



# **Imagerie par spectrométrie de masse de l'accumulation d'acide okadaïque dans la glande digestive de la moule**

**Anaïs SAM LONE**

## **Rapport de Stage de Master 2**

**Préparé au sein de l'équipe de spectrométrie de masse du Dr. Alain Brunelle**

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Centre National de Recherche Scientifique

**1<sup>er</sup> Février 2016 / 29 Juillet 2016**



## FICHE DOCUMENTAIRE

### Abstract :

Among the applications that facilitate the study of functional processes in living systems, measurement of the spatial distribution of molecules in biological tissues is currently available.

Thus, in the field of human health, this application which targets the molecular distributions of altered tissues can be used, for example, in the diagnosis of diseases such as cancers, Alzheimer's disease, muscular myopathy, but also to recognize the distribution of drugs in animal tissues.

The principle of imaging by mass spectrometry is to produce a mapping of the surface of a section of tissue, recording at each point a mass spectrum. All these spectra reconstitute so many "ion density maps", called images, that there are peaks of biological interest in the spectra. Previous studies published by the Institute of Chemistry of Natural Substances (CNRS UPR2301) have shown the interest of localized analyzes for the study of plaques of atheroma, steatosis and liver cirrhosis, or genetic diseases such as Fabry, Duchenne muscular dystrophy, cystic fibrosis.

The study reported here, carried out in collaboration with the Phycotoxins laboratory at Ifremer in Nantes, allowed to deepen tests obtained in a study aiming at detecting and locating the okadaic acid (AO) in mussels and giving promising results (Guitton, Mondeguer et al., 2012).

AO is one of the dinophysistoxins produced by dinoflagellates of the genus *Prorocentrum* and *Dinophysis*. This diarrhetic toxin, predominantly bio-concentrated in mussels digestive glands (Blanco, Morono et al., 2005), is a secondary metabolite synthesized by the microalgae. Studies conducted to date with biochemical tools to locate toxins in a subcellular manner and search for markers related to the presence of toxins have not led to major advances. Concerning the link between the AO and its sequestration site in bivalves, most of the studies carried out on mussels show that a large part of the AO that is easily detachable is related to the digestive cells while a smaller fraction of okadaic acid, perhaps a lipoprotein (Rossignoli and Blanco, 2010), would be strongly related to the secretory cells of the digestive gland.

MALDI-TOF mass spectrometry imaging using a Bruker UltrafleXtreme mass spectrometer was the tool used to attempt to detect and quantify okadaic acid on digestive gland of toxic mussel cross-section surface. Changes in the lipid composition were also investigated.

TOF-SIMS mass spectrometry imaging was also used to attempt more accurate micron scale locations

### Mots-clés :

Imagerie par spectrométrie de masse ; MALDI-TOF ; TOF-SIMS ; Acide okadaïque ; Glande digestive ; *Mytilus edulis*

### Words keys :

Imaging by mass spectrometry; MALDI-TOF; TOF-SIMS; Okadaic acid; Digestive Gland; *Mytilus edulis*

## **Remerciements**

Je souhaite tout d'abord remercier le Dr. Alain Brunelle pour m'avoir accueillie dans son équipe, pour ses conseils et pour m'avoir transmis tout ce que je sais maintenant en imagerie par spectrométrie de masse.

Je remercie chaleureusement Nicolas Elie pour sa patience, sa disponibilité et son encadrement. L'acide okadaïque nous aura vraiment donné du fil à retordre...

J'adresse mes sincères remerciements à Florence Mondeguer pour nous avoir fourni les échantillons et pour ses précieuses informations sur les bivalves.

Merci également au Dr. David Touboul pour sa pédagogie et son sens critique, à Jean-Pierre Le Caer et Vincent Guérineau pour m'avoir formée aux différents appareillages et enfin à Laurent Laboureur et Tingting Fu pour la bonne humeur qui règne au sein de notre bureau.

# Sommaire

Abréviations

Introduction	1
I. Imagerie par spectrométrie de masse	2
I.1. Généralités	2
I.2. Imagerie MALDI-TOF	2
I.3. Imagerie TOF-SIMS	3
II. Préparation des échantillons	3
II.1. Prélèvement et congélation des glandes digestives de moules	4
II.1.a. Dissection des moules	4
II.1.b. Congélation des glandes digestives	4
II.2. Coupes de glandes digestives : utilisation du cryostat	4
II.2.a. Température du cryostat	4
II.2.b. Orientation de la coupe	5
II.2.c. Protocole optimisé	5
II.3. Anatomie des glandes digestives de moules	6
II.3.a. Coloration hématoxyline-éosine : protocole et résultats	6
II.4. Spray de matrice et étalonnage des spectres	7
II.4.a. Protocole général pour le spray de matrice	7
II.4.b. Étalonnage du spectromètre	9
III. Résultats	9
III.1. Analyse de coupes de glandes digestives de moules saines et infectées	9
III.1.a. Analyse par TOF-SIMS	9
III.1.b. Imagerie MALDI-TOF	10
III.2. Analyse d'une solution commerciale d'acide okadaïque	10
III.2.a. Analyse par MALDI-TOF	10
- Mélanges matrice/analyte à un ratio de 10/1 en volume	11
- Mélanges matrice/analyte à un ratio de 1/1 en volume	12
- Spectres MS/MS de l'acide okadaïque	13
- Effet des sels de lithium	14
- Bilan des tests MALDI-TOF	15
III.2.b. Analyse par TOF-SIMS	15
- Utilisation de la source argon	15
- Vérification de la détectabilité de la molécule	15
- Optimisation des paramètres du floodgun	17
- Utilisation de sels de lithium	17
- Analyse d'une coupe après rinçage à l'eau MilliQ	18
- Dépôt d'acide okadaïque sur une coupe de cerveau de rat	18
Conclusion et perspectives	18
Références bibliographiques	20

## **Abréviations**

9-AA : 9-aminoacridine

CHCA: acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique

Da : Dalton

DHB: acide 2,5-dihydroxybenzoïque

eV: électron-volt

g: gramme

HE: hématoxyline-éosine

HPLC-MS: High Pressure Liquid Chromatography - Mass Spectrometry

ITO: Indium-tin-oxide

L: litre

MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight

min: minute

mL: millilitre

mol: mole

MS/MS: fragmentation par spectrométrie de masse

$m/z$ : rapport masse/charge d'une molécule

OA: acide okadaïque

OCT: Optimal Cutting Temperature

psi: pound per square inch (unité de pression)

TFA: acide trifluoroacétique

TOF-SIMS : Time Of Flight - Secondary Ion Mass Spectrometry

u.a.: unités arbitraires

$\mu$ g: microgramme

$\mu$ L: microlitre

$\mu\text{m}$ : micromètre

$\mu\text{M}$ : micromolaire

UV: Ultraviolet

## Introduction

L'acide okadaïque est une phycotoxine produite par des micro-algues (dinoflagellés) de type *Prorocentrum* ou *Dinophysis* ([1] Barbier *et al.*, 1999) s'accumulant dans les glandes digestives des bivalves ([2] Guéguen *et al.*, 2009) et qui est impliquée dans les intoxications diarrhéiques par les fruits de mer.

Cette molécule, de formule brute  $C_{44}H_{68}O_{13}$  et de masse moléculaire 805 g/mol, est un polyéther d'acide gras ayant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des Serine/Thréonine phosphatases issues d'Eucaryotes (protéines PP1 et PP2A, [3] Mondeguer, 2002).

Néanmoins, c'est une des toxines les moins dangereuses, de par son faible taux de morbidité, même si c'est celle ayant le plus fort impact économique et sociétal du fait de la comestibilité des bivalves.

Afin de comprendre le processus physiologique d'élimination de la toxine chez les bivalves, une localisation précise de l'acide okadaïque et la caractérisation de ses potentiels partenaires d'interaction sont nécessaires, l'organisme modèle généralement utilisé pour ces études étant *Mytilus galloprovincialis* (ou « moule méditerranéenne »).

L'acide okadaïque ne possédant aucune propriété de fluorescence et un spectre UV aspécifique, son étude par ces techniques nécessite sa dérivatisation. La dérivatisation de la toxine étant difficile à réaliser du fait de l'instabilité du réactif de dérivatisation et de l'étape chromatographique de purification de la toxine dérivée, l'étude de l'acide okadaïque est généralement effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ([3] Mondeguer, 2002).

Des études préliminaires montrent que la cinétique d'élimination de l'acide okadaïque peut être décrite par un modèle à « deux compartiments » suggérant l'existence de deux formes de toxines dans les glandes digestives, l'une des deux étant plus difficile à éliminer que l'autre ([4] Blanco *et al.*, 1999).

Sachant que les tubules digestifs (composants des glandes digestives) comportent deux types de cellules, les cellules digestives et les cellules sécrétrices, qui accumulent l'acide okadaïque à des degrés différents, la variabilité d'élimination des deux formes de toxine peut s'expliquer par leur séquestration dans des types de cellules différents ou bien par leur liaison à des composants cellulaires différents.

Expérimentalement, il a été constaté que l'accumulation d'acide okadaïque est plus importante dans les cellules digestives que dans les cellules sécrétrices, juste après une contamination. Cependant, après quelques jours de dépuración, les cellules sécrétrices deviennent le site d'accumulation majoritaire ([5] Rossignoli et Blanco, 2008).

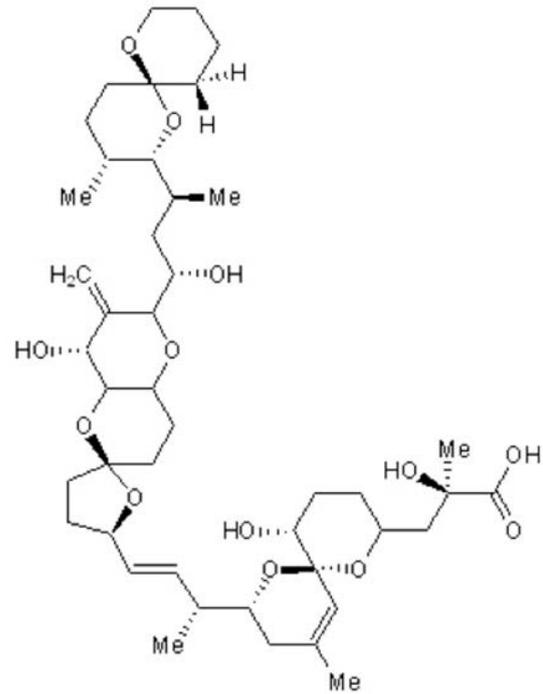


Figure 1 : Structure chimique de l'acide okadaïque.

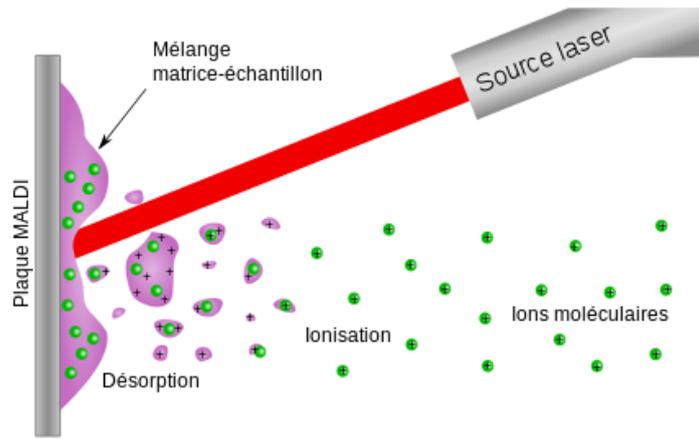


Figure 2 : Schéma illustrant le principe de la désorption-ionisation.

La variabilité d'élimination des deux formes d'acide okadaïque n'est donc pas liée à leur séquestration dans des cellules différentes mais semble être causée par une liaison à un composé cellulaire.

L'étude par ultracentrifugation couplée à une analyse HPLC-MS d'acide okadaïque extrait de glandes digestives de moules *Mytilus galloprovincialis* infectées met en évidence l'existence d'une interaction entre l'acide okadaïque et un composé cellulaire ayant une masse comprise entre 30 et 300 kDa.

Des expériences de digestion (en présence d'une protéase, d'une lipase ou d'une amylase) suivie d'une ultrafiltration ont été effectuées pour déterminer la nature de l'espèce liée à l'acide okadaïque qui semble être une lipoprotéine de haute densité ([6] Rossignoli et Blanco, 2010).

Afin de prévenir les épisodes d'intoxication diarrhéique par les fruits de mer, des marqueurs de contamination à l'acide okadaïque sont recherchés. Dans le cadre de ce projet, effectué en collaboration avec le laboratoire Phycotoxines de l'Ifremer à Nantes, il m'a été demandé de localiser l'acide okadaïque et de rechercher d'éventuelles modifications de lipides, en imagerie par spectrométrie de masse, sur des coupes de glandes digestives de moules *Mytilus galloprovincialis* infectées.

## **I. Imagerie par spectrométrie de masse**

### 1. Généralités.

L'imagerie par spectrométrie de masse est une technique analytique permettant la « cartographie » de la surface d'une coupe biologique par enregistrement de spectres de masse successifs : à chaque point de la coupe de coordonnées (x, y) correspond un spectre de masse.

Après traitement informatique des données, des « cartes de densité ionique » appelées images peuvent être reconstruites pour les différents pics d'intérêt biologique, permettant ainsi leur localisation spatiale sur l'échantillon analysé.

Les deux appareillages majoritairement utilisés en imagerie par spectrométrie de masse sont le MALDI-TOF et le TOF-SIMS.

### 2. Imagerie MALDI-TOF.

L'analyse par MALDI-TOF est basée sur le principe de désorption-ionisation des molécules (*figure 2*) suite à un tir laser sur un mélange matrice-échantillon.

Contrairement à l'analyse MALDI « classique » où l'échantillon en solution est co-cristallisé avec la matrice sur une surface, l'échantillon analysé en imagerie MALDI est généralement une coupe biologique. De ce fait, la matrice est déposée, sous forme de spray, sur la surface de l'échantillon à l'aide d'un « robot sprayer », pour permettre l'obtention d'une couche homogène de cristaux.

Les ions émis suite à l'impulsion laser sont ensuite focalisés grâce à un système de lentilles et envoyés dans le tube de vol avant d'arriver au détecteur (linéaire ou réflectron).

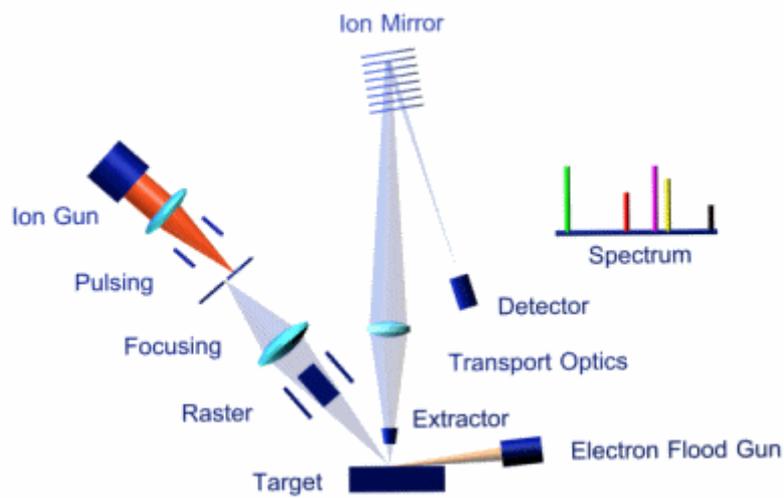
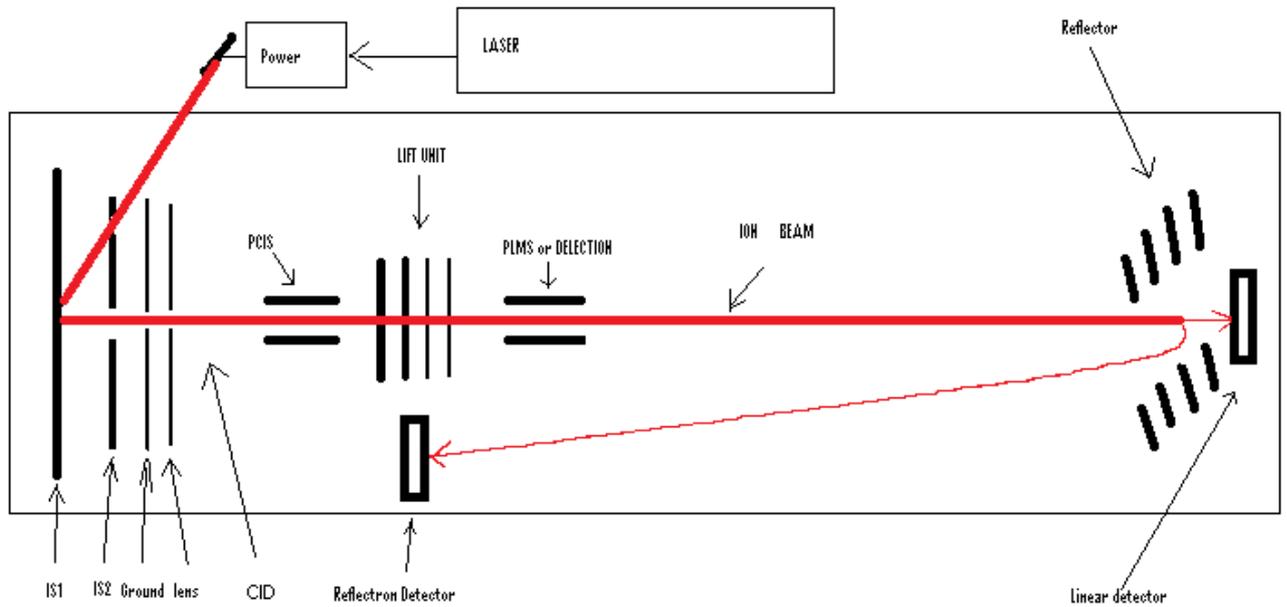


Figure 4 : Représentation schématique du TOF-SIMS IV (Ion-Tof GmbH).

La reconstruction des images s'effectue après acquisition des données, à l'aide du logiciel « flexImaging » associé au spectromètre de masse.

L'appareillage utilisé au laboratoire est le MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme de chez Bruker Daltonics (dont le schéma de principe est présenté en *figure 3*), qui permet l'analyse d'une large gamme de molécules, avec une résolution spatiale déterminée par la largeur du faisceau laser comprise entre 10  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$  (les réglages disponibles étant « small », « medium » ou « large »).

Après introduction de l'échantillon (qui se place au niveau de la surface notée « IS1 »), un tir laser est effectué, provoquant la désorption des molécules. Grâce aux différences de potentiel appliquées entre « IS1 », « IS2 » et « lens », les ions sont focalisés et acheminés vers le tube de vol où leur séparation s'effectue.

### 3. Imagerie TOF-SIMS.

L'imagerie par TOF-SIMS repose sur le bombardement de l'échantillon biologique par un faisceau d'ions primaires (noté « ion gun » sur la *figure 4*), provoquant ainsi l'émission d'ions secondaires (issus de la coupe biologique) analysés par le détecteur pour conduire au spectre de masse.

Afin de compenser les charges émises suite au bombardement de la coupe, un faisceau d'électrons (noté « electron flood gun » sur la *figure 4*) est émis, limitant l'apparition « d'effets de bords » (dus à cette accumulation de charges) sur l'image reconstruite et les risques d'arcs électriques.

L'appareil utilisé au sein du laboratoire est un TOF-SIMS IV de la société Ion-Tof GmbH (dont le schéma de principe est présenté en *figure 4*). Cet appareil permet l'obtention de résolutions spatiales de l'ordre du micromètre (environ 2  $\mu\text{m}$ ) mais est limité à l'analyse de petites molécules (tels que les lipides) puisque la gamme de masse s'étend généralement de 1 à 2000 Da.

L'analyse par TOF-SIMS est une analyse de surface puisque les ions primaires (composés d'agrégats de bismuth  $\text{Bi}_3^+$ ) ne pénètrent l'échantillon que sur quelques centaines de nanomètres au maximum, et que les ions secondaires émis ne proviennent que des 10 premiers nanomètres de l'épaisseur de la coupe analysée.

Néanmoins, l'appareillage que nous utilisons dispose également d'une source argon permettant de creuser la surface de l'échantillon. En utilisant alternativement les faisceaux d'agrégats de bismuth et d'agrégats d'argon, l'échantillon peut être analysé sur une épaisseur plus élevée (quelques dizaines de nanomètres), malgré un temps d'acquisition très élevé.

## **II. Préparation des échantillons.**

La méthodologie de préparation d'échantillon a été développée sur des glandes digestives isolées à partir de moules *Mytilus edulis* (espèce légèrement différente de celle étudiée par la suite) non infectées par de l'acide okadaïque.

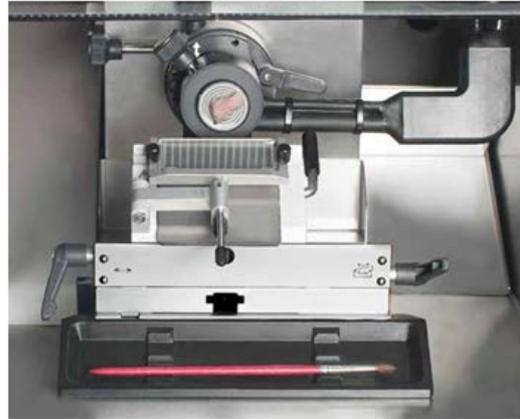


Figure 5 : Cryostat CM3050-S (Leica).

## 1. Prélèvement et congélation des glandes digestives de moules.

### a. Dissection des moules.

À l'aide d'un scalpel, sectionner le muscle adducteur postérieur et ouvrir délicatement la moule en deux.

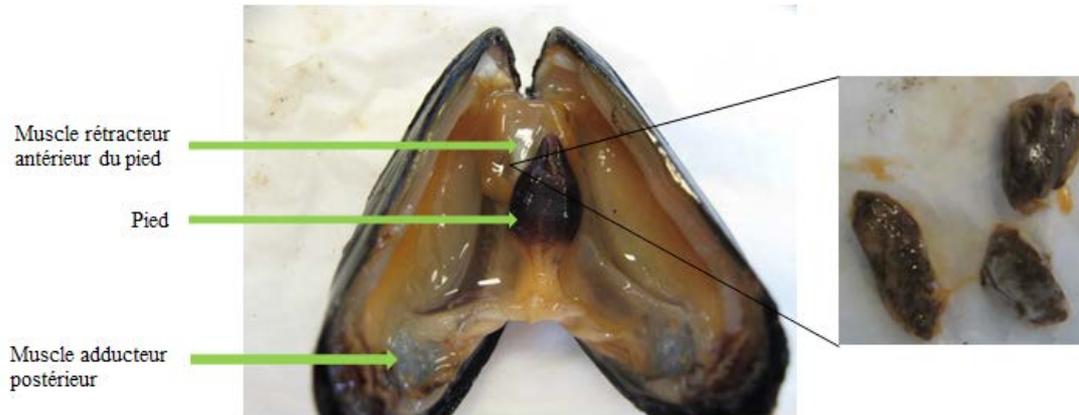


Figure 6 : Anatomie de la moule *Mytilus edulis* et extraction de la glande digestive.

Soulever le pied et couper les muscles rétracteurs antérieurs du pied situés au-dessus de la glande digestive. Couper le manteau (chairs orangées) entourant la glande digestive pour pouvoir l'extraire.

### b. Congélation des glandes digestives.

Refroidir un petit béccher rempli d'isopentane ( $T_{\text{fusion}} = -160^{\circ}\text{C}$ ) dans un vase Dewar contenant de l'azote liquide.

Lorsque la solution d'isopentane forme une couronne blanche (qui ne se dissipe pas par agitation), sortir le béccher du vase Dewar, saisir une glande digestive à l'aide d'une pince et la plonger dans la solution d'isopentane.

Laisser congeler quelques secondes avant de récupérer la glande et de la placer dans un tube en plastique. Refroidir le tube dans l'azote liquide puis conserver à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Coupe de glandes digestives : utilisation du cryostat.

Le protocole de préparation d'échantillon présenté en *partie c.* a été établi par utilisation du cryostat CM3050-S de l'entreprise Leica (*figure 5*).

L'épaisseur des coupes est choisie de manière à ce que cette dernière ne soit ni trop épaisse, afin de limiter le risque d'avoir un échantillon isolant, ni trop fine, de manière à conserver l'intégrité de la coupe et à éviter l'obtention d'un signal de faible intensité.

En se basant sur les résultats précédemment obtenus au laboratoire lors de l'étude des lipides dans des cerveaux de souris, l'épaisseur de la coupe a été réglée à 14 microns.

### a. Température du cryostat.

La gamme de température testée s'étend de  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $-36^{\circ}\text{C}$ . Les essais réalisés permettent d'établir les conclusions suivantes :

- Entre  $-20^{\circ}\text{C}$  et  $-30^{\circ}\text{C}$ , il n'est pas possible de réaliser des coupes : l'échantillon étant trop décongelé, il s'écrase sur la lame de coupe.
- La température de coupe optimale est  $-33^{\circ}\text{C}$ .

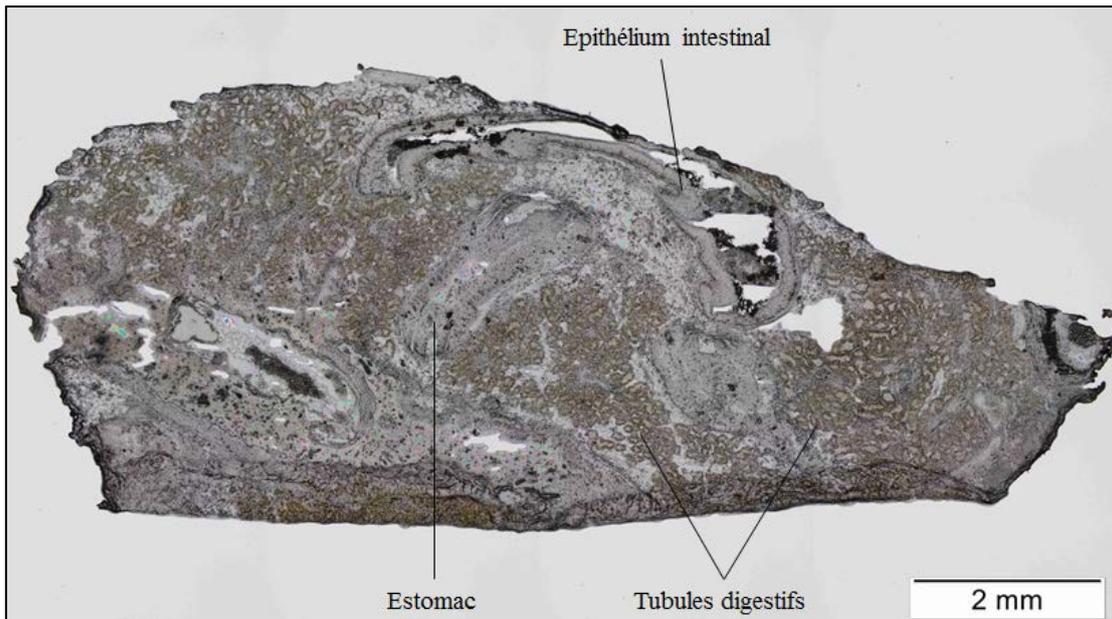


Figure 7 : Coupe longitudinale d'une glande digestive de moule saine (*Mytilus edulis*).

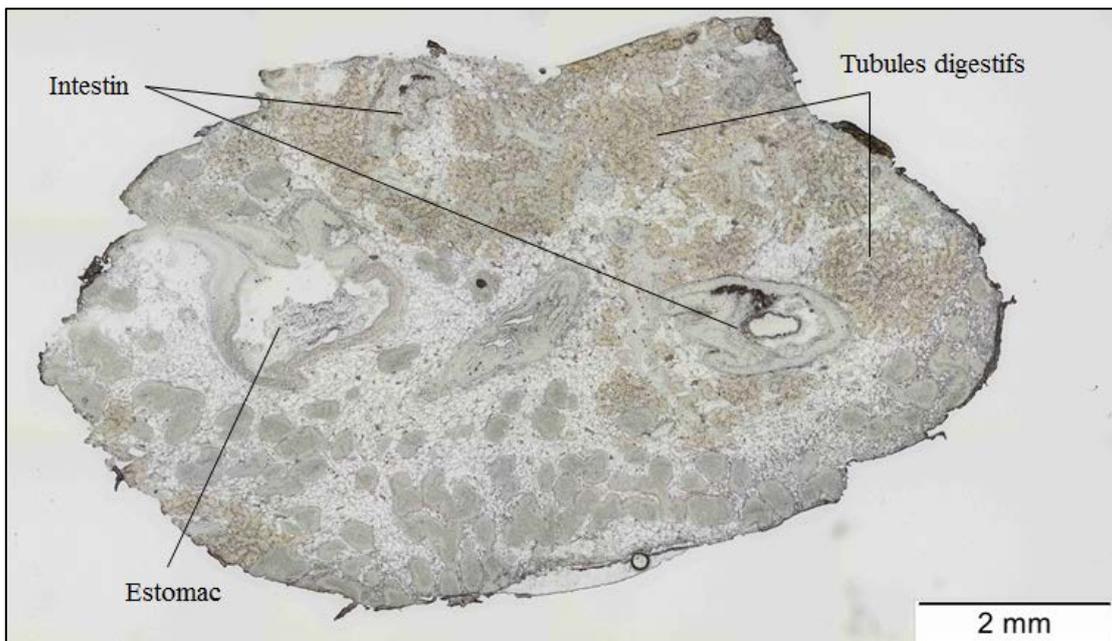


Figure 8 : Coupe diagonale d'une glande digestive de moule saine (*Mytilus edulis*).

### b. Orientation de la coupe.

Une coupe longitudinale (*figure 7*) de la glande digestive ne permet pas une bonne observation des différents éléments qui la composent, tel que l'estomac ou l'intestin. Néanmoins, les tubules digestifs, petites cellules de couleur jaune et lieu de stockage présumé de l'acide okadaïque, sont bien visibles.

La coupe en diagonale (*figure 8*) d'une glande digestive permettant une meilleure observation des différentes structures de la glande digestive (estomac, intestin et parfois tige cristalline) ainsi qu'une bonne observation des tubules digestifs (petites cellules de couleur jaune), nous avons retenu cette orientation de coupe pour la préparation des échantillons.

### c. Protocole optimisé.

Sortir l'échantillon du congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$  et laisser réchauffer, dans le cryostat, environ 30 min à  $-33^{\circ}\text{C}$ .

À l'aide de colle OCT, fixer l'échantillon sur une rondelle de liège puis fixer la rondelle de liège sur le support métallique. Placer le support dans le portoir de coupe et ajuster l'orientation de l'échantillon de façon à obtenir une coupe plane.



Figure 9 : Porte échantillon du cryostat.

Tester les réglages en effectuant une à deux coupes en mode « trim » (coupes de 50 microns d'épaisseur). Si le résultat est satisfaisant, enlever le mode « trim » et effectuer quelques coupes à 14 microns pour régulariser la surface (les coupes à 50 microns créent des dégradations à la surface de l'échantillon).

Rabattre la lame « anti-roll » (lame en verre qui permet d'éviter que la coupe s'enroule sur elle-même) sur le réceptacle de coupe et couper l'échantillon.

Soulever délicatement la lame « anti-roll » puis étaler précautionneusement la coupe à l'aide d'un pinceau. Lorsque toutes les coupes ont été effectuées, rabattre le support (lame ITO, galette de silicium ou lame en inox) sur les coupes pour les transférer.

Placer le support contenant les coupes dans une boîte de Pétri et déshydrater au dessiccateur environ 10 min. Pendant ce temps, décoller l'échantillon et sa rondelle de liège du support métallique en découpant la colle à l'aide d'un scalpel. Enrouler l'échantillon dans du papier aluminium et le placer dans un tube en plastique avant de le conserver au congélateur à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

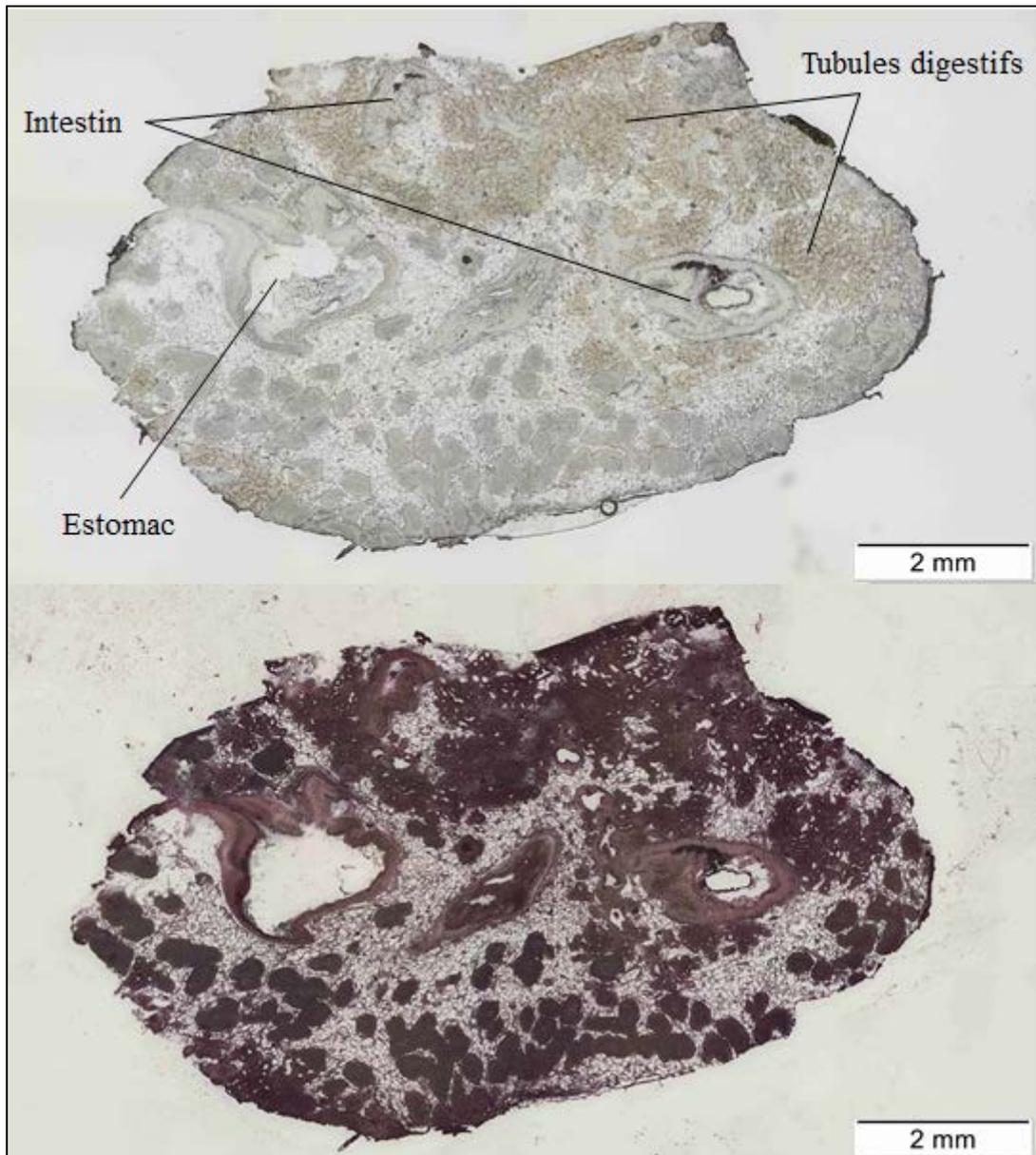


Figure 10 : Coupe diagonale d'une glande digestive de moule saine (*Mytilus edulis*) avant et après coloration HE.

Vérifier la qualité de la coupe par observation microscopique et enregistrer une image pour en garder une référence. Si la coupe est utilisée en MALDI, il faut également scanner la lame, l'image scannée servant à l'alignement du laser sur la coupe.

Si la coupe n'est pas analysée dans la journée, placer la lame dans une boîte de Pétri entourée de papier aluminium puis dans un sac congélation hermétique rempli d'azote et conserver au réfrigérateur à -20°C. Lors de la décongélation, laisser sous atmosphère d'azote pour éviter la formation de gouttelettes d'eau par condensation ou décongeler au dessiccateur.

Dans un souci de compatibilité avec le porte-échantillon de notre spectromètre MALDI Bruker, les coupes analysées par MALDI-TOF doivent être déposées sur des lames ITO (lames en verre rendues conductrices grâce au dépôt d'une fine couche d'oxyde d'indium mélangé à de l'étain sur l'une des faces).

Si l'analyse est effectuée par TOF-SIMS, l'échantillon peut être déposé sur différents types de supports conducteurs tels que les lames en inox, les galettes de silicium ou les lames ITO.

### 3. Anatomie des glandes digestives de moules.

Afin de mettre en évidence de potentielles différences de populations cellulaires dans le but d'établir des zones d'études préférentielles, des coupes de glandes digestives de moules ont été colorées (coloration hématoxyline-éosine).

#### a. Coloration hématoxyline-éosine (HE) : protocole et résultats.

Le protocole établi ci-dessous correspond au protocole optimisé. Les temps d'immersion de la lame dans les différentes solutions ont été ajustés afin que les tissus ne subissent pas une trop forte dégradation à l'issue de la coloration.

- Coloration dans de l'hématoxyline de Harris pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau du robinet (sous le jet, lame retournée).
- Elimination de l'excès de colorant par incubation dans une solution d'acide-alcool à 1% (= 10 mL HCl 37% dans 1 L d'alcool à 70%) pendant 30 secondes.
- Rinçage à l'eau du robinet (sous le jet, lame retournée).
- Contre coloration dans de l'éosine Y à 1%, acidifiée (= 0.5 mL acide acétique glacial pour 100 mL d'éosine) pendant 30 secondes.
- Déshydratation, 5 secondes dans chaque bain :
  - 2 bains d'alcool à 70%.
  - 2 bains d'alcool à 95%.
  - 2 bains d'alcool à 100%.
  - 2 bains de toluène.

La coloration de la coupe de glande digestive de moule saine (*figure 10*) permet la mise en évidence de structures telles que l'estomac ou l'intestin. L'intensité de coloration semble homogène mais les différents types cellulaires sont distinguables (tubules digestifs / « cellules de grande taille »).

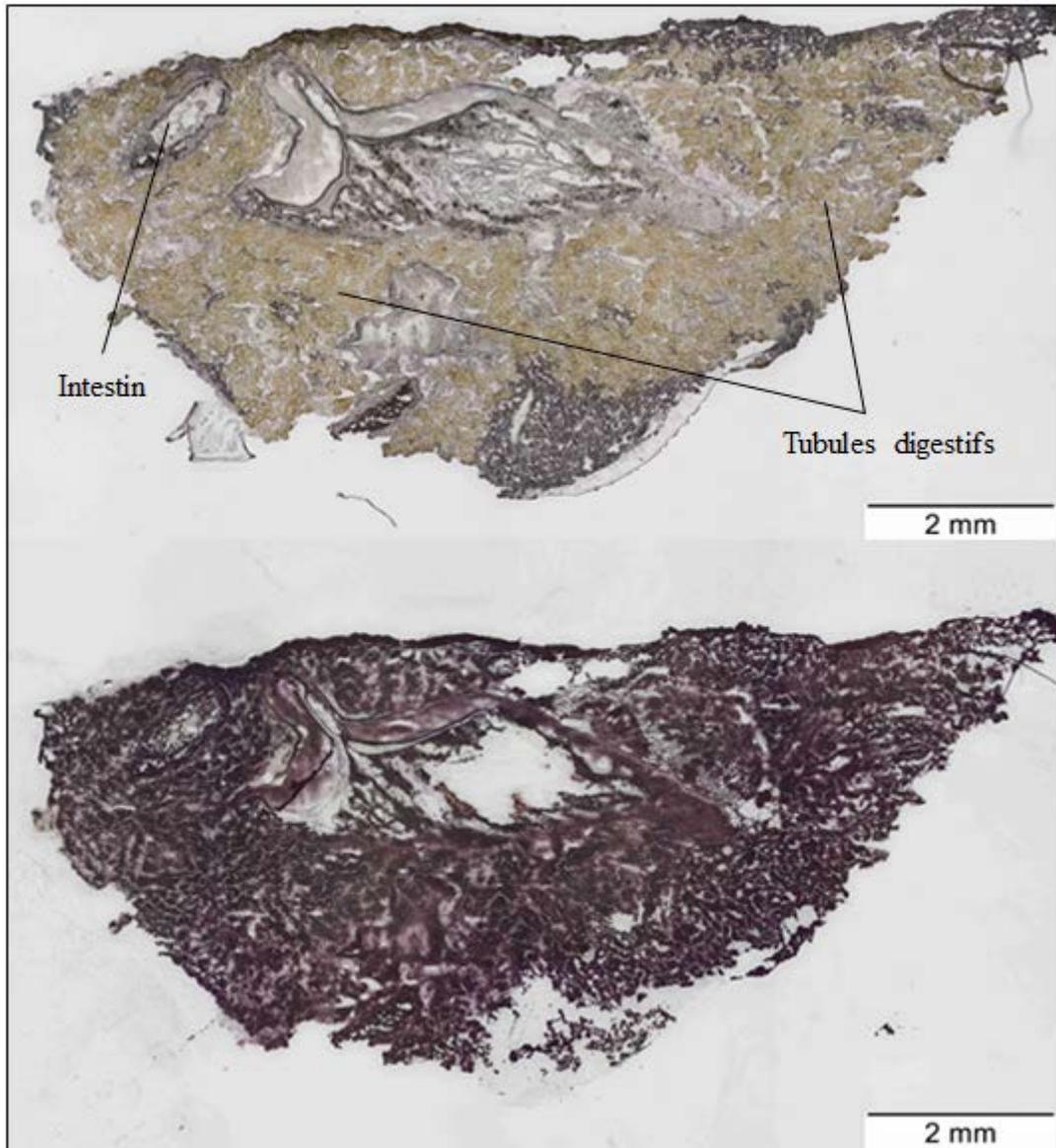


Figure 11 : Coupe diagonale d'une glande digestive de moule infectée (*Mytilus galloprovincialis*) avant et après coloration HE.

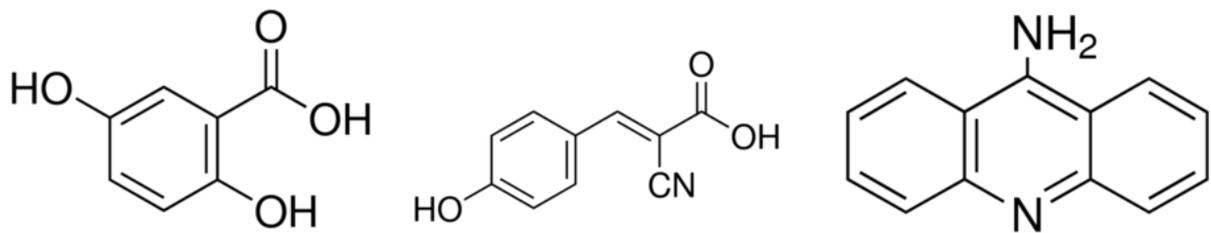


Figure 12 : Structure chimique des matrices : à gauche la DHB, au centre la CHCA et à droite la 9-AA.

La coloration de la coupe de glande digestive de moule infectée (*figure 11*) montre un résultat plus mitigé : les structures telles que l'estomac ou l'intestin sont peu visibles et l'observation microscopique (de la coupe avant coloration) montre un seul type cellulaire (tubules digestifs).

#### 4. Spray de matrice et étalonnage des spectres.

L'analyse d'un échantillon par MALDI nécessite au préalable un dépôt de matrice, généralement réalisé par un robot sprayer (TM-Sprayer de chez HTX Technologies) afin d'obtenir un spray de cristaux de matrice de taille et d'épaisseur homogènes.



Figure 13 : TM-Sprayer (HTX Technologies).

Les matrices utilisées dépendent de la nature des molécules recherchées ainsi que de la polarité de l'analyse. Les molécules ciblées lors de nos études étant des lipides, les matrices utilisées sont l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique ou CHCA (détection en positif), la 9-aminoacridine ou 9-AA (détection en négatif) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque ou DHB (détection en positif et en négatif) dont les structures chimiques sont présentées en *figure 12*.

Tableau 1 : Préparation des matrices.

	CHCA	9-AA	DHB
<b>Solvant de matrice (v/v)</b>	Acétonitrile/H <sub>2</sub> O/TFA 70/30/0.1	EtOH/H <sub>2</sub> O 70/30	MeOH/H <sub>2</sub> O 50/50
<b>Concentration (mg/mL)</b>	10	10	40

##### a. Protocole général pour le spray de matrice.

Ouvrir la bouteille d'azote, mettre en marche le sprayer et la pompe puis démarrer le logiciel « TM-Sprayer ». Démarrer la pompe en appuyant sur le bouton « start/stop flow ».



Indiquer le type de lame utilisé (lames ITO) au logiciel (fichier « Glass slide 75x44 mm ») puis charger la méthode (fichier regroupant les paramètres énumérés dans le *tableau 2*) correspondant à la matrice à sprayer (« hcca-75-glassslide-2pass.mth » pour la CHCA, « 9-AAglassslide.mth » pour la 9-AA ou « DHB-8pass-drytime.mth » pour la DHB).

Rincer le système à l'éthanol absolu pendant 10 min à un débit de 0.75 mL/min, avec la vanne en position « spray », ce qui permet de rincer la boucle d'injection. Régler la température du nozzle (cf. valeur du *tableau 2*) et vérifier, sur la façade du sprayer, que la pression est de 10 psi.

Préparer la solution de matrice (cf. *tableau 1*). Il faut un peu plus de 5 mL pour remplir entièrement la boucle d'injection.

*N.B. Les matrices étant sensibles à la lumière, il est préférable de les préparer juste avant utilisation. Pour la CHCA et la DHB, un mélange au vortex suivi de 5 min de sonication suffit à l'homogénéisation. Pour la 9-AA, la concentration étant saturante, il est nécessaire de centrifuger le tube (environ 10 min) afin d'en récupérer le surnageant et de préparer une plus grande quantité de matrice pour pallier les pertes à l'issue de l'étape de centrifugation.*

Descendre le débit de la pompe (cf. valeurs du *tableau 2*), rincer la seringue à l'éthanol absolu (afin de faciliter le prélèvement de la matrice) et placer la vanne en position « load » pour charger la matrice dans la boucle d'injection.

Déposer la plaque à recouvrir de matrice dans le coin supérieur droit du portoir et la maintenir à l'aide d'un petit morceau d'adhésif.

Placer la vanne en position « spray » et attendre que la matrice arrive au nozzle (le spray prend la teinte de la matrice) avant de démarrer le spray (cliquer sur « start » puis sur « start now »).

Le système se met en « standby » lorsque le robot a effectué tous les passages. Laisser sécher quelques instants avant de retirer la plaque du sprayer.

Rincer le système avec le mélange de solvants de la matrice (pour CHCA, utiliser un mélange de solvants sans acide) à un débit de 0.75 mL/min pendant 30 min (vanne en position « spray » pour nettoyer la boucle) puis à l'éthanol absolu pendant 30 autres minutes, toujours à un débit de 0.75 mL/min.

Nettoyer l'intérieur du sprayer, régler le débit à 0.24 mL/min et la température à 30°C. Lorsque la température du nozzle atteint les 30°C, éteindre les différents éléments dans le sens inverse d'allumage (logiciel, sprayer et pompe puis fermer la bouteille de gaz).

Vérifier la régularité des cristaux de matrice (taille et forme) et l'homogénéité du spray par observation microscopique et si possible, comparer avec une image de référence.

**Tableau 2 : Réglages du sprayer suivant la matrice utilisée.**

	CHCA	9-AA	DHB
Débit du sprayer (mL/min)	0.24	0.24	0.1
Température du nozzle (°C)	75	75	75

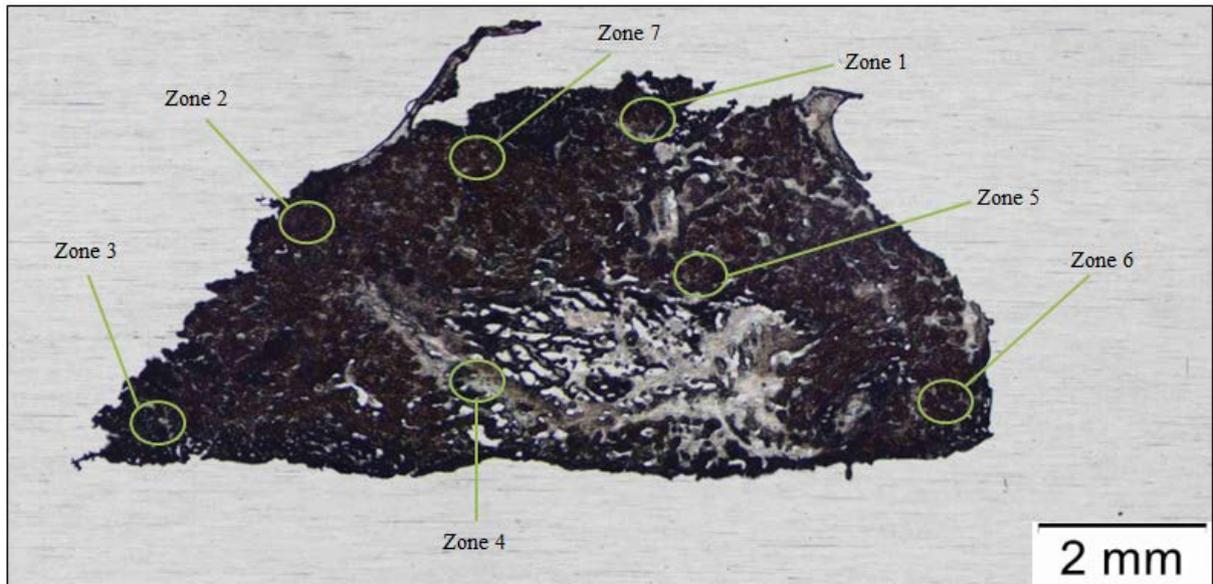


Figure 14 : Zones d'analyses (par TOF-SIMS) de la coupe de glande digestive de moule infectée (*Mytilus galloprovincialis*).

Tableau 3(suite) : Réglages du sprayer suivant la matrice utilisée.

	CHCA	9-AA	DHB
<b>Nombre de couches</b>	2	1	8 ou 12
<b>Temps de séchage entre les couches (min)</b>	0.5	0	0.6
<b>Vitesse de spray (mm/min)</b>	1250	1250	950
<b>Espace entre les lignes de spray (mm)</b>	1.5	1.5	3

#### b. Étalonnage du spectromètre.

L'étalonnage des spectres est réalisé à l'aide d'un mélange standard de peptides, le « pepmix5 » de LaserBio Labs, dont la composition est la suivante :

- Bradykinine [1-5]  $m/z$  573,31
- Bradykinine [1-7]  $m/z$  757,39
- Bradykinine  $m/z$  1060,56
- Angiotensine I  $m/z$  1296,68
- Neurotensine  $m/z$  1672,91

Le mélange de calibration, préparé à partir de 10  $\mu$ L de matrice et d'1  $\mu$ L de pepmix5, est déposé (0.5  $\mu$ L) par-dessus le spray de matrice, sur la coupe et sur la lame afin de réaliser un étalonnage interne et un étalonnage externe.

Les pics de matrice peuvent également servir à l'étalonnage de l'appareil.

- CHCA [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  190,05
- CHCA [2M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  379,09
- DHB M<sub>n</sub>  $m/z$  154,03
- DHB [M+H]<sup>+</sup>  $m/z$  155,03
- 9-AA [M-H]<sup>-</sup>  $m/z$  193,08

Contrairement à l'analyse MALDI, l'analyse par TOF-SIMS ne nécessite ni additifs (matrice ou sels) ni mélanges standards de calibration, l'étalonnage des spectres étant effectué à partir des ions émis (H<sup>+</sup>, H<sub>2</sub><sup>+</sup>, H<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sup>+</sup>, CH<sup>+</sup>, CH<sub>2</sub><sup>+</sup>, CH<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>2</sub>H<sub>3</sub><sup>+</sup> et C<sub>2</sub>H<sub>5</sub><sup>+</sup> en positif et H<sup>-</sup>, C<sup>-</sup>, CH<sup>-</sup>, CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, O<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, C<sub>2</sub><sup>-</sup>, C<sub>2</sub>H<sup>-</sup>, CN<sup>-</sup>, C<sub>3</sub><sup>-</sup> et C<sub>4</sub>H<sup>-</sup> en négatif).

### **III. Résultats.**

#### 1. Analyse de coupes de glandes digestives de moules saines et infectées.

##### a. Analyse par TOF-SIMS.

Des tests préliminaires ont été réalisés sur des glandes digestives saines, avec pour objectif d'effectuer le réglage de l'appareil et d'établir une liste d'ions caractéristiques de la glande digestive.

L'analyse (en positif et en négatif) de différentes zones (*figure 14*) de la coupe de glande digestive de moule infectée n'a pas permis la détection de l'acide okadaïque. Les valeurs de  $m/z$  attendues pour l'acide okadaïque étant les suivantes :

- En négatif : 803,5 ([M-H]<sup>-</sup>)
- En positif : 805,5 ([M+H]<sup>+</sup>), 827,5 ([M+Na]<sup>+</sup>), 843,5 ([M+K]<sup>+</sup>), 849,5 ([M+2Na-H]<sup>+</sup>)



Les zones analysées étant hétéroclites et représentatives de l'échantillon, l'hypothèse d'un « mauvais choix » de zone semble être erronée.

Afin de confirmer (ou infirmer) cette observation, des images de glandes digestives issues de moules saines ou infectées ont été enregistrées par MALDI-TOF.

#### b. Imagerie MALDI-TOF.

Une première acquisition (servant de référence) est effectuée sur toute la surface d'une coupe de glande digestive de moule saine, en matrice CHCA, dans les conditions énumérées ci-dessous :

- Mode : réflectron positif
- Tension d'accélération : 20 kV
- Intervalle de détection :  $m/z$  140-1800
- Nombre de tirs laser : 2000
- Fréquence du laser : 2 kHz
- Diamètre du faisceau laser : medium (environ 40  $\mu\text{m}$ )

L'analyse, dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus, de la coupe de glande digestive de moule infectée ne permet pas la détection de l'acide okadaïque. Le même résultat est obtenu lorsque l'analyse est effectuée en matrice DHB (en mode de détection positif).

Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour expliquer l'absence de détection de l'acide okadaïque sur la coupe de glande digestive infectée :

- L'acide okadaïque est localisé en profondeur et ne serait donc pas extrait par le tir laser.
- La concentration en acide okadaïque est trop faible pour être détectée.
- Le ratio matrice/analyte n'est pas correct : en général, il y a  $10^4$  à  $10^6$  fois plus de molécules de matrice que de molécules d'analyte. Pour les petites molécules, ce rapport est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^4$ .
- La matrice utilisée ne permet pas une bonne ionisation de la molécule.

Pour tenter de pallier la non-détection de l'acide okadaïque, il a été envisagé de diviser une population de moules saines en deux groupes et d'infecter massivement l'un des groupes par addition d'une micro-algue produisant de l'acide okadaïque (*Dinophysis*) dans le milieu de culture, l'autre groupe servant de témoin.

Cependant, l'expérience ne peut pas être mise en place par nos collaborateurs de l'Ifremer puisque la culture du *Dinophysis* est difficile et ne permet pas l'obtention de quantités suffisantes (et fortement toxiques) pour la nutrition des moules.

À titre de comparaison, les cultures de *Prorocentrum lima* (autre micro-algue productrice d'acide okadaïque) permettent la contamination des moules à environ 1  $\mu\text{g}$  d'acide okadaïque par gramme de glande digestive alors que les moules utilisées lors de nos analyses contiennent entre 2,41 et 3,21  $\mu\text{g}$  d'acide okadaïque par gramme de glande digestive.

## 2. Analyse d'une solution commerciale d'acide okadaïque.

La solution commerciale d'acide okadaïque utilisée est à une concentration de 17  $\mu\text{M}$  dans le méthanol.

### a. Analyse par MALDI-TOF.

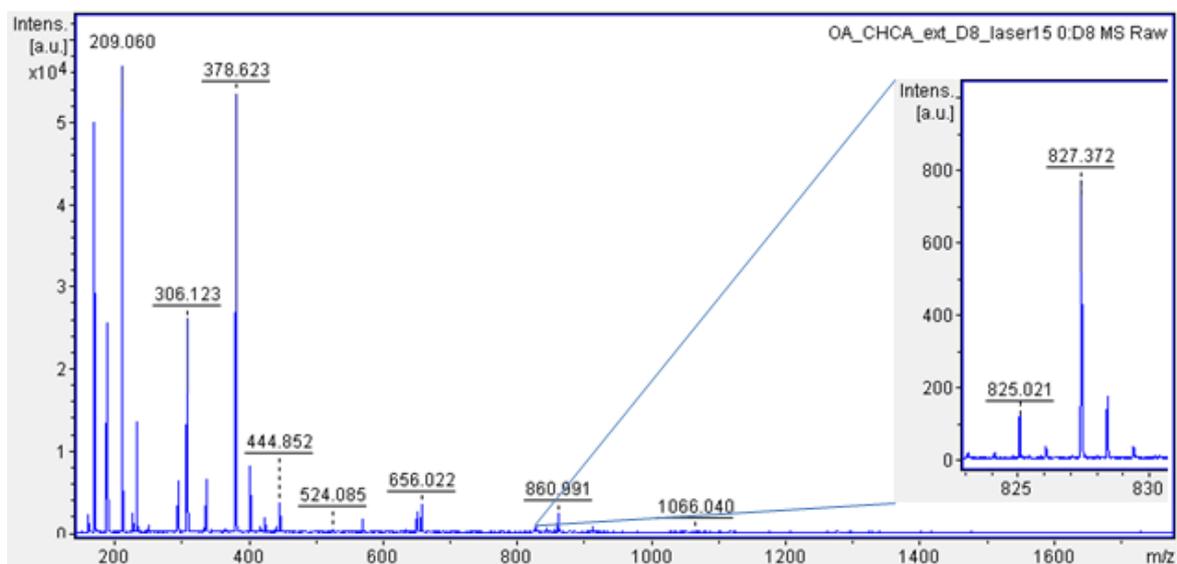


Figure 15 : Spectre global ( $m/z$  140-1800) du dépôt (en matrice CHCA) sur la lame ITO et zoom sur le pic d'acide okadaïque ( $m/z$  827,4).

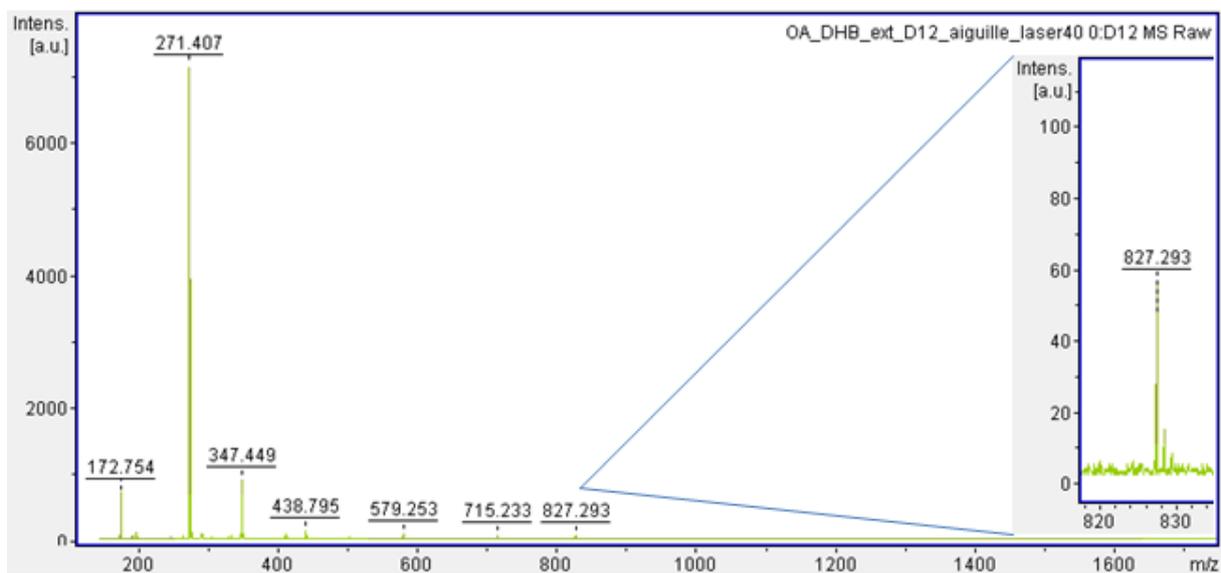


Figure 16 : Spectre global ( $m/z$  140-1800) du dépôt (en matrice DHB) sur la lame ITO et zoom sur le pic d'acide okadaïque ( $m/z$  827,3).

✚ Mélanges matrice/analyte à un ratio de 10/1 en volume.

Des mélanges acide okadaïque 17  $\mu\text{M}$ /matrice (CHCA 10 mg/mL ou DHB 40 mg/mL) à un ratio 1/10 (en volume) sont préparés et 0.5  $\mu\text{L}$  de chaque solution est déposé sur une coupe de glande digestive de moule saine ou sur la lame ITO. Les réglages du spectromètre restent identiques à ceux énoncés en partie III.1.b.

Les résultats obtenus amènent aux conclusions suivantes :

- L'acide okadaïque est détectable, sous forme  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , lorsque le dépôt a été effectué sur la lame ITO (pic à  $m/z$  : 827,4 en CHCA et 827,3 en DHB, *figures 15 et 16*). Néanmoins, l'intensité du pic est faible.
- L'acide okadaïque n'est pas détectable, dans les conditions de l'expérience, lorsque le dépôt est effectué sur une coupe.
- Le méthanol (solvant de la solution commerciale d'acide okadaïque) n'est pas responsable de l'absence de détection de la toxine : les spectres obtenus par dépôt de 0.5  $\mu\text{L}$  de solution méthanol/CHCA (1/10 v/v) et méthanol/DHB (1/10 v/v) sont similaires à ceux obtenus lors de l'analyse de la coupe de glande digestive de moule saine. Le méthanol n'a donc aucun effet sur le tissu biologique.

La solution commerciale d'acide okadaïque ayant été ouverte en juin 2015, l'hypothèse d'une dégradation de la toxine a été vérifiée par réplication des tests présentés ci-dessus à l'aide d'une nouvelle solution commerciale et par comparaison HPLC-MS des deux solutions commerciales.

Les répliqués confirment les résultats obtenus avec la première solution commerciale. De plus, l'analyse HPLC-MS des deux solutions permet d'écarter l'hypothèse d'une dégradation de la molécule pendant son stockage (absence de fragments) et l'unique différence entre les deux solutions est leur différence de concentration (la solution ouverte en juin 2015 étant légèrement moins concentrée, ceci étant dû à l'addition de méthanol dans le tube puisque la solution s'est évaporée lors du stockage).

Lors de tests antérieurs à mon stage (effectués en juin 2015), le ratio matrice/analyte était de 1/1 en volume, ce qui permettait la détection de l'acide okadaïque à des concentrations de l'ordre de quelques centaines de femtomoles par microlitre (*figure 17*). Cependant, les dépôts ont uniquement été réalisés sur une plaque inox 384 puits.

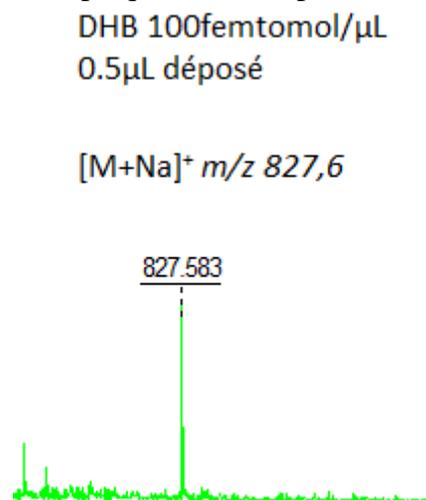


Figure 17 : Analyse MALDI-TOF d'un mélange acide okadaïque 17  $\mu\text{M}$ /DHB 10 mg/mL à un ratio 1/1 (en volume).

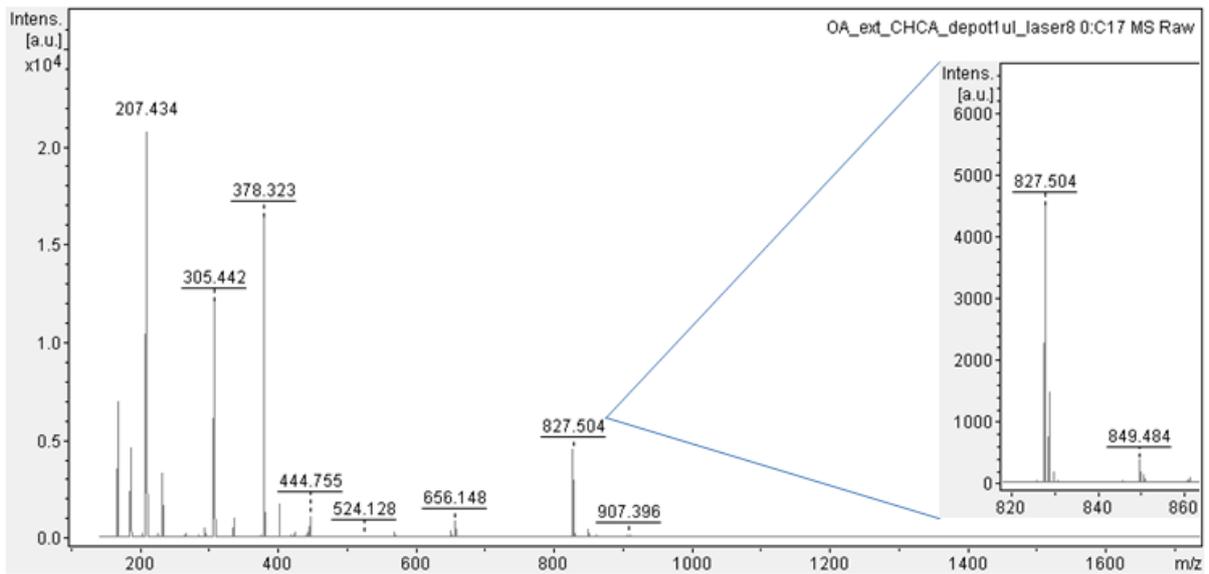


Figure 18 : Spectre global ( $m/z$  140-1800) du dépôt (1  $\mu$ L, en matrice CHCA) sur la lame ITO et zoom sur les pics d'acide okadaïque ( $m/z$  827,5 et 849,5).

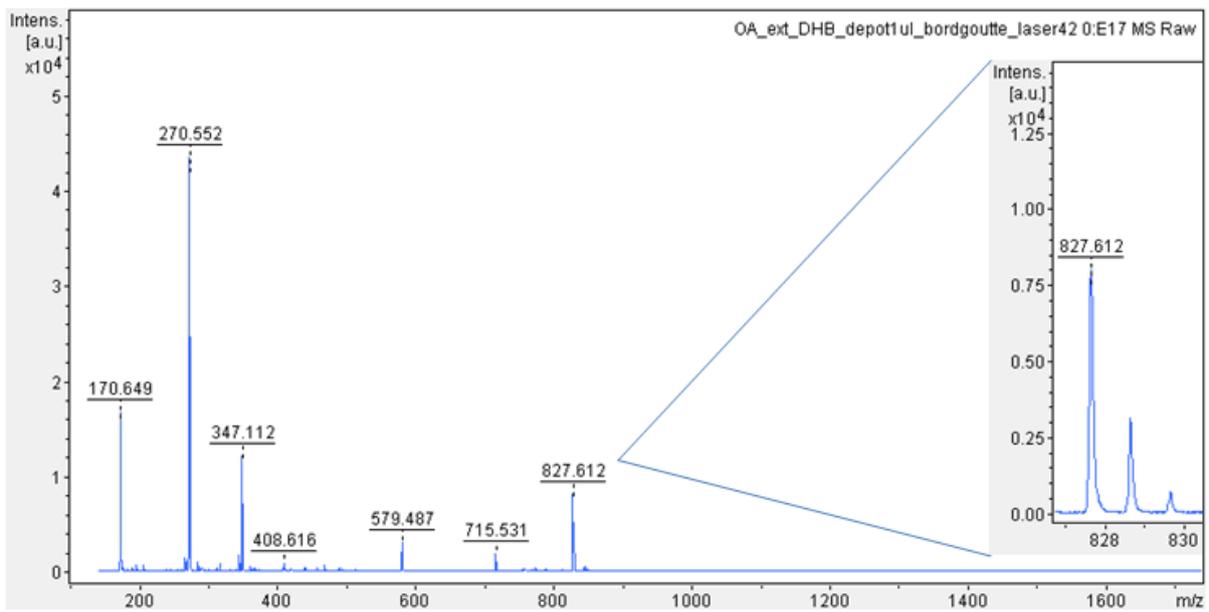


Figure 19 : Spectre global ( $m/z$  140-1800) du dépôt (1  $\mu$ L, en matrice DHB) sur la lame ITO et zoom sur le pic d'acide okadaïque ( $m/z$  827,6).

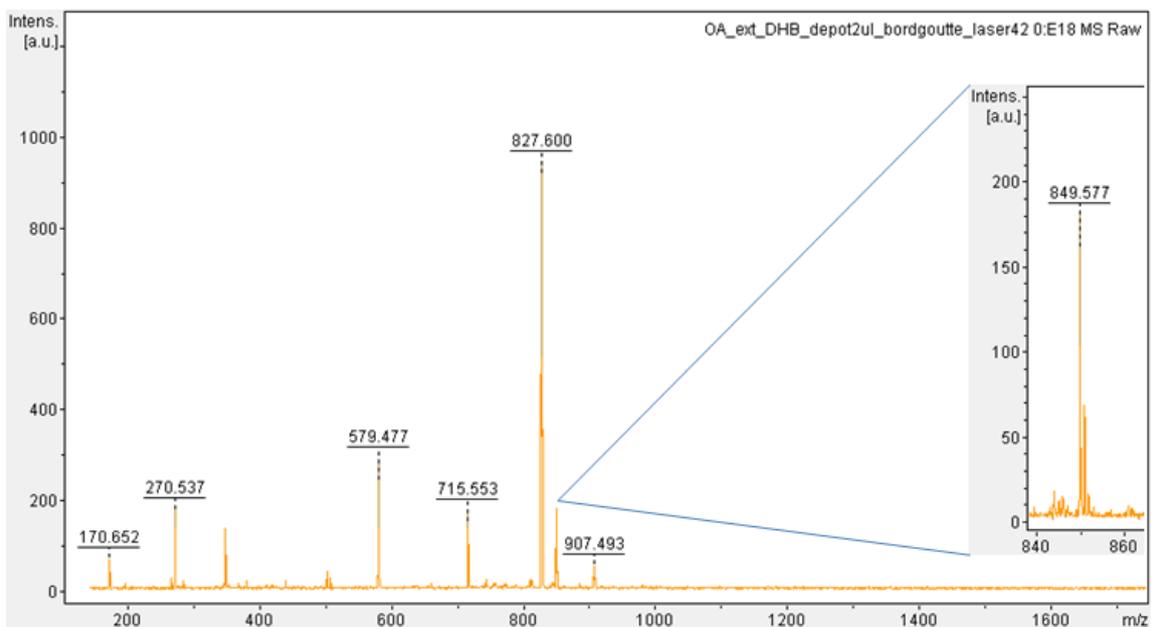
✚ Mélanges matrice/analyte à un ratio de 1/1 en volume.

Afin de vérifier la reproductibilité des résultats de juin 2015 et de tester ces conditions sur une coupe, des solutions ayant un ratio matrice/analyte de 1/1 (en volume) sont préparées et différents volumes (1  $\mu\text{L}$  ou 2  $\mu\text{L}$ ) sont déposés sur la lame ITO et sur une coupe de glande digestive de moule saine.

Les deux solutions commerciales d'acide okadaïque étant similaires, ces tests ont été réalisés en utilisant le flacon ouvert en juin 2015, les matrices utilisées étant toujours la CHCA et la DHB. Les réglages du spectromètre restent identiques à ceux énoncés en III.1.b.

Les résultats de ces tests permettent d'établir les conclusions suivantes :

- Les dépôts effectués sur la lame ITO permettent une bonne détection de l'acide okadaïque sous forme  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  en matrice CHCA (*figure 18*), quel que soit le volume du dépôt. En matrice DHB, seule la forme  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  de l'acide okadaïque est détectable, si le volume du dépôt est de 1  $\mu\text{L}$ . La forme  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$  devient détectable lors du dépôt de 2  $\mu\text{L}$  de solution DHB/acide okadaïque (1/1 v/v) (*figures 19 et 20*).
- Les dépôts réalisés sur la coupe de glande digestive ne permettent pas la détection de l'acide okadaïque, quel que soit la matrice utilisée et le volume du dépôt.



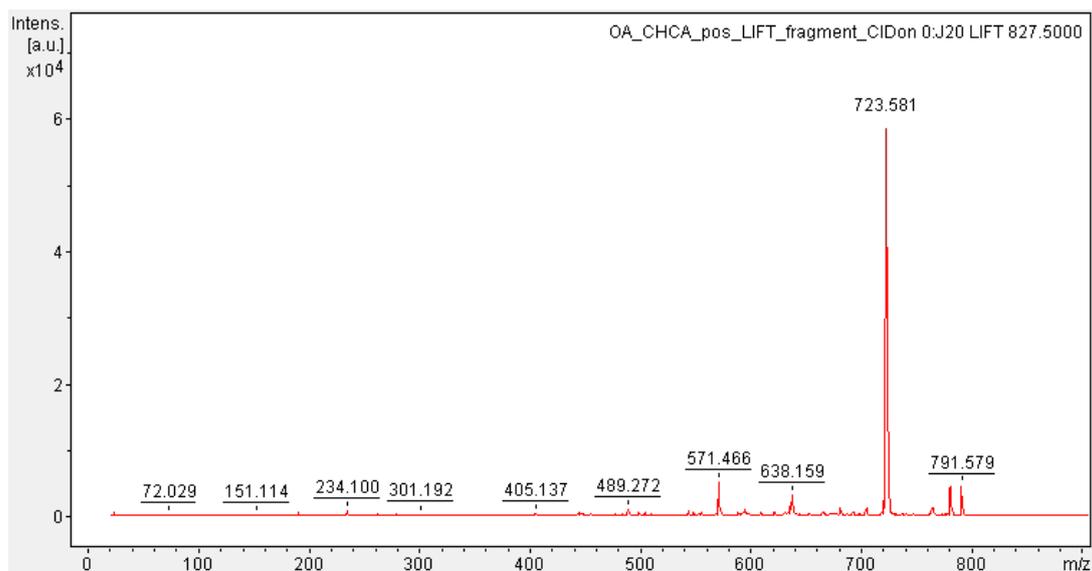


Figure 21 : Spectre de fragmentation MS/MS (mode positif, matrice CHCA) de l'ion à  $m/z$  827,5.

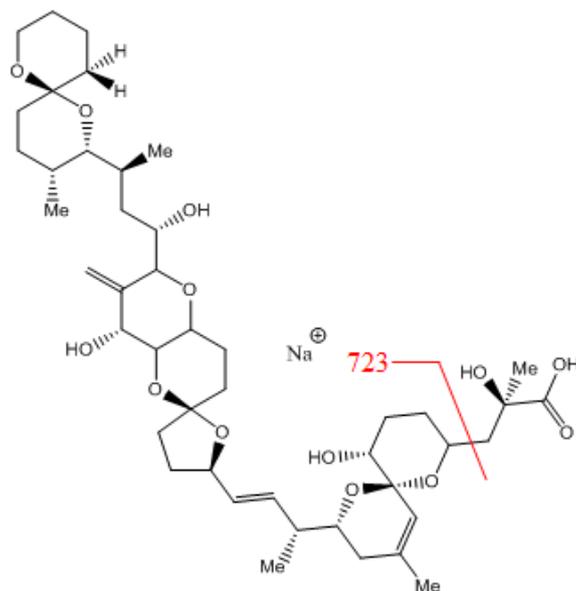


Figure 22 : Proposition de fragmentation conduisant à l'ion fragment à  $m/z$  723,6.

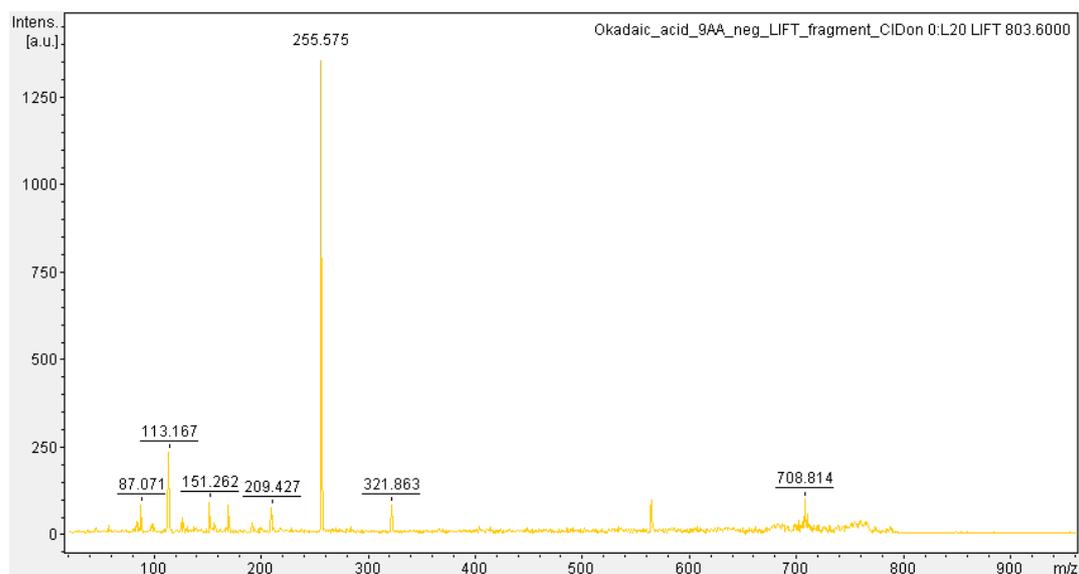


Figure 23 : Spectre de fragmentation MS/MS (mode négatif, matrice 9-AA) de l'ion à  $m/z$  803,6.

L'analyse en mode négatif de ces mêmes dépôts d'acide okadaïque en matrice DHB ne permet pas l'obtention de meilleurs résultats sur une coupe de glande digestive (absence de détection du  $[M-H]^-$  à 803,5 Da).

Pour tenter de régler le problème de détection de l'acide sur la coupe, il a été envisagé d'ajouter un sel de lithium pour permettre une meilleure ionisation et, en parallèle, d'enregistrer le spectre de fragmentation MS/MS de l'acide okadaïque, afin de déterminer si les pics visibles jusqu'à présent correspondent ou non à des fragments de l'acide okadaïque.

#### ✚ Spectres MS/MS de l'acide okadaïque.

Les spectres de fragmentation MS/MS sont enregistrés en MALDI-TOF/TOF sur des mélanges de 1  $\mu$ L d'acide okadaïque (17  $\mu$ M) + 1  $\mu$ L de matrice déposés sur une plaque 384 puits. Les matrices utilisées sont la CHCA (10 mg/mL) pour la fragmentation en mode positif et la 9-AA (10 mg/mL) pour la fragmentation en mode négatif.

Le principe de la fragmentation MS/MS en MALDI-TOF/TOF repose sur la sélection d'un ion précurseur (ou « ion parent ») issu du spectre MS qui est ensuite fragmenté par collision avec un gaz inerte.

Le spectre de fragmentation en mode positif (*figure 21*) de l'ion précurseur à  $m/z$  827,5, met en évidence l'existence d'un ion fragment majoritaire à  $m/z$  de 723,6 et dont la voie de fragmentation est proposée en *figure 22*.

L'ion à  $m/z$  791,6 peut également être attribué à une perte successive de deux molécules d'eau à partir de l'ion précurseur ( $m/z$  827,5  $\rightarrow$  809,5  $\rightarrow$  791,5). Néanmoins, ces fragments ne sont pas visibles sur les spectres issus de l'analyse des dépôts sur coupe des tests précédents.

Le spectre de fragmentation de l'ion précurseur à  $m/z$  803,6 obtenu en mode négatif est présenté en *figure 23*.

L'ion à  $m/z$  255,6 est l'ion fragment majoritaire. Une voie de fragmentation possible est présentée en *figure 24* ([7] Murata *et al.*, 1998, [8] Torgersen *et al.*, 2008).

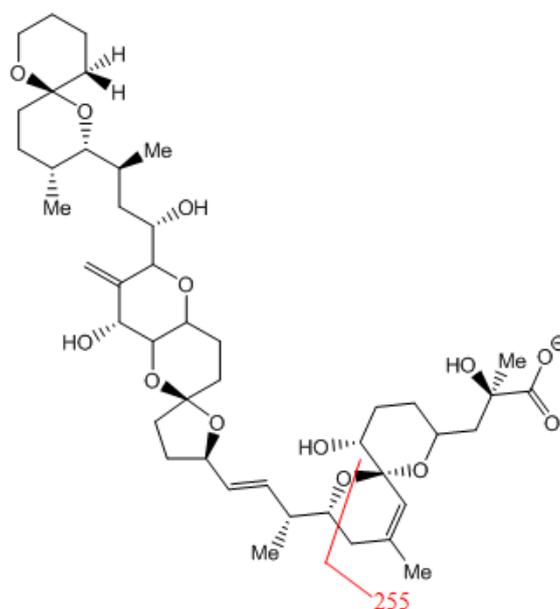


Figure 24 : Proposition de fragmentation pour l'ion fragment à  $m/z$  255,6.

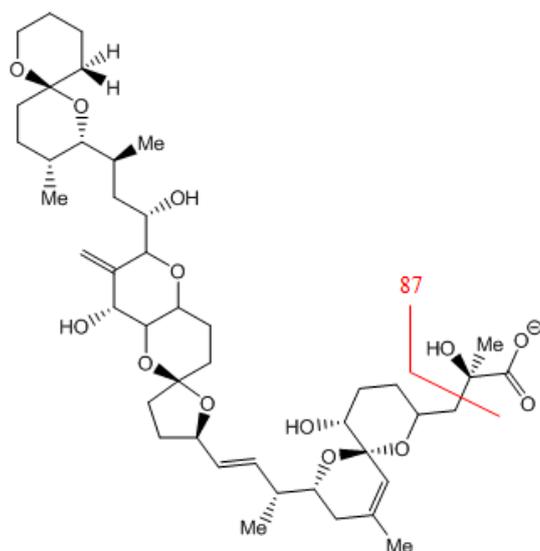


Figure 25 : Proposition de fragmentation pour l'ion fragment à  $m/z$  87.

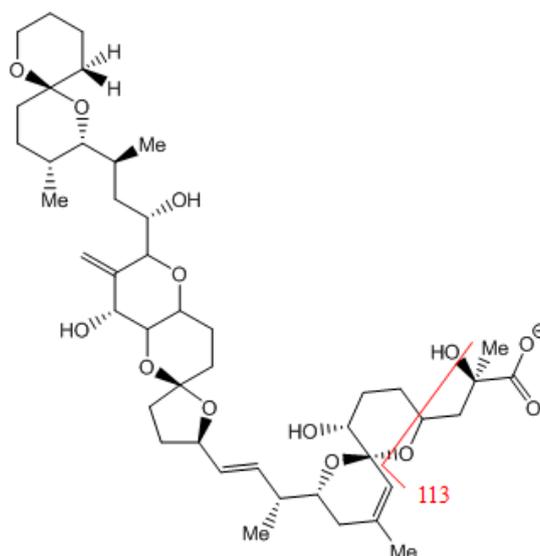


Figure 26 : Proposition de fragmentation pour l'ion fragment à  $m/z$  113.

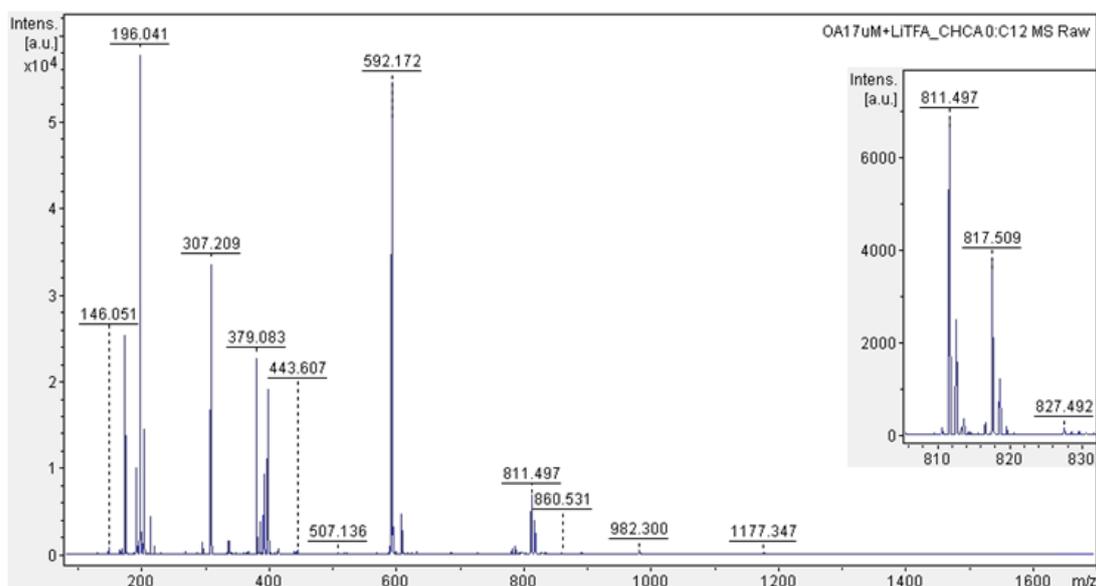


Figure 27 : Spectre global ( $m/z$  80-1700) du dépôt (en matrice CHCA+LiTFA) sur la lame ITO et zoom sur les pics d'acide okadaïque ( $m/z$  811,5 et 817,5).

Les ions à  $m/z$  87 et 113 correspondent respectivement à la perte de l'extrémité comportant l'acide carboxylique (*figure 25*, ([7] Murata *et al.*) et à un réarrangement (*figure 26*, [7] Murata *et al.*). Aucun de ces ions fragments n'est retrouvé dans les spectres correspondants aux dépôts d'acide okadaïque sur coupe des tests précédents.

#### ✚ Effet des sels de lithium.

Afin de vérifier que l'absence de détection de l'acide okadaïque sur une coupe de glande digestive de moule n'est pas liée à un problème d'ionisation de la molécule, des tests en matrice CHCA ont été réalisés en présence d'un sel de lithium, à un ratio matrice/analyte de 1/1 en volume. 1  $\mu$ L de solution a été déposé sur et en dehors d'une coupe de glande digestive de moule saine. Les paramètres du spectromètre restent identiques à ceux énoncés en III.1.b.

Le sel de lithium choisi est le lithium trifluoroacétate (ou LiTFA) puisqu'il permet (contrairement à d'autres sels de lithium tels que le lithium citrate ou le lithium acétate) l'obtention de cristaux de taille régulière (environ 10  $\mu$ m de diamètre) et une couverture homogène de l'ensemble de la coupe ([9] Cerruti *et al.*, 2011).

Le LiTFA est directement ajouté à la solution de matrice CHCA, de façon à obtenir une concentration de 2 mg/mL. Les pics d'acide okadaïque attendus (détection en polarité positive) lors de ces tests sont :

- 811,5 ( $[M+Li]^+$ ).
- 817,5 ( $[M+2Li-H]^+$ ).

Les résultats (*figures 27 et 28*) de ces tests sont similaires à ceux obtenus en absence de lithium :

- Le dépôt effectué hors de la coupe permet une bonne détection de l'acide okadaïque ( $[M+Li]^+$ ,  $[M+2Li-H]^+$  et  $[M+Na]^+$ ).
- L'acide okadaïque et/ou ses fragments ne sont pas détectés dans le dépôt effectué sur la coupe. L'ajout de sels de lithium ne résout donc pas le problème de détection de l'acide okadaïque sur une coupe de glande digestive.

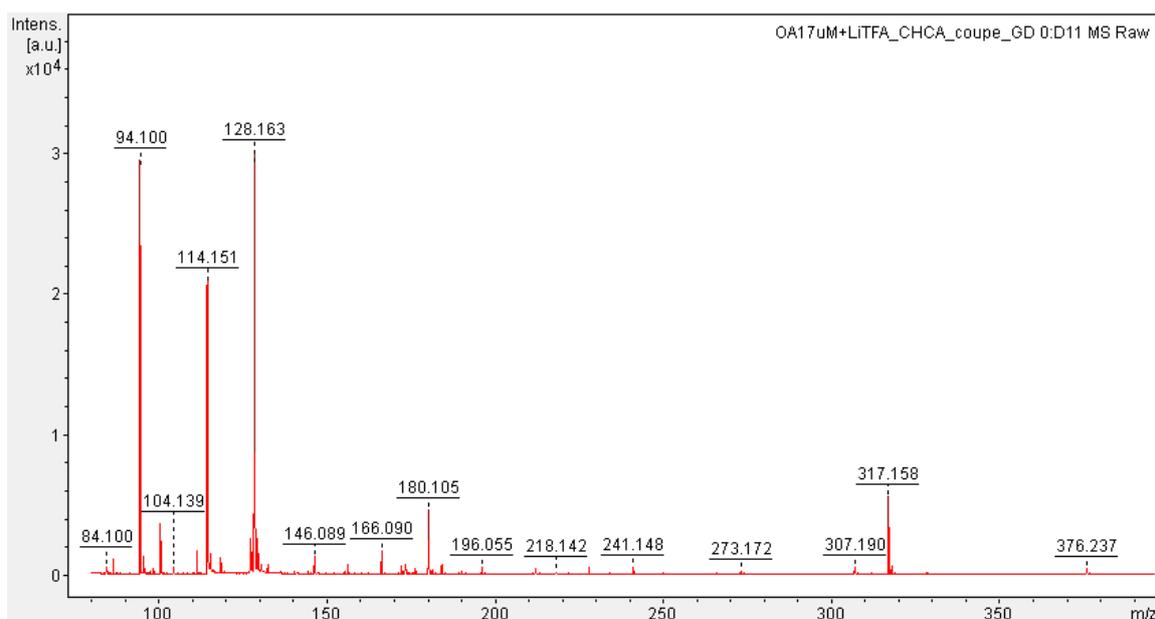


Figure 28 : Spectre global ( $m/z$  80-400) du dépôt (en matrice CHCA+LiTFA) sur la coupe (absence de pics d'intensité majeure au-delà de  $m/z$  400).



#### ✚ Bilan des tests MALDI-TOF.

L'ensemble des tests réalisés en MALDI-TOF met en évidence l'impossibilité de détecter l'acide okadaïque sur une coupe de glande digestive dans nos conditions expérimentales.

De plus, cette absence de détection n'est pas liée :

- À la nature de la matrice (CHCA, DHB ou 9-AA).
- À la polarité de détection (positive ou négative).
- À la présence ou à l'absence d'additifs (sels de lithium).

#### b. Analyse par TOF-SIMS.

##### ✚ Utilisation de la source argon.

Afin d'invalider (ou non) l'hypothèse d'une séquestration de l'acide okadaïque dans la profondeur du tissu biologique, des tests ont été menés en TOF-SIMS à l'aide d'une source argon. La source argon permet, grâce à des agrégats d'argon de taille déterminée, de creuser (plus ou moins fortement et rapidement) la surface d'un échantillon.

Dans le cadre de cette analyse, 1 µL de la solution commerciale d'acide okadaïque a été déposé sur une coupe de glande digestive de moule saine (sur une zone correspondant aux tubules digestifs).

Paramètres de l'acquisition :

- Mode de détection : réflectron négatif
- Taille et énergie des agrégats d'argon : 1500 atomes ; 10 keV

Le spectre global correspondant à l'analyse en profondeur de l'échantillon ne permet pas la visualisation du pic d'acide okadaïque à  $m/z$  803,5 (résultat similaire à ceux obtenus en MALDI-TOF). Il semblerait donc que l'absence de détection de l'acide okadaïque ne soit pas liée à sa séquestration dans les tissus.

##### ✚ Vérification de la détectabilité de la molécule.

L'acide okadaïque étant une molécule de haut poids moléculaire pour l'étude en SIMS, des tests de détection ont été effectués suivant les conditions énoncées ci-dessous :

- Dépôts de 0.5 µL de solution commerciale à 17 µM
- Support du dépôt : galette de silicium
- Faisceau d'ions primaires utilisé : agrégats de bismuth

*N.B. : L'acide okadaïque ayant tendance à s'étaler lors de son dépôt sur la galette de silicium, la concentration détectée est généralement inférieure à 17 µM.*

Une première acquisition est effectuée en polarité positive. En suivant attentivement l'intensité des pics au cours de l'acquisition, il a été observé que le pic du  $[M+2Na-H]^+$  de l'acide okadaïque (à  $m/z$  849,5) diminue en intensité au fur et à mesure que le nombre de scans augmente.

En effet, pour les scans 1 à 6, l'intensité du pic est à  $2,5 \times 10^2$  u.a. tandis que pour les scans 45 à 51, l'intensité n'est plus que de  $0,6 \times 10^2$  u.a.

Cette dégradation rapide de l'acide okadaïque peut être liée à l'utilisation du « floodgun », faisceau d'électrons servant à compenser les charges émises suite au bombardement d'une

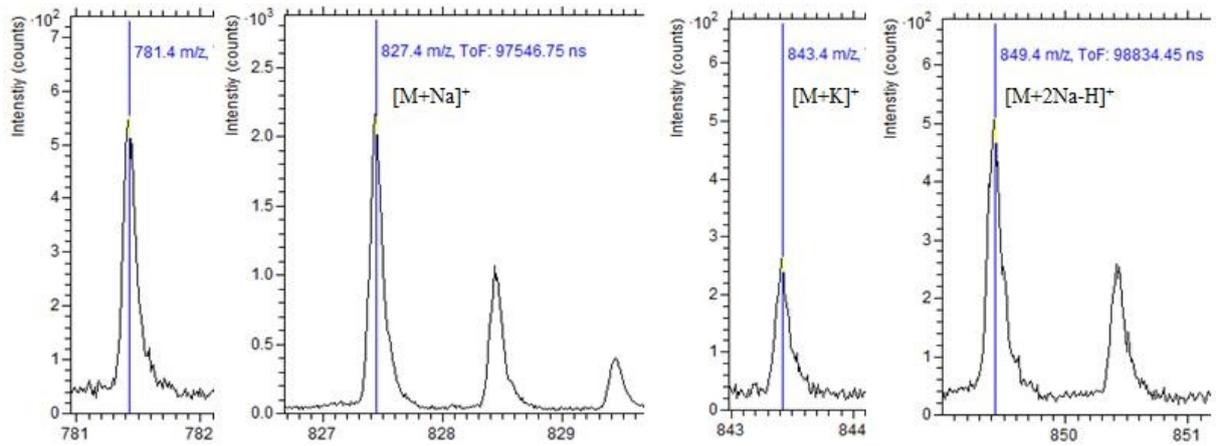


Figure 29 : Pics de l'acide okadaïque et d'un de ses fragments (mode positif, sans floodgun).

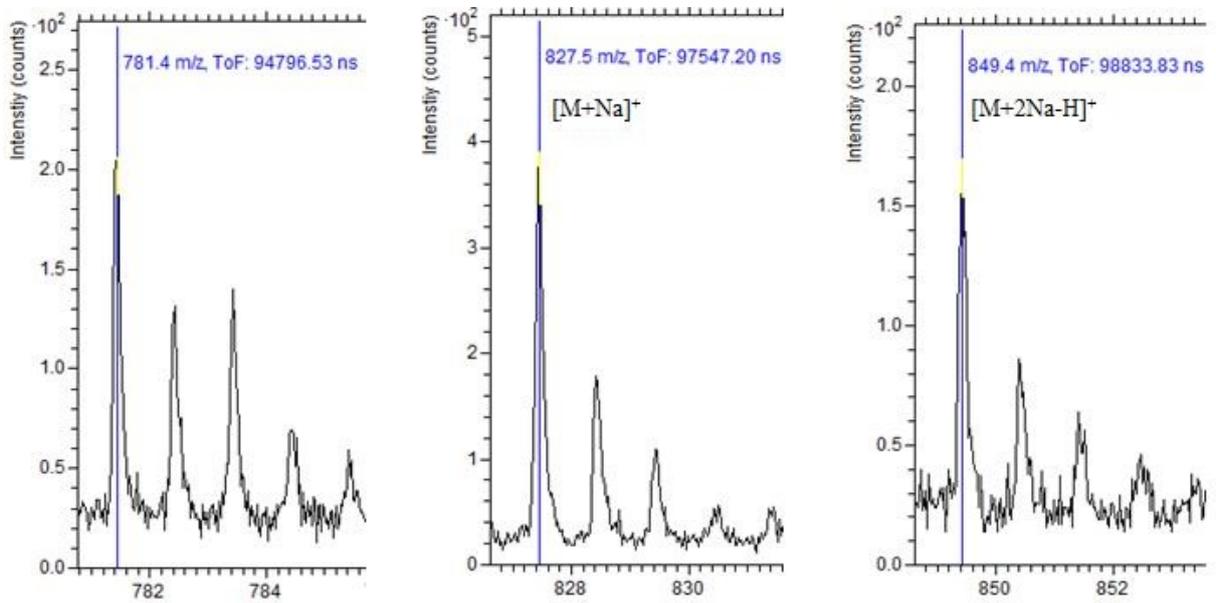


Figure 30 : Pics de l'acide okadaïque et d'un de ses fragments (mode positif, avec floodgun).

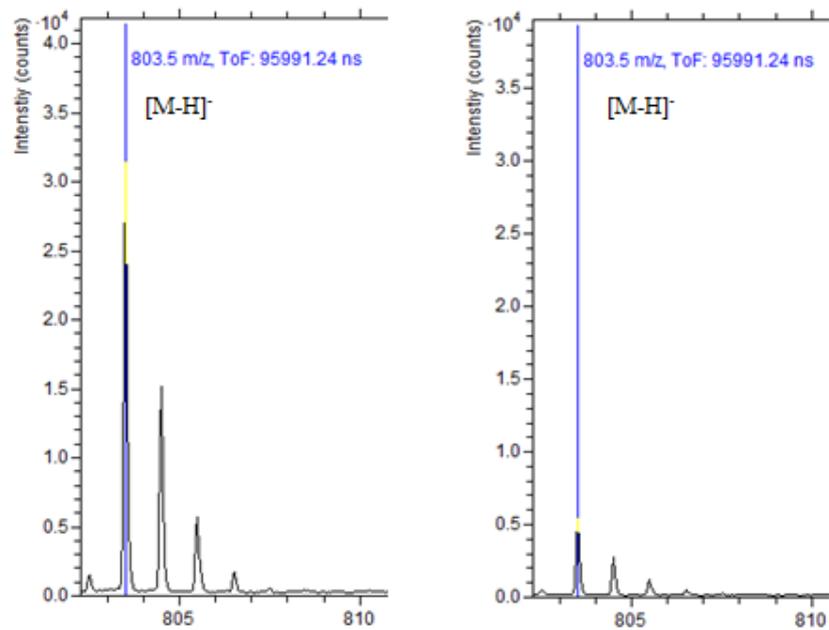


Figure 31 : Pic d'acide okadaïque (mode négatif) : sans floodgun, spectre de gauche ; avec floodgun, spectre de droite.

surface par le faisceau de bismuth. Afin de tester son effet sur l'acide okadaïque, une analyse est effectuée après l'avoir désactivé. Le spectre obtenu est présenté en *figure 29*.

La comparaison avec l'acquisition précédente amène aux conclusions suivantes :

- En absence de floodgun, l'intensité des pics d'acide okadaïque reste constante tout au long de l'analyse.
- L'absence de floodgun permet la détection du  $[M+Na]^+$  et du  $[M+K]^+$  de l'acide okadaïque.
- Les pics à  $m/z$  781,4 et 849,5 ont une intensité respectivement 5 fois et 2 fois plus élevées en absence de floodgun.

La reproductibilité de ces résultats a pu être démontrée en réitérant les acquisitions. Dans le but de confirmer l'implication du floodgun dans la diminution du signal des pics d'acide okadaïque, une acquisition est démarrée sur le dépôt des deux cas précédents, en présence du floodgun (*figure 30*).

Lorsqu'une nouvelle acquisition est lancée sur cette même zone, aucun des trois pics cités ci-dessus n'est détecté. Cette observation prouve que l'intensité indiquée sur le spectre global (*figure 30*) correspond en majorité à l'intensité de ces pics lors des premiers scans.

En mode de détection négatif, l'effet du floodgun est moins visible étant donné que le pic de départ (obtenu en absence de floodgun) est beaucoup plus intense. Néanmoins, l'intensité du pic est quand même affectée par le floodgun (*figure 31*).

Bilan :

Les tests effectués ci-dessus montrent que l'analyse de dépôts d'acide okadaïque sur une galette de silicium nécessite la désactivation du floodgun. En effet, l'utilisation du floodgun conduit à une dégradation de la molécule qui s'accompagne d'une perte d'intensité des pics, cet effet étant plus prononcé en mode positif (les pics étant moins intenses, ils se confondent rapidement avec le bruit de fond).

Cette dégradation de l'acide okadaïque par le floodgun peut expliquer son absence de détection sur les coupes de glandes digestives de moules infectées.

Cependant, il est impossible d'analyser une coupe de tissu biologique en absence de floodgun : les charges accumulées à la surface du tissu n'étant pas compensées, les images reconstruites à partir des données spectrales comporteront d'importants effets de bord, rendant l'interprétation de l'image difficile. De ce fait, des tests d'optimisation des paramètres du floodgun ont été effectués sur des dépôts d'acide okadaïque (0.5  $\mu$ L à 17  $\mu$ M, déposés sur une galette de silicium).

Ces tests ont pour objectif de :

- Trouver la dose d'électrons nécessaire à la neutralisation des charges émises.
- Déterminer le temps d'exposition maximal au floodgun avant qu'il y ait dégradation de l'acide okadaïque.

*N.B. Valeurs de base des paramètres du floodgun :*

- « *Lead off* » : 2  $\mu$ s.
- « *Delay* » : 1  $\mu$ s.

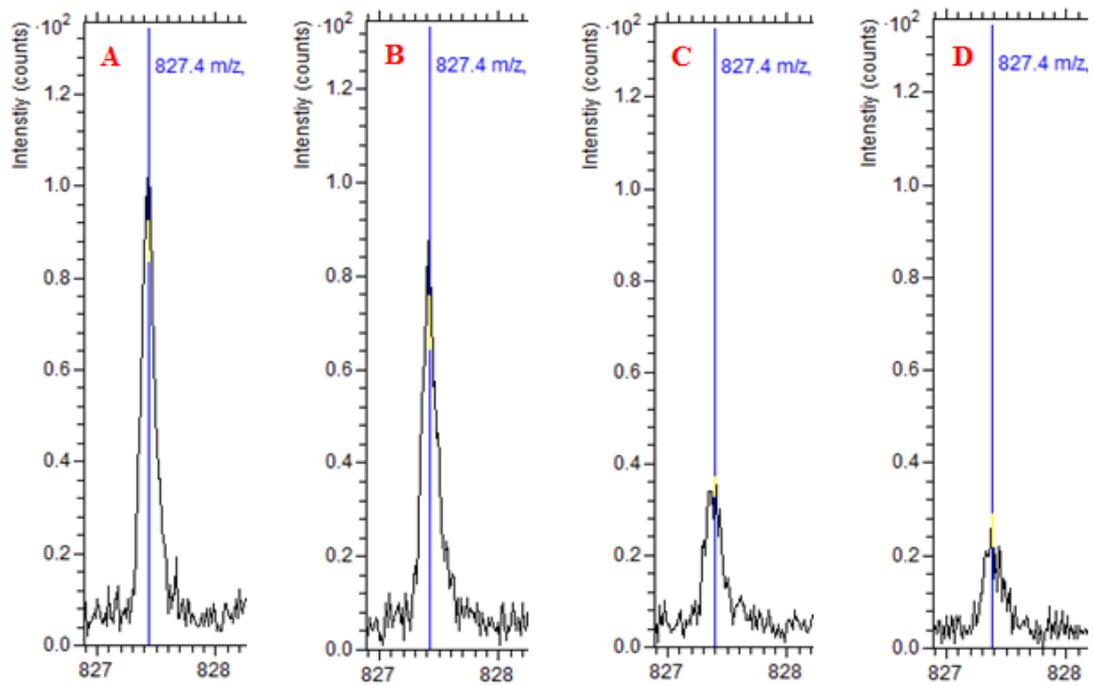


Figure 32 :  $[M+Na]^+$  de l'acide okadaïque pour les acquisitions 0010 (A), 0011 (B), 0012 (C) et 0013 (D).

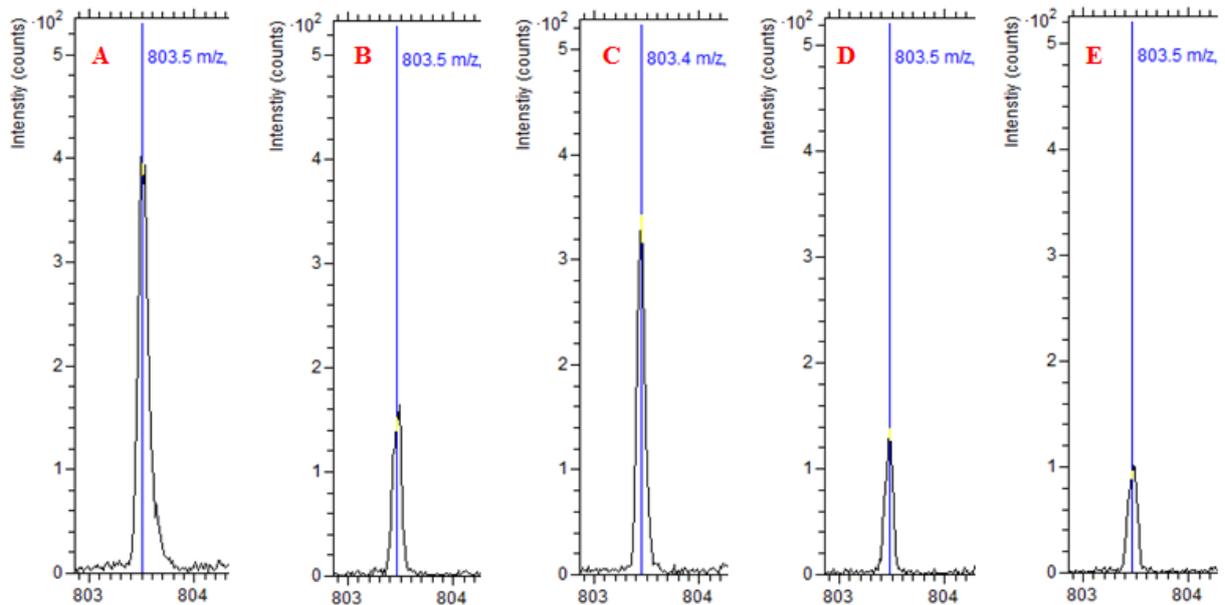


Figure 33 :  $[M-H]^-$  de l'acide okadaïque pour les acquisitions 0018 (A), 0019 (B), 0020 (C), 0021 (D) et 0022 (E).

✚ Optimisation des paramètres du floodgun.

1<sup>ère</sup> série de tests : Polarité positive, Extraction pulsée activée, Dépôt n°1 (sur galette de silicium).

Tableau 4 : Paramètres des acquisitions de la 1<sup>ère</sup> série.

Acquisition	Floodgun	Lead off (µs)	Delay (µs)	Figure
2016_04_0010	off	/	/	32.A
2016_04_0011	on	20	108	32.B
2016_04_0012	on	10	108	32.C
2016_04_0013	on	1	108	32.D

La comparaison de ces quatre conditions (l'acquisition 0010 servant de référence) montre une décroissance rapide de l'intensité du pic correspondant au  $[M+Na]^+$  de l'acide okadaïque dès que le floodgun est activé et quelle que soit sa durée d'activation.

2<sup>ème</sup> série de tests : Polarité négative, Extraction pulsée activée, Dépôt n°2 (sur galette de silicium).

Tableau 5 : Paramètres des acquisitions de la 3<sup>ème</sup> série.

Acquisition	Floodgun	Lead off (µs)	Delay (µs)	Figure
2016_04_0018	off	/	/	33.A
2016_04_0019	on	1	63	33.B
2016_04_0020	off	/	/	33.C
2016_04_0021	on	1	42	33.D
2016_04_0022	on	20	23	33.E

La comparaison des pics des *figures 33.A et 33.B* met en évidence la division par deux de l'intensité du pic à  $m/z$  803,5, mais le pic de référence (acquisition 0018) étant intense, l'acide okadaïque reste détectable. Néanmoins, l'activation du floodgun, même sur un laps de temps faible, semble dégrader la molécule.

Bilan :

L'optimisation des paramètres du floodgun ne règle pas le problème puisque le floodgun provoque, dans tous les cas, la dégradation de la molécule. De ce fait, l'analyse de l'acide okadaïque par TOF-SIMS ne semble pas possible.

Dans le but d'identifier le (ou les) élément(s) responsable(s) de la non détection de l'acide okadaïque, les tests suivants ont été effectués :

- Utilisation d'un sel de lithium (LiTFA) : pour écarter l'hypothèse d'une mauvaise ionisation de la molécule.
- Rinçage de la coupe de glande digestive à l'eau MilliQ avant analyse : pour diminuer la concentration en sels.
- Dépôt d'acide okadaïque sur une coupe de cerveau de rat : pour vérifier si l'absence de détection de la molécule est liée à un tissu biologique spécifique.

✚ Utilisation de sels de lithium.

L'analyse par TOF-SIMS ne requiert ni matrice ni additifs, néanmoins, pour écarter l'hypothèse d'une mauvaise ionisation de la molécule, un mélange acide okadaïque 17 µM + LiTFA (préparé à 2 mg/mL, directement dans la solution d'acide okadaïque) a été analysé (en absence de floodgun).

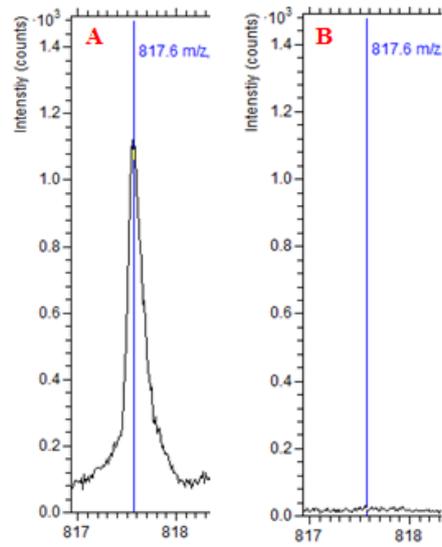


Figure 34 :  $[M+2Li-H]^+$  de l'acide okadaïque : dépôt hors coupe (A) et dépôt sur coupe (B).

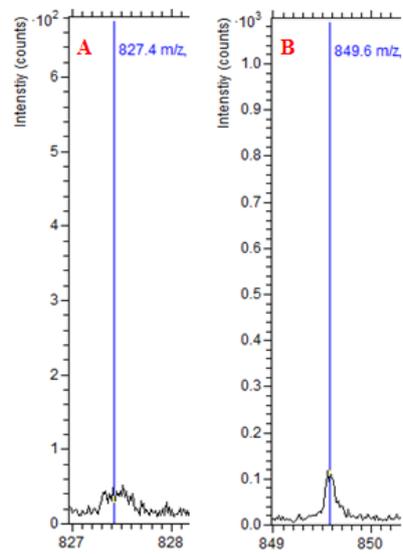


Figure 35 : ions à  $m/z$  827,4 (A) et 849,6 (B) du dépôt sur coupe.

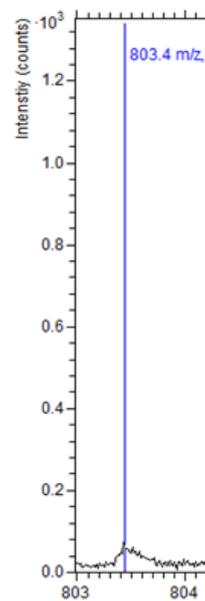


Figure 36 : Ion à  $m/z$  803,4 du dépôt sur coupe.

Des dépôts de 1  $\mu\text{L}$  ont été réalisés sur une galette de silicium (support) et sur une coupe de glande digestive de moule saine. La zone de détection du  $[\text{M}+2\text{Li}-\text{H}]^+$  est présentée en *figure 34*.

L'ajout de sels de lithium ne semble pas avoir d'effet sur l'ionisation de l'acide okadaïque puisque la molécule reste indétectable sur une coupe de glande digestive (absence de pic à  $m/z$  817,5).

De plus, en réalisant un test sur de l'acide okadaïque ayant fusé de la coupe vers la galette de silicium (lors de son dépôt), il a été observé une absence totale de signal à  $m/z$  805,5, 827,5, 843,5 ou 849,5. Il existe donc un « élément » sur la coupe qui dégrade la molécule.

✚ Analyse d'une coupe de glande digestive après rinçage à l'eau MilliQ.

Le rinçage à l'eau MilliQ a été envisagé dans le but de diminuer la concentration en sels sur la coupe de la glande digestive de moule. Après rinçage et séchage de la coupe à l'air libre, 1  $\mu\text{L}$  d'acide okadaïque à 17  $\mu\text{M}$  est déposé sur la coupe. L'analyse est effectuée en mode positif et en absence de floodgun.

Le spectre obtenu (non présenté car non enregistré) ne permet pas la visualisation de l'acide okadaïque ( $m/z$  805,5, 827,5, 843,5 ou 849,5) et ses fragments. Néanmoins, le spectre global comporte moins de pics de sels ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ...).

Le rinçage à l'eau n'a donc aucun effet sur la détection de l'acide okadaïque.

✚ Dépôt d'acide okadaïque sur une coupe de cerveau de rat.

Afin de vérifier si la non-détection de l'acide okadaïque est spécifiquement liée à son dépôt sur une coupe de glande digestive de moule, un test est réalisé sur une coupe de cerveau de rat de 14 microns d'épaisseur déposée sur une lame ITO (dépôt de 1  $\mu\text{L}$  de solution commerciale sur et hors coupe).

Après vérification des réglages sur un dépôt d'acide okadaïque extérieur à la coupe (pics à  $m/z$  827,5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  et 849,5  $[\text{M}+2\text{Na}-\text{H}]^+$ ), une analyse, en mode positif et en floodgun désactivé, du dépôt sur coupe est enregistrée (*figure 35*).

Le spectre obtenu est similaire à ceux obtenus lors de dépôts d'acide okadaïque sur une coupe de glande digestive de moule : l'acide okadaïque n'est pas (ou très peu) détecté.

L'analyse en polarité de détection négative conduit également à une absence de détection de l'acide okadaïque (*figure 36*).

Le problème de détection de l'acide okadaïque (lorsqu'il est déposé sur une coupe de glande digestive) n'est donc pas spécifiquement lié à la glande digestive de moule.

## Conclusion et perspectives

Les expériences effectuées en MALDI-TOF et en TOF-SIMS n'ont pas permis la détection de l'acide okadaïque sur une coupe de glande digestive, ces méthodes n'étant pas assez sensibles pour l'étude de ce problème.



La détection et la localisation, par MALDI-TOF et TOF-SIMS, de l'acide okadaïque dans une coupe de glande digestive de moule infectée reste donc un défi non résolu, même s'il a été démontré que cette absence de détection n'est pas liée aux paramètres listés ci-dessous :

- Appareillage (TOF-SIMS ou MALDI-TOF).
- Coupe biologique (glande digestive de moule).
- Nature du support (lame ITO, lame inox ou galette de silicium).
- Présence ou absence d'additifs (sels de lithium).
- Nature de la matrice (dans le cas d'une analyse MALDI-TOF).
- Polarité de détection (positive ou négative).

Ce projet étant abandonné, j'ai maintenant l'opportunité d'appliquer mes connaissances en imagerie par spectrométrie de masse sur un projet européen nommé Biomargin.

Dans le cadre du projet Biomargin, notre laboratoire a pour mission d'identifier et de localiser des biomarqueurs, dans des biopsies de reins de patients greffés, par utilisation des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse (MALDI-TOF et TOF-SIMS).

L'optimisation des protocoles d'analyse, effectuée sur des biopsies de rein de porc (plus proche homologue de l'Homme) et sur des coupes de cerveaux de rat (échantillon biologique de référence en imagerie par spectrométrie de masse), a déjà été réalisée par une post-doctorante de l'équipe.

Il a donc été mis en évidence les données suivantes :

- Les ions détectés sont majoritairement des lipides.
- Les biopsies sont de trop petits objets pour l'analyse MALDI où seul un profil spectral peut être établi avec certitude.
- Parmi les différents types de rejet de greffe, le rejet humoral est celui présentant une réponse très différente du contrôle (patient non greffé) et du normal (patient greffé avec absence de rejet du greffon).

De ce fait, il m'a été demandé de réitérer les analyses sur 3 rejets humoraux et 3 biopsies normales afin de valider les résultats précédemment obtenus.



## Références bibliographiques

- [1] M. Barbier, Z. Amzil, F. Mondeguer, Y. Bhaud, M-O. Soyer-Gobillard, P. Lassus (1999) Okadaic acid and PP2A cellular immunolocalization in *Prorocentrum lima* (Dinophyceae), *Phycologia*, Vol. 38 (1), 41-46.
- [2] M. Guéguen, A. Duinker, C. Marcaillou, J. Aasen, L. Barillé (2009) A first approach to localizing biotoxins in mussel digestive glands, ICMSS09 – Nantes, France.
- [3] F. Mondeguer (2002) Un nouvel outil dans l'identification et la quantification des dinophysistoxines (DTXs) : le couplage Chromatographie Liquide Haute Performance / Spectrométrie de Masse par piégeage d'ions quadripolaire et interface d'électro-nébulisation (CLHP/SM<sup>2</sup>), Ifremer.
- [4] J. Blanco, M.L. Fernández, A. Míguez, A. Moroño (1999), Okadaic acid depuration in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: one- and two-compartment models and the effect of environmental conditions, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 176, 153-163.
- [5] A.E. Rossignoli, J. Blanco (2008) Cellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*, *Toxicon*, Vol. 52, 957-959.
- [6] A.E. Rossignoli, J. Blanco (2010) Subcellular distribution of okadaic acid in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*: first evidences of lipoprotein binding to okadaic acid, *Toxicon*, Vol. 55 (2-3), 221-226.
- [7] M. Murata, M. Izumikawa, K. Tachibana, T. Fujita, H. Naoki (1998) Labeling Pattern of Okadaic Acid from <sup>18</sup>O<sub>2</sub> and [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>]Acetate Elucidated by Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, 147-151.
- [8] T. Torgersen, A.L. Wilkins, T. Rundberget, C.O. Miles (2008) Characterization of fatty acid esters of okadaic acid and related toxins in blue mussels (*Mytilus edulis*) from Norway, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, Vol. 22, 1127-1136.
- [9] C.D. Cerruti, D. Touboul, V. Guérineau, V.W. Petit, O. Laprèvote, A. Brunelle (2011) MALDI imaging mass spectrometry of lipids by adding lithium salts to the matrix solution, *Anal. Bioanal. Chem*, Vol. 401, 75-87.