



Imagerie

P3-001

Cationisation spécifique par le lithium de lipides biologiques pour l'imagerie par spectrométrie de masse

C. Cerruti(1) • V. Guérineau(1) • D. Touboul(1) • A. Brunelle(1) • O. Laprèvote(1,2)

(1)Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (2)Chimie Toxicologie Analytique et cellulaire EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Université Paris Descartes, Paris

Les techniques d'imagerie biologique constituent le moyen le plus efficace de mesurer, de manière localisée, la variation de différents paramètres au sein d'un tissu biologique. Des études antérieures ont montré que l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI est une technique de choix pour étudier la répartition des différents métabolites, en particulier les lipides. L'approche qui a été envisagée pour analyser les lipides à partir de coupes de cerveau de rat repose sur la constatation que ces molécules d'intérêt M forment divers adduits en phase gazeuse : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. Ainsi, le signal de la molécule M est fractionné en 3 signaux d'intensités différentes. Ceci a pour conséquence de diminuer l'intensité du signal de l'ion correspondant à la molécule ciblée et l'image qui en résulte perd en définition car n'est considérée qu'une partie de l'information attribuée à notre molécule. Il est donc intéressant d'optimiser un protocole de préparation des échantillons pour déplacer l'équilibre entre ces différents adduits vers un type ionique unique, comme par exemple des ions $[M+Li]^+$ formés par addition de sels de lithium. Les images acquises sur des coupes de cerveau de rat démontreront la pertinence d'une telle approche.

Des coupes sagittales de cerveau de rat (12 μ m d'épaisseur) sont préparées à -20°C avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre, France) et sont immédiatement déposées sur une plaque en acier inoxydable. Une solution de matrice acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (α -CHCA 10 mg.mL⁻¹ dans acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 70/30/0.1 v/v/v) servant de référence est préparée pour l'analyse en mode d'ionisation positif. Au cours de notre étude cinq contre-ions (iodure, chlorure, acétate, citrate, et trifluoroacétate) ont été testés chacun à différentes concentrations en lithium 0,2 ; 0,5 ; 1 ; 2 mg/mL. L'appareil employé pour déposer ces solutions de matrice est un nébulisateur robotisé (LEAP Technologies, Carrboro, USA). Les images lipidiques sont acquises grâce à un spectromètre de masse 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Les Ulis, France). La distance entre deux pixels adjacents a été fixée à 100 μ m, ce qui définit la résolution latérale. Les images ont été enregistrées en utilisant le logiciel 4000 Series

Imaging et traité avec le logiciel TissueView (Applied Biosystems, Les Ulis, France). A partir de spectres acquis au niveau du thalamus et du cervelet les proportions relatives en adduit sodium, potassium, et lithium ont été calculées à l'aide de l'aire des pics correspondant aux espèces $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Li]^+$ des phosphatidylcholines PC32:0 et PC34:1.

L'iodure, le trifluoroacétate et l'acétate de lithium présentent des proportions élevées en adduit lithié. Néanmoins l'iodure de lithium complique la préparation des échantillons en modifiant l'homogénéité du dépôt de matrice. L'acétate de lithium entraîne une délocalisation des lipides sur toute la coupe à partir de 1 mg/mL. Le trifluoroacétate de lithium est le sel qui présente les meilleurs résultats, et l'analyse des spectres permet de constater que ce sel conduit à une meilleure sensibilité que les autres. Ainsi pour le PC32:0, il y a un adduit de 100% d'adduits avec le lithium sont formés à partir de 2 mg/mL dans le thalamus et le cervelet. Cependant une concentration en sel trop importante entraîne une délocalisation des lipides sur la coupe de tissu ce qui fausse l'analyse. Une concentration en LiTFA de 1 mg/mL semble être la mieux appropriée pour l'imagerie. Les ions m/z 734,57 [$PC32:0+H$]⁺, m/z 760,586 [$PC34:1+H$]⁺, m/z 740,57 [$PC32:0+Li$]⁺ et m/z 766,586 [$PC34:1+Li$]⁺ sont co-localisés dans la matière grise du cerveau de rat. Les spectres MS/MS des espèces lithiées présentent des taux de fragmentation élevés correspondant à la perte de chaînes d'acide gras ce qui permet de caractériser structurellement les phosphatidylcholines sur une coupe de cerveau de rat.

L'addition de sels de lithium à la solution de matrice facilite donc la caractérisation structurale in situ et spatiale de lipides dans des échantillons biologiques.

Imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS appliquée à l'ophtalmologie : étude de la distribution du principal conservateur des collyres, le chlorure de benzalkonium

N. Desbenoit(1) • F. Brignole-Baudouin(2,3) • A. Brunelle(1) • C. Baudouin(4) • O. Laprèvote(1,2)

(1)Centre de recherche de Gif, Inst. de chimie des substances naturelles, CNRS, UPR 2301, Gif-sur-Yvette • (2)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Fac. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris Descartes, Paris • (3)Inst. de la Vision, INSERM, U968, Paris

(4)Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts Paris

Grâce à leurs propriétés désinfectantes, les chlorures de benzalkonium (BAC), sels d'ammonium quaternaire possédant une chaîne alkyle variable, sont employés dans de très nombreux produits d'usage courant. En ophtalmologie, ce sont des conservateurs utilisés dans les solutions de nettoyage des lentilles de contact et dans les collyres où ils sont réputés pour favoriser la pénétration des principes actifs. Les effets cytotoxiques sur la surface oculaire de faibles doses en utilisation chronique sont désormais bien connus et concernent de manière cruciale les patients glaucomateux qui sont obligatoirement traités à vie pour éviter la cécité. Ainsi, la distribution des BACs dans l'œil mérite d'être réévaluée à l'aide d'outils d'imagerie modernes et puissants, tels que l'imagerie ToF-SIMS, dans des modèles d'utilisation répétée et prolongée afin de comprendre les impacts de cette toxicité sur des structures primordiales dans la pathologie glaucomateuse comme le filtre trabéculaire et le nerf optique.

La spectrométrie de masse (SM) d'ions secondaires couplée à un analyseur à temps de vol (ToF-SIMS) est une technique de choix pour l'analyse en surface des tissus biologiques. Elle permet en une simple acquisition de localiser sur une échelle de l'ordre du micromètre de nombreux composés biologiques. L'imagerie par SM a été donc employée afin de caractériser la distribution spatiale des chlorures de benzalkonium et de définir les conséquences physiopathologiques au niveau moléculaire. L'identification des zones d'accumulation de ces conservateurs est d'un intérêt majeur en ophtalmologie, car les effets peuvent être particulièrement délétères pour les porteurs de lentilles et les patients glaucomateux.

Des yeux de lapins albinos ont été instillés deux fois par jour avec deux gouttes d'une solution de BAC à 0,01%, concentration communément utilisée dans les solutions de collyres commerciaux, pour une durée de un et cinq mois. Après sacrifice, les yeux ont été rapidement énucléés, et conservés à -80°C dans une gomme tragacathe. Des coupes sériées de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées à -30°C avec un cryostat Leica CM3050-S, et déposées alternativement sur des plaques en verre et en silicium pour respectivement les analyses histologiques et ToF-SIMS. Les images ioniques

sont obtenues avec un spectromètre de masse ToF-SIMS IV, muni d'une source délivrant des agrégats de bismuth (Bi³⁺). Les images de 500x500 µm² (résolution spatiale de 2 µm), ainsi que des images pouvant avoir une surface de plusieurs mm² ont été enregistrées en mode d'ionisation positif, avec 256x256 pixels.

Deux ions ont été détectés à la surface des échantillons des yeux de lapin traités au BAC, correspondant à un mélange de benzododecinium (C₂₁H₃₈N⁺, m/z 304.30) et myristalkonium (C₂₃H₄₂N⁺, m/z 332.33). Les images ioniques indiquaient une distribution à la périphérie extérieure du globe oculaire, plus précisément au niveau de l'épithélium cornéen et conjonctival, le limbe (jonction entre la cornée et la sclère), ainsi que proche de l'angle irido-cornéen. Ces deux zones d'intérêt à la surface oculaire contiennent respectivement les cellules souches cornéennes, et le système d'écoulement de l'humeur aqueuse. Le nerf optique et la papille n'ont pas révélé la présence de BAC. Les images ToF-SIMS nous ont permis de montrer une augmentation des zones d'accumulation du benzalkonium avec des yeux traités pendant cinq mois. La corrélation spatiale entre les images ioniques et l'immunohistologie a mis en évidence les zones d'infiltration inflammatoire et de mort cellulaire (apoptose).

En conclusion, l'imagerie par ToF-SIMS présente un intérêt majeur pour déterminer la distribution de molécules dans l'œil, principes actifs ou excipients à effets délétères notoires comme dans cette étude sur les chlorures de benzalkonium. Elle ouvre d'importantes perspectives pour l'évaluation fine de la toxicité liée à la présence de la molécule en termes de lipidomique et de métabolomique.

Ionic Matrices and MALDI Mass Spectrometry Imaging: Study of some features and parameters

J. Franck(1) • I. Fournier(2) • G. Bollbach(1)

(1)Plateforme de spectrométrie de masse et protéomique, Labo. des Biomolécules, UMR CNRS 7203, Univ. Pierre & Marie Curie, Paris, France • (2)MALDI Imaging Team, Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutives, FRE-CNRS 3249, IFR 147, Université Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France

Introduction:

Since its introduction[1], MALDI mass spectrometry imaging (MALDI-MSI) has become a powerful and versatile tool for analyzing different classes of endogenous[2] and exogenous[3] molecules within tissue sections. MALDI-MSI shows continuously increased performances in term of sensitivity, spatial resolution, speed of acquisition number and class of detected molecules. Recently, it was shown that the use of Ionic Matrices (IMs) allows for a better detection of some biomolecules including lipids[4], peptides[5] and proteins[6]. In contrast, some of these matrices do not show any improvement when used in classical target preparation. Moreover, even if IMs provide better images in terms of number and intensity of detected molecules, the fundamental explaining such improvements has not yet been studied. This is partially due to our still rather poor knowledge on the desorption/ionization process involved in MALDI by itself. However, physicochemical parameters of matrices seem to play an important role. We have therefore investigated the properties of classical matrices versus several IMs used as MALDI-MSI matrices. Matrices were compared using dried droplet preparation or spray coating on both classical target and tissue sections. Matrices were compared on the basis of different parameters and features including matrix crystal size, matrix organization on tissue sections, analyte irradiation effects, initial axial velocity and effective temperature (Teff). Initial velocity measurements on classical targets on tissues were performed by using the delay extraction method[7] and Teff was estimated using thermometer ions including benzylpyridinium ions[8].

Preliminary results:

The first analyses have revealed that both standard peptides intensity and matrices crystals morphology (size and density) are extremely related to the deposit method (dried droplet vs. spray coating) and also to the sample holder (metal vs. tissue section). The measured initial axial velocity v_0 was found slightly higher for HCCA/ANI compared to HCCA especially after spray coating on tissue section. Typically, for insulin on tissue $v_0 \sim 700$ m/s with HCCA-ANI and $v_0 \sim 605$ m/s for HCCA. Using dried droplet on metal the initial

velocity are 570m/s for HCCA/ANI and 425m/s for HCCA, respectively. The crystal morphology studied by Scanning Electron Microscopy (SEM) is extremely different on tissue and on metal after dried droplet and spray coating. Especially, the spray coating on tissue sections is featured by a high matrix coverage formed by very small and flat crystals. This can be interpreted as a "sponge" effect of the tissue for which the solvent is partially and quickly absorbed within the tissue preventing a complete crystallization.

This feature seems to influence the analyte irradiation effect, i.e. the decrease of intensity vs the number of laser shots. This decrease was less pronounced on spray coating on metal than on dried droplet. An intermediate behavior was observed after spray coating on tissue especially for IMs. This result suggests that IMs limit the diffusion of peptides within the tissue section and could explain why a better extraction of endogenous compounds was observed.

Measurements on Teff will be also presented and a rationalization of all these data will be discussed.

- (1) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal Chem* 1997, 69, 4751-4760.
- (2) Rubakhin, S. S.; Jacoben, J. C.; Munroe, E. B.; Siewald, J. V. *Drug Discov Today* 2005, 10, 823-837.
- (3) Franck, J.; Arafah, K.; Elayed, M.; Boumel, D.; Vorgara, D.; Jacquet, A.; Yimaten, D.; Wiszorski, M.; Day, R.; Fournier, I.; Salzet, M. *Mol Cell Proteomics* 2009, 8, 2023-2033.
- (4) Chan, K.; Lambiot, P.; Liu, X.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D.; Li, J. *Anal Chim Acta* 2009, 639, 57-61.
- (5) Lemaire, R.; Tahet, J. C.; Ducrocq, P.; Hendra, J. B.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* 2006, 78, 809-819.
- (6) Franck, J.; Arafah, K.; Barnes, A.; Wiszorski, M.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal Chem* 2009, 81, 8193-8202.
- (7) Karas, M.; Bahr, U.; Fournier, I.; Glückmann, M.; Pfenninger, A. *Int. J. Mass Spectrom.* 2001, 226, 239-248.
- (8) Gabelica, V.; Schulz, E.; Karas, M. *J Mass Spectrom* 2004, 39, 379-393.

Mise en évidence par cluster-ToF-SIMS d'urine animale dans l'art rupestre africain

V. Mazel(1) • P. Richardin(1) • D. Touboul(2) • A. Brunelle(2) • C. Richard(1) • E. Laval(1) • P. Walter(1)

O. Laprévotte(2,3) • (1)Laboratoire du Centre de Recherche et de Restauration des Musées de France (LACRMF), CNRS UMR 171, Paris • (2)Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (3)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire (EA 4463), Fac. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Univ. Paris Descartes

Entre Bandiagara et Mopti au Mali, dans l'amas rocheux qui domine le village de Songo, sur une paroi appelée "auvent Desplagnes", du nom du lieutenant qui fut le premier européen à y avoir accès, sont peints des signes dont seuls les initiés peuvent comprendre véritablement le sens. Ces peintures sont liées au rituel de la circoncision, rituel très important chez les Dogon qui se déroule généralement tous les trois ans. Sous cet auvent, les jeunes garçons s'assoient sur des pierres où le sang de leur circoncision va laisser des traces. Ces "pierres à graffitis" vont ensuite être ornées par les pères de motifs rouges, noirs et blancs, vingt jours après la cérémonie. De même, sur la paroi elle-même, les signes sont repeints dans les mêmes couleurs.

La littérature ethnologique fait mention de l'utilisation de l'urine d'animaux de différentes espèces comme les oiseaux, lézards ou serpents pour la fabrication de la couleur blanche utilisée pour peindre les motifs. L'urine de ces animaux dits uricotéliques, est principalement composée d'acide urique ou de sels d'urates.

Le but de notre étude est de prouver l'utilisation d'urine animale pour la fabrication du pigment blanc d'une des pierres peintes rapportées en 1931 par Marcel Griaule et conservées au Musée du quai Branly à Paris. Nous avons utilisé l'imagerie par spectrométrie de masse cluster-ToF-SIMS et la microdiffraction des rayons X pour comparer un microprélèvement de peinture réalisé sur cette pierre, avec un standard commercial d'acide urique et un échantillon d'urine de serpent, récupéré à la ménagerie du jardin des plantes à Paris.

Les mesures par ToF-SIMS en mode d'ionisation positive et négative permettent de différencier avec certitude acide urique et sels d'urates. Il est ainsi possible de construire une stratégie analytique pour l'analyse d'un matériau susceptible de contenir ces constituants. Le mode d'ionisation négative est utilisé pour prouver la présence de l'une ou l'autre des deux espèces, par la présence de la molécule déprotonée $[M-H]^-$ à m/z 167,01) accompagnée de ses ions fragments, alors que l'ionisation positive permet de trancher sans ambiguïté pour l'une ou l'autre. Les sels d'urates sont caractérisés par différents adduits potassium et sodium : m/z 228,9 $[(M-H)+Na+K]^+$, m/z 244,9 $[M-H+2K]^+$, m/z 266,9 $[M-2H+Na+2K]^+$ et m/z 282,9 $[M-2H+3K]^+$ correspondant

à l'urate une fois et deux fois déprotonés, accompagnés d'autres ions fragments. Pour l'acide urique par contre, la molécule protonée $[(M+H)^+]$ à m/z 169,03) et ses ions fragments sont principalement détectés.

En ce qui concerne le pigment blanc de la pierre Dogon, nous avons pu prouver qu'il était constitué exclusivement d'acide urique. C'est la première fois qu'il est prouvé scientifiquement que de l'urine animale a été utilisée comme pigment par les Dogons. La présence d'acide urique au lieu de sels d'urate attendus normalement, pourrait être expliquée par la préparation du pigment lors de son application sur la pierre.

V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, C. Richard, E. Laval, P. Walter, O. Laprévotte, *Journal of Mass Spectrometry*, sous presse.

C. Klenitz and B. Dietz, *Signs of the times/ Times of the signs: rock art and circumcision in Songo, Dogon country (Mali)*, Dutch National Museum of Ethnology, Leyden, 2003.

V. Mazel and P. Richardin, in *Organic Mass Spectrometry in Art and Archaeology* (Eds: M. P. Colombini and F. Mondrago), Wiley, 2009, pp. 433-459.

V. Mazel, P. Richardin, D. Touboul, A. Brunelle, P. Walter and O. Laprévotte, *Analytica Chimica Acta* 2006, 570, 34-40.

V. Mazel, P. Richardin, D. Debois, D. Touboul, M. Cotte, A. Brunelle, P. Walter and O. Laprévotte, *Analytical Chemistry* 2007, 79, 9253-9260.

Cartographie lipidique du colon de souris *cftr*^{-/-} par cluster TOF-SIMS et analyse multivariée

M. Ollero(1,2) • M. Brudet(1) • A. Seyer(1) • A. Edelman(2) • A. Brunelle(1) • J. Fritschy(2) • O. Laprèvote(1,3)

(1)Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette, France • (2)Inserm, U845, Faculté de Médecine Paris Descartes, France • (3)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Fac. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes, France

La morphologie de la muqueuse du colon est un paramètre fondamental dans la caractérisation de plusieurs maladies et un point de contrôle important pour l'évaluation des thérapies. Parmi ces pathologies se trouve la mucoviscidose (MV), une maladie génétique attribuée à des mutations dans le gène CFTR. De nombreuses études associent la MV à un contenu et un métabolisme anormal de certains lipides dans le plasma et les tissus des patients et des modèles animaux. La souris knockout pour l'exon 10 de *cftr* présente, parmi d'autres symptômes, une obstruction, malabsorption et inflammation intestinales, ainsi qu'un déséquilibre des acides gras de la muqueuse de ce tissu. Le but de notre étude a été la réalisation d'une cartographie lipidique de la muqueuse du colon de souris et la recherche d'altérations du contenu et/ou de la distribution spatiale des lipides dans le modèle MV en rapport avec la morphologie intestinale.

Des coupes de côlon de 10µm d'épaisseur ont été obtenues à partir de 3 souris MV et 3 souris contrôle (WT) et analysées à l'aide d'un spectromètre de masse TOF-SIMS IV (Ion-Tof GmbH, Münster, Allemagne), équipé d'une source à pointe liquide émettant des ions agrégats Bi³⁺. Les images ont été acquises en mode d'ionisation négatif avec une résolution spatiale de 2µm. Les données ont été analysées manuellement ou par des analyses statistiques multivariées, incluant l'analyse par composantes principales (ACP), le clustering de partition, le clustering hiérarchique et l'analyse par algorithmes génétiques (AAG).

L'analyse manuelle des données a montré une localisation majoritaire du sulfate de cholestéryle au niveau de la bordure de l'épithélium, de l'acide gras C16:1 dans les glandes de Lieberkühn, ainsi que de l'acide gras C18:0 dans la lamina propria et la sousmuqueuse. La comparaison des spectres extraits des régions d'intérêt des souris WT et CF a montré que le signal correspondant à la vitamine E et de l'acide gras C16:0 augmente significativement dans la bordure épithéliale du colon de souris MV. Quinze ions ont été sélectionnés pour l'ACP et le clustering de partition. Ces analyses ont permis la caractérisation de plusieurs structures morphologiques du côlon en fonction des variations en acides gras C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2,

C20:3, C20:4 et C22:6, en phosphatidyléthanolamine, phosphocholine, phosphatidylinositol, cholestérol, vitamine E et sulfate de cholestéryle. Ainsi, les glandes de Lieberkühn sont caractérisées par des niveaux élevés de C16:0, C14:0, C16:1 et phosphatidyléthanolamine; la lamina propria et la sousmuqueuse sont corrélées avec une quantité relative élevée en C16:0, C18:2 et phosphocholine; la bordure épithéliale interne avec C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 et le sulfate de cholestéryle; et la bordure épithéliale externe avec C14:0, C16:1, C18:1, le phosphatidylinositol et la phosphatidyléthanolamine. De plus, l'analyse par ACP de ces 15 variables à partir de la région des glandes de Lieberkühn -où CFTR est plus fortement exprimé- permet une ségrégation presque complète des souris MV et WT par la première composante principale. Cette ségrégation est complète en choisissant par AAG une série de 12 ions, tels que C14:0, C16:0 et plusieurs fragments de phospholipides. Ces ions permettent également une séparation correcte des individus par clustering hiérarchique.

L'ensemble des résultats suggère que l'imagerie TOF-SIMS couplée à des analyses multivariées est une approche très puissante pour la recherche de la distribution spatiale de signatures lipidiques associées à des états physiopathologiques particuliers, comme celui du modèle murin de la MV.

P3-006

Practical Considerations on Normalization in MALDI Imaging

G. Rubel(1) • S. Deininger(2) • M. Becker(2) • E. Wolski(2) • H. Kaminski(2) • R. Pääpe(2) • S. Cornett(3)

(1)Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany • (2)Bruker Daltonics, Billerica, USA

Normalization of MALDI imaging data is a topic of debate, as it can lead to artifacts. The use of normalization is always based on certain assumptions, which are not always met on real world data. We present here datasets that lead to artifacts with the commonly used normalization on TIC or the vector norm and propose ways to detect and avoid these.

Exclusion of these signals for the calculation of the TIC solves this. The comparison of data after TIC and median or noise normalization can be used to detect the inapplicability of a TIC normalization. The median/noise or TIC with exclusion of mass ranges can be used in such cases.

Imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS de gouttelettes lipidiques durant l'absorption intestinale

A. Seyer(1) • D. Touboul(1) • C. Coméra(2) • X. Collet(2) • A. Brunelle(1) • O. Laprèvote(1,3)

(1)Centre de recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette • (2)INSERM U563, Toulouse

(3)Chimie Toxicologie Analytique et Cellulaire, EA 4463, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Université Paris Descartes

Les lipides représentent environ 40% des calories ingérées par la population des pays développés, alors que les recommandations sont de 5 à 10% plus basses. Cet apport lipidique excessif favorise grandement le développement de l'obésité et de maladies associées. Plusieurs étapes impliquées dans l'absorption des lipides comme la formation de gouttelettes lipidiques, l'hydrolyse des lipides par les entérocytes (dans la lumière de l'intestin) et leur transport dans les compartiments intracellulaires, où les acides gras et les stéroïdes sont transformés en lipides neutres, ont donc besoin d'être étudiés. Dans cette étude, nous avons utilisé l'imagerie par spectrométrie de masse ToF-SIMS pour comprendre ces changements d'état chimiques et physiques.

Des souris âgées de trois semaines ont été traitées par voie orale avec 200 µL d'huile de tournesol enrichie en cholestérol (10 mg/mL), elles ont été sacrifiées immédiatement, après 30 min, 1 h et 4 h. Les intestins ont rapidement été prélevés, congelés dans de l'azote liquide et des coupes de 12 µm d'épaisseur ont été préparées à -20°C avec un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Nanterre, France). Les images ioniques ont été acquises avec un spectromètre de masse ToF-SIMS IV (ION-TOF GmbH, Münster, Allemagne). Ce spectromètre est équipé d'une source à pointe liquide émettant des ions agrégats Bi³⁺. Des grandes images de 500x500 µm² (résolution spatiale : 2 µm) ont été enregistrées dans les deux modes d'ionisation, tandis que des images de 100x100 µm² (résolution spatiale : 400nm) n'ont été enregistrées qu'en mode négatif, avec toujours 256x256 pixels. De plus, un spectromètre de masse 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems, Les Ulis, France) a été utilisé pour des expériences de MS/MS in situ.

Les grandes images permettent d'analyser les changements globaux qui s'opèrent durant la digestion. En mode d'ionisation positif, nous observons une augmentation de l'intensité des ions correspondant aux monoacylglycérols contenant 18 carbones sur leur chaîne d'acides gras (MAG18), aux diacylglycérols contenant 34 (DAG34) et 36 (DAG36) carbones sur leur deux chaînes d'acides gras et aux triacylglycérols contenant 52 (TAG52), 54 (TAG54) et 56 (TAG56)

carbones sur leurs trois chaînes d'acides gras. Au contraire, une diminution de la quantité relative est observée pour les monoacylglycérols contenant 16 carbones (MAG16). En mode d'ionisation négatif, l'intensité des pics à m/z 279,2 et 281,2, correspondant respectivement aux carboxylates des acides gras C18:2 et C18:1 augmente, alors que celles correspondant aux C16:0 (m/z 255,2) diminue au cours de la digestion. L'huile de tournesol contenant essentiellement de TAGs, composés principalement d'acides gras C18:2 (60%) et C18:1 (22%) et peu d'acides gras en C16 (C16:1, 0,5%; C16:0, 6,2%), ces variations pourraient correspondre à un phénomène de rééquilibrage. De plus, on observe l'apparition d'un pic à m/z 514,3, qui a été identifié suite à des expériences de MS/MS in situ comme étant de l'acide taurocholique, un acide biliaire impliqué dans l'émulsification des lipides.

Grâce à l'acquisition d'images à haute résolution spatiale (400 nm), nous avons été capables d'extraire les spectres de régions correspondant aux entérocytes en contact direct avec la lumière de l'intestin et d'une région correspondant au tissu conjonctif localisée plus profondément dans la muqueuse. En comparant l'évolution du profil lipidique au cours de la digestion de ces deux régions, beaucoup de variations sont observées. Ainsi, la quantité relative des acides gras C16:1, C16:0 et C18:0 diminue plus rapidement dans le tissu conjonctif alors que celle de l'acide taurocholique augmente fortement dans la région entérocytes, et que celle des acides gras C18:2 et C18:1 reste constante dans la région tissu conjonctif tandis qu'elle augmente dans la région entérocytes.

Ainsi l'emploi d'une résolution spatiale inférieure au micron en imagerie par spectrométrie de masse donne accès à des localisations très précises de lipides, information très précieuses pour la compréhension des mécanismes biologiques de la digestion.

P3-008

Apport de l'imagerie MALDI pour l'étude de la sclérose amyotrophique latérale (SLA)

S. Deforges(1) • C. Meriaux(2) • M. Salzet(2) • I. Fournier(2) • F. Charbonnier(1) • M. Wisztorski(2)

(1)Université Paris Descartes, Centre Universitaire des Saints-Pères, Centre d'études de la Sensori-Motricité, CNRS UMR 8194,

Equipe Dégénérescence et Plasticité Neuro-musculaire, Paris, France • (2)Université Lille Nord de France, CNRS FRE 3249,

Laboratoire de Neuroimmunologie et Neurochimie Evolutive, MALDI Imaging Team, Université de Lille 1, Villeneuve d'Ascq, France.

Introduction :

La sclérose amyotrophique latérale (SLA) est une maladie neurodégénérative caractérisée par la mort des motoneurons associée à la perte des fonctions musculaires. Les symptômes apparaissent à l'âge adulte et se développent rapidement jusqu'à la paralysie et la perte des fonctions respiratoires. Malgré les efforts consentis ces dernières années dans le domaine, les nombreuses études ne parviennent pas à expliquer les effets différents, parfois opposés, de l'exercice physique dans la SLA. En particulier, les mécanismes cellulaires et moléculaires conditionnant ces effets restent inconnus. Deux protocoles d'exercices ont été développés chez la souris qui, appliqués dans un modèle de SLA, donnent des résultats différents en terme de durée de vie et de neuroprotection (Deforges et al., 2009). Contrairement à un programme de course modérée sur tapis roulant, un programme de nage forcée retarde considérablement la mort des souris SLA et semble protéger les motoneurons spinaux de surface moyenne.

Méthodes :

Des souris B6SJL-tg(SOD1-G93A)1Gur/J modèles de la SLA ont été soumises ou non à un entraînement à la nage. La région lombaire de la moelle épinière a été prélevée au cours de la phase symptomatique à 115 jours. Sur coupes de 12µm d'épaisseur, différentes préparations de l'échantillon ont été réalisées par un dépôt de matrice par spray (Imageprep, Bruker Daltonics). Des analyses en imagerie MALDI à une résolution de 80x80µm² ont été réalisées dans des conditions spécifiques à l'étude de différents composés grâce à un Ultraflex II TOF-TOF (Bruker Daltonics). Les données ont été soumises à des analyses statistiques de type composante principale ou analyse hiérarchique.

Résultats préliminaires :

Dans le cadre de cette étude, l'imagerie MALDI a été utilisée pour étudier les modifications impliquées dans les neurones activés spécifiquement par l'entraînement et ainsi mieux comprendre les bénéfices de l'exercice de nage. L'utilisation d'outils statistiques nous a notamment permis de discriminer des profils spécifiques entre substances blanche et grise de moelle épinière de souris contrôles et de souris SLA sédentaires ou entraînées à la nage.

L'analyse de ces modifications est actuellement en cours et permettra d'identifier les mécanismes induits par la nage et par conséquent de relier l'activation de certaines voies de signalisation à l'amélioration motrice des souris SLA. Cette approche pourrait permettre de proposer des molécules candidates pour des essais thérapeutiques de la SLA.