

Université de Montréal

**Développement d'une méthode SPRI-MALDI-IMS pour la
quantification et l'identification des protéines dans des
empreintes de tissus biologiques**

par

Simon Forest

Département de chimie, Université de Montréal

Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.) en chimie

Septembre 2015

© Simon Forest, 2015

Résumé

Plusieurs tests médicaux, comme celui du dépistage du cancer du sein, se basent sur l'observation de section tissulaire sous un microscope. Ces tests se basent sur l'interprétation d'un spécialiste et les résultats peuvent varier d'un expert à un autre dû la subjectivité des observations. L'utilisation d'une technique analytique offrant une quantification et une identification de cibles moléculaires dans une section tissulaire permettrait aux experts de produire des diagnostics plus objectifs et diminuerait possiblement le nombre de faux diagnostics.

Les travaux présentés dans ce mémoire portent sur le développement d'une technique SPRi-MALDI-IMS permettant l'imagerie en deux dimensions de protéines contenues dans une section tissulaire. La MALDI-IMS est la technique de choix pour l'imagerie de biomolécules dans les sections tissulaires. Par contre, elle ne parvient pas à elle seule à quantifier de façon absolue le matériel adsorbé à la surface. Donc, le couplage de la MALDI-IMS avec la SPRi permet la quantification absolue de protéines en deux dimensions et crée une technique répondant aux besoins des experts médicaux. Pour ce faire, nous avons étudié, l'effet de la chimie de surface sur la nature et la quantité de matériel adsorbé à la surface du capteur. De plus, la cinétique de transfert des protéines du tissu vers le capteur a dû être optimisée afin de produire des empreintes correspondant au tissu d'origine, afin d'atteindre la gamme dynamique des instruments SPRi et MALDI-IMS. La technique résultante de ces optimisations permet d'obtenir les premières images quantitatives et qualitatives de protéines en deux dimensions d'une seule section tissulaire.

Mots-clés : Imagerie, SPRi, MALDI-IMS

Abstract

Several medical tests, such as breast cancer screening, are based on the observation of tissue section under a microscope. These tests rely on the interpretation of a specialist and the results can vary due to subjectivity of these analyses. Using an analytical technique able to quantify and identify molecular targets in a tissue section would enable experts to produce more objective diagnostic and possibly reduce the number of misdiagnosis.

The work presented in this thesis focuses on the development of a SPRi-MALDI-IMS technique for imaging proteins in a tissue section. MALDI-IMS is the contemporary technique of choice for biomolecule imaging in tissue sections. However, absolute quantification of material absorbed to the surface cannot be performed using MALDI-IMS. The absolute quantification of proteins in two dimensions was successfully achieved by coupling of the MALDI-IMS with SPRi. Accordingly, we investigated by studying the nature of the surface chemistry and the amount of material adsorbed on the sensor's surface. In addition, the kinetics of the protein transfer had to be optimized to produce imprints corresponding to the transferred tissue and to reach the dynamic ranges of both SPRi and MALDI-IMS instruments. The resulting technique led to quantitative and qualitative images of proteins in two dimensions of a single tissue section. It is envisioned that SPRi-MALDI-IMS can eventually meet the needs of medical experts for pathological screening.

Keywords : Imaging, Surface plasmon resonance, mass spectrometry, SPRi, MALDI-IMS

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Liste des symboles et abréviations.....	vi
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 Introduction.....	1
1.1 La spectroscopie de résonance de plasmons de surface (SPR).....	2
1.2 Historique.....	2
1.2.1 Théorie.....	4
1.2.2 Instrumentation.....	9
1.2.3 Applications.....	15
1.3 La spectrométrie de masse par ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI-MS).....	15
1.3.1 Historique.....	16
1.3.2 Théorie et instrumentation.....	17
1.4 Applications en imagerie MS.....	28
1.5 Objectifs de recherche.....	30
Chapitre 2 Partie expérimentale.....	31
2.1 Préparation des tissus biologiques.....	31
2.1.1 Préparation des homogénats de foie de souris.....	31
2.1.2 Préparation des coupes tissulaires.....	32
2.1.3 Préparation des coupes tissulaires colorées à l'hématoxyline et à l'éosine.....	33
2.2 Analyse en imagerie SPR.....	33

2.2.1	Instrumentation	33
2.2.2	Production des images SPR de tissus biologiques	39
2.3	Analyse MALDI-MS	41
2.3.1	Profilage de protéines	41
2.3.2	Imagerie de protéines	42
Chapitre 3	Surface Plasmon Resonance Imaging - MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry (SPRi - MALDI IMS) of Thin Tissue Sections.....	43
3.1	Abstract	44
3.2	Introduction.....	44
3.3	Experimental section.....	47
3.3.1	SPR sensing with different surface chemistries.....	47
3.3.2	Tissues preparation	48
3.3.3	SPR analysis of liver tissue transfer.....	48
3.3.4	Transferred protein identification	48
3.3.5	MALDI-TOF MS analyses	49
3.3.6	SPRi images	50
3.3.7	MALDI-TOF-IMS analysis	51
3.4	Results and Discussion	51
3.4.1	Protein transfer to SPR sensors.....	51
3.4.2	Surface chemistry.....	52
3.4.3	Regioselective transfer of tissue proteins to the SPRi sensor.....	55
3.4.4	SPRi - MALDI IMS.....	60
3.5	Conclusions.....	63
3.6	Acknowledgements.....	64
3.7	Supplemental information.....	64
3.7.1	Effect of solvent.....	64
3.7.2	Nylon membrane.....	65
3.7.3	Supplemental Table:	66
3.7.4	Supplemental figures:	67

Chapitre 4	Conclusions.....	72
4.1	Perspectives.....	73
	Bibliographie.....	76
Chapitre 5	Annexe	85
5.1	Code Matlab utilisé pour le traitement des données fournies par l’imageur	86
5.1.1	Code <i>Minpixhunthr</i>	86
5.1.2	Code <i>SPR_Process</i>	87
5.1.3	Code <i>Image_Masse</i>	88

Liste des symboles et abréviations

Note : Pour simplifier la consultation des références, les abréviations en anglais sont utilisées dans ce mémoire. La description en français est donnée, puis celle en anglais est inscrite en italique.

ACN	Acétonitrile
<i>c</i>	Vitesse de la lumière dans le vide
CCD	Dispositif à couplage de charge
CERES	Comité d'éthique de la recherche en santé
CHCA	Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique
DHB	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque
DMF	Diméthylformamide
<i>e</i>	Charge élémentaire
<i>E_c</i>	Énergie cinétique
EC	Électrophorèse capillaire
ϵ_m	Constante diélectrique du métal
ESI	Ionisation par électro nébulisation
FAB	Bombardement d'atomes rapide
H&E	Hématoxyline et l'éosine
I	Intensité lumineuse

I_0	Intensité lumineuse initiale
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
IR	Infrarouge
k_o	Vecteur d'onde de la lumière
k_{sp}	Vecteur d'onde du plasmon de surface
L	Longueur du tube de temps de vol
LAMMA	Analyseur de masse par microscopie laser
LC	Chromatographie liquide
λ	Longueur d'onde de la lumière
m	Masse
MALDI	Ionisation-désorption laser assistée par matrice
MS	Spectrométrie de masse
NBT	2-mercaptobenzothiazole
q	Charge d'un ion
RTI	Réfraction totale interne
SA	Acide sinapinique
SDS-PAGE	Électrophorèse en gel de polyacrylamide et de laurylsulfate sodium
SPR	Résonance de plasmons de surface
SPRi	Imagerie par résonance de plasmons de surface

t	Temps pris par un ion pour parcourir la distance L du tube de temps de vol
TFA	Acide trifluoroacétique
TOF	Temps de vol
UV	Ultraviolet
V	Vitesse d'un ion
V_s	Potentiel appliqué par l'électrode dans une source MALDI
ω	Fréquence angulaire de la lumière
z	degré d'ionisation

Liste des figures

Figure 1.1: Propagation des plasmons de surface à l'interface d'un métal et d'un diélectrique. Copyright © 2012. Deutsch Lab, University of Oregon, Department of Physics	4
Figure 1.2: Représentation du phénomène SPR. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.	5
Figure 1.3: Mouvement de la bande SPR en fonction de l'indice de réfraction de la solution. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.....	7
Figure 1.4: Excitation théorique des plasmons de surface avec une surface d'or de 50 nm recouverte d'eau. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.	8
Figure 1.5: Schéma d'un instrument SPR de configuration Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde. ²⁵ Copyright © 2009, avec la permission d'Elsevier.....	9
Figure 1.6: Schémas de la polarisation de la lumière S (rouge) et P (Bleu) par rapport au plan de la surface	10
Figure 1.7: Schémas comparatifs entre un montage utilisant un détecteur à barrette de diodes versus un spectrophotomètre simple. Copyright © 1998 – 2015. GMI Group Inc.	11
Figure 1.8: Schémas d'un montage SPR à interrogation de l'angle avec un détecteur à barrette de diodes. Tous les angles sont dirigés vers un point du capteur et réfléchis vers le détecteur. Copyright © 2015 McGill University.....	12
Figure 1.9: Changement de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de faisceau lumineux. Copyright © Biosensing Instrument	13
Figure 1.10: Schémas d'un imageur SPR avec fonctionnement par interrogation de l'intensité lumineuse à angle fixe. Copyright © 2015 Nature ²⁸	14
Figure 1.11: Les composantes d'un spectromètre de masse. Note de cours CHM6160 – reproduction autorisée par Pierre Thibault	17
Figure 1.12: Représentation schématique de l'ionisation et de la désorption laser dans une source MALDI-MS. Copyright © 2008 National High Magnetic Field Laboratory ⁴⁴	19

Figure 1.13: Représentation schématique (a) et images de fluorescence de la plume de désorption (b). "Reprinted (adapted) with permission from: The desorption process in MALDI. Copyright 2003 American Chemical Society. ⁴⁵	20
Figure 1.14: Illustration du modèle du «Lucky Survivor» ⁵³	23
Figure 1.15: Schémas d'un spectromètre de masse avec analyseur TOF (http://www.stevenaccardo.com/instrumentation/).....	25
Figure 1.16: Schémas d'un spectromètre de masse MALDI-TOF/MS avec réflectron ⁶³	27
Figure 1.17: Protocole général d'imagerie MALDI	29
Figure 2.1: Instrument d'imagerie SPR d'Horiba (SPRi-LAB+) ⁷¹	34
Figure 2.2: Photo des cellules fluidiques conçues lors du projet.....	35
Figure 2.3: Configuration finale avec modifications de l'imageur SPRi-LAB+.....	38
Figure 2.4: Illustration du montage d'imagerie SPR pour transfert de protéines avec membrane	39
Figure 2.5: Images SPRi acquises à un angle de 60° en polarisation P (gauche) et S (droite), 45 minutes après le début d'un transfert de rein de souris	40
Figure 2.6: Image d'un MALDI-TOF/TOF Ultraflextrem de Bruker Daltonics. Copyright © 2015 Bruker Corporation	41
Figure 2.7: Image d'un Imageprep 2.0 de Bruker Daltonics. Copyright © 2015 Bruker Corporation	42
Figure 3.1: Schematic representation of SPR - MALDI MS (A) and SPRi - MALDI IMS (B) experimental methods. A droplet of PBS or water was added on the SPR sensor between two 0.7 mm spacers (A1). The tissue sample was then deposited on the spacers and the sample was in contact with the droplet (A2). After a transfer time of 20 min, the tissue sample was removed and the sensor was immersed in PBS or ethanol (A3). Matrix was then manually applied on the sensor (A4) and MALDI MS analysis was performed (A5). A wet (150 mM ammonium formate) nylon membrane was applied on functionalised (dodecanethiol) SPRi sensor and the SPRi reference scan was performed (B1). The tissue section mounted on a glass slide was then deposited on the membrane to perform regionalized protein transfer for 1 h (B2). Once completed, the nylon membrane was dried under a nitrogen stream and was carefully removed from the SPRi sensor with the tissue	

sample (B3). Matrix was then applied (ImagePrep) on the sensor (B4) and MALDI IMS analysis was performed (B5).	56
Figure 3.2: Transfer kinetics of proteins from a 20 μm thick homogenised liver section to a SPRi sensor using a nylon membrane spacer to minimize lateral diffusion. (A): SPRi images of transferred proteins (Color scale in ng/cm^2 , dashed line represents the original dimension and shape of the homogenised liver section). (B): Relative SPR shift (black) and relative total ion current measured from the corresponding MS spectra (blue, see Figure 3.10) as a function of time.	58
Figure 3.3: Lateral diffusion of proteins with (bottom panel) and without (top panel) the addition of a nylon membrane. The protein transfer was measured for a 20 μm thick homogenised liver tissue section to a SPRi sensor. The lateral diffusion was measured at 5.47 $\mu\text{m}/\text{s}$ without the membrane and at 0.34 $\mu\text{m}/\text{s}$ with the membrane.	59
Figure 3.4: SPRi - MALDI IMS protein images acquired for a 20 μm thick mouse kidney section. (A): H&E stained kidney section after 60 min of protein transfer, (B-F): SPRi images of the protein imprint at different time intervals (color scale is in ng/cm^2). (G-O): Selected protein MALDI IMS images (100 μm spatial resolution) of the imprint on the SPRi sensor after 60 min of transfer time.	62
Figure 3.5: Magnified microphotographs of SPR surfaces exposed to a liver tissue section using a spacer during the transfer process (A) and in direct contact with the SPR surface (B). The images were acquired with a 10 X objective.	67
Figure 3.6: Adsorption of biomaterial on a smooth gold film transferred from liver tissue sections and monitored by SPR (red line = no spacer, blue line = with a spacer) without a nylon membrane.	68
Figure 3.7: MALDI mass spectra of proteins transferred from a 10 μm thick liver tissue section onto different SAMs: dodecanethiol (A), 16-MHA (B), MESNA (C). A PBS wash was performed on each sample before MS data acquisition.	68
Figure 3.8: MALDI mass spectra of a liver tissue section imprints on a 16-MHA surface after washing with A) 100% deionized water or B) a 90% EtOH solution.	69
Figure 3.9 : SPRi protein image acquired after 4.5 min of transfer time from a 20 μm thick homogenised liver section without the using the nylon membrane. (Color scale is in ng/cm^2) (Dashed line represents the outline of the homogenized liver section).	69

Figure 3.10: MALDI MS spectra of transferred proteins from a liver tissue section onto a dodecanethiol surface after 15 min (red), 30 min (blue), 45 min (black) and 60 min (gray) of transfer time..... 70

Figure 3.11: H&E stained 10 μm mouse kidney section (A) and mouse kidney histology (B): renal pelvis (1), inner medulla (2), outer medulla (3) and cortex (4). 70

Figure 3.12 : MALDI-TOF MS spectrum of liver proteins after transfer from a tissue section onto a dodecanethiol surface..... 71

Figure 3.13 : MALDI-TOF MS spectrum of kidney proteins after transfer from a tissue section onto a dodecanethiol surface..... 71

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Type de laser utilisé en MALDI	21
Tableau 1.2: Principales matrices utilisées en MALDI selon la classe de molécules analysées et selon le mode d'ionisation ⁴⁰	22
Tableau 2.1: Modifications, problématiques et avantages des différents designs de cellule....	37
Table 3.1: Amount of biomaterial from liver tissue sections adsorbed on different self-assembled monolayers measured by SPR after 20 min of transfer time.....	53
Tableau 3.2 : Peptides generated by trypsin digestion of adsorbed proteins transferred from a liver tissue section.....	66

« Si tu as une pomme, que j'ai une pomme, et que l'on échange nos pommes, nous aurons chacun une pomme. Mais si tu as une idée, que j'ai une idée et que l'on échange nos idées, nous aurons chacun deux idées. »

George Bernard Shaw

Remerciements

J'aimerais premièrement remercier les membres de ma famille qui ont su me supporter durant toute la durée de mon parcours à l'Université de Montréal en chimie.

Je tiens à remercier mes nombreux amis avec qui j'ai créé des liens qui résisteront à l'épreuve du temps. Rita, merci pour tes fous rires et nos innombrables heures passées ensemble. Merci à tous ceux que j'ai côtoyés dans le cadre de mon implication dans l'AEDCUM, nous avons ensemble créé de belles choses pour la communauté étudiante du département de chimie. Merci aux Gringos, avec qui tous les coups possibles et imaginables ont été faits.

J'aimerais remercier tous les membres du groupe Masson pour les deux années passées à vos côtés. Julien, merci de m'avoir guidé lors du début de mes études graduées, tu es un exemple à suivre. Alexandra, merci pour son pragmatisme inébranlable et son aide dans notre aventure au Café=In. Hugo et Maxime, vos niaiseries auront créé une ambiance unique dans un groupe de recherche. Je souhaite bonne chance aux nouveaux arrivants du groupe, Félix, Geneviève et Jérémie, et surtout à Simon dans la continuation du projet.

J'aimerais finalement remercier mon directeur de recherche, Jean-François Masson, pour ces conseils, son encadrement et sa vision et d'avoir cru en mes capacités de chercheur tout au long de ma maîtrise. En tant que directeur de recherche tu fais sortir le meilleur de tes étudiants tous les jours en t'assurant de maintenir une ambiance amicale et professionnelle. Je suis fier d'avoir fait partir de ton groupe de recherche.

Chapitre 1 Introduction

L'imagerie médicale est un outil puissant dans le diagnostic de plusieurs pathologies. De toutes les techniques d'imagerie existantes, l'histologie se démarque par l'étude de coupes tissulaires minces. L'étude de coupes sous microscope permet l'identification de différents tissus et leur composition. L'observation de coupes tissulaires sans traitement préalable donne toutefois peu d'information au professionnel médical lors de l'identification d'une pathologie. C'est pourquoi plusieurs techniques de coloration de ces coupes ont vu le jour afin d'augmenter l'information acquise lors de ces observations.

Immunohistochimie est une technique offrant au pathologiste de l'information sur l'histologie d'un tissu et est couramment utilisée pour identifier des cellules cancéreuses dans les biopsies. Elle rend possible l'identification de pathologies en révélant l'absence, la présence ou l'accumulation de cibles moléculaires spécifiques via des anticorps fixés à des marqueurs colorés ou fluorescents. Il est même possible de quantifier des cibles en immunofluorescence. Par contre, les anticorps utilisés lors de ces marquages sont coûteux et la sélection de cibles est limitée. Une technique permettant la quantification et l'identification d'une plus grande variété de cibles moléculaires dans les coupes tissulaires permettrait d'outiller les experts médicaux et de mieux diagnostiquer plusieurs pathologies.

La spectrométrie de masse (MS) est une technique de choix pour l'identification des protéines dans les tissus biologiques. Avec l'avènement de techniques permettant l'imagerie de tissus comme la spectrométrie de masse avec ionisation-désorption laser assisté par matrice (MALDI), il est maintenant possible d'obtenir des informations sur l'emplacement de ces biomolécules à l'intérieur des tissus. Toutefois, la quantification des protéines identifiées par MALDI-MS reste un défi de taille, car elle est souvent relative et non absolue.^{1,2} Afin de pallier à ce problème, il est possible de coupler la MALDI-MS avec d'autres techniques comme la chromatographie liquide afin d'obtenir les informations quantitatives complémentaires.^{3, 4} Cependant, ces techniques ne permettent pas d'obtenir des informations sous la forme d'image. La résonance de plasmons de surface (SPR) est une technique permettant la quantification

absolue de biomolécules à la surface d'un capteur. De plus, la SPR peut être utilisée en imagerie pour obtenir des informations en deux dimensions ce qui en fait une technique dont le couplage avec la MALDI-MS est très prometteur. Il existe quelques exemples de couplage entre l'imagerie de résonance de plasmons de surface (SPRi) et la MALDI-MS.⁵⁻⁷ Toutefois, dans ces exemples, la SPRi et l'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) sont utilisées pour faire du multiplexage et non de l'imagerie de tissu intégral.

Les travaux exposés dans ce mémoire porteront sur le couplage de la SPRi avec la MALDI-IMS afin d'obtenir des informations quantitatives et qualitatives des protéines présentes en tissus biologiques sous la forme d'images. Aucun exemple de couplage de ces méthodes dans un but similaire n'a pas été rapporté dans la littérature jusqu'à maintenant. En regroupant les informations obtenues par les deux techniques, il sera possible d'identifier la quantité et la nature des protéines en fonction de leur position dans un tissu biologique. Dans cette section, un résumé de l'historique, de la théorie et de l'instrumentation utilisée dans les travaux de ce mémoire seront exposées.

1.1 La spectroscopie de résonance de plasmons de surface (SPR)

Dans cette section, le thème de la spectroscopie SPR sera abordé. Un bref historique de la SPR sera donné. Par la suite, la théorie ainsi que l'instrumentation SPR seront discutées, en particulier pour effectuer de l'imagerie SPR. Dans le cadre de ce mémoire, la SPR sera utilisée afin de produire des images quantitatives d'empreintes de tissus biologiques. Il est donc essentiel de bien comprendre les particularités de cette technique puisqu'elle est au cœur des travaux présentés dans ce mémoire.

1.2 Historique

La coupe de Lycurgue est une coupe romaine représentant un épisode d'un mythe dans l'Iliade. Datant du IV^e siècle, elle est maintenant exposée au British Museum de Londres. Cette coupe a la caractéristique de changer de couleur du vert opaque au rouge dépendant si l'observateur perçoit la lumière diffusée ou transmise. Ce changement de couleur est attribué

aux nanoparticules d'argent et d'or contenues dans la teinture servant à décorer la coupe.⁸ En effet, les nanoparticules d'argent et d'or ont la propriété d'absorber certaines longueurs d'onde de la lumière en fonction de leur diamètre. Cette propriété découle directement de la résonance des plasmons de surfaces associée à ces nanoparticules. Ainsi, les propriétés de l'interaction de la lumière avec les plasmons de surface ont été observées bien avant que les physiciens en comprennent l'origine il y a environ 100 ans.

Le phénomène de diffraction anormale de la lumière sur des réseaux de diffraction a été décrit pour la première par R.W. Wood au début du 20^e siècle.⁹ Il a fallu toutefois attendre jusque dans les années 1950 pour que la cause de cette diffraction inhabituelle de la lumière soit attribuée aux plasmons de surface. Par la suite, Kretschmann¹⁰ et Otto¹¹ publient les premiers exemples d'excitation des plasmons de surface par réflexion totale interne atténuée dans les années 1960. Les premières utilisations de la SPR par réflexion totale interne pour la détection de biomolécules surviennent en 1983 par Liedberg et Nylander.¹² Depuis, la SPR est en pleine expansion dans le domaine de la spectroscopie analytique, surtout grâce à sa simplicité d'utilisation et sa rapidité d'acquisition de données, le tout sans marquer l'analyte.

Le développement de l'imagerie par résonance de plasmons de surface a été un avancement très important dans le monde de la SPR et de l'analyse en général. C'est avec les expériences en microscopie de plasmons de surface faite dans les laboratoires de Ash¹³ et de Knoll¹⁴ que la SPRi voit le jour à la fin des années 1980. Par la suite, les premiers exemples d'utilisation de la SPRi pour la détection et pour la caractérisation de l'adsorption de biomolécules comme les protéines et les oligonucléotides sur des films métalliques sont produits dans les laboratoires de Corn au milieu des années 1990.¹⁵⁻¹⁷ Il fallut toutefois attendre le développement de sources lumineuses dans le proche infrarouge afin d'augmenter la résolution et la sensibilité des appareils de SPRi.¹⁸ Suite à cette amélioration, l'intérêt pour le multiplexage en SPRi explose. En effet, la SPRi permet maintenant de faire des analyses d'interactions cinétiques et de spécificités de centaines de composés différents, le tout en temps réel.¹⁹

1.2.1 Théorie

Le phénomène de SPR est sensible aux changements de la constante diélectrique du milieu à la proximité du capteur. Cette constante diélectrique est directement reliée à l'indice de réfraction selon :

$$\epsilon = \eta^2 \tag{1.1}$$

Où ϵ représente la constante diélectrique et η l'indice de réfraction du diélectrique. Cette capacité de la SPR à être sensible aux changements d'indice de réfraction à la surface d'un film métallique en fait une technique presque universelle.²⁰ Cette propriété découle directement de l'interaction de la lumière avec les plasmons de surface. Les plasmons de surface sont le produit de l'oscillation collective d'une densité de charge à l'interface d'un diélectrique et d'un métal noble. Ceux-ci sont souvent comparés aux ondes à la surface de l'eau lorsque l'on y jette une pierre. De plus, cette propagation des densités de charges peut être associée à l'énergie d'une onde électromagnétique et, comme une onde électromagnétique classique, les plasmons de surface induisent un champ électromagnétique dont le vecteur atteint son maximum à l'interface et décroît par la suite dans les deux milieux (Figure 1.1).

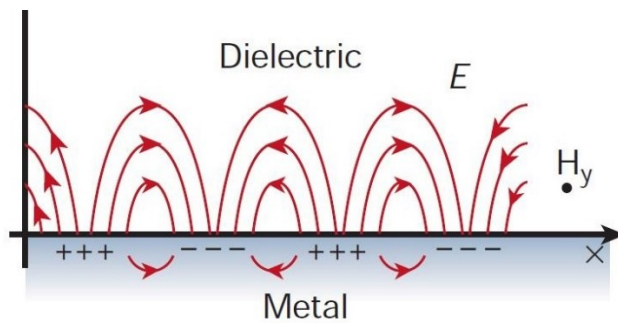


Figure 1.1: Propagation des plasmons de surface à l'interface d'un métal et d'un diélectrique, où E représente l'énergie et H_y le champ électromagnétique. Copyright © 2012. Deutsch Lab, University of Oregon, Department of Physics

Ces ondes plasmoniques se déplacent dans le plan de la surface et leur intensité décroît très rapidement. La décroissance du champ électromagnétique limite la sensibilité de la SPR dans le plan de la surface métallique à quelques μm . Quant à elle, la pénétration de ce champ dans le diélectrique est de l'ordre de 200 nm. Ces caractéristiques font de la SPR un phénomène localisé (Figure 1.2).

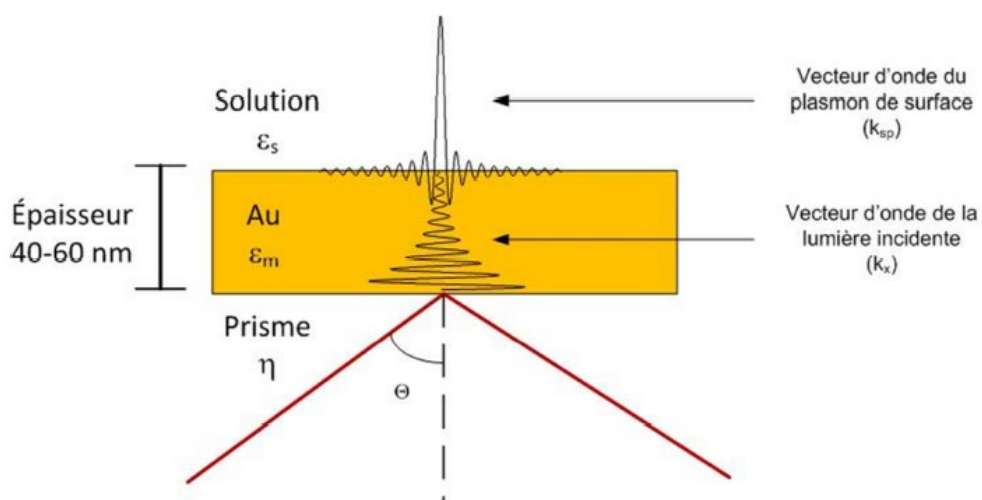


Figure 1.2: Représentation du phénomène SPR. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.

Comme il a été dit, la propagation des densités de charge à l'interface des diélectriques sont associées à une onde électromagnétique. À l'image des ondes électromagnétiques, ces densités de charges peuvent entrer en résonance avec des photons si certains paramètres sont respectés. En effet, le métal doit avoir une constante diélectrique dont la portion réelle est négative.²¹ De plus, le vecteur d'onde de la lumière (k_o) doit avoir la bonne polarisation et la bonne fréquence afin d'entrer en résonance avec le vecteur d'onde du plasmon de surface (k_{sp}) comme montré dans les équations **Error! Reference source not found.** 1.2, 1.3 et 1.4 :

$$k_{sp} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m(\lambda) \epsilon_s(\lambda)}{\epsilon_m(\lambda) + \epsilon_s(\lambda)}} \quad (1.2)$$

$$k_x = k_0 \eta_D \sin(\theta)_{inc} \quad (1.3)$$

$$k_o = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (1.4)$$

Où ω est la fréquence angulaire de la lumière, λ est la longueur d'onde de la lumière, ϵ_m est la constante diélectrique du métal, ϵ_s est la constante diélectrique du diélectrique en contact avec le métal et c la vitesse de la lumière dans le vide. Dans le cas où $k_o = k_{sp}$, le photon pourra être absorbé par la surface et sondé l'indice de réfraction dans le diélectrique.

Comme la constante diélectrique du métal a une grande influence en spectroscopie SPR, le choix du bon métal est primordial. Plusieurs métaux possèdent les caractéristiques nécessaires pour supporter des plasmons de surface, comme Au, Ag, Cu, Pt, Pd et Al.^{22, 23} L'argent est le métal permettant la plus grande sensibilité, mais celui-ci s'oxyde au contact de l'oxygène présent dans l'air ambiant. L'or quant à lui est inerte dans les conditions standard et permet lui aussi une bonne sensibilité, c'est pourquoi il est souvent le métal de choix pour les expériences en spectroscopie SPR.²⁴

Donc, en dirigeant un faisceau de lumière polychromatique remplissant les critères précédemment énoncés dans un prisme recouvert d'un film d'or, les photons possédant la bonne longueur d'onde seront absorbés par la surface et sonderont l'indice de réfraction du diélectrique tandis que les autres seront réfléchis en réflexion totale interne (RTI) vers un détecteur. En montrant le résultat sous la forme d'un spectre I/I_0 en fonction de la longueur d'onde de la lumière, une bande dont le minimum correspond à la longueur d'onde préférablement absorbée sera obtenue. En modifiant l'indice de réfraction à l'interface entre le métal et le diélectrique, les conditions de l'équation changent et cela est observé par un déplacement de la bande comme montré dans la Figure 1.3.

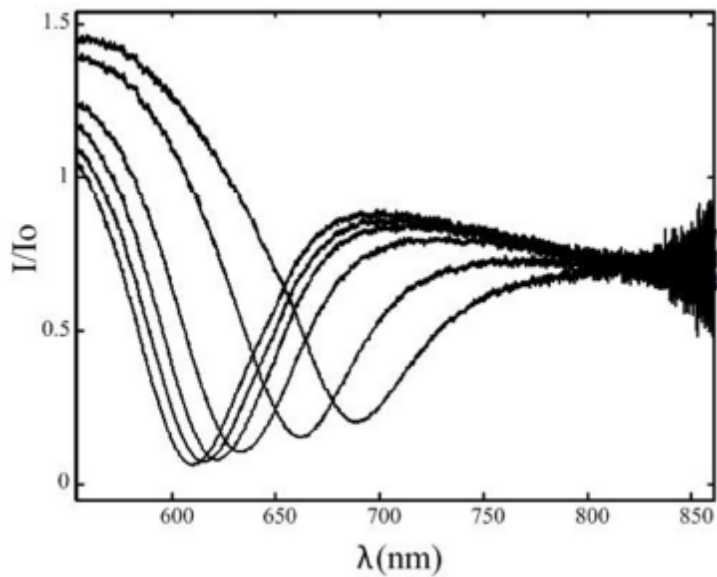


Figure 1.3: Mouvement de la bande SPR en fonction de l'indice de réfraction de la solution.
Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson
J.-F. Automne 2008.

Outre la longueur d'onde, l'angle incident de la lumière doit aussi être pris en compte lors d'expériences SPR. En effet, l'angle incident de la lumière sur la surface du métal a aussi son rôle à jouer lors de l'absorption du photon. Donc, il existe une gamme de couples d'angle et de longueur d'onde pour lesquels la bande d'absorption sera plus étroite et intense comme illustrée dans la Figure 1.4.

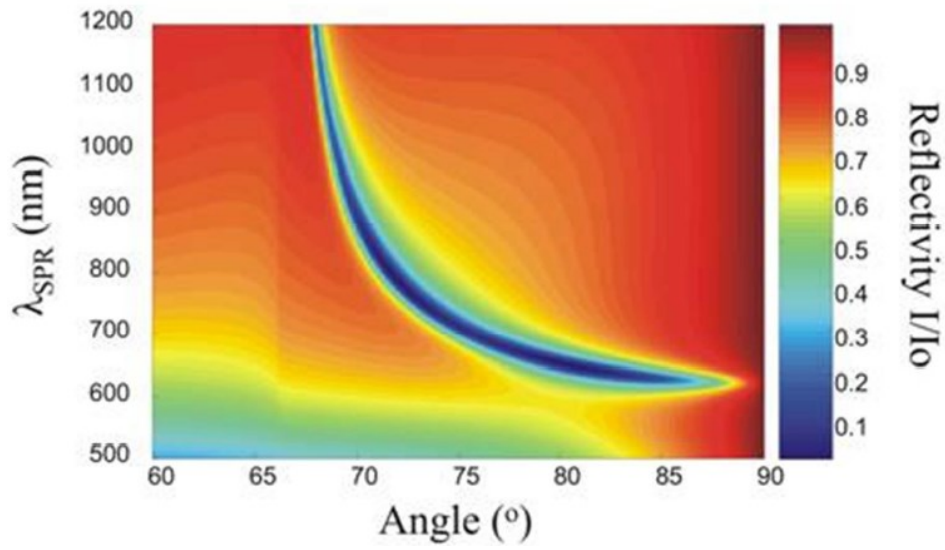


Figure 1.4: Excitation théorique des plasmons de surface avec une surface d'or de 50 nm recouverte d'eau. Figure tirée des notes de cours CHM 6110 : Chapitres choisis de chimie analytique, Masson J.-F. Automne 2008.

Donc, afin de produire des spectres d'intensité de la lumière réfléchie, l'angle d'incidence ou la longueur d'onde doit rester inchangé tandis que l'autre paramètre est balayé. Ainsi, il est possible de faire des expériences SPR avec une source monochromatique en construisant un spectre de l'intensité en fonction de l'angle d'incidence et de trouver θ_{SPR} . θ_{SPR} correspond à l'angle où l'absorption du faisceau incident est maximale. C'est à cet angle que le changement de réflectivité observé suite à un changement d'indice de réfraction sera le plus grand. La lumière possède une dualité ondulatoire et corpusculaire, c'est-à-dire qu'elle possède des propriétés semblables aux ondes et aux particules. Ainsi, en agissant comme une particule et en frappant la surface d'un film métallique à différents angles, des photons de même longueur d'onde peuvent transférer différentes quantités d'énergie à l'interface, c'est le momentum du photon représenté par le vecteur d'onde. Seulement les photons frappant la surface à l'angle correspondant à une collision d'une énergie équivalente au vecteur d'onde du plasmon de surface seront absorbés.

1.2.2 Instrumentation

Les premiers instruments SPR ont été développés dans les 1960 par Kretschmann et Otto.^{10, 11} La configuration de Kretschmann est aujourd'hui encore la plus utilisée. Ces instruments se basent sur la réflexion totale interne d'un faisceau lumineux à l'interface d'un film métallique et d'un prisme (Figure 1.5).

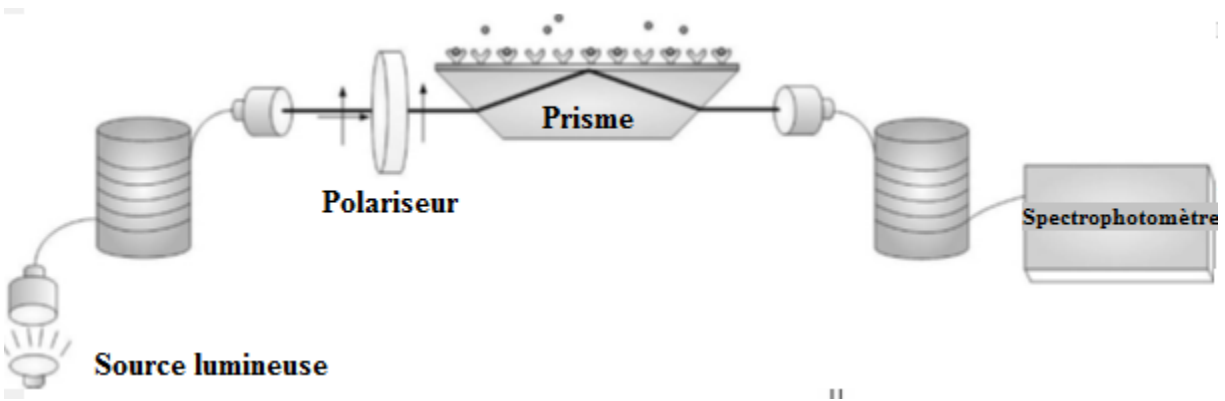


Figure 1.5: Schéma d'un instrument SPR de configuration Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde.²⁵ Copyright © 2009, avec la permission d'Elsevier

Les instruments SPR sont populaires par la simplicité de leur fonctionnement et de leurs composantes. Les instruments Kretschmann reposent sur trois types de fonctionnements : l'interrogation de la longueur d'onde, l'interrogation de l'angle, ou les mesures de réflectivité.

Les instruments d'interrogation de la longueur d'onde reposent sur l'excitation du plasmon de surface par une lumière polychromatique dirigée vers le capteur à un angle fixe. La lumière polychromatique est tout d'abord dirigée vers un polariseur. La lumière polarisée en S n'est pas absorbée par les plasmons de surface, celle-ci est donc totalement réfléchi à l'interface du prisme et du métal. Un faisceau de lumière polarisé en P a un champ électrique parallèle au

plan de la surface, tandis que le champ électrique d'un faisceau polarisé S y est perpendiculaire (Figure 1.6).

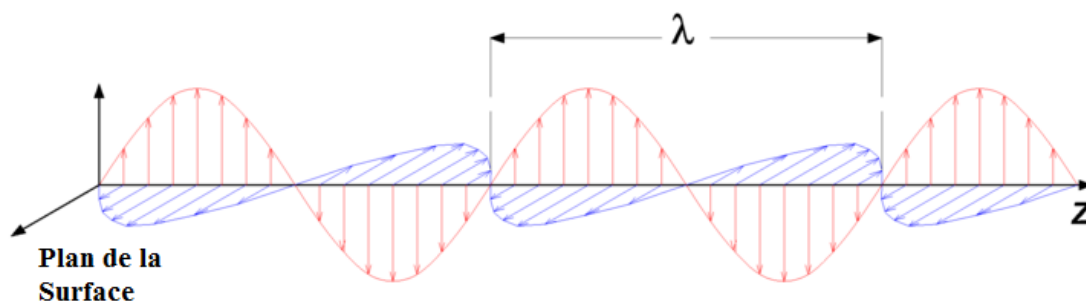


Figure 1.6: Schémas de la polarisation de la lumière S (rouge) et P (Bleu) par rapport au plan de la surface

La lumière polarisée en S est donc utilisée pour trouver la constante I_0 . À l'inverse, la lumière polarisée en P est absorbée en partie aux longueurs d'onde entrant en résonance avec les plasmons de surface. La lumière polarisée en P est donc utilisée pour obtenir l'intensité I propre à un temps donné. Par la suite, les spectres SPR sont enregistrés en fonction du rapport l'intensité I/I_0 ou de l'absorbance par rapport à la longueur d'onde. Le spectre enregistré par un spectrophotomètre prend l'allure d'une bande dont le maximum (ou le minimum dans le cas de l'intensité lumineuse) correspond aux photons possédant les bonnes propriétés électromagnétiques comme il a été vu dans la section précédente (Figure 1.3). Finalement, le déplacement de cette bande peut être relié à l'adsorption de matériel à la surface du capteur. Ce type de configuration, couplée avec un spectrophotomètre à barrette de diodes, permet une acquisition rapide des spectres qui est très pratique lors d'expériences cinétiques.

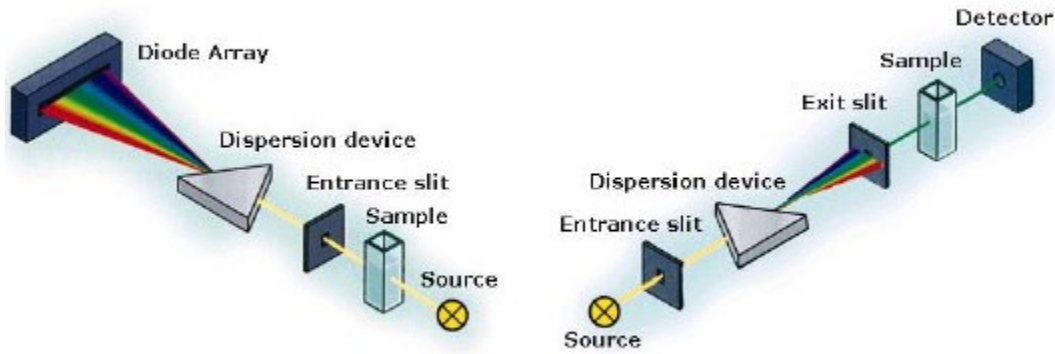


Figure 1.7: Schémas comparatifs entre un montage utilisant un détecteur à barrette de diodes versus un spectrophotomètre simple. Copyright © 1998 – 2015. GMI Group Inc.

En effet, dans ce type de montage SPR, le choix du détecteur utilisé aura un impact sur la résolution du spectre obtenu (Figure 1.7). Dans le cas d'un détecteur à barrette de diode, la lumière non absorbée par l'échantillon sera réfractée dans un prisme ou diffractée par un réseau de diffraction et ainsi les différentes composantes de la lumière seront séparées. Une fois séparées, ces composantes frapperont une diode différente et comme chaque diode est associée à une longueur d'onde, le spectre entier peut être reconstitué. La résolution au niveau de la longueur d'onde est dans ce cas limitée par le nombre de diodes, tandis que la résolution temporelle est dictée par le temps d'accumulation de la lumière par spectre. Pour ce qui est de l'utilisation d'un détecteur simple, la lumière non absorbée par l'échantillon est immédiatement dirigée dans un prisme ou un réseau de diffraction pour en séparer les composantes. Une fois séparés, ceux-ci sont acheminés dans une fente, puis vers un détecteur qui quantifiera la lumière une longueur d'onde à la fois. Cette configuration permet une grande résolution au niveau de la longueur d'onde avec une fente de petite dimension, mais limite la résolution temporelle avec le temps de balayage du spectre. Finalement, les instruments SPR Kretschmann à interrogation de la longueur d'onde sont très populaires en raison de la simplicité de leurs composantes ce qui leur permet d'être facilement miniaturisés et d'être déplacés sur le terrain.²⁶

Un autre type de montage SPR fonctionne par interrogation des angles. Les montages par interrogation de l'angle peuvent être construits selon deux géométries distinctes. La première consiste à illuminer le film d'or avec un faisceau de lumière monochromatique contenant tous les angles sur un point du senseur et de reconstruire le spectre à l'aide d'un détecteur à barrettes de diode. Au même titre que dans le cas du montage par interrogation de la longueur d'onde, ce détecteur permet de faire des acquisitions rapides de spectres entiers, mais dans le cas de ce montage, l'alignement optique est très complexe.²⁷

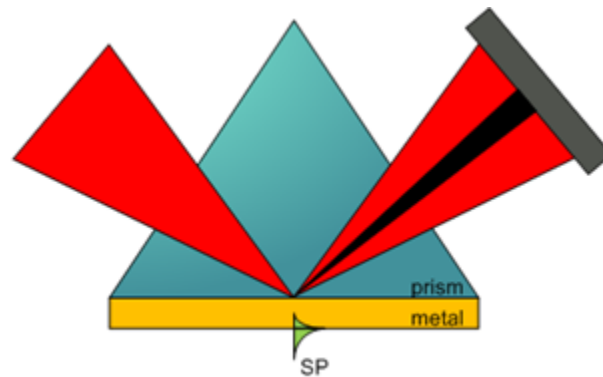


Figure 1.8: Schémas d'un montage SPR à interrogation de l'angle avec un détecteur à barrette de diodes. Tous les angles sont dirigés vers un point du capteur et réfléchis vers le détecteur.

Copyright © 2015 McGill University

La deuxième géométrie consiste à balayer un à un, avec une lumière monochromatique, tous les angles à l'aide d'un miroir rotatif. Cette géométrie est moins couramment utilisée en SPR à cause des temps d'acquisition trop longs pour faire des études cinétiques. Même si ce type de configuration a une résolution temporelle moins performante, la résolution angulaire, elle, est grandement améliorée. Cette géométrie s'avère beaucoup plus populaire dans les études physico-chimiques de surface où une résolution temporelle est moins importante. Elle est aussi utile dans les appareils d'imagerie SPR.

En effet, la plupart des appareils d'imagerie SPR travaillent par interrogation de l'intensité lumineuse avec une géométrie semblable à celle du balayage d'angle. Cependant, la majeure partie des expériences faites en SPRi sont produites à angle fixe, comme dans le cas des montages à interrogation de la longueur d'onde, mais avec une source monochromatique. Le balayage d'angle est utilisé afin de déterminer l'angle optimal pour l'acquisition des données. En effet, en balayant tous les angles en début d'expérience à l'aide d'un miroir rotatif et d'une source lumineuse monochromatique, il est possible d'obtenir des spectres de la variation de la réflectivité en fonction de l'angle et de la position sur le capteur.

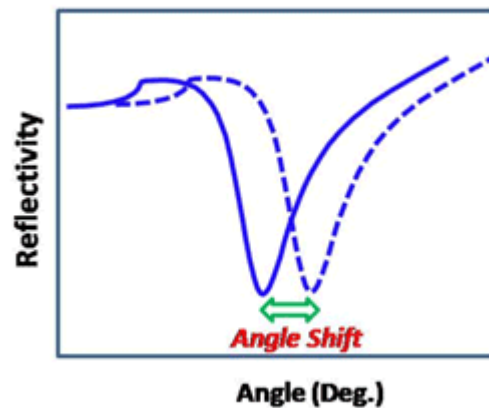


Figure 1.9: Changement de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de faisceau lumineux. Copyright © Biosensing Instrument

Par la suite, le miroir est fixé à l'angle optimal. Comme il a été vu, l'angle optimal en imagerie SPR correspond à l'angle où 50% de l'intensité lumineuse est absorbée par le senseur. C'est à cet angle que la variation de l'intensité lumineuse est maximale par rapport au changement de l'indice de réfraction à l'interface entre le diélectrique et la surface métallique. Une fois le montage fixé à cet angle, c'est la variation de l'intensité qui est enregistrée par le détecteur en fonction de la position (Figure 1.10).

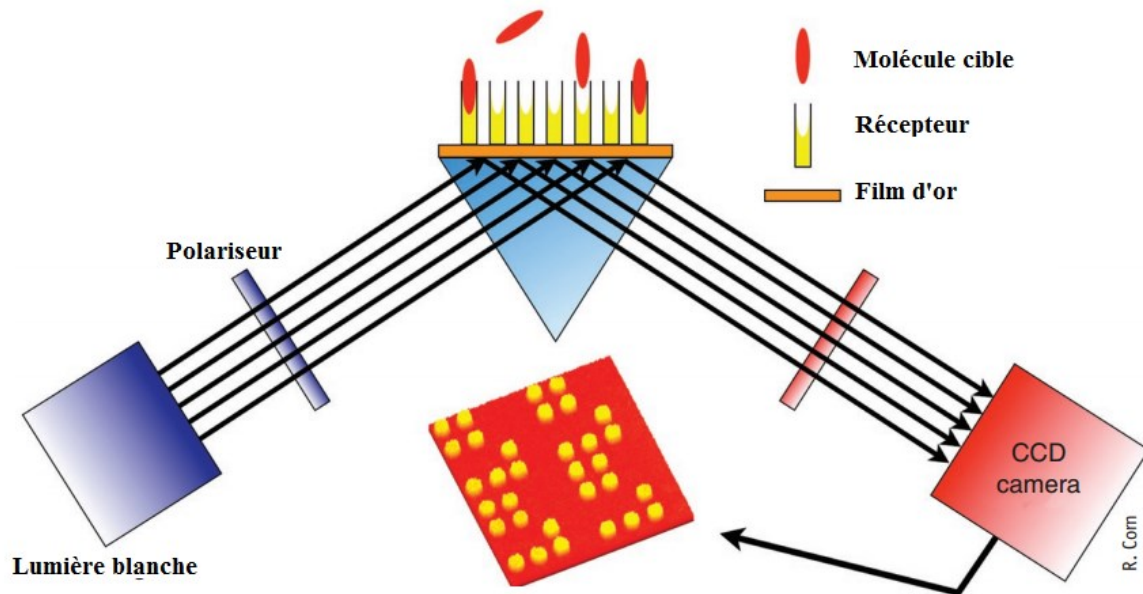


Figure 1.10: Schémas d'un imageur SPR avec fonctionnement par interrogation de l'intensité lumineuse à angle fixe. Copyright © 2015 Nature ²⁸

Dans le cas de la SPRi, un spectrophotomètre simple ou une barrette de diodes ne peuvent pas être utilisés, car ceux-ci ne permettent pas de produire des images en fonction de la position sur un capteur avec une résolution acceptable. Pour produire ces images, une caméra à dispositif à couplage de charge (CCD) est utilisée. Une caméra CCD est faite d'une surface de pixels eux-mêmes composés de semi-conducteurs pouvant transformer le signal lumineux en signal électrique. Ici, la résolution est dépendante du nombre de pixels.

Il est aussi possible de faire de la SPRi en utilisant le déplacement de la bande de la réflectivité en fonction de l'angle. ²⁹ Ce genre d'expérience peut être produit avec le même type d'instrument. Par contre, dans le cas présent, tous les angles seront balayés en continu et c'est la position du minimum de la bande qui sera suivie. Comme dans le cas d'un spectrophotomètre simple, un gain de résolution sera obtenu au niveau du spectre, mais la rapidité d'acquisition de ces spectres sera grandement diminuée.

1.2.3 Applications

Comme il a été vu dans les sections précédentes, la SPR est une technique analytique simple offrant une grande sensibilité. C'est pourquoi son application principale se trouve dans le domaine de la détection de biomolécules en temps réel.

En effet, la SPR est largement utilisée pour faire la quantification de biomolécules comme des protéines, des brins d'ADN ou d'ARN.³⁰ Certaines stratégies ont été développées afin d'effectuer la détection de petites molécules qui sont habituellement difficiles à quantifier en SPR dû à leur faible masse.³¹ En jumelant ces caractéristiques de la SPR à ceux de la SPRi, il est possible de créer des surfaces pouvant quantifier jusqu'à une centaine de biomolécules sur un seul capteur, le tout en temps réel. Il est possible avec ce genre de capteur de faire du criblage à haut débit afin d'identifier des marqueurs potentiels.

La SPRi a déjà été utilisée par le passé pour faire de l'imagerie de structures physiques. En effet, Edgar D. Goluch de l'Université de Northeastern a utilisé la SPRi pour caractériser l'adhésion de biofilm sur différentes surfaces.³² Dans le même ordre d'idée, le groupe de recherche de Robert Corn a détecté l'adsorption de nanoparticules d'or sur un capteur et d'en produire des images SPRi.³³ Ces travaux démontrent qu'il est possible de caractériser et de quantifier des structures physiques en SPR et d'en produire des images en SPRi. Ainsi, la SPRi est une technique de choix pour quantifier les protéines dans une structure comme un tissu biologique.

1.3 La spectrométrie de masse par ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI-MS)

Dans cette section, le thème de la spectrométrie de masse par ionisation-désorption laser assisté par matrice sera abordé. Un bref historique du MALDI-MS, la théorie des phénomènes physiques derrière le MALDI-MS ainsi que les principes expérimentaux y seront étudiés. Ces éléments sont indispensables à la bonne compréhension du MALDI-IMS qui est au cœur des

travaux présentés dans ce mémoire. La MALDI-IMS sera utilisée afin de produire des images qualitatives d'empreintes de tissus biologiques. Ce sont grâce à ces images qu'il sera possible de mieux caractériser le matériel préalablement quantifié en SPRi. Il est donc essentiel de bien comprendre les particularités de cette technique.

1.3.1 Historique

La spectrométrie de masse a vu le jour en 1897 lorsque J. J. Thomson a construit un appareil capable de faire dévier un gaz d'ions à l'aide d'un champ électrique. Ainsi, il a pu identifier le ratio charge sur masse des ions contenus dans le gaz.³⁴ Deux ans plus tard, Thomson a fabriqué un appareil semblable qui cette fois mesure le ratio charge sur masse et permet de mesurer la valeur de la charge et ainsi trouver la masse des ions. Ses travaux sur ce sujet lui ont permis de découvrir l'électron et de gagner le prix Nobel de physique de 1906. Il a fallu attendre le début des années 1940 pour voir apparaître les premiers spectromètres de masse commerciaux.

Au début des années 1980, la MS était bien implantée dans les laboratoires et l'identification de petites molécules organiques avec cette technique était courante. Par contre, l'identification par spectrométrie de masse de molécules plus haut poids moléculaire comme les peptides, les protéines et autres macromolécules constituait encore un défi de taille. Des méthodes comme le bombardement d'atomes rapide (FAB) et la désorption plasma avec ionisation par nébulisation thermique arrivaient à effectuer ces analyses, mais seulement à des concentrations très élevées de ces macromolécules.

Il a fallu attendre 1988 pour le développement de l'ionisation par électro nébulisation (ESI) et de l'ionisation-désorption laser assistée par matrice (MALDI). Cela a permis de simplifier l'identification de protéines et de peptides par spectrométrie de masse.³⁵ Ce sont Franz Hillenkamp et Michael Karas qui ont développé le MALDI en faisant des expériences pour cartographier les ions Ca^{2+} dans des cellules musculaires cardiaques en utilisant un analyseur de

masse par microscopie laser (LAMMA).^{35, 36} Depuis, le MALDI-MS est en plein essor dans le domaine de l'analyse des biomolécules de tous genres, surtout grâce à sa capacité d'imagerie.

1.3.2 Théorie et instrumentation

Peu importe la technique ou l'instrument utilisé, la MS peut se résumer en étapes bien distinctes : l'ionisation, l'analyse et la détection (Figure 1.11).

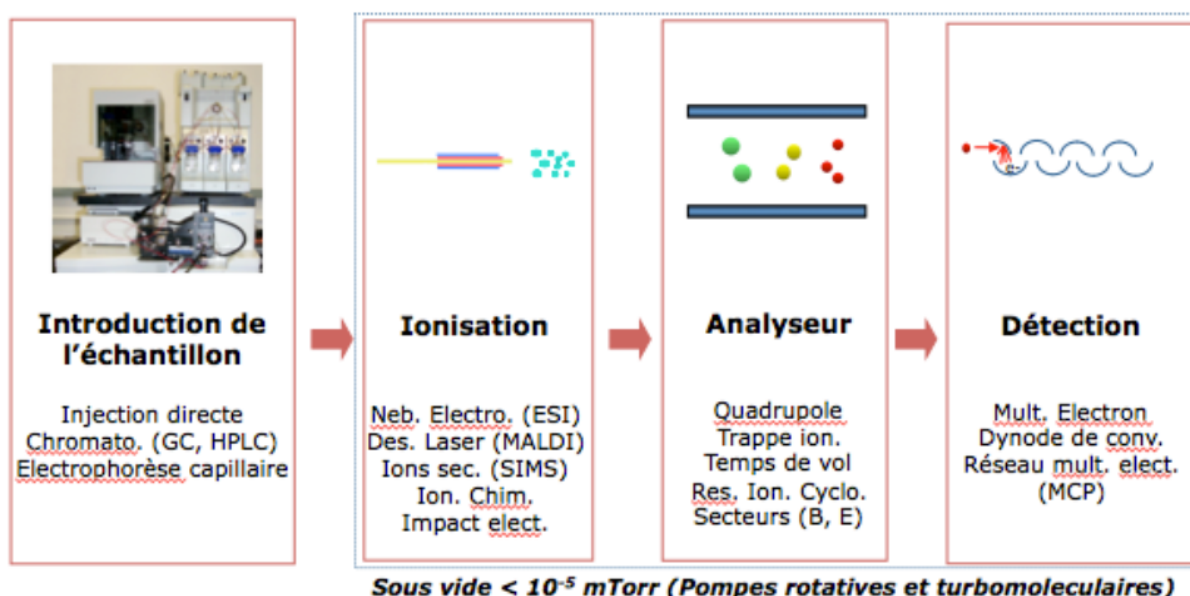


Figure 1.11: Les composantes d'un spectromètre de masse. Note de cours CHM6160 – reproduction autorisée par Pierre Thibault

Le MALDI-MS ne déroge pas de cette règle. En effet, même si plusieurs types et géométries d'instruments MALDI-MS sont retrouvés sur le marché, chacune de ces étapes est bien présente avec leurs particularités bien propres.

Pour ce qui est de l'introduction de l'échantillon dans le spectromètre de masse dans un instrument MALDI, celle-ci peut être effectuée d'une seule façon. En effet, bien que l'échantillon puisse être traité préalablement avec diverses méthodes comme la

chromatographie liquide (LC)^{37, 38}, l'électrophorèse capillaire (EC)^{39, 40}, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE)⁴¹ et autres⁴², il ne reste que la matrice doit être incorporé à l'échantillon et être déposé une plaque conductrice lors de l'utilisation d'un analyseur par temps de vol. Par la suite, l'échantillon co-cristallisé est introduit dans le spectromètre.

1.3.2.1 Ionisation-désorption laser

La production et la désorption des ions en MALDI sont des phénomènes complexes dont la compréhension est très importante. Cette étape a beaucoup d'impact sur l'analyse au niveau du nombre d'ions produits, de la fragmentation des molécules et de l'état de charge. La complexité de ce phénomène est surtout due au nombre de mécanismes impliqués.⁴³

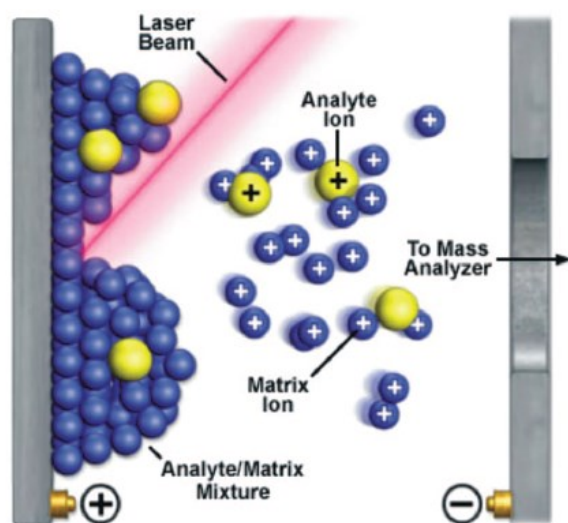


Figure 1.12: Représentation schématique de l'ionisation et de la désorption laser dans une source MALDI-MS. Copyright © 2008 National High Magnetic Field Laboratory ⁴⁴

La désorption laser de l'échantillon fonctionne par l'ablation des cristaux de matrice contenant l'analyte suite au transfert de l'énergie du laser. Cette irradiation cause une grande concentration d'énergie en un point précis de l'échantillon. L'énergie, une fois libérée sous forme thermique, sublime la matrice et provoque la désorption des cristaux de matrice et de l'analyte. Il s'en suit une expansion en phase gazeuse sous la forme d'une plume de désorption comme illustrée dans la Figure 1.13. Les ions présents dans cette plume de désorption sont par la suite accélérés par un champ électrique et dirigés vers l'analyseur de masse.

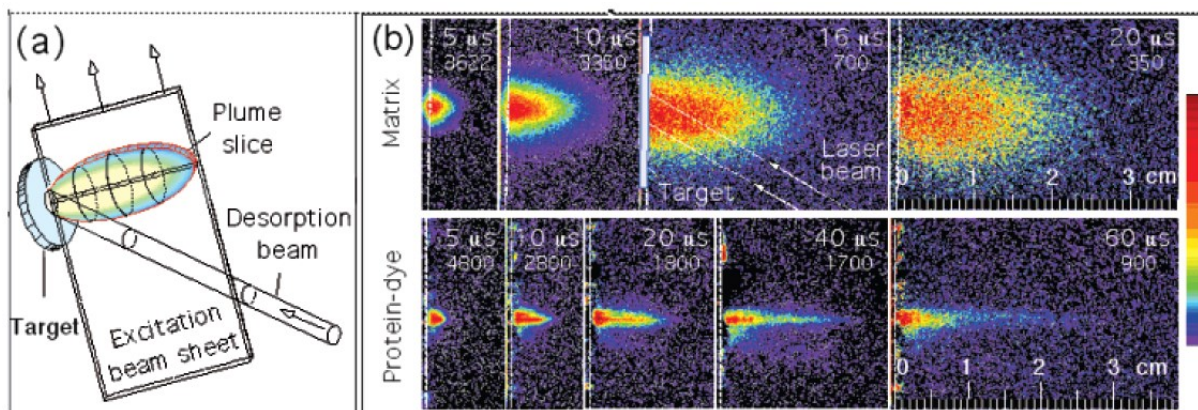


Figure 1.13: Représentation schématique (a) et images de fluorescence de la plume de désorption (b). "Reprinted (adapted) with permission from: The desorption process in MALDI. Copyright 2003 American Chemical Society.⁴⁵

Les lasers utilisés en MALDI vont de l'infrarouge (IR) lointain à l'ultraviolet (UV). Les spectres de masse obtenus avec les deux types de lasers sont très semblables. Les lasers UV, plus hauts en énergie que les lasers IR, provoquent un peu plus de fragmentation. Les lasers IR sont donc utilisés lorsqu'une ionisation plus douce est requise. De plus, la distance de pénétration des lasers IR est plus importante ce qui se résulte en un plus grand volume d'échantillon éjecté par pulsation laser.⁴⁶

Pour obtenir un bon signal en MALDI, le paramètre laser le plus important est la quantité d'énergie totale par impulsion, donc le flux d'énergie apporté à l'échantillon.⁴⁷ En général, le flux d'énergie correspond à 20 mJ/cm^2 sur un diamètre d'impact variant de 5 à 250 μm . Le flux d'énergie varie en fonction de la capacité de la matrice à absorber l'énergie du laser.

Tableau 1.1: Type de laser utilisé en MALDI

Laser	Longueur d'onde	Énergie (eV)	Durée d'impulsion
Azote (N₂)	337 nm	3.68	5 ns
Nd : YAG 3^e harmonique	355 nm	3.49	1 ns
Nd : YAG 4^e harmonique	266 nm	4.66	5 ns
Er : YAG	2.94 µm	0.42	85 ns
CO₂	10.6 µm	0.12	100 ns

En MALDI, la matrice est grandement responsable de l'ionisation et de la désorption de l'échantillon. Elle est habituellement présente dans l'échantillon dans un ratio de 10^3 - 10^5 par rapport à l'analyte.⁴⁸ Ce large excès de matrice par rapport aux molécules cibles rend le MALDI plus sensible que les autres méthodes d'ionisation laser. En effet, les molécules d'analytes se voient isolées les unes des autres évitant ainsi la formation d'agrégats qui inhibent la formation des ions moléculaires. De plus, en absorbant la majorité de l'énergie du laser, la matrice minimise les dommages que pourrait subir les molécules analytes, ce qui améliore la sensibilité de la technique. Comme il a été mentionné, un des rôles principal de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser ce qui cause une désorption explosive des cristaux contenant l'analyte. Comme montré dans le Tableau 1.2, il existe plusieurs molécules utilisées comme matrice pour produire des analyses sur une large gamme de classe de molécules.

Tableau 1.2: Principales matrices utilisées en MALDI selon la classe de molécules analysées et selon le mode d'ionisation⁴⁹

Matrice	Masse moléculaire (Da)	Classe de molécules	Mode d'ionisation
Acide sinapinique (SA)	224.21	Protéines	Positif
Acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)	189.17	Protéines, peptides, drogues	Positif
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB)	154.12	Peptides, drogues, lipides	Positif
9-aminoacridine	194.23	Drogues, lipides	Négatif
2,6-dihydroxyacetophénone	152.15	Lipides	Positif, négatif
2-mercaptobenzothiazole (NBT)	167.25	Lipides	Positif
1,5-diaminonaphtalène	158.20	Protéines, lipides	Positif, négatif
Acide férulique	198.18	Protéines	Positif
2,4-dinitrophénylhydrazine	198.14	Peptides	Positif

Afin de bien jouer son rôle, la matrice doit posséder plusieurs propriétés : elle doit co-cristalliser avec l'analyte, avoir une faible pression de vapeur, être inerte envers l'échantillon, produire peu d'ions interférents et absorber fortement à la longueur d'onde du laser. Un autre rôle de la matrice est d'ioniser l'analyte.

Une revue de la littérature permet de comprendre rapidement que le mécanisme d'ionisation des molécules cibles ne fait pas l'unanimité.⁵⁰ Plusieurs mécanismes ont été

proposés comme la photo-ionisation en phase gazeuse, le transfert de proton, les réactions ions-molécules et la désorption des ions préformés. Les mécanismes les plus cités sont la désorption des ions préformés et la photo-ionisation en phase gazeuse.

En effet, la plupart des molécules utilisées comme matrice cocrystallisent avec l'échantillon et comportent des groupements acides et/ou basiques pouvant protoner ou déprotoner les molécules cibles.^{51, 52} Ainsi, les molécules cibles seraient ionisées en solution par la matrice et le tout co-cristalliserait. Finalement, le cristal résultant est désorbé par le laser et les molécules cibles préalablement ionisées par la matrice qui survivent au processus de désorption se dirigent vers l'analyseur. Ce scénario se nomme «Lucky Survivor» (Figure 1.14).

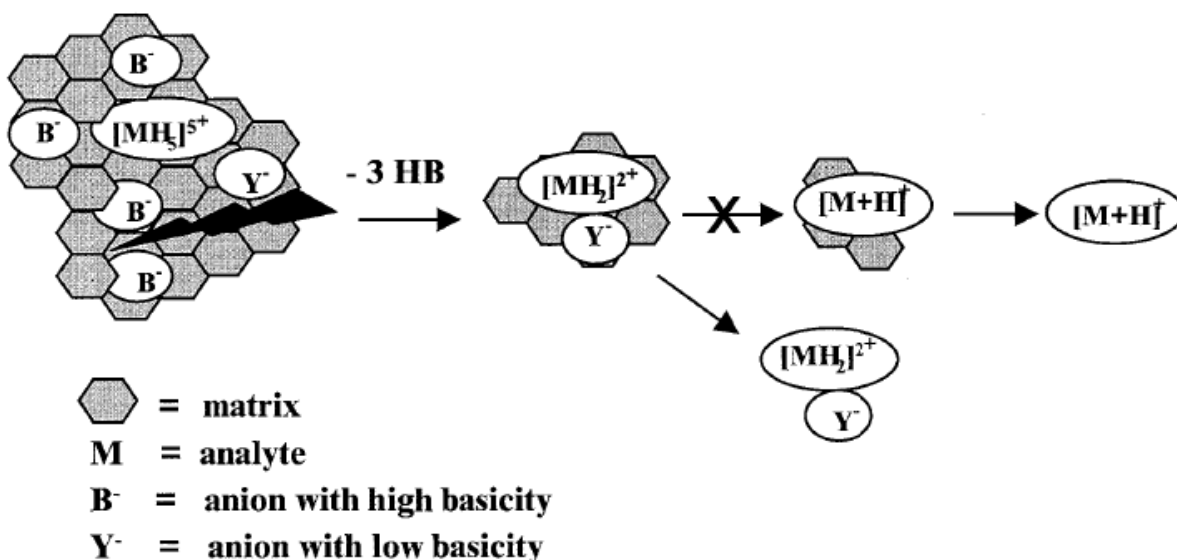
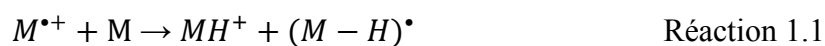


Figure 1.14: Illustration du modèle du «Lucky Survivor»⁵³

Le scénario du «Lucky Survivor» est cependant très critiqué dans la littérature. En effet, quelques problèmes et limitations ont été soulevés avec ce modèle comme la présence de contre

ions négatifs en solution pouvant grandement affecter la sensibilité du signal en neutralisant les ions d'analytes.⁵⁴

L'autre scénario en compétition avec celui du «Lucky Survivor» est le mécanisme de l'ionisation en phase gazeuse.^{55, 56} Ce mécanisme stipule que les molécules cibles restent majoritairement neutre lorsqu'elles cocrystallisent avec la matrice et que le processus d'ionisation se produit lors de la désorption laser. Deux types de réactions seraient en œuvre dans ce scénario d'ionisation : les réactions matrice/matrice et les réactions matrices/analytes.⁵⁷ Les réactions matrice/matrice produiraient, avec l'énergie résiduelle de la désorption, des molécules de matrices ionisées et des radicaux selon les mécanismes suivants :



Par la suite, les ions de matrices protoneraient l'analyte par transfert de charge lors de réactions matrices/analytes. Le transfert de protons entre la matrice et l'analyte serait grandement influencé par la différence d'affinité protonique entre les deux molécules. En effet, une matrice possédant une affinité protonique plus faible que l'analyte améliore grandement la sensibilité.⁵⁸



1.3.2.2 Analyseur par temps de vol (TOF)

En 1948, Cameron et Eggers⁵⁹ publient les premiers plans pour un modèle d'analyseur par temps de vol d'après les principes décrits par Stephens⁶⁰ en 1946. Puis, c'est en 1955 que les premiers analyseurs TOF voient le jour à des fins commerciales⁶¹, mais ce n'est qu'avec l'arrivée des ordinateurs pour traiter le grand nombre de données et avec le MALDI que les analyseurs TOF prennent une plus grande part de marché dans la MS.

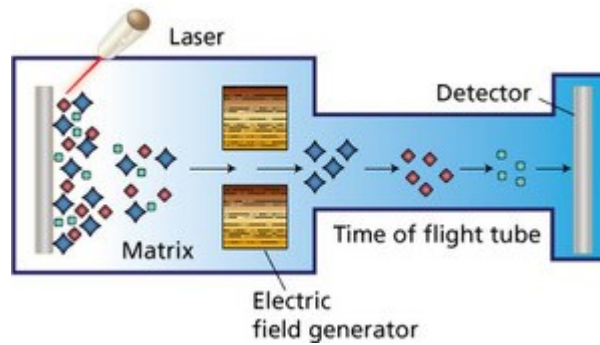


Figure 1.15: Schémas d'un spectromètre de masse avec analyseur TOF
 (<http://www.stevenaccardo.com/instrumentation/>)

Le principe des analyseurs TOF est basé sur le temps que prend un ion pour se rendre au détecteur dans un tube sous vide et libre de champs à partir de la source. En effet, comme il a été mentionné plus tôt, une fois en phase gazeuse, les ions de même charge sont accélérés avec la même énergie cinétique dans la source d'ionisation par une différence de potentiel et dirigés vers le tube de vol. La séparation des ions se produit selon la différence de vitesse de chacun d'entre eux. Comme l'énergie potentielle donnée à chaque ion est la même, la vitesse des ions est seulement dépendante de sa masse sur charge.

$$\frac{mV^2}{2} = qV_s = zeV_s = E_c \quad (1.5)$$

Où m représente la masse de l'ion, V sa vitesse, q sa charge, V_s le potentiel appliqué par l'électrode dans la source, z le nombre de charges, e la charge élémentaire et E_c l'énergie cinétique. De plus, la distance parcourue par les ions est connue et fixe, représentée par la distance sans champs du tube de vol.

$$t = \frac{L}{v} \quad (1.6)$$

Où t est le temps prit par l'ion pour parcourir la distance sans champs L du tube de vol à la vitesse v . Finalement, en remplaçant v par $(2zeV_s/m)^{1/2}$ on obtient :

$$t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{L^2}{2eV_S} \right) \quad (1.7)$$

Cette équation relie directement le temps de vol d'un ion à son rapport masse sur charge m/z . Donc, selon la même équation, plus le rapport masse sur charge de l'ion est faible moins il prendra de temps à atteindre le détecteur. Ce type d'analyseur requiert toutefois que le temps zéro, le signal de départ des ions, soit connu. C'est pourquoi le MALDI utilise souvent un analyseur TOF, puisque le temps zéro est bien connu, représenté par l'impulsion laser. Les analyseurs TOF n'ont pas de limite virtuelle de masse supérieure pouvant être analysée, ce qui est pratique en MALDI où les analytes peuvent avoir des masses jusqu'à plus de 300 kDa.^{61, 62} De plus, les lasers utilisés en MALDI sont très rapide avec des durées d'impulsion de 1-100 ns et un analyseur TOF peut enregistrer jusqu'à 1000 unités de masse par microseconde grâce à la séparation temporelle des ions.

La résolution des pics obtenus par TOF est obtenue en dérivant l'équation reliant t à la m/z des ions.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{t}{2\Delta t} \quad (1.8)$$

Où Δm et Δt correspondent à la largeur de pic à mi-hauteur pour des spectres avec des échelles de masses et de temps de vol. Ainsi, il est possible de trouver que la résolution est proportionnelle au temps de vol de l'ion dans le tube. Donc, pour augmenter la résolution spectrale obtenue avec un analyseur TOF, la stratégie la plus utilisée est d'allonger la distance du tube de vol. Plus le tube est long, plus les ions y passent de temps et plus ceux-ci se séparent selon leurs masses respectives ce qui augmente la résolution des spectres.

Le manque de résolution spectrale des analyseurs TOF a longtemps été un problème pour les instruments qui en étaient équipés. En effet, la distribution temporelle, spatiale et d'énergies cinétiques imposées aux ions de même masse en source causaient une perte de résolution. L'impulsion laser, bien que très brève (1-100 ns), cause une distribution temporelle pour les ions de même masse. Dans ce cas, le temps zéro n'est pas le même pour les ions et cela causera une perte de résolution. Par la suite, les irrégularités de l'échantillon et l'emplacement

des ions dans celui-ci fait en sorte que le point de départ des ions de même ratio masse sur charge ne passeront pas le même temps dans la zone avec champs où les ions sont accélérés. Ainsi, les ions n'auront pas la même vitesse de vol dans la zone sans champs puisqu'ils auront reçu la même quantité d'énergie provenant du champ électrique en source. Finalement, il existe aussi une distribution des énergies cinétiques en source pour les ions de même m/z dut à des variations de vitesses initiales de chacun des ions. Cette distribution provient de la formation des ions et cause elle aussi une perte de résolution spectrale. Afin de pallier à ces problèmes, deux systèmes ont été développés s'ajoutant aux instruments MS avec analyseurs TOF : le réflectron et l'extraction retardée.

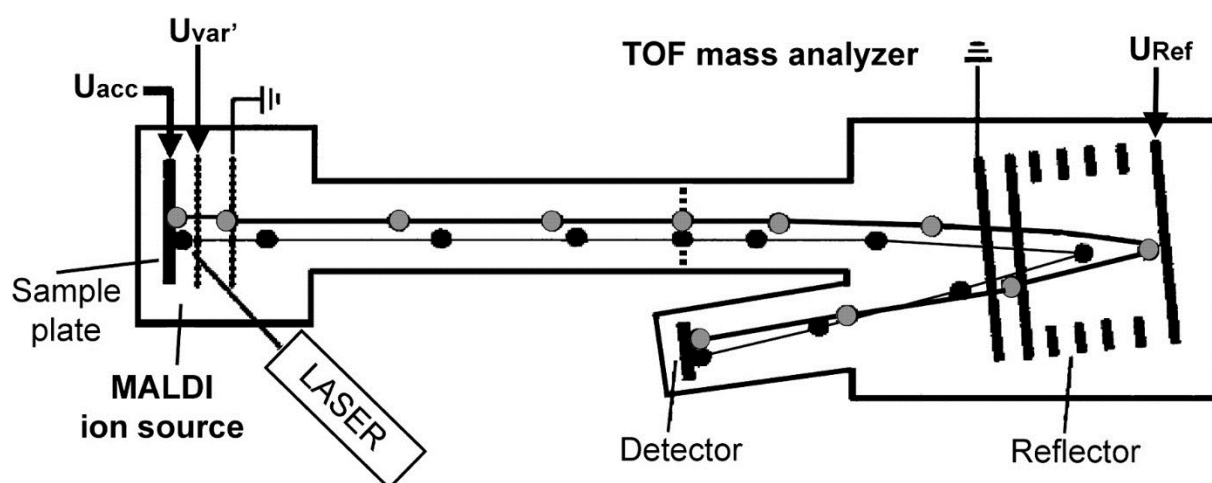


Figure 1.16: Schémas d'un spectromètre de masse MALDI-TOF/MS avec réflectron ⁶³

Proposé pour la première fois en 1973 par Mamyrin B.A., le réflectron, aussi appelé réflecteur ou miroir électrostatique, est une technologie utilisée afin d'augmenter la résolution spectrale en TOF-MS ^{64, 65}. Un réflectron est composé d'une série d'électrodes qui impose un champ électrostatique retardateur aux ions qui lui sont dirigés. Le réflectron est disposé au fond du TOF avec un léger angle afin de diriger les ions vers un détecteur. Un ion entrant dans un réflectron verra sa vitesse diminuer jusqu'à un arrêt complet par le champ électrostatique produit

par les électrodes du réflectron. Par la suite, l'ion sera accéléré vers le détecteur par le même champ électrostatique. Le réflectron augmente la résolution spectrale en corrigeant la dispersion temporelle des ions de même m/z dans le TOF. En effet, un ion possédant plus d'énergie cinétique qu'un autre ion de même m/z aura un plus long parcours dans le réflectron, focalisant ainsi le faisceau d'ions. Finalement, en redirigeant les ions, le réflectron augmente aussi la distance de vol, ce qui augmente encore plus la résolution.

Un autre système utilisé pour augmenter la résolution spectrale est l'extraction retardée développée par Wiley et McLaren dans les années 50. L'extraction retardée corrige elle aussi la distribution des ions de même m/z causée par les variations d'énergie cinétique en source. En mode d'extraction continue, les ions sont immédiatement accélérés dès leur formation dans la source. Un ion ayant une vitesse initiale supérieure atteindra donc le détecteur plus rapidement qu'un autre ion de même m/z . Pour corriger ce problème, l'extraction retardée impose une période sans champ lors de la formation des ions, puis, après une période de temps prédéterminée, un champ électrostatique est appliqué pour accélérer les ions vers le détecteur. Ainsi, les ions plus rapides auront plus progressé vers le détecteur que les autres ions de même m/z moins rapides dans la période sans champ. Lors de l'application du champ, les ions moins rapides passeront plus de temps dans la zone avec champs et seront donc plus accélérés que les ions initialement plus rapides. Le résultat est un regroupement des ions de même m/z au niveau du détecteur et une augmentation de la résolution est alors observée.

1.4 Applications en imagerie MS

Le spectromètre de masse MALDI-TOF peut être configuré pour faire de l'imagerie. L'imagerie MALDI consiste en la cartographie d'un échantillon avec le laser. En enregistrant un spectre complet à chacun des pixels préétablis, il est possible de créer des images montrant l'intensité de chacun des m/z en fonction de leur position dans l'échantillon.

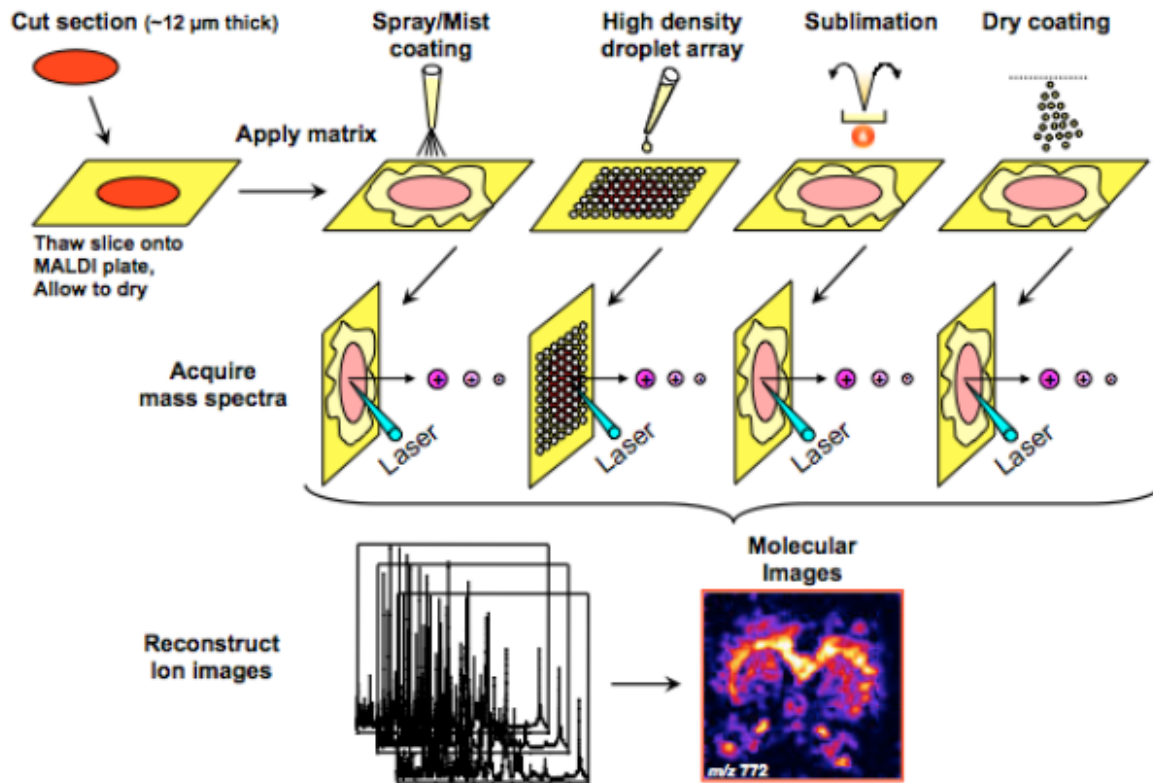


Figure 1.17: Protocole général d'imagerie MALDI REF

Une analyse MALDI-IMS requière quelques modifications des protocoles. Toutes étapes préalables à l'analyse MALDI-IMS ne doivent pas ou le moins possible délocaliser le matériel de l'échantillon de départ. Pour ce faire, des lavages passifs et des méthodes de dépositions de matrice spécifiques sont utilisés (Figure 1.17).

Il a été démontré à maintes reprises que la MALDI-IMS est capable de donner des informations sur la présence, l'absence ou l'accumulation de biomolécules comme les protéines, les lipides et le cholestérol.⁶⁶ Ces informations peuvent être révélatrices dans le cadre du diagnostic de certaines pathologies comme les cancers, l'Alzheimer et le Parkinson.^{67, 68} Le MALDI-IMS est aussi un outil de recherche important dans des analyses protéomiques ou dans les études histologiques où l'étude de la repartions des métabolites est étudiée.⁶⁹

Les travaux faits en MALDI-IMS montrent que celle-ci correspond à la technique de choix pour effectuer de l'imagerie de protéines provenant de tissus biologiques. Ainsi, il sera possible de faire une caractérisation des protéines adsorbées à la surface du senseur SPRi en fonction de leur position et d'obtenir plusieurs images en fonction des ions présents.

1.5 Objectifs de recherche

L'objectif principal poursuivi dans ce mémoire sera d'effectuer le couplage de la SPRi et de la MALDI-IMS dans le but d'obtenir des images informant sur la quantité et la nature de protéines dans des coupes de tissus biologiques. La SPRi sera utilisée afin de produire des images quantitatives. Pour ce faire, la modification d'un imageur SPR commercial devra être produite afin de permettre l'introduction de l'échantillon dans l'instrument. Puis, la chimie de surface du capteur SPRi devra être étudiée afin de déterminer son impact sur le matériel adsorbé. Les protéines seront ainsi transférées d'une section tissulaire vers une surface fonctionnalisée. Le MALDI-IMS sera quant à lui, utilisé pour caractériser le matériel préalablement adsorbé à la surface. Pour ce faire, une méthode de déposition de matrice réduisant la délocalisation des protéines transférées sera utilisée. Finalement, le grand défi sera de produire un protocole d'analyse unique pour les deux méthodes afin d'obtenir de façon successive une image SPRi et une image MALDI-IMS à partir d'une coupe tissulaire unique. Pour ce faire, les gammes dynamiques des instruments utilisés devront être étudiées afin d'obtenir les informations désirées. De plus, une étude de la cinétique de transfert devra être produite afin de maximiser la qualité des images produites par les deux méthodes. Tous ces travaux permettront de produire les premières images SPRi et IMS répertoriées dans la littérature pour des coupes tissulaires.

Chapitre 2 Partie expérimentale

2.1 Préparation des tissus biologiques

Tous les tissus biologiques utilisés lors des expériences ont été obtenus avec le consentement du comité d'éthique de la recherche en santé (CERES) de l'Université de Montréal. Une fois âgées de 30 jours, les souris sont sacrifiées par asphyxie en augmentant graduellement la concentration de CO₂ dans leur cage. Une fois sacrifiées, les souris sont disséquées et les organes d'intérêts sont prélevés et congelés lentement dans de l'azote liquide. Par la suite, les organes sont enveloppés dans du papier d'aluminium, étiquetés et entreposés dans un congélateur à -80 °C jusqu'à leur utilisation.

2.1.1 Préparation des homogénats de foie de souris

La méthode de préparation des homogénats de foie de souris a été fortement inspirée de la méthode développée par Groseclose et Castellino.⁷⁰

Deux ou trois foies de souris congelées ont été coupés en petits morceaux avec une lame de rasoir, selon la quantité d'homogénat nécessaire. Ceux-ci ont été insérés dans un vial de plastique. Par la suite, le vial contenant les morceaux de foie a été placé dans de l'eau glacée pendant 5 minutes afin de décongeler les morceaux de foie sans qu'ils n'atteignent température pièce. Puis, un volume équivalent de petites billes en métal magnétique préalablement nettoyées avec une solution d'isopropanol 70% ont été ajoutés dans le vial. Le vial a par la suite été agité manuellement et à l'aide d'un vortex durant une minute puis été mit dans l'eau glacée durant une minute. La procédure a été répétée jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène. Ensuite, les billes magnétiques sont retirées du vial à l'aide d'un aimant et en prenant garde à ne pas retirer trop de foie avec les billes. Finalement, le mélange de foie obtenue est centrifugée dans le vial pendant 30 secondes à 1500 rpm afin de rassembler la mixture dans le fond du vial. Le vial doit être identifié avec la date de la préparation et l'origine des foies utilisées et être entreposé à -80 °C jusqu'à son usage futur.

Un moule négatif est ensuite préparé pour accueillir l'homogénat de foie préparé antérieurement en versant du composé transparent pour coupe congelé (polyvinyle alcool et polyéthylène glycol) dans un fond de vial de plastique de 1 cm de diamètre. Par la suite, une tige de métal d'un diamètre de 5 mm est insérée dans le composé pour coupe congelé. Le tout est mis à -25 °C pendant une heure pour faire durcir le polymère et pour s'assurer que la tige de métal reste bien droite. La tige de métal est retirée délicatement du bloc de polymère pour obtenir le moule final. L'homogénat est dégelé en mettant le vial dans de l'eau glacée. Finalement, l'homogénat est transféré dans le moule de polymère à l'aide d'une pipette Pasteur en s'assurant de ne pas y incorporer de bulles d'air. Le tout est congelé à -80 °C pour 12 heures. Il est bien important que la température de la mixture de foie ne dépasse jamais 4°C lors de la préparation, car cela pourrait entraîner la digestion de certaines protéines par les enzymes contenues dans le foie.

2.1.2 Préparation des coupes tissulaires

Toutes les coupes de tissus biologiques ont été faites avec un cryostat Leica CM3050 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Allemagne). La température de l'enceinte du cryostat est réglée à -25 °C tandis que la température de la tête de coupe est réglée à -15°C. Tous les tissus ont été montés sur des lames de microscope en borosilicate de dimensions variées selon les besoins de l'expérience.

L'organe voulu a été sorti du congélateur -80 °C et mis le plus rapidement possible dans l'enceinte du cryostat. L'organe peut être coupé après environ 15 minutes, le temps que celui-ci atteigne la température -25 °C ce qui facilite sa coupe. Par la suite, l'organe a été monté sur la tête de coupe et taillé jusqu'à ce que toute la glace pouvant s'accumuler sur la surface du tissu soit retirée. Puis, le guide de verre du cryostat a été abaissé et une coupe à 20 µm d'épaisseur fût faite. La coupe doit être aplatie délicatement avec un pinceau à poil long puis déplacée sur la lame de microscope. Une fois le tissu bien en place, la lame de microscope a été apportée tranquillement à température pièce afin de fixer le tissu. Les coupes effectuées ont été mises

dans un dessiccateur pour 15 minutes. Par la suite, afin de retirer le maximum de lipides avant les analyses, les coupes ont été trempées 30 secondes dans une solution d'isopropanol 70% puis 30 secondes dans une solution d'isopropanol 90%. Finalement, les coupes ont été remises au dessiccateur 15 minutes jusqu'à leur utilisation.

2.1.3 Préparation des coupes tissulaires colorées à l'hématoxyline et à l'éosine

La méthode de coloration utilisée sur les coupes de tissus biologiques est basée sur la méthode traditionnelle de coloration à hématoxyline et l'éosine (H&E). La coupe à colorer au H&E est sortie du dessiccateur et plongée 30 secondes dans une solution d'éthanol 95%, 30 secondes dans une solution d'éthanol 70%, 30 secondes dans de l'eau Milli-Q, 120 secondes dans une solution d'hématoxyline, 20 secondes dans de l'eau Milli-Q, 30 secondes dans une solution d'éthanol 70%, 30 secondes dans une solution d'éthanol 95%, 60 secondes dans une solution d'éosine, 30 secondes dans une solution d'éthanol 95% et 30 secondes dans une solution d'éthanol 100%. La coupe ainsi colorée a été séchée dans un dessiccateur pour une période de 12h.

2.2 Analyse en imagerie SPR

2.2.1 Instrumentation

Toutes les analyses SPRi ont été faites avec un imageur SPRi Lab+ d'Horiba et l'acquisition des données a été faite avec le logiciel SPRi-View L4.0. Les prismes utilisés avec l'imageur étaient composés de SF11 (indice de réfraction de 1.7847) et sur mesure selon les plans fournis en annexe.



Figure 2.1: Instrument d'imagerie SPR d'Horiba (SPRi-LAB+)⁷¹

L'imageur SPRi Lab+ d'Horiba a été conçu pour faire des mesures de cinétiques en solution avec un faisceau à angle fixe pour la durée de l'acquisition et non pour faire de l'imagerie comme présentée dans ce mémoire. En effet, cet instrument a été utilisé afin de quantifier en temps réel l'adsorption de molécules cibles sur une surface possédant une chimie de surface favorisant seulement l'adsorption des molécules cibles. De plus, l'échantillon y est sous forme liquide et introduit via une cellule fluïdique fermée. Plusieurs modifications à l'imageur ont donc dû être réalisées afin de pouvoir obtenir les résultats présentés.

2.2.1.1 Modification à la cellule fluïdique

La cellule fluïdique a deux rôles dans l'imageur SPR; le premier est de maintenir en place le prisme et le deuxième est d'assurer l'étanchéité et la circulation de l'échantillon sur la surface du capteur. Dans le cas des expériences présentées dans ce mémoire, la circulation d'une solution n'était pas requise afin de produire les images SPR des tissus biologiques. C'est pourquoi le design d'une nouvelle cellule a dû être effectué afin d'y permettre l'incorporation de l'échantillon biologique monté sur une lamelle.

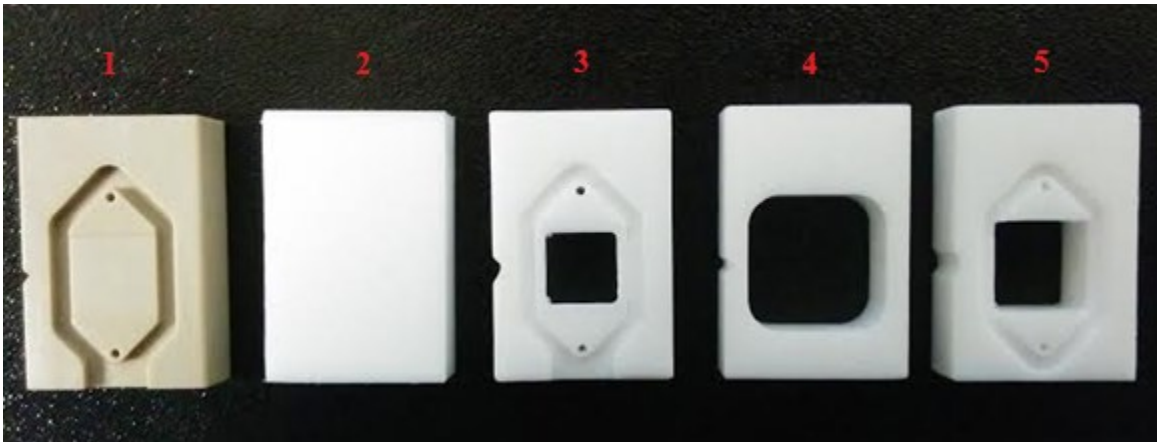


Figure 2.2: Photo des cellules fluidiques conçues lors du projet

En effet, la cellule fluidique originale (1) ne permettait pas d'introduire une coupe tissulaire montée sur une lame de microscope entre la prise des images de référence et les images de transfert sans ouvrir la cellule pour le faire. Une ouverture de la cellule fluidique pour y mettre l'échantillon après l'acquisition de la référence change les conditions et la position du capteur ce qui rend la référence caduque. En effet, il était difficile avec le design de la cellule d'origine de conserver l'alignement lors de l'introduction de l'échantillon. La cellule 2 consiste en un simple bloc rectangulaire. Son design était conçu afin de faciliter la conservation de l'alignement lors de l'ajout du tissu. Malheureusement, deux problèmes ont été soulevés avec cette configuration, soit l'impossibilité d'aligner le prisme suite à une ouverture de la fluidique et la pression exercée sur l'échantillon par la fluidique cause le contact de la membrane avec la surface du capteur ce qui perturbe le signal SPR. Ainsi, afin de pallier à ces deux problèmes une troisième cellule fluidique a été conçue. Celle-ci consiste en la même configuration que la cellule 1, mais avec une ouverture menant à la surface de la membrane en tout temps lors de l'analyse. La cellule 3 a aussi un frein créant un espace entre le tissu et la surface de la membrane pour ne pas appliquer de pression sur la membrane et surcharger le signal SPR. La configuration avec une ouverture a été un changement significatif dans la bonne direction. En effet, il était dorénavant possible de produire les images de référence et les images de transfert sans avoir à ouvrir la fluidique puisque le tissu peut être ajouté par cette ouverture une fois la référence

effectuée. Toutefois, les images de transfert produites avec cette cellule fluïdique ne correspondaient pas à la forme des tissus. Une diffusion latérale importante des protéines dans l'espace entre la membrane et le tissu était l'hypothèse pour expliquer cette délocalisation. En effet, cet espace était rempli avec la solution aqueuse de transfert afin que les protéines puissent migrer jusqu'à la surface du capteur SPR. Par contre, la diffusion latérale était importante, causant une perte de régiosélectivité. Pour diminuer cette diffusion latérale du matériel lors du transfert, tout en conservant les avancés acquis avec la configuration 3, la cellule fluïdique 4 a été produite. Celle-ci consiste en un bloc avec une très grande ouverture. Elle permettait toujours de produire les images sans avoir à ouvrir la fluïdique, mais cette fois-ci le tissu était déposé directement sur la surface de la membrane retirant ainsi l'espace problématique. De plus, en déposant délicatement le tissu sur la membrane, cela ne créait pas de pression trop importante et le signal SPR n'en était pas affecté. Une amélioration de la conservation de la régiosélectivité a été observée immédiatement. Par contre, l'ouverture étant plus grande que la lamelle de borosilicate servant de support au tissu, une partie de la membrane est exposée à l'air ambiant et celle-ci sèche rapidement. En séchant, le transfert s'arrête et il n'est plus possible de produire des images SPR de transfert. Donc, pour pallier à ce problème, la cellule fluïdique 5 a été construite avec une ouverture aux dimensions d'une lamelle de borosilicate et sans espace. Avec cette fluïdique, il fut possible de produire des images SPR de tissus biologiques avec en conservant la régiosélectivité du transfert et de conserver une membrane à la bonne humidité jusqu'à 3 heures. C'est avec cette cellule fluïdique que les images SPR de ce mémoire ont été produites.

Tableau 2.1: Modifications, problématiques et avantages des différents designs de cellule

Numéro de cellule fluidique	Modifications apportées à la fluidique	Avantages par rapport à la fluidique précédente	Problématique
1	N/A	N/A	Incorporation de l'échantillon dans l'imageur
2	Design sans joint d'étanchéité	Conservation de l'alignement lors de l'introduction de l'échantillon	La pression exercée sur la membrane par la cellule fluidique sature le signal SPR
3	Retour au design 1 avec une ouverture vers la surface et un frein pour l'échantillon créant un espace de 1 mm avec la membrane	Aucune pression sur la membrane de nylon, donc le signal SPR est intact	Délocalisation du signal du à l'espace trop grand entre l'échantillon et la membrane
4	Grande ouverture permettant de déposer délicatement l'échantillon sur la membrane	Grande amélioration de la régiosélectivité du transfert	Exposée à l'air, la membrane sèche rapidement et stop le transfert trop tôt
5	Ouverture de la taille de l'échantillon sans écart avec la membrane	La membrane reste humide durant tout le transfert	N/A

2.2.1.2 Modification à l'imageur SPR

Des modifications ont dû être faites sur l'imageur afin de faciliter les manipulations. En effet, toutes les composantes entourant le montage du prisme et de la fluïdique ont été retirées afin de libérer l'accès au montage. Aucune modification aux composantes optiques n'a été faite.

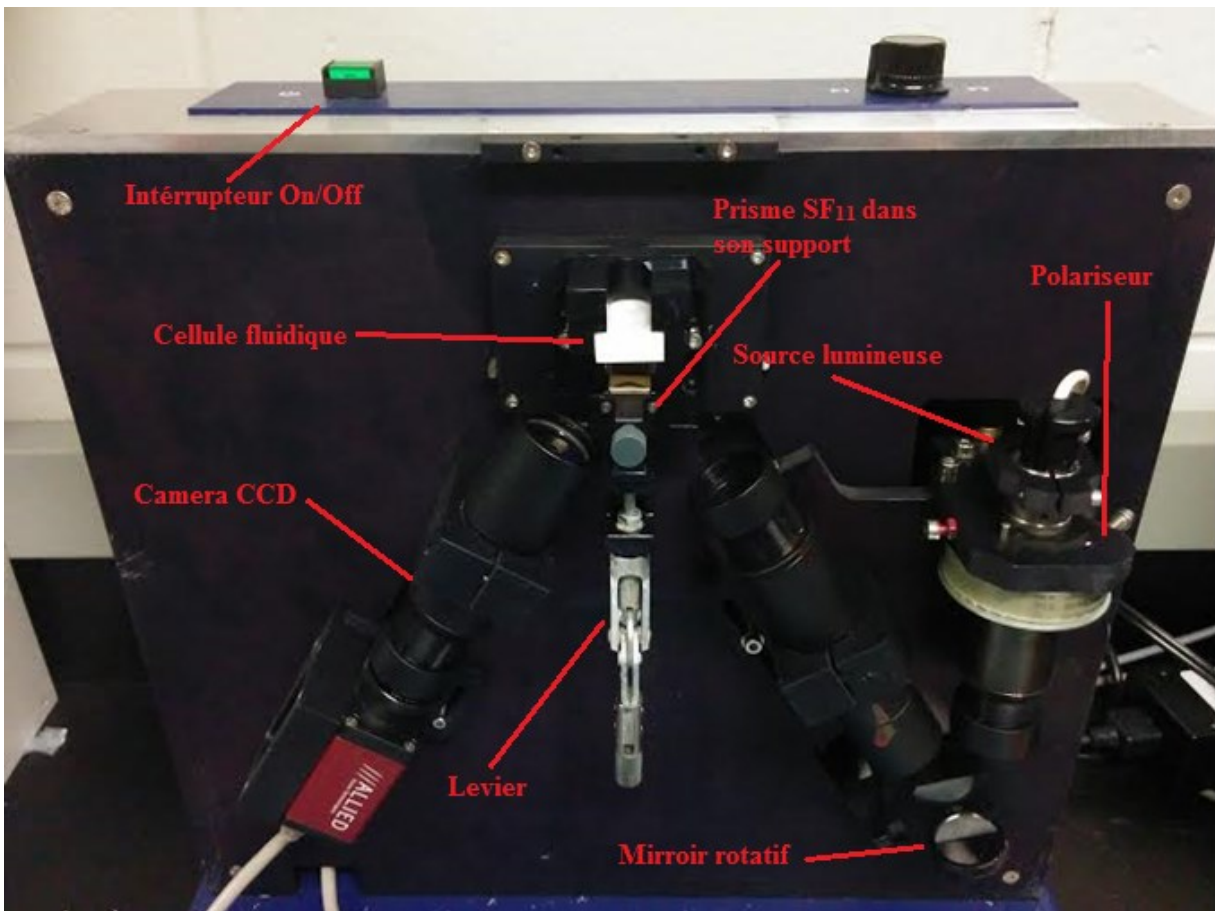


Figure 2.3: Configuration finale avec modifications de l'imageur SPRi-LAB+

2.2.1.3 Préparation des capteurs

Les prismes en SF11 ont été nettoyés dans une solution de piranha (acide sulfurique + peroxyde d'hydrogène 3 :1 v/v) à température pièce pendant 60 minutes. Par la suite, les prismes ont été rincés abondamment avec de l'eau déionisée et de l'éthanol avant d'être séchés avec un jet d'azote. Une fois propre, la face «S3» (Figure A1) des prismes fut recouverte de 2 nm de chrome et de 50 nm d'or en utilisant un évaporateur de métaux E-beam. Une monocouche de dodécane-thiol a ensuite été formée en plongeant les prismes recouverts d'or dans une solution de 1 mM de dodécane-thiol dissous dans du diméthylformamide (DMF) pendant 6 heures. Finalement, les prismes ont été rincés abondamment avec de l'éthanol afin de retirer le surplus de DMF et de dodécane-thiol.

2.2.2 Production des images SPR de tissus biologiques

Une membrane de nylon a été découpée aux dimensions du prisme. Puis, celle-ci fut trempée dans une solution aqueuse contenant 150 mM de formate d'ammonium. La membrane humectée obtenue a été appliquée délicatement sur le prisme. Par la suite, le prisme monté de la membrane de nylon a été inséré dans l'imageur SPR et le tout a été refermé sur la cellule fluïdique.

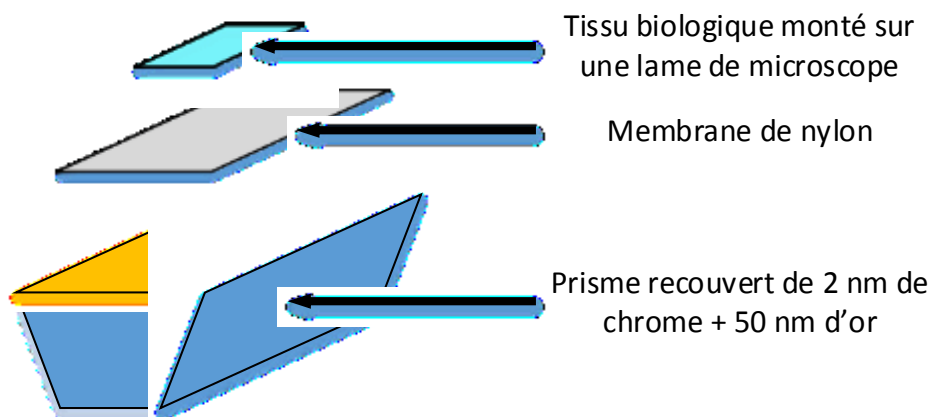


Figure 2.4: Illustration du montage d'imagerie SPR pour transfert de protéines avec membrane

Une série de 100 images à des intervalles de 0.1° de 53.5° à 63.5° ont été prise à l'aide du logiciel SPRi View L 4.0 afin de pouvoir recréer l'image de référence du transfert. Le tissu a été délicatement monté sur la lame de microscope face à la membrane. Finalement, des séries d'images à des intervalles de 0.1° de 53.5° à 63.5° ont été acquises aux temps voulus afin de créer les images SPR de transfert.

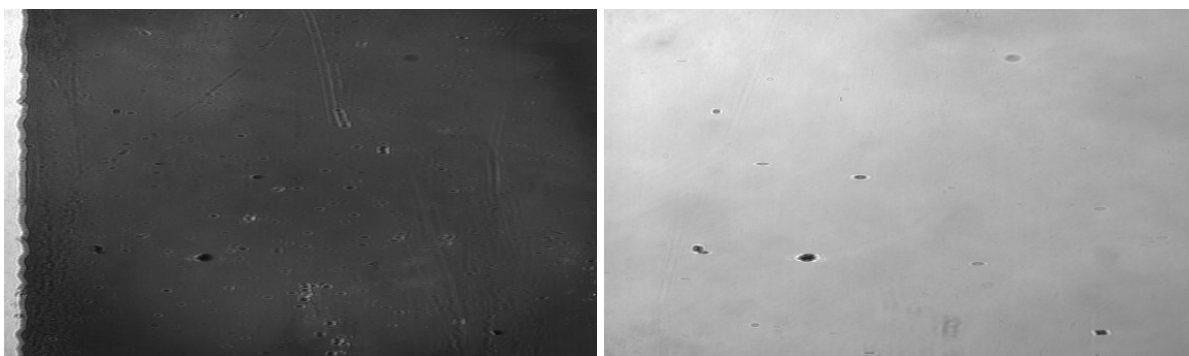


Figure 2.5: Images SPRi acquises à un angle de 60° en polarisation P (gauche) et S (droite), 45 minutes après le début d'un transfert de protéines à partir d'une section tissulaire de rein de souris

Par la suite, le prisme monté de la membrane et de la lame de microscope ont été retirés de l'imageur et le tout a été séché avec un jet d'azote afin de stopper le transfert des protéines. La membrane sèche ainsi que la lame de microscope du prisme ont été retirées et le prisme a été entreposé dans un dessiccateur jusqu'à leur analyse en MALDI-MS.

2.3 Analyse MALDI-MS

Toutes les analyses MALDI-MS ont été réalisées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF Ultraflextreme équipé d'un laser SmartBeam II Nd:YAG/355 nm opérant à 0.5 kHz (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Le laser a été utilisé en mode «large» et a un diamètre de 75 μm une fois sur plaque.



Figure 2.6: Image d'un MALDI-TOF/TOF Ultraflextrem de Bruker Daltonics. Copyright © 2015 Bruker Corporation

2.3.1 Profilage de protéines

Suite à un transfert de protéine sur un prisme comme montré dans la section 2.2.2 *production des images SPR de tissus biologiques*, le prisme a été sorti du dessiccateur. 0.5 μL d'une solution d'acide trifluoroacétique (TFA) 0.2% et d'acétonitrile (ACN) 3:2 v/v 1 mg/ml d'acide sinapinic a été appliquée trois fois d'une sur la région à profiler. Les spectres de profilage ont été pris en géométrie linéaire avec une accélération en source de 25 kV dans l'intervalle de m/z 3000 – 25000 avec une accumulation de 2000 tirs de laser.

2.3.2 Imagerie de protéines

Suite à un transfert de protéine sur un prisme tel que détaillé dans la section 2.2.3 *production des images SPR de tissus biologiques*, le prisme est sorti du dessiccateur. L'application de la matrice a été faite de manière homogène en utilisant un ImagePrep 2.0 de Bruker Daltonics.



Figure 2.7: Image d'un Imageprep 2.0 de Bruker Daltonics. Copyright © 2015 Bruker Corporation

La méthode de déposition a été optimisée pour favoriser l'extraction et la cocrystallisation des protéines. La matrice appliquée était une solution de TFA 0.2% et d'ACN 3:2 v/v 1 mg/ml de SA.

Chapitre 3 Surface Plasmon Resonance Imaging - MALDI-TOF Imaging Mass Spectrometry (SPRi - MALDI IMS) of Thin Tissue Sections

Article soumis au journal Analytical Chemistry le 28 août 2015

Simon Forest^a, Julien Breault-Turcot^a, Pierre Chaurand^{a*} and Jean-Francois Masson^{a,b*}

^aDépartement de chimie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montreal, QC, Canada, H3C 3J7

^bCentre for self-assembled chemical structures (CSACS)

Ce chapitre présente les travaux effectués dans le cadre de ce mémoire. Il présente les conclusions faites dans le cadre du couplage SPRi-MALDI-IMS sur des coupes minces de tissus biologique. La grande partie des travaux présentés dans cette section ont été effectués par Simon Forest, toutefois ces travaux n'auraient pas vu le jour sans la contribution de plusieurs collaborateurs. Julien Breault-Turcot a produit les résultats préliminaires de ce projet de couplage SPRi-MALDI-IMS en effectuant l'étude sur l'impact des différentes monocouches sur la quantité et sur la nature du matériel adsorbé à la surface. L'atelier mécanique de l'Université de Montréal a été d'une aide non négligeable en aidant à la modification des instruments dans le cadre du projet. Finalement, Jean-François Masson, directeur de recherche, a agi en tant que conseiller important lors de l'élaboration du projet et de la rédaction de l'article.

3.1 Abstract

Identification and absolute quantification of proteins in imaging of biological samples is a challenge in today's science. Here, we demonstrate a novel SPRi - MALDI IMS coupled technique competent for the acquisition of multiparametric information by creating a tissue section imprint on a SPRi sensor surface. To achieve the combination of these two imaging techniques for tissue sections, many instrumental challenges were faced and successfully overcome. Surface chemistry had to be optimized to adsorb and retain high concentrations of biomolecules. The diffusion kinetics had to be controlled to insure fast transfer of biomolecules from a tissue section with minimal lateral diffusion to achieve high spatial fidelity transfer. Lastly, the SPRi and MALDI IMS experimental conditions had to be optimized to ensure that the dynamic ranges of these techniques overlap. The results show quantitative and regioselective SPRi images correlating to MALDI IMS images of different biomolecules all transferred from a single tissue section.

3.2 Introduction

The presence or relative concentration of a specific biomolecules in biofluids or tissues can be useful indicators on the state of different diseases such as breast⁷², colon⁷³, and prostate⁷⁴ cancers or other pathologies^{75, 76}. Certain pathologies require additional regioselective information about the local concentration in tissues. In these cases, biopsies are taken from patients suspected of a disease and analyzed in pathology. Histological staining is the current workhorse of the pathology for providing information about tissue samples. The histological staining of tissue sections can reveal details about the presence of cancer cells in biopsied tissues but histology based diagnostic can be subjective and time consuming. The development of new techniques that could both identify and quantify specific biomolecules with regioselective information in tissue sections could enable more objective diagnostics for several pathologies.

Matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry (MS) is a state of the art technique for biomolecule analysis and sequencing⁷⁷⁻⁷⁹. MALDI Imaging MS (MALDI IMS) is a powerful tool to visualize the distribution of biomolecules in a flat sample such as directly from biological thin tissue sections⁸. Despite the tremendous power of MALDI IMS, it remains difficult to quantify proteins and peptides, with regioselective resolution². In the few reported occurrences of quantitative MALDI IMS, only a relative quantification was achieved, while absolute quantification remains uncommon even in profiling methods⁸⁰. Quantification of biomolecules can be achieved by coupling MALDI MS with others analytical techniques such as liquid chromatography (LC) and thin layer chromatography (TLC)^{3, 81-83}. For MALDI IMS, proteins can be quantified from a subsequent tissue section after microdissection or at the expense of imaging resolution⁸³.

Surface plasmon resonance (SPR) is a well-known technique for the monitoring of biomolecular interactions and for the quantification of different classes of biomolecules^{27, 84}. The popularity of SPR sensors is mainly due to the numerous advantages, including the combination of high sensitivity, real-time and label-free detection. SPR biosensors have been developed for the detection of wide variety of specific disease related biomarkers^{85,86}. However, SPR sensors can also serve to study surface adsorption processes, including the adsorption of biomolecules from biofluids and biosamples⁸⁷⁻⁹⁴. SPR sensors are versatile tools for monitoring the interaction of biomolecules with different surface chemistries. While most research articles on this topic reported the development of surface chemistries with low fouling properties, one can also exploit the nonspecific adsorption of biomolecules to surfaces to extract biomolecules from a sample to a SPR surface.

SPR sensing is a label-free and quantitative technique for biomolecules. Absolute quantification of material deposited on a SPR chip relies on the relation between the thickness of the adsorbate (d) and the density of the adsorbate (ρ) (Equations 1 and 2). The thickness is a function of the change in SPR angle ($\Delta\Theta_{\text{SPR}}$), the refractive index properties of the adsorbate (η_a) and of the solution (η_s) as well as the plasmonic properties of the SPR sensor (sensitivity – m and penetration depth – l_d)⁹⁵. These parameters are constant in a SPR experiments, such that

surface coverage (Γ) can be extracted from the SPR shift and quantify the amount of proteins adsorbed to the surface.

$$d = -\frac{l_d}{2} \ln\left(1 - \frac{\Delta\theta_{SPR}}{m(n_a - n_s)}\right) \quad (3.1)$$

$$\Gamma = \rho d \quad (3.2)$$

SPR offers good spatial resolution on the order of a few tens of microns, which led to the development of SPR imaging (SPRi). The SPR chip is imaged using a collimated beam of light at a single angle of incidence to provide a picture of the reflectivity of the surface⁹⁶. Changes in reflectivity in the SPR images are associated with local binding events, thus the quantification of proteins can be achieved with high regioselectivity^{97,98}. In this configuration of SPR, biosensing of several biomolecules can be achieved on a single SPR sensor modified with a microarray of molecular receptors⁹⁶. Recent studies revealed the power of SPRi for detecting nanoparticles⁹⁹, imaging biosamples¹⁰⁰ and the formation of biofilms on the SPRi chip^{32,101}. These results indicate that imaging thin tissue sections would be possible with SPRi.

SPRi does not provide molecular information and thus cannot identify unknown biomolecular adsorbate. Hence, SPRi must be combined with other techniques. Thus, SPRi has been coupled with MALDI MS for the absolute quantification and identification of biomolecule leading to the development of techniques such as immuno-MALDI and SUPRA MS^{5,102,103}. In these techniques, microarrays were functionalized with different surface chemistries in specific regions of the SPRi. Microarrays have been developed to quantify a large variety of affinity interactions¹⁹. The SPRi and MALDI IMS images showed various intensities as a function of location on the sensor. However, such experiments were only performed using liquid or homogenised samples. In addition, the transfer of the molecular content from a tissue section to the surface of a SPRi sensor with high spatial fidelity remains challenging. A method to transfer biomolecules from a tissue sample to a surface with high spatial fidelity was recently developed for MALDI IMS¹⁰⁴. The integration of a tissue transfer method to a SPRi fluidics is reported here for the quantification of proteins with SPRi and the subsequent visualization of transferred biomolecules with MALDI IMS. To the best of our knowledge, this is the first example reported

of a SPRi - MALDI IMS method capable of providing regional and quantitation information of proteins from a single tissue section.

3.3 Experimental section

3.3.1 SPR sensing with different surface chemistries

SPR measurements were performed on a custom miniature instrument based on a dove prism²⁵ for the selection of surface chemistry and on a SPRi instrument (SPRi-Lab+, Horiba France Sarl, Les Ulis, France) for tissue imaging measurements. The SPR sensors were prepared as described here for the experiments on the instrument based on a dove prism. Piranha solution (sulfuric acid + hydrogen peroxide – 3 : 1; *Caution! Piranha solution is highly corrosive*) was used to clean microscope slides of 25 x 75 x 1.0 mm and cover slips of 22 x 22 x 0.17 mm for 90 minutes. Clean glass slides were afterward washed with deionised water to remove any traces of piranha solution and then dried. The microscope slides and cover slips were sputter coated with 1 nm Cr and 45 nm Au (Cressington 308R sputter coater, Ted Pella Inc. Redding, CA) with an argon pressure of 0.02 mbar and a current set at 80 mA during deposition. Self-assembled monolayers were formed overnight on the Au surfaces with 1 mM solution prepared in DMF of either 3-mercaptopropionic acid (MPA), 4-nitrobenzenthionol (4-NBT), sodium 2-mercaptoethane sulfonate (MESNA), 8-mercaptooctanoic acid (8-MOA), 11-mercaptoundecanoic acid (11-MUA), 16-mercaptohexadecanoic acid (16-MHA) or dodecanethionol. The SPR sensors were then rinsed with ethanol to remove all unbound molecules and dried under a stream of nitrogen. The SPR sensors were then mounted on a dove prism fitted to the instrument. The dark spectrum, the reference and the p-polarized spectra were acquired as previously reported⁹⁴. Data were collected with a portable spectrophotometer (Ocean optic, Dunedin, FL) and MatLab was used for data processing.

3.3.2 Tissues preparation

The local Ethical Committee of the University of Montreal has approved all animal studies. One-month old mice were sacrificed by CO₂ asphyxiation. Once sacrificed, the liver and kidneys were removed and flash frozen using liquid nitrogen. Homogenised liver tissues were prepared as reported by Groseclose and Castellino⁷⁰. For all the SPR - MALDI (I)MS experiments, tissues were sectioned at 20 µm thickness using a Leica CM3050 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and thaw-mounted onto a borosilicate glass slide of the appropriate dimension. Tissues sections were washed in 70% and 90% isopropanol for 30 s respectively for removing lipids¹⁰⁵ and then dried in a desiccator for 1 h.

3.3.3 SPR analysis of liver tissue transfer

The survey of protein transfer with different surface chemistries was done with a homogenised liver tissue. The homogeneity, reproducibility and ample supply of this tissue type were ideal for all method developments. A droplet of PBS or water was added on the SPR sensor. A spacer was created using two 0.7 mm thick glass slides, to create a 700 µm gap between the tissue sample and the SPR surface. The baseline was monitored in PBS for 1 min before mounting the liver tissue on the spacer. PBS was the transfer medium for the tissue to the sensor surface. The spacer was necessary to assure that the tissue did not directly contact the gold layer. Protein transfer from the tissue was performed for 20 min and then immersed for 5 s in either PBS or ethanol depending on the nature of the self-assembled monolayer (SAM).

3.3.4 Transferred protein identification

The SPR sensors were then dismantled from the instrument. Digestion of proteins adsorbed on different monolayers was performed on the SPR sensor surface with a solution containing 0.09 µg/µL of trypsin at 37°C. Trypsin was prepared and activated in a 50 mM acetic

acid/100 mM ammonium bicarbonate (1:10) solution. The incubation chamber used for protein digestion consisted of a heating plate on which a glass petri dish was filled with humidified cotton to maintain a constant temperature and humidity in the digestion chamber. SPR sensors with adsorbed proteins were placed directly on the humidified cotton to reach the proper temperature. A temperature probe was installed in a water droplet on a glass slide placed beside the sample where digestion occurred to monitor the temperature in the digestion chamber. To compensate evaporation of the solution during enzymatic digestion, microliters of buffer solution (50 mM acetic acid and 100 mM ammonium bicarbonate with a 1:10 ratio) were added over the course of the digestion in order to maintain trypsin in solution. The digestion time was adjusted between 10 and 45 min depending on the monolayer to maximize enzymatic digestion for subsequent MALDI-TOF MS analyses.

3.3.5 MALDI-TOF MS analyses

A solution of 10 mg/mL alpha cyano-4-hydroxy cinnamic acid (α -CHCA) was prepared in 1:1 acetonitrile/H₂O + 0.2% TFA. This matrix was spotted directly onto the SPR sensor on which proteins from a tissue section were adsorbed. For intact protein and peptide analysis, three successive volumes of 0.5 μ L of matrix were spotted directly on the sample without enzymatic digestion, with enough time between the depositions for the matrix to dry at room temperature. Analysis of proteins and tryptic peptides were performed by MALDI-TOF MS using an UltrafleXtreme mass spectrometer equipped with an Nd:YAG/355nm laser and operated by flexControl 3.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA). A homebuilt sample holder was used to introduce the SPRi sensor into the source of the mass spectrometer. Data acquisition for the tryptic peptides was carried out in reflectron geometry under optimized delayed extraction conditions with a nominal source accelerating voltage of +25 kV in the m/z range between 60 - 5,000. To monitor intact proteins, MS data was acquired in linear mode with optimized sources parameters for the m/z range between 1,000 - 20,000. Profiling data were acquired by summing 10 x 500 laser shots on a single sample. Mass calibration of the instrument for the peptide m/z range was performed using a mix of known peptides (Bradikinin, Angiotensin II, ACTH (18-

39), Insulin B chain). Calibration of the instrument for the protein m/z range was performed using a mix of standard proteins (insulin, ubiquitin, cytochrome C, myoglobin and trypsinogen). flexAnalysis software (Bruker Daltonics) was used for all mass spectrum analysis. For peptide characterization, the instrument LIFT mode was used for MS/MS measurements. The corresponding proteins were identified using the MASCOT search engine and the Swissprot database.

3.3.6 SPRi images

For all SPRi experiments, prisms adapted for the SPRi-Lab+ instrument were washed in a room temperature piranha solution for 1 h, rinsed profusely with deionised water and ethanol and then dried under a light stream of nitrogen. Cleaned prisms were subsequently coated with 2 nm Cr and 50 nm Au using a custom made focused electron beam evaporator. A 1 mM dodecanethiol solution in DMF was reacted overnight to form a monolayer on the SPRi sensor. The prisms were then rinsed with ethanol and dried under a stream of nitrogen. A nylon membrane (0.45 μm pore size) was deposited to the SPRi prism and was then conditioned in 150 mM ammonium formate. The resulting wet nylon membrane was applied delicately on the gold-coated prism. A reference image was constructed with the acquisition of 100 SPRi images from 53.5° to 63.5° with 0.1° steps between each image in both S and P polarisation. Afterward, the mounted tissue section was gently dropped on the nylon membrane, with the tissue facing the membrane (see Figure 3.1). SPRi images from the protein transfer were obtained using the same acquisition procedure as for the reference images at different time intervals. Once the last transfer image was acquired, the prism, the membrane and the tissue were removed still assembled from the SPRi instrument and the assembly was dried quickly with a nitrogen stream in order to stop the protein transfer. When completely dried, the membrane and tissue were carefully removed from the gold-coated prism. The prism containing the transferred proteins were then analyzed by IMS.

3.3.7 MALDI-TOF-IMS analysis

For all IMS experiments, a Bruker Daltonics ImagePrep instrument was used for the deposition of a 10 mg/mL sinapinic acid solution prepared in 3:2 acetonitrile/H₂O + 0.2% TFA. A custom ImagePrep method was designed to maximise protein extraction, matrix thickness and matrix homogeneity. IMS experiments were performed using the Ultraflex extreme MALDI-TOF mass spectrometer operated at 0.5 kHz with a laser focus on target of 100 µm in diameter using the “large” beam setting. Profiling and IMS data acquisitions were performed in linear geometry under optimized delayed extraction conditions with a source accelerating voltage of +25 kV in a mass range from 2 to 22 kDa. The laser power was set to obtain the best signal to noise (S/N) ratio, while keeping maximum signal resolution. These settings also provided optimal reproducibility across analyses.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 Protein transfer to SPR sensors

Several aspects must be considered in the development of SPRi - MALDI IMS. Foremost, liver tissue sections were selected because of the general homogeneity of the biomolecular composition of liver. This will improve reproducibility for all method developments. Then, the thickness of the tissue section must be considered in order to be compatible with SPRi. For IMS experiments, tissue sections are typically cut between 10 - 20 µm in thickness, which far exceeds the sensing depth of SPR at approximately 300 nm. Directly probing the tissue section would therefore saturate the SPR response. Thus, a molecular imprint of the tissue must be transferred to the SPRi sensor. Analyzing the imprint of the tissue on the SPRi sensor will therefore facilitate the quantification of specific molecular targets in future development of the technology.

A direct imprint of the tissue was attempted on the gold surface with only a droplet of buffer between the two surfaces. The direct transfer of proteins on the sensor was observed after 1 minute of SPR signal monitoring and generated an important signal of 8.7 ± 2.0 nm. However, upon removal of the tissue sections, large cell clusters and tissue debris were observed on the sensor surface by light microscopy (Figure 3.5). The presence of these contaminants and the irreproducibility of the process (CV of 23 %) were undesirable for subsequent protein imaging with SPR and MALDI IMS. Thus, the transfer of biomaterial onto the SPR sensor was performed by placing a 0.7 mm thick spacer and the addition of phosphate saline buffer (PBS) transfer medium between the tissue and the gold surface. In this case, the larger physical distance between the tissue and the sensor surface guaranteed a transfer that is not generated by a physical contact of the tissue on sensor surface, but led to longer transfer times (Figure 3.6). For example, 2 minutes were required for proteins to reach the SPR sensor leading to a lower SPR response at 5.1 ± 0.4 nm with respect to direct contact. However, the transfer process was more reproducible (CV of 8%) and no cell clusters were observed on the surface (Figure 3.5). Hence, a spacer is needed to cleanly transfer proteins from cells and tissues to the sensor surface to monitor deposition response by SPR.

3.4.2 Surface chemistry

In the current experiment, the adsorption of proteins to the SPR sensor exclusively relied on nonspecific adsorption, which is known to be highly dependent on the nature of the surface chemistry¹⁰⁶. SAMs of different surface chemistry were shown elsewhere to influence adsorption of biomolecules in biofluids such as serum or cell lysates^{94,107}. Thus, it is suspected here that adsorption of dissolved biomolecules from tissue sections will depend on their respective affinity for a surface. This phenomenon was studied here for the protein transfer from liver sections on different SAMs.

Table 3.1: Amount of biomaterial from liver tissue sections adsorbed on different self-assembled monolayers measured by SPR after 20 min of transfer time.

SAM	$\Delta\lambda_{\text{SPR}}$ (nm)	Γ (ng/cm ²)
4-NBT	9.1 ± 0.3	349 ± 11
MESNA	3.1 ± 0.7	117 ± 27
3-MPA	6.5 ± 0.9	248 ± 34
8-MOA	5.7 ± 0.2	218 ± 8
11-MUA	6.2 ± 0.7	237 ± 27
16-MHA	5.3 ± 0.2	202 ± 8
Dodecanethiol	8.0 ± 0.9	306 ± 34

Functional groups exposed at the sensor surface are the primary interaction points with the biomolecules and thus, will have an impact on the surface concentration and the nature of the biomolecules adsorbed on the monolayers. The SAM investigated comprised a variety of functional groups, including hydrophobic, neutral and a series of negatively charged monolayers commonly used in SPR sensing. The total amount of proteins transferred was higher for the hydrophobic surfaces (306 and 349 ng/cm²) than for the negatively charged surfaces, leading to protein transfers ranging from 117 to 248 ng/cm² (Table 3.1). All monolayers showed a SPR signal with a relative error smaller than 15% (except for MESNA which gave a 20% error) demonstrating the good reproducibility of the transfer procedure.

MALDI MS analyses performed directly on the SPR sensor provided molecular information about the molecular nature of the adsorbates from the liver tissue sections. The mass spectra clearly showed peaks in mass range typical of the molecular weight of proteins, providing strong evidence that proteins were indeed transferred from the tissue sections. The comparison of the mass spectra for MESNA, 16-MHA and dodecanethiol monolayers (Figure 3.7) revealed that the nature of the SAM affected the nonspecific adsorption of proteins. The signal intensities of the MS spectra were in good agreement with the SPR data, as the MESNA surface with the lowest SPR response also gave the MS spectrum with the lowest signal intensity. After protein adsorption, monolayers such as MESNA will typically show a simpler mass spectrum with only a few peaks displayed while other SAMs such as dodecanethiol show more complex mixtures of biomolecules adsorbed on their surfaces. MS response for the 4-NBT monolayer showed an imprint more similar to the one obtained from dodecanethiol in term of the nature of biomolecules adsorbed.

The sensor washing procedure also needed to be carefully selected (See text and data in electronic supplementary information and Figure 3.8). For example, the dodecanethiol surface had to be washed with an aqueous solution to avoid important desorption of the adsorbed proteins while the 16-MHA surface was washed with an ethanol solution to maximise retention of adsorbed material at the surface. MS analysis thus seems to show that changing the surface chemistry does not only imply a change in the amount of material at the surface, but also affects the nature of the biomolecules adsorbed. Finally, dodecanethiol was easier to work with than 4-NBT for the SPRi - MALDI IMS experiments due to its higher hydrophobic properties. Therefore, dodecanethiol has been chosen for SPRi - MALDI IMS experiments even if 4-NBT showed the higher concentration of biomolecules adsorbed at its surface.

Bottom-up protein identification using MS usually requires trypsin digestion. Direct digestion was performed on the surface of the SPR sensors as previously reported⁹⁴. Proteolysis confirmed the identity of proteins adsorbed on the different surface chemistries due to gradual disappearance of protein MS peaks as the digestion progressed and with the appearance of peptides of smaller molecular weights. Sequencing of some of the tryptic peptides by MALDI MS/MS followed by database searching using the MASCOT search engine and the Swissprot

database identified several proteins adsorbed to the different surfaces. For example, from the dodecanethiol surface it was possible to identify several abundant proteins such as hemoglobin subunit alpha, hemoglobin subunit beta, junctophilin-3 and the mitogen-activated protein kinase organizer 1 (See Table 3.2). The same four proteins were also observed on a 16-MHA surface. Many unidentified proteolytic peptides were also observed on these surfaces but could not be sequenced and linked to specific proteins due to either low abundance or poor MS/MS spectra. Nevertheless, as previously indicated by the mass spectra of undigested proteins (Figure 3.7), different peptide profiles can be generated from proteolysis of the different monolayers. This type of approach is therefore complementary to evaluate which surface chemistries can be used to promote or reduce adsorption of certain proteins as previously discussed in the literature for serum protein adsorption ⁹⁴.

3.4.3 Regioselective transfer of tissue proteins to the SPRi sensor

The regioselectivity of the protein transfer method from the tissue sections using a spacer and a transfer buffer was then evaluated for SPRi and MALDI IMS analyses. The first attempt to produce a SPR image from a tissue imprint was performed using the typical reflectivity percentage SPRi acquisition method with a 0.7 mm spacer, similar to the classical SPR analysis presented above (Figure 3.1 A). The mass adsorbed on the SPRi sensor was calculated with equations 1 and 2 for each pixel. However, SPRi images showed little correspondence to the tissues histologies due to the saturation of the reflectivity image and the large diffusion of the biomolecules. The limited dynamic range of SPRi in reflectivity is a common issue ¹⁰⁸, and this effect caused the saturation of the SPR sensor rapidly observed here. Scanning angle SPR imaging was used to overcome this problem, but the lateral diffusion remained an issue (Figure 3.9). This process was however time-consuming, such that it required 4.5 min per image set due to some instrumental and software limitations. Despite this long acquisition, scanning angle SPRi enabled an absolute quantification of the material at the surface of the sensor knowing the angle shift between the reference image and images acquired later in the transfer.

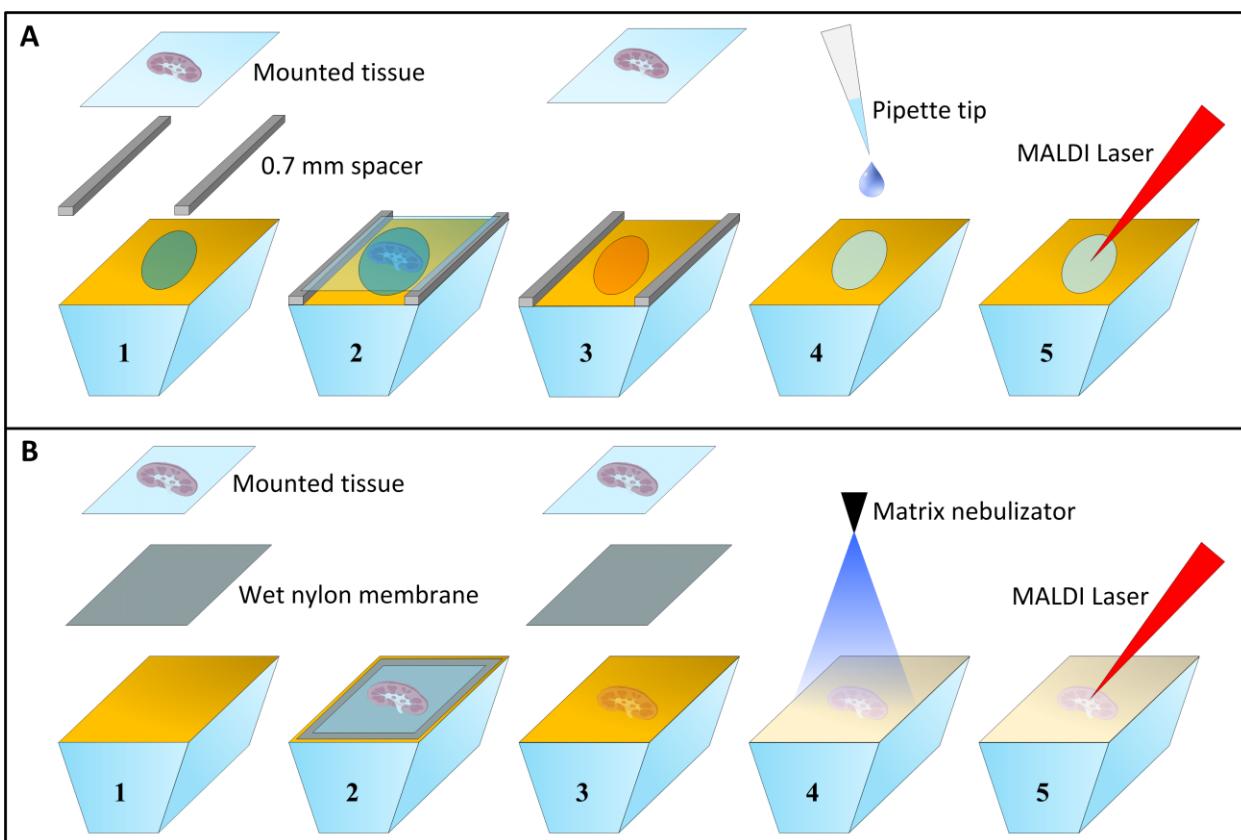


Figure 3.1: Schematic representation of SPR - MALDI MS (A) and SPRi - MALDI IMS (B) experimental methods. A droplet of PBS or water was added on the SPR sensor between two 0.7 mm spacers (A1). The tissue sample was then deposited on the spacers and the sample was in contact with the droplet (A2). After a transfer time of 20 min, the tissue sample was removed and the sensor was immersed in PBS or ethanol (A3). Matrix was then manually applied on the sensor (A4) and MALDI MS analysis was performed (A5). A wet (150 mM ammonium formate) nylon membrane was applied on functionalised (dodecanethiol) SPRi sensor and the SPRi reference scan was performed (B1). The tissue section mounted on a glass slide was then deposited on the membrane to perform regionalized protein transfer for 1 h (B2). Once completed, the nylon membrane was dried under a nitrogen stream and was carefully removed from the SPRi sensor with the tissue sample (B3). Matrix was then applied (ImagePrep) on the sensor (B4) and MALDI IMS analysis was performed (B5).

Proteins diffuse randomly in solution leading to a non-regioselective transfer. To achieve higher quality SPRi and MS images, the lateral diffusion from the proteins during the transfer had to be reduced in order to conserve the original histological image. Regioselectivity was improved using a wet nylon membrane between the tissue section and the surface of the SPR sensor (Figures 3.1 and 3.2). The inclusion of a membrane in the fluidics of the SPRi instrument did not influence the measurement of the SPRi response (See details in electronic supplementary information – nylon membrane section). The membrane increased the transfer time due to the slower diffusion process of proteins through the membrane pores, but as a consequence reduced significantly the lateral diffusion. In addition, the slower diffusion time permitted the acquisition of more SPRi images during the transfer providing further information about the kinetics of the protein diffusion process. Diffusion coefficients can be calculated with Eq. 3 and 4 by plotting $\langle x \rangle$ (diffusion distance) as a function of the square root of time (Figure 3.3).

$$\langle x \rangle = 2 \sqrt{\frac{D t}{\pi}} \quad (3.3)$$

$$D = \frac{\pi}{4} \text{slope}^2 \quad (3.4)$$

When comparing SPRi images acquired at different time points without the membrane (Figure 3.2A), the lateral diffusion speed was estimated to 5.47 $\mu\text{m}/\text{sec}$ (Figure 3.3). Without the membrane, the diffusion constant was $8.55 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$. Adding the nylon membrane decreased the lateral diffusion speed to 0.34 $\mu\text{m}/\text{s}$ for an average diffusion coefficient of $3.53 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Figure 3.3). Therefore, the membrane was effective at slowing down the lateral diffusion.

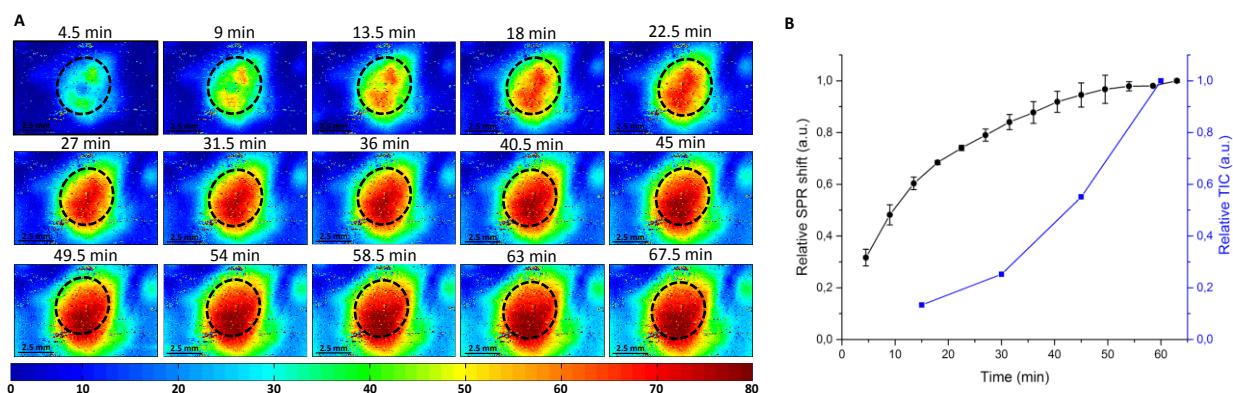


Figure 3.2: Transfer kinetics of proteins from a 20 μm thick homogenised liver section to a SPRi sensor using a nylon membrane spacer to minimize lateral diffusion. (A): SPRi images of transferred proteins (Color scale in ng/cm^2 , dashed line represents the original dimension and shape of the homogenised liver section). (B): Relative SPR shift (black) and relative total ion current measured from the corresponding MS spectra (blue, see Figure 3.10) as a function of time.

The transfer kinetics with the nylon membrane was studied in order to find the optimal time needed to maximize protein deposition on the SPRi sensor for higher sensitivity with minimal delocalization of the proteins to therefore achieve the best SPRi and MALDI IMS image quality. To do so, the relative SPR shift has been plotted at 4.5 min intervals during the transfer process from homogenised liver samples and the best resolution images were obtained around 35 min (Figure 3.2A). After 35 min of transfer, the lateral diffusion had induced a signal equal to 50% of the final tissue protein concentration at a distance corresponding to 10% of the tissue diameter. While SPRi showed relatively high response early in the transfer process, a transfer of 35 min provided poor MS results (Figure 3.10). The relative total ion current (TIC) revealed that the overall MS signals greatly increased only after 45 min (Figure 3.10 and Figure 3.2B). These results provide some information on the differences in sensitivity between SPRi and MALDI MS. The time of the transfer was thus optimized to overlap both SPRi and MALDI MS detection ranges. Figure 3.2B indicates that the SPRi signal stabilised after 40 min of protein

transfer and that additional increase of this signal was mainly due to the lateral diffusion of material on the sensor surface. A longer kinetic graph shows an increase of the signal in the region of the sensor not directly under the tissue section until the membrane dried out which stops the transfer process. Ultimately, the 60 min transfer time point was the best compromise for high image quality in both SPRi and MALDI IMS.

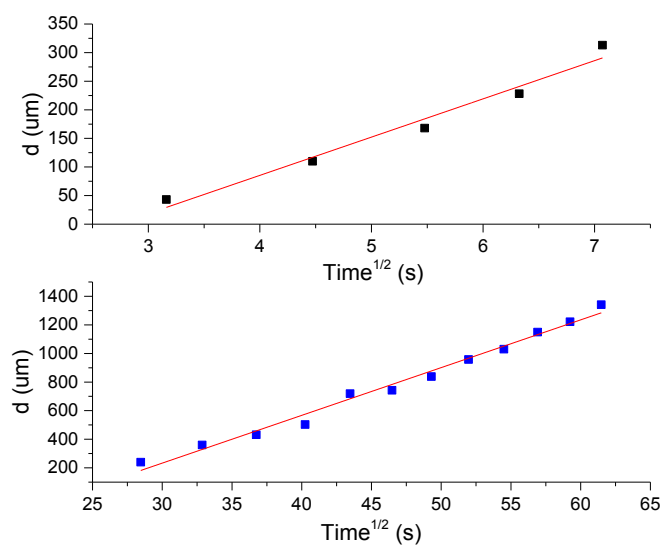


Figure 3.3: Lateral diffusion of proteins with (bottom panel) and without (top panel) the addition of a nylon membrane. The protein transfer was measured for a 20 μm thick homogenised liver tissue section to a SPRi sensor. The lateral diffusion was measured at 5.47 $\mu\text{m}/\text{s}$ without the membrane and at 0.34 $\mu\text{m}/\text{s}$ with the membrane.

A modeling of a fully packed monolayer of hemoglobin at the surface of the sensor using Equations 3.1 and 3.2 has been performed to estimate the quantification range of the SPRi method. A complete protein monolayer would equal to approximately 685 ng/cm^2 compared to the maximum quantity measured in our experiments at approximately 50 ng/cm^2 for a 60 min transfer from a kidney tissue section¹⁰⁹. Moreover, the data process allowed to determine the

minimum quantity of proteins adsorbed on the SPR sensor within a 0.01° angular error, which correspond to a limit of detection of approximately 5 ng/cm^2 . Better angular resolution can be achieved with shorter steps, at the expense of time resolution. Therefore, this interval of 5 to 685 ng/cm^2 makes it therefore possible to quantify biomolecules on a large dynamic range with an adequate time resolution.

3.4.4 SPRi - MALDI IMS

Optimisation of methods using biological tissues can be very difficult due to the variance in the biological samples. To minimise the biological effects and to recreate as close as possible the condition of a tissue sample, an homogenised mice liver tissue block was initially used ⁷⁰. All the tissues samples were washed with isopropanol solutions to enhanced protein signal and remove most of the lipids in the sections ¹¹⁰.

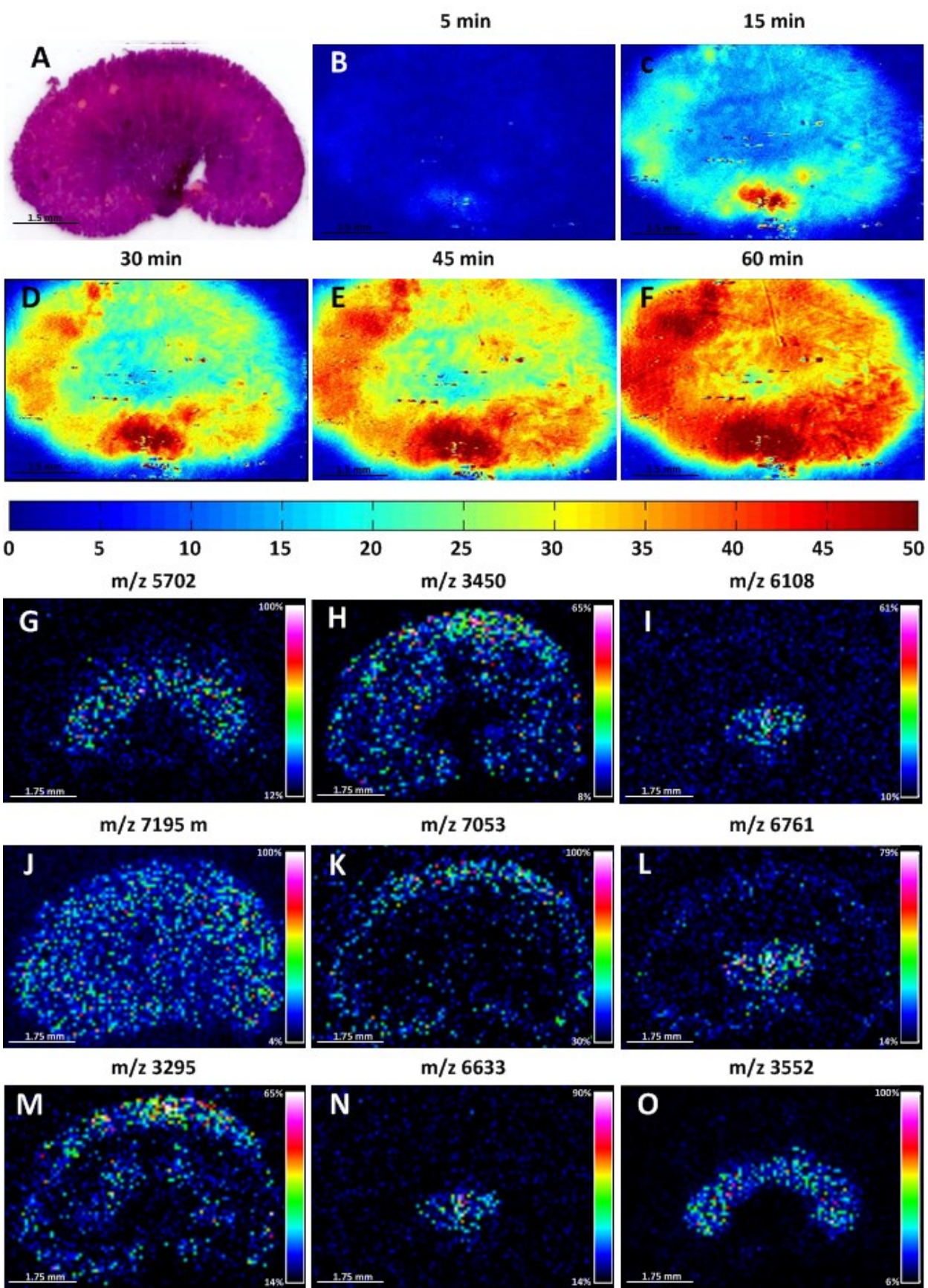


Figure 3.4: SPRi - MALDI IMS protein images acquired for a 20 μm thick mouse kidney section. (A): H&E stained kidney section after 60 min of protein transfer, (B-F): SPRi images of the protein imprint at different time intervals (color scale is in ng/cm^2). (G-O): Selected protein MALDI IMS images (100 μm spatial resolution) of the imprint on the SPRi sensor after 60 min of transfer time.

While the transfer from homogenized liver sections was ideal for method optimization, it provided no regioselective information other than the tissue borders. Thus, SPRi - MALDI IMS experiments were also acquired from 20 μm thick mouse kidney sections. Kidney provided a more complex model tissue due to several large and distinct histological regions (Figure 3.11)¹¹¹. SPRi - MALDI IMS allowed for the distinction of different histological regions in a kidney tissue section (Figure 3.4). The H&E stained kidney for a section that has been analyzed by SPRi - MALDI IMS showed some damages on the tissue due to manipulations and to the contact with the nylon membrane (Figure 3.4A). In SPRi, the cortex, medulla and pelvis can be identified by the difference in adsorbed material from each region. The pelvis was the region where the highest material concentration per surface unit was adsorbed on the SPRi sensor in the range of $50 \text{ ng}/\text{cm}^2$. Cortex and medulla were also distinguished (Figure 3.4B-F). The medulla corresponds to the central area of the kidney where the amount of material on the sensor was the lowest while the outer shape of the cortex was defined as the outer layer. It was also associated with the region where lateral diffusion was observed, although it is not expected to be exclusive to this region. Nevertheless, the regional protein information from the tissue was essentially preserved during the transfer process and quality SPR images were obtained.

MALDI IMS images directly acquired from the SPR sensor surface showed the same anatomical regions as observed in SPRi (Figure 3.4G-O). Indeed, the cortex was observed with the images of m/z 3450, 7053 and 3295, the medulla was identified with the images at m/z 3552 and 5702 and the pelvis was seen with m/z 6108, 6633 and 6761. Matrix deposition for IMS using ImagePrep has a lower extraction yield of proteins from the surface compared to the

manual matrix spotting technique typically performed to acquire simple protein profiles (Figure 3.12 and 3.13). For this reason, no images with m/z values higher than 10,000 were observed. It seems that proteins with MW <10,000 are more readily extracted by the matrix deposition method with respect to proteins with higher MWs. Unfortunately, protein identification was not here possible due to the low concentration of proteins adsorbed on the surface.

The comparison of both imaging techniques reveals that the histological regions are more resolved in MALDI IMS compared to SPRi. The higher sensitivity of SPRi may be the principal factor. Indeed, SPRi was sensitive enough to detect proteins diffusing away from the tissue imprint, which were not detected in MALDI IMS. Also, the molecular selectivity of MALDI IMS provides images of greater details than SPRi.

Even if both imaging techniques give complementary information about the absolute amount and the spatial organization of proteins at the surface of the sensor, it is impossible with our current experimental design to combine these information to quantify specific singular proteins as a function of their location. This is however theoretically possible if SPR sensor surfaces were functionalized to specifically retain a targeted protein. Several factors such as protein extraction from the section, migration from the tissue to the surface, non-specific adsorption on the surface of the sensor, and IMS response are important factors to perfectly control for SPRi - MALDI IMS to become a standard technique to locate, identify and quantify selected proteins present within tissue sections.

3.5 Conclusions

We have demonstrated here the potential of combining SPRi and MALDI IMS techniques to obtain quantitative and qualitative images of proteins contained within a single thin tissue section. Both techniques brought complementary information, as SPRi provided quantitative and kinetic information about the transfer process of proteins to the surface of the SPRi sensor, while MALDI IMS provided specific molecular information correlated to the histology of the tissue section. Moreover, we showed that the kinetics of the tissue transfer was

influenced by the presence of a spacer between the sensor surface and the tissue section, which prevented the transfer of cell clusters and tissue debris. In this case, only soluble biomolecules contained in disembowelled cells of the section diffused to the sensor surface. Furthermore, adding a nylon membrane within the spacer lowered the lateral diffusion speed 15 folds (and diffusion coefficient 25 folds). Thereby, SPRi and MALDI MS dynamic ranges were overlapping allowing the acquisition of quality images.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge financial support from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQ-NT), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Centre for Self-assembled Chemical Structures (CSACS), and the Canadian Foundation for Innovation (CFI).

3.7 Supplemental information

3.7.1 Effect of solvent

The nature of the solvent used for the washing step may influence the retention of biomolecules onto the SPR sensor surface. For example, introducing a washing step with a 90% ethanol solution instead of 100% deionized water after protein transfer from tissue sections could have the advantage of precipitating proteins already adsorbed on the surface. This ethanol wash was intended to better retain water soluble biomolecules adsorbed on the surface. The ethanol wash was effective on more hydrophilic surfaces such as 16-MHA (Figure 3.8). Indeed, the SPR response was larger indicating a higher concentration of adsorbed proteins and the corresponding MS spectrum showed an increase in the number of biomolecules detected on the 16-MHA surface. For the more hydrophobic dodecanethiol surface, the ethanol wash reduced the general intensity by an order of magnitude in MS without however affecting the nature of

the proteins adsorbed. These results indicate that pairing a hydrophobic surface with a more hydrophobic solvent reduces the concentration of surface bound species. Also, the use of a more hydrophobic solvent wash with a more hydrophilic surface leads to an overall increase in the surface protein concentration.

3.7.2 Nylon membrane

The nylon membrane did not have a significant impact on the SPR signal when deposited directly onto the sensor surface in comparison to the SPR signal observed in the transfer medium. The hypothesis is that a thin layer of transfer medium is created between the membrane and the SPR sensor. This layer prevents the membrane from directly touching the sensor and massively shifting the SPR response. To validate this hypothesis, pressure was applied to the membrane to minimize if not eliminate this layer of transfer medium. In that case, the SPRi signal saturated and no relevant images were obtained. This clearly showed that a layer of transfer medium is created and is essential for monitoring the real time SPRi response. Different polymer membranes have been tested without observing any change in the nature of the proteins adsorbed at the surface of the SPRi sensor.

3.7.3 Supplemental Table:

Tableau 3.2 : Peptides generated by trypsin digestion of adsorbed proteins transferred from a liver tissue section.

[M + H] ⁺ (Da)	Protein	Related or Identified Sequence	Mascot Score
827.476	Junctophilin-3	QNVLVSGK (Gln - pyro-Glu)	
1011.746		NLIPLRASK	32.7
1190.696		GAGGDRGFGLQR	
1274.777		QSVPYGMAAVIR (Gln - pyro-Glu)	
1548.080		ITAKEFSPSFQHR	
1029.567	Hemoglobin subunit alpha	MFASFPTTK	
1045.562		MFASFPTTK (oxydation)	
1529.948		IGGHGAEYGAEALER	77.7
2043.104		AAWGKIGGHGAEYGAEALER	
1126.696	Hemoglobin subunit beta-1	LHVDPENFR	42.0
1274.777		LLVYPWTQR	
1713.994		LLGNMIVIVLGHHLGK	67.3
1308.688	Mitogen-activated protein kinase organizer 1	MKTLDCSQGAVR	
1324.808		MKTLDCSQGAVR (oxydation)	
1338.836		LWNPLRGTLR	25.6

3.7.4 Supplemental figures:

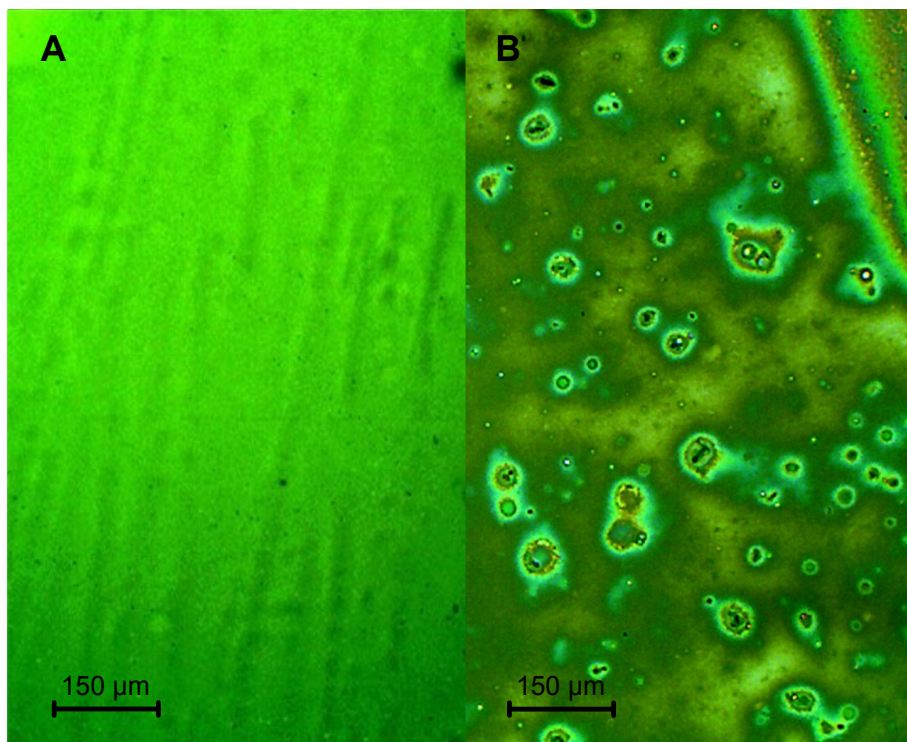


Figure 3.5: Magnified microphotographs of SPR surfaces exposed to a liver tissue section using a spacer during the transfer process (A) and in direct contact with the SPR surface (B). The images were acquired with a 10 X objective.

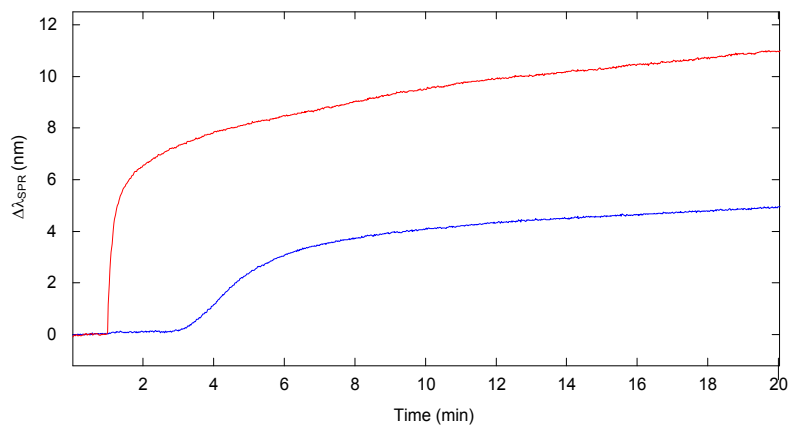


Figure 3.6: Adsorption of biomaterial on a smooth gold film transferred from liver tissue sections and monitored by SPR (red line = no spacer, blue line = with a spacer) without a nylon membrane.

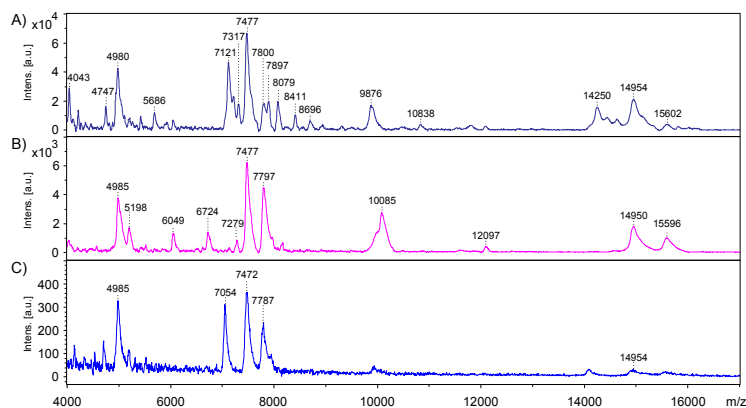


Figure 3.7: MALDI mass spectra of proteins transferred from a 10 μm thick liver tissue section onto different SAMs: dodecanethiol (A), 16-MHA (B), MESNA (C). A PBS wash was performed on each sample before MS data acquisition.

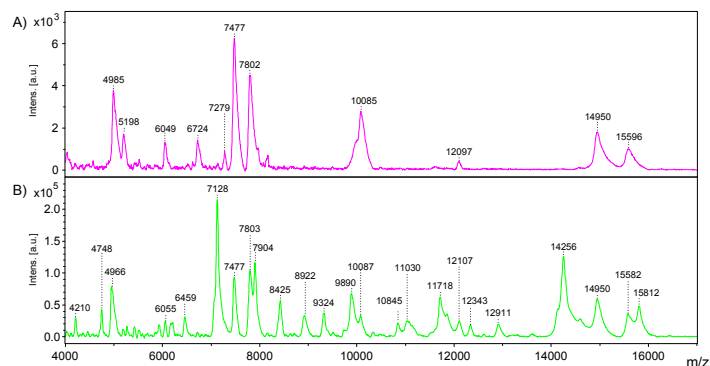


Figure 3.8: MALDI mass spectra of a liver tissue section imprints on a 16-MHA surface after washing with A) 100% deionized water or B) a 90% EtOH solution.

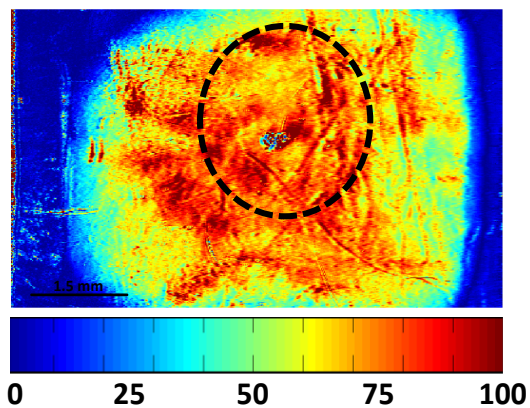


Figure 3.9 : SPRi protein image acquired after 4.5 min of transfer time from a 20 μm thick homogenised liver section without the using the nylon membrane. (Color scale is in ng/cm^2) (Dashed line represents the outline of the homogenized liver section).

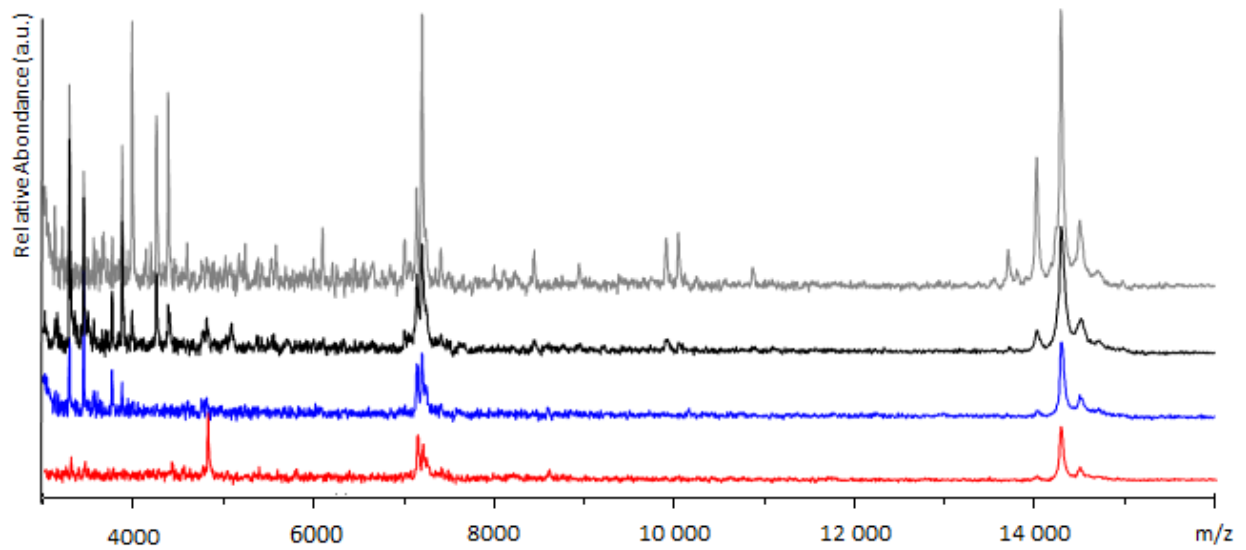


Figure 3.10: MALDI MS spectra of transferred proteins from a liver tissue section onto a dodecanethiol surface after 15 min (red), 30 min (blue), 45 min (black) and 60 min (gray) of transfer time.

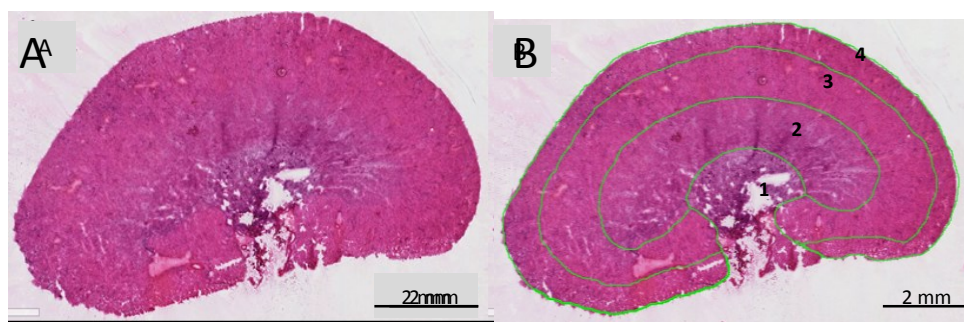


Figure 3.11: H&E stained 10 μm mouse kidney section (A) and mouse kidney histology (B): renal pelvis (1), inner medulla (2), outer medulla (3) and cortex (4).

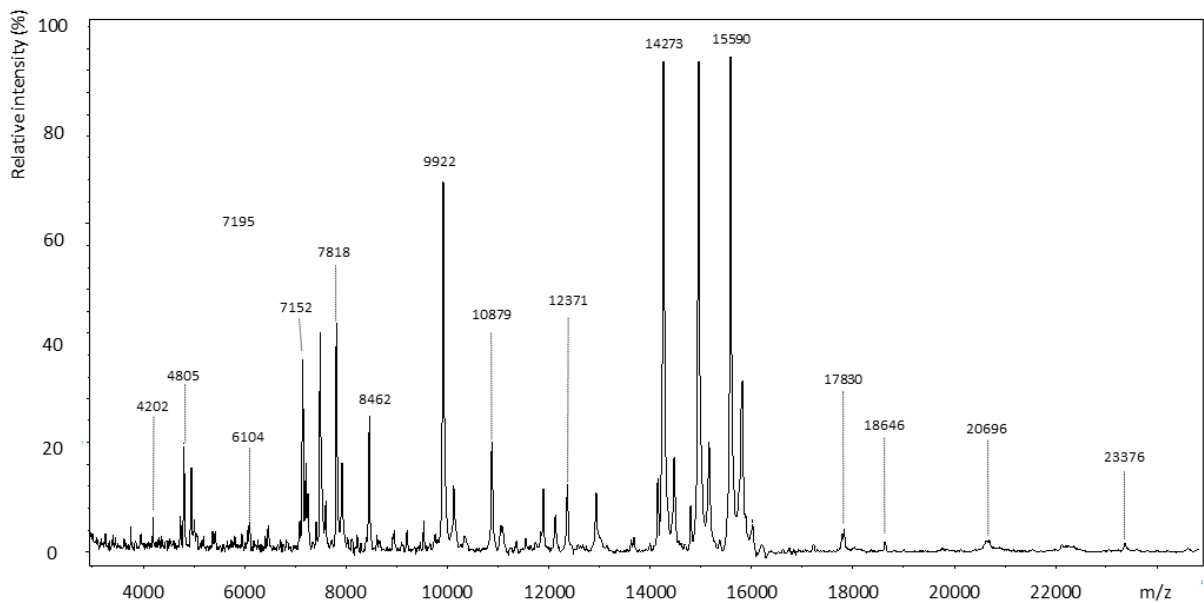


Figure 3.12 : MALDI-TOF MS spectrum of liver proteins after transfer from a tissue section onto a dodecanethiol surface.

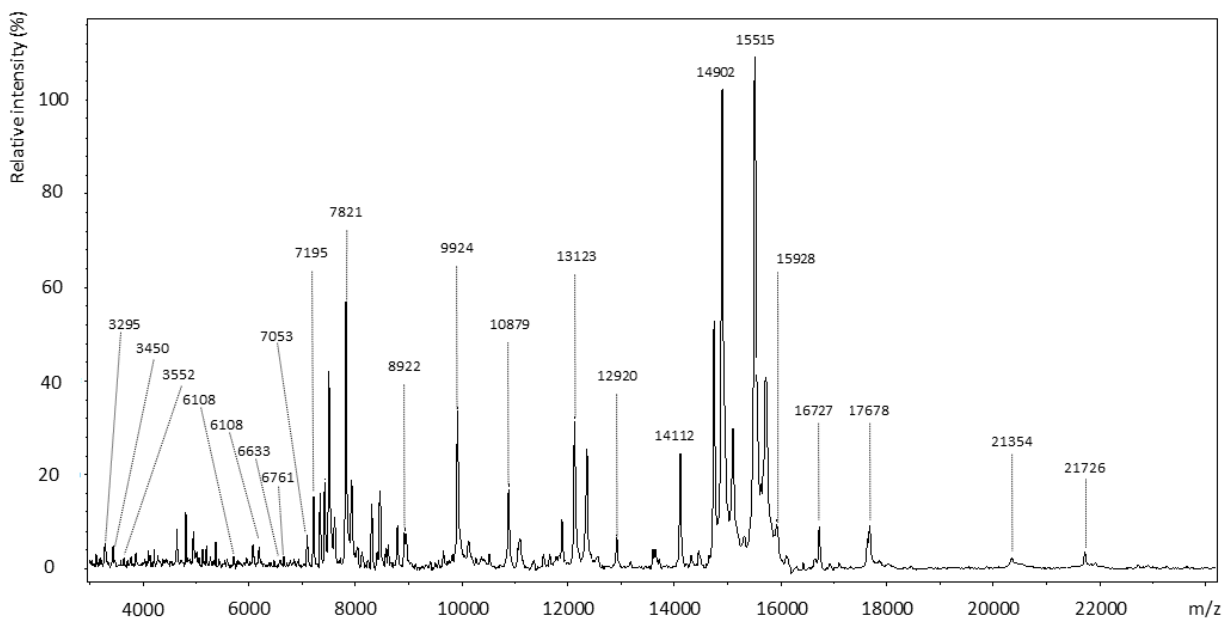


Figure 3.13 : MALDI-TOF MS spectrum of kidney proteins after transfer from a tissue section onto a dodecanethiol surface.

Chapitre 4 Conclusions

En conclusion, les travaux discutés dans ce mémoire présentent les fondements de base d'une nouvelle technique imagerie analytique permettant la quantification et l'identification des protéines dans des échantillons biologiques. En effet, il a été démontré que la combinaison de l'imagerie SPR et de l'imagerie MS peut produire des images capables de quantifier de façon absolue le matériel provenant d'un échantillon biologique adsorbé à la surface d'un capteur SPR. Cette quantification spatiale a permis de distinguer différentes régions dans un échantillon biologique par leur variation en concentration de matériel adsorbé à la surface du capteur. De plus, en effectuant le suivi du transfert en fonction du temps, cela a permis de faire une étude cinétique du procédé de transfert. Cette étude a permis de déterminer les temps de transfert maximisant la résolution des images SPR ainsi que les temps favorisant le couplage de la SPRi avec la MALDI-IMS.

De plus, les images obtenues en MALDI-IMS montrent qu'il a été possible de cartographier la distribution de protéine dans un échantillon biologique. En effet, en produisant des images en fonction d'ions spécifiques, il a été possible de corréler dans le tissu d'origine les mêmes résultats obtenus en SPRi et en MALDI-IMS. L'identification des ions n'a cependant pas été possible due à la trop faible quantité de matériel à la surface du capteur, il est toutefois possible d'estimer, avec précaution, la nature des protéines principales avec leur masse exacte.

Finalement, malgré les différences de sensibilité des méthodes et les incompatibilités instrumentales le couplage de la SPRi et la MALDI-IMS a pu être effectué en optimisant la chimie de surface, la cinétique du transfert et en effectuant des modifications effectués aux instruments. Les bases de cette nouvelle technique étant maintenant établies, des optimisations plus adaptées à des applications concrètes peuvent être envisagées.

4.1 Perspectives

Ces travaux sur l'élaboration d'une nouvelle technique d'imagerie ouvrent la porte à plusieurs autres avenues de recherche potentielle surtout dans le domaine du diagnostic médical. En effet, il serait possible d'adapter la technique SPRi-MALDI-IMS afin de faire une carte de certaines cibles biologiques difficiles à produire avec les techniques de coloration de tissus présentement utilisés. Un diagnostic pourrait être fait en étudiant les variations de concentration de ces cibles dans des régions spécifiques de tissu ou en observant la présence de nouvelles biomolécules dans ces régions.

En effet, l'identification des protéines reste un problème, car celle-ci est faite de manière indirecte via la masse exacte des protéines les plus abondantes, souvent déjà répertoriées dans la littérature. Afin de pouvoir faire une identification rigoureuse des protéines à la surface du capteur, deux solutions pourraient être envisagées. La première serait de mieux contrôler l'adsorption des protéines à la surface du capteur afin de quantifier des protéines ciblées, par exemple en fixant un anticorps d'une cible à la surface du capteur. Ceci permettra de faire la quantification absolue d'une protéine connue en fonction de sa position dans l'échantillon, ce que la technique ne peut pas faire pour le moment. Par contre, cette solution implique de connaître la cible et de posséder l'anticorps correspondant ce qui n'est pas toujours le cas. Une autre solution serait d'ajouter une étape de digestion trypsique des protéines adsorbées à la surface du capteur. Ainsi, de la MS/MS pourrait être faite sur les fragments obtenus et une identification pourrait être faite avec une base de données. Cette solution permet l'identification de plusieurs protéines sans avoir à mieux contrôler la chimie de surface du capteur. Par contre, la technique telle que décrite dans ce mémoire ne permettrait pas l'ajout de cette étape due au manque de matériel à la surface. Une meilleure technique d'incorporation de la matrice qui augmenterait le taux d'extraction des protéines de la surface du capteur pourrait offrir une solution à ce problème.

Par la suite, le regroupement des informations contenues dans les images SPRi et MALDI-IMS ne permettait pas de retrouver la quantité absolue de chacune des espèces adsorbées sur la surface et encore moins leur concentration dans le tissu d'origine. La raison principale de cette lacune était l'impossibilité de pouvoir identifier les ratios des protéines entre elles malgré les images SPR qui rapportent la quantité totale. En effet, l'extraction des protéines de la surface du capteur et l'ionisation des protéines sont des phénomènes uniques à chacune des protéines et empêchent l'élaboration d'un modèle pouvant déduire le ratio des protéines entre elles et ultimement trouver la quantité de chacune des protéines retrouvées à la surface. Pour pallier à ce problème, un meilleur contrôle de la chimie de surface du capteur pourrait être envisagé. En effet, en contrôlant la chimie de surface il sera possible de contrôler l'adsorption des protéines et d'en connaître l'identité. Par exemple, en greffant des anticorps à la surface du capteur, il serait possible de connaître l'identité de toutes les espèces à la surface du capteur. Ainsi, l'information de ces images pourra être utilisée ensemble et non séparément comme c'est le cas avec la présente technique. De plus, un capteur fonctionnalisé en différents endroits avec différents anticorps pourraient aussi permettre de faire des expériences de multiplexage comme en immuno MALDI. Aucune expérience utilisant le multiplexage et l'immuno MALDI n'est retrouvée jusqu'à présent dans la littérature et la technique développée dans ce mémoire ouvre la voie à ce type de travaux.

Finalement, la technique proposée dans ces travaux offre un faible taux de réussite dû surtout à des limitations instrumentales. En effet, l'utilisation d'appareils commerciaux construits à des fins bien différentes de ceux utilisés pour cette technique a posé et pose toujours bien des problèmes au niveau de l'acquisition des données en SPRi, de l'introduction de l'échantillon en SPRi et de l'incorporation de la matrice en MALDI-MS. En effet, le logiciel utilisé en SPRi (Lab view 4.1, Horiba) limite le temps entre les acquisitions des scans d'angles en SPRi à 4.5 minutes, alors qu'il serait probablement possible de diminuer ce temps à environ 1 minute avec un logiciel approprié. Ceci permettrait d'obtenir plus d'information sur la cinétique de transfert de l'échantillon vers le capteur et une optimisation plus fine de ce phénomène pouvant ainsi augmenter la résolution spatiale des images autant en SPRi qu'en MALDI-IMS. L'introduction de l'échantillon en SPRi est depuis le début du développement de

la technique le facteur instrumental le plus critique. En effet, celle-ci doit permettre d'effectuer une image de référence sans devoir ouvrir la cellule fluidique entre l'image de référence et les images SPRi successives. Ce problème a été partiellement résolu en concevant une nouvelle cellule fluidique, mais le design devra sans doute être amélioré. De plus, l'incorporation de l'échantillon doit se faire très délicatement pour ne pas perturber le mince film de solution aqueuse entre la membrane et le capteur. Cette limitation constitue la cause principale du faible taux de réussite de la technique. Afin de résoudre ce problème, un système d'approche de l'échantillon devrait être conçu et incorporer à l'instrument SPRi permettant ainsi une approche mieux contrôlé et plus reproductible. Finalement, l'incorporation de la matrice à l'échantillon demeure toujours le plus gros défi à relever en MALDI-IMS. En effet, la technique d'ImagePrep a un très bas taux d'extraction. Un meilleur instrument permettant une optimisation plus fine des paramètres de déposition permettrait d'augmenter le taux d'extraction des protéines à la surface du capteur. En conséquence, les images MALDI seraient de plus grande qualité et permettraient l'identification d'une plus grande quantité de protéines.

L'imagerie SPRi-MALDI-IMS telle qu'illustrée dans ces travaux offrent des avantages clairs en terme d'informations quantitatives et qualitatives par rapport aux autres méthodes comme la chromatographie et la spectrométrie de masse conventionnelle. En effet, en révélant la position des biomolécules à l'étude, la SPRi-MALDI-MS donne des informations supplémentaires pouvant ultimement permettre d'approfondir nos connaissances en histologie. Le but ultime d'une telle technique serait de performer des analyses pathologiques sur les biopsies en hôpitaux. Ce nouvel outil permettrait d'ajouter de l'objectivité dans les décisions des professionnels de la santé en fournissant des résultats quantitatifs sur les espèces présentes dans les tissus à l'étude lors des diagnostics.

Bibliographie

1. Albalat, A.; Stalmach, A.; Bitsika, V.; Siwy, J.; Schanstra, J. P.; Petropoulos, A. D.; Vlahou, A.; Jankowski, J.; Persson, F.; Rossing, P.; Jaskolla, T. W.; Mischak, H.; Husi, H. *Proteomics* **2013**, 13, (20), 2967-2975.
2. Porta, T.; Lesur, A.; Varesio, E.; Hopfgartner, G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, (8), 2177-2187.
3. Wei, H.; Nolkrantz, K.; Parkin, M. C.; Chisolm, C. N.; O'Callaghan, J. P.; Kennedy, R. T. *Anal. Chem.* **2006**, 78, (13), 4342-4351.
4. Mateos, J.; Lourido, L.; Fernandez-Puente, P.; Calamia, V.; Fernandez-Lopez, C.; Oreiro, N.; Ruiz-Romero, C.; Blanco, F. J. *J. Proteomics* **2012**, 75, (10), 2869-2878.
5. Remy-Martin, F.; El Osta, M.; Lucchi, G.; Zeggari, R.; Leblois, T.; Bellon, S.; Ducoroy, P.; Boireau, W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, (2), 423-432.
6. Bellon, S.; Buchmann, W.; Gonnet, F.; Jarroux, N.; Anger-Leroy, M.; Guillonneau, F.; Daniel, R. *Anal. Chem.* **2009**, 81, (18), 7695-7702.
7. Wang, W. Z.; Zhang, D.; Wei, Z. W.; Wang, Z. H.; Bu, X. L.; Yang, S.; Fang, Q. J.; Hu, Z. Y. *Talanta* **2015**, 134, 705-711.
8. Andrews, D. L.; Mackay, T. G. *NANOP* **2008**, 2, (1), 021899-021899-2.
9. Wood, R. W. *Philos. Mag. Series 6* **1902**, 4, (21), 396-402.
10. Kretschm.E; Raether, H. *Zeitschrift Fur Naturforschung Part a-Astrophysik Physik Und Physikalische Chemie* **1968**, A 23, (12), 2135-&.
11. Otto, A. *Zeitschrift Fur Physik* **1968**, 216, (4), 398-&.

12. Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, (2), 299-304.
13. Yeatman, E.; Ash, E. A. *Electron. Lett.* **1987**, 23, (20), 1091-1092.
14. Rothenhausler, B.; Knoll, W. *Nature* **1988**, 332, (6165), 615-617.
15. Jordan, C. E.; Frutos, A. G.; Thiel, A. J.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (24), 4939-4947.
16. Thiel, A. J.; Frutos, A. G.; Jordan, C. E.; Corn, R. M.; Smith, L. M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (24), 4948-4956.
17. Jordan, C. E.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (7), 1449-1456.
18. Nelson, B. P.; Frutos, A. G.; Brockman, J. M.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, 71, (18), 3928-3934.
19. Scarano, S.; Scuffi, C.; Mascini, M.; Minunni, M. *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 26, (4), 1380-1385.
20. Polo, J. J. A.; Mackay, T. G.; Lakhtakia, A. *J. Opt. Soc. Am. B* **2011**, 28, (11), 2656-2666.
21. Zayats, A. V.; Smolyaninov, II; Maradudin, A. A. *Phys. Rep.-Rev. Sec. Phys. Lett.* **2005**, 408, (3-4), 131-314.
22. Yang, F. Z.; Sambles, J. R.; Bradberry, G. W. *Phys. Rev. B* **1991**, 44, (11), 5855-5872.
23. Debruijn, H. E.; Kooyman, R. P. H.; Greve, J. *Appl. Opt.* **1992**, 31, (4), 440-442.
24. Homola, J., *Surface plasmon resonance based sensors*. Springer-Verlag: Berlin, 2006.
25. Bolduc, O. R.; Live, L. S.; Masson, J. F. *Talanta* **2009**, 77, (5), 1680-1687.
26. Zhao, S. S.; Bukar, N.; Toulouse, J. L.; Pelechacz, D.; Robitaille, R.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 64, 664-670.

27. Couture, M.; Zhao, S. S.; Masson, J. F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2013**, 15, (27), 11190-11216.
28. Blow, N. *Nat. Methods* **2009**, 6, (5), 389-392.
29. Hoa, X. D.; Kirk, A. G.; Tabrizian, M. *Biosensors and Bioelectronics* **2007**, 23, (2), 151-160.
30. Paul, S.; Vadgama, P.; Ray, A. K. *Nanobiotechnology, IET* **2009**, 3, (3), 71-80.
31. Malic, L.; Cui, B.; Veres, T.; Tabrizian, M. *Optics Letters* **2007**, 32, (21), 3092-3094.
32. Abadian, P. N.; Goluch, E. D. *Analytical Methods* **2015**, 7, (1), 115-122.
33. Fang, S.; Lee, H. J.; Wark, A. W.; Corn, R. M. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, 128, (43), 14044-14046.
34. Griffiths, J. *Anal. Chem.* **2008**, 80, (15), 5678-5683.
35. Hillenkamp, F.; Karas, M. *International Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 200, (1-3), 71-77.
36. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, 60, (20), 2299-2301.
37. Wu, W. W.; Wang, G. H.; Baek, S. J.; Shen, R. F. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, (3), 651-658.
38. Bodnar, W. M.; Blackburn, R. K.; Krise, J. M.; Moseley, M. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, (9), 971-979.
39. Yu, W. J.; Li, Y.; Deng, C. H.; Zhang, X. M. *Electrophoresis* **2006**, 27, (11), 2100-2110.
40. Jacksen, J.; Frisk, T.; Redeby, T.; Parmar, V.; van der Wijngaart, W.; Stemme, G.; Emmer, A. *Electrophoresis* **2007**, 28, (14), 2458-2465.
41. Fox, K.; Fox, A.; Rose, J.; Walla, M. *J. Microbiol. Methods* **2011**, 84, (2), 243-250.

42. Murray, K. K. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, 16, (5), 283-299.
43. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, 17, (5), 337-366.
44. Chughtai, K.; Heeren, R. M. A. *Chem. Rev.* **2010**, 110, (5), 3237-3277.
45. Dreisewerd, K. *Chem. Rev.* **2003**, 103, (2), 395-425.
46. Nordhoff, E.; Ingendoh, A.; Cramer, R.; Overberg, A.; Stahl, B.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Crain, P. F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, (12), 771-776.
47. Demirev, P.; Westman, A.; Reimann, C. T.; Hakansson, P.; Barofsky, D.; Sundqvist, B. U. R.; Cheng, Y. D.; Seibt, W.; Siegbahn, K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, 6, (3), 187-191.
48. Woods, A. S.; Ugarov, M.; Jackson, S. N.; Egan, T.; Wang, H. Y. J.; Murray, K. K.; Schultz, J. A. *J. Proteome Res.* **2006**, 5, (6), 1484-1487.
49. Thomas, A.; Chaurand, P. *Bioanalysis* **2014**, 6, (7), 967-982.
50. Knochenmuss, R. *Analyst* **2006**, 131, (9), 966-986.
51. Steenvoorden, R.; Breuker, K.; Zenobi, R. *Eur. Mass Spectrom.* **1997**, 3, (5), 339-346.
52. Burton, R. D.; Watson, C. H.; Eyler, J. R.; Lang, G. L.; Powell, D. H.; Avery, M. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, 11, (5), 443-446.
53. Karas, M.; Gluckmann, M.; Schafer, J. *Journal of Mass Spectrometry* **2000**, 35, (1), 1-12.
54. Kruger, R.; Karas, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, 13, (10), 1218-1226.
55. Hoberg, A. M.; Haddleton, D. M.; Derrick, P. J. *Eur. Mass Spectrom.* **1997**, 3, (6), 471-473.
56. Burgers, P. C.; Terlouw, J. K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1998**, 12, (12), 801-804.

57. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, 27, (4), 472-480.
58. Jorgensen, T. J. D.; Bojesen, G.; Rahbek-Nielsen, H. *Eur. Mass Spectrom.* **1998**, 4, (1), 39-45.
59. Cameron, A. E.; Eggers, D. F. *Rev. Sci. Instrum.* **1948**, 19, (9), 605-607.
60. Stephens, W. E. *Physical Review* **1946**, 69, (11-1), 691-691.
61. Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, 26, (12), 1150-1157.
62. Onnerfjord, P.; Nilsson, J.; Wallman, L.; Laurell, T.; Marko-Varga, G. *Anal. Chem.* **1998**, 70, (22), 4755-4760.
63. Hirsch, J.; Hansen, K. C.; Burlingame, A. L.; Matthey, M. A. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* **2004**, 287, (1), L1-L23.
64. Mamyrin B. A. , K. V. I., Shmikk D. V. and Zagulin V. A. *Journal of Experimental and Theoretical Physics* **1973**, 64, 82-89.
65. Mamyrin, B. A. *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, 206, (3), 251-266.
66. McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, 26, (4), 606-643.
67. McDonnell, L. A.; Mize, T. H.; Luxembourg, S. L.; Koster, S.; Eijkel, G. B.; Verpoorte, E.; de Rooij, N. F.; Heeren, R. M. A. *Anal. Chem.* **2003**, 75, (17), 4373-4381.
68. Puglielli, L.; Tanzi, R. E.; Kovacs, D. M. *Nat Neurosci* **2003**, 6, (4), 345-351.
69. Clerc, J.; Fourré, C.; Fragu, P. *Cell Biology International* **1997**, 21, (10), 619-633.
70. Groseclose, M. R.; Castellino, S. *Anal. Chem.* **2013**, 85, (21), 10099-10106.
71. Horiba <http://www.horiba.com/>

72. Rauser, S.; Marquardt, C.; Balluff, B.; Deininger, S. O.; Albers, C.; Belau, E.; Hartmer, R.; Suckau, D.; Specht, K.; Ebert, M. P.; Schmitt, M.; Aubele, M.; Hofler, H.; Walch, A. *J. Proteome Res.* **2010**, 9, (4), 1854-1863.
73. Shimma, S.; Sugiura, Y.; Hayasaka, T.; Hoshikawa, Y.; Noda, T.; Setou, M. *J. Chromatogr. B* **2007**, 855, (1), 98-103.
74. Schwamborn, K.; Krieg, R. C.; Reska, M.; Jakse, G.; Knuechel, R.; Wellmann, A. *Int. J. Mol. Med.* **2007**, 20, (2), 155-159.
75. Chaurand, P.; Sanders, M. E.; Jensen, R. A.; Caprioli, R. M. *Am. J. Pathol.* **2004**, 165, (4), 1057-1068.
76. Wisztorski, M.; Lemaire, R.; Stauber, J.; Menguelet, S. A.; Croix, D.; Mathe, O. J.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Curr. Pharm. Design* **2007**, 13, (32), 3317-3324.
77. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, 69, (23), 4751-4760.
78. Francese, S.; Dani, F. R.; Traldi, P.; Mastrobuoni, G.; Pieraccini, G.; Moneti, G. *Comb. Chem. High Throughput Screen* **2009**, 12, (2), 156-174.
79. Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, 71, (23), 5263-5270.
80. Rasmussen, G. T.; Isenhour, T. L. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **1979**, 19, (3), 179-186.
81. Nicola, A. J.; Gusev, A. I.; Hercules, D. M. *Appl. Spectrosc.* **1996**, 50, (12), 1479-1482.
82. Benk, A. S.; Roesli, C. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, (4), 1039-1056.
83. Franck, J.; Quanico, J.; Wisztorski, M.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2013**, 85, (17), 8127-8134.
84. Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. *Sens. Actuator B-Chem.* **1999**, 54, (1-2), 3-15.

85. Homola, J. *Chem. Rev.* **2008**, 108, (2), 462-493.
86. Zhao, S. S.; Bolduc, O. R.; Colin, D. Y.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F., Development of LSPR and SPR sensors for the detection of an anti-cancer drug for chemotherapy. In *Plasmonics in Biology and Medicine IX*, VoDinh, T.; Lakowicz, J. R., Eds. Spie-Int Soc Optical Engineering: Bellingham, 2012; Vol. 8234.
87. Chapman, R. G.; Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2000**, 16, (17), 6927-6936.
88. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Holmlin, R. E.; Takayama, S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, 17, (18), 5605-5620.
89. Ostuni, E.; Chapman, R. G.; Liang, M. N.; Meluleni, G.; Pier, G.; Ingber, D. E.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, 17, (20), 6336-6343.
90. Ostuni, E.; Grzybowski, B. A.; Mrksich, M.; Roberts, C. S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2003**, 19, (5), 1861-1872.
91. Green, R. J.; Davies, M. C.; Roberts, C. J.; Tendler, S. J. B. *Biomaterials* **1999**, 20, (4), 385-391.
92. Bolduc, O. R.; Masson, J.-F. *Langmuir* **2008**, 24, (20), 12085-12091.
93. Aube, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J.-F. *Langmuir* **2013**, 29, (32), 10141-10148.
94. Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Masson, J. F. *Anal. Chem.* **2014**, 86, (19), 9612-9619.
95. Shumaker-Parry, J. S.; Campbell, C. T. *Anal. Chem.* **2004**, 76, (4), 907-917.
96. Scarano, S.; Mascini, M.; Turner, A. P. F.; Minunni, M. *Biosensors & Bioelectronics* **2010**, 25, (5), 957-966.
97. Peterson, A. W.; Halter, M.; Tona, A.; Plant, A. L. *BMC Cell Biol.* **2014**, 15, 14.

98. Peterson, A. W.; Halter, M.; Tona, A.; Bhadriraju, K.; Plant, A. L. *BMC Cell Biol.* **2009**, 10, 17.
99. Halpern, A. R.; Wood, J. B.; Wang, Y.; Corn, R. M. *Acs Nano* **2014**, 8, (1), 1022-1030.
100. Abadian, P. N.; Kelley, C. P.; Goluch, E. D. *Analytical Chemistry* **2014**, 86, (6), 2799-2812.
101. Abadian, P. N.; Tandogan, N.; Jamieson, J. J.; Goluch, E. D. *Biomicrofluidics* **2014**, 8, (2).
102. Sparbier, K.; Wenzel, T.; Dihazi, H.; Blaschke, S.; Muller, G. A.; Deelder, A.; Flad, T.; Kostrzewa, M. *Proteomics* **2009**, 9, (6), 1442-1450.
103. Kim, Y. E.; Yi, S. Y.; Lee, C. S.; Jung, Y.; Chung, B. H. *Analyst* **2012**, 137, (2), 386-392.
104. Fournaise, E.; Chaurand, P. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, (8), 2159-2166.
105. Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, 19, (8), 1069-1077.
106. Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **1999**, 15, (1), 3-30.
107. Aube, A.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Pelletier, J. N.; Masson, J. F. *Langmuir* **2013**, 29, (32), 10141-10148.
108. Nenninger, G. G.; Piliarik, M.; Homola, J. *Meas. Sci. Technol.* **2002**, 13, (12), 2038-2046.
109. Erickson, H. P. *Biol. Proced. Online* **2009**, 11, (1), 32-51.
110. Thomas, A.; Patterson, N. H.; Charbonneau, J. L.; Chaurand, P. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, 48, (1), 42-48.

111. Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17, (4), 431-436.

Chapitre 5 Annexe

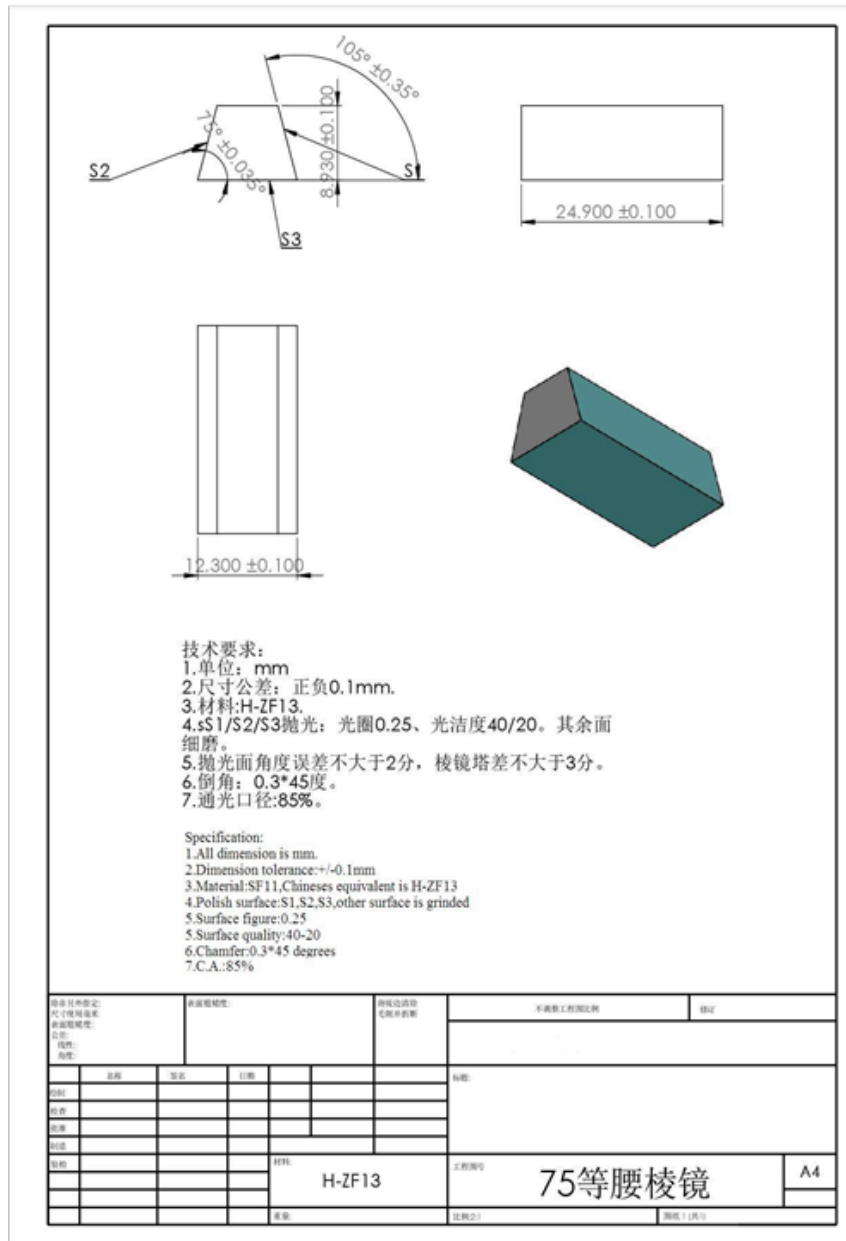


Figure A1: Schémas des prismes utilisés dans l'instrument SPRi

5.1 Code Matlab utilisé pour le traitement des données fournies par l'imageur

Afin de produire l'image SPR, les images P1 et P2 du scan de référence sont mises dans un fichier commun avec les fichiers de code *Minpixhunthr* et *SPRi_Process*. Par la suite, le code *SPRi_Process* est opéré afin de produire l'image de référence nommée *SPR_image_1*. Ensuite, la même stratégie est faite avec les images P1 et P2 du scan de transfert afin de produire l'image SPR de transfert *SPR_image_2*. Finalement, l'image finale en ng/cm^2 est obtenue en procédant le code *Image_masse*.

5.1.1 Code *Minpixhunthr*

```
for i = 1:1:576
[mins]=minpixhunthr(B(:, :, i), theta);
SPR_image_1(:, i) = mins';
end
figure
imagesc(SPR_image_1)

%[mins,pixs,Y]=minpixhunthr(A);
%A is the matrix of ratioed spectra
%mins is the wavelength minima of each spectrum
%pixs is the pixel minima of each spectrum
%Y is the section parabola from which the minima is determined

function [mins,pixs,Y]=minpixhunthr(A, angle);
%wavel=( [1:1:1024].*0.0324+647)';
wavel=angle;
[m,n]=size(A);
count=1;
pixel=[1:1:100]';
countr=1;
mins=[];
for i=1:1:n
    [mn,indx]=min(A(:, i));
    %[startp, endp]=fpnts(A(:, i), mn, indx);
    [startp]=1;
    [endp]=100;
    dip=A(startp:endp, i);
    wvdip=pixel(startp:endp);
```

```

    p=polyfit(wavdip,dip,2);
    pp=polyder(p);
    min1=roots(pp);
    mins=[mins,min1];
end;
pixs=round(mins);
[m,n]=size(A);
Y=[];
for j=1:1:n
    [mn,indx]=min(A(:,j));
    %[stp,enp]=fpnts(A(:,j),mn,pixs(j));
    [stp]=1;
    enp=100;
    dip=A(stp:enp,j);
    wavdip=wavel(stp:enp);
    p=polyfit(wavdip,dip,2);
    ppv=polyval(p,wavdip);
    pp=polyder(p);
    Y=[Y;ppv];
    mins(:,j)=roots(pp);
    countr=countr+1;
end;

```

5.1.2 Code *SPR_Process*

```

for k = 1:1:100
jpgFilename = strcat('P2_', num2str(k), '.tif');
S(:, :, k) = imread(jpgFilename);
end

for k = 1:1:100
jpgFilename = strcat('P1_', num2str(k), '.tif');
P(:, :, k) = imread(jpgFilename);
end

P = double(P);
S = double(S);
rat = P./S;

B = permute(rat, [3,1,2]);

for i = 1:1:576

```

```
[mins]=minpixhunthr(B(:,:,i),theta);  
SPR_image_1(:,i) = mins';  
end  
figure  
imagesc(SPR_image_1)
```

5.1.3 Code *Image_Masse*

```
ImageSPR = SPR_image_2-SPR_image_1;  
ABSImageSPR = abs(ImageSPR);  
NEGImageSPR = -ABSImageSPR;  
ImageSPRmasse = 230e-7 * log10(1-(NEGImageSPR/31.179))*1.3*1e9;  
imagesc(ImageSPRmasse)
```