

Université de Montréal
Département de chimie, Faculté des arts et des sciences

Ce mémoire intitulé

**Développement d'une méthode d'analyse par spectrométrie de masse du mode d'action
des biguanides dans le traitement du cancer**

Présenté par
Alexandra Doré

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Joelle Pelletier
Président-rapporteur

Andreea-Ruxandra Schmitzer
Directeur de recherche

Samy Cecioni
Membre du jury

Université de Montréal

**Développement d'une méthode d'analyse par
spectrométrie de masse du mode d'action des biguanides
dans le traitement du cancer**

par Alexandra Doré

Département de chimie
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de maître ès science (M. Sc.)
en chimie

Août 2019

© Alexandra Doré, 2019

Résumé

L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) est une des tumeurs solides les plus malignes retrouvées dans la population humaine actuelle. Plusieurs chercheurs s'intéressent donc à trouver un nouveau traitement efficace pour ce type de cancer. Les biguanides, souvent utilisés comme antidiabétiques, intéressent de plus en plus les chercheurs par la découverte de leurs propriétés antiprolifératives. Dans notre groupe, une variété de nouveaux biguanides a été synthétisée et étudiée pour leurs propriétés antiprolifératives des cellules cancéreuses du pancréas. Nous avons identifié un biguanide avec une chaîne de phényléthynylbenzyle, appelé composé **A**, comme un composé de choix par son activité 800 fois plus élevée que celle de la metformine et 10 fois plus élevée que celle de la phenformine, deux biguanides commercialement disponibles. Des études *in vivo* ont été effectuées en greffant des cellules PDAC humaines dans l'espace sous-cutané de souris et laissées croître pendant 28 jours jusqu'à une taille de 100 mm³. Différents groupes de souris ont reçu des doses quotidiennes de 50 mg/kg de metformine, phenformine ou du composé **A**. Par la suite, les souris ont été sacrifiées afin de recueillir les organes et les tumeurs pour des analyses par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Le développement d'une méthode d'analyse par MALDI-TOF a permis de localiser et quantifier les biguanides dans les organes et tumeurs. Différents paramètres, tels que le choix de matrice et la méthode de dépôt, ont été optimisés afin d'obtenir des courbes d'étalonnage par IMS des trois composés biguanides. Une accumulation du composé **A** est observée dans le foie et le rein. Avec une régression linéaire, les concentrations approximatives du composé **A** dans le rein et le foie sont de 16,8 µg/mL et 4,1 µg/mL respectivement. De plus, pour en apprendre davantage sur le mécanisme d'action des biguanides dans le traitement du cancer, une étude différentielle d'expression de certaines biomolécules a été effectuée sur les foies des différents groupes de souris traitées. Des différences d'expression de certaines biomolécules ont été observées par rapport aux foies des animaux non-traités, notamment pour le signal à *m/z* 558 qui montre une grande abondance de ce phospholipide seulement dans les foies traités au composé **A**. Bref, le mécanisme d'action des biguanides dans le traitement du cancer demeure à l'étude pour de futurs travaux et développements.

Mots-clés : Biguanides, cancer, spectrométrie de masse, MALDI-TOF, imagerie

Abstract

The development of new therapies against pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), one of the most malignant and deadly tumors, has become of great interest for finding effective treatment. Many research groups have studied different types of biguanides in cancer treatment which inspired our group to synthesize a library of biguanide analogs. These new compounds can inhibit the tumor growth and show a great selectivity. We identified a biguanide with a phenylethynylbenzyl side chain as our hit compound, designated as compound **A**, which is 800 times more active than metformin and 10 times more active than phenformin, two commercial biguanide compounds used as antidiabetics. *In vivo* studies have been performed where human PDAC cells have been grafted in the subcutaneous space of mice and let to grow for 28 days to about 100 mm³. Different groups of mice were exposed to daily doses of 50mg/kg of metformin, phenformin or compound **A**. The tumors and organs of the treated mice were recovered to analyze their mechanism of action by MALDI-TOF mass spectrometry.

A method of analysis by MALDI-TOF was developed in order to locate and quantify the biguanide compounds in the treated organs and tumors. Various parameters, such as the choice of matrix and the deposition method were optimized to obtain IMS calibration curves for each biguanide compound. The analyzed organs and tumors showed accumulation of compound **A** in the liver and kidney. With linear regression, this semi-quantitative method allowed to determine a concentration of 16.8 µg/mL in the kidney and 4.1 µg/mL in the liver. Another objective to understand the mechanism of action of biguanides in cancer therapy is to detect molecular patterns of biomolecules that correlate with the diagnostic, the prognostic and to the response of the therapy. The livers from mice treated with compound **A** showed differences of expression of certain phospholipids compared to the other livers, namely at *m/z* 558. In short, the mechanism of action of biguanides in cancer therapy is still a work in progress for future developments.

Keywords: Biguanides, cancer, mass spectrometry, MALDI-TOF, imaging

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	xii
1 Introduction.....	1
1.1 Le cancer.....	1
1.1.1 Le cancer du pancréas.....	2
1.1.2 Voies de traitements pour le cancer du pancréas.....	4
1.2 Les biguanides.....	5
1.2.1 Généralités.....	5
1.2.2 Épidémiologie des biguanides.....	6
1.2.3 Mécanismes d'action de la metformine comme médicament antidiabétique et anticancéreux.....	7
1.2.4 Synthèse d'analogues de metformine dans le groupe Schmitzer.....	9
1.2.5 Études <i>in vivo</i> du composé A.....	13
1.3 La spectrométrie de masse.....	15
1.3.1 Théorie et instrumentation.....	15
1.3.2 La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI).....	16
1.3.3 L'analyseur en masse par temps de vol (TOF).....	19
1.3.4 L'analyse en mode réflectron.....	20
1.3.5 L'analyse par spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF.....	21
1.4 L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS).....	23
1.4.1 L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	23
1.4.2 L'analyse de tissus biologiques par IMS.....	24
1.5 Objectifs de recherche.....	25
2 Partie expérimentale.....	26

2.1	Préparation des homogénats de foies de souris.....	26
2.2	Préparation et coupe des tissus biologiques.....	27
2.3	Déposition de la matrice	28
2.4	Méthode de quantification des biguanides sur tissus biologiques	30
2.5	Comparaison de la composition lipidique des organes.....	32
2.6	Analyse par MALDI-MS	33
3	Développement de la méthode d'analyse par spectrométrie de masse MALDI.....	34
3.1	Paramètres d'ionisation des biguanides	34
3.2	Choix de la matrice et méthode de dépôt.....	36
3.3	Limites de détection des biguanides en MALDI	41
3.4	Courbes d'étalonnage pour la quantification des biguanides	43
4	Résultats d'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) MALDI	48
4.1	IMS et quantification des biguanides dans les organes et tumeurs traités	48
4.2	Comparaison de la composition lipidique des foies de souris par IMS	51
5	Conclusion et perspectives.....	55
5.1	Conclusion	55
5.2	Perspectives.....	56
6	Références.....	i
7	Annexe	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Principales matrices utilisées en MALDI selon la classe privilégiée de molécules à analyser. ⁶¹	18
Tableau II.	Préparation et intensités des signaux des biguanides des différentes matrices organiques.	38
Tableau III.	Limites de détection des biguanides (en $\mu\text{g/mL}$) obtenues sur des homogénats de foie.	43
Tableau IV.	Valeurs de l'intensité moyenne (u.a.) du composé A sur l'aire totale de la région.	50

Liste des figures

Figure 1.	Description globale des différents stades de cancer selon le système TMN. ³	2
Figure 2.	Schéma général de l'anatomie du pancréas.	3
Figure 3.	Composés de type biguanides communément utilisés en pharmacologie comme agents antidiabétiques.	6
Figure 4.	Représentation générale de la chaîne respiratoire mitochondriale.	8
Figure 5.	Structure générale d'un biguanide et ses sites de fonctionnalisation (R : hydrogène, alkyle, aryle).....	9
Figure 6.	Structures générales des composés biguanides synthétisés.	11
Figure 7.	Criblage <i>in vitro</i> des analogues de la metformine sur des cellules pancréatiques saines (<i>IMR90</i>) et cancéreuses (<i>NB508</i>).	12
Figure 8.	Structure du composé A retenu pour les essais <i>in vivo</i>	12
Figure 9.	Courbe de croissance des cellules tumorales (PDAC) après les traitements des composés biguanides.	14
Figure 10.	Composantes de base d'un spectromètre de masse.....	15
Figure 11.	Représentation schématique de l'ionisation de molécules par désorption laser. 17	
Figure 12.	Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol (TOF).	19
Figure 13.	Représentation schématique de l'analyse en mode réflectron.	21
Figure 14.	Représentation schématique d'un spectromètre de masse en tandem TOF-TOF. 22	
Figure 15.	Schéma du protocole général pour une expérience d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF.	24
Figure 16.	Montage de l'échantillon biologique pour la coupe au cryostat.	28
Figure 17.	Montage du TMSprayer 1 ^{ère} génération.....	29
Figure 18.	Exemple d'une lame ITO pour une expérience d'imagerie.	31
Figure 19.	Spectres de masse des biguanides obtenus par ionisation laser (LDI).....	34
Figure 20.	Spectres MS/MS des trois biguanides en solution MeOH/H ₂ O (50/50) suivant la méthode de fragmentation d'ions parents MALDI-LIFT-TOF-TOF.	35

Figure 21.	Intensités relatives des biguanides avec les trois meilleures matrices déterminées par spectrométrie de masse MALDI.	39
Figure 22.	Comparaison de l'intensité du signal de la metformine ($m/z=130,11$ Da) selon le solvant de la matrice de CHCA.	40
Figure 23.	Comparaison de l'intensité du signal du composé A ($m/z=292,15$ Da) selon le nombre de passages de matrice CHCA avec le TMSprayer.	41
Figure 24.	Limites de détection des biguanides en solution de MeOH/H ₂ O (50/50).....	42
Figure 25.	Courbes de régression linéaire de l'intensité maximale normalisée en fonction de la concentration des biguanides – A (composé A $m/z=292,15 \pm 0,5$ Da), B (metformine $m/z=130,11 \pm 0,5$ Da) et C (phenformine $m/z=206,14 \pm 0,5$ Da).	46
Figure 26.	Photos des tumeurs PDAC recueillies.	48
Figure 27.	Localisation du composé A ($m/z=292,15 \pm 0,5$ Da) dans les organes et la tumeur PDAC acquis à une résolution spectrale de 75 μ m.	49
Figure 28.	Concentrations approximatives (μ g/mL) du composé A dans les organes et tumeur évaluées par la méthode de quantification IMS-MALDI-TOF.	50
Figure 29.	IMS en mode positif des foies de souris véhicules et traités aux différents biguanides.	53
Figure 30.	IMS en mode négatif des foies de souris véhicules et traités aux différents biguanides.	54
Figure 31.	Représentation schématique d'une nouvelle méthode de quantification par IMS avec des homogénats d'organes dopés.	56
Figure A-1.	Spectres de masse des biguanides lors des expériences de limites de détection sur tissu homogène de foie de souris.	ii

Liste des abréviations

2,5 DHA	2,5-Dihydroxyacetophénone
2D	Deux dimensions
9AA	9-Aminoacridine
ACN	Acétonitrile
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	Protéine kinase activée par AMP (en anglais: <i>AMP-Activated Protein Kinase</i>)
ATP	Adénosine triphosphate
CHCA	Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
Cm	Centimètre
CO ₂	Dioxyde de carbone
Da	Dalton
DAN	1,5-Diaminonaphthalène
DESI	Désorption/ionisation par électronébulisation (en anglais: <i>Desorption ElectroSpray Ionization</i>)
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
<i>e</i>	Charge élémentaire
EtOH	Éthanol
fg/mL	Femtogramme par millilitre
H ₂ O	Eau
IGF-1	Facteur de croissance 1 ressemblant à l'insuline (en anglais: <i>Insulin-Like Growth Factor 1</i>)
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
IR	Infra-rouge
ITO	Oxyde d'indium-étain (en anglais: <i>Indium-Tin-Oxyde</i>)
kHz	Kilohertz
KP4	Souche de cellules cancéreuses pancréatiques
kV	Kilo Volts
λ	Longueur d'onde
L	Distance parcourue d'un ion

LDI	Désorption/ionisation laser
MALDI	Désorption/ionisation par laser assistée par matrice (en anglais: <i>Matrix assisted laser desorption/ionization</i>)
MBT	2-Mercaptobenzothiazole
MeOH	Méthanol
Met	Metformine
mg/kg	Milligrammes par kilogrammes en masse
mL	Millilitre
mL/h	Millilitre par heure
mm ³	Millimètre cube
mm/min	Millimètre par minute
MS	Spectrométrie de masse
mTOR	Cible de la rapamycine chez les mammifères (en anglais: <i>Mammalian target of rapamycin</i>)
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
Nd :YAG	Laser au grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (en anglais: <i>neodymium-doped yttrium aluminium garnet</i>)
nm	Nanomètre
ns	Nanoseconde
NTf ₂	Bis(trifluoromethanesulfonyl)amide
OCT-1	Transporteur de cations organiques 1
OCT-3	Transporteur de cations organiques 3
PDAC	Adénocarcinome ductal pancréatique
PEB	Phényléthynylbenzyle
pg/mL	Picogramme par millilitre
Phen	Phenformine
PSI	Livre-force par pouce carré
R	Groupement fonctionnel (chaîne aliphatique ou aromatique)
<i>Res</i>	Résolution spectrale

Rpm	Rotation par minute
S/N	Rapport signal/bruit
SIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaires (en anglais: <i>Secondary Ion Mass Spectrometry</i>)
t	Temps de vol d'un ion
TfO ⁻	Ion triflate
TFA	Acide trifluoroacétique
TNM	Système de stadification du cancer (tumeur, nodules, métastases)
TOF	Temps d'envol (en anglais: <i>Time of Flight</i>)
UV	Ultra-Violet
V_s	Potentiel d'accélération à la source
X ⁻	Contre-anion
Δm	Largeur d'un pic à la mi-hauteur d'un spectre de masse (mesure en masse)
Δt	Largeur d'un pic à la mi-hauteur d'un spectre de masse (mesure en temps de vol)
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μm	Micromètre
°C	Degré Celsius

À ma famille, mon amour et spécialement, à mon petit frère Ti-Lou.

Pour Papi et Mamie.

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier particulièrement ma directrice de recherche, Andreea, sans qui mon développement dans le monde de la chimie n'aurait jamais été aussi riche. Merci d'avoir cru en moi dès le début, lorsque je me cherchais un avenir dans la chimie, et ce jusqu'à la fin, où je ressors avec un beau bagage scientifique. Je suis très reconnaissante de tous tes conseils, les opportunités, tes présences et tes encouragements au cours de mon parcours dans le groupe. C'est une chance d'avoir fait partie de la belle famille de chimistes Schmitzer.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de cette belle famille où nos chemins se sont croisés au cours de ces deux belles années. Premièrement, Julie, ma douce jumelle (oui, oui, ma sœur jumelle!) qui amène la joie, le positif et la bonne humeur et qui est devenue pour moi une grande amie. Avec toi, il est impossible pour moi de me sentir de mauvaise humeur, et je sais qu'on va toujours pouvoir se confier l'une à l'autre. Je suis si heureuse de t'avoir rencontrée, hélas ce n'est pas fini! Je suis prête à faire la vieille gribiche avec toi du haut de nos 85 ans, en campagne, et en train de juger les gens! Bisous! Ensuite, Margaux (c'est de l'eau!), ma belle voisine de bureau qui me comprend à tout coup et avec qui j'ai découvert une personne tellement généreuse, rayonnante et sublime. Tu as été un vrai soleil pour moi et j'ai nul doute que cela va continuer par après. Je t'adore! Solène, la sagesse du groupe, tu as été présente pour moi dès le début de ma maîtrise, et où j'ai appris bien des choses à tes côtés et où je me suis senti encouragée dans tout ce parcours inconnu qui se présentait à moi. Merci pour tous tes conseils et aussi pour les rires et les niaiseries qui étaient au rendez-vous (surtout en Démo hihi!).

Pour continuer; Audrey où on a partagé énormément sur nos projets, mais aussi avec le sport, la bouffe et les bons films sur Netflix; Jérémie et Guillaume, mon bromance préféré, qui trouvent toujours à faire rire et à détendre l'atmosphère; Philippe, pour toutes nos discussions de tout et de rien autour d'un café ou d'un UberEats impossible à résister; et Amélie, sans qui la conférence de Supra à Québec aurait été pas mal moins éclatante! J'aimerais aussi faire un «*shout-out*» à notre groupe de la conférence à Lecce, Audrey, Jérémie, Julie et Philippe, *grazie* pour tous les moments inoubliables de ce «*trip*», *prego*! Sans oublier la belle Clem du groupe voisin des Collins avec qui j'ai pu toujours rire et partager sur du hockey! À tous les stagiaires qui sont passés dans le groupe, Émilie, Thibault, Pierre (plutôt au Doc maintenant, bravo!),

Célia, ce fût un plaisir d'apporter de la folie dans votre formation. À mes deux stagiaires de l'été 2018, Samy et Alexanne, des perles rares qui ont tellement apporté au projet! Je suis très reconnaissante de tout notre temps passé ensemble et ça me fait très chaud au cœur de vous voir grandir dans le monde scientifique. Vous avez été tellement investis, curieux, géniaux, souriants, et je pourrais en nommer encore pleins des qualités comme ça. Vous les méritez tous!

Un énorme merci au Professeur Pierre Chaurand pour m'avoir permis de réaliser ce projet de recherche en utilisant les appareils de votre laboratoire. Merci pour votre temps et vos conseils dans le monde de la spectrométrie de masse. Merci aux membres du groupe, Frédéric et Ethan, pour toutes vos réponses à mes questions, votre patience, votre coopérativité et surtout votre sourire! Un merci particulier à Ethan pour m'avoir formé et montré tous les secrets du monde du MALDI-TOF. Ce fût un immense plaisir de partager ce projet avec toi et je suis très reconnaissante envers ta générosité que tu as donné au cours de ce projet qui a vu toutes sortes de couleurs!

Pour terminer, j'aimerais remercier mes proches et mes amis d'avoir cru en moi tout au long de mon parcours universitaire. Mes amis, même si vous ne comprenez rien lorsque je vous parlais de chimie, merci de m'avoir écouté et encouragé. Ma famille, merci pour vos encouragements et votre support. Nous sommes soudés lors de moments difficiles, et c'est ce qui fait notre force irréprochable! Merci à mes parents, Bernard et Liette, pour l'aide financière, les encouragements, l'amour et tout votre dévouement à chaque jour. Je vous aime plus que tout. À mon petit frère, Louis-Victor, tu m'as donné le goût de pousser ma curiosité, et ce sans même que tu le saches! Tu es si important pour moi, et je t'adore Ti-lou! Enfin, mon amour, Simon, qu'est-ce que je ferais sans toi ?! Merci pour ton aide, ta présence, tes compliments, tes encouragements et ta compréhension (surtout lorsque j'étais stressée!). Tu es mon rayon de soleil au quotidien et mon ange dans mon cœur à tout jamais (même si tu as ton petit côté démon, hihi!). Je t'aime fort fort mon amour!

1 Introduction

1.1 Le cancer

Avec les technologies récentes en matière de diagnostic et de traitement du cancer, les progrès dans la lutte contre cette maladie sont encourageants. Toutefois, les défis demeurent encore nombreux en matière d'améliorer l'efficacité et la sélectivité de ces innovations. Il existe un grand nombre de chercheurs qui s'intéressent au cancer et à la recherche d'un traitement potentiel de cette maladie, qui pose un réel problème dans la société, en raison des nombreuses causes et conséquences éventuelles. En effet, le cancer est la deuxième cause de mortalité au monde¹, responsable d'environ un décès sur six.² Au Canada, le cancer demeure la principale cause de décès selon les données statistiques canadiennes sur le cancer de 2018.³

Cette maladie provient d'une perturbation du matériel génétique des cellules, entraînant une prolifération de cellules mutantes, appelées tumeurs, qui peuvent être bénignes ou malignes. Les cellules malignes sont celles responsables de l'apparition d'un cancer. Cette maladie peut provenir d'un facteur génétique ou d'un facteur externe qui favorise la mutation des cellules. Il existe différents types de cancer, communs, ou plus rares, affectant tous les organes du corps.

Les cancers sont classifiés en stades afin de pouvoir apporter un pronostic sur l'état clinique des patients atteints. Ces stades sont déterminés par un système TNM, qui prend en considération la taille primitive de la tumeur (T), le nombre de nœuds lymphatiques (N) et s'il y a présence de métastases (M).^{3,4,5} La combinaison de ces critères permet de classifier les cancers selon différents stades allant de *0* à *IV* (**Figure 1**). Plus le stade est élevé, moins le pronostic et le taux de survie sont favorables.

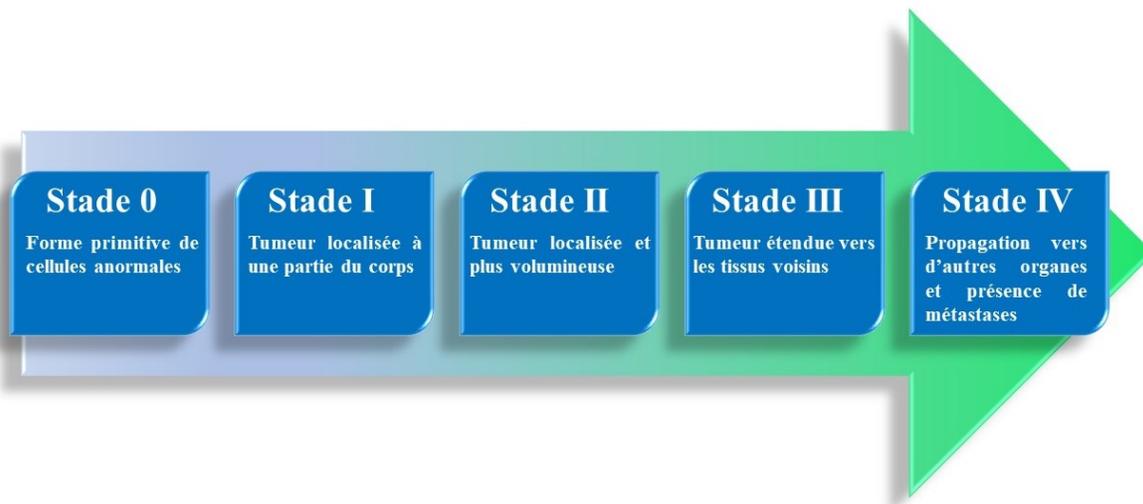


Figure 1. Description globale des différents stades de cancer selon le système TNM.³

Les cancers des organes internes tel que l'estomac, l'œsophage et le pancréas sont plus susceptibles d'être diagnostiqués à un stade plus avancé, car ils ne présentent pas de signes ou de symptômes d'alerte. Étant constatées à un stade avancé, ces tumeurs des organes internes présentent les plus faibles taux de survie. Le cancer du pancréas est un des plus mortels puisqu'il présente un taux de survie de 8 % sur 5 ans au Canada.^{3,6}

1.1.1 Le cancer du pancréas

Le pancréas est un organe vital qui possède plusieurs fonctions, dont la principale est de produire et libérer dans le sang une série d'hormones qui sont nécessaires au métabolisme du glucose. Cet organe est constitué de deux types de cellules majeures : les cellules endocrines et exocrines (**Figure 2**).^{7,8} Les cellules endocrines forment des agglomérats, appelés îlots de Langerhans, dispersés dans l'ensemble de l'organe. Ces derniers sont responsables de la fabrication de certaines hormones, telles que l'insuline ou le glucagon, qui sont essentielles au métabolisme du glucose. Les cellules exocrines forment le canal pancréatique. Elles comprennent les cellules ductales, qui forment les parois, et les cellules acineuses, qui forment les glandes terminales des canaux. Les tumeurs du pancréas affectent principalement les cellules exocrines ductales et se développent alors dans le canal pancréatique. Ce dernier sécrète les

enzymes digestives essentielles dans le duodénum.⁸ L'adénocarcinome ductal pancréatique (PDAC) est considéré comme une des formes de tumeur solide la plus maligne qui soit.⁹

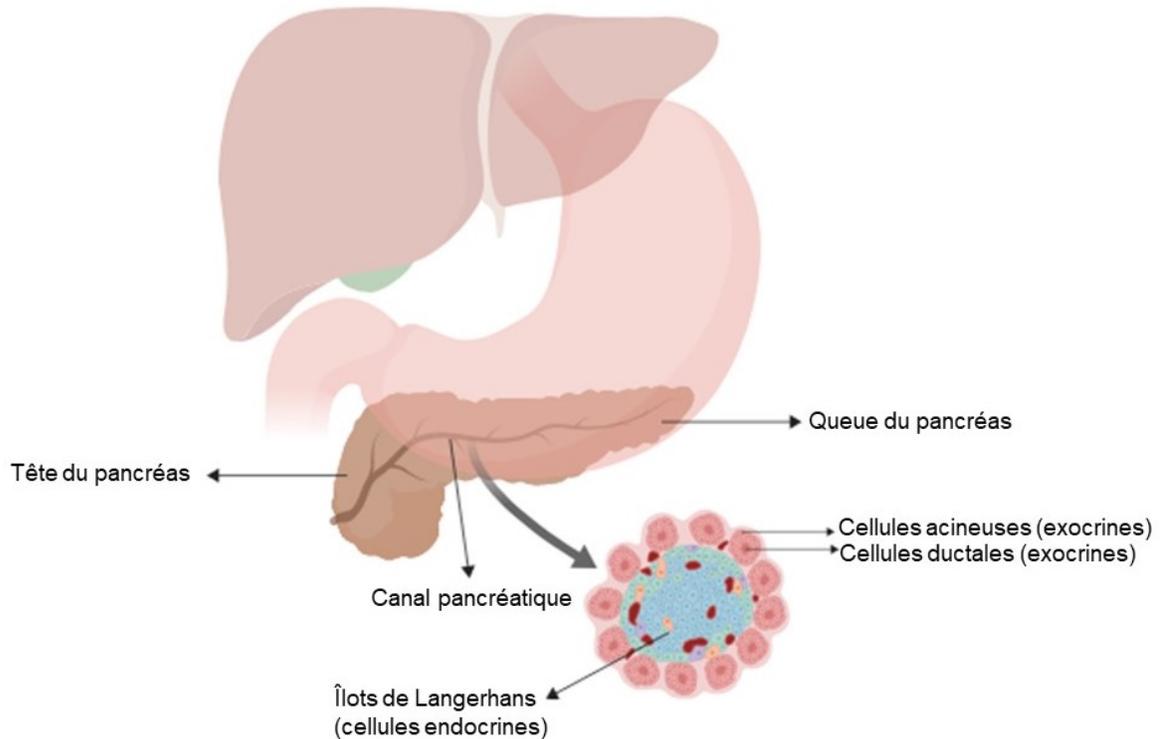


Figure 2. Schéma général de l'anatomie du pancréas.

Étant un des plus néfastes, le cancer du pancréas occupe le douzième rang du type de tumeur le plus diagnostiqué au Canada.¹⁰ Les données de mortalité sont cependant plutôt sombres en occupant le quatrième rang des principales causes de décès par le cancer au Canada et le septième rang dans le monde.^{11,12} Parmi les différents types de cancer, les tumeurs du pancréas font partie des tumeurs les plus difficiles à diagnostiquer en raison de la localisation profonde du pancréas dans l'abdomen, ce qui rend la tâche invasive et complexe.^{7,13} De plus, la plupart du temps, les symptômes liés au cancer du pancréas n'apparaissent pas dès la formation des premières tumeurs. Il y a souvent une confusion entre des symptômes gastro-intestinaux plutôt bénins, ce qui retarde le stade de diagnostic.¹⁴ En effet, 56,7 % des cas de cancer du

pancréas au Canada sont découverts au stade le plus avancé, ce qui réduit considérablement les chances de survie de ces patients.³

Aucun facteur externe spécifique n'est connu comme principale cause du cancer du pancréas. Toutefois, plusieurs facteurs comme le tabagisme, l'obésité ou l'hérédité sont fréquemment observés chez les patients atteints de ce cancer.⁷ Le risque d'apparition du cancer du pancréas augmente également avec l'âge. Les études montrent que 80 % des cas diagnostiqués au Canada sont des personnes de plus de 60 ans.¹⁰ Bien que certains facteurs externes puissent être contrôlés pour diminuer l'apparition de cancers, dans certains cas il n'est pas possible de limiter ce risque. Il est donc capital d'avoir un suivi constant afin de détecter rapidement la présence de tumeurs.

1.1.2 Voies de traitements pour le cancer du pancréas

Le traitement du cancer du pancréas présente un défi, car il ne réagit que très faiblement à la chimiothérapie ou à la radiothérapie et présente de forts risques de récurrence.¹⁵ L'efficacité des nouvelles méthodes de détection ou de traitement n'a pas beaucoup augmenté au fil des années,¹³ ce qui n'améliore pas les statistiques de mortalité associées à ce cancer. Tel que mentionné précédemment, un diagnostic tardif complique l'obtention d'un remède puissant, sans risque de rechute, car la tumeur du pancréas se retrouve souvent en phase trop avancée ou métastatique.

Afin d'augmenter la force du traitement, il est possible de combiner la chimiothérapie avec la radiothérapie pour décimer les cellules malignes du pancréas.¹⁶ Cependant, les recherches montrent que les patients ayant obtenu la combinaison des deux thérapies n'avaient pas une meilleure réponse au traitement que les patients ayant eu recours à la chimiothérapie seule.^{9,16}

Une autre voie de traitement possible est la combinaison de plusieurs agents anticancéreux connus pour leur efficacité dans d'autres types de cancers. Une des combinaisons d'agents chimiothérapeutiques les plus utilisées pour traiter le cancer du pancréas est connue sous l'abréviation « FOLFIRINOX » et est composée d'oxaliplatine, d'irinotecan, de 5-

fluorouracil ainsi que de la leucovorine.¹⁷ Il est ainsi possible d'observer un effet plus efficace et un taux de survie plus long qu'en utilisant un seul agent anticancéreux, tel que le gemcitabine, qui était devenu l'option de choix pour traiter les tumeurs avancées du pancréas.¹⁷ Cependant, la combinaison de plusieurs agents anticancéreux alourdit les effets secondaires, sans tout de même assurer une destruction complète de la tumeur en place.¹⁸

Enfin, la voie de traitement la plus prometteuse demeure l'ablation chirurgicale de la tumeur.^{13,19} Lorsque la tumeur est retirée du pancréas, les patients survivent en moyenne entre une et deux années supplémentaires. Malheureusement, il y a un fort taux de récurrence.^{20,21} Cependant, seulement 20 % des patients peuvent obtenir cette chirurgie d'ablation puisque la plupart des tumeurs diagnostiquées sont à un stade trop avancé.¹⁵ Cette chirurgie demeure complexe et invasive puisque le pancréas est un organe abdominal interne difficile d'accès. Elle comporte habituellement un risque élevé de complications par la suite. Des études sont en cours pour un traitement néoadjuvant, qui consiste à réduire partiellement la taille de la tumeur du pancréas par chimiothérapie avant de procéder à l'ablation totale.²² Cependant, pour connaître le traitement le plus adapté, il reste à évaluer la réponse chimiothérapeutique, la meilleure manière d'administrer cette voie de traitement ainsi qu'à vérifier si le taux de survie est prolongé.²²

1.2 Les biguanides

1.2.1 Généralités

La découverte des biguanides remonte aux années 1920, où des molécules, formées de deux groupements guanidines, ont été extraites du lilas français (*Galega officinalis*).²³ Par la suite, les biguanides ont été identifiés comme agents biologiquement actifs. La metformine (**Figure 3**) est le dérivé biguanide avec deux groupements méthyles sur l'amine tertiaire terminale. Elle est actuellement grandement utilisée dans le traitement du diabète de type II. En effet, les extraits du lilas français ont été utilisés durant le Moyen Âge en France pour traiter les gens souffrant de syndromes urinaires provenant de cette maladie.²⁴ Ce n'est qu'au début des

années 1950 que le médecin français Jean Sterne s'est penché sur les propriétés hyperglycémiques des biguanides, et notamment de la metformine.²⁵ C'est sous le nom commun de « Glucophage » que les premiers comprimés de metformine ont été utilisés en Europe pour le traitement du diabète et ensuite dans le reste du monde au début des années 1960.²⁶ Aujourd'hui, celle-ci est prescrite à environ 120 millions de patients autour du monde souffrant du diabète de type II.²⁷ La metformine compense, entre autres, le dérèglement du métabolisme du glucose chez les patients diabétiques, ce qui aide à pallier aux complications. La phenformine (**Figure 3**) est également un biguanide, utilisé comme agent hypoglycémique dans les années 1960 et ayant montré une meilleure efficacité que la metformine. Cependant, elle a rapidement été retirée des marchés pharmaceutiques au début des années 1970 en raison de sa production d'acidose lactique aiguë et de complications cardiaques.²⁸ La buformine (**Figure 3**), tout comme la phenformine, possède les mêmes effets biologiques, mais sa toxicité lui a valu d'être retirée du marché également.²⁴

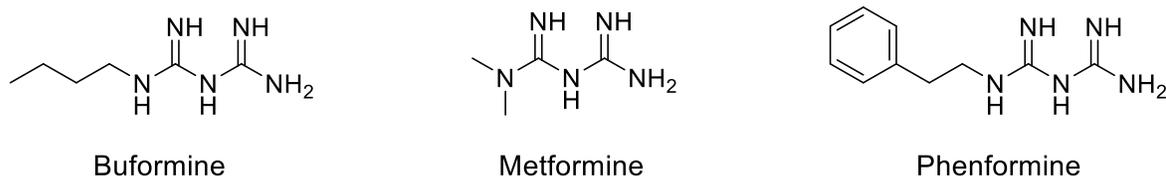


Figure 3. Composés de type biguanides communément utilisés en pharmacologie comme agents antidiabétiques.

1.2.2 Épidémiologie des biguanides

La metformine, prescrite comme agent antidiabétique, a attiré l'attention des chercheurs sur le cancer en raison de résultats assez surprenants à la suite de récentes études épidémiologiques. Ces dernières ont dévoilé que les patients atteints de diabète de type II, traités avec la metformine, présentaient moins de risque de développer certains cancers.²⁶ En effet, les patients diabétiques sont aussi plus propices à développer un cancer à long terme, notamment des cancers du côlon, du pancréas ou du foie, qui sont les plus communs en raison de la résistance à l'insuline, ce qui engendre une prolifération plus importante des cellules

anormales.²⁹ De plus, l'Association Américaine du Diabète et l'Association Américaine du Cancer ont publié un rapport conjoint montrant les liens entre ces deux maladies et en indiquant les mécanismes physiologiques pouvant être associés à ces conditions.³⁰ Ce qui ressort davantage chez les patients atteints de diabète de type *II* et ceux atteints du cancer est qu'ils partagent de multiples facteurs de risque qui augmentent l'apparition de ces maladies, soient l'âge, l'obésité et les mauvaises habitudes de vie.

L'effet de la metformine comme agent anticancéreux n'est pourtant pas prouvé. Il existe encore beaucoup de débats dans la littérature concernant le mécanisme d'action de la metformine, afin d'expliquer son effet antiprolifératif ciblant les cellules tumorales. Différentes hypothèses seront proposées dans la prochaine section. Plusieurs études décrivent l'effet des biguanides sur la réduction du cancer, notamment avec les cas de cancer de la prostate,³¹ du sein³² ainsi que du foie et pancréas.³³ Bien que les résultats de ces recherches montrent que l'utilisation de la metformine permet un meilleur pronostic suite au diagnostic, le lien direct entre la metformine et la diminution du taux de mortalité n'a pas encore été établi.^{34,35,36}

1.2.3 Mécanismes d'action de la metformine comme médicament antidiabétique et anticancéreux

Bien que plusieurs études aient été effectuées sur l'effet de la metformine associé avec la prévention et le traitement de certains cancers, son mécanisme d'action, autant comme antidiabétique ou anticancéreux, est encore à l'étude. Afin de comprendre son action dans la cellule, les chercheurs se sont intéressés à son transport à travers la membrane cellulaire. Ce médicament est très hydrophile, ce qui ne permet pas son passage par diffusion directe à travers la bicouche lipidique, dont l'intérieur est majoritairement hydrophobe.³⁷ La metformine s'introduit dans la cellule par des transporteurs de cations organiques (OCT-1 et OCT-3), qui sont présents en grand nombre aux parois des membranes cellulaires de cellules hépatiques et intestinales.^{38,39}

Le diabète est associé à une augmentation de la glycolyse, du taux de glucose sanguin et du taux d'insuline dans le sang.⁴⁰ Ainsi, la metformine permet d'avoir un contrôle glycémique

grâce à ces effets antidiabétiques. Elle diminue, entre autres, le taux d'insuline et aussi d'autres hormones, comme IGF-1 (en anglais : *Insulin-like Growth Factor 1*), ce qui se traduit en une diminution du taux de glucose dans le sang. Ces hormones sont aussi des agents qui jouent un rôle important dans la croissance, le développement et le métabolisme des cellules, ce qui peut influencer la prolifération cellulaire.⁴¹

Une des hypothèses pour son action anticancéreuse propose une cible intracellulaire, impliquée dans la modification de la quantité d'énergie produite sous forme d'adénosine triphosphate (ATP). En effet, certains chercheurs ont proposé comme cible le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce dernier permet de former deux électrons par oxydation du NADH en NAD^+ , générant ainsi un gradient électrochimique le long de la chaîne respiratoire (**Figure 4**).⁴² Le complexe I assure le bon fonctionnement des autres complexes, notamment le complexe V qui permet de former l'ATP.

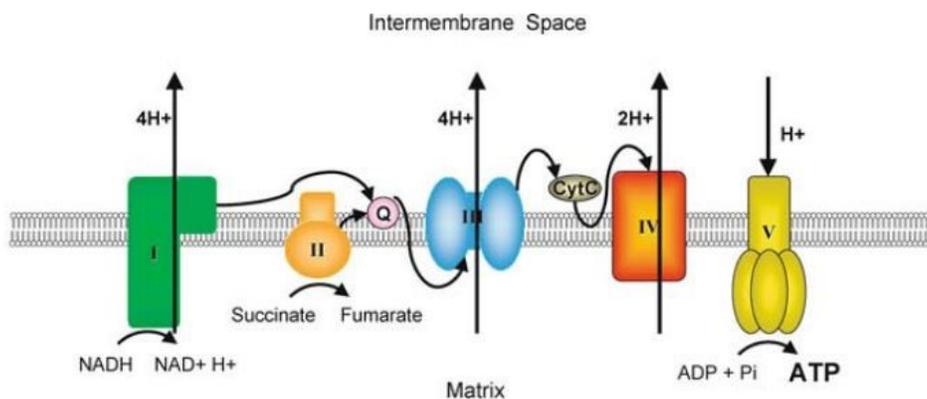


Figure 4. Représentation générale de la chaîne respiratoire mitochondriale. Reproduction autorisée et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁴³

Cette source d'énergie (ATP) provient de l'adénosine monophosphate (AMP). Par conséquent, la conversion de l'AMP en ATP se fait par l'ATP synthase (complexe V). Un dysfonctionnement du complexe I induit une accumulation de l'AMP. L'augmentation du taux AMP/ATP vient activer l'AMPK (en anglais : *AMP-Activated Protein Kinase*), une enzyme qui intervient lorsque le niveau d'ATP de la cellule diminue. L'enzyme AMPK activée vient alors

inhiber un ensemble de voies métaboliques nécessaires au maintien de l'homéostasie de la cellule.³⁹

Le stress énergétique, causant l'activation de l'enzyme AMPK afin de diminuer les voies nécessitant de l'ATP, vient aussi inhiber la cible de la rapamycine chez les mammifères, mTOR (en anglais : *Mammalian Target of Rapamycin*). Cette enzyme régule en majeure partie la croissance, la mobilité et la prolifération cellulaire.⁴¹ Ainsi, l'inhibition de mTOR provoquerait un effet antiprolifératif des cellules cancéreuses.

À l'heure actuelle, d'autres cibles potentielles de la metformine et des dérivés biguanides en général sont à l'étude. La chaîne respiratoire mitochondriale est particulièrement étudiée afin d'expliquer la diminution de la production d'énergie de la cellule.⁴⁴ Donc, la metformine pourrait avoir un effet antiprolifératif en affectant les autres complexes de la chaîne respiratoire.

1.2.4 Synthèse d'analogues de metformine dans le groupe Schmitzer

Les biguanides sont des molécules présentant des propriétés chimiques de base forte en raison des deux groupements de guanidine, qui détiennent une grande capacité à capter un proton. De cette façon, ils sont polaires et hydrophiles, par la présence des guanidines qui peuvent créer des liaisons hydrogène. Les biguanides peuvent être fonctionnalisés sur les différents atomes d'azote, excepté l'azote centrale, par des groupements apolaires, entre autres.

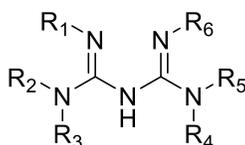


Figure 5. Structure générale d'un biguanide et ses sites de fonctionnalisation (R : hydrogène, alkyle, aryle).

Ces fonctionnalisations changent les propriétés physico-chimiques des biguanides et les rendent ainsi plus lipophiles. De cette façon, en fonctionnalisant le biguanide, il est possible de modifier ses propriétés et ainsi obtenir une nouvelle activité biologique. La metformine est le biguanide le plus simple commercialement disponible. Tel que mentionné, la metformine a besoin de transporteurs spécifiques pour entrer dans la cellule car elle n'est pas assez lipophile pour diffuser à travers la bicouche lipidique. En fonctionnalisant ce type de molécule avec des groupements apolaires, il est alors possible d'augmenter la lipophilie de la molécule favorisant ainsi une meilleure pénétration des membranes cellulaires. Une plus grande biodisponibilité de la metformine peut alors se traduire par un changement au niveau de l'activité cellulaire.

Au cours des dernières années, le groupe Schmitzer a élaboré de nouveaux composés perturbateurs de membranes cellulaires en étudiant leurs propriétés biologiques dans différents modèles, soit des liposomes, des bactéries ou des globules rouges.⁴⁵ Plus récemment, le groupe a étudié la perméabilisation membranaire des sels d'alkyles biguanidiums.⁴⁶ Ainsi, en s'inspirant de la metformine, les biguanides synthétisés avec de nouvelles chaînes alkyles ont démontré de nouveaux effets perturbateurs de membrane. Il était donc intéressant d'optimiser l'activité transmembranaire de dérivés de metformine en observant l'influence de la structure sur la perméabilité. Pour cela, différents paramètres ont été étudiés, comme la nature des substituants **R** (chaîne aliphatique ou cycle aromatique), la présence d'un espaceur ainsi que le nombre et la nature d'un contre-anion **X⁻** (**Figure 6**).

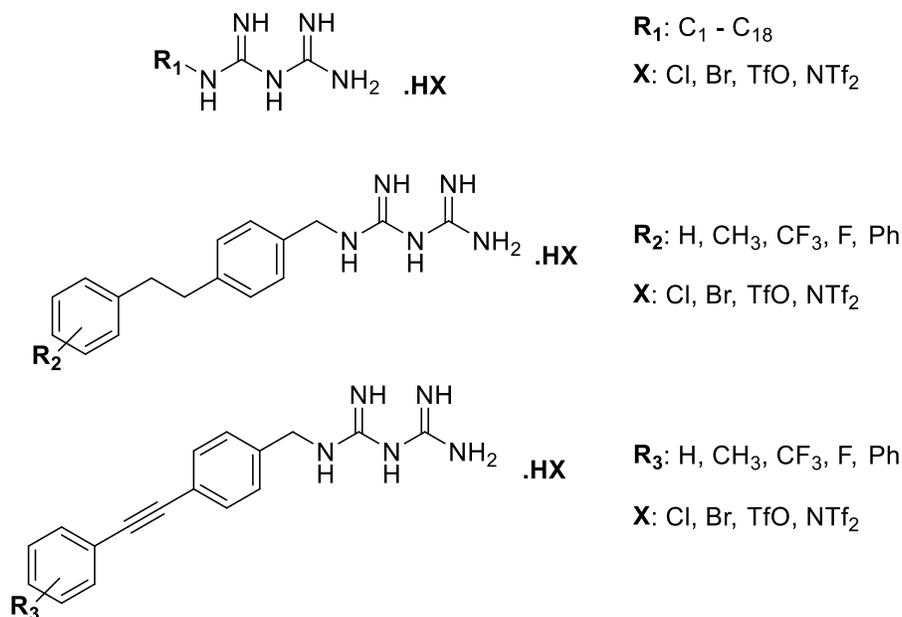


Figure 6. Structures générales des composés biguanides synthétisés.

La synthèse d'une librairie des composés biguanide a été effectuée en majeure partie par Audrey Hébert, étudiante au *Ph.D.* du groupe Schmitzer. Les dérivés de biguanide avec une chaîne phényléthynylbenzyle (**Figure 6**) ont montré une meilleure diffusion transmembranaire, selon des essais de transport d'ions de chlorure et de dépolarisation membranaire de liposomes. Afin de comparer l'effet des composés biguanides sur la croissance de cellules saines et tumorales du pancréas, des études *in vitro* ont été menées. Le criblage *in vitro* (**Figure 7**) montre le taux de croissance de cellules du pancréas saines et tumorales afin d'illustrer si le composé est sélectif envers les cellules saines ou cancéreuses. Certains dérivés ont été identifiés comme étant extrêmement actifs *in vitro*, dont le composé **R₃OTf** de la **Figure 6**, qui montre la plus grande inhibition de croissance de cellules tumorales, et évalué à une activité 800 fois plus élevée que la metformine (**Figure 7**). Ce dernier sera renommé comme le composé **A**. La structure du **A** (**Figure 8**) est constituée du groupement biguanide relié à une chaîne de phényléthynylbenzyle (PEB) par un espaceur d'un carbone avec un contre-anion de trifluorométhylsulfonate (TfO⁻). Par la suite, ce nouveau composé a été retenu pour des études *in vivo*.

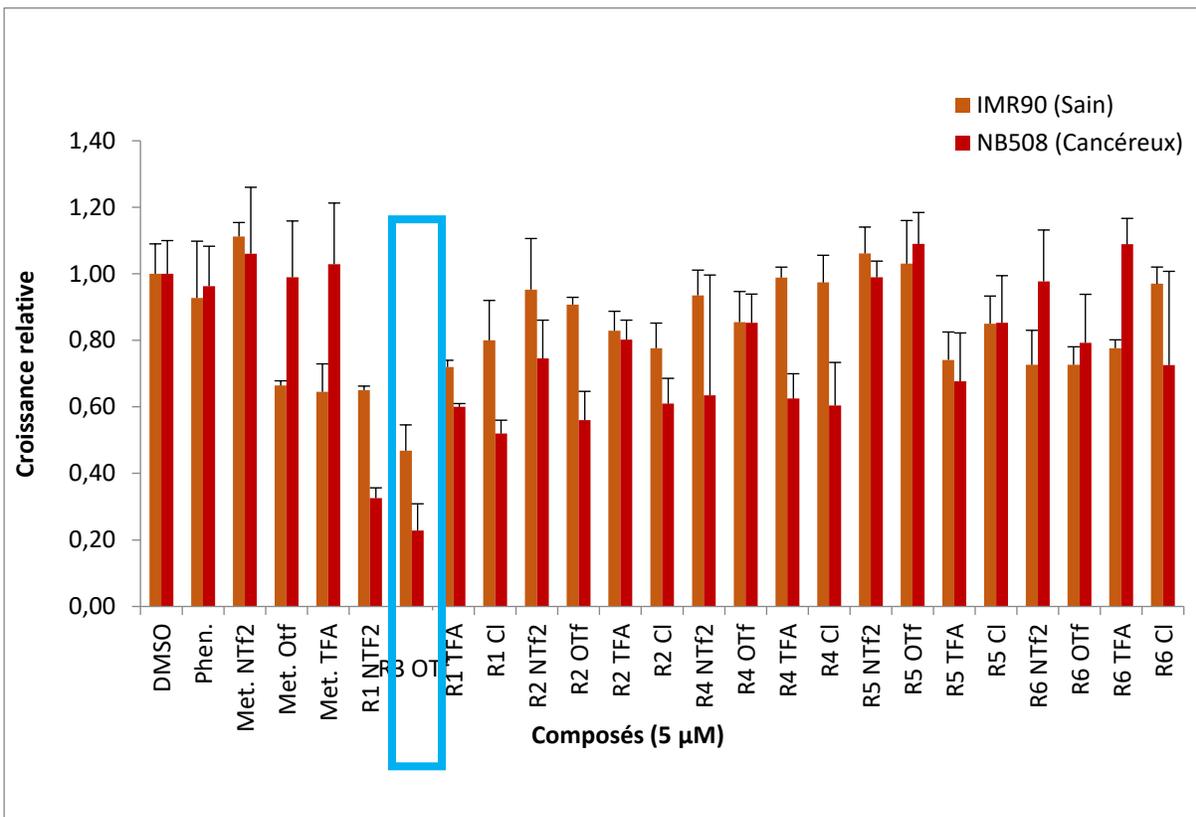


Figure 7. Criblage *in vitro* des analogues de la metformine sur des cellules pancréatiques saines (*IMR90*) et cancéreuses (*NB508*). Le contrôle positif est le DMSO. Travaux effectués par Audrey Hébert du groupe Schmitzer.

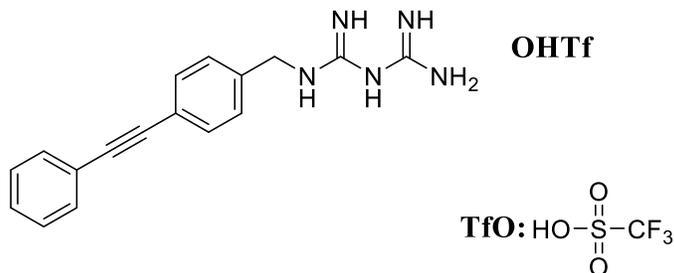


Figure 8. Structure du composé A retenu pour les essais *in vivo*.

1.2.5 Études *in vivo* du composé A

Afin d'étudier la capacité du biguanide A à inhiber la croissance de cellules tumorales, des études ont été effectuées pour déterminer la dose maximale tolérée par un organisme. Ces essais ont été réalisés en se conformant aux normes et directives prescrites pour l'expérimentation animale. En plus du composé A, les mêmes études *in vivo* ont été réalisées avec la metformine et la phenformine, commercialement disponibles, afin de les comparer au nouvel analogue synthétisé. Ces études ont été effectuées par Maxime Parisotto, agent de recherche dans le groupe Schmitzer du département de chimie travaillant en collaboration avec le groupe du professeur G. Ferbeyre du département de biochimie de l'Université de Montréal.

En résumé, des xénogreffes de cellules PDAC humaines ont été greffées dans l'espace sous-cutané de souris nues, qui sont des souris génétiquement modifiées résultant en un système immunitaire déficient. La tumeur a été laissée pour se développer pendant 28 jours jusqu'à atteindre une taille homogène d'environ 100 mm³. Par la suite, les souris ont été réparties en plusieurs groupes et exposées à différents biguanides (metformine, phenformine, composé A), à des doses de 50 mg/kg. Ces traitements ont été effectués par des injections intrapérinéales quotidiennes durant cinq jours consécutifs. Un des groupes de souris était un groupe de contrôle (véhicule), c'est-à-dire qu'il recevait une injection saline quotidienne pour cinq jours consécutifs. Après une pause de sept jours, un deuxième traitement d'une durée de cinq jours a été administré aux groupes de souris ayant reçu une première dose de biguanides, et de même pour le groupe contrôle avec une injection saline. Un arrêt complet de la prolifération tumorale à la suite du deuxième traitement du biguanide A a été observé (**Figure 9**), suggérant une meilleure activité anticancéreuse de ce composé. De plus, des échantillons de ces tumeurs et des différents organes ont été prélevés dans chacun des groupes de souris afin de les analyser par imagerie en spectrométrie de masse, une technique qui sera présentée dans la **section 1.3**.

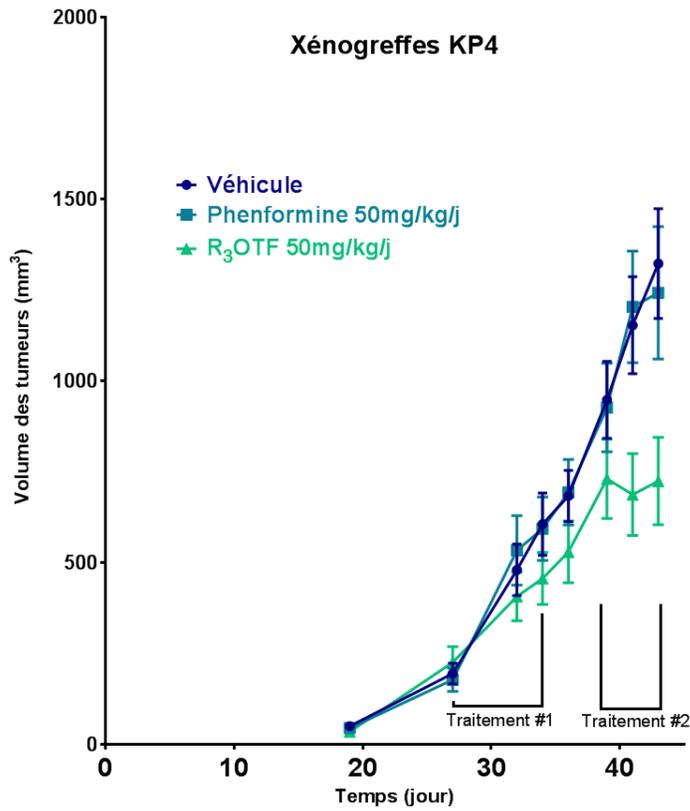


Figure 9. Courbe de croissance des cellules tumorales (PDAC) après les traitements des composés biguanides. Le nombre de souris par groupe sont n=6 souris pour la phenformine, n=17 souris pour le R₃OTF et n=10 souris pour le groupe véhicule. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type standard. Travaux effectués par Dr. Maxime Parisotto.

1.3 La spectrométrie de masse

1.3.1 Théorie et instrumentation

La spectrométrie de masse est une technique analytique courante utilisée dans plusieurs secteurs de recherche, notamment, dans les domaines pharmaceutiques, environnementaux et agro-alimentaires, pour n'en nommer que quelques-uns. Cette technique permet d'obtenir des informations qualitatives et quantitatives sur la structure moléculaire de composés organiques ou inorganiques par mesure de leur masse. Ainsi, cela peut permettre différentes applications comme une analyse structurale détaillée pour mener à une identification d'une molécule, ou la quantification d'une molécule ainsi que l'imagerie d'une surface. Souvent, la spectrométrie de masse est couplée à une technique de séparation moléculaire, telle que la chromatographie liquide, ou à une technique spectroscopique pour analyser des mélanges complexes.

Le principe de la spectrométrie de masse est de former des ions pour ensuite effectuer leur séparation selon leur rapport de masse sur charge (m/z). Il est ensuite possible d'évaluer qualitativement et quantitativement les signaux détectés. Le spectre de masse généré représente l'intensité du courant d'ions en fonction de leur rapport de masse (en Daltons) sur leur charge élémentaire. De manière générale, le spectromètre de masse possède quatre composantes distinctes, soit un système d'introduction de l'échantillon, une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur avec un système de traitement de données (**Figure 10**).

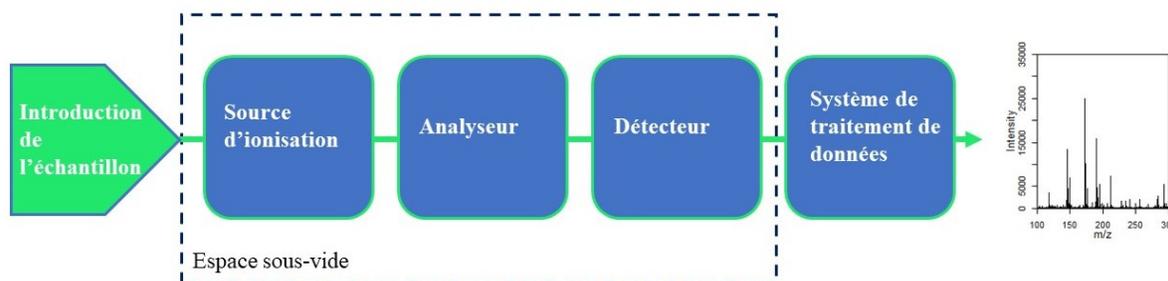


Figure 10. Composantes de base d'un spectromètre de masse.

Après avoir introduit l'échantillon dans l'appareil, selon une injection directe ou à la suite d'une méthode de séparation, les molécules se font premièrement ioniser. Différentes sources d'ionisation avec différentes caractéristiques existent selon le type de molécule à analyser.^{47,48,49} Les ions générés se font entraîner par un champ électrostatique vers un analyseur qui va séparer ces ions selon leur rapport m/z . Les nouvelles technologies ont permis de développer une grande variété d'analyseurs, tel que le quadripôle,⁵⁰ l'Orbitrap⁵¹ ou l'analyseur par temps de vol,⁵² qui sont les plus courants et qui permettent différentes séparations à différentes résolutions. Pour terminer leur trajet, les ions arrivent à un détecteur en induisant un courant électrique, converti par un système informatique en données d'analyse.

Pour les travaux de recherches présentés dans ce mémoire, la spectrométrie de masse par désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et à analyseur par temps de vol (TOF) sera présentée plus en détails. Cette méthode d'ionisation est qualifiée comme étant douce et permet ainsi d'analyser des molécules avec une grande variété de poids moléculaires et très peu de possibilités de fragmentation. Les spectres générés par cette méthode sont majoritairement des ions mono-chargés, ce qui facilite davantage l'interprétation. Le MALDI permet d'analyser par masse la plupart des larges biomolécules, telles que les protéines,⁵³ les nucléotides⁵⁴ ou les lipides.⁵⁵ Par ailleurs, l'analyse de petites molécules pharmacologiques s'est développée au fil des années,⁵⁶ ce qui rend cette technique très polyvalente.

1.3.2 La désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Le MALDI est une technique qui permet d'analyser des composés immobilisés sur une surface conductrice de manière rapide et précise. Le principe de cette technique se base sur des impulsions laser focalisées sur l'échantillon provoquant la sublimation d'ions et de molécules neutres.⁵⁷ La matrice, qui est un composé organique, est ajoutée à l'analyte et aide à ioniser ce dernier, sans qu'il ne se dégrade en absorbant l'énergie du laser (**Figure 11**). La matrice est soit ajoutée à la solution d'analyte ou appliquée en couche mince sur la surface. Lorsque la matrice sèche, elle forme des cristaux et des co-cristaux avec l'analyte qui seront ainsi sublimés par l'énergie libérée sous forme de chaleur après l'impulsion laser. Durant la phase gazeuse, différents processus de transfert réactionnel ou de fragmentation moléculaire se produisent pour

former les ions, selon le type d'analytes et la matrice organique.⁵⁷ Les ions formés sont par la suite accélérés par un champ électrostatique pour être dirigés vers l'analyseur en masse.

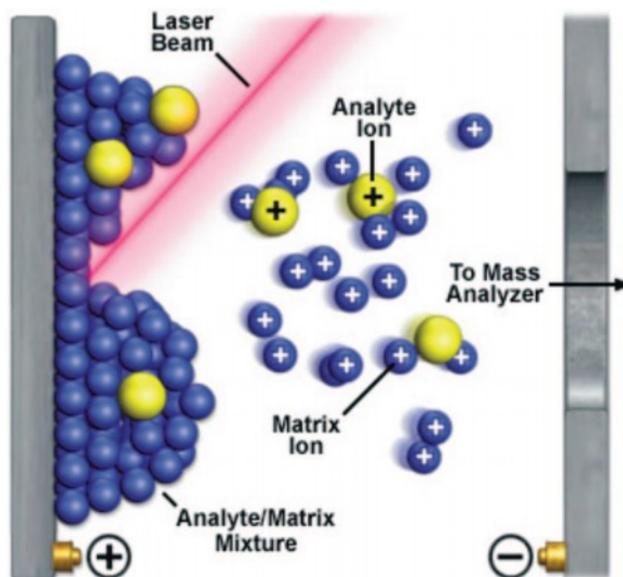
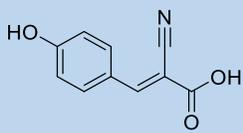
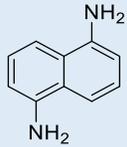
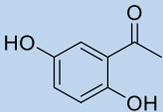
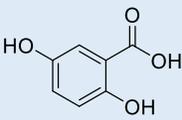
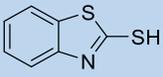
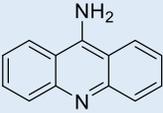


Figure 11. Représentation schématique de l'ionisation de molécules par désorption laser. Reproduction autorisée et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁵⁸

Il existe une grande variété de matrices utilisées en MALDI capables de s'adapter à certains types de molécules pour faciliter leur ionisation. Le choix d'une matrice appropriée à l'analyte étudié est une étape cruciale dans l'analyse. Différentes matrices sont présentées dans le **Tableau I** présentant les principales familles de biomolécules couramment analysées en MALDI. Ces composantes de matrice présentent une grande absorption dans l'infrarouge (IR) ou dans l'ultra-violet (UV) en raison de la présence de chromophores ou de systèmes conjugués, ce qui facilite l'absorption de l'irradiation du laser. En effet, la longueur d'onde, la durée du pulse, le diamètre d'impact et l'intensité du laser sont d'autres paramètres à prendre en considération lors de l'analyse. Les lasers présents dans les appareils de spectrométrie de masse MALDI peuvent aller du lointain UV au lointain IR. Dans le cas d'expériences d'imagerie en spectrométrie de masse, ce sont des lasers à l'azote ($\lambda_{\text{émission}} 337 \text{ nm}$) ou au grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:YAG) ($\lambda_{\text{émission}} 355 \text{ nm}$) avec un pulse de moins de 3 ns

pour une meilleure sensibilité.^{59,60} Une fois les ions formés suite à l'impulsion laser, ceux-ci sont dirigés vers l'analyseur en masse.

Tableau I. Principales matrices utilisées en MALDI selon la classe privilégiée de molécules à analyser.⁶¹

Matrice	Structure	Poids Moléculaire (Da)	Classe de molécules privilégiée
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)		189,17	Protéines, Peptides, Drogues
1,5-Diaminonaphthalène (DAN)		158,20	Lipides, Protéines
2,5-Dihydroxyacetophénone (2,5-DHA)		152,15	Lipides
Acide 2,5-Dihydroxybenzoïque (DHB)		154,12	Drogues, Lipides, Peptides
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)		167,24	Lipides
9-Aminoacridine (9AA)		194,24	Lipides, Drogues

1.3.3 L'analyseur en masse par temps de vol (TOF)

Un type d'analyseur les plus courants dans les instruments MALDI est l'analyseur en masse par temps de vol (TOF pour *Time-Of-Flight* en anglais) (**Figure 12**). Le principe est relativement simple. Les ions sont séparés selon le temps qu'ils prennent pour traverser un tube d'espace défini, libre de champs électrostatiques et magnétiques.⁵⁷ Tel que mentionné précédemment, suite à l'irradiation laser, les ions sont accélérés vers l'analyseur en appliquant un champ électrostatique de l'ordre de 20-25 kV.⁵⁵ Les ions vont voyager à différentes vitesses dans l'analyseur selon leur rapport m/z . L'énergie potentielle étant la même pour tous au départ, la taille des ions fera ainsi varier la vitesse de ceux-ci selon le principe de l'énergie cinétique. Ainsi, les ions avec les plus petits rapports m/z seront les premiers à se rendre au détecteur.

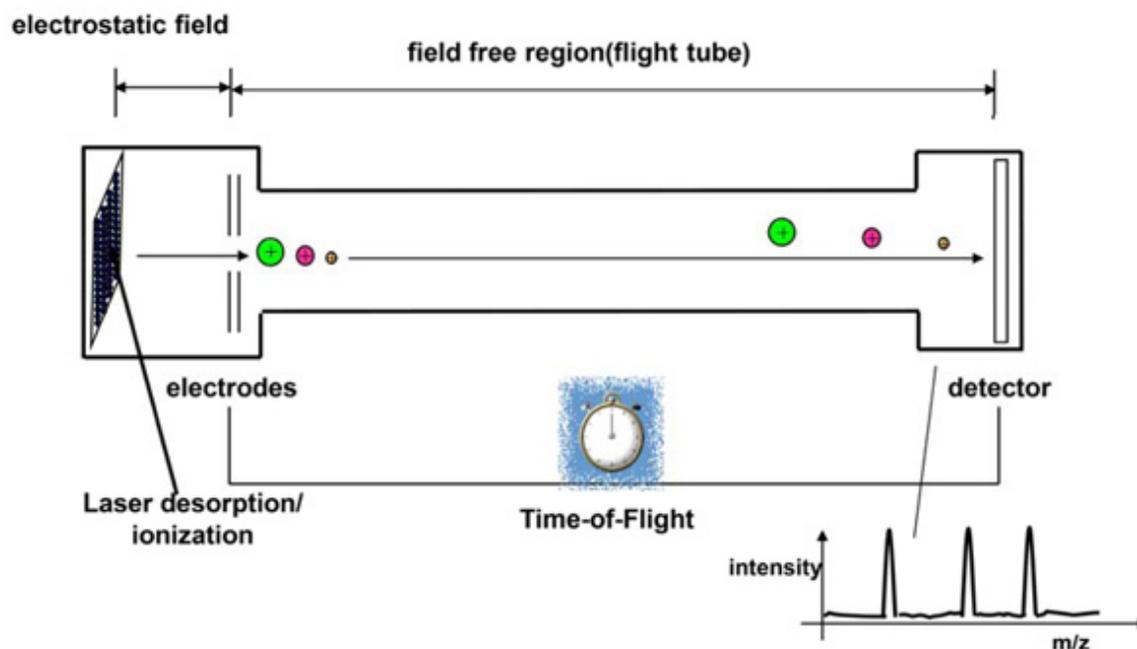


Figure 12. Représentation schématique d'un analyseur à temps de vol (TOF).
Reproduction autorisée et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁶²

Le temps de vol d'un ion (t) dans un espace libre de champ dépend de son rapport m/z , et donc de l'énergie qu'il aura emmagasinée selon l'équation suivante :

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{(2eV_s)}{L^2} \right) * t^2 \quad (\text{Équation 1,1})$$

La distance parcourue (L) et le potentiel d'accélération à la source (V_s) sont des paramètres connus et fixes de l'appareil, e étant la charge élémentaire. Les analyseurs TOF n'ont pas de limites de masses à analyser, ce qui rend les appareils MALDI-TOF très répandus dans le domaine d'analyse de biomolécules à hauts poids moléculaires.⁶³ Cependant, un des inconvénients provient de sa géométrie linéaire et du fait qu'il existe une dispersion au niveau de la distribution spatiale, temporelle ainsi que de l'énergie cinétique des ions.⁶⁴ En effet, au cours de l'ionisation par le laser, il arrive que les ions de même ratio m/z ne soient pas ionisés simultanément ou qu'ils soient dispersés dans l'espace en raison des irrégularités des cristaux de matrice.⁶⁴ Ceci induit donc une variation de l'énergie cinétique des ions qui traversent l'analyseur et produit une résolution spectrale inférieure. Grâce aux avancées technologiques, des améliorations sont possibles pour les analyseurs en masse pour contrer cet effet et ainsi augmenter la résolution spectrale. Il s'agit de l'extraction retardée,⁵² qui consiste à accorder un court délai entre la formation d'ions et leur accélération, ou à ajouter un réflectron.

1.3.4 L'analyse en mode réflectron

Afin de permettre une meilleure résolution spectrale, l'utilisation d'un réflectron (ou miroir électrostatique) est devenue une des grandes avancées dans le monde de la spectrométrie de masse.⁶⁵ Le réflectron est situé à la fin de l'analyseur TOF. Il est composé d'une série d'électrodes qui appliquent un champ électrostatique retardant les ions qui y pénètrent. La forme courbée de ce dispositif permet de réduire la dispersion des énergies cinétiques des ions de même m/z et les dirige vers le détecteur placé à la fin du parcours co-axial (**Figure 13**). En pénétrant dans le réflectron, les ions de même espèces qui ont une plus grande énergie cinétique, vont pénétrer plus profondément dans le dispositif afin d'être tous mis au même niveau d'énergie cinétique avant d'arriver au détecteur.⁶⁵ Tous les ions qui y pénètrent se font ralentir jusqu'à l'arrêt complet pour être ensuite éjectés à la même vitesse.

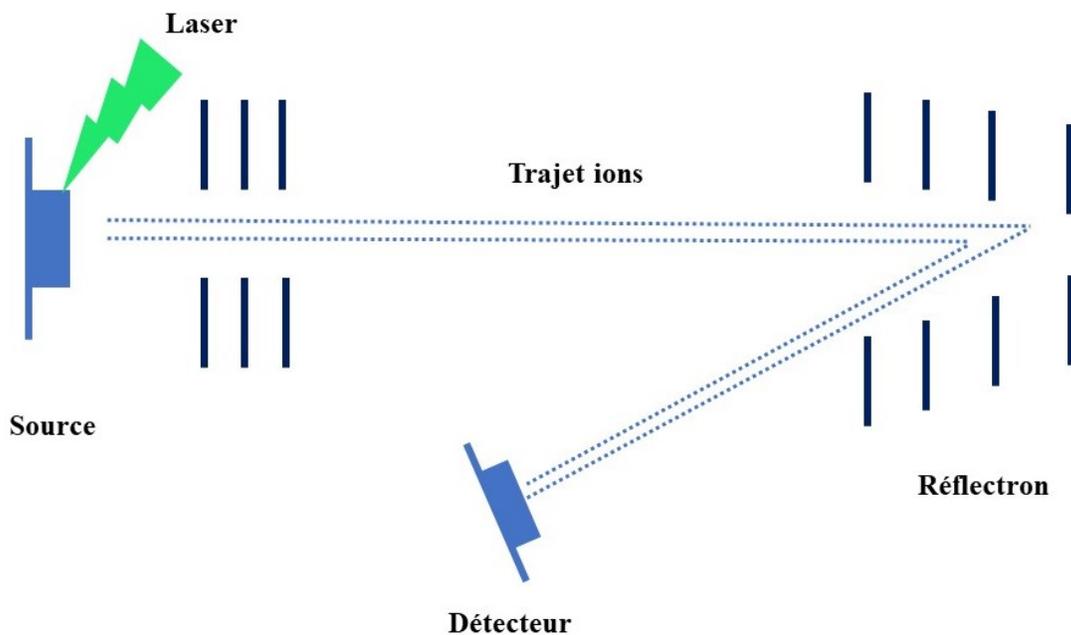


Figure 13. Représentation schématique de l'analyse en mode réflectron.

Le réflectron permet donc de corriger la dispersion temporelle des ions en augmentant leur distance de parcours dans l'analyseur, c'est-à-dire leur temps de vol. Le faisceau d'électrons est ainsi focalisé au point final ce qui améliore la résolution spectrale (Res). Ce paramètre peut être relié au temps de vol selon l'équation suivante :

$$Res = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (\text{Équation 1,2})$$

Δm et Δt correspondent à la largeur du pic à la mi-hauteur sur un spectre de masse avec soit une mesure en masse (Δm) ou en temps de vol (Δt).

1.3.5 L'analyse par spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF

La technique d'analyse de spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir davantage de renseignements sur la structure moléculaire de l'analyte à des fins d'identification, notamment pour des protéines ou des molécules à plus petits poids moléculaires.⁶⁶ Les différents groupements fonctionnels présents dans la molécule vont se fragmenter pour générer des ions

fragments qui leur sont caractéristiques. Il est, par la suite, possible de comparer les ions fragments obtenus expérimentalement avec ceux d'une banque de données ou avec une molécule standard.

Il existe une grande variété de combinaisons d'analyseurs possibles pour permettre différents types d'analyses. Celle qui a été utilisée au cours de ce projet de recherche est la combinaison TOF-TOF. Le principe consiste à coupler deux analyseurs (dans ce cas-ci, à temps de vol) l'un à la suite de l'autre pour sélectionner un ion d'intérêt dans le premier analyseur, et le fragmenter pour suivre son parcours dans le deuxième analyseur.⁶⁷ (**Figure 14**) Dans le premier analyseur TOF, l'ion précurseur est sélectionné par une trappe ionique située à l'extrémité de l'analyseur, qui va isoler l'ion choisi. Par la suite, l'ion précurseur est fragmenté par son instabilité à la suite de l'augmentation de l'énergie laser à cet endroit.⁶⁸ Lorsque la fragmentation se produit dans le premier TOF, les ions fragments possèdent la même vitesse que l'ion parent. Une trappe ionique pourra alors sélectionner ces ions selon leur temps de vol afin de permettre leur analyse dans le deuxième TOF.

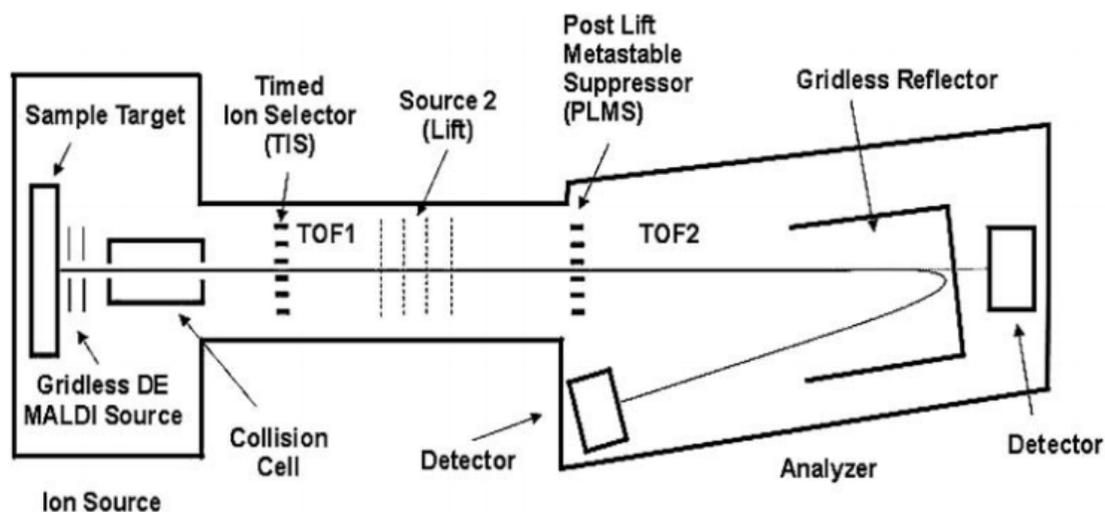


Figure 14. Représentation schématique d'un spectromètre de masse en tandem TOF-TOF. Reproduction autorisée et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁶⁶

1.4 L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS)

1.4.1 L'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF

La spectrométrie de masse offre une technologie assez impressionnante en termes de précision, d'efficacité et de sensibilité dans la détermination de composition moléculaire. Avec l'apparition de l'imagerie par spectrométrie de masse dans le début des années 90, cette technique permet d'effectuer la cartographie de certaines molécules, notamment sur des tissus biologiques.⁶⁹

Les résultats des expériences d'imagerie sont une recombinaison offrant des informations sur la distribution et l'intensité d'un composé sur une surface à deux dimensions (2D), ce qui peut être représenté comme une photo des molécules présentes. C'est une technique qui permet de visualiser la répartition de divers composés en suivant leur masse dans une région délimitée.⁷⁰ Elle présente un avantage, comparée à la spectrométrie de masse conventionnelle, car de nombreux spectres de masse peuvent être enregistrés à plusieurs points sur une surface afin d'établir une reconstitution en 2D selon la coordonnée et l'abondance du signal.

Différentes techniques d'ionisation et de désorption sont utilisées pour effectuer de l'imagerie, soit en SIMS (*Secondary Ion Mass Spectrometry*)⁷¹, DESI (*Desorption ElectroSpray Ionization*)⁷² ou MALDI, qui est la technique la plus courante dans plusieurs domaines^{73,74,75} et celle utilisée au cours de ce projet de recherche. Avec le MALDI, tel qu'expliqué plus haut, une couche de matrice est appliquée uniformément sur l'échantillon. Une impulsion laser vient désorber la matrice et l'analyte de la surface, induisant l'ionisation durant la phase gazeuse.

Il est possible d'effectuer une analyse de la distribution spatiale de plusieurs composés tel que des drogues pharmaceutiques, des polymères, des lipides, des protéines et plus encore.⁵⁹ Ce qui rend cette technique attrayante est qu'elle combine la précision de la spectrométrie de masse, la détection de plusieurs analytes à la fois et des analyses sans marqueurs.⁵⁹

1.4.2 L'analyse de tissus biologiques par IMS

Une des applications les plus communes de l'IMS-MALDI est l'identification de composés présents dans des tissus biologiques afin d'en apprendre davantage sur leurs mécanismes d'action dans des processus biologiques ou dans certaines maladies.⁷⁶ L'IMS-MALDI continue d'évoluer afin de pouvoir diversifier l'étendue des tissus à analyser tel que les organes,⁷⁷ les tumeurs,⁷⁸ et jusqu'à un organisme entier.⁷⁹

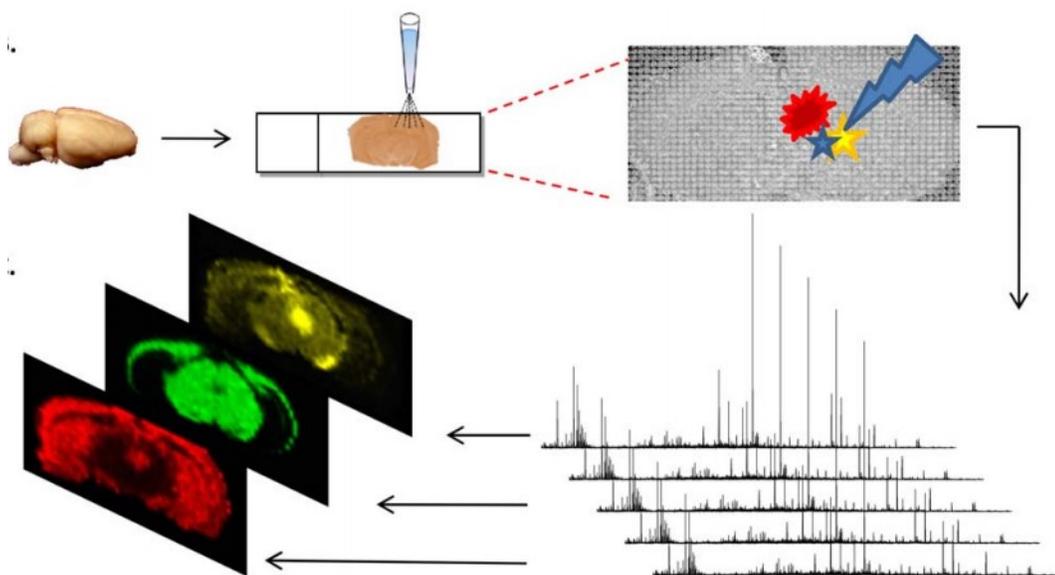


Figure 15. Schéma du protocole général pour une expérience d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Reproduction et modifications autorisées et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁸⁰

Pour des tissus biologiques à analyser, ces derniers sont tranchés finement (10 à 20 μm) à l'état congelé. Les tranches sont appliquées sur une surface conductrice, qui est souvent une lame de microscope recouverte d'une couche conductrice d'oxyde d'indium-étain (ITO). La matrice choisie est ensuite déposée de manière uniforme par un système automatisé avec des paramètres optimisés. La région d'analyse est ensuite délimitée et les spectres obtenus suite à l'ablation par le laser sont combinés. En sélectionnant le poids moléculaire d'intérêt, il est possible de former une image en deux dimensions avec les coordonnées de plan cartésien recueillies (**Figure 15**).

1.5 Objectifs de recherche

Les objectifs de ce projet de recherche en collaboration avec le professeur P. Chaurand consistent à développer une méthode d'analyse par spectrométrie de masse des organes et tumeurs prélevés des groupes de souris ayant reçu des doses de biguanides, suite aux essais *in vivo*. Cette méthode d'analyse en imagerie par spectrométrie de masse permettra de construire une image en 2D pour visualiser les signaux en masse des biguanides dans les organes et tumeurs, afin de comprendre davantage le mécanisme d'action anticancéreux. En effet, la technique d'imagerie par MALDI-TOF peut permettre différentes analyses afin de localiser et de quantifier une drogue présente dans des tissus biologiques en suivant l'intensité de son signal m/z .

Pour ce faire, une optimisation du signal des biguanides en solution sera effectuée en étudiant diverses matrices organiques. Puis, pour effectuer l'imagerie sur les tissus biologiques, les paramètres de dépôt de matrice seront optimisés afin d'obtenir de bonnes intensités pour les signaux désirés. Pour effectuer une courbe d'étalonnage sur tissus biologique, il suffira de déposer une goutte des solutions de drogues à différentes concentrations connues sur un tissu et appliquer les paramètres optimisés de dépôt de matrice. En connaissant et en sélectionnant le signal m/z respectif des trois biguanides recherchés, il sera possible d'effectuer des images des organes et tumeurs traités avec les biguanides afin de localiser le composé. Enfin, grâce à la courbe d'étalonnage, il sera possible de déterminer la concentration approximative des biguanides dans les tissus prélevés.

Ces résultats permettront dans un premier temps d'examiner dans quels organes les biguanides s'accumulent à la suite des traitements. Il sera aussi possible de comparer les différences au niveau de l'accumulation des trois biguanides dans les organes de même que dans les tumeurs prélevées, et observer si le nouveau biguanide **A** possède un comportement similaire ou différent des deux autres biguanides étudiés (metformine et phenformine).

2 Partie expérimentale

Ce chapitre présentera les protocoles expérimentaux suivis pour chacune des étapes du développement de la méthode d'analyse par spectrométrie de masse. Tous les appareils utilisés ainsi que les matériaux seront détaillés dans cette section.

2.1 Préparation des homogénats de foies de souris

Les foies de souris utilisés pour la préparation d'homogénats ont été obtenus avec le consentement du comité éthique de l'Université de Montréal. À l'âge de 30 jours, les souris sont sacrifiées par asphyxie, en augmentant la concentration en CO₂ dans leur cage. Elles sont disséquées pour en recueillir les organes d'intérêt, qui sont par la suite congelés avec de l'azote liquide. Les organes sont enveloppés dans du papier d'aluminium, identifiés et entreposés dans un congélateur réglé à -80°C jusqu'à leur utilisation.

La méthode de préparation des homogénats de foie a été inspirée par le protocole élaboré par Groseclose et Castellino⁸¹ et retravaillée par les membres du groupe de Pierre Chaurand.

Deux foies de souris congelés sont tranchés en petits morceaux avec une lame de rasoir et placés dans une fiole de plastique (type Eppendorf® de 15 mL). La fiole contenant les morceaux de foie est conservée dans un bécher rempli de glace afin d'éviter que la fiole n'atteigne la température pièce. Par la suite, un volume équivalent de petites billes métalliques préalablement lavées à l'éthanol est ajouté au contenu de la fiole. Celle-ci est manuellement agitée à l'aide d'un vortex pendant 30 secondes et remise au bécher de glace pour 30 secondes. Cette procédure est répétée pour une période d'environ 20 minutes, ou jusqu'à temps que tous les morceaux de foie soient bien homogénéisés. Les billes sont ensuite retirées à l'aide d'un aimant. Par la suite, le mélange de foie obtenu est centrifugé dans la fiole pendant 30 secondes à 2000 rpm avec un rayon de rotor de 10,0 cm. Suite à la centrifugation, l'émulsion présente sur le dessus du mélange est retirée à l'aide d'une pipette Pasteur. La fiole avec le mélange de foie est ensuite placée dans un bécher de glace et mis au bain à ultrasons (*Bransonic, Branson*

Ultrasonics Corporation, CT, USA) pour 30 minutes. Si l'homogénat n'est pas utilisé le jour même, celui-ci est identifié et entreposé à -80°C.

Afin de pouvoir couper des sections d'homogénats, un moule est confectionné avec un polymère visqueux à température pièce et solide sous 0°C, soit du polyéthylène glycol (PEG-400). Celui-ci est déposé dans une fiole de plastique d'environ 1 cm de diamètre. Une tige de métal de 5 mm de diamètre est ensuite insérée dans le polymère liquide et le tout est placé au cryostat à -25°C afin de figer dans cette forme pendant au moins 1 heure. La tige est ensuite retirée délicatement toujours à -25°C. L'homogénat de foie dégelé peut ensuite être transféré délicatement dans le moule froid à l'aide d'une pipette Pasteur, tout en évitant de former des bulles d'air. Le moule avec l'homogénat est ensuite mis à -80°C pour au moins 12 heures avant l'utilisation.

2.2 Préparation et coupe des tissus biologiques

Toutes les coupes des tissus ont été effectuées à l'aide d'un cryostat de type microtome (*Thermo Fisher Scientific MicromTM HM550, MI, USA*). La température de l'enceinte ainsi que de la tête de coupe a été réglée à -25°C.

Les organes et tumeurs recueillis provenant des expériences *in vivo* sont conservés au congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation, tout comme les moules d'homogénats de foie. Ils sont ensuite sortis et placés rapidement dans l'enceinte du cryostat. L'échantillon peut être coupé après 30 minutes afin que celui-ci atteigne la température du cryostat, ce qui facilite la découpe. Les organes, tumeurs ainsi que les homogénats sont chacun fixés sur un support amovible à l'aide d'une goutte de polyéthylène glycol (**Figure 16**). Ces derniers sont placés sur la tête de coupe et taillés afin d'enlever la couche de glace qui peut se former. Ensuite, les tissus sont coupés à une épaisseur de 14 µm et à l'aide d'un pinceau à poils longs, les tranches minces sont transférées sur une lame de microscope recouverte d'une couche conductrice d'ITO (*Delta Technologies, Loveland, CO, USA*). Lorsque toutes les coupes sont effectuées, la lame avec les tranches de tissus est tranquillement réchauffée à l'aide d'un objet à température pièce afin de

faire fondre et fixer les tissus en place. Enfin, la lame est placée dans un dessiccateur à vide pour un minimum de 30 minutes.

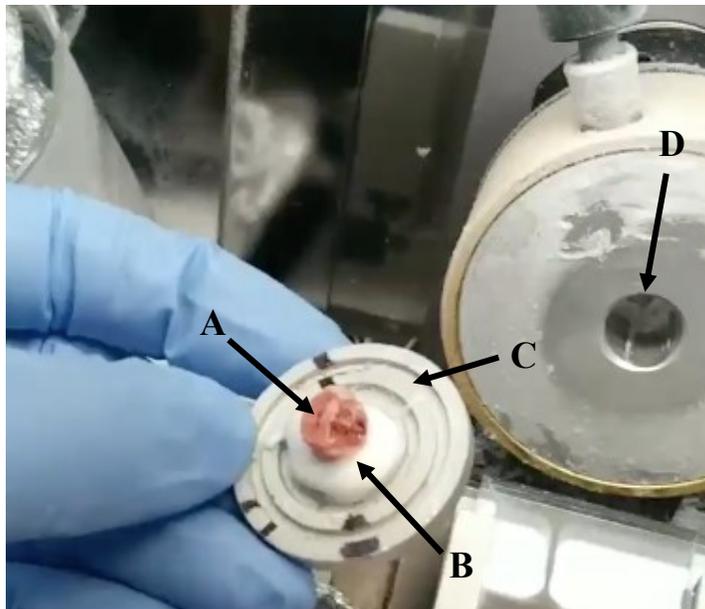


Figure 16. Montage de l'échantillon biologique pour la coupe au cryostat. L'organe à découper (A) est fixé par du polyéthylène glycol (B) sur un support amovible (C) afin d'être placé sur la tête de coupe (D) du cryostat.

2.3 Déposition de la matrice

Deux méthodes de dépôt de matrice ont été effectuées pour deux types d'analyses. La première méthode est un dépôt de gouttes concentrées de matrice pour les expériences de profilage et d'analyses préliminaires. La deuxième est un dépôt par nébulisation à l'aide d'un appareil automatisé TMSprayer® de 1^{ère} génération (*HTX Technologies, Chapel Hill, NC, USA*) pour les expériences d'imagerie par MALDI.

Pour la première méthode de dépôt, les solutions de matrices ont été préparées de la même manière dans des fioles de 1,5 mL avec différentes proportions de solvants organiques et aqueux (proportions indiquées dans le **Tableau II, Section 3.2**). Chaque solution a été agitée à l'aide d'un mélangeur vortex et passée au bain à ultrasons.

Pour ce qui est de la méthode par un système automatisé, les solutions de matrices sont préalablement préparées et mélangées. La solution de matrice est prélevée dans une seringue de 5 mL et placée sur un pousse-seringue. Le contenu va ainsi circuler dans un capillaire jusqu'à l'expulsion sur la lame (**Figure 17**). La lame contenant les tissus est fixée au centre de la chambre de l'appareil TMSprayer à l'aide de ruban adhésif. La porte de la chambre est ensuite fermée afin de conserver une température et pression constante, ainsi que d'éliminer l'humidité. Les paramètres optimisés de dépôt sont choisis avec le logiciel ordinateur.

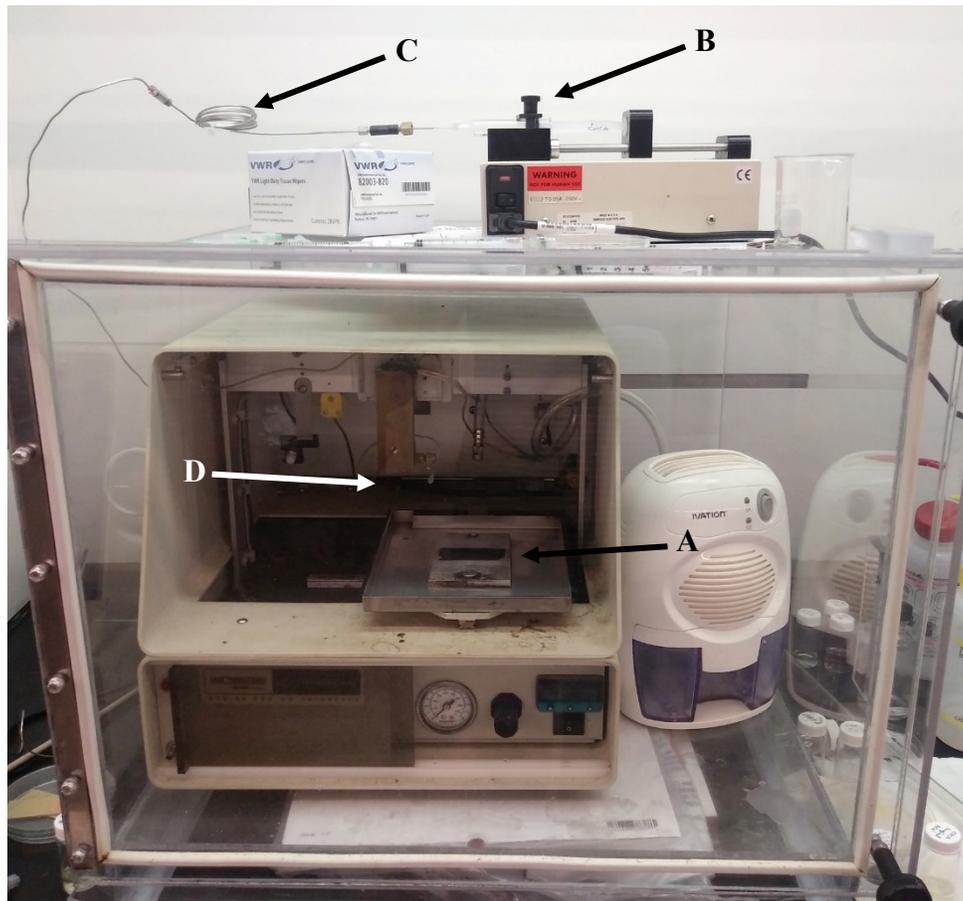


Figure 17. Montage du TMSprayer 1^{ère} génération. La lame est déposée sur la plaque amovible (A) où son trajet est programmé par le logiciel. La matrice est graduellement injectée dans la chambre par un pousse-seringue (B) et traverse un capillaire (C) pour se rendre à la sortie de nébulisation (D) où la température, la pression, le trajet de la plaque et la vitesse d'expulsion sont programmées par le même logiciel.

2.4 Méthode de quantification des biguanides sur tissus biologiques

Afin de quantifier les composés biguanides dans les organes et tumeurs traités, des courbes d'étalonnage des 3 composés ont été effectuées en suivant un protocole optimisé pour chaque composé. Les homogénats de foies sont couramment utilisés lors des expériences de quantification de composés pharmaceutiques en MALDI, en raison de leur distribution plus homogène d'espèces moléculaires présentes par rapport à d'autres organes.⁸²

Pour chacun des composés biguanides analysés, une série de 5 tranches d'homogénats de foie a été coupée à l'aide du cryostat à une épaisseur de 14 μm . Les tranches sont déposées et fixées sur une lame de microscope recouverte d'une couche d'ITO, tel que mentionné précédemment. Sur chacune des lames, 2 rangées de 5 tranches d'homogénats de foie sont apposées. Ensuite, la lame est séchée à l'aide d'un dessiccateur sous-vide pour 30 minutes. Après, avec un des biguanides à analyser, une goutte de 0,5 μL d'une solution à concentration connue est déposée sur chacune des tranches (**Figure 18**).⁸³ Le solvant est un mélange 50/50 d'eau Milli-Q/ méthanol. Les concentrations utilisées sont situées entre 50,0 et 1,0 $\mu\text{g/mL}$. La goutte de solution de biguanide est laissée à sécher à l'air ambiant avant de déposer la couche de matrice à l'aide du système automatisé TMSprayer. Les solutions de matrice utilisées pour le dépôt pour l'analyse de chacun des composés sont les suivantes :

- Metformine : CHCA 7,0 mg/mL dans un ratio 70/30 ACN: H₂O avec 0,1 % TFA
- Phenformine : CHCA 4,0 mg/mL dans un ratio 80/20 ACN: H₂O avec 0,1 % TFA
- Composé A : CHCA 4,0 mg/mL dans un ratio 80/20 ACN: H₂O avec 0,1 % TFA

Pour les composés analysés, les paramètres optimisés du TMSprayer sont les suivants :

- Débit (mL/h) : 13,5
- Vitesse d'expulsion (mm/min) : 1170,0
- Température du jet (°C) : 45,0
- Pression du jet (PSI) : 10,0
- Espacement entre les passages (mm) : 7,0
- Nombre de couches de matrice : 15

La lame recouverte de la couche de matrice est marquée aux 4 coins avec un crayon blanc et numérisée à l'aide d'un scanner (*Epson®V500 Photo*) afin d'utiliser cette image dans le logiciel d'imagerie. Enfin, la lame est insérée dans le spectromètre de masse MALDI pour effectuer l'image des gouttes de biguanides sur les homogénats. Ce protocole de quantification est répété en triplicata pour chacun des biguanides analysés.

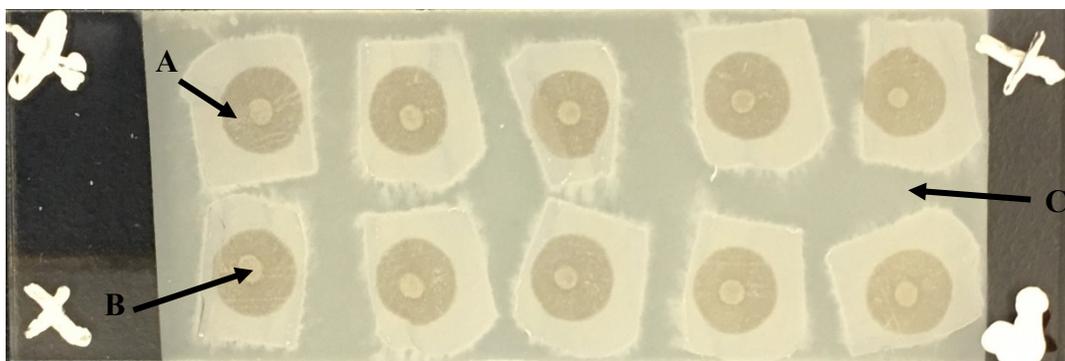


Figure 18. Exemple d'une lame ITO pour une expérience d'imagerie. Les tranches d'homogénats de foies (A) sont déposées sur une lame ITO. Les gouttes de biguanides (B) sont déposées sur les homogénats avant d'appliquer la couche uniforme de matrice (C) par le TMSprayer. Les dimensions de la lame sont de 75,0 mm x 25,0 mm.

2.5 Comparaison de la composition lipidique des organes

Afin d'analyser le mécanisme d'action des biguanides par spectrométrie de masse, une étude comparative de la composition lipidique des foies de souris traitées et véhicules a été effectuée.

À l'aide du cryostat, des sections de 14 μm d'épaisseur ont été tranchées pour chacun des foies analysés. Les tranches sont déposées et fixées sur une lame de microscope recouverte d'une couche d'ITO. Sur chacune des lames, 3 coupes de chaque échantillon sont placées. Ensuite, la lame est séchée au dessiccateur sous-vide pour 30 minutes. Après, la matrice 1,5-diaminonaphthalène (DAN) est déposée par le système automatisé TMSprayer. Cette matrice est couramment utilisée pour l'analyse des phospholipides en MALDI.⁸⁴ Les paramètres optimisés de dépôt de matrice sont les suivants :

- DAN 10,0 mg/mL dans un ratio 50/50 ACN: H₂O avec 0,1 % TFA
- Débit (mL/h) : 8,0
- Vitesse d'expulsion (mm/min) : 1170,0
- Température du jet (°C) : 55,0
- Pression du jet (PSI) : 20,0
- Espacement entre les passages (mm) : 4,0
- Nombre de couches de matrice : 16

2.6 Analyse par MALDI-MS

Les expériences de spectrométrie de masse (MS) et d'imagerie MALDI ont été effectuées sur un appareil UltrafleXtreme MALDI TOF/TOF (*Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA*) équipé d'un laser SmartBeam II Nd:Yag/355 nm opérant à 1 kHz avec un diamètre de 20 μm . L'acquisition de données a été réalisée en mode positif avec la géométrie linéaire et réflectron de l'analyseur. Les logiciels utilisés pour acquérir les données sont flexControl 3,4 et flexImaging 4,1 (*Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA*).

Le potentiel d'accélération des ions a été réglé à +25 kV et les paramètres de l'instrument (extraction retardée, potentiel à la source, énergie du laser etc.) ont été optimisés afin d'obtenir le maximum signal/bruit (S/N) pour chaque biguanide. Pour les expériences IMS, la résolution spectrale enregistrée est à 75 μm . Un étalonnage de l'appareil est effectué en utilisant les signaux de matrices et d'une solution standard de CsI pour obtenir 5 points d'étalonnage dans la gamme de masse étudiée.

Les données statistiques ont été analysées avec le logiciel RStudio (version 3,4,4). Afin de calculer l'intensité des biguanides, des codes ont été conçus en utilisant MALDIquant (version 1,19,3) pour les expériences MS et Cardinal (version 2,1) pour les expériences IMS.

3 Développement de la méthode d'analyse par spectrométrie de masse MALDI

3.1 Paramètres d'ionisation des biguanides

Les composés utilisés lors des essais *in vivo* sur les espèces murines sont des analogues de biguanides commercialement disponibles ou synthétisés afin d'apporter de nouvelles propriétés de perméabilisation des membranes cellulaires. Pour débiter les analyses en spectrométrie de masse MALDI, des échantillons des composés sont mis en solution dans un mélange méthanol/eau (50/50). Ces solutions ayant une concentration de 1,0 mg/mL ont ensuite été analysées en masse par désorption/ionisation laser (LDI), sans matrice organique, afin de connaître leur capacité d'ionisation. Les spectres obtenus montrent les ions moléculaires $[M+H]^+$ respectifs des trois biguanides, montrant un signal plus intense pour le composé **A** (m/z 292,15 Da) par rapport à la metformine (m/z 130,11 Da) et la phenformine (m/z 206,14 Da) (Figure 19).

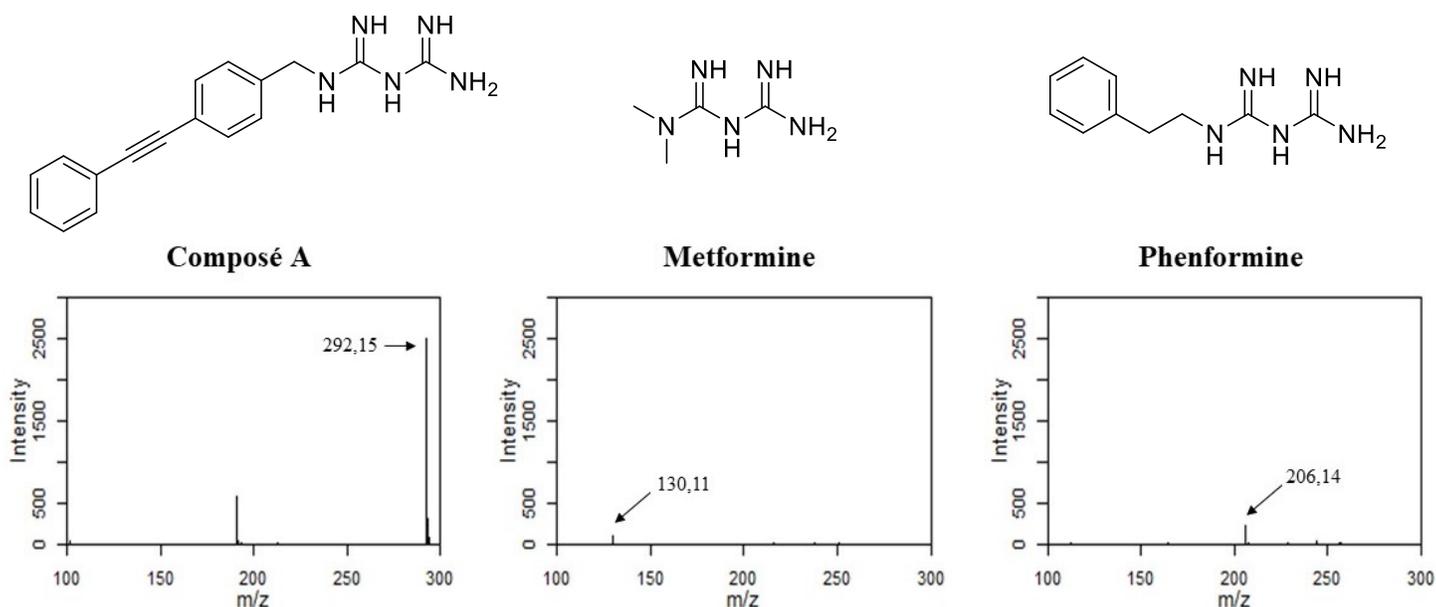


Figure 19. Spectres de masse des biguanides obtenus par ionisation laser (LDI).

Les spectres de spectrométrie de masse en tandem MS/MS des trois composés ont été effectués en utilisant la méthode de MALDI LIFT-TOF-TOF,⁶⁶ afin de suivre les ions fragments pertinents aux ions moléculaires des biguanides. Il sera ainsi possible de confirmer l'identité d'un biguanide en connaissant les valeurs m/z des ions fragments. Dans un milieu complexe, tel que des cellules cancéreuses, cette confirmation est nécessaire lorsque les autres molécules du milieu peuvent interférer avec l'analyte.

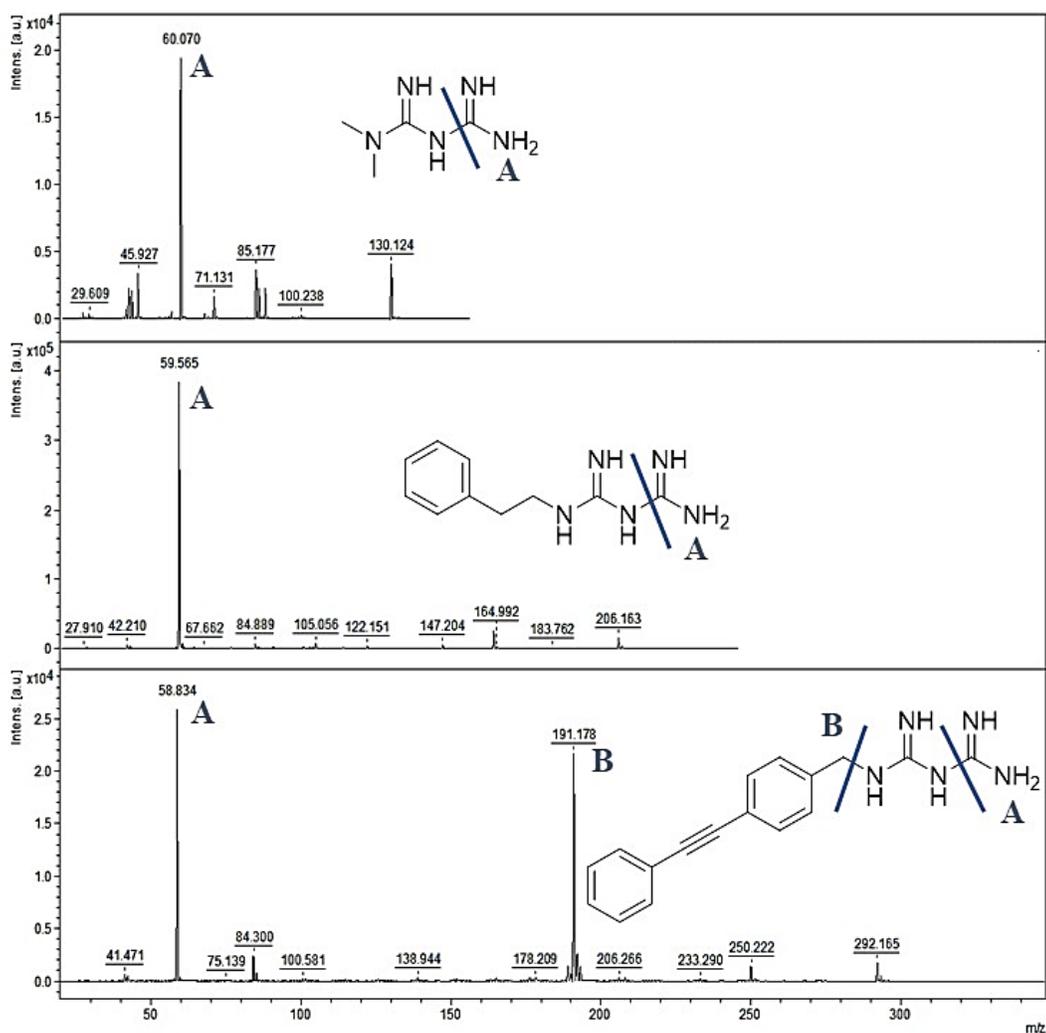


Figure 20. Spectres MS/MS des trois biguanides en solution MeOH/H₂O (50/50) suivant la méthode de fragmentation d'ions parents MALDI-LIFT-TOF-TOF.

Les analyses MS/MS ont été effectuées en solution de MeOH/H₂O (50/50) afin d'obtenir des signaux fiables. Un fragment commun a été observé pour les trois composés, ce qui correspond à la partie terminale du biguanide (**Figure 20**). Un autre pic intense (m/z 191,18 Da) est présent pour le composé **A** ce qui correspond à la partie PEB et va permettre de confirmer la présence de ce composé.

3.2 Choix de la matrice et méthode de dépôt

Afin de déterminer les meilleures conditions d'ionisation des biguanides, différentes matrices organiques ont été testées. La spectrométrie de masse MALDI utilise l'aide d'une matrice organique afin de faciliter l'ionisation d'un analyte. Ces matrices, tel que mentionné, viennent dissiper l'énergie du laser avant d'aider à ioniser l'analyte, réduisant ainsi le risque de fragmentation de l'analyte. En plus, les matrices permettent d'ioniser tout type de molécules. C'est un des avantages de la technique du MALDI puisque cela permet d'analyser des molécules et biomolécules ayant une large gamme de poids moléculaires, sans qu'il y ait de fragmentation prédominante. Les matrices organiques aident aussi à la formation d'ions mono-chargés, ce qui vient faciliter l'interprétation des spectres de masses. Ces matrices sont en très grand excès par rapport à l'analyte (~5000 :1) afin de pouvoir absorber et dissiper le surplus de l'énergie laser. En revanche, un des inconvénients du MALDI est de déterminer la meilleure méthode d'analyse pour le type d'analyte. Celle-ci est différente selon chaque type d'analyte par son choix de matrice pour la meilleure ionisation, la méthode de préparation de l'échantillon ainsi que la méthode de dépôt de la matrice. Cette étape est une étape cruciale pour obtenir des résultats fiables et reproductibles.

Les matrices utilisées en MALDI sont généralement des petites molécules organiques composées d'un ou plusieurs cycles aromatiques (**Tableau I, p.18**). Ces derniers sont capables d'absorber l'énergie des lasers à l'azote, qui sont les plus courants dans les appareils MALDI. De plus, les molécules de matrices portent des groupements fonctionnels qui sont soit donneurs ou accepteurs de protons, afin de favoriser leur capacité d'ionisation. Des groupements hydroxyles sont souvent présents par leur grande affinité avec diverses analytes, tel que les peptides, les glucides, et les petites molécules pharmaceutiques.⁸⁵

Les matrices sont généralement dissoutes avec l'analyte dans des proportions de solvants organiques et aqueux. Ce système de solvants permet, entre autres, de dissoudre l'analyte avec la matrice afin de favoriser la désorption et l'ionisation de l'analyte. Lorsque le solvant s'évapore, il se forme ainsi un réseau de cristaux avec l'analyte et la matrice, qui pourront être ionisés par le laser. Dans les solvants de matrice, un acide fort comme le TFA est souvent ajouté afin d'aider à générer des ions $[M+H]^+$ par son fort caractère donneur de protons. Le TFA augmente davantage l'efficacité d'ionisation des petites molécules,⁸⁶ qui est le type d'analyte d'intérêt dans ce projet. Pour les composés biguanides en solution, différentes combinaisons de matrices et de solvants ont été préparées et testées. Toutes les solutions de matrices ont été préparées de la même manière, selon une concentration et solubilité spécifique à chacune (**Tableau II**). Les combinaisons de solvants essayées pour chaque matrice sont couramment utilisées pour d'autres analyses et ont effectivement permis de dissoudre les biguanides.

Tableau II. Préparation et intensités des signaux des biguanides des différentes matrices organiques.

Matrice	Concentration de matrice (mg/mL)	Système de solvants	Intensité du signal des biguanides à une concentration de 1,0 mg/mL
Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)	7,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Excellent
1,5-Diaminonaphthalène (DAN)	10,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Moyen
2,6-Dihydroxyacetophénone (2,6-DHA)	10,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Pauvre
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)	30,0	50/50 MeOH: H ₂ O + 0,1 % TFA	Bien
2-Mercaptobenzothiazole (MBT)	10,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Bien
Acide 3,5-diméthoxy-4-hydroxycinnamique (SA)	13,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Pauvre
5-Chloro-2-mercaptobenzothiazole (cMBT)	10,0	50/50 ACN: H ₂ O + 0,1 % TFA	Moyen
9-Aminoacridine (9AA)	10,0	70/30 EtOH: H ₂ O	Pauvre

Ainsi, trois candidates ont révélé les meilleures intensités et formes de pics pour les trois biguanides, soit l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB), le 2-mercaptobenzothiazole (MBT) et l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA). En se référant aux signaux des biguanides sans matrice, le CHCA montre un signal très élevé pour chaque biguanide à une concentration de 1,0 mg/mL (**Figure 21**). Le CHCA est souvent utilisé pour l'analyse de petites molécules

pharmaceutiques^{87,88} en plus de présenter aucune interférence au niveau des ratios m/z des biguanides. C'est donc le CHCA qui sera utilisé pour les analyses de profilage et d'imagerie.

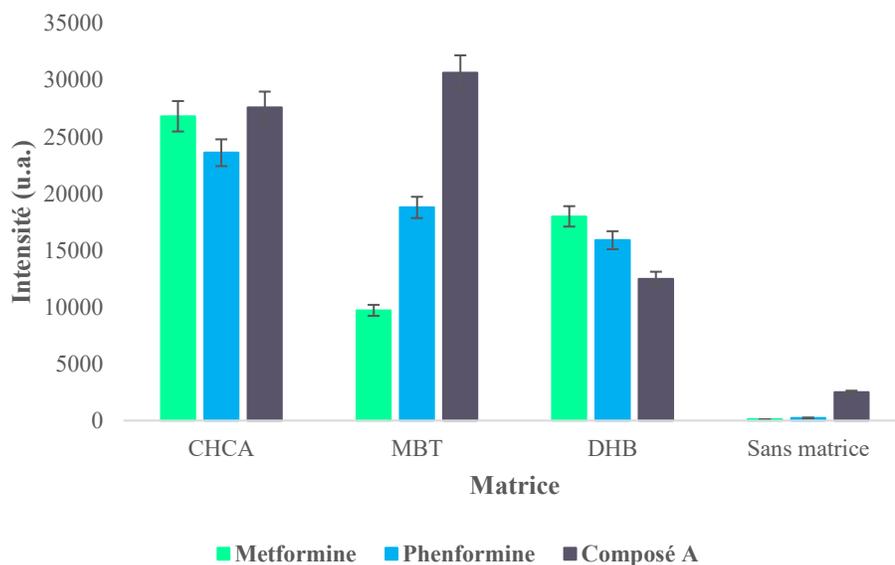


Figure 21. Intensités relatives des biguanides avec les trois meilleures matrices déterminées par spectrométrie de masse MALDI.

Pour ce qui est de la méthode de dépôt de la matrice, deux méthodes de dépôt ont été utilisées. La première est par dépôt de gouttes concentrées de solutions de matrices directement sur le milieu à analyser. Cette méthode permet une analyse rapide de profilage afin de caractériser et comparer globalement les signaux présents. Ces solutions de matrice sont les mêmes que préparées dans le **Tableau II**.

La deuxième méthode consiste à nébuliser la matrice par un système automatisé (TMSprayer). Le dépôt de matrice par le système automatisé permet une couche homogène sur les sections de tissus, ce qui est favorable pour les expériences IMS afin d'obtenir des images de haute qualité. Plusieurs paramètres entrent en jeu lors de la nébulisation de la matrice afin d'obtenir une couche homogène et idéale pour la détection des analytes à diverses concentrations. Les paramètres optimisés montrés dans la **section 2.4** ont été obtenus sur des concentrations de chaque biguanide allant de 50,0 à 5,0 $\mu\text{g/mL}$. L'objectif de l'optimisation des

signaux est d'avoir une méthode capable de détecter les biguanides à plus hautes concentrations comme à plus basses concentrations.

La température à 45°C et la pression à 10 PSI permettent une évaporation lente du solvant lors du dépôt de la matrice sur la lame. Ceci permet à la solution de matrice d'humidifier la surface de l'échantillon afin de bien extraire les signaux de l'analyte. Ensuite, avec le solvant qui s'évapore, les cristaux de la matrice se forment sur l'échantillon avec l'analyte extrait. Le ratio des solvants d'acétonitrile et d'eau joue entre 70/30 pour la metformine (**Figure 22**) et 80/20 pour la phenformine et le composé **A**. Une solution plus aqueuse permet une meilleure extraction de la metformine, tandis que la phenformine et le composé **A**, qui ont un caractère plus hydrophobe, utilisent des solutions de matrice moins aqueuses. Le nombre de passages déterminé est un des facteurs les plus importants car une couche trop mince ou trop épaisse influence davantage l'extraction de l'analyte et ainsi l'intensité des pics. Ainsi, 15 passages de matrice ont été évalués comme étant le nombre idéal pour le composé **A** (**Figure 23**) de même que les deux autres composés.

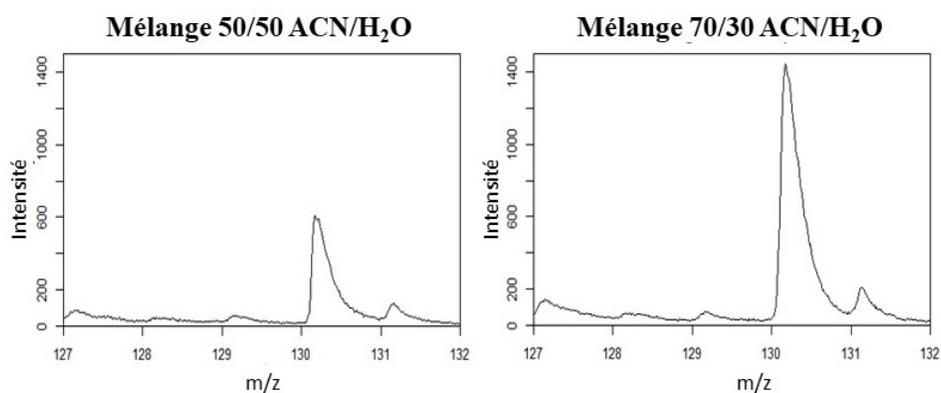


Figure 22. Comparaison de l'intensité du signal de la metformine ($m/z=130,11$ Da) selon le solvant de la matrice de CHCA. Une goutte de 10,0 $\mu\text{g/mL}$ de la metformine dans 50/50 MeOH/H₂O est déposée sur une coupe d'homogénat de foie. La matrice est appliquée avec le TMSprayer.

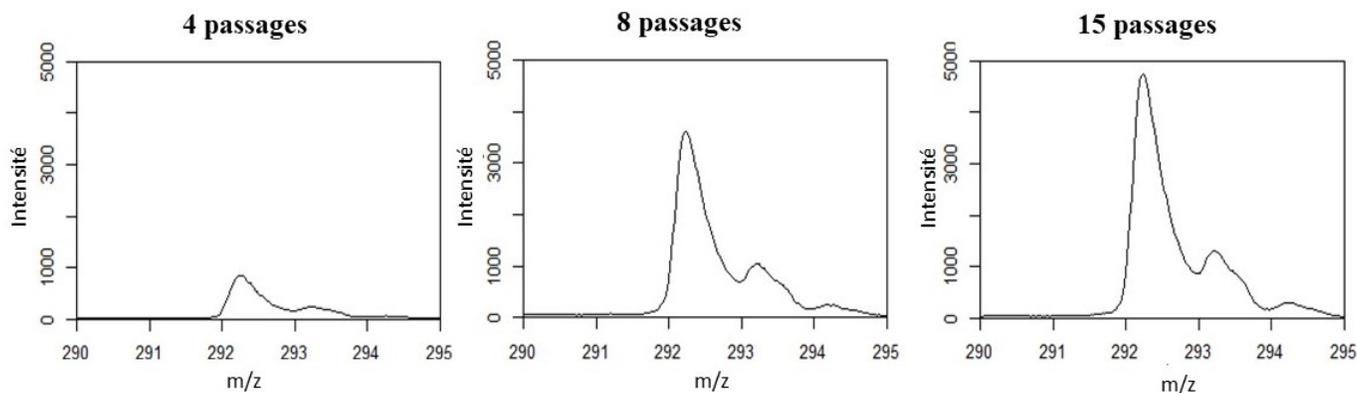


Figure 23. Comparaison de l'intensité du signal du composé **A** ($m/z=292,15$ Da) selon le nombre de passages de matrice CHCA avec le TMSprayer. Une goutte de $10,0 \mu\text{g/mL}$ du composé **A** dans 50/50 MeOH/H₂O est déposée sur une coupe d'homogénat de foie. Le solvant utilisé pour la matrice est un mélange 80/20 ACN/H₂O.

3.3 Limites de détection des biguanides en MALDI

En vue d'analyser les organes et tumeurs traités avec les biguanides, les limites de détection par MALDI de ces composés ont été effectuées en solution et sur tissu homogène de foie. Une série de dilutions successives des biguanides dans du MeOH/H₂O (50/50) a été analysée en appliquant une goutte de ces solutions sur une plaque MALDI suivi d'une goutte de CHCA concentrée pour chaque solution à analyser. Tous les pics ont été confirmés par spectrométrie de masse MALDI MS/MS. Une meilleure intensité de signal est observée par rapport aux résultats par LDI (**Figure 19**) en raison de la présence de matrice qui facilite d'ionisation. De plus, tel que vu précédemment, le composé **A** est le biguanide qui s'ionise le mieux, montrant toujours un signal jusqu'à une concentration de $1,0 \text{ fg/mL}$ (**Figure 24**). La metformine et la phenformine présentent des limites de détection légèrement plus élevées, soit autour de $10,0 \text{ pg/mL}$.

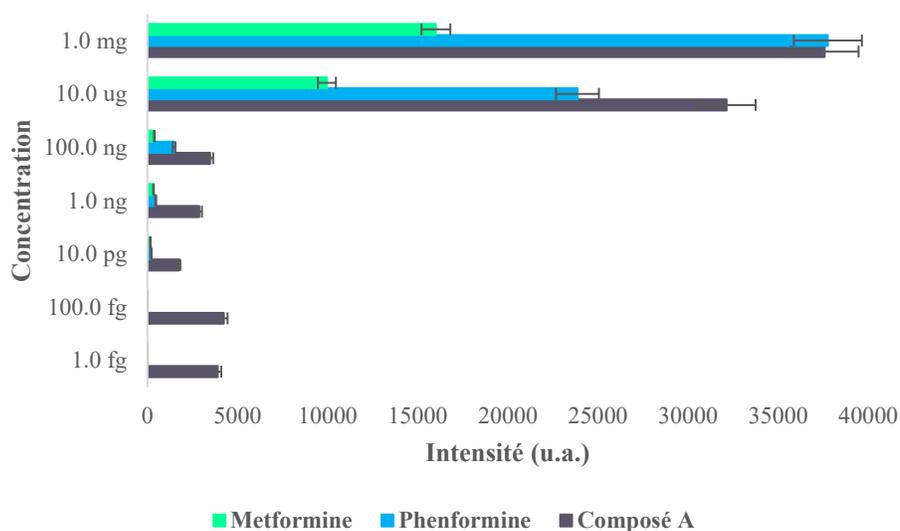


Figure 24. Limites de détection des biguanides en solution de MeOH/H₂O (50/50). Les intensités enregistrées sont une moyenne de 10 acquisitions par concentration.

La limite de détection en solution fournit une idée générale de la capacité de détection par MALDI des concentrations très faibles. Pour les expériences d'imagerie (IMS), les analyses seront effectuées sur des coupes de tissu, ce qui engendre de nouveaux signaux qui peuvent interagir avec l'analyte ou la matrice. Ainsi, pour effectuer les limites de détection sur tissu, le même principe qu'expliqué précédemment est effectué. La seule différence est que les solutions diluées des biguanides sont chacune appliquées sur le dessus ou en dessous d'une tranche d'homogénat de foie finement coupée et apposée sur une lame ITO afin d'observer s'il y a une différence d'intensité du signal. En appliquant la goutte de biguanide sur le dessus, cela permet une meilleure reproductibilité et sensibilité. Les spectres enregistrés sont montrés en Annexes (**Figure A1**).

Tableau III. Limites de détection des biguanides (en $\mu\text{g/mL}$) obtenues sur des homogénats de foie.

	Composé A	Metformine	Phenformine
Au-dessus	0,01	2,5	0,5
En dessous	0,01	5,0	1,0

Ces résultats ne permettent pas de prédire la qualité de la quantification, mais montrent qu'il n'y a pas de différence majeure entre la limite de détection obtenue par le dépôt de biguanide au-dessus et en dessous du tissu. Ainsi, pour l'élaboration des courbes d'étalonnage et par soucis de facilité, le dépôt de la solution de biguanide a été fait sur le dessus du tissu. Pour les trois composés, il y a une différence d'environ 10^6 entre les limites de détection en solution et sur tissu, ce qui est attendu avec la composition complexe du milieu de l'échantillon. De plus, il est normal d'obtenir des limites de détection plus élevées sur tissu qu'en solution en raison de la complexité et de la suppression ionique qui peut se produire. Cette suppression ionique est causée par plusieurs facteurs de l'échantillon et sa préparation, notamment les lipides présents qui peuvent réduire le pouvoir d'ionisation de l'analyte.^{89,90} Ces essais ont été effectués sur des tissus homogènes, où les signaux parasites sont réduits et permettent une fiabilité et reproductibilité des résultats.

3.4 Courbes d'étalonnage pour la quantification des biguanides

Des courbes d'étalonnage pour les trois biguanides ont été obtenues sur des tissus homogènes de foies. Tel que mentionné dans la partie expérimentale (**Section 2,4**), les homogénats de foies permettent un milieu biologique uniforme et sont couramment utilisés en quantification par spectrométrie de masse.

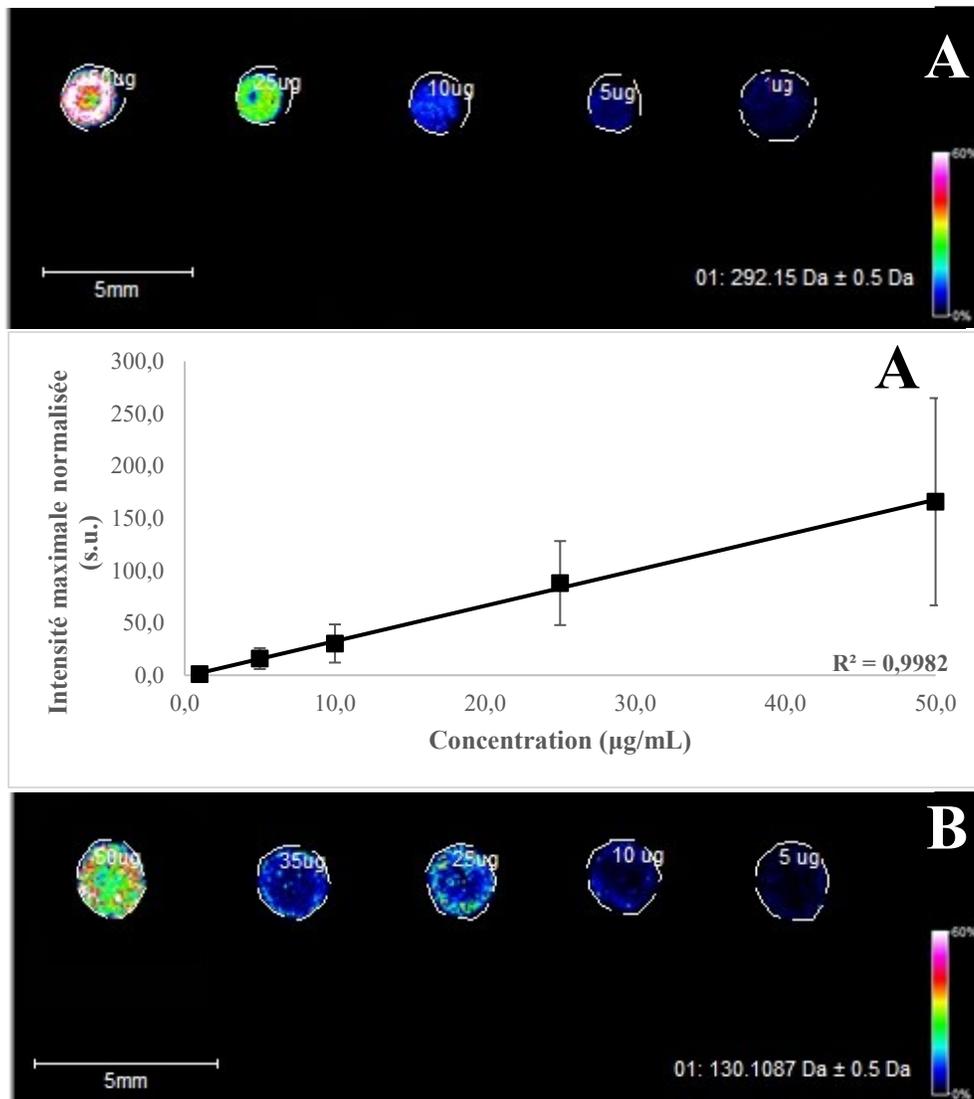
La méthode de quantification par MALDI développée consiste à déposer une goutte de solution à concentration connue sur une section de tissu homogène. Par la suite, la matrice est appliquée en couche uniforme pour ensuite effectuer l'image MS de la région de la goutte. Cette méthode réduit les variations encourues lors des étapes de la préparation de l'échantillon et tient en compte les effets d'interactions de la matrice avec l'analyte. Cette technique simple d'approche a souvent été utilisée dans la quantification de composés pharmaceutiques. Notamment, un groupe de chercheurs a employé cette méthode pour la quantification de la pirféridone, un immunosuppresseur utilisé dans le traitement de la fibrose pulmonaire iodoathique.⁹¹ Ils ont utilisé la méthode de dépôt d'une goutte de solution à concentration connue sur des sections de tissus pulmonaires véhicules afin d'établir des courbes d'étalonnage pour quantifier ce médicament et ces métabolites dans différents organes (foie, rein, poumon).^{91,92}

Les paramètres de dépôt de matrice ont été optimisés pour chaque biguanide en raison des différences de capacité d'ionisation, tel que mentionné précédemment. Les résultats obtenus sont ainsi uniformes et linéaires sur la gamme de concentrations déterminées. Afin de respecter la gamme de linéarité pour chaque biguanide, la plus faible concentration évaluée est légèrement supérieure à la limite de détection sur tissu obtenue précédemment. La variation des intensités est trop prononcée pour une concentration près de la limite de détection, ce qui n'est pas optimal dans l'élaboration d'une méthode de quantification par IMS.

La **Figure 25** présente un exemple des triplicatas obtenus pour chacun des biguanides analysés. Cinq solutions à concentrations différentes pour les différents biguanides sont préparées et disposées sur les homogénats de foie avant de déposer la matrice. L'image de chacune des gouttes est enregistrée selon une méthode d'acquisition de données optimisée au MALDI-TOF avec une résolution latérale à 75 μm . Ceci représente que dans la région d'analyse, un spectre de masse est enregistré à chaque 75 μm . Les valeurs m/z pour le composé **A**, la metformine et la phenformine sont sélectionnées afin d'obtenir une représentation 2D de chaque région. Ensuite, les valeurs d'intensités maximales pour chaque solution sont analysées en conservant les signaux avec un S/N supérieur à 10.

Les résultats des images sont ensuite normalisés selon la méthode Total Ion Current (TIC), qui stipule que l'intensité totale se doit d'être proportionnelle à la concentration totale.⁹³

Ainsi, cette méthode consiste à multiplier à l'aide d'un facteur de normalisation les valeurs d'intensités dans chaque spectre afin qu'elles soient similaires dans tous les spectres enregistrés. À la suite de ces manipulations statistiques, les courbes d'étalonnage sont construites en traçant un graphique de la moyenne obtenue des intensités normalisées en fonction des concentrations des solutions.



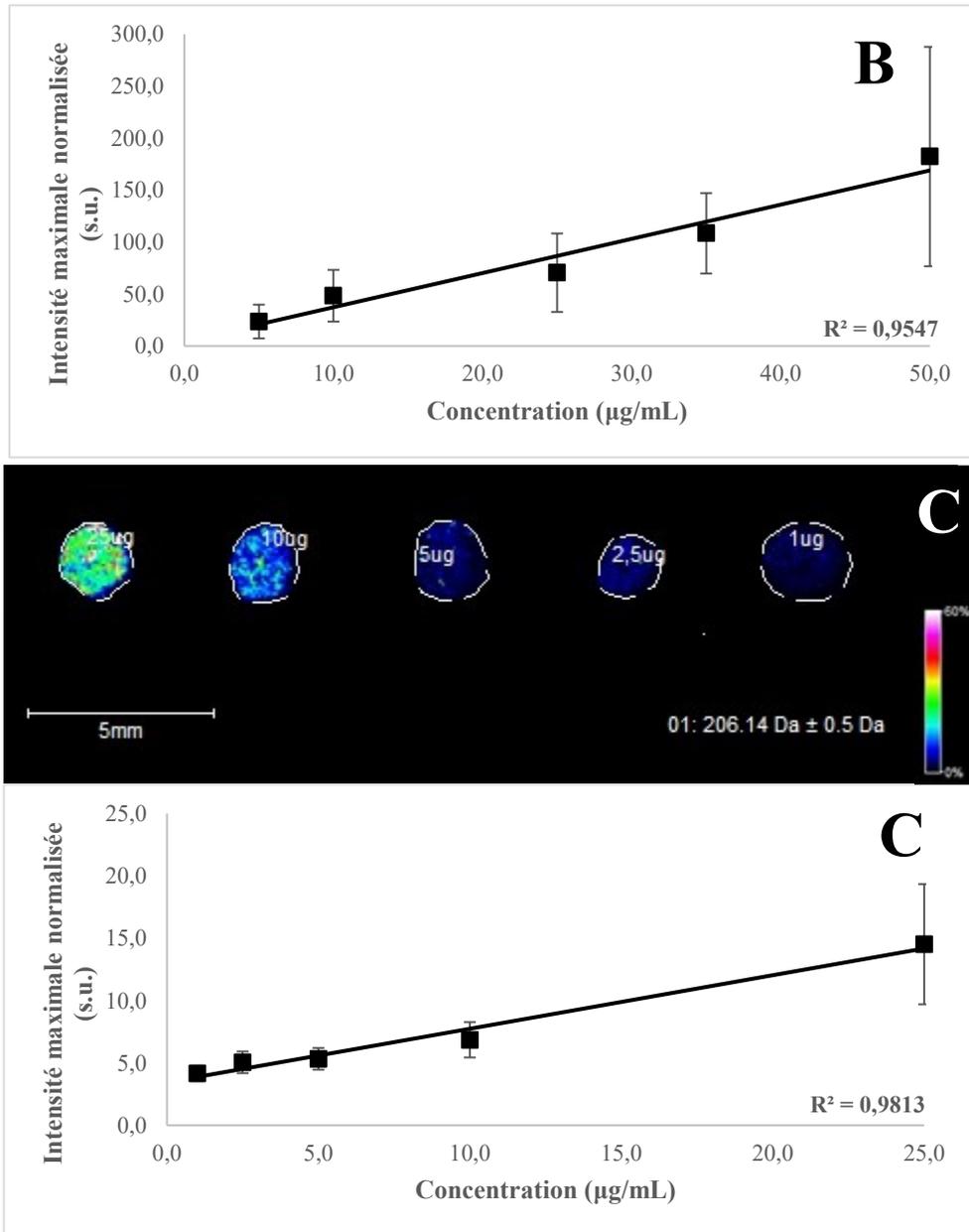


Figure 25. Courbes de régression linéaire de l'intensité maximale normalisée en fonction de la concentration des biguanides – **A** (composé **A** $m/z=292,15 \pm 0,5$ Da), **B** (metformine $m/z=130,11 \pm 0,5$ Da) et **C** (phenformine $m/z=206,14 \pm 0,5$ Da). Les courbes sont tracées en utilisant la moyenne ($n = 3$) des intensités ioniques.

La méthode de quantification des biguanides par IMS-MALDI-TOF montre des résultats concluants pour les trois composés biguanides. La régression linéaire simple est utilisée pour l'analyse de ces courbes. Ce type de régression linéaire a permis de corrélérer la variation de l'intensité du signal obtenu avec la variation de la concentration des solutions de biguanides. Les coefficients de corrélation linéaire (R^2) sont de 0,9982 pour le composé **A**, 0,9547 pour la metformine et 0,9813 pour la phenformine, ce qui représente une très bonne linéarité des courbes. Les écart-types montrés sur les graphiques sont cependant très élevés. Il est difficile de contrôler le volume de la goutte déposée sur les homogénats de foie afin qu'elle soit uniforme, ce qui peut influencer la reproductibilité. Cette technique se doit d'être répétée à plusieurs reprises ($n > 3$) afin d'éliminer statistiquement les valeurs aberrantes. Somme tout, la méthode développée pour la quantification des biguanides est simple et reproductible. Les courbes d'étalonnage obtenues par IMS permettront de quantifier les biguanides dans les organes et tumeurs traités.

4 Résultats d'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) MALDI

4.1 IMS et quantification des biguanides dans les organes et tumeurs traités

Un des objectifs de l'imagerie par spectrométrie de masse est de déterminer de manière quantitative la distribution spatiale d'une molécule, soit dans des organes et tumeurs ayant été traités avec des biguanides, dans le cadre de ce projet. Cette méthode de quantification par imagerie MS permet d'obtenir des informations sur la localisation de la molécule d'intérêt dans un organe. C'est, entre autres, le principal avantage par rapport aux autres méthodes de quantification, telle que la LC-MS. Ainsi, de manière générale, les données recueillies par l'IMS permettent d'obtenir de l'information qualitative et quantitative fiable sur la localisation d'une molécule dans différents tissus ou types de cellules.⁹⁴

À la suite des essais *in vivo*, les souris ont été sacrifiées après une période de 28 jours de traitement où les organes et tumeurs ont été recueillis. Il est possible de remarquer une différence visible au niveau de la taille des tumeurs suite aux différents traitements de biguanides (**Figure 26**). Les tumeurs des souris traitées à la metformine et phenformine n'ont pas réduit en taille lors de la période de 28 jours, par rapport à celle traitée avec le composé A.

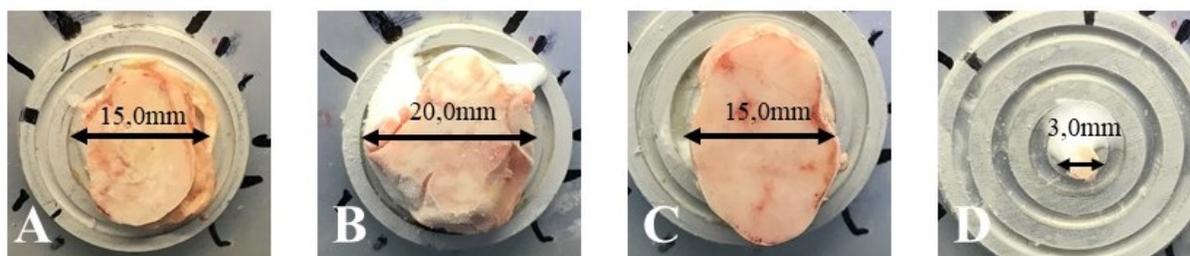


Figure 26. Photos des tumeurs PDAC recueillies. La taille indiquée (mm) représente le plus court diamètre approximatif des tumeurs. **A** (véhicule), **B** (metformine), **C** (phenformine) et **D** (composé A).

Dans l'intérêt d'en apprendre davantage sur le comportement du nouveau composé **A**, un essai de quantification de ce composé dans les organes et tumeurs a été effectué avec la procédure développée. Étant un nouveau composé synthétisé dans le groupe, son mécanisme d'action n'est pas connu, mais montre des effets anticancéreux très intéressants.

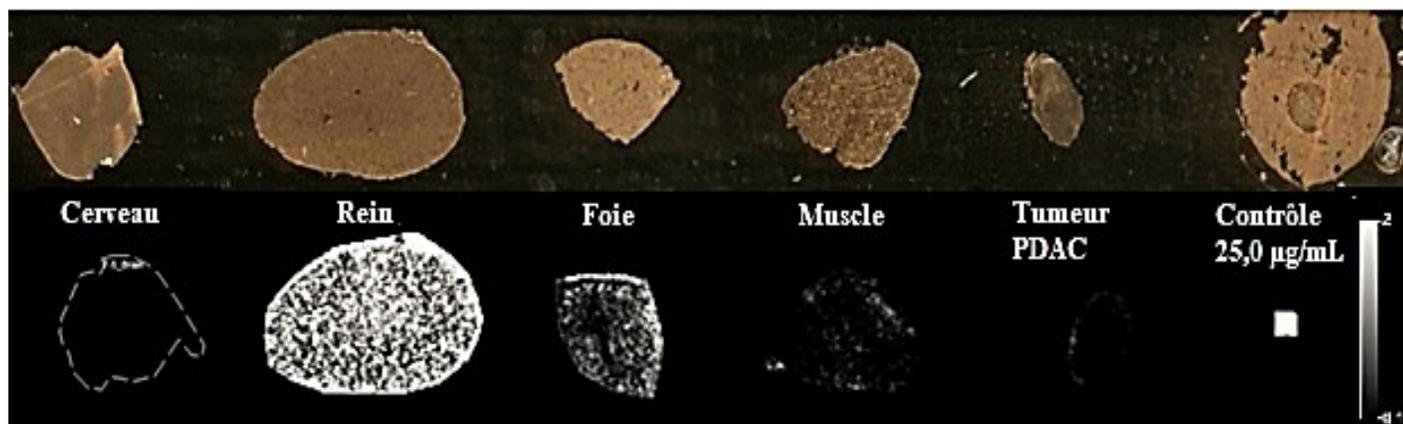


Figure 27. Localisation du composé **A** ($m/z=292,15 \pm 0,5$ Da) dans les organes et la tumeur PDAC acquis à une résolution spectrale de $75 \mu\text{m}$. Les valeurs sont normalisées par TIC et comparées à une solution standard de $25 \mu\text{g/mL}$ du composé **A** dans MeOH/H₂O 50/50. Crédit à Ethan Yang du groupe de Pierre Chaurand pour la collaboration et l'obtention de cette IMS.

Le contrôle utilisé est une goutte du composé **A** ($25,0 \mu\text{g/mL}$ dans une solution 50/50 MeOH/H₂O) déposée sur une coupe d'homogénat de foie. Une région carrée de 100 mm^2 au centre de la goutte a été sélectionnée comme région d'intérêt afin d'obtenir une image uniforme pour le contrôle. Les résultats qualitatifs de l'IMS des organes et tumeur (**Figure 27**) montrent que le m/z 292,15 Da se retrouve en grande quantité dans le rein, en raison de l'élimination naturelle du médicament par l'urine. Il est aussi possible de remarquer une accumulation au niveau du foie et une très faible accumulation dans un muscle. À long terme, une accumulation du biguanide dans le foie va engendrer de la toxicité qui peut s'étendre au reste de l'organisme. Selon le **Tableau IV**, dans la tumeur PDAC, le m/z 292,15 Da se retrouve qu'en très faible intensité, stipulant que le composé **A** ne reste pas dans la tumeur. Pour la section de cerveau, aucun signal du composé **A** ne se retrouve dans la région analysée.

Tableau IV. Valeurs de l'intensité moyenne (u.a.) du composé **A** sur l'aire totale de la région.

Région	Moyenne	Écart-type	Nombre de pixels
Cerveau	0,0	0,0	1229,0
Rein	100,5	49,2	3736,0
Foie	29,8	12,4	1429,0
Muscle	6,8	3,7	1949,0
Tumeur PDAC	3,2	1,0	598,0
Contrôle 25,0 µg/mL	192,5	71,4	80,0

Pour ce qui est de la quantification, les valeurs des intensités ioniques du composé **A** dans les sections de tissus ont été analysées en suivant le même protocole que pour les courbes d'étalonnage. Pour ce faire, trois répliques de chaque tissu biologique ont été effectués dans le but de quantifier le composé **A**. Dans les équations de régression linéaire de la courbe d'étalonnage, les valeurs de la pente, l'ordonnée à l'origine ainsi que l'intensité ionique sont connues. Il est ainsi possible de trouver la concentration inconnue correspondant à la valeur de l'intensité ionique en isolant cette valeur dans l'équation. Ainsi, les valeurs obtenues correspondent à la concentration moyenne approximative sur toute la surface du tissu et sont normalisées en utilisant le contrôle de 25,0 µg/mL.

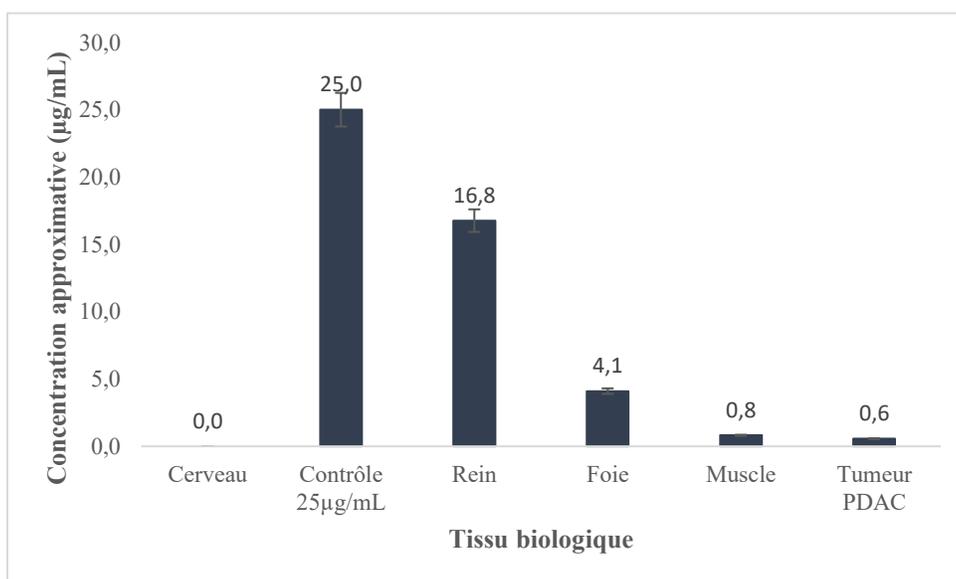


Figure 28. Concentrations approximatives (µg/mL) du composé **A** dans les organes et tumeur évaluées par la méthode de quantification IMS-MALDI-TOF. L'équation de régression linéaire utilisée est $y = 0,4583x + 0,7598$. L'écart-type standard est calculé sur les trois répliques de chaque tissu biologique.

Par rapport à la concentration de la solution standard du composé **A** à 25,0 µg/mL, le rein présente une concentration approximative de 16,8 µg/mL, ce qui correspond à son intensité ionique élevée observée dans l'IMS. L'accumulation dans le foie est approximativement à 4,1 µg/mL, environ le quart de ce qui est présent dans le rein. Dans le muscle et la tumeur, les concentrations approximatives sont inférieures à 1,0 µg/mL, ce qui est aussi représentatif de leurs distributions ioniques observées par IMS. Cette faible quantité calculée du composé **A** dans la tumeur permet de soutenir le fait que le composé n'agit pas directement dans la tumeur car il est très peu présent.

La méthode développée permet effectivement de quantifier le signal m/z 292,15 Da du composé **A** dans les organes et tumeur PDAC recueillies. Ces résultats sont ainsi encourageants pour la quantification des autres organes et tumeurs traités avec les autres composés biguanides en utilisant les paramètres optimisés au préalable. La quantification par imagerie en spectrométrie de masse permet d'obtenir des résultats fiables et reproductifs avec des informations qualitatives et quantitatives sur la distribution du nouveau composé synthétisé dans notre groupe.

4.2 Comparaison de la composition lipidique des foies de souris par IMS

L'imagerie par spectrométrie de masse permet d'analyser une variété de molécules et leur distribution dans des tissus biologiques. Le MALDI permet d'ioniser et analyser des molécules ayant des larges poids moléculaires, telles que des protéines ou des lipides. Dans le cas de ce projet, une comparaison de la distribution des lipides dans les différents foies traités et véhicules a été réalisée afin de déterminer les différences majeures d'expression ou d'inhibition.

Le métabolisme des lipides lors du développement d'une tumeur est affecté, en produisant ou en inhibant la formation de nouveaux lipides.⁹⁵ Les lipides sont des biomolécules qui sont responsables de plusieurs fonctions cellulaires, telles que la formation de la membrane cellulaire, la communication cellulaire ainsi que l'homéostasie.^{84,95} L'analyse par IMS-MALDI

des lipides est une pratique courante en raison de l'abondance d'une variété de lipides qui composent la membrane cellulaire, telle que les phospholipides, les sphingolipides et le cholestérol. De plus, ces molécules sont présentes sous formes d'ions positifs ou négatifs, ce qui rend leur ionisation et analyse par spectrométrie de masse encore plus efficace. Les lipides présentent des masses majoritairement inférieures à 1000 Da, ce qui est dans la gamme de détection idéale de la spectrométrie de masse MALDI.^{84,96}

Comme ils peuvent être présents comme ions positifs ou négatifs, il est possible d'effectuer l'analyse MALDI en mode positif $[M+H]^+$ ou négatif $[M-H]^-$. Ces deux modes permettront d'obtenir des informations complémentaires sur la composition lipidique des tissus de foie analysés. En mode positif, il est possible de détecter toute la famille des phosphatidylcholines (PC) ainsi que les sphingomyélines (SM) en raison de la présence d'une amine quaternaire qui apporte une charge positive permanente. En mode négatif, ce sont majoritairement des phospholipides qui peuvent être analysés, tels que les phosphatidylglycérol (PG) et les phosphatidylserines (PS).^{84,97}

Les résultats ont été obtenus en coupant des sections de foie de tous les groupes de souris traités et véhicules. La matrice utilisée dans l'analyse des lipides est le DAN, qui a été déposée en utilisant une méthode optimisée avec le système automatisé. Les images ont été enregistrées avec une résolution spectrale de 75 μm et avec les mêmes paramètres de traitement statistique que les IMS des solutions de biguanides. Puisque les lipides sont présents en très grande variété selon leur degré d'insaturation et la longueur de leurs chaînes carbonées, il est possible de sélectionner une étendue de ratio m/z afin de comparer leur intensité dans les différents organes. Les valeurs obtenues sont comparées à celles d'une base de données (Lipid Maps® Lipodimics Gateway) afin d'obtenir une identification primitive des composés analysés.

Les plus grandes différences en mode positif ont été observées à des m/z de 558, 760, 818 et 848 Da (**Figure 29**). Le composé à m/z 558 est présent avec une intensité beaucoup plus élevée dans le foie traité avec le biguanide **A**. Cette molécule ne semble pas être présente en abondance dans les autres foies, ce qui pourrait expliquer un mécanisme de réaction unique du nouveau biguanide synthétisé. Le composé à m/z 760 est très abondant dans le foie véhicule, et moins dans les foies traités aux biguanides, suggérant une inhibition de cette biomolécule suite aux traitements avec les biguanides. L'inverse est observé pour le composé à m/z 848, où les

foies traités aux biguanides présentent une plus grande abondance. Finalement, à m/z 818 il y a une différence de composition avec le foie traité à la metformine versus les autres foies, ce qui suggérerait un mécanisme unique à la metformine.

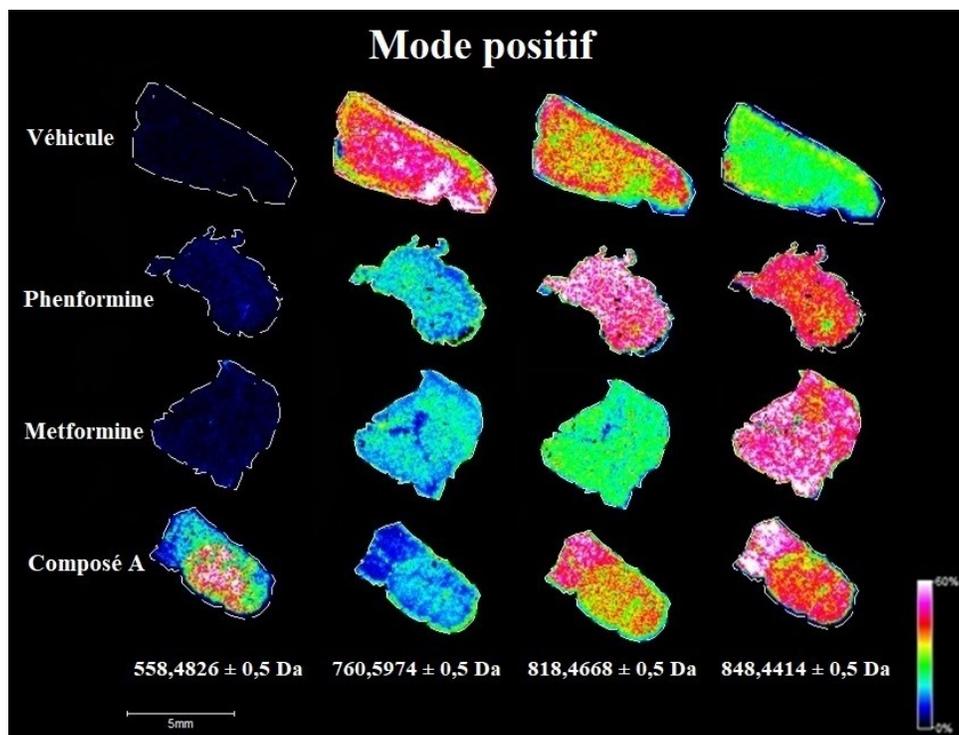


Figure 29. IMS en mode positif des foies de souris véhicules et traités aux différents biguanides. Les données sont normalisées par TIC avec une résolution spectrale de $75\mu\text{m}$.

Pour l'analyse en mode négatif des lipides (**Figure 30**), le foie traité avec le composé **A** présente un signal à m/z 757 qui a une intensité plus élevée que dans les autres foies, supposant encore un mécanisme propre au traitement du biguanide **A**. À m/z 744, ce composé est plus abondant dans le foie véhicule que dans les foies traités. À m/z à 714, l'expression de cette biomolécule est altérée dans les foies traités à la metformine et au composé **A**. Enfin, pour les foies traités à la metformine et phenformine, il y a une abondance du signal à m/z 790, suggérant une abondance de ce composé à la suite de ces traitements. Somme tout, dans les analyses des lipides en mode positif et négatif, les signaux sont localisés uniformément dans les tissus. Afin d'approfondir et de confirmer l'identité des signaux observés, des analyses par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) pourront être effectuées.

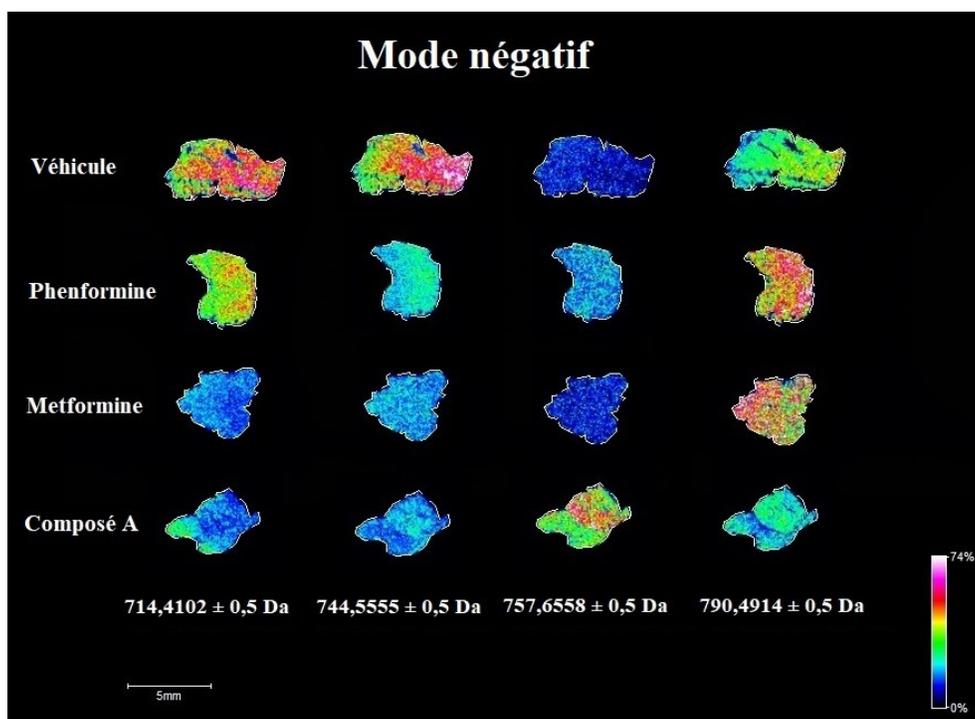


Figure 30. IMS en mode négatif des foies de souris véhicules et traités aux différents biguanides. Les données sont normalisées par TIC avec une résolution spectrale de 75 μ m.

5 Conclusion et perspectives

5.1 Conclusion

En conclusion, les travaux réalisés et discutés dans ce mémoire présentent le développement d'une méthode d'analyse de composés biguanides par spectrométrie de masse MALDI dans un traitement pour le cancer du pancréas. Cette méthode a permis d'analyser des organes et tumeurs pancréatiques à la suite d'expériences sur des souris ayant reçu des traitements avec des composés biguanides. Ces composés sont la metformine, la phenformine et le composé **A**, qui est un analogue biguanide synthétisé dans le groupe afin d'augmenter la perméabilité membranaire. Les résultats ont permis de localiser et quantifier les biguanides présents dans les organes et tumeurs, en plus de comparer la composition de biomolécule suite aux différents traitements.

La méthode d'analyse des biguanides a été optimisée en déterminant la meilleure matrice permettant des intensités ioniques élevées pour chacun des biguanides, soit l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA). Les images en spectrométrie de masse ont été enregistrées afin d'élaborer des courbes d'étalonnage pour chaque biguanide avec des coefficients de corrélation linéaire supérieurs à 0,95. L'IMS a permis de quantifier le composé **A** présent dans les organes et tumeur, pour montrer une accumulation dans le rein et foie de 16,8 et 4,1 $\mu\text{g/mL}$ respectivement. Le composé **A** est faiblement présent dans la tumeur et ne s'accumule pas dans le cerveau. Une étude comparative des lipides a montré qu'il y avait effectivement des différences d'expression de certains lipides, surtout pour les organes traités au composé **A**.

Pour terminer, la méthode développée pourra s'appliquer pour l'analyse des autres biguanides commerciaux dans les organes et tumeurs traités. Avec les mêmes bases et une optimisation adéquate, il serait aussi possible d'analyser de nouveaux composés biguanides pour de futurs essais dans le développement d'un agent anticancéreux. Bien que le mécanisme d'action des biguanides dans le traitement du cancer demeure toujours un mystère, ce sont les progrès dans différentes branches de recherche qui vont permettre d'obtenir les réponses nécessaires.

5.2 Perspectives

Avec ces premiers travaux réalisés dans le cadre de ce projet et avec les avancées dans la littérature, plusieurs portes s'ouvrent afin d'améliorer et d'approfondir la méthode d'analyse. En effet, pour en apprendre plus sur la distribution du médicament, les organes et tumeurs pourraient être recueillis à différents intervalles de temps suivant leur injection afin d'en suivre la pharmacocinétique par spectrométrie de masse. Les expériences d'IMS permettraient simultanément de localiser et quantifier les biguanides à différents temps dans divers organes.

Une autre méthode de quantification par dopage d'homogénats d'organes est de plus en plus utilisée dans la littérature, ce qui améliorerait la méthode de quantification.⁹⁸ Afin de produire les courbes d'étalons, un moule avec plusieurs sections pourrait accueillir les homogénats d'organes dopés avec différentes concentrations de biguanides à analyser. En limitant la taille de ce moule, il serait possible d'effectuer l'IMS des homogénats dopés avec les échantillons d'organes traités sur la même lame d'analyse, réduisant ainsi les variations lors de la préparation de l'échantillon.

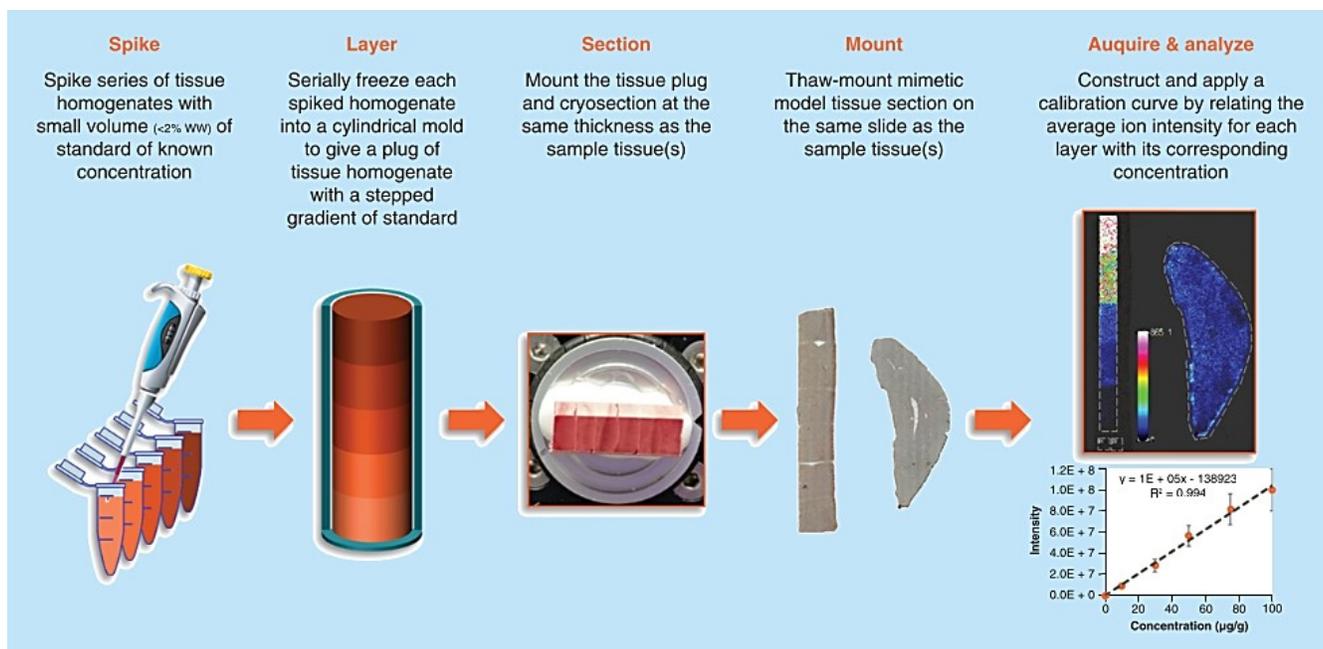


Figure 31. Représentation schématique d'une nouvelle méthode de quantification par IMS avec des homogénats d'organes dopés. Reproduction autorisée et crédit aux auteurs de l'article en citation.⁹⁸

Avec les développements récents dans le domaine de l'imagerie par spectrométrie de masse, cette branche de recherche permet d'offrir de plus en plus d'informations sur la distribution moléculaire de nouveaux composés lors des phases de développement. Cette nouvelle méthode de quantification et de localisation de composés pharmaceutiques offre un environnement mimétique et représentatif de l'échantillon biologique à analyser. Les matrices biologiques sont souvent la source de fluctuation et de variation en analyse par spectrométrie de masse. Ainsi, avec ce modèle, l'activité du composé pharmaceutique dans le milieu biologique complexe est mieux représentée et permet une meilleure précision de la quantification par IMS. De plus, pour limiter les écarts de linéarité avec cette nouvelle méthode d'analyse, il serait intéressant d'ajouter un étalon interne ayant la même concentration à chaque solution étalon et échantillon. L'étalonnage interne utilise une molécule de référence qui a une structure et des propriétés apparentées à la molécule d'intérêt. Ainsi, l'élaboration des courbes d'étalonnage se fera en fonction du rapport des concentrations de l'analyte et de la substance d'étalon interne, augmentant alors la précision de l'étalonnage.

Finalement, pour les études comparatives des biomolécules, les travaux porteront sur l'identification des lipides d'intérêts. En utilisant la spectrométrie de masse en tandem MS/MS, il sera possible de suivre les ions fragments clés et les associer à une section de la structure pour l'identification. De plus, pour explorer davantage le mécanisme antiprolifératif par les biguanides, les futurs travaux porteront sur l'analyse comparative de l'expression des protéines dans les organes et voir l'altération de leur composition au travers les organes. L'activation ou l'inhibition de certaines protéines est induite par des voies métaboliques spécifiques qui pourraient nous en apprendre davantage sur le mécanisme d'action des biguanides.

6 Références

1. World Health Organization. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (consulté le 9 mai 2019).
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, A. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68* (6), 394-424.
3. Comité consultatif des statistiques canadiennes sur le cancer. *Stats Can Cancer 2018*; 0835-2976; Société canadienne du cancer: Toronto, ON, 2018.
4. Burke, H. B. *J Natl Cancer Inst* **2004**, *96* (19), 1408-9.
5. Giraldo, N. A.; Peske, J. D.; Sautes-Fridman, C.; Fridman, W. H. *Virchows Arch* **2019**, *474* (4), 463-474.
6. Longnecker, D. S. *Am J Pathol* **2019**, *189* (1), 6-8.
7. Zhang, Q.; Zeng, L.; Chen, Y.; Lian, G.; Qian, C.; Chen, S.; Li, J.; Huang, K. *Gastroenterol Res Pract* **2016**, *2016*, 8962321.
8. Hezel, A. F.; Kimmelman, A. C.; Stanger, B. Z.; Bardeesy, N.; Depinho, R. A. *Genes Dev* **2006**, *20* (10), 1218-49.
9. Adamska, A.; Domenichini, A.; Falasca, M. *Int J Mol Sci* **2017**, *18* (7).
10. Comité consultatif de la Société canadienne du cancer. *Stats Can Cancer 2017*; 0835-2976; Toronto, ON, 2017.
11. Siegel, R. L.; Miller, K. D.; Jemal, A. *CA Cancer J Clin* **2015**, *65* (1), 5-29.
12. McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R. C.; Jones, C.; Coleman, H. G.; McCain, R. S. *World J Gastroenterol* **2018**, *24* (43), 4846-4861.
13. Swierczewska, M.; Kozlov, S.; Adisheshaiah, P. P. *Oncogenom*, 2019; pp 313-327.
14. Seufferlein, T.; Bachet, J. B.; Van Cutsem, E.; Rougier, P.; Group, E. G. W. *Ann Oncol* **2012**, *23 Suppl 7*, vii33-40.
15. Warsame, R.; Grothey, A. *Expert Reviews* **2012**, *12* (10), 1327-1336.
16. Hammel, P.; Huguet, F.; van Laethem, J. L.; Goldstein, D.; Glimelius, B.; Artru, P.; Borbath, I.; Bouche, O.; Shannon, J.; Andre, T.; Mineur, L.; Chibaudel, B.; Bonnetain, F.; Louvet, C.; Group, L. A. P. T. *JAMA* **2016**, *315* (17), 1844-53.
17. Conroy, T.; Desseigne, F.; Ychou, M.; Bouche, O.; Guimbaud, R.; Becouarn, Y.; Adenis, A.; Raoul, J. L.; Gourgou-Bourgade, S.; de la Fouchardiere, C.; Bennouna, J.; Bachet, J. B.; Khemissa-Akouz, F.; Pere-Verge, D.; Delbaldo, C.; Assenat, E.; Chauffert, B.; Michel, P.; Montoto-Grillot, C.; Ducreux, M.; Groupe Tumeurs Digestives of, U.; Intergroup, P. *N Engl J Med* **2011**, *364* (19), 1817-25.
18. Gresham, G. K.; Wells, G. A.; Gill, S.; Cameron, C.; Jonker, D. J. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 471.
19. Scheffer, H. J.; Vroomen, L. G.; de Jong, M. C.; Melenhorst, M. C.; Zonderhuis, B. M.; Daams, F.; Vogel, J. A.; Besselink, M. G.; van Kuijk, C.; Witvliet, J.; de van der Schueren, M. A.; de Gruijl, T. D.; Stam, A. G.; van den Tol, P. M.; van Delft, F.; Kazemier, G.; Meijerink, M. R. *Radiology* **2017**, *282* (2), 585-597.
20. Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R. H.; Goggins, M. *The Lancet* **2011**, *378* (9791), 607-620.
21. Aier, I.; Semwal, R.; Sharma, A.; Varadwaj, P. K. *Cancer Epidemiol* **2019**, *58*, 104-110.

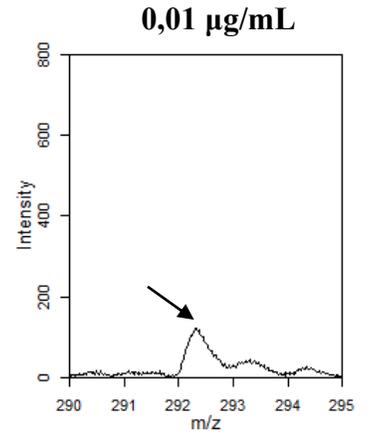
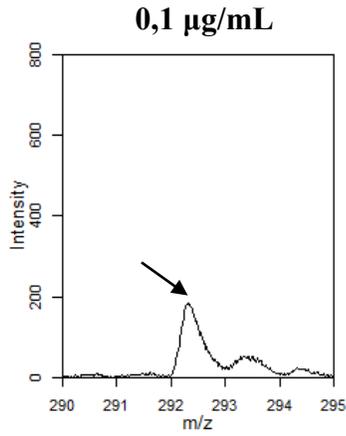
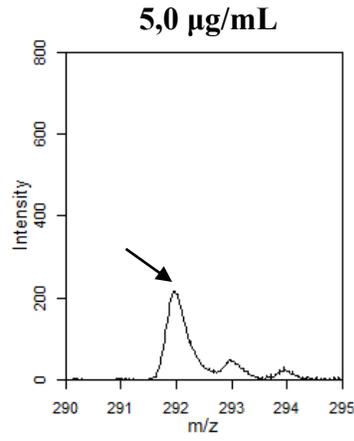
22. Truty, M. J.; Kendrick, M. L.; Nagorney, D. M.; Smoot, R. L.; Cleary, S. P.; Graham, R. P.; Goenka, A. H.; Hallemeier, C. L.; Haddock, M. G.; Harmsen, W. S.; Mahipal, A.; McWilliams, R. R.; Halfdanarson, T. R.; Grothey, A. F. *Ann Surg* **2019**.
23. Sanchez-Rangel, E.; Inzucchi, S. E. *Diabetologia* **2017**, *60* (9), 1586-1593.
24. Witters, L. A. *J Clin Invest* **2001**, *108* (8), 1105-1107.
25. Sterne, J. *Maroc méd* **1957**, *36*, 1295-1296.
26. Pollak, M. *Cancer Prev Res (Phila)* **2010**, *3* (9), 1060-5.
27. Viollet, B.; Guigas, B.; Sanz Garcia, N.; Leclerc, J.; Foretz, M.; Andreelli, F. *Clin Sci (Lond)* **2012**, *122* (6), 253-70.
28. Kwong, S. C.; Brubacher, J. *J Emerg Med* **1998**, *16* (6), 881-886.
29. Kasznicki, J.; Sliwinska, A.; Drzewoski, J. *Ann Transl Med* **2014**, *2* (6), 57.
30. Giovannucci, E.; Harlan, D. M.; Archer, M. C.; Bergenstal, R. M.; Gapstur, S. M.; Habel, L. A.; Pollak, M.; Regensteiner, J. G.; Yee, D. *Diabetes Care* **2010**, *33* (7), 1674-85.
31. He, X. X.; Tu, S. M.; Lee, M. H.; Yeung, S. C. *Ann Oncol* **2011**, *22* (12), 2640-5.
32. Hadad, S.; Iwamoto, T.; Jordan, L.; Purdie, C.; Bray, S.; Baker, L.; Jellema, G.; Deharo, S.; Hardie, D. G.; Pusztai, L.; Moulder-Thompson, S.; Dewar, J. A.; Thompson, A. M. *Breast Cancer Res Treat* **2011**, *128* (3), 783-94.
33. Lee, M. S.; Hsu, C. C.; Wahlqvist, M. L.; Tsai, H. N.; Chang, Y. H.; Huang, Y. C. *BMC Cancer* **2011**, *11*, 20.
34. Stevens, R. J.; Ali, R.; Bankhead, C. R.; Bethel, M. A.; Cairns, B. J.; Camisasca, R. P.; Crowe, F. L.; Farmer, A. J.; Harrison, S.; Hirst, J. A.; Home, P.; Kahn, S. E.; McLellan, J. H.; Perera, R.; Pluddemann, A.; Ramachandran, A.; Roberts, N. W.; Rose, P. W.; Schweizer, A.; Viberti, G.; Holman, R. R. *Diabetologia* **2012**, *55* (10), 2593-2603.
35. Marshall, S. M. *Diabetologia* **2017**, *60* (9), 1561-1565.
36. Farmer, R. E.; Ford, D.; Forbes, H. J.; Chaturvedi, N.; Kaplan, R.; Smeeth, L.; Bhaskaran, K. *Int J Epidemiol* **2017**, *46* (2), 728-744.
37. Wang, D. S.; Jonker, J. W.; Kato, Y.; Kusuvara, H.; Schinkel, A. H.; Sugiyama, Y. *J Pharmacol Exp Ther* **2002**, *302* (2), 510-5.
38. Graham, G. C.; Punt, J.; Arora, M.; Day, R. O.; Doogue, M. P.; Duong, J. K.; Furlong, T. J.; Greenfield, J. R.; Greenup, L. C.; Kirkpatrick, C. M.; Ray, J. E.; Timmins, P.; Williams, K. M. *Clin Pharmacokinet* **2011**, *50* (2), 81-98.
39. Gong, L.; Goswami, S.; Giacomini, K. M.; Altman, R. B.; Klein, T. E. *Pharmacogenet Genomics* **2012**, *22* (11), 820-7.
40. Pollak, M. N. *Cancer Discov* **2012**, *2* (9), 778-90.
41. A., L.; Sullivan, L. B.; Vander Heiden, M. G. *BMC Biology* **2014**, *12* (82), 1-4.
42. Hirst, *J Biochem Soc Trans* **2005**, *33* (Pt 3), 525-9.
43. Cuperus, R.; Leen, R.; Tytgat, G. A.; Caron, H. N.; van Kuilenburg, A. B. *Cell Mol Life Sci* **2010**, *67* (5), 807-16.
44. Drahotova, Z.; Palenickova, E.; R., E.; Milerova, M.; Brejchova, J.; Vosahlikova, M.; Svoboda, P.; Kazdova, L.; Kalous, M.; Z., C.; Cahova, M. *Physiol. Res.* **2014**, *63*, 1-11.
45. (a) Gravel, J.; Elie, C. R.; Khayat, M.; Schmitzer, A. *MedChemComm* **2016**, *7* (6), 1128-1131; (b) Elie, C. R.; David, G.; Schmitzer, A. R. *J Med Chem* **2015**, *58* (5), 2358-2366; (c) Elie, C. R.; Hebert, A.; Charbonneau, M.; Haiun, A.; Schmitzer, A. R. *Org Biomol Chem* **2013**, *11* (6), 923-8; (d) Elie, C.-R.; Charbonneau, M.; Schmitzer, A. R. *MedChemComm* **2012**, *3* (10).
46. Hébert, A.; Parisotto, M.; Ferbeyre, G.; Schmitzer, A. R. *Supramol Chem* **2018**, *31* (3), 127-139.

47. Yamashita, M.; Fenn, J. B. *J Phys Chem US* **1984**, *88* (20), 4451-4459.
48. Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal Chem* **2000**, *72* (15), 3653-3659.
49. Bahr, U.; Deppe, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. *Anal Chem* **2002**, *64* (22), 2866-2869.
50. Yost, R. A.; Enke, C. G. *J Am Chem Soc* **1978**, *100* (7), 2274-2275.
51. Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. *J Mass Spectrom* **2005**, *40* (4), 430-43.
52. Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Rev Sci Instrum* **1955**, *26* (12), 1150-1157.
53. Bonk, T.; Humeny, A. *Neuroscientist* **2001**, *7* (1), 6-12.
54. Kuhn-Holsken, E.; Lenz, C.; Sander, B.; Luhrmann, R.; Urlaub, H. *RNA* **2005**, *11* (12), 1915-30.
55. Schiller, J.; Suss, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Lessig, J.; Muller, M.; Petkovic, M.; Spalteholz, H.; Zschornig, O.; Arnold, K. *Prog Lipid Res* **2004**, *43* (5), 449-88.
56. Hatsis, P.; Brombacher, S.; Corr, J.; Kovarik, P.; Volmer, D. A. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17* (20), 2303-9.
57. Karas, M.; Bahr, U. *Nato Adv Sci I C-MAT*, Springer, Dordrecht: 1997; Vol. 504, pp 33-53.
58. Chughtai, K.; Heeren, R. M. *Chem Rev* **2010**, *110* (5), 3237-77.
59. McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. *Mass Spectrom Rev* **2007**, *26* (4), 606-43.
60. Dreisewerd, K. *Chem Rev* **2003**, *103* (2), 395-426.
61. Thomas, A.; Chaurand, P. *Bioanalysis* **2014**, *6* (7), 967-82.
62. Pavlovic, M.; Huber, I.; Konrad, R.; Busch, U. *Open Microbiol J* **2013**, *7*, 135-41.
63. Chen, J. H.; Yam, W. C.; Ngan, A. H.; Fung, A. M.; Woo, W. L.; Yan, M. K.; Choi, G. K.; Ho, P. L.; Cheng, V. C.; Yuen, K. Y. *J Clin Microbiol* **2013**, *51* (12), 3981-7.
64. Guilhaus, M. *J Mass Spectrom* **1995**, *30* (11), 1519-1532.
65. Mamyrin, B.; Karataev, V.; Shmikk, D.; V., Z. *J Exp Theor Phys* **1973**, *64*, 82-89.
66. Suckau, D.; Resemann, A.; Schuerenberg, M.; Hufnagel, P.; Franzen, J.; Holle, A. *Anal Bioanal Chem* **2003**, *376* (7), 952-65.
67. Gogichaeva, N. V.; Williams, T.; Alterman, M. A. *J Am Soc Mass Spectrom* **2007**, *18* (2), 279-84.
68. Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B. *J Am Soc Mass Spectrom* **1999**, *10* (2), 91-103.
69. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal Chem* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
70. Murayama, C.; Kimura, Y.; Setou, M. *Biophys Rev* **2009**, *1* (3), 131.
71. Anderton, C. R.; Gamble, L. J. *Microscopy Today* **2016**, *24* (2), 24-31.
72. Wiseman, J. M.; Ifa, D. R.; Zhu, Y.; Kissinger, C. B.; Manicke, N. E.; Kissinger, P. T.; Cooks, R. G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105* (47), 18120-5.
73. Gessel, M. M.; Norris, J. L.; Caprioli, R. M. *J Proteomics* **2014**, *107*, 71-82.
74. Jones, E. E.; Powers, T. W.; Neely, B. A.; Cazares, L. H.; Troyer, D. A.; Parker, A. S.; Drake, R. R. *Proteomics* **2014**, *14* (7-8), 924-35.
75. Schulz, S.; Becker, M.; Groseclose, M. R.; Schadt, S.; Hopf, C. *Curr Opin Biotechnol* **2019**, *55*, 51-59.
76. Chaurand, P. *J Proteomics* **2012**, *75* (16), 4883-92.
77. Tang, W.; Chen, J.; Zhou, J.; Ge, J.; Zhang, Y.; Li, P.; Li, B. *Theranostics* **2019**, *9* (4), 932-944.

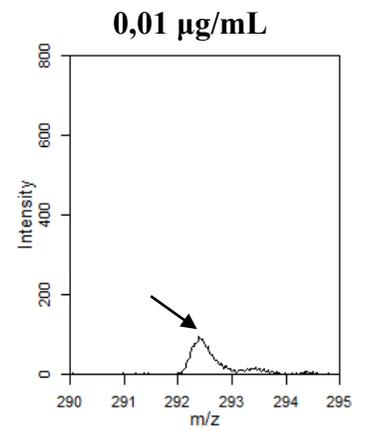
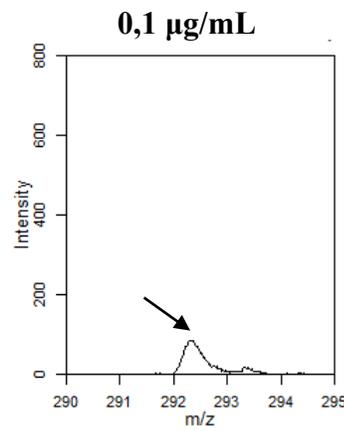
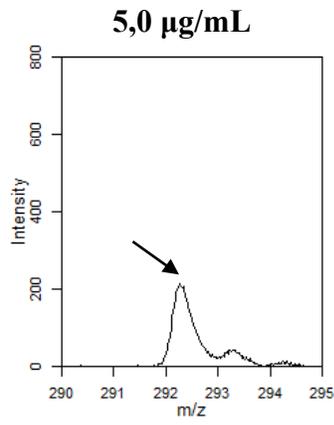
78. Meding, S.; Nitsche, U.; Balluff, B.; Elsner, M.; Rauser, S.; Schone, C.; Nipp, M.; Maak, M.; Feith, M.; Ebert, M. P.; Friess, H.; Langer, R.; Hofler, H.; Zitzelsberger, H.; Rosenberg, R.; Walch, A. *J Proteome Res* **2012**, *11* (3), 1996-2003.
79. Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2006**, *78* (18), 6448-56.
80. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat Med* **2001**, *7* (4), 493-6.
81. Groseclose, M. R.; Castellino, S. *Anal Chem* **2013**, *85* (21), 10099-106.
82. Cornett, D. S.; Frappier, S. L.; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2008**, *80* (14), 5648-53.
83. Chumbley, C. W.; Reyzer, M. L.; Allen, J. L.; Marriner, G. A.; Via, L. E.; Barry, C. E., 3rd; Caprioli, R. M. *Anal Chem* **2016**, *88* (4), 2392-8.
84. Berry, K. A.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Spraggins, J. M.; Caprioli, R. M.; Murphy, R. C. *Chem Rev* **2011**, *111* (10), 6491-512.
85. Fukuyama, Y. Liquid Matrices in MALDI-MS. In *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*, Handy, S., Ed. InTech: 2011; pp 361-374.
86. Hsieh, Y.; Chen, J.; Korfmacher, W. A. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2007**, *55* (2), 193-200.
87. Porta, T.; Grivet, C.; Knochenmuss, R.; Varesio, E.; Hopfgartner, G. *J Mass Spectrom* **2011**, *46* (2), 144-52.
88. Dong, J.; Ning, W.; Mans, D. J.; Mans, J. D. *Anal Methods* **2018**, *10*, 572-578.
89. Taylor, A. J.; Dexter, A.; Bunch, J. *Anal Chem* **2018**, *90* (9), 5637-5645.
90. Petkovic, M.; Schiller, J.; Muller, M.; Benard, S.; Reichl, S.; Arnold, K.; Arnhold, J. *Anal Biochem* **2001**, *289* (2), 202-16.
91. Sun, N.; Fernandez, I. E.; Wei, M.; Wu, Y.; Aichler, M.; Eickelberg, O.; Walch, A. *Histochem Cell Biol* **2016**, *145* (2), 201-11.
92. Rzagalinski, I.; Volmer, D. A. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* **2017**, *1865* (7), 726-739.
93. Haglund, O. Qualitative Comparison of Normalization Approaches in MALDI-MS. Royal Institute of Technology School of Computer Science and Engineering, Stockholm, Sweden, 2008.
94. Prideaux, B.; Lenaerts, A.; Dartois, V. *Curr Opin Chem Biol* **2018**, *44*, 93-100.
95. Arlauckas, S. P.; Browning, E. A.; Poptani, H.; Delikatny, E. J. *NMR Biomed.* **2019**.
96. Murphy, R. C.; Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Zemski Berry, K. A. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1811* (11), 970-5.
97. Schiller, J.; Süß, R.; Petković, M.; Zschörnig, O.; Arnold, K. *Anal Biochem* **2002**, *309* (2), 311-314.
98. Barry, J. A.; Groseclose, M. R.; Castellino, S. *Bioanalysis* **2019**, *11* (11), 1099-1116.

7 Annexe

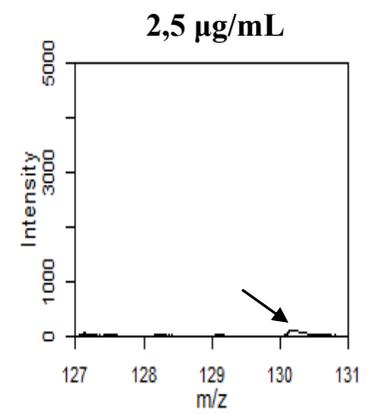
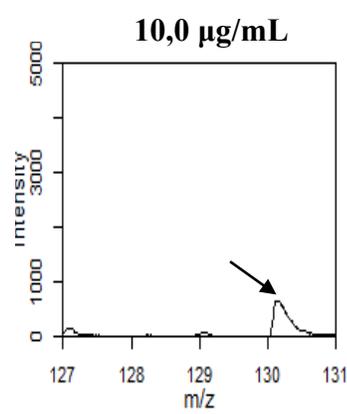
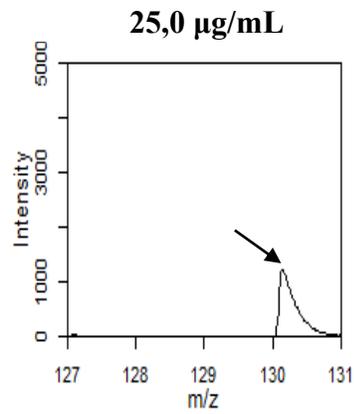
Composé A
Au-dessus



Composé A
En dessous



Metformine
Au-dessus



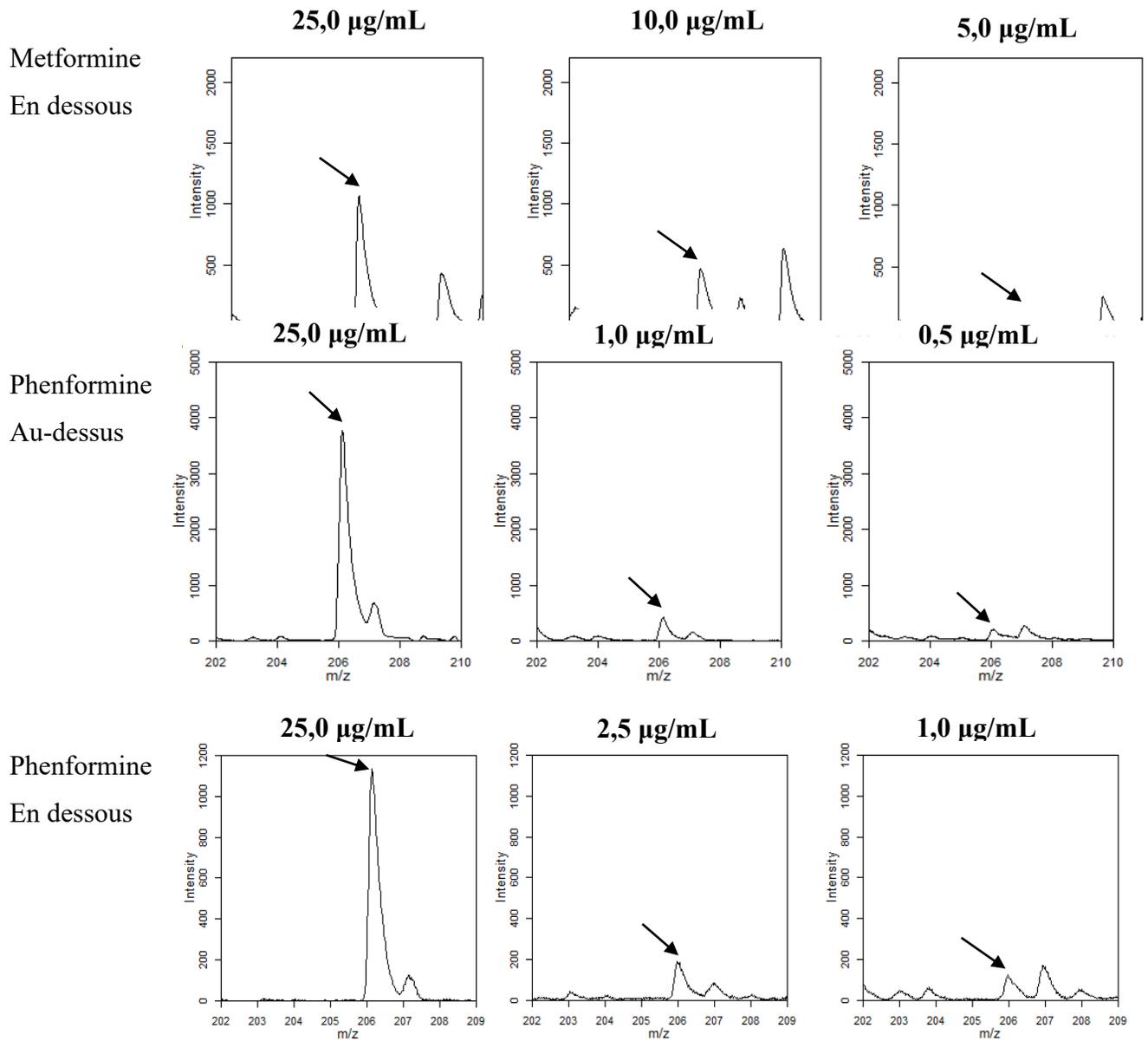


Figure A-1. Spectres de masse des biguanides lors des expériences de limites de détection sur tissu homogène de foie de souris. Les solutions sont dans un mélange de MeOH et H₂O 50/50.

