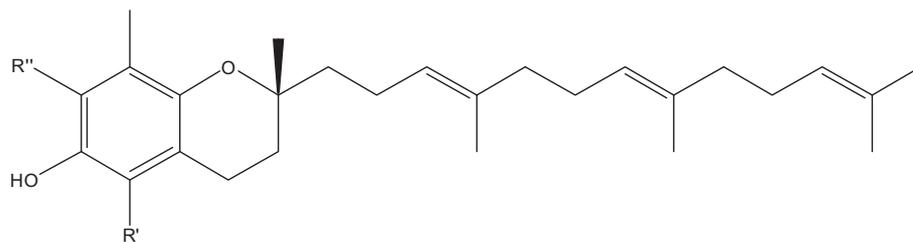


α -tocophérol : R' : CH₃, R'' : CH₃

β -tocophérol : R' : CH₃, R'' : H

γ -tocophérol : R' : H, R'' : CH₃

δ -tocophérol : R' : H, R'' : H



α -tocotriénol : R' : CH₃, R'' : CH₃

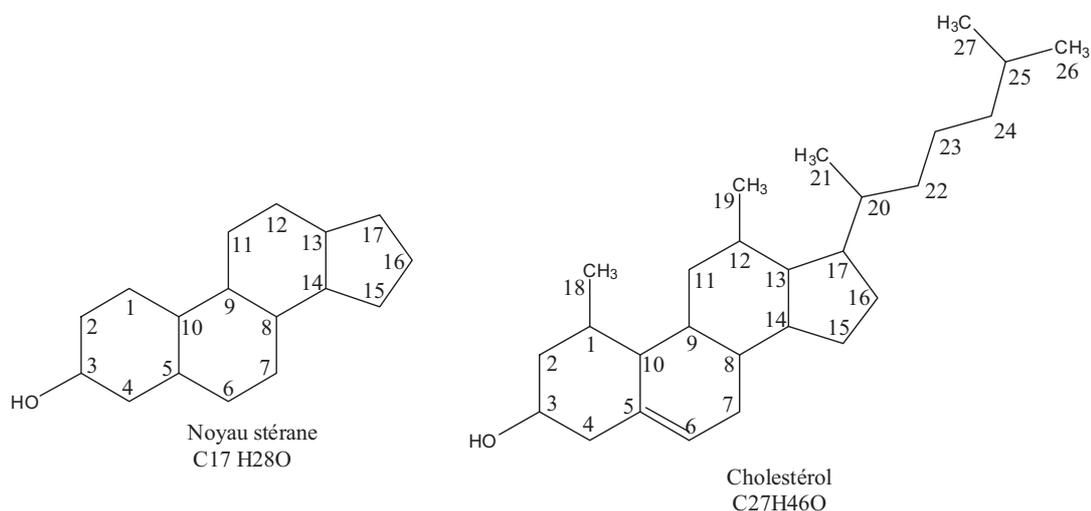
β -tocotriénol : R' : CH₃, R'' : H

γ -tocotriénol : R' : H, R'' : CH₃

δ -tocotriénol : R' : H, R'' : H

– Les stérols

Un stérol est un lipide possédant un noyau stérane dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle. Les stérols sont considérés comme une sous-classe des stéroïdes.



Le cholestérol, l'un des stérols les plus communément répandus, fut isolé pour la première fois en 1814 par le chimiste français Eugène Chevreul. Le cholestérol est composé d'un noyau stérane et de 8 carbones asymétriques (les carbones 3, 8, 9, 10, 13, 14, 17 et 20). L'hydroxyle situé sur le carbone 3 constitue la tête polaire et donc la partie hydrophile du cholestérol. Cette fonction peut être estérifiée par un acide gras, rendant la molécule totalement insoluble dans l'eau.

Le cholestérol est présent sous forme estérifié dans les tissus animaux et est principalement localisé dans le cerveau. C'est un composant majeur des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides. Il rigidifie la membrane et joue également un rôle de précurseur de vitamines (vitamine D3) et d'hormones stéroïdiennes liposolubles (cortisol, œstrogène, progestérone...).

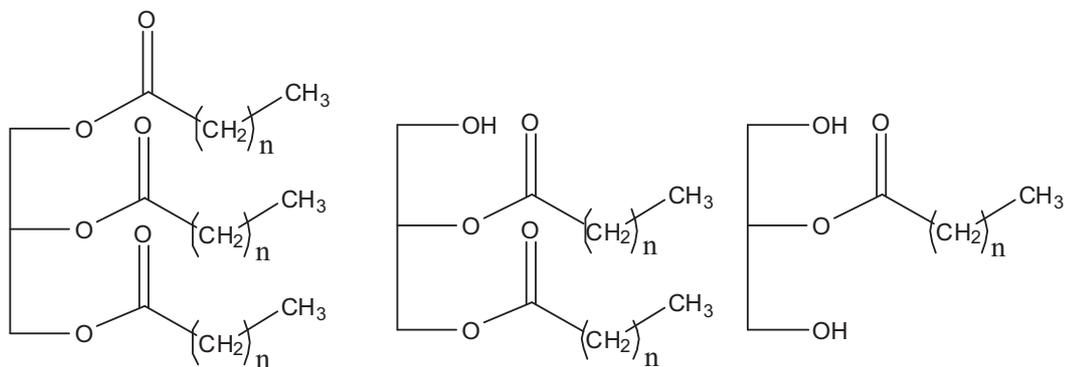
Sa biosynthèse a lieu dans le cytoplasme des cellules du foie et de l'intestin principalement. Elle est assez complexe et fait intervenir de multiples étapes catalysées par de nombreuses enzymes.

– Les mono-, di-et triacylglycérols (MG, DG, TG)

Les triacylglycérols ou triacylglycérides sont des glycérides dans lesquels les trois groupements hydroxyle du glycérol sont estérifiés par des acides gras. Ils sont le constituant principal de l'huile végétale et des graisses animales, principale source énergétique résultant du relargage d'acide gras catalysé par des lipases.

Le 1,2 diacylglycérol joue un rôle de précurseur dans la synthèse des triacylglycérols. Ces molécules sont utilisées comme second messager dans de nombreux processus cellulaires. Les diacylglycérols seraient responsables du transport des protéines à la surface des membranes cellulaires, et leurs implications dans la physiopathologie du cancer et d'autres maladies sont fortement suspectées.

Enfin, les monoacylglycérols sont les produits résultants de la digestion des triacylglycérols dans les intestins. Ils peuvent être répartis en deux groupes : 1- et 2-monoacylglycérols en fonction de la position de la liaison ester sur la fraction glycérol. Ils sont peu représentés dans les tissus en raison de leurs propriétés détergentes et émulsifiantes.



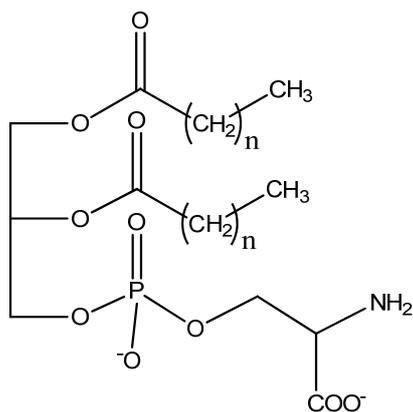
Triacylglycérol (TAG)

Diacylglycérol (DAG)

Monoacylglycérol (MAG)

– Les phosphatidylsérines (PS)

La phosphatidylsérine est un phospholipide composé de deux acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol, elle-même liée à un acide phosphatidique et dont le groupement phosphate est associé à un acide aminé, la sérine.

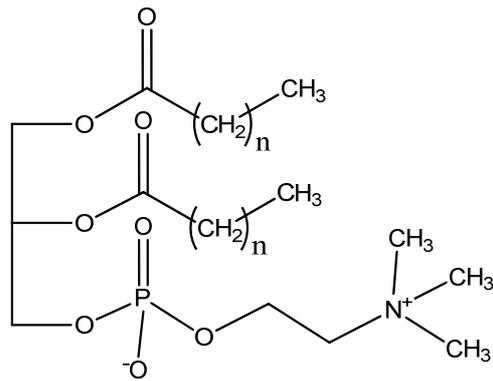


structure de base des phosphatidylsérines

Du fait de son caractère amphiphile, c'est un constituant des membranes plasmiques. Chez les mammifères, on la rencontre principalement du côté intracellulaire. Elle possède une charge nette négative. Or comme elle est principalement présente sur la face intracellulaire, elle est responsable de l'apparition d'une différence de potentiel entre le côté extra-cytosolique et le côté intra-cytosolique. Quand une cellule subit une mort cellulaire par apoptose la phosphatidylsérine n'est plus limitée à la partie cytosolique de la membrane, mais est exposée à la surface de la cellule.

– Les phosphatidylcholines (PC)

La phosphatidylcholine, plus connue sous le nom lécithine, a été découverte par le chimiste français Théodore Gobley. Cette famille de phospholipide est la plus abondante dans les tissus animaux et végétaux. Les phosphatidylcholines sont des lipides formés à partir de choline, de phosphate, de glycérol et d'acides gras. La phosphatidylcholine est naturellement produite par le foie. Elle est un important constituant de la bile dans laquelle elle émulsionne les graisses présentes dans le duodénum. Elle est aussi nécessaire, en plus des sels biliaires, pour empêcher que les gouttelettes lipidiques ne se ré-agglutinent. En tant que phospholipide, elle participe à la membrane des cellules et sert à préserver leur élasto-viscosité. Elle est un composant essentiel du système nerveux et constitue près de 30% du poids sec du cerveau et de 15% des nerfs.

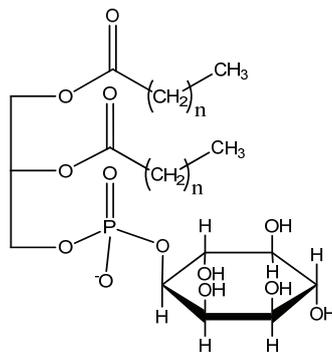


structure de base des phosphatidylcholines

– Les phosphatidylinositols (PI)

Le phosphatidylinositol est un phospholipide, constituant des membranes cellulaires. Cette molécule est composée d'un groupement phosphatidyl (deux acides gras estérifiés sur une molécules de glycérol, elle-même liée de façon covalente à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule d'inositol, un polyol cyclique.

De part leur structure anionique, ils peuvent interagir avec des protéines et les réguler. Ils sont également la principale source de diacylglycérols grâce à l'action de la phospholipase C.

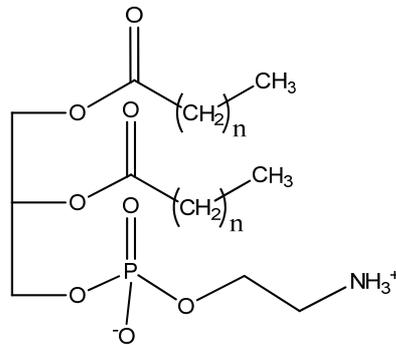


structure de base des phosphatidylinositol

– Les phosphatidyléthanolamines (PE)

La phosphatidyléthanolamine aussi appelée céphaline, est un phospholipide constituée de deux acides gras estérifiés sur une molécule de glycérol, elle-même liée à un acide phosphatidique et dont le groupement phosphate est associée à une amine, l'éthanolamine.

La céphaline se trouve dans toutes les cellules vivantes, et en particulier dans les tissus du système nerveux tels que la substance blanche du cerveau, les nerfs, les tissus nerveux, et la moelle épinière chez l'homme. Alors que la lécithine est le principal phospholipide chez les animaux, la céphaline est le principal phospholipide chez les bactéries. Elle est également précurseur dans la synthèse d'amines biologiquement actives.



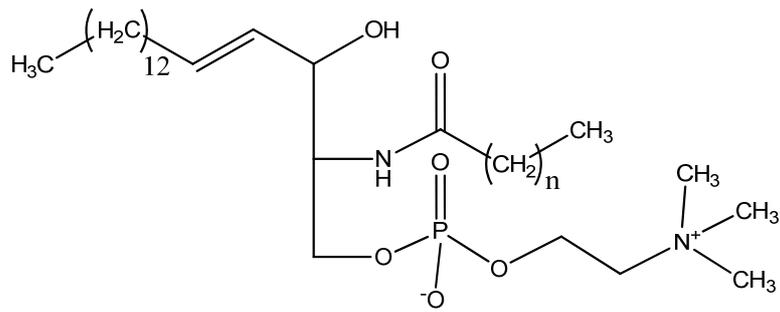
structure de base des phosphatidyléthanolamine

– Les sphingomyélines (SM)

Les sphingomyélines sont des phospholipides membranaires, présents dans toutes les membranes mais surtout dans le système nerveux (gaines de myéline). Ce sont les représentants majeurs des sphingolipides chez l'homme, représentant jusqu'à 50% des lipides totaux dans certains tissus. Elles sont constituées d'une base sphingosine ou dihydrosphingosine, d'un acide gras amidifiant la fonction amine et d'un phosphate estérifiant la fonction alcool primaire et lui même estérifié par une choline.

La biosynthèse des sphingomyélines se fait soit en associant un céramide avec la CDP-choline (voie de Kennedy), soit en amidifiant une sphingophosphorylcholine avec un acyl-CoA à très longue chaîne (voie de Brady). L'hydrolyse des sphingomyélines en céramide et phosphorylcholine est catalysée par une sphingomyélinase acide lysosomique dont le déficit se traduit par la maladie de Niemann-Pick.

On a longtemps pensé que les sphingomyélines avaient uniquement un rôle structural. On sait maintenant qu'ils jouent aussi un rôle de récepteur et de seconds messagers (intervenant dans des fonctions majeures de la vie cellulaire) et que de nombreuses maladies génétiques (sphingolipidoses) s'expliquent par un dysfonctionnement de leur métabolisme.



structure de base des sphingomyélines

La majeure partie de ces lipides a été analysée en spectrométrie de masse TOF-SIMS par Nora Tahallah et Delphine Debois, créant ainsi une base de données regroupant tous les pics détectés et leur attribution.

8. Imagerie SIMS vs MALDI

Comme nous l'avons vu précédemment, l'imagerie MALDI-TOF et l'imagerie TOF-SIMS sont deux techniques capables d'analyser un mélange complexe dans des zones confinées. En acquérant des spectres de masse à intervalles réguliers sur une surface, une carte de densité ionique peut être construite. Dans cette partie, nous comparerons leurs points forts et leurs points faibles sur différents points : la sensibilité, la possibilité d'identifier des composés inconnus *in situ* et la résolution spatiale. Pour cela, nous avons comparé les résultats obtenus à partir de coupe de cerveau de rat.

8.1. Imagerie à une résolution spatiale de plusieurs dizaines de microns

Des spectres de masse enregistrés à la surface d'une coupe sagittale de cerveau de rat par TOF-SIMS et MALDI-TOF en mode d'ionisation positif et négatif sont présentés dans la figure 23. Une partie de la matière grise a été sélectionnée comme région d'intérêt et les spectres en ont été extraits (ROI, *Region of interest*). La plupart des ions sont détectés par les deux méthodes, mais quelques différences sont toutefois observées. On peut noter que le ratio signal-sur-bruit diminue fortement en TOF-SIMS pour des valeurs de m/z élevées, alors que cela dépend beaucoup de la matrice et de l'intensité laser pour l'imagerie MALDI-TOF. Ainsi, même si le profil global ne peut être directement utilisé pour accéder à la concentration relative ou absolue dans les tissus, nous devons nous attendre à avoir les mêmes localisations pour les ions à la surface de l'échantillon.

La figure 24 montre des images obtenues par TOF-SIMS et MALDI-TOF en mode d'ionisation positif et négatif à partir de coupes adjacentes d'un cerveau de rat. L'ion correspondant au carboxylate de l'acide gras C18:0 (acide stéarique) détecté en mode d'ionisation négatif en TOF-SIMS et MALDI-TOF, respectivement à m/z 283,2 et à m/z 283,1 est principalement localisé dans la matière grise. Néanmoins, des petites différences peuvent être observées. En imagerie MALDI-TOF, les acides gras semblent être plus concentrés dans le *gyrus denté* et au bord de la matière grise du *cerebellum*. Cette différence peut être

expliquée par le fait que l'amplitude de l'image MALDI-TOF est six fois plus élevée que celle de l'image TOF-SIMS.

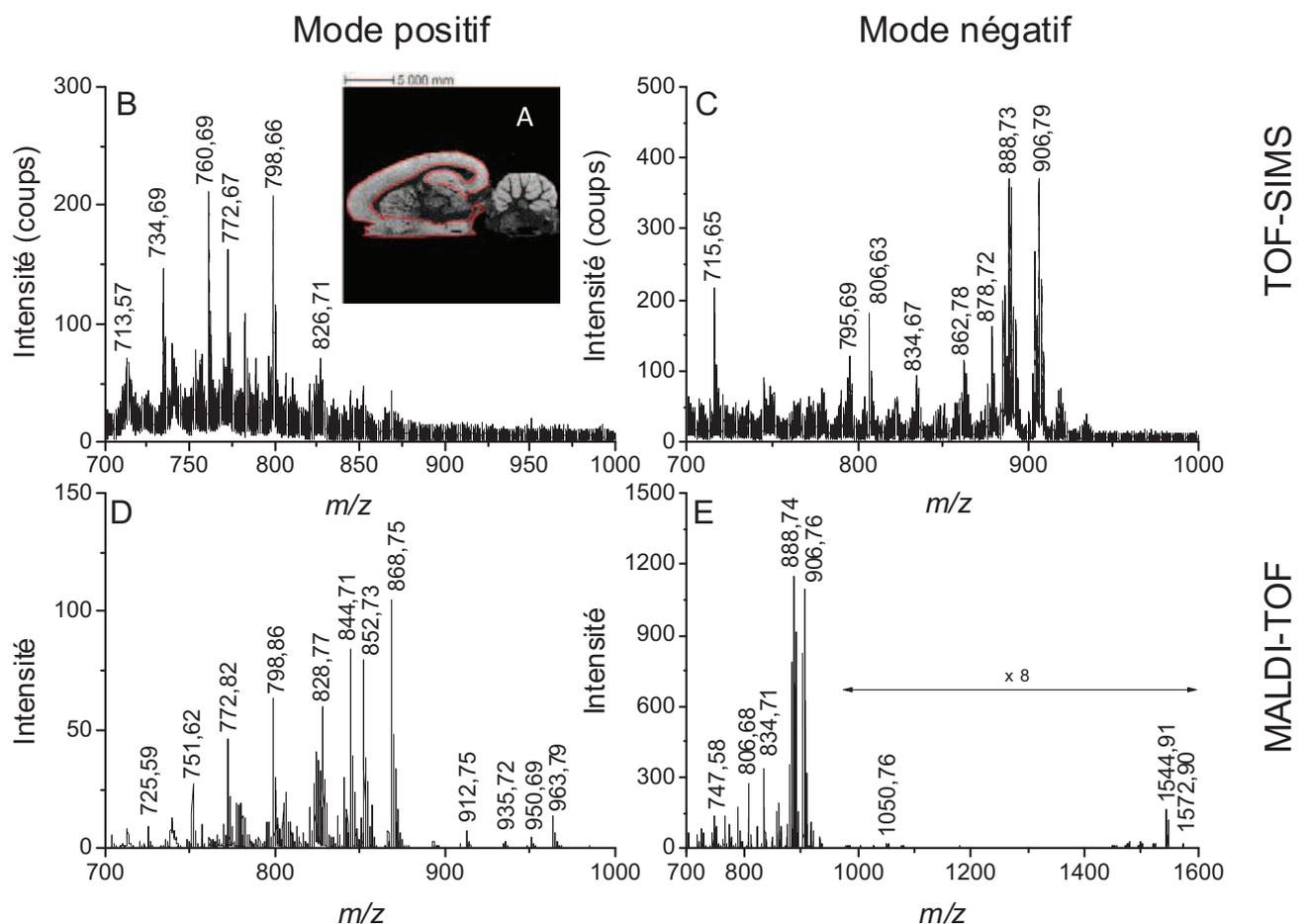


Figure 23 : Spectres de masse extraits de la matière grise après l'acquisition d'images d'une coupe sagittale de cerveau de rat. A : image optique de la coupe de cerveau de rat analysée, l'aire entourée de rouge correspond à la zone dont les spectres ont été extraits. B : spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif. C : spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif. D : spectre MALDI enregistré en mode d'ionisation positif. E : spectre MALDI enregistré en mode d'ionisation négatif.

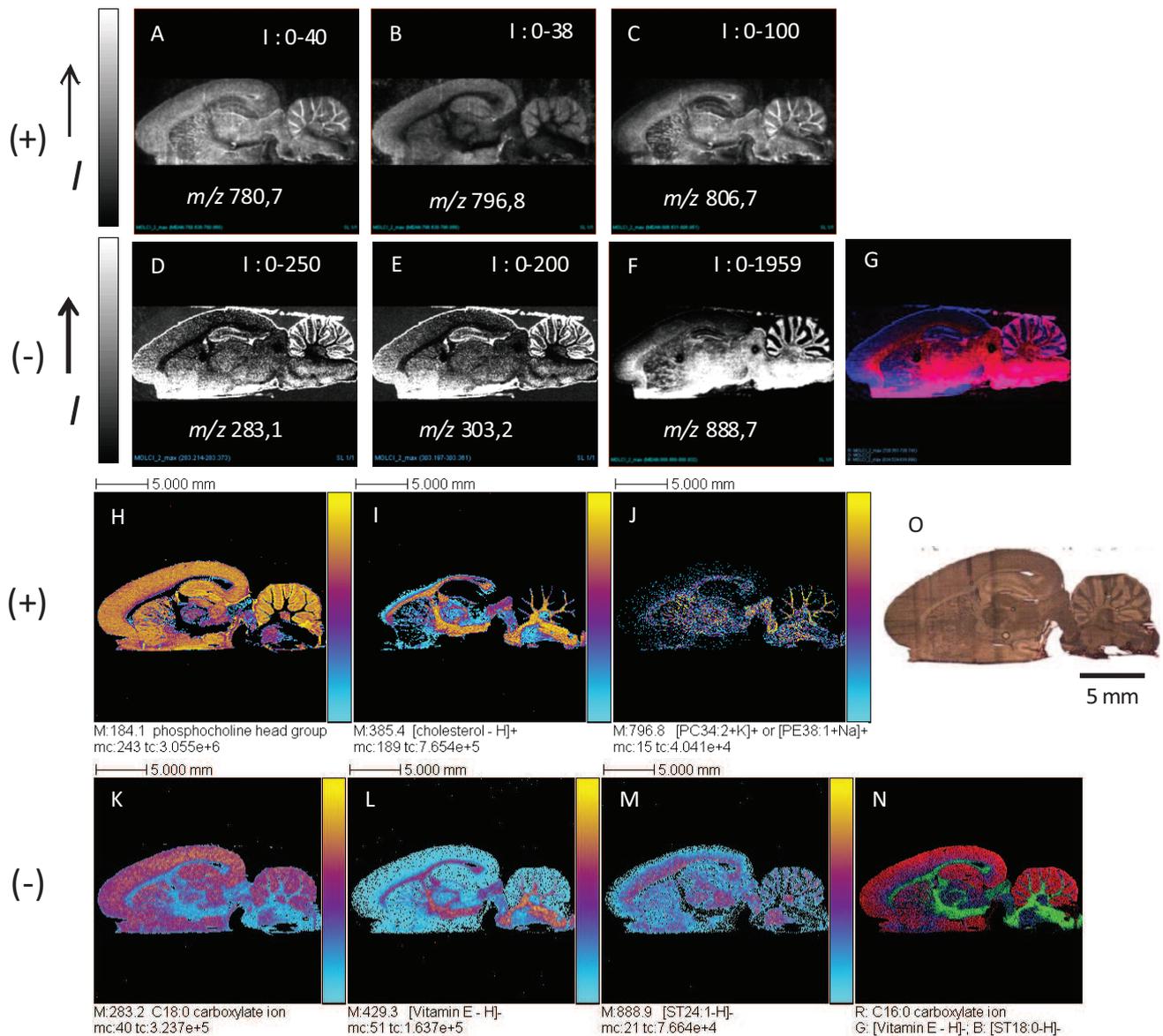


Figure 24 : Images ioniques enregistrées à la surface d'une coupe sagittale de cerveau de rat. **A à C** : Images MALDI-TOF en mode d'ionisation positif. **A** : m/z 780,7 ; phosphatidylcholine $[\text{PC36:5+H}]^+$. **B** : m/z 796,8 ; $[\text{PE40:4+H}]^+$ ou $[\text{PE38:1+H}]^+$ ou $[\text{PC34:2K}]^+$. **C** : m/z 806,7 ; $[\text{PC38:6+H}]^+$. Images de 106x237 pixels avec une taille de pixel de 100 μm . **D à G** : Images MALDI-TOF enregistrées en mode d'ionisation négatif. **D** : m/z 283,1 ; carboxylate de l'acide gras C18:0. **E** : m/z 303,2 ; carboxylate de l'acide gras C20:4. **F** : m/z 888,7 ; sulfatide ($[\text{ST 24:1-H}]^-$). **G** : superposition en deux couleurs des ions à m/z 726,6 ($[\text{PEo-36:2-H}]^-$), en rouge et à m/z 834,7 ($[\text{PS40:6-H}]^-$), en bleu. Images de 214x408 pixels avec une taille de pixel de 50 μm . la valeur de l'intensité indiquée en blanc dans chaque image correspond aux intensités minimum et au maximum dans un pixel.

H à J : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation positif. **H** : m/z 184,1 ; tête polaire de la phosphatidylcholine. **I** : m/z 385,4 ; cholestérol ($[M-H]^+$). **J** : m/z 798,6 ; $[PE40:4+H]^+$ ou $[PE38:1+H]^+$ ou $[PC34:2K]^+$. **K à N** : images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif. **K** : m/z 283,2 ; carboxylate de l'acide gras C18:0. **L** : m/z 429,3 ; vitamine E ($[M-H]^-$). **M** : m/z 888,9 ; sulfatide ($[ST\ 24:1-H]^-$). **N** : superposition en trois couleurs des ions correspondants aux carboxylates de l'acide gras C16:0 en rouge, à la vitamine E en vert et au sulfatide ST18:0 en bleu. Pour toutes les images TOF-SIMS : ion primaire : Bi_3^{2+} ; 50 keV ; PIDD : $3,4 \times 10^8$ ions.cm⁻² ; taille des images de 22,4x22,4 mm² et taille de pixel de 87,5x87,5 μm². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

L'ion à m/z 888,6 détecté en mode d'ionisation négatif pouvant correspondre au sulfatide C24:1 est fortement concentré dans la matière blanche dans les deux méthodes. Les ions à m/z 385,4 (cholestérol; $[M-H]^+$) en mode d'ionisation positif et à m/z 429,3 (vitamine E; $[M-H]^-$) en mode d'ionisation négatif, ne sont détectés qu'en imagerie TOF-SIMS. Ces deux ions sont parfaitement co-localisés. En utilisant les superpositions d'images (Fig. 24 G et 24N), des structures locales peuvent être facilement distinguées grâce à leurs compositions lipidiques différentes. Enfin, il y a des cas plus problématiques. L'ion à m/z 796,8, qui peut correspondre à une phosphatidyléthanolamine C40:4 déprotonée ($[PE40:4+H]^+$), ou à une phosphatidyléthanolamine C38:1 cationisée par le sodium ($[PE38:1+Na]^+$), ou encore à une phosphatidylcholine C34:2 cationisée par le potassium ($[PC34:2K]^+$), produit des images qui sont parfaitement anti-colocalisées entre le TOF-SIMS et le MALDI-TOF. Une explication possible de cette différence est que l'une de ces espèces est préférentiellement désorbée et ionisée par une méthode alors qu'une autre espèce l'est par l'autre méthode. Ce phénomène est appelé « effet de matrice », plus précisément un effet promoteur ou inhibiteur de la désorption d'une espèce par l'interaction avec son microenvironnement à la surface de l'échantillon. Plusieurs cas peuvent mener à cette différence de désorption/ionisation. Avant tout, la nature de la matrice MALDI et la méthode de dépôt jouent un rôle crucial. Pour les deux techniques, l'environnement entourant les analytes (sels, ou autres composés organiques) peut aussi modifier ce paramètre.

8.2. Méthodes d'identification

Comme nous l'avons vu dans le cas de l'ion à m/z 796,8, il est très souvent indispensable d'identifier de la manière la plus sûre possible des composés inconnus. Pour cela, différents outils existent. Dans le cas du MALDI, son analyseur TOF-TOF permet de réaliser des analyses structurales (MS/MS). Ainsi, il est possible d'acquérir des spectres en mode MS/MS directement sur la coupe de tissus avec une bonne sensibilité.^{99,100} L'étape la plus sensible est la sélection de l'ion parent, qui est souvent difficile en raison de la faible résolution en masse des plaques électrostatiques (ou porte temporelle) utilisées à cette fin. En effet, les massifs isotopiques des ions correspondants aux lipides de rapport m/z pair et impair ont tendance à se superposer, rendant les spectres MS/MS parfois difficiles à interpréter.

La figure 25 montre un spectre MS/MS de l'ion précurseur à m/z 834,6 enregistré avec le spectromètre de masse 4800 MALDI TOF-TOF en mode d'ionisation négatif. L'ion fragment à m/z 747,5 qui correspond à la perte d'un neutre de masse 87, indique la présence d'une sérine. Les ions à m/z 283,3 et 327,3 correspondent respectivement aux acides gras déprotonés C18:0 et C22:6. Les ions à m/z 463,4 et à m/z 419,3 sont liés respectivement à la perte des acides gras C18:0 et C22:6 à partir de l'ion à m/z 747,5, alors que les ions à m/z 481,4 et 437,2 sont liés respectivement à la perte des acides gras C18:0 et C22:6 sous forme de cétène. Finalement, les ions à m/z 79,1 et 96,9 confirment la présence d'un groupement phosphate. Ainsi, l'ion précurseur à m/z 834,6 peut être attribué sans ambiguïté à une phosphatidylsérine C18:0/C22:6 déprotonée.

Le spectromètre de masse TOF-SIMS IV n'étant pas équipé d'un tel analyseur, l'identification des composés est plus difficile et passe souvent par l'analyse de solutions de références ou par la comparaison avec des bases de données. Néanmoins, il est possible d'obtenir des spectres d'ions fragments issus d'ions métastables. Cette technique, initiée en PDMS dans les années 80,^{101,102} puis popularisée en MALDI sous le nom de « *Post Source Decay* » (PSD) dans les années 90,¹⁰³ a récemment été employée pour l'identification *in situ* de composés en spectrométrie de masse TOF-SIMS.¹⁰⁴ La figure 26 montre un spectre PSD enregistré à la surface d'une coupe de cerveau de rat de l'ion précurseur à m/z 760,6 en mode d'ionisation positif. Cette méthode permet d'avoir une idée sur la famille de lipide de l'ion sélectionné. Ici, la perte de 183 (phosphocholine) indique qu'il s'agit d'une phosphatidylcholine. Néanmoins, cette technique longue et fastidieuse ne donne généralement pas accès à toute la structure des ions et est rarement utilisée.

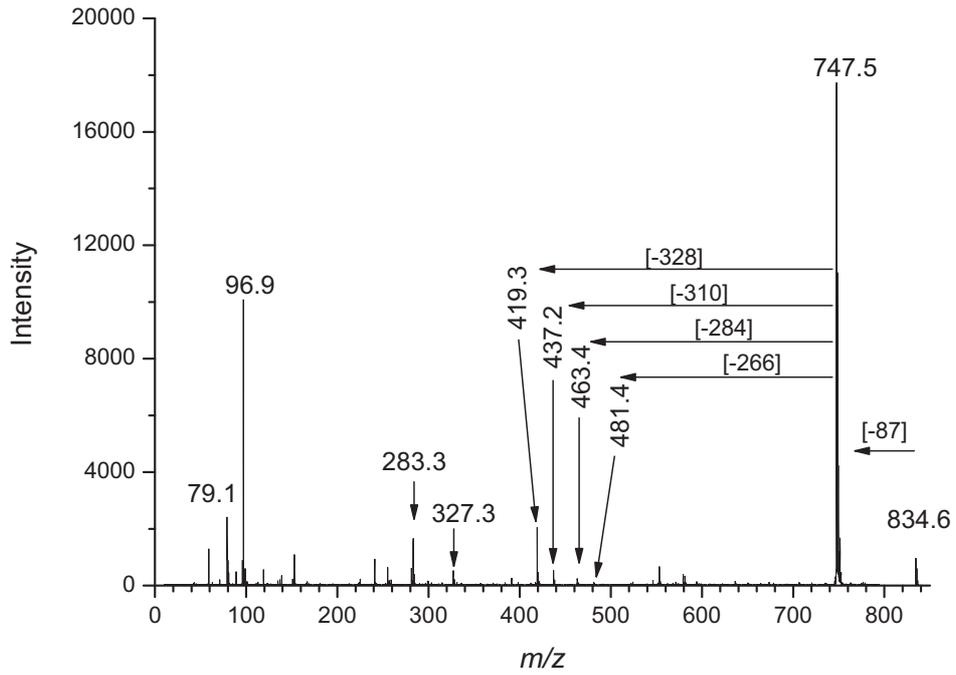


Figure 25 : Spectre MALDI-TOF *in situ* en mode MS/MS de l'ion précurseur à m/z 846,6 ([PS40:6-H]⁻) en mode d'ionisation négatif. Énergie de collision : 1 keV; gaz de collision : air.

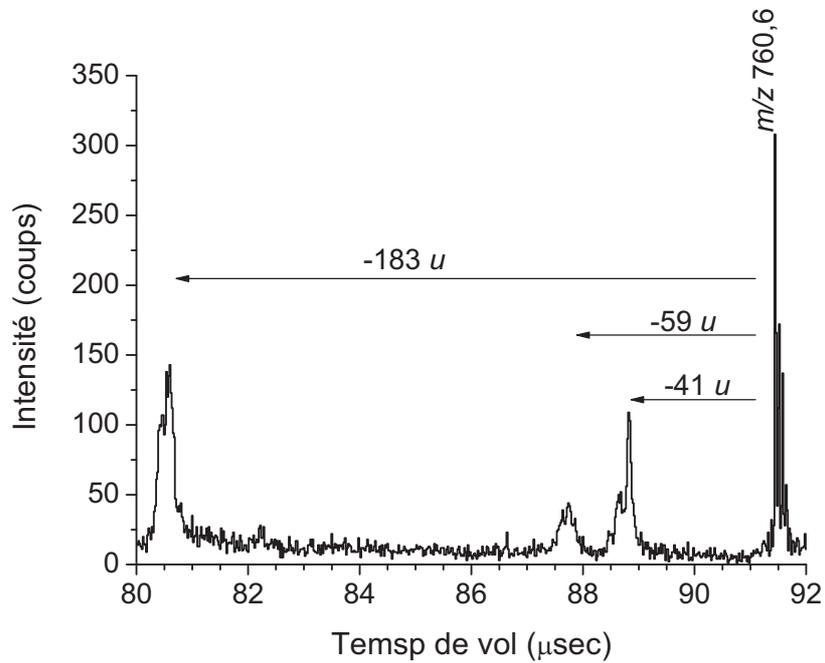


Figure 26 : Spectre TOF-SIMS en mode PSD de l'ion précurseur à m/z 760,6 ([PC34:1+H]⁺). D'après la référence 104.

8.3. Imagerie à une résolution spatiale inférieure au micron

À une résolution spatiale inférieure au micromètre, seule l'imagerie TOF-SIMS est capable d'acquérir des images de molécules biologiques. La figure 27 présente des images TOF-SIMS acquises en mode d'ionisation positif et négatif et en mode « *burst alignment* ».

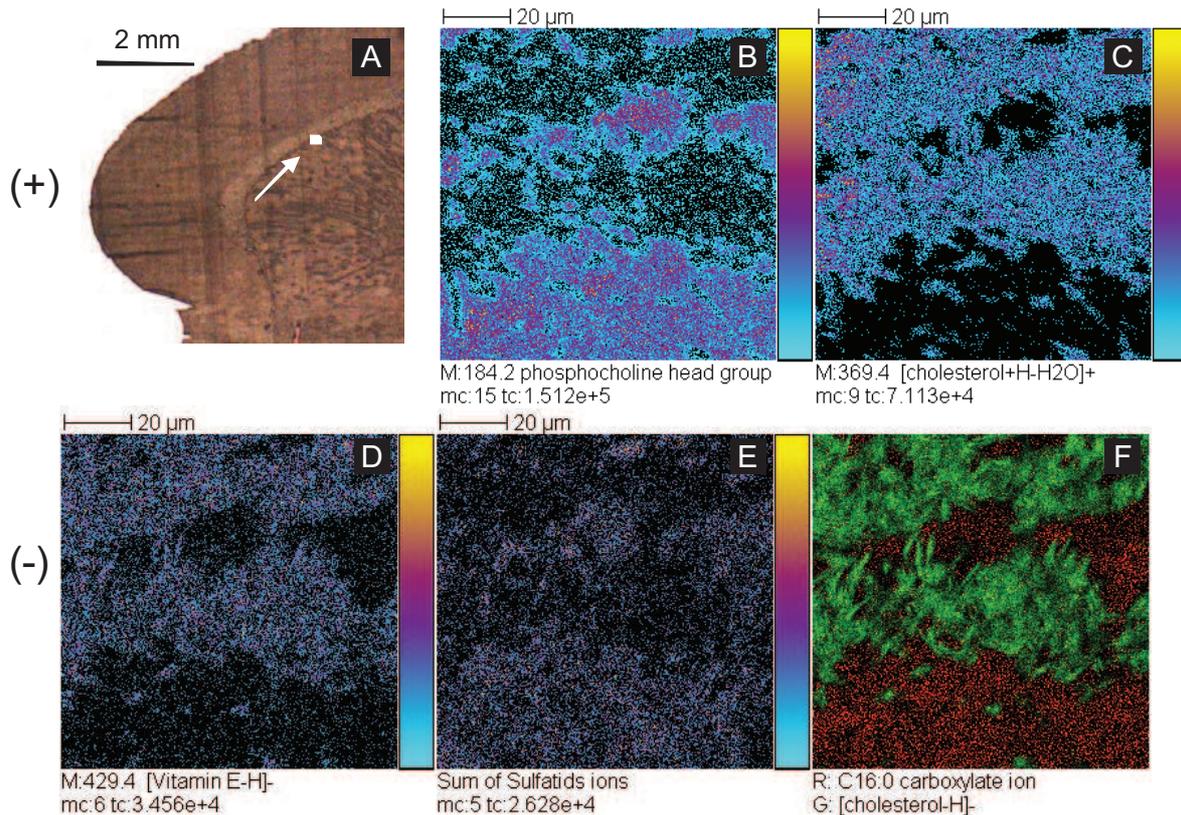


Figure 27 : Images TOF-SIMS enregistrées à la surface d'une coupe sagittale de cerveau de rat. **A** : image optique. Les images ioniques ont été enregistrées dans le carré blanc indiqué par la flèche. **B** et **C** : images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif. **A** : m/z 184,2 ; tête polaire de la phosphatidylcholine. **B** : m/z 369,4 ; cholestérol ($[M+H-H_2O]^+$). **D** à **F** : images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif. **D** : m/z 429,4 ; vitamine E ($[M-H]^-$). **E** : somme des ions correspondants aux sulfatides. **F** : superposition en deux couleurs du carboxylate de l'acide gras C16:0 en rouge et du cholestérol en vert. Ions primaires Bi_3^{2+} ; 50keV ; PIDD : 2×10^{12} ions.cm⁻² ; taille des images de $100 \times 100 \mu m^2$; taille des pixels de $390 \times 390 \mu m^2$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Le cholestérol et la vitamine E présentent des localisations similaires dans les deux modes d'ionisation et sont complémentaires avec celles des sulfatides, de la tête polaire de la phosphocholine et du carboxylate de l'acide gras C16:0. Les microstructures observées pourraient être apparentées à des structures neuronales enchevêtrées. La résolution spatiale ultime disponible sur notre TOF-SIMS IV est ici atteinte avec une taille de faisceau inférieure à 300 nm. Ce diamètre peut être mesuré précisément sur une grille métallique (Figure 28). Elle correspond à la distance, sur le profil de la grille, entre un point à 16 % et un point à 84 % du signal maximum.

Néanmoins, à cette résolution spatiale, l'interprétation est assez difficile puisque la résolution en masse n'est plus qu'unitaire.

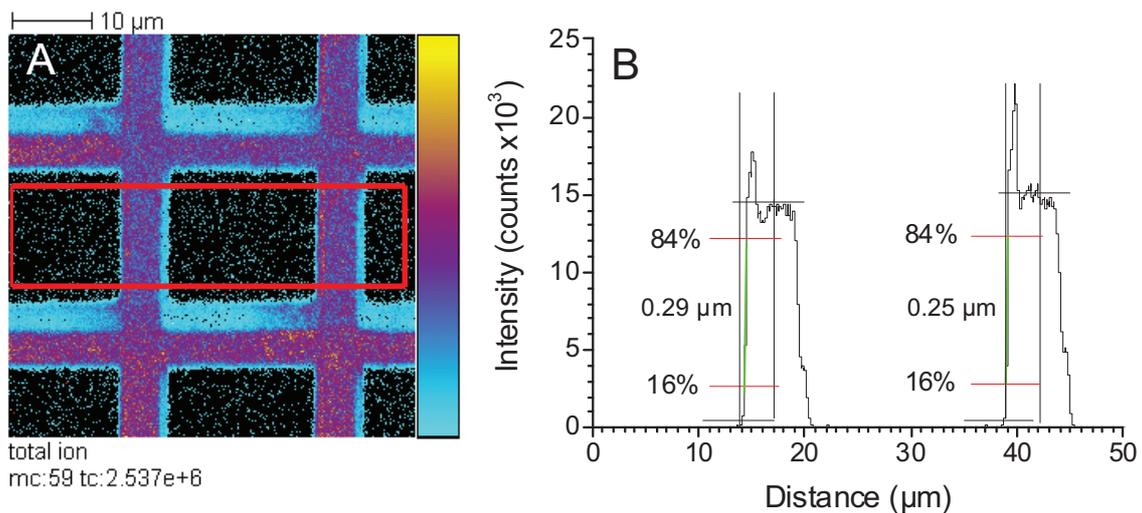


Figure 28 : **A** : image TOF-SIMS du courant ionique total en mode « *burst alignment* » de la grille « *1000 mesh* ». Ions primaire : Bi_3^{2+} ; 50 keV ; PIDD : 2×10^{11} ions.cm⁻² ; taille de l'image de 50x50 μm² ; taille de pixel de 97x97 nm². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **B** : Profil de l'aire délimité par le carré rouge de l'image du courant ionique total montrant que le diamètre du faisceau est inférieur à 300 nm (16-84% de la hauteur total).

8.4. Conclusion

L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF s'avère donc être un outil puissant permettant d'identifier et de localiser des lipides à une résolution spatiale de 50 μm mais avec une excellente sensibilité. De plus, une bonne reproductibilité peut être atteinte avec les récents développements d'instruments déposant la matrice de manière automatique. Il est possible d'améliorer la résolution spatiale grâce à des optiques spécifiques permettant d'atteindre 10 μm , néanmoins, cette amélioration risque de se faire au détriment de la sensibilité.¹⁰⁵

L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS, quant à elle, est une technique parfaitement adaptée à l'acquisition d'images à haute résolution spatiale. Néanmoins, pour l'élucidation structurale, la méthode PSD est encore perfectible puisqu'elle ne permet d'obtenir que peu de fragments d'intérêts. Toutefois, il existe des exemples de couplage de source C_{60} avec des analyseurs de type hybride quadripôle/temps-de-vol donnant des spectres MS/MS préliminaires très intéressants.¹⁰⁶

Ces deux techniques sont donc toute à fait complémentaires.

Références bibliographiques

- [1] Laprévotte, O. *Eléments d'une Histoire de la Spectrométrie de Masse*. 12^{ème} rencontres du CJSM, Saint-Dié, 19-23 mars **2007**.
- [2] Thomson, J.J. *Phil. Mag.* **1897**, *44*, 293
- [3] Thomson, J.J. *Phil. Mag.* **1899**, *48*, 547
- [4] Aston, F.W. *Nature* **1919**, *104*, 393
- [5] Aston, F.W. *Nature* **1920**, *105*, 617
- [6] Dempster, A.J. *Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316-324
- [7] Mattauach, J.; Herzog, R. *Z. Phys.* **1934**, *89*, 786-795
- [8] Nier, A.O. *Phys. Rev.* **1940**, *57*, 546.
- [9] Grayson, M.A. Ed. *Measuring Mass: From Positive Rays to Proteins*; Chemical Heritage Press: Philadelphia, **2002**.
- [10] Stephens, W.E. *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 691.
- [11] Wiley, W.C.; MacLaren, I.H. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26*, 1150
- [12] Karataev, V.I.; Mamyrin, B.A.; Shmikk, D.V. *Sov. Phys. Tech. Phys.* **1972**, *16*, 1177
- [13] Mamyrin, B.A.; Karataev, V.I.; Shmikk, D.V.; Zagulin, V.A. *Sov. Phys.-JETP* **1973**, *37*, 45.
- [14] Paul, W.; Steinwedel, H. *Z. Natureforsch.* **1953**, *8A*, 448.
- [15] Hipple, J.A.; Sommer, H.; Thomas, H.A. *Phys. Rev.* **1949**, *76*, 1877.
- [16] Comisarow, M.B.; Marshal, A.G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282
- [17] Dempster, A.J. *Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316
- [18] Delfosse, J.; Bleakney, W. *Phys. Rev.* **1939**, *56*, 256-260.
- [19] Munson, M.S.B; Field, F.H. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 2681.

-
- [20] Dole, M.; Hines, R.L.; Mack, R.C.; Mobley, R.C.; Ferguson, L.D.; Alice, M.B. *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240.
- [21] MacFarlane, R.D.; Torgersson, T.F. *Science*, **1976**, *191*, 970.
- [22] Barber, M.; Bardoli, R.S.; Sedwick, R.D.; Tyler, A.H. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1981**, *7*, 325.
- [23] Fenn, J.B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1993**, *4*, 524.
- [24] Tanaka, K.; Waki, H.; Ido, Y.; Akita, S.; Yoshida, Y.; Yoshida, T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151.
- [25] Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* **1987**, *78*, 53.
- [26] Makarov, A. US Patent US5886346.
- [27] Makarov, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 1156.
- [28] Thomson, J.J. *Phil. Mag.* **1910**, *20*, 752.
- [29] Bolbach, G.; Viari, A.; Galera, R.; Brunot, A.; Blais, J.C. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes.* **1992**, *112*, 9.
- [30] Wittmaack, K. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1975**, *17*, 39.
- [31] Magee, C.W.; Harrington, W.L.; Honig, R.E. *Rev. Sci. Instrum.* **1978**, *49*, 477.
- [32] Chait, B.T.; Standing, K.G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1981**, *40*, 185.
- [33] Bouneau, S.; Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Jacquet, D.; Le Beyec, Y.; Pautrat, M.; Fallavier, M.; Poizat, J.C.; Andersen, H.H. *Phys. Rev. B*, **2002**, *65*, 144106.
- [34] Touboul, D. *Imagerie biologique par spectrométrie de masse. Aspects fondamentaux, méthodologiques et applications*. Thèse de Doctorat. Université Évry-Val d'Essonne, **2006**.
- [35] Grove, W.R. *Philos. Mag.* **1853**, *5*, 203
- [36] Gassiot, J.P. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1858**, *148*, 148.
- [37] Sigmund, P. *Phys. Rev.* **1969**, *184*, 383.

-
- [38] Delcorte, A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, 7, 3395.
- [39] Rabalais, J.W.; Chen, J.W. *J. Chem. Phys.* **1986**, 85, 3615.
- [40] Sigmund, P.; Clausen, C. *J. Appl. Phys.* **1981**, 52, 990.
- [41] Wehbe, N. *Emission ionique des solides à l'impact d'agrégats Au_n^+ ($n=1-9$) accélérés entre 0.15 et 1.25 MeV*. Thèse de Doctorat. Université Claude Bernard Lyon-I, **2002**.
- [42] Urbassek, H.M.; Michl, J. *Nucl. Instrum. Methods Phys Res. B.* **1987**, 22, 480.
- [43] Bitensky, I.S.; Parilis, E. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* **1987**, 21, 26
- [44] Thompson, D.A. *Radiat. Eff.* 1981, 56, 105
- [45] Andersen, H.H., in *Fundamental Processes in Sputtering of Atoms and Molecules* (SPUT92) ed. by P. Sigmund, Vol. 43 (Mat. Fys. Medd. Dan. Vidensk. Selsk. **1993**) 127.
- [46] Andersen, H.H.; Bay, H.L. *J. Appl. Phys.* **1974**, 45, 953.
- [47] Thompson, D.A.; Johar, S.S. *Appl. Phys. Lett.* **1979**, 34, 342.
- [48] Johar, S.S.; Thompson, D.A. *Surf. Sci.* **1979**, 90, 319.
- [49] Benguerba, M.; Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Joret, H.; Le Beyec, Y.; Blain, M.G.; Schweikert, E.A.; Ben Assayag, G.; Sudraud, P. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* **1991**, 36, 355.
- [50] Colla, T.J.; Urbassek, H.M. *Nucl. Instrum. Methods Phys Res. B* **2000**, 164-165, 687.
- [51] Benguerba, M.; Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Joret, H.; Le Beyec, Y.; Blain, M.G.; Schweikert, E.A.; Ben Assayag, G.; Sudraud, P. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B.* **1991**, 62, 8.
- [52] Kollmer, F. *Appl. Surf. Sci.* **2004**, 231-232, 153.
- [53] Webeil, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J.C. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 1754.
- [54] Postawa, Z.; Czerwinski, B.; Szewczyk, M.; Smiley, E.J.; Winograd, N.; Garrison, B.J. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4402.

-
- [55] Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprévotte, O. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 985.
- [56] Knochenmuss, R.; Stortelder, A.; Breuker, K.; Zenobi, R. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1237.
- [57] Karas, M.; Gluckmann, M.; Schafer, J. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1.
- [58] Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299.
- [59] Beavis, R.C.; Chait, B.T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1989**, *3*, 3191.
- [60] Xiang, F.; Beavis, R.C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 199.
- [61] Colby, S.M.; King, T.B.; Reilly, J.P.; Lubman, D.M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8*, 865.
- [62] Brown, R.S.; Lennon, J.J. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1998.
- [63] Vestal, M.L.; Juhasz, P.; Martin, S.A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9*, 1044.
- [64] Salpin, J.Y. *Spectrométrie de masse à temps de vol. 8^{ème} rencontres du CJSM, La Bresse, 24-28 mars 2003.*
- [65] Brunelle, A.; Chaurand, P.; Della-Negra, S.; Le Beyec, Y.; Parilis, E. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11*, 353.
- [66] Sodhi, R.N. *Analyst* **2004**, *129*, 483.
- [67] Gilmore, I.S.; Seah, M.P. *Appl. Surf. Sci.* **2002**, *187*, 89.
- [68] Benninghoven, A.; Loebach, E. *Rev. Sci. Instrum.* **1971**, *42*, 49.
- [69] Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1550.
- [70] Sjövall, P.; Lausmaa, J.; Johansson, B. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4271.
- [71] Brunelle, A.; Laprévotte, O. *Curr. Pharm. Design* **2007**, *13*, 3335.
- [72] Brunelle, A.; Laprévotte, O. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 31.
- [73] Touboul, D.; Roy, S.; Germain, D.P.; Chaminade, P.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 158.

-
- [74] Mas, S.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Aragoncillo, P.; Egido, J.; Laprévotte, O.; Vivanco, F. *Analyst* **2007**, *132*, 24.
- [75] Tahallah, N.; Brunelle, A.; De La Porte, S.; Laprévotte, O. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 438.
- [76] Debois, D.; Bralet, M.P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2823.
- [77] Nygren, H.; Börner, K.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Månsson, J.E. *Biochim. Biophys. Acta.* **2005**, *1737*, 102.
- [78] Börner, K.; Nygren, H.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Tallarek, E.; Månsson, J.E. *Biochim. Biophys. Acta.* **2006**, *1761*, 335.
- [79] Malmberg, P.; Börner, K.; Chen, Y.; Friberg, P.; Hagenhoff, B.; Månsson, J.E.; Nygren, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1771*, 185.
- [80] Pernber, Z.; Richter, K.; Månsson, J.E.; Nygren, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **2007**, *1771*, 202.
- [81] Nygren, H.; Malmberg, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 499.
- [82] Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1608.
- [83] Debois, D. *Imagerie moléculaire d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse TOF-SIMS*. Thèse de Doctorat. Université Évry-Val d'Essonne, **2008**.
- [84] Jimenez, C.R.; Vanveelen, P.A.; Li, K.W.; Wildering, W.C.; Geraerts, W.P.M.; Tjaden, U.R.; Vandergreef, J. *J. Neurochem.* **1994**, *62*, 404.
- [85] Redeker, V.; Toullec, J.Y.; Vinh, J.; Rossier, J.; Soye, D. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 1805.
- [86] Jimenez, C.R.; Li, K.W.; Dreisewerd, K.; Spijker, S.; Kingston, R.; Bacterman, R.H.; Burlingame, A.L.; Smit, A.B.; van Minnen, J.; Geraerts, W.P.M. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2070.
- [87] Jimenez, C.R.; Burlingame, A.L. *Exp. Nephrol.* **1998**, *6*, 421.

-
- [88] Moroz, L.L.; Gillette, R.; Sweedler, J.V. *J. Exp. Biol.* **1999**, *202*, 333.
- [89] Rubakhin, S.S.; Garden, R.W.; Fuller, R.R.; Sweedler, J.V. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 172.
- [90] Li, L.; Garden, R.W.; Sweedler, J.V. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 151.
- [91] Rubakhin, S.S.; Greenough, W.T.; Sweedler, J.V. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 5374.
- [92] Fournier, I.; Day, R.; Salzet, M. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9.
- [93] Spengler, B.; Hubert, M.; Kaufmann, R. Proceedings of the 42nd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, Chicago, Illinois, May 19–June 3, **1994**, 1041.
- [94] Caprioli, R.M.; Farmer, T.B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 4751.
- [95] Schwartz, S.A.; Reyzer, M.L.; Caprioli, R.M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 699.
- [96] Chaurand, P.; Schwartz, S.A.; Caprioli, R.M. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 87A
- [97] Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D.E.; Caprioli, R.M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493.
- [98] Stoeckli, M.; Farmer, T.B.; Caprioli, R.M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10*, 67.
- [99] Medzihradzky, K.F.; Campbell, J.M.; Baldwin, M.A.; Falick, A.M.; Juhasz, P.; Vestal, M.L.; Burlingame, A.L. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 552-558.
- [100] Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 952-965.
- [101] Della-Negra, S.; Le Beyec, Y. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2035.
- [102] Brunelle, A.; Della-Negra, S.; Depauw, J.; Joret, H.; Le Beyec, Y. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 40.
- [103] Spengler, B.; Kirsch, D.; Kaufmann, R.; Cotter, R.J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 198.
- [104] Touboul D.; Brunelle, A.; Laprévotte O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 703-709.
- [105] Spengler, B.; Hubert, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13*, 735.

[106] Carado, A.; Passarelli, M.K.; Kozole, J.; Wingate, J.E.; Winograd, N.; Loboda, A.V.

Anal. Chem. **2008**, *60*, 7921.

CHAPITRE I

Développement méthodologique : Localisation de flavonoïdes dans des graines végétales

1. Introduction

1.1. Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui proviennent de la voie de biosynthèse des phénylpropanoïdes. Ils peuvent être classés dans plusieurs groupes en fonction du degré d'insaturation et d'oxydation du squelette carboné, mais ce sont les flavonols qui représentent le groupe le plus important.¹ À l'heure actuelle, plus de 350 composés dérivés d'une seule aglycone de flavonol, la quercétine, ont été décrits chez les plantes,¹ les aglycones quercétines et kaempférol faisant partie des plus représentés (Figure 1). La majeure partie de cette variabilité provient de leur glycosylation par un ou plusieurs sucres.

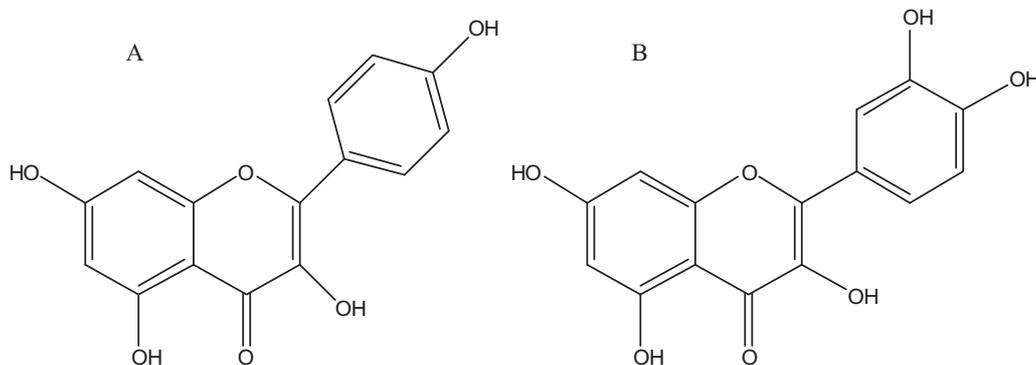


Figure 1 : Structure des deux aglycones, kaempférol (**A** ; 3,4',5,7-tétrahydroflavone) et quercétine (**B** ; 3,3',4',5,7-tétrahydroflavone).

Ces composés sont largement distribués dans les plantes et y remplissent de nombreuses fonctions, tels que la pigmentation des fleurs ou leur protection contre les attaques bactériennes et d'insectes.² Des études épidémiologiques et de laboratoires ont suggéré que ces flavonoïdes ont un effet bénéfique sur la santé humaine, en empêchant l'apparition de maladies liées au vieillissement telles que les maladies cardiovasculaires,^{3,4} et certains cancers.⁵ C'est ce qui explique l'intérêt croissant porté sur la compréhension de l'accumulation et du métabolisme des flavonoïdes dans les plantes. La teneur en polyphénols de deux espèces de graines, *Pisum Sativum* (le pois) et *Arabidopsis thaliana* (Figure 2), a récemment été étudiée.^{6,7} Dans ces études, les auteurs ont montré des différences de concentration entre l'enveloppe des graines et leurs cotylédons en effectuant des mesures quantitatives par ESI-LC-MS (*Electrospray Ionisation- Liquid Chromatography – Mass*

Spectrometry). L'analyse des flavonoïdes par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) et par résonance magnétique nucléaire (RMN) a aussi été récemment présentée.⁸

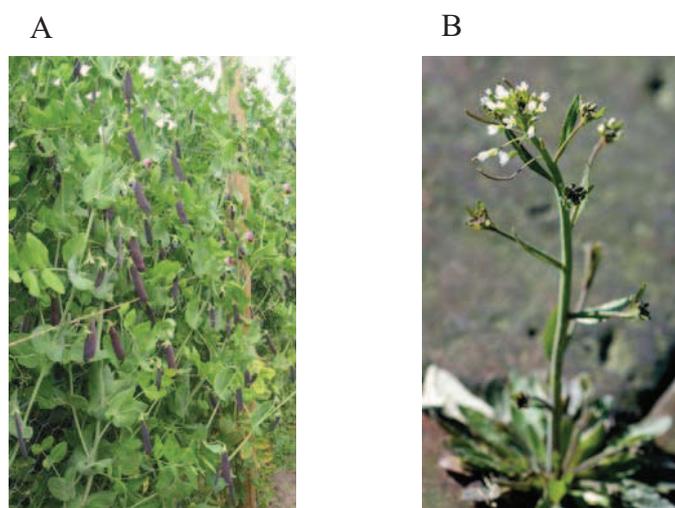


Figure 2 : Photographie de *Pisum sativum* (A) et d'*Arabidopsis thaliana* (B).

L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS était jusqu'à présent surtout utilisée dans le domaine de la biologie animale et humaine. Par contraste, la possibilité de cartographier des ions à la surface d'un tissu végétal n'a que très rarement été explorée avec cette technique.⁹ Quelques études basées sur la désorption/ionisation MALDI ou LDI (laser desorption ionization) ont été rapportées. En particulier, l'AP-IR-MALDI (Atmospheric Pressure – Infrared- MALDI) a été utilisé afin d'étudier la composition en flavonoïdes et autres composés, ainsi que leurs localisations dans les pétales, les feuilles, les graines et les bulbes de fleurs de lys.¹⁰ La désorption-ionisation laser (LDI), à l'aide de graphite colloïdal comme matrice, a également été utilisée pour cartographier ces flavonoïdes dans les pétales, les feuilles et les tiges d'*Arabidopsis thaliana*.¹¹

Dans notre étude, nous avons utilisé l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS pour localiser des flavonoïdes tels que le kaempférol ou des quercétines glycosylées (flavonols) dans deux types de graines de tailles très différentes. Des graines de *Pisum sativum*, ayant un diamètre d'environ 10 mm ont d'abord été analysées. Dans une seconde étape nous avons analysé des graines d'*Arabidopsis thaliana*, qui ont un diamètre d'environ 400 μm . *Arabidopsis thaliana* est une plante modèle couramment utilisée pour étudier la biosynthèse et les voies de régulation des flavonoïdes en raison d'un large éventail de mutants disponibles impliquant ces voies.¹²

1.2. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est cruciale pour toute méthode d'imagerie chimique, et surtout pour l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS. En effet, il est nécessaire que la surface des échantillons soit parfaitement plane et qu'il n'y ait aucune pollution ni délocalisation ou modification chimique des molécules d'intérêt. Pour les échantillons biologiques de grande taille (organes, biopsies,...), les méthodes de préparations sont au point et assez standardisées. Le stockage à -80°C , suivi de coupes de quelques micromètres d'épaisseur, à froid et avec une lame inox, déshydratés quelques minutes sous vide suffisent pour la plupart des ces échantillons. D'autres méthodes de préparation existent pour des échantillons de très petites tailles. Ces techniques sont notamment utilisées pour l'imagerie NanoSIMS ou pour la microscopie électronique.^{13,14} Une première méthode consiste à cryofixer les échantillons en les plongeant dans un bain de propane ou d'azote liquide, ou en les projetant sur une surface métallique refroidie, ou encore par haute pression. Les échantillons sont ensuite déshydratés à froid (*freeze-drying*) en utilisant un appareil dédié.¹⁵ Le freeze-drying est une étape qui peut durer plusieurs jours. Enfin, ils peuvent être coupés à froid (sous azote liquide) en utilisant un ultracryomicrotome, ou à température ambiante avec un ultramicrotome. La seconde méthode consiste à placer l'échantillon en sandwich entre deux plaques de silicium et cryofixer dans de l'azote liquide. Les deux plaques de silicium sont ensuite séparées, l'échantillon est alors fracturé (*freeze-fractured*). Suit alors une étape de freeze-drying pouvant durer aussi plusieurs jours.¹⁶

Ces méthodes sont couramment utilisées, par exemple, pour l'analyse de cellule unique mais nécessitent un savoir faire et un équipement lourd dont nous ne disposons pas. C'est pourquoi nous avons testé plusieurs méthodes de préparation nous permettant d'obtenir des coupes de graines analysables en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS.

1.3. Objectifs de l'étude

Le premier objectif de cette étude est de savoir s'il est possible de détecter et de localiser des ions issus des flavonoïdes dans des graines, d'abord de *P. sativum* et ensuite d'*A. thaliana* (Figure 3), en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS. Le second objectif est de tester et de comparer plusieurs méthodes de préparations des graines d'*A. thaliana* afin

d'obtenir une méthode reproductible nous permettant d'avoir coupes de des graines analysables en imagerie TOF-SIMS. Nous avons d'abord testé des méthodes couramment utilisées en histologie, en collaboration avec Adeline Berger et Jocelyne Kronenberger (INRA, Versailles), et d'autres méthodes, notamment celles employées pour l'analyse par imagerie TOF-SIMS des objets du patrimoine, en collaboration avec Elsa Van Elslande et Pascale Richardin (C2RMF, Paris).¹⁷ Enfin le troisième objectif est de comparer la localisation des flavonoïdes détectés, dans des graines d'*A. thaliana* de type sauvage et de deux mutants. Toute cette étude a été menée en collaboration avec Jacques Einhorn (INRA, Versailles).

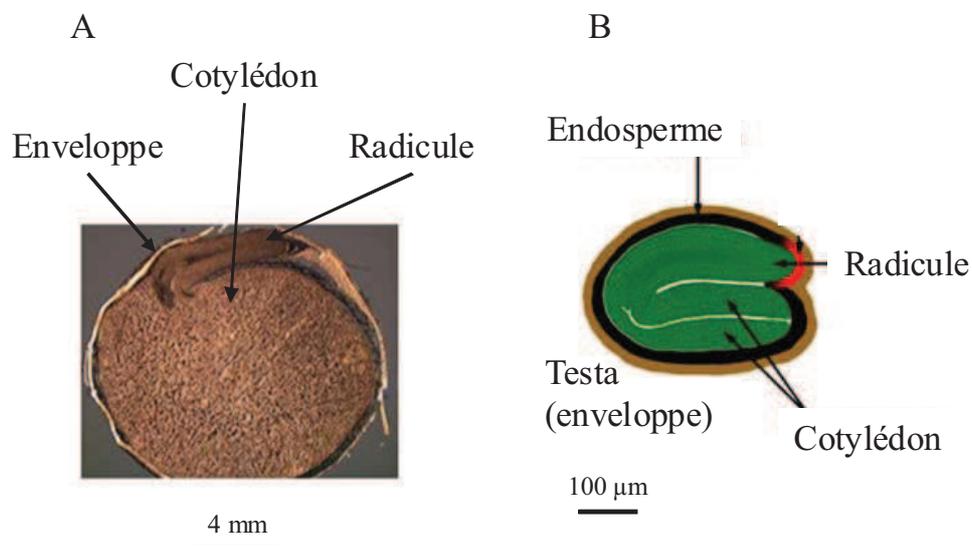


Figure 3 : Photographie d'une coupe de graine de *P. sativum* (A) et schéma représentant une coupe de graine d'*A. thaliana* (B).

2. Protocole expérimental

2.1 *Pisum sativum*

Deux variétés ont été analysées : *P. sativum* NGB 5839, fourni par l'INRA de Versailles, et *P. sativum* ZP-840, gracieusement fourni par M. Dueñas (CSIC, Madrid, Espagne) et qui a été cultivé à l'Instituto Agrario of Valladolid (Espagne). La variété NGB est souvent utilisée pour des études physiologiques en raison de sa petite taille, tandis que la seconde variété est connue pour produire des graines noires potentiellement riches en flavonoïdes.

Les graines ont été reçues fraîches et immédiatement stockées à -80°C . Des coupes de $12\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à -20°C ont été préparées avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre, France) et déposées sur un support en silicium pour l'analyse TOF-SIMS. Elles ont été légèrement déshydratées sous un vide de quelques hectopascals juste avant analyse. Des images optiques ont été enregistrées avec un microscope Olympus BX51 (Rungis, France) équipé d'une caméra Color View I et piloté par le logiciel Cell^B (Soft imaging System GmbH, Münster, Allemagne). Les images TOF-SIMS ont été acquises en mode de balayage dit stage scan de $9,1 \times 9,1\ \text{mm}^2$ à 256×256 pixels, soit une taille de pixel de $35,5 \times 35,5\ \mu\text{m}^2$, afin de balayer toute la surface de la coupe. Les images ont été enregistrées en mode d'ionisation négatif avec une dose d'ions primaires de $6,7 \times 10^9\ \text{ions.cm}^{-2}$, les agrégats d'ions Bi_3^+ ont été sélectionnés et le canon à électron a été utilisé.

2.2 *Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*A. thaliana* de type sauvage (*WT*) ainsi que deux mutants ont été fournis par l'INRA de Versailles. Ces deux mutants sont le *tt7*, qui ne produit que des flavonoïdes ayant comme base l'aglycone kaempférol, et le mutant *tt4* qui ne produit aucun flavonoïde. Les plantes ont été cultivées avec une photopériode de 16 heures dans une chambre de culture contrôlée. Elles ont été collectées à 18 jours.

Plusieurs techniques de préparation des échantillons ont été testées pour ces graines. Nous avons commencé par des techniques couramment employées en histologie :

- Les graines ont été fixées au paraformaldéhyde,
- Elles ont été séchées dans plusieurs bains successifs d'éthanol,
- Elles ont été incluses dans différents matériaux : de la cire, de la paraffine, de la résine Spurr (résine époxy) et de l'Historesin (résine de méthacrylate de glycol).

Des graines fraîches ont été congelées à -80°C . Pour ces graines, deux techniques ont été employées. Un premier lot a été inclus dans de la colle OCT sans aucun traitement préalable. La colle a été durcie à -30°C , et des coupes de $30\ \mu\text{m}$ à -20°C ont été préparées avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre) et ont été déposées sur un support de silicium. Elles ont ensuite été déshydratées sous un vide de quelques hectopascals. Le second lot de graines fraîches a été décongelé et inclus dans une résine polyester (H59, Sodemi,

France). Cette première étape a été réalisée au Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (Musée du Louvre, France), avec l'aide d'Elsa Van Elslande et de Pascale Richardin. Les plots ainsi obtenus ont été polis de sorte qu'ils aient une forme de pyramide tronquée, et que les graines affleurent à leur surface. Cette étape a eu lieu au Centre Commun de Microscopie Electronique (Université d'Orsay), avec l'aide de Daniel Jaillard. Nous avons enfin utilisé un ultramicrotome équipé d'une lame Diatome en diamant (Leica Microsystems SA, Nanterre) afin d'obtenir des coupes de 100-200 nm d'épaisseur. Comme ces coupes sont de très mauvaise qualité (présence de micro-trous et fréquente absence de la graine elle-même), ce sont finalement les plots qui ont directement été analysés par imagerie TOF-SIMS. Le protocole est résumé dans la figure 4. Pour cette dernière méthode de préparation, nous nous sommes inspirés de celle employée pour l'analyse TOF-SIMS des objets du patrimoine.¹⁷

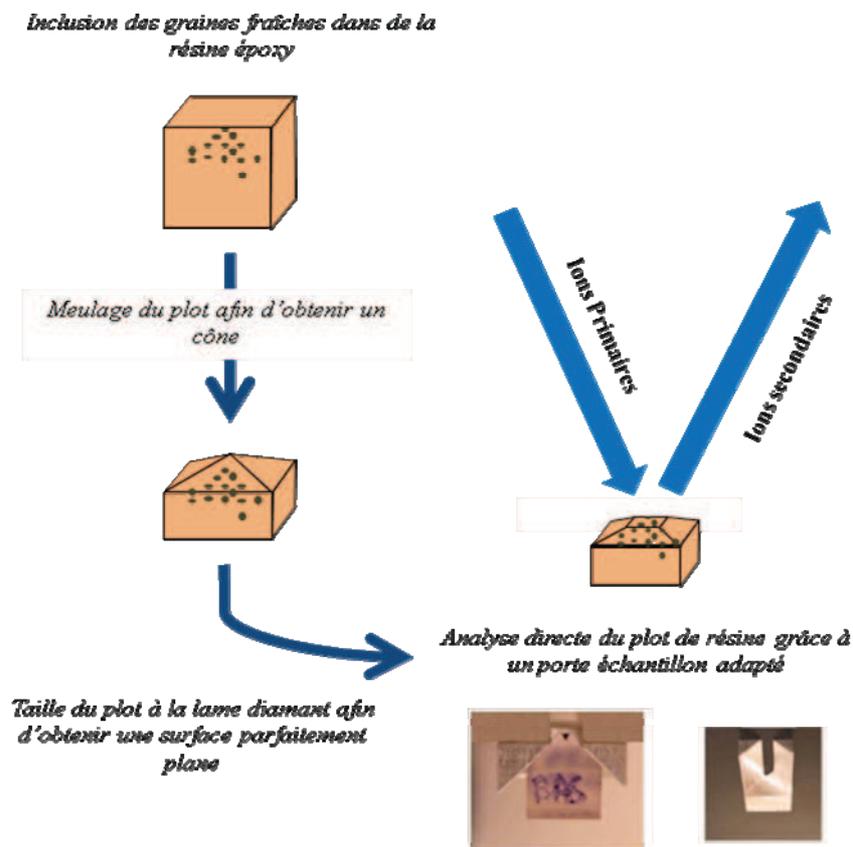


Figure 4 : Schéma détaillant la procédure suivie afin d'obtenir des plots analysables.

3. Résultats et discussion

3.1 Analyse de composés de référence

Il est important d'analyser les solutions étalons des différents composés recherchés, ceci nous permettant d'assigner les masses. Nous avons donc analysé par spectrométrie de masse TOF-SIMS les composés suivants : le kaempférol (masse exacte : 286,05), la quercétine (masse exacte : 302,04), l'isoquercétine (masse exacte : 464,10), la quercétine 3-*O*-rutinoside (masse exacte : 610,15), la quercétine 3-*O*-rhamnoside (masse exacte : 448,10) et le kaempférol 3-*O*-glucoside (masse exacte : 448,10). Les composés sont dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v) à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹.

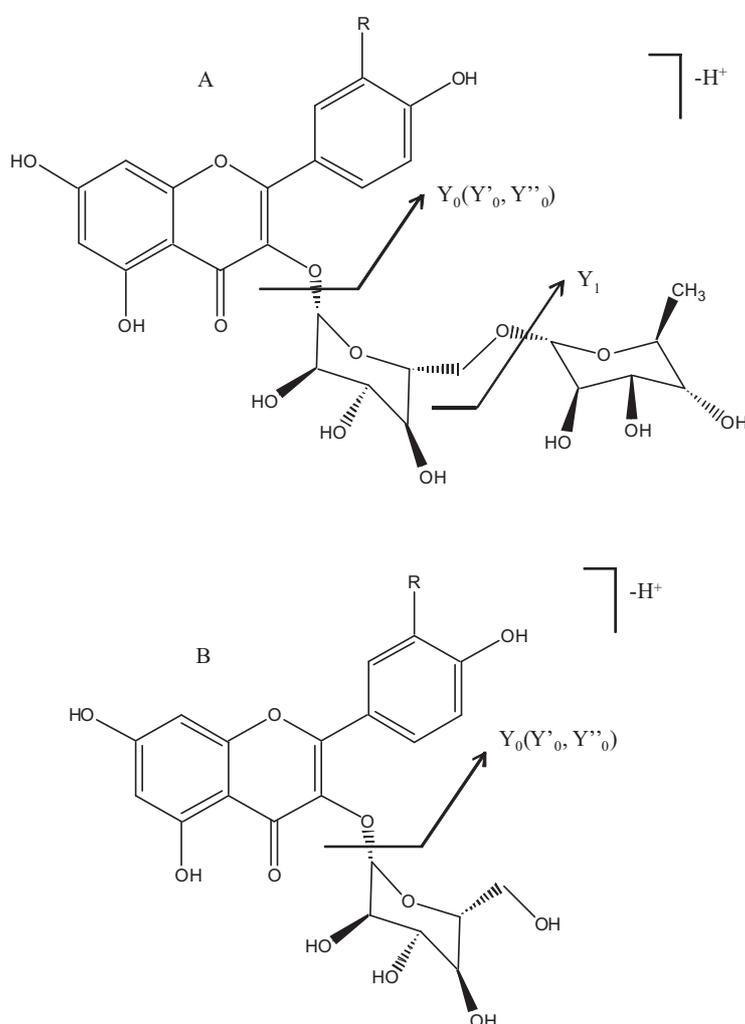


Figure 5 : Structures des flavonoïdes et principales fragmentation observées en spectrométrie de masse TOF-SIMS de molécules déprotonées [M-H]⁻ en mode d'ionisation négatif. **A** : quercétine (R=OH) ou kaempférol (R=H) 3-*O*-rutinoside. **B** : quercétine (R=OH) ou

kaempférol (R=H) 3-*O*-glucoside. Les ions Y_0 et Y_1 représentent respectivement les ions fragments obtenus après la perte du groupe glycosidique entier ou seulement du sucre externe. Les ions Y'_0 et Y''_0 , qui n'ont pas été utilisés pour l'imagerie, correspondent respectivement aux ions $[Y_0-H]^-$ et $[Y_0-2H]^-$. D'après Kerhoas *et al.*¹⁸

La structure de certains de ces composés est présentée dans la figure 5. Les solutions de référence des différents flavonoïdes ont d'abord été analysées en mode d'ionisation positif, néanmoins, le mode d'ionisation négatif est plus sensible. Les spectres de masse en mode d'ionisation négatif de la quercétine 3-*O*-rutinoside, de la quercétine 3-*O*-rhamnoside et du kaempférol 3-*O*-rutinoside sont présentés dans la figure 6.

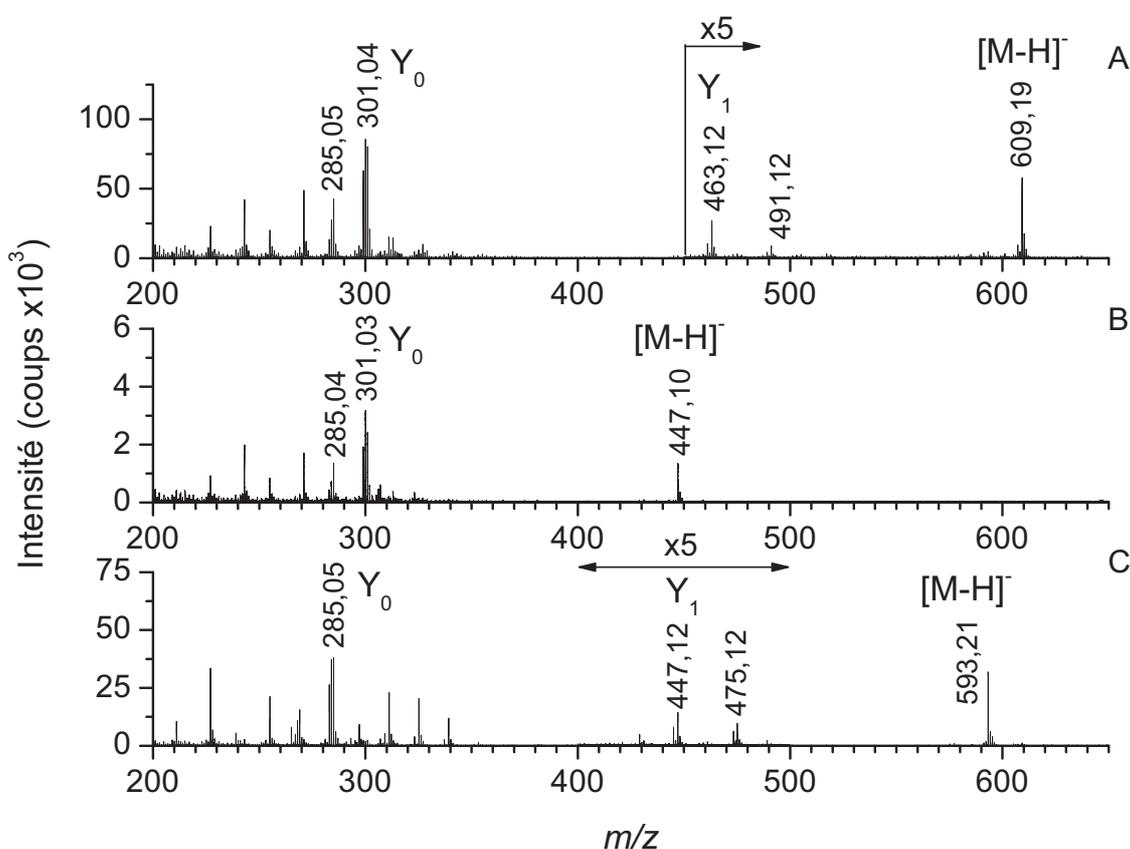


Figure 6 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif de la quercétine 3-*O*-rutinoside (A), de la quercétine 3-*O*-rhamnoside (B) et du kaempférol 3-*O*-rutinoside (C) (0,5 mg.mL⁻¹ dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v)).

Le pic correspondant à la molécule déprotonée $[M-H]^-$ est détecté dans les trois spectres à m/z 609,19; 447,10 et 593,21. Les principales fragmentations observées en spectrométrie de masse TOF-SIMS sont présentées dans la figure 5. Des ions fragments très intenses sont

détectés à m/z 301,04 et 285,05 dans les spectres des flavonoïdes à base d'aglycone quercétine. La perte du groupement glycosidique entier mène à la formation de l'ion à m/z 301,04 (fragment Y_0) et la perte d'une fonction hydroxyle sur ce dernier mène à l'ion à m/z 285,05. Un pic à m/z 285,05 est aussi détecté dans le spectre du kaempférol 3-*O*-rutinoside et correspond à la perte du rutinoside (fragment Y_0). Il sera donc impossible de différencier les flavonoïdes à base d'aglycone kaempférol et quercétine à partir de l'ion à m/z 285,05. Deux ions peu intenses sont détectés à m/z 463,12 et 447,12, dans les spectres de la quercétine 3-*O*-rutinoside et du kaempférol 3-*O*-rutinoside, respectivement. Ces ions correspondent à la perte du groupement rhamnoside (146 Da), il s'agit du fragment Y_1 . En examinant les spectres des flavonoïdes mono- et di-glycosylés à base d'aglycone quercétine, nous pouvons observer un triplet d'ions d'intensités similaires dans la région de l'ion de l'aglycone à m/z 301,04; 300,05 et 299,05. Ceci indique que l'élimination du groupement glycosidique (Gly) se produit par trois voies formant les ions $[M-H-Gly]^+$, $[M-H-GlyH]^+$ et $[M-H-GlyH_2]^+$. Les mêmes observations peuvent être faites pour la série kaempférol. Ce type de fragmentation est, dans une certaine mesure, plus complexe que celui observé lors d'expériences de CAD (Collision Activated Dissociation) à faible énergie en ESI-MS-MS sur l'ion $[M-H]^+$.¹⁸

La limite de détection de ces composés a aussi été évaluée. Pour cela, chaque étalon de flavonoïde a été solubilisé dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v) à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹. A partir de cette solution, une série de dilutions au dixième a été réalisée jusqu'à la dilution 10⁻⁶ (0,5 ng.mL⁻¹). Pour chacune de ces dilutions, 1 µL a été déposé sur un support de silicium et analysé en imagerie TOF-SIMS. Afin de prendre en compte la totalité du spot et éviter toute erreur potentielle due à une concentration non uniforme sur la goutte après séchage, des images de 4x4 mm² à 64x64 pixels ont été enregistrées avec une dose d'ions primaires de 1,5x10⁹ ions.cm⁻² (ions primaires : Bi₃⁺, canon à électron activé). La figure 7 présente les spectres totaux obtenus pour la quercétine 3-*O*-rhamnoside pour les dilutions 10⁰ (solution mère), 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³, soit des quantités déposées de 0,5 µg; 50 ng; 5 ng et 0,5 ng respectivement. La limite de détection (S/N = 3) a été atteinte pour une quantité déposée d'environ 5 ng.

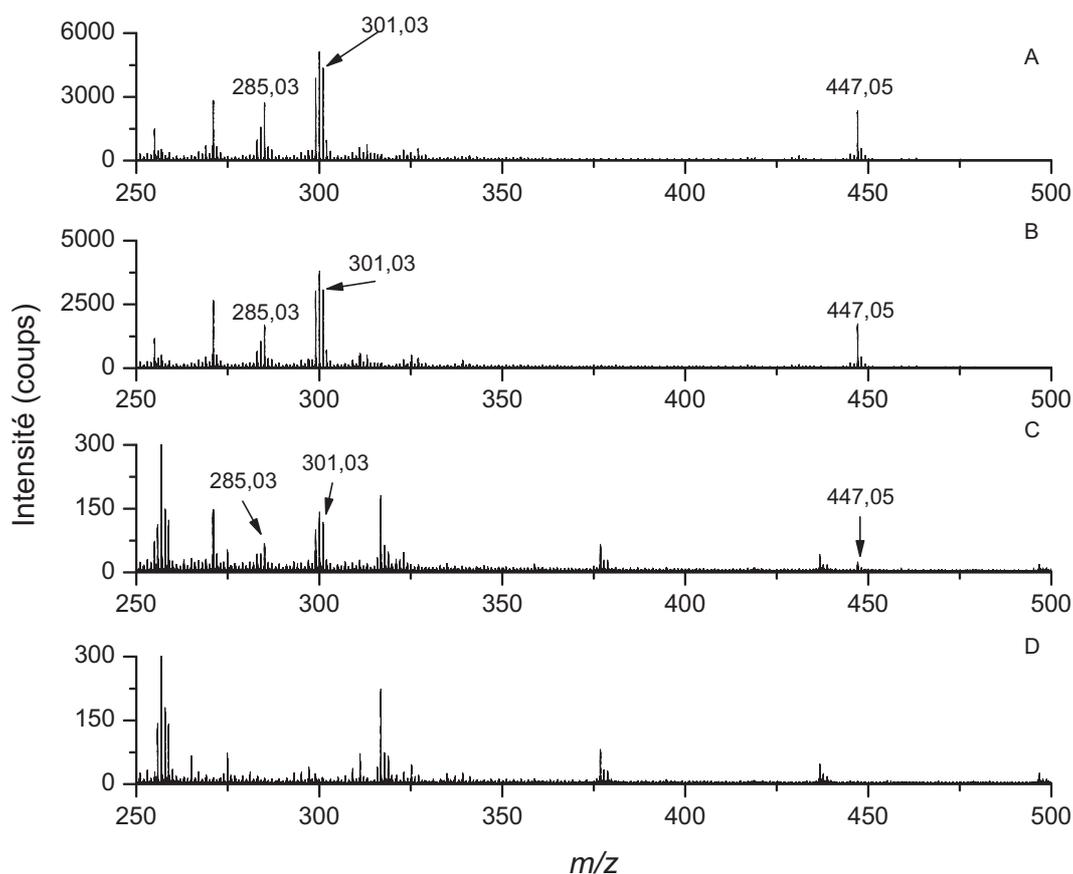


Figure 7 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif de la quercétine 3-*O*-rhamnoside (masse exacte : 447,10) à 0,5 $\mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$ (A), 50 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ (B), 5 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ (C) et 0,5 $\text{ng}.\mu\text{L}^{-1}$ (D) dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v). Des images de $4\times 4\ \mu\text{m}^2$ avec 64×64 pixels ont été enregistrées sur un dépôt de 1 μL de chacune de ces solutions pour obtenir ces spectres. Dose d'ions primaires : $1,5\times 10^9$ ions. cm^{-2} , Bi_3^+ , canon à électron activé.

3.2 *Pisum Sativum*

Puisque les flavonoïdes sont détectés de manière plus sensible en mode d'ionisation négatif qu'en mode d'ionisation positif, nous avons focalisé toutes nos analyses sur le mode négatif. Le spectre de masse total enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de *P. sativum* ZP-840 est présenté en figure 8.

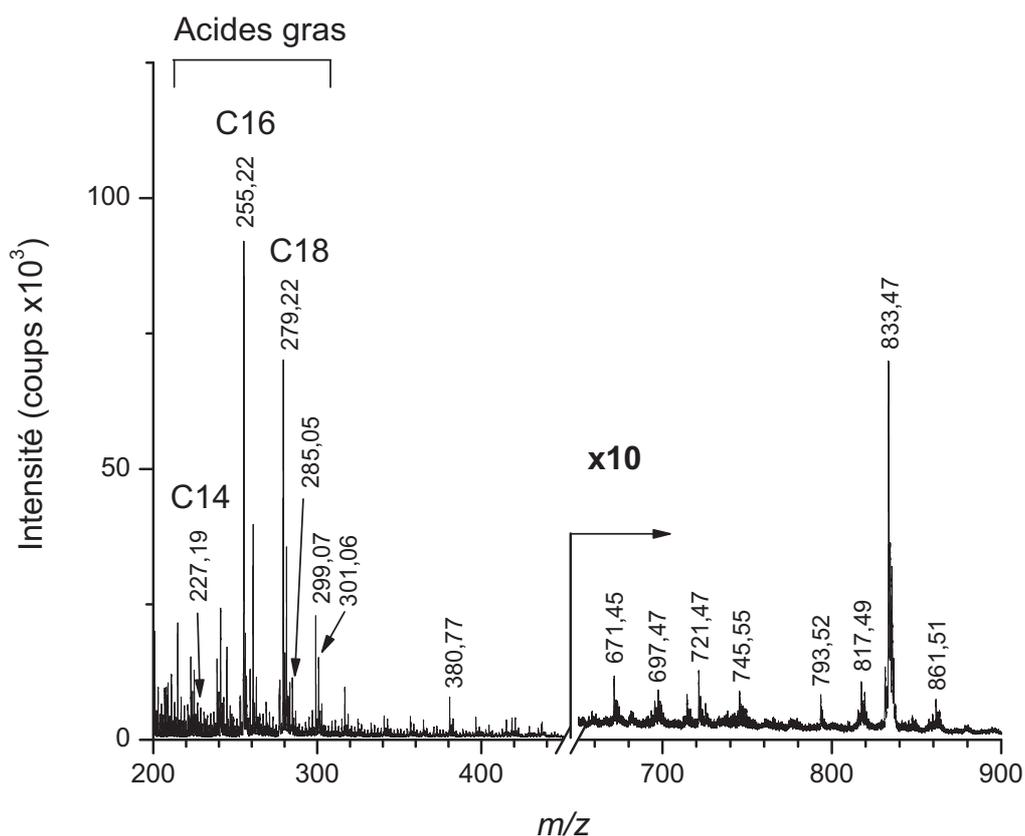


Figure 8 : Spectre de masse TOF-SIMS en mode d’ionisation négatif enregistré à la surface d’une coupe de *P. sativum* ZP-840.

Ce spectre est dominé par les signaux correspondant aux carboxylates d’acides gras composés de 14, 16 et 18 carbones, centrés respectivement aux rapports masse-sur-charge 227,17 (C14:0), 255,22 (C16:0) et 279,22 (C18:3). À plus haute masse, des pics ont été identifiés comme étant les formes déprotonées $[M-H]^-$ des triacylglycérols saturés composés de 52 (TG52:0) et 42 (TG42:0) carbones sur leurs trois chaînes d’acides gras à m/z 861,51 et 721,55, respectivement. La forme déprotoné $[M-H]^-$ du phosphatidylinositol composé de 34 atomes de carbones et deux insaturations (PI34:2) est, quant à lui, détecté à m/z 861,47. Les pics à m/z 671,45 et 697,47 ont été identifiés comme étant des fragments de phosphatidylcholine.

Enfin, deux fragments de flavonoïdes ont été détectés aux rapports masse-sur-charge 285,05 et 301,06, correspondant respectivement aux aglycones kaempférol et quercétine. Le spectromètre de masse ne permettant pas d’effectuer des expériences de MS/MS, certains pics n’ont pas pu être identifiés, en particulier ceux à m/z 380,77; 745,55; 793,52 et 817,49.

Les figures 9 et 10 montrent la localisation des différents composés phénoliques et de certains flavonoïdes dans les deux variétés de pois, NGB 5839 (Figure 9) et ZP-840 (Figure 10). Dans l'étude de Dueñas *et al.*, les auteurs ont comparé la composition en polyphénols du cotylédon et de l'enveloppe de deux variétés, ZP-840 et *Fidelia*.⁶ Les tableaux 1 et 2 récapitulent leurs localisations selon quatre domaines, l'enveloppe, la région de l'enveloppe proche de la radicule, le cotylédon et la radicule.

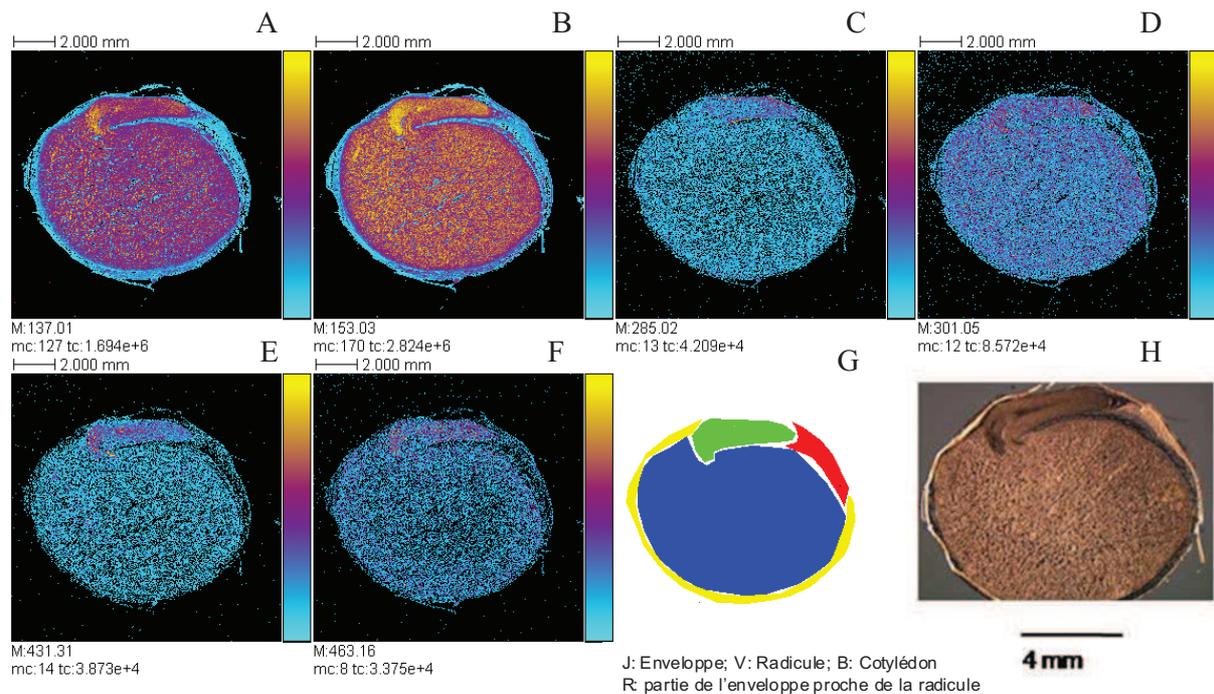


Figure 9 : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de *P. sativum* NGB 5839. **A** : acide *p*-hydroxybenzoïque (m/z 137,01). **B** : acide protocatéchuique ou aldéhyde gallique (m/z 153,02). **C** : fragment de flavonoïde (kaempférol à m/z 285,05). **D** : fragment de flavonoïde (quercétine à m/z 301,05). **E** : apigénine glycoside (m/z 431,33). **F** : quercétine 3-*O*-galactoside (m/z 463,15). **G** : ROI montrant en jaune l'enveloppe, en vert le radicule, en bleu le cotylédon et en rouge la région de l'enveloppe proche de la radicule. **H** : image optique. Images de 13x13 mm² à 256x256 pixels, taille de pixel : 50,78x50,78 μm², dose d'ions primaires de 3,86x10⁹ ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Identification possible	Rapport m/z	Différence avec la masse exacte (m/z)	Région de l'enveloppe			
			Enveloppe	proche de la radicule	Cotylédon	Radicule
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	137,01	-0,02	-	-	+	+
Acide protocatéchique ou aldéhyde gallique	153,03	0,00	+	+	+	+
Fragment de flavonoïde (Kaempférol)	285,01	-0,04	-	-	+	++
(+)-Catechine ou (-)-Epicatechine	non détecté	non détecté				
Fragment de flavonoïde (Quercétine)	301,05	0,01	+	+	+	++
Acideprotocatéchique glycoside	315,08	0,00	-	+	+	++
Apigénine glycoside	431,31	0,21	-	-	-	++
Quercétin 3- <i>O</i> -galactoside	463,16	0,06	+	+	+	++

Tableau 1 : Localisation des principaux flavonoïdes et de quelques précurseurs dans les coupes de *P. sativum* NGB5839.

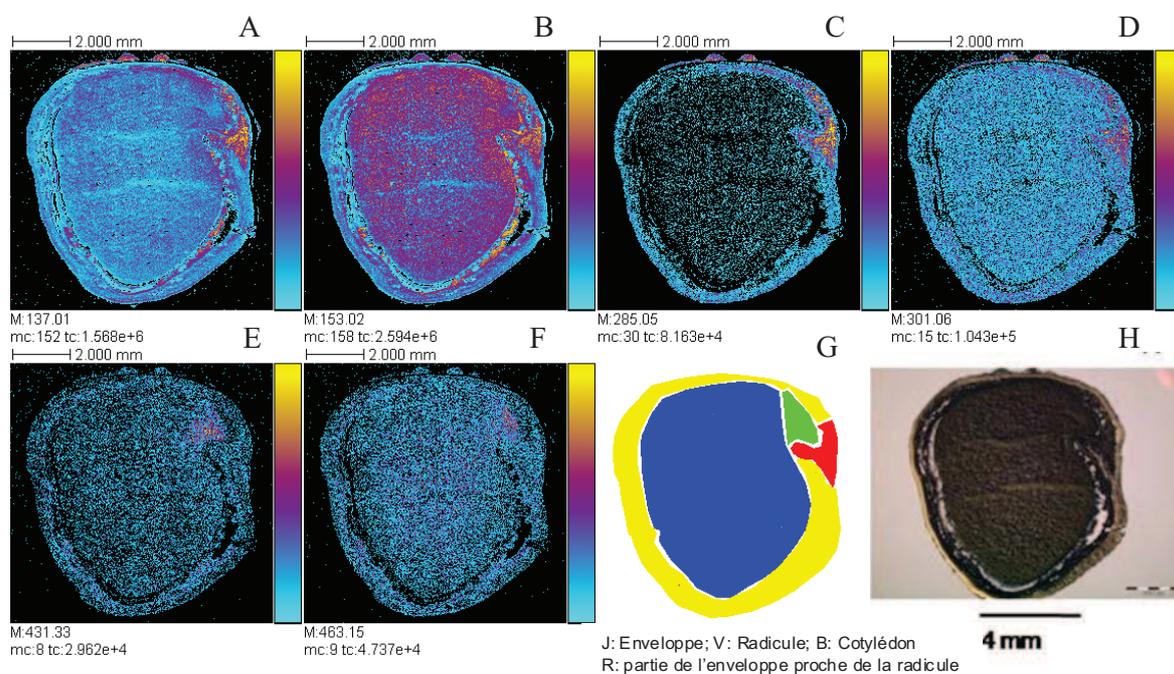


Figure 10 : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de *P. sativum* ZP-840. **A** : acide *p*-hydroxybenzoïque (m/z 137,01). **B** : acide protocatéchique ou aldéhyde gallique (m/z 153,02). **C** : fragment de flavonoïde (kaempférol à m/z 285,05). **D** : fragment de flavonoïde (quercétine à m/z 301,06). **E** : apigénine glycoside (m/z 431,33). **F** : quercétine 3-*O*-galactoside (m/z 463,15). **G** : ROI montrant en jaune l'enveloppe, en vert le radicule, en bleu le cotylédon et en rouge la région de l'enveloppe proche de la radicule. **H** : image optique. Images de 9,1x9,1 mm² à 256x256 pixels, taille de pixel : 35,54x35,54 μm², dose d'ions primaires de 6,7x10⁹ ions.cm⁻². Le nombre maximum de

coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Identification possible	Rapport <i>m/z</i>	Différence avec la masse exacte (<i>m/z</i>)	Région de l'enveloppe proche de la radicule			
			Enveloppe		Cotylédon	Radicule
acide <i>p</i> -hydroxybenzoïque	137,02	0,01	+	+	+	+
Acide protocatéchuique ou aldéhyde gallique	153,03	0,00	+	+	+	+
Fragment de flavonoïde (Kaempférol)	285,07	0,02	+	+	-	-
(+)-Catechine ou (-)-Epicatechine	288,98	-0,10	+	+	-	-
Fragment de flavonoïde (Quercétine)	301,07	0,03	+	++	+	+
Acideprotocatéchuique glycoside	315,08	0,00	+	+	+	+
Apigénine glycoside	431,34	0,24	+	-	-	+
Quercétin 3- <i>O</i> -galactoside	463,16	0,06	+	+	+	+

Tableau 2 : Localisation des principaux flavonoïdes et de quelques précurseurs dans les coupes de *P. sativum* ZP-840.

Chez *P. sativum* ZP-840, les ions à *m/z* 153,03 et 288,98 sont localisés dans la même région que ceux identifiés par Dueñas *et al.*. L'ion à *m/z* 288,98 (catéchine déprotonée ou épicatechine) n'est pas détecté dans la variété NGB 5839, mais les ions à *m/z* 153,03 (acide protocatéchuique) et 315,08 (acide protocatéchuique glycoside) présentent des localisations similaires. L'ion à *m/z* 137,02, correspondant à l'acide *p*-hydroxybenzoïque déprotoné, est situé au bord du cotylédon et dans la région de l'enveloppe proche de la radicule dans les graines ZP-840, mais seulement dans les cotylédons et la radicule pour la variété NGB 5839.

Un ion à *m/z* 431,34 est détecté, en imagerie TOF-SIMS, principalement au niveau de la radicule et de l'enveloppe, pour la variété ZP-840, et seulement dans la radicule pour la variété NGB 5839. Dueñas *et al.* ont attribué un ion à *m/z* 431,0 comme étant de l'apigénine glycoside, et cet ion a été détecté dans l'enveloppe et le cotylédon des deux variétés ZP-840 et *Fidelia*. Néanmoins, l'écart important entre les valeurs de *m/z* que nous avons observé et la valeur de masse exacte calculée pour cet ion, ainsi que les localisations obtenues en imagerie TOF-SIMS qui sont contradictoires avec celles obtenues par Dueñas *et al.*, rendent son identification douteuse.

L'ion à m/z 285,07, qui peut provenir de flavonoïdes à base d'aglycone kaempférol (fragment Y_0) mais aussi d'aglycone quercétine, est détecté principalement au niveau de l'enveloppe, et de la région de l'enveloppe proche de la radicule chez ZP-840, tandis qu'il n'est localisé que dans la radicule chez NGB 5839. En revanche, l'ion à m/z 301,07, qui provient uniquement de la fragmentation des flavonoïdes à base d'aglycone quercétine, est détecté dans les quatre régions pour la variété ZP-840 et principalement dans la radicule pour la variété NGB 5839. L'ion à m/z 463,16 est quant à lui détecté dans l'enveloppe et le cotylédon mais principalement dans la radicule des graines des deux variétés de *P. sativum*. Cet ion est suspecté d'être la forme déprotonée $[M-H]^-$ d'une quercétine glycoside ou d'être un fragment Y_0 d'un flavonoïde, à base d'aglycone quercétine, de plus haut poids moléculaire (di- ou tri-glycosylé). Il n'a pas été détecté lors des expériences de LC-ESI-MS des autres auteurs dans la variété ZP-840 (seulement chez *Fidelia*). Au contraire, l'ion à m/z 447,1, identifié dans l'étude de Dueñas *et al.* comme étant de la quercétine 3-*O*-rhamnoside ou une lutéoline glycoside, n'a pas été détecté lors de nos expériences.⁶

Enfin, bien que moins de composés phénoliques aient été détectés et identifiés en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS que par des expériences de LC-ESI-MS, cette méthode semble généralement conforme aux résultats déjà publiés dans la littérature. En adaptant les techniques de préparation des échantillons, il sera donc *a priori* possible de détecter et de localiser des flavonoïdes dans des graines d'*A. thaliana*.

3.3 *Arabidopsis thaliana*

Les premières méthodes de préparation des graines d'*A. thaliana* testées pour l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS ont été les méthodes couramment utilisées en histologie, soit fixation au formaldéhyde, déshydratation dans des bains successifs d'éthanol et inclusion dans différents supports : paraffine, cire, résine Spurr et Historésine. D'après la littérature, le flavonoïde le plus représenté dans les graines de type sauvage (WT) est la quercétine 3-*O*-rhamnoside (masse exacte : 448,10 Da). Pour évaluer les différentes méthodes, nous nous sommes donc basés sur la détection de la forme déprotonée $[M-H]^-$ de ce composé (m/z 447,10) ainsi que sur la détection des deux fragments Y_0 correspondant aux aglycones kaempférol (m/z 285,05) et quercétine (m/z 301,04). De plus, nous avons enregistré des images topographiques de la surface des graines. En effet, avec le spectromètre de masse

TOF-SIMS, il est possible d'obtenir des images des électrons émis (électrons secondaires). Pour cela, la source d'ion primaire doit être en mode « burst alignment », aucun ion primaire n'est sélectionné, toutes les sortes d'agrégats sont donc émis (mode DC ou *Direct Current*) et les électrons sont détectés avec un détecteur d'électrons secondaire. Le détecteur d'ions secondaires est éteint pour éviter qu'il ne sature durant ces expériences. Nous pouvons donc obtenir des images de la surface des graines avec une résolution de 1024x1024 pixels, soit une résolution spatiale de 488 nm² pour des images de 500x500 μm², ce qui nous permet d'évaluer l'endommagement qu'elles subissent durant leur préparation. Toutefois, après ce type d'analyse, l'échantillon ne peut plus être analysé en imagerie TOF-SIMS, la surface étant trop endommagée.

La figure 11 montre les résultats obtenus après inclusion des graines dans de la paraffine et coupe au cryostat. D'après l'image des électrons secondaires (Fig. 11B), la surface de la graine après ce traitement présente des trous et quelques reliefs. Sur le spectre de masse (Fig. 11A) enregistré en mode d'ionisation négatif, aucun signal correspondant aux lipides ou à un flavonoïde n'est détecté. Quant aux images (Fig. 11C) des ions à m/z 285,04; 301,02 et 447,16, leur valeur de mc (5, 4 et 2 respectivement) correspond au bruit de fond. Des résultats similaires sont obtenus en incluant des graines WT dans de la cire.

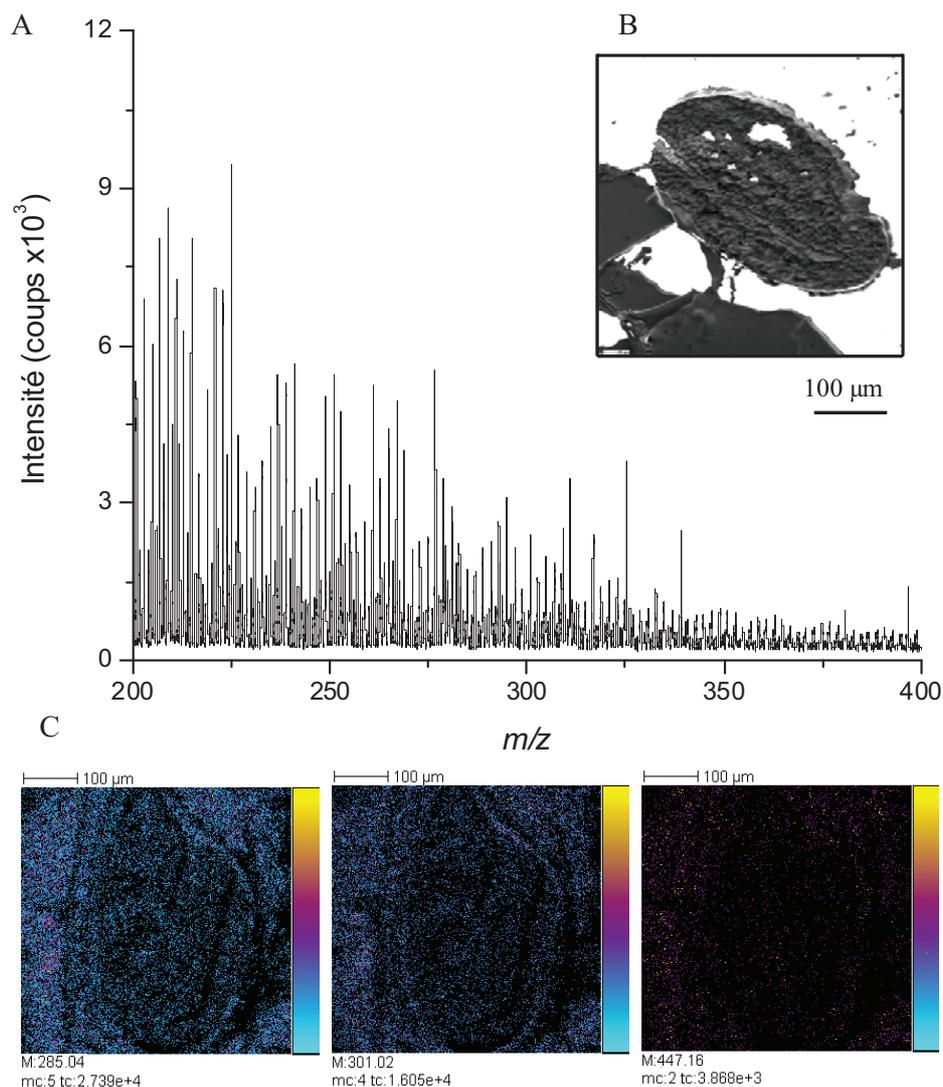


Figure 11 : Résultats obtenus en incluant les graines d'*A. thaliana* dans de la paraffine. **A** : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. **B** : image des électrons secondaires de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 1024×1024 pixels, soit une taille de pixel de $488 \times 488 \text{ nm}^2$. **C** : images des ions à m/z 285,05; 301,02 et 447,16. Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $3,43 \times 10^{11}$ ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Les résultats obtenus en incluant les graines dans de la résine Spurr (résine époxy) sont présentés dans la figure 12. Sur le spectre (Fig. 12A), plusieurs massifs sont détectés autour de m/z 255,24 (C16:0), 281,24 (C18:1), 309,28 (C20:1) et 337, 32 (C22:1), correspondant respectivement aux carboxylates des acides gras contenant 16, 18, 20 et 22 atomes de

carbone. De plus, les pics à m/z 285,04; 301,04 et 447,10 sont détectés. La résine époxy ne semble donc pas « polluer » les spectres comme la paraffine et la cire. Néanmoins, en observant l'image des électrons secondaires (Fig. 12B), nous remarquons que la surface de la graine est très irrégulière ; il est même difficile d'en discerner les contours.

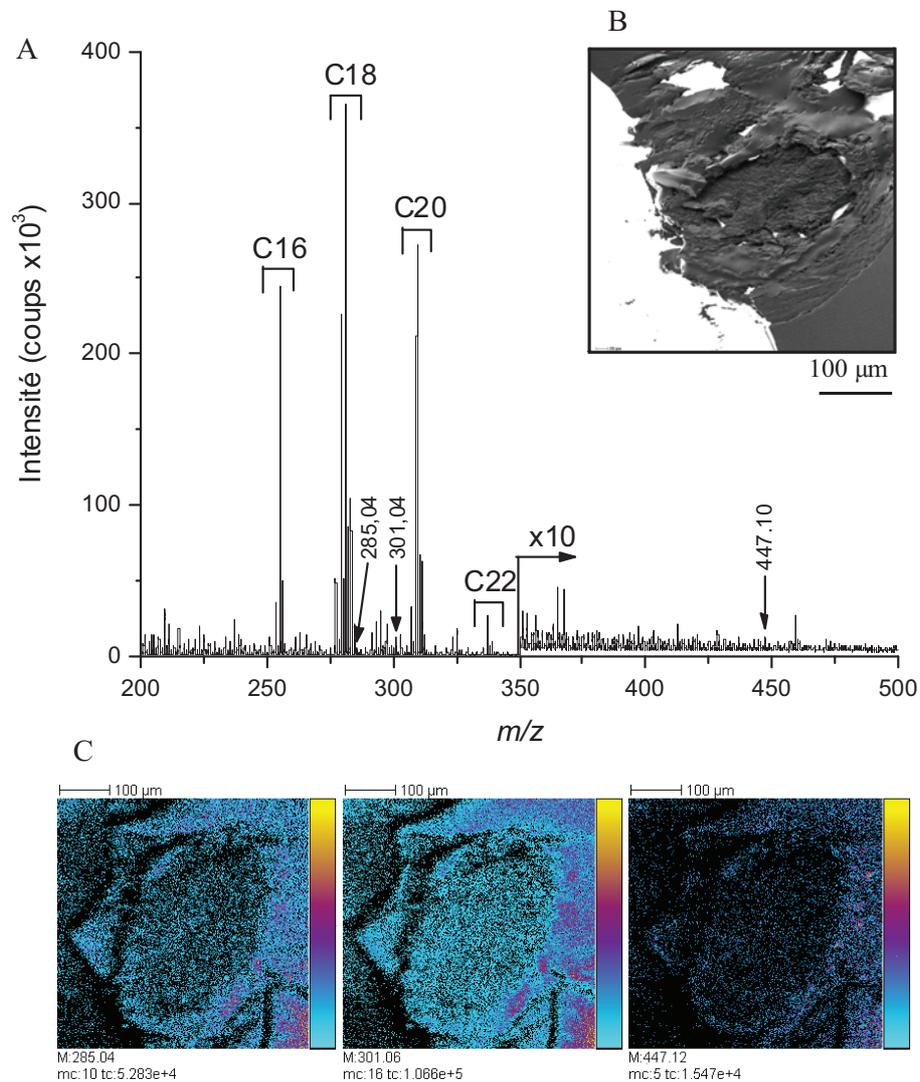


Figure 12 : Résultats obtenus en incluant les graines d'*A. thaliana* dans de la résine Spurr. **A** : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. **B** : image des électrons secondaires de 500x500 μm² à 1024x1024 pixels, soit une taille de pixel de 488x488 nm². **C** : images des ions à m/z 285,04; 301,06 et 447,12. Images de 500x500 μm² à 256x256 pixels, taille de pixel : 2x2 μm², dose d'ions primaires de 3,38x10¹¹ ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Les images obtenues en sélectionnant les pics à m/z 285,04; 301,06 et 447,12 (Fig. 12C), indiquent que ces composés ne sont pas localisés dans la graine, mais autour et plus précisément, dans la résine. Les mêmes résultats ont été obtenus lorsque les graines sont incluses dans de l'Historésine. Il semble donc que l'inclusion de graines dans ce type de support délocalise complètement les molécules d'intérêt. Ces méthodes ne sont donc pas compatibles avec l'imagerie par spectrométrie de masse.

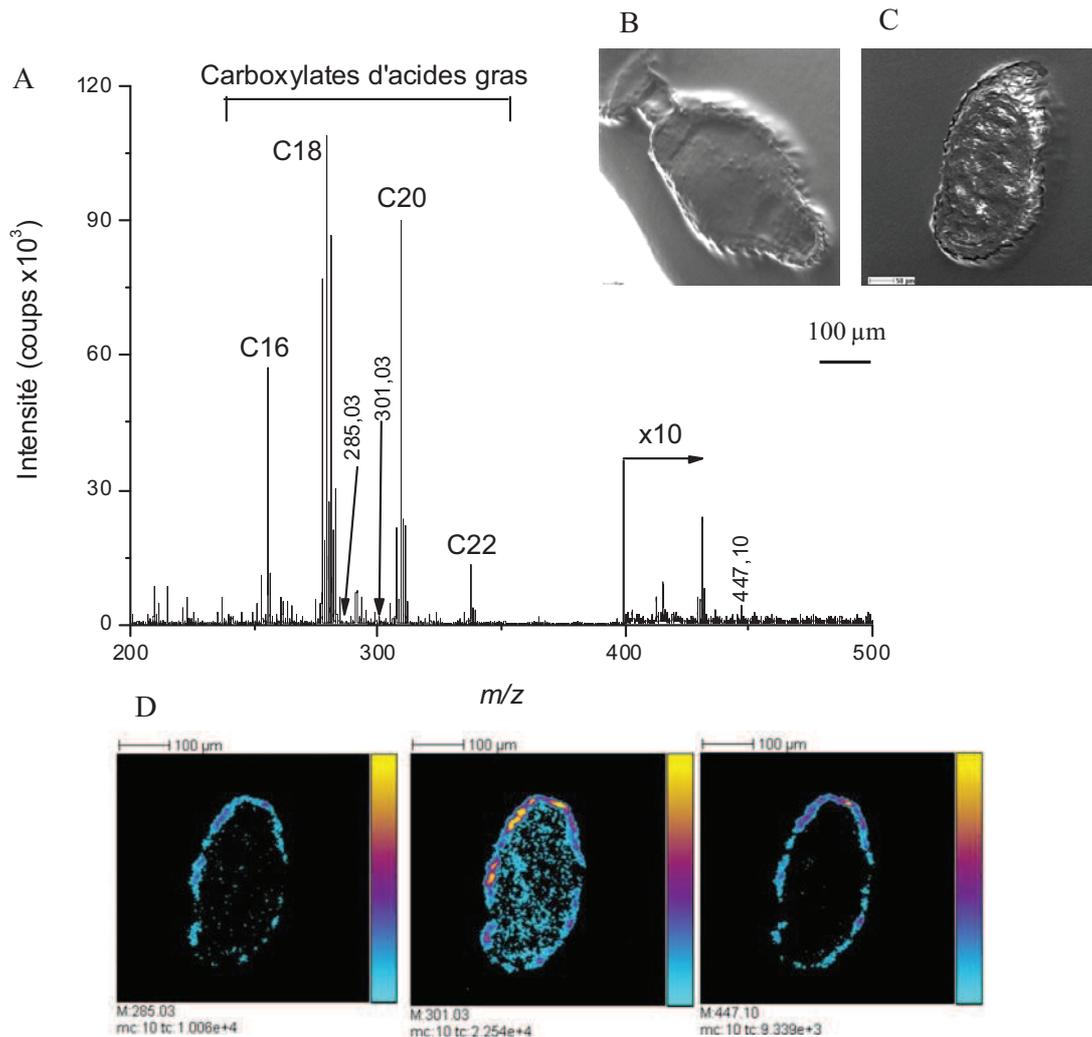


Figure 13 : Résultats obtenus en incluant les graines fraîches d'*A. thaliana* dans de la colle OCT. **A** : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. **B** : image des électrons secondaires d'une coupe de graine recouverte par la colle. **C** : image en électrons secondaire d'une coupe de graine non recouverte. Images de 500x500 μm² à 1024x1024 pixels, soit une taille de pixel de 488x488 nm². **D** : images des ions à m/z 285,03; 301,03 et 447,10. Images de 500x500 μm² à 256x256 pixels, taille de pixel : 2x2 μm², dose d'ions primaires de 3,52x10¹¹ ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur

[0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Suite à ces échecs avec les méthodes de préparation utilisées en histologie, nous nous sommes penchés sur d'autres techniques. La première que nous avons expérimenté est l'inclusion des graines fraîches dans de la colle OCT. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 13.

La première difficulté que nous avons rencontrée est que la grande majorité des graines ainsi obtenues présente de la colle OCT à leur surface (Fig. 13B). Néanmoins certaines n'en présentaient pas (1/30 en moyenne; Fig. 13C). Nous avons donc pu enregistrer des spectres de masse en mode d'ionisation négatif à la surface de ces dernières. L'un de ces spectres est présenté en figure 13A. Comme pour l'inclusion dans les résines, plusieurs massifs sont détectés autour de m/z 255,24 (C16:0), 281,24 (C18:1), 309,28 (C20:1) et 337, 32 (C22:1) et les pics correspondants aux flavonoïdes à m/z 285,03; 301,03 et 447,10 sont détectés. Les images générées en sélectionnant ces trois pics (Fig. 13D) suggèrent qu'ils sont principalement localisés dans l'enveloppe des graines, ce qui est tout à fait compatible avec la littérature.⁷ Cette méthode donne donc de bons résultats, néanmoins elle manque de gravement de reproductibilité.

Enfin, la dernière méthode utilisée consistait à inclure les graines fraîches dans de la résine polyester (H59, Sodemi, France) et à préparer les plots obtenus de sorte que les graines affleurent à leur surface. Néanmoins, ces échantillons constitués d'un bloc de 6 à 8 mm d'épaisseur de résine ne sont pas conducteurs et, lorsqu'ils sont introduits dans le champ électrostatique dédié à l'extraction des ions secondaires, ils agissent comme un diélectrique à la surface duquel la tension ne peut être connue à l'avance. C'est pourquoi l'énergie cinétique des ions secondaires n'est pas exactement 2 keV, mais une valeur fixe et indéterminée comprise entre 0 et 2 keV. Sans correction de l'optique des ions secondaires, c'est-à-dire le miroir électrostatique ainsi que les lentilles disposées le long du trajet ionique, leurs trajectoires seraient incorrectes, ce qui conduirait à une diminution de la résolution en masse et de la transmission des ions. Un moyen simple et efficace pour régler les paramètres de l'analyseur à l'énergie cinétique effective des ions secondaire est de profiter de la capacité du miroir électrostatique pour mesurer cette énergie cinétique. En effet, en diminuant la tension appliquée à la dernière électrode du miroir, la valeur à partir de laquelle les ions disparaissent du spectre, si on la multiplie par la charge des ions, est égale à leur énergie cinétique. Il est

ensuite nécessaire de régler les tensions de l'analyseur en fonction de cette nouvelle valeur d'énergie cinétique.

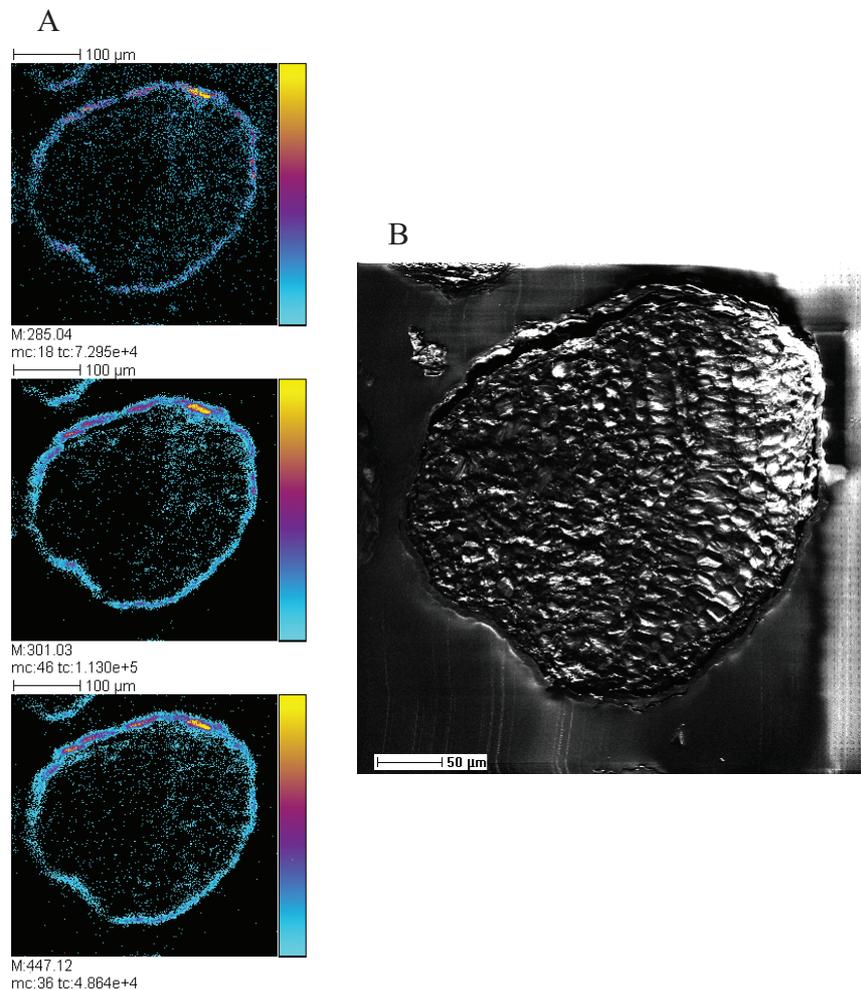


Figure 14 : Résultats obtenus en incluant les graines fraîches d'*A. thaliana* dans la résine polyester. **A** : images des ions à m/z 285,03; 301,03 et 447,10. Images de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $1,5 \times 10^{12}$ ions. cm^{-2} . **B** : image des électrons secondaires d'une coupe de graine. Images de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ à 512×512 pixels, soit une taille de pixel de $800 \times 800 \text{nm}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Cette méthode permettant d'optimiser les paramètres de l'analyseur, est appelée « charge compensation » (compensation de charge) par le constructeur. Elle permet ainsi d'atteindre une résolution en masse comparable à celle obtenue avec des échantillons conducteurs, en maintenant une excellente transmission des ions secondaires. Cette étape ne peut être négligée

pour ces échantillons, car le défaut d'énergie cinétique mesuré est de l'ordre de $\sim 10\%$ (quelle que soit la polarité), ainsi la véritable énergie cinétique des ions secondaires est de $\sim 1,8$ keV au lieu de 2keV, pour ± 2 kV appliqués. Pour les fines coupes de tissus animaux, ce défaut n'est que de $\sim 1\%$ ou moins.

Les résultats obtenus avec cette méthode sont présentés dans la figure 14. Les reliefs que présente la surface des graines (Fig. 14B) sont acceptables pour l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS.

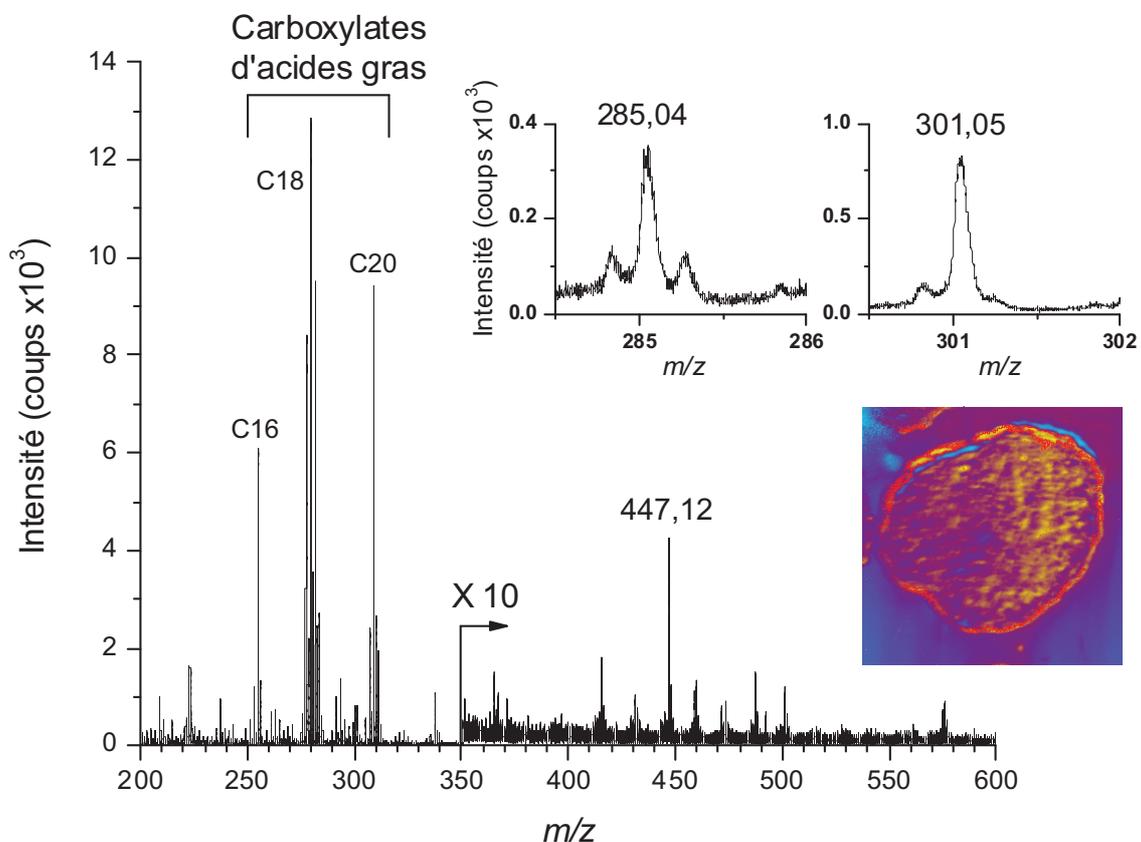


Figure 15 : Spectre de masse TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une graine fraîche d'*A. thaliana* incluse dans de la résine polyester et extrait de la ROI enveloppe.

Les images obtenues en sélectionnant les différents ions correspondants aux flavonoïdes à m/z 285,04; 301,03 et 447,12 (Fig. 14A) délimitent parfaitement l'enveloppe des graines et ne présentent aucune délocalisation. De plus, les valeurs de mc obtenues pour les pics sont largement supérieures à celles obtenues avec toutes les autres méthodes (18, 46 et 36

respectivement pour les ions à m/z 285,04; 301,03 et 447,12). Le spectre de masse extrait de la région de l'enveloppe est présenté dans la figure 15.

Là encore, les massifs correspondant aux carboxylates des acides gras contenant 16, 18, 20 et 22 carbones dominent le spectre. De plus, les ions correspondants aux flavonoïdes (m/z 285,04; 301,05 et 447,12) sont détectés avec une très bonne intensité. Toutefois, nous n'avons pas détecté de flavonoïdes différemment glycosylés (que ce soit de la série quercétine, kaempférol ou isorhamnétine), qui ont été identifiés lors des expériences de LC-ESI-MS. Néanmoins, ces composés ne représentent que 1 à 10% de la quantité totale de quercétine 3-*O*-rhamnoside.¹⁸

Au vu de ces résultats, nous avons réalisé des expériences à plus forte résolution en mode « burst alignment ». À la périphérie d'une graine fraîche incluse dans cette résine polyester, nous avons enregistré une image de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ avec 256×256 pixels, soit une taille de pixel de 586 nm^2 (Fig. 16).

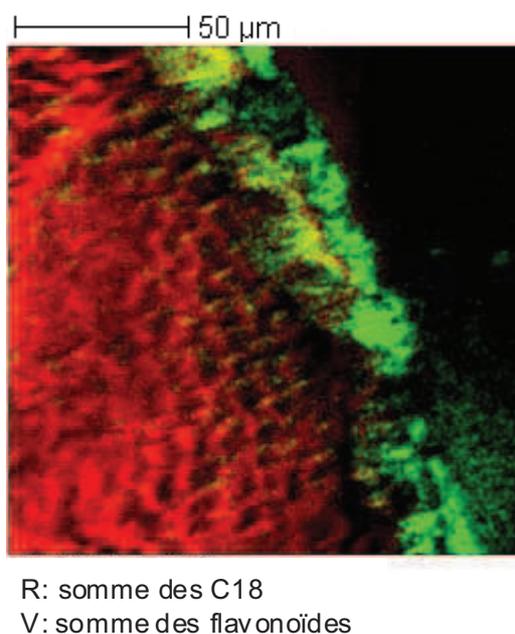


Figure 16 : Superposition en deux couleurs enregistrée à la surface d'une graine fraîche incluse dans de la résine polyester. Vert : somme des images des pics correspondants aux flavonoïdes (m/z 285,04; 301,03 et 447,12). Rouge : somme des images des pics correspondants aux carboxylates des acides gras contenant 18 carbones (m/z 277,25; 279,24; 281,22 et 283,24). Images enregistrées en mode « burst alignment », de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $586 \times 586 \text{ nm}^2$, dose d'ions primaires de $4 \times 10^{12} \text{ ions.cm}^{-2}$.

Il s'agit de la superposition en deux couleurs de la somme des ions carboxylates d'acides gras C18 (m/z 277,25; 279,24; 281,22 et 283,24), en rouge, et de la somme des trois principaux ions correspondants aux flavonoïdes détectés (m/z 285,04, 301,03 et 447,12), en vert. L'enveloppe est bien représentée par les signaux des flavonoïdes, alors que les signaux des acides gras sont plus intenses dans le cotylédon. Quelques petites irrégularités du signal des flavonoïdes sont observées, ce qui pourrait être du soit à de petites variations de l'épaisseur de l'enveloppe, soit à la modification de cette enveloppe après contact avec la résine polyester au cours du processus d'inclusion.

La méthode a finalement été testée avec des graines de deux mutants différents d'*A. thaliana*, ayant subi des modifications sur leur voie de biosynthèse des flavonoïdes, et déjà étudiés par LC-ESI-MS.⁷ Un premier mutant nommé *tt7* se caractérise par l'absence de composés à base de quercétine. Un second mutant, nommé *tt4*, est connu pour ne pas produire de flavonoïdes.

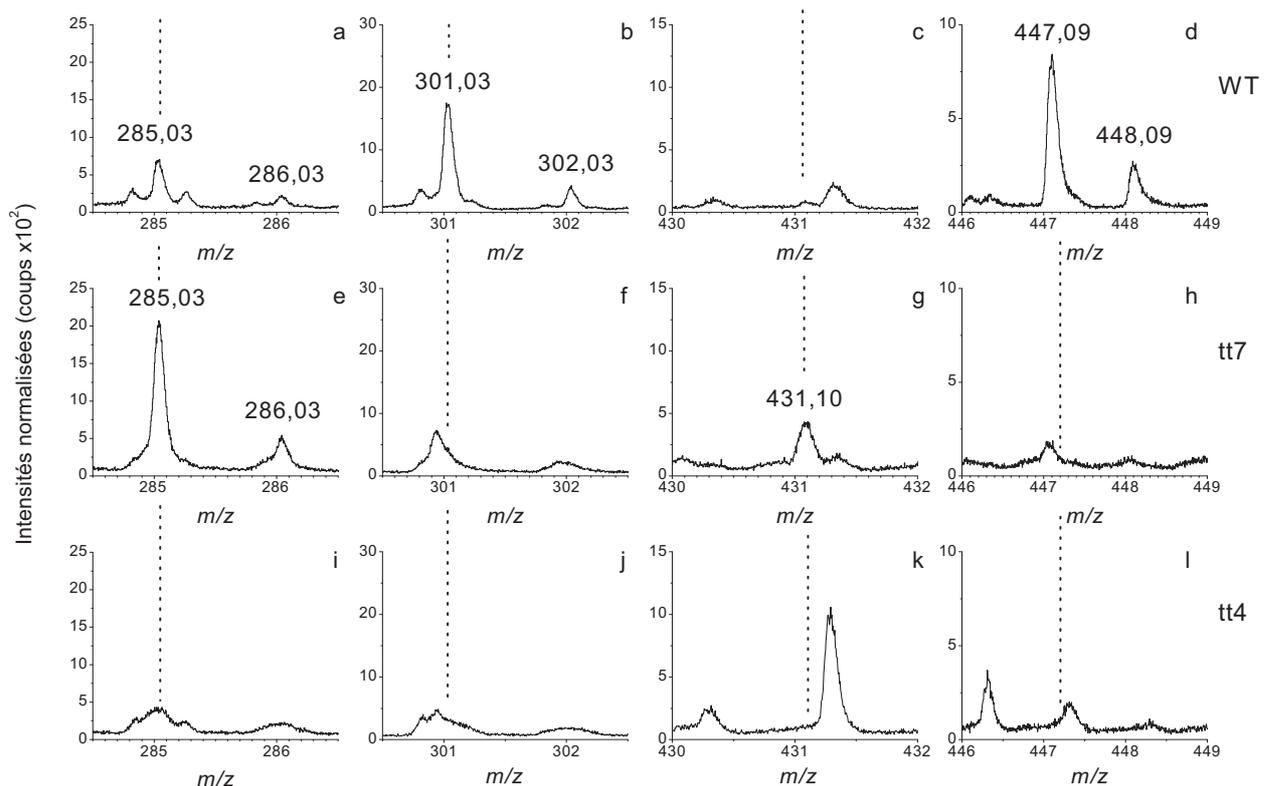


Figure 17 : Portions de spectres de masse TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de graines WT (a-d), *tt7* (e-h) et *tt4* (i-l) et extraits de la région enveloppe.

Les graines fraîches des mutants ont été préparées en suivant exactement la même procédure que pour les graines de type sauvage, et des images ioniques ont été enregistrées

avec les mêmes conditions expérimentales. Des spectres de l'enveloppe ont été extraits pour les trois sortes de graines. Ces spectres de masse sont présentés dans la figure 7. Dans les graines de type sauvage, les ions à m/z 285,03; 301,03 et 447,09 sont détectés. Aucun de ces ions ne peut être spécifiquement attribué à des composés à base de kaempférol, sa présence ne peut donc pas être rigoureusement démontrée. Dans le spectre des graines mutantes *tt7*, les ions détectés aux rapports masse-sur-charge 285,03 et 431,10 sont probablement liés aux kaempférol 3-*O*-rhamnoside et kaempférol 3,7-di-*O*-rhamnoside, les deux principaux flavonoïdes signalés.¹⁸ L'ion $[M-H]^-$ à m/z 577 de ce dernier n'étant pas détecté. Ces informations, en plus du fait de n'avoir pas détecté d'ion à m/z 301, nous permettent de conclure que le mutant *tt7* ne produit que des flavonoïdes de type kaempférol. Enfin, aucun flavonoïde, que ce soit à base de kaempférol ou de quercétine, n'est détecté dans le mutant *tt4*.

4. Conclusion

L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS permet de cartographier une partie des flavonoïdes dans des coupes de *Pisum sativum* et d'*Arabidopsis thaliana*. Dans cette étude, nous avons dû sélectionner, parmi toutes sortes de méthodes de préparations d'échantillons connues, laquelle serait la plus efficace pour l'analyse chimique de tels objets. S'il a été relativement simple de préparer des coupes de pois, la méthode étant la même que pour les coupes de tissus animaux, aucune des méthodes couramment utilisées en histologie ou en microscopie électronique n'a été jugée adéquate pour l'imagerie chimique des graines d'*Arabidopsis thaliana*. Pour cela, il a été nécessaire d'inclure les graines fraîches dans une résine polyester, de polir les plots obtenus et de les tailler avec un ultramicrotome équipé d'une lame diamant. Finalement, il a été possible de localiser avec précision différentes classes de flavonoïdes, et ainsi de comparer leur composition et leur localisation dans différents types de mutants par rapport à la souche sauvage.

Bien que cette méthode de préparation des échantillons ne puisse être considérée comme un moyen simple et rapide, elle est la plus reproductible. Nous avons observé la même distribution pour les flavonoïdes majeurs dans les différentes graines sauvages que nous avons analysées ($n = 10$). À l'avenir, la méthode proposée pourrait être utilisée pour cartographier les flavonoïdes dans des graines d'*Arabidopsis thaliana*, issues de différents écotypes, à différents stades de maturation. De cette manière, nous pourrions déduire beaucoup plus

d'informations biologiques sur l'origine et le rôle de certains flavonoïdes. Finalement, afin de confirmer l'identité de certains composés, la spectrométrie de masse en tandem couplée à l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS devrait probablement être envisagée.

Références bibliographiques

- [1] Harbourne, J.; Baxter, H.A. *A Handbook of the Natural Flavonoids*; Wiley : New York, **1999**.
- [2] Dixon, R. A.; Achine, L.; Kota, P.; Liu, C. J.; Reddy, M. S. S.; Wang, L. J. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 371.
- [3] Bagchi, D.; Sen, C. K.; Ray, S. D.; Das, D. K.; Bagchi, M.; Preuss, H. G.; Vinson, J. A. *Mutat. Res.* **2003**, *523-524*, 87.
- [4] Serafini, M.; Bugianesi, R.; Maiani, G.; Valtuena, S.; De Santis, S.; Crozier, A. *Nature* **2003**, *424*, 1013.
- [5] Park, O. J.; Surh, Y. J. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 43.
- [6] Dueñas, M.; Estrella, I.; Hernández, T. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 116.
- [7] Routaboul, J. M.; Kerhoas, L.; Debeaujon, I.; Pourcel, L.; Caboche, M.; Einhorn, J.; Lepiniec, L. *Planta* **2006**, *224*, 96.
- [8] March, R.; Brodbelt, J. *J. Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1581.
- [9] Tokareva, E. N.; Fardim P.; Pranovich, A. V.; Fagerholm, H. P.; Daniel, G.; Holmbom, B. *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 7569.
- [10] Li, Y.; Shrestha, B.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 407.
- [11] Cha, S.; Zhang, H.; Ilarslan, H. L.; Surkin Wurtele, E.; Brachova, L.; Nikolau, B. J.; Yeung, E. S. **2008**, *Plant J.*, *55*, 348.
- [12] Winkel-Shirley, B. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485.
- [13] Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Quintana, C.; Croisy, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 228.
- [14] Chandra, S.; Morrison, G.H. *Biol. Cell*, **1992**, *74*, 31.

[15] Edelmann, L. *Scanning Microsc.* **1994**, 8, 551.

[16] Chandra, S.; Morrison, G.H.; Wolcott, C.C. *J. Microsc. (Oxf.)*, **1986**, 144, 15.

[17] Mazel, V.; Richardin, P.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Walter, P.; Laprévotte, O. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 570, 34.

[18] Kerhoas, L.; Aouak, D.; Cingöz, A.; Routaboul, J. M.; Lepiniec, L.; Einhorn, J.; Birlirakis, N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 6603.

CHAPITRE II

Localisation de molécules exogènes

1. Localisation d'un retardateur de flamme bromé

1.1. Introduction

1.1.1. Présentation

L'avènement des polymères synthétiques a entraîné une impulsion nouvelle dans la lutte contre les incendies. En effet, l'inflammabilité élevée de ces matériaux malléables, peu onéreux et hautement hydrophobes, ainsi que le besoin grandissant de sécurité et de réduction du risque, ont ouvert la voie à une production scientifique intense. Afin de diminuer les risques de propagation des flammes dans ces matériaux synthétiques, les industriels ajoutent des composés capables de retarder les flammes. Ces produits chimiques sont incorporés directement dans divers matériaux à usages domestiques et industriels afin de leur conférer des propriétés ignifuges. En général, 5 à 30% de ce qui entre dans la fabrication de ces matériaux peut être constitué de composés retardateurs de flammes. Dans nos intérieurs, aussi bien que sur les lieux de travail, la proportion des appareils constitués de polymères synthétiques est en constante augmentation. L'utilisation de ces retardateurs de flammes n'est pas limitée uniquement à l'ignifugation des matériaux synthétiques, en effet, ils permettent également de lutter contre les incendies et notamment les feux de forêt. Ces derniers sont combattus grâce aux déversements d'organophosphorés. En revanche, ce sont principalement les retardateurs de flammes bromés qui sont incorporés aux polymères synthétiques afin de retarder la prise de feu de biens domestiques et industriels. Le caractère persistant de ces substances a suscité de nombreuses inquiétudes, tant au plan environnemental qu'au niveau de la santé publique. En effet, à l'inverse des autres polluants organiques persistants (POP) majoritairement chlorés, leur concentration dans l'environnement semble être en augmentation.

Les retardateurs de flammes vont inhiber ou supprimer le processus de combustion par une action chimique et/ou physique. Ils interfèrent avec la combustion, à l'une des quatre étapes de ce processus : l'échauffement, la décomposition, l'inflammation ou la propagation des flammes. Ils agissent donc sur deux fronts, en limitant le départ de feu et en retardant la propagation de l'incendie.

Les halogènes sont très efficaces dans le piégeage des espèces radicalaires formées lors du processus de combustion et présentes au sein des flammes, permettant de ralentir ou

d'arrêter la prise du feu. Les quatre halogènes sont efficaces dans la capture des radicaux libres, et cette efficacité de piégeage augmente avec la taille de l'halogène (I>Br>Cl>F). Tous ne peuvent être utilisés comme retardateurs de flammes. En effet, les composés fluorés sont très stables et ne se décomposent qu'à très haute température, délivrant les halogènes trop tard pour être réellement efficaces. À l'inverse, les composés iodés sont peu stables et se décomposent à de faibles températures. Ainsi, seuls les composés organochlorés et organobromés sont utilisés comme retardateurs de flammes. Avec un piégeage plus efficace et une température de décomposition plus basse, les composés organobromés sont beaucoup plus utilisés que leurs homologues chlorés.¹

1.1.2. Les retardateurs de flammes bromés (RFB)

Il existe 75 composés aliphatiques, aromatiques et cyclo-aliphatiques différents utilisés comme retardateurs de flammes bromés répartis en six familles. Leur seul point commun est la présence de brome et leur action en phase gazeuse, permettant le ralentissement ou l'arrêt de la prise de feu par piégeage des espèces radicalaires présentes au sein des flammes. Les six familles sont : le tétrabromobisphénol A (TBBPA), les polybromodiphényles éthers (PBDE), l'hexabromocyclododécane (HBCD), les polystyrènes bromés, les bromophénols et l'anhydride tétrabromophthalique.

Les polybromodiphényles éthers représentent près d'un tiers de la production mondiale de RFB et sont utilisés depuis les années 60. Trois types de mélanges de PBDE sont utilisés commercialement, chacun est nommé en fonction du PBDE majoritaire :

- Le Penta-mix, utilisé dans les mousses de polyuréthane souple : rembourrage, tapis, matelas et oreillers. On le trouve aussi dans les mousses rigides où il entre dans la composition des ordinateurs personnels et des téléviseurs. Il est constitué de triBDE, tetraBDE, de pentaBDE et d'hexaBDE.
- L'Octa-mix, utilisé dans les plastiques (styrène) : plastique d'écrans d'ordinateurs, téléviseurs et circuits électriques. Il est constitué de congénères ayant de 6 à 10 atomes de brome.
- Le Deca-mix, utilisé dans les boîtiers en plastique en polystyrène pour équipement électroniques est aussi utilisé pour les fils, câbles, tuyaux et revêtements textiles (tissus d'ameublement et rideaux). Il est constitué de nonaBDE et de decaBDE.

La demande mondiale annuelle en PBDE est estimée à environ 65 000 tonnes/an, dont 85% sous la forme de deca-mix, 10% sous la forme de penta-mix et 5% sous la forme d'octa-mix.

Les PBDE sont synthétisés par bromation d'une molécule de diphenyl éther dans des solvants organiques. Les conditions de cette synthèse déterminent le degré d'halogénéation des molécules obtenues. La formule générale d'un PBDE est $C_{12}O_1H_{(n)}Br_{(10-n)}$ avec la somme des atomes d'hydrogène et de brome toujours égale à 10 ($1 \leq n \leq 10$) (Figure 1). Il existe donc théoriquement 209 congénères, répartis en 10 groupes, du mono au decabromodiphényle éther, DBDE.

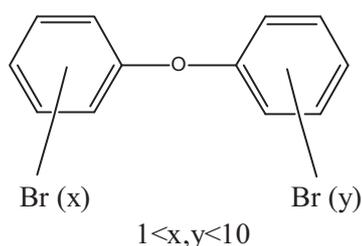


Figure 1 : Structure chimique des PBDE.

1.1.3. Niveau de contamination et risques pour la santé

En raison de leur efficacité et de leur faible coût, les retardateurs de flammes bromés ont de nombreuses applications et ils permettent de sauver des vies et des biens. Néanmoins, d'autres composés de structures très proches, le bisphénol A (BPA) pour le TBBPA et les polychlorobiphényles (PCB) et polybromobiphényles (PBB) pour les PBDE, sont reconnus comme étant des contaminants organiques de l'environnement. Le BPA est un perturbateur endocrinien, doté d'une activité œstrogène-mimétique. Les PCB et les PBB sont persistants dans l'environnement, ont un potentiel de bioaccumulation élevé et présentent un risque toxique. Il est donc légitime de penser que leurs analogues organobromés puissent posséder des caractéristiques voisines.

Il a été démontré que les PBDE sont présents dans l'environnement,^{2,3} chez l'animal,^{4,5} ainsi que dans les tissus humains.^{6,7} Ceux de faible poids moléculaires (du tetraBDE à l'heptaBDE) ont été les plus étudiés, ainsi, certains d'entre eux peuvent induire des effets neurotoxiques chez la souris.^{8,9} De plus, ils sont soupçonnés d'avoir un impact sur la

régulation du système hormonal thyroïdien,¹⁰ et auraient une activité agoniste et antagoniste envers le récepteur Ah.¹¹ Ils induisent aussi l'expression de CYP1A1 et de CYP1A2,¹² qui sont des protéines de la superfamille des cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme des molécules exogènes ainsi que des molécules endogènes comme les stéroïdes. Le decabromodiphényle éther (DBDE) a été considéré par les fabricants comme étant peu bioaccumulable (en dessous de 1%) en raison de son poids moléculaire élevé,¹³ et seulement un nombre limité d'études ont examiné sa toxicité.

	% of administered radioactivity	$\mu\text{g g}^{-1}$ (or $\mu\text{g mL}^{-1}$) [^{14}C]-DBDE equivalents
Faeces	66.29±1.35	
Digestive tract content	5.33±1.50	
Urine	0.11±0.02	0.06±0.01
Adrenals	0.16±0.05	33.03±4.07
Ovaries	0.13±0.02	16.05±2.91
Liver	6.48±1.03	11.16±2.42
Kidneys	0.29±0.05	3.90±0.48
Stomach	0.20±0.07	3.10±0.46
Small intestine	0.64±0.15	2.81±0.79
Heart	0.08±0.01	2.47±0.36
Lung	0.13±0.02	1.93±0.32
Spleen	0.06±0.01	1.82±0.18
Large intestine	0.16±0.04	1.61±0.27
Plasma		1.53±0.12
Uterus	0.24±0.09	1.39±0.28
Adipose tissue		0.79±0.10
Muscle		0.41±0.05
Brain	0.01±0.00	0.11±0.01
Placentas	0.47±0.05	2.48±0.16
Foetuses	0.43±0.03 ^a	0.46±0.05
Amniotic fluid	0.02±0.00	0.11±0.01
Carcass	9.23±1.21	1.11±0.05
Cages	<0.0002	

^a For the whole litter.

Figure 2 : Bilan de l'étude métabolique menée durant quatre jours sur des rats femelles nourris de force avec 2 mg.kg-1 de [^{14}C]-DBDE chaque jour entre les jours de gestation 16 à 19. Extrait de la référence 21.

Les PBDE de hauts poids moléculaires sont rarement étudiés dans les recherches traitant de l'exposition de l'homme en raison de difficultés techniques. Toutefois, lorsqu'ils le sont, le DBDE ainsi que d'autres PBDE de hauts poids moléculaires sont jugés être des contaminants majeurs.¹⁴ Par exemple, chez l'homme, la présence de DBDE a été rapportée dans le lait maternel,¹⁵ le sérum,^{16,17} et les tissus adipeux.^{18,19,20}

Ces conclusions sont également étayées par des données récentes obtenues chez le rat,^{21,22} où l'utilisation de [^{14}C]-DBDE radiomarqué a montré que la biodisponibilité du DBDE est supérieure à 20%. De plus, il a été démontré que ces composés se concentrent dans certains

organes comme le foie, les glandes surrénales,^{21,22} ainsi que les ovaires (Figure 2).²² Il est particulièrement intéressant de noter que les concentrations obtenues dans ces deux glandes endocrines sont encore plus élevées que celles obtenues dans le foie. Ainsi, chez les rats recevant 2 mg.kg⁻¹ de DBDE radiomarqué, les concentrations résiduelles observées étaient de 11,2; 16,1 et 33,0 ppm respectivement dans le foie, les ovaires et les glandes surrénales. En outre, une partie de la radioactivité détectée a été associée à des métabolites débromés (environ 10% dans les glandes surrénales et les ovaires). Cette débromation peut entraîner la bioactivation des PBDE. Certains métabolites, comme le tetraBDE hydroxylé, sont des substances chimiques capables de perturber le système endocrinien (EDCs, pour Endocrine Disrupting Chemicals).^{22,23}

1.2. Objectifs de l'étude

Dans cette étude, l'imagerie par spectrométrie de masse a été utilisée afin de localiser le DBDE avec précision dans ses principaux organes cibles, en l'occurrence le foie ainsi que deux glandes endocrines, les glandes surrénales et les ovaires. La taille de ces organes ne faisant que quelques millimètres détermine la technique à utiliser. En effet, avec l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF, les composés n'auraient pas été localisés avec suffisamment de précision, tandis que la taille limitée du champ analysable en imagerie nano-SIMS n'aurait pas permis d'enregistrer l'image de l'ensemble des organes. L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS est alors apparue comme la méthode la plus adaptée.

Cette étude a été menée en collaboration avec Laurent Debrauwer, Anne Riu et Daniel Zalko (Xénobiotiques, INRA-ENVT, Toulouse) ainsi que Nathalie Bourgès-Abella (Département des Sciences Cliniques, École Nationale Vétérinaire de Toulouse).

1.3. Protocole Opératoire

1.3.1. Préparation des échantillons

Des rats femelles Wistar, âgées de 12 semaines (n=6), ont été acclimatées à un cycle jour/nuit de 12/12 heures pendant une semaine et ont été nourries de manière conventionnelle avec accès à l'eau à volonté. Trois animaux ont été nourris de force pendant quatre jours

consécutifs avec une dose journalière de 2 mg.kg^{-1} de DBDE (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) dissous dans de l'huile d'arachide et trois animaux ont été nourris de force avec seulement de l'huile d'arachide (témoin). Les animaux ont été euthanasiés par dislocation cervicale suivie d'une exsanguination, 24h après la dernière dose de DBDE. Le foie, les glandes surrénales et les ovaires ont été prélevés et immédiatement congelés et stockés à -80°C jusqu'aux analyses.

Des coupes de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur à -20°C pour les glandes surrénales et les ovaires et de $14 \mu\text{m}$ d'épaisseur à -25°C pour le foie, ont été préparées avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre) et déposées sur un support en silicium. Après chaque coupe d'ovaire, des coupes adjacentes ont été déposées sur une lame de verre pour subir une coloration histologique.

1.3.2. Analyse histologique

Les coupes déposées sur lame de verre ont été colorées suivant le protocole du Trichrome de Masson (Sigma Kit HT15, Saint-Quentin-Fallavier, France) détaillé ci-dessous :

- Réhydrater les tissus dans du tampon PBS pendant 10 minutes,
- Colorer au Réactif de Bouin toute la nuit à température ambiante,
- Décolorer des tissus devenus jaunes sous l'eau du robinet,
- Tremper dans hématoxyline pendant 15 min,
- Rincer à l'eau du robinet pendant 5 min puis à l'eau MilliQ,
- Placer les lames dans un bain de BSA Fuchsine pendant 5 min puis rincer à l'eau MilliQ,
- Placer les lames dans un bain d'acide phosphotungstique T (1 volume), acide phosphomolybdique M (1 volume) et eau MilliQ (2 volumes) pendant 5 min,
- Colorer les lames dans de l'aniline bleu pendant 5 min,
- Décolorer à l'acide acétique pendant 2 min, rincer à l'eau MilliQ,
- Déshydrater dans des bains successifs d'alcool :
 - 2 bains d'alcool à 70%,
 - 2 bains d'alcool à 95%,
 - 2 bains d'alcool à 100%.

Les lames sont ensuite montées avec une résine anhydre (résine Eukitt, O. Kinder GmbH). Le collagène est ainsi coloré en bleu clair, le cytoplasme apparaît rouge et les noyaux bleu foncé. Des images optiques des coupes déposées sur le support de silicium et sur lame de verre ont été enregistrées avec un microscope photonique Olympus BX51 (Olympus, Rungis, France) équipé d'une série d'objectifs allant de x1,25 à x50 et piloté par le logiciel Cell^B (Soft Imaging System GmbH, Münster, Allemagne)

1.3.3. Analyse TOF-SIMS

Avant analyse, les coupes ont été légèrement déshydratées sous un vide de quelqueshectopascals. Toutes les images ont été enregistrées en mode d'ionisation négatif avec 256x256 pixels en mode de balayage dit « stage scan », les agrégats d'ions Bi_3^+ ont été sélectionnés et le canon à électrons a été utilisé. Les images des coupes de glandes surrénales ont été acquises dans un champ de $3,52 \times 3,52 \text{ mm}^2$ avec une dose d'ion de $8,74 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$ (512 tirs par pixel). Celles des coupes d'ovaires ont été enregistrées avec une dose d'ion allant de $1,83 \times 10^{10}$ à $2,07 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$ (512 tirs par pixel) et celles des coupes de foie de $8,4 \times 10^8$ à $1,75 \times 10^9 \text{ ions.cm}^{-2}$ (256 tirs par pixel).

1.4. Résultats

1.4.1. Analyse TOF-SIMS du DBDE

Avant de commencer toute analyse sur les coupes de tissus, il est nécessaire d'analyser une solution étalon du composé recherché. Un spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une solution de référence de decabromodiphényle éther (DBDE) à 1 mg.mL^{-1} dans un mélange eau/méthanol 50:50 v:v est présenté dans la figure 3.

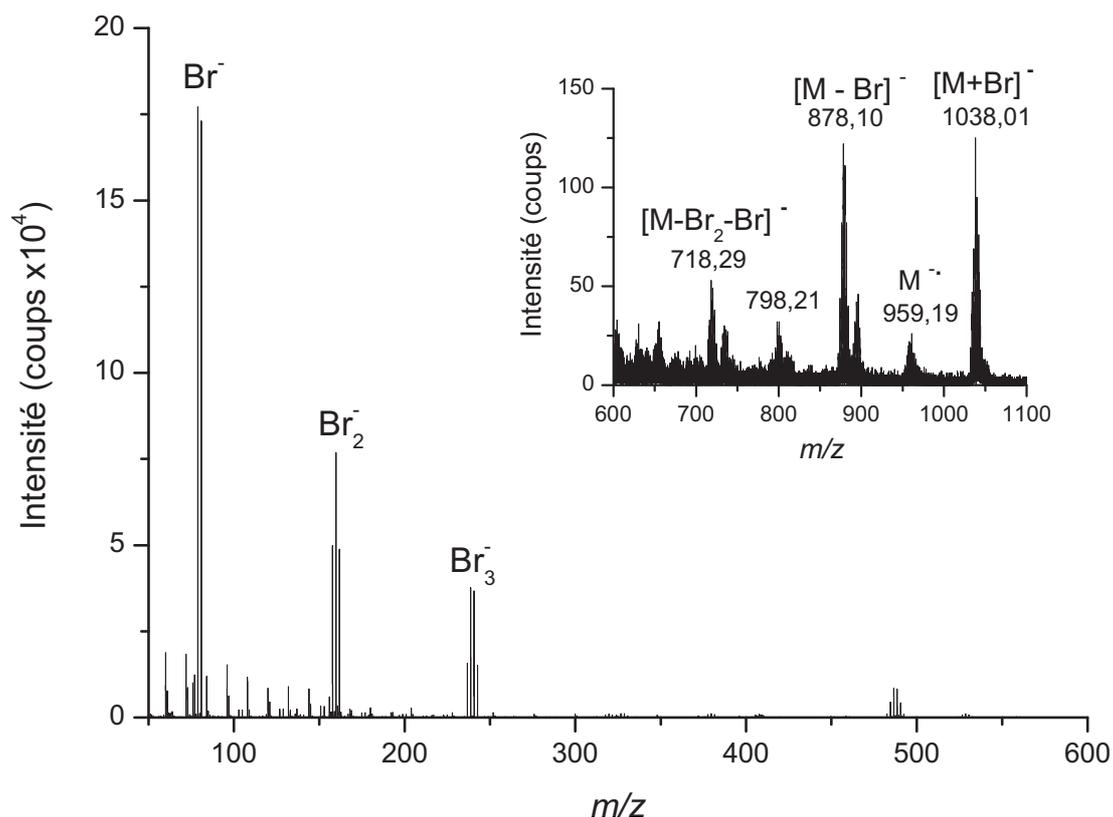


Figure 3 : Spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une solution étalon de decabromodiphényle éther à 1 mg.mL⁻¹ dans une solution eau/méthanol, 50:50 v:v.

Le pic correspondant à l'ion moléculaire M⁻ est observé à m/z 959,19 (pour l'isotopomère ⁷⁹Br₅ ⁸¹Br₅). Son intensité étant très faible, il sera, à première vue, difficile de le détecter à la surface des coupes de tissu. D'autres massifs isotopiques sont présents, centrés autour des rapports masse-sur-charge m/z 878,10; m/z 798,21 et m/z 718,29. Ils correspondent à l'élimination d'atomes de brome. Un massif correspondant à l'ion fragment C₆Br₅O⁻, généré par le clivage du pont éther de la molécule, est détecté autour des masses 482,52 (¹²C₆⁷⁹Br₅¹⁶O⁻) et 492,52 (¹²C₆⁸¹Br₅¹⁶O⁻). En revanche, les pics correspondants aux ions Br⁻ (m/z 78,91 et 80,91), Br₂⁻ (m/z 157,82; 159,81 et 161,82) et Br₃⁻ (m/z 236,71; 238,81; 240,72 et 242,71) sont de loin les plus intenses. Enfin, les ions correspondants aux deux isotopes naturels du brome (50,69% pour le ⁷⁹Br et 49,31% pour le ⁸¹Br) sont les seuls qui sont détectés à la surface des coupes d'organes d'animaux dosés, et ont donc été choisis pour imager le DBDE dans les organes de rat.

1.4.2. Validation et Optimisation de la méthode

En comparant les spectres obtenus sur les organes de rat « dosés » et sur les organes de rats témoins, nous avons pu constater que les deux isotopes $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$ du brome ne sont jamais détectés dans les témoins (Figure 4). Néanmoins, les deux isotopes sont détectés à la base de deux pics très intenses correspondants aux ions PO_3^- (masse mesurée en moyenne à m/z 79,961) et HSO_3^- (masse mesurée en moyenne à m/z 80,974) respectivement pour les ions $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$. Le signal du pic correspondant à l'ion phosphite est tellement intense qu'il sature le spectre, c'est-à-dire qu'au moins un ion est émis à ce rapport masse-sur-charge après chaque impulsion d'ions primaires. Ceci a pour conséquence d'élargir et de déformer le pic en raison du temps mort du discriminateur à fraction constante et du convertisseur temps-numérique.

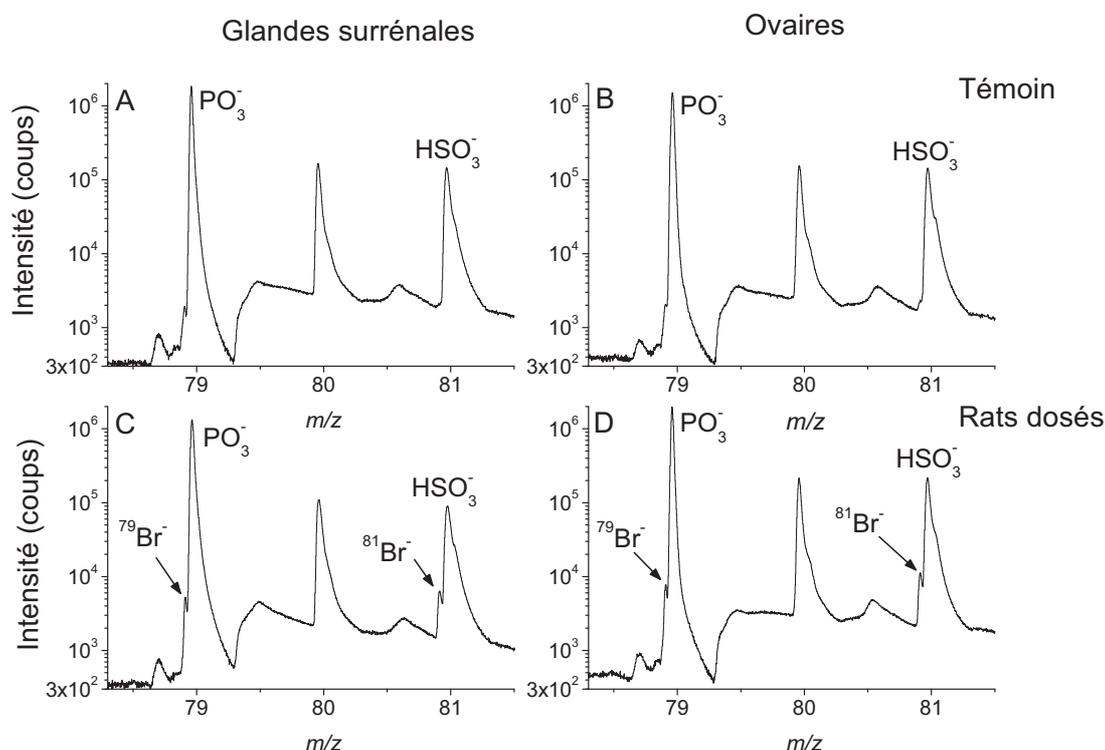


Figure 4 : Parties de spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de coupes de glandes surrénales de rat témoin (A) et dosés (C), et à la surface de coupes d'ovaires de rats témoins (B) et dosés (D). L'axe des ordonnées est présenté en échelle logarithmique.

Cette saturation est clairement visible dans la figure 4, où le bruit chimique moyen chute juste après le pic de l'ion PO_3^- . Le fait que les deux ions $^{79}\text{Br}^-$ et PO_3^- soient très proches en

masse et que ce dernier soit très intense entraîne une erreur sur la mesure de masse de l'ion $^{79}\text{Br}^-$. En effet, la déviation entre la masse théorique et la masse mesurée est de 13 ppm en moyenne (voir Tableau 1). Cette faible séparation peut aussi se répercuter dans les images, en effet, la distribution homogène de l'ion phosphite peut altérer la localisation spécifique de l'isotope 79 du brome.

	$^{79}\text{Br}^-$	dev (ppm)	$^{81}\text{Br}^-$	dev (ppm)
Masse théorique	78,918		80,916	
m/z expérimental (mesuré sur une coupe de glande surrénale)	78,908	11	80,911	5
m/z expérimental (mesuré sur une coupe d'ovaire)	78,904	14	80,909	7
m/z expérimental (valeur moyenne pour les deux organes)	78,906	13	80,909	7

Tableau 1 : Valeurs de m/z pour les ions $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$ mesurées par spectrométrie de masse TOF-SIMS sur des coupes de glandes surrénales et d'ovaires de rats dosés ainsi que leur déviation en ppm par rapport à la masse théorique.

Toutefois, la situation est différente pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$, la déviation observée entre la masse théorique (80,916 Da) et la masse mesurée (m/z 80,909 en moyenne) n'étant que de 7 ppm. Le pic correspondant à l'ion bisulfite ne sature pas le détecteur, de plus, la séparation entre les deux ions est bien meilleure, c'est pourquoi l'image correspondant à l'ion $^{81}\text{Br}^-$ ne devrait pas être influencée par celle de l'ion HSO_3^- .

Une méthode permettant d'améliorer la séparation pourrait être de diminuer l'énergie cinétique des ions secondaires dans la région libre-de-champs du tube de vol. Le contrôle total des hautes tensions qu'offre le logiciel pilotant le spectromètre de masse TOF-SIMS IV rend possible cette manipulation. Nous avons donc diminué l'énergie cinétique des ions secondaires de 2 keV à 1 keV, tout en maintenant la tension d'extraction à 2 kV et la tension de post-accélération, avant le détecteur, à 10 kV. Ceci a pour conséquence d'augmenter le temps-de-vol et la séparation des ions d'un facteur $2^{1/2}$ sans affecter l'efficacité de leur détection.

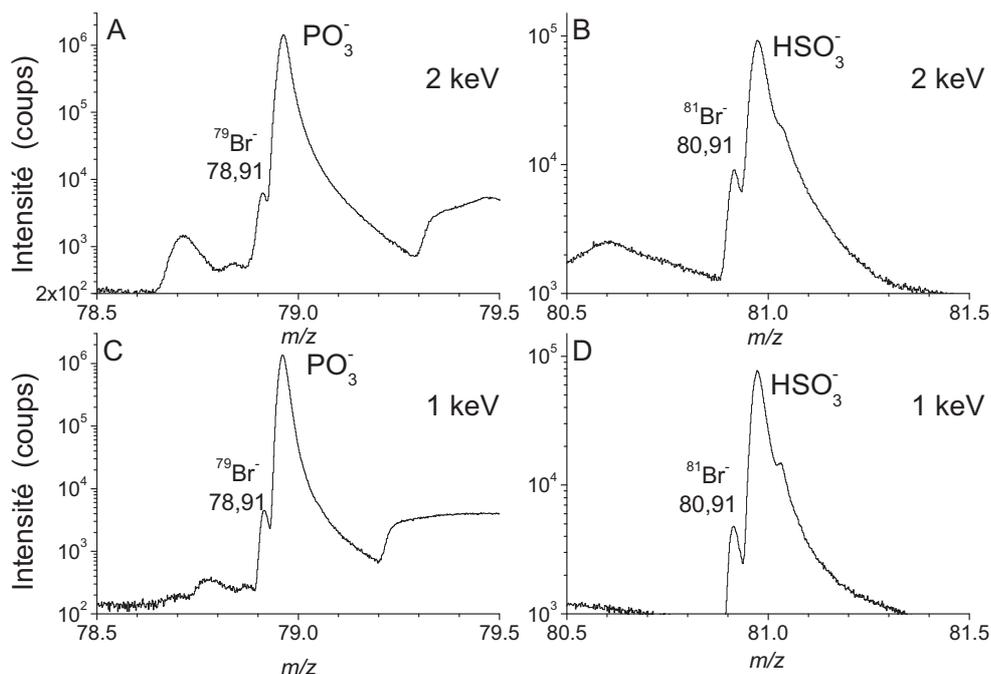


Figure 5 : Parties de spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de glandes surrénales de rats dosés pour des énergies cinétiques des ions secondaires de 2 keV (A et B) et 1 keV (C et D).

La figure 5 présente deux portions des spectres obtenus sur une coupe de glande surrénale de rat dosé pour les deux énergies cinétiques : 2 keV (en haut) et 1 keV (en bas). L'amélioration de la séparation entre les deux isotopes 79 et 81 du brome et les ions PO_3^- et HSO_3^- est clairement visible lorsque les ions secondaires sont portés à une énergie cinétique de 1 keV. Néanmoins, l'intensité du pic correspondant à l'ion $^{81}\text{Br}^-$ a diminué d'un facteur 2,7, cette manipulation menant à la chute de la transmission des ions dans l'analyseur par temps-de-vol. De plus, la séparation entre les ions $^{79}\text{Br}^-$ et PO_3^- n'est toujours pas suffisante pour s'affranchir de l'influence qu'a l'ion le plus abondant sur la répartition de l'ion minoritaire. Cette méthode n'a donc pas été retenue et nous avons choisi de sélectionner l'isotope $^{81}\text{Br}^-$ pour tracer le DBDE dans les organes de rats dosés.

1.4.3. Localisation du DBDE dans les organes de rats dosés

Suite à ces optimisations, nous avons pu procéder à l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS des coupes des trois organes cibles des souris dosés et témoins. La figure 6 expose les images obtenues à partir des coupes de foie. La colonne de gauche (Fig. 6A et 6B)

montre les images optiques des deux coupes de foie de souris dosées analysées. La colonne centrale (Fig. 6C et 6D) montre les images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$ enregistrées sur les coupes de foies de souris dosées et la colonne droite (Fig. 6E), l'image obtenue en sélectionnant exactement la même zone du spectre à partir de la coupe de foie de rat témoin. L'ion $^{81}\text{Br}^-$ est distribué uniformément à la surface des coupes de foies de rats dosés et ne présente pas de localisation particulière. L'image obtenue à partir de la coupe de foie témoin correspond en réalité à la contribution de l'ion HSO_3^- dans la zone de sélection du pic de l'ion $^{81}\text{Br}^-$, et correspond au signal du bruit de fond et à une partie du pic de l'ion HSO_3^- .

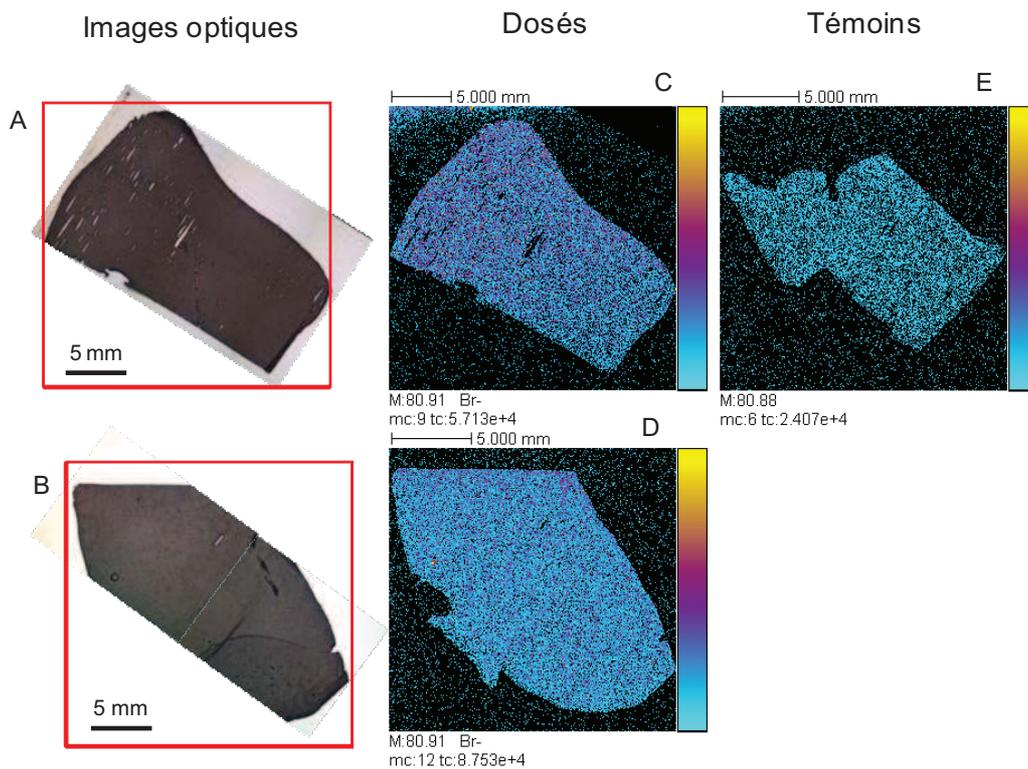


Figure 6 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes de foies de rats. **A** et **B** : images optiques. **C** et **D** : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. **E** : rats témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de $17,8 \times 17,8 \text{ mm}^2$ à $23,8 \times 23,8 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, 256 tirs/pixel, taille de pixel de $69,5 \times 69,5 \text{ }\mu\text{m}^2$ à $92,9 \times 92,9 \text{ }\mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $8,4 \times 10^8 \text{ ions.cm}^{-2}$ à $1,75 \times 10^9 \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

La figure 7 montre les résultats obtenus sur les coupes de glandes surrénales de rats dosés et témoins. De la même manière, la colonne de gauche (Fig. 7A, 7B et 7C) présente les images optiques, le carré rouge délimitant la zone analysée, la colonne centrale (Fig. 7D, 7E et 7F), les images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$ obtenues à la surface des glandes surrénales de rats dosés et la colonne de droite (Fig. 7G, 7H et 7I), les images obtenues en sélectionnant la même zone sur les coupes de glandes surrénales de rats témoins.

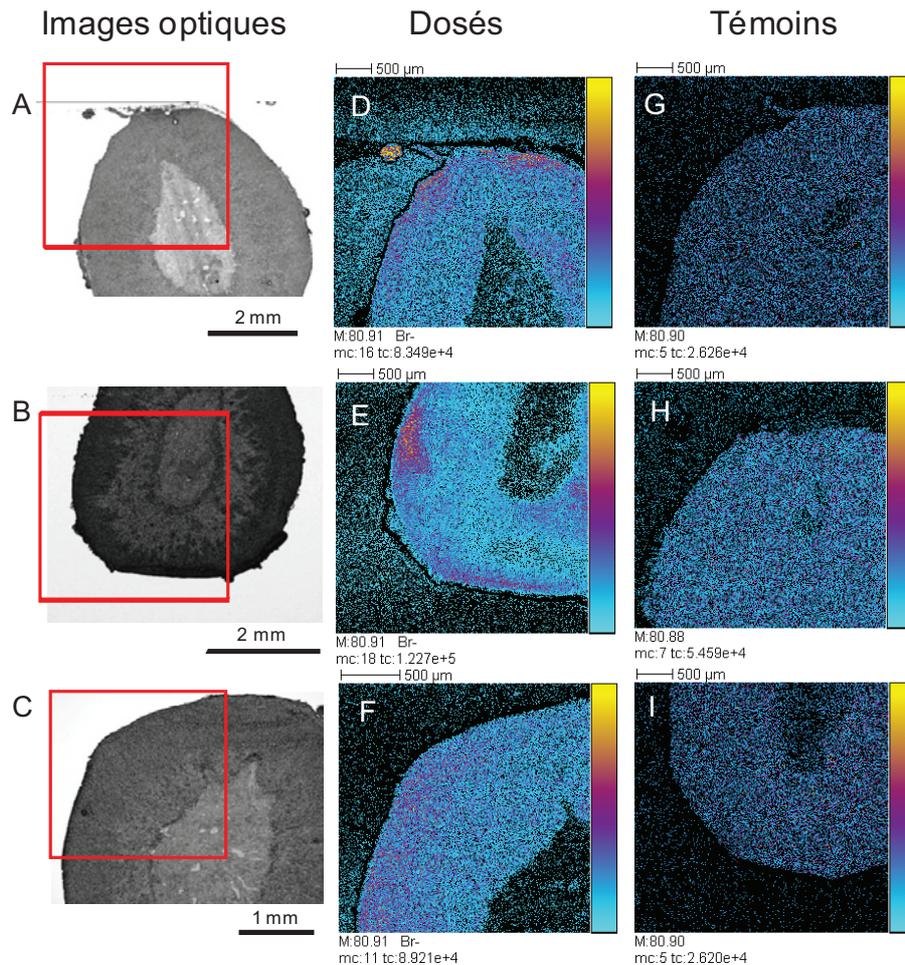


Figure 7 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes de glandes surrénales de rats. **A**, **B** et **C** : images optiques. **D**, **E** et **F** : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. **G**, **H** et **I** : rats témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de $3,52 \times 3,52 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, 512 tirs/pixel, taille de pixel de $13,7 \times 13,7 \text{ μm}^2$, dose d'ions primaires de $8,74 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Sur cet organe, les images de l'isotope 81 du brome sont plus contrastées. En effet, l'ion s'accumule dans une zone bien spécifique des glandes surrénales correspondant à la région corticale (périphérie de la glande), tandis qu'aucun signal n'est enregistré dans la région médullaire (région centrale) pour les rats dosés. Ici aussi, les images obtenues en sélectionnant la même zone sur les coupes de glandes surrénales de rats témoins correspondent au signal de l'ion HSO_3^- . De plus, il est important de noter que lorsque l'ion bromure est détecté, l'amplitude *mc* de l'échelle de couleur de chaque image est plus grande que quand il ne l'est pas. Ce paramètre varie de 11 à 18 pour les rats dosés et de 5 à 7 pour les rats témoins.

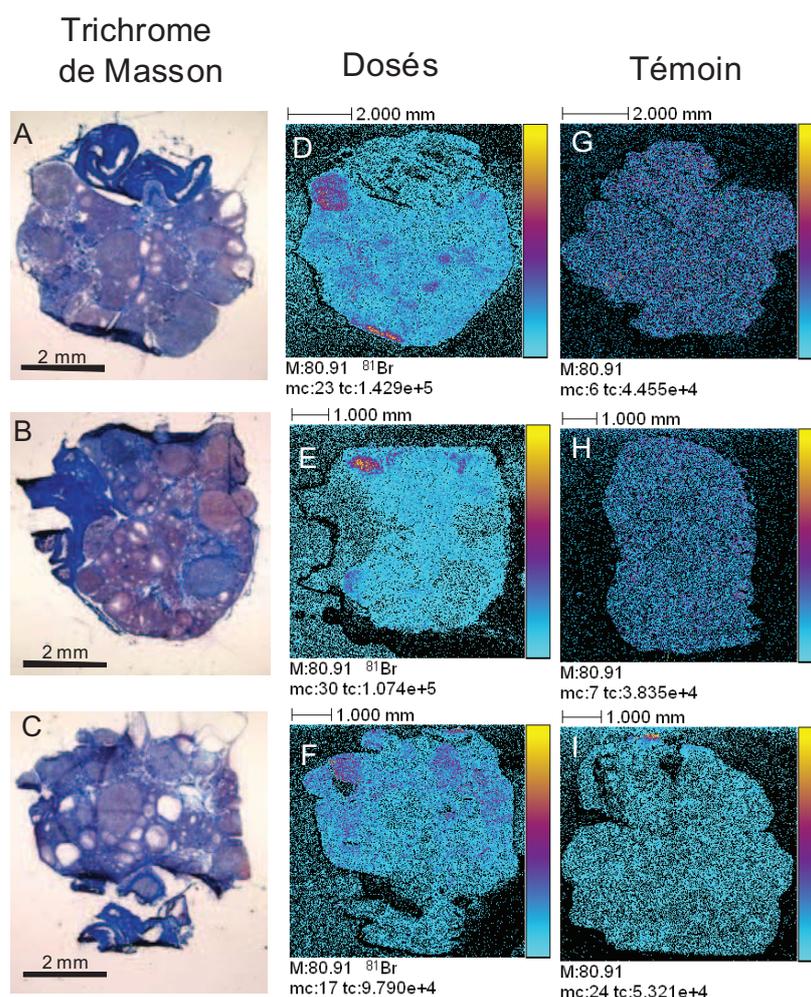


Figure 8 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes d'ovaires de rats. **A**, **B** et **C** : images optiques des coupes colorées au Trichrome de Masson. **D**, **E** et **F** : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. **G**, **H** et **I** : rats témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de 6x6 à 7.4x7.4 mm², 256x256 pixels, 512 tirs/pixel, taille de pixel de 23.4x23.4 μm² à 28.9x28.9 μm², dose d'ions primaires de 1.8x10¹⁰ to 4x10¹⁰ ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups

mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

La figure 8 montre les résultats obtenus sur les ovaires. L'ion $^{81}\text{Br}^-$ s'accumule dans des régions spécifiques. En comparant les images ioniques obtenues à partir des coupes d'ovaires de rats dosés et les coupes adjacentes ayant subies une coloration au Trichrome de Masson, nous avons pu déduire que la localisation de l'isotope du brome correspond à certains corps jaunes ou *corpora lutea* observés dans le stroma ovarien.

Dans ces expériences, la résolution spatiale maximale disponible en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS est loin d'être atteinte. De plus, la dose d'ions primaires de quelques 10^{10} ions par centimètre carré utilisée pour enregistrer les images ioniques est de plusieurs ordres de grandeur inférieure à la limite du SIMS statique. Une seconde image a donc été acquise dans la zone où l'ion $^{81}\text{Br}^-$ s'accumulait sur la coupe présentée dans la figure 8D. L'image obtenue est présentée dans la figure 9.

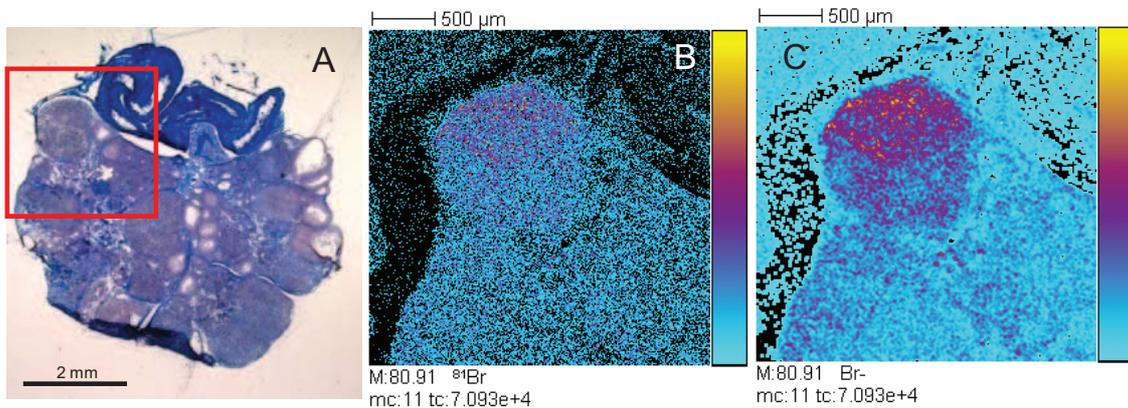


Figure 9 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes d'ovaires de rats. **A** : image optique de la coupe colorée au Trichrome de Masson. **B** : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. **C** : même image que B mais après avoir additionné, pour tous les pixels, le nombre de coups des 4 pixels adjacents. Taille de $2,7 \times 2,7 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, taille de pixel de $10,5 \times 10,5 \text{ }\mu\text{m}^2$ (B) et 128×128 pixels, taille de pixel de $21 \times 21 \text{ }\mu\text{m}^2$ (C), 512 tirs/pixel, dose d'ions primaires de $1,4 \times 10^{11} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

La figure 9A correspond à l'image optique de la coupe adjacente à la coupe d'ovaire de rat dosé et après avoir été colorée au Trichrome de Masson, le carré rouge délimitant la zone analysée. La figure 9B correspond à l'image de l'ion $^{81}\text{Br}^-$ et la figure 9C présente la même image après avoir subi une réduction du nombre de pixel de 256x256 à 128x128, l'intensité de chaque pixel correspond maintenant à la somme des intensités de quatre pixels adjacents. Cette méthode permet d'augmenter le contraste de l'image mais diminue la résolution spatiale par deux. Ce « zoom » nous permet de confirmer la localisation de l'ion bromure dans le *corpus luteum*.

1.5. Discussion et conclusion

Étant donnée l'impossibilité technique de localiser le DBDE directement en sélectionnant l'ion moléculaire correspondant, nous n'avons pas pu faire la différence entre le DBDE intact et ses métabolites. Néanmoins, il a précédemment été démontré que la majeure partie de la radioactivité extraite du foie, des glandes surrénales et des ovaires de rats ayant été oralement dosés avec du DBDE correspondait au DBDE intact, alors que les métabolites ne correspondaient qu'à environ 10% de la radioactivité totale.²¹

L'isotope 81 du brome a été retrouvé uniformément réparti à la surface des coupes de foie, nous ne pouvons donc pas conclure sur une localisation dans une région spécifique comme la zone périportale ou la zone centrolobulaire.

Les PBDE ont une structure très proche de celle des PCB, pour lesquels la toxicité a déjà été largement documentée, et qui sont notamment suspectés d'être des perturbateurs endocriniens.^{22,23} En effet, il a été démontré que les PCB et quelques uns de leurs métabolites hydroxylés ciblent les glandes surrénales entraînant une hyperplasie de la région corticale.²⁴ L'immunotoxicité des PCB a été démontrée dans une autre étude, celle-ci avec des rats, ce qui est cohérent puisque les corticostéroïdes sont connus pour réguler le système immunitaire.²⁵ Dans le cas des PCB, l'hyperplasie de la région corticale de la glande surrénale est suspectée d'être corrélée avec l'augmentation de la production de cortisol, qui à son tour déclenche une diminution de l'activité du système immunitaire. En effet, cette hormone corticostéroïdienne agit au niveau sanguin en favorisant le retour des lymphocytes et des polynucléaires éosinophiles dans les organes immunitaires (rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques) et en augmentant le nombre de polynucléaires neutrophiles. Au niveau cellulaire, elle agit au

niveau des lymphocytes T et B en favorisant leur apoptose et en diminuant leurs activités exocrines (sécrétion de cytokines et d'interleukines). Compte tenu de la similarité structurale qu'ont les PCB et les PBDE, il est très intéressant d'observer que ces derniers s'accumulent dans la région corticale de la glande surrénale. Néanmoins, le fait que ces composés s'y accumulent spécifiquement, alors qu'au contraire ils sont complètement absents de la zone médullaire, reste à expliquer.

Dans les coupes d'ovaires de souris dosés, le DBDE ou/et ses métabolites ciblent certains *corpora lutea*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que tous les corps jaunes ne sont pas au même stade de développement. Chez les espèces comme le rat, qui ont un cycle ovarien de quatre jours, les cellules lutéales synthétisent activement des stéroïdes, de plus, de minuscules gouttelettes lipidiques cytoplasmiques, riches en progestérone, sont présentes dans ces corps jaunes seulement le jour du diestrus.²⁶ Les coupes réalisées dans le cadre de l'imagerie TOF-SIMS permettent une analyse histologique satisfaisante, toutefois, elles ne permettent pas de caractériser avec précision le stade de développement des corps jaunes. Néanmoins, les PBDE, comme d'autres composés organo-halogénés, sont relativement liposolubles. D'ailleurs, il a été démontré que d'autres xénobiotiques, comme les PCB, avaient une activité négative sur la production de progestérone.²⁷ Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le DBDE, ou un de ses métabolites, présents au niveau des corps jaunes peuvent perturber l'activité naturelle de stéroïdogénèse des ovaires.

Finalement, l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS nous a permis dans cette étude de localiser avec précision et pour la première fois un composé xénobiotique d'intérêt toxicologique au niveau de ses tissus cibles.

2. Localisation d'un composé anti-acné Introduction

2.1.1. Présentation

L'acné (ou *Acne Vulgaris*) est une maladie de la peau très commune. Elle est caractérisée par des zones de la peau présentant de multiples dermatoses non-inflammatoires, ou comédons et dans ses formes les plus sévères, par des dermatoses inflammatoires, des pustules et des nodules. L'acné affecte principalement des domaines de la peau ayant une population dense en follicules sébacés, ces domaines comprenant le visage, la partie supérieure de la poitrine et le dos.

La pathogénie de l'acné est multivectorielle, mais le facteur clé est génétique. Si les deux parents avaient de l'acné, trois enfants sur quatre en auront, alors que si un seul parent avait de l'acné, seulement un enfant sur quatre sera touché. Cependant, comme pour d'autres maladies à contribution génétique, toutes les familles n'auront pas ce même schéma, l'acné peut sauter une génération. Le facteur héréditaire est la propension à une hyperprolifération épidermique folliculaire, mais d'autres facteurs peuvent aggraver la situation comme l'excès de sébum, la présence et l'activité de *Propionibacterium acnes* et l'inflammation.

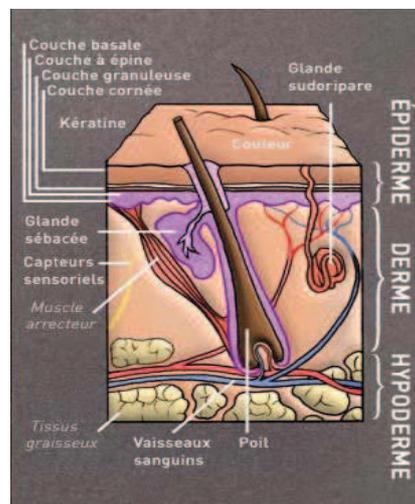


Figure 10 : représentation schématique d'une glande sébacée.

L'acné se développe en raison d'un blocage survenant au niveau des follicules. L'hyperkératinisation et la formation d'un bouchon de kératine et de sébum (un microcomédon) est le premier changement. Viennent ensuite l'élargissement des glandes sébacées (Figure 10) et l'augmentation de la production de sébum engendrés par

l'augmentation de la production d'androgènes, en particulier la DHEAS (Sulfate de Déhydroépiandrostérone). Les microcomédons, en s'agrandissant, peuvent former soit un comédon ouvert (point noir) soit un comédon fermé (milia). Dans ces conditions, la bactérie commensale *Propionibacterium acnes* peut provoquer une inflammation, conduisant à des lésions inflammatoires (papules, pustules infectées ou nodules) dans le derme à travers les microcomédons ou les comédons. Ceci se traduit par des rougeurs et peut entraîner des cicatrices ou des taches pigmentaires.

L'activité hormonale, comme les cycles menstruels et la puberté, peuvent contribuer à la formation de l'acné. Pendant la puberté, l'augmentation de la production des hormones mâles androgènes cause un élargissement des glandes folliculaires et une augmentation de la sécrétion de sébum. L'utilisation de stéroïdes anabolisants peut avoir un effet similaire. Plusieurs hormones ont été liées à l'acné : la testostérone, la dihydrotestostérone (DHT) et le sulfate de déhydroépiandrostérone, ainsi que le facteur de croissance analogue à l'insuline 1 (IGF-I).

2.1.2. Les traitements

Les modes de fonctionnement ne sont pas nécessairement bien compris, néanmoins, les traitements sont supposés agir de quatre façons différentes : diminuer la sécrétion de sébum des pores pour empêcher leur blocage, tuer *Propionibacterium acnes*, avoir des effets anti-inflammatoires et avoir des effets hormonaux. De nombreux traitements existent contre l'acné :

– Le peroxyde de benzoyle :

Le peroxyde de benzoyle est un traitement qui convient pour l'acné légère à sévère en raison de son efficacité et de ses effets secondaires légers (principalement une dermatite irritante). Il est presque aussi efficace que les antibiotiques et ne semble pas générer de résistances bactériennes. Les produits contenant de l'acide azélaïque sont également utilisés dans le traitement de *P. acnes*.

– Les antibiotiques :

Les antibiotiques sont réservés aux cas les plus sévères. Néanmoins, en raison de l'augmentation de la résistance de *P. acnes* dans le monde entier, ils sont de moins en moins

efficaces. Les antibiotiques les plus souvent utilisés, soit par voie topique (appliqué sur la peau), soit par voie orale, sont l'érythromycine, la clindamycine et la tétracycline.

– Injection de stéroïdes :

Si un bouton d'acné est trop gros, ou ne semble pas être affecté par d'autres traitements, un dermatologue peut administrer une injection de cortisone, ce qui généralement réduira la rougeur et l'inflammation presque immédiatement. Ce traitement a pour effet de résorber le bouton. Les effets secondaires sont une hypopigmentation (allègement de la couleur de la peau), atrophie de la graisse sous-cutanée, infection bactérienne (soit par des bactéries introduites lors de l'injection, soit par des bactéries commensales des pores) et la récurrence de l'acné. D'autres méthodes de traitement doivent donc être utilisées en complément.

– Les rétinoïdes par voie orale :

Un apport quotidien d'isotrétinoïne, un dérivé de la vitamine A (commercialisé sous le nom de Roaccutane, Accutane, Amnesteem, Sotret, ...), sur une période de 4 à 6 mois peut diminuer ou résoudre totalement le problème à long terme dans 80% des cas. L'isotrétinoïne agirait principalement en réduisant la sécrétion de sébum par les glandes sébacées. De plus, il a été montré que ce composé est très efficace dans le traitement de l'acné sévère. Néanmoins, il nécessite une surveillance médicale étroite puisqu'il présente de nombreux effets secondaires. En effet, il peut entraîner un assèchement de la peau, des saignements de nez, mais aussi endommager le foie des patients.

– Les anti-inflammatoires :

Il a été démontré dans une étude menée en 1995 que la vitamine B3 (nicotinamide) sous forme de gel appliqué directement sur la peau avait des effets comparables à l'application de l'antibiotique clindamycine.²⁸ Ce composé agirait en augmentant, entre autres, la synthèse du collagène et de la kératine, mais sa principale activité est sa nature anti-inflammatoire. D'autres agents anti-inflammatoires sont utilisés, comme le rofécoxib,²⁹ qui soigne les acnés prémenstruelles ou encore le naproxène, qui est utilisé pour certaines acnés modérées.³⁰

2.2. Objectifs de l'étude

Cette étude a été menée en collaboration avec Brendan Prideaux, Dieter Staab, Andreas Bilich et Markus Stoeckli du Novartis Institute for Biomedical Research (Novartis, Basel, Suisse).

Dans cette étude, nous avons deux objectifs. Le premier était de localiser l'agent anti-inflammatoire d'une crème anti-acné développée par Novartis (composé soumis à confidentialité) dans des coupes de peau de cadavre humain. L'objectif étant de savoir si cette molécule est capable de s'accumuler au niveau des glandes sébacées, sa cible. Le second objectif était d'évaluer quatre « systèmes de livraison » de ce composé. Pour cela, plusieurs techniques d'imagerie par spectrométrie de masse ont été employées. L'équipe de Novartis a utilisé l'imagerie MALDI-TOF en mode MS et MS/MS afin de localiser le composé dans des coupes de peau entière. Et nous avons utilisé l'imagerie TOF-SIMS afin de localiser le composé dans des coupes de peau entière mais aussi au niveau des glandes sébacées.

2.3. Protocole opératoire

2.3.1. Préparation des échantillons

De la peau de cadavre humain a été prélevée au niveau du scalp, le tissu adipeux a été retiré. La peau a ensuite été traitée avec le composé à 1% dans une solution de glycol/alcool oléique 9:1 (v:v) pendant 48 heures. Des coupes de 14 μm d'épaisseur à -20°C ont été préparées avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre) et déposées soit sur une plaque en acier inoxydable recouverte d'or pour l'imagerie MALDI, soit sur une plaque de silicium pour l'imagerie SIMS. Des coupes adjacentes ont été préparées et déposées sur une lame de verre pour des images optiques.

2.3.2. Analyses MALDI

Les coupes ont été recouvertes d'une fine couche d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (20 mg/mL dans acétonitrile/eau/TFA 50:50:0,1) en utilisant un nébuliseur pneumatique. Les images en mode MS ont été acquises avec un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF 4700 (Applied Biosystems, Les Ulis, France) permettant une résolution spatiale de 50 μm . Les images en mode MS-MS ont été acquises avec un spectromètre de masse hybride

quadripôle/temps de vol QStar Elite (Applied Biosystems, Les Ulis, France) équipé d'une source oMALDI. Dans ce dernier mode, les images ont été suréchantillonnées pour atteindre une résolution spatiale de 100 μm , la taille du spot laser mesurant 200x150 μm^2 .

2.3.3. Analyses TOF-SIMS

Avant analyse, les coupes ont été légèrement déshydratées sous un vide de quelques hectopascals. Toutes les images ont été enregistrées en mode d'ionisation positif avec 256x256 pixels, en sélectionnant les agrégats Bi_3^+ comme ions primaires et en activant le canon à électrons. Deux types d'images ont été enregistrés. Des images acquises en mode de balayage dit « stage scan » avec un champ de 3x3 mm^2 et une dose d'ions primaires de $6,3 \times 10^{10}$ ions. cm^{-2} (256 tirs/pixel), soit une taille de pixel de 11,7x11,7 μm^2 et des images des glandes sébacées, avec un champ de 500x500 μm^2 et une dose d'ions primaires de 1×10^{12} ions. cm^{-2} , soit une taille de pixel de 2x2 μm^2 .

2.4. Résultats

2.4.1. Analyse TOF-SIMS du composé pur

Nous avons débuté l'étude par l'analyse par spectrométrie de masse TOF-SIMS du composé pur dans une solution de méthanol/dichlorométhane 99,9:0,1 (v:v). Les spectres enregistrés en mode d'ionisation positif et négatif sont présentés dans la figure 11. En mode d'ionisation positif, le composé est détecté sous sa forme protonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ au rapport masse-charge 466,26, de plus, deux fragments intenses sont détectés à m/z 163,03 et 191,09. En mode d'ionisation négatif, la forme déprotonée $[\text{M}-\text{H}]^-$ est détectée à m/z 464,20, mais l'ion le plus intense du spectre est le fragment à m/z 163,03.

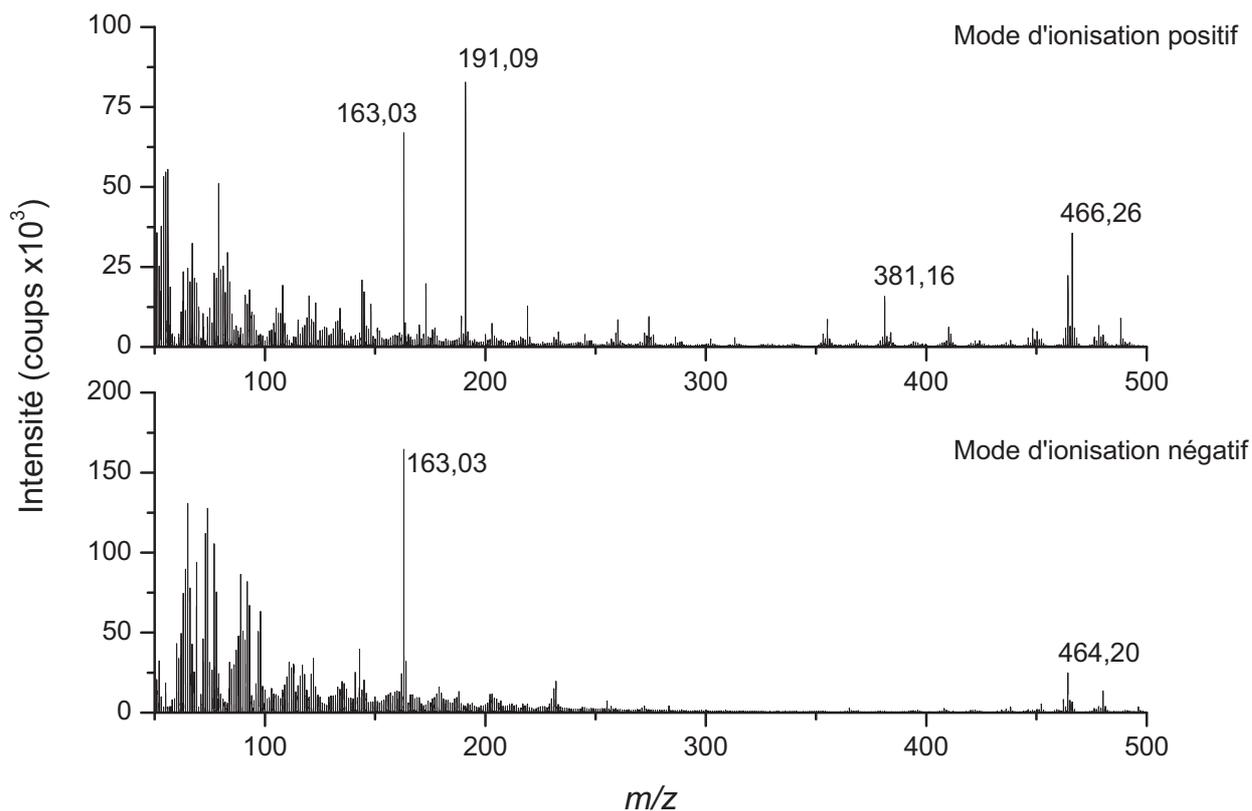


Figure 11 : Spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation positif (en haut) et négatif (en bas) du composé à 1 mg.mL^{-1} dans une solution méthanol/dichlorométhane 99,9:0,1 (v:v).

Le pic de l'ion moléculaire étant légèrement plus intense en mode d'ionisation positif, nous avons décidé de nous concentrer sur ce mode.

2.4.2. Imagerie MALDI-MS et MS/MS

Les images enregistrées sur les coupes de peau de cadavre humain traitées avec le composé acquises en mode d'ionisation positif en mode MS, en sélectionnant la forme déprotonée $[\text{M}+\text{H}]^+$ à m/z 466,2 du composé, et en mode MS/MS, en sélectionnant un fragment du composé à m/z 399,1 sont présentées dans la figure 12. Ces images MALDI en mode MS et MS/MS montrent clairement que le composé a pénétré la couche cornéenne de la peau (*stratum corneum*) et atteint l'hypoderme (cf. Figure 10). Néanmoins, nous ne pouvons pas affirmer qu'il cible les glandes sébacées, les résolutions spatiales de $50 \mu\text{m}$ en mode MS et de $100 \mu\text{m}$ en mode MS/MS étant limitantes.

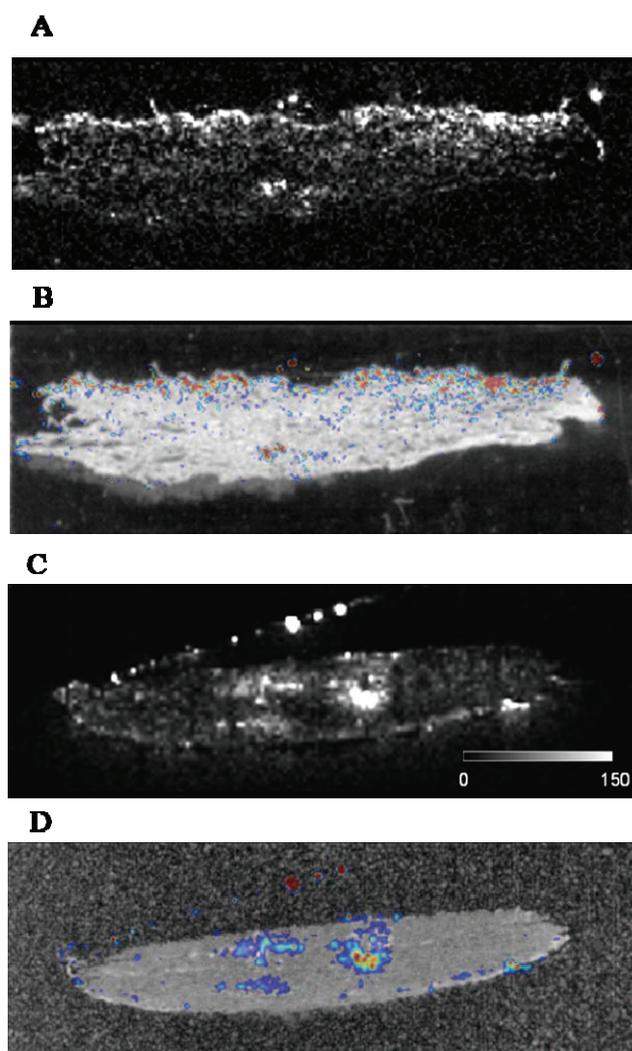


Figure 12 : Images MALDI en mode MS (**A** et **B**) et MS/MS (**C** et **D**) enregistrées en mode d'ionisation positif sur des coupes de peau de cadavre humain traitée avec l'agent anti-acné. **A** : Image du pic à m/z 466,2 correspondant au composé deprotoné. **B** : Superposition de l'image ionique du composé et de l'image optique de la coupe de peau analysée. **C** : Image d'un fragment à m/z 399,1 obtenu en mode MS/MS (ion précurseur : m/z 466,2). **D** : Superposition de l'image ionique du fragment du composé à m/z 399,1 et de l'image optique de la coupe de peau analysée.

2.4.3. Imagerie TOF-SIMS

Les images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation positive des coupes de peau de cadavre humain traitées et non traitées (témoin) avec le composé sont présentées dans la figure 13.

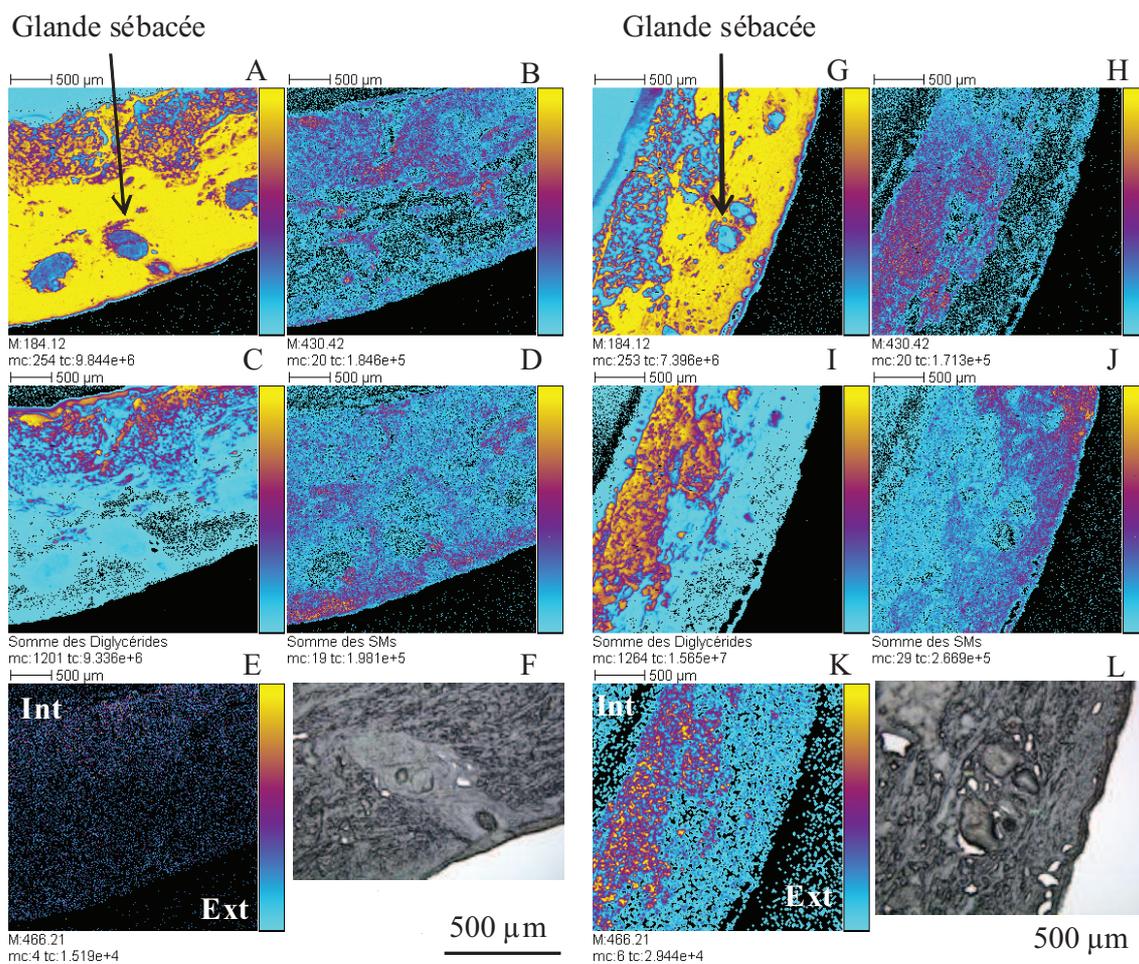


Figure 13 : Images TOF-SIMS de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ à 256×256 pixels en mode d'ionisation positif enregistrées sur des coupes de peau de cadavre humaine traitée (A à F) et témoin (13G à 13L). A et G : image de l'ion à m/z 184,12 correspondant à la tête polaire de la phosphocholine. B et H : image de l'ion correspondant à la vitamine E à m/z 430,42. C et I : somme des images des pics correspondants aux diglycérides. D et J : somme des images correspondant aux sphingomyélines (m/z 666,78; 703,69 et 725,70). E et K : image de l'ion à m/z 466,2 correspondant au composé. F et L : images optiques, la barre d'échelle correspond à $500 \mu\text{m}$. Dose d'ions primaires : $6,3 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$, taille de pixel : $11,7 \times 11,7 \mu\text{m}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Les images enregistrées sur la coupe de peau témoin (Fig. 13A à 13F) montrent que le composé n'est pas détecté. Tandis que celle enregistrée sur la coupe de peau traitée (Fig. 13G à 13L) laisse clairement apparaître que le composé est présent et s'accumule dans la partie

intérieure de la peau mais pas au niveau des glandes sébacées. De plus, il apparaît parfaitement colocalisé avec les diglycérides et la vitamine E (Fig. 13H, m/z 430,42) et anti-localisé avec la tête polaire des phosphocholines (Fig. 13G, m/z 184,12) et les sphingomyélines (Fig. 13J, m/z 666,78; 703,69 et 725,70). Une autre façon de savoir avec quelle espèce moléculaire le composé anti-inflammatoire est colocalisé est d'extraire le spectre de la région où il s'accumule et de le comparer avec le spectre de la région où il est absent. Après avoir extrait ces deux spectres, nous avons soustrait le spectre riche en composé à celui pauvre en composé. Les régions sélectionnées n'étant pas de la même taille, il a fallu normaliser les spectres. La région pauvre étant constituée d'un nombre de pixel 1,882 fois plus grand que la région riche, nous avons appliquée la formule suivante : $I(\text{région pauvre}) - (1/1,882 \times I(\text{région riche}))$. Le spectre obtenu est présenté dans la figure 14. Ainsi, les pics plus intenses dans la région riche en composé seront dans la partie haute du spectre tandis que les pics plus intenses dans la région pauvre seront dans la partie basse du spectre.

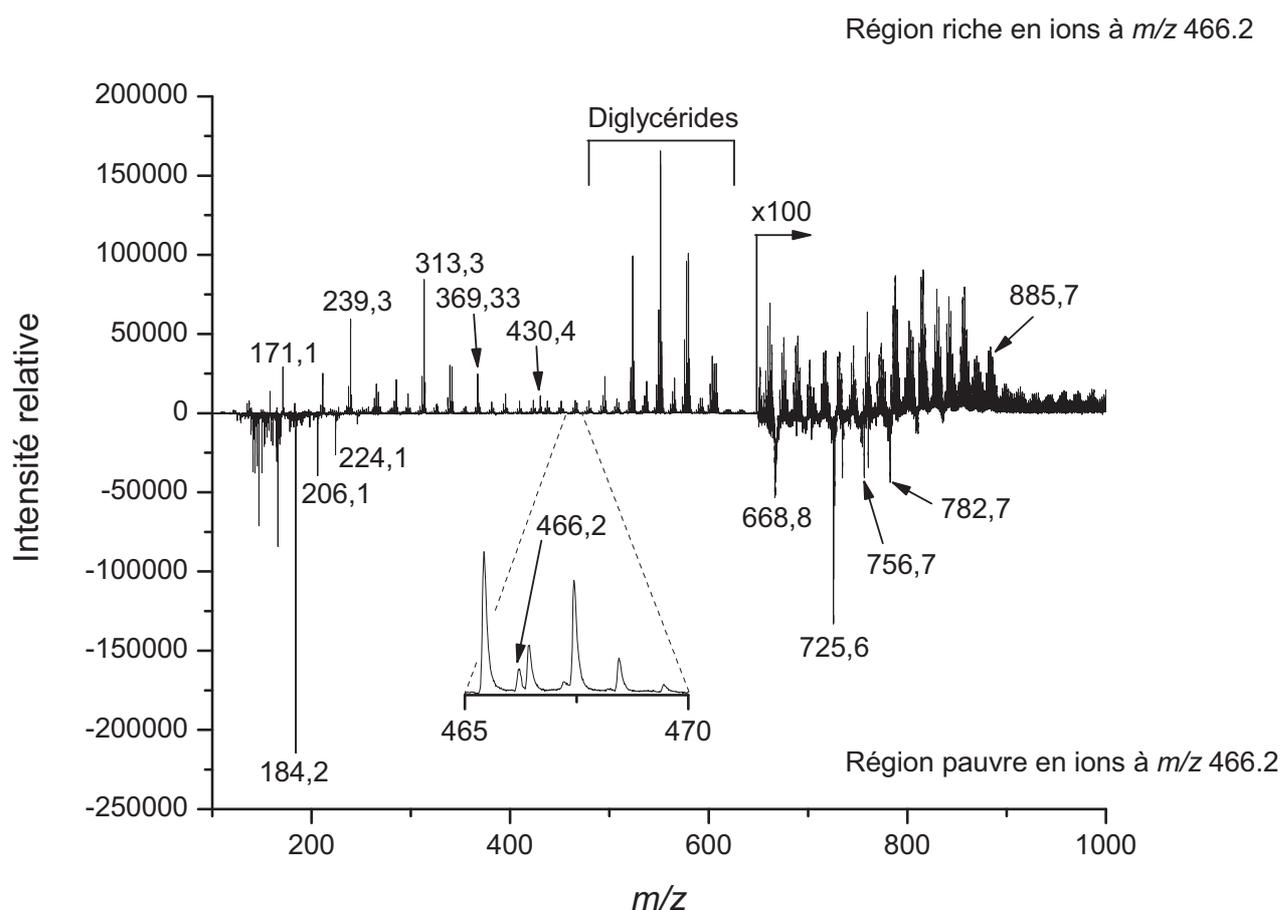


Figure 14 : Spectre obtenu en soustrayant le spectre extrait de la région riche en composé par le spectre de la région pauvre en composé. La région pauvre contenant 1,882 fois plus de pixel que la région riche, celui-ci a été divisé par ce même facteur.

Le spectre de la région riche est principalement composé de triacylglycérols (m/z 885,7; [TG52:0+Na]⁺), de diglycérides et de quelques uns de leurs fragments (m/z 171,1; 239,3 et 313,3). Le cholestérol (m/z 369,3; [M+H-H₂O]⁺) et la vitamine E (m/z 430,4; M⁺) sont aussi plus intenses dans cette zone. Le spectre de la région pauvre en agent anti-inflammatoire est, quant à lui, composé principalement de sphingomyélines (m/z 725,6; [SM34:1+Na]⁺) et de ses fragments (m/z 206,1 et 668,8) ainsi que de phosphatidylcholine aux rapports masse-surcharge 184,2 (fragment), 206,1 (fragment), 756,7 ([PC32:0+Na]⁺) et 782,7 ([PC34:1+Na]⁺).

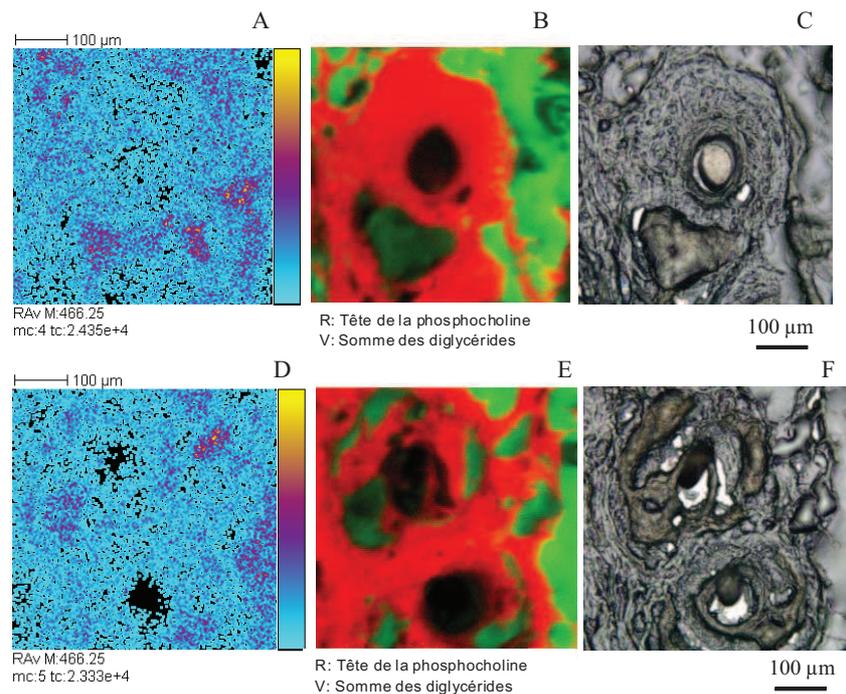


Figure 15 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif de glandes sébacées enregistrées sur deux coupes de peau de cadavre humaine traitée avec le composé anti-inflammatoire. **A** et **D** : image de l'ion à m/z 466,2 correspondant au composé. **B** et **E** : superposition en deux couleurs, en rouge, la tête de la phosphocholine à m/z 184,2 et en vert la somme des ions correspondants aux diglycérides. **C** et **F** : images optiques des coupes analysées, la barre d'échelle correspond à 100 μm . Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : 2 μm , dose d'ions primaires : 1×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Il a ensuite été possible d'acquérir des images plus précises en ciblant les glandes sébacées. Les images enregistrées sur les coupes de deux glandes sébacées différentes sont

présentées dans la figure 15. Il est clair que le composé ne s'accumule pas spécifiquement dans ces glandes (Fig.15 A et 15D), il est uniquement présent dans les régions riches en diglycérides (Fig.15 B et 15E) et absent des zones riches en phosphocholines. Il faut toutefois remarquer que le signal du composé est peu intense, et que les images correspondantes sont peu contrastées.

2.4.4. Évaluation des formulations du composé anti-acné

Une étape importante de la création d'un médicament à application locale, est de trouver la formulation délivrant le plus d'agents actifs dans les tissus cibles. Dans notre cas, quatre formules ont été testées :

- composé à 0,50% dans un gel émulsionné (*clinical service form* « CSF »)
- composé à 0,62% dans une solution de propylène glycol / alcool oléique (PG/OL)
- composé à 0,28% dans une solution de propylène glycol (PG)
- Nanoparticules (composé broyé à 200nm) suspendues à 0,90% dans une crème

La concentration du composé dans la peau a déjà été évaluée par nos collaborateurs (Tableau 2). C'est le système « PG/OL » qui permet d'avoir la plus forte concentration dans la peau du composé avec $128 \mu\text{g.g}^{-1}$, vient ensuite le « CSF » avec $89 \mu\text{g.g}^{-1}$, « PG » avec $18 \mu\text{g.g}^{-1}$ et enfin le système « nanoparticules » avec seulement $5 \mu\text{g}$ de composé par gramme de peau. Nous avons voulu comparer ces résultats avec ceux pouvant être obtenus par imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS.

	Conc. dans la peau $\mu\text{g/g}$	Conc. dans les fluides ng/mL
PG/OL	128 +/- 42	5820
CSF	89 +/- 24	1470
PG	18 +/- 5	1266
Nanoparticules	5 +/- 3	207

Tableau 2 : Concentration du composé anti-inflammatoire dans la peau et dans les fluides, déterminée pour quatre formulations différentes.

Des images TOF-SIMS de coupes de peau de cadavre humain traitée avec le composé dans ces quatre conditions ont été enregistrées en mode d'ionisation positif. Les spectres obtenus sont présentés dans la figure 16.

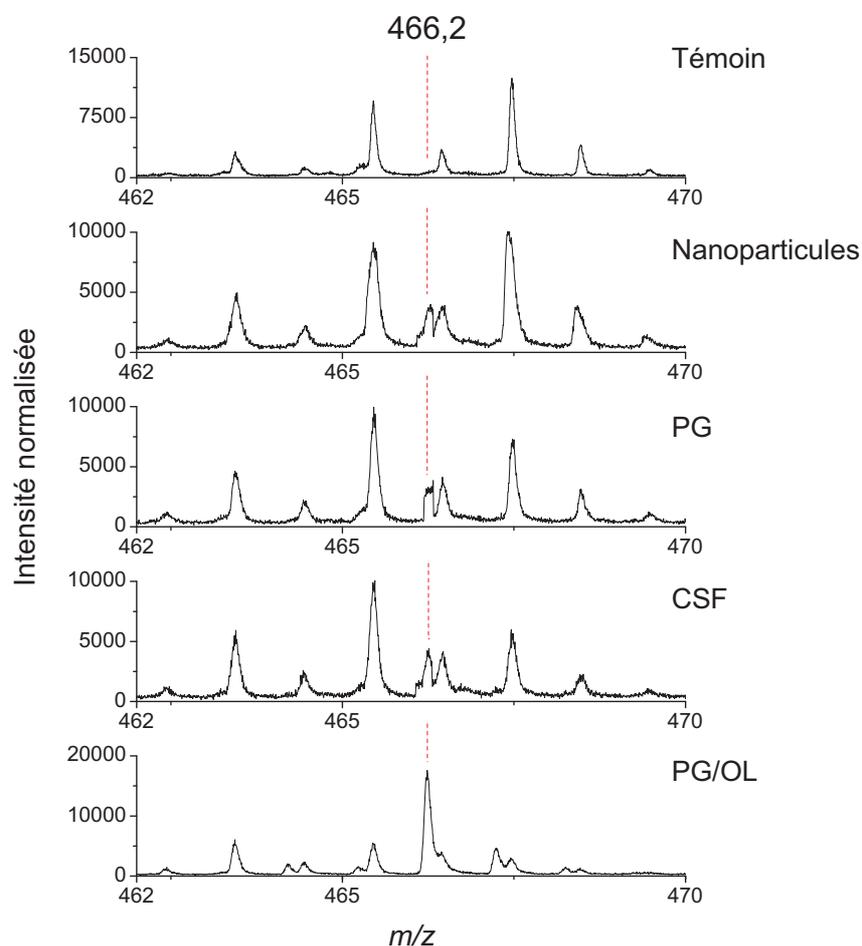


Figure 16 : Spectres TOF-SIMS, en mode d'ionisation positif, enregistrés à la surface de coupes de peau de cadavre humain traitée avec le composé anti-inflammatoire dans quatre systèmes de livraison.

Le composé n'est toujours pas détecté dans les coupes de peau témoin. L'intensité de l'ion à m/z 466,2, correspondant au composé, pour les formulations « nanoparticules », « PG » et « CSF » est très proche, tandis que celle pour la formulation PG/OL est largement supérieure.

2.5. Discussion et conclusion

L'imagerie MALDI en mode MS est une technique rapide et sensible, alors qu'en mode MS/MS, il est possible d'identifier avec certitude le composé, mais au prix de plusieurs heures d'acquisition. Ces deux méthodes ont permis de détecter et de localiser le composé anti-inflammatoire de la crème anti-acné. Les images montrent qu'il a pénétré à travers la couche cornéenne de la peau et atteint l'hypoderme. Néanmoins, il n'a pas été possible de savoir s'il s'accumulait au niveau des glandes sébacées, les cibles.

L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS, grâce à une résolution spatiale allant de 2 à 10 μm , nous a permis de constater que le composé ne s'accumulait pas spécifiquement dans les glandes sébacées mais était localisé dans les régions riches en tri- et diglycérides, en cholestérol et en vitamine E, alors qu'il était absent des zones riches en phosphatidylcholines et en sphingomyélines.

Finalement, l'utilisation combinée des imageries MALDI et SIMS permet la localisation d'un composé à la fois dans l'ensemble d'un tissu et dans des régions de très petites tailles. Alors que le composé est détecté avec des résolutions de 50-100 μm en MALDI dans l'hypoderme, le SIMS permet de le détecter non pas dans les glandes sébacées, mais à proximité de celles-ci, avec une colocalisation avec des lipides endogènes.

Références bibliographiques

- [1] Alae, M.; Arias, P.; Sjodin, A.; Bergman, A. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 683.
- [2] Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. *B. Environ. Contam. Tox.*, **1986**, *36*, 839.
- [3] Yamamoto, H.; Okumura, T.; Nishikawa, Y.; Konishi, H. *J. AOAC Int.*, **1997**, *80*, 102.
- [4] Lindstrom, G.; Wingfors, H.; Dam, M.; von Bavel, B. *Arch. Environ. Con. Tox.*, **1999**, *36*, 355.
- [5] Huwe, J.K.; Lorentzen, M.; Thuresson, K.; Bergman, A. *Chemosphere*, **2002**, *46*, 635.
- [6] Noren, K.; Meironyte, D. *Chemosphere*, **2000**, *40*, 1111.
- [7] Sjodin, A.; Jones, R.S.; Focant, J.F.; Lapeza, C.; Wang, R.Y.; McGahee, E.E.; Zhang, Y.L.; Turner, W.E.; Slazyk, B.; Needham, L.L.; Patterson, D.G. *Environ. Health Persp.*, **2004**, *112*, 654.
- [8] Eriksson, P.; Viberg, H.; Jakobsson, E.; Orn, U.; Fredriksson, A. *Toxicol. Sci.*, **2002**, *67*, 98.
- [9] Viberg, H.; Fredriksson, A.; Eriksson, P. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **2003**, *192*, 95.
- [10] Meerts, I.A.T.M.; van Zanden, J.J.; Luijckx, E.A.C.; van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A. *Toxicol. Sci.*, **2000**, *56*, 95.
- [11] Chen, G.S; Bunce, N.J. *Toxicol Sci.*, **2003**, *76*, 310.
- [12] von Meyerinck, L.; Hufnagel, B.; Schmoltdt, A.; Benthe, H.F. *Toxicology*, **1990**, *61*, 259.
- [13] Norris, J.M.; Kociba, R.J.; Schwetz, B.A.; Rose, J.Q.; Humistone, C.G.; Jewett, G.L.; Gehring, P.J.; Mailhes, J.B. *Environ. Health Persp.*, **1975**, *11*, 153.
- [14] Antignac, J.P.; Cariou, R.; Zalko, D.; Berrebi, A.; Cravedi, J.P.; Maume, D.; Marchand, P.; Monteau, F.; Riu, A.; Andre, F.; Le Bizec, B. *Environ. Pollut.*, **2009**, *157*, 164.

-
- [15] Schechter, A.; Pavuk, M.; Papke, O.; Ryan, J.J.; Birnbaum, L.; Rosen, R. *Health Persp.* **2003**, *111*, 1723.
- [16] Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Takemori, H.; Ohi, E.; Tsuji, H.; Nagayama, J. *Chemosphere* **2004**, *57*, 795.
- [17] Thomas, G.O.; Wilkinson, M.; Hodson, S.; Jones, K.C. *Environ. Pollut.* **2006**, *141*, 30.
- [18] Stanley, J.S.; Cramer, P.H.; Thornburg, K.R.; Remmers, J.C.; Breen, J.J.; Schwemberger, J. *Chemosphere* **1991**, *23*, 1185.
- [19] Cariou, R.; Antignac, J.P.; Marchand, P.; Berrebi, A.; Zalko, D.; André, F.; Le Bizec, B. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 144.
- [20] Mörck, A.; Hakk, H.; Örn, U.; Klasson-Wehler, E. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 900.
- [21] Riu, A.; Cravedi, J.P.; Debrauwer, L.; Garcia, A.; Canlet, C.; Jouanin, I.; Zalko, D. *Environ. Int.* **2008**, *34*, 318.
- [22] Jansen, H.T.; Cooke, P.S.; Porcelli, J.; Liu, T.C.; Hansen, L.G. *Reprod. Toxicol.* **1993**, *7*, 237.
- [23] Cooke, P.S.; Zhao, Y.D.; Hansen, L.G. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1996**, *136*, 112.
- [24] Ross, P.; De Swart, R.; Addison, R.; Van Loveren, H.; Vos, J.; Osterhaus, A. *Toxicology* **1996**, *112*, 157.
- [25] Ross, P.S.; de Swart, R.L.; van der Vliet, H.; Willemsen, L.; de Klerk, A.; van Amerongen, G.; Groen, J.; Brouwer, A.; Schipholt, I.; Morse, D.C.; van Loveren, H.; Osterhaus, A.D.M.E.; Vos, J.G. *Arch. Toxicol.* **1997**, *71*, 563.
- [26] Yuan, W.; Wang, X.N.; Greenwald, G.S. *Biol. Reprod.* **1995**, *52*, 313.
- [27] Bredhult, C.; Bäcklin, B.M.; Olovsson, M. *Reprod. Toxicol.* **2007**, *23*, 550.
- [28] Shalita A.R.; Smith J.G.; Parish L.C.; Sofman M.S.; Chalker D.K. *Int. J. Dermatol.* **1995**, *34*, 434.
- [29] Tehrani R.; Dharmalingam M. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* **2004**, *70*, 345–348.

[30] Wong R.C.; Kang S.; Heezen J.L.; Voorhees J.J.; Ellis C.N. *J. Am. Acad. Dermatol.* **1984**, *11*, 1076.

CHAPITRE III

Analyse lipidique pour l'étude de maladies et du métabolisme

1. Recherche de marqueurs lipidiques de la Mucoviscidose

1.1. Introduction

1.1.1. Présentation

La mucoviscidose fut décrite pour la première fois par en 1936 par le pédiatre Guido Fanconi sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie », mais elle ne fut reconnue comme entité pathologique à part entière qu'en 1938 par la pédiatre Dorothy Hansine Andersen. Néanmoins, elle était connue depuis le Moyen Age, en effet on connaissait le sort funeste qu'attendait le nouveau-né dont la mère remarquait le « baiser salé » c'est-à-dire le gout salé laissé par un baiser sur le front de l'enfant. Cette anomalie électrolytique dans la sueur des patients atteints de la mucoviscidose fut découverte en 1953 par le docteur Paul di Saint'Agnese, qui décrivit une augmentation importante du chlore, du sodium et de manière moins marquée, du potassium.

La mucovisvidose est la maladie génétique létale la plus fréquente chez les sujets caucasiens. Elle touche environ 1 enfant sur 2500 naissances en Europe et en Amérique du Nord et la fréquence des hétérozygotes, porteurs sains de la maladie, y est d'environ 1/25, soit 4% de la population occidentale.^{1,2} Elle est la première maladie autosomique récessive dont le gène a été isolé par clonage positionnel. En 1985, le locus CF (*cystic fibrosis*) fut localisé sur le bras long du chromosome 7. En 1989, le gène impliqué dans la maladie a été isolé. Ce gène contient 27 exons s'étendant sur 250 kb du chromosome (7q31) et code pour une protéine dénommée CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*).³ Cette protéine exerce plusieurs fonctions dans la cellule parmi lesquelles celles de canal chlore activé par l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de régulateur d'autres canaux ioniques.

Depuis la description du gène CFTR, de nombreux laboratoires caractérisent les diverses mutations responsables de la mucoviscidose. De nos jours, plus de 1700 mutations ont été décrites depuis le clonage du gène dont seulement cinq sont représentées à plus de 2%. La mutation la plus fréquente qui est une délétion de trois nucléotides aboutissant à l'élimination de la phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$) représente 70% des allèles CF. Toutes les autres mutations sont rares voire détectées seulement dans une seule famille et la fréquence de certaines d'entre elles peut varier énormément d'un groupe ethnique ou géographique à l'autre.

1.1.2. La Protéine CFTR

La protéine CFTR est un membre de la superfamille de transporteur membranaire *ATP-binding cassette* (ABC) qui inclue des protéines comme les *multiple drug resistance protein* (MDR). La séquence protéique déduite de la séquence nucléotidique du gène *CFTR* correspond à une protéine composée de 1480 acides aminés avec un poids moléculaire d'environ 168 kDa. Cette protéine est constituée de cinq domaines. Elle contient deux motifs répétés constitués chacun d'un domaine hydrophobe transmembranaire (MSD ou *membrane spanning domain*), contenant six segments transmembranaires en hélice alpha et deux domaines hydrophiles contenant des séquences consensus d'interaction avec les nucléotides (NBD ou *nucléotide binding domain*) susceptible de se lier à l'ADN. Ces deux motifs sont reliés par un domaine cytoplasmique (domaine R) contenant de nombreux résidus chargés et la majorité des sites potentiels de phosphorylation (Figure 1).

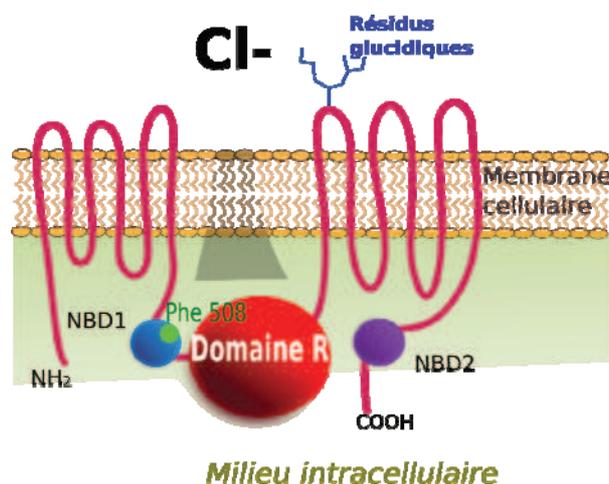


Figure 1 : Modèle topologique de la structure de la protéine CFTR.

Elle est située au pôle apical des cellules épithéliales, se comporte principalement comme un canal ionique sélectif pour certains anions, comme le chlore, et est régulée par la protéine kinase A.⁴ La protéine CFTR régule aussi d'autres canaux : le canal Cl^- à rectification sortante (ORCC, *outwardly rectifying Cl channel*), le canal Na^+ épithélial (ENaC, *epithelial Na⁺ channel*), et au moins deux canaux K^+ appartenant à la famille de canaux K^+ à rectification entrante (ROMK1 et ROMK2).⁵ Mais d'autres fonctions indépendantes de la régulation des canaux ont été proposées (transport d'ATP, modulation des phénomènes d'exocytose / endocytose, régulation du pH des organites intracellulaires...). Certaines études suggèrent que

la protéine CFTR serait aussi un transporteur de HCO_3^- ou régulerait son transport à travers les membranes des cellules épithéliales.⁶

Des mutations sur le gène *CFTR* peuvent altérer la fonction de la protéine CFTR de différentes manières, en fonction de leur nature et du domaine touché par ces mutations. C'est pourquoi ces mutations ont été classées comme il suit :

Classe I : mutations affectant la biosynthèse de CFTR,

Classe II : mutations affectant la maturation de la protéine,

Classe III : mutations affectant l'ouverture et la régulation du canal Cl^- ,

Classe IV : mutations affectant la conductance du canal Cl^- ,

Classe VI : mutations affectant la stabilité de la protéine.

La classe V, qui regroupe les mutations altérant la stabilité de l'ARNm CFTR, à récemment été incluse dans la classe I.⁷ La mutation la plus répandue, ΔF508 , fait partie de la classe II.

1.1.3. Physiopathologie humaine

Les personnes atteintes de la mucoviscidose présentent un mucus très visqueux qui s'accumule, non seulement dans les voies respiratoires, mais aussi dans l'intestin grêle, le côlon et les canaux pancréatiques. Cette accumulation de mucus obstrue ces organes. C'est pourquoi les personnes atteintes de la maladie développent souvent des obstructions gastro-intestinales, des insuffisances pancréatiques et, éventuellement, diabète et cirrhose du foie. De plus, ces personnes peuvent aussi développer des problèmes pulmonaires, tels que des inflammations chroniques, fibreuses et récurrentes, ainsi que des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenza*. L'augmentation de la viscosité du mucus dans les poumons peut également contribuer à l'augmentation de leur susceptibilité à des infections par d'autres agents pathogènes.

L'insuffisance de l'activité exocrine du pancréas est présente pour environ 90% des patients atteints de mucoviscidose. Cette pancréatite est probablement le résultat d'une réduction du volume de la sécrétion pancréatique avec une faible concentration de HCO_3^- .⁸

Sans un volume suffisant de liquide et de HCO_3^- , les proenzymes digestives sont conservées dans les canaux pancréatiques et sont prématurément activées. Ceci conduit finalement à la destruction des tissus et à une fibrose. A l'heure actuelle, les mécanismes moléculaires qui interviennent dans ces modifications physiopathologiques résultant de l'augmentation de la viscosité du mucus dans la mucoviscidose sont très peu connus.

Une autre conséquence, assez peu décrite, de la dysfonction de la protéine CFTR est la présence d'altérations du métabolisme de certains lipides, ainsi que la composition lipidique du sang et de différents tissus.⁹ Cela concerne les acides gras polyinsaturés,^{10,11} les phospholipides,^{12,13} les sphingolipides,^{14,15} et le cholestérol.¹⁶ Néanmoins, ces résultats ont été mis en évidence par des méthodes biochimiques sur des homogénats de tissu total ou par imagerie chimique d'analogues de lipides dans des cellules modèles. Ainsi, la distribution locale de ces altérations lipidiques dans les tissus est peu connue.

1.2. Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude a été de comparer les profils lipidiques et la localisation de certains composés dans des coupes d'organes d'animaux modèles de la mucoviscidose et d'animaux sains par imagerie par spectrométrie de masse. Le modèle sélectionné a été la souris ΔF508 , puisque la délétion de la phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR est la mutation la plus souvent retrouvée chez les patients atteints de la maladie. La physiopathologie de la mucoviscidose chez les souris est légèrement différente de celle observée chez l'homme. Ainsi, les principaux symptômes sont une forte malabsorption intestinale et une pancréatite aigüe. Nous avons donc travaillé sur des coupes de pancréas et de côlon de souris ΔF508 , dites « KO » et de souris saines, dites « WT ». Ces deux organes sont décrits ci-dessous.

Ce travail a débuté en 2007, avant ma thèse, par l'analyse du pancréas en imagerie TOF-SIMS par Nora Tahallah et Renjie Hui. Les résultats sont brièvement présentés mais je n'ai que très peu participé à ces premières expériences. Ensuite nous avons continué avec l'analyse du côlon en imagerie TOF-SIMS et MALDI-TOF. Ces deux études ont été menées en collaboration avec Aleksander Edelman, Mario Ollero et Janine Fritsch de la Faculté de Médecine Paris Descartes (Inserm, U845).

1.2.1. Le pancréas

Le pancréas est un organe abdominal digestif rétropéritonéal (le péritoine recouvre sa face antérieure) situé derrière l'estomac, devant et au-dessus des reins (Figure 2). Ses fonctions dichotomiques de glande à sécrétions exocrines et endocrines font du pancréas une glande amphicrine.

La fonction exocrine du pancréas est la sécrétion des enzymes pancréatiques dans le duodénum, par le canal principal pancréatique. Le suc pancréatique contient des proenzymes biosynthétisées par les cellules acineuses. Ces proenzymes sont inactives: elles seront activées dans le tube digestif par les sucs gastriques pour détruire des molécules plus ou moins grosses, elles seront alors appelées hydrolases.

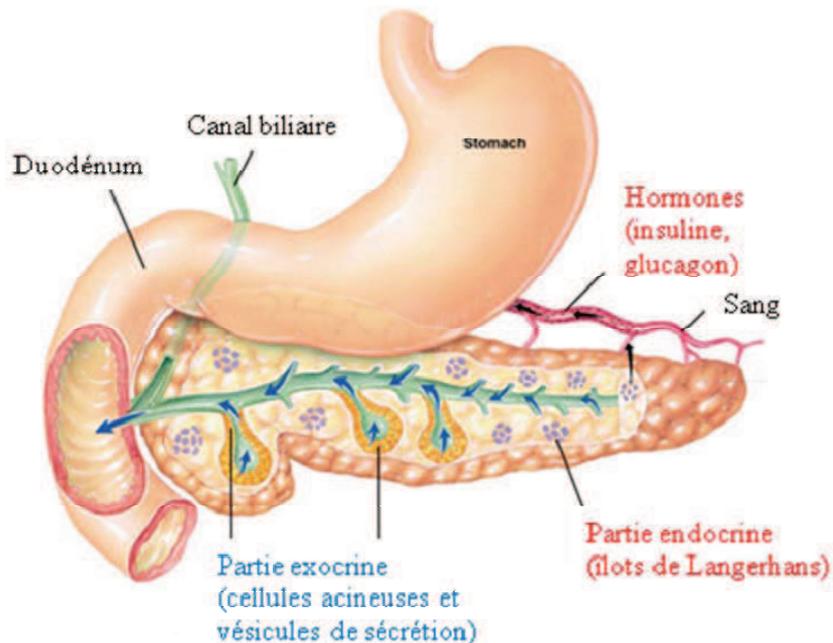


Figure 2 : Schéma représentant le pancréas et ses fonctions endocrines et exocrines.

Comme toutes les glandes endocrines, le pancréas synthétise des produits de sécrétion qui sont libérés dans la circulation sanguine où ils vont agir à distance vers des tissus (ou cellules) cibles. La partie endocrine ne représente que 1% du pancréas (en nombre de cellules et en masse) mais s'octroie 10% de son irrigation sanguine. Les produits synthétisés par le pancréas endocrine sont principalement les quatre hormones suivantes : l'insuline (seule hormone hypoglycémiante), le glucagon (hormone hyperglycémiante), la somatostatine et le polypeptide pancréatique.

1.2.2. Le côlon

Le côlon, aussi appelé "gros intestin", court du cæcum jusqu'au rectum et constitue la partie terminale de l'intestin, appartenant à l'appareil digestif. Il fait suite à l'iléon au niveau de la valvule iléo-cæcale (valvule de Bauhin), et se termine au niveau du rectum. Le côlon est constitué de la muqueuse (*mucosa*), de la sous-muqueuse (*submucosa*) et de la musculieuse (*muscle layers*) (figure 3). Les fonctions du côlon sont la déshydratation du bol alimentaire (absorption de l'eau et des électrolytes), la digestion terminale de la cellulose par la flore intestinale et l'évacuation des déchets alimentaires.

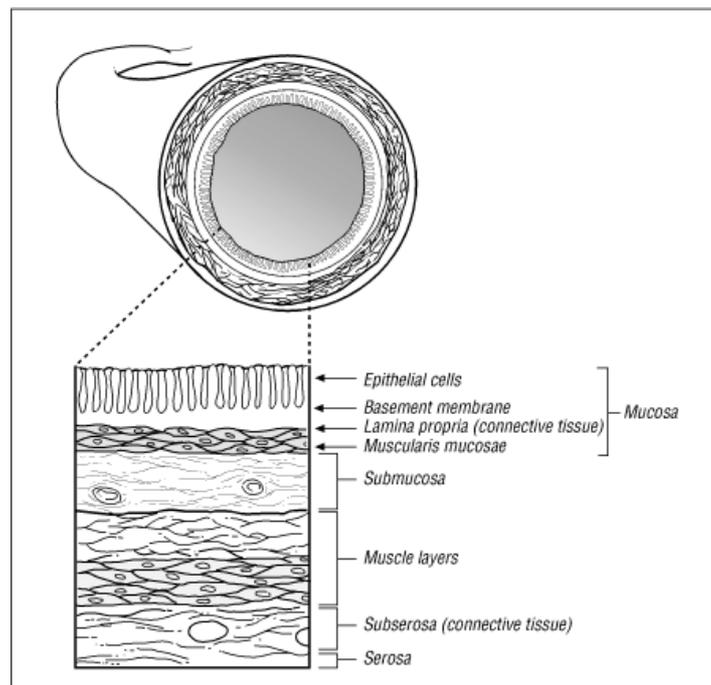


Figure 3 : Schéma détaillant les différentes couches composant le côlon.

La muqueuse comporte un épithélium de revêtement composée majoritairement de cellules caliciformes qui s'invaginent dans la muqueuse en cryptes de Lieberkühn (figure 4). Le chorion est riche en tissu lymphoïde (lymphocytes diffus et follicules lymphoïdes débordant vers la musculature muqueuse).

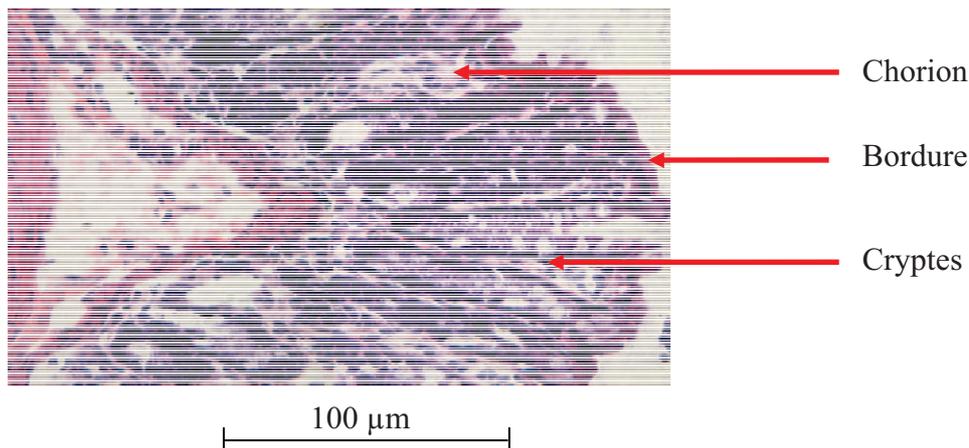


Figure 4 : Coloration histologique (rouge : cytoplasme ; bleu : noyau) d'une coupe transversale d'un côlon sain.

La sous-muqueuse, quant à elle, se soulève en valvules conniventes et entraîne avec elle la *muscularis* et la muqueuse. La musculature fixe le tissu dans la bonne position dans le corps. De l'intérieur du côlon vers la séreuse (*serosa*), la musculature comporte deux couches de muscle différents : une couche circulaire et une couche longitudinale.

1.3. Protocole opératoire

1.3.1. Le pancréas

Les pancréas de deux souris âgées de 24 jours, une souris WT (WT+25) et une souris KO (KO-28), ont été prélevés puis immédiatement stockés à -80°C . Des coupes de $12\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à -20°C ont été réalisées avec un cryostat Leica CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre France) et déposées sur un support en silicium destiné à l'analyse TOF-SIMS. Le pancréas de souris WT a été coupé de manière transversale tandis que le pancréas de souris KO a été coupé de manière longitudinale. Des images de $500 \times 500\ \mu\text{m}^2$ (deux acquisitions par coupes) ont été enregistrées en mode d'ionisation positif et négatif avec une résolution spatiale de $2\ \mu\text{m}$ (256×256 pixels) et une dose d'ions primaires de 3×10^{11} ions. cm^{-2} . Les agrégats d'ions Bi_3^+ ont été sélectionnés et le canon à électrons a été utilisé.

1.3.2. Le côlon

Pour l'analyse du côlon, nous avons utilisé les deux techniques d'imagerie par spectrométrie de masse disponible au laboratoire : l'imagerie TOF-SIMS et l'imagerie MALDI-TOF.

Pour les analyses TOF-SIMS, les organes de trois souris WT (WTA, WT14 et WT94) et de trois souris KO (KO5, KO6 et KO13) ont été prélevés et congelés à -80°C . Nous avons préparé des coupes transversales de $12\ \mu\text{m}$ d'épaisseur à -20°C que nous avons déposées sur une plaque de silicium. Les coupes ont ensuite été légèrement déshydratées sous un vide de quelques hectopascals. Des images TOF-SIMS de $500 \times 500\ \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels (résolution spatiale : $2\ \mu\text{m}$) ont été acquises en mode d'ionisation négatif avec une dose d'ions primaires de 2×10^{12} ions. cm^{-2} . Sept images de côlons WT (2xWTA, 2xWT94 et 3xWT14) et six images de côlons KO (2xKO5, 2xKO6 et 2xKO13) ont été obtenues. Les agrégats d'ions Bi_3^+ ont été sélectionnés et le canon à électrons a été utilisé.

Pour les analyses MALDI-TOF, nous disposions aussi de trois souris WT (WT 29, WT31 et WT40) et de trois souris KO (KO13, KO20 et KO88). Le même protocole a été suivi pour obtenir des coupes de côlon, qui ont ensuite été déposées sur une plaque inox. Les images MALDI-TOF ont été acquises en mode d'ionisation positif et négatif. La tension d'accélération a été fixée à 20 kV et l'extraction retardée à 500 ns. Une solution d' α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) à $10\ \text{mg.mL}^{-1}$ (acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 70/30/0,1 v/v/v) a été préparée pour le mode d'ionisation positif et une solution de 9-aminoacridine à $10\ \text{mg.mL}^{-1}$ (éthanol 100%) a été préparée pour le mode d'ionisation négatif. Ces matrices ont été déposées de manière homogène sur les coupes de côlon à l'aide d'un robot nébuliseur (LEAP Technologies, Carrboro, USA). Les conditions expérimentales ont été optimisées pour chaque mode d'ionisation. Ainsi en mode positif, le nébuliseur a été chauffé à 120°C et le nombre de tir laser par pixel a été de 200, tandis qu'en mode négatif, le spray a été chauffé à 80°C et le nombre de tir laser par pixel a été de 80. La résolution spatiale a toujours été de $50\ \mu\text{m}$ (distance entre deux pixels adjacents). Nous avons enregistré une image en mode d'ionisation positif et négatif par échantillon, soit trois jeux d'images de souris KO et trois jeux d'images de souris WT.

1.4. Résultats obtenus sur le pancréas

Pour l'analyse du pancréas en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS, nous disposons donc de deux jeux d'acquisitions (mode positif et négatif) enregistrés sur une coupe transversale de souris WT et deux jeux d'acquisitions enregistrés sur une coupe longitudinale d'une souris KO. Les images optiques de ces deux coupes sont présentées dans les figures 5 et 6.

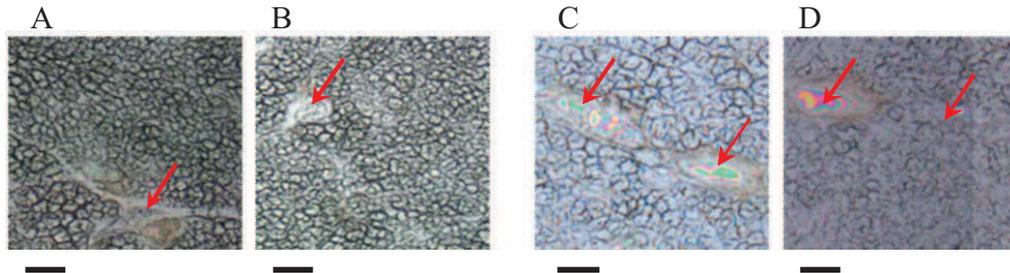


Figure 5 : Images optiques des différentes zones analysées. **A** et **B** : pancréas de souris WT. **C** et **D** : pancréas de souris KO (échelles = 100 μ m). Les passages de Boll sont désignés par les flèches rouges.

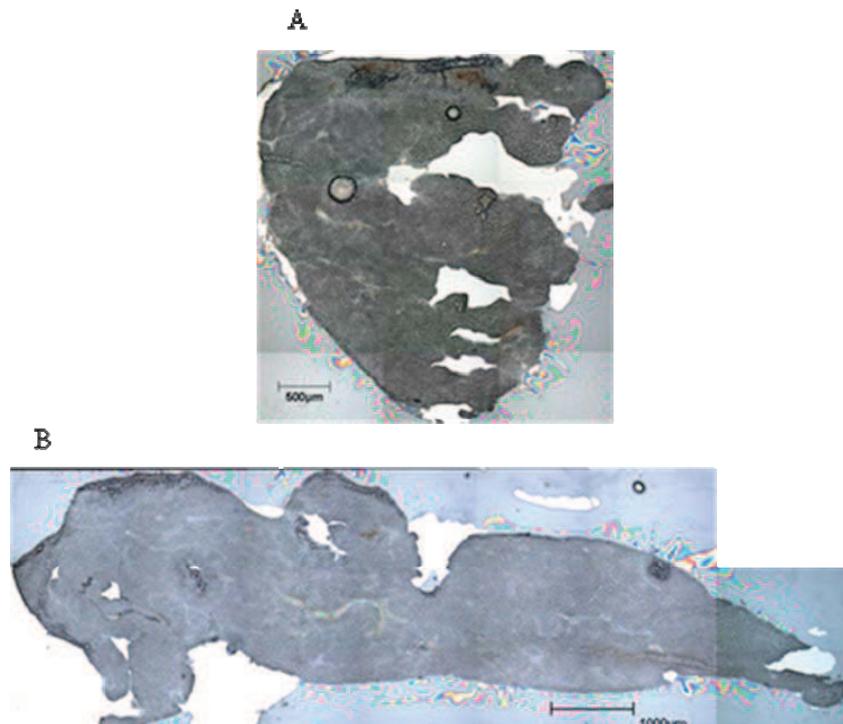


Figure 6 : Images optiques des deux coupes de pancréas analysées en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS. **A** : coupe transversale de pancréas de souris WT. **B** : coupe longitudinale de pancréas de souris KO.

Sur chaque acquisition, les aires des pics les plus intenses ont été notées (61 pics en mode positif et 46 pics en mode négatif). La moyenne de ces aires et leur écart-type a ensuite été calculée pour les images enregistrées sur les coupes du pancréas de la souris WT et de la souris KO.

En mode d'ionisation positif, quelques différences sont observées, principalement dues à l'erreur expérimentale engendrée par le faible nombre d'acquisitions. Néanmoins, une différence significative est décelée pour le pic à m/z 430,30 correspondant à la vitamine E, puisque son aire est 83% plus élevée chez la souris KO par rapport à la souris WT. En mode d'ionisation négatif, quelques différences significatives ont été trouvées pour les ions à m/z 255,23; 283,26; 429,37 et 465,31 correspondant respectivement au carboxylates des acides gras C16:0 et C18:0, à la vitamine E et au sulfate de cholestéryle déprotoné. Ainsi, il a été observé une diminution des aires des ions correspondant aux acides gras C16:0 et C18:0 de 25% et 38%, respectivement, chez la souris KO par rapport à la souris WT. Au contraire, l'aire des pics des ions correspondant à la vitamine E et au sulfate de cholestéryle augmente chez la souris KO de 76% et 36% respectivement.

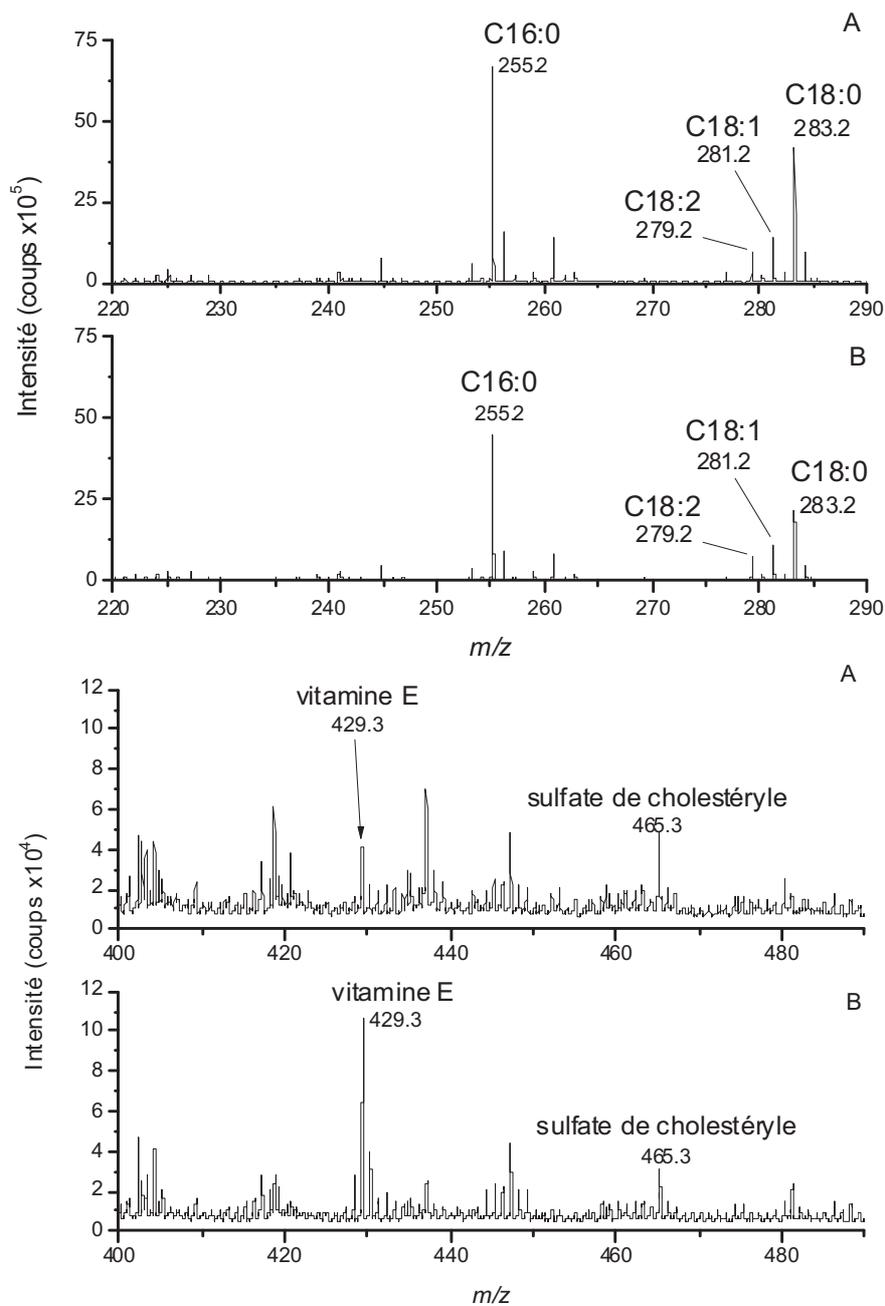


Figure 7 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrés sur les coupes de pancréas de la souris WT (A) et sur les coupes de la souris KO (B).

Ces différences observées entre le pancréas de la souris WT et de la souris KO sont clairement visibles si l'on examine les spectres présentés dans la figure 7. Les images de ces quatre ions sont présentées dans la figure 8.

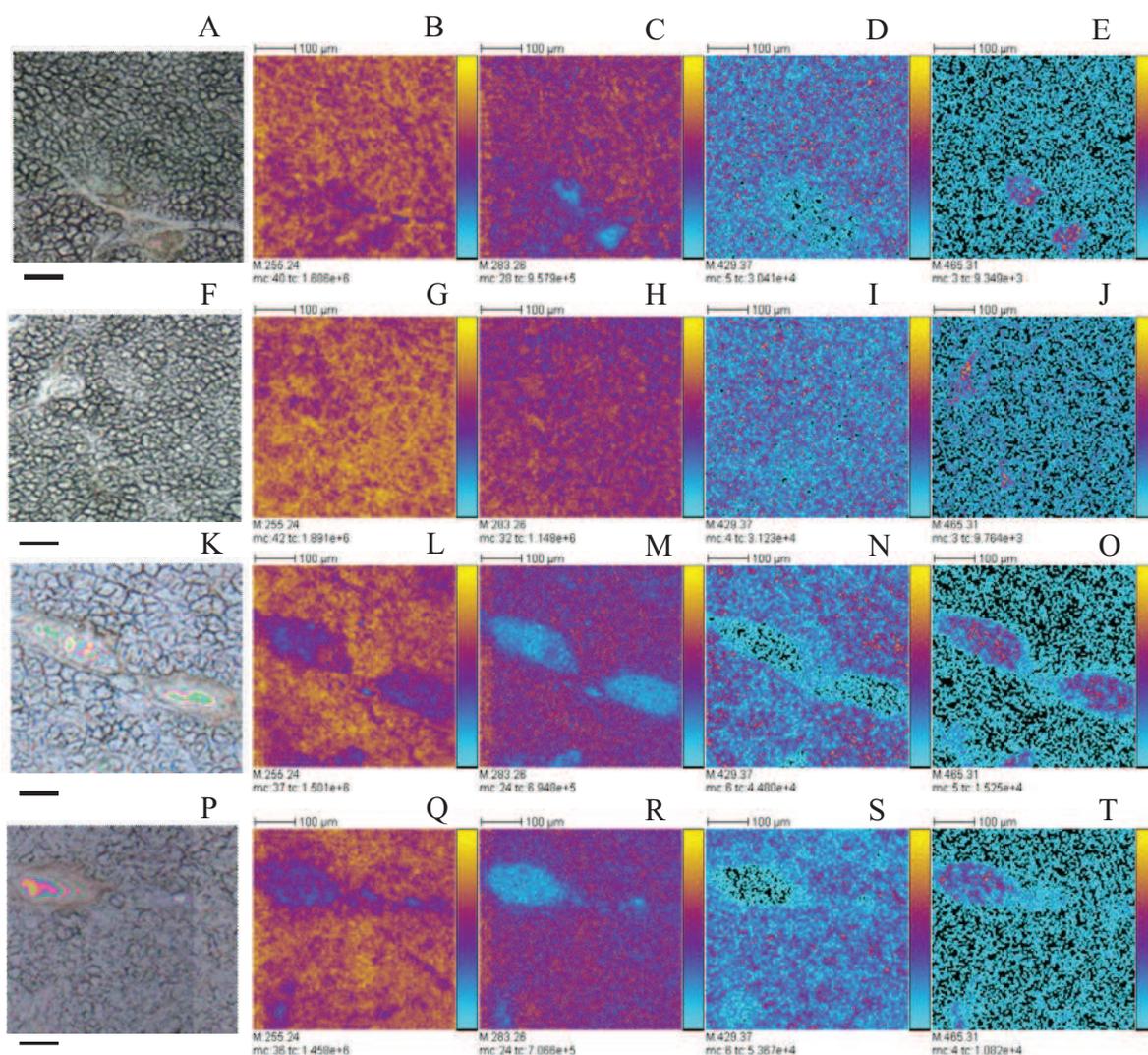


Figure 8 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) des coupes de pancréas de souris WT (A à J) et KO (K à T). Première colonne : images enregistrées avec la caméra du spectromètre, la barre d'échelle correspond à $100 \mu\text{m}$. Seconde colonne : image ionique du carboxylate de l'acide gras C16:0 (m/z 255,23). Troisième colonne : images ioniques du carboxylate de l'acide gras C18:0 (m/z 283,26). Quatrième colonne : images ioniques de l'ion correspondant à la vitamine E déprotonée (m/z 429,37). Cinquième colonne : images ioniques de l'ion correspondant au sulfate de cholestéryle déprotoné (m/z 465,31). Dose d'ions primaire : 3×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistré pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Sur les images optiques (Fig. 8A, 8F, 8K et 8P), on peut voir que les quatre acquisitions sont centrées autour des passages de Boll, qui constituent la partie étroite des canaux

excréteurs. La seconde et la troisième colonne présentent les images des ions correspondants au carboxylate de l'acide gras C16:0 à m/z 255,24 (Fig. 8B, 8G, 8L et 8Q) et de l'acide gras C18:0 à m/z 283,26 (Fig. 8C, 8H, 8M et 8R). Ces deux ions sont présents dans toute l'image sauf dans les passages de Boll. La même localisation est observée pour l'ion correspondant à la vitamine E déprotonée à m/z 429,37 (Fig. 8D, 8I, 8N et 8S). À l'inverse, le sulfate de cholestéryle à m/z 465,31 (Fig. 8E, 8J, 8O et 8T) est quant à lui localisé dans ces passages. En comparant les deux paramètres mc et tc de chaque image, il est possible de retrouver les différences observées dans les spectres. En effet, leur valeur diminue entre la souris WT et la souris KO pour les images des carboxylates des acides gras C16:0 et C18:0 et augmente pour les images de la vitamine E et du sulfate de cholestéryle. Néanmoins, aucune différence marquée de localisation n'est décelée entre les images enregistrées sur le pancréas de la souris WT et celles enregistrées sur le pancréas de la souris KO.

1.5. Résultats obtenus sur le côlon

1.5.1. Résultats TOF-SIMS

A la vue des résultats obtenus sur le pancréas de souris WT et KO, nous avons décidé de nous focaliser sur le mode d'ionisation négatif et d'augmenter le nombre d'échantillons (3 souris WT et 3 souris KO). De plus, afin d'accroître le nombre de données par acquisition, la dose d'ions primaire a été fixée à 2×10^{12} ions.cm⁻², proche de la limite théorique du SIMS statique.

La figure 9 présente la localisation des carboxylates d'acide gras C16:1 (m/z 253,23; Fig. 9A et 9I) et C18:0 (m/z 283,27; Fig. 9B et 9J), du cholestérol (m/z 385,36; Fig. 9C et 9D), de la vitamine E (m/z 429,37; Fig. 9D et 9L), du sulfate de cholestéryle (m/z 465,32; Fig. 9E et 9M) et de la somme des phosphatidylinositols (PI28, PI32, PI34, PI36 et PI38; Fig. 9F et 9N). Les images optiques de chaque acquisition sont en Fig. 9G et 9O.

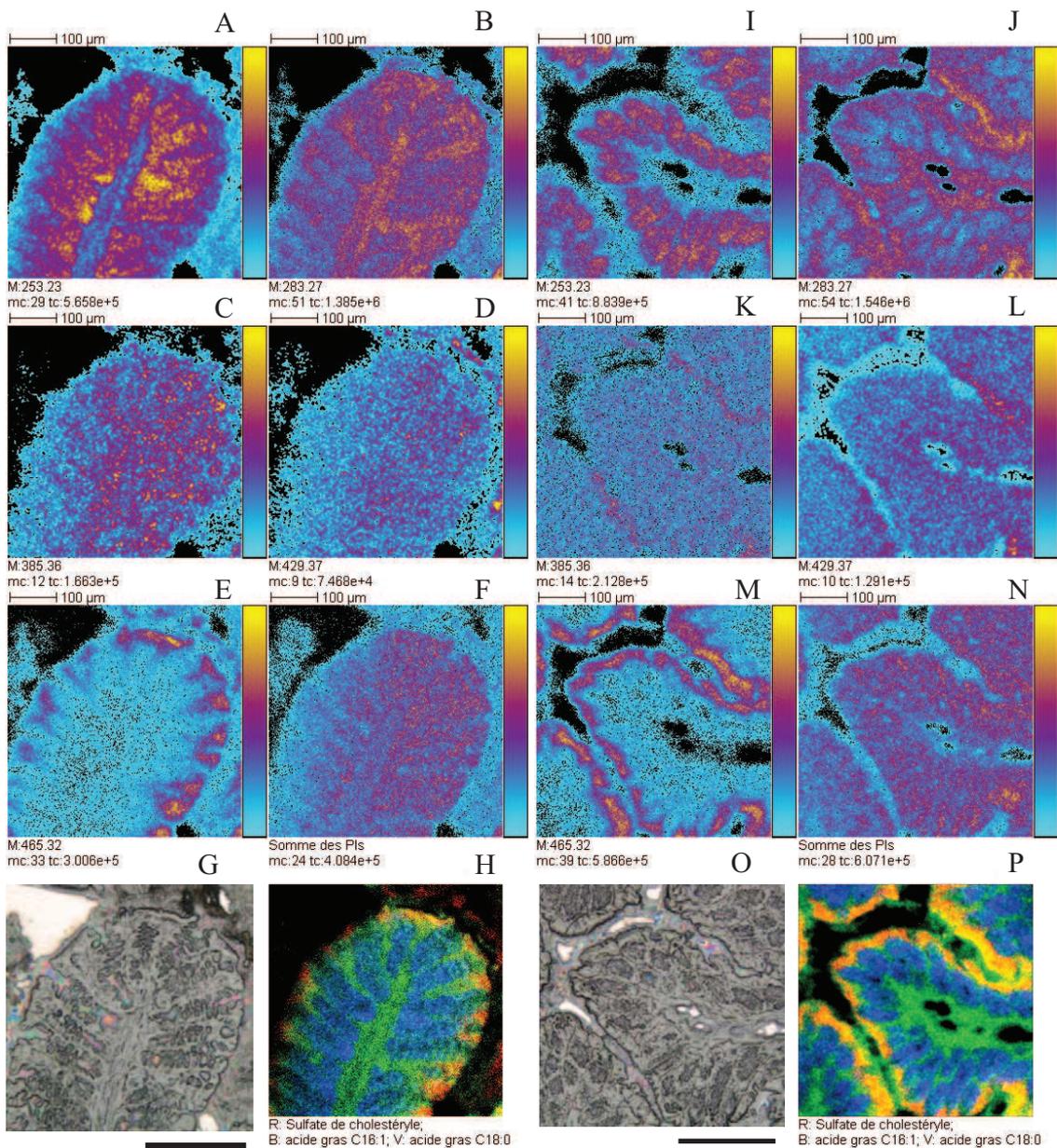


Figure 9 : Images TOF-SIMS de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels en mode d'ionisation négatif enregistrées sur des coupes de côlon de souris WT (A à H) et de souris KO (I à P). A et I : images de l'ion à m/z 253,23 correspondant au carboxylate de l'acide gras C16:1. B et J : images de l'ion à m/z 283,27 correspondant au carboxylate de l'acide gras C18:0. C et K : image du cholestérol à m/z 385,36. D et L : image de l'ion correspondant à la vitamine E à m/z 429,37. E et M : image du sulfate de cholestéryle à m/z 465,32. F et N : somme des images des ions correspondants aux phosphatidylinositols. G et O : images optique de la zone analysée, la barre d'échelle correspond à $200 \mu\text{m}$. H et P : superposition en 3 couleurs des images du sulfate de cholestéryle (rouge), de l'acide gras 16:1 (bleu) et de l'acide gras C18:0 (vert). Dose d'ions primaire : 2×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond

à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Trois types de localisations très distinctes ressortent, une première correspondant à la submucosa et au chorion, représentée par les acides gras C18:0, une seconde correspondant aux cryptes, représentée par les acides gras C16:1 et par la somme des phosphatidylinositols, et une troisième correspondant à la bordure épithéliale représentée par le sulfate de cholestéryle. La complémentarité de ces trois localisations est illustrée sur la superposition en trois couleurs Fig. 9H et 9P. Le cholestérol et la vitamine E ont une localisation plus diffuse. En examinant les images des pics les plus intenses, nous n'avons pas décelé de différence distincte entre les coupes de côlon de souris WT et celles des souris KO. Néanmoins, l'analyse des aires des pics peut indiquer quelques disparités.

Les coupes de côlon analysées étant très différentes au niveau morphologique, nous ne pouvons pas comparer directement les spectres totaux de chaque acquisition, les différences obtenues seraient plus dues à leur morphologie qu'à une réelle différence de composition chimique. C'est pourquoi, nous nous sommes basés sur la complémentarité des trois types de localisation observés. Pour chaque acquisition, nous avons extrait les spectres de ces trois régions d'intérêt (ROI, *region of interest*). Nous avons donc obtenu 7 spectres de la bordure épithéliale, 7 des cryptes et 7 du chorion et de la submucosa pour les côlons de souris WT ainsi que 6 de chaque pour les côlons de souris KO.

Un spectre de chacune de ces trois régions enregistré sur une coupe de côlon WT est présenté dans la figure 10. Les pics les plus intenses correspondent aux carboxylates des acides gras C16 (C16:0, m/z 255,2) et C18 (C18:1, m/z 281,2). La forme déprotonée du sulfate de cholestéryle est détectée à m/z 465,3. Les trois ions à m/z 616,5; m/z 642,5 et m/z 687,5 correspondent à des fragments de sphingomyéline. Enfin, nous notons la présence de phosphatidylinositol contenant 34 atomes de carbones, détecté au rapport m/z 835,6 ([PI34:1-H]), contenant 36 carbones, détecté à m/z 863,6 ([PI36:1-H]) et contenant 38 carbones, détecté à m/z 887,6 ([PI38:3-H]).

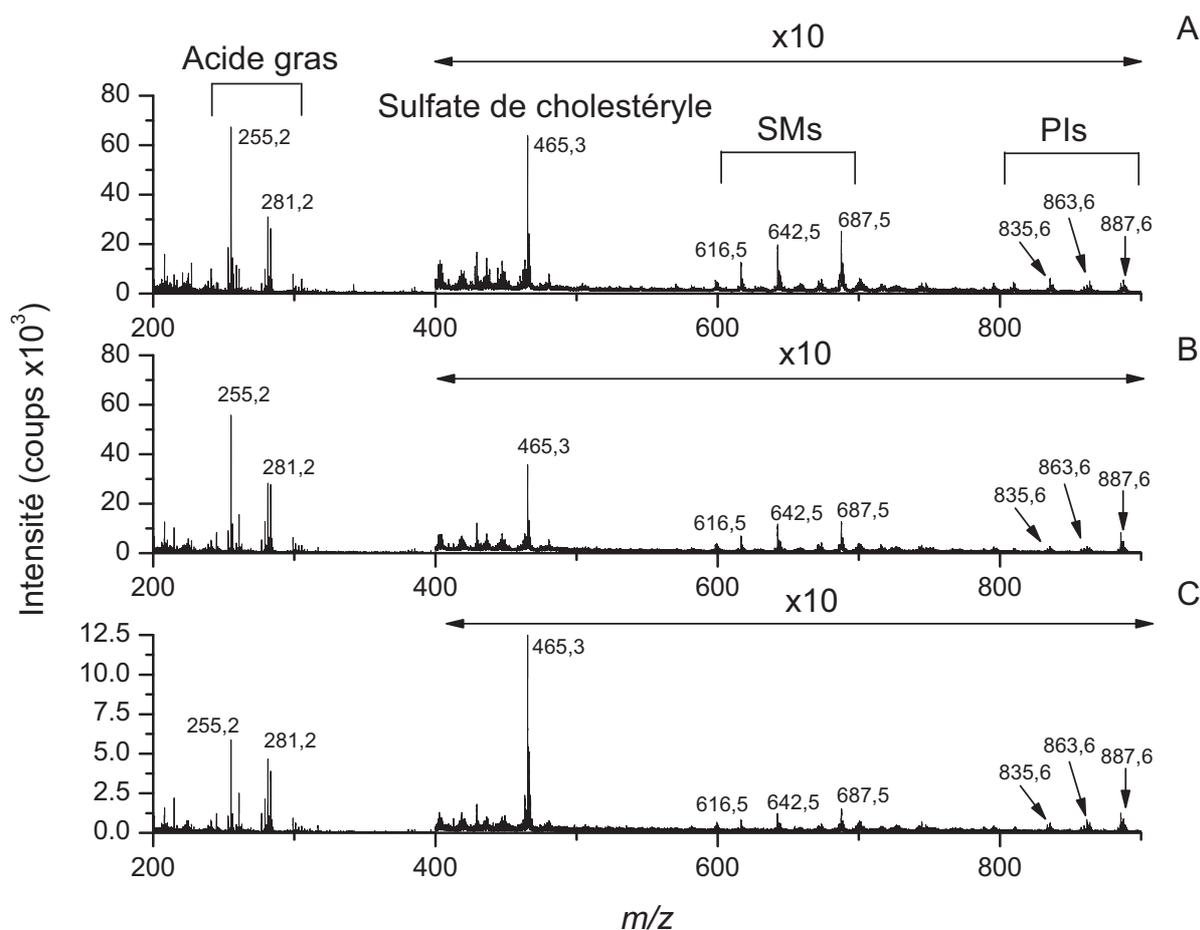


Figure 10 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif extrais de la région « cryptes » (A), de la région « chorion » (B) et de la région « bordure épithéliale » (C) d'une coupe de côlon WT.

L'aire des pics d'intérêts a été divisée par le nombre de pixel que comportait la zone sélectionnée, ce qui nous permet d'obtenir l'aire de chaque pic pour un pixel et pour chaque région. Enfin, la moyenne de ces aires normalisées a été calculée. En comparant ces aires pour les côlons de souris WT et KO dans les régions « bordure épithéliale », « cryptes » et « chorion », deux différences significatives ont été mises en évidence : l'augmentation de l'aire du pic correspondant à l'acide gras C16:0 et à la vitamine E, déjà observée lors de l'analyse du pancréas. Les résultats pour ces deux composés sont détaillés dans la **figure 11**. L'aire de l'acide gras C16:0 augmente principalement dans la bordure épithéliale (+23%, Fig. 10B) dans les côlons de souris KO, tandis que l'aire de la vitamine E est plus importante dans la bordure épithéliale (+52%, Fig. 10A) et au niveau du chorion (+48%, Fig. 10A) des souris KO.

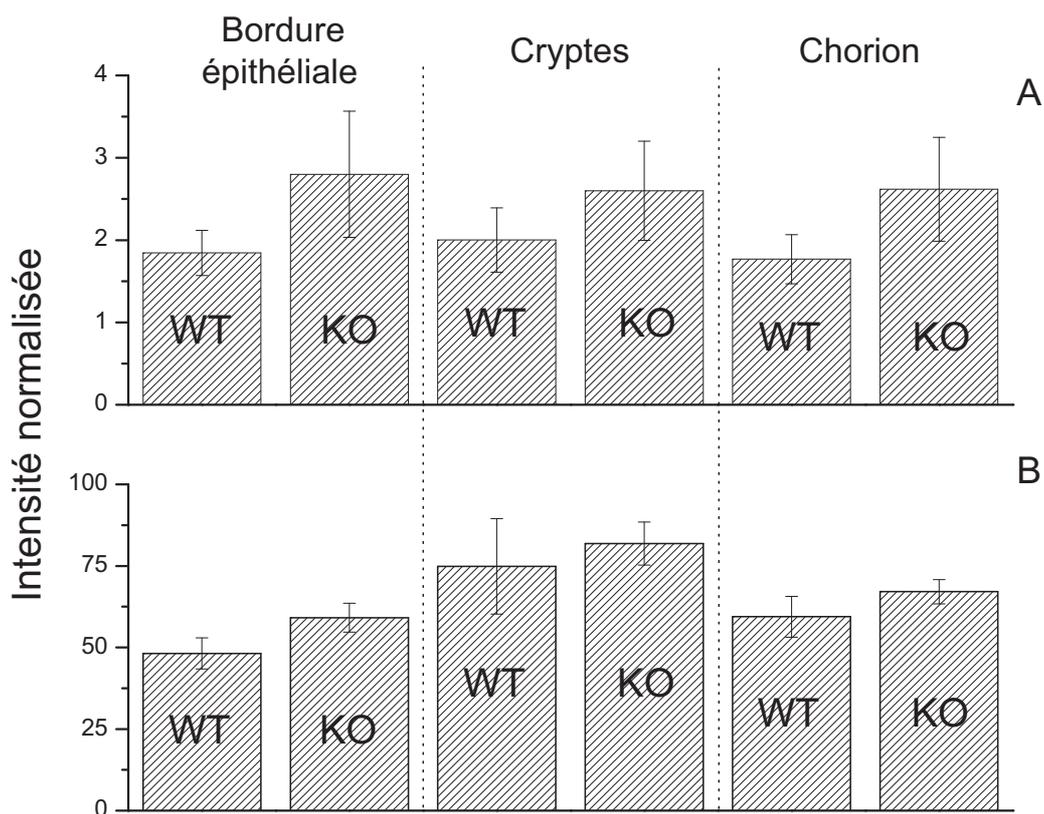


Figure 11 : Diagramme détaillant la moyenne des aires normalisées dans les trois régions : « bordure épithéliale », « cryptes » et « chorion », pour la vitamine E (A) et le carboxylate de l'acide gras C16:0 (B).

1.5.2. Résultats MALDI-TOF

À la suite de ces expériences, nous disposons donc de 3 images en mode d'ionisation positif et 3 images en mode d'ionisation négatif pour les côlons de souris WT et KO. Un spectre en mode d'ionisation positif et un spectre en mode d'ionisation négatif enregistrés sur une coupe de côlon WT sont présentés dans la figure 12.

En mode d'ionisation positif (Fig. 11A), la plupart des ions détectés le sont sous forme cationisée par un ion alcalin, sodium ou potassium. En effet la sphingomyéline contenant 34 carbones et une insaturation sur ses deux chaînes d'acide gras est détectée à m/z 725,5 ($[SM34:1+Na]^+$) et à m/z 741,4 ($[SM34:1+K]^+$). Les phosphatidylcholines sont les espèces dont les pics sont les plus intenses dans le spectre de masse. En effet, celles contenant 32 carbones sur les deux chaînes d'acide gras sont détectées autour de m/z 772,5 ($[PC32:0+K]^+$),

celles contenant 34 carbones à m/z 798,5 ($[PC34:1+K]^+$), les phosphatidylcholines avec 36 atomes à m/z 820,5 ($[PC36:4+K]^+$), et enfin, celles contenant 38 atomes de carbones sont détectées à m/z 848,5 ($[PC38:4+K]^+$). Des pics très intenses à m/z 476,9; m/z 492,9; m/z 671,9; m/z 687,9 et à m/z 703,9 n'ont pas été identifiés.

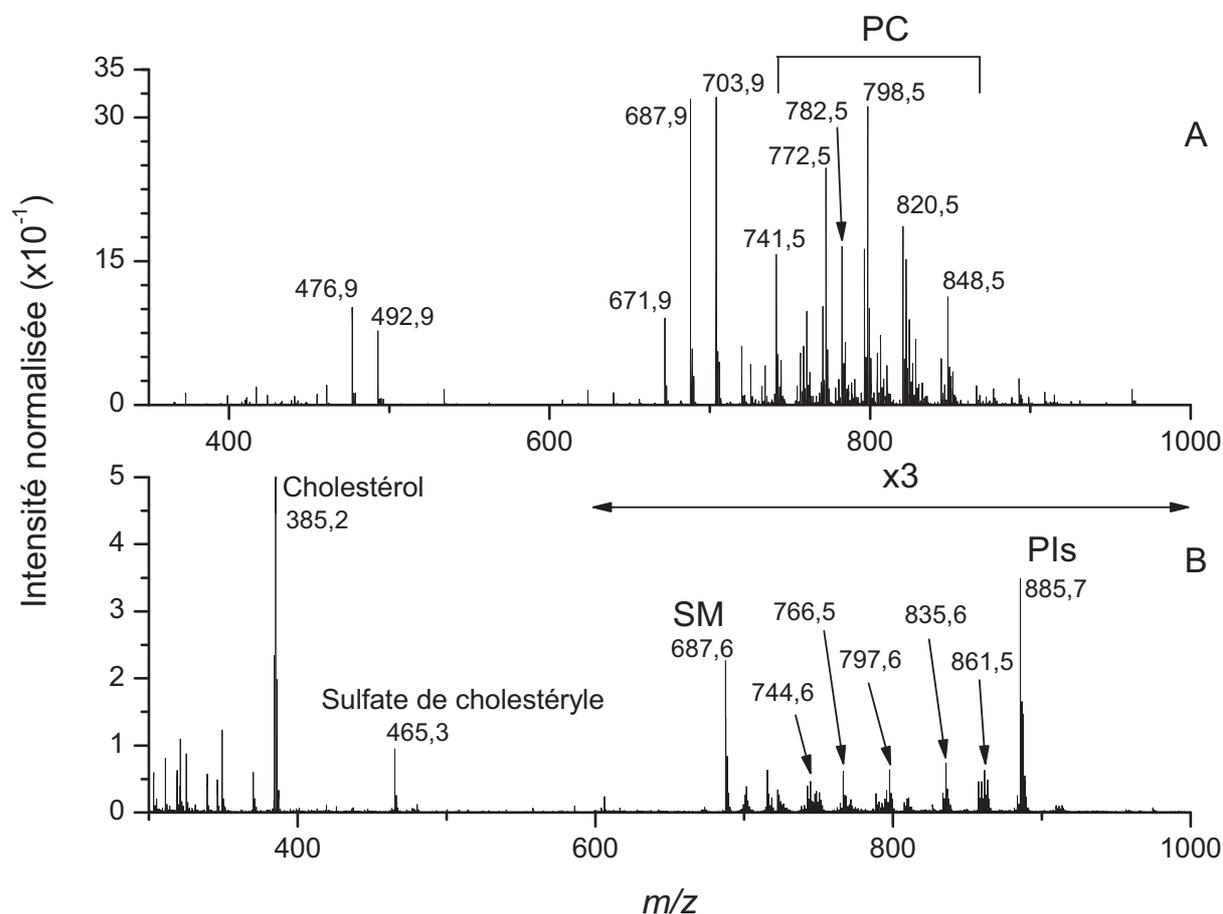


Figure 12 : Spectres MALDI-TOF enregistrés sur une coupe de côlon WT en mode d'ionisation positif (A) et en mode d'ionisation négatif (B).

En mode d'ionisation négatif (Fig. 11B), le pic le plus intense correspond au cholestérol à m/z 385,2. Le sulfate de cholestéryle est quant à lui détecté à m/z 465,3. Un fragment de la sphingomyéline 34:1 est détecté à m/z 687,6. Des phosphoéthanolamines sont détectées sous forme de massifs centrés autour des rapports m/z 744,5 ($[PE36:1-H]^-$) et m/z 766,5 ($[PE38:4-H]^-$). Les massifs centrés autour de m/z 835,6, m/z 861,5 et m/z 885,7 correspondent aux phosphoinositols contenant 34 carbones, 36 carbones et 38 carbones sur leurs deux chaînes d'acide gras respectivement. Enfin, le pic à m/z 797,6 pourrait correspondre à la forme déprotonée d'un triacylglycérol contenant 48 carbones et 4 insaturations ($[TG48:4-H]^-$).

Il n'a pas été possible de clairement identifier les différentes structures du côlon en imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF, la résolution spatiale offerte par cette technique étant assez faible pour ces échantillons. En effet, dans ces conditions, les coupes ne faisant que 1 à 2 mm de diamètre correspondent à 20 à 40 pixels seulement pour chaque dimension de l'image. Néanmoins, quelques acquisitions nous ont permis d'obtenir des images d'ions non détectés (ou très faiblement) en imagerie TOF-SIMS telles que l'acide arachidonique (C20:4) ou l'acide docosahexaénoïque (C22:6) présentés dans la figure 13.

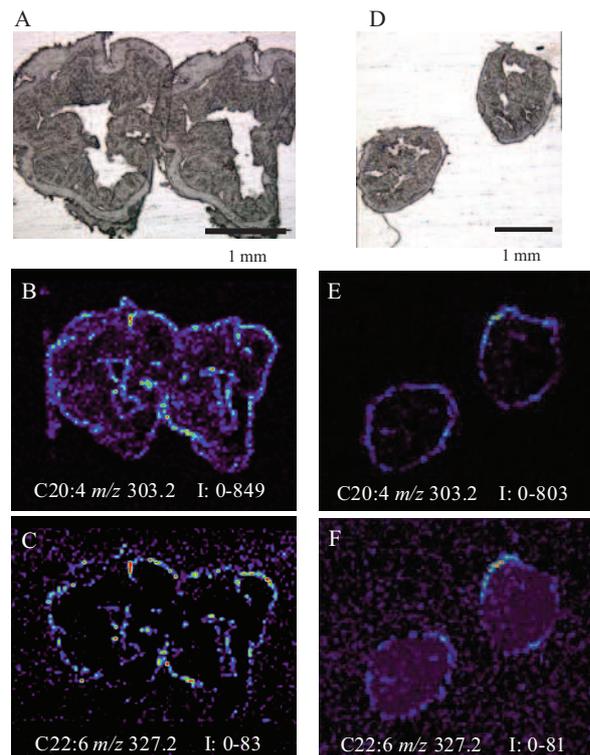


Figure 13 : Images MALDI-TOF en mode d'ionisation négatif de coupes de côlon de souris WT (A à C) et KO (D à F). A et D : images optiques des coupes de côlons analysées, l'échelle correspond à 1 mm. B et E : images de l'ion à m/z 303,2 correspondant à l'acide arachidonique (C20:4). C et F : images de l'ion à m/z 327,2 correspondant à acide docosahexaénoïque (C22:6). Les images de côlon de souris WT ont été enregistrées avec 107x116 pixels (taille de pixel de 50x50 μm) et les images de côlon de KO avec 106x106 pixels (taille de pixel de 50x50 μm). La valeur de l'intensité I indiquée en blanc sur chaque image correspond aux intensités minimales et maximales.

Afin de pouvoir comparer les spectres entre eux, et comme la taille des échantillons analysés n'était pas identique, nous avons extrait les spectres des régions correspondant aux coupes de côlon dans chaque image. L'intensité des spectres obtenus a ensuite été divisée par

le nombre de pixels que composait la région. Par ce procédé, nous avons pu aussi diminuer la contribution des pics de la matrice. Des spectres en mode d'ionisation négatif enregistrés sur des coupes de côlon de souris WT et sur des coupes de côlon KO avec les zones correspondantes sont présentés dans la figure 14.

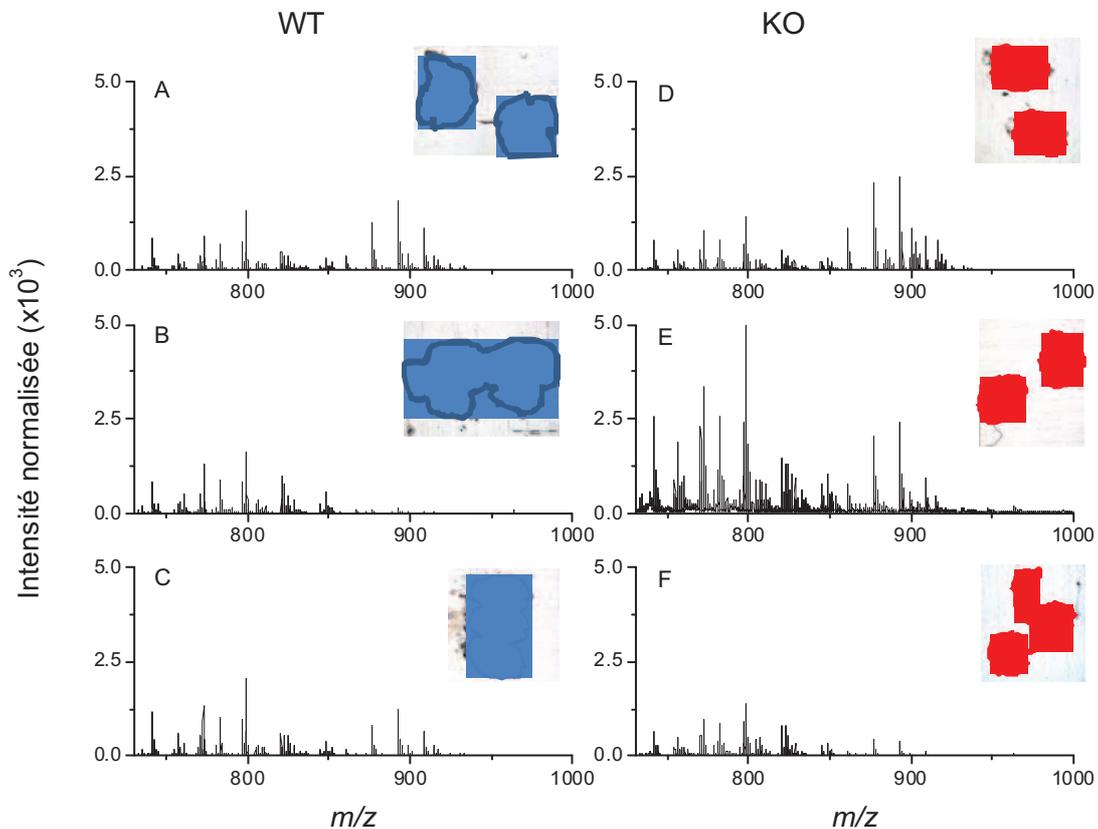


Figure 14 : Spectres MALDI-TOF en mode d'ionisation négatif extrait des régions enregistrées sur les coupes de côlon WT (A à C) et KO (D à F).

En comparant ces différents spectres, il s'est avéré que l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF de ces coupes de côlon de souris était moins reproductible que l'imagerie TOF-SIMS. En effet, nous avons observé de nombreuses variations entre les spectres d'un même groupe, que ce soit WT ou KO, comme l'illustre la figure 14. Il n'a donc pas été possible de comparer les spectres issus des coupes de côlon de souris WT de ceux issus des coupes de côlon KO.

1.5.3. Résultats des analyses statistiques

Cette partie de notre étude de la mucoviscidose par imagerie par spectrométrie de masse ne rentre pas dans le cadre de ma thèse puisque ce travail a entièrement été mené par Marc Brulet. Les résultats obtenus étant intéressants, je vais me contenter de vous les citer.

En parallèle du dépouillement « manuel » des analyses TOF-SIMS, un dépouillement statistique sur ces mêmes données a été mené en utilisant les logiciels Solo+MIA, et les versions PLS_Toolbox et MIA_Toolbox (www.eigenvector.com, Eigenvector Research, Wetatchee, WA) de Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA). Trois ensembles de données ont été analysés. Un premier correspondant aux images TOF-SIMS de côlon de souris KO, afin de caractériser les différentes structures. Un second, correspondant aux aires de pics sélectionnés d'après la littérature issus des spectres TOF-SIMS de la région des cryptes (ou glande de Liberkühn). Et enfin un troisième, correspondant aux aires de pics générées par un algorithme dit « algorithme génétique ». Sur les images, des analyses par composantes principales (PCA) ainsi qu'une analyse par « partitioning clustering » ont été effectuées. Sur les deux listes de pics, des analyses par composantes principales ainsi qu'une analyse de « clustering » hiérarchique ont été menées. Seuls les résultats des PCA sur les images et les spectres seront décrits.

Le principal objectif de l'analyse par PCA appliquée à l'imagerie par spectrométrie de masse est d'identifier des structures ayant un sens biologique par leur similarité spectrale. Dans cette étude, les 3 premières composantes principales ont été sélectionnées. La PC1 participe pour 20,90% à l'inertie totale (ce qui représente la quantité relative d'information contenue dans chaque composante) et est principalement due à l'augmentation de la concentration des carboxylates d'acide gras C14:0, C16:1 et C16:0 et la diminution de la concentration du C18:0 et du sulfate de cholestéryle. La PC2 participe pour 14,16% et est caractérisée par l'augmentation de la quantité d'un fragment des phosphoéthanolamines (m/z 140,03), d'un ion à m/z 259,07 (fragment de lipides sulfatés ou/et de phosphoinositol), et de l'acide gras C18:0 combiné à la diminution de la quantité d'un ion à m/z 168,07 (fragment de phosphatidylcholine et/ou de sphingomyéline). Enfin, la PC3 participe à l'inertie totale pour 9,89% et est caractérisée par l'augmentation de la concentration des carboxylates d'acide gras C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 et C20:4, de la vitamine E et du fragment à m/z 168,07 (fragment de phosphatidylcholine et/ou de sphingomyéline), ainsi que par la diminution de la quantité du fragment à m/z 259,07 (fragment de lipides sulfatés ou/et de phosphoinositol).

Les images des trois premières composantes principales peuvent être superposées. Le résultat est présenté dans la figure 15A. La couleur des pixels est déterminée par leur contribution dans chaque composante principale (PC1 en rouge, PC2 en verte et PC3 en bleue). Toutes les différentes structures peuvent être distinguées. Le chorion et la submucosa sont colorés en bleu-violet, ce qui indique que ces deux régions présentent une contribution positive à la PC3 et à la PC1 (à moindre mesure). La bordure épithéliale est divisée en deux régions, la première, colorée en bleu clair, est en contact avec l'épithélium et est caractérisée par une contribution positive aux PC2 et PC3, la seconde, en vert, est en contact avec la lumière de l'intestin, ceci est probablement dû à la sécrétion de mucus et est définie par une contribution positive à la PC2. Les cryptes (contenant les glandes de Lieberkühn) sont essentiellement colorées en jaune, indiquant une contribution aux PC1 et PC2. Finalement, quelques pixels vert foncé localisés à l'intérieur des cryptes suggèrent une contribution aux PC2 et PC3, ce qui peut être interprété par la présence de mucus secrété.

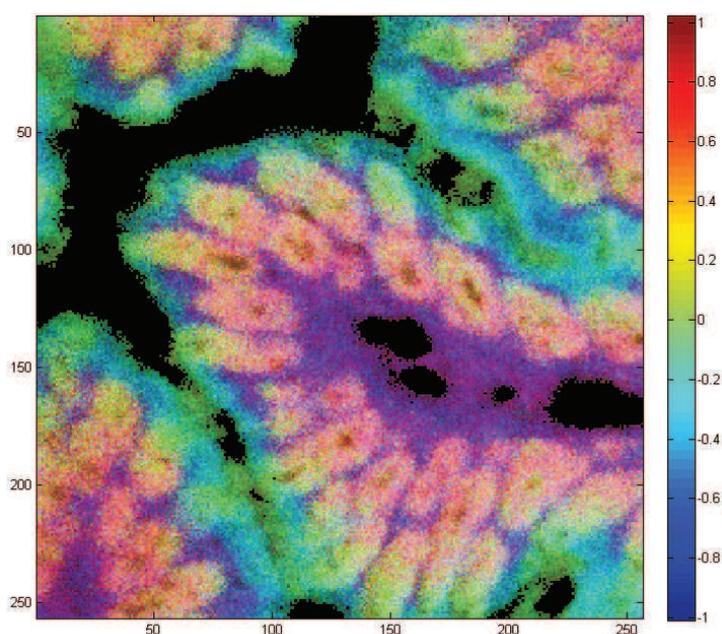


Figure 15 : Superposition des images des scores de PC1, PC2 et PC3. L'échelle de couleur représente la contribution de chaque pixel pour l'axe principal sélectionné. Rouge, vert et bleu indique une forte contribution positive des composantes PC1, PC2 et PC3 respectivement.

Afin d'établir une comparaison entre les coupes de côlon de souris WT et KO, les spectres extraits de la région correspondant aux glandes de Lieberkühn ont été analysés par PCA. Le choix de cette région est dû au fait que la protéine CFTR y est abondamment exprimée. Une première liste d'ions, issue de la littérature, a été soumise à une analyse PCA.

La figure 16 présente le biplot obtenu en superposant les individus avec les variables originales (les ions sélectionnés) dans un espace commun représenté par les plans principaux construit à partir des PC1 et PC2. Ces deux composantes portent la plus grande variance et représentent respectivement 41,49% et 20,91% de l'inertie totale. Les deux types d'échantillon (WT et KO) sont plutôt bien séparés par la première composante. La contribution principale de cette séparation est due à l'augmentation de la quantité relative dans les souris KO des carboxylates d'acide gras C16:1, C16:0, du sulfate de cholestéryle, d'un fragment de phosphatidyléthanoline (PE) à m/z 140,03, d'un fragment de phosphatidylinositol (PI) ou/et de sulfatide (ST) à m/z 259,07 d'un fragment de phosphatidylcholine (PC) à m/z 168,07, de cholestérol et de la vitamine E ainsi que de la diminution de la quantité de C18:2.

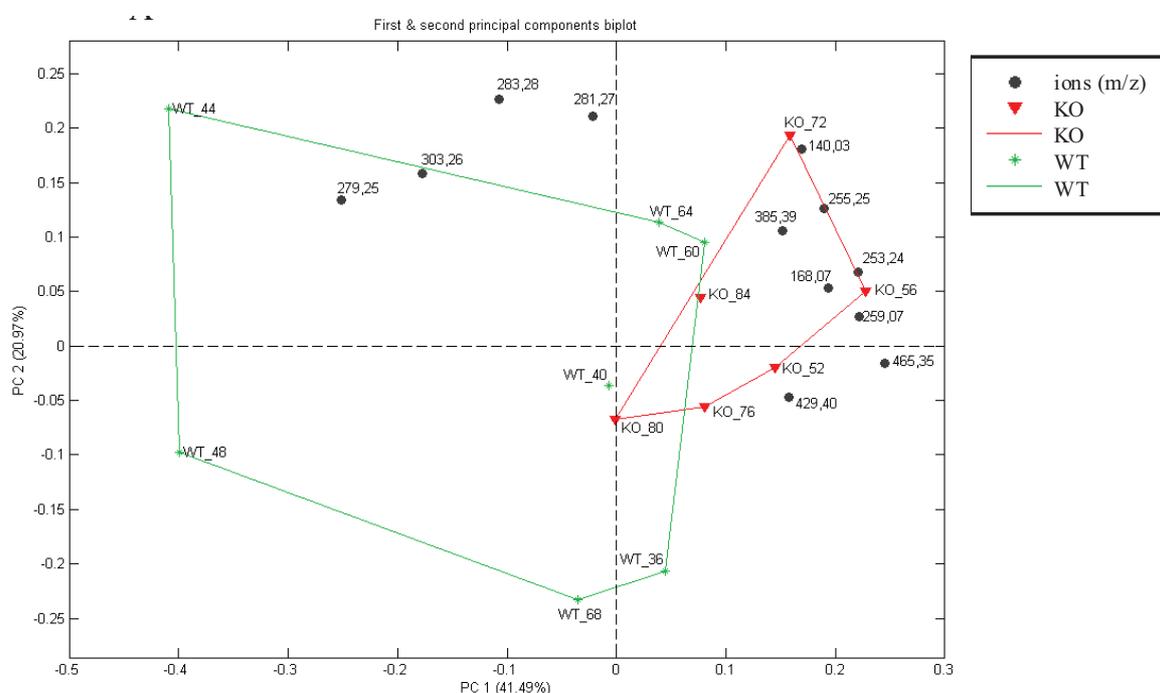


Figure 16 : Biplot des deux premières composantes principales obtenu avec la liste de pic issu de la littérature.

Une deuxième liste d'ion a été soumise à l'analyse PCA. Cette liste a été générée par un algorithme, dit « algorithme génétique », qui permet la sélection d'un petit nombre de variables dont la combinaison apporte la meilleure séparation des individus WT et KO. Les résultats obtenus sont présentés dans la **figure 17**. La séparation des souris WT et KO est encore plus évidente qu'avec la liste précédente. Ces résultats indiquent que les souris KO sont caractérisées par une augmentation de la quantité relative des carboxylates d'acides gras

C14:0 et C16:0, de la vitamine E et des ions fragment à m/z 109,99 et m/z 168,07 (fragment de PE, PC et SM).

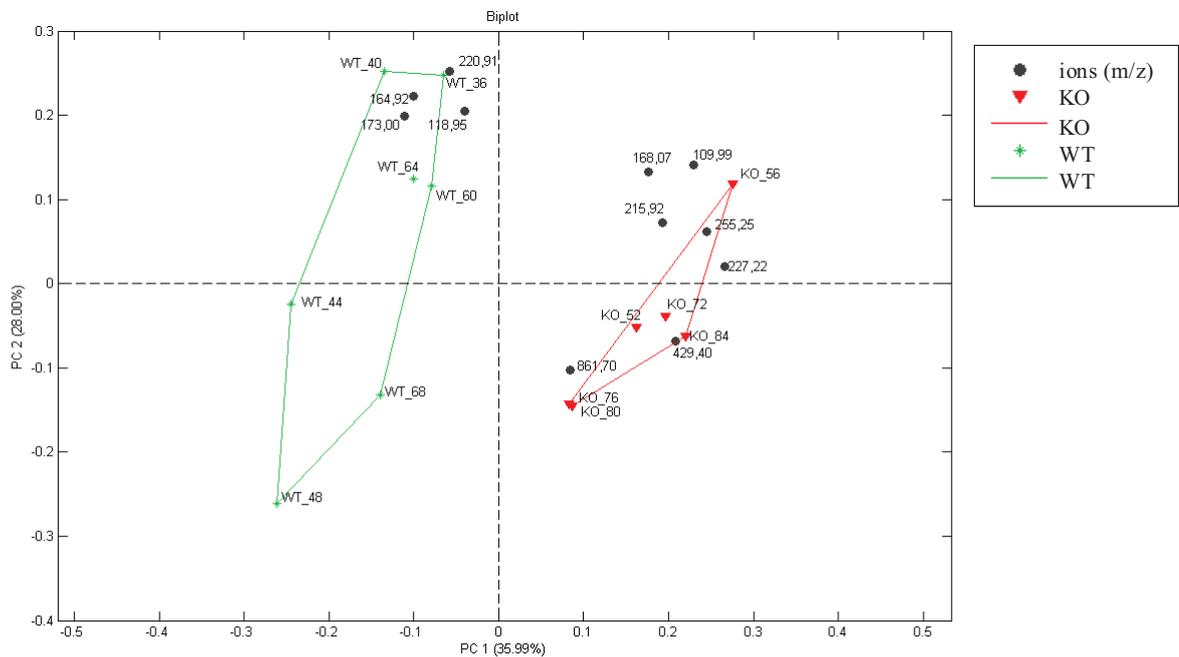


Figure 17 : Biplot des deux premières composantes principales obtenu avec la liste générée par l'algorithme génétique.

1.6. Discussion et conclusion

En étudiant le pancréas de souris $\Delta F508$, modèle de la mucoviscidose, par imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS, nous avons pu trouver quelques différences dans les profils lipidiques des deux types d'échantillon. Malgré tout, ces résultats ne sont pas significatifs puisque seul un échantillon de chaque a été analysé. De plus, un doute subsiste quant à la comparaison d'une coupe transversale (pancréas sain) et d'une coupe longitudinale (pancréas KO). Afin de consolider ces résultats, il faudrait réitérer ces expériences avec un nombre plus conséquent d'échantillons et réaliser des coupes dans le même plan.

Quant à l'étude sur le côlon, nous avons combiné deux techniques, l'imagerie TOF-SIMS et l'imagerie MALDI-TOF, avec des méthodes d'analyse statistique univariées (dépouillement « manuel ») et multivariées pour fournir une cartographie détaillée du côlon de souris et afin d'établir des différences possibles dans la composition lipidique entre souris WT et KO. Nous avons donc pu distinguer des profils lipidiques spécifiques à différentes

structures histologiques de la muqueuse du côlon. De plus, de légères différences ont pu être observées entre les souris WT et KO, notamment au niveau de certains acides gras, de la vitamine E (méthode univariée et multivariée) et de quelques fragments de phospholipides (méthode multivariée).

Nos résultats sont en accord avec une étude récente basée sur l'imagerie TOF-SIMS de duodénum de rat. Dans cette étude, l'acide gras C16:0 et la tête polaire des phosphatidylinositols (m/z 241) sont principalement détectés dans les cryptes, tandis que l'acide gras C18:2 n'est présent qu'en faible quantité dans cette région mais détecté de manière intense dans les villosités. L'acide gras C18:1, quant à lui, n'est présent que dans ces villosités et le C18:0 est détecté partout de manière homogène.¹⁷ Dans notre étude, l'acide gras C18:2, un acide gras essentiel, a été principalement détecté dans la bordure épithéliale. Même si la majeure partie de l'absorption prend place au niveau du jejunum, la présence d'un acide gras essentiel dans cette zone peut indiquer une intense activité d'absorption. Il a d'ailleurs été montré que les acides gras ayant une longueur de chaîne moyenne, comme les C18, peuvent être absorbés au niveau du côlon.¹⁸

Les différences de composition lipidique entre les souris WT et KO déterminées lors de notre étude se limitent à l'augmentation de la quantité relative de l'acide gras C16:0 et de la vitamine E, principalement dans la bordure épithéliale, des souris KO. L'augmentation de la quantité des C16:0 peut être expliquée par l'augmentation de la saturation des lipides membranaires, conséquence de la diminution de la quantité des espèces polyinsaturées. D'après la littérature, les anomalies lipidiques associées à la mucoviscidose consistent principalement en la diminution de la quantité des acides essentiels et polyinsaturés dans le sang¹⁹ et les tissus^{19,20} des patients, des animaux^{13,20} et des modèles cellulaires,²¹ avec une tendance à un déséquilibre en faveur de la biosynthèse des séries n-6.^{11,21} Dans notre étude, nous n'avons pas noté de différences significatives dans la quantité relative des acides gras polyinsaturés entre souris WT et KO. Néanmoins, il convient de noter que la seule référence sur un déséquilibre des acides gras dans l'intestin correspond à l'iléon.²⁰ De plus, les déséquilibres observés correspondaient à des homogénats de tissus total, alors que dans notre cas, il s'agit de régions bien définies du côlon.

L'augmentation du signal correspondant à la vitamine E peut être le signe d'un stress oxydant. En effet, la vitamine E, ou α -tocophérol, est le principal agent antioxydant membranaire liposoluble. Elle permet de piéger les espèces radicalaires, comme les peroxydes,

par transfert de H^\bullet (figure 18). Néanmoins, l'augmentation de la quantité relative de la vitamine E principalement au niveau de la bordure épithéliale peut indiquer aussi un défaut d'absorption de ce composé. En effet, plusieurs études ont déjà démontré que le déficit en vitamine E dans le sérum de patients atteints de la mucoviscidose est dû à une malabsorption intestinale.^{22,23}

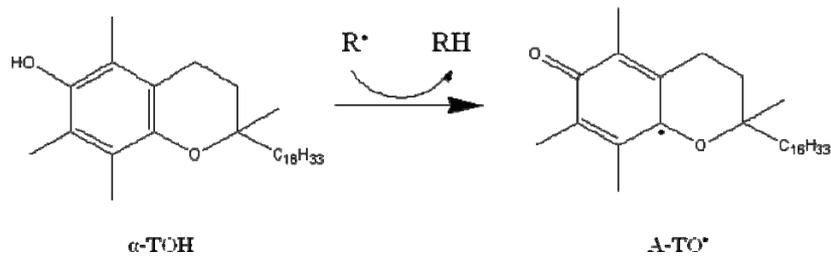


Figure 18 : Réactivité de l' α -tocophérol (α -TOH) vis-à-vis d'une espèce radicalaire.

Si les différences observées peuvent révéler un dysfonctionnement épithélial, cela reste encore à confirmer avec un plus grand nombre d'échantillon. Néanmoins, l'absence de différences importantes peut aussi être due au fait que la plupart des fonctions d'absorption ont lieu dans l'intestin grêle, les conséquences de la malabsorption devraient donc être moins visible dans le côlon.

Les analyses par composantes principales des images obtenues par imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS ont permis de distinguer les différentes structures des tissus en fonction de leur profils lipidiques sans avoir recours à des techniques comme les colorations histologiques.^{24,25} De plus, en dépit du nombre limité d'échantillons, la PCA sur les spectres TOF-SIMS a été capable d'établir un ensemble de variables en mesure de séparer les deux types d'échantillons. Cela confirme le fait que les principales informations, dans un ensemble de données, ne sont généralement pas portées par une seule variable, mais par un groupe de variables. L'ensemble discriminant des variables doit donc être considéré comme une signature lipidique unique.

2. Etude de l'absorption intestinale des lipides

Les lipides représentent environ 40% des calories ingérées par la population des pays occidentaux, alors que les recommandations diététiques sont 5 à 10% plus basses. Cet apport lipidique excessif associé à un déséquilibre qualitatif favorise fortement le développement de l'obésité et des maladies associées. Différentes étapes de l'absorption des lipides, comme la formation des gouttelettes lipidiques, l'hydrolyse des lipides par les entérocytes (dans la lumière intestinale) et leur transport vers les compartiments intracellulaires où les acides gras et stérols sont transformés en lipides neutres, méritent donc d'être étudiées. Dans ce travail, que nous avons réalisé en collaboration avec Christine Coméra de l'INSERM de Toulouse (INSERM U563, BP 3028, F-31024 Toulouse cedex 3), nous rapportons l'utilisation de l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS pour comprendre ces changements d'états chimiques et physiques des lipides durant le processus de leur absorption intestinale.

2.1. Introduction

Quantitativement, les composants lipidiques de l'alimentation les plus importants sont les triacylglycérols (TAG). Chez l'homme, son apport devrait être de 100 g par jour voir plus si une activité physique est pratiquée. De plus, l'alimentation apporte des phospholipides, environ 5 g par jour, ainsi que dans une moindre mesure, des glycolipides, des stérols et des vitamines D, E, A et K. Le système digestif est capable de digérer les TAGs et de les absorber avec plus de 95% d'efficacité.²⁶

Les TAGs représentent souvent plus de 95% des huiles raffinées et environ 99% de la graisse provenant du tissu adipeux animal. Leurs propriétés physiques sont déterminées par leur composition en acides gras ainsi que par la position qu'ils occupent sur le squelette glycérol dont les trois carbones permettent des positions de liaison des acides gras distinctes. Ces trois positions sont nommées *sn*-1, *sn*-2 et *sn*-3. Un TAG avec les trois mêmes acides gras est rarement retrouvé dans la nature, la norme étant de deux à trois acides gras différents.

Dans l'alimentation humaine, la longueur de chaîne des acides gras peut varier de deux (C2) à vingt-quatre (C24) atomes de carbones comprenant, ou non, des insaturations (jusqu'à

six double liaisons). Le nombre de combinaison possible de TAGs est de n^3 , où n est le nombre d'acides gras présents. Ainsi, avec seulement 10 acides gras différents, le nombre total de combinaisons possibles de TAG s'élèvera à 1000. Les lipides alimentaires doivent d'abord être hydrolysés avant leur redirection vers leurs tissus cibles (tissus adipeux et musculaires principalement).

2.1.1. Emulsification, hydrolyse et formation des micelles

La première étape, qui a lieu dans l'estomac, consiste en la dispersion des lipides alimentaires en une fine émulsion (formation de micelles). Cela crée une interface lipide-eau, ce qui permettra l'interaction entre les lipases, solubles dans l'eau, et les lipides, insolubles dans l'eau.²⁷

La seconde étape est l'hydrolyse des TAGs par des lipases gastriques spécifiques. Chez l'homme, cette activité est présente dans le suc gastrique tandis que chez les rongeurs, la principale activité provient des lipases sécrétées par les glandes salivaires. Ces enzymes hydrolysent partiellement les TAGs en diacylglycérols (DAGs) et en acides gras libres (FA). Elles hydrolysent préférentiellement la liaison ester en *sn*-3 entraînant la formation de *sn*1,2-DAG.²⁸ En effet l'activité envers le *sn*-3 est deux fois plus élevée que vers le *sn*-1.²⁹ Chez un homme sain, les lipases gastriques mènent à l'hydrolyse de 10 à 30% des TAGs ingérés.

Cette émulsion lipidique partiellement hydrolysée entre ensuite dans l'intestin sous la forme de fines gouttelettes lipidiques (moins de 0,5 μm de diamètre). L'entrée de ces produits de dégradation des TAGs entraîne la libération des acides biliaires, la sécrétion de lipase pancréatique et de cholécystokinine.³⁰

Les acides biliaires, qui sont libérés de la vésicule biliaire ou directement du foie, sont des détergents forts et vont émulsionner les matières grasses et ainsi diminuer la taille des gouttelettes. Cette action a pour effet d'augmenter la surface disponible. Les lipases pancréatiques sont sécrétées dans le duodenum en réponse à l'hormone cholécystokinine et vont se lier à la surface des gouttelettes lipidiques à l'aide de co-lipase afin de digérer les TAGs. Cette dégradation est régio-spécifique et conduit, idéalement, à la formation de *sn*2-monoacylglycérol (*sn*2-MAG) et d'acides gras libres.³¹ La majeure partie de la digestion des TAGs résulte de cette hydrolyse par les lipases pancréatiques.

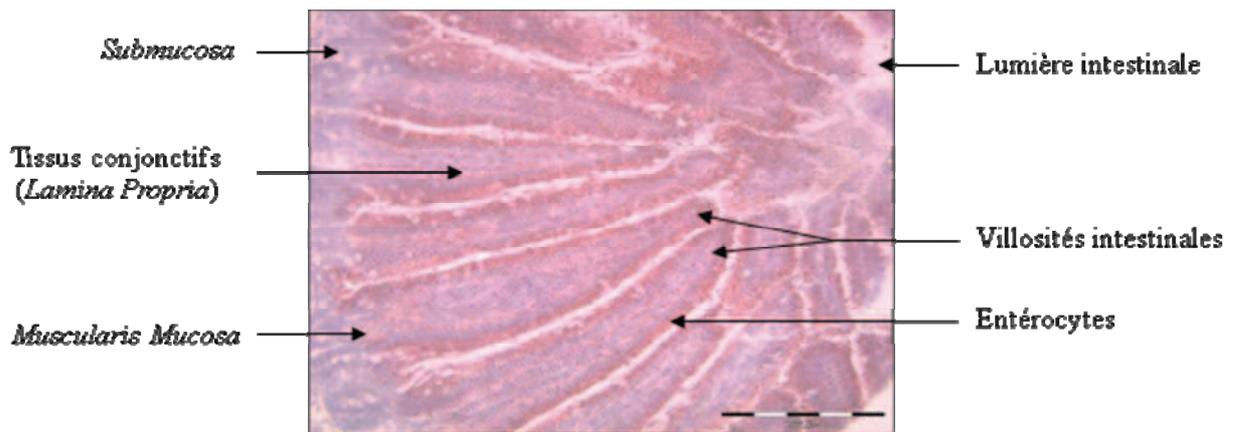


Figure 19 : Coupe histologique de duodénum de souris colorée à l'Oil Red-O. L'échelle correspond à 200 μm .

La troisième étape est la désorption et la dispersion des lipides insolubles sous une forme absorbable par les entérocytes (Fig. 19). Les lipides hydrolysés sont solubilisés dans la lumière de l'intestin par au moins deux types de particules : les micelles de sels biliaires et les vésicules unilamellaires, composées principalement de phospholipides. Ces particules ont pour rôle de délivrer les lipides digérés à la surface de la membrane des entérocytes.

2.1.2. Sort des monoacylglycérols et des acides gras libres

Les acides gras libres ainsi que les *sn2*-MAG résultant de l'hydrolyse pancréatique des TAGs vont ainsi être absorbés soit par diffusion passive à travers la bicouche lipidique de la membrane des entérocytes, soit par transport actif faisant intervenir des protéines spécifiques situées dans la membrane.³² Une fois dans le cytoplasme, les acides gras libres, ainsi que les *sn2*-MAG, doivent être liés à une protéine. En effet s'ils ne l'étaient pas, ils pourraient perturber les membranes cellulaires, ce qui pourrait potentiellement mener à la mort de la cellule.³³ Les acides gras libres vont donc être liés soit à la protéine I-FABP (intestinal-type Fatty Acid-Binding Protein) soit à la protéine L-FABP (liver-type Fatty Acid-Binding Protein). Les *sn2*-MAG, vont, eux, se lier à la protéine L-FABP. Ils seront ensuite transloqués (transportés) au niveau du réticulum endoplasmique des entérocytes.

Il existe un autre mécanisme permettant de livrer les acides gras libres issus de l'alimentation au réticulum endoplasmique. Il s'agit de leur acylation par la protéine FATP4 (Fatty Acids-Transport Protein 4) qui est localisée à la surface du réticulum. De plus, il a été

démontré que cette protéine peut aussi activer les acides gras libres en FA-CoA.³⁴ Ils peuvent alors être transportés au réticulum endoplasmique par les protéines L-FABP ou par la protéine liant l'acyl-CoA (« acyl-CoA-binding protein »).³⁵ La Figure 20 résume ces différentes étapes.

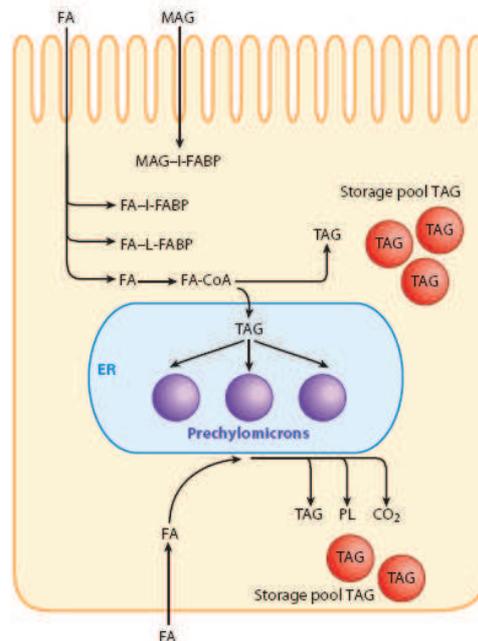


Figure 20 : Schéma résumant les différentes étapes de l'absorption des acides gras libres et des *sn*2-MAG ainsi que leur conversion en TAGs. Extrait de la référence 32.

Les acides gras libres et les *sn*2-MAG vont être tous les deux convertis en TAG par le système enzymatique complexe de synthèse lipidique dans le réticulum endoplasmique. Cette voie de synthèse est résumée dans la figure 21. Le *sn*2-MAG est acétylé par la monoacylglycérol acyltransférase (MGAT) pour donner le *sn*1,2-MAG et le *sn*2,3-MAG. Ces deux produits vont ensuite être acétylés par l'acyl-CoA: diacylglycérol acyltransférase (DGAT) et donner le produit final, le TAG.^{26,36} Ils seront stockés dans la lumière du réticulum sous la forme de particules riches en lipides, composées principalement de TAG et d'esters de cholestéryle. Elles vont alors fusionner avec les chylomicrons primordiaux, particules très denses constituées d'apoB48, de phospholipides, de cholestérol et d'une manière plus mineure, de TAG et d'ester de cholestérol.^{37,38} Cette fusion donnera naissance au pré-chylomicron.

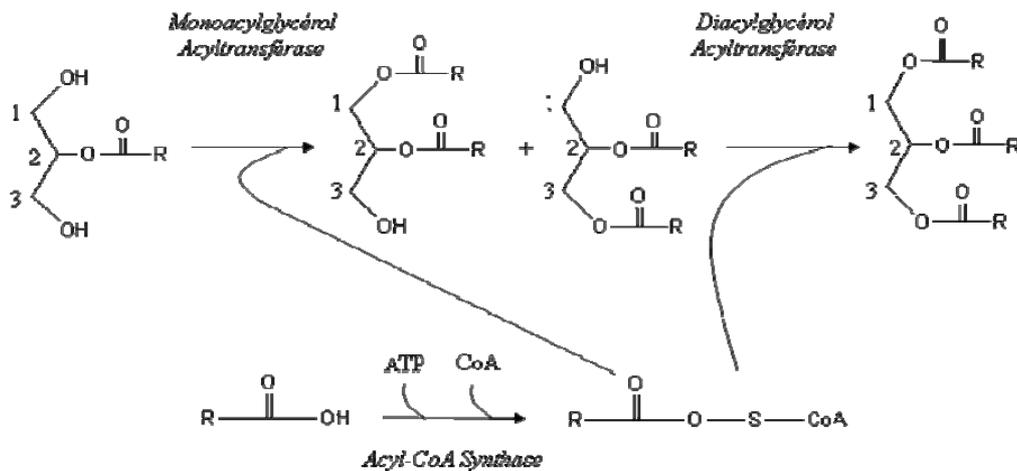


Figure 21 : Principale voie de synthèse des TAGs à partir de *sn*2-monoacylglycérol dans le réticulum endoplasmique des entérocytes.

Il arrive, lors de grands apports lipidiques, que les TAGs synthétisés du côté cytosolique du réticulum endoplasmique forment des gouttelettes qui seront stockées (« Storage pool TAG »).³⁹ Ces gouttelettes de stockages de TAG pourront, par la suite, être éliminées par l'action des lipases pancréatiques, les acides gras ainsi libérés seraient alors transportés par la veine porte.⁴⁰

Cet ensemble de pré-chylomicron est transporté vers l'appareil de Golgi par les vésicules de transport des pré-chylomicrons (« prechylomicron transport vesicles », PCTVs).^{41,42,43,44} La taille de ces corps lipidiques est d'environ 250 à 1000 nm.⁴³ La maturation des pré-chylomicrons se fait par l'ajout de la protéine apoAI dans l'appareil de Golgi.⁴⁵ Les chylomicrons matures seront exportés et secrétés au niveau de la membrane basolatérale (du côté du tissu conjonctif) des entérocytes et iront rejoindre la circulation *via* le canal lymphatique thoracique.

Cette étape de conversion des acides gras libres et des *sn*2-MAG en TAG est indispensable d'une part pour empêcher leur effet perturbateur sur les membranes et d'autre part pour permettre leur inclusion dans l'une des lipoprotéines la plus riche en TAG, le chylomicron.

2.2. Objectif de l'étude

De manière générale, les études traitant de la digestion et de l'absorption des lipides sont menées à l'aide de techniques chromatographiques telles que la GC ou l'HPLC en phase inverse couplée à la spectrométrie de masse. Ces méthodes apportent des informations très précises sur l'identité des lipides et sur leur quantité mais n'apportent aucune information sur leur localisation tissulaire.

Tous ces mécanismes d'hydrolyse et d'absorption entraînent la formation de particules de taille, de composition et de localisation différente, l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS peut donc, ici, apporter de précieuses informations.

2.3. Protocole opératoire

2.3.1. Préparation des échantillons

Notre de choix s'est porté sur l'étude de duodénum de souris. Ce modèle animal a l'avantage d'être facilement disponible (souris gracieusement fournies par Sabine De La Porte, Institut Alfred Fessard). Quatre souris âgées de trois semaines ont donc été traitées par voie orale avec 200 μ L d'huile de tournesol enrichie en cholestérol (10 mg/mL). Elles ont été sacrifiées immédiatement après l'ingestion (souris T₀ ou témoin) ou après 30 minutes, 1 heure et 4 heures. Le duodénum de chaque animal a été immédiatement prélevé, lavé au PBS et congelé dans de l'azote liquide. Des coupes de 12 μ m d'épaisseur ont été préparées avec un cryostat Leica CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre, France) à -20°C. Des coupes sériées ont aussi été préparées pour des colorations histologiques à l'Oil Red-O. Si la coupe est destinée à une analyse TOF-SIMS, elle est déposée sur un disque de silicium, et si elle est destinée à la coloration histologique, elle est déposée sur une lame de verre.

2.3.2. Analyses TOF-SIMS

Avant analyse, les coupes ont été légèrement déshydratées sous un vide de quelques hectopascals. Des images de 500x500 μ m² ont été enregistrées en modes d'ionisation positif et négatif avec une résolution spatiale de 2 μ m (256x256 pixels) et une dose d'ions primaires

de 5×10^{11} ions.cm⁻². Des images en mode « burst alignement » ont été également acquises en modes d'ionisation positif et négatif, avec un champ de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, une résolution spatiale de 390 nm (256x256 pixels), et une dose d'ions primaires de 2×10^{12} ions.cm⁻². Dans les deux conditions, les agrégats d'ions Bi₃⁺ ont été sélectionnés, et le canon à électrons a été utilisé.

2.3.3. Analyse histologique

Les coupes déposées sur la lame de verre ont été colorées d'après le protocole suivant. Les lames ont d'abord été colorées dans une solution diluée d'Oil Red-O (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) pendant 10 minutes (coloration rouge des lipides) et lavées à l'isopropanol 60% pendant 5 minutes et à l'eau pendant quelques secondes. Elles ont ensuite subi un bain d'hématoxyline de Harris (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) pendant 1 minute (coloration bleue des noyaux des cellules), puis ont été lavées à l'eau courante et à l'eau distillée. Pour garantir leur conservation, les lames ainsi colorées ont finalement été montées sous lamelles avec un gel de glycérol-gélatine.

Les lames ont été observées avec un microscope photonique Olympus BX51 (Olympus, Rungis, France) équipé d'une série d'objectifs allant de x1,25 à x50 et piloté par le logiciel Cell^B (Soft Imaging System GmbH, Münster, Allemagne).

2.4. Résultats

Pour chaque coupe de duodénum de souris, nous avons acquis de larges images à une résolution spatiale de $2 \mu\text{m}$, la faible fluence nous le permettant, les images en modes positif et négatif étant enregistrées au même endroit. Ce « grossissement » nous a permis d'observer les changements de composition lipidiques globaux qui s'opèrent au cours de la digestion. Les images TOF-SIMS à forte résolution spatiale (390 nm) ont été enregistrées en mode d'ionisation négatif avec une dose d'ions primaires élevée. Grâce au faible champ de ces images, seulement $100 \times 100 \mu\text{m}^2$, nous avons pu distinguer la couche d'entérocytes du tissu conjonctif des villosités intestinales. Les spectres de ces deux zones ont donc été extraits et ainsi comparés tout au long de la digestion et de l'absorption des lipides.

2.4.1. Analyses histologiques

La figure 4 présente les résultats des colorations histologiques à l'Oil-Red-O pour les coupes de duodénum de souris sacrifiées à T0 (Fig. 22A), T30min (Fig. 22B), T1h (Fig. 22C) et à T4h (Fig. 22D). On distingue clairement les différentes structures du duodénum (cf. Figure 1). Sur les coupes T0, aucune gouttelette n'est visible. A T30min, les gouttelettes lipidiques sont principalement situées dans les entérocytes. A T1h, elles sont présentes dans les entérocytes mais aussi dans le tissu conjonctif. Enfin à T4h, elles sont distribuées en grande quantité dans tout le tissu.

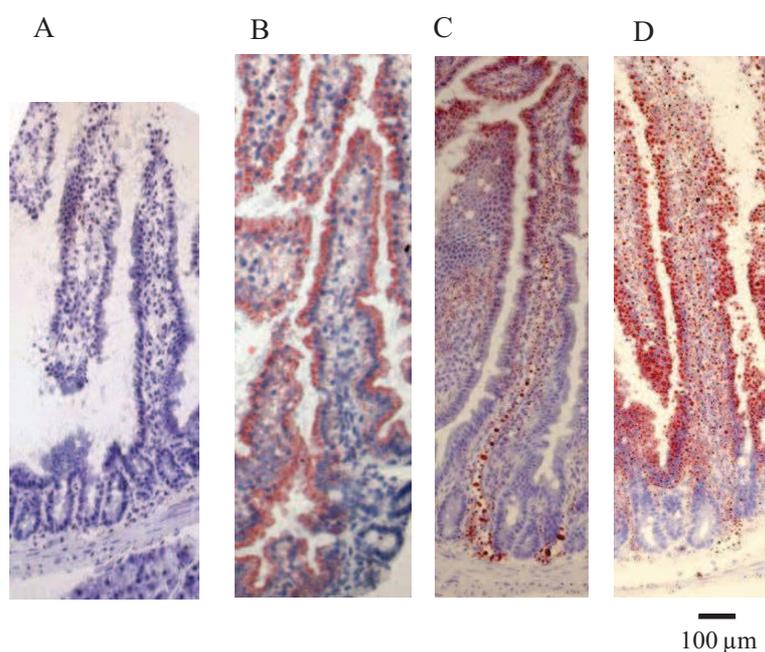


Figure 22 : Images optiques de coupe de côlon de souris sacrifiées à T0 (A), à T30min (B), à T1h (C) et à T4h (D) après ingestion d'huile de tournesol et colorées à l'Oil-Red-O.

2.4.2. Profil lipidique de l'huile de tournesol

Avant toute analyse TOF-SIMS des coupes de tissus, il a été nécessaire d'analyser l'huile de tournesol enrichie en cholestérol (10 mg/mL) pour en connaître le profil lipidique. Les spectres en modes d'ionisation positif et négatif de l'huile diluée au 1/20^{ème} dans du chloroforme sont présentés en figure 23.

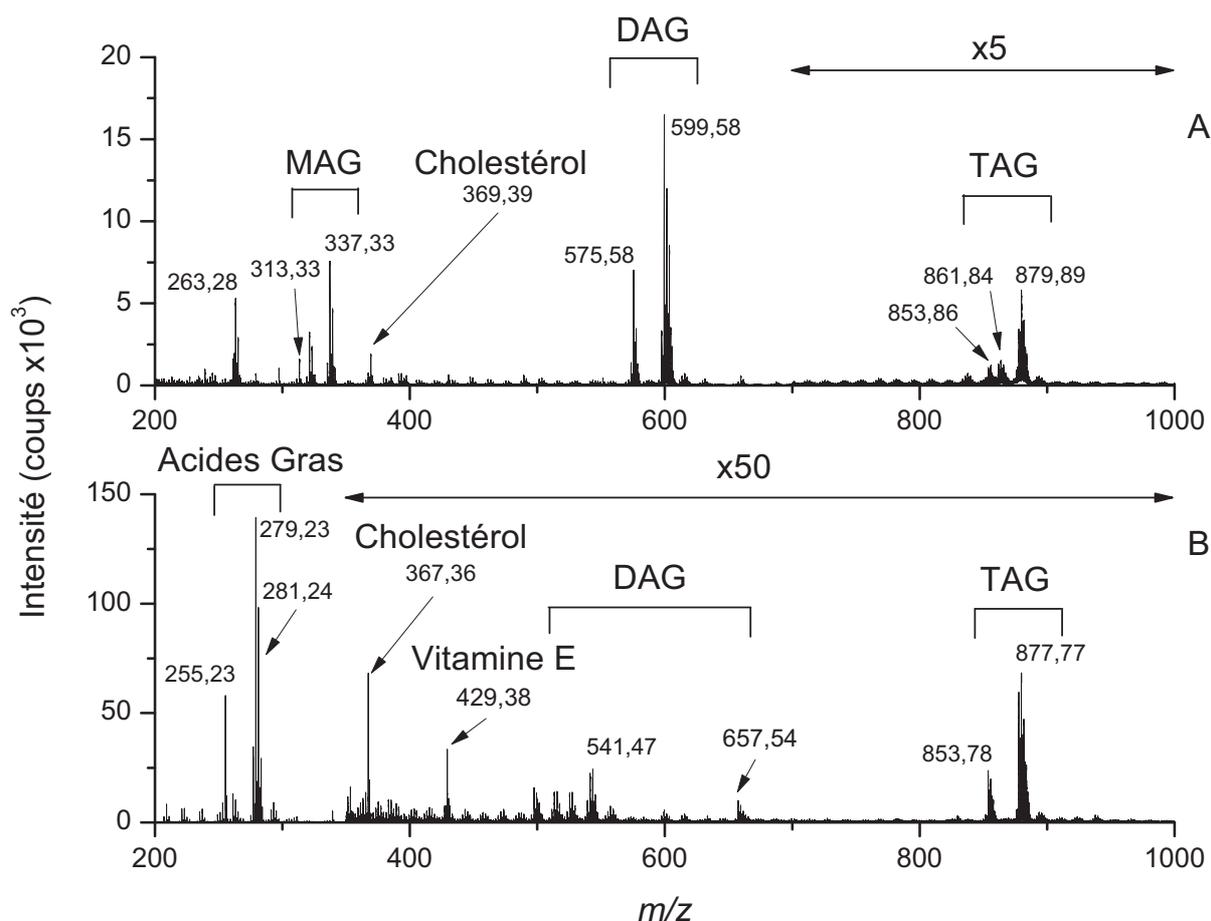


Figure 23 : Spectres de masse TOF-SIMS de l'huile de tournesol enrichie en cholestérol en modes d'ionisation positif (A) et négatif (B).

En mode d'ionisation positif (Fig.23A), les ions des monoacylglycérols (MAG) sont détectés à m/z 313,33 et 337,33 correspondant respectivement aux ions $[M+H-H_2O]^+$ des MAG C16:0 et MAG C18:2, c'est-à-dire, comportant une chaîne d'acide gras composée de 16 carbones sans insaturation et une chaîne d'acide gras composée de 18 carbones et 2 insaturations. L'ion détecté à m/z 369,39 peut être attribué à l'ion $[M+H-H_2O]^+$ du cholestérol. Deux massifs dominant le spectre peuvent être distingués. Ils correspondent aux forme protonées ($[M+H]^+$) et déshydratées ($[M+H-H_2O]^+$) des DAG, comportent respectivement 34 et 36 atomes de carbone sur les deux chaînes d'acides gras, et sont centrés sur les ions à m/z 575,58 (DAG C34:2) et à m/z 599,58 (DAG C36:4). Enfin, dans les rapports masse-sur-charge plus élevés, on distingue plusieurs massifs correspondant aux triacylglycérols. Les TAG comportant 50 atomes de carbones sur les trois chaînes d'acides gras sont détectés sous leur forme cationisée par le sodium. Ce massif est centré autour de l'ion à m/z 853,86, correspondant au TAG C50:2. Les TAG comportant 52 atomes de carbone

sont détectés sous la forme protonée, centrée autour de l'ion à m/z 861,84 (TAG C52:1), ou cationisée par le sodium, centrée autour de l'ion à m/z 879,89 (TAG C52:3).

En mode d'ionisation négatif (Fig. 23B), le spectre est dominé par les ions carboxylates d'acides gras C16:0 (m/z 255,23), C18:2 (m/z 279,23), C18:1 (m/z 281,24), et C18:0 (m/z 283,22). Les pics à m/z 367,36 et m/z 429,38 peuvent être attribués respectivement à un fragment du cholestérol ($[M-H-H_2O]^-$) et à la vitamine E déprotonée ($[M-H]^-$). Les ions déprotonés $[M-H]^-$ des TAG contenant 52 carbones et 54 carbones sur les trois chaînes d'acides gras, sont détectés respectivement autour des rapports m/z 853,78 (TAG C52:4) et m/z 877,77 (TAG C54:6). Les deux ions à m/z 541,47 et à m/z 657,54 n'ont pas été identifiés.

Cette huile de tournesol est composée presque essentiellement de lipides neutres, de cholestérol et de vitamine E. Les MAG et les DAG peuvent être issus de la fragmentation des TAG,⁴⁶ il est donc impossible de savoir, uniquement avec des spectres TOF-SIMS, s'ils proviennent de l'huile de tournesol ou s'il s'agit effectivement de fragments. D'après la littérature, l'huile de tournesol est composée essentiellement de TAG et de vitamine E. Ces TAG sont composés majoritairement des acides gras C18:2 (60,2 %), C18:1 (21,9 %), C16:0 (6,2 %) et C18:0 (4,8 %).⁴⁷ Ces proportions sont à peu près conservées dans le spectre en mode d'ionisation négatif et les pics correspondants aux MAG et DAG en mode positif sont donc des fragments des TAG.

2.4.3. Analyse TOF-SIMS à une résolution de 2 μ m

Dans un premier temps, nous avons analysé une première série d'expériences constituée d'acquisitions de 500x500 μ m² à une résolution de 2 μ m des coupes de duodénum des souris sacrifiées aux différents temps. Sur la figure 6 sont présentés les spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif. Pour plus de clarté, ils sont affichés avec la même intensité. Les aires des principaux pics ont été mesurées et leurs valeurs à T30min, T1h et T4h ont été divisées par leurs valeurs à T0. Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Entre les spectres enregistrés sur les coupes T0 (Fig. 24A) et T4h (Fig. 24D), de nombreuses variations sont observées. En effet, la zone dite MAG, contenant principalement les formes $[M+H-H_2O]^+$ des monoacylglycérols avec des chaînes d'acides gras de 18 carbones, voit son intensité augmenter au fur et à mesure de la digestion. Tout comme la zone

DAG, dominée par les $[M+H-H_2O]^+$ des diacylglycérols MAG C34 et MAG C36, et la zone TAG représentée par les triacylglycérols TAG C52 et C54 cationisés par le sodium et les TAG C56 protonés.

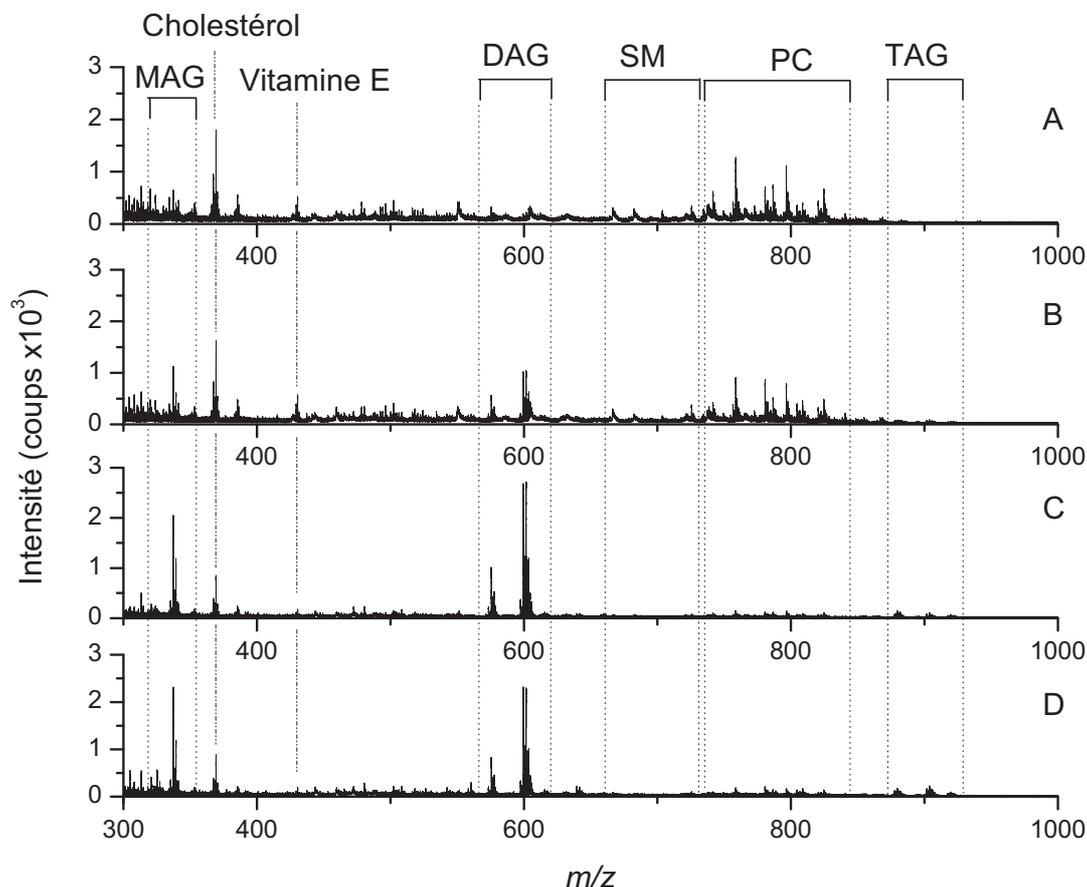


Figure 24 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif enregistrés sur des coupes de duodénum de souris sacrifiées après T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D).

À l'inverse, certains composés voient leur intensité diminuer au cours du temps : les monoacylglycérols MAG contenant 16 carbones sur leur chaîne d'acide gras, le cholestérol à m/z 369,37 ($[M+H-H_2O]^+$), la vitamine E à m/z 430,42 ($[M]^+$). Les aires des pics de la zone dite SM, contenant un fragment métastable de la sphingomyéline à m/z 666,62 (environ) et la sphingomyéline composée de 34 atomes de carbone et une insaturation (SM 34:1) à m/z 703,62 ($[M+H]^+$), 725,64 ($[M+Na]^+$) et à m/z 741,59 ($[M+K]^+$), diminuent elles aussi. Et finalement, on observe le même phénomène pour la section du spectre PC, contenant essentiellement les phosphatidylcholines avec 32 atomes de carbones sur les deux chaînes d'acides gras, à m/z 734,66 (PC 32:0; $[M+H]^+$) et 756,60 (PC 32:0; $[M+Na]^+$), 34 atomes de carbone, à m/z 758,65 (PC 34:2; $[M+H]^+$), 780,62 (PC 34:2; $[M+Na]^+$), 782,61 (PC 34:1;

$[M+Na]^+$) et 796,61 (PC 34:2; $[M+K]^+$) et enfin avec 36 atomes de carbones à m/z 786,66 (PC 36:2; $[M+H]^+$), 804,62 (PC 36:4; $[M+Na]^+$), 808,67 (PC 36:2; $[M+Na]^+$), 820,54 (PC 36:4; $[M+K]^+$) et 824,64 (PC 36:2; $[M+K]^+$).

	T30min	T1h	T4h
MAG 16	0,85	0,65	0,67
MAG 18	1,39	2,50	2,76
cholestérol	0,96	0,57	0,62
vitamine E	1,03	0,35	0,38
DAG 34	1,49	2,34	2,15
DAG 36	2,63	6,52	6,01
SM	0,87	0,21	0,24
PC 32	0,92	0,20	0,26
PC 34	0,83	0,17	0,23
PC 36	0,84	0,20	0,30
TAG 52	1,48	1,97	2,46
TAG 54	1,50	1,47	3,35
TAG 56	1,22	1,06	1,47

Tableau 1 : Variations de l'aire de certains ions entre les spectres T30min, T1h et T4h et T0 en mode d'ionisation positif.

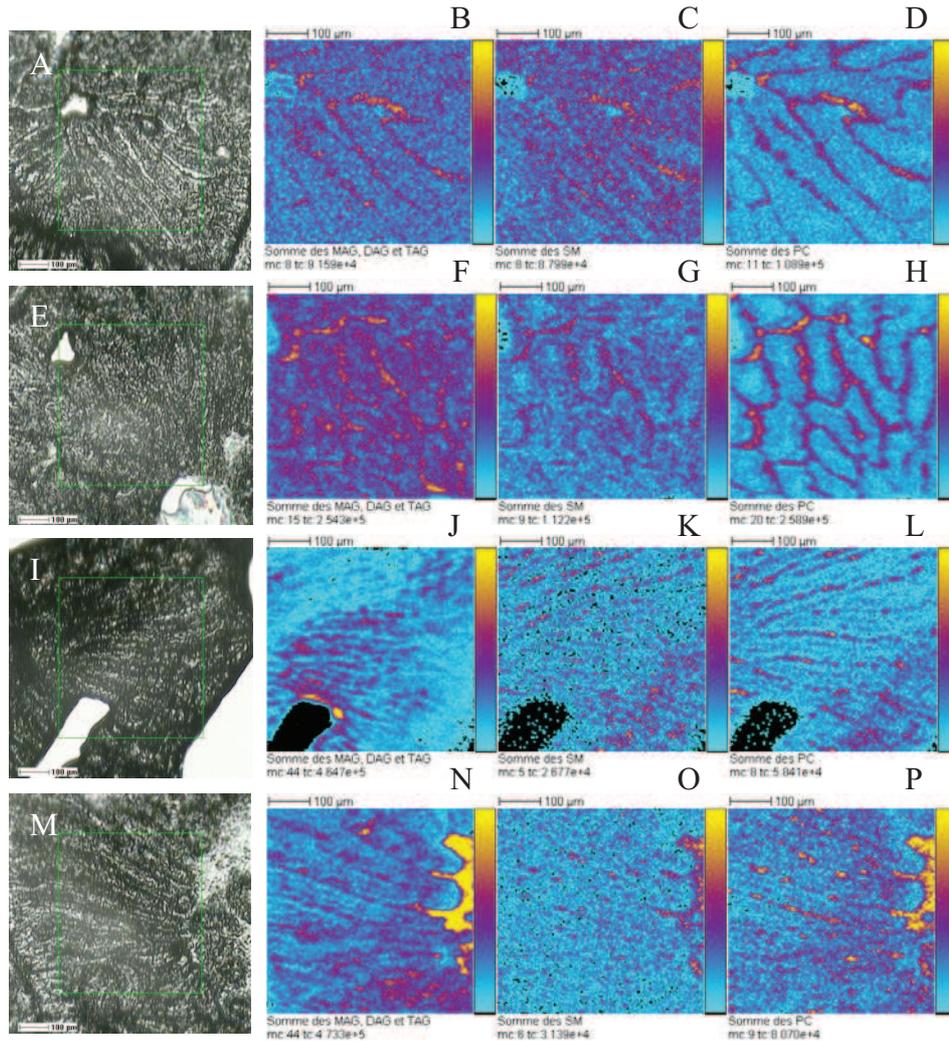


Figure 25 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) des coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A à D), T30min (E à H), T1h (I à L) et T4h (M et P). Première colonne : images enregistrées par la caméra vidéo du spectromètre, le carré vert de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ étant la zone analysée. Seconde colonne : somme des images des ions correspondant aux monoacylglycérols (MAG), aux diacylglycérols (DAG) et aux triacylglycérols (TAG). Troisième colonne : somme des images des ions correspondant aux sphingomyélines (SM). Quatrième colonne : somme des images des ions correspondant aux phosphatidylcholines (PC). Dose d'ions primaires : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Les monoacylglycérols (MAG), diacylglycérols (DAG) et triacylglycérols (TAG) ont les mêmes localisations et leurs images délimitent les villosités intestinales (Fig 25B, 25F, 25J et 25N). Il en va de même des sphingomyélines (Fig. 25C, 25G, 25K et 25O) et des phosphatidylcholines (Fig. 25D, 25H, 25L et 25P). En examinant le nombre de coups du pixel le plus intense (*mc*), les différences observées précédemment sont retrouvées. En effet, la valeur de *mc* des images de la somme des MAG, DAG et TAG enregistrées à T0 (Fig. 25B), T30min (Fig. 25F), T1h (Fig. 25J) et T4h (Fig. 25N), augmente, allant respectivement de 9 à 44. Ainsi que pour les images de la somme des PC, où il varie de 11 pour T0 (Fig. 25D), voir même 20 pour T30min (Fig. 25H), à 6 pour T4h (Fig. 25P), même si ces lipides s'accumulent dans la lumière intestinale au cours du temps, tout comme les MAG, DAG, TAG, et SM. Ces variations n'apparaissent pas aussi clairement pour les images de la somme des SM.

Les spectres en mode d'ionisation négatif sont présentés dans la figure 26 ainsi que les variations d'intensité entre les spectres à T0 et les spectres à T30min, T1h et T4 (Tableau 2).

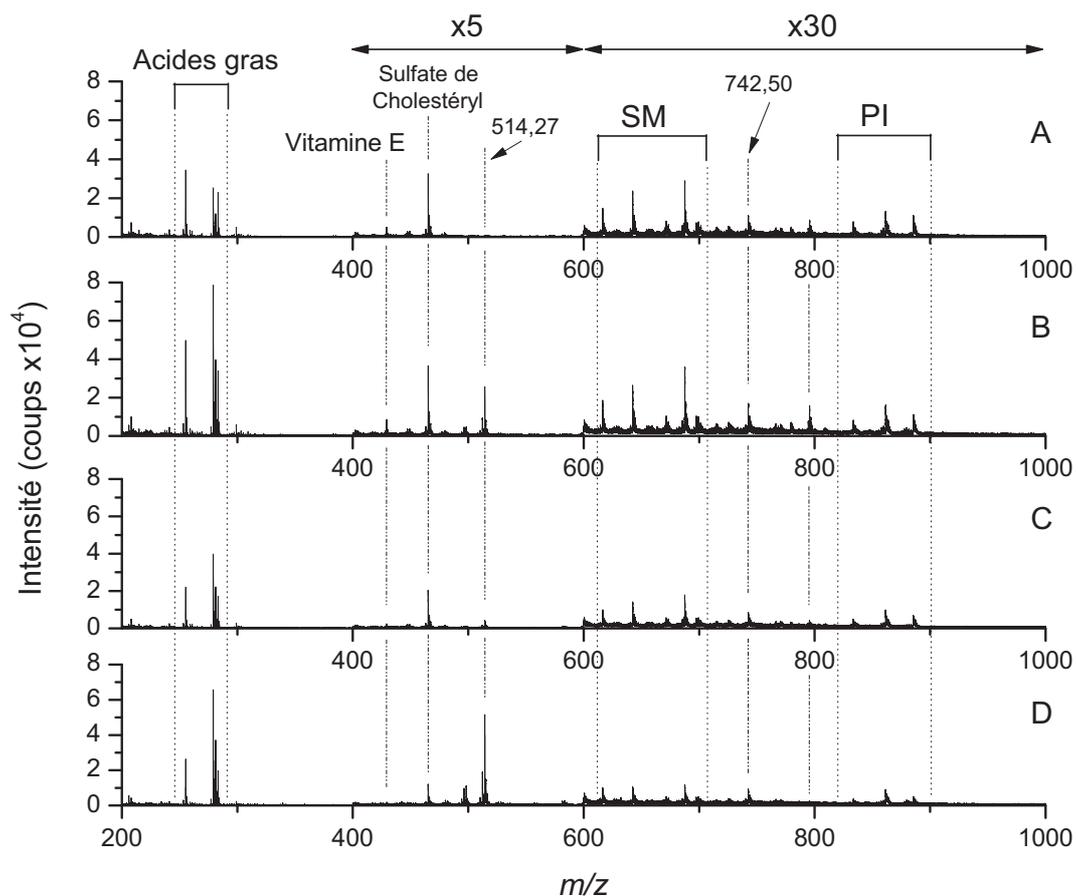


Figure 26 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrés sur des coupes de duodénum de souris sacrifiées après T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D).

	T30min	T1h	T4h
C16:1	1,56	0,75	0,81
C16:0	1,51	0,80	0,93
C18:2	2,83	1,73	2,88
C18:1	2,85	1,95	3,14
C18:0	1,45	0,90	0,99
Vitamine E	1,69	0,67	0,64
Sulfate de cholestéryle	1,10	0,78	0,46
<i>m/z</i> 514,27	13,25	3,18	29,04
PI 34	1,20	0,76	0,65
PI 36	1,28	0,86	0,86
PI 38	1,10	0,73	0,56

Tableau 2 : Variations de l'aire de certains ions entre les spectres T30min, T1h et T4h et T0 en mode d'ionisation négatif.

Là aussi des différences apparaissent au cours de la digestion. L'intensité des pics des ions correspondant aux carboxylates d'acides gras contenant 18 carbones, à *m/z* 277,21 (C18:3), 279,22 (C18:2), 281,22 (C18:1), 283,24 (C18:0) augmente. Une forte augmentation de l'intensité d'un pic au rapport *m/z* 514,27 est aussi observée. D'autres pics voient eux leur intensité chuter : il s'agit de ceux correspondant aux fragments de la sphingomyéline SM 34:1 (*m/z* 616,42; 642,47; 687,51 et 715,59), déjà observée en mode d'ionisation positif, ainsi que le pic à *m/z* 742,50 identifié comme étant la phosphatidyléthanolamine contenant 36 atomes de carbone et deux insaturations sur ses deux chaînes d'acides gras (PE 36:2, [M-H]⁻). Enfin, l'intensité de certains ions détectés en mode négatif semble augmenter entre T0 et T30min et chuter après T30min. C'est le cas des carboxylates d'acides gras contenant 16 carbones, à *m/z* 253,21 (C16:1), 255,21 (C16:0), mais aussi de la vitamine E à *m/z* 429,33 ([M-H]⁻) et du sulfate de cholestéryle, à *m/z* 465,29 ([M-H]⁻). Ce phénomène est observé aussi à plus haute masse : en effet, trois massifs correspondant aux phosphatidylinositols avec 34 carbones, centré autour de l'ion à *m/z* 833,55 (PI 34:2, [M-H]⁻), 36 atomes de carbones, centré sur le rapport *m/z* 861,53 (PI 36:2, [M-H]⁻), et 38 atomes de carbones, centré autour de l'ion à *m/z* 885,61 (PI 38:4, [M-H]⁻), présentent une intensité qui augmente jusqu'à T30min et chute ensuite.

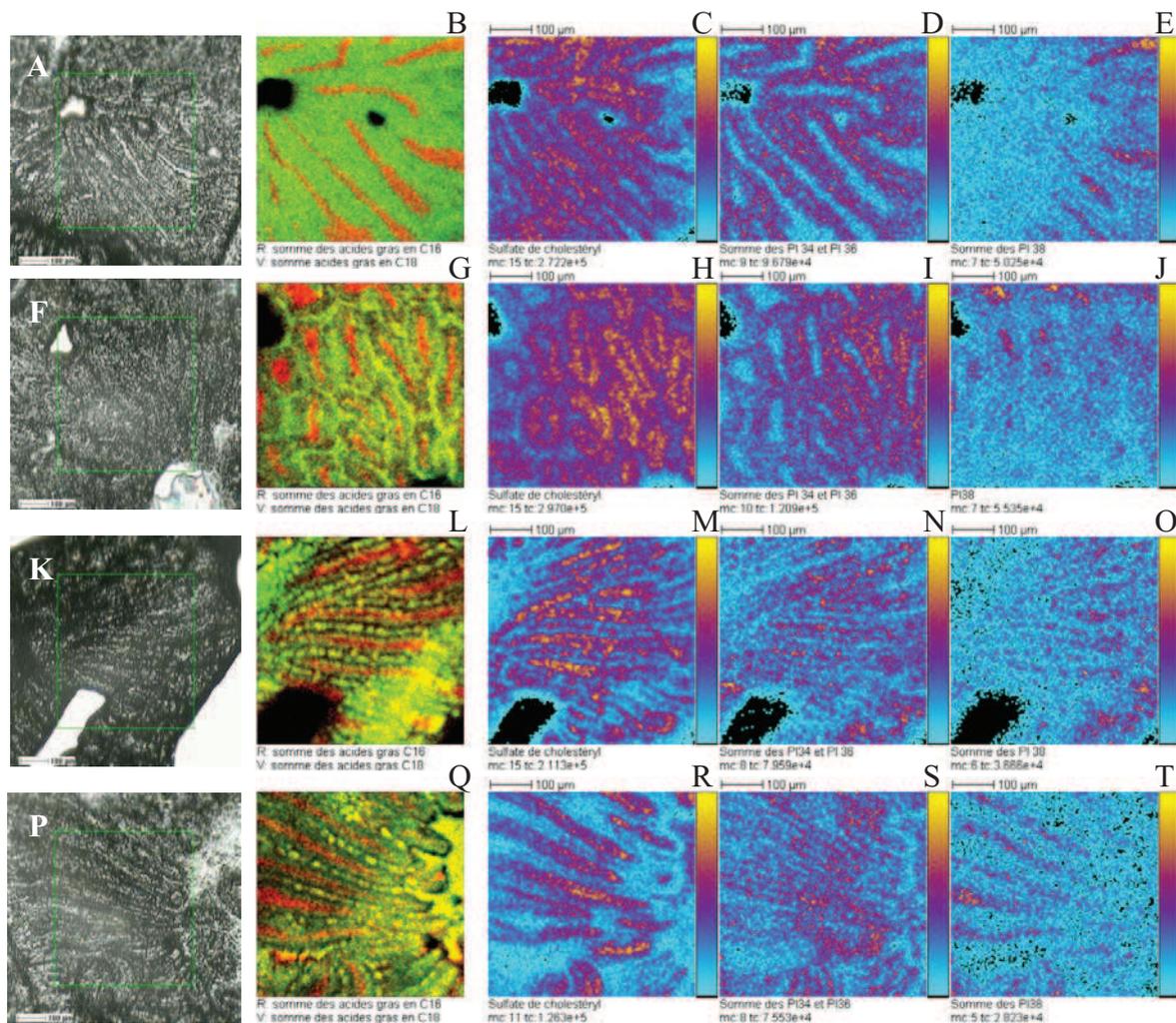


Figure 27 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) des coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A à E), T30min (F à J), T1h (K à O) et T4h (P à T). Première colonne : images enregistrées par la caméra vidéo du spectromètre, le carré vert de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ étant la zone analysée. Seconde colonne : superpositions en deux couleurs des images de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C16 (C16:1 m/z 253,2; C16:0 m/z 255,2) en rouge, et de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C18 (C18:2 m/z 279,2; C18:1 m/z 281,2; C18:0 m/z 283,2). Troisième colonne : images ioniques du sulfate de cholestéryle (m/z 465,3). Quatrième colonne : images de la somme des ions correspondant aux phosphatidylinositols PI 34 et PI 36. Cinquième colonne : images de la somme des ions correspondant aux PI 38. Dose d'ions primaire : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Les images des différents ions détectés en mode d'ionisation négatif sont présentées dans la figure 27. La superposition des images de la somme des acides gras en C16 et C18 (Fig. 27B, 27G, 27L et 27Q) montre qu'ils sont anti-colocalisés, les acides gras en C16 étant principalement dans le tissu conjonctif des villosités intestinales alors que les acides gras en C18 sont présents partout sauf dans cette zone. Cette distinction est de plus en plus floue au cours de la digestion : ainsi à T4h (Fig. 27Q), ils sont tous les deux principalement localisés au niveau de la lumière intestinale et entre les villosités. Tout comme les MAG et les DAG en mode d'ionisation positif, ces ions peuvent être issus de la fragmentation de lipides de plus haute masse. La forme déprotonée du sulfate de cholestéryle semble être répartie dans les entérocytes (Fig. 27C, 27H, 27M et 27R). Les PI présentent la même anti-colocalisation que les acides gras. En effet, les PI contenant 34 et 36 atomes de carbone sont présents partout sauf dans le tissu conjonctif alors que les PI contenant 38 carbones se concentrent dans ce tissu (Fig. 27E, 27J, 27O et 27T).

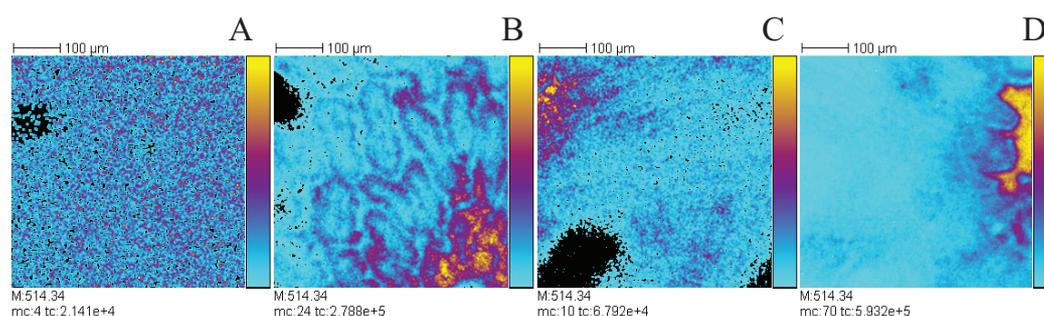


Figure 28 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) de l'ion à m/z 514,3 enregistrées sur les coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D). Dose d'ions primaire : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

L'ion détecté au rapport m/z 514,27 en mode d'ionisation négatif est localisé principalement dans la lumière de l'intestin et au niveau des entérocytes des villosités intestinales (Fig. 28). Les différences d'intensité observées dans les spectres se confirment lorsque la valeur de mc des différentes acquisitions est comparée. Ainsi, sa valeur est de 4 pour T0 (Fig. 28A), de 24 pour T30min (Fig. 28B), de 10 pour T1h (Fig. 28C) et enfin de 70 à

T4h (Fig. 28D). Les acquisitions à T30min et T1h ont été réalisées trois fois pour confirmer ces valeurs.

2.4.4. Identification du pic à m/z 514,28

Cet ion a déjà été caractérisé au laboratoire, il a notamment été retrouvé dans des coupes de foie tumoral (voir la thèse de Delphine Debois) où il a été identifié comme étant la forme déprotonée de l'acide taurocholique. Afin de vérifier cette attribution, nous avons comparé un spectre MS/MS enregistré directement sur une coupe de duodénum de souris sacrifiée 4 heures après ingestion de l'huile avec un spectre MS/MS d'une solution étalon d'acide taurocholique (1 mg/mL dans eau/méthanol 50:50 v/v). Pour cela, nous avons utilisé un spectromètre de masse de type MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Les Ulis, France). Les spectres sont présentés dans la figure 29. La matrice MALDI utilisée a été l'acide α -cyano-4-hydroxycinamique à 10 mg/mL dans un mélange acétonitrile/eau 50:50 v/v. Une goutte de matrice a été déposée directement sur la coupe et la solution de référence d'acide taurocholique a été diluée au $1/10^{\text{ème}}$ dans cette même matrice pour les analyses.

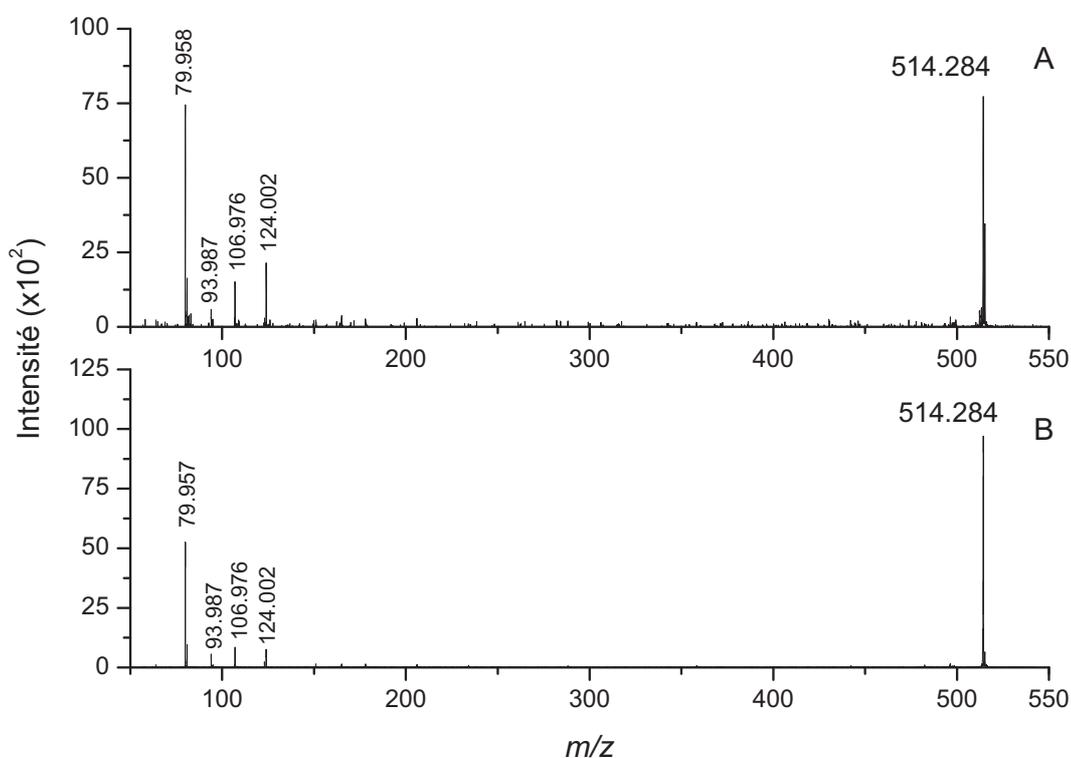


Figure 29 : Spectres MS/MS (1 keV, CID on, précurseur : m/z 514,28) en mode d'ionisation négatif enregistrés avec un MALDI TOF/TOF sur une coupe de duodénum de souris sacrifiée

à T4h (A) et sur un dépôt d'acide taurocholique à 1 mg/mL dans une solution d'eau/méthanol 50:50 v/v (B). Matrice : acide α -cyano-4-hydroxycinamique 10 mg/mL (dans acétonitrile/eau 50:50 v/v).

Il semblerait donc que ce pic à m/z 514,27 puisse être attribué à l'ion taurocholate (Fig. 30). Ce composé est un acide biliaire produit dans le foie.

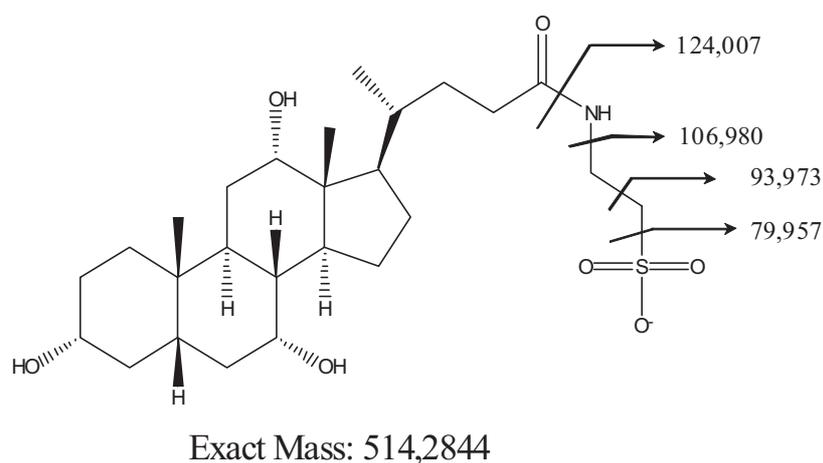


Figure 30 : Structure du taurocholate et attribution des fragments détectés en MS/MS.

2.4.5. Analyse TOF-SIMS à une résolution de 390 nm

La seconde série d'expériences est constituée de deux acquisitions de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ avec une résolution spatiale de 390 nm (256x256 pixels), à chaque temps. Les images de la somme des acides gras en C16 et C18, du sulfate de cholestéryle, de l'acide taurocholique, de la somme des SM et de la somme des PI sont présentées dans la figure 31. Dans cette figure, nous ne montrons qu'une acquisition pour chaque temps de digestion, mais deux ont été enregistrées.

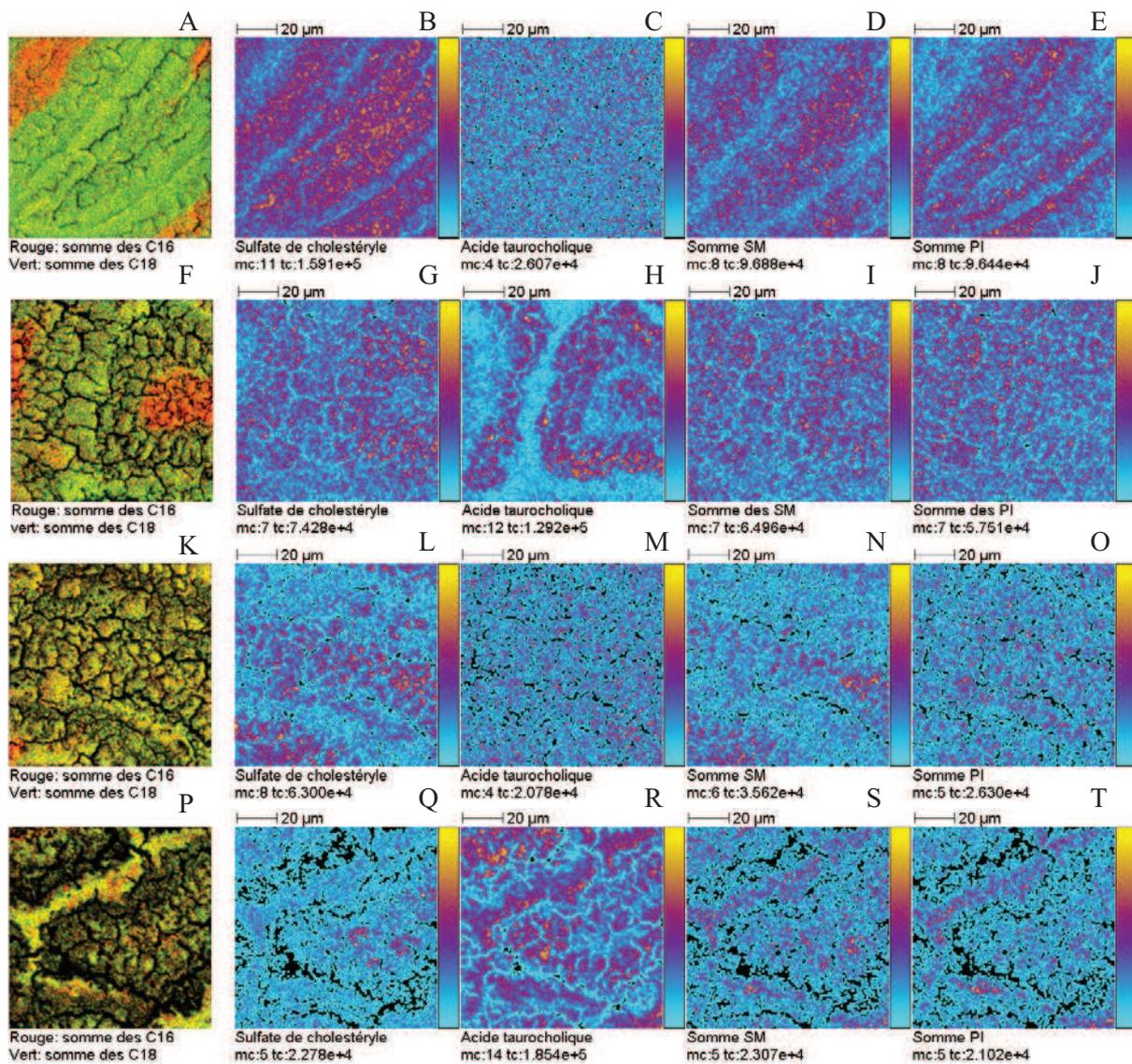


Figure 31 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ à une résolution de 390 nm (256x256 pixels) des coupes de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A à E), T30min (F à J), T1h (K à O) et T4h (P à T). Première colonne : superposition en deux couleurs des images de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C16 (C16:1 m/z 253,2; C16:0 m/z 255,2) en rouge, et de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C18 (C18:2 m/z 279,2; C18:1 m/z 281,2; C18:0 m/z 283,2). Seconde colonne : image ionique du sulfate de cholestéryle (m/z 465,3). Troisième colonne : images ioniques de l'acide taurocholique (m/z 514,3). Quatrième colonne : images de la somme des ions correspondant aux sphingomyélines (m/z 616,4 ; m/z 642,5 et m/z 687,5). Cinquième colonne : images de la somme des ions correspondant aux PI 34, 36 et 38. Dose d'ions primaire : 2×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de

coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

La première colonne est une superposition en deux couleurs de la somme des acides gras contenant 16 carbones (en rouge) et de la somme des acides gras contenant 18 carbones (en vert). A T0 et à T30min, les deux types d'acide gras sont anticolocalisées (Fig. 31A et 31F), alors qu'à T1h et à T4h, les deux images se superposent (Fig. 31K et 31P). Le sulfate de cholestéryle (m/z 465,3) semble être présent principalement dans les entérocytes et le tissu conjonctif, tout comme les sphingomyélines et les phosphatidylinositols (PI 34, 36 et 38). En comparant les mc et les tc des images du sulfate de cholestéryle, de la somme des SM et de la somme des PI, nous pouvons en conclure que leur quantité relative diminue au court du temps. À l'inverse, en comparant les paramètres de l'image de l'acide taurocholique déprotonné, il apparaît clairement que sa quantité relative augmente entre T0 et T4h allant de 4 à 14 respectivement.

Grâce au niveau de détail que nous avons atteint avec ce mode de focalisation de la source d'ions, nous avons pu extraire les spectres distinctifs des entérocytes et ceux du tissu conjonctif constituant le centre des villosités intestinales. Les zones sélectionnées sont présentées dans la figure 32.

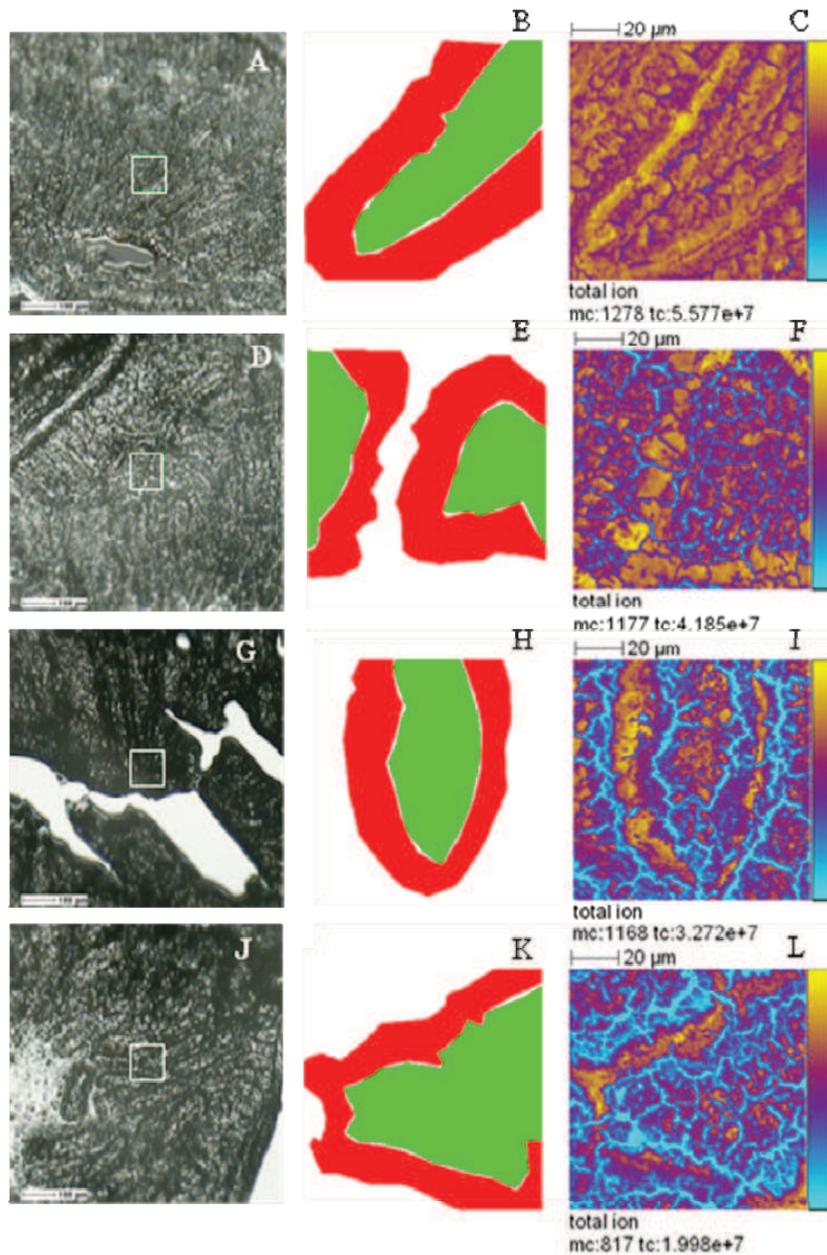


Figure 32 : Sélection des régions d'intérêt afin d'extraire les spectres correspondant aux entérocytes et au tissu conjonctif des coupes T0 (A à C), T30min (D à F), T1h (G à I) et T4h (J à L). Première colonne : images optiques enregistrées avec la caméra vidéo du spectromètre, les carrés blancs correspondent aux zones analysées. Seconde colonne : régions d'intérêt, en rouge, la zone correspondant aux entérocytes et en vert, la zone correspondant au tissu conjonctif. Troisième colonne : images ioniques totales de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ avec une résolution spatiale de 390 nm (256×256 pixels), dose d'ions primaires : 2×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

Pour ces deux zones, « entérocytes » et « tissu conjonctif », nous avons donc extrait les spectres et mesuré l'aire des pics. Afin de pouvoir comparer ces aires, il est nécessaire de les normaliser à des surfaces équivalentes. Nous avons donc divisé la valeur des aires de chaque pic par le nombre de pixel de la zone concernée. Le tableau 3 détaille les variations des aires des pics de chaque zone, exprimées en pourcentage, entre les spectres T0 (référence) et les spectres T30min, T1h et T4h.

	Variations zone "Entérocytes" (%)					
	T30min	+/-	T1h	+/-	T4h	+/-
C16:1	-2	0,0	-5	0,2	-15	1,4
C16:0	-5	0,0	-16	1,4	-19	1,6
C18:2	111	0,5	208	49,1	319	27,2
C18:1	99	5,5	202	54,0	314	21,7
C18:0	11	1,5	25	1,1	19	1,8
Sulfate de cholestéryle	-35	6,4	-25	2,8	-62	17,7
Acide taurocholique	1696	37,2	223	105,4	2589	1091,1
SM	-16	5,0	-41	5,3	-50	5,0
PE 36	-11	7,6	1	0,1	-33	3,2
PI 34	-9	16,8	-3	0,1	-38	2,4
PI 36	-19	20,5	7	0,4	-43	7,4
PI 38	-33	5,8	-53	0,8	-69	8,1

	Variations zone "Tissu conjonctif" (%)					
	T30min	+/-	T1h	+/-	T4h	+/-
C16:1	-8	0,0	-45	4,1	-64	6,9
C16:0	-4	0,0	-47	7,3	-63	5,8
C18:2	-4	0,5	9	2,5	6	0,5
C18:1	40	5,5	47	15,1	45	3,5
C18:0	-29	1,5	-46	3,2	-61	8,1
Sulfate de cholestéryle	-54	6,4	-57	2,3	-84	7,4
Acide taurocholique	814	37,2	74	37,8	1029	580,6
SM	-30	5,0	-63	5,4	-79	7,4
PE 36	-47	7,6	-58	6,6	-78	6,7
PI 34	-63	16,8	-68	5,2	-85	7,0
PI 36	-74	20,5	-69	2,7	-86	17,3
PI 38	-32	5,8	-73	5,2	-87	11,4

Tableau 3 : Variations de l'aire (en pourcentage) de certains ions entre les spectres T0 (référence) et les spectres T30min, T1h et T4h en mode d'ionisation négatif (moyenne de deux acquisitions par temps de digestion). La valeur des écarts-types sont notés dans la colonne +/-.

L'aire des pics correspondant aux acides gras en C16:0 et C16:1 diminue dans les deux zones, avec respectivement une baisse de 19% et 15% dans la zone « entérocyte » et une baisse de 63% et 64% dans la zone « tissu conjonctif » à T4h. Les principales différences s'observent pour les acides gras en C18. En effet dans la zone « entérocytes », l'aire des pics des ions C18:1 et C18:2 augmente considérablement à T4h alors que dans la zone « tissu conjonctif », l'aire du pic de l'ion C18:1 n'augmente que de 45% et celle du C18:2 ne varie presque pas. De plus l'aire du pic correspondant à l'acide gras C18:0 augmente sensiblement dans la zone « entérocyte » alors qu'elle diminue de 61% dans la zone « tissu conjonctif » à T4h. L'aire du pic correspondant au sulfate de cholestéryle diminue de concert dans les deux zones. La quantité relative de sphingomyéline, ici exprimée à travers l'aire des pics correspondant à trois de ses fragments, diminue de 50% dans la zone « entérocyte » et de 79% dans la zone « tissu conjonctif ». On observe une diminution des aires des pics correspondant aux phosphatidyléthanolamines contenant 36 carbones, ainsi que celle des phosphatidylinositols contenant 34, 36 et 38 carbones, allant de 33% à 87%. Enfin, la variation la plus importante, par rapport à T0, est observée pour l'acide taurocholique dans les deux zones.

2.5. Discussion et conclusion

L'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS, avec les acquisitions de 500x500 μm^2 , nous a permis de suivre l'évolution du profil lipidique des coupes de duodénum de souris, ainsi que la localisation des principaux lipides, durant la digestion et l'absorption de l'huile de tournesol enrichie en cholestérol. Tandis que les images en haute résolution nous ont permis d'extraire le profil lipidique de deux types de tissus différents d'une même villosité intestinale.

Ainsi, nous avons pu observer que la quantité des lipides apportés par l'huile augmentait alors que celle des lipides peu présents dans cette huile diminuait au cours du temps. En effet, la quantité relative des triacylglycérols et de ses fragments composés principalement de chaînes d'acides gras en C18:2 et C18:1 (TAG54, DAG36, MAG18, carboxylates des acides gras C18:2 et C18:1) augmente fortement alors que celle des triacylglycérols et de ses fragments composés d'au moins une chaîne d'acides gras en C16:1 et C16:0 (TAG52 et DAG34) augmente beaucoup moins au cours de la digestion. L'intensité des fragments des

triacylglycérols composés uniquement de chaîne d'acides gras en C16:1 et C16:0 (MAG16, carboxylates d'acides gras C16:1 et C16:0) diminuant au cours de la digestion. Toutefois, les gouttelettes lipidiques ne sont pas visibles dans les images à haute résolution.

L'autre différence majeure qui apparaît lorsque l'on compare les profils lipidiques du duodénum de souris durant la digestion est l'augmentation du signal du composé identifié comme étant l'acide taurocholique. Il a été démontré que cet acide biliaire produit dans le foie favorise l'absorption du cholestérol de la lumière de l'intestin vers les entérocytes des villosités intestinales. Les acides biliaires sont des détergents biologiques qui, lorsqu'ils sont présents à une concentration supérieure à leur concentration micellaire critique, forment spontanément des micelles capables de solubiliser les lipides.⁴⁸ Le cholestérol est peu soluble dans les solutions d'acide biliaires, néanmoins, l'addition de phospholipides et de monoacylglycérols augmente grandement sa solubilité.⁴⁹ L'acide taurocholique pénètre donc dans les entérocytes et repart dans la circulation sanguine, en passant par le tissu conjonctif, pour être dégradé dans le foie. Ce qui explique que cet acide biliaire est détecté en grande quantité dans les deux types de tissus, entérocyte et tissu conjonctif.

Une étude a montré qu'après absorption de cholestérol exogène, sa concentration augmente très peu dans la lumière de l'intestin, ceci indique qu'il peut rapidement être transformé et exporté de la muqueuse intestinale vers la lymphe.⁵⁰ En effet, après une dose intragastrique de cholestérol radiomarqué, son transport dans la lymphe augmente rapidement et atteint son maximum après 6-8h.⁵¹ Le cholestérol absorbé apparaît principalement estérifié dans les VLDL et les chylomicrons lymphatiques.⁵¹ Une autre étude a démontré que le cholestérol passant de la lumière de l'intestin vers les cellules de la muqueuse intestinale (entérocytes) est essentiellement sous forme non-estérifiée, tandis que le cholestérol sécrété dans la lymphe après un repas riche est principalement estérifié (70-80%).⁵² De plus, il a été suggéré que l'activité d'estérification du cholestérol des entérocytes peut être un régulateur important de l'absorption du cholestérol. En effet, l'estérification du cholestérol libre absorbé augmenterait son gradient de diffusion vers les entérocytes. Deux isoformes d'acyl-coenzymes A sont impliquées dans l'estérification du cholestérol dans les cellules de la muqueuse intestinale : les cholestérol acyltransférase 1 et 2 (ACAT 1 et 2).^{53,54} Ceci peut donc expliquer la diminution de la quantité relative de cholestérol au cours de la digestion alors qu'il est apporté par l'huile, les esters de cholestérol n'étant pas détectés en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS. Cet apport massif en cholestérol peut avoir d'autres conséquences. En effet, d'après la littérature, un apport massif en cholestérol et en acides gras

libre pourrait induire une diminution de la biosynthèse des phospholipides, des stérols et des sphingolipides.⁵⁵ En effet, les voies de biosynthèses de ces différentes classes de lipides sont liées. Il a été démontré par exemple qu'un même système protéique, les SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Proteins), pouvait exercer un control négatif sur la synthèse de stérol.⁵⁶ Ceci peut expliquer la diminution de la quantité relative observée pour les phosphatidylcholines, les phosphatidylinositols et les sphingomyélines.

Une autre variation d'intensité relative durant la digestion, de plus faible amplitude cette fois, concerne la vitamine E. Le terme vitamine E regroupe en réalité huit isomères de tocophérols et tocotriénols (α -, β -, γ - et δ - pour chaque). L' α -tocophérol est l'isomère le plus actif et le plus abondant dans le plasma. Néanmoins, son mécanisme d'absorption est étonnamment confus : toutes les formes de vitamine E seraient absorbées par les cellules intestinales et délivrées dans la circulation sanguine par les chylomicrons.⁵⁷ D'après l'analyse de l'huile de tournesol, nous avons pu observer que la vitamine E est un des ses composants. Néanmoins, sa quantité relative chute après 30 min, elle serait donc rapidement absorbée par les entérocytes et transportée dans la circulation sanguine.

Enfin, un point intéressant est l'accumulation des acides gras C18:2 et C18:1 dans les entérocytes, alors que dans le tissu conjonctif, leur quantité relative reste stable. Cette disparité peut être expliquée par les rôles respectifs des deux tissus dans la villosité intestinale *i.e.* les entérocytes ont pour rôle de stocker alors que le tissu conjonctif est lié à la circulation sanguine.

Finalement, pour compléter ces analyses, la composition lipidique des gouttelettes sera déterminée par chromatographie sur couche mince et les lipides seront quantifiés par des méthodes de GC-MS ou LC-MS. Les résultats obtenus pourront donc être comparés à ceux obtenus en imagerie par spectrométrie de masse.

Références bibliographiques

- [1] Davis, P.B.; Drumm, M.; Konstan, M.W. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **1996**, *154*, 1229.
- [2] Corey, M. ; Farewell, V. *Am. J. Epidemiol.* **1996**, *143*, 1007.
- [3] Kerem, B.; Rommens, J.M.; Buchanan, J.A.; Markiewicz, D.; Cox, T.K.; Chakravarti, A.; Buchwald, M.; Tsui, L.C. *Science*, **1989**, *245*, 1073.
- [4] Sheppard, D.N.; Welsh, M.J. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 23.
- [5] Schwiebert, E.M.; Benos, D.J.; Egan, M.E.; Stutts, M.J.; Guggino, W.B. *Physiol. Rev.*, **1999**, *79*, 145.
- [6] Quinton, P.M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 292.
- [7] Welsh, M.; Ramsey, B.W.; Accurso, F.; Cutting, G.R. *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease* (ed. A. B. CL Scriver, W. S. Sly & D. Valle), **2001**, 5124-5188. Mc GrawHill, New York.
- [8] Kopelman, H.; Durie, P.; Gaskin, K.; Weizman, Z.; Forstner, G. *N. Engl. J. Med.* **1985**, *312*, 329.
- [9] Worgall, T.S. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **2009**, *12*, 105.
- [10] Freedman, S.D.; Blanco, P.G.; Zaman, M.M.; Shea, J.C.; Ollero, M.; Hopper, I.K.; Weed, D.A.; Gelrud, A.; Regan, M.M.; Laposata, M.; Alvarez, J.G.; O’Sullivan, B.P. *N. Engl. J. Med.*, **2004**, *350*, 560.
- [11] Ollero, M.; Laposata, M.; Zaman, M.M.; Blanco, P.G.; Andersson, C.; Zeind, J.; Urman, Y.; Kent, G.; Alvarez, J.G.; Freedman, S.D. *Metabolism*, **2006**, *55*, 1192.
- [12] Guerrero, I.C.; Astarita, G.; Jais, J.P.; Sands, D.; Nowakowska, A.; Colas, J.; Sermet-Gaudelus, I.; Schuerenberg, M.; Piomelli, D.; Edelman, A.; Ollero, M. *PLoS One*, **2009**, *4*, e7735.
- [13] Dombrowsky, H.; Clark, G.T.; Rau, G.A.; Bernhard, W.; Postle, A.D. *Pediatr. Res.*, **2003**, *53*, 447.
- [14] Guilbault, C.; Wojewodka, G.; Saeed, Z.; Hajduch, M.; Matouk, E.; De Sanctis, J.B.; Radzioch, D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2009**, *41*, 100.

-
- [15] Teichgraber, V.; Ulrich, M.; Endlich, N.; Riethmuller, J.; Wilker, B.; De Oliveira-Munding, C.C.; van Heeckeren, A.M.; Barr, M.L.; von Kurthy, G.; Schmid, K.W.; Weller, M.; Tummler, B.; Lang, F.; Grassme, H.; Doring, G.; Gulbins, E. *Nat. Med.*, **2008**, *14*, 382.
- [16] White, N.M.; Jiang, D.; Burgess, J.D.; Bederman, I.R.; Previs, S.F.; Kelley, T. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, **2007**, *292*, L476.
- [17] Richter, K.; Nygren, H.; Malmberg, P.; Hagenhoff, B. *Microsc. Res. Tech.*, **2007**, *70*, 640.
- [18] Jorgensen, J.R.; Fitch, M.D.; Mortensen, P.B.; Flemming, S.E. *Gut*, **2002**, *51*, 76.
- [19] Farrel, P.M.; Mischler, E.H.; Engle, M.J.; Brown, D.J.; Lau, S.M. *Pediatr. Res.*, **1985**, *19*, 104.
- [20] Freedman, S.D.; Katz, M.H.; Parker, E.M.; Laposata, M.; Urman, M.Y.; Alvarez, J.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **1999**, *96*, 13995-.
- [21] Andersson, C.; Al-Turkmani, M.R.; Savaille, J.E.; Alturkmani, R.; Katrangi, W.; Cluette-Brown, J.E.; Zaman, M.M.; Laposata, M.; Freedman, S.D. *J. Lipid Res.*, **2008**, *49*, 1692.
- [22] Homnick, D.N.; Cox, J.H.; DeLoof, M.J.; Ringer, T.V. *J. Pediatr.*, **1993**, *122*, 703.
- [23] Huang, S.H.; Schall, J.I.; Zemel, B.S.; Stallings, V.A. *J. Pediatr.*, **2006**, *148*, 557.
- [24] McCombie, G.; Staab, D.; Stoeckli, M.; Knochenmuss, R. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*, 6118.
- [25] Eijkel, G.B.; Kürer Kaleta, B.; van der Wiel, I.M.; Kros, J.M.; Luider, T.M.; Heeren, R.M.A. *Surface and Interface Analysis*, **2009**, *41*, 675.
- [26] Mu, H.; Høy, C.E. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 105.
- [27] Singh, H.; Ye, A.; Horne, D. *Prog. Lipid Res.* **2009**, *48*, 92.
- [28] Hamosh, M.; Scow, R.O. *J. Clin. Invest.* **1973**, *52*, 88.
- [29] Paltauf, F.; Esfandi, F.; Holasek, A. *FEBS Lett.* **1974**, *40*, 119.
- [30] Watanabe, S.; Lee, K.Y.; Chang, T.M.; Berger-Ornstein, L.; Chey, W.Y. *Am. J. Physiol.* **1988**, *254*, G837.
- [31] Mattson, F.H.; Volpenhein, R.A. *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2772.
- [32] Mansbach, C.; Siddiqi, S.A. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 315.
- [33] Stralfors, P. *FEBS Lett.* **1990**, *263*, 153.

-
- [34] Stahl, A.; Hirsch, D.J.; Gimeno, R.E.; Punreddy, S.; Ge, P. et al. *Mol. Cell* **1999**, *4*, 299.
- [35] Frolov, A.; Schroeder, F. *Biochemistry*, **1997**, *36*, 505.
- [36] Yang, L.Y.; Kukis, A. *J. Lipid Res.* **1991**, *32*, 1173.
- [37] Cartwright, I.J.; Higgins, J.A.; *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 48048.
- [38] Kane, J.P.; Hardman, D.A.; Paulus, H.E. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1980**, *77*, 2465.
- [39] Mansbach, C.M. II; Dowel, R.F. *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, G927.
- 40 Mansbach, C.M. II; Dowell, R.F.; Pritchett, D. *Am. J. Physiol.* **1991**, *261*, G530.
- [41] Kumar, N.S.; Mansbach, C.M. II *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, G18.
- [42] Kumar, N.S.; Mansbach, C.M. II *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, G378.
- [43] Siddiqi, S.A.; Gorelick, F.S.; Mahan, J.T.; Mansbach, C.M. II *J. Cell. Sci.* **2003**, *116*, 415.
- [44] Siddiqi, S.A.; Kumar, N.S.; St Hilaire, R.J.; Nutting, D.F.; Mansbach, C.M. II *Curr. Opin. Gastroenterol.* **2000**, *16*, 147.
- [45] Siddiqi, S.A.; Siddiqi, S.; Mahan, J.; Peggs, K.; Gorelick, F.S.; Mansbach, C.M. II *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 20974.
- [46] Debois, D.; Bralet, M.P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprévote, O. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2823.
- [47] Wagner, K.H.; Tomasch, R.; Elmadfa, I. *Eur. J. Nutr.* **2001**, *40*, 161.
- [48] Hofmann, A.F.; Small, D.M. *Annu. Rev. Med.* **1967**, *18*, 333.
- [49] Carey, M.C.; Small, D.M. *Am. J. Med.* **1970**, *49*, 590.
- [50] Swell, L.; Trout Jr., E.C.; Hopper, R.; Field, H.; Treadwell, C.R. *Ann. NY Acad. Sci.* **1959**, *72*, 813.
- [51] Rudel, L.L.; Morris, M.D.; Felts, J.M. *J. Clin. Invest.* **1972**, *51*, 2686.
- [52] Treadwell, C.R.; Vahouny, G.V. Code, editor. *American Physiological Society*, Washington, DC, **1968**.

-
- [53] Swell, L.; Byron, J.E; Treadwell, C.R. *J. Biol. Chem.* **1950**, *186*, 543.
- [54] Haugen, R.; Norum, K.R. *Scand. J. Gastroenterol.* **1976**, *11*, 615.
- [55] Gulati, S.; Liu, Y.; Munkacsi, A.B.; Wilcox, L.; Sturley, S.L. *Prog. Lipid Res.* **2010**, doi:10.1016/j.plipres.2010.03.003.
- [56] Goldstein, J.L.; DeBose-Boyd, R.A.; Brown, M.S. *Cell*, **2006**, *124*, 35.
- [57] Brigeluis-Flohe, R.; Kelly, F.J.; Salonen, J.T.; Neuzil, J.; Zingg, J.M.; Azzi, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 703.

Conclusion Générale

Durant mes trois années de thèse, j'ai continué le travail qui est effectué au laboratoire depuis plusieurs années en contribuant au développement de l'imagerie par spectrométrie de masse, tant au niveau méthodologique qu'au niveau de ses applications biologiques. La détection et la localisation, sans aucun *a priori*, d'un grand nombre de composés en mélange, avec une grande sensibilité en MALDI-TOF et à une résolution spatiale allant de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres en TOF-SIMS, est la force de ces deux techniques arrivées aujourd'hui à maturité.

Mon travail m'a permis de mener à bien des collaborations avec des scientifiques issus de domaines très variés. Ainsi, avec Jacques Einhorn de l'Institut National de la Recherche Agronomique de Versailles, nous avons pu développer une méthode de préparation d'échantillons de très petites tailles pour l'imagerie chimique. Cette méthode a été validée en détectant et en localisant des molécules de la famille des flavonoïdes avec précision au niveau de l'enveloppe de différents types de graines d'*Arabisopsis thaliana*.

Par la suite, à travers de deux projets, nous avons démontré que l'imagerie par spectrométrie de masse peut être un outil puissant pour localiser des composés xénobiotiques dans différents tissus. En collaboration avec l'INRA de Toulouse, nous avons montré que les retardateurs de flamme bromés et en particulier les polybromodiphényles éthers, déjà connus pour être des perturbateurs endocriniens, s'accumulent dans des zones très spécifiques des ovaires et des glandes surrénales. Et en collaboration avec une équipe du Novartis Institute for Biomedical Research, il a été possible de tracer la molécule active d'une crème anti-acné appliquée de manière topique à la surface de la peau.

Enfin, l'imagerie par spectrométrie de masse s'est avérée très utile pour comparer des profils lipidiques de différents organes. Ainsi, à travers les collaborations menées avec l'équipe d'Aleksander Edelman de la Faculté de Médecine Paris Descartes et avec Christine Coméra de l'INRA de Toulouse, nous avons montré que cette technique, associée ou non aux analyses statistiques, peut être un outil extrêmement prometteur pour l'étude de cartographie lipidique sur du matériel biologique.

Finalement, l'imagerie par spectrométrie de masse est bel et bien un outil à faire connaître à d'autres communautés scientifiques. De plus, elle peut encore être améliorée en développant par exemple un analyseur de type TOF-TOF pour l'imagerie SIMS ou encore, en focalisant le faisceau laser pour l'imagerie MALDI-TOF.

Liste des Illustrations

Liste des Illustrations

Introduction Générale

Tableaux :

Tableau 1 : Quelques matrices utilisées en MALDI. **p20**

Tableau 2 : Composition de la solution de calibration PepMix5 (LaserBio Labs, Sophia-Antipolis, France). **p40**

Figures :

Figure 1 : Les prix Nobel liés à la Spectrométrie de masse. **p7**

Figure 2 : Image obtenue en microscopie à force atomique d'une surface d'or (5000x5000 Å) bombardée par des ions primaires Au_{11}^+ possédant une énergie de 1,4 MeV. PIDD= $1,61 \times 10^{10}$ ions.cm⁻². Extrait de la référence 33. **p10**

Figure 3 : Schéma illustrant l'influence du rendement d'émission ionique secondaire Y et de la section efficace d'endommagement σ sur l'efficacité. Extrait de la référence 34. **p12**

Figure 4 : Les trois modèles de pulvérisation par collisions élastiques. A : le modèle de collisions frontales unique, B : le modèle de cascades linéaires, C : le modèle des pointes de collisions. Extrait de la référence 41. **p14**

Figure 5 : Résultats de dynamiques moléculaires d'après la référence 50. Une surface d'or est bombardée par des agrégats Au_4 ou un projectile monoatomique Au_1 possédant une énergie totale de 16 keV. **p16**

Figure 6 : Schéma de principe (A) et photographie (B) d'une source à pointe liquide. Extrait de la référence 55. **p17**

Figure 7 : Schéma de principe de l'ionisation MALDI. **p19**

- Figure 8 : Schéma de principe de l'analyseur par temps-de-vol en mode linéaire. **p22**
- Figure 9 : Schéma de principe de l'extraction retardée. Extrait de la référence 64. **p24**
- Figure 10 : Schéma de principe d'un miroir électrostatique, ou reflectron. Deux ions ont les mêmes rapports m/z , mais des vitesses initiales différentes. **p26**
- Figure 11 : Schéma de principe du spectromètre de masse 4800 MALDI TOF-TOF de la société Applied Biosystems. **p27**
- Figure 12 : A. Schéma représentant une galette de microcanaux. B. Deux types de montage : canaux simples et assemblage en chevrons. **p29**
- Figure 13 : Photographie du spectromètre de masse TOF-SIMS IV (Ion ToF GmbH). **p30**
- Figure 14 : Schéma de principe du dispositif de pulsation/sélection équipant le TOF-SIMS IV (Ion ToF GmbH). Extrait de la référence 55. **p31**
- Figure 15 : Les trois principaux modes de fonctionnement de la source d'ions primaires équipant le spectromètre de masse. Extrait de la référence 66. **p32**
- Figure 16 : Zone de fonctionnement d'un canon à électron utilisé sur un spectromètre de masse TOF-SIMS. Extrait de la référence 67. **p33**
- Figure 17 : Photographie du spectromètre de masse MALDI TOF-TOF 4800 Applied Biosystems / MDS Sciex. **p34**
- Figure 18 : Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF et TOF-SIMS. **p36**
- Figure 19 : Images TOF-SIMS en bordure du corps calleux d'une coupe de cerveau de rat en mode d'ionisation positif. Taille de $256 \times 256 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels (taille de pixels de $1 \mu\text{m}$). La PIDD a été fixée à 10^{12} ions. cm^{-2} . Extrait de la référence 82. **p37**

Figure 20 : Signification des informations fournies par une image. Extrait de la référence 83.

p37

Figure 21 : Photographie du nébuliseur Leap Technologies utilisé au laboratoire.

p39

Figure 22 : Photographie d'une coupe de cerveau de rat après dépôt de matrice α -CHCA à 10 mg.mL⁻¹ et 100 tirs laser.

p40

Figure 23 : Spectres de masse extraits de la matière grise après l'acquisition d'images d'une coupe sagittale de cerveau de rat. A : image optique de la coupe de cerveau de rat analysée, l'aire entourée de rouge correspond à la zone dont les spectres ont été extraits. B : spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation positif. C : spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif. D : spectre MALDI enregistré en mode d'ionisation positif. E : spectre MALDI enregistré en mode d'ionisation négatif.

p51

Figure 24 : Images ioniques enregistrées à la surface d'une coupe sagittale de cerveau de rat. A à C : Images MALDI-TOF en mode d'ionisation positif. A : m/z 780,7 ; phosphatidylcholine [PC36:5+H]⁺. B : m/z 796,8 ; [PE40:4+H]⁺ ou [PE38:1+H]⁺ ou [PC34:2K]⁺. C : m/z 806,7 ; [PC38:6+H]⁺. Images de 106x237 pixels avec une taille de pixel de 100 μ m. D à G : Images MALDI-TOF enregistrées en mode d'ionisation négatif. D : m/z 283,1 ; carboxylate de l'acide gras C18:0. E. m/z 303,2 ; carboxylate de l'acide gras C20:4. F : m/z 888,7 ; sulfatide ([ST 24:1-H]⁻). G : superposition en deux couleurs des ions à m/z 726,6 ([PEo-36:2-H]⁻), en rouge et à m/z 834,7 ([PS40:6-H]⁻), en bleu. Images de 214x408 pixels avec une taille de pixel de 50 μ m. la valeur de l'intensité indiquée en blanc dans chaque image correspond aux intensités minimum et au maximum dans un pixel.

H à J : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation positif. H : m/z 184,1 ; tête polaire de la phosphatidylcholine. I : m/z 385,4 ; cholestérol ([M-H]⁺). J : m/z 798,6 ; [PE40:4+H]⁺ ou [PE38:1+H]⁺ ou [PC34:2K]⁺. K à N : images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif. K : m/z 283,2 ; carboxylate de l'acide gras C18:0. L : m/z 429,3 ; vitamine E ([M-H]⁻). M : m/z 888,9 ; sulfatide ([ST 24:1-H]⁻). N : superposition en trois couleurs des ions correspondants aux carboxylates de l'acide gras C16:0 en rouge, à la vitamine E en vert et au sulfatide ST18:0 en bleu. Pour toutes les images TOF-SIMS : ion primaire : Bi₃²⁺ ; 50 keV ; PIDD : 3,4x10⁸ ions.cm⁻² ; taille des images de 22,4x22,4 mm² et

taille de pixel de $87,5 \times 87,5 \mu\text{m}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p52

Figure 25 : Spectre MALDI-TOF *in situ* en mode MS/MS de l'ion précurseur à m/z 846,6 ($[\text{PS40:6-H}]^-$) en mode d'ionisation négatif. Énergie de collision : 1 keV; gaz de collision : air.

p55

Figure 26 : Spectre TOF-SIMS en mode PSD de l'ion précurseur à m/z 760,6 ($[\text{PC34:1+H}]^+$). D'après la référence 104.

p55

Figure 27 : Images TOF-SIMS enregistrées à la surface d'une coupe sagittale de cerveau de rat. A : image optique. Les images ioniques ont été enregistrées dans le carré blanc indiqué par la flèche. B et C : images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif. A : m/z 184,2 ; tête polaire de la phosphatidylcholine. B : m/z 369,4 ; cholestérol ($[\text{M+H-H}_2\text{O}]^+$). D à F : images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif. D : m/z 429,4 ; vitamine E ($[\text{M-H}]^-$). E : somme des ions correspondants aux sulfatides. F : superposition en deux couleurs du carboxylate de l'acide gras C16:0 en rouge et du cholestérol en vert. Ions primaires Bi_3^{2+} ; 50keV ; PIDD : 2×10^{12} ions. cm^{-2} ; taille des images de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$; taille des pixels de $390 \times 390 \mu\text{m}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p56

Figure 28 : A : image TOF-SIMS du courant ionique total en mode « *burst alignment* » de la grille « *1000 mesh* ». Ions primaire : Bi_3^{2+} ; 50 keV ; PIDD : 2×10^{11} ions. cm^{-2} ; taille de l'image de $50 \times 50 \mu\text{m}^2$; taille de pixel de $97 \times 97 \text{nm}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur $[0, mc]$ de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). B : Profil de l'aire délimité par le carré rouge de l'image du courant ionique total montrant que le diamètre du faisceau est inférieur à 300 nm (16-84% de la hauteur total).

p57

CHAPITRE I

Développement méthodologique : Localisation de flavonoïdes dans des graines végétales

Tableaux :

Tableau 1 : Localisation des principaux flavonoïdes et de quelques précurseurs dans les coupes de *P. sativum* NGB5839. **p79**

Tableau 2 : Localisation des principaux flavonoïdes et de quelques précurseurs dans les coupes de *P. sativum* ZP-840. **p80**

Figures :

Figure 1 : Structure des deux aglycones, kaempférol (A ; 3,4',5,7-tétrahydroflavone) et quercétine (B ; 3,3',4',5,7-tétrahydroflavone). **p67**

Figure 2 : Photographie de *Pisum sativum* (A) et d'*Arabidopsis thaliana* (B). **p68**

Figure 3 : Photographie d'une coupe de graine de *P. sativum* (A) et schéma représentant une coupe de graine d'*A. thaliana* (B). **p70**

Figure 4 : Schéma détaillant la procédure suivie afin d'obtenir des plots analysables. **p72**

Figure 5 : Structures des flavonoïdes et principales fragmentation observées en spectrométrie de masse TOF-SIMS de molécules déprotonées $[M-H]^-$ en mode d'ionisation négatif. A : quercétine (R=OH) ou kaempférol (R=H) 3-O-rutinoside. B : quercétine (R=OH) ou kaempférol (R=H) 3-O-glucoside. Les ions Y_0 et Y_1 représentent respectivement les ions fragments obtenus après la perte du groupe glycosidique entier ou seulement du sucre externe. Les ions Y'_0 et Y''_0 , qui n'ont pas été utilisés pour l'imagerie, correspondent respectivement aux ions $[Y_0-H]^-$ et $[Y_0-2H]^-$. D'après Kerhoas *et al.*¹⁸. **p73**

Figure 6 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif de la quercétine 3-*O*-rutinoside (A), de la quercétine 3-*O*-rhamnoside (B) et du kaempférol 3-*O*-rutinoside (C) (0,5 mg.mL⁻¹ dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v)). **p74**

Figure 7 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif de la quercétine 3-*O*-rhamnoside (masse exacte : 447,10) à 0,5 µg.µL⁻¹ (A), 50 ng.µL⁻¹ (B), 5 ng.µL⁻¹ (C) et 0,5 ng.µL⁻¹ (D) dans une solution de méthanol/eau 50:50 (v:v). Des images de 4x4 µm² avec 64x64 pixels ont été enregistrées sur un dépôt de 1 µL de chacune de ces solutions pour obtenir ces spectres. Dose d'ions primaires : 1,5x10⁹ ions.cm⁻², Bi₃⁺, canon à électron activé. **p76**

Figure 8 : Spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistré à la surface d'une coupe de *P. sativum* ZP-840. **p77**

Figure 9 : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de *P. sativum* NGB 5839. A : acide *p*-hydroxybenzoïque (*m/z* 137,01). B : acide protocatéchuique ou aldéhyde gallique (*m/z* 153,02). C : fragment de flavonoïde (kaempférol à *m/z* 285,05). D : fragment de flavonoïde (quercétine à *m/z* 301,05). E : apigénine glycoside (*m/z* 431,33). F : quercétine 3-*O*-galactoside (*m/z* 463,15). G : ROI montrant en jaune l'enveloppe, en vert le radicule, en bleu le cotylédon et en rouge la région de l'enveloppe proche de la radicule. H : image optique. Images de 13x13 mm² à 256x256 pixels, taille de pixel : 50,78x50,78 µm², dose d'ions primaires de 3,86x10⁹ ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p78**

Figure 10 : Images TOF-SIMS enregistrées en mode d'ionisation négatif à la surface d'une coupe de *P. sativum* ZP-840. A : acide *p*-hydroxybenzoïque (*m/z* 137,01). B : acide protocatéchuique ou aldéhyde gallique (*m/z* 153,02). C : fragment de flavonoïde (kaempférol à *m/z* 285,05). D : fragment de flavonoïde (quercétine à *m/z* 301,06). E : apigénine glycoside (*m/z* 431,33). F : quercétine 3-*O*-galactoside (*m/z* 463,15). G : ROI montrant en jaune l'enveloppe, en vert le radicule, en bleu le cotylédon et en rouge la région de l'enveloppe proche de la radicule. H : image optique. Images de 9,1x9,1 mm² à 256x256 pixels, taille de

pixel : $35,54 \times 35,54 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $6,7 \times 10^9 \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p79

Figure 11 : Résultats obtenus en incluant les graines d'*A. thaliana* dans de la paraffine. A : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. B : image des électrons secondaires de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 1024×1024 pixels, soit une taille de pixel de $488 \times 488 \text{ nm}^2$. C : images des ions à m/z 285,05; 301,02 et 447,16. Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $3,43 \times 10^{11} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p83

Figure 12 : Résultats obtenus en incluant les graines d'*A. thaliana* dans de la résine Spurr. A : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. B : image des électrons secondaires de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 1024×1024 pixels, soit une taille de pixel de $488 \times 488 \text{ nm}^2$. C : images des ions à m/z 285,04; 301,06 et 447,12. Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $3,38 \times 10^{11} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p84

Figure 13 : Résultats obtenus en incluant les graines fraîches d'*A. thaliana* dans de la colle OCT. A : spectre de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif. B : image des électrons secondaires d'une coupe de graine recouverte par la colle. C : image en électrons secondaire d'une coupe de graine non recouverte. Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 1024×1024 pixels, soit une taille de pixel de $488 \times 488 \text{ nm}^2$. D : images des ions à m/z 285,03; 301,03 et 447,10. Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $2 \times 2 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $3,52 \times 10^{11} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p85

Figure 14 : Résultats obtenus en incluant les graines fraîches d'*A. thaliana* dans la résine polyester. A : images des ions à m/z 285,03; 301,03 et 447,10. Images de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $1,5 \times 1,5 \mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $1,5 \times 10^{12}$ ions. cm^{-2} . B : image des électrons secondaires d'une coupe de graine. Images de $400 \times 400 \mu\text{m}^2$ à 512×512 pixels, soit une taille de pixel de $800 \times 800 \text{nm}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p87

Figure 15 : Spectre de masse TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif à la surface d'une graine fraîche d'*A. thaliana* incluse dans de la résine polyester et extrait de la ROI enveloppe.

p88

Figure 16 : Superposition en deux couleurs enregistrée à la surface d'une graine fraîche incluse dans de la résine polyester. Vert : somme des images des pics correspondants aux flavonoïdes (m/z 285,04; 301,03 et 447,12). Rouge : somme des images des pics correspondants aux carboxylates des acides gras contenant 18 carbones (m/z 277,25; 279,24; 281,22 et 283,24). Images enregistrées en mode « burst alignment », de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : $586 \times 586 \text{nm}^2$, dose d'ions primaires de 4×10^{12} ions. cm^{-2} .

p89

Figure 17 : Portions de spectres de masse TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de graines WT (a-d), *tt7* (e-h) et *tt4* (i-l) et extraits de la région enveloppe.

p90

CHAPITRE II

Localisation de molécules exogènes

Tableaux :

Tableau 1 : Valeurs de m/z pour les ions $^{79}\text{Br}^-$ et $^{81}\text{Br}^-$ mesurées par spectrométrie de masse TOF-SIMS sur des coupes de glandes surrénales et d'ovaires de rats dosés ainsi que leur déviation en ppm par rapport à la masse théorique. **p104**

Tableau 2 : Concentration du composé anti-inflammatoire dans la peau et dans les fluides, déterminée pour quatre formulations différentes. **p122**

Figures :

Figure 1 : Structure chimique des PBDE. **p97**

Figure 2 : Bilan de l'étude métabolique menée durant quatre jours sur des rats femelles nourris de force avec 2 mg.kg⁻¹ de [¹⁴C]-DBDE chaque jour entre les jours de gestation 16 à 19. Extrait de la référence 21. **p98**

Figure 3 : Spectre TOF-SIMS enregistré en mode d'ionisation négatif d'une solution étalon de decabromodiphényle éther à 1 mg.mL⁻¹ dans une solution eau/méthanol, 50:50 v:v. **p102**

Figure 4 : Parties de spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de coupes de glandes surrénales de rat témoin (A) et dosés (C), et à la surface de coupes d'ovaires de rats témoins (B) et dosés (D). L'axe des ordonnées est présenté en échelle logarithmique. **p103**

Figure 5 : Parties de spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation négatif à la surface de glandes surrénales de rats dosés pour des énergies cinétiques des ions secondaires de 2 keV (A et B) et 1 keV (C et D). **p105**

Figure 6 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes de foies de rats. A et B : images optiques. C et D : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. E : rats

témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de $17,8 \times 17,8 \text{ mm}^2$ à $23,8 \times 23,8 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, 256 tirs/pixel, taille de pixel de $69,5 \times 69,5 \text{ }\mu\text{m}^2$ à $92,9 \times 92,9 \text{ }\mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $8,4 \times 10^8 \text{ ions.cm}^{-2}$ à $1,75 \times 10^9 \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p106**

Figure 7 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes de glandes surrénales de rats. A, B et C : images optiques. D, E et F : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. G, H et I : rats témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de $3,52 \times 3,52 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, 512 tirs/pixel, taille de pixel de $13,7 \times 13,7 \text{ }\mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $8,74 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p107**

Figure 8 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes d'ovaires de rats. A, B et C : images optiques des coupes colorées au Trichome de Masson. D, E et F : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. G, H et I : rats témoins, images obtenues en sélectionnant la même zone que pour l'ion $^{81}\text{Br}^-$. Pour toutes les images : taille de 6×6 à $7,4 \times 7,4 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, 512 tirs/pixel, taille de pixel de $23,4 \times 23,4 \text{ }\mu\text{m}^2$ à $28,9 \times 28,9 \text{ }\mu\text{m}^2$, dose d'ions primaires de $1,8 \times 10^{10}$ to $4 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p108**

Figure 9 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrées à la surface de coupes d'ovaires de rats. A : image optique de la coupe colorée au Trichome de Masson. B : rats dosés, images de l'ion $^{81}\text{Br}^-$. C : même image que B mais après avoir additionné, pour tous les pixels, le nombre de coups des 4 pixels adjacents. Taille de $2,7 \times 2,7 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, taille de pixel de $10,5 \times 10,5 \text{ }\mu\text{m}^2$ (B) et 128×128 pixels, taille de pixel de $21 \times 21 \text{ }\mu\text{m}^2$ (C), 512 tirs/pixel, dose d'ions primaires de $1,4 \times 10^{11} \text{ ions.cm}^{-2}$. Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le

nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p109**

Figure 10 : représentation schématique d'une glande sébacée. **p112**

Figure 11 : Spectres TOF-SIMS enregistrés en mode d'ionisation positif (en haut) et négatif (en bas) du composé à 1 mg.mL^{-1} dans une solution méthanol/dichlorométhane 99,9:0,1 (v:v). **p117**

Figure 12 : Images MALDI en mode MS (A et B) et MS/MS (C et D) enregistrées en mode d'ionisation positif sur des coupes de peau de cadavre humain traitée avec l'agent anti-acné. A : Image du pic à m/z 466,2 correspondant au composé déprotoné. B : Superposition de l'image ionique du composé et de l'image optique de la coupe de peau analysée. C : Image d'un fragment à m/z 399,1 obtenu en mode MS/MS (ion précurseur : m/z 466,2). D : Superposition de l'image ionique du fragment du composé à m/z 399,1 et de l'image optique de la coupe de peau analysée. **p118**

Figure 13 : Images TOF-SIMS de $3 \times 3 \text{ mm}^2$ à 256×256 pixels en mode d'ionisation positif enregistrées sur des coupes de peau de cadavre humain traitée (A à F) et témoin (13G à 13L). A et G : image de l'ion à m/z 184,12 correspondant à la tête polaire de la phosphocholine. B et H : image de l'ion correspondant à la vitamine E à m/z 430,42. C et I : somme des images des pics correspondants aux diglycérides. D et J : somme des images correspondant aux sphingomyélines (m/z 666,78; 703,69 et 725,70). E et K : image de l'ion à m/z 466,2 correspondant au composé. F et L : images optiques, la barre d'échelle correspond à $500 \mu\text{m}$. Dose d'ions primaires : $6,3 \times 10^{10} \text{ ions.cm}^{-2}$, taille de pixel : $11,7 \times 11,7 \mu\text{m}^2$. Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p119**

Figure 14 : Spectre obtenu en soustrayant le spectre extrait de la région riche en composé par le spectre de la région pauvre en composé. La région pauvre contenant 1,882 fois plus de pixel que la région riche, celui-ci a été divisé par ce même facteur. **p120**

Figure 15 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif de glandes sébacées enregistrées sur deux coupes de peau de cadavre humain traitée avec le composé anti-inflammatoire. A et D : image de l'ion à m/z 466,2 correspondant au composé. B et E : superposition en deux couleurs, en rouge, la tête de la phosphocholine à m/z 184,2 et en vert la somme des ions correspondants aux diglycérides. C et F : images optiques des coupes analysées, la barre d'échelle correspond à 100 μm . Images de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à 256×256 pixels, taille de pixel : 2 μm , dose d'ions primaires : 1×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p121

Figure 16 : Spectres TOF-SIMS, en mode d'ionisation positif, enregistrés à la surface de coupes de peau de cadavre humain traitée avec le composé anti-inflammatoire dans quatre systèmes de livraison.

p123

CHAPITRE III

Analyse lipidique pour l'étude de maladies et du métabolisme

Tableaux :

Tableau 1 : Variations de l'aire de certains ions entre les spectres T30min, T1h et T4h et T0 en mode d'ionisation positif. *p166*

Tableau 2 : Variations de l'aire de certains ions entre les spectres T30min, T1h et T4h et T0 en mode d'ionisation négatif. *p169*

Tableau 3 : Variations de l'aire (en pourcentage) de certains ions entre les spectres T0 (référence) et les spectres T30min, T1h et T4h en mode d'ionisation négatif (moyenne de deux acquisitions par temps de digestion). La valeur des écarts-types sont notés dans la colonne +/-.

p177

Figures :

Figure 1 : Modèle topologique de la structure de la protéine CFTR. *p130*

Figure 2 : Schéma représentant le pancréas et ses fonctions endocrines et exocrines. *p133*

Figure 3 : Schéma détaillant les différentes couches composant le côlon. *p134*

Figure 4 : Coloration histologique (rouge : cytoplasme ; bleu : noyau) d'une coupe transversale d'un côlon sain. *p135*

Figure 5 : Images optiques des différentes zones analysées. A et B : pancréas de souris WT. C et D : pancréas de souris KO (échelles = 100 μ m). Les passages de Boll sont désignés par les flèches rouges. *p137*

Figure 6 : Images optiques des deux coupes de pancréas analysées en imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS. A : coupe transversale de pancréas de souris WT. B : coupe longitudinale de pancréas de souris KO. *p137*

Figure 7 : Spectres de masse TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrés sur les coupes de pancréas de la souris WT (A) et sur les coupes de la souris KO (B). **p139**

Figure 8 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de 500x500 μm^2 à une résolution de 2 μm (256x256 pixels) des coupes de pancréas de souris WT (A à J) et KO (K à T). Première colonne : images enregistrées avec la caméra du spectromètre, la barre d'échelle correspond à 100 μm . Seconde colonne : image ionique du carboxylate de l'acide gras C16:0 (m/z 255,23). Troisième colonne : images ioniques du carboxylate de l'acide gras C18:0 (m/z 283,26). Quatrième colonne : images ioniques de l'ion correspondant à la vitamine E déprotonée (m/z 429,37). Cinquième colonne : images ioniques de l'ion correspondant au sulfate de cholestéryle déprotoné (m/z 465,31). Dose d'ions primaire : 3×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistré pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p140**

Figure 9 : Images TOF-SIMS de 500x500 μm^2 à 256x256 pixels en mode d'ionisation négatif enregistrées sur des coupes de côlon de souris WT (A à H) et de souris KO (I à P). A et I : images de l'ion à m/z 253,23 correspondant au carboxylate de l'acide gras C16:1. B et J : images de l'ion à m/z 283,27 correspondant au carboxylate de l'acide gras C18:0. C et K : image du cholestérol à m/z 385,36. D et L : image de l'ion correspondant à la vitamine E à m/z 429,37. E et M : image du sulfate de cholestéryle à m/z 465,32. F et N : somme des images des ions correspondants aux phosphatidylinositols. Dose d'ions primaire : 2×10^{12} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). G et O : images optique de la zone analysée, la barre d'échelle correspond à 200 μm . H et P : superposition en 3 couleurs des images du sulfate de cholestéryle (rouge), de l'acide gras 16:1 (bleu) et de l'acide gras C18:0 (vert). **p142**

Figure 10 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif extraits de la région « cryptes » (A), de la région « chorion » (B) et de la région « bordure épithéliale » (C) d'une coupe de côlon WT. **p144**

Figure 11 : Diagramme détaillant la moyenne des aires normalisées dans les trois régions : « bordure épithéliale », « cryptes » et « chorion », pour la vitamine E (A) et le carboxylate de l'acide gras C16:0 (B).

p145

Figure 12 : Spectres MALDI-TOF enregistrés sur une coupe de côlon WT en mode d'ionisation positif (A) et en mode d'ionisation négatif (B).

p146

Figure 13 : Images MALDI-TOF en mode d'ionisation négatif de coupes de côlon de souris WT (A à C) et KO (D à F). A et D : images optiques des coupes de côlons analysées, l'échelle correspond à 1 mm. B et E : images de l'ion à m/z 303,2 correspondant à l'acide arachidonique (C20:4). C et F : images de l'ion à m/z 327,2 correspondant à acide docosahexaénoïque (C22:6). Les images de côlon de souris WT ont été enregistrées avec 107x116 pixels (taille de pixel de 50x50 μm) et les images de côlon de KO avec 106x106 pixels (taille de pixel de 50x50 μm). La valeur de l'intensité I indiquée en blanc sur chaque image correspond aux intensités minimales et maximales.

p147

Figure 14 : Spectres MALDI-TOF en mode d'ionisation négatif extrait des régions enregistrées sur les coupes de côlon WT (A à C) et KO (D à F).

p148

Figure 15 : Superposition des images des scores de PC1, PC2 et PC3. L'échelle de couleur représente la contribution de chaque pixel pour l'axe principal sélectionné. Rouge, vert et bleu indique une forte contribution positive des composantes PC1, PC2 et PC3 respectivement.

p150

Figure 16 : Biplot des deux premières composantes principales obtenu avec la liste de pic issu de la littérature.

p151

Figure 17 : Biplot des deux premières composantes principales obtenu avec la liste générée par l'algorithme génétique.

p152

Figure 18 : Réactivité de l' α -tocophérol (α -TOH) vis-à-vis d'une espèce radicalaire.

p154

Figure 19 : Coupe histologique de duodénum de souris colorée à l'Oil Red-O. L'échelle correspond à 200 μm .

p157

Figure 20 : Schéma résumant les différentes étapes de l'absorption des acides gras libres et des *sn2*-MAG ainsi que leur conversion en TAGs. Extrait de la référence 32. **p158**

Figure 21 : Principale voie de synthèse des TAGs à partir de *sn2*-monoacylglycérol dans le réticulum endoplasmique des entérocytes. **p159**

Figure 22 : Images optiques de coupe de côlon de souris sacrifiées à T0 (A), à T30min (B), à T1h (C) et à T4h (D) après ingestion d'huile de tournesol et colorées à l'Oil-Red-O. **p162**

Figure 23 : Spectres de masse TOF-SIMS de l'huile de tournesol enrichie en cholestérol en modes d'ionisation positif (A) et négatif (B). **p163**

Figure 24 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation positif enregistrés sur des coupes de duodénum de souris sacrifiées après T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D). **p165**

Figure 25 : Images TOF-SIMS en mode d'ionisation positif de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) des coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A à D), T30min (E à H), T1h (I à L) et T4h (M et P). Première colonne : images enregistrées par la caméra vidéo du spectromètre, le carré vert de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ étant la zone analysée. Seconde colonne : somme des images des ions correspondant aux monoacylglycérols (MAG), aux diacylglycérols (DAG) et aux triacylglycérols (TAG). Troisième colonne : somme des images des ions correspondant aux sphingomyélines (SM). Quatrième colonne : somme des images des ions correspondant aux phosphatidylcholines (PC). Dose d'ions primaires : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups *mc* correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, *mc*] de chaque image, et *tc* indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (*tc* est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p167**

Figure 26 : Spectres TOF-SIMS en mode d'ionisation négatif enregistrés sur des coupes de duodénum de souris sacrifiées après T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D). **p168**

Figure 27 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) des coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris

sacrifiées à T0 (A à E), T30min (F à J), T1h (K à O) et T4h (P à T). Première colonne : images enregistrées par la caméra vidéo du spectromètre, le carré vert de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ étant la zone analysée. Seconde colonne : superpositions en deux couleurs des images de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C16 (C16:1 m/z 253,2; C16:0 m/z 255,2) en rouge, et de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C18 (C18:2 m/z 279,2; C18:1 m/z 281,2; C18:0 m/z 283,2). Troisième colonne : images ioniques du sulfate de cholestéryle (m/z 465,3). Quatrième colonne : images de la somme des ions correspondant aux phosphatidylinositols PI 34 et PI 36. Cinquième colonne : images de la somme des ions correspondant aux PI 38. Dose d'ions primaire : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p170

Figure 28 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ à une résolution de $2 \mu\text{m}$ (256×256 pixels) de l'ion à m/z 514,3 enregistrées sur les coupes ($12 \mu\text{m}$ d'épaisseur) de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A), T30min (B), T1h (C) et T4h (D). Dose d'ions primaire : 5×10^{11} ions. cm^{-2} . Le nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image).

p171

Figure 29 : Spectres MS/MS (1 keV, CID on, précurseur : m/z 514,28) en mode d'ionisation négatif enregistrés avec un MALDI TOF/TOF sur une coupe de duodénum de souris sacrifiée à T4h (A) et sur un dépôt d'acide taurocholique à 1 mg/mL dans une solution d'eau/méthanol 50:50 v/v (B). Matrice : acide α -cyano-4-hydroxycinamique 10 mg/mL (dans acétonitrile/eau 50:50 v/v).

p172

Figure 30 : Structure du taurocholate et attribution des fragments détectés en MS/MS. **p173**

Figure 31 : Images TOF-SIMS, en mode d'ionisation négatif, de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ à une résolution de 390 nm (256×256 pixels) des coupes de duodénum de souris sacrifiées à T0 (A à E), T30min (F à J), T1h (K à O) et T4h (P à T). Première colonne : superposition en deux couleurs des images de la somme des images des ions correspondant aux acides gras C16 (C16:1 m/z 253,2; C16:0 m/z 255,2) en rouge, et de la somme des images des ions

correspondant aux acides gras C18 (C18:2 m/z 279,2; C18:1 m/z 281,2; C18:0 m/z 283,2).
Seconde colonne : image ionique du sulfate de cholestéryle (m/z 465,3). Troisième colonne :
images ioniques de l'acide taurocholique (m/z 514,3). Quatrième colonne : images de la
somme des ions correspondant aux sphingomyélines (m/z 616,4 ; m/z 642,5 et m/z 687,5).
Cinquième colonne : images de la somme des ions correspondant aux PI 34, 36 et 38. Dose
d'ions primaire : 2×10^{12} ions.cm⁻². Le nombre maximum de coups mc correspond à
l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de chaque image, et tc indique le nombre total de
coups enregistrés pour chaque image (tc est égal à la somme des coups de tous les pixels de
chaque image). **p174**

Figure 32 : Sélection des régions d'intérêt afin d'extraire les spectres correspondant aux
entérocytes et au tissu conjonctif des coupes T0 (A à C), T30min (D à F), T1h (G à I) et T4h
(J à L). Première colonne : images optiques enregistrées avec la caméra vidéo du
spectromètre, les carrés blancs correspondent aux zones analysées. Seconde colonne : régions
d'intérêt, en rouge, la zone correspondant aux entérocytes et en vert, la zone correspondant au
tissu conjonctif. Troisième colonne : images ioniques totales de $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ avec une
résolution spatiale de 390 nm (256x256 pixels), dose d'ions primaires : 2×10^{12} ions.cm⁻². Le
nombre maximum de coups mc correspond à l'amplitude de l'échelle de couleur [0, mc] de
chaque image, et tc indique le nombre total de coups enregistrés pour chaque image (tc est
égal à la somme des coups de tous les pixels de chaque image). **p176**

Annexes

Annexe 1

Benabdellah^{*}, F.; Seyer^{*}, A.; Quinton, L.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévote, O.
Mass spectrometry imaging of rats brain sections : nanomolar sensitivity with MALDI versus
nanometer resolution by TOF-SIMS.

Anal. Bioanal. Chem. 2010, 396,151.

** Ces deux auteurs ont autant contribués à ce travail.*

Mass spectrometry imaging of rat brain sections: nanomolar sensitivity with MALDI versus nanometer resolution by TOF–SIMS

Farida Benabdellah · Alexandre Seyer · Loïc Quinton · David Touboul · Alain Brunelle · Olivier Laprévôte

Received: 16 June 2009 / Revised: 29 July 2009 / Accepted: 30 July 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Mass spectrometry imaging is becoming a more and more widely used method for chemical mapping of organic and inorganic compounds from various surfaces, especially tissue sections. Two main different techniques are now available: matrix-assisted laser desorption/ionization, where the sample, preliminary coated by an organic matrix, is analyzed by a UV laser beam; and secondary ion mass spectrometry, for which the target is directly submitted to a focused ion beam. Both techniques revealed excellent performances for lipid mapping of tissue surfaces. This article will discuss similarities, differences, and specificities of ion images generated by these two techniques in terms of sample preparation, sensitivity, ultimate spatial resolution, and structural analysis.

Keywords Mass spectrometry imaging · MALDI · TOF–SIMS · Lipid · Rat brain

Farida Benabdellah and Alexandre Seyer contributed equally to this work.

F. Benabdellah · A. Seyer · D. Touboul (✉) · A. Brunelle · O. Laprévôte
Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS UPR 2301,
Avenue de la Terrasse,
91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France
e-mail: touboul@icsn.cnrs-gif.fr

L. Quinton
Laboratoire de spectrométrie de masse,
Centre d'Analyse des Résidus en Traces—GIGA-R,
Université de Liège,
4000 Liège, Belgium

O. Laprévôte
IFR 71, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes,
4 Avenue de l'Observatoire,
75006 Paris, France

Introduction

Nowadays, biologists have a rising interest in imaging tools in order to survey the local variation of the molecular content of tissue or cell culture. There are numerous chemical imaging techniques, which allow scientists to detect and localize biological compounds at a cellular level, i.e., tens of micrometer resolution. Several drawbacks have to be considered for most of these methods. First of all, chemical tagging is often needed to amplify an excitation signal. For example, fluorescence imaging typically requires fluorophore labeling, which can induce modifications of the biological function or false localization of the compound of interest [1]. Moreover, only pre-selected targets can be studied, at the expense of information about metabolization or interactions with other molecules of interest that may be present in the same area. Secondly, only very few compounds can be simultaneously detected due to a low resolving power or due to the fact that different molecules give rise to overlapping signals. This can be the case for UV [2] or Raman spectroscopy [3]. These two limitations are extremely severe for lipids, and only few of them can be efficiently tagged without losing their biological function. This class of molecules generally exhibits a weak natural absorption in the UV or visible wavelengths. The Nile Red dye [4], which is a sensitive fluorescent histochemical staining tool for tissue lipids, is not specific to any particular lipid class, and up to now no specific immunohistochemical staining is available, except for lipid A [5]. It is quite clear that a new sensitive and specific analytical method for lipid imaging is a big issue, which needs to be developed to overcome these major drawbacks.

Mass spectrometry (MS) offers various versatile tools for lipid analysis. Historically, gas chromatography (GC)

coupled to chemical or electron ionization sources and triple quadrupole analyzer was an efficient and popular combination for the structural and quantitative analysis of lipids [6]. However, complex lipids such as glycerophosphatidyl derivatives needed to be chemically modified by saponification and alkylation prior to be studied. This limitation was overcome by the development of new ionization methods during the 1980s and 1990s, such as electrospray ionization (ESI) [7] and matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) [8]. At the same time, the performances of some mass analyzers, such as time-of-flight (TOF) ones, were increased particularly in terms of the sensitivity. The great advantage of these combinations is the relatively soft ionization process enabling the analysis of intact complex lipids. ESI requires a liquid sample, whereas a solid state sample can be examined by MALDI. MALDI consists to mix and to deposit an organic matrix with/on the sample and to irradiate the surface by a UV or IR light from a pulsed laser. The matrix is usually absorbing at the wavelength of the laser leading to the soft desorption/ionization of the intact compounds of interest. Most of the instruments are equipped with N_2 ($\lambda=337$ nm) or tripled-frequency Nd/YAG ($\lambda=355$ nm) lasers, which are focused to ~ 50 μm on the sample surface. The MALDI-generated singly charged ions are usually introduced in a TOF mass analyzer, which separates them along their time needed to reach a detector after traveling in a linear field-free path or after reflection by an electrostatic mirror. This time-of-flight is proportional, to the first order, to the square root of the mass-to-charge ratio (m/z) of the ions. Combination of a MALDI source and a TOF mass analyzer allows the simultaneous detection of numerous and various compounds (polymers, peptides, metabolites, lipids, etc) in mixture with an excellent sensitivity [9].

In parallel, secondary ion mass spectrometry (SIMS) has been employed since the 1960s for chemical surface analysis [10, 11]. In that case, the sample is bombarded by a focused beam of mono- or polyatomic ions, which induces desorption/ionization of secondary ions from the surface. With mono-atomic ion beams, a lateral resolution down to 50 nm can be achieved but only elemental ions and few organic fragments can be detected [12, 13]. To the contrary, polyatomic ion beams recently demonstrated their efficiency to analyze organic surfaces, particularly tissue sections, with an ultimate resolution of some hundreds of nanometers [14–19]. Both TOF–SIMS and MALDI–TOF offer the unique capability to analyze complex mixtures in one shot and in a confined area. By acquiring mass spectra at regular intervals on a surface, an ion density map, corresponding to the plot of an ion intensity versus (x,y) position, can be reconstructed by appropriate software [20]. Critical experimental steps are the sample preparation [21], the data acquisition and processing, and finally the data

analysis. Here we present the state of the art in terms of lipid imaging of a rat brain section by both TOF–SIMS and MALDI–TOF mass spectrometry imaging techniques with a critical discussion on the nanomolar sensitivity achieved by MALDI versus the nanometer resolution attained by SIMS.

Experimental section

Serial rat brain sections (12 μm thick) were cut at -20 °C with a CM3050-S cryostat (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France) and immediately deposited on a silicon wafer (2-in.-diameter polished silicon wafers, ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France) for TOF–SIMS experiments and a stainless steel plate for MALDI–TOF experiments. The samples were dried under vacuum, at a pressure of a few hectopascals for 10 min before analysis. Optical images were recorded with an Olympus BX51 microscope (Rungis, France) equipped with lenses $\times 1.25$ to $\times 50$ and a Color View I camera, monitored by Cell^B software (Soft Imaging System, GmbH, Münster, Germany).

TOF–SIMS imaging

The experiments have been performed using a commercial TOF–SIMS IV time-of-flight mass spectrometer (Ion-Tof GmbH, Münster, Germany), which is equipped with a liquid metal ion gun filled with bismuth. Bi_3^{2+} ions were selected for all experiments. Primary ions extracted from the source emitter with a 25-kV potential reach the sample surface with a kinetic energy of 50 keV and at an angle of incidence of 45° . Secondary ions are accelerated to an energy of 2 keV, fly through a field free region, and are reflected with a single stage reflector (effective flight path ~ 2 m) before being post-accelerated to 10 keV just before hitting the entrance surface of the hybrid detector, which is made of one single micro-channel plate, followed by a scintillator and a photomultiplier. A low-energy electron flood gun is activated between two primary ions pulses in order to neutralize the sample surface with the minimum damage [22].

Two modes of operation of the ion source were used for this study, which are usually named “high current bunched” mode and “burst alignment” mode [23]. With the so-called high current bunched mode, the pulsed primary ion current, measured with a Faraday cup located on the grounded sample holder, is 1 pA for Bi_1^+ and 0.4 pA for Bi_3^{2+} at 10 kHz (taking into account the two charges borne by this ion, the true number of particles corresponds to half this intensity). Ion pulses of less than 1 ns long hit the sample surface, ensuring a mass resolution of about $M/\Delta M=5 \times 10^3$ (fwhm) at m/z 500, but with a moderate focus of ~ 2 μm . For

the burst alignment mode, the primary ion current is 0.03 pA for Bi_1^+ and 0.006 pA for Bi_3^{2+} at 10 kHz with a pulse duration of ~ 30 ns, according a unitary mass resolution, but a high spatial resolution allowed by a beam focus of ~ 400 nm. The best compromise between acquisition time and image contrast is reached with Bi_3^+ , but Bi_3^{2+} exhibits a better efficiency due to double kinetic energy (50 keV) [16]. It is why this last primary ion has been chosen for the experiments discussed here.

Two modes of image acquisition have been used, depending on the area to be scanned. Images with fields of view of $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ or less are recorded without sample stage movement just by rastering the primary ion beam. Images with a wider field of view of $22.4 \times 22.4 \text{ mm}^2$ were recorded using the so-called stage scan. In this mode, the sample is continuously moved by the sample stage. The repeatability of the movement is better than $5 \mu\text{m}$ and therefore does not limit the lateral resolution. In order to scan the whole surface area, the primary ion beam is rastered over the area of an individual pixel. The number of pixels was always 256×256 , each pixel having therefore a size depending on the area which was scanned.

The fluence (also called primary ion dose density) was always maintained below the so-called static SIMS limit [24] and was adjusted according to the scanned area, from 6×10^8 ions cm^{-2} for large area analysis, to 2.5×10^{11} ions cm^{-2} for $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ areas, and 4×10^{12} ions cm^{-2} for a $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ image.

MALDI imaging

Matrices and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Data were acquired with a 4800 MALDI TOF/TOF mass spectrometer from Applied Biosystems (Les Ulis, France) equipped with a 200 Hz tripled-frequency Nd/YAG pulsed laser (355 nm) and an electrostatic mirror, leading to a routine mass resolution of about 15,000 in MS mode. The acceleration voltage was set at 20 kV, and the delayed extraction time at 250 ns. External mass calibration was achieved using a standard solution of peptides (Pepmix 5, LaserBio Labs, Sophia Antipolis, France). A α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution at 10 mg mL^{-1} concentration in acetonitrile/water/trifluoroacetic acid (70/30/0.1 v/v/v) was prepared for positive ion mode analysis. A 9-aminoacridine matrix solution at 10 mg mL^{-1} concentration in ethanol/water (70/30 v/v) was prepared for negative ion mode analysis of lipids. Rat brain sections were homogeneously covered by matrix using a TM-Sprayer from LEAP Technologies (Carrboro, USA). In this system, the heated nozzle/air spray system is coupled to an isocratic pump, which provides a constant flow rate of $240 \mu\text{L min}^{-1}$ of matrix solution. The MALDI target plate is anchored on an

x - y axis stage, and matrix coating is achieved by moving the sample plate under the fixed nozzle/air system at a linear velocity of $\sim 120 \text{ cm min}^{-1}$. Experimental parameters were optimized in order to reach best sensitivity and reproducibility. When spraying the CHCA matrix solution, the spray was heated at $120 \text{ }^\circ\text{C}$, while for the 9-aminoacridine, the spray was heated at $80 \text{ }^\circ\text{C}$. The number of laser shots per pixel was set to 300 in the positive ion mode and to 200 for lipid analysis in the negative ion mode. The distance between two adjacent pixels was set to $50 \mu\text{m}$, which roughly corresponds to the laser spot diameter and which thus defines the lateral resolution. This lead to acquisition times of several hours, depending of the analyzed surface size. The images were recorded using 4000 Series Imaging software (www.maldi-msi.org, M. Stoeckli, Novartis Pharma, Basel, Switzerland) and processed using TissueView software (Applied Biosystems, Les Ulis, France). The reproducibility was tested over eight tissue sections from three different rat brains. For acquisitions of direct on-tissue MS/MS spectra in the negative ion mode, 800 laser shots per pixel were needed, with a collision energy fixed at 1 keV and air pressure in the collision cell of $3 \times 10^{-6} \text{ Pa}$.

Results and discussion

Sample preparation

Sample preparation is the crucial step in order to acquire good quality chemical images, with good contrast and minimizing delocalization. Tissue sections of 10 – $20 \mu\text{m}$ thickness can be deposited on different supports. For TOF-SIMS, as the sample is simply dried under vacuum before being introduced in the mass spectrometer, the support just needs to be clean and as flat as possible. Moreover, the sample holder offers the possibility to analyze large sample of several tens of square centimeters. Different surfaces have been tested in the past. The first choice was directed to indium tin oxide (ITO) conductive glass slides, which have been firstly developed for MALDI imaging [25]. Nevertheless, one should remember that TOF-SIMS was initially devoted to metal surface analysis due to an excellent sensitivity toward metallic compounds. Thus, strong interferences were detected outside of the tissue surface, making some images difficult to interpret. The second choice was disposable stainless steel foils, leading to only iron and iron oxides signals out of the sample of interest. Finally, our final choice turns toward silicon wafers, which offered all required specifications and a cheap price, making them disposable.

For MALDI imaging, sample plates are limited to commercially available stainless steel ones, although ITO

conductive glass slides can be used on some instruments. Washing steps with organic solvents or buffer solutions are described in the literature for peptides and proteins analysis [26]. For lipids, no washing step is needed; especially, no organic solvent should be used in order to avoid removal or delocalization of these compounds.

Contrarily to TOF–SIMS, the crucial step for MALDI is the matrix deposition. The goal is to obtain a homogeneous coating of a thin matrix layer over the sample surface. A compromise is absolutely required between a wet deposition, which is needed for an efficient mixing between the sample compounds and the matrix solution, and a dry deposition, which is needed to avoid delocalization. Several apparatus have been tested in our laboratory. The first one was a manual air brush working with an adjustable N₂ gas pressure. This simple setup allowed us a very wet matrix deposition, leading to partial compounds delocalization over the surface. Moreover, low reproducibility was achieved due to small variations on spraying distance, gas pressure, and displacement velocity. Second attempts were done using an electrospray deposition. This technique was described in the literature to be very efficient for a uniform coating [27]. Nevertheless, a very dry matrix deposition was usually obtained leading to low sensitivity. Final try was achieved with a new sprayer robot, which has been developed by LEAP Technologies. This robot is equipped with a heated nozzle making a narrow aerosol of matrix droplets. The sample is moved under the thermal spray, allowing a regular matrix coating of a rat brain in less than 1 min. One or two deposition steps are only necessary to reach an optimal sensitivity during the latter analysis with the mass spectrometer. Matrix crystals with a typical size of less than 10 μm are produced on the tissue surface, and no noticeable delocalization was observed when optimizing solvent mixture and spray temperature. More than 100 tissue sections have been already analyzed using this apparatus, and an excellent reproducibility was achieved. Other automatic matrix sprayers are also commercially available and seem to be efficient as well for homogeneous and reproducible matrix deposition [28–32].

Last but not the least choice is the matrix itself. For positive ion mode, CHCA and DHB are typically used for low mass range, i.e., below 2,000 Da, whereas sinapinic acid is better suited for large peptide and protein analysis. CHCA seems to be the best option for lipid imaging due to a lower laser power needed for desorption/ionization and a very good sample surface coverage when deposited with the robotic sprayer. In the negative ion mode, CHCA is also well suited even if a better sensitivity can be achieved with 9-aminoacridine (9-AA). The only limitation with 9-AA is its toxicity, which forces the operator to take safety precautions when manipulating it.

Data acquisition and processing

Prior to any acquisition, the most important parameter to be chosen is the spatial resolution needed for the analysis. It is in the following defined by the pixel size. Keeping in mind that for any decrease of the pixel size by a factor of 10, the studied area is decreased by a factor of 100. This leads to a decrease of sensitivity by the same order of magnitude. Consequently, the choice of the spatial resolution depends on the instrument capacities, the needed level of details, and the sensitivity, which is related to the class of compounds to be analyzed. It must also be clear that, even if mass spectrometry is a very sensitive method, which provides parallel access to a many ion signals, ionization yields are usually lower than 0.01% for both MALDI and SIMS, meaning that a great part of the sputtered material is lost and not detected. For TOF–SIMS imaging acquisitions, three kind of images were recorded. Large area images of 22.4 × 22.4 mm², with 256 × 256 pixels, correspond to a moderate pixel size of 87.5 × 87.5 μm². In that case, which involves a stage scan analysis, the fluence was 3.4 × 10⁸ ions cm⁻², and the acquisition time is more than 4 h due to the slow moving of the sample stage. In a second case, images of 500 × 500 μm² were recorded, with the same number of pixels, leading to a pixel size of ~2 μm and an acquisition time of ~5 min for a fluence of 2.5 × 10¹¹ ions cm⁻². For these two kinds of image acquisition, the high current bunched mode provided a moderate beam focus of 2 μm together with a high mass resolution. A third kind of TOF–SIMS images was recorded, with a field of view of 100 × 100 μm², and still 256 × 256 pixels, leading to a pixel size of 390 nm, which required the burst alignment beam focus mode (Fig. 1). In this last case, the primary ion beam intensity is much lower than for the previous experiments. However, since the scanned area is also much smaller, a fluence of 2 × 10¹² ions cm⁻² can be reached in only ~20 min of acquisition time. Under such conditions, the mass resolution decreases dramatically, and the lack of sensitivity limits the effective *m/z* range to [0–400]. Such a high lateral resolution is not accessible on commercial MALDI instrument, although an original setup with a laser focused at 1 μm was published [33, 34]. Nevertheless, a debate is still open on the real MALDI process at such a low resolution, and one can simply state that for laser spots smaller than ~10 μm, ablation and sputtering of the target material becomes the major consequence of the irradiation and likely annihilates ionization [35].

Before any image acquisition, mass calibration is always required. For TOF–SIMS, internal calibration is easily achieved due to an excellent linear relationship over the entire mass range between the time-of-flight and the square root of *m/z*. Thus, low mass fragment ions, i.e., H⁺, C⁺, CH₃⁺ ... in positive ion mode and H⁻, C⁻, CH⁻, CH₂⁻,

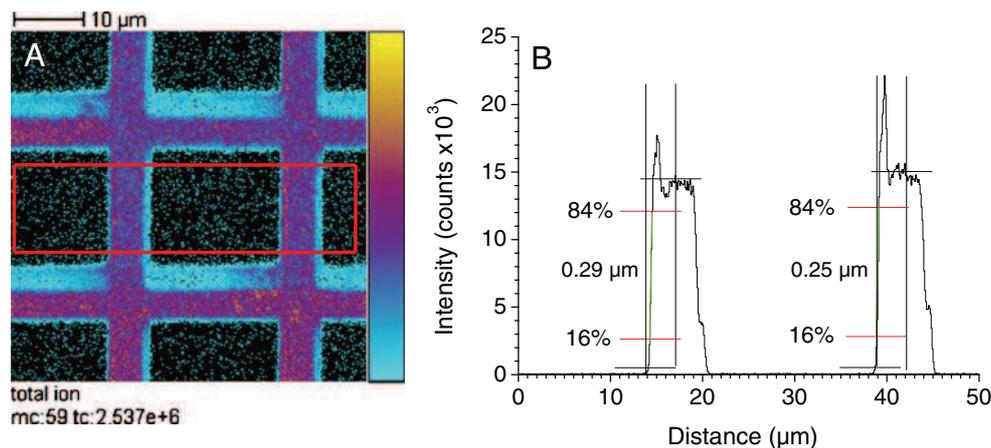


Fig. 1 **a** TOF-SIMS total ion image in burst alignment mode of a 1,000 mesh grid. Primary ion Bi_3^{2+} , 50 keV, 2×10^{11} ions cm^{-2} , area $50 \times 50 \mu\text{m}^2$, 512×512 pixels, pixel size $97 \times 97 \text{ nm}^2$. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts mc and

could be read as $[0, mc]$. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (it is the sum of counts in all the pixels). **b** Profile of the area delimited in red in the total ion image showing a beam profile of less than 300 nm (16–84% of full height)

C_2^- ... in negative ion mode, can be used for a complete calibration. Refinement can be sometimes necessary using known ions, such as m/z 224 and 369 in the positive ion mode, corresponding to phospholipids fragments and cholesterol, respectively, or fatty acid carboxylate ions in the negative ion mode [36]. For MALDI-TOF, mass calibration is only external, leading to a worst mass accuracy compared to TOF-SIMS. Lipids or peptides calibration standards are spotted as close as possible to the tissue section in order to limit the mass calibration drift usually observed over large sample surfaces. Matrix ions could be also used as internal calibrants, although CHCA and 9-AA generate only ions at m/z values below 300.

Data processing is finally the last step before image visualization. For both systems, proprietary softwares are available. They allow extracting ion images from a global mass spectrum of the surface, reconstructing mass spectra from different part of the sample, and basic statistic data treatment (principal component analysis, profiles, sums and differences between images, etc). A standard format, which could allow a data processing on any imaging software and a complete compatibility between different instrumental data, is strongly needed. Some efforts are done by several groups, especially with the so-called *i-mzML* data format, according to the HUPO Proteomics Standard Initiative [37, 38]. It must be noted that computers with RAM larger than 2 gigabytes are actually needed due to the fact that the complete set of spectra, i.e., 10,000 spectra for a 100×100 pixels image size, need to be entirely loaded.

Lipid imaging by TOF-SIMS and MALDI-TOF-TOF

Lipids are fat-soluble molecules, which are involved in energy storage, cell membrane structure, and signaling

pathways. Among them, phospholipids are those which have the greatest importance to maintain membrane integrity, modulate its flexibility, permeability, and to allow anchorage of surface proteins. Since all cellular structures are surrounded by a phospholipide bi-layer, this class of compounds is abundant and also directly reflects the cellular state. Thus, phospholipids can be considered as good biomarkers for degenerative processes [39], cancer [40], and diabetes [41]. Phospholipids can be divided into two sub-classes. The first one contains a diglyceride skeleton, a phosphate group, and a head, which is a simple organic molecule, such as choline or ethanolamine, while the second one is derived from sphingosine, instead of glycerol. Depending on their chemical structures, i.e., the presence of a basic, neutral, or acidic head group, their ionization can be preferentially promoted in positive or in negative ion mode. Phospholipids exhibit wide structure diversity, especially due to the large number of fatty acid lengths occurring in the nature. Except bacteria, the most common fatty acid chains are C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:4, and C22:6, already leading to 81 possible combinations.

Imaging at a spatial resolution of several tens of microns

Lipid imaging by mass spectrometry is now of growing interest due to the high sensitivity of MALDI, i.e., nanomolar concentration, and high resolution of SIMS, i.e., down to several hundreds of nanometers [42]. Several biological applications have been already studied in our laboratory [36, 43–50]. Global mass spectra acquired from adjacent rat brain sections by TOF-SIMS and MALDI-TOF in the positive and negative ion modes are displayed in Fig. 2. The gray matter part of the rat brain was selected as

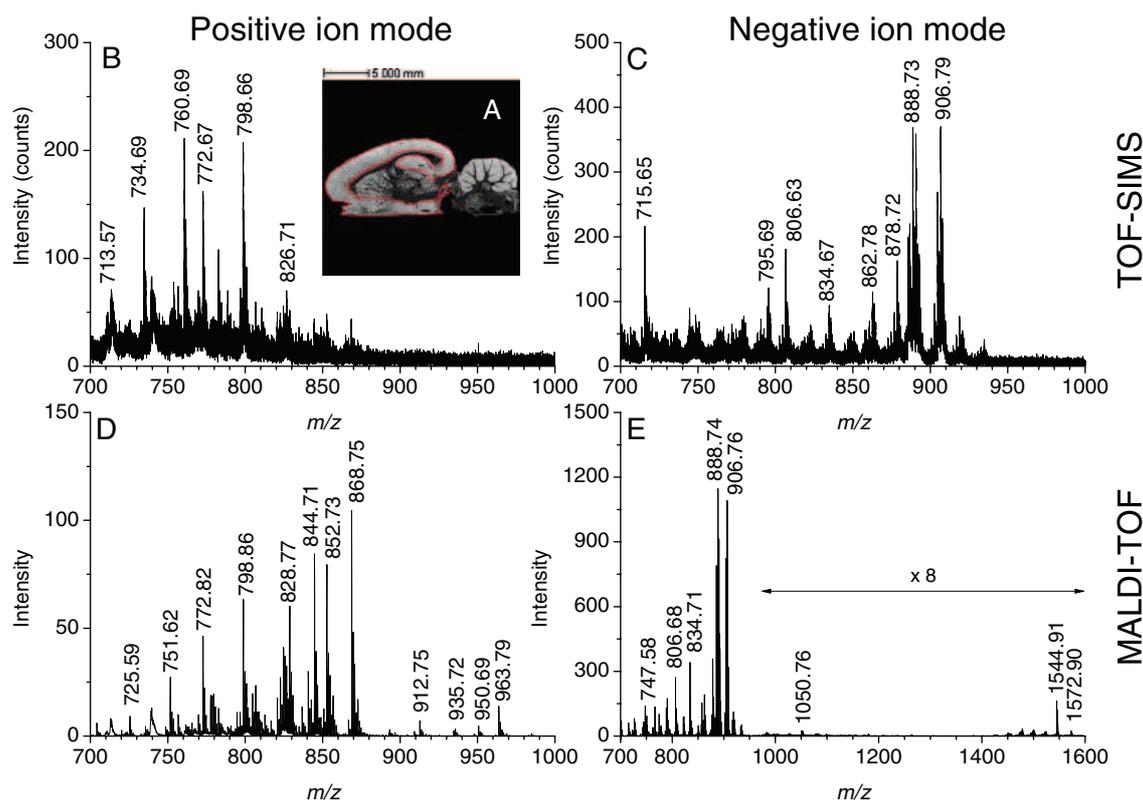


Fig. 2 Time-of-flight spectra extracted from the gray matter part after acquisition of images from a rat brain section. *a* Optical picture of a sagittal section of a rat brain. The area is surrounded in red. *b* TOF–

SIMS spectrum in the positive ion mode. *c* TOF–SIMS spectrum in the negative ion mode. *d* MALDI–TOF spectra in the positive ion mode. *e* MALDI–TOF spectrum in the negative ion mode

a region of interest to draw these spectra. Most of the ions are detected by both SIMS and MALDI methods, but with quite different relative intensities. It must be noted that the signal-to-noise ratio is dramatically decreasing for increasing m/z values in TOF–SIMS, whereas it strongly depends on the matrix and laser intensity in MALDI–TOF. Moreover, the chemical micro-environment is also playing a role during desorption/ionization process. Thus, even if the global profile cannot be directly used to access to relative or absolute lipid concentration in the tissue, one should expect the same localization of the ions over the sample surface. Figure 3 shows ion images obtained from adjacent rat brain sections by TOF–SIMS and MALDI–TOF analysis in positive and negative ion modes. The ion at m/z 283, corresponding to the C18:0 (stearic) fatty acid and detected in the negative ion mode by both techniques, is mainly located in the gray matter with a residual signal in the white matter. However, small differences are observed. In MALDI experiments, fatty acids seem to be more concentrated in the *dentate gyrus* and at the edge of the gray matter of the *cerebellum*, which could be attributed to the inner granular layer. This difference between TOF–SIMS and MALDI–TOF images could be due to a six times higher contrast (the amplitudes of the color scale bars) for

MALDI–TOF images compared to TOF–SIMS ones. The ion at m/z 888.6 in the negative ion mode, corresponding to a sulfatide C24:1 [51], is highly concentrated in the white matter on both TOF–SIMS and MALDI–TOF images. Sulfatide is described in the literature to be highly abundant in the white matter, playing a role in the axonal myelination [52]. That is in excellent agreement with our experiments. Ions at m/z 385 in the positive ion mode and at m/z 429 in the negative ion mode, and corresponding to cholesterol and vitamin E, respectively [36], are only detected by TOF–SIMS. Both these ions are perfectly colocalized on the rat brain section. Cholesterol and vitamin E are well known to be mostly located in the white matter, especially in the *corpus callosum*, where they also play a role in the axonal myelination [53]. Color overlays are shown, with the MALDI–TOF images of ions at m/z 726.6 (red) and at m/z 834.7 (blue), which can be assigned to deprotonated plasmalogen phosphatidylethanolamine C36:2 and deprotonated phosphatidylserine C40:6, respectively. These overlays display an excellent anti-colocalization with C16:0, vitamin E, and sulfatide 18:0. By using these overlays between several ion images, local structures of the rat brain can be easily defined thanks to important differences in their lipid content.

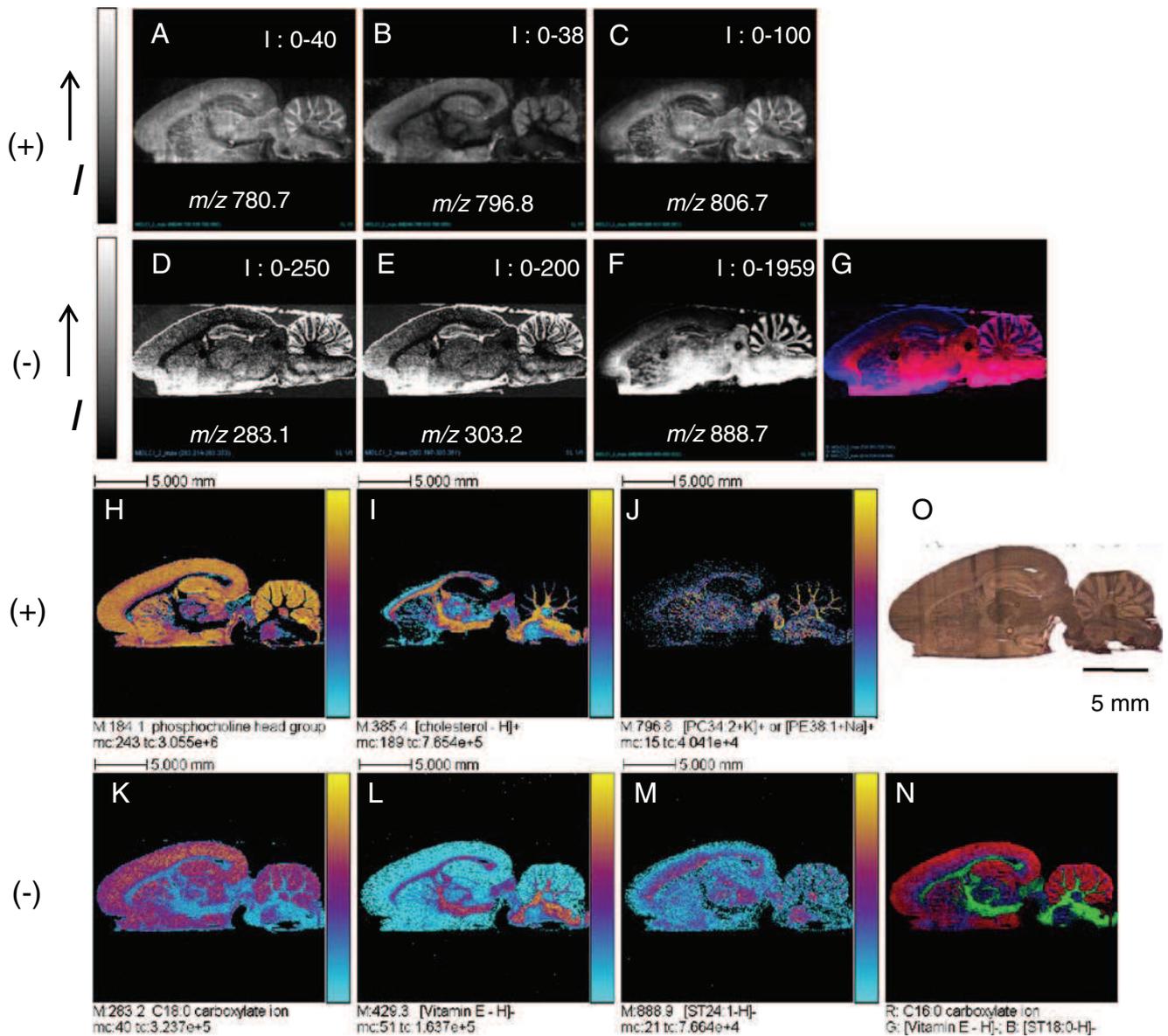


Fig. 3 Ion images of a sagittal rat brain section. **a** to **c** MALDI-TOF ion images in the positive ion mode. **a** m/z 780.7 (phosphatidylcholine [PC 36:5+H]⁺); **b** m/z 796.8 ([PE 40:4+H]⁺ or [PE38:1+Na]⁺ or [PC34:2 [PC34:2+K]⁺]; **c** m/z 806.7 ([PE 44:12+H]⁺ or [PC 38:6+H]⁺). Images of 106×237 pixels with a pixel size of 100 μm. **d** to **g**: MALDI-TOF ion images in the negative ion mode. **d** m/z 283.1 (fatty acid carboxylate [C18:0-H]⁻); **e** m/z 303.2 ([C20:4-H]⁻); **f** m/z 888.7 (sulfatide [ST d18:1/24:1-H]⁻); **g** two-color overlay between MALDI-TOF ion images of [PE o-36:2-H]⁻ (m/z 726.6) in red and of phosphatidylserine [PS 40:6-H]⁻ (m/z 834.7) in blue. Images of 214×408 pixels with a pixel size of 50 μm. The value of intensity (*I*) indicated in white in each image corresponds to the minimum and the maximum intensities in a pixel. **h** to **j** TOF-SIMS ion images in the

positive ion mode. **h** m/z 184.1 (phosphocholine head group); **i** m/z 385.4 ([cholesterol-H]⁺); **j** m/z 796.8 ([PE 40:4+H]⁺ or [PE38:1+Na]⁺ or [PC34:2+K]⁺). **k** to **n** TOF-SIMS ion images in negative ion mode. **k** m/z 283.2 (fatty acid carboxylate [C18:0-H]⁻); **l** m/z 429.3 ([vitamin E-H]⁻); **m** m/z 888.9 ([ST d18:1/24:1-H]⁻); **n** three-color overlay between TOF-SIMS ion images C16:0 carboxylate ion (red), vitamin E (green), and [ST d18:1/18:0-H]⁻ (blue). For all TOF-SIMS images: primary ion Bi₃²⁺, 50 keV, 3.4×10⁸ ions cm⁻², area 22.4×22.4 μm², 256×256 pixels, pixel size 87.5×87.5 μm². The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts *mc* and could be read as [0, *mc*]. *tc* is the total number of counts recorded for the specified m/z (it is the sum of counts in all the pixels). **o** Optical ion image of the sagittal rat brain section

Finally, some cases are more problematic. The ion at m/z 796.8, which can be assigned to protonated phosphatidylethanolamine C40:4 or sodium cationized phosphatidylethanolamine C38:1, or potassium cationized phosphatidylcholine C34:2, exhibits perfectly anti-correlated distribution between

TOF-SIMS and MALDI-TOF images. One possible explanation is that one of the species is preferentially desorbed and ionized by the first method, whereas another one is preferentially desorbed and ionized by the second one. This phenomenon is called matrix effect. Different causes can lead

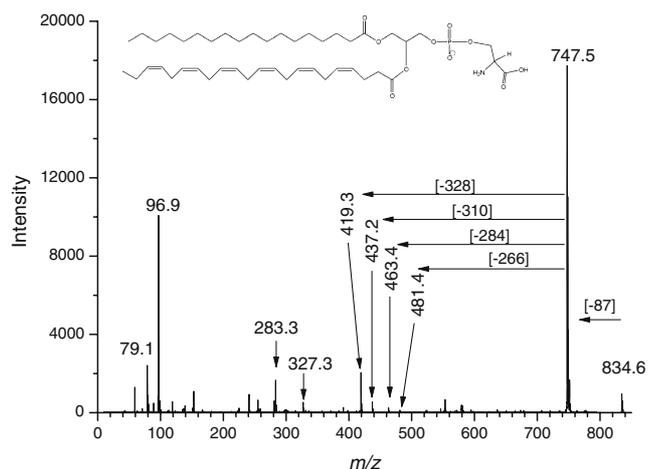


Fig. 4 In situ MALDI/TOF product-ion spectrum of the m/z 834.6 precursor ion, corresponding to a deprotonated phosphatidylserine C18:0/C22:6, acquired in the negative ion mode and directly from a rat brain section. Collision energy was set at 1 keV and air was used as collision gas

to this difference of desorption/ionization. First of all, the nature of the MALDI matrix and its deposition mode plays a crucial role due to differential analyte ionization yield depending on proton affinities and due to extraction effects from the solvent. For both techniques, the environment surrounding the analytes, i.e., salts or other organic compounds, will also modify desorption/ionization yields, leading

the preferential protonation or cationization of the sample. In this particular case, a structural characterization by tandem mass spectrometry (MS/MS) becomes mandatory. Commercial MALDI-TOF-TOF [54, 55] instruments permit to acquire MS/MS spectra directly from the tissue section with a good sensitivity. The most difficult step remains a precise selection of the precursor ion due to the limited mass resolution of the electrostatic gates utilized for this purpose. Overlaps of isotopic patterns of lipid ions of odd and even mass-to-charge ratio are therefore frequently observed, leading to mixed MS/MS spectra, which cannot be easily analyzed. A shortening to less than 1 amu of the window when selecting the precursor ion strongly reduces the sensitivity, meaning that no MS/MS spectra can be acquired for low intensity ions. Figure 4 shows a representative MALDI-MS/MS spectrum of precursor ion at m/z 834.6 in the negative ion mode. The fragment ion at m/z 747.5, which corresponds to a neutral loss of 87, indicates the presence of a serine head group. Ions at m/z 283.3 and 327.3 correspond to deprotonated fatty acids C18:0 and C22:6, respectively. Ions at m/z 463.4 and 419.3 are related to the loss of neutral C18:0 and C22:6 from the ion at m/z 747.5, respectively, whereas ions at m/z 481.4 and 437.2 are linked to the neutral losses of C18:0 and C22:6 ketenes, respectively. Finally, ions at m/z 79.1 and 96.9 confirm the presence of a phosphate group. Thus the precursor ion at m/z 834.6 is unambiguously identified as a deprotonated phosphatidylserine C18:0/C22:6.

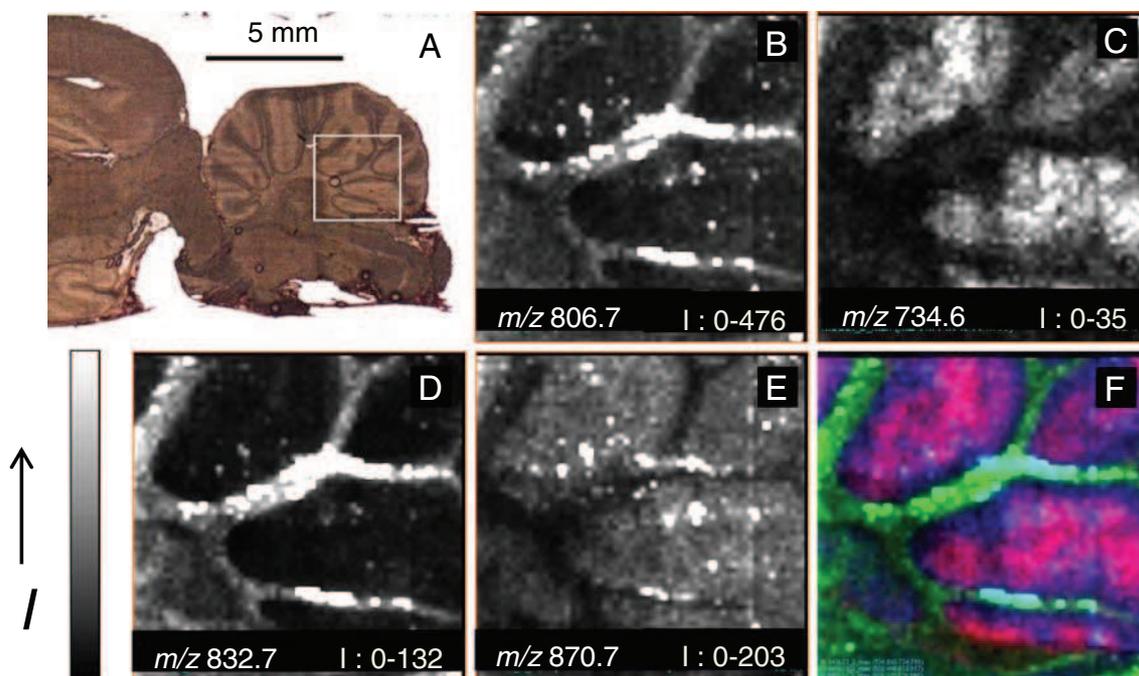


Fig. 5 MALDI mass spectrometric images in the positive ion mode of a sagittal rat brain section. **a** Optical picture of the sagittal rat brain section. The white square corresponds to the area analyzed on the rat brain section. **b** m/z 806.7 ($[\text{PE } 44:12+\text{H}]^+$ or $[\text{PC } 38:6+\text{H}]^+$). **c** m/z 734.6 ($[\text{PC } 32:0+\text{H}]^+$). **d** m/z 832.7 ($[\text{PC } 40:7+\text{H}]^+$). **e** m/z 870.7

($[\text{PC}42:2+\text{H}]^+$). **f** Three-color overlay. Red corresponds to the m/z 734.6 ion, green to m/z 832.7 ion, and blue to m/z 870.7 ion. Images of 62×62 pixels with a pixel size of $50 \mu\text{m}$. The value of intensity (I) indicated in white in each image corresponds to the minimum and the maximum intensities in a pixel

Unfortunately, no good quality spectrum could be acquired for the precursor ion at m/z 796.8. Contrariwise, TOF–TOF–SIMS instrument has just been very recently commercialized by Ionoptika Ltd. and is not yet widely distributed [56]. Two alternatives are possible. The first is to use natural occurring fragmentation, meaning to analyze in-flight fragmentations arising from metastable ions [57, 58]. This technique, called post-source decay (PSD) in MALDI [59], was successfully applied to some lipids in the positive ion mode. Nevertheless, this MS/MS mode is not particularly sensitive because no control of the internal energy and then on the fragmentation rate of metastable ions is currently possible. The second way is to equip a hybrid quadrupole/time-of-flight instrument with a cluster ion beam [60, 61]. It is clear that this setup could be well suited for structural analysis. However, this apparatus is still a prototype and needs to be improved in terms of both sensitivity and spatial resolution, and in fact, only the MS/MS spectrum of cholesterol $[M+H-H_2O]^+$ ion was acquired on a tissue section.

For such large area imaging, MALDI–TOF allows to detect and localize more lipid ions and with a better

sensitivity than TOF–SIMS. Small detailed images, i.e., 62×62 pixels, were acquired in the positive ion mode at a spatial resolution of $50 \mu\text{m}$ (Fig. 5). Ions at m/z 806.7 and m/z 832.7, which can be attributed to protonated phosphatidylcholine 38:6 and 40:7, respectively, exhibit the same localization in the deep white matter of *cerebellum*, while ions at m/z 734.6 and m/z 870.7 are located in the gray matter. The color overlay between these two ionic images and the image of m/z 832.7 ion shows fine differences in their respective localizations: The ion at m/z 870.7 is more abundant at the edge of the white matter, which could be attributed to the inner granular layer, whereas the ion at m/z 734.6 is mainly located in the outer molecular layer. Nevertheless, the spatial resolution is unfortunately not high enough to identify the Purkinje cell layer, which is $\sim 10 \mu\text{m}$ wide.

Imaging at a spatial resolution below $2 \mu\text{m}$

High-resolution images were acquired by TOF–SIMS in the *caudate putamen (striatum)* of the rat brain with the high

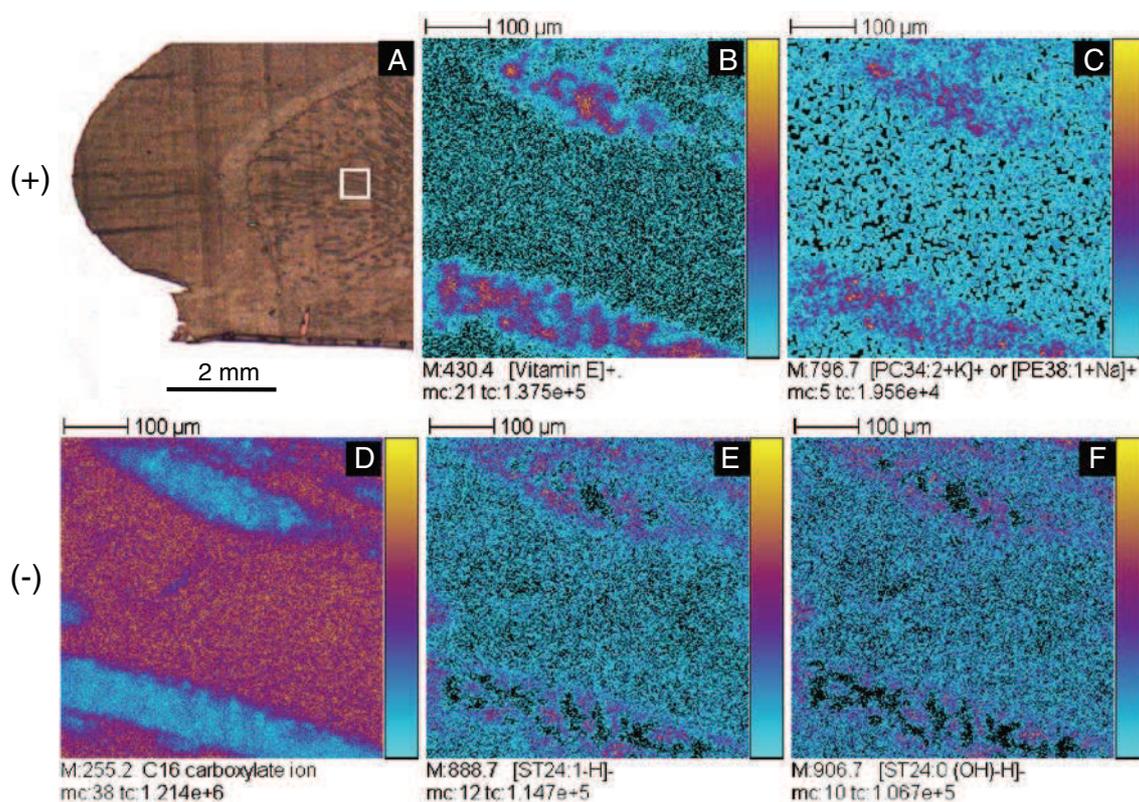


Fig. 6 TOF–SIMS ion images of a sagittal rat brain section. **a** Optical picture of the sagittal rat brain section. Ions images were recorded in the square delimited in white. **b, c** TOF–SIMS ion images in the positive ion mode. **b** m/z 430.4 ([vitamin E] $^+$). **c** m/z 796.7 ([PE 40:4+H] $^+$ or [PE38:1+Na] $^+$ or [PC34:2+K] $^+$). **d** to **f** TOF–SIMS ion images in the negative ion mode. **d** m/z 255.2 (C16:0 carboxylate ion)

e m/z 888.7 ([ST d18:1/24:1–H] $^-$). **f** m/z 906.7 ([ST d18:1/24:0–OH–H] $^-$). Primary ion Bi_3^{2+} , 50 keV, 2.5×10^{11} ions/ cm^2 , area $500 \times 500 \mu\text{m}^2$, 256×256 pixels, pixel size $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts mc and could be read as [0, mc]. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (it is the sum of counts in all the pixels)

current bunched mode at a 2- μm spatial resolution (Fig. 6). When dividing the pixel size by 44, the available number of molecules per pixel is theoretically divided by 1,936, leading to images with a weaker contrast. Nevertheless, a primary ion dose as high as 10^{11} ions cm^{-2} can be quickly achieved compared to large scale images. Thus, even if the number of molecules per pixel surface is much lower at 2- μm resolution compared to 88 μm , the image contrast is quite similar because the fluence was adequately increased. While low-resolution images (Fig. 3) tended to point out a similar localization of sulfatides and vitamin E in the white matter of the *caudate putamen*, which is complementary to fatty acid distribution, high-resolution images clearly reveal a fine structure with different localizations between these ions. Indeed, both vitamin E and sulfatides are altogether located in the white matter but there are characteristic of different cellular structures in the rat brain. Figure 5 indicates long structures of ~ 50 – 100 μm . This is the typical size of myelinated axons, which would be in the present case longitudinally cut.

Finally, ion images at an ultimate spatial resolution of 390 nm (Fig. 7) were acquired at the expense of the mass resolution and with a 25-fold theoretical sensitivity decrease. However, a primary ion dose ten times larger than for previous 2- μm resolution images can be attained in the same acquisition time. Cholesterol and vitamin E show in both ion modes similar localization, complementary to sulfatides, phosphocholine head group or fatty acid ones. At this spatial resolution, data interpretation is quite difficult without an immunohistochemical expertise. Unfortunately, attempts of tissue staining prior or after TOF–SIMS analysis clearly indicate no compatibility between the two techniques.

Outlooks

We demonstrate here that MALDI–TOF imaging is a powerful technique allowing identification and localization of lipids at a 50- μm spatial resolution with a practical nanomolar sensitivity. A very good reproducibility is accessible with a careful sample preparation combined with

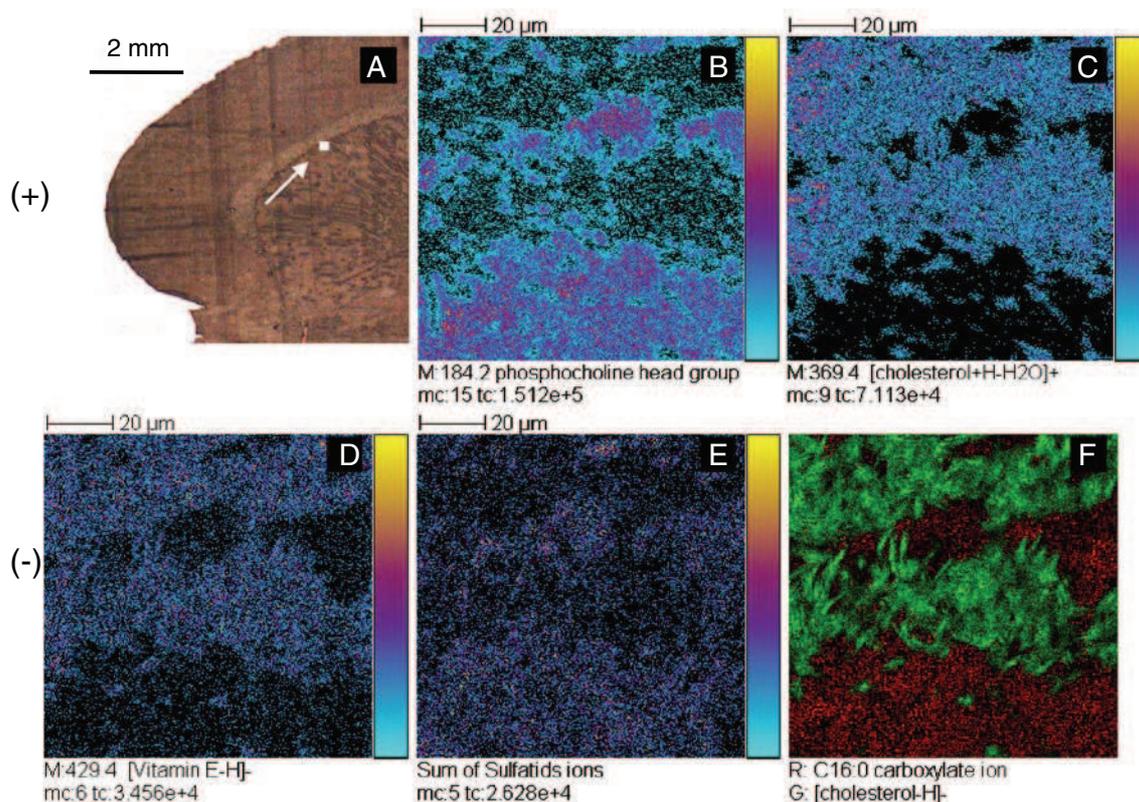


Fig. 7 TOF–SIMS images of a sagittal rat brain section. **a** Optical picture of the sagittal rat brain section. Ions images were recorded in the square delimited in white and located by the arrow. **b**, **c** TOF–SIMS ion images in the positive ion mode. **a** m/z 184.2 (phosphocholine head group). **b** m/z 369.4 ([cholesterol+H–H₂O]⁺). **d**, **f** TOF–SIMS ion images in the negative ion mode. **d** m/z 429.4 ([vitamin E–H][–]). **e** Sum of sulfatides ions. **f** Two-color overlay between C16:0

carboxylate ion (red) and [cholesterol–H][–] (green). Primary ion Bi₃²⁺, 50 keV, 2×10^{12} ions/cm², area 100×100 μm^2 , 256×256 pixels, pixel size 390×390 nm². The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts mc and could be read as [0, mc]. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (it is the sum of counts in all the pixels)

matrix deposition by an automatic sprayer in order to avoid lipid delocalization. Improving the laser optics can lead to spatial resolutions of 10 μm , which is probably the best attainable, due to the loss of sensitivity and to the MALDI process itself. Two challenges are now emerging: structural and quantitative analysis. As described above, structural characterization of lipids is a key point. Several ideas are currently built up. One consists in coupling MALDI to high mass accuracy/resolution analyzers, such as Orbitrap or Fourier-transform ion cyclotron resonance systems [34]. However, isobaric lipids, which are only differentiated by fatty acid chains length, cannot be discriminated by this type of analyzer in MS mode. Prior to them, quadrupoles or ion traps are generally used in order to efficiently generate fragment ions for a truly informative MS/MS analysis. Unfortunately, the MS/MS mode is particularly time consuming, and ion traps cannot store low mass fragment ions, which are of high importance for structural elucidation of lipids. Another possibility to analyze isobaric lipids is their separation with an ion mobility cell [62, 63]. This device allows separation of gaseous ions in a potential difference through a gas filled tube. Ions with same m/z values but with different cross sections can thus be easily separated by different flight-times in this cell. This apparatus is of growing importance, although no general table of lipid cross sections is nowadays available. Thus, MS/MS on MALDI-TOF-TOF still remains a very efficient tool for lipid structural analysis at this time.

On the other side, TOF-SIMS is perfectly suited for high spatial resolution images even if neither staining, nor fixation was for the moment found compatible with this technique, thus making difficult biological data interpretation. In terms of primary ion beams, fullerene (C_{60}) or bismuth cluster ion sources show quite similar performance in terms of sensitivity even though C_{60} primary ions cannot be focused below 20 μm in a pulsed mode [64, 65]. For structural elucidation, the adaptation of the PSD method is still perfectible since it leads to only few fragments of interest. Coupling of a C_{60} primary ion beam with a hybrid quadrupole-time-of-flight showed interesting preliminary MS/MS results although the current spatial resolution is more or less the same than on commercial MALDI instruments, which in addition are much more sensitive. It is quite clear that coupling of a bismuth primary ion source with an MS/MS analyzer, such as a TOF-TOF, could be really benefic for the spreading of this technique in the chemical and biological fields.

Acknowledgments This work and the PhD research fellowship of FB are supported by the European Union (contract LSHG-CT2005-518194 COMPUTIS). The PhD research fellowship of AS is supported by the Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS). This work is also supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (EICO-CF, grant no. ANR-07-MRAR-006-01).

References

- Willoughby D, Cooper DM (2008) *Nat Methods* 5:29–36
- Cruz L, Moroz LL, Gillette R, Sweedler JV (1997) *J Neurochem* 69:110–115
- Freudiger CW, Min W, Saar BG, Lu S, Holtom GR, He C, Tsai JC, Kang JX, Xie XS (2008) *Science* 322:1857–1861
- Greenspan P, Mayer EP, Fowler SD (1985) *J Cell Biol* 100:965–973
- Young LS, Hoffman KR, Stevens P (1975) *Proc Soc Exp Biol Med* 149:389–396
- Christie WW (1998) *Lipids* 33:343–353
- Pulfer M, Murphy RC (2003) *Mass Spectrom Rev* 22:332–364
- Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillenkamp F (1987) *Int J Mass Spectrom Ion Processes* 78:53–68
- Hillenkamp F, Peter-Katalinic J (2007) *MALDI MS a practical guide to instrumentation, methods and applications*. Wiley-VCH, Weinheim
- Castaing R, Slodzian GJ (1962) *Microsc* 1:395–410
- Benninghoven A, Loebach E (1971) *Rev Sci Instrum* 42:49–52
- Belu AM, Graham DJ, Castner DG (2003) *Biomaterials* 24:3635–3653
- Li T, Wu TD, Mazéas L, Toffin L, Guerquin-Kern JL, Leblon G, Bouchez T (2008) *Environ Microbiol* 10:580–588
- Touboul D, Halgand F, Brunelle A, Kersting R, Tallarek E, Hagenhoff B, Laprèvote O (2004) *Anal Chem* 76:1550–1559
- Sjövall P, Lausmaa J, Johansson B (2004) *Anal Chem* 76:4271–4278
- Touboul D, Kollmer F, Niehuis E, Brunelle A, Laprèvote O (2005) *J Am Soc Mass Spectrom* 16:1608–1618
- Weibel D, Wong S, Lockyer N, Blenkinsopp P, Hill R, Vickerman JC (2003) *Anal Chem* 75:1754–1764
- Biddulph GX, Piwowar AM, Fletcher JS, Lockyer NP, Vickerman JC (2007) *Anal Chem* 79:7259–7266
- Cheng J, Kozole J, Hengstebeck R, Winograd N (2007) *J Am Soc Mass Spectrom* 18:406–412
- McDonnell LA, Heeren RMA (2007) *Mass Spectrom Rev* 26:606–643
- Kaletas BK, van der Wiel IM, Stauber J, Dekker LJ, Güzel C, Kros JM, Luidert TM, Heeren RMA (2009) *Proteomics* 9:2622–2633
- Gilmore IS, Seah MP (2002) *Appl Surf Sci* 187:89–100
- Sodhi RN (2004) *Analyst* 129:483–487
- Vickerman JC (2001) TOF-SIMS – an overview. In: Vickerman JC, Briggs D (eds) *ToF-SIMS—surface analysis by mass spectrometry*. SurfaceSpectra, Manchester, p 1
- Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli RM (2004) *Anal Chem* 76:1145–1155
- Seeley EH, Oppenheimer SR, Mi D, Chaurand P, Caprioli RM (2008) *J Am Soc Mass Spectrom* 19:1069–1077
- Kruse R, Sweedler JV (2003) *J Am Soc Mass Spectrom* 14:752–759
- Sugiura Y, Shimma S, Setou M (2006) *Anal Chem* 78:8227–8235
- Baluya DL, Garrett TJ, Yost RA (2007) *Anal Chem* 79:6862–6867
- Chen Y, Allegood J, Liu Y, Wang E, Cachón-Gonzalez B, Cox TM, Merrill AH Jr, Sullards MC (2008) *Anal Chem* 80:2780–2788
- Aerni HR, Cornett DS, Caprioli RM (2006) *Anal Chem* 78:827–834
- Schuerenberg M, Luebbert C, Deininger SO, Ketterlinus R, Suckau D (2007) *Nat Methods* 4:iii–iv
- Spengler B, Hubert M (2002) *J Am Soc Mass Spectrom* 13:735–748
- Koestler M, Kirsch D, Hester A, Leisner A, Guenther S, Spengler B (2008) *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:3275–3285

35. Dreisewerd K, Schurenberg M, Karas M, Hillekamp F (1995) *Int J Mass Spectrom* 141:127–148
36. Touboul D, Brunelle A, Halgand F, De La Porte S, Lapr evote O (2005) *J Lipid Res* 46:1388–1395
37. Deutsch E (2008) *Proteomics* 8:2776–2777
38. Roempp A, Schramm T, Klinkert I, Hester A, Both JP, Brulet M, Brunelle A, Lapr evote O, Heeren RMA, Stoeckli M, Spengler B (2009) Proceedings of the 57nd ASMS conference on mass spectrometry and allied topics. Philadelphia, Pennsylvania May 31 – June 4
39. Jana A, Hogan EL, Pahan K (2009) *J Neurol Sci* 278:5–15
40. Bounoux P, Hajjaji N, Couet C (2008) *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79:93–96
41. Holland WL, Summers SA (2008) *Endocr Rev* 29:381–402
42. Isaac G, Jeannotte R, Esch SW, Welti R (2007) *Genet Eng (N Y)* 28:129–157
43. Touboul D, Piedno el H, Voisin V, De La Porte S, Brunelle A, Halgand F, Lapr evote O (2004) *Eur J Mass Spectrom* 10:657–664
44. Mazel V, Richardin P, Touboul D, Brunelle A, Walter P, Lapr evote O (2006) *Anal Chim Acta* 570:34–40
45. Mas S, Touboul D, Brunelle A, Aragocillo P, Egido J, Lapr evote O, Vivanco F (2007) *Analyst* 132:24–26
46. Mazel V, Richardin P, Debois D, Touboul D, Cotte M, Brunelle A, Walter P, Lapr evote O (2007) *Anal Chem* 79:9253–9260
47. Touboul D, Roy S, Germain DP, Chaminade P, Brunelle A, Lapr evote O (2007) *Int J Mass Spectrom* 260:158–165
48. Mazzucchelli GD, Cellier NA, Mshviladzade V, Elias R, Shim YH, Touboul D, Quinton L, Brunelle A, Lapr evote O, De Pauw EA, De Pauw-Gillet MC (2008) *J Proteome Res* 7:1683–1692
49. Debois D, Hamze K, Guérineau V, Le Caër JP, Holland IB, Lopes P, Ouazzani J, S eror SJ, Brunelle A, Lapr evote O (2008) *Proteomics* 8:3682–3691
50. Debois D, Bralet MP, Le Naour F, Brunelle A, Lapr evote O (2009) *Anal Chem* 81:2823–2831
51. Jackson SN, Wang HY, Woods AS (2007) *J Am Soc Mass Spectrom* 18:17–26
52. Eckhardt M (2008) *Mol Neurobiol* 37:93–103
53. Vatasery GT, Berry JF, Younozai R, Lam Bergad P (1976) *Lipids* 11:317–321
54. Medzihradzky KF, Campbell JM, Baldwin MA, Falick AM, Juhasz P, Vestal ML, Burlingame AL (2000) *Anal Chem* 72:552–558
55. Suckau D, Resemann A, Schuerenberg M, Hufnagel P, Franzen J, Holle A (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:952–965
56. Fletcher JS, Rabbani S, Henderson A, Blenkinsopp P, Thompson SP, Lockyer NP, Vickerman JC (2008) *Anal Chem* 80:9058–9064
57. Della-Negra S, Le Beyec Y (1985) *Anal Chem* 57:2035–2040
58. Touboul D, Brunelle A, Lapr evote O (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:703–709
59. Spengler B, Kirsch, Kaufmann R (1991) *Rapid Commun Mass Spectrom* 5:198–202
60. Carado A, Passarelli MK, Kozole J, Wingate JE, Winograd N, Loboda AV (2008) *Anal Chem* 80:7921–7929
61. Piehowski PD, Carado AJ, Kurczy ME, Ostrowski SG, Heien ML, Winograd N, Ewing AG (2008) *Anal Chem* 80:8662–8667
62. Jackson SN, Wang HY, Woods AS, Ugarov M, Egan T, Schultz JA (2005) *J Am Soc Mass Spectrom* 16:133–138
63. Jackson SN, Ugarov M, Egan T, Post JD, Langlais D, Albert Schultz J, Woods AS (2007) *J Mass Spectrom* 42:1093–1098
64. Fletcher JS, Lockyer NP, Vaidyanathan S, Vickerman JC (2007) *Anal Chem* 79:2199–2206
65. Debois D, Brunelle A, Lapr evote O (2007) *Int J Mass Spectrom* 260:115–120

Annexe 2

Seyer, A.; Einhorn, J.; Brunelle, A.; Laprévotte, O.
Localization of flavonoids in seeds by cluster TOF-SIMS imaging.
Anal. Chem. 2010, 82, 2326.

Localization of Flavonoids in Seeds by Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging

Alexandre Seyer,[†] Jacques Einhorn,^{‡,§} Alain Brunelle,^{*,†} and Olivier Laprévôte^{†,||}

Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques and Unité de Biologie Cellulaire, INRA, route de St-Cyr, 78026 Versailles, France, and Laboratoire de Toxicologie, IFR 71, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging has been used to map flavonoids in fresh seed sections of peas (*Pisum sativum*) and *Arabidopsis thaliana*. While for peas a very simple preparation method derived from mammalian tissue imaging could be utilized, several preparation methods had to be tested for the *A. thaliana* seeds before obtaining tissue sections on which the diagnostic ions were not delocalized. For such small and stiff biological material, none of the methods currently used in histology or scanning electron microscopy could be transferred to mass spectrometry imaging. Only the embedding of the fresh seeds in a polyester resin, followed by the analysis of the block after having obtained a flat surface section with a diamond blade, gave sensitive and reproducible results. Several flavonoid ions have been detected in the sections, showing increased concentrations of flavonoids in the seed coats. The method was finally applied to confirm the variations in the flavonoid content of seeds from different *A. thaliana* mutants.

Flavonoids are plant secondary metabolites that originate from the phenylpropanoid biosynthesis pathway. These compounds are widely distributed in plants and have numerous functions, such as flower pigmentation and protection against bacterial or insect attacks.¹ It has been suggested by epidemiologic and laboratory studies that flavonoids have a beneficial effect on human health, in preventing the occurrence of aging-linked diseases such as cardiovascular diseases^{2,3} and some cancers.⁴ This explains the increasing interest brought to a better understanding of flavonoid accumulation and metabolism. The polyphenol content of two kinds of seeds, *Pisum sativum* and *Arabidopsis thaliana*, has

recently been extensively studied.^{5,6} Quantitative electrospray ionization liquid chromatography–mass spectrometry (ESI-LC–MS) measurements were done showing some differences in concentrations between seed coat and cotyledon extracts. The analysis of flavonoids by tandem mass spectrometry (MS–MS) and nuclear magnetic resonance (NMR) has recently been reviewed.⁷

Among the various techniques aiming to map the surface of a sample, mass spectrometry imaging (MSI) is the only one that provides a view of the spatial localization of numerous chemical compounds within a single analysis.⁸ Contrary to other methods such as immunohistochemistry or fluorescence microscopy, for which the molecules of interest need to be labeled before the experiment, MSI is not limited to any a priori knowledge of the molecules. Three different methods coexist that have different advantages and drawbacks: time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS), matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI), and nano-SIMS. While MALDI, which is the most popular molecular imaging method, aims to localize peptides and proteins, but also lipids and metabolites, at a resolution of a few tens of micrometers (~50 μm) at the surface of the sample,⁹ the so-called nano-SIMS gives very precise localization of elements or small fragments at a scale of a few tens of nanometers only.¹⁰ Between these two extremes, TOF-SIMS is able to localize various molecules, mainly lipids and metabolites, with a mass-to-charge ratio up to m/z 1000–1500 and a routine resolution from 400 nm to 1–2 μm . Thanks to the great increase of sensitivity brought by new polyatomic ion sources,^{11–13} TOF-SIMS imaging has been for several years much more widely utilized in animal and human

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Alain.Brunelle@icsn.cnrs-gif.fr. Phone 33 169 824 575. Fax: 33 169 077 247.

[†] CNRS.

[‡] Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA.

[§] Unité de Biologie Cellulaire, INRA.

^{||} Université Paris Descartes.

- (1) Dixon, R. A.; Achine, L.; Kota, P.; Liu, C. J.; Reddy, M. S. S.; Wang, L. J. *Mol. Plant Pathol.* **2002**, *3*, 371–390.
- (2) Bagchi, D.; Sen, C. K.; Ray, S. D.; Das, D. K.; Bagchi, M.; Preuss, H. G.; Vinson, J. A. *Mutat. Res.* **2003**, *523–524*, 87–97.
- (3) Serafini, M.; Bugianesi, R.; Maiani, G.; Valtuena, S.; De Santis, S.; Crozier, A. *Nature* **2003**, *424*, 1013.
- (4) Park, O. J.; Surh, Y. J. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 43–56.

- (5) Dueñas, M.; Estrella, I.; Hernández, T. *Eur. Food Res. Technol.* **2004**, *219*, 116–123.
- (6) Routaboul, J. M.; Kerhoas, L.; Debeaujon, I.; Pourcel, L.; Caboche, M.; Einhorn, J.; Lepiniec, L. *Planta* **2006**, *224*, 96–107.
- (7) March, R.; Brodbelt, J. J. *Mass Spectrom.* **2008**, *43*, 1581–1617.
- (8) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 606–643.
- (9) Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 828–833.
- (10) Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Quintana, C.; Croisy, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 228–238.
- (11) Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarak, E.; Hagenhoff, B.; Laprévôte, O. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1550–1559.
- (12) Sjövall, P.; Lausmaa, J.; Johansson, B. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4271–4278.
- (13) Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J. C. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1754–1764.

biology.^{14–16} The possibility to map ions at the surface of vegetal tissues has been nevertheless seldomly explored by this method,¹⁷ while a few studies based on MALDI or LDI (laser desorption ionization) have been reported. Wheat seeds have been mapped by MALDI.¹⁸ Atmospheric pressure infrared MALDI (AP-IR-MALDI) was used for an extensive study of the composition in flavonoids and other compounds, as well as their localization, in lily flowers, fruits, leaves, almond seeds, and bulbs.¹⁹ LDI using colloidal graphite as a matrix was also utilized to map flavonoids in flower petals, leaves, and stems of *A. thaliana*.²⁰ In the present work we have used TOF-SIMS imaging to map ions from flavonoids, such as kaempferol and quercetin glycosides, in seeds of extremely different sizes. Pea seeds (*P. sativum*), having a section of up to 10 mm, have first been mapped, and in a second step seeds of *A. thaliana*, with a typical size of $\sim 400 \mu\text{m}$ or less, were investigated. *A. thaliana* is a model plant for the study of biosynthesis and regulation of the flavonoid pathway, due to the availability of a wide range of mutants affected in this pathway.²¹ Sample preparation was undoubtedly the most delicate step. In contrast to MALDI-TOF imaging, no coating of the sample is needed for TOF-SIMS or nano-SIMS imaging. However, it was required to obtain a rigorously flat and nonpolluted surface. Due to their very small size, it was of special importance to ensure the nondelocalization of the metabolites of interest in seeds of *A. thaliana*. Several methods were thus explored in this study to obtain a suitable procedure.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Flavonoid standards of kaempferol (MW 286.05), quercetin (MW 302.04), isoquercetin (MW 464.10), quercetin 3-*O*-rutinoside (MW 610.15), quercetin 3-*O*-rhamnoside (MW 448.10), kaempferol 3-*O*-rutinoside (MW 594.16), and kaempferol 3-*O*-glucoside (MW 448.10) and lipid standards of triacylglycerols (TAGs) 14:0/14:0/14:0 (TAG42:0; MW 722.64) and 18:0/18:0/16:0 (TAG52:0; MW 862.80) and phosphatidylinositol 16:0/18:2 (PI34:2; MW 834.53) were purchased from Sigma-Aldrich (BP 701, F-38297 St-Quentin-Fallavier, France). Structures of some of these flavonoids are shown in Figures S-1 and S-2 (Supporting Information). To record spectra of these standard compounds, 0.5 μL of each solution (0.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ in methanol/water (50:50, v/v)) was deposited onto a silicon wafer, the droplet of several square millimeters was allowed to dry, and a surface of $500 \mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ inside this dried droplet was scanned by the primary ion beam with a fluence of $\sim 3.6 \times 10^{10}$ ions $\cdot\text{cm}^{-2}$. Dilutions were also carried out to determine the limits of detection.

Plant Seeds. The wild type and tt7 and tt4 mutants of *A. thaliana* seeds were obtained from the INRA-Versailles collection. Plants were grown in a controlled growth chamber with a 16 h photoperiod. Seeds were collected after a ca. 18 day maturation

period. Seeds from *P. sativum* NGB 5839 variety were also provided by INRA-Versailles. *P. sativum* seeds of the ZP-840 variety were graciously provided by M. Dueñas (CSIC, Madrid, Spain). The NGB variety is often used for physiological studies due to its small size and great convenience for handling, whereas the latter (cultivated by the Instituto Agrario of Valladolid, Spain) yielding dark seeds was known as potentially rich in flavonoids.

Sample Preparation. The sample preparation from a dry or fresh seed is rather difficult. Furthermore, some parts, such as the coat and the cotyledon, may have different levels of hardness. Testing procedures on *A. thaliana* seeds were extremely delicate and challenging due to their very small size. The two varieties of peas, ZP 840 and NGB 5839, were received fresh in the laboratory and immediately frozen at -80°C . Sections $12 \mu\text{m}$ thick were cut at -20°C with a cryostat (CM3050-S, Leica Microsystems SA, Nanterre, France) and deposited onto silicon wafers (2 in. diameter polished silicon wafers, ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France). Samples were dried just before analysis under a pressure of a few hectopascals for 15 min, without any further treatment. This procedure is exactly the same as that routinely used in the laboratory for mammalian tissue imaging.²² Reference images of sections (not shown) were taken with an Olympus BX51 microscope (Rungis, France), equipped with 1.25 \times to 50 \times lenses and a Color View I camera, monitored by Cell^B software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

Wild-type (WT) *A. thaliana* seeds were first prepared according to established sample preparation procedures for histology and/or scanning electron microscopy at INRA-Versailles. These methods gave negative results. The method that was finally used was adapted from that described for imaging in cultural heritage samples. Details are given in the Results and Discussion.

TOF-SIMS Imaging Data Acquisition and Processing. The experiments were performed using a commercial TOF-SIMS IV spectrometer (Ion-ToF GmbH, Münster, Germany), located at the Institut de Chimie des Substances Naturelles (Gif-sur-Yvette, France). The spectrometer is equipped with a liquid metal ion gun (LMIG) filled with bismuth, and Bi_3^+ ions have always been selected, as they provide, among all the other bismuth cluster species, the best compromise between intensity and efficiency.²³ Primary ions reach the sample surface with a kinetic energy of 25 keV and at an angle of incidence of 45° . The fluence (also called primary ion dose density) is maintained between 2×10^{11} and 2×10^{12} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$, which is always below the so-called static SIMS limit.²⁴ Secondary ions are accelerated to an energy of 2 keV, fly through a field-free region, and are reflected (effective flight path ~ 2 m) before being postaccelerated to 10 keV just before hitting the entrance surface of the hybrid detector, which is made of one microchannel plate, a scintillator, and a photomultiplier. A low-energy electron flood gun is activated between two primary ions pulses to neutralize the sample surface with the minimum damage.²⁵ Two modes of operation of the primary ion column have been used during

(14) Brunelle, A.; Laprèvote, O. *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 3335–3343.

(15) Nygren, H.; Malmberg, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 499–504.

(16) Brunelle, A.; Laprèvote, O. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 31–35.

(17) Tokareva, E. N.; Fardim, P.; Pranovich, A. V.; Fagerholm, H. P.; Daniel, G.; Holmbom, B. *Appl. Surf. Sci.* **2007**, *253*, 7569–7577.

(18) Burell, M. M.; Earnshaw, C. J.; Clench, M. R. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 757–763.

(19) Li, Y.; Shrestha, B.; Vertes, A. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 407–420.

(20) Cha, S.; Zhang, H.; Ilarslan, H. L.; Surkin Wurtele, E.; Brachova, L.; Nikolau, B. J.; Yeung, E. S. *Plant J.* **2008**, *55*, 348–360.

(21) Winkel-Shirley, B. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485–493.

(22) Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprèvote, O. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 985–999.

(23) Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprèvote, O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1608–1618.

(24) Vickerman, J. C. TOF-SIMS—an overview. In *ToF-SIMS—Surface Analysis by Mass Spectrometry*; Vickerman, J. C., Briggs, D., Eds.; Surface Spectra and IM Publications: Manchester and Chichester, U.K., 2001; pp 1–40.

(25) Gilmore, I. S.; Seah, M. P. *Appl. Surf. Sci.* **2002**, *187*, 89–100.

the experiments. The first one, which is called “high-current bunched mode”, ensures both a beam focus of $2\ \mu\text{m}$ and a pulse duration of less than 1 ns, thus enabling an excellent mass resolution, $M/\Delta M = 8 \times 10^3$ (fwhm), at m/z 500. For the second operating mode, which is called “burst alignment”, the primary ion beam focus diameter is $\sim 400\ \text{nm}$, but the primary ion pulses cannot be bunched, and the pulse duration is 20–100 ns, ensuring only a nominal mass resolution. A detailed description of the different setting modes of the ion column can be found elsewhere.²⁶ The Bi_3^+ primary ion current, measured at 10 kHz with a Faraday cup on the grounded sample holder, is $\sim 0.4\ \text{pA}$ in the high-current bunched mode and $0.05\ \text{pA}$ in the burst alignment mode.

Two modes of image acquisition have been used. Images of *A. thaliana* seed sections, with fields of view of $500\ \mu\text{m} \times 500\ \mu\text{m}$ or less, were recorded without sample stage movement just by rastering the primary ion beam. For most of these images, the high-current bunched mode (see above) was preferred. The number of pixels was chosen as 256×256 to obtain a $2\ \mu\text{m}$ or less pixel size. The burst alignment ion gun mode was used when a higher image resolution was needed. In this case the image was acquired with a field of view of $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$ and a $\sim 600\ \text{nm}$ pixel size (256×256 pixels). For images of *P. sativum* sections, a large-area analysis ($9.1\ \text{mm} \times 9.1\ \text{mm}$) was performed using the same LMIG conditions (high-current bunched mode) and the so-called stage scan. In this case, the sample is continuously moved by the sample stage. The repeatability of the movement is better than $5\ \mu\text{m}$. To scan the whole surface area, the primary ion beam is rastered over the area of each individual pixel. The number of pixels was 256×256 , each pixel having a size of $\sim 35\ \mu\text{m}$. In these conditions, the fluence was $6.7 \times 10^9\ \text{ions} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Because of the very low initial kinetic energy distribution of the secondary ions, the relationship between the time-of-flight and the square root of m/z is always linear over the whole mass range. The mass calibration was always internal, and signals used for initial calibration were those of H^+ , H_2^+ , H_3^+ , C^+ , CH^+ , CH_2^+ , CH_3^+ , and C_2H_5^+ for the positive ion mode and those of C^- , CH^- , C_2^- , and C_2H^- for the negative ion mode.

The name of the compound or 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 $[0, \text{mc}]$ intervals.

Regions of interest (ROIs) corresponding to different image areas were drawn with the IonImage software (Ion-ToF GmbH). The associated mass spectra were further extracted to reveal different local compositions. For a proper and easier comparison, as each ROI had a different area (in pixels), a normalization of their respective mass spectrum intensities had to be performed. The intensity of the mass spectrum from each ROI was normalized against the area of the smallest one.

RESULTS AND DISCUSSION

Mass Spectrometry Analysis of Flavonoid Standards. It is important to record reference mass spectra of pure standard compounds, in parallel to the imaging experiments, to help and reinforce the mass assignments. Studies with the TOF-SIMS instrument have been performed first in the positive ionization mode, but the negative one appeared the most sensitive and

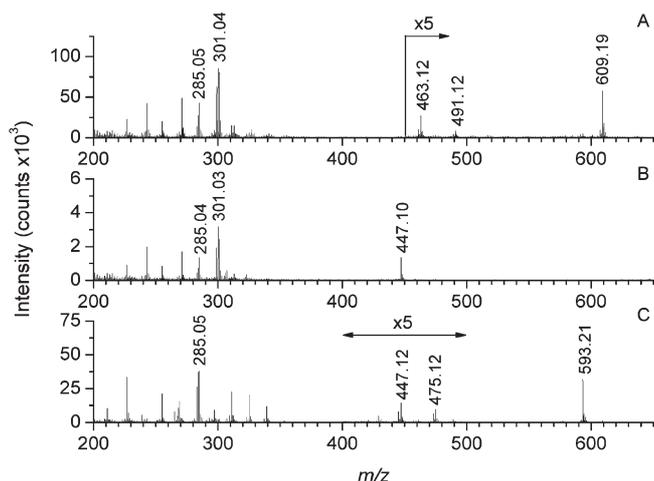


Figure 1. TOF-SIMS negative ion mass spectra of quercetin 3-*O*-rutinoside (A), quercetin 3-*O*-rhamnoside (B), and kaempferol 3-*O*-rutinoside (C).

convenient for identification. Figure 1 shows the TOF-SIMS negative ion mass spectra of quercetin 3-*O*-rutinoside (MW 610.15; Figure 1A), quercetin 3-*O*-rhamnoside (MW 448.10; Figure 1B), and kaempferol 3-*O*-rutinoside (MW 594.16; Figure 1C). The signal of the deprotonated molecule $[\text{M} - \text{H}]^-$ is well detected in each spectrum (at m/z 609.19, 447.1, and 593.21, respectively), while intense fragment ion peaks are detected particularly near the aglycon ion region at m/z 301.04 and 285.05, respectively. Much less abundant ions can also be noticed in the intermediate region of Figure 1A,C (at m/z 463.12 and 447.12, respectively), which likely correspond to the loss of the external rhamnosyl (146 u) sugar of the glycosidic chain from $[\text{M} - \text{H}]^-$. The nomenclature of these fragmentations is recalled in Figure S-2 (Supporting Information), according to Kerhoas et al.²⁷ A careful examination of spectra of the monoglycosides quercetin 3-*O*-rhamnoside and quercetin 3-*O*-glucoside and of the diglycoside quercetin 3-*O*-rutinoside at various concentrations (0.5–500 ng deposited amounts) led to systematic observation of a triplet of ions of similar abundances in the aglycon ion region. This observation indicates that the mono- or disaccharide moiety can be eliminated by three competitive pathways, yielding ions $[\text{M} - \text{H} - \text{Gly}]^-$, $[\text{M} - \text{H} - \text{GlyH}^+]^-$, and $[\text{M} - \text{H} - \text{GlyH}_2]^-$, at m/z 301.03, 300.03, and 299.03, respectively, for the quercetin series. The same behavior was found in the kaempferol series (data not shown). This type of fragmentation is to some extent more complex than that observed under ESI-MS-MS using low-energy collision-activated dissociation of the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion.²⁷ The limit of detection of such compounds was found to be 2–3 ng deposited amount ($\text{S/N} = 3$). In the study of Kerhoas et al.,²⁷ the authors have taken advantage of tandem mass spectrometry to identify the main flavonoid fragments from *A. thaliana* seeds. With the TOF-SIMS IV spectrometer, it is not possible to perform tandem mass spectrometry. Although postsource decay like experiments can in some cases be carried out,²⁸ this method does not generally enable the complete structural analysis of ions. It was thus also important for unambiguous

(27) Kerhoas, L.; Aouak, D.; Cingöz, A.; Routaboul, J. M.; Lepiniec, L.; Einhorn, J.; Birlirakis, N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 6603–6612.

(28) Touboul, D.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 703–709.

(26) Sodhi, R. N. S. *Analyst* **2004**, *129*, 483–487.

ion assignments to consider in the present study other criteria such as isotopic patterns, colocalization (or not) of ion images, and information from previous conventional work.

Sample Preparation from Seeds and Time-of-Flight Analyzer Settings. In the case of *P. sativum* seeds, the same preparation method as for animal tissues, i.e., inclusion in OCT (optimum cutting temperature) glue and sectioning at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a cryostat, appeared simple and convenient for such large size samples. However, *A. thaliana* seeds are small size samples of $\sim 0.4\text{ mm}$ dimension, and for which a robust and reproducible preparation method had therefore to be found. Several fixation methods, which are popular in histology, have been tested first, followed by cross sections using stainless steel or diamond blades. Inclusion in OCT glue and cryosectioning was also tested. Finally, cross sections of seeds embedded in a polyester resin have been obtained using an ultramicrotome equipped with a diamond blade. This last method was found to be the most suitable and reproducible one among all tested procedures.

The seeds (WT) were first fixed in formaldehyde, then dried in several successive ethanol baths, and finally placed in four different embedding materials, wax, paraffin, and two different resins currently utilized in histology, an epoxy resin (Spurr) and a glycol methacrylate resin (historesin). Other WT fresh seeds were frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. For those seeds, two different preparation methods have been utilized. Some have been embedded in OCT glue, without any preliminary treatment. The glue was allowed to harden at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, and $30\text{ }\mu\text{m}$ thick sections were prepared at a temperature of $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ with the Leica cryostat, deposited onto silicon wafers, and finally dried under a pressure of a few hectopascals for 15 min, without any further treatment, just before analysis. In a last attempt, fresh seeds were defrosted and embedded in a polyester resin (H59, Sodemi, France). The resin block was polished until the sample reached the surface and then cut into 500 nm thick sections by ultramicrotomy using a Diatome diamond blade (Leica Microsystemes). Due to the impossibility to maintain these sections intact, the analyses were performed directly on the flat and clean surface of the block itself.

For the seeds embedded in epoxy (Spurr) and glycol methacrylate (historesin) resins (data not shown), most of the detected ions originated from lipids. Ions at m/z 285.07, 301.07, and 447.10, which can be attributed to flavonoids (see above), were also detected, but appeared mainly in the embedding resin and thus delocalized by the sample preparation. When using wax or paraffin, no ions that could originate from the seed were detected. These methods utilizing fixation and dehydration prior to the embedding step are therefore not adapted for TOF-SIMS mass spectrometry imaging. When the fresh seeds were embedded in OCT glue, it was very difficult to obtain a section that was not covered by a thin glue layer. The mass spectra obtained from 30 different sections were almost all dominated by OCT glue ions. Only one section was usable for mass spectrometry imaging, yielding ions at m/z 285.07, 301.07, and 447.10 in the seed tissue itself (data not shown). Thus, embedding the *A. thaliana* seeds in OCT glue could not be considered as a reproducible sample preparation method.

Finally, the embedding in a polyester resin, followed by cutting with an ultramicrotome, a procedure already utilized to analyze

cross sections of cultural heritage samples,²⁹ was successfully tested in the present study. The obtained seed sections were flat and did not exhibit any noticeable pollution in the mass spectra. Nevertheless, such samples made of a $6\text{--}8\text{ mm}$ thick block of resin are not conductive and, when introduced into the electrostatic field set to extract the secondary ions, behave like a dielectric at the surface of which the voltage cannot be known in advance. The consequence is that the kinetic energy of the secondary ions is not exactly 2 keV , but a fixed but indeterminate value, between 0 and 2 keV . Without any correction of the secondary ion optics, the reflectron and lenses along the ion path would not be correctly tuned and the ion trajectories would not be correct, leading to bad mass resolution and ion transmission. A simple and efficient way to adjust the parameters of the analyzer to the effective kinetic energy of the secondary ions is to take advantage of the capability of a reflectron to be used to measure this kinetic energy. Indeed, by decreasing the voltage applied to the end electrode of the reflectron, the value for which the ion signals vanish from the spectra is, if multiplied by the charge of the ions, equal to their kinetic energy. Then it is easy to tune all the analyzer voltages according to this new value of the kinetic energy. This method for an optimized tuning of the analyzer parameters, which is called by the manufacturer the "charge compensation mode", enables a mass resolution quite as high as for conductive samples to be reached, with an excellent ion transmission. This step cannot be neglected for such samples, since the measured kinetic energy defect is in the present case $\sim 10\%$ (whatever the polarity, the true kinetic energy of the secondary ions is $\sim 1.8\text{ keV}$ instead of 2 keV , for $\pm 2\text{ kV}$ applied), while it is only $\sim 1\%$ or less for thin mammalian tissue sections.

Flavonoid Imaging in Seeds of *P. sativum*. Since flavonoids are better detected in the negative ion mode than in the positive ion mode, we have chosen to focus our study on negative ion spectra and images. The total negative ion mass spectrum recorded at the surface of a section of a ZP-840 pea seed is shown in Figure S-3 (Supporting Information). This spectrum is dominated by lipid ion peaks: carboxylate ions of palmitic acid (C16:0 ; m/z 255.2) and of linoleic acid (C18:2 ; m/z 279.2) and deprotonated molecules of triacylglycerols [$\text{TAG42:0} - \text{H}$]⁻ (m/z 721.5) and [$\text{TAG52:0} - \text{H}$]⁻ (m/z 861.5) and of phosphatidylinositol [$\text{PI34:2} - \text{H}$]⁻ (m/z 833.5). Many noncharacteristic fragment ions are observed below m/z 200. Reference mass spectra of the most abundant lipids detected in the negative ion mode have also been recorded in parallel (triacylglycerols TAG42:0 and TAG52:0 and phosphatidylinositol PI34:2, data not shown).

Figures 2 and 3 show the localization of various phenolics and flavonoids previously analyzed by ESI-LC-MS in the two varieties of peas ZP 840 and NGB 5839, respectively.⁵ Dueñas et al. have compared the polyphenol content of the cotyledon and of the seed coat of two different pea varieties, ZP-840 and *Fidelia*. According to the identification of four different areas on the sample surface, namely, the cotyledon, radicle, seed coat, and seed coat near the radicle, evidenced in Figures 2G and 3G, Table 1 summarizes the localizations of several ions detected in these areas. For the ZP-840 variety, ions at m/z 153.03 and 288.98 are localized in the same areas as those identified by Dueñas et al. The ion at m/z

(29) Mazel, V.; Richardin, P.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Walter, P.; Laprévôte, O. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 34–40.

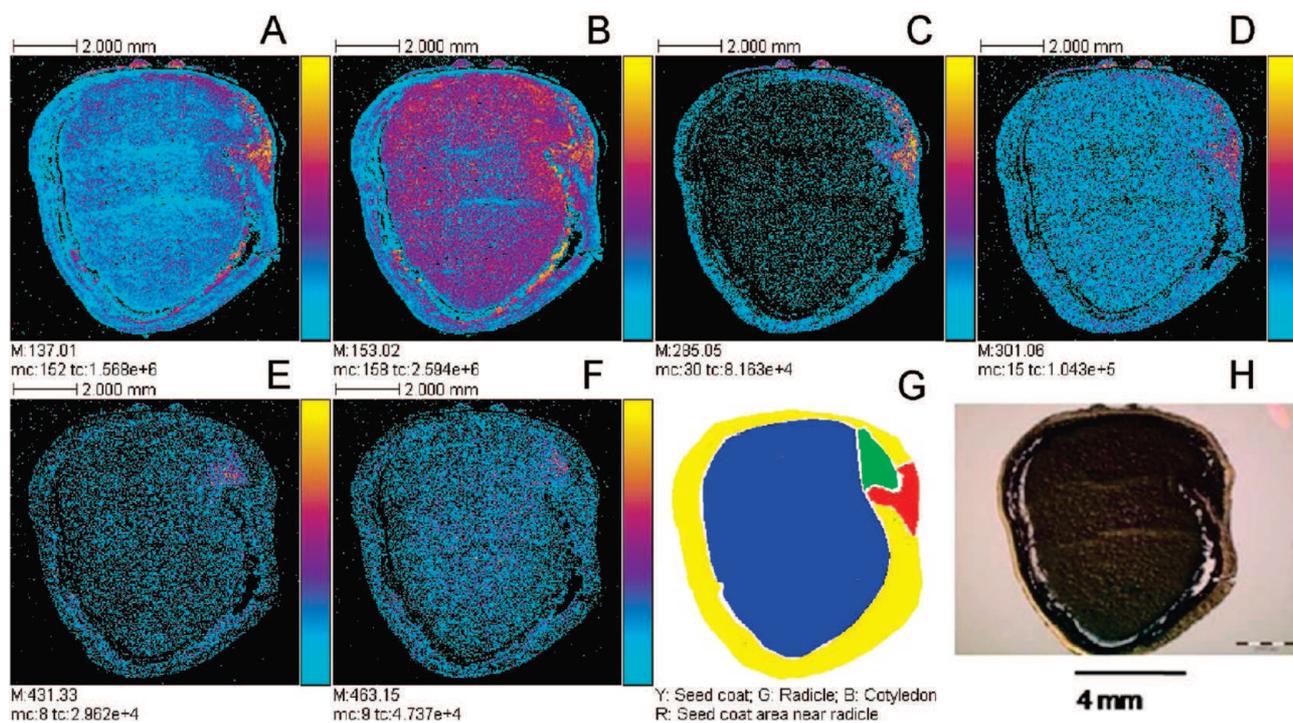


Figure 2. TOF-SIMS negative ion images of a *P. sativum* ZP-840 tissue section: (A) *p*-hydroxybenzoic acid (m/z 137.01); (B) protocatechuic acid or gallic aldehyde (m/z 153.02); (C) flavonoid fragment (kaempferol at m/z 285.05); (D) flavonoid fragment (quercetin at m/z 301.06); (E) apigenin glycoside or other (m/z 431.33); (F) quercetin 3-*O*-galactoside (m/z 463.15); (G) ROIs showing in yellow the seed coat, in green the radicle, in blue the cotyledon, and in red the seed coat area near the radicle; (H) optical image (field of view 9.1 mm \times 9.1 mm, 256 \times 256 pixels, pixel size 35.54 μ m, fluence 6.7×10^9 ions \cdot cm $^{-2}$). Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts (mc) and could be read as [0, mc]. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (sum of counts in all the pixels).

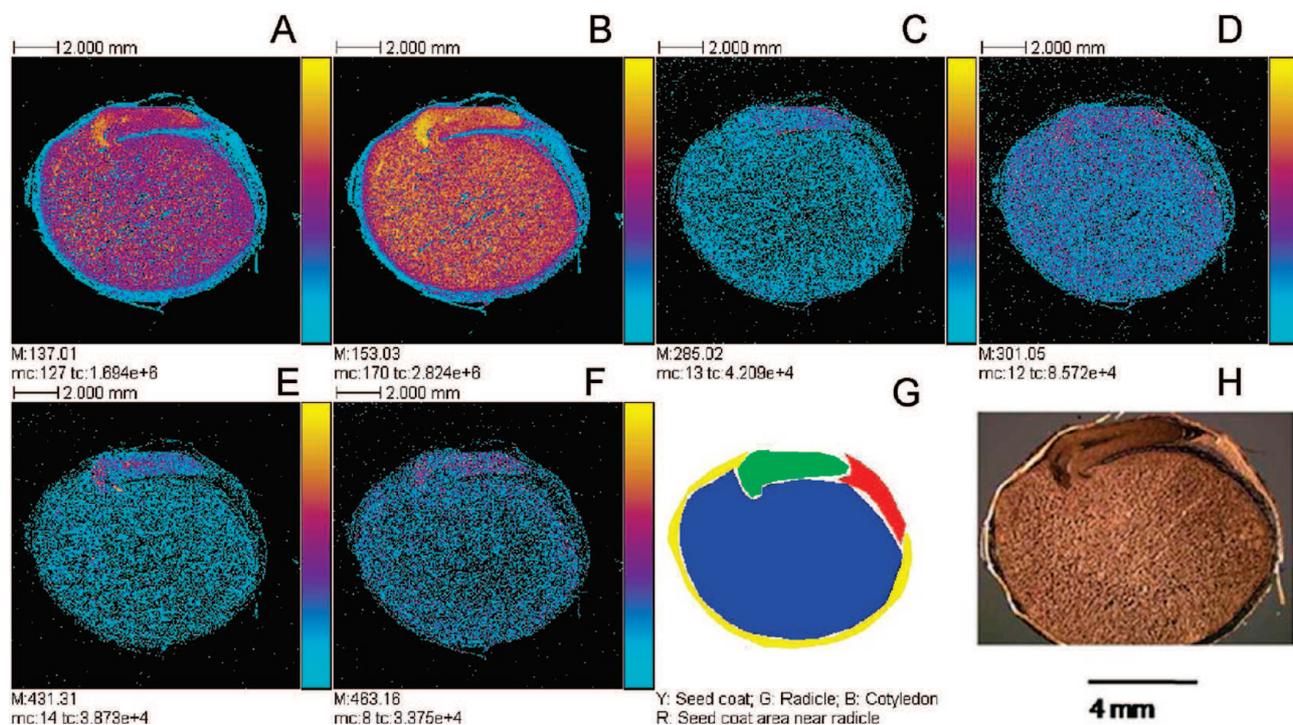


Figure 3. TOF-SIMS negative ion images of a *P. sativum* NGB 5839 tissue section: (A) *p*-hydroxybenzoic acid (m/z 137.00); (B) protocatechuic acid or gallic aldehyde (m/z 153.03); (C) flavonoid fragment (kaempferol at m/z 285.02); (D) flavonoid fragment (quercetin at m/z 301.05); (E) apigenin glycoside or other (m/z 431.31); (F) quercetin 3-*O*-galactoside (m/z 463.16); (G) ROIs showing in yellow the seed coat, in green the radicle, in blue the cotyledon, and in red the seed coat area near the radicle; (H) optical image (field of view 13 mm \times 13 mm, 256 \times 256 pixels, pixel size 50.78 μ m, fluence 3.86×10^9 ions \cdot cm $^{-2}$). Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts (mc) and could be read as [0, mc]. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (sum of counts in all the pixels).

Table 1. Localization of the Main Flavonoids Identified and of Some Precursors^a in the Different Pea Areas^b and for the Two Varieties ZP-840 and NGB-839

possible compound identification	mass to charge ratio (<i>m/z</i>)	<i>m/z</i> difference with exact mass	seed coat	seed coat area near radicle	cotyledon	radicle
ZP 840						
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	137.02	0.00	+	+	+	+
protocatechuic acid or gallic aldehyde	153.03	0.00	+	+	+	+
flavonoid fragment (kaempferol)	285.07	0.02	+	+	–	–
(+)-catechin or (–)-epicatechin	288.98	–0.10	+	+	–	–
flavonoid fragment (quercetin)	301.07	0.03	+	++	++	+
protocatechuic acid glycoside	315.08	0.00	+	+	+	+
apigenin glycoside	431.34	0.24	+	–	–	+
quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	463.16	0.06	+	+	+	+
NGB 5839						
<i>p</i> -hydroxybenzoic acid	137.01	–0.01	–	–	+	+
protocatechuic acid or gallic aldehyde	153.03	0.00	+	+	+	+
flavonoid fragment (kaempferol)	285.01	–0.04	–	–	+	++
(+)-catechin or (–)-epicatechin	not detected		–	–	–	–
flavonoid fragment (quercetin)	301.05	0.01	+	+	+	++
protocatechuic acid glycoside	315.08	0.00	–	+	+	++
apigenin glycoside	431.31	0.21	–	–	–	++
quercetin 3- <i>O</i> -galactoside	463.16	0.06	+	+	+	++

^a Key: ++, high; +, present; –, absent. ^b According to schemes in Figures 3G and 4G.

288.98 (deprotonated catechin or epicatechin) is not detected in the NGB 5839 variety, but the ions at *m/z* 153.03 (protocatechuic acid) and 315.08 (protocatechuic acid glycoside) led to similar localizations. The ion at *m/z* 137.02 (*p*-hydroxybenzoic acid) is located at the edge of the cotyledon and in the seed coat area near the radicle of the ZP-840 seed, but only in the cotyledon and radicle for the NGB 5839 variety. An ion at *m/z* 431.34 (Figures 2E and 3E) is detected in TOF-SIMS imaging in the radicle and seed coat for ZP-840 and only in the radicle for NGB 5839. Dueñas et al. attributed an ion at *m/z* 431.0 to an apigenin glycoside that was found in both the cotyledon and the seed coat. However, the important deviation in our study between the observed *m/z* value of this ion and the exact mass calculation as well as its different distribution area makes questionable its assignment as an apigenin derivative. The ion at *m/z* 285.07 (Figures 2C and 3C), which can originate from kaempferol (see above) and eventually from quercetin flavonoids as a minor fragment, is detected in the seed coat and in the area near the radicle for ZP-840 species and around the radical in the NGB 5839 seed. By contrast, the ion at *m/z*

301.07 (Figures 2D and 3D), which can result from the dissociation of quercetin flavonoids only, is detected in the four regions but mainly in the seed coat area near the radicle for ZP-840 and mainly in the radicle for NGB 5839. The ion at *m/z* 463.16 (Figures 2F and 3F) is detected in the seed coat and in the cotyledon, with some accumulation in the radicle. This ion, which is likely to be a deprotonated quercetin glycoside and/or a fragment of a heavier molecular weight quercetin-type compound (di- or triglycoside), was not detected by ESI-LC–MS in the ZP-840 pea (only in the *Fidelia* variety). Inversely, the *m/z* 447.1 ion corresponding to quercetin 3-*O*-rhamnoside and to a luteolin glycoside is not detected by our imaging approach. Although less phenolic compounds are detected and identified in TOF-SIMS imaging than by ESI-LC–MS, and despite the complexity of the spectra (the high-energy primary ion impacts, responsible for the secondary ion emission, generate intense fragment ion signals), this MSI method generally appears consistent with the results already published in the literature. A few contradictions may, however, be noticed likely if seeds studied by the two approaches are not issued from the same batches. Furthermore, the MSI method provides more detailed localizations of the flavonoid compounds since four different areas (instead of two) showing different relative concentrations could be drawn from the ion images.

Flavonoid Imaging in Seeds of *A. thaliana*. Figure 4 shows the mass spectrum extracted from the ROI of the coat of a wild-type *A. thaliana* seed section. While this spectrum is dominated by signals of fatty acid carboxylates, flavonoid ions at *m/z* 285.04, 301.03, and 447.12 are clearly detected. Figure 5 displays the images of these three ions, which are mainly localized in the seed coat. There is no compound delocalization due to the sample preparation, with respect to the spatial resolution. The flavonoid composition of *A. thaliana* seeds from various origins was studied in detail by Routaboul et al.⁶ The most abundant flavonoid in the wild type was quercetin 3-*O*-rhamnoside (MW 448.1). Ions *m/z* 447.12 ($[M - H]^-$) and 301.03 (separated by 146 u, e.g., loss of a rhamnosyl residue) allow characterization of the latter. As seen in the spectrum of the standard, ions at ca. *m/z* 299.05

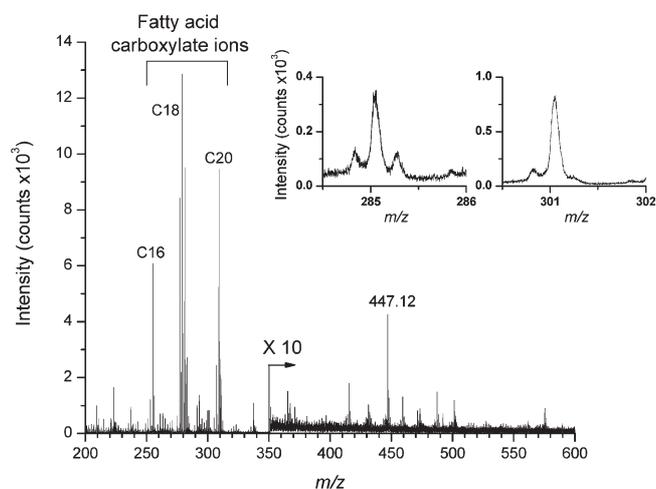


Figure 4. TOF-SIMS negative ion mass spectrum of the area corresponding to the seed coat of an *A. thaliana* seed section embedded in a polyester resin.

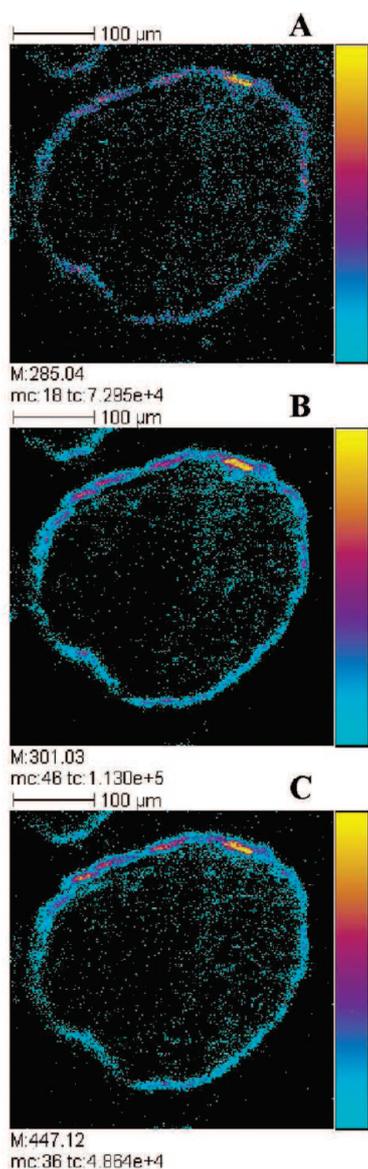


Figure 5. TOF-SIMS negative ion images of an *A. thaliana* seed section, embedded in a polyester resin: (A) m/z 285.04, (B) m/z 301.03, (C) m/z 447.1 (field of view $400\ \mu\text{m} \times 400\ \mu\text{m}$, 256×256 pixels, pixel size $1.56\ \mu\text{m}$, fluence 1.5×10^{12} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$). Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts (mc) and could be read as [0, mc]. tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (sum of counts in all the pixels). The ion signals from the coat of another seed section appear in the top left of the images.

and 300.05 resulting from alternative decomposition pathways of the deprotonated molecule might also be considered. These ions at m/z 299.05 and 300.06 may also originate from a phosphoinositol fragment ($\text{C}_9\text{H}_{16}\text{O}_9\text{P}^-$; m/z 299.05) and its ^{13}C contribution (m/z 300.05), respectively. This ambiguity cannot be neglected, and these two ions were not further considered for the analysis of the data. The structure assignment of the ion peak at m/z 285.04 is more ambiguous since it may either originate from a quercetin derivative as a secondary fragment or correspond to a diagnostic ion of kaempferol derivatives. Routaboul et al. found that 90% of quercetin 3-*O*-rhamnoside was concentrated in the coat while the remaining 10% was

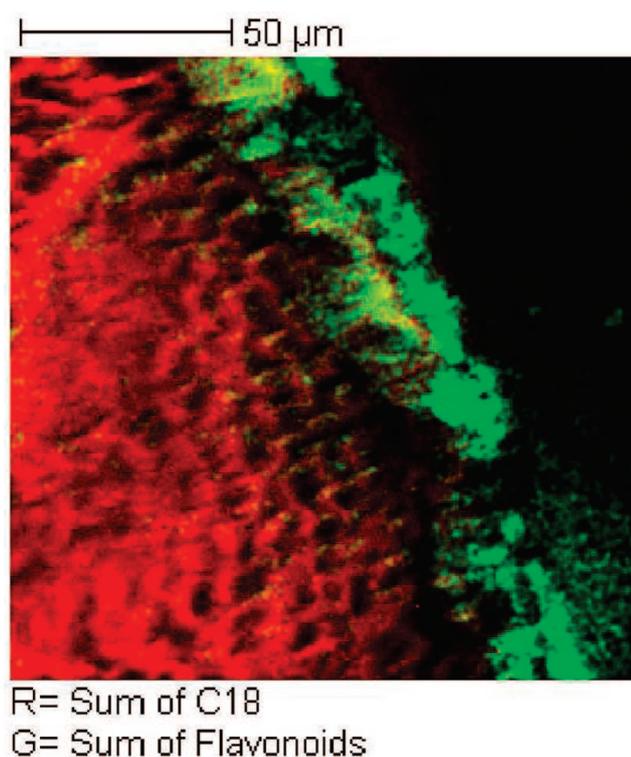


Figure 6. High spatial resolution negative ion image recorded close to the seed coat of an *A. thaliana* seed section embedded in a polyester resin (field of view $150\ \mu\text{m} \times 150\ \mu\text{m}$, 256×256 pixels, pixel size $586\ \text{nm}$, fluence 4×10^{12} ions $\cdot\text{cm}^{-2}$). Two-color overlay: red, sum of C18 fatty acid carboxylate ions; green, sum of flavonoid ions.

located in the cotyledon. In the mass spectra extracted from ROIs of the coat and of the cotyledon, the intensity of the $[\text{M} - \text{H}]^-$ ion at m/z 447.12 was 20 times higher in the coat than in the cotyledon. Then the sample preparation method used herein is the one that leads to the most relevant and reproducible results. Furthermore, it was possible with such samples to record an ion image using the high spatial resolution mode (burst alignment). The result, with a pixel size of $\sim 600\ \text{nm}$, is shown in Figure 6, which is a color overlay between the sum of C18 fatty acid carboxylate ions (sum of stearic C18:0, oleic C18:1, and linoleic C18:2 fatty acids), in red, and the sum of the three major flavonoid ions detected (m/z 285.04, 301.03, and 447.12), in green. This ion image was recorded at the edge of the seed section, and the coat is clearly represented by the flavonoid ion signals, while the fatty acid ion signals are more intense in the cotyledon. Some small irregularities of the flavonoid ion signal are observed, which could be due either to little variations of the thickness of the seed coat or to alterations of this coat after the contact with the polyester resin during the embedding process of the seed. The other diversely glycosylated flavonoids (the quercetin, kaempferol, and isorhamnetin series) also identified, each representing less than 1–10% of quercetin 3-*O*-rhamnoside, could not be detected.²⁷

The method was finally tested with seeds from two different mutants (modified in the flavonoid biosynthesis pathway) of *A. thaliana* previously studied by ESI-MS.⁶ A first mutant named tt7 is characterized by the lack of quercetin compounds. A second mutant variety, named tt4, is known to produce no flavonoid. The fresh seeds were prepared using exactly the same procedure as

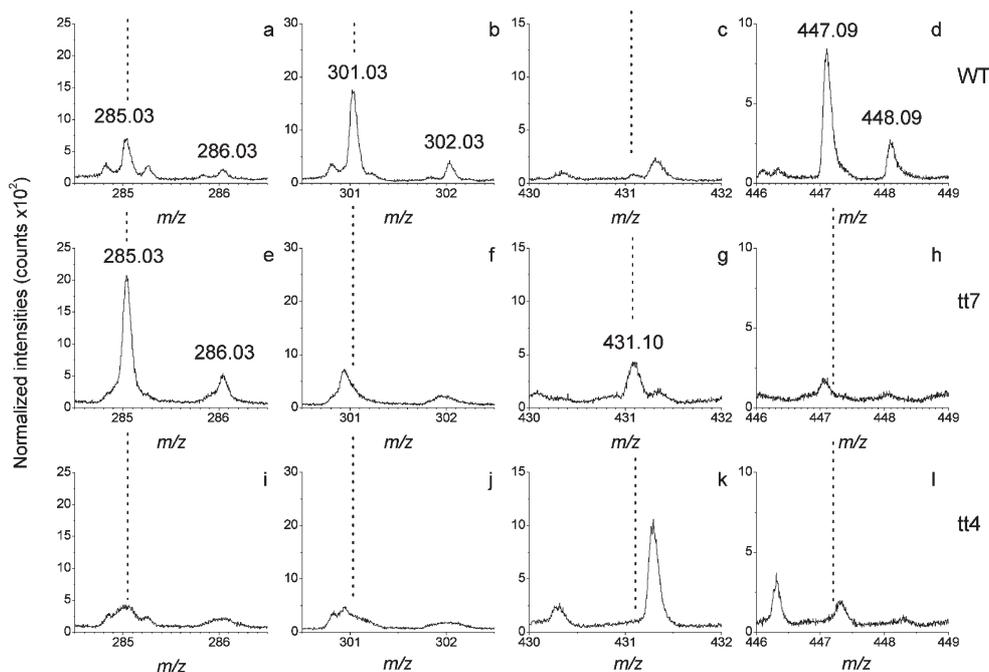


Figure 7. Parts of the TOF-SIMS negative ion mass spectra of the area corresponding to the seed coat of three different *A. thaliana* seeds, the wild type (WT) (a–d) and two different mutants, namely, tt7 (e–h) and tt4 (i–l).

for the wild-type seeds, ion images (not shown) were recorded under the same experimental conditions, and ROIs corresponding to the coat of the three kinds of seeds were drawn to extract the subsequent mass spectra (it was verified that the flavonoids were not detected in the cotyledon areas). These mass spectra are shown in Figure 7 in comparison with that of the WT, and the results obtained are in agreement with the literature.^{6,27} In the wild-type seed, ions at m/z 285.03, 301.03, and 447.09 are detected. Two of them are characteristic of quercetin-type flavonoid (m/z 301.03 and 447.09). None of these ions can be specifically attributed to kaempferol compounds, the presence of which cannot be strictly demonstrated. In the tt7 mutant seed section, ions detected at m/z 285.03 and 431.10 are likely related to kaempferol 3-*O*-rhamnoside and to kaempferol 3,7-di-*O*-rhamnoside, the two major reported flavonoids,²⁷ the parent ion $[M - H]^-$ at m/z 577 of the latter not being detected. These observations and the nondetection of a signal for ion m/z 301 allow concluding the presence of only kaempferol-type flavonoids in the tt7 mutant seeds. As also expected, no flavonoid (quercetin and/or kaempferol types) was detected in the tt4 mutant.

CONCLUSION

Cluster TOF-SIMS imaging enables mapping a part of the flavonoid content of pea and *A. thaliana* seed sections. This work needed to select, among various known sample preparation methods, which one could be the best suited for the chemical analysis of such small and hard seeds. While it was relatively easy to prepare the pea sections, since the method was the same as for mammalian tissue sections, none of the methods which are commonly utilized in histology or scanning electron microscopy were found adequate for the chemical imaging of *A. thaliana* seeds by mass spectrometry. It was necessary to embed the seeds in a polyester resin and to cut them with diamond blades in an ultramicrotome. Finally it was possible to localize different classes

of flavonoids, and to confirm the flavonoid content, together with their localization, from mutant types of seeds compared to the wild-type seed. Although that sample preparation method cannot be considered as an easy or rapid one, it is the only one that was found to be reproducible. The same distribution of the major flavonoids was observed through the various wild-type single seeds examined ($n = 10$). According to the literature, that compound is expected to represent less than 0.5% of the total content of a 0.025 mg single seed. In the future, the proposed method could be utilized to map the flavonoid content of *A. thaliana* seeds as a function of their development and maturation and for different mutants and ecotypes. By this way, it is assumed that many more biological features regarding the origin and role of a given flavonoid could be deduced. To improve the detection of minor components, tandem mass spectrometry in association with TOF-SIMS imaging should likely be considered.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Jean-Marc Routaboul for providing the *A. thaliana* seeds (WT and mutants) and Adeline Berger, Jocelyne Kronenberger, Pascale Richardin, and Elsa Van Elslande for their help during sample preparation. A.S. is indebted to the Institut de Chimie des Substances Naturelles for a Ph.D. research fellowship. This work was supported by the European Union (Contract LSHG-CT-2005-518194 COMPUTIS).

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Received for review November 5, 2009. Accepted February 4, 2010.

AC902528T

Supporting information of:

Localization of flavonoids in seeds by cluster TOF-SIMS imaging

By

Alexandre Seyer¹, Jacques Einhorn^{2,3}, Alain Brunelle^{1} Olivier Laprèvote^{1,4}*

¹Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France

²Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, INRA, route de St-Cyr, 78026 Versailles, France

³Unité de Biologie Cellulaire, INRA, route de St-Cyr, 78026 Versailles, France

⁴Laboratoire de Toxicologie, IFR 71, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

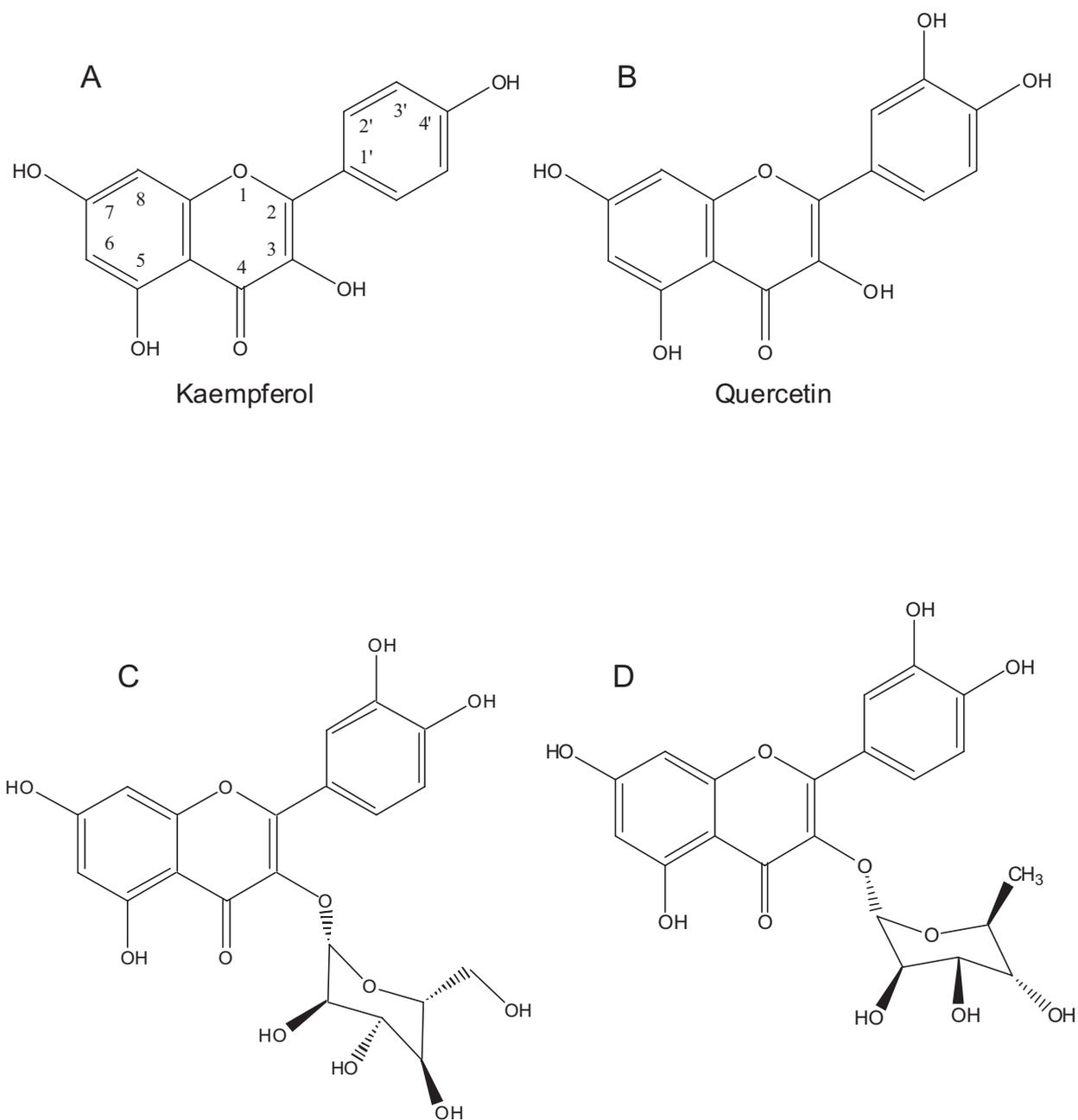


Figure S-1. Structures of flavonoids. A: kaempferol, B: quercetin, C: quercetin 3-*O*-glucoside, D: quercetin 3-*O*-rhamnoside.

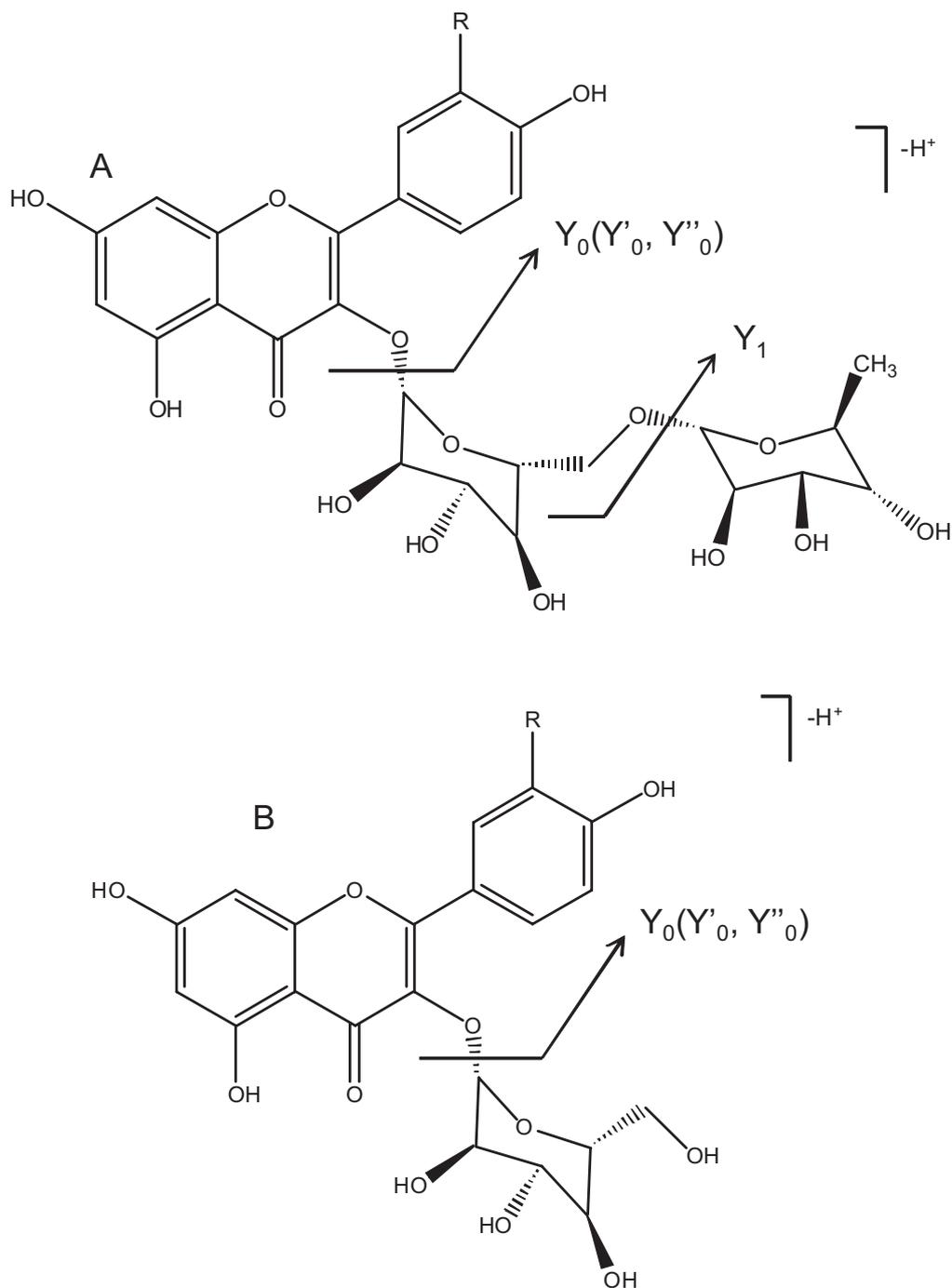


Figure S-2. Structures of flavonoids and main TOF-SIMS fragmentations of the corresponding $[M - H]^-$ ions (negative ionization mode). A: quercetin ($R = OH$) or kaempferol ($R = H$) 3-*O*-rutinoside, B: quercetin ($R = OH$) or kaempferol ($R = H$) 3-*O*-glucoside. Ions Y_0 and Y_1 represent the obtained fragment ions after the loss of the entire glycosidic group or of the external sugar residue only, respectively. The Y'_0 and Y''_0 ions, not used in this study for imaging, correspond to $[Y_0 - 1H]^-$ or $[Y_0 - 2H]^-$, respectively.

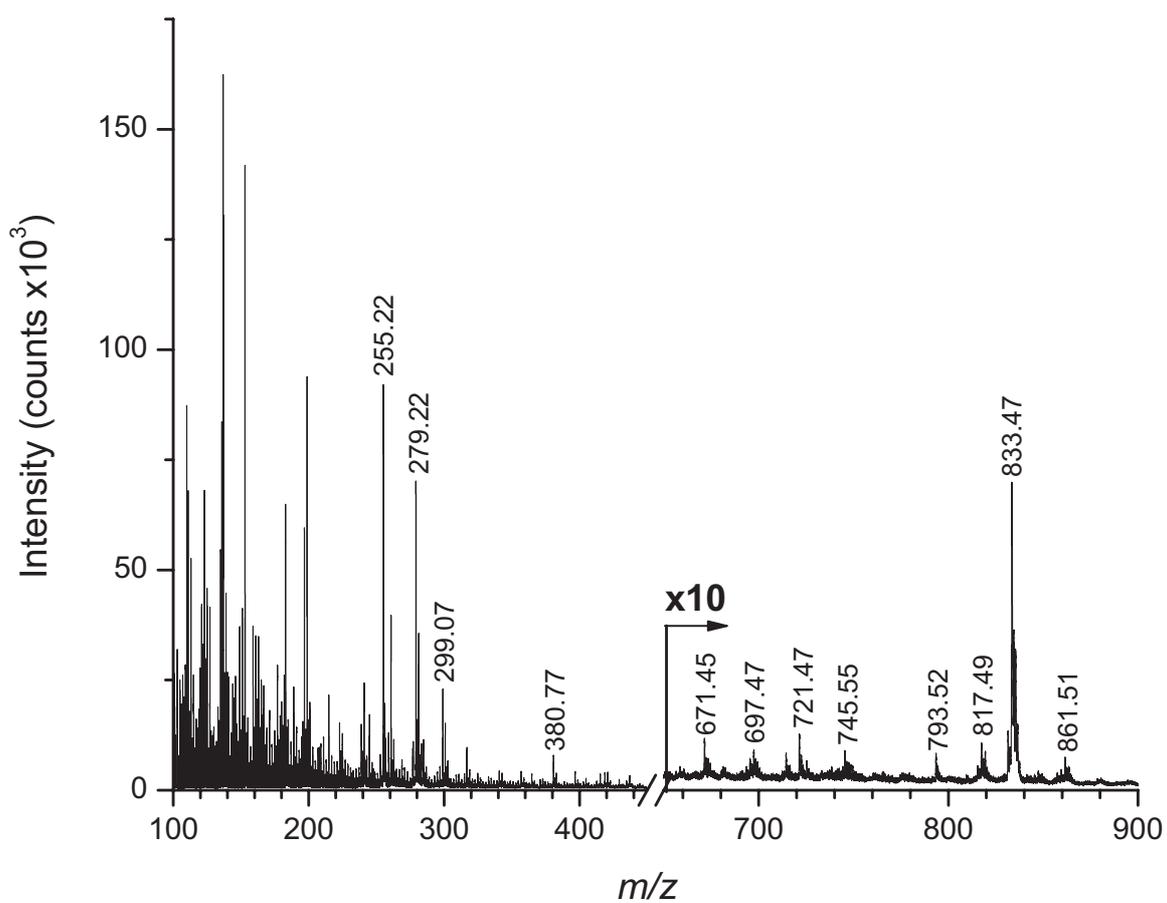


Figure S-3. TOF-SIMS negative ion mass spectrum of the surface of a *Pisum sativum* ZP-840 section.

Annexe 3

Seyer, A.; Riu, A.; Debrauwer, L.; Bourgès-Abella, N.; Brunelle, A.; Laprévote, O.; Zalko, D.

Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry imaging demonstrates the specific localization of Deca-Bromo-Diphenyl-Ether residues in the ovaries and adrenal glands of exposed rats.

J Am. Soc. Mass Spectrom. 2009, *in press*, doi: 10.1016/j.jasms.2010.06.019.

Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging Demonstrates the Specific Localization of Deca-Bromo-Diphenyl-Ether Residues in the Ovaries and Adrenal Glands of Exposed Rats

Alexandre Seyer,^a Anne Riu,^b Laurent Debrauwer,^b
Nathalie Bourguès-Abella,^c Alain Brunelle,^a Olivier Laprèvote,^{a,d} and
Daniel Zalko^b

^a Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

^b UMR 1089 Xénobiotiques INRA-ENVIT, Toulouse, France

^c Département des Sciences Cliniques, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France

^d Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, Paris, France

Deca-bromo-diphenyl ether (DBDE) is one of the most efficient brominated flame retardant (BFR) available on the market. We recently demonstrated that when administered to female rat by oral route, DBDE is efficiently absorbed, with the highest residual concentrations found in two endocrine glands, namely the adrenal glands and the ovaries. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging, a technique usually used for the study of endogenous compounds, was applied for the first time to a persistent organic pollutant, allowing to detect and to precisely localize DBDE residues in these two target tissues. The detection of the bromide ion (⁸¹Br isotope) by TOF-SIMS mass spectrometry imaging allowed us to demonstrate a marked cortical tropism of DBDE residues for the adrenal glands in female rats dosed per os 2 mg · kg⁻¹ DBDE, daily, over 96 h. In ovaries, DBDE residues were found to be concentrated in spots corresponding to part of the corpora lutea. Hepatic residues of DBDE were found to be homogeneously distributed. Due to the intrinsic toxicity of DBDE, its accumulation in the adrenal glands and the ovaries may be connected to the mechanisms of actions by which DBDE could trigger endocrine disruption in mammals. (J Am Soc Mass Spectrom 2010, xx, xxx) © 2010 American Society for Mass Spectrometry

Polybromo diphenyl ethers (PBDE) are a major class of brominated flame retardants (BFR). They are widely used to manufacture various industrial and domestic devices, with the aim to prevent or minimize fire damage. PBDE have been demonstrated to be present in the environment [1, 2], in animals [3, 4], as well as in human tissues [5, 6]. Among the three different formulations of PBDEs that are currently manufactured ("penta", "octa", and "deca"), the "deca-mix" is the most widely used, and is nowadays in many countries the only mix that remains marketed [7]. Deca-BDE (DBDE) is the major constituent (ca. 97%) of the "deca" commercial mix. Lower molecular weight PBDE (tetra-BDE to hepta-BDE) are the compounds that have been the most extensively studied. It has been demonstrated that some of them can induce neurotoxic effects in mice [8, 9]. They are suspected to impact

thyroid hormonal regulation [10], and display agonist and antagonist activities towards the Ah receptor [11]. They also induce the expression of CYP1A1 and CYP1A2 [12], which are proteins that belong to the cytochrome P450 superfamily and are involved in the metabolism of exogenous as well as endogenous molecules such as steroids. DBDE was considered by manufacturers to be poorly bioavailable (below 1%) due to its high molecular weight [13], and only a limited number of studies have examined its toxicity.

Because of technical difficulties, higher brominated PBDEs are seldom monitored in studies dealing with human exposure. However, when they are, DBDE and other high molecular weight PBDE are major contaminants [14]. For instance, in humans, the presence of DBDE has been reported in mother's milk [15], serum [16, 17] and adipose tissue [14, 18, 19]. These conclusions are also supported by recent data obtained in rat using radio-labeled [¹⁴C]-DBDE [20, 21], which demonstrate that DBDE bioavailability is above 20%. Its residues have been shown to markedly concentrate in the

Address reprint requests to Dr. A. Brunelle, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France. E-mail: Alain.Brunelle@icsn.cnrs-gif.fr

liver and the adrenal glands [20, 21] as well as in the ovaries [21]. Of particular interest is the fact that DBDE respective residual concentrations are even higher in these two endocrine glands than in the liver itself. In rats dosed $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ labeled DBDE, residual levels were 11.2, 16.1 and 33.0 ppm in the liver, the ovaries, and the adrenal glands, respectively. Moreover, part of the detected radioactivity (about 10% in adrenal glands and ovaries) was found to be associated with debrominated metabolites. This debromination may result in the bioactivation of PBDE, the structure of which is relatively close to that of poly-chlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. PBDE metabolites such as hydroxylated tetra-BDE have been shown to be endocrine disrupting chemicals (EDCs) [22, 23]. Thus, the consequences of the presence of these residues in endocrine glands needs to be better understood, beginning with the study of their precise localization. We consequently decided to use mass spectrometry imaging (MSI), namely time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging, to localize DBDE residues in the liver as well as in the two main target tissues of DBDE in female rats: the adrenal glands and the ovaries.

MALDI-TOF [24] and nano-SIMS [25] are two mass spectrometry methods that are frequently used for imaging. MALDI-TOF mass spectrometry imaging is able to detect numerous classes of molecules (lipids, metabolites, peptides, proteins . . .) with the possibility to perform *in situ* tandem mass spectrometry experiments, but with a spatial resolution limited to $50 \mu\text{m}$. This would not allow localizing the compounds with enough precision. Nano-SIMS imaging can detect elements with a spatial resolution of a few tens of nanometers. However, the field of view is only of several tens of micrometers, which would not have enabled to record the image of entire organs. Moreover, sample preparation methods for nano-SIMS are relatively difficult and long to implement. Finally, taking into account the size of the tissues to be analyzed in the present study (a few millimeters), the use of nano-SIMS or MALDI-TOF MSI would have led to very long acquisition times.

Until recently, the mass to charge ratio (m/z) of the ions that could be imaged using TOF-SIMS instrument was limited to 100–200, mainly because the ion sources used were inefficient in transferring intact heavy molecular ions into the gas phase. The range of biological applications was therefore relatively limited [26]. Nowadays, thanks to the increase of sensitivity due to advent of polyatomic ion beams such as those of gold [27–29], bismuth [30], or C_{60} fullerenes [31], the field of TOF-SIMS imaging has been greatly extended. This method now enables drawing from various kinds of samples the density map (image) of any ion present in the mass spectra, with a spatial resolution from a few μm to less than 500 nm, and with a mass range which is now reaching more than 1000 Da. In recent years, many applications of TOF-SIMS imaging have been published in the fields of biology and medicine [32–43]. However,

it has never been directly applied to the exploration of persistent organic pollutants such as environmental or food contaminants.

Thus, TOF-SIMS imaging appeared to be the best suited method to map DBDE in the liver, the adrenal glands, and the ovaries of orally dosed rats, following the *in vivo* experimental conditions already used by Riu et al. [21], but using non-radio-labeled DBDE. Histologic studies of the imaged tissue sections were carried out in parallel to TOF-SIMS imaging, with the aim to better understand the tissue distribution of DBDE residues.

Experimental

Female Wistar rats, aged 12 wk ($n = 6$), were acclimatized with a 12/12 h light/dark cycle for 1 wk and were fed a standard diet with *ad libitum* access to water. Three animals were force-fed, during 4 consecutive d, a daily dose of $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ DBDE (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) dissolved in peanut oil as described previously [21]. Three animals were forced-fed only with peanut oil (control). Animals were euthanized by cervical dislocation followed by exsanguinations 24 h after the last DBDE dosage. The liver, the adrenal glands, and ovaries were removed and immediately frozen and stored at -80°C until time of analysis.

Sections were made with a CM3050-S cryostat (Leica Microsystems SA, Nanterre, France) at -20°C for the adrenal glands and the liver, and at -25°C for ovaries. Cryostat sections ($10 \mu\text{m}$ for adrenal glands and ovaries; $14 \mu\text{m}$ for the liver) were immediately collected on a silicon wafer (2 in. diameter polished silicon wafers; ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France). After each ovary section, an adjacent section was made and collected on a glass slide for Masson's trichrome histologic staining (Sigma Kit HT15; Saint-Quentin-Fallavier, France). Before analysis, cryostat sections were dried under a pressure of a few hectopascals for 10 min. Optical images were recorded from both silicon wafer and glass slide sections using a photonic BX51 microscope fitted with $\times 1.25$ to $\times 50$ objectives (Olympus, Rungis, France) coupled to a Color View I camera monitored by Cell^B software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

All ion images were recorded with a TOF-SIMS IV commercial mass spectrometer (Ion-Tof GmbH, Münster, Germany) located at the Institut de Chimie des Substances Naturelles in Gif-sur-Yvette (France). This mass spectrometer is fitted with a bismuth liquid metal ion gun (LMIG) delivering Bi_n^+ bismuth cluster ions (Bi_3^+ ions were selected). Primary ions reached the sample surface with a kinetic energy of 25 keV and an angle of incidence of 45° . The primary ion dose density used for the experiments was set between 6×10^{10} and $9 \times 10^{10} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$, well below the static SIMS limit [44]. This ion dose was chosen to limit both the acquisition time to 6 h and the size of the raw data files to ca. 1.5 Gb. Secondary ions were accelerated to a kinetic

energy of 2 keV, passed through a field free region and a single-stage reflectron (first-order compensation). The effective ion flight path was ~ 2 m. Ions were then post-accelerated to a kinetic energy of 10 keV before hitting a hybrid detector composed by a microchannel plate, a scintillator, and a photomultiplier. A low-energy electron flood gun was activated between two primary ion pulses to neutralize the sample surface. In this study, we used the so-called "high current bunched mode" to set the primary ion column [45]. This mode of operation allows reaching a spatial resolution of $2 \mu\text{m}$, while maintaining an excellent mass resolution of about $M/\Delta M = 8 \times 10^3$ (FWHM) at m/z 500, and a pulsed primary ion current (measured with a Faraday cup located on the grounded sample holder) of 0.35 pA for Bi_3^+ at 10 kHz , which does not penalize the time required for ion images acquisition. Because of the very low initial kinetic energy distribution of the secondary ions, the relation between time-of-flight and the square root of the mass-to-charge ratio m/z is always linear. Consequently the mass spectra were always internally calibrated using signals from C^- , CH^- , CH_2^- , C_2^- , C_3^- , and C_4H^- ions, in the negative ion mode. The so-called "stage scan" raster mode was used. In this mode, the sample is continuously moved by the sample stage in a saw-tooth mode and scans the whole surface area. The primary ion beam is rastering itself inside the area of each individual pixel. The time required to achieve one analysis with this mode is about 6 h, mainly because of the positioning control of the sample holder. Images were always recorded with a number of pixels equal to 256×256 , meaning that the pixel size varied with the size of the area to be analyzed. For example, an area of $8 \times 8 \text{ mm}^2$ would result in a pixel size of $31.25 \times 31.25 \mu\text{m}^2$.

Results and Discussion

The TOF-SIMS mass spectrum, recorded in the negative ion mode from a solution of DBDE ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) is shown in Figure 1. A very weak signal corresponding to the molecular ion (M^- , m/z 959.19 for the $^{79}\text{Br}_5$ $^{81}\text{Br}_5$ isotopomer) was detected, showing that the detection of this molecule based on the monitoring of the molecular ion at the surface of a tissue section would be extremely difficult. Besides the M^- ions, several brominated isotopic clusters corresponding to the fragmentation of the molecular ion via bromine atoms eliminations were detected. These were centered on the m/z 878.10, 798.21, and 718.29 ion peaks, respectively. The spectrum (Figure 1) also displayed the $\text{C}_6\text{Br}_5\text{O}^-$ fragment ion (isotopic pattern ranging from m/z 482.52, $^{12}\text{C}_6$ $^{79}\text{Br}_5$ $^{16}\text{O}^-$ to 492.52, $^{12}\text{C}_6$ $^{81}\text{Br}_5$ $^{16}\text{O}^-$) generated by the cleavage of the ether bond of the molecule. Conversely, the Br^- (m/z 78.91 and 80.91), Br_2^- (m/z 157.82, 159.81, 161.82) and Br_3^- (m/z 236.71, 238.71, 240.72 and 242.71) ion peaks were by far the most intense signals, the Br^- ions being the base peak of the spectrum. The ion peaks corresponding to the two natural isotopes of bromine, and displaying almost the same natural abundances (50.69% and 49.31%, respectively), were the only ones detected in organs of dosed rat. They were never detected in organs of control rat (Figure 2). The $^{79}\text{Br}^-$ isotope was detected at m/z 78.906 (average of all experiments) with a deviation of 13 ppm (Table 1), compared with the theoretical mass-to-charge ratio (m/z 78.918). As shown in Figure 2, this peak was located at the left edge of a very intense peak corresponding to the phosphite ion PO_3^- (mean value m/z 78.961). The signal corresponding to this ion

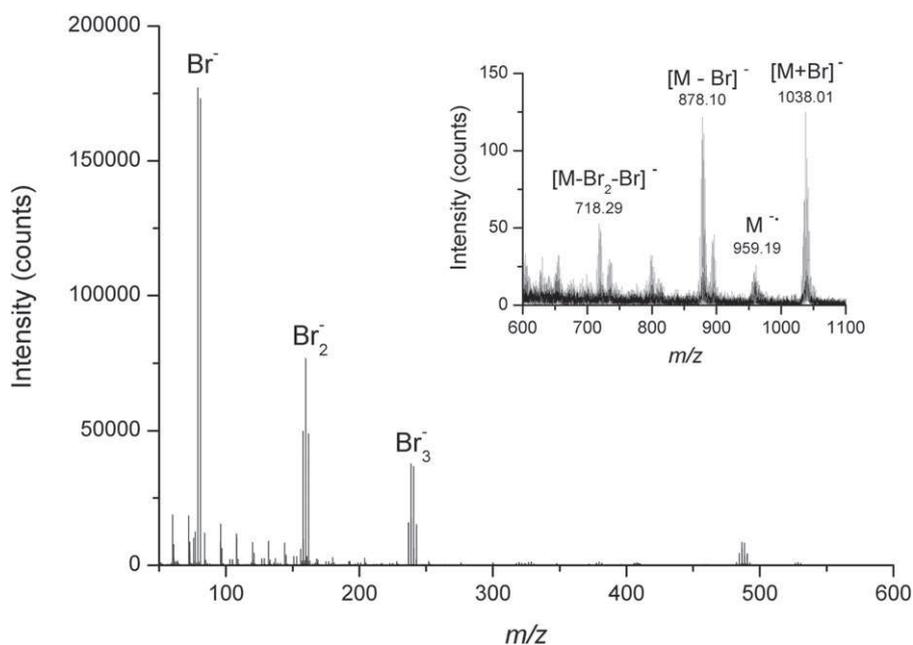


Figure 1. TOF-SIMS negative ion mass spectrum of a standard solution of deca-bromo-diphenyl ether at a concentration of $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ in methanol/water 50:50 vol:vol.

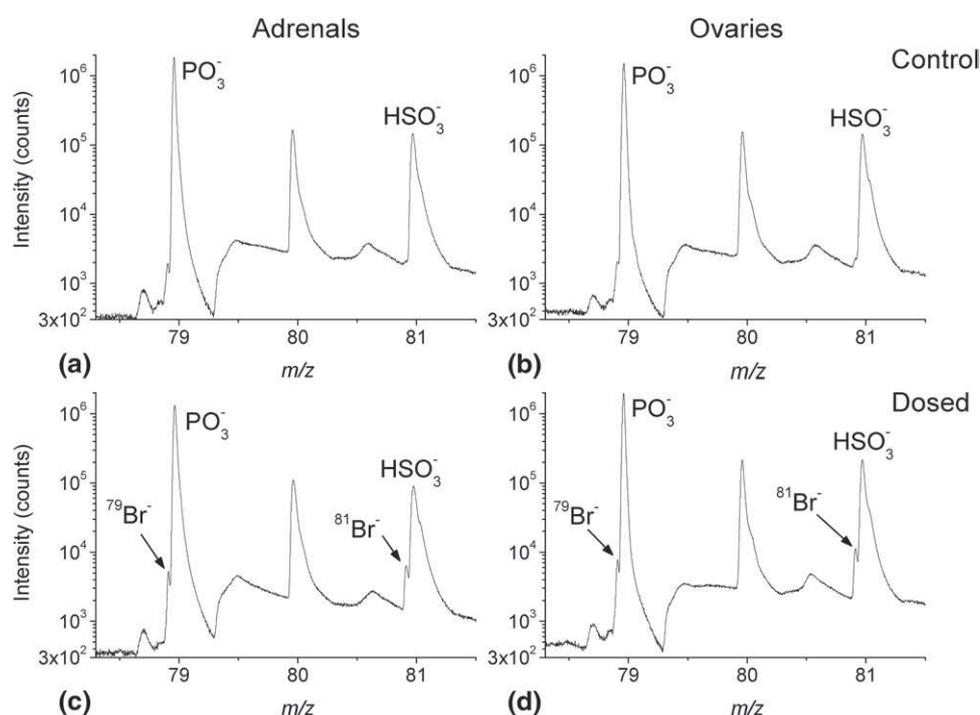


Figure 2. Parts of the TOF-SIMS negative ion mass spectra recorded at the surface of sections from adrenal glands of control (a) and dosed rat (c), and from ovaries of control (b) and dosed (d) rats. A log scale has been chosen for the y -axis to better show all the peaks with very different intensities.

was so intense that at least one ion was emitted at this mass-to-charge ratio after each primary ion pulse, leading to a very large and distorted peak due to the dead time of the entire electronic chain (constant fraction discriminator and time-to-digital converter) following the detector. This saturation is clearly evidenced in Figure 2 (for which the intensity on the y -axis was intentionally drawn using a log scale) by the average chemical noise level, which is falling down just after the intense PO_3^- ion peak. The very high intensity of this ion peak together with the close m/z ratio values of the PO_3^- and $^{79}\text{Br}^-$ ions can therefore explain the large error on the measured value of the $^{79}\text{Br}^-$ isotope mass-to-charge ratio. Since the PO_3^- ion signal is saturated, this ion appears as homogeneously distributed over the entire ion image and thus makes false the representation of the $^{79}\text{Br}^-$ ion image. The situation was different for the $^{81}\text{Br}^-$ isotope (theoretical mass 80.916 Da) which was detected at m/z 80.910, with a mass deviation of 7 ppm. This ion peak was also located at the left edge of an intense ion peak, i.e., the bisulphite HSO_3^- ion peak (m/z 80.974). Nevertheless, in this case, the HSO_3^- ion peak is

much less intense than the PO_3^- ion peak (see Figure 2). The corresponding signal was consequently not saturated, and did not disturb the ion image of the $^{81}\text{Br}^-$ ion, thanks to a better separation of the two peaks. Figure S1, which can be found in the electronic version of this article, shows that $^{81}\text{Br}^-$ and HSO_3^- ions have different spatial distributions, while the distributions of $^{79}\text{Br}^-$ and PO_3^- ions cannot be differentiated since the PO_3^- ion signal is saturated (its ion image is uniform and cannot exhibit any contrast).

An improved separation between these two close ion peaks could be achieved by making the secondary ions fly in the field-free path of the TOF-SIMS IV mass spectrometer with a kinetic energy of 1 keV, instead of 2 keV. This was obtained by maintaining the extraction voltage at 2 kV and by decelerating the secondary ions only when entering the field-free path. The post-acceleration before the detector was kept at 10 kV. Neither the extraction of the secondary ions nor their detection efficiency was affected. Using this method, both the time-of-flight and the separation of all the ions were increased by a factor of square root of two. Figure 3

Table 1. Mass-to-charge ratio of $^{79}\text{Br}^-$ and $^{81}\text{Br}^-$ bromide ions measured by TOF-SIMS at the surface of sections from ovaries and adrenal glands of dosed rats and their deviation in ppm regarding to the exact mass

	$^{79}\text{Br}^-$	Dev (ppm)	$^{81}\text{Br}^-$	Dev (ppm)
Theoretical m/z	78.918		80.916	
Experimental m/z (measured on adrenal gland sections)	78.908	11	80.911	5
Experimental m/z (measured on ovary sections)	78.904	14	80.909	7
Experimental m/z (mean value from the two organs)	78.906	13	80.909	7

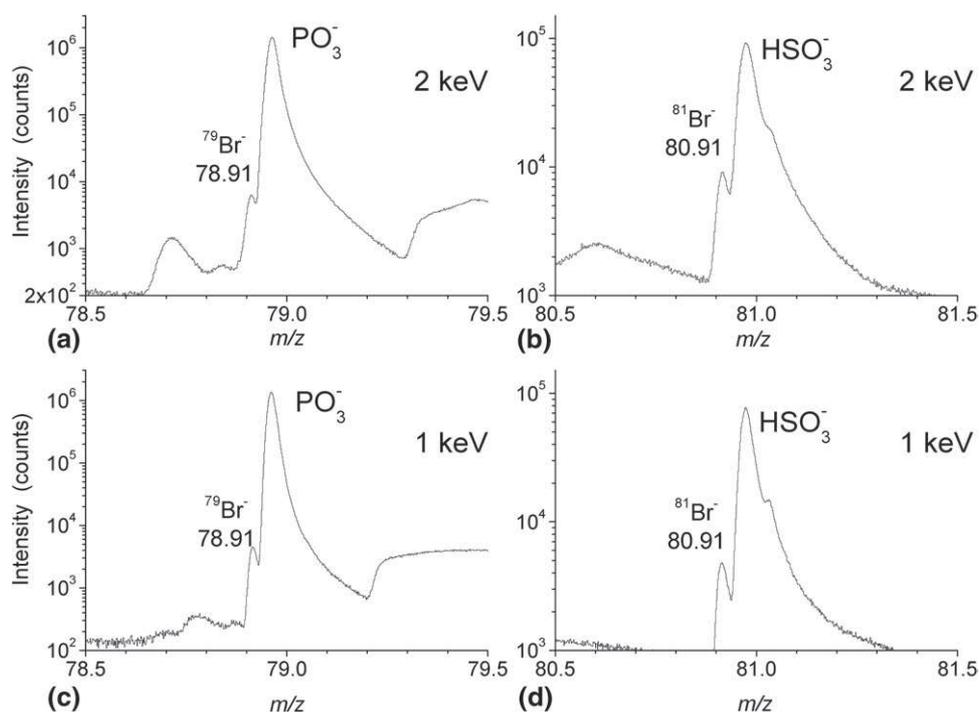


Figure 3. Parts of the TOF-SIMS negative ion mass spectra recorded at the surface of sections from adrenal glands of a dosed rat for 2 keV (a) and (b) and 1 keV (c) and (d) of secondary ion kinetic energy.

shows parts of the spectra obtained at the surface of an adrenal gland section from a dosed rat, with kinetic energies of 2 keV (top) and 1 keV (bottom), respectively. The use of 1 keV kinetic energy led to a better mass separation between each of the two bromide isotopes and the PO_3^- and HSO_3^- ions, respectively, as indicated in Figure 3c and d. Nevertheless the intensity of the $^{81}\text{Br}^-$ ion peak was diminished by a factor of 2.7 when decreasing the secondary ion kinetic energy because this option led to a fall down in the transmission of the time-of-flight analyzer. Regarding the separation of the $^{79}\text{Br}^-$ and PO_3^- ions, the separation's enhancement was not sufficient to get rid of the mix between the two ions. Consequently, these low-energy settings of the analyzer were not selected for the studies, and only the $^{81}\text{Br}^-$ isotopic ion was used for the imaging of DBDE residues at the surface of adrenal gland and ovary sections of dosed rats. Since the natural abundance of this isotope accounts for nearly half of the total amount of bromine in the samples, these difficulties in the measurements did not affect the worthiness of the results.

Following the optimization of the method, we proceeded to the TOF-SIMS imaging of tissues of organs from rats exposed *in vivo* to DBDE versus controls. Given the technical impossibility to base on the signal directly corresponding to DBDE, we did not aim to distinguish between the parent compound and its metabolites. However, it was previously demonstrated that the main part of the extractible radioactivity found in the adrenal glands and the ovaries of rats dosed orally with DBDE in these *in vivo* conditions does

primarily correspond to unchanged DBDE, while metabolites (lower brominated PBDE congeners) account only for roughly 10% of the overall residues [21].

Bromide ions were detected in hepatic parenchyma, where they presented a homogeneous distribution, which prevented spotting a specific localization such as periportal or centrolobular zonation (data not shown). Images recorded from one quarter of the surface of adrenal gland sections of dosed and control rats are presented in Figure 4. The left column (Figure 4a, b, and c) shows optical images on which the red color squares indicate the areas analyzed by TOF-SIMS imaging. The middle column (Figure 4d, e, and f) shows the $^{81}\text{Br}^-$ ion images recorded from adrenal sections of dosed rats, and the right column (Figure 4g, h, and i) shows the ion images of the $^{81}\text{Br}^-$ ion peak recorded from adrenal sections of control rats. Dosed and control rats $^{81}\text{Br}^-$ images (d and g, e and h, f and i, respectively) in Figure 4 were generated by selecting exactly the same area. In dosed rats, the bromide ion was clearly detected in the cortex of the adrenal glands. The bromide ion distribution appeared heterogeneous even if it seemed that its main localization was the outer cortex containing cells with cytoplasmic lipid droplets enriched in aldosterone (zona glomerulosa) and corticosterone (zona fasciculata). In contrast, in control animals, no significant amount and specific location of the bromide ion was detected. Although the occurrence of ion suppression effects or "matrix effects" can not be totally ruled out, the comparison of the images obtained on the dosed rats with those obtained on the control ones, and the

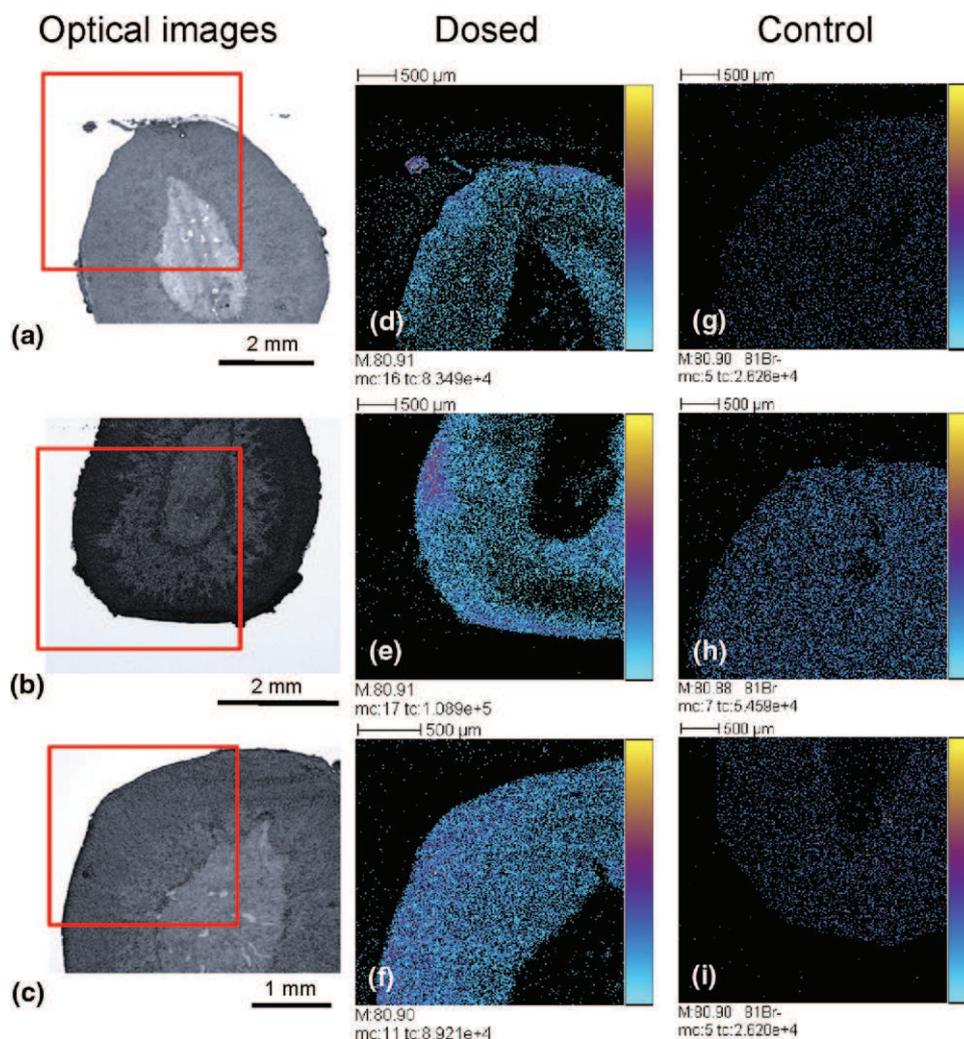


Figure 4. TOF-SIMS negative ion images recorded at the surface of sections from adrenal glands of rats. (a), (b), (c): optical images of sections from adrenal glands of dosed rats. The red squares indicate the areas from which the ion images (d), (e), and (f) were recorded. (d), (e), (f): $^{81}\text{Br}^-$ ion, dosed rats. (g), (h), (i): control rats, images were obtained after the selection, in the mass spectra, of the same window as for the $^{81}\text{Br}^-$ ion. For all ion images: field of view $3.52 \times 3.52 \text{ mm}^2$; 256×256 pixels, pixel size $13.75 \mu\text{m}^2$, 512 shots/pixel, fluence: $8 \times 10^{10} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts *mc* indicated below each ion image, and could be read as [0, *mc*]; *tc* is the total number of counts recorded for the specified *m/z* (sum of counts in all the pixels).

optical images clearly shows a tropism of brominated species for particular zones of the organs studied. For the latter animals, it can then be considered that the low intensity signals recorded in the adrenal (g, h, and i images: controls) only correspond to the HSO_3^- ion contribution at the base of the $^{81}\text{Br}^-$ ion peak, constituting a background signal. Moreover, it is important to notice that when the bromide ion is detected (middle column) the amplitude *mc* of the color scale of each image is greater than when not detected (right column).

The structure of PBDE is closely related to that of PCBs, for which the toxicity was largely documented in particular as endocrine disruptors [22, 23]. Among others, it has been demonstrated that PCBs and some of

their hydroxylated metabolites target the adrenal glands of marine mammals, inducing the hyperplasia of the cortical area [46]. The immunotoxicity of PCBs was demonstrated in another study with rats, which is consistent with the known deregulation of the immune system by corticosteroids [47]. In the case of PCBs, cortical hyperplasia of the adrenal glands is hypothesized to be correlated with an increased production of cortisol, which in turn triggers the down regulation of the immune system. Given the structural similarity between PCBs and PBDEs, it is noteworthy that DBDE residues mainly target the outer part of the adrenal cortex. Why these residues specifically accumulate in this part of the adrenal glands while, in contrast, the

medulla is not a target for DBDE, remains to be better understood. Though the current knowledge about the toxicity of DBDE is insufficient to link BFR exposure to adverse outcomes due to a disruption of the adrenocortical function, this hypothesis is greatly favored by the conclusions of TOF-SIMS imaging. Further in vivo exploration studies of the adrenal function will be necessary to confirm this hypothesis.

Images recorded on ovary sections of dosed and control rats are presented in Figure 5. The layout of this figure is the same as for Figure 4. The left column shows

ovary micrographies recorded after Masson's trichrome staining (Figure 5a, b, and c). The medium column presents the $^{81}\text{Br}^-$ ion images recorded from ovary sections of dosed rats (Figure 5d, e, and f) while right column shows images from control rats. The bromide ions appeared to accumulate in only part of the several corpora lutea observed in the ovarian stroma from dosed rats, while others were not colored. This result could be explained by the fact that all corpora lutea were not at the same stage of development. In species like rat, which have a 4-d long estrous cycle, luteal cells

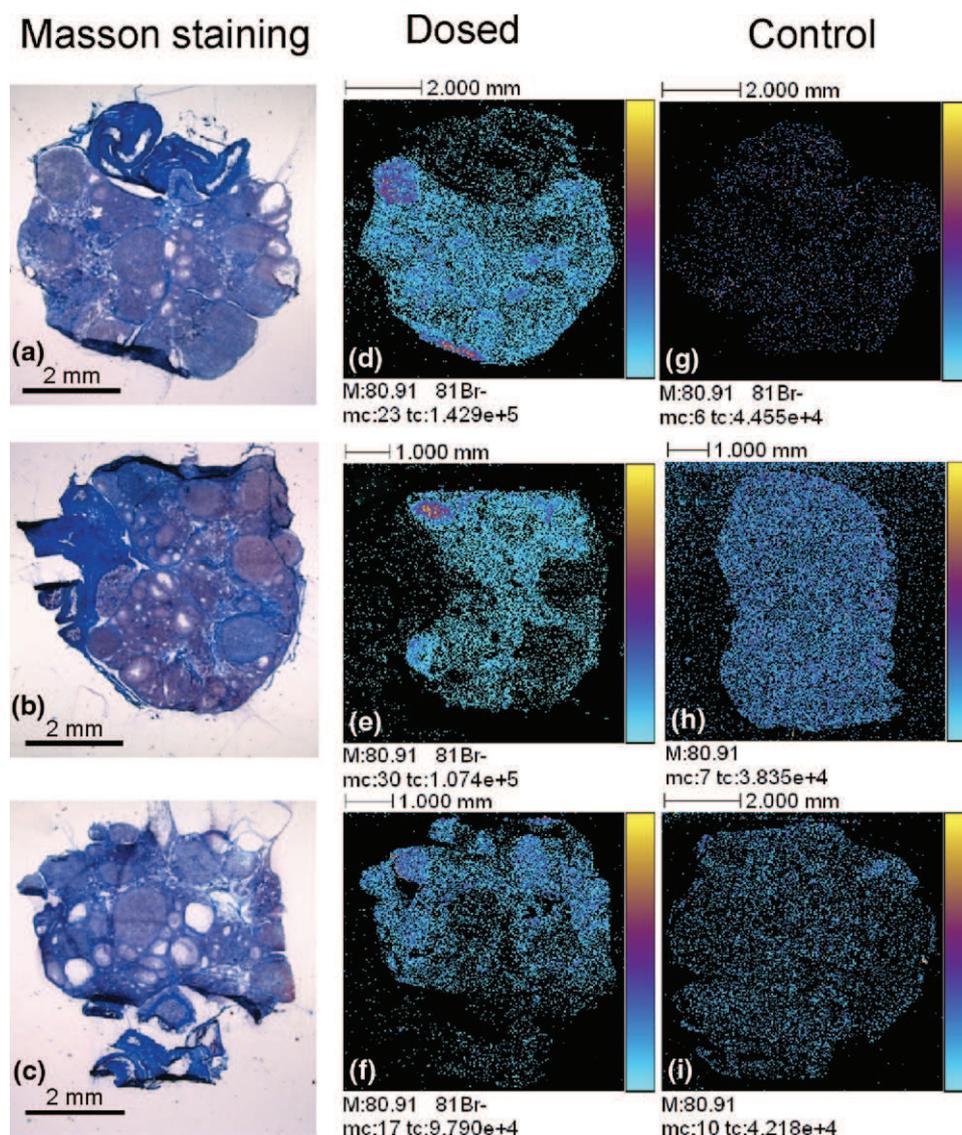


Figure 5. TOF-SIMS negative ion images recorded at the surface of sections from ovaries of rats. (a), (b), (c): Optical images of trichrome Masson staining of ovaries sections of dosed rats. The collagenic dense ovarian stroma was stained in blue whereas ovarian follicles and corpora lutea show as pink ovoid structures. (d), (e), (f): $^{81}\text{Br}^-$ ion, dosed rats; (g), (h), (i): control rats, images were obtained after selection, in the mass spectra, of the same window as for the $^{81}\text{Br}^-$ ion. For all ion images: field of view 6×6 to $7.4 \times 7.4 \text{ mm}^2$; 256×256 pixels, pixel size $23.4 \times 23.4 \mu\text{m}^2$ to $28.9 \times 28.9 \mu\text{m}^2$, 512 shots/pixel, fluence: from 1.8×10^{10} to $4 \times 10^{10} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts *mc* indicated below each ion image, and could be read as $[0, mc]$; *tc* is the total number of counts recorded for the specified *m/z* (sum of counts in all the pixels).

actively synthesize steroids, and progesterone-rich tiny lipid cytoplasmic droplets are present in corpora lutea only at the day of diestrus [48]. In the conditions suitable to enable TOF-SIMS imaging, the produced sections enabled a satisfactory histologic analysis, but did not allow to fully characterizing the histologic stage of corpora lutea. Like other organo-halogen compounds, including polybrominated biphenyls (PBB) and PCBs, PBDE are relatively lipid soluble xenobiotics. Compounds like PCB have been shown to adversely affect progesterone production [49]. It could therefore be hypothesized that DBDE (or its metabolites) present at the level of the corpora lutea may disrupt natural steroidogenesis in the ovary.

In these experiments, the maximum spatial resolution provided by TOF-SIMS mass spectrometry imaging was not fully implemented. Moreover, the primary ion dose of a few 10^{10} ions per cm^2 used to record the ion images shown in Figure 5 was several orders of magnitude below the so-called static SIMS limit. A second image was therefore recorded for specific areas of the same ovarian section. This is shown in Figure 6, where the $^{81}\text{Br}^-$ ion, which appeared to accumulate in Figure 5d, was mapped with a better spatial resolution and higher primary ion fluence. Figure 6a shows the optical image after Masson's trichrome staining from the dosed rat ovary section in which the red color square delimitates the analyzed area. Figure 6b shows the $^{81}\text{Br}^-$ ion image, and Figure 6c the same image after a reduction of the number of pixels from 256×256 to 128×128 , the intensity of each pixel now corresponding to the sum of four adjacent pixels. This method allowed in the present case to improve the apparent contrast of images, at the expense of a reduction of the spatial resolution by a

factor of 2. This additional magnified acquisition clearly confirmed the localization of the bromide ion in the corpus luteum.

Conclusion

TOF-SIMS imaging using a bismuth cluster ions source allowed for the first time and with a high precision to localize the residues of a xenobiotic of large toxicological interest, namely the brominated flame retardant DBDE, at the level of its target tissues. DBDE was spotted in well-defined parts of two endocrine glands, as demonstrated by *in vivo* experiments carried out in rat as a model animal. Although DBDE was not detected in its molecular form, it was possible to map it at the surface of adrenal glands and ovaries thanks to the detection of the $^{81}\text{Br}^-$ isotope of the bromide ion, which was only detected in organs from dosed rats. This ion was located in the cortical area of adrenal glands. Despite the low amount of work documenting BFR's effects, this appears to be consistent with the several studies that previously demonstrated a link between PCB exposure and cortical hyperplasia (as well as related immunotoxic effects). Indeed, these organo-halogen compounds are very close to DBDE in terms of chemical structure. In ovaries from dosed rat, the $^{81}\text{Br}^-$ ion was detected in active corpora lutea, which is even more alarming than the previously released data demonstrating that, quantitatively, ovaries are the second main target tissue of DBDE in rat [21]. Given the fact that some PBDE metabolites have been shown to act as nuclear receptor ligands [10], TOF-

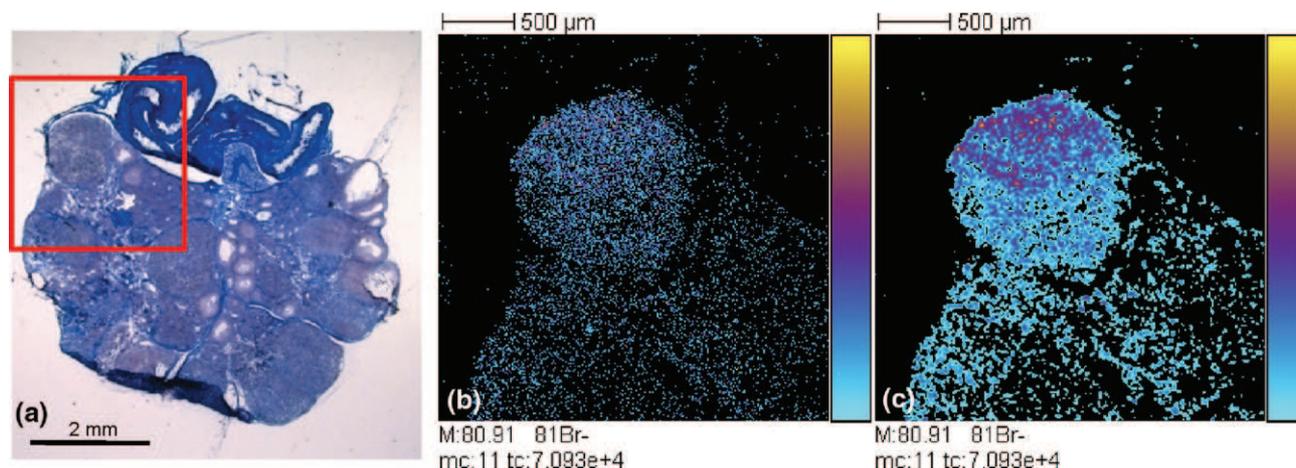


Figure 6. Precise localization of $^{81}\text{Br}^-$ in rat ovary. (a) Optical image of trichrome Masson staining of an ovary section of dosed rat. The red square indicates the area in which the ion image was recorded. (b) TOF-SIMS negative ion images of the $^{81}\text{Br}^-$ ion recorded at the surface of a section from an adrenal of dosed rat. (c) Same image as (b), but after having summed the number of counts of all four adjacent pixels. Field of view $2.7 \times 2.7 \text{ mm}^2$, 256×256 pixels, pixel size $10.5 \times 10.5 \mu\text{m}^2$ (b) and 128×128 pixels, pixel size $21 \times 21 \mu\text{m}^2$ (c), 512 shots/pixel, fluence $1.4 \times 10^{11} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$. Color scale bars, with amplitude in number of counts, are indicated to the right of each ion image. The amplitude of the color scale corresponds to the maximum number of counts mc and could be read as $[0, mc]$; tc is the total number of counts recorded for the specified m/z (sum of counts in all the pixels).

SIMS imaging techniques could provide valuable data, enabling to better understand the possible endocrine disrupting effects of DBDE, as well as lower brominated PBDE.

Acknowledgments

The authors acknowledge support for this work by the European Union (contract LSHG-CT2005-518194 COMPUTIS). The Ph.D. research fellowship of A.S. is supported by the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS).

Appendix A Supplementary Material

Supplementary material associated with this article may be found in the online version at doi:10.1016/j.jasms.2010.06.019.

References

- Watanabe, I.; Kashimoto, T.; Tatsukawa, R. Confirmation of the Presence of the Flame-Retardant Decabromobiphenyl Ether in River Sediment from Osaka. *Jpn. B Environ. Contam. Tox.* **1986**, *36*, 839–842.
- Yamamoto, H.; Okumura, T.; Nishikawa, Y.; Konishi, H. Determination of Decabromobiphenyl Ether in Water and Sediment Samples by Gas Chromatography with electron Capture Detection. *J. AOAC Int.* **1997**, *80*, 102–106.
- Lindstrom, G.; Wingfors, H.; Dam, M.; von Bavel, B. Identification of 19 Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Long-Finned Pilot Whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. *Arch. Environ. Con. Tox.* **1999**, *36*, 355–363.
- Huwe, J. K.; Lorentzen, M.; Thuresson, K.; Bergman, A. Analysis of Mono- to Deca-Brominated Diphenyl Ethers in Chickens at the Part Per Billion Level. *Chemosphere* **2002**, *46*, 635–640.
- Noren, K.; Meironyte, D. Certain Organochlorine and Organobromine Contaminants in Swedish Human Milk in Perspective of Past 20–30 Years. *Chemosphere* **2000**, *40*, 1111–1123.
- Sjodin, A.; Jones, R. S.; Focant, J. F.; Lapeza, C.; Wang, R. Y.; McGahee, E. E.; Zhang, Y. L.; Turner, W. E.; Slazyk, B.; Needham, L. L.; Patterson, D. G. Retrospective Time-Trend Study of Polybrominated Diphenyl Ether and Polybrominated and Polychlorinated Biphenyl Levels in Human Serum from the United States. *Environ. Health Persp.* **2004**, *112*, 654–658.
- EHC-162. Environmental Health Criteria 162. Brominated Diphenyl ethers. International Program on Chemical Safety. World Health Organization: Geneva, Switzerland; 1994.
- Eriksson, P.; Viberg, H.; Jakobsson, E.; Orn, U.; Fredriksson, A. A Brominated Flame Retardant, 2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl Ether: Uptake, Retention, and Induction of Neurobehavioral Alterations in Mice During a Critical Phase of Neonatal Brain Development. *Toxicol. Sci.* **2002**, *67*, 98–103.
- Viberg, H.; Fredriksson, A.; Eriksson, P. Neonatal Exposure to Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE 153) Disrupts Spontaneous Behavior, Impairs Learning and Memory, and Decreases Hippocampal Cholinergic Receptors in Adult Mice. *Toxicol. Appl. Pharm.* **2003**, *192*, 95–106.
- Meerts, I. A. T. M.; van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A. C.; van Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A.; Brouwer, A. Potent Competitive Interactions of Some Brominated Flame Retardants and Related Compounds with Human Transthyretin In Vitro. *Toxicol. Sci.* **2000**, *56*, 95–104.
- Chen, G. S.; Bunce, N. J. Polybrominated Diphenyl Ethers as Ah Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicol. Sci.* **2003**, *76*, 310–320.
- von Meyerinck, L.; Hufnagel, B.; Schmoltdt, A.; Benthe, H. F. Induction of Rat Liver Microsomal Cytochrome-P-450 by the Pentabromo Diphenyl Ether Bromkal-70 and Half-Lives of Its Components in the Adipose Tissue. *Toxicology* **1990**, *61*, 259–274.
- Norris, J. M.; Kociba, R. J.; Schwetz, B. A.; Rose, J. Q.; Humistone, C. G.; Jewett, G. L.; Gehring, P. J.; Mailhes, J. B. Toxicology of Octabromobiphenyl and Decabromodiphenyl Oxide. *Environ. Health Persp.* **1975**, *11*, 153–161.
- Antignac, J. P.; Cariou, R.; Zalko, D.; Berrebi, A.; Cravedi, J. P.; Maume, D.; Marchand, P.; Monteau, F.; Riu, A.; André, F.; Le Bizec, B. Exposure Assessment of French Women and Their Newborn to Brominated Flame Retardants: Determination of Tri- to Deca-Polybromodiphenylethers (PBDE) in Maternal Adipose Tissue, Serum, Breast Milk, and Cord Serum. *Environ. Pollut.* **2009**, *157*, 164–173.
- Schecter, A.; Pavuk, M.; Papke, O.; Ryan, J. J.; Birnbaum, L.; Rosen, R. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in U.S. Mothers' Milk. *Environ. Health Persp.* **2003**, *111*, 1723–1729.
- Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Takemori, H.; Ohi, E.; Tsuji, H.; Nagayama, J. Impact of Fermented Brown Rice with *Aspergillus oryzae* (FEBRA) Intake and Concentrations of Polybrominated Diphenylethers (PBDEs) in Blood of Humans from Japan. *Chemosphere* **2004**, *57*, 795–811.
- Thomas, G. O.; Wilkinson, M.; Hodson, S.; Jones, K. C. Organohalogen Chemicals in Human Blood from the United Kingdom. *Environ. Pollut.* **2006**, *141*, 30–41.
- Stanley, J. S.; Cramer, P. H.; Thornburg, K. R.; Remmers, J. C.; Breen, J. J.; Schwemberger, J. Mass-Spectral Confirmation of Chlorinated and Brominated Diphenylethers in Human Adipose Tissues. *Chemosphere* **1991**, *23*, 1185–1195.
- Cariou, R.; Antignac, J. P.; Marchand, P.; Berrebi, A.; Zalko, D.; André, F.; Le Bizec, B. New Multiresidue Analytical Method Dedicated to Trace Level Measurement of Brominated Flame Retardants in Human Biological Matrices. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1100*, 144–152.
- Mörck, A.; Hakk, H.; Örn, U.; Klasson-Wehler, E. Decabromodiphenyl Ether in the Rat: Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion. *Drug Metab. Dispos.* **2003**, *31*, 900–907.
- Riu, A.; Cravedi, J. P.; Debrauwer, L.; Garcia, A.; Canlet, C.; Jouanin, I.; Zalko, D. Disposition and Metabolic Profiling of [C-14]-Decabromodiphenyl Ether in Pregnant Wistar Rats. *Environ. Int.* **2008**, *34*, 318–329.
- Jansen, H. T.; Cooke, P. S.; Porcelli, J.; Liu, T. C.; Hansen, L. G. Estrogenic and Antiestrogenic Actions of PCBs in the Female Rat—In Vitro and In Vivo Studies. *Reprod. Toxicol.* **1993**, *7*, 237–248.
- Cooke, P. S.; Zhao, Y. D.; Hansen, L. G. Neonatal Polychlorinated Biphenyl Treatment Increases Adult Testis Size and Sperm Production in the Rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* **1996**, *136*, 112–117.
- Stoekli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. Imaging Mass Spectrometry: A New Technology for the Analysis of Protein Expression in Mammalian Tissues. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493–496.
- Guerquin-Kern, J. L.; Wu, T. D.; Quintana, C.; Croisy, A. Progress in Analytical Imaging of the Cell by Dynamic Secondary Ion Mass Spectrometry (SIMS microscopy). *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1724*, 228–238.
- Pacholski, M. L.; Winograd, N. Imaging with Mass Spectrometry. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2977–3005.
- Davies, N.; Weibel, D. E.; Blenkinsopp, P.; Lockyer, N.; Hill, R.; Vickerman, J. C. Development and Experimental Application of a Gold Liquid Metal Ion Source. *Appl. Surf. Sci.* **2003**, *203*, 223–227.
- Touboul, D.; Halgand, F.; Brunelle, A.; Kersting, R.; Tallarek, E.; Hagenhoff, B.; Laprévotte, O. Tissue Molecular Ion Imaging by Gold Cluster Ion Bombardment. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1550–1559.
- Sjövall, P.; Lausmaa, J.; Johansson, B. Mass Spectrometric Imaging of Lipids in Brain Tissue. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 4271–4278.
- Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. Improvement of Biological TOF-SIMS Imaging with a Bismuth Cluster Ion source. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1608–1618.
- Weibel, D.; Wong, S.; Lockyer, N.; Blenkinsopp, P.; Hill, R.; Vickerman, J. C. A C60 Primary Ion Beam System for Time of Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Its Development and Secondary Ion Yield Characteristics. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1754–1764.
- Brunelle, A.; Laprévotte, O. Recent Advances in Biological Tissue Imaging with Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry: Polyatomic Ion Sources, Sample Preparation, and Applications. *Curr. Pharm. Design* **2007**, *13*, 3335–3343.
- Brunelle, A.; Laprévotte, O. Lipid Imaging with Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 31–35.
- Touboul, D.; Roy, S.; Germain, D. P.; Chaminade, P.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. MALDI-TOF and Cluster-TOF-SIMS Imaging of Fabry Disease Biomarkers. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 158–165.
- Mas, S.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Aragoncillo, P.; Egidio, J.; Laprévotte, O.; Vivanco, F. Lipid Cartography of Atherosclerotic Plaque by Cluster-TOF-SIMS Imaging. *Analyst* **2007**, *132*, 24–26.
- Tahallah, N.; Brunelle, A.; De La Porte, S.; Laprévotte, O. Lipid Mapping in Human Dystrophic Muscle by Cluster-Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging. *J. Lipid Res.* **2008**, *49*, 438–454.
- Debois, D.; Bralet, M. P.; Le Naour, F.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. In Situ Lipidomic Analysis of Nonalcoholic Fatty Liver by Cluster TOF-SIMS Imaging. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 2823–2831.
- Seyer, A.; Einhorn, J.; Brunelle, A.; Laprévotte, O. Localization of Flavonoids in Seeds by Cluster Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry Imaging. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2326–2333.
- Nygren, H.; Börner, K.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Månsson, J. E. Localization of Cholesterol, Phosphocholine, and Galactosylceramide in Rat Cerebellar Cortex with Imaging TOF-SIMS Equipped with a Bismuth Cluster Ion Source. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1737*, 102–110.
- Börner, K.; Nygren, H.; Hagenhoff, B.; Malmberg, P.; Tallarek, E.; Månsson, J. E. Distribution of Cholesterol and Galactosylceramide in Rat Cerebellar White Matter. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1761*, 335–344.
- Malmberg, P.; Börner, K.; Chen, Y.; Friberg, P.; Hagenhoff, B.; Månsson, J. E.; Nygren, H. Localization of Lipids in the Aortic Wall with Imaging TOF-SIMS. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 185–195.
- Pernber, Z.; Richter, K.; Månsson, J. E.; Nygren, H. Sulfatide with Different Fatty Acids Has Unique Distributions in Cerebellum as Imaged by Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS). *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1771*, 202–209.
- Nygren, H.; Malmberg, P. High Resolution Imaging by Organic Secondary Ion Mass Spectrometry. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 499–504.

44. Vickerman, J. C. TOF-SIMS—an Overview. In *TOF-SIMS-Surface Analysis by Mass Spectrometry*; Vickerman, J. C., Briggs, D., Eds.; Surface Spectra and IM Publications: Manchester and Chichester, 2001; p.1–40.
45. Sodhi, R. N. S. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS): Versatility in Chemical and Imaging Surface Analysis. *Analyst* **2004**, *129*, 483–487.
46. Ross, P.; De Swart, R.; Addison, R.; Van Loveren, H.; Vos, J.; Osterhaus, A. Contaminant-Induced Immunotoxicity in Harbor Seals: Wildlife at Risk? *Toxicology* **1996**, *112*, 157–169.
47. Ross, P. S.; de Swart, R. L.; van der Vliet, H.; Willemsen, L.; de Klerk, A.; van Amerongen, G.; Groen, J.; Brouwer, A.; Schipholt, I.; Morse, D. C.; van Loveren, H.; Osterhaus, A. D. M. E.; Vos, J. G. Impaired Cellular Immune Response in Rats Exposed Perinatally to Baltic Sea Herring Oil or 2,3,7,8-TCDD. *Arch. Toxicol.* **1997**, *71*, 563–574.
48. Yuan, W.; Wang, X. N.; Greenwald, G. S. Follicle-Stimulating-Hormone, Human Chorionic-Gonadotropin, and Prolactin Receptors in Hamster Corpora Lutea or Dispersed Luteal Cells During Pregnancy. *Biol. Reprod.* **1995**, *52*, 313–319.
49. Bredhult, C.; Bäcklin, B. M.; Olovsson, M. Effects of Some Endocrine Disruptors on the Proliferation and Viability of Human Endometrial Endothelial Cells In Vitro. *Reprod. Toxicol.* **2007**, *23*, 550–559.

Annexe 4

Brulet^{*}, M.; Seyer^{*}, A.; Edelman A.; Brunelle, A.; Laprévotte, O.
Lipid mapping of colonic mucosa by cluster TOF-SIMS imaging and multivariate analysis
in cfr knockout mice.

J. Lipid Res. accepté juillet 2010, doi: 10.1194/jlr.M008870.

^{*} *Ces deux auteurs ont autant contribué à ce travail.*

Lipid mapping of colonic mucosa by cluster TOF-SIMS imaging and multivariate analysis in *cftr* knockout mice

Marc Brulet^{1§}, Alexandre Seyer^{1§}, Aleksander Edelman², Alain Brunelle¹, Janine Fritsch²,
Mario Ollero^{1,2*}, Olivier Lapr v te^{1,3}

¹ Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France

² Inserm, U845, Faculté de Médecine Paris Descartes, Paris, France

³ Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, 4, avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

§Contributed equally to the work.

*Corresponding author: Mario Ollero. Address: Institut de Chimie des Substances Naturelles. CNRS, Avenue de la Terrasse. F-91198 Gif-sur-Yvette, France. Phone: +33 1 69 82 45 88. Fax : +33 1 69 07 72 47. E-mail : mario.ollero@icsn.cnrs-gif.fr

Running title: Lipid imaging of cystic fibrosis mouse colon

Abbreviations:

CF: cystic fibrosis; CFTR: cystic fibrosis transmembrane regulator; CS: cholesteryl sulfate; FA: fatty acid; LG: Lieberkühn glands; PC: phosphatidylcholine; PC1-4: principal component 1 to 4; PCA: principal component analysis; PE:

phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol; TOF-SIMS: secondary-ion mass spectrometry; SM: sphingomyelin; ST: sulfatides; TOF: time of flight; vE: vitamin E.

Abstract

The *cftr* knockout mouse model of cystic fibrosis (CF) shows intestinal obstruction, malabsorption and inflammation, and a fatty acid imbalance in intestinal mucosa. We performed a lipid mapping of colon sections from CF and control (WT) mice, by cluster TOF-SIMS imaging, to localize lipid alterations. Data were processed either manually or by multivariate statistical methods. TOF-SIMS analysis showed a particular localization for cholesteryl sulfate at the epithelial border, C16:1 fatty acid in Lieberkühn glands, and C18:0 fatty acid in *lamina propria* and submucosa. Significant increases in vitamin E and C16:0 fatty acid in the epithelial border of CF colon were detected. Principal component analysis and partitioning clustering allowed to characterize different structural regions of colonic mucosa according to variations in C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2, C20:3, C20:4 and C22:6 fatty acids, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and phosphatidylinositol glycerolipids, cholesterol, vitamin E and cholesteryl sulfate. Principal component analysis on spectra from Lieberkühn glands led to separation of CF and WT individuals. This study shows for the first time the spatial distribution of lipids in colonic mucosa, suggesting TOF-SIMS plus multivariate analyses as a powerful tool to investigate disease-related tissue spatial lipid signatures.

Supplementary key words: imaging, mass spectrometry, K-mean, partitioning clustering, principal component analysis.

Introduction

The morphology of colonic mucosa can be a crucial parameter in the characterization of diverse diseases, ranging from cancer, Crohns disease, inflammatory bowel disease, diverticular disease, microscopic colitis, to cystic fibrosis, and a checkpoint in the evaluation of potential therapies. Cystic fibrosis (CF), an autosomal recessive inherited disorder due to mutations in the *CFTR* gene (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), is characterized, among other symptoms, by meconium ileus as one of the earliest manifestations, distal intestinal obstruction in adults (1), accompanied by abnormal absorption and assimilation of nutrients (2), and chronic intestinal inflammation (3, 4). *CFTR* is mainly expressed in colonic crypts and largely contributes to Cl^- and fluid secretion in this section of the intestine (5). Among the different CF animal models developed, the exon 10-knockout represents a particularly useful model to address the gastrointestinal aspects of the disease. CF mice show mucus accumulation in intestinal crypts and subsequent lethal obstruction (6), as well as increased inflammation markers (7). Yet, the pathogenesis of these conditions is not clear. The functions of *CFTR*, a chloride channel, in the intestine include fluid secretion and pH regulation, by modulation of Cl^- , Na^+ and bicarbonate transport through the epithelium (8). However, these two functions are not sufficient to explain all the pathologic manifestations associated with CF.

Another aspect that is hardly explained as a consequence of *CFTR* dysfunction is the presence of alterations in the metabolism, as well as in the blood and tissue content of certain lipids (9). This concerns polyunsaturated fatty acids (10, 11), phospholipids (12,

13), sphingolipids (14, 15) and cholesterol (16). Nevertheless, these findings have been addressed by biochemical methods on total tissue homogenates or by chemical imaging of lipid analogues in cell models. As a consequence, little is known about the local distribution in tissue of such lipid alterations in CF.

The advent of mass spectrometry-based imaging techniques, namely MALDI and TOF-SIMS, has opened new perspectives in the combination of morphological analysis and molecule localization. Their particular suitability for the analysis of small molecules opens up the possibility of targeting lipids in the search for mechanistic insights leading to the discovery of therapeutic approaches or biomarkers by these techniques. TOF-SIMS was first developed in the 1960s for surface analysis (17, 18). This technology consists of the bombardment of the sample by a beam of mono- or polyatomic ions, which induces desorption/ionization of secondary ions from the sample surface. Polyatomic ion beams have been used successfully in the analysis of organic surfaces with a resolution of some hundreds of nanometers (19-24), which makes the technology particularly fit for the analysis of tissue sections (19, 22, 25-32). Conversely, MALDI uses a matrix to allow soft desorption/ionization of intact compounds, upon laser absorption, and is also adapted to imaging analysis, but at a spatial resolution limited to $\sim 50 \mu\text{m}$ with the current state-of-the-art.

The approach of mass spectrometry imaging (MSI) is usually based on univariate analysis of ion images. This represents a limitation in global studies where there are no particular targeted molecules. Multivariate approaches, like principal component analysis (PCA), allow to distinguish spatial structures and to establish correlations between tissue molecules (33-35). In this study, we have performed a thorough analysis of mouse

colonic mucosa by TOF-SIMS imaging in tissue samples from CF and wild-type (WT) mice, and we have processed the data by PCA and other multivariate approaches. We have established the spatial distribution and the co-variation of lipids of interest in the tissue. We have also evaluated potential differences in lipid content and distribution between both groups of animals, which can be attributed to the presence or absence of functional CFTR. The results obtained represent the first lipid mapping of colon mucosa, as well as the first lipid imaging study in the context of CF, and establish a starting point for future analyses on those pathologies that target colon.

Materials and Methods

Biological material and sample processing

Wild-type (WT) and Cftr-exon 10-knockout (CF) C57BL/6J mice were obtained from the “Centre de Distribution, de Typage et d’Archivage Animal” (Orléans, France). After weaning, mice were fed a standard laboratory diet and water. Experiments were performed on 8-12 week-old mice, in conformity with the Public Health Service (PHS) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals, and in accordance with Necker Faculty of Medicine Animal Care and Use Committee (Paris Descartes University). Animals were sacrificed by cervical dislocation. Colon was harvested, washed in phosphate buffer saline, and snap frozen in liquid nitrogen. Serial transversal sections (10 μm thick) were cut at -20°C with a CM3050-S cryostat (Leica Microsystems SA, Nanterre, France) and immediately deposited on either 2 in diameter polished silicon wafers (ACM, Villiers-Saint-Frédéric, France) for TOF-SIMS experiments. Samples were dried under vacuum, at a pressure of a few hectopascals for 10 min before analysis. Optical images were recorded with an Olympus BX51 microscope (Rungis, France) equipped with $\times 1.25$ to $\times 50$ lenses and a Color View I camera, monitored by Cell^B software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany). Adjacent tissue sections were stained by hematoxylin-eosin and used as morphology controls. Thirteen sections of mouse colon were used for the different analyses, 6 corresponding to 3 WT and 7 to 3 CF mice.

TOF-SIMS imaging

A standard commercial ToF-SIMS IV (Ion-Tof GmbH, Münster, Germany) reflectron-type TOF mass spectrometer was used for mass spectrometry imaging (MSI) experiments. The primary ion source was a bismuth liquid metal ion gun. Bi_3^+ cluster ions were selected. The ion column focusing mode ensured both a 1-2 μm beam focus and short pulse duration of less than 1 ns. Such short pulses are a prerequisite for high mass resolution, accurate mass measurements and structure assignments. Because of the very low initial kinetic energy distribution of the secondary ions, the relationship between the time-of-flight and the square root of the mass-to-charge ratio (m/z) of secondary ions is always linear over the whole mass range. The mass calibration was always internal and signals used for initial calibration were those of C^- , CH^- , C_2^- , C_2H^- for the negative ion mode. Signals of fatty acid carboxylate ions and deprotonated vitamin E were used for the calibration refinement. Structure attributions or assignments of ion peaks were made according to the instrument resolution ($M/\Delta M=10^4$, full width half maximum [FWHM], at m/z 500), accuracy and the valence rule. Moreover, mass spectra of reference compounds have been recorded and compared to spectra recorded “*in situ*” to confirm the assignments. Finally, the biological relevance of the attribution was also taken into account and many mass assignments were also confirmed or at least reinforced with the help of the literature (20-22, 31, 32, 36-39).

Images were recorded with a field of view of $500 \times 500 \mu\text{m}^2$ and 256×256 pixels, giving a pixel size of $2 \times 2 \mu\text{m}^2$. A color scale bar, for which the amplitude and ion counts, are given for each image, is placed to the right of the ion images. The data acquisition and processing softwares were IonSpec and IonImage (Ion-Tof GmbH, Münster, Germany).

Negative ion mode images were successively recorded for each selected area. All the images were recorded with a primary ion fluence (also called primary ion dose density) of 2×10^{12} ions.cm⁻², an ion rate higher than in our usual imaging experiments, but still below the so-called static-SIMS limit, ensuring little sample damage and the maximum of intact secondary ion emission (40). A low-energy electron flood gun was activated to neutralize the surface during the analysis (41).

Multivariate analysis

The classical approach in mass spectrometry-based imaging consists of univariate analyses. This type of approach presents its limitations in those studies where there is not an *a priori* molecular target or in the absence of a known disease marker. The alternative strategy is the use of multivariate analyses, where the effects of more than one statistical variable on the parameter of interest are simultaneously analyzed. Our study was based on two main multivariate techniques, namely Principal Component Analysis (PCA) and Partitioning Clustering.

PCA explores the links between variables and similarities between individuals. It is defined as an orthogonal linear transformation of data to a new coordinate system. The new axes are defined by the eigenvectors of the variance-covariance matrix. Each axis is associated with a linear form explaining the variability of the new axis and a variable containing the coordinates corresponding to the projections of individuals on the axis called 'principal component' (PC). PCA is a powerful technique to explore large sets of data and to reduce their dimensions. In the present study, the main source of variability

within an image is due to chemical compositions of the different parts of the tissue, while between images it corresponds to the WT or CF mouse genotype,

Clustering analyses assign each individual to a subclass called 'cluster', such that all individuals contained in a subclass present a degree of similarity. These are unsupervised learning processes based on the calculation of inertia between individuals of the dataset. Inertia is a generalized measure of the variance in the system. The total inertia is equal to the sum of the intra-class inertia and inter-class inertia. Intra-class inertia is the amount of inertia of the separate clusters and inter-class inertia is the amount of inertia between clusters. The latter can be seen as a measure of the difference between classes. Therefore, the goal of clustering is to maximize inter-class inertia to obtain the most distinct classes possible. The two types of clustering used in the study are partitioning clustering, to regroup pixels in clusters defining biochemical zones, and hierarchical clustering, to classify mice by their spectral similarities.

In addition, we used genetic algorithms, which can serve as an early step in data analysis. This is a supervised learning method that selects a small number of highly predictive variables, in the present case to discriminate WT and CF mice.

Multivariate analyses were carried out on TOF-SIMS-MSI data using Solo+MIA, the stand-alone versions of PLS_Toolbox and MIA_Toolbox (www.eigenvector.com, Eigenvector Research, Wenatchee, WA) for Matlab (The MathWorks Inc., Natick, MA).

Two kinds of data sets were analyzed, the first one corresponding to TOF-SIMS images to characterize different structural regions, the second one corresponding to concatenated areas of TOF-SIMS spectra to differentiate CF and WT individuals. Both data sets needed a different preprocessing step.

TOF-SIMS image data sets came from colon sections of CF mice. Data acquisition was performed using the IonImage software in order to generate images from peaks of interest. Import of images to Solo+MIA software was made in binary format. Regions of interest (ROI) were defined manually with the lasso tool. The areas corresponding to the lumen of colon were excluded (56546 out of 65536 pixels were included in the example shown, which represents about 86.3% of total area). The preprocessing step consisted of centering, scaling and normalizing using the Euclidian distance. This last step allowed in this case a better discrimination of the distinctive histochemical features. *In fine*, 15 variables comprised in the m/z range 100-900 were selected for PCA and Partitioning Clustering (Table 1, see images in Figure S1). They were chosen according to ions of interest cited in the literature (10, 12, 13) and possessing a distinct spatial distribution as well as a reasonable intensity.

The TOF-SIMS-spectra data set came from 13 colon sections of 3 WT and 3 CF mice. Data acquisition for each region of interest (ROI) spectra was performed using the IonSpec software (Fig. S1). All 13 ROI spectra were generated according to the distribution of the m/z 253.24 ion (carboxylate ion of palmitoleic acid C16:1n-7), which delineates the glands of Lieberkühn (Fig. 1). All spectra were further normalized according to the number of pixels of each ROI spectra. Areas were computed for 12 ions of interest, corresponding to the same as in the image data set (Table 1) excluding carboxylate ions C14:0 (m/z 227.22), C20:3 (m/z 305.26) and C22:6 (m/z 327.15). The data set was also centered and rescaled prior to PCA.

Principal Component Analysis

PCA was applied to TOF-SIMS image data sets from colon sections after preprocessing. Score plots show the values for each pixel on the associated principal component (PC) axis. The false color scale indicates the level of contribution of each pixel to the axis. Those pixels corresponding to the same histochemical structure (*i.e.* those showing similar mass spectra), are expected to have a similar contribution to the different PC, and appear with the same color. Loading plots show the positive and negative correlations of each original variable with the respective PC. In the end, it is the co-evolution of the original variables what explains the discrimination of pixels on PC.

PCA was also applied to TOF-SIMS spectra data sets after preprocessing. Biplots synthesize the information by superimposing the samples (*i.e.* the spectra) and the original variables (*i.e.* the selected ion peaks) on a common space. Here we used the PC1-PC2 factorial plane. This graph allows to visualize the affinities between the different spectra (representing each individual mouse) and to explain the correlation between the original variables and the PC.

Partitioning clustering

Partitioning clustering was performed by the K-means algorithm on the TOF-SIMS image data set after preprocessing, which assigns each point to the nearest cluster, represented by its barycenter. The K-means algorithm requires as input the determination of a number of wished 'k' clusters. The algorithm classifies each pixel into one of these 'k' classes, by minimizing the sum of distances from their respective centers, or by maximizing interclass distance, ultimately leading to the most distinct clusters possible.

Hierarchical clustering

The TOF-SIMS spectra data set, after preprocessing, was subjected to hierarchical clustering analysis using the Euclidean metric as the distance metric and Ward's criterion as the agglomerative criterion. By hierarchical clustering a hierarchy of clusters is created and represented by a structure reminding the shape of a tree that is also called 'dendrogram'. The trunk of the tree corresponds to the cluster regrouping the totality of individuals (*i.e.* mice) and the leaves to the unique individuals. This graph enables to visualize the similarity between two individuals and/or clusters as a function of the number of branches separating them from a common junction. By cutting off the dendrogram at a specific level, the data set can be characterized by the corresponding number of classes.

Genetic Algorithm (GA) analysis

GA analysis is a supervised learning method, allowing the selection of a small number of highly predictive variables among an initial list of variables. In the present case, the initial list of variables was chosen according to known m/z values of ions and fragments. GA analysis was performed on TOF-SIMS spectra of ROI corresponding to Lieberkühn glands. Spectra preprocessing is detailed above. From the different random combinations of variables tested by the algorithm, the one which provided the best discrimination between the two classes of mice was chosen. The selected ions were reexamined and validated according to their intensity and spatial distribution characteristics. The final list of ions (Table 2) was subsequently subjected to a PCA and a hierarchical clustering analysis.

Results

Lipid mapping of mouse colon by univariate analysis

Colon sections from 3 WT and 3 CF mice were analyzed by TOF-SIMS in the negative ion mode. Figure 1 shows images corresponding to the spatial localization of fatty acid carboxylate ions C16:1 (m/z 253.20, Fig. 1A and 1I), C18:0 (m/z 283.27, Fig. 1C and 1K), and C18:2 (m/z 279.24, Fig. 1B and 1J), vitamin E (vE, m/z 429.37, Fig. 1D and 1L), cholesteryl sulfate (CS, m/z 465.32, Fig. 1E and 1M), and the sulfatide and/or phosphoinositol fragment (m/z 259.05, Fig. 1F and 1N) from WT and CF mice (see also the animated image, Fig. S2). It must be noted that the detected fatty acid carboxylate ions correspond to both free fatty acids and acyl fragments from more complex molecules. Some ion signatures are characteristic of the *lamina propria* and submucosa (C18:0), of Lieberkühn glands (LG) (C16:0), and of the epithelial border (CS, C18:2). This distribution in three regions is illustrated by the merged 3-color image (Figure 1H and 1P). The distribution of ions corresponding to cholesterol (not shown) and vE is mostly uniform. Arachidonic acid (AA, C20:4, m/z 303.26) was localized to submucosa, *lamina propria* and border, while its fatty acid precursor (C20:3, m/z 305.26) was mainly present in LG, in both WT and CF sections (Fig. S3, S4 and S5). Although some minor differences in spatial localization were observed between WT and CF colon, they were not consistently present in all individuals. In addition, no significant differences were observed between total spectra from WT and CF mice.

Lipid mapping by Principal Component Analysis (PCA) on a TOF-SIMS image

The main objective of PCA applied to mass spectrometry imaging data is to identify underlying structures in the (X,Y) space by their spectral similarity, to identify correlations between ions characterizing the main structures, and ultimately to discriminate different structural areas biologically relevant in the tissue based on their mass spectral fingerprint. For this study we selected the first four principal components. PC1 accounts for 20.90%, while PC2, PC3 and PC4 capture respectively 14.16, 9.89 and 7.45% of total inertia (which represent the relative amount of information captured by each principal component). Their respective spatial distributions are shown in Figure 2, where each panel shows both the score (left) and loading (right) plot for each principal component. From the score plot it can be inferred that PC1 delineates a structure consistent with the morphology and spanning of Lieberkühn glands (red to yellow), discriminating in a general way the mucosa from the epithelial edge (blue pixels) (Fig. 2A). Dark blue pixels correspond to those removed from the analysis. The loading plot indicates the contribution of each ion to PC1 (Fig. 2E). In fact, the co-evolution of the increased concentration of C14:0, C16:1 and C16:0 with respect to the decreased concentration of CS and C18:0 is responsible for this discrimination. As shown in the corresponding score plot (Fig. 2B), PC2 delineates a structure consistent with the apical part of Lieberkühn glands, as well as some border elements (red to yellow), in contrast with *lamina propria* and submucosa (blue). This is due to increased amounts of phosphoethanolamine (fragment of PE), an ion detected at m/z 259 and attributed as a fragment of either PI or as a sulfated lipid (sulfatide, ST), C18:1 in combination with decreased levels of phosphocholine (fragment of PC and/or SM), as shown in the loading plot (Fig. 2F). PC3 is consistent with the localization of *lamina propria*, border and

submucosa (red to yellow pixels on Fig. 2C), mainly due to increased C20:4, C18:0, phosphocholine (fragment of PC and/or SM), vE, C18:1, C18:2 and C16:0, and decreased ST or PI fragment, as shown by the loading plot (Fig. 2G). PC4 is mostly localized at the epithelial edge, the *lamina propria* and submucosal structures (red to yellow pixels), with a contribution of increased cholesterol, C22:6 and phosphoethanolamine (fragment of PE) concomitant with a decrease in CS and C18:2 (Fig. 2D and 2H). However, the interpretation of the score plot becomes more and more subjective for the later principal components.

Another way of visualizing the results is to represent the pixels in the space of scores, to evaluate the differences between groups of pixels and to define specific biological structures as a function of their spectral similarity. Figure 3 synthesizes the information contained in the principal plane PC1-PC2, represented in the center, where pixels are defined by their coordinates on the PC1 and PC2 axes. The color scale indicates the density of pixels having similarities in their spectra. This plane contains 35.06% of total inertia and embodies three major regions of pixels grouped in clusters (Areas 1, 2 and 3), mainly discriminated by PC1. As seen in Figure 3, the left cluster (Area 1) is constituted of pixels of the epithelium border region. This cluster covers 5142 pixels, which represents approximately 9.1% of the total tissue area. The epithelium border is characterized by an increased amount of CS, C18:0 and C18:2, and decreased amounts of C14:0, C16:0 and C16:1 fatty acids compared to the rest of the tissue. The right cluster (Area 2) contains mainly pixels of Lieberkühn glands. This cluster covers 12788 pixels which represents approximately 22.6% of the total tissue area. Lieberkühn glands (LG) are characterized by increased C14:0, C16:0 and C16:1 amounts, and

decreased CS and C18:0 amounts, compared to the rest of the tissue. This nearly reverse lipid fingerprint, with respect to Area 1, is due to the fact that the PC1 is the main discriminating axis that separates LG from the epithelium border pixel cluster, as it can be seen on the PC1-PC2 score plane (image in the center of Figure 3). The bottom cluster (Area 3) is mainly generated by pixels from the submucosa and some from the *lamina propria*. This cluster covers 5695 pixels, accounting approximately for 10.1% of total tissue area. This cluster is mainly carried out by the PC2 on the negative value area. The submucosa is characterized by increased phosphocholine and decreased phosphoethanolamine, ST or PI fragment and C18:1 content, as compared to the rest of the tissue. The last area (Area 4) is characterized by a rather vague contour, when compared to the three other areas. It is located between Areas 2 and 3 and it corresponds to the *lamina propria*. This cluster covers 1895 pixels, which represents approximately 3.4% of total area, and is characterized by increased phosphocholine and C16:0 content, as well as decreased CS, C18:2 and C18:1 fatty acids, phosphoethanolamine and ST or PI fragment amounts.

A three color overlay of the first three principal components provides a better contrast between the different histochemical areas according to their spectral profiles (Fig. 4). The color of pixels is determined by their contribution score on each principal component (red for PC1, green for PC2 and blue for PC3). All different histochemical sub-structures can be distinguished: *lamina propria* and submucosa are colored in blue-magenta, indicating that these two regions are primarily defined by a positive contribution of PC3 and some PC1; the border is divided into two regions: a light blue layer in contact with the epithelium, characterized by a positive contribution PC2 and

PC3; and a green area in contact with the lumen, probably due to secreted mucus and characterized by a positive contribution of PC2; Lieberkühn glands are mainly yellow colored, indicating major contributions of PC1 and PC2. Some color variation can be observed from yellow-green and yellow-red, characterizing the proximal and distal part of LG, respectively. Finally, some dark-green pixels located inside the glands suggest a contribution of PC2 and PC3, which could be interpreted as the presence of secreted mucus.

Lipid mapping by Partitioning Clustering on a TOF-SIMS image

In the partitioning clustering study the K-mean algorithm was used on the same variables as those for PCA (Table 1). The result is shown in Figure 5, as a palette of images representing the partitioning into 2, 3, 4 and 5 clusters respectively. The dark blue area corresponds to pixels of the colon lumen, which were excluded from the analysis. The 2-class clustering (Fig. 5A) distinguishes the Lieberkühn glands (brown) from the rest of structures (green). The 3-class (Fig. 5B) separates border (light blue), LG (brown), from *lamina propria* and submucosa (yellow-red). The 4-class (Fig. 5C) discriminates the apical part of LG (brown) from the rest of the gland (orange), the *lamina propria* submucosa (green) and the epithelial border (light blue). The 5-class clustering (Fig. 5D) results in the discrimination of a brown area corresponding to the external part contiguous to the lumen, a middle-blue area corresponding to the epithelial border, a green-blue surface corresponding to the *lamina propria* and submucosa, and finally the LG in two clusters, orange and yellow for the distal and proximal part, respectively. This analysis confirms the results obtained by PCA.

Differences between CF and WT mice are revealed by TOF-SIMS

A semi-quantitative analysis of potential differences in lipid content between CF and WT was performed by selecting several ROI from each tissue section and comparing their associated spectra. These regions correspond to the epithelial border, the crypts and the *lamina propria*, according to the localization of CS, C16:1 and C18:0, respectively. The corrected area for each peak of interest was divided by the number of pixels accounting for each ROI. The C16:0 amount was significantly increased (by 23%) in the border of CF vs WT mice, while the vE amount was significantly increased in CF both in the border (by 52%) and in the *lamina propria* (by 52%). The rest of peaks presented no significant differences between the two mouse types.

Discrimination of CF and WT mice by PCA on TOF-SIMS spectra from LG region

In order to establish a comparison between WT and CF tissues, spectra from selected ROI corresponding to LG from the 13 sections were analyzed by PCA. The choice of this ROI is due to the fact that CFTR is mostly expressed in this area. The ions listed in Table 1 were subjected to PCA analysis. PC1 and PC2, which carry the greatest variance among the 13 sections, account for 41.49% and 20.91% of total inertia, respectively. The three main PC accumulate 81.65% of total inertia. Assuming that the greatest source of variability between mice corresponds to CFTR expression, this feature is expected to be the main contributor to the potential discrimination between the two classes of mice, and should be expressed in the first two PC. The biplot shown in Figure 6 synthesizes the results by superimposing the individuals and the original variables

(selected ions) on a common space representing the principal plane built from PC1 and PC2, where WT individuals are represented in green and CF in red. Both classes of mice seem to be separated by the first principal component, even though the separation is not very distinct. The main contribution to the separation is due to an increase in CF mice of the amounts of CS, C16:1, C16:0, phosphoethanolamine, phosphoinositol (PI fragment) or ST, phosphocholine, and to a lesser extent cholesterol and vE, accompanied by a decrease in C18:2.

In addition PCA and hierarchical clustering were carried out on the 12 ions listed in Table 2. This list was produced by GA analysis providing the best combinations of variables discriminating WT and CF mice. The PC1-PC2 biplot (Fig. 7A) shows a perfect separation between CF and WT based on the first principal component. These results indicate that CF mice are characterized by increased amounts of C14:0 and C16:0 carboxylate ions (m/z 227.22 and 255.25, respectively), vE ion fragment (m/z 429.40), and ion fragments (m/z 109.99 and 168.07) of different phospholipids (PE, PC and SM) in LG with respect to WT mice. Hierarchical clustering analysis (Fig. 7B) provided a very satisfactory separation between WT and CF mice present at the first branching. Similarly, different sections from the same mice are paired, indicating that the analysis is reproducible within the same individual.

Discussion

In the present work we combined a mass spectrometry-based lipid imaging method with several multivariate statistical analyses to provide a detailed mapping of lipids in the mouse colon and to establish potential differences in lipid content and distribution between WT and CF mice. As a result, we found a distinct lipid pattern that characterizes the different histological structures of colonic mucosa, some of them attributable to the differentiation state of intestinal epithelial cells. In addition, slight differences between CF and WT mice in fatty acids, vE and several phospholipid fragments have been recurrently shown by both univariate and multivariate approaches.

Nevertheless, the results presented in this manuscript cannot be assumed in terms of absolute quantitative data. It must be noted that cluster TOF-SIMS does not allow an absolute quantification. As an imaging technique, only the relative quantification of an individual ion on a surface can be provided. In addition, quantitative comparison between different ions is only possible if they are physico-chemically close.

Intestinal mucosa is characterized by intense cell differentiation and turnover. In our study, this fact is suggested by the color variations observed in the different parts of the LG (Fig. 4). Differential lipid content of intestinal epithelial cells related to their differentiation status has been reported (42, 43). Activity of fatty acid desaturases (44) and lipid content is also modified in colonic Caco-2 cells (45) as a function of differentiation. These changes can be associated with the development of the mucosal barrier, as well as the permeability and functional properties of the intestinal mucosa. Nevertheless, our technique eliminates the bias due to cell purification and introduces the

analytical accuracy of mass spectrometry. Interestingly, in the case of fatty acid desaturases (44), our results suggest a intense $\Delta 5$ -desaturase activity in *lamina propria*, border and submucosa, according to the presence of AA and absence of its precursor C20:3 (Fig. S2).

To our knowledge, the present study constitutes the first attempt to establish a detailed mapping of the lipid content in colonic mucosa. Our results seem to be in agreement with a recent report based on TOF-SIMS imaging of rat duodenum (46). In this seminal study, strong signals corresponding to C16:0 and to the PI polar head (m/z 241) were found in the Lieberkühn crypt region, whereas C18:2 signal was weak in the crypt and strong in the villus, C18:1 was predominant in villi and C18:0 was ubiquitous (46). In our study, C18:2, an essential fatty acid, was mainly found in the epithelial border (Fig. 1B, 1J and S6). Even though most of the nutrient absorption takes place at the jejunum, the presence of an essential fatty acid, *i.e.* exogenous, in this area may denote an intense absorptive activity. In fact, medium chain fatty acids, and in particular C18, have been reported to be readily absorbed in the colon (47). The authors suggest that this could compensate for alterations in fatty acid absorption in the small intestine. It has also been demonstrated that the mucin present in the lumen of the digestive tract is able to bind fatty acids, and that these could act as a shield against oxygen radicals (48, 49). It must be noted that in our study C20:4 (Fig. S3, S4 and S5) also presented this type of distribution. This result is consistent with a previous report indicating higher n-6 polyunsaturated fatty acid content in differentiated vs. non-differentiated CaCo-2 cells (45). A more intense biosynthetic activity of differentiated border cells could account in part for this particular distribution.

A remarkable finding in our study is the partial colocalization of C18:2 and CS at the epithelial border (Fig. 1B, J, E, and M, and Fig. S7). CS is known to be present in the intestinal epithelium of different animal species (50). It has also been shown, along with other sulfated lipids, to inhibit pancreatic trypsin, chymotrypsin (51) and elastase (50), in a mechanism aimed at protecting the epithelium against the enzyme-rich environment that characterizes the intestinal lumen. However, this is the first time, to our knowledge, that the precise localization of CS at the colon epithelial border is reported.

Particularly surprising was the distribution of the ion at m/z 259 (Fig. 1F and N, and Fig. S8), with localized clusters, not spatially correlated with any other ion or tissue structure. This ion could correspond to either the PI polar head – phosphoinositol- or to a sulfatide (ST) ion, or to both. The fact that it colocalizes with the sulfate ion (m/z 79.96, not shown) favors the second option. STs are a class of sulfated galactocerebrosides, which are characteristic of the peripheral nervous system, but are also present in other tissues. However, little is known about their presence and function in the intestine, apart from participating in specialized microdomains involved in the apical trafficking in polarized cultured enterocytes (52). This does not discard the contribution of phosphoinositol to the particular distribution of this ion. In fact, phosphatidylinositol kinase plays a pivotal role in the regulation of differentiation, survival and anoikis of enterocytes, colonocytes and goblet cells, associated with the Akt1 signaling pathway (53-58). Therefore, it could be expected that a differential content of phosphoinositides was present, depending on the differentiation status of cells. Techniques like the one described in the present article may help to increase the knowledge on the spatial

distribution and regulation of differentiation, and other important events in intestinal physiology, such as proliferation, apoptosis, anais, and electrolyte transport.

The second main objective of the present study was to establish differences in the lipid content and/or in the lipid spatial distribution between WT and CF mice. The differences found were limited to a slight but significant increase in C16:0 and vE in CF colon border. The former can be consistent with an increased saturation of membranes concomitant with a decrease in the presence of polyunsaturated species, while the latter can be attributed to an increased oxidative stress scenario. In fact, the well documented lipid alterations associated with CF consist, for the most part, of decreased essential and polyunsaturated fatty acid levels in blood (59) and tissues (59, 60) from patients, animal (13, 60) and cell models (61), with a trend towards an imbalance favoring n-6 series biosynthesis (11, 61), as well as decreased choline-containing phospholipids in plasma (12). In the present article, no significant differences were detected in either polyunsaturated acid content or distribution. Firstly, it must be noted that the only reference to date on a fatty acid imbalance in the intestine corresponds to the ileum (60). Secondly, the reported imbalances corresponded to total tissue homogenates, and in our case to restricted regions of interest. It is known that other pathologies affecting the colon also present alterations in fatty acid content. Colonic adenocarcinoma has been associated with increased saturated fatty acid ratios (62). The fatty acid content of Crohn's diseased ileal and colonic mucosa has been characterized (63), showing that inflamed mucosa is characterized by a decrease in C18:2 and C18:3 accompanied by a substantial increase in the highly polyunsaturated fatty acids C20:4n-6, C22:4n-6, and C22:6n-3. Ceramide accumulation and LPC decrease have been reported as a consequence of experimental

colonic inflammation in mouse (64). However, it must be pointed out that inflammation is not the main alteration in the CF knockout mouse model, and similar lipid alterations are not likely to be present.

Concerning vE changes, a deficit in serum vE in CF patients, attributed to intestinal malabsorption, is widely accepted (65, 66). This is believed to contribute to a redox imbalance, and vE supplementation is routinely provided to patients (67). In addition, serum vE content is decreased in pancreatic insufficient patients at the onset of pulmonary exacerbations (68). These results are consistent with a decrease of vE in liver (69). However, to our knowledge the content of this vitamin in intestinal mucosa had not been addressed before. The fact that only the ROI delineating the epithelial border shows this difference points to the hypothesis of a potential deficit in absorption.

Whether the observed differences are indicative of an epithelial dysfunction remains to be demonstrated. It is assumed that the small number of samples can be a limiting factor. In any case, the lack of dramatic differences may also be due to the fact that most of absorptive function happens in the small intestine. Subsequently, the consequences of malabsorption should be less remarkable in the colon. Therefore, in this part of the intestine, it would be expected that any differences found in lipid content and/or distribution would be due for the most part to defective CFTR-related electrolyte transport. In view of this, it could be argued that lipid abnormalities associated with CF are not directly linked to the regulation of electrolyte transport by CFTR, but with other CFTR functions (8).

The main added value of our study is the detailed mapping of lipids obtained by the combined approach of mass spectrometry imaging and multivariate statistical

analysis. The analysis of lipids in colonic mucosa has been seldom addressed, using the classic techniques, consisting mostly of a fatty acid profiling (62, 63). PCA as well as partitioning clustering applied to mass spectrometry imaging data enables to distinguish the different tissue regions according to their histochemical lipid profiles, without resorting to invasive chemicals, such as histological staining (70, 71). In our study, K-mean partitioning into 5 areas (Fig. 5D) is in good agreement with the histochemical structure shown by optical microscopy (Fig. 1G and O), as well as with the overlay image obtained with PC1, PC2 and PC3 (Fig. 4). In our study, PCA differentiated the main histological areas of the colon section and identified the lipid profiles responsible for this distinction. Our results highlight the very heterogeneous distribution of lipids within the tissue, which represents a perfect example of differential lipidome associated with differential function and metabolic state of the cell types present in colon mucosa. This can be attributed to the differentiation status of epithelial cells, in a tissue where the turnover is especially fast. Our data can provide clues about differentiation mechanisms and also a model for other tissues. The differences found between proximal and distal parts of LG present in the 4- and 5-class clusters (Fig. 5C and D), as well as the color shift in the superposed PC1-PC2-PC3 ion images (Fig. 4) can serve as putative markers of cell differentiation.

It is noteworthy that, in spite of the limited number of samples subjected to our study and the slight differences between WT and CF obtained by semi-quantitative univariate analyses, PCA and hierarchical clustering were able to discriminate somehow the two types of mice. This is in accordance with the fact that the main information in a dataset is usually not carried by a single variable, but rather in how each variable changes

comparing to the other variables; in other words, how a subset of lipids co-varies and not how a single lipid is modified. The discriminating set of variables must be considered like a single lipid signature. However, the results reported must be taken cautiously, as some of the variables selected by the genetic algorithm analysis, which allow a better separation (Fig. 7, Table 2), correspond to low abundance fragments of ambiguous origin, as their masses are not specific of a particular lipid class. This reveals ion identification as a crucial step in the interpretation of the results provided by this technique.

Nevertheless, and in spite that the robustness of the performed study needs to be tested in a validation series of experiments, it can be concluded that multivariate approaches, such as PCA, are of particular interest to establish differences between models corresponding to two or more pathological states. The present work can be considered as a proof-of-concept for further tissue analysis in CF, for those pathologies affecting colon and for tissue-scale functional investigations in the intestinal environment.

Acknowledgments

Supported by Agence Nationale de la Recherche grant EICO-CF, European Commission grants NEUPROCF (FP6) and COMPUTIS (LSHG-CT2005-518194), by the associations Vaincre la Mucoviscidose and Mucoviscidose:ABCF, and by Legs Poix-University of Paris 5. The PhD research fellowship of AS is supported by the Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS).

References

1. Littlewood J. M. 1992. Cystic fibrosis: gastrointestinal complications. *Br Med Bull* **48**: 847-59.
2. Mascarenhas M. R. 2003. Treatment of Gastrointestinal Problems in Cystic Fibrosis. *Curr Treat Options Gastroenterol* **6**: 427-441.
3. Raia V., Maiuri L., de Ritis G., de Vizia B., Vacca L., Conte R., Auricchio S., and Londei M. 2000. Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* **47**: 344-50.
4. Smyth R. L., Croft N. M., O'Hea U., Marshall T. G., and Ferguson A. 2000. Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* **82**: 394-9.
5. Brouillard F., Bensalem N., Hinzpeter A., Tondelier D., Trudel S., Gruber A. D., Ollero M., and Edelman A. 2005. Blue native/SDS-PAGE analysis reveals reduced expression of the mClCA3 protein in cystic fibrosis knock-out mice. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1762-75.
6. Eckman E. A., Cotton C. U., Kube D. M., and Davis P. B. 1995. Dietary changes improve survival of CFTR S489X homozygous mutant mouse. *Am J Physiol* **269**: L625-30.
7. Norkina O., Kaur S., Ziemer D., and De Lisle R. C. 2004. Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**: G1032-41.
8. Ollero M., Brouillard F., and Edelman A. 2006. Cystic fibrosis enters the proteomics scene: new answers to old questions. *Proteomics* **6**: 4084-99.
9. Worgall T. S. 2009. Lipid metabolism in cystic fibrosis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **12**: 105-9.
10. Freedman S. D., Blanco P. G., Zaman M. M., Shea J. C., Ollero M., Hopper I. K., Weed D. A., Gelrud A., Regan M. M., Laposata M., Alvarez J. G., and O'Sullivan B. P. 2004. Association of cystic fibrosis with abnormalities in fatty acid metabolism. *N Engl J Med* **350**: 560-9.
11. Ollero M., Laposata M., Zaman M. M., Blanco P. G., Andersson C., Zeind J., Urman Y., Kent G., Alvarez J. G., and Freedman S. D. 2006. Evidence of increased flux to n-6 docosapentaenoic acid in phospholipids of pancreas from *cftr*^{-/-} knockout mice. *Metabolism* **55**: 1192-200.
12. Guerrero I. C., Astarita G., Jais J. P., Sands D., Nowakowska A., Colas J., Sermet-Gaudelus I., Schuerenberg M., Piomelli D., Edelman A., and Ollero M. 2009. A novel lipidomic strategy reveals plasma phospholipid signatures associated with respiratory disease severity in cystic fibrosis patients. *PLoS One* **4**: e7735.
13. Dombrowsky H., Clark G. T., Rau G. A., Bernhard W., and Postle A. D. 2003. Molecular species compositions of lung and pancreas phospholipids in the *cftr*(tm1HGU/tm1HGU) cystic fibrosis mouse. *Pediatr Res* **53**: 447-54.
14. Guilbault C., Wojewodka G., Saeed Z., Hajduch M., Matouk E., De Sanctis J. B., and Radzioch D. 2009. Cystic fibrosis fatty acid imbalance is linked to ceramide deficiency and corrected by fenretinide. *Am J Respir Cell Mol Biol* **41**: 100-6.
15. Teichgraber V., Ulrich M., Endlich N., Riethmuller J., Wilker B., De Oliveira-Munding C. C., van Heeckeren A. M., Barr M. L., von Kurthy G., Schmid K. W., Weller M., Tummler B., Lang F., Grassme H., Doring G., and Gulbins E. 2008.

- Ceramide accumulation mediates inflammation, cell death and infection susceptibility in cystic fibrosis. *Nat Med* **14**: 382-91.
16. White N. M., Jiang D., Burgess J. D., Bederman I. R., Previs S. F., and Kelley T. J. 2007. Altered cholesterol homeostasis in cultured and in vivo models of cystic fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **292**: L476-86.
 17. Benninghoven A., and Loebach E. 1971. Tandem Mass spectrometer for secondary ion studies. *Rev Sci Instrum* **42**: 49-52.
 18. Castaing R., and Slodzian G. J. 1962. Microanalyse par émission ionique secondaire. *J Microscopie* **1**: 395-410.
 19. Benabdellah F., Seyer A., Quinton L., Touboul D., Brunelle A., and Laprévotte O. 2010. Mass spectrometry imaging of rat brain sections: nanomolar sensitivity with MALDI versus nanometer resolution by TOF-SIMS. *Anal Bioanal Chem* **396**: 151-62.
 20. Biddulph G. X., Piwowar A. M., Fletcher J. S., Lockyer N. P., and Vickerman J. C. 2007. Properties of C84 and C24H12 molecular ion sources for routine TOF-SIMS analysis. *Anal Chem* **79**: 7259-66.
 21. Sjövall P., Lausmaa J., and Johansson B. 2004. Mass spectrometric imaging of lipids in brain tissue. *Anal Chem* **76**: 4271-8.
 22. Touboul D., Halgand F., Brunelle A., Kersting R., Tallarek E., Hagenhoff B., and Laprévotte O. 2004. Tissue molecular ion imaging by gold cluster ion bombardment. *Anal Chem* **76**: 1550-9.
 23. Touboul D., Kollmer F., Niehuis E., Brunelle A., and Laprévotte O. 2005. Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source. *J Am Soc Mass Spectrom* **16**: 1608-18.
 24. Weibel D., Wong S., Lockyer N., Blenkinsopp P., Hill R., and Vickerman J. C. 2003. A C60 primary ion beam system for time of flight secondary ion mass spectrometry: its development and secondary ion yield characteristics. *Anal Chem* **75**: 1754-64.
 25. Brunelle A., and Laprévotte O. 2009. Lipid imaging with cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **393**: 31-5.
 26. Brunelle A., and Laprévotte O. 2007. Recent advances in biological tissue imaging with Time-of-flight Secondary Ion Mass Spectrometry: polyatomic ion sources, sample preparation, and applications. *Curr Pharm Des* **13**: 3335-43.
 27. Brunelle A., Touboul D., and Laprévotte O. 2005. Biological tissue imaging with time-of-flight secondary ion mass spectrometry and cluster ion sources. *J Mass Spectrom* **40**: 985-99.
 28. Debois D., Bralet M. P., Le Naour F., Brunelle A., and Laprévotte O. 2009. In situ lipidomic analysis of nonalcoholic fatty liver by cluster TOF-SIMS imaging. *Anal Chem* **81**: 2823-31.
 29. Le Naour F., Bralet M. P., Debois D., Sandt C., Guettier C., Dumas P., Brunelle A., and Laprévotte O. 2009. Chemical imaging on liver steatosis using synchrotron infrared and ToF-SIMS microspectroscopies. *PLoS One* **4**: e7408.
 30. Mas S., Touboul D., Brunelle A., Aragoncillo P., Egido J., Laprévotte O., and Vivanco F. 2007. Lipid cartography of atherosclerotic plaque by cluster-TOF-SIMS imaging. *Analyst* **132**: 24-6.

31. Tahallah N., Brunelle A., De La Porte S., and Laprévotte O. 2008. Lipid mapping in human dystrophic muscle by cluster-time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging. *J Lipid Res* **49**: 438-54.
32. Touboul D., Brunelle A., Halgand F., De La Porte S., and Laprévotte O. 2005. Lipid imaging by gold cluster time-of-flight secondary ion mass spectrometry: application to Duchenne muscular dystrophy. *J Lipid Res* **46**: 1388-95.
33. Trim P. J., Atkinson S. J., Princivalle A. P., Marshall P. S., West A., and Clench M. R. 2008. Matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry imaging of lipids in rat brain tissue with integrated unsupervised and supervised multivariate statistical analysis. *Rapid Commun Mass Spectrom* **22**: 1503-9.
34. Piras F. M., Dettori M. F., and Magnani A. 2009. ToF-SIMS PCA analysis of *Myrtus communis* L. *Appl Surf Sci* **255**.
35. Magnusson Y. K., Friberg P., Malmberg P., and Chen Y. 2008. Application of multivariate analysis of TOF-SIMS spectra for studying the effect of high glucose intake on aortic lipid profile. *Appl Surf Sci* **254**: 6580-6585.
36. Borner K., Nygren H., Hagenhoff B., Malmberg P., Tallarek E., and Mansson J. E. 2006. Distribution of cholesterol and galactosylceramide in rat cerebellar white matter. *Biochim Biophys Acta* **1761**: 335-44.
37. Heim C., Sjövall P., Lausmaa J., Leefmann T., and Thiel V. 2009. Spectral characterisation of eight glycerolipids and their detection in natural samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**: 2741-53.
38. Magnusson Y. K., Friberg P., Sjövall P., Malm J., and Chen Y. 2008. TOF-SIMS analysis of lipid accumulation in the skeletal muscle of ob/ob mice. *Obesity (Silver Spring)* **16**: 2745-53.
39. Monroe E. B., Jurchen J. C., Lee J., Rubakhin S. S., and Sweedler J. V. 2005. Vitamin E imaging and localization in the neuronal membrane. *J Am Chem Soc* **127**: 12152-3.
40. Vickerman J. C. 2001. TOF-SIMS: an overview, in *ToF-SIMS: surface analysis by mass spectrometry* (Vickerman J. C., and Briggs D., Eds.), SurfaceSpectra, Manchester. p1.
41. Gilmore I. S., and Seah M. P. 2002. Electron flood gun damage in the analysis of polymers and organics in time-of-flight SIMS. *Appl Surf Sci* **187**: 89-100.
42. Alessandri J. M., Arfi T. S., Thevenoux J., and Leger C. L. 1990. Diet-induced alterations of lipids during cell differentiation in the small intestine of growing rats: effect of an essential fatty acid deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **10**: 504-15.
43. Brasitus T. A., and Dudeja P. K. 1985. Alterations in the physical state and composition of brush border membrane lipids of rat enterocytes during differentiation. *Arch Biochem Biophys* **240**: 483-8.
44. Dias V. C., and Parsons H. G. 1995. Modulation in delta 9, delta 6, and delta 5 fatty acid desaturase activity in the human intestinal CaCo-2 cell line. *J Lipid Res* **36**: 552-63.
45. Jindrichova S., Novakova O., Bryndova J., Tvrzicka E., Lisa V., Novak F., and Pacha J. 2003. Corticosteroid effect on Caco-2 cell lipids depends on cell differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* **87**: 157-65.

46. Richter K., Nygren H., Malmberg P., and Hagenhoff B. 2007. Localization of fatty acids with selective chain length by imaging time-of-flight secondary ion mass spectrometry. *Microsc Res Tech* **70**: 640-7.
47. Jorgensen J. R., Fitch M. D., Mortensen P. B., and Fleming S. E. 2002. Absorption and metabolism of octanoate by the rat colon in vivo: concentration dependency and influence of alternative fuels. *Gut* **51**: 76-81.
48. Gong D. H., Turner B., Bhaskar K. R., and Lamont J. T. 1990. Lipid binding to gastric mucin: protective effect against oxygen radicals. *Am J Physiol* **259**: G681-6.
49. Krause W. J. 2000. Brunner's glands: a structural, histochemical and pathological profile. *Prog Histochem Cytochem* **35**: 259-367.
50. Ito N., Iwamori Y., Hanaoka K., and Iwamori M. 1998. Inhibition of pancreatic elastase by sulfated lipids in the intestinal mucosa. *J Biochem* **123**: 107-14.
51. Iwamori M., Iwamori Y., and Ito N. 1997. Sulfated lipids as inhibitors of pancreatic trypsin and chymotrypsin in epithelium of the mammalian digestive tract. *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 262-5.
52. Delacour D., Gouyer V., Zanetta J. P., Drobecq H., Leteurtre E., Grard G., Moreau-Hannedouche O., Maes E., Pons A., Andre S., Le Bivic A., Gabius H. J., Manninen A., Simons K., and Huet G. 2005. Galectin-4 and sulfatides in apical membrane trafficking in enterocyte-like cells. *J Cell Biol* **169**: 491-501.
53. Bouchard V., Demers M. J., Thibodeau S., Laquerre V., Fujita N., Tsuruo T., Beaulieu J. F., Gauthier R., Vezina A., Villeneuve L., and Vachon P. H. 2007. Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* **212**: 717-28.
54. Dufour G., Demers M. J., Gagne D., Dydensborg A. B., Teller I. C., Bouchard V., Degongre I., Beaulieu J. F., Cheng J. Q., Fujita N., Tsuruo T., Vallee K., and Vachon P. H. 2004. Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* **279**: 44113-22.
55. Durual S., Blanchard C., Estienne M., Jacquier M. F., Cuber J. C., Perrot V., Laboisse C., and Cuber J. C. 2005. Expression of human TFF3 in relation to growth of HT-29 cell subpopulations: involvement of PI3-K but not STAT6. *Differentiation* **73**: 36-44.
56. Laprise P., Chailier P., Houde M., Beaulieu J. F., Boucher M. J., and Rivard N. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**: 8226-34.
57. Li X., Leu S., Cheong A., Zhang H., Baibakov B., Shih C., Birnbaum M. J., and Donowitz M. 2004. Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology* **126**: 122-35.
58. Vachon P. H., Harnois C., Grenier A., Dufour G., Bouchard V., Han J., Landry J., Beaulieu J. F., Vezina A., Dydensborg A. B., Gauthier R., Cote A., Drolet J. F., and Lareau F. 2002. Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* **123**: 1980-91.

59. Farrell P. M., Mischler E. H., Engle M. J., Brown D. J., and Lau S. M. 1985. Fatty acid abnormalities in cystic fibrosis. *Pediatr Res* **19**: 104-9.
60. Freedman S. D., Katz M. H., Parker E. M., Laposata M., Urman M. Y., and Alvarez J. G. 1999. A membrane lipid imbalance plays a role in the phenotypic expression of cystic fibrosis in *cftr(-/-)* mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13995-4000.
61. Andersson C., Al-Turkmani M. R., Savaille J. E., Alturkmani R., Katrangi W., Cluette-Brown J. E., Zaman M. M., Laposata M., and Freedman S. D. 2008. Cell culture models demonstrate that CFTR dysfunction leads to defective fatty acid composition and metabolism. *J Lipid Res* **49**: 1692-700.
62. Rakheja D., Kapur P., Hoang M. P., Roy L. C., and Bennett M. J. 2005. Increased ratio of saturated to unsaturated C18 fatty acids in colonic adenocarcinoma: implications for cryotherapy and lipid raft function. *Med Hypotheses* **65**: 1120-3.
63. Buhner S., Nagel E., Korber J., Vogelsang H., Linn T., and Pichlmayr R. 1994. Ileal and colonic fatty acid profiles in patients with active Crohn's disease. *Gut* **35**: 1424-8.
64. Bauer J., Liebisch G., Hofmann C., Huy C., Schmitz G., Obermeier F., and Bock J. 2009. Lipid alterations in experimental murine colitis: role of ceramide and imipramine for matrix metalloproteinase-1 expression. *PLoS One* **4**: e7197.
65. Homnick D. N., Cox J. H., DeLoof M. J., and Ringer T. V. 1993. Carotenoid levels in normal children and in children with cystic fibrosis. *J Pediatr* **122**: 703-7.
66. Lancellotti L., D'Orazio C., Mastella G., Mazzi G., and Lippi U. 1996. Deficiency of vitamins E and A in cystic fibrosis is independent of pancreatic function and current enzyme and vitamin supplementation. *Eur J Pediatr* **155**: 281-5.
67. Huang S. H., Schall J. I., Zemel B. S., and Stallings V. A. 2006. Vitamin E status in children with cystic fibrosis and pancreatic insufficiency. *J Pediatr* **148**: 556-559.
68. Hakim F., Kerem E., Rivlin J., Bentur L., Stankiewicz H., Bdolach-Abram T., and Wilschanski M. 2007. Vitamins A and E and pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **45**: 347-53.
69. Underwood B. A., and Denning C. R. 1972. Blood and liver concentrations of vitamins A and E in children with cystic fibrosis of the pancreas. *Pediatr Res* **6**: 26-31.
70. McCombie G., Staab D., Stoekli M., and Knochenmuss R. 2005. Spatial and spectral correlations in MALDI mass spectrometry images by clustering and multivariate analysis. *Anal Chem* **77**: 6118-24.
71. Eijkel G. B., Kürer Kaleta B., van der Wiel I. M., Kros J. M., Luijckx T. M., and Heeren R. M. A. 2009. Correlating MALDI and SIMS imaging mass spectrometric datasets of biological tissue surfaces. *Surface and Interface Analysis* **41**: 675-685.

Figure legends

Figure 1. Localization of individual lipids in WT and CF mouse colonic mucosa.

Images from one WT (A-H) and one CF (I-P) mouse colon section are shown. Cluster TOF-SIMS images, correspond to C16:1 ([M-H]⁻, A and I), C18:0 ([M-H]⁻, B and J), C18:2 ([M-H]⁻, C and K), vE ([M-H]⁻, D and L), CS ([M-H]⁻, E and M), sulfated lipid fragment and/or phosphoinositol ([M-H]⁻, F and N) are shown. The name of the compounds and 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 amplitude of the color scales correspond to the interval [0, *mc*]. G and O: Optical images (bar size = 200µm). H and P: 3-color overlay for C16:1, C18:0 and CS. CS: cholesteryl sulfate. vE: vitamin E.

Figure 2. Score and loading plots of the first four principal components in a CF mouse colon section. Score (left panels) and loading (right panels) plots corresponding to PC1 (A and E), PC2 (B and F), PC3 (C and G) and PC4 (D and H) are represented.

Figure 3. Distribution of clusters on the PC1 and PC2 plane. Visualization of the 4 different clusters of pixels manually selected on the principal plane constituted by the two first principal components. Those clusters represent the four main histochemical structures, namely the epithelial border (Area 1), the Lieberkühn glands (Area 2), the submucosa and *lamina propria* (Area 3) and the *lamina propria* (Area 4). The total ion current image was used to represent the different selected clusters of pixels. The color

scale of the center image corresponding to the PC1-PC2 score plot represents the density of pixels having the same PC1 and PC2 score coordinate.

Figure 4. Overlay of the score images of PC1, PC2 and PC3. The color scale represents the contribution for each pixel on the selected principal axes. Red, green and blue indicate a strong positive contribution of PC1, PC2 and PC3 respectively.

Figure 5. Distribution of partitioning clusters. Partitioning clustering was performed on a CF mouse colon section using the K-mean algorithm. Images correspond to partitioning into two (A), three (B), four (C) and five (D) clusters. The dark blue area corresponds to pixels excluded from the analysis.

Figure 6. Biplot on the first two principal components. This graphic permits to simultaneously represent the WT and CF scores and the loadings on the first two principal components. WT mice are represented in green and CF in red.

Figure 7. Separation of WT and CF mice by PCA and hierarchical clustering of ions selected by GA analysis and listed in Table 2. WT mice are represented in green and CF in red. A: Biplot representing simultaneously WT and CF scores and the loadings on the first two principal components. B: Dendrogram showing the separation of WT and CF mice obtained by hierarchical clustering analysis. This distinction occurs at the first branching, indicating that it is the most characteristic feature between the 13 experiments.

Table 1

Selected ions for the principal component analysis on TOF-SIMS-MSI data. Ion species marked by an asterisk are excluded from the PCA on TOF-SIMS spectra data analysis.

<i>m/z</i>	Ion species	Lipid family	Localization
140.03	[C ₂ H ₇ NO ₄ P] ⁻	PE	LG, border
168.07	[C ₄ H ₁₁ NO ₄ P] ⁻	SM, PC	<i>Lamina propria</i> , submucosa
227.22	C14:0 *	FA	LG
253.24	C16:1	FA	LG
255.25	C16:0	FA	mucosa
259.07	[phosphoinositol] ⁻ or ST frag.	ST, PI	mucosa
279.25	C18:2	FA	border
281.27	C18:1	FA	border, LG
283.28	C18:0	FA	<i>Lamina propria</i> , submucosa, border
303.26	C20:4 *	FA	border, submucosa
305.26	C20:3 *	FA	LG
327.15	C22:6	FA	homogeneous distribution
385.39	[Cholesterol – H] ⁻	ST	LG, border
429.4	[Vitamin E – H] ⁻	vE	border
465.35	[cholesteryl sulfate-H] ⁻	ST	border

Table 2. Ions selected by GA analysis for further PCA and hierarchical clustering analysis.

<i>m/z</i>	Ion Species	Lipid family
109.99	[CH ₃ O ₄ P] ⁻	PE, PC, SM
164.92	fragment	PI
168.08	[C ₄ H ₁₁ NO ₄ P] ⁻	PC, SM
215.92	fragment	CS, ST
220.91	fragment	PI, ST
227.22	C14:0 carboxylate	Fatty Acid
255.25	C16:0 carboxylate	Fatty Acid
429.40	[Vitamin E – H] ⁻	VE
861.70	[TG52:0 – H] ⁻	TG

Supplementary figure legends

Figure S1. TOF-SIMS negative ion mass spectra of the area corresponding to Lieberkühn glands (A), *lamina propria* (B) and epithelial border (C) of a WT colon section.

Figure S2. Animated file of four TOF-SIMS ion images showing the distribution in colon of C16:1 ([M-H]⁻, *m/z* 253.24), C18:0 ([M-H]⁻, *m/z* 283.28), CS ([M-H]⁻, *m/z* 465.35) and sulfated lipid fragment and/or phosphoinositol (*m/z* 259.07). The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

Figure S3. TOF-SIMS ion images of 500x500 μm^2 in the negative ion mode recorded on colon sections from WT (A) and KO (B) mice. Two-color overlay: red, C20:4 fatty acid carboxylate (*m/z* 303.26); green, C20:3 fatty acid carboxylate (*m/z* 305.26).

Figure S4. Animated file of two TOF-SIMS ion images representing the localization to different areas of arachidonic acid (AA, C20:4, *m/z* 303.26), mostly localized to submucosa, and its fatty acid precursor (C20:3, *m/z* 305.26), mainly present in the glands of Lieberkühn. The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

Figure S5. Animated file of the TOF-SIMS images of C20:4 fatty acid carboxylate ([M-H]⁻, *m/z* 303.26) and the overlaid PC1-PC2-PC3 image score. This file shows the

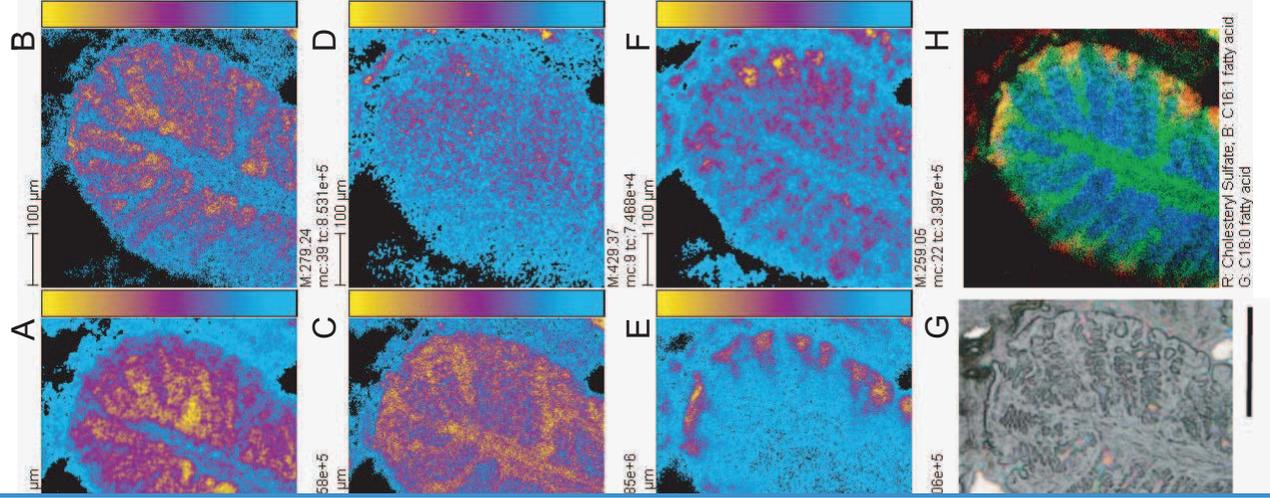
arachidonic acid carboxylate distribution mainly in submucosa, *lamina propria* and epithelial border. The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

Figure S6. Animated file of the TOF-SIMS image of C18:2 fatty acid carboxylate ([M-H]⁻, *m/z* 279.25) and the overlaid PC1-PC2-PC3 image score. This file shows linoleic acid carboxylate mainly localized to the epithelial border. The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

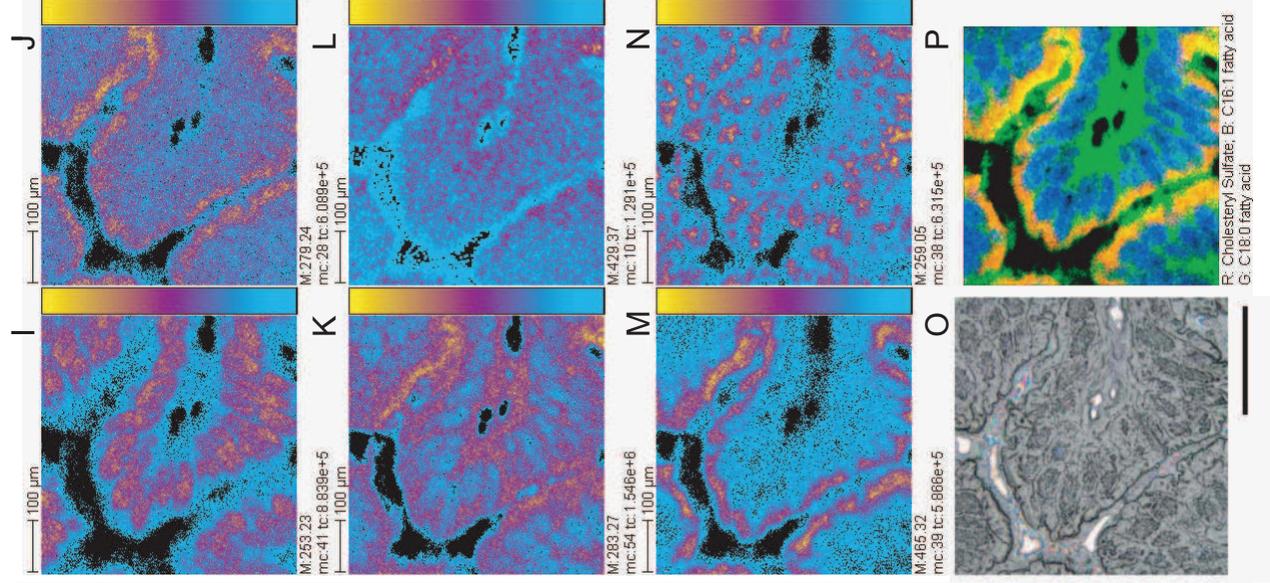
Figure S7. Animated image file of two TOF-SIMS ions C18:2 ([M-H]⁻, *m/z* 279.25) and CS ([M-H]⁻, *m/z* 465.35). This file shows a co-localization of the two lipid fragments essentially at the epithelial border of colon mucosa. The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

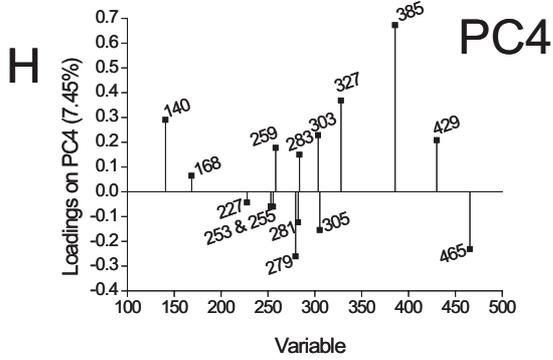
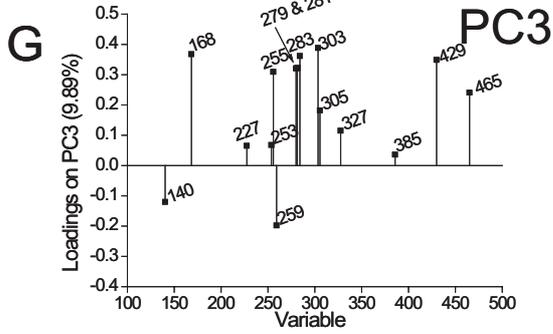
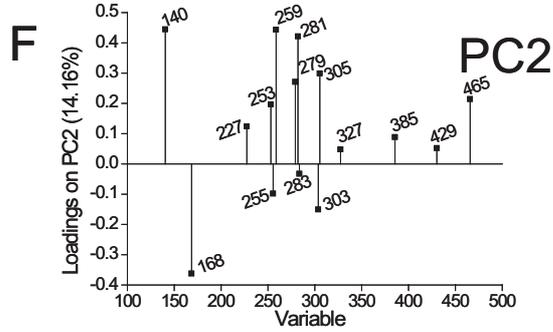
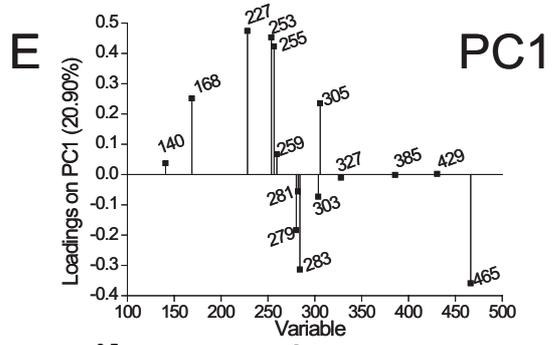
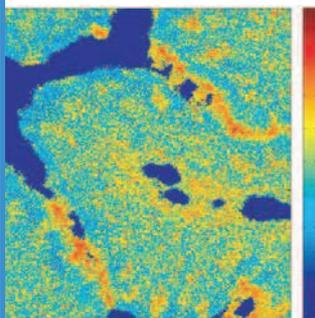
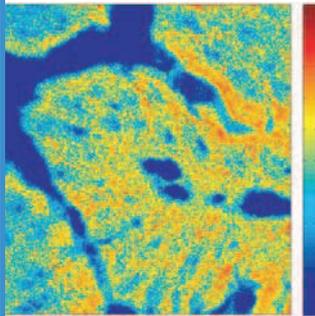
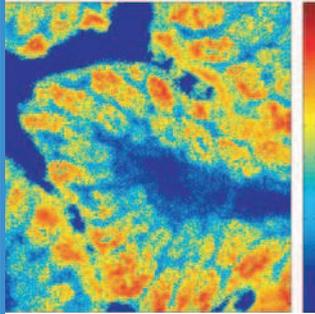
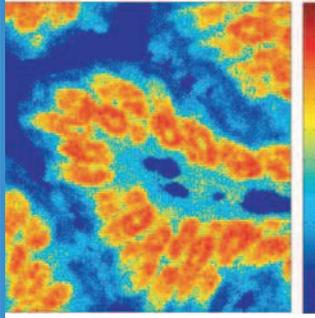
Figure S8. Animated file of the TOF-SIMS ion image at *m/z* 259, which can be attributed to either the sulfated lipid fragment and/or phosphoinositol ion, with the overlaid PC1-PC2-PC3 image score. This file shows the localization of ion clusters mainly to Lieberkühn glands and at the epithelial border. The animated gif file can be opened with a web browser to see the animation.

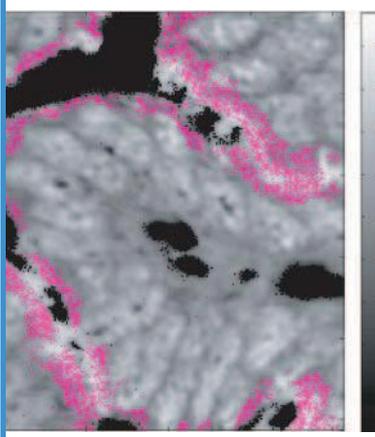
WT



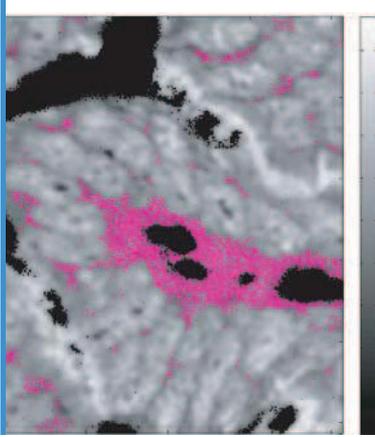
CF



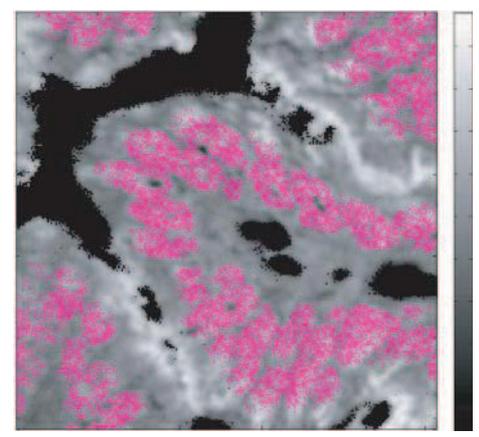
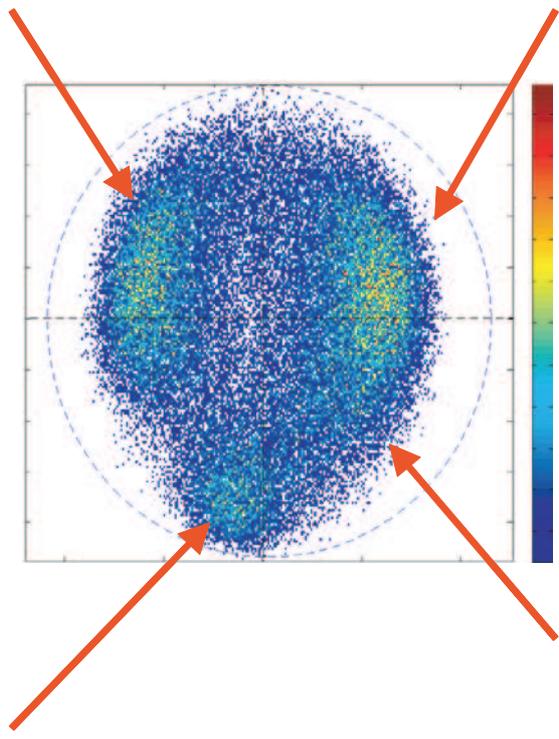




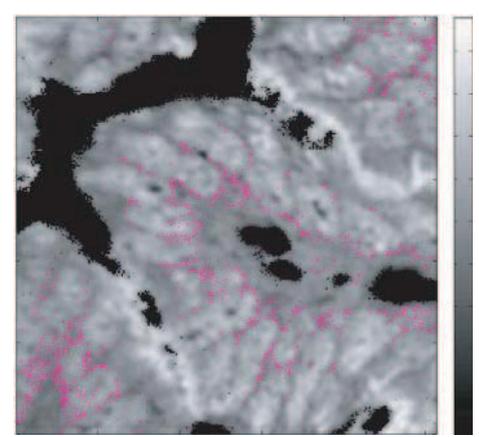
Area 1



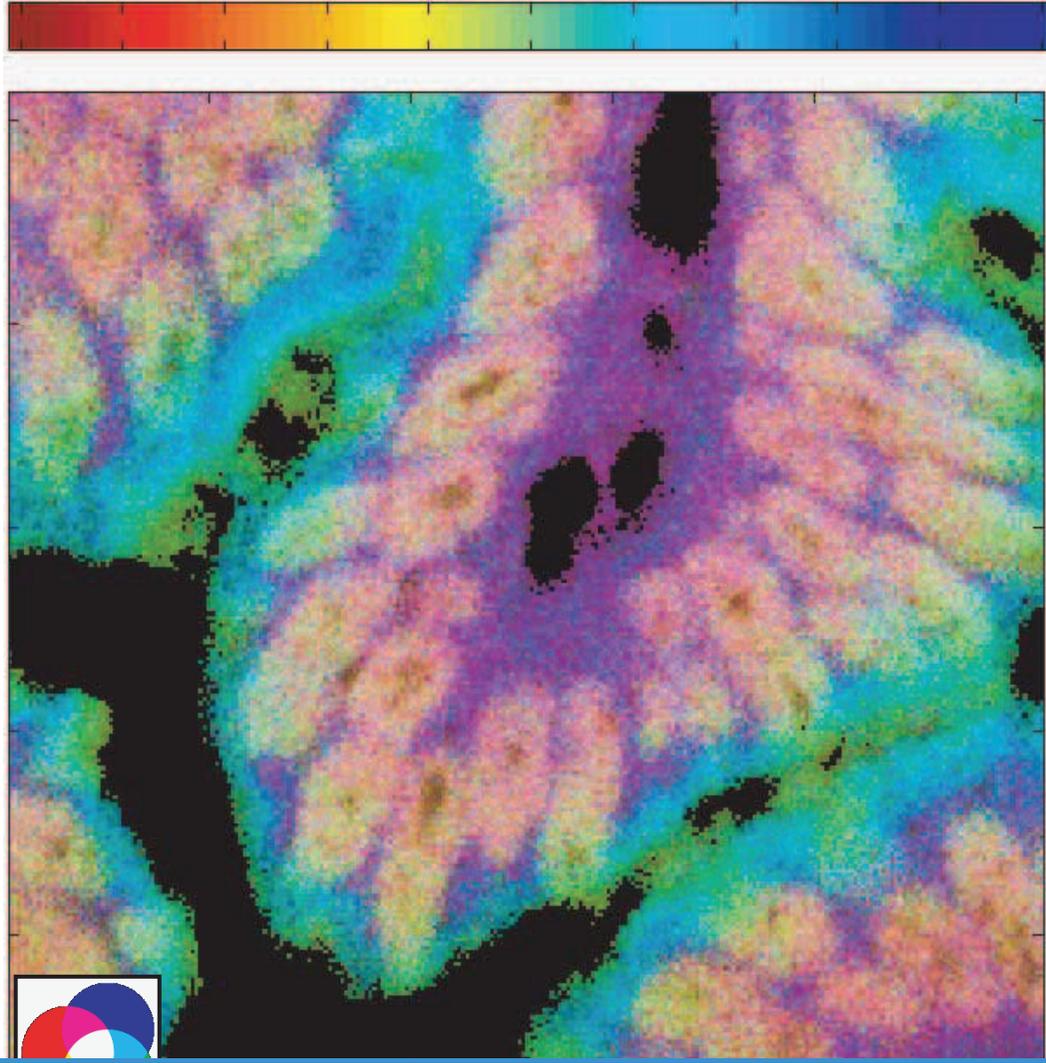
Area 3



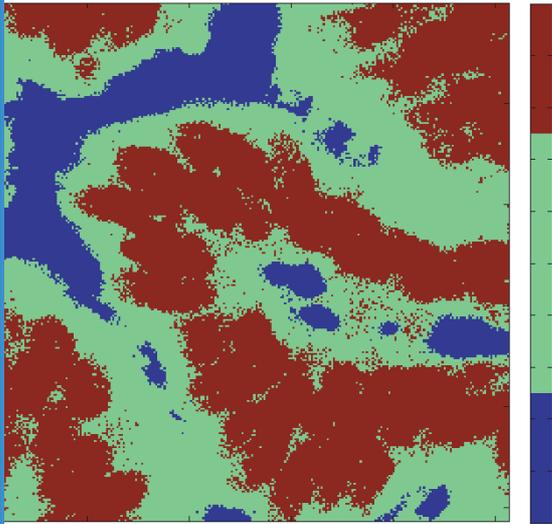
Area 2



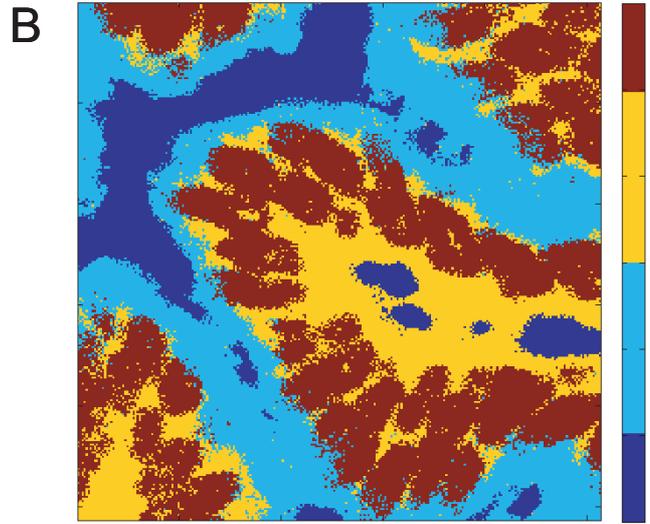
Area 4



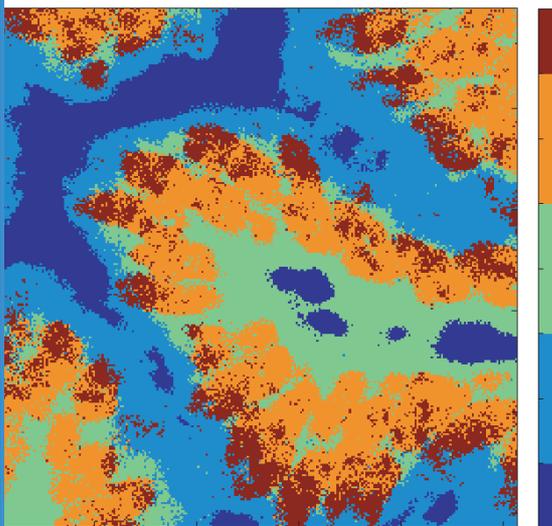
2 clusters



3 clusters



4 clusters



5 clusters

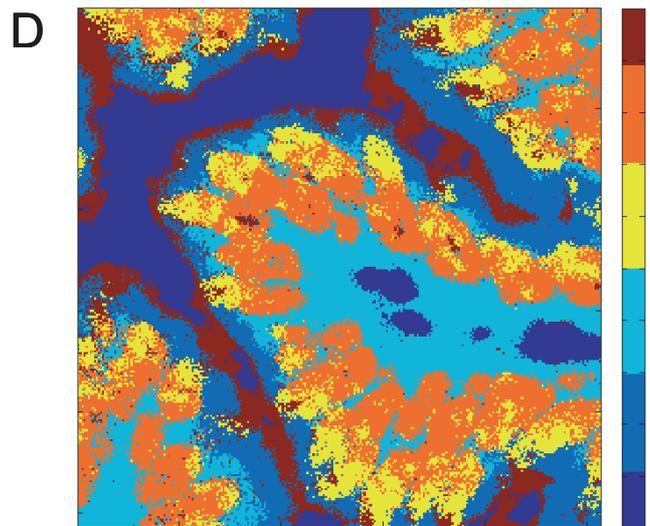
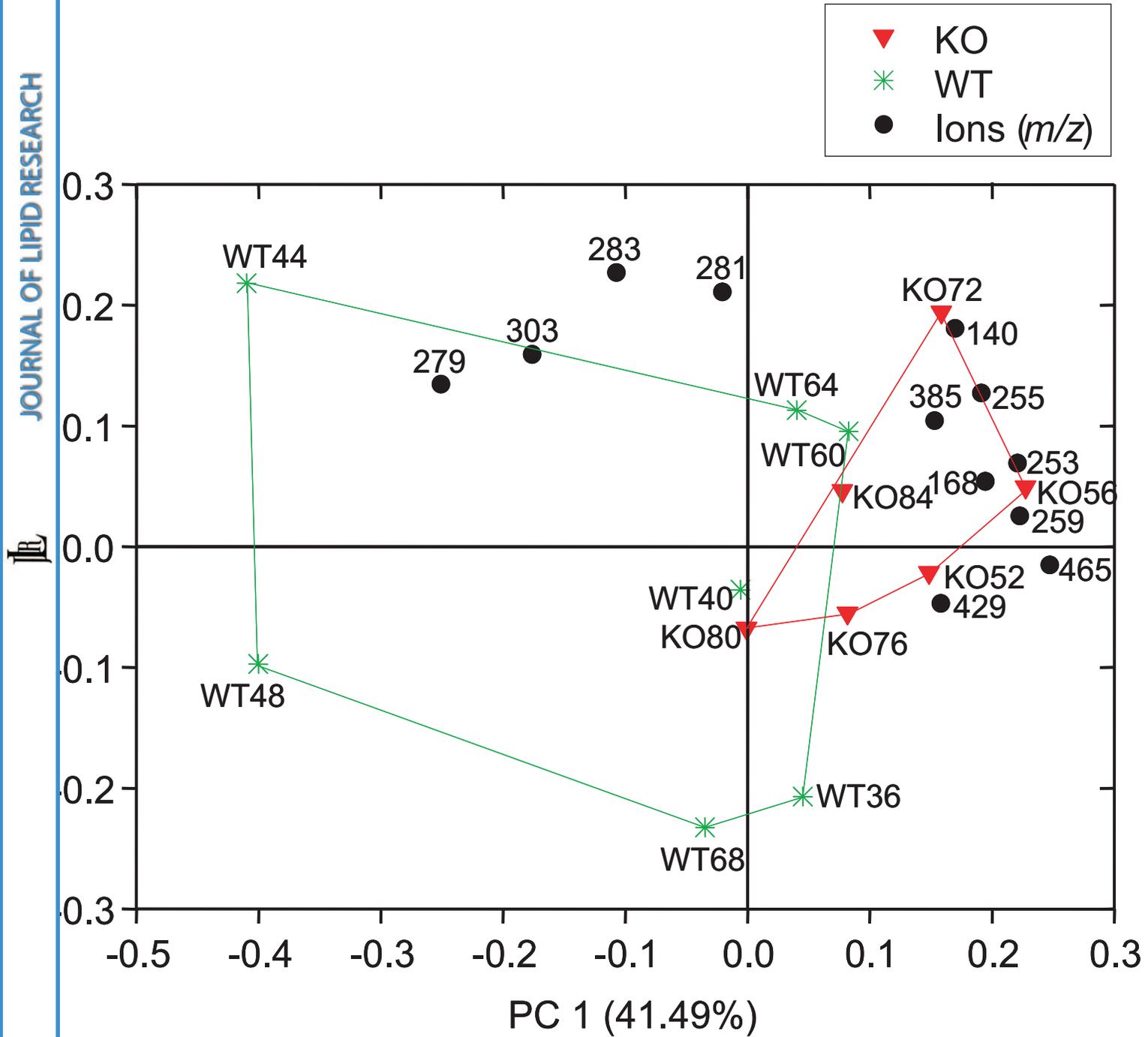
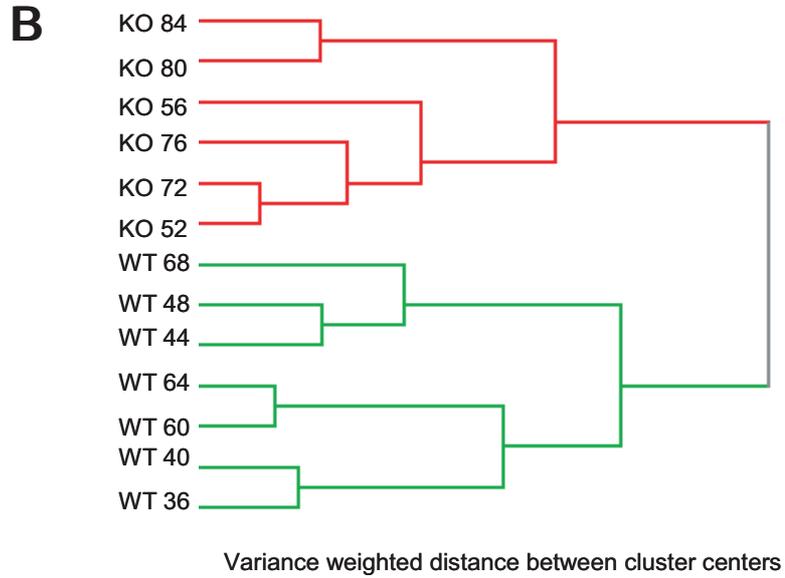
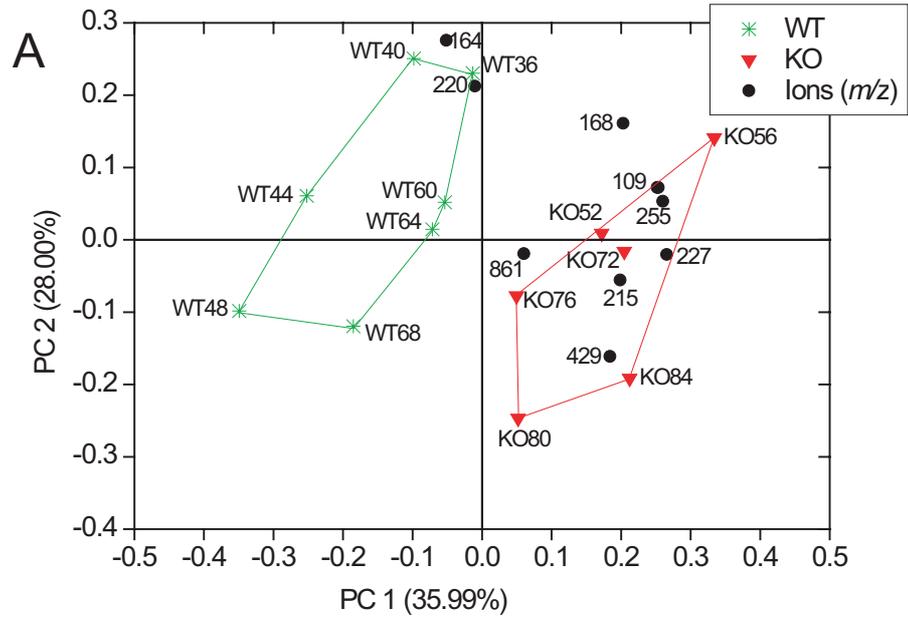


Figure 6





Mon travail de thèse a consisté à poursuivre le développement de l'Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS), à la fois sur le plan méthodologique mais aussi à travers des applications biologiques.

Dans une première partie est exposé le développement d'une méthode de préparation des échantillons de très petite taille pour l'imagerie chimique, et plus particulièrement pour l'imagerie TOF-SIMS. Cette méthode a pu être validée en étudiant des molécules de la famille des flavonoïdes dans différents types de graines d'*Arabidopsis thaliana* ne mesurant que 400 nm de diamètre. La seconde partie, dédiée aux applications biologiques, est divisée en deux sections. La première section regroupe deux sujets où il était question de détecter et de localiser, à l'aide de l'imagerie TOF-SIMS, la molécule active d'une crème anti-acné dans des coupes de peaux de cadavre humain, ainsi qu'un retardateur de flamme bromé, le décabromodiphényl éther, dans ses tissus cibles chez le rat. Dans la seconde section, nous avons étudié, en imagerie TOF-SIMS et MALDI-TOF, l'absorption des lipides durant la digestion et enfin, avec l'aide d'outils d'analyse statistiques, nous avons comparé les profils lipidiques d'échantillons sains et atteints de la mucoviscidose chez un animal modèle de la maladie.

À travers ces différents projets, nous avons pu conclure que les imageries par spectrométrie de masse TOF-SIMS et MALDI-TOF sont deux techniques complémentaires et qui, combinées à l'analyse statistique, peuvent être de puissants outils.

My PhD's work consisted in continuing the development of Mass Spectrometry Imaging (MSI) methods, in terms of methodology improvements but also through biological applications.

The first part concerned the development of a novel sample preparation method dedicated to very small objects for chemical imaging, particularly for TOF-SIMS imaging. This method has been validated by studying different types of flavonoids in from seeds of *Arabidopsis thaliana*, with a size of 400 nm only. The second part, dedicated to biological applications, is divided into two sections. The first section includes two projects where the goals was to detect and locate, using TOF-SIMS imaging, the active molecule of an anti-acne cream in human skin sections, and a brominated flame retardant, the decabromodiphenyl ether, in target tissues in rats. In the second section, we have studied by MALDI-TOF and TOF-SIMS imaging the lipid absorption during the digestion, and finally, with the help of statistical analysis tools, we compared lipid profiles of healthy samples versus those from cystic fibrosis samples in a model animal of the disease.

Through these projects, we have concluded that MALDI-TOF and TOF-SIMS imaging are two complementary techniques, and, when they are combined with statistical analysis, they can be powerful tools.

Équipe de Spectrométrie de Masse
Institut de Chimie des Substances Naturelles (UPR 2301)
CNRS-Avenue de la Terrasse
F-91198 GIF-SUR-YVETTE Cedex