

Université de Montréal

Quantification relative et absolue du cholestérol à partir de sections tissulaires minces via
l'imagerie par spectrométrie de masse par désorption ionisation laser assistée par l'argent

Par

Zari Saadati Nezhad

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présentée à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de la Maîtrise
(M.Sc) en Chimie bio analytique

Mars 2022

© Zari Saadati Nezhad, 2022

Université de Montréal

Département Chimie

Ce mémoire intitulé

Quantification relative et absolue du cholestérol à partir de sections tissulaires minces via l'imagerie par spectrométrie de masse par désorption ionisation laser assistée par l'argent

Présenté par

Zari Saadati Nezhad

A été évalués par un jury composé des personnes suivantes

Prof. Pierre Thibault

Président-rapporteur

Prof. Pierre Chaurand

Directeur de recherche

Prof. Karen Waldron

Membre du jury

Résumé

Le cholestérol est l'une des molécules biologiques indispensable au bon fonctionnement de la plupart des organismes vivants, y compris chez l'homme. Cette molécule se trouve en abondance dans des tissus cérébraux et joue trois rôles principaux dans l'organisme. C'est un constituant (composant) essentiel de la membrane cellulaire qui sert à maintenir l'intégrité et la fluidité des cellules. Le cholestérol est aussi un élément déclencheur pour la production d'hormones stéroïdiennes comme les hormones sexuelles et la vitamine D. Finalement, il contribue à la production des acides biliaires par le foie.

Dans cette étude, une méthode analytique de quantification absolu du cholestérol dans sections tissulaires de cerveau de souris par IMS a été développée. Pour ce faire, dans un premier temps des courbes d'étalonnage faites à partir de concentrations croissantes de cholestérol-d7 ont été réalisées en dopant directement des sections minces d'homogénat de cerveau. Par la suite, un étalon interne de stigmastérol (un stérol naturel d'origine exclusivement végétale) a été utilisé pour normaliser les signaux en provenance du cholestérol et du cholestérol-d7.

Finalement, les analyses ont été effectuées en utilisant une méthode IMS préalablement développée au laboratoire pour la détection spécifique et l'imagerie du cholestérol par désorption ionisation laser assistée par l'argent. L'étalon interne a été utilisé ici pour réduire les erreurs instrumentales, et les résultats avant et après normalisation montrent le rôle fonctionnel de cette méthode dans l'amélioration de la linéarité de la courbe d'étalonnage et, en conséquence, la mesure précise du cholestérol dans des échantillons analysés.

Mots-clés : Désorption ionisation laser assistée par matrice (MALDI), désorption ionisation laser assistée par argent (AgLDI), Imagerie par spectrométrie de masse (IMS), Quantification, Étalon interne, Stigmastérol, Cholestérol.

Abstract

Cholesterol is one of the biological molecules essential for the proper functioning of most living organisms, including humans, and accurate quantification of cholesterol has many potential implications. This molecule is found abundantly in the brain and plays three main roles in the body. It is an essential component of the cell membrane which serves to maintain the integrity and fluidity of cells. Cholesterol is also a chemical trigger for the production of various steroid hormones such as sex hormones and vitamin D. Ultimately, it helps the liver to produce bile acids. A greater understanding of cholesterol and of its role in the body may directly impact our understanding of these processes.

In this study, an analytical method for the absolute quantification of cholesterol in the mouse brain slices by IMS was developed. To achieve this calibration curves made from increasing concentrations of cholesterol-d7 were first performed by doping them on thin sections of brain homogenate. Subsequently, stigmasterol (a natural sterol of exclusively plant origin) was used as an internal standard to normalize the signals from cholesterol and cholesterol-d7 was evenly deposited over all analyzed sections.

Finally, the analyzes were performed using an IMS method previously developed in the laboratory for the specific detection and imaging of cholesterol by silver-assisted laser ionization desorption. The internal standard was used here to reduce instrument errors, and the before and after normalization results show the functional role of this method in improving the linearity of the calibration curve and, therefore, the accurate measurement of cholesterol in the analyzed samples.

Keywords: Matrix Assisted Laser Ionization Desorption (MALDI), Silver assisted Laser Desorption/Ionization (AgLDI), Mass Spectrometry Imaging (IMS), Quantification, Internal Standard, Stigmasterol, Cholesterol.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract.....	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des figures supplémentaires	x
Liste des sigles et abréviations	xi
Remerciements.....	1
Chapitre 1 – Introduction	2
1.1. La spectrométrie de masse par désorption ionisation laser	2
1.1.1. La spectrométrie de masse	2
1.1.2. La désorption ionisation par laser	3
1.1.3. L'analyseur par temps de vol.....	6
1.1.4. L'extraction retardée de la source MALDI	7
1.1.5. Modes d'analyse linéaire et réflectron en TOF MS	8
1.1.6. La spectrométrie de masse en tandem.....	9
1.2. L'imagerie moléculaire par MALDI MS.....	11
1.2.1. Principe de l'imagerie MS.....	11
1.2.2. Analyse directe de tissus biologiques.....	12
1.2.3. Dépôt de matrice selon les tissus biologiques.....	13
1.2.4. Application de l'imagerie MS en recherche biologique.....	14
1.2.5. La lipidomique	14
1.2.6. Le cholestérol et son rôle biologique	15

1.2.7. L'analyse du cholestérol par MALDI IMS.....	16
1.3. L'imagerie MS assistée par argent (AgLDI IMS).....	16
1.3.1. Quantification du cholestérol par imagerie MS.....	17
1.4. Objectif de recherche.....	18
Chapitre 2 – Absolute Quantification of Cholesterol from Thin Tissue Sections by Silver-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging.....	20
2.1. Abstract.....	21
2.2. Introduction.....	21
2.3. Methods.....	23
2.3.1. Chemicals and reagents.....	23
2.3.2. Preparation of cholesterol-D7 calibration curves.....	24
2.3.3. Reference standard spray deposition.....	25
2.3.4. Sputter coating.....	26
2.3.5. Mass spectrometry Imaging.....	26
2.3.6. Data analysis.....	26
2.4. Results and discussion.....	27
2.5. Conclusions.....	33
2.6. Declarations.....	34
2.7. Supplementary information.....	34
Chapitre 3 – Conclusions et perspectives.....	42
3.1. Conclusions.....	42
3.2. Perspectives de recherche.....	42
Références bibliographiques.....	44

Liste des tableaux

Tableau 1 - Liste des matrices MALDI les plus couramment utilisées.....	5
Table S1 - Protocol for hematoxylin and eosin (H&E) staining.....	34
Table S2 - Average cholesterol quantities extracted from Slides 1, 2 &3 after AgLDI MSI either expressed in mg/g of wet brain tissue or in ng/mm ² of brain tissue for different brain subregions. SC, whole sagittal section; HP, hippocampus; CBX, cerebellum.	35

Liste des figures

Figure 1 - Schéma des composants communs des spectromètres de masse.....	3
Figure 2 - Schéma du mécanisme MALDI. L'irradiation des co-cristaux de matrice et d'analyte par une impulsion laser brève de quelques nanosecondes induit l'étape de désorption-ionisation des molécules de matrice et d'analyte. Des collisions en phase gazeuse dans la plume de matériel éjecté induisent l'ionisation des ions d'analyte par transfert de proton.....	7
Figure 3 - Schéma d'un spectromètre MALDI-TOF avec une source d'extraction à champ constant (A, B) ou avec une source à extraction retardée (C) pour un seul analyte. ..	8
Figure 4 - Schéma d'un analyseur MALDI-TOF en mode réflectron pour les ions positifs.....	9
Figure 5 - Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) avec un appareil de type MALDI TOF/TOF.....	10
Figure 6 - Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse de sections tissulaires minces par imagerie MALDI MS. A) les étapes de la préparation des sections. B) Trois différentes méthodes de la déposition de la matrice selon l'analyte. C) Acquisition, analyse et interprétation des résultats.....	12
Figure 7 - Experimental scheme for cholesterol absolute quantification within mouse brain tissue. See text for details.	28
Figure 8 - Cholesterol calibration curves from Slide 1. To generate the cholesterol calibration curves, increasing amounts of cholesterol-D ₇ were manually spotted either on serially cut mouse brain homogenate 12 µm sections, or directly on the the ITO-coated glass slide. On- and off-tissue AgLDI MSI ion images for increasing amounts of cholesterol-D ₇ before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. c) On- and off-tissue section cholesterol-D ₇ calibration curves.	30
Figure 9 - AgLDI MSI cholesterol ion images from the two 12 µm thick sagittal mouse brain sections mounted on Slide 1 acquired with a spatial resolution of 100 µm before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. Cholesterol was detected with higher abundance in the brain white matter. The absolute cholesterol quantification scales are derived from the calibration curves (Figure 2.2).	31
Figure 10 - Cholesterol absolute quantification within the mouse brain and specific brain	

substructures. a) Sagittal MALDI MSI ion image for cholesterol (m/z 493.26), and b) matching H&E staining from a serial section. c) Cholesterol amounts within the sections are provided in areal density (ng/mm²) or weight per weight of wet brain tissue (mg/g). Average values were derived from the six sagittal sections mounted on Slides 1, 2 and 3. The error bars represent the standard deviation. Detailed values can be found in Electronic Supplementary Material Table S2. SC, sagittal cut; Hp, hippocampus; CBX, cerebellum; CTX, iso cortex; MB, mid brain; CC, corpus callosum; FT fiber tracts and AN, amygdalar nucleus.....32

Liste des figures supplémentaires

Figure S1 - Chemical formula, molecular weight, and structure for cholesterol, cholesterol-D ₇ and stigmasterol.	36
Figure S2 - Photomicrographs of Slides 1, 2 & 3 after silver sputter deposition.	37
Figure S3 - AgLDI MS spectrum acquired from the 3rd on tissue cholesterol-D ₇ calibration point. The MS signals for cholesterol, cholesterol-D ₇ and stigmasterol are clearly distinct.	38
Figure S4 - AgLDI MS spectrum acquired from the hippocampus region of a mouse brain sagittal section. The MS signals for cholesterol and stigmasterol are clearly distinct.	39
Figure S5 - Cholesterol calibration curves from Slide 2 (top) and Slide 3 (bottom). To generate the cholesterol calibration curves, increasing amounts of cholesterol-D ₇ were manually spotted either on 12 μm thick mouse brain homogenate sections, or directly on the ITO-coated glass slide. On- and off-tissue AgLDI MSI ion images for increasing amounts of cholesterol-D ₇ before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. c) On- and off-tissue section cholesterol-D ₇ calibration curves.	40
Figure S6 - AgLDI MSI cholesterol ion images from the two 12 μm thick sagittal mouse brain sections mounted on Slides 2 and 3 acquired with a spatial resolution of 100 μm before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. Cholesterol was detected with higher abundance in the brain white matter. The absolute cholesterol quantification scales are derived from the calibration curves (Figure S5).	41

Liste des sigles et abréviations

AA	Acide arachidonique (<i>Arachidonic acid</i>)
ACN	Acétonitrile (<i>Acetonitrile</i>)
AGLDI	Désorption/ionisation laser assistée par l'argent (<i>Silver assisted laser desorption/ionization</i>)
AD	La maladie d'Alzheimer (<i>Alzheimer's disease</i>)
AN	(<i>amygdalar nucleus</i>)
CBX	Cervelet (<i>Cerebellum</i>)
CC	Corps calleux (<i>Corpus callosum</i>)
CHCA	Acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique (<i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>)
CHO	Cholestérol (<i>Cholesterol</i>)
CTX	Iso-cortex (<i>Iso cortex</i>)
DAN	1,5-diaminonaphtalène (<i>1, 5-diaminonaphthalene</i>)
DESI	Désorption ionisation par nébulisation électrostatique (<i>Desorption electrospray ionization</i>)
DHA	Acide docosahexaénoïque (<i>Docosahexaenoic acid</i>)
DHB	Acide 1,5-dihydroxybenzoïque (<i>Dihydroxybenzoic acid</i>)
EtOH	Éthanol (<i>Ethanol</i>)
FA	Acide gras (<i>Fatty acid</i>)
FT	(<i>Fiber tracts</i>)
FTICR	Résonance cyclotronique d'ion par transformée de Fourier (<i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
H&E	Hématoxyline et éosine (<i>Hematoxylin and eosin</i>)
HPA	Acide 3-Hydroxy picolinique (<i>3-Hydroxypicolinic acid</i>)
HP	Hippocampe (<i>Hippocampus</i>)
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse (<i>Imaging by mass spectrometry</i>)
ITO	Oxide d'indium étain (<i>Indium Tin Oxide</i>)
LDI	Désorption par ionisation laser (<i>Laser desorption ionization</i>)
m/z	Ratio masse sur charge (<i>mass-to-charge ratio</i>)

MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice (<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
MB	Mésencéphale ou cerveau moyen (<i>Mid brain</i>)
MM	Masse moléculaire (<i>Molecular mass</i>)
MeOH	Méthanol (<i>Methanol</i>)
MS	Spectrométrie de masse (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem (<i>hybrid mass spectrometry</i>)
NEG	Ionisation en mode négatif (<i>ionization in negative mode</i>)
Norm ref	Normalisation référence (<i>reference normalization</i>)
PA	Acide picolinique (<i>Picolinic acid</i>)
POS	Ionisation en mode positive (<i>ionization in positive mode</i>)
SIMS	Spectrométrie de masse des ions secondaires
SC	Coupe sagittale (<i>Sagittal cut</i>)
S/N	Signal sur Bruit (<i>Signal on noise</i>)
TAG	Triacylglycérol (<i>Triglyceride</i>)
TIS	Sélecteur temporel d'ions (<i>Timed ion selector</i>)
TOF/TOF	Temps de vol (<i>Time-of-flight</i>)
TOF/TOF	Spectrométrie de masse par temps de vol en tandem (<i>Tandem time-of-flight mass spectrometry</i>)

“Problems are not stop signs; they are guidelines.”

Robert Schuller

Remerciements

Tout d'abord, je dois remercier le directeur du groupe, le professeur Pierre Chaurand, pour sa confiance et son soutien. Professor Chaurand, pleinement conscient de ma situation particulière de poursuivre mes études après vingt ans tout en ayant une famille avec deux enfants, m'a accepté dans son groupe de recherche et m'a encouragé à plusieurs reprises de continuer dans cette voie avec ses conseils et son soutien.

Le soutien et l'aide infinie de mon mari au cours de ces années ont joué un rôle très important dans ma vie et dans la réalisation de cet objectif. Il n'a jamais laissé les problèmes de notre vie privée et d'immigration et le fait d'avoir deux enfants m'empêcher de poursuivre mes études ; il a toujours été mon meilleur ami et mon meilleur assistant. Mes chers enfants m'ont patiemment permis de passer le temps que je devais investir derrière des portes fermées à étudier.

Je remercie aussi mes anciens et nouveaux collègues qui ont toujours été à mes côtés comme mes frères et mes sœurs, sincères et gentils, et qui m'ont aidé et soutenu par leurs conseils et leurs orientations. Je remercie mon cher ami et collègue Ethan Yang, dont malheureusement le virus Corona m'a empêché de profiter de sa présence et de son immense connaissance sur l'imagerie par spectrométrie de masse. Mon cher ami Frédéric Fournelle, qui a toujours été à mes côtés, comme mon petit frère, m'a soutenu et m'a enseigné beaucoup de choses avec une grande patience et générosité.

Je remercie mes nouveaux collègues, Rachel, Luna, Sarah et Juan Pablo ; je garde de bons souvenirs des nombreuses journées passées en votre compagnie. My dear Rachel, I want to thank you for being with me during these rough times. I've learned a lot from you, and I really appreciate your help. Thank you for all that you did. My knowledge about the culture and tourist attractions in Canada has grown since knowing you and I am truly grateful.

Je remercie mes chers amis des groupes de Karen Waldron et d'Alexandra Furtos qui m'ont donné l'opportunité de passer un court moment avec eux et d'élargir mes connaissances et mon expérience dans le domaine de la chimie bioanalytique. Je remercie le professeur Jean-François Masson et ses collègues pour leur coopération infinie et leur accès illimité au système de pulvérisation métallique qui m'a permis de faire de ce projet avec succès.

Chapitre 1 – Introduction

1.1. La spectrométrie de masse par désorption ionisation laser

1.1.1. La spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse puissante qui permet d'isoler et de détecter électriquement les ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle est utilisée dans divers domaines scientifiques, de recherche, médicaux, pharmaceutiques et même criminels. Les spectromètres de masse varient considérablement selon le type d'application et le type d'analyse, la précision, la vitesse et la sensibilité requises, mais ils sont tous constitués respectivement des éléments suivants : un système d'introduction d'échantillon, une source d'ionisation, un analyseur de masse, un détecteur d'ions et un système d'enregistrement des données.(1) (Figure 1.1)

L'analyseur de masse et le détecteur sont placés sous vide. C'est souvent aussi le cas pour la source d'ionisation. Un bon vide ($\sim 10^{-7}$ mbar) permet de créer un chemin libre pour le déplacement des ions sans risque de collision, fragmentation ou neutralisation dans l'analyseur et contribue à améliorer la résolution en masse des pics. En fait, il existe une relation inverse entre la pression à l'intérieur de l'analyseur et la résolution maximale. La réduction de la pression augmente la résolution du spectre. Par conséquent, plusieurs pompes doivent être utilisées pour atteindre le niveau de vide idéal à l'intérieur de l'analyseur.(1)

Le but commun de toutes les techniques de spectrométrie de masse est d'ioniser des molécules d'analyte, de les séparer, de les identifier qualitativement et pour certaines applications de les quantifier. Le spectre de masse obtenu a deux dimensions : l'intensité du signal en fonction du m/z des ions. Les méthodes d'introduction des échantillons et les techniques d'ionisation, l'analyse de masse et leur mode de fonctionnement sont différents selon le type d'appareil utilisé.

En conclusion, la spectrométrie de masse permet de mesurer avec précision une large gamme de masse et de créer des ponts entre les différentes disciplines scientifiques, de la physique, vers la chimie, biologie, médecine et pharmacie. La capacité de détecter une large gamme de masse allant des atomes aux grandes biomolécules, sa sensibilité et sa résolution élevée ont établi

son champ d'application dans de nombreuses disciplines scientifiques.

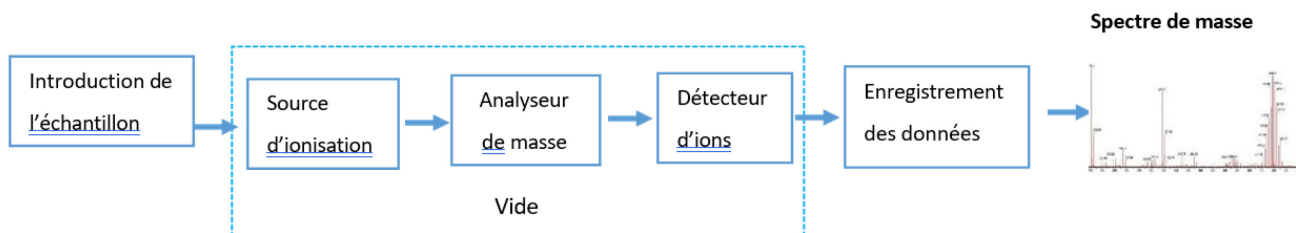


Figure 1 - Schéma des composants communs des spectromètres de masse.

1.1.2. La désorption ionisation par laser

Indépendamment de la technique de spectrométrie de masse, l'analyseur n'est capable d'analyser que les espèces chargées. Il existe donc différents types de système d'ionisation adaptés à différents types d'analyte.

La technique de désorption ionisation laser (LDI), a été introduite à la fin des années 1960s.(1-3) Initialement, cette approche a permis de détecter de petits sels et des molécules absorbant la lumière laser.(3) A la fin des années 80, l'introduction de nouveaux matériaux et molécules absorbant à la longueur d'onde du laser et leur combinaison avec des échantillons ont permis la désorption-ionisation de molécules de haut poids moléculaire. Les deux approches proposées à cette époque étaient : 1) l'utilisation d'une fine poudre de cobalt mélangée avec du glycérol en présence de l'analyte, et puis sous irradiation laser de ce mélange, la détection de molécules de haute masse fut observée (4) ; 2) l'utilisation de molécules organiques de faibles poids moléculaires absorbant fortement la lumière laser. Cette 'matrice' est alors mélangée avec l'analyte en solution.(5) L'évaporation des solvants et la co-cristallisation de ces espèces suivit de l'irradiation laser a permis la encore la détection de molécules de haute masse.(6) Cette deuxième méthode baptisée *Matrix Assisted Laser desorption/ionisation* 'MALDI' a connue depuis un développement fulgurant en raison de sa simplicité et de sa plus grande sensibilité. La combinaison de la technique d'ionisation MALDI et de l'analyseur en masse *Time of flight* 'TOF' a alors permis de produire des spectres de masse de protéines ayant une masse moléculaire élevée.(7, 8) Une autre particularité intéressante de la technique MALDI est qu'elle favorise grandement la production d'ions simplement chargés. Elle permet donc de faire des analyses directes de mélanges complexes de molécules.

Le mécanisme de cette méthode d'ionisation se décrit selon l'ordre suivant : l'absorption de la lumière laser par les molécules de la matrice; l'élévation rapide de la température entraîne la sublimation locale de la matrice ce qui provoque la désorption de la matrice et des molécules d'analyte (changement de phase de l'état solide à l'état gazeux); dans la plume de matériel résultante, des collisions entre des molécules d'analyte avec des molécules de matrice chargées favorise le transfert de proton de la matrice vers l'analyte ce qui induit leur ionisation (5) (Figure 1.2). La longueur d'onde du laser est un paramètre important pour cette technique et il existe différents types de lasers allant de l'UV à l'IR. Les lasers UV sont supérieurs aux IR en raison de leur temps d'impulsion plus court et de leur fréquence plus élevée. Le temps d'impulsion des lasers UV est d'environ 3 à 10 nanosecondes contre 6 à 200 nanosecondes par rapport aux lasers IR. Des durées d'impulsion plus courtes empêche la dissipation de chaleur et la dégradation de l'échantillon. La puissance laser est réglable via un atténuateur et doit être optimisée pour chaque analyse.

La technique MALDI est utile pour ioniser une large gamme de biomolécules (protéines, peptides, oligosaccharides, oligonucléotides, lipides, métabolites). Par contre, un paramètre important dans cette méthode est l'utilisation d'une matrice appropriée au type d'analyte. Au fil des ans, de nombreuses matrices organiques ont été introduites pour analyser une variété de molécules biologiques (Tableau 1.1).

Tableau 1 - Liste des matrices MALDI les plus couramment utilisées.

Composé	Abréviation / Autre nom	Solvant	Langueur d'onde (nm)	Application
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	DHB, Acide gentisique	Eau, acétonitrile, acétone, chloroforme	337, 355, 266	Peptides, nucléotides, oligonucléotides oligosaccharides
Acide 3-(4-hydroxy-3-méthoxyphényl) prop-2-énoïque	Acide férulique	Eau, acétonitrile, propanol	337, 355, 266	Protéines
Acide 3-(4-hydro-3,5-diméthoxyphenyl) - prop-2-énoïque	SA, Acide sinapinique	Eau, acétonitrile, acétone, chloroforme	337, 355, 266	Peptides, protéines, lipides
Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique	CHCA	Eau, acétonitrile,	337, 355	Peptides, lipides, nucléotides
Acide picolinique	PA	Éthanol	266	Oligonucléotides
Acide 3-Hydroxy picolinique	HPA, 3-HPA	Éthanol	337, 355	Oligonucléotides

Dans la technique MALDI, le faisceau laser est pulsée et pour chaque pulse laser sur la surface de l'échantillon, un paquet d'ions est généré et dirigé vers l'analyseur. Les analyseurs de type TOF sont idéals en raison de la nécessité pour les ions d'être accélérés simultanément et de commencer leur libre mouvement à travers le tube de vol. Les ions produits par MALDI sont généralement simplement protoné ou déprotoné (e.g. $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$), de sorte que le m/z des ions est relativement grand. De ce fait, les analyseurs TOF se couplent bien avec la technique MALDI en raison de l'absence de contraintes de plage de masse.(9)

La technique MALDI est une méthode analytique rapide, précise et fiable qui a pu remplacer certaines méthodes de dépistage fastidieuses et routinières dans de nombreux centres scientifiques et de recherche pour identifier, déterminer la présence ou l'absence d'agents pathogènes y compris les germes, les champignons et les bactéries. Par conséquent, cela aide à économiser du temps et des efforts pour le microbiologiste, en plus de réduire les coûts des tests.

Avec l'avancement des technologies en spectrométrie de masse, leurs différentes composantes, y compris les sources d'ionisation, ont également beaucoup évolué. Par exemple, en 1985, Karas *et al.* ont étudié l'effet de la longueur d'onde laser (266 nm vs 355 nm) sur le processus MALDI en utilisant différents groupes de molécules organiques absorbantes et non absorbantes ainsi que des matrices absorbantes.(10) Ils ont démontré qu'avec la longueur d'onde de 355 nm, le rapport des ions moléculaires sur les ions fragments est grandement amélioré par rapport à 266 nm. Outre la longueur d'onde, le taux de répétition laser a aussi beaucoup évolué avec le temps. Les premiers laser UV (à 337 nm) utilisés offraient des taux de répétition de quelques Hz.(11) Aujourd'hui, les systèmes les plus moderne offrent des taux de répétition de plusieurs kHz.(12, 13) La méthode MALDI a été initialement couplée à des analyseurs en masse de type TOF. Avec un intérêt croissant pour le MALDI, les QTOF, les trappes à ions, les QIT-TOF, les FT/ICR, les Orbitraps et les systèmes TOF MS à mobilité ionique ont progressivement été équipés de sources d'ions MALDI ouvrant de nouvelles possibilités analytiques.(14-21)

1.1.3. L'analyseur par temps de vol

L'analyseurs temps de vol (TOF) est grandement utilisé en spectrométrie de masse. Comme tous les analyseurs, le TOF est capable de déterminer la masse moléculaire des ions avec précision. Ils sont abondamment utilisés pour identifier, caractériser et déterminer l'abondance relative et absolue des ions en provenance d'une variété d'échantillons biologiques. La séparation des ions est basée sur les différences de temps de vol des ions. En effet, suite à l'accélération des ions sous une tension constante (entre 20 et 25 kV) dans l'espace source des spectromètres, ceux-ci sont temporellement séparés dans l'analyseur (entre la source et le détecteur) en fonction de leur vitesse, donc de leur rapport m/z (Figure 1.3).

Pour des ions de même état de charge, plus le poids moléculaire augmente, plus la vitesse diminue et plus le temps de vol augmente. Les TOF sont capables d'analyser une large gamme de molécules de plusieurs MDa. Leur gamme de masse 'utile' est néanmoins situé entre 1 et 150 000 Da avec des précisions en masse de l'ordre de 1 à 50 ppm et une résolution entre 1000 et 50 000.(22)

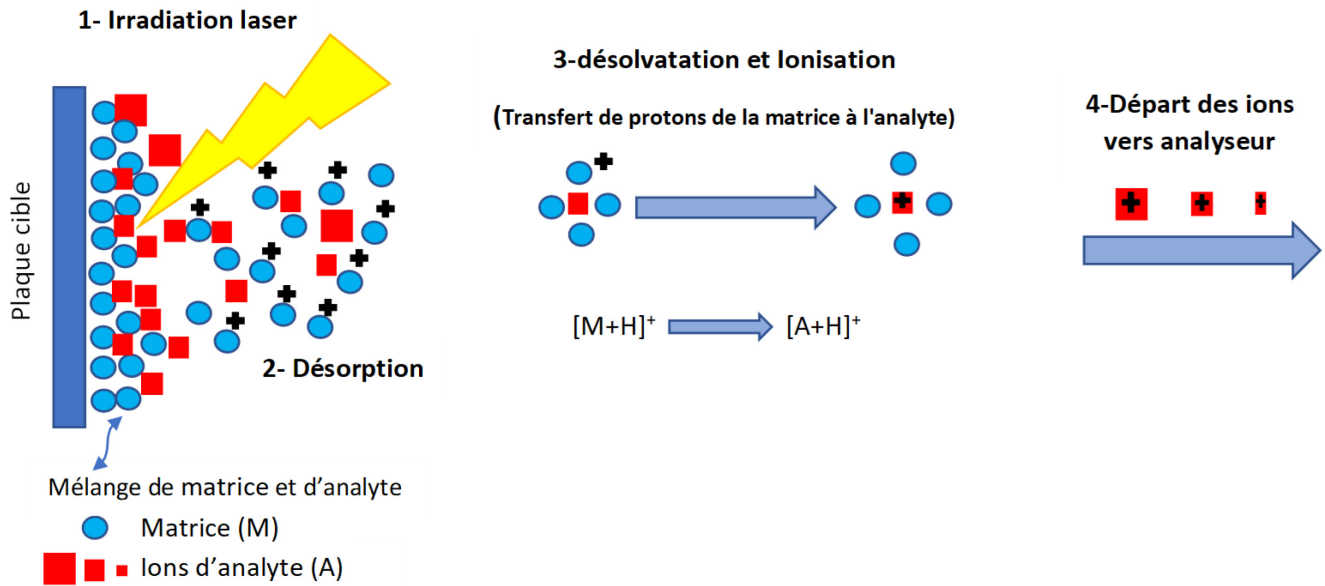


Figure 2 - Schéma du mécanisme MALDI. L'irradiation des co-cristaux de matrice et d'analyte par une impulsion laser brève de quelques nanosecondes induit l'étape de désorption-ionisation des molécules de matrice et d'analyte. Des collisions en phase gazeuse dans la plume de matériel éjecté induisent l'ionisation des ions d'analyte par transfert de proton.

1.1.4. L'extraction retardée de la source MALDI

En MALDI, la production massive des espèces moléculaires neutres est préjudiciable à l'obtention d'une résolution en masse optimale. En effet, sous la tension d'accélération appliquée dans l'espace source des spectromètres, les ions formés sont accélérés et entrent en collision avec les espèces neutres. Cela induit des pertes en énergie cinétique qui conduisent à une augmentation des temps de vol et donc à un élargissement des pics de masse.

En 1995, Lennon et Brown ont développé une nouvelle géométrie de source MALDI à deux étapes permettant de grandement diminuer ce problème.(23) En introduisant un décalage temporel entre l'irradiation laser (la production d'ions) et le voltage d'accélération (l'extraction des ions), une dissipation de la plume de désorption est alors obtenue permettant l'extraction des ions produits tout en limitant les collisions. Pour ce faire, suite à l'impulsion laser, pendant quelques centaines de millisecondes le premier espace de la source est maintenu sans champ. Cela permet donc la dissipation de la plume de désorption. Après ce délai, une tension de quelques kilovolts permet d'extraire les ions du premier espace de la source. Les ions sont alors accélérés avec le complément de potentiel dans le deuxième espace de la source.

Le contrôle précis du délai et de la tension d'extraction permet de focaliser en temps l'arrivée des ions de même m/z sur le détecteur. En effet, l'extraction retardée permet de compenser les variations en énergie cinétique des ions induites par une distribution de vitesses initiales provoquée par l'étape de désorption. Cela a pour effet de grandement augmenter la résolution en masse atteignable et de ce fait d'augmenter la précision sur la mesure de masse. Une autre conséquence de l'extraction retardée est de minimiser l'énergie interne des ions formés et donc de diminuer leur instabilité. Cette plus grande stabilité des ions contribue également à l'augmentation de la résolution (24) (Figure 1.4).

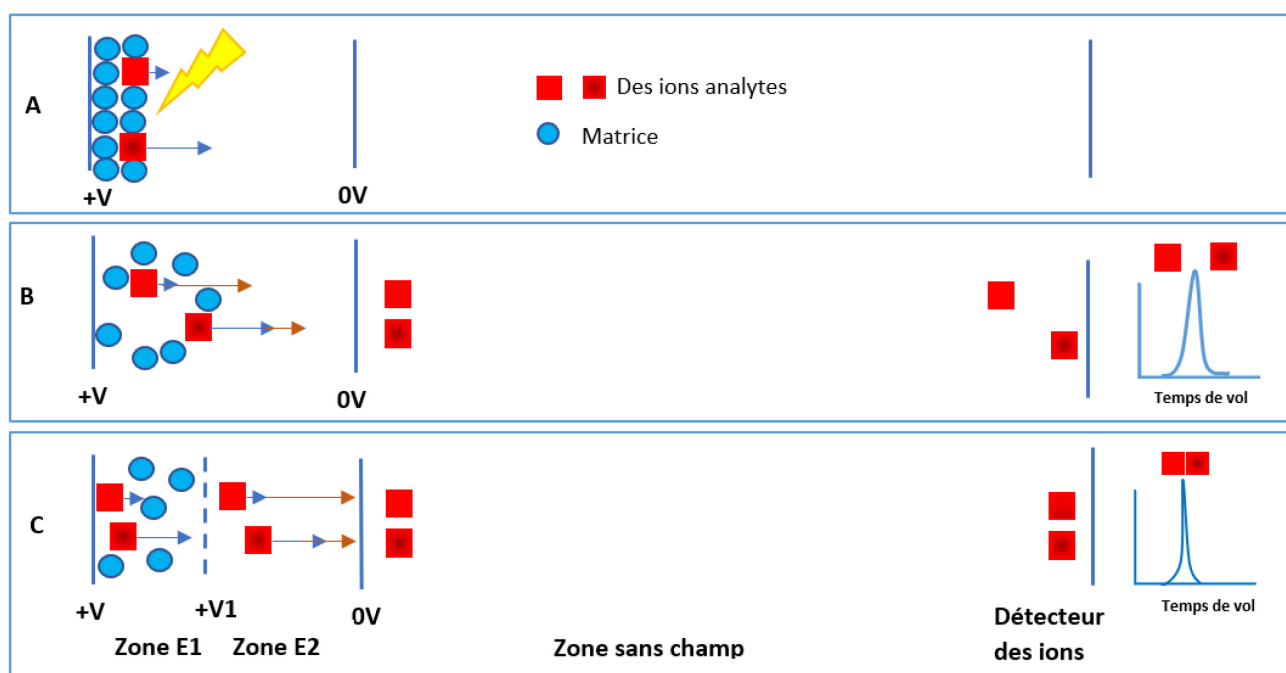


Figure 3 - Schéma d'un spectromètre MALDI-TOF avec une source d'extraction à champ constant (A, B) ou avec une source à extraction retardée (C) pour un seul analyte.

1.1.5. Modes d'analyse linéaire et réflectron en TOF MS

Les analyseurs TOF peuvent être utilisés avec deux géométries : linéaire et réflectron. La géométrie linéaire est la plus simple (Figure 1.3). Elle consiste d'un espace source où les ions sont produits et accélérés, d'un espace libre de champ (le TOF) et d'un détecteur d'ions, le tout aligné sur un même axe. Cette géométrie offre moins de résolution, mais une plus grande sensibilité analytique, surtout pour les (bio)molécules de plus hautes masses (> 5000 Da) tel que les protéines et autres polymères synthétiques.

En mode réflectron, un miroir électrostatique (ou réflectron) est installé sur l'axe du temps de vol ce qui a pour effet d'inverser la trajectoire des ions et de les envoyer vers un deuxième détecteur (Figure 1.5). À la suite de leur accélération dans l'espace source du spectromètre, les ions vont traverser un premier espace libre de champ (TOF 1) et pénétrer dans le réflectron. Dans le réflectron, les ions sont décélérés sous l'effet d'un champ électrostatique retardateur. Quand ils atteignent leur équipotentiel, les ions rebroussement chemin et sont réaccélérés jusqu'à la sortie du réflectron.

Les ions traversent alors un deuxième espace libre de champ (TOF 2) avant d'atteindre le détecteur. La fonction première du réflectron est de corriger les variations d'énergie cinétique des ions de même m/z , induites par les phénomènes de désorption-ionisation, afin qu'ils puissent atteindre le détecteur de manière synchrone. Dans les systèmes MALDI-TOF MS plus modernes, la combinaison de l'action de l'extraction retardée, du réflectron et de l'augmentation de la longueur des espaces libre de champ permet d'atteindre une résolution $>40\ 000$ avec une précision de l'ordre 5 ppm. La géométrie en mode réflectron est essentiellement utilisée pour l'analyse de (bio)molécules de plus faibles masse moléculaire (< 5000 Da) tel que les peptides, les acides nucléiques, les glucides, les lipides et les métabolites.

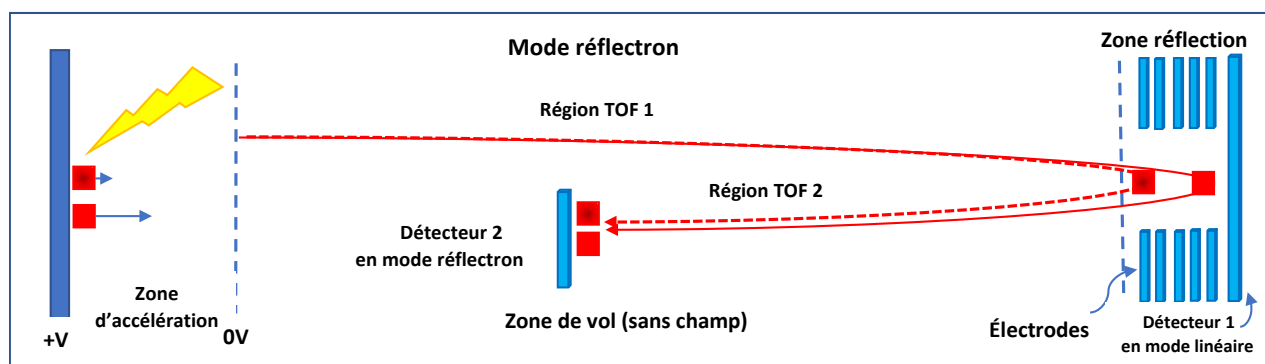


Figure 4 - Schéma d'un analyseur MALDI-TOF en mode réflectron pour les ions positifs.

1.1.6. La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) requiert le couplage d'au moins deux analyseurs de masse. Dans le premier analyseur, l'ion d'intérêt (ion précurseur) est isolé spatialement ou temporellement en fonction de son m/z et les ions fragments issus de sa

décomposition sont analysés dans le deuxième analyseur. Dans de nombreux systèmes MS, l'installation d'une cellule de collision entre les deux analyseurs permet le contrôle précis de la fragmentation de l'ion précurseur. Le spectre de masse des ions fragments issus d'un ion précurseur aide à identifier la structure chimique de la molécule.(25)

Les spectromètres de masse MALDI-TOF modernes peuvent effectuer des mesures de masse en tandem en utilisant l'approche expérimentale décrite ci-dessus ou avec des variantes de celle-ci. Le système utilisé pour la réalisation de ce mémoire comporte deux analyseurs TOF en série. Le premier TOF possède une géométrie linéaire alors que le deuxième TOF possède une géométrie réflectron. Entre les deux TOF est installée une série de lentilles électrostatiques ou une porte électrostatique, sélecteur temporel d'ions (timed ion selector TIS) qui permettent d'isoler l'ion parent et de réaccélérer l'ensemble des ions fragments (Figure 1.6). La fragmentation des ions précurseurs est induite en augmentant l'énergie laser utilisée pour la désorption-ionisation de l'échantillon. Cela a pour effet d'augmenter l'instabilité des ions précurseur et de favoriser leur fragmentation dans le premier TOF. Dans ce cas, les ions fragments possèdent la même vitesse que l'ion parent et ceux-ci sont réaccélérés vers le deuxième TOF pour leur analyse. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans la littérature scientifique démontrant la puissance de cette approche, tel que l'identification de nouveaux neuropeptides du système nerveux cardiaque chez les crustacés, y compris les crabes,(26) l'identification de nouveaux métabolites impliqués dans le cancer de la prostate,(27) ou encore l'identification de nouveaux sites de phosphorylation d'une protéine impliquées dans le cancer du sein.(28)

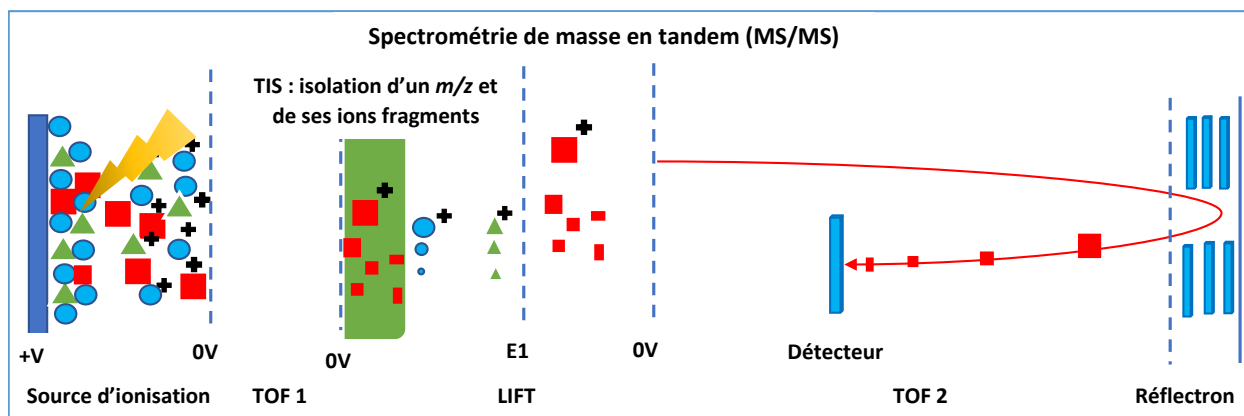


Figure 5 - Schéma de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) avec un appareil de type MALDI TOF/TOF.

1.2. L'imagerie moléculaire par MALDI MS

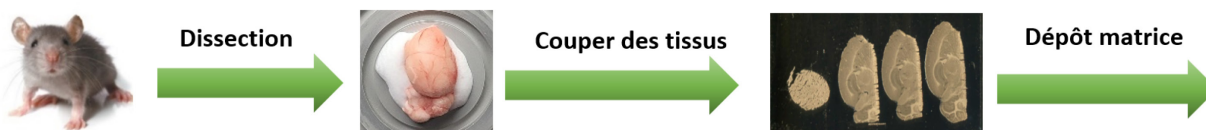
Au cours des deux dernières décennies, l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) a connu d'importants développements technologiques. Cela est illustré par le nombre sans cesse croissant de groupes de recherche ayant des activités d'imagerie MS, l'abondance croissante de publications dans le domaine (29, 30), le vif intérêt des fabricants d'instrumentation MS pour la conception ou l'adaptation de plates-formes MS à l'imagerie, et le nombre actuel d'événements, de réunions et conférences qui incluent ou sont dédiées à l'imagerie MS. Cette explosion extraordinaire est en grande partie due aux travaux fondateurs de Richard Caprioli et de ses collègues de l'Université Vanderbilt (Nashville TN, États-Unis) au début des années 2000, qui ont démontré qu'en utilisant la MALDI MS, des protéines intactes ont pu être détectées à partir de coupes histologiques de tissus.(11, 31) À partir de ce moment, l'imagerie (MALDI) MS est passée d'une simple curiosité à une technologie à part entière capable de répondre à diverses questions dans les domaines de la biologie du développement, la science pharmaceutique, la science végétale, la médecine légale et, peut-être le plus passionnant, à la compréhension de l'apparition et de la progression des maladies. Alors que l'imagerie MALDI MS était initialement axée sur l'imagerie de protéines intactes, aujourd'hui, des différents types de biomolécules (métabolites, lipides, glucides, peptides, protéines) peuvent être étudiées. Cela est dû à l'abondance de nouveaux protocoles et méthodes de préparation d'échantillons qui ont été développés et optimisés par de nombreux groupes à travers le monde.

1.2.1. Principe de l'imagerie MS

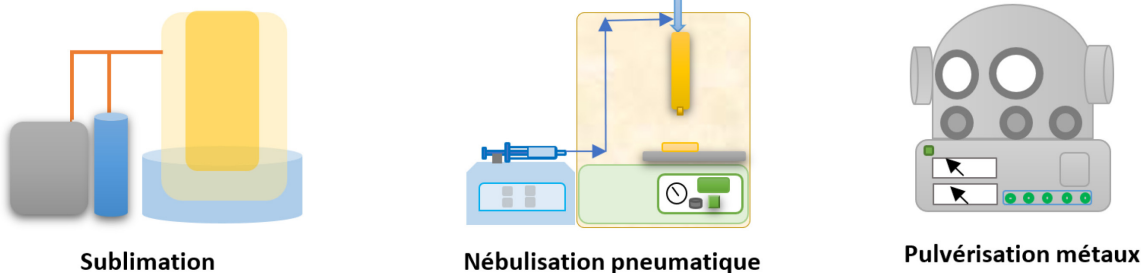
L'imagerie MS est une approche qui permet de mesurer la composition et l'abondance des molécules de manière régiospécifique. Si dans cette zone, des mesures ponctuelles par MS adjacentes sont systématiquement effectuées avec un pas de résolution préalablement défini, les données peuvent être assemblées pour présenter l'abondance d'un signal de poids moléculaire choisi dans un espace tridimensionnel. Dans un système cartésien, pour un signal m/z donné, les données sont représentées par un ensemble de coordonnées x/y et par i l'intensité du signal proportionnelle à l'abondance locale de la molécule correspondante. Cette intensité peut être visualisée sous forme de nuances de gris ou avec des schémas de couleurs différentes. Par conséquent, un ensemble de données d'imagerie MS complet présente des informations dans un

espace de dimension $2+n$, $(x/y/i_n)$ où n est le nombre de signaux m/z détectés au cours de l'acquisition des données MS. Une cartographie de l'intensité ionique peut être construit pour chaque valeur m/z (Figure 1.7).

A: La préparation de l'échantillon.



B: La déposition de la matrice selon l'analyte.



C: L'analyse d'échantillon par MALDI TOF et d'interprétation des résultats.

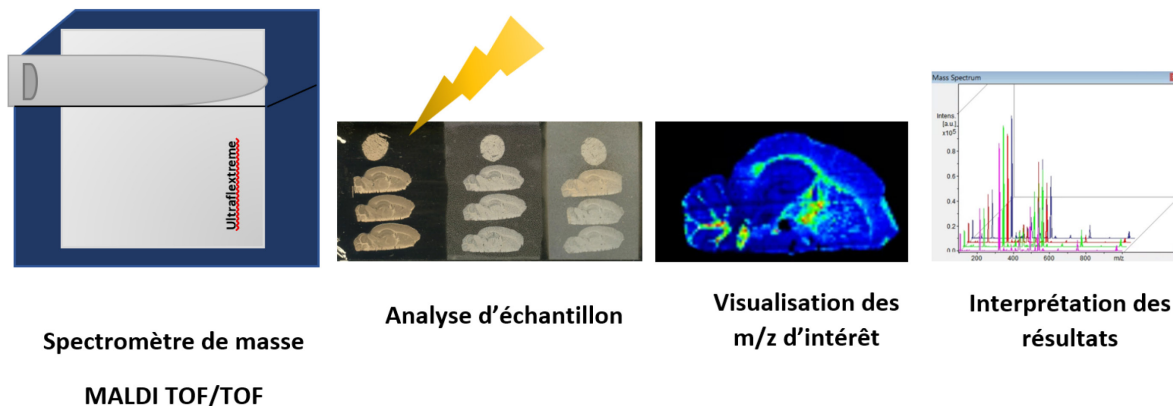


Figure 6 - Schéma représentant les différentes étapes de l'analyse de sections tissulaires minces par imagerie MALDI MS. A) les étapes de la préparation des sections. B) Trois différentes méthodes de la déposition de la matrice selon l'analyte. C) Acquisition, analyse et interprétation des résultats.

1.2.2. Analyse directe de tissus biologiques

La technique MALDI offre la possibilité d'effectuer des expériences à partir d'une variété de tissus prélevés à partir d'organismes vivants. Cette fonctionnalité présente de nombreux avantages, notamment de fournir des informations complètes sur la distribution spatiale de plusieurs molécules à la surface des tissus et de donner une image claire de leur distribution spatiale ainsi que leurs abondances relatives.(11) Ces informations précieuses sont par exemple utiles pour identifier différents types de tissus cancéreux, la détection précoce de divers types de cancer, la production et le développement de nouveaux médicaments et d'autres applications pour lesquelles on peut minimiser le temps requis pour la préparation, l'extraction ou encore la purification et la dérivatisation des échantillons.

Les étapes de préparation de l'échantillon pour l'imagerie par MALDI MS sont relativement courtes, mais la manipulation des tissus pour maintenir l'intégrité des sections minces et éviter leur dégradation peut être délicate. De plus, le dépôt de la couche mince de matrice de manière uniforme tout en minimisant la délocalisation des molécules, est l'un des points clés et critiques de cette méthode pour fournir des résultats précis de grande fiabilité.(29)

1.2.3. Dépôt de matrice selon les tissus biologiques

Comme déjà mentionnés ci-dessus, le choix de la matrice, des solvants ainsi que la méthode de déposition de la matrice sont faits en fonction de la classe de la molécule évaluée. Un point clé de la technique MALDI est la méthode de déposition de la matrice. Les méthodes usuelles pour la déposition des matrices organiques sont la sublimation (déposition sèche) et la nébulisation pneumatique (déposition par solvant). Chaque approche présente des avantages et des inconvénients (Figure 1.7) ; il faut les optimiser pour réduire les erreurs éventuelles et améliorer l'exactitude des données et la fiabilité des résultats.

Des pinceaux d'artiste pneumatiques portatifs ont initialement été adaptés pour une application de matrice sur tissu offrant un contrôle homogène du dépôt, y compris la mouillabilité de l'échantillon et l'épaisseur de la couche. Au milieu des années 2000, les premiers systèmes pneumatiques automatisés de dépôt de matrice ont été développés et commercialisés.(32, 33) Ceux-ci ont permis un contrôle précis des multiples paramètres (hauteur, débit, température, et

motif de déposition) permettant un dépôt de matrice homogène et reproductible. Au-delà du dépôt par nébulisation, des systèmes de dépôt de matrice par sublimation ont également été développés.(34, 35) Cette approche est intéressante, car le dépôt se fait sans solvant éliminant tout risque de délocalisation des analytes. Bien qu'initialement exclusivement réservé à l'imagerie MS des lipides, de récents développements de méthodes permettent désormais des études protéomiques.(36, 37)

1.2.4. Application de l'imagerie MS en recherche biologique

Grâce à ses nombreux avantages, la technique d'imagerie MALDI MS occupe aujourd'hui une place particulière dans les essais scientifiques de recherche et cliniques. Une précision d'imagerie avec une dimension cellulaire, une bonne sensibilité (quelques ng par mm²), une vitesse d'acquisition élevée (quelques heures), des résultats fiables et un faible coût par échantillon encouragent aujourd'hui les chercheurs de divers domaines scientifiques à l'utiliser. Aujourd'hui, l'imagerie MALDI MS est utilisée pour la cartographie d'une large gamme de biomolécules, y compris les métabolites, les lipides, les glucides, les peptides et les protéines à partir de sections histologiques tissulaires. Ceci a permis le développement d'applications allant de la biologie du développement, la science pharmaceutique, la science végétale, la médecine légale, et, peut-être le plus excitant, la compréhension de l'apparition et de la progression de maladies. L'imagerie MALDI MS est aujourd'hui reconnue comme un outil d'analyse majeur et essentiel dans notre quête permanente pour comprendre la vie.

1.2.5. La lipidomique

La lipidomique est l'étude à grande échelle des voies et des réseaux de lipides cellulaires dans les systèmes biologiques. Le mot « lipidome » est utilisé pour décrire le profil lipidique complet d'une cellule, d'un tissu, d'un organisme ou d'un écosystème et est un sous-ensemble du métabolome. La recherche en lipidomique implique l'identification et la quantification de milliers d'espèces moléculaires lipidiques cellulaires et de leurs interactions avec d'autres lipides, protéines et autres métabolites. Les chercheurs en lipidomique examinent les structures, les fonctions, les interactions et la dynamique des lipides cellulaires et les changements qui se produisent lors de la perturbation du système, lors de l'apparition de maladies. Outre leur importance dans la structure

des membranes cellulaires, les lipides jouent des rôles critiques dans le maintien de l'homéostasie métabolique et la signalisation cellulaire. Ils sont aussi fortement dérégulés dans les maladies inflammatoires, le cancer, les maladies cardiovasculaires et les maladies neurologiques. Le lipide qui est probablement le plus connu est le cholestérol.

1.2.6. Le cholestérol et son rôle biologique

Le cholestérol est l'un des éléments constitutifs essentiels de la vie animale. Bien que la majeure partie du cholestérol soit fabriquée par le corps dans le foie (une moindre quantité est absorbée par l'alimentation), il est le principal stérol biosynthétisé par toutes les cellules animales. C'est un des composants structurels essentiels des membranes cellulaires animales.⁽³⁸⁾ Le cholestérol compose environ 30% de toutes les membranes cellulaires animales. Il est nécessaire pour construire et entretenir les membranes et moduler la fluidité membranaire sur une large gamme de températures physiologiques animales. Au sein de la membrane cellulaire, le cholestérol remplit également diverses fonctions, notamment le transport intracellulaire, la signalisation cellulaire et la conduction nerveuse.⁽³⁹⁾ C'est également une molécule précurseur pour la biosynthèse des hormones stéroïdiennes telles que les acides biliaires et la vitamine D.

Le cholestérol est l'un des composants les plus importants du cerveau. C'est dans le cerveau que la concentration du cholestérol est la plus élevée. La concentration du cholestérol dans le système nerveux central est ~23 mg/g.^(40, 41) Le cholestérol est donc essentiel pour de nombreuses activités cérébrales normales. Le cholestérol est donc une composante importante des membranes cellulaires du cerveau et de la moelle épinière ; il joue un rôle important dans le maintien et l'intégration de la structure des cellules du cerveau. Une carence ou une augmentation du cholestérol dans le cerveau peut entraîner diverses maladies du système nerveux central telles que l'accumulation du cholestérol non estérifié dans la maladie de Niemann-Pick (42-45), le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (SLOS) (46-54) et la maladie d'Alzheimer (55-71). En raison du rôle vital de cette molécule, une surveillance et une mesure précise du métabolisme du cholestérol dans le cerveau peuvent prévenir l'apparition éventuelle de ces maladies. La maladie d'Alzheimer est l'une des maladies les plus importantes du système nerveux central qui est associée à plusieurs facteurs, notamment l'accumulation de cholestérol due à une altération de son métabolisme, du vieillissement, de plusieurs facteurs génétiques et du mode de vie.

1.2.7. L'analyse du cholestérol par MALDI IMS

L'imagerie des lipides par MALDI MS est d'une grande importance dans la recherche scientifique. La sélection de la matrice appropriée en fonction de la structure moléculaire et de la tendance des molécules à s'ioniser par ajout ou perte de proton est très importante et détermine la sensibilité et la sélectivité de la méthode d'analyse.(72) En effet, la capacité d'ionisation des lipides n'est pas la même et varie selon leur structure.(18) Certaines classes de lipides telles que les stéroïdes sont plus réfractaire à l'ionisation. C'est notamment le cas du cholestérol qui s'ionise très mal avec les matrices organiques usuelles. La détection et l'imagerie MS du cholestérol et des molécules apparentées par MALDI MS a déjà été rapportée. Cependant, la nature neutre de la structure du cholestérol rend sa protonation difficile par MALDI MS et l'ion le plus couramment observé pour le cholestérol est la molécule déshydratée et protonée à m/z 369 $[M-H_2O+H]^+$, qui est typiquement un signal de faible intensité.(73) Par conséquent, ces dernières années, des méthodes alternatives de désorption-ionisation du cholestérol à partir de sections tissulaires minces ont été développées notamment la méthode assistée par argent.

1.3. L'imagerie MS assistée par argent (AgLDI IMS)

Notre groupe a récemment développé une approche MS par désorption-ionisation laser assistée par argent (AgLDI) qui offre une spécificité et une sensibilité élevées pour l'imagerie du cholestérol à partir de coupes minces de tissus.(74) Cette approche est intéressante, car l'ionisation est induite via la capture d'un ion argent formant un ion moléculaire de la forme $[M+Ag_n]^+$. En effet, l'argent est un métal qui se lie aux doubles liaisons. En AgLDI MS, l'argent est de ce fait capable d'ioniser une large gamme de molécules insaturées et la présence d'une double liaison dans la structure du cholestérol permet sa détection de manière intacte sous la forme d'ions $[CHO+Ag]^+$.

Bien que la formation d'une couche mince d'argent soit possible par nébulisation pneumatique d'un sel de nitrate d'argent, (75) l'approche utilisée pour les travaux de recherche présentés dans ce mémoire est le dépôt métallique de nanoparticules d'argent sans solvant par pulvérisation cathodique en phase gazeuse tel qu'initialement décrit par Dufresne et al.(74)

Chacune de ces méthodes présentes des avantages et des inconvénients. La méthode de dépôt par nébulisation d'une solution saline de nitrate d'argent est peu coûteuse et relativement simple à mettre en œuvre par la plupart des laboratoires spécialisés en imagerie MS ayant un système automatisé de dépôt par nébulisation. L'optimisation des paramètres instrumentaux permettant un dépôt d'argent uniforme avec une épaisseur appropriée reste néanmoins nécessaire (débit, température, type de solvant, vitesse et espacement du balayage, temps de séchage, etc.). Un contrôle précis de ces paramètres permet de réduire la taille des cristaux ce qui permet d'augmenter la résolution spatiale atteignable. Bien que performante, l'approche de dépôt d'argent par nébulisation reste moins sensible que l'approche de dépôt par pulvérisation cathodique en phase gazeuse.

Le procédé de dépôt d'une couche mince de nanoparticules d'argent sur des sections tissulaires minces par pulvérisation cathodique en phase gazeuse nécessite d'avoir accès à l'instrumentation appropriée. Le dépôt d'argent est par la suite très rapide et relativement simple à mettre en œuvre. L'optimisation des paramètres instrumentaux, tels que la distance entre la tête métallique et la plaque cible, le courant d'argon, le temps de dépôt, etc., est néanmoins nécessaire. Une fois optimisée, cette approche de dépôt d'argent est très reproductible et offre une résolution spatiale en imagerie MS par AgLDI de l'ordre de 5 μm . Un autre avantage est la présence dans les spectres de masse d'ions agrégats d'argent (de Ag^+ à Ag_9^+) qui permettent d'effectuer un étalonnage interne et de ce fait d'atteindre des précisions en masse de l'ordre de 5 ppm avec un instrument MALDI-TOF.

Cependant, avec l'appareillage utilisée (Cressington 308R sputter coater, Ted Pella Inc. Redding, CA), l'épaisseur de la couche d'argent n'est pas constante sur la totalité de la surface des lames échantillons utilisées (25 x 75 mm^2) ce qui peut entraîner une erreur de mesure analytique. Par conséquent, l'utilisation d'un composé organique comme étalon interne est nécessaire.

1.3.1. Quantification du cholestérol par imagerie MS

En plus de la distribution spatiale des molécules, l'imagerie MS permet d'en déterminer l'abondance relative. Cela peut être mesurée en différent point d'une section ou à travers une cohorte d'échantillons tissulaires.(76) Pour une molécule étudiée, la quantification relative est toujours estimée sur la base de l'intensité maximum du signal considéré. La quantification absolue

de molécules endogènes ou de xénobiotiques peut aussi être déterminée par imagerie MS.(77, 78) Pour se faire, une courbe d'étalonnage est préalablement établie avec des concentrations croissantes d'une solution standard le plus souvent déposées sur tissu. Pour s'affranchir des problèmes de variabilité inhérent à la spectrométrie de masse MALDI et des phénomènes de suppression ionique, un étalon interne est utilisé pour normaliser les signaux.

Des mesures qualitatives et quantitatives du cholestérol par imagerie MALDI MS ont récemment été rapportées par Angelini *et al.*(79) Leur approche analytique implique la conversion enzymatique du cholestérol tissulaire en sa forme cétonique, suivie de la dérivatisation de cette cétone par l'hydrazine Girard-P. Cette étape de dérivatisation apporte une charge positive fixe (sous la forme d'une amine quaternaire) et permet de s'affranchir de l'étape d'ionisation. Après le dépôt de la matrice, les mesures d'imagerie MS ont été effectuées. Leurs résultats ont permis de déterminer des quantités absolues de cholestérol pour plusieurs régions cérébrales chez la souris variant entre 400 et 800 ng/mm². La méthode proposée est cependant problématique puisqu'elle implique au moins trois étapes de dépôt de réactifs ou de matrice par nébulisation. Le risque de délocalisation des analytes, ici le cholestérol, et donc très élevé.

1.4. Objectif de recherche

Le cholestérol est essentiel à toute vie animale, et son dérèglement est observé dans de nombreuses maladies. Pour certaines d'entre elles, la détermination précise de la localisation histologique du cholestérol et de son abondance absolue à l'échelle de la cellule dans des échantillons de tissus ouvrirait la voie à une compréhension plus fondamentale du rôle du cholestérol dans l'apparition et la progression de maladies. Le cerveau est l'organe du corps où la quantité de cholestérol est la plus élevée, soit 25% du cholestérol total.(41, 80) Dans cette étude, nous avons choisi de quantifier de manière absolue le cholestérol dans le cerveau en raison en raisons mentionnées ci-dessus.

Il y a à notre connaissance, aucune étude publiée de quantification absolue de lipide ou de métabolite endogène par IMS. La stratégie de quantification la plus souvent utilisée est de construire une courbe d'étalonnage avec des concentrations croissantes de solutions standards de la molécule ciblée. Pour tenir compte des effets de matrice, ces solutions sont déposées sur des

sections tissulaires de l'organe étudié. Pour éviter toute variation histologique intrinsèque, des sections sont découpées à partir de blocs d'homogénats réalisés à partir de tissus frais. Pour effectuer la quantification du cholestérol dans le cerveau de souris par IMS, plusieurs défis sont à surmonter :

- Le cholestérol est déjà extrêmement abondant dans le système nerveux central. Il serait néanmoins théoriquement possible d'effectuer une courbe d'étalonnage par ajouts dosés. Le risque encouru avec cette stratégie est une saturation rapide du signal. Une alternative au cholestérol pour la courbe d'étalonnage doit être trouvée.
- Le dépôt d'argent par pulvérisation cathodique en phase gazeuse est en général très homogène (sur quelques cm²) dans la région centrale de la cible utilisée ce qui est généralement suffisant pour l'analyse d'une section tissulaire. Comme la totalité de la surface utile des cibles est nécessaire à notre étude, il est indispensable de normaliser l'ensemble des signaux en utilisant un étalon interne proche en structure chimique au cholestérol est qui soit détectable par AgLDI MS.

Dans le deuxième chapitre de ce mémoire, présente la mise au point d'une méthode analytique simple et rapide de quantification absolue du cholestérol dans des échantillons de cerveau, basée sur la détection sensible et la cartographie du cholestérol par imagerie par AgLDI IMS dans de fines coupes tissulaires de cerveau de souris. Des courbes d'étalonnage reproductibles ont été générées suite au dépôt d'une gamme de concentrations de cholestérol-D₇ (au lieu de cholestérol natif) sur des sections de tissus d'homogénat de cerveau, combiné au dépôt homogène par nébulisation d'un étalon interne stéroïdien non-animal, le stigmastérol, afin de minimiser la variabilité expérimentale. Les résultats obtenus à partir de coupes sérielles de cerveau ont donné des valeurs quantitatives de cholestérol en très bon accord avec celles obtenues avec d'autres méthodes analytiques.

Chapitre 2 – Absolute Quantification of Cholesterol from Thin Tissue Sections by Silver-assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging.

Zari Saadati Nezhad¹, Juan Pablo Salazar¹, Rachel S. Pryce¹, Lisa M. Munter² and Pierre Chaurand¹

1) Dept of Chemistry, Université de Montréal, Montreal (Quebec), Canada

2) Dept of Pharmacology & Therapeutics, McGill University, Montreal (Quebec), Canada

Reference:

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022 Sep; 414(23):6947-6954.

doi: 10.1007/s00216-022-04262-6.

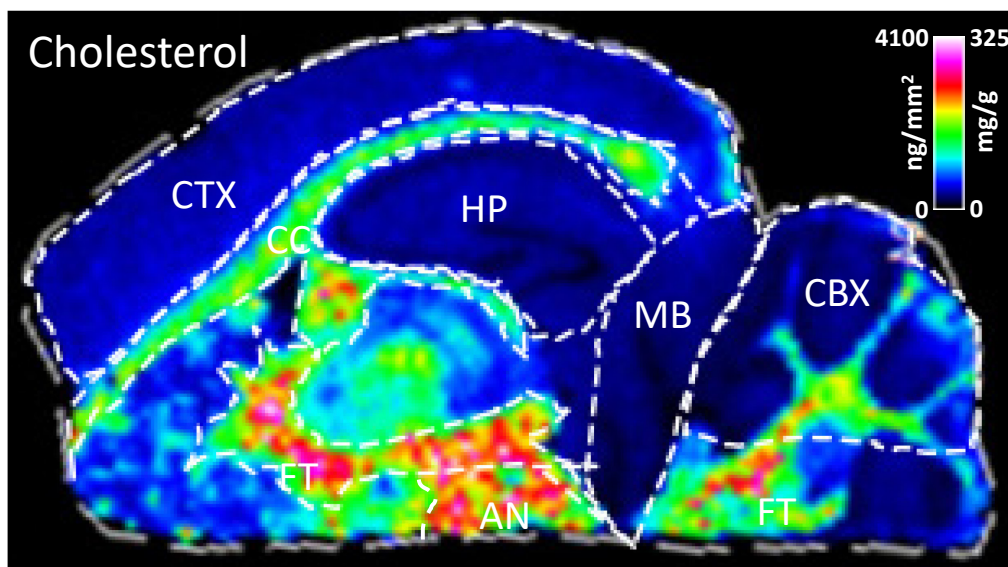
Epub 2022 Aug 11.

Keywords:

Cholesterol, Quantification, Mass spectrometry, Imaging, Tissue, Brain.

Contribution des co-auteurs :

Zari Saadati Nezhad - Établissement des courbes d'étalonnage du cholestérol à partir de sections tissulaires. Optimisation de la méthode de dépôt de l'étalon interne par nébulisation. Optimisation de la méthode de dépôt d'argent par pulvérisation. Interprétation et analyse des résultats. Écriture du manuscrit. Juan Pablo Salazar - Optimisation de la méthode de dépôt de l'étalon interne par nébulisation. Rachel Pryce - Analyse des résultats et établissement d'une pipeline d'analyse des données dans R. Lisa M. Munter - Conception de l'expérience et aide à l'écriture du manuscrit. Pierre Chaurand - Conception de l'expérience, supervision des travaux et analyse des résultats, et aide à l'écriture du manuscrit.



2.1. Abstract

Cholesterol is essential to all animal life, and its dysregulation is observed in many diseases. For some of these, the precise determination of cholesterol's histological location and absolute abundance at cellular length scales within tissue samples would open the door to a more fundamental understanding of the role of cholesterol in disease onset and progression. We have developed a fast and simple method for absolute quantification of cholesterol within brain samples based on the sensitive detection and mapping of cholesterol by silver-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging (AgLDI MSI) from thin tissue sections. Reproducible calibration curves were generated by depositing a range of cholesterol-D₇ concentrations on brain homogenate tissue sections combined with the homogeneous spray deposition of a non-animal steroid reference standard detectable by AgLDI MSI to minimize experimental variability. Results obtained from serial brain sections gave consistent cholesterol quantitative values in very good agreement to those obtained with other mass spectrometry-based methods.

2.2. Introduction

Cholesterol is one of the essential building blocks of animal life. Cholesterol is the principal sterol biosynthesized by all animal cells and is a major structural component of animal cell membranes.(38) It is also a precursor molecule for the biosynthesis of primary bile acids. Cholesterol composes about 30% of all animal cell membranes and modulates membrane fluidity

over a wide range of animal physiological temperatures.(38) Within the cell membrane, cholesterol also regulates diverse functions including intracellular transport, cell signaling and nerve conduction.(39) Abnormally high levels of cholesterol measured in the blood stream are linked to increased risk of type II diabetes, hypertension, heart attack, coronary heart disease, stroke and many others.(81) While the central nervous system comprises only 2% of our body weight, it harbors up to 25% of the body's cholesterol. Cholesterol levels in the brain are tightly regulated for optimal physiological brain function, but mounting evidence indicates that excessive cholesterol accumulates in Alzheimer's disease (AD), where it may drive AD-associated pathological changes.(58, 82) Cholesterol brain imbalance is also thought to be linked to chronic neurodegenerative disorders, including Huntington's disease, Parkinson's disease, Niemann-Pick type C disease and Smith-Lemli Opitz syndrome.(83, 84) Cholesterol has also been demonstrated to play an active role in the development of several cancers including breast, colon, rectal, prostatic, and testicular cancer.(85-87)

Whereas analytical methodologies for the measurement of cholesterol levels in blood and tissue extracts are well established (88), the need for novel tools and methods offering more precise quantitative cholesterol measurements in tissues are urgently needed. In this regard, mass spectrometry imaging (MSI) technology is now able to explore the molecular complexity of tissue sections with single-cell accuracy.(89, 90) Several MSI approaches and methods have been used to measure cholesterol distribution and relative abundance within thin tissue sections.(73) For instance, metal-assisted secondary ion mass spectrometry (SIMS) imaging technology has been used to map the distribution of cholesterol within the *Lymnaea stagnalis* nervous tissue (91), within rat kidney tissue sections (92), and within freeze-dried cells.(93) More recently, SIMS imaging revealed micrometer-sized cholesterol accumulations in hippocampal regions undergoing amyloid-beta deposition.(94)

The detection and mapping of cholesterol and related molecules by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) MSI has also been reported. For example, cholesterol has been detected by atmospheric pressure MALDI MSI in HeLa cells.(95) Another example of MALDI MSI of cholesterol includes the analysis of atherosclerosis aortic plaques.(96) However, the neutral nature of the cholesterol structure makes protonation difficult by MALDI MS and the most commonly observed ion for cholesterol is the m/z 369 dehydrated, protonated molecule

$[M-H_2O+H]^+$, which is typically a low intensity signal.(73) More recently, qualitative and quantitative cholesterol MSI measurements were performed after on-tissue enzymatic conversion of cholesterol to its ketone form, which was then charge-tagged with the Girard P hydrazine and analyzed by MALDI MSI.(79)

Cholesterol can also be detected and imaged in thin tissue sections in the ambient environment using desorption electrospray ionization (DESI) MSI.(97) Further, direct and rapid analysis of cholesterol can be accomplished by reactive DESI MSI. This is achieved by incorporating betaine aldehyde into the spray solvent, which reacts selectively and rapidly with the alcohol group of cholesterol.(98-100)

Nanoparticles are increasingly being used as alternatives to conventional MALDI matrices.(30, 101) For the analysis of cholesterol, silver nanoparticles are an interesting choice because ionization is induced via the capture of a silver ion forming $[M+Ag_n]^+$ molecular ions.(102, 103) This approach has been used to monitor changes in cholesterol levels after traumatic brain injury.(104) Our group has recently developed a silver-assisted laser desorption ionization (AgLDI) MS approach for the imaging of cholesterol from thin tissue sections with high specificity and sensitivity and demonstrated its potential in cancer research and forensic science.(74, 75, 105, 106)

We present here a novel approach to determine *in situ* absolute amounts of cholesterol in brain tissue by AgLDI MSI. The method relies on the generation of a calibration curve after the deposition of a of cholesterol-D₇ standard solutions (Electronic Supplementary Material Figure S1) on thin sections cut from a brain tissue homogenate block. MSI data is further normalized by the addition of a sterol standard evenly spray-deposited on the calibration and test tissue sections.

2.3. Methods

2.3.1. Chemicals and reagents

All solvents were purchased from Thermo Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Cholesterol and stigmasterol were purchased from Sigma-Aldrich Canada (Oakville, ON, Canada). Cholesterol-D₇ was purchased from CDN Isotopes Inc. (Montreal, QC, Canada). Silver sputter targets were purchased from ESPI Metals (Ashland, OR, USA).

2.3.2. Preparation of cholesterol-D₇ calibration curves

Mouse brain tissue homogenates were prepared as previously described.⁽¹⁰⁷⁾ All animal studies have been approved by the local Ethical Committee of the Université de Montréal. Mice were euthanized through CO₂ asphyxiation and their brains were harvested for analysis. Immediately after dissecting, the brains were wrapped loosely in aluminum foil without any lateral pressure and frozen on dry ice. This operation was performed with high speed to prevent molecular deterioration of tissues and to preserve sample morphology. To generate the mouse brain homogenate, 6 wild-type brains were cut at -20°C using a Leica CM3050 cryostat (Leica microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) to a thickness of 50 µm. Frozen sections were then transferred to a 2 mL Eppendorf tube. Several small metal balls were added to the Eppendorf for mechanical abrasion. The sample was alternately vortexed and cooled in an ice-water solution, using 30 s intervals. The ice water was used to maintain a low sample temperature, minimizing the risk of tissue degradation. This operation was repeated for approximately 30 min until a uniform color was obtained throughout the mixture. No additives were used. After completing this step, the metal balls were carefully separated from the homogenate and removed using a magnet. This generates about 2 mL of brain homogenate. To mold the homogenate, a 5.0 mm diameter plastic straw was inserted into the Eppendorf tube prior to quickly freezing with dry ice. After complete solidification, the straw was separated from the homogenate. The resulting homogenate rod was then encased in a 1,5% carboxymethylcellulose solution and stored at -80°C until used.

The brain homogenate samples were cut at a thickness of 12 µm using the cryostat. The chamber and the specimen temperatures for all subsequent sectioning steps were -20 and -25°C, respectively. Sections were then thaw-mounted on 25×75 mm indium-tin-oxide (ITO)-coated microscope slides (Delta-technologies, Loveland, CO). The brain evaluated for cholesterol quantification was obtained from a 12-week-old mouse. The brain was cut with a sagittal orientation at a thickness of 12 µm using the cryostat and two serial sections were thaw-mounted on the same ITO-coated microscope slide used to generate the calibration curves. Serial sections were also cut for histology. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was performed according to a standard protocol (Electronic Supplementary Material Table S1). To assess reproducibility, three identical slides were prepared (Electronic Supplementary Material Figure S2). Each slide allows

the generation of an independent cholesterol calibration curve and the MSI measurement of two serial sagittal brain sections. Once prepared, the slides were then stored at -80 °C in a sealed nitrogen filled bag to minimize molecular degradation.(108) The day of analysis, a slide was removed from the freezer and dried in a vacuum desiccator for one hour before performing the next sample preparation steps.

A stock solution of cholesterol-D₇ was prepared in ethanol at a concentration of 66.9 mM using heat (35-40 °C) and constant vortex agitation. To reach full solubility, ethanol was slowly added to the vial. At a concentration of 66.9 mM, the solution appeared clear suggesting full solubilization and was immediately used to generate diluted standard solutions. Aliquots taken from the stock solution were diluted with ethanol to reach their final concentrations. The diluted stock solutions were immediately used to generate the calibration curve. The calibration curve consisted of eight standard solutions with increasing concentrations of 0.5, 7.5, 15, 25, 35, 45, 55, 66.9 mM, respectively. A volume of 0.6 µL of each cholesterol-D₇ standard solution was manually spotted on individual homogenate sections. A second series of spots were deposited directly on the slide. This was done so that potential matrix effects of the tissue could be precisely accounted for.

2.3.3. Reference standard spray deposition

To provide accurate quantification, stigmasterol (Electronic Supplementary Material Figure S1) was used as sprayed-on reference standard. A thin layer of 0.5 mg/mL stigmasterol solution prepared in 100 % ethanol was uniformly deposited onto the slide using a first-generation HTX TM sprayer (HTX Technologies LLC, Chapel Hill, NC, USA). The amount of stigmasterol sprayed was optimized with respect to average signal strength of cholesterol in brain tissue. Stigmasterol was sprayed according to the following parameters: spray deposition was performed at a temperature of 40°C and an air pressure of 20 psi. Five passes with a 4 mm track spacing with a 2 mm offset on alternate passes with a flowrate of 0.1 mL/min and a nozzle velocity of 500 mm/min. There was a 6 s pause between each pass to ensure full dryness of stigmasterol.

2.3.4.Sputter coating

Silver metal deposition was performed on all slides using a Cressington 308R sputter coater (Ted Pella Inc., Redding, CA, USA) according to Dufresne *et al.*(74) Sputter coating parameters were 80 mA argon current and 0.02 mA argon partial pressure. A deposition time of 40 s resulted in a 19 nm thick homogeneous silver layer.(74) This silver layer thickness was determined to be optimal for maximum cholesterol signal intensity from brain tissue sections.

2.3.5.Mass spectrometry Imaging

All AgLDI MSI experiments were performed on a Bruker MALDI TOF/TOF ultrafleXtreme mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) equipped with a Smart Beam II Nd:YAG 355 nm laser operating at 2 kHz using the ‘small’ laser focus setting. Cholesterol MSI data was acquired in the reflectron geometry with an acceleration voltage of 25 kV. MSI data was automatically acquired in the 100-1000 Da mass range at a spatial resolution of 100 μm with 500 laser shots per pixel (utilizing 5 random walk positions of 100 shots within the dimension of the pixel). The energy of the laser and acquisition method parameters such as detector gain, source voltage and delayed extraction values were optimized for maximum cholesterol signal-to-noise (S/N) ratio and mass resolution in mouse brain tissue. The acquisition method within the flexControl acquisition software (version 3.4, Bruker Daltonics) was calibrated using silver-clusters (from Ag^+ to Ag_9^+).

2.3.6.Data analysis

Data analysis was performed using flexImaging v4.1 (Bruker Daltonics) and the R package Cardinal (v2.1).(109) MSI results were visualized in flexImaging both with and without normalization to stigmasterol. Baseline reduction was performed using Cardinal to minimize noise. All intensity data was normalized to the intensity of the stigmasterol sprayed-on standard.

The calibration curves were generated by plotting the sum intensity of cholesterol-D₇ for each spot against the amount (in μg) of cholesterol-D₇ deposited. On the investigated sagittal mouse brain sections, regions of interest (ROI) were selected with respect to histology. Sum intensities of cholesterol were then calculated for each ROI, and the standard curves allowed this

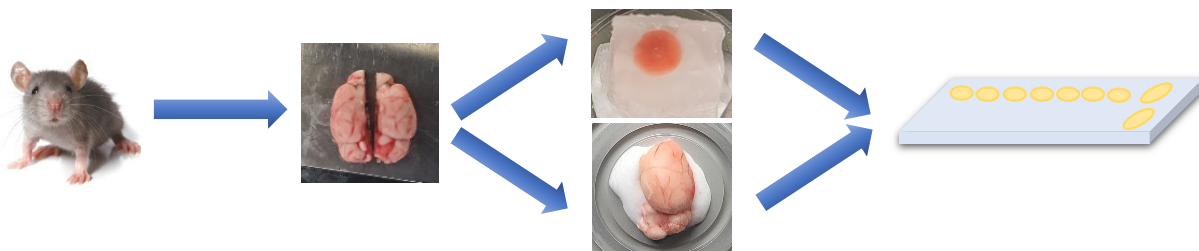
be converted in mole amounts. Using spatial resolution, the molar mass of cholesterol and the number of pixels, it was possible to translate these values into ng/mm^2 and therefore into mg/g of mouse brain tissue when considering the thickness of the sections. By using the average mouse brain density value of 1048 kg/m^3 , it was also possible to quantify cholesterol in mg per g of tissue (mg/g).⁽¹¹⁰⁾

2.4. Results and discussion

Cholesterol is found in very high abundance in brain tissue and has low levels of solubility in many common solvents, including ethanol which was used in this experiment. The use of other solvents more appropriate for cholesterol solubilization such as chloroform, heptanol, and hexanol, result in tissue alterations or molecular displacement, both of which impair MSI measurement spatial accuracy. Further, these solvents can be damaging to the automated spray system. Homogenates from tissues which contain significantly lower amounts of cholesterol such as kidney and liver were initially tested to create standard calibration curves. However, due to the baseline presence of cholesterol and difference in composition between these tissues and brain, good results were not obtained.

The experimental workflow used is presented in Figure 2.1. Whole fresh frozen mouse brains were used to generate a brain homogenate tissue block. Sections from frozen brain homogenate were used to represent a matrix similar in composition to brain tissue. With similar average compositions, it is expected that cholesterol detection from both media by AgLDI MSI would likely be close in behavior. Serial cryosections from this block were thaw-mounted on ITO slides on which were also added two serial sagittal sections from a brain hemisphere cut at approximately Bregma 2.35. To assess experimental reproducibility, three slides were prepared on the same day. To allow comparison of results across the three slides, all mouse brain sagittal sections were serial (Electronic Supplementary Material Figure S2). Each slide was then processed and analyzed individually.

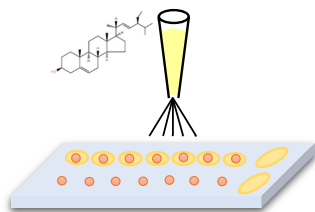
A) Mouse brain sampling, homogenate and sagittal sections



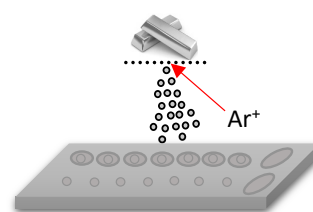
B) Manual deposition of cholesterol-D₇ standard solutions



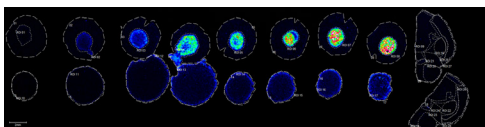
C) Internal standard spray deposition



D) Silver sputter deposition



E) AgLDI mass spectrometry imaging



F) Data analysis

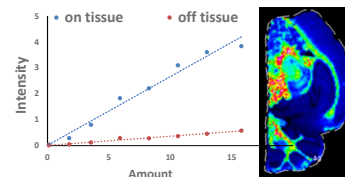


Figure 7 - Experimental scheme for cholesterol absolute quantification within mouse brain tissue. See text for details.

To generate a calibration curve without interference from abundant endogenous cholesterol, we chose to use increasing amounts of cholesterol-D₇. We verified that when mixed in equal amounts, cholesterol and cholesterol-D₇ respond with equal intensities when analyzed by AgLDI MS (not shown). Further, cholesterol-D₇ can be easily distinguished from cholesterol and stigmasterol (used here as a sprayed-on reference standard) and does not overlap with any signals originating from brain tissue when analyzed by AgLDI MS (Electronic Supplementary Material Figure S3). To generate calibration curves, solutions of increasing cholesterol-D₇ concentrations were then manually spotted onto the serial homogenate sections. Although doping brain tissue

homogenates with increasing amounts of cholesterol-D₇ may have been a more accurate approach to generate a calibration curve (107), we chose the spotting approach because we found it difficult to solubilize and properly mix higher concentrations of cholesterol within brain tissue homogenates. Further, we and others have demonstrated that after thaw-mounting of fresh frozen tissue sections onto slides, cholesterol tends to migrate to the surface of the sections, the totality of which should therefore be readily available for analysis.(111-114)

To minimize experimental variation, we chose here to use stigmaterol as a sprayed-on standard. Stigmaterol, found in plant tissues, is structurally similar to cholesterol (Electronic Supplementary Material Figure S1), is not expressed by mammalian tissues and responds very well when analyzed by AgLDI MS (Electronic Supplementary Material Figure S3). However, it should be noted that the stigmaterol molecule has two double bonds, in comparison with cholesterol who has only one. Silver, which binds to double bonds may therefore have an increased affinity for stigmaterol in comparison to cholesterol. High amounts of stigmaterol may decrease the intensity of the cholesterol signal if competing for silver ions and therefore amounts on tissue must be carefully controlled. Stigmaterol solvent, concentration and spray deposition parameters were optimized to generate an on-tissue stigmaterol signal of comparable intensity as the one generated by the 15 mM cholesterol-D₇ calibration point (corresponding to 3.75 µg deposited on tissue) (Electronic Supplementary Material Figure S2). On brain tissue sections, the intensity of the stigmaterol signal was comparable to the signal obtained for cholesterol in the regions of lower abundance (Electronic Supplementary Material Figure S4). We also verified that no signal from brain tissue sections interfered with the stigmaterol signal when analyzed by AgLDI MS, and that stigmaterol spray deposition conditions did not induce on-tissue cholesterol delocalization at the spatial resolution used.

The last step prior to MSI data acquisition is silver sputter deposition. In our experience, inhomogeneous silver deposition across the full length of the ITO slide is the largest source of experimental variability. With the sputter coating system used, homogeneous coating can be achieved for roughly the central 3/4 of the slide. The thickness of the silver layer tends to decrease on the left and right edges of the slide. To realize a complete experiment (calibration curve and sample sections), the full surface of the slide was however required (Electronic Supplementary Material Figure S2) hence the importance of adding an internal standard to minimize, if not

eliminate, experimental variability.

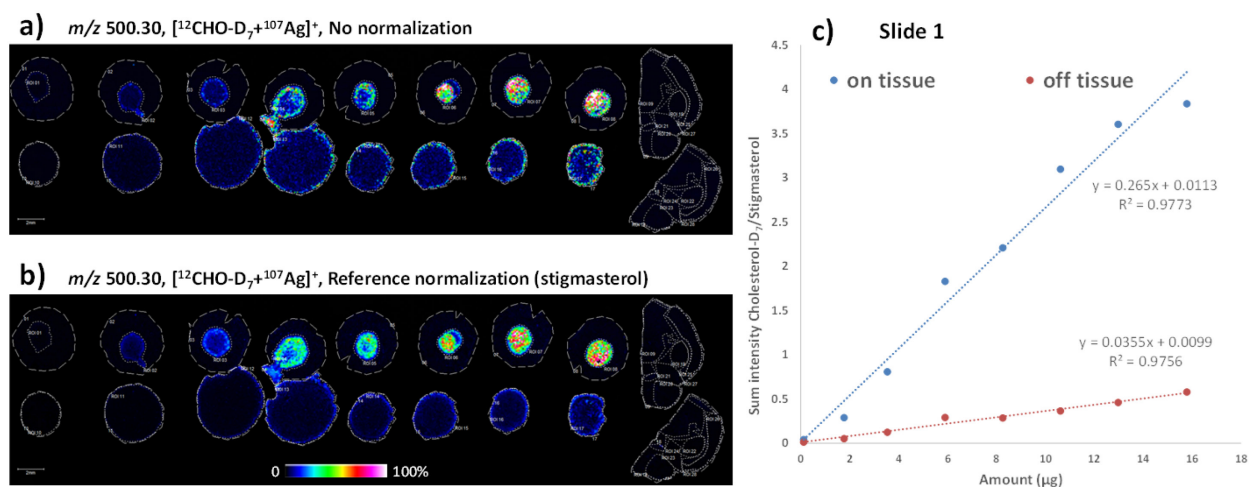


Figure 8 - Cholesterol calibration curves from Slide 1. To generate the cholesterol calibration curves, increasing amounts of cholesterol-D₇ were manually spotted either on serially cut mouse brain homogenate 12 μm sections, or directly on the the ITO-coated glass slide. On- and off-tissue AgLDI MSI ion images for increasing amounts of cholesterol-D₇ before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. c) On- and off-tissue section cholesterol-D₇ calibration curves.

Figure 2.2 presents on- and off-tissue cholesterol-D₇ calibration curves generated by AgLDI MSI from the first slide (Slide 1). The results from Slides 2 and 3 can be found in Electronic Supplementary Material Figures S5. For all curves, MSI data was acquired with a spatial resolution of 100 μm and an approximately linear increase in signal was observed with increasing amounts of cholesterol-D₇. In all cases, on-tissue R squared values better than 90% were observed. Surprisingly, we found that cholesterol-D₇ calibration curves generated on mouse brain homogenate sections displayed significantly better sensitivities than the ones generated after direct cholesterol-D₇ deposition on the ITO-coated slides. This positive matrix effect may be due to a stronger affinity of cholesterol for the slide with respect to the surface of tissue sections, potentially causing it to be more difficult to dislodge and analyze under AgLDI MS conditions. It is also possible that the tissue sections possess some absorbance under UV light excitation therefore favorably contributing to the desorption/ionization process.

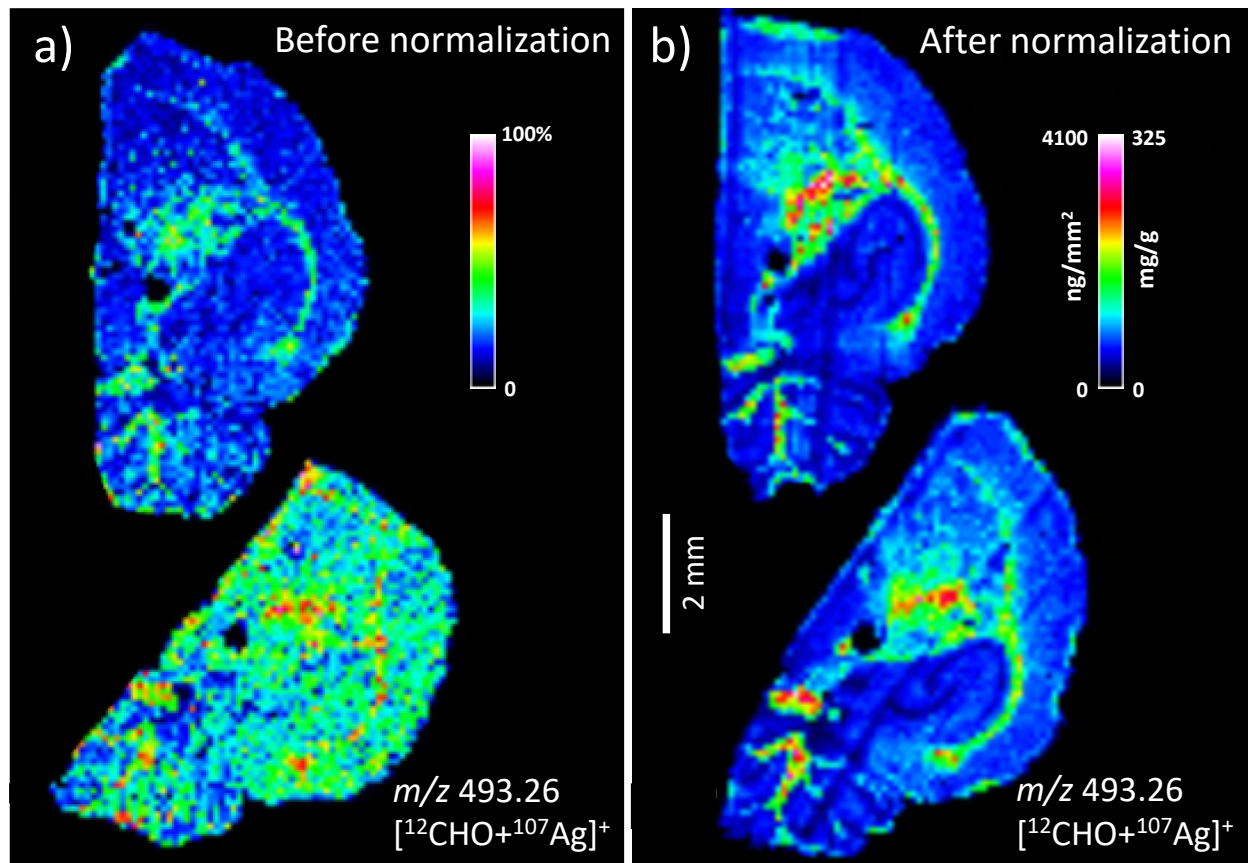


Figure 9 - AgLDI MSI cholesterol ion images from the two 12 μm thick sagittal mouse brain sections mounted on Slide 1 acquired with a spatial resolution of 100 μm before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. Cholesterol was detected with higher abundance in the brain white matter. The absolute cholesterol quantification scales are derived from the calibration curves (Figure 2.2).

Figure 2.3 presents AgLDI MSI results for cholesterol from the sagittal mouse brain sections thaw-mounted on the first slide before and after signal normalization with stigmasterol. The MSI results from the brain sections mounted on the 2nd and 3rd slides are presented in Electronic Supplementary Material Figure S6. All MSI data were acquired with a spatial resolution of 100 μm . Whereas the cholesterol distributions before normalization and without intensity thresholding were in some cases inconclusive with respect to histology, the distributions observed after normalization were of very high quality. Overall, a higher cholesterol abundance was observed in the brain regions classified as white matter with respect to the gray matter. Using the cholesterol-D₇ calibration curves, the normalized ion images could be plotted on an absolute cholesterol quantity scale. Cholesterol abundance peaked at 4100 ng/mm^2 , a concentration found only in certain substructures within the white matter regions of the brain. This abundance

corresponds to 325 mg of cholesterol per gram of wet brain tissue.

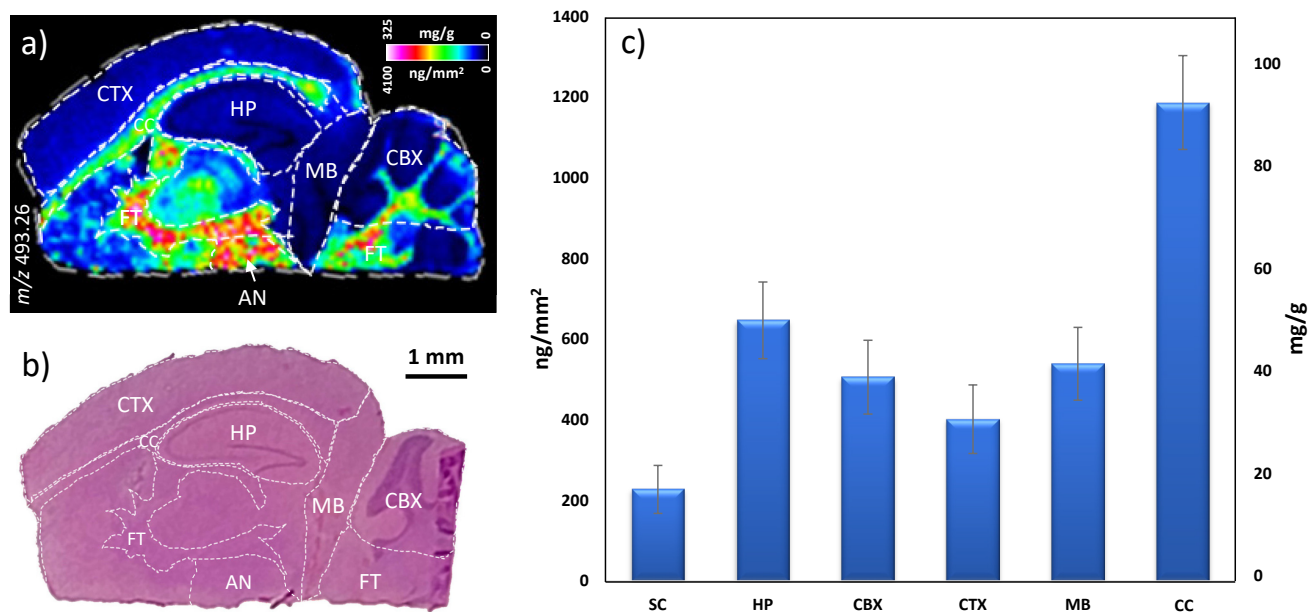


Figure 10 - Cholesterol absolute quantification within the mouse brain and specific brain substructures. a) Sagittal MALDI MSI ion image for cholesterol (m/z 493.26), and b) matching H&E staining from a serial section. c) Cholesterol amounts within the sections are provided in areal density (ng/mm^2) or weight per weight of wet brain tissue (mg/g). Average values were derived from the six sagittal sections mounted on Slides 1, 2 and 3. The error bars represent the standard deviation. Detailed values can be found in Electronic Supplementary Material Table S2. SC, sagittal cut; Hp, hippocampus; CBX, cerebellum; CTX, iso cortex; MB, mid brain; CC, corpus callosum; FT fiber tracts and AN, amygdalar nucleus.

By considering all six mouse sagittal section MSI datasets, it was possible to obtain precise cholesterol quantification within specific brain substructures. (Figure 2.4 and Electronic Supplementary Material Table S2). Brain substructures could be precisely located when correlating the cholesterol ion images to H&E-stained serial sections. Substructures were further identified using the Allen brain atlas online (<https://portal.brain-map.org/>). From the whole sagittal section (sagittal cut, SC), an average cholesterol amount of $227 \text{ ng}/\text{mm}^2$ corresponding to $18 \text{ mg}/\text{g}$ of wet brain tissue was obtained. Although only a snapshot of cholesterol brain amounts, this last value is very much in line with reported average cholesterol amounts of $15 \text{ mg}/\text{g}$ within mouse brain tissue.⁽⁴¹⁾ Cholesterol amounts from different brain substructures, including the hippocampus, cerebellum, isocortex and midbrain regions, ranged between 400 and $650 \text{ ng}/\text{mm}^2$

(32-51 mg/g of wet brain tissue). As expected, higher cholesterol amounts were found within the corpus callosum with an average value of 1190 ng/mm², corresponding to 94 mg/g of wet brain tissue. Again, these values are comparable to those previously reported.⁽⁷⁹⁾ Cholesterol abundance within certain substructures of mouse brain white matter such as the fiber tracks, Dentate gyrus and Amygdala (Figure 2.4) peaked at 4100 ng/mm², corresponding to 325 mg/g of wet brain tissue.

2.5. Conclusions

We propose here a simple method for absolute quantification of cholesterol within brain tissue samples based on cholesterol detection and mapping by AgLDI MSI. The use of cholesterol-D₇ as a calibration standard combined with the deposition of a (AgLDI MS detectable non-animal) steroidal sprayed-on reference standard allowed the generation of cholesterol calibration curves and high-quality cholesterol ion images leading to consistent cholesterol quantitative values from serial brain sections. We acknowledge that the calibration curve linearities were below what is expected for a validated MSI quantification method. This may be in part due to inaccuracies in pipetting small volumes of a saturated cholesterol-D₇ solution at elevated temperatures. However, the recovered values for cholesterol abundance within mouse brain tissue were found to be very consistent with those from the literature. The only step within the sample preparation protocol susceptible of inducing analyte delocalization is the spray deposition of the (stigmaterol) reference standard. However, at the spatial resolutions used here for AgLDI MSI (100 μm), no obvious cholesterol delocalization was observed. Since AgLDI MSI has been demonstrated feasible at spatial resolutions as low as 5 μm, this opens the possibility to measure accurate absolute cholesterol abundance in very small brain substructures.⁽⁷⁴⁾

We chose to develop our cholesterol absolute quantification method from brain tissue both because it is by far the organ with the highest cholesterol amounts within the body and because of the importance of numerous neurodegenerative diseases where cholesterol dysregulation is observed. In this respect, the generation of a brain homogenate tissue block to mimic brain tissue proved key to determine correct cholesterol quantification. The same analytical strategy could however be used to determine absolute cholesterol amounts in other organs or tissues if a homogenate tissue block from the target organ can first be generated.

2.6. Declarations

The authors declare no conflicts of interest. All animals used were obtained from the Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (Université de Montréal) animal housing service. Animals were ethically sacrificed following internationally recognized guidelines after ethics approval from the Université de Montréal. PC acknowledges funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC - RGPIN-2021-03125). PC and LMM acknowledge funding from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR - PJT-162302). The authors would like to thank Pr. Jean-Francois Masson (Dept of Chemistry, Université de Montréal) for unlimited access to the metal sputtering system used in this study.

2.7. Supplementary information

Table S1 - Protocol for hematoxylin and eosin (H&E) staining.

Step	Solution	Time
1	95% ethanol	30 seconds
2	70% ethanol	30 seconds
3	De-ionized water	30 seconds
4	Gill 3 Hematoxylin	15 seconds
5	De-ionized water	10 seconds
6	0.007% Sodium Bicarbonate in H ₂ O	5 dips
7	70% ethanol	30 seconds
8	95% ethanol	30 seconds
9	Eosin	5 dips
10	95% ethanol	30 seconds
11	100% ethanol	30 seconds
12	Air Dry	30 minutes
13	Mount slide with Cytoseal	NA

Table S2 - Average cholesterol quantities extracted from Slides 1, 2 &3 after AgLDI MSI either expressed in mg/g of wet brain tissue or in ng/mm² of brain tissue for different brain subregions. SC, whole sagittal section; HP, hippocampus; CBX, cerebellum.

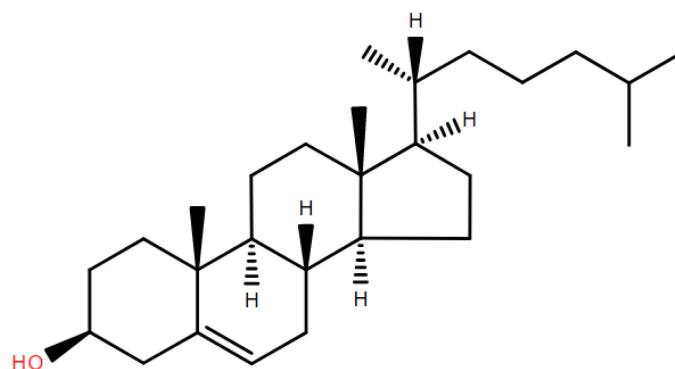
mg/g

Position	Slide	S C	HP	CBX	CTX	MB	CC
Top	1	13.26	53.46	43.66	26.85	31.41	104.20
	2	15.56	49.36	35.10	24.41	46.44	87.86
	3	18.13	44.33	32.49	30.18	37.97	92.46
Bottom	1	20.15	62.56	50.87	38.68	44.06	89.22
	2	15.09	56.38	39.12	30.09	45.34	85.16
	3	26.42	42.56	error	41.56	51.97	107.52
mean		18.10	51.44	40.25	31.96	42.86	94.40
sd		4.74	7.56	7.29	6.74	7.19	9.24
se		1.94	3.09	3.26	2.75	2.93	3.77

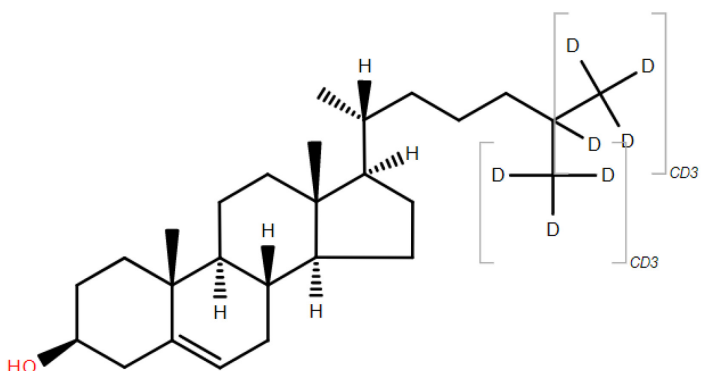
ng/mm²

Position	Slide	SC	HP	CBX	CTX	MB	CC
Top	1	166.70	672.29	549.01	337.63	395.03	1310.46
	2	195.71	620.73	441.47	306.96	584.03	1104.94
	3	227.96	557.45	408.63	379.50	477.47	1162.75
Bottom	1	253.37	786.78	639.73	486.46	554.05	1122.00
	2	189.82	708.97	491.98	378.39	570.24	1071.00
	3	332.23	535.22	error	522.68	653.57	1352.22
mean		227.63	646.91	506.16	401.94	539.07	1187.23
sd		59.61	95.10	91.62	84.78	90.41	116.23
se		24.33	38.82	40.97	34.61	36.91	47.45

Cholesterol
$C_{27}H_{46}O$
$MW_{\text{mono}} = 386.35$
$[CHO+Ag]^+_{\text{mono}} = 493.26$



Cholesterol- D_7
$C_{27}H_{39}OD_7$
$MW_{\text{mono}} = 393.40$
$[CHO-D_7+Ag]^+_{\text{mono}} = 500.30$



Stigmasterol
$C_{29}H_{48}O$
$MW_{\text{mono}} = 412.37$
$[Stig+Ag]^+_{\text{mono}} = 519.28$

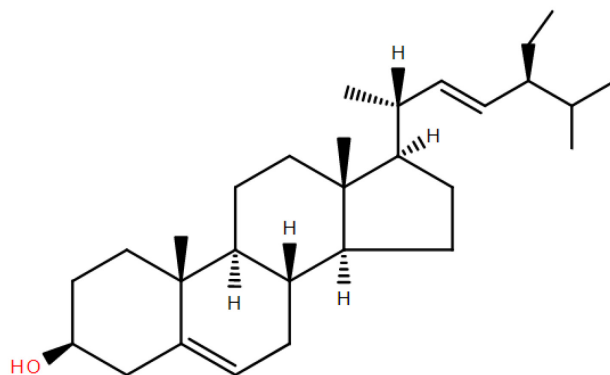
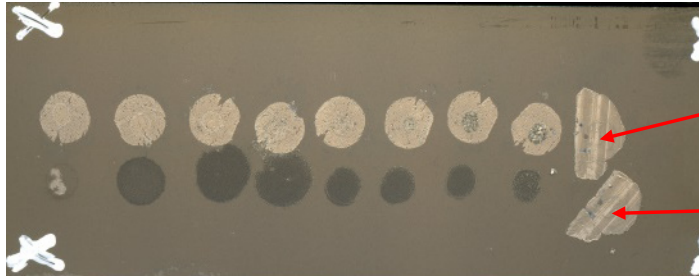


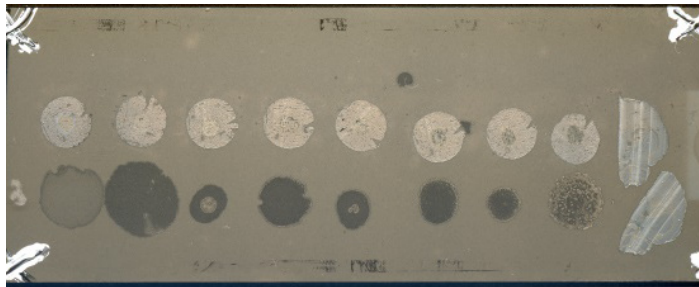
Figure S1 - Chemical formula, molecular weight, and structure for cholesterol, cholesterol- D_7 and stigmasterol.



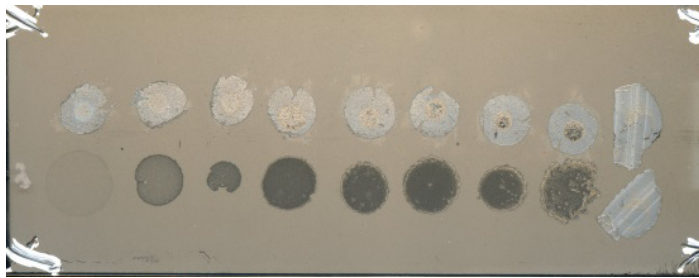
Slide 1 – (2021.12.10)

Sagittal section 1 (top)

Sagittal section 2 (bottom)



Slide 2 – (2021.12.14)



Slide 3 – (2021.12.15)

Figure S2 - Photomicrographs of Slides 1, 2 & 3 after silver sputter deposition.

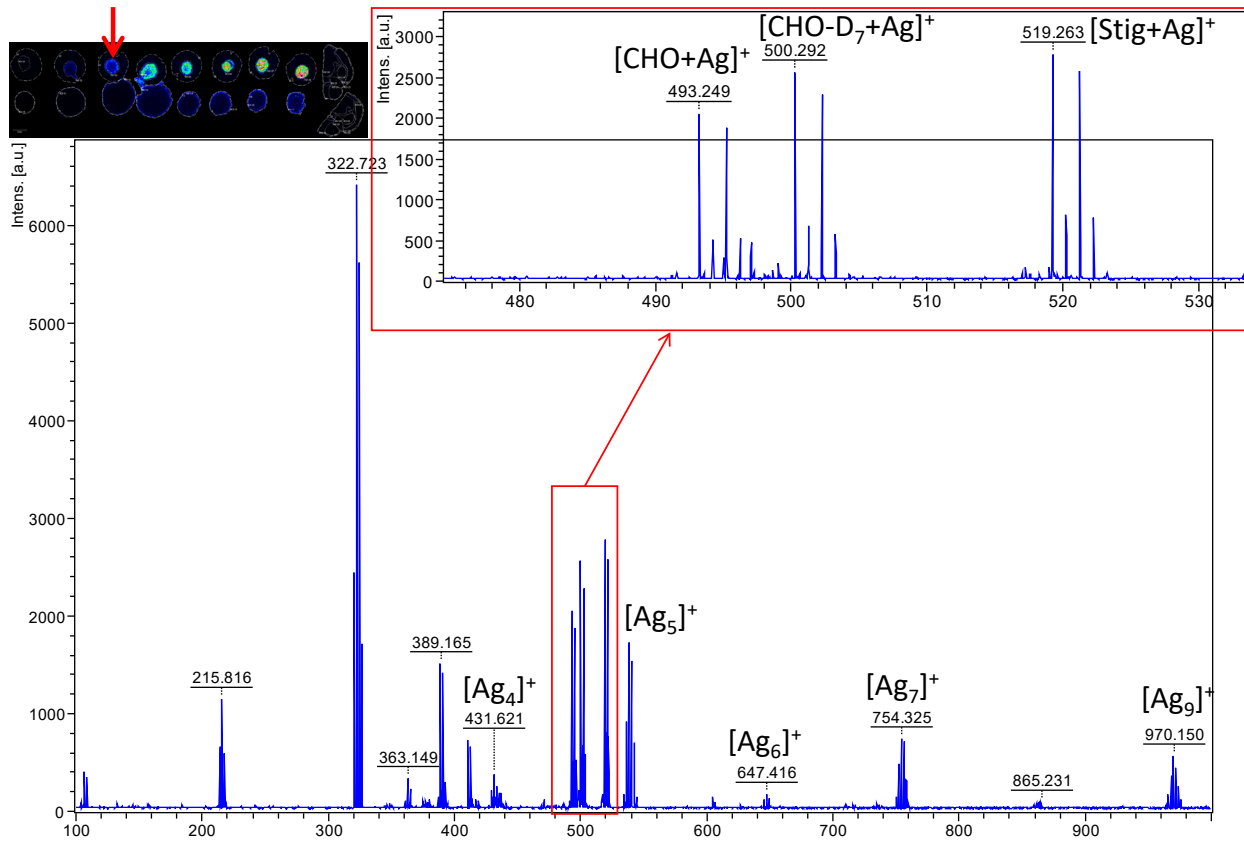


Figure S3 - AgLDI MS spectrum acquired from the 3rd on tissue cholesterol-D7 calibration point. The MS signals for cholesterol, cholesterol-D7 and stigmasterol are clearly distinct.

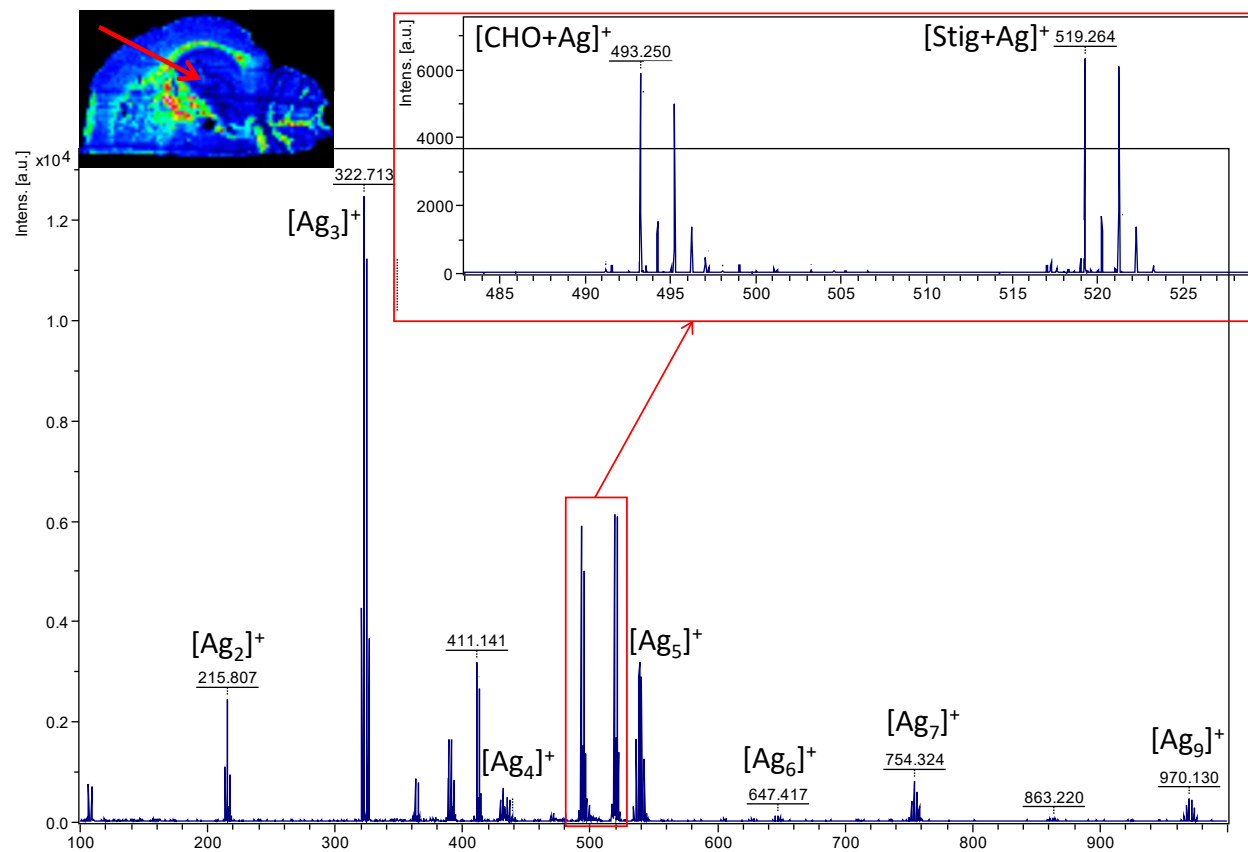
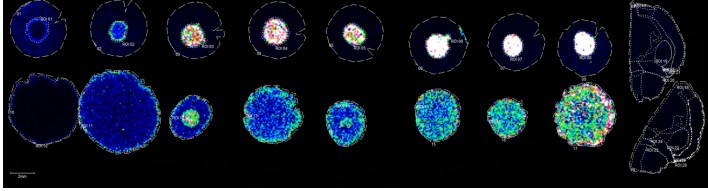


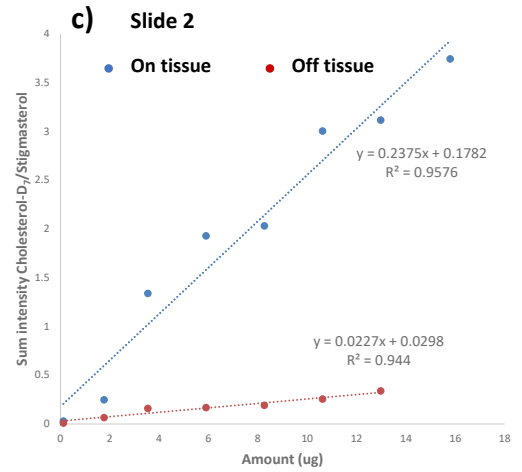
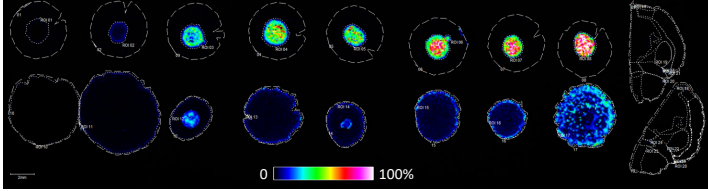
Figure S4 - AgLDI MS spectrum acquired from the hippocampus region of a mouse brain sagittal section. The MS signals for cholesterol and stigmasterol are clearly distinct.

Slide 2

a) m/z 500.30, [$^{12}\text{CHO-D}_7+^{107}\text{Ag}$] $^+$, No normalization

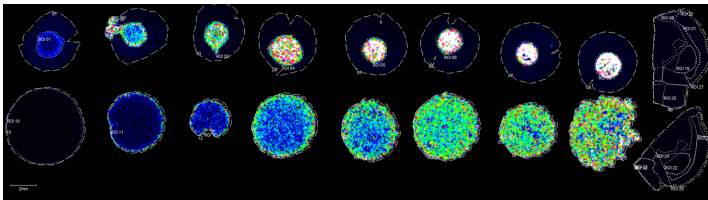


b) m/z 500.30, [$^{12}\text{CHO-D}_7+^{107}\text{Ag}$] $^+$, Reference normalization (stigmasterol)



Slide 3

a) m/z 500.30, [$^{12}\text{CHO-D}_7+^{107}\text{Ag}$] $^+$, No normalization



b) m/z 500.30, [$^{12}\text{CHO-D}_7+^{107}\text{Ag}$] $^+$, Reference normalization (stigmasterol)

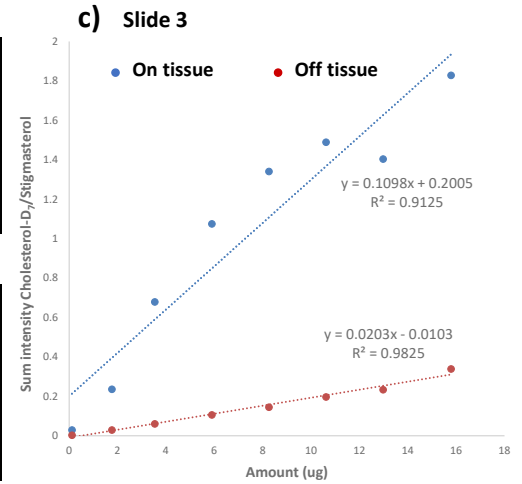
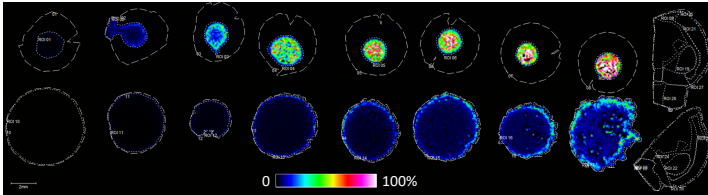


Figure S5 - Cholesterol calibration curves from Slide 2 (top) and Slide 3 (bottom). To generate the cholesterol calibration curves, increasing amounts of cholesterol-D₇ were manually spotted either on 12 μm thick mouse brain homogenate sections, or directly on the ITO-coated glass slide. On- and off-tissue AgLDI MSI ion images for increasing amounts of cholesterol-D₇ before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. c) On- and off-tissue section cholesterol-D₇ calibration curves.

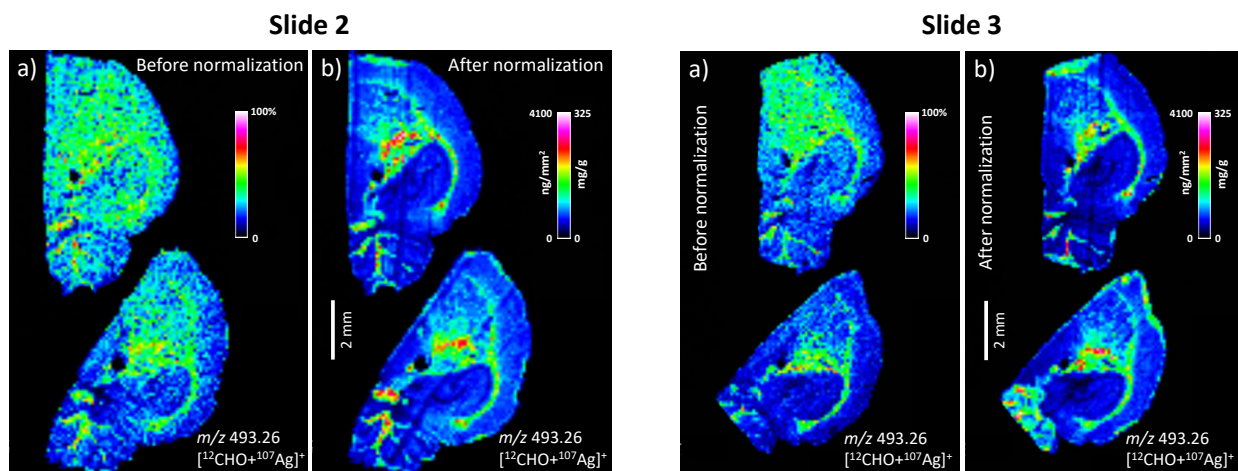


Figure S6 - AgLDI MSI cholesterol ion images from the two 12 μm thick sagittal mouse brain sections mounted on Slides 2 and 3 acquired with a spatial resolution of 100 μm before a) and after b) signal normalization with stigmasterol. Cholesterol was detected with higher abundance in the brain white matter. The absolute cholesterol quantification scales are derived from the calibration curves (Figure S5).

Chapitre 3 – Conclusions et perspectives

3.1. Conclusions

La mesure de la teneur en cholestérol dans le corps est d'une importance particulière en raison de sa participation à de nombreux processus biologiques, notamment dans le cerveau, et de sa dérégulation observée dans de nombreuses maladies. Dans cette étude, nous avons développé une nouvelle approche pour mesurer la quantité absolue de cholestérol présent dans les sections tissulaires par AgLDI IMS. La technique de dépôt métallique d'une matrice d'argent a été utilisée en raison de sa haute spécificité et sensibilité pour le cholestérol du à l'affinité de l'argent pour les doubles liaisons. L'utilisation cholestérol-D₇, différenciable en masse mais de réponse MS identique au cholestérol, a permis la construction de courbes d'étalonnages reproductibles. L'utilisation de stigmastérol comme étalon interne grâce à une structure proche du cholestérol mais d'origine exclusivement végétale, a permis en grande partie de corriger les variations expérimentales afin d'améliorer la précision et la sensibilité des mesures quantitatives. Dans le cerveau de souris, des concentrations en cholestérol jusqu'à 4100 ng/mm² (correspondant à 325 mg de cholestérol par g de tissu frais) ont été observées dans la matière blanche. De plus, en tenant compte de l'ensemble des signaux du cholestérol détectable dans des sections sagittales, une concentration moyenne de l'ordre de 215 ng/mm² (correspondant à 18 mg de cholestérol par g de tissu frais) en cholestérol dans le cerveau de souris a pu être déterminée. L'ensemble de ces valeurs sont comparables à celle relevées dans la littérature.

3.2. Perspectives de recherche

Dans notre méthode de quantification absolue du cholestérol par AgLDI IMS, la seule étape du protocole de préparation des échantillons susceptible d'induire une délocalisation spatiale de l'analyte est le dépôt par nébulisation de la solution d'étalon interne (solution de stigmastérol préparée dans l'éthanol). Cependant, à la résolution spatiale utilisée (100 µm), aucune délocalisation évidente du cholestérol n'a été observée. Puisqu'il a été démontré que l'imagerie par AgLDI MS est réalisable à des résolutions spatiales aussi basses que 5 µm, cela ouvre la possibilité de mesurer avec précision l'abondance absolue du cholestérol dans de très petites sous-structures du cerveau. Cela dit, ce point reste à être formellement démontré.

En effectuant divers tests de dépôt du stigmastérol avec différents solvants, nous avons constaté que certains solvants induisent une augmentation non négligeable de la détection du cholestérol par AgLDI MS à partir de sections tissulaires minces. Un criblage systématique de différents types de solvants (organiques, inorganiques, halogénés et aromatiques) devrait permettre de déterminer lesquels permettent d'augmenter la détectabilité du cholestérol par AgLDI MS et d'en comprendre les mécanismes impliqués.

Nous avons démontré le potentiel de notre méthode pour la quantification du cholestérol dans le tissu cérébral. L'une des clés de cette méthode est d'utiliser un homogénat de cerveau qui permet d'imiter la matrice tissulaire de départ. Notre approche n'est cependant pas exclusive au tissu cérébral et devrait pouvoir être adaptée à la quantification du cholestérol dans d'autres tissus ou organes, sous réserve que des homogénats puissent être générés à partir des tissus considérés.

Références bibliographiques

1. Gross JH. Mass spectrometry : a textbook: Springer Nature; 2017.
2. Fenner NC, Daly NR. Laser Used for Mass Analysis. *Revi Sci Instrum.* 1966;37(8):1068-70.
3. Vastola FJ, Mumma RO, Pirone AJ. Analysis of organic salts by laser ionization. *Org Mass Spectrom.* 1970;3(1):101-4.
4. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T, et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 1988;2(8):151-3.
5. Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Biopolymers. *Anal Chem* 1991;63(24):1193A-203A.
6. Webster J, Oxley D. Protein identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2012;800:227-40.
7. Petre G, Durand H, Pelletier L, Poulencard M, Nugue G, Ray PF, et al. Rapid Proteomic Profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry for Better Brain Tumor Classification. *Proteomics Clin Appl.* 2020;14(5):e1900116.
8. Peng B, Qiu X, Dong Z, Zhang J, Pei Y, Wang T. Proteomic profiling of biomarkers by MALDI-TOF mass spectrometry for the diagnosis of tracheobronchial stenosis after tracheobronchial tuberculosis. *Exp Ther Med.* 2021;21(1):63.
9. Thomson JJ. Bakerian Lecture :—Rays of positive electricity. *Proceedings of the Royal Society of London Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character.* 1913;89(607):1-20.
10. Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Anal Chem* 1985;57(14):2935-9.
11. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: A new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med.* 2001;7(4):493-6.
12. Ogrinc Potočnik N, Porta T, Becker M, Heeren RMA, Ellis SR. Use of advantageous, volatile matrices enabled by next-generation high-speed matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight imaging employing a scanning laser beam. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2015;29(23):2195-203.

13. Spraggins JM, Caprioli RM. High-speed MALDI-TOF imaging mass spectrometry: rapid ion image acquisition and considerations for next generation instrumentation. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011;22(6):1022-31.
14. Manier ML, Reyzer ML, Goh A, Dartois V, Via LE, Barry CE, et al. Reagent Precoated Targets for Rapid In-Tissue Derivatization of the Anti-Tuberculosis Drug Isoniazid Followed by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2011;22(8):1409-19.
15. Drexler DM, Garrett TJ, Cantone JL, Diters RW, Mitroka JG, Prieto Conaway MC, et al. Utility of imaging mass spectrometry (IMS) by matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) on an ion trap mass spectrometer in the analysis of drugs and metabolites in biological tissues. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007;55(3):279-88.
16. Shimma S, Sugiura Y, Hayasaka T, Zaima N, Matsumoto M, Setou M. Mass imaging and identification of biomolecules with MALDI-QIT-TOF-based system. *Anal Chem.* 2008;80(3):878-85.
17. Cornett DS, Frappier SL, Caprioli RM. MALDI-FTICR Imaging Mass Spectrometry of Drugs and Metabolites in Tissue. *Anal Chem.* 2008;80(14):5648-53.
18. Khalil SM, Römpf A, Pretzel J, Becker K, Spengler B. Phospholipid Topography of Whole-Body Sections of the *Anopheles stephensi* Mosquito, Characterized by High-Resolution Atmospheric-Pressure Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem* 2015;87(22):11309-16.
19. Djidja M-C, Claude E, Snel MF, Scriven P, Francese S, Carolan V, et al. MALDI-Ion Mobility Separation-Mass Spectrometry Imaging of Glucose-Regulated Protein 78 kDa (Grp78) in Human Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Pancreatic Adenocarcinoma Tissue Sections. *J Proteome Res.* 2009;8(10):4876-84.
20. Djambazova KV, Klein DR, Migas LG, Neumann EK, Rivera ES, Van De Plas R, et al. Resolving the Complexity of Spatial Lipidomics Using MALDI TIMS Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem* 2020;92(19):13290-7.
21. Rivera ES, Djambazova KV, Neumann EK, Caprioli RM, Spraggins JM. Integrating ion mobility and imaging mass spectrometry for comprehensive analysis of biological tissues: A brief review and perspective. *J Mass Spectrom.* 2020;55(12):e4614.
22. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin*

Microbiol Rev. 2013;26(3):547-603.

23. Brown RS, Lennon JJ. Mass Resolution Improvement by Incorporation of Pulsed Ion Extraction in a Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Linear Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Anal Chem*. 1995;67(13):1998-2003.
24. Kaufmann R, Chaurand P, Kirsch D, Spengler B. Post-source Decay and Delayed Extraction in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Reflectron Time-of-Flight Mass Spectrometry. Are There Trade-offs? *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10(10):1199-208.
25. Nier AO. Some reminiscences of mass spectrometry and the Manhattan Project. *J Chem Educ*. 1989;66(5):385.
26. Hummon AB, Amare A, Sweedler JV. Discovering new invertebrate neuropeptides using mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2006;25(1):77-98.
27. Flatley B, Malone P, Cramer R. MALDI mass spectrometry in prostate cancer biomarker discovery. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2014;1844(5):940-9.
28. Hu L, Zhou H, Li Y, Sun S, Guo L, Ye M, et al. Profiling of Endogenous Serum Phosphorylated Peptides by Titanium (IV) Immobilized Mesoporous Silica Particles Enrichment and MALDI-TOFMS Detection. *Anal Chem* 2009;81(1):94-104.
29. Chaurand P. Imaging mass spectrometry of thin tissue sections: A decade of collective efforts. *J Proteomics*. 2012;75(16):4883-92.
30. Müller WH, Verdin A, De Pauw E, Malherbe C, Eppe G. Surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging: A review. *Mass Spectrom Rev*. 2022;41(3):373-420.
31. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997;69(23):4751-60.
32. Mounfield WP, Garrett TJ. Automated MALDI Matrix Coating System for Multiple Tissue Samples for Imaging Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. 2012;23(3):563-9.
33. Lagarrigue M, Becker M, Lavigne R, Deininger SO, Walch A, Aubry F, et al. Revisiting rat spermatogenesis with MALDI imaging at 20-microm resolution. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(3):M110.005991.
34. Hankin JA, Barkley RM, Murphy RC. Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging. *J Am Soc Mass Spectrom* 2007;18(9):1646-52.
35. Thomas A, Charbonneau JL, Fournaise E, Chaurand P. Sublimation of new matrix candidates for

- high spatial resolution imaging mass spectrometry of lipids: enhanced information in both positive and negative polarities after 1,5-diaminonaphthalene deposition. *Anal Chem.* 2012;84(4):2048-54.
36. Lin LE, Su PR, Wu HY, Hsu CC. A Simple Sonication Improves Protein Signal in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Imaging. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018;29(4):796-9.
 37. Yang J, Caprioli RM. Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution. *Anal Chem.* 2011;83(14):5728-34.
 38. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res.* 1985;26(9):1015-35.
 39. Luu W, Sharpe LJ, Gelissen IC, Brown AJ. The role of signalling in cellular cholesterol homeostasis. *IUBMB Life.* 2013;65(8):675-84.
 40. Jin U, Park SJ, Park SM. Cholesterol Metabolism in the Brain and Its Association with Parkinson's Disease. *Exp Neurobiol.* 2019;28(5):554-67.
 41. Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004;45(8):1375-97.
 42. Madra M, Sturley SL. Niemann-Pick type C pathogenesis and treatment: from statins to sugars. *Clin Lipidol.* 2010;5(3):387-95.
 43. Ashikawa H, Mogi H, Honda T, Nakamura H, Murayama T. Beneficial effects of primidone in Niemann-Pick disease type C (NPC)-model cells and mice: Reduction of unesterified cholesterol levels in cells and extension of lifespan in mice. *Eur J Pharmacol.* 2021;896:173907.
 44. Torres S, Solsona-Vilarrasa E, Nunez S, Matias N, Insausti-Urkiá N, Castro F, et al. Acid ceramidase improves mitochondrial function and oxidative stress in Niemann-Pick type C disease by repressing STARD1 expression and mitochondrial cholesterol accumulation. *Redox Biol.* 2021;45:102052.
 45. Yamada Y, Ishitsuka Y, Kondo Y, Nakahara S, Nishiyama A, Takeo T, et al. Differential mode of cholesterol inclusion with 2-hydroxypropyl-cyclodextrins increases safety margin in treatment of Niemann-Pick disease type C. *Br J Pharmacol.* 2021;178(13):2727-46.
 46. Abdel-Khalik J, Hearn T, Dickson AL, Crick PJ, Yutuc E, Austin-Muttitt K, et al. Bile acid biosynthesis in Smith-Lemli-Opitz syndrome bypassing cholesterol: Potential importance of pathway intermediates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021;206:105794.
 47. Eren EE, Bilgin N, Urganci N, Kose G. A Case of Smith-Lemli-Opitz Syndrome Diagnosed with

Hypertrophic Pyloric Stenosis. *Sisli Etfal Hastan Tip Bul.* 2021;55(2):268-71.

48. Klouda J, Benesova L, Kocovsky P, Schwarzova-Peckova K. Voltammetry of 7-dehydrocholesterol as a new and useful tool for Smith-Lemli-Opitz syndrome diagnosis. *Talanta.* 2021;229:122260.
49. Koczok K, Horvath L, Korade Z, Mezei ZA, Szabo GP, Porter NA, et al. Biochemical and Clinical Effects of Vitamin E Supplementation in Hungarian Smith-Lemli-Opitz Syndrome Patients. *Biomolecules.* 2021;11(8).
50. Park JE, Lee T, Ha K, Ki CS. Carrier frequency and incidence estimation of Smith-Lemli-Opitz syndrome in East Asian populations by Genome Aggregation Database (gnomAD) based analysis. *Orphanet J Rare Dis.* 2021;16(1):166.
51. Pfeiffer BA, Xu L, Fliesler SJ. Transcriptomic Changes Associated with Loss of Cell Viability Induced by Oxysterol Treatment of a Retinal Photoreceptor-Derived Cell Line: An In Vitro Model of Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2021;22(5).
52. Rozdzyńska-Swiatkowska A, Ciara E, Halat-Wolska P, Krajewska-Walasek M, Jezela-Stanek A. Anthropometric characteristics of 65 Polish Smith-Lemli-Opitz patients. *J Appl Genet.* 2021;62(3):469-75.
53. Schaefer EJ, Tint GS, Duell PB, Steiner RD. Cerebrotendinous xanthomatosis, sitosterolemia, Smith-Lemli-Opitz syndrome and the seminal contributions of Gerald Salen, MD (1935-2020). *J Clin Lipidol.* 2021.
54. Sharma A, Kumar GA, Chattopadhyay A. Late endosomal/lysosomal accumulation of a neurotransmitter receptor in a cellular model of Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Traffic.* 2021;22(10):332-44.
55. Behl T, Kaur I, Sehgal A, Kumar A, Uddin MS, Bungau S. The Interplay of ABC Transporters in Abeta Translocation and Cholesterol Metabolism: Implicating Their Roles in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol.* 2021;58(4):1564-82.
56. Casas-Fernandez E, Pena-Bautista C, Baquero M, Chafer-Pericas C. Lipids as early and minimally invasive biomarkers for Alzheimer disease. *Curr Neuropharmacol.* 2021.
57. Chen H, Meng L, Shen L. Multiple roles of short-chain fatty acids in Alzheimer disease. *Nutrition.* 2021;93:111499.
58. Feringa FM, van der Kant R. Cholesterol and Alzheimer's Disease; From Risk Genes to Pathological Effects. *Front Aging Neurosci.* 2021;13:690372.

59. Gupta M, Weaver DF. Axonal plasma membrane-mediated toxicity of cholesterol in Alzheimer's disease: A microsecond molecular dynamics study. *Biophys Chem.* 2021;281:106718.
60. Jahn T, Clark C, Kerksiek A, Lewczuk P, Lutjohann D, Popp J. Cholesterol metabolites and plant sterols in cerebrospinal fluid are associated with Alzheimer's cerebral pathology and clinical disease progression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2021;205:105785.
61. Mancini G, Dias C, Lourenco CF, Laranjinha J, de Bem A, Ledo A. A High Fat/Cholesterol Diet Recapitulates Some Alzheimer's Disease-Like Features in Mice: Focus on Hippocampal Mitochondrial Dysfunction. *J Alzheimers Dis.* 2021;82(4):1619-33.
62. Nanjundaiah S, Chidambaram H, Chandrashekar M, Chinnathambi S. Role of Microglia in Regulating Cholesterol and Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* 2021;41(4):651-68.
63. Pedrini S, Chatterjee P, Hone E, Martins RN. High-density lipoprotein-related cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2021;159(2):343-77.
64. Roca-Agujetas V, Barbero-Camps E, de Dios C, Podlesniy P, Abadin X, Morales A, et al. Cholesterol alters mitophagy by impairing optineurin recruitment and lysosomal clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 2021;16(1):15.
65. Roca-Agujetas V, de Dios C, Abadin X, Colell A. Upregulation of brain cholesterol levels inhibits mitophagy in Alzheimer disease. *Autophagy.* 2021;17(6):1555-7.
66. Samant NP, Gupta GL. Novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease targeting brain cholesterol homeostasis. *Eur J Neurosci.* 2021;53(2):673-86.
67. Shi W, Wu H, Liu S, Wu Z, Wu H, Liu J, et al. Progesterone Suppresses Cholesterol Esterification in APP/PS1 mice and a cell model of Alzheimer's Disease. *Brain Res Bull.* 2021;173:162-73.
68. Smyth BJ, Polaski RS, Safer A, Boettcher FA, Konrad-Martin D, Gratton MA. Point-of-Care Glucose and Lipid Profile Measures Using a Human Point-of-Care Device in Mouse Models of Type 2 Diabetes Mellitus, Aging, and Alzheimer Disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2021.
69. Varma VR, Busra Luleci H, Oommen AM, Varma S, Blackshear CT, Griswold ME, et al. Abnormal brain cholesterol homeostasis in Alzheimer's disease-a targeted metabolomic and transcriptomic study. *NPJ Aging Mech Dis.* 2021;7(1):11.
70. Wu Q, Cortez L, Kamali-Jamil R, Sim V, Wille H, Kar S. Implications of exosomes derived from cholesterol-accumulated astrocytes in Alzheimer's disease pathology. *Dis Model Mech.* 2021;14(10).

71. Zhou R, Chen LL, Yang H, Li L, Liu J, Chen L, et al. Effect of High Cholesterol Regulation of LRP1 and RAGE on Abeta Transport Across the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res.* 2021;18(5):428-42.
72. Perry WJ, Patterson NH, Prentice BM, Neumann EK, Caprioli RM, Spraggins JM. Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments. *J Mass Spectrom* 2020;55(4):e4491.
73. Cologna SM. Mass Spectrometry Imaging of Cholesterol. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1115:155-66.
74. Dufresne M, Thomas A, Breault-Turcot J, Masson JF, Chaurand P. Silver-assisted laser desorption ionization for high spatial resolution imaging mass spectrometry of olefins from thin tissue sections. *Anal Chem.* 2013;85(6):3318-24.
75. Yang E, Fournelle F, Chaurand P. Silver spray deposition for AgLDI imaging MS of cholesterol and other olefins on thin tissue sections. *J Mass Spectrom.* 2020;55(4):e4428.
76. Patterson NH, Alabdulkarim B, Lazaris A, Thomas A, Marcinkiewicz MM, Gao Z-H, et al. Assessment of pathological response to therapy using lipid mass spectrometry imaging. *Sci Rep.* 2016;6(1):36814.
77. Goodwin RJA, Takats Z, Bunch J. A Critical and Concise Review of Mass Spectrometry Applied to Imaging in Drug Discovery. *SLAS Discovery.* 2020;25(9):963-76.
78. Tobias F, Hummon AB. Considerations for MALDI-Based Quantitative Mass Spectrometry Imaging Studies. *J Proteome Res.* 2020;19(9):3620-30.
79. Angelini R, Yutuc E, Wyatt MF, Newton J, Yusuf FA, Griffiths L, et al. Visualizing Cholesterol in the Brain by On-Tissue Derivatization and Quantitative Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem.* 2021;93(11):4932-43.
80. Bjorkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):806-15.
81. Virani SS, Alonso A, Aparicio HJ, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation.* 2021;143(8):e254-e743.
82. Sjögren M, Blennow K. The link between cholesterol and Alzheimer's disease. *World J Biol Psychiatry.* 2005;6(2):85-97.
83. Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech.* 2012;5(6):746-55.

84. Patti GJ, Shriver LP, Wassif CA, Woo HK, Uritboonthai W, Apon J, et al. Nanostructure-initiator mass spectrometry (NIMS) imaging of brain cholesterol metabolites in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Neuroscience*. 2010;170(3):858-64.
85. Radišauskas R, Kuzmickienė I, Milinavičienė E, Everatt R. Hypertension, serum lipids and cancer risk: A review of epidemiological evidence. *Medicina (Kaunas)*. 2016;52(2):89-98.
86. Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol Chem*. 2015;396(1):1-11.
87. Li C, Yang L, Zhang D, Jiang W. Systematic review and meta-analysis suggest that dietary cholesterol intake increases risk of breast cancer. *Nutr Res*. 2016;36(7):627-35.
88. Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC. Analytical methods for cholesterol quantification. *J Food Drug Anal*. 2019;27(2):375-86.
89. Ščupáková K, Balluff B, Tressler C, Adelaja T, Heeren RMA, Glunde K, et al. Cellular resolution in clinical MALDI mass spectrometry imaging: the latest advancements and current challenges. *Clin Chem Lab Med*. 2020;58(6):914-29.
90. Gilmore IS, Heiles S, Pieterse CL. Metabolic Imaging at the Single-Cell Scale: Recent Advances in Mass Spectrometry Imaging. *Annu Rev Anal Chem*. 2019;12(1):201-24.
91. Altelaar AFM, van Minnen J, Heeren RMA, Piersma SR. The influence of the cholesterol microenvironment in tissue sections on molecular ionization efficiencies and distributions in ToF-SIMS. *Appl Surf Sci*. 2006;252(19):6702-5.
92. Nygren H, Malmberg P, Kriegeskotte C, Arlinghaus HF. Bioimaging TOF-SIMS: localization of cholesterol in rat kidney sections. *FEBS Letters*. 2004;566(1-3):291-3.
93. Nygren H, Malmberg P. Silver deposition on freeze-dried cells allows subcellular localization of cholesterol with imaging TOF-SIMS. *J Microsc*. 2004;215(2):156-61.
94. Solé-Domènech S, Sjövall P, Vukojević V, Fernando R, Codita A, Salve S, et al. Localization of cholesterol, amyloid and glia in Alzheimer's disease transgenic mouse brain tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) and immunofluorescence imaging. *Acta Neuropathologica*. 2013;125(1):145-57.
95. Schober Y, Guenther S, Spengler B, Römpp A. Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging. *Anal Chem* 2012;84(15):6293-7.
96. Castro-Perez J, Hatcher N, Kofi Karikari N, Wang SP, Mendoza V, Shion H, et al. In vivo isotopically labeled atherosclerotic aorta plaques in ApoE KO mice and molecular profiling by

- matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2014;28(22):2471-9.
97. Wang X, Hou Y, Hou Z, Xiong W, Huang G. Mass Spectrometry Imaging of Brain Cholesterol and Metabolites with Trifluoroacetic Acid-Enhanced Desorption Electrospray Ionization. *Anal Chem* 2019;91(4):2719-26.
 98. Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG. Rapid, Direct Analysis of Cholesterol by Charge Labeling in Reactive Desorption Electrospray Ionization. *Anal Chem.* 2009;81(18):7618-24.
 99. Manicke NE, Nefliu M, Wu C, Woods JW, Reiser V, Hendrickson RC, et al. Imaging of Lipids in Atheroma by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2009;81(21):8702-7.
 100. Wu C, Ifa DR, Manicke NE, Cooks RG. Molecular imaging of adrenal gland by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst.* 2010;135(1):28-32.
 101. Yagnik GB, Hansen RL, Korte AR, Reichert MD, Vela J, Lee YJ. Large Scale Nanoparticle Screening for Small Molecule Analysis in Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2016;88(18):8926-30.
 102. Muller L, Kailas A, Jackson SN, Roux A, Barbacci DC, Schultz JA, et al. Lipid imaging within the normal rat kidney using silver nanoparticles by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Kidney Int.* 2015;88(1):186-92.
 103. Xu L, Kliman M, Forsythe JG, Korade Z, Hmelo AB, Porter NA, et al. Profiling and Imaging Ion Mobility-Mass Spectrometry Analysis of Cholesterol and 7-Dehydrocholesterol in Cells Via Sputtered Silver MALDI. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2015;26(6):924-33.
 104. Roux A, Muller L, Jackson SN, Post J, Baldwin K, Hoffer B, et al. Mass spectrometry imaging of rat brain lipid profile changes over time following traumatic brain injury. *J Neurosci Methods.* 2016;272:19-32.
 105. Dufresne M, Patterson NH, Lauzon N, Chaurand P. Assessing the Potential of Metal-Assisted Imaging Mass Spectrometry in Cancer Research. *Adv Cancer Res.* 2017;134:67-84.
 106. Lauzon N, Dufresne M, Beaudoin A, Chaurand P. Forensic analysis of latent fingerprints by silver-assisted LDI imaging MS on nonconductive surfaces. *J Mass Spectrom.* 2017;52(6):397-404.
 107. Groseclose MR, Castellino S. A Mimetic Tissue Model for the Quantification of Drug Distributions by MALDI Imaging Mass Spectrometry. *Anal Chem.* 2013;85(21):10099-106.

108. Patterson NH, Thomas A, Chaurand P. Monitoring time-dependent degradation of phospholipids in sectioned tissues by MALDI imaging mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2014;49(7):622-7.
109. Bemis KD, Harry A, Eberlin LS, Ferreira C, van de Ven SM, Mallick P, et al. Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments. *Bioinformatics*. 2015;31(14):2418-20.
110. Bothe HW, Bodsch W, Hossmann KA. Relationship between specific gravity, water content, and serum protein extravasation in various types of vasogenic brain edema. *Acta Neuropathologica*. 1984;64(1):37-42.
111. Van Nuffel S, Elie N, Yang E, Nouet J, Touboul D, Chaurand P, et al. Insights into the MALDI Process after Matrix Deposition by Sublimation Using 3D ToF-SIMS Imaging. *Anal Chem* 2018;90(3):1907-14.
112. Bich C, Havelund R, Moellers R, Touboul D, Kollmer F, Niehuis E, et al. Argon Cluster Ion Source Evaluation on Lipid Standards and Rat Brain Tissue Samples. *Anal Chem* 2013;85(16):7745-52.
113. Sjövall P, Johansson B, Lausmaa J. Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS. *Appl Surf Sci*. 2006;252(19):6966-74.
114. Jones EA, Lockyer NP, Vickerman JC. Depth Profiling Brain Tissue Sections with a 40 keV C60+ Primary Ion Beam. *Anal Chem*. 2008;80(6):2125-32.