

Université de Montréal

Nouvelles Stratégies Analytiques Favorisant l'Augmentation
de la Spécificité et de la Sensibilité en Imagerie MS

Par Martin Dufresne

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en chimie

Septembre 2016

©Martin Dufresne, 2016

Résumé

La spectrométrie de masse est une technique analytique permettant de mesurer le ratio masse sur charge d'un ion. Cette technique, très répandue en chimie analytique permet d'élucider la composition moléculaire de mélanges complexes à partir de systèmes homogénéisés. De ce fait, toute l'information sur la distribution spatiale des molécules est perdue. L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) a été inventée afin de résoudre ce problème et permettre d'élucider la distribution spatiale de molécules cibles sur des sections tissulaires minces provenant de tissus biologiques tels que de mammifères ou de plantes. L'un des grands avantages de l'IMS est sa complémentarité à l'histopathologie, technique permettant de révéler la structure ainsi que la localisation de certaines biomolécules à partir de sections tissulaires minces. Cependant, cette dernière se limite principalement aux protéines et aux molécules pouvant avoir une interaction spécifique avec un anticorps. L'IMS permet la détection d'une vaste gamme de biomolécules allant des petits métabolites aux polymères de haut poids moléculaire. Parmi les biomolécules détectables par IMS, les lipides attirent de plus en plus l'attention des analystes. En effet, ils occupent différentes fonctions clés au sein des systèmes biologiques, autant structurales que métaboliques, comme constituants des parois cellulaires, acteurs de la signalisation cellulaires ainsi que dans le stockage d'énergie. Leur intérêt est d'autant plus important qu'aucune technique histologique classique ne permet actuellement de détecter de façon spécifique les différentes classes de lipides.

De façon générale, l'IMS de lipides est effectuée en utilisant la désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI). Ce procédé permet de révéler l'emplacement de

différentes classes de molécules en exploitant l'affinité que ces dernières ont pour une matrice particulière. Au-delà du choix de la matrice, d'autres paramètres tels que le mode de déposition de la matrice, le choix des solvants ainsi que le type de lavage utilisé vont également affecter le type de molécules détectés lors d'une analyse MALDI. Malgré les très bonnes performances du MALDI pour l'analyse de lipides, ce mode d'analyse se limite souvent aux lipides polaires facilement ionisables. Les lipides neutres comme le cholestérol (CHO) et les triacylglycérols (TAGs) sont impliqués à différents niveaux de fonctions biologiques fondamentales. Ainsi, nous avons développé trois stratégies permettant l'analyse de ces lipides neutres et de faibles abondances comme les gangliosides, directement à partir de sections tissulaires minces par MALDI ainsi que par désorption-ionisation laser classique (LDI).

L'implication du cholestérol en tant que molécule structurale et précurseur de la synthèse de diverses hormones et vitamines, en fait une cible de choix pour l'analyse par IMS. Historiquement, l'analyse du cholestérol par MALDI permettait de le détecter sous sa forme déshydratée. De ce fait, il était impossible de le distinguer des autres métabolites tels que ses esters qui produisaient le même fragment. Afin de permettre l'IMS du cholestérol intact nous avons développé une nouvelle technique de préparation d'échantillons reposant sur le dépôt d'une couche nanométrique d'argent (16 ± 2 nm) sur une section tissulaire mince par pulvérisation. Cette technique permet d'ioniser spécifiquement le cholestérol intact ainsi que divers acides gras sous forme d'adduits d'argent, et ce, avec une haute résolution spatiale (5 μm).

Au-delà du cholestérol et des acides gras, une autre classe de lipides neutres très abondants, les triglycérides, reste difficilement analysable par MALDI IMS. En effet, les TAGs constituent la principale classe de lipides impliqués dans le stockage énergétique au niveau cellulaire. Ce rôle comme source d'énergie fait des TAGs un acteur incontournable de plusieurs maladies métaboliques telles que la stéatose hépatique, l'athérosclérose ainsi que la maladie d'Alzheimer. La difficulté d'analyser les TAGs par IMS provient de leur fragilité en milieu acide ainsi que de leur faible tendance à former des adduits sodium nécessaire à leurs analyses. En considérant ces limites, nous avons développé une méthodologie de préparation d'échantillon en deux étapes permettant l'analyse hautement spécifique des TAGs par LDI IMS. Dans un premier temps, les sections tissulaires minces sont initialement exposées à une solution aqueuse contenant un tampon carbonate à base de sodium (pH 10.3, 85 mM) ainsi que d'acétate de sodium (250 mM) afin de faciliter la formation d'adduit sodium et de limiter la fragmentation des TAGs en source. Par la suite, une couche nanométrique d'or (28 ± 3 nm) est déposée sur la section afin de permettre l'analyse des TAGs par IMS à haute résolution spatiale ($> 10 \mu\text{m}$). Lorsque ces derniers ont une abondance réduite dans les sections tissulaires, cette méthode permet aussi l'analyse d'esters de cholestérol (CE).

La maladie de Hunter est une maladie génétique caractérisée par l'accumulation de glycosaminoglycanes (GAGs) ainsi que de l'accumulation secondaire de gangliosides. Ce phénomène est dû à l'absence de l'enzyme iduronate-2-sulfatase (IdS) qui permet la dégradation des GAGs. L'accumulation des GAGs et des gangliosides a pour conséquence l'apparition de problèmes fonctionnels et neurologiques majeurs entraînant la mort. Il existe une thérapie de remplacement enzymatique où une forme recombinante de l'enzyme IdS est injectée aux patients. Cette thérapie permet de rétablir le métabolisme normal des GAGs et

gangliosides dans tous les organes sauf le cerveau où la barrière hémato-encéphalique empêche l'IdS recombinante d'atteindre les zones affectées. L'étude de la composition moléculaire des dépôts de GAGs et gangliosides au niveau cérébral constitue un défi important afin de comprendre la progression des troubles neurologiques engendrés par cette accumulation. À cette fin, nous avons développé une méthode MALDI spécifique à l'analyse des gangliosides à partir de sections tissulaires minces de cerveau de souris simulant la maladie Hunter (IdS-KO). Cette méthode d'analyse par MALDI IMS permet une révélation immuno-histochimique (IHC) des dépôts suivant l'analyse IMS. Nous avons pu visualiser cinq types de gangliosides dont quatre spécifiques au dépôt présent dans les cerveaux révélés par IHC sur la même section tissulaire. Cette étude nous a permis de distinguer pour la première fois des GM3 et GM2 selon la composition de leur chaîne latérale et non de leur chaîne polysaccharidique révélée par l'analyse IHC.

Mots Clés : imagerie par spectrométrie de masse, argent, sodium, or, lipides, cholestérol, acide gras, triacylglycérol, ester de cholestérol, maladie de Hunter.

Abstract

Mass spectrometry (MS) is an analytical technique that measures the mass-to-charge ratio of ions. This technique is widely used in analytical chemistry to solve the molecular composition of complex homogenized samples. The use of homogenized samples means that all the information with respect to the initial distribution of analytes is lost. Imaging mass spectrometry (IMS) is an MS technique which is able to provide the spatial localization of a given analyte on a surface, such as thin tissue sections from various animal sources. One of the greatest advantages of IMS is its complementarity with histopathology which normally reveals the general structure of thin tissue sections as well as the localization of certain biomolecules such as proteins or of any molecules capable of specific interactions with an antibody. On the other hand, IMS is capable of imaging a wide variety of biomolecules ranging from small metabolites to the high molecular weight proteins and polymers. Among these, lipids are of particular interest for their key involvements in many biological processes. Their interest is even greater when considering that lipid imaging by classical histology is unable to differentiate between all lipid species.

IMS of lipids is typically performed using matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI). MALDI IMS can differentiate various classes of lipids and their localization within a thin tissue section by taking advantage of the specific affinity that different classes of lipids have for different matrices. The matrix deposition process, along with the choice of solvents, are key parameters that need to be considered in MALDI IMS. While MALDI offers great coverage of the phospholipidome, it fails miserably for neutral lipid analysis. Indeed, cholesterol and triacylglycerols (TAGs) are two classes of neutral lipids with very important

biological roles which are extremely difficult to image by MALDI. We have developed three new strategies that enables the detection of neutral lipids, some of which are expressed in low abundance such as gangliosides, directly from thin tissue section using either MALDI or laser desorption/ionization (LDI).

Cholesterol is a precursor of many key biomolecules such as vitamins and hormones. It's also a major component of the cellular membrane. MALDI IMS allows in some cases imaging of the dehydrated form of cholesterol. Unfortunately, detecting cholesterol as such makes it impossible to distinguish some of its metabolites which ionize in a similar fashion and dissociate to produce the same ions. To address this issue, we have developed a new sample preparation method involving the deposition of a nanometer scale silver layer (16 ± 2 nm) over a thin tissue section. This enables the detection by LDI MS of intact cholesterol and some fatty acid species as silver adducts with up to 5 μm in spatial resolution.

Beyond cholesterol and fatty acids, TAGs is another class of highly abundant neutral lipids still poorly detected by MALDI IMS. As TAGs are the main molecules involved in energy storage of cells, they have been implicated in many metabolic diseases such as non-alcoholic fatty liver disease, atherosclerosis and even Alzheimer's disease. The reason why TAGs are poorly detected by MALDI comes from two key factors. First, TAGs are unstable in acidic environments, typical of MALDI matrices. Second, competition effects for the ionizing proton provided by the MALDI matrix prevent TAGs from easily ionizing through this main ionization process. To overcome these limitations, we have developed a new two-step sample preparation method for TAG LDI IMS. We initially deposited a solution of carbonate buffer (pH 10.3, 85 mM) and sodium acetate (250 mM) on the tissue section to increase the amount

of available sodium for enhanced TAG ionization. The second step consisted of sputtering a nanometer scale UV absorbing gold layer (28 ± 3 nm) that allows for the detection of TAGs by LDI IMS with spatial resolution as low as $10\ \mu\text{m}$. When TAGs are present in low amounts in the tissue section, this method also enables the detection of cholesterol esters.

Hunter's disease is a genetic disease characterized by the abnormal accumulation of glucoaminoglycans (GAGs) and the secondary accumulation of gangliosides due to the lack of iduronate-2-sulfatase (IdS) enzyme which controls their degradation. The accumulation of both GAGs and gangliosides form deposits which induces various functional issues to different organs as well as neurologic disorders. To minimize these effects, an enzyme replacement therapy has been developed. Unfortunately, it shows efficacy in all organs except the brain due to the inability of the recombinant enzyme to cross the blood-brain barrier. To further our knowledge of the progression of the disease, using a mouse model of Hunter's disease we have developed a MALDI based method to specifically image gangliosides in brain deposits with a spatial resolution of $5\ \mu\text{m}$. This method also permits subsequent ganglioside staining by immunohistochemistry of the tissue section. With this method, we have identified four types of ganglioside which are specific to the Hunter's disease pathology. We were also able to detect two types of deposits, one which is enriched in short chain gangliosides and the other in long chain gangliosides.

Key words : imaging mass spectrometry, silver, sodium, gold, lipid, cholesterol, fatty acid, triacylglycerol, cholesterol ester, Hunter's disease.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	v
Liste des figures.....	xiv
Liste des sigles et abréviations.....	xvi
Remerciements.....	xxi
Chapitre 1: Introduction.....	1
1.1 Spectrométrie de masse.....	2
1.1.1 Désorption et ionisation laser.....	2
1.1.1.1 “Matrix assisted laser desorption/ionization” du métabolome au protéome .	3
1.1.1.2 “Surface assisted laser desorption/ionization” l’alternative au MALDI	4
1.1.1.3 “Surface enhanced laser desorption/ionization” : l’arrivée de la chimie de surface	6
1.1.2 L’analyseur de masse par temps de vol	7
1.1.2.1 L’analyse en mode réflectron	9
1.1.2.2 Le délai d’extraction.....	10
1.1.3 L’analyse par spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF (MS/MS)	13
1.2 Imagerie par spectrométrie de masse (MA)LDI.....	15
1.2.1 L’analyse de tissu biologique par IMS	18

1.2.2	L'imagerie (MA)LDI de lipides neutres	19
1.2.2.1	Les acides gras	20
1.2.2.2	Les glycérolipides	22
1.2.2.3	Les sphingolipides	23
1.2.2.4	Les stérols	24
1.2.3	Identification par fragmentation	25
1.2.3.1	Les acides gras	25
1.2.3.2	Les glycérolipides	26
1.2.3.3	Les gangliosides	26
1.2.3.4	Les stérols	26
1.2.4	L'analyse biomédicale des lipides neutre par IMS	27
1.3	Les cations métalliques comme agent d'ionisation	28
1.3.1	L'interaction cation métallique-analyte	29
1.3.2	Préparation des échantillons pour l'IMS assistée par métal	29
1.4	Ionisation par adduit d'argent	30
1.4.1	Limitations pour l'IMS de sections tissulaires minces	31
1.5	Ionisation par adduit sodium	32
1.5.1	Limitations pour l'IMS de sections tissulaires minces	33
1.6	La maladie de Hunter (HD).....	35
1.6.1	Les défis techniques de l'imagerie à haute résolution spatiale	36

1.7	Objectifs de recherche	37
Chapitre 2: Silver-Assisted Laser Desorption Ionization For High Spatial Resolution Imaging		
	Mass Spectrometry of Olefins from Thin Tissue Sections	39
2.1	Abstract	40
2.2	Introduction	40
2.3	Materials and Methods	43
2.3.1	Chemicals and Reagents	43
2.3.2	Tissue sampling and sectioning	43
2.3.3	Sputter coating	44
2.3.4	Silver layer characterization.....	44
2.3.5	LDI mass spectrometry	45
2.4	Results and Discussion.....	46
2.4.1	On tissue silver layer optimization	46
2.4.2	Characterization of olefins from mouse brain and kidney tissue sections	49
2.4.3	IMS of a mouse kidney silver coated section	52
2.4.4	IMS of a mouse brain silver coated section	53
2.4.5	High spatial resolution IMS of a mouse cerebellum section	56
2.5	Conclusion.....	57
2.6	Acknowledgements	58
2.7	Supporting informations.....	59

Chapitre 3: Sodium doped gold assisted laser desorption ionization for enhanced imaging mass spectrometry of triacylglycerols from thin tissue sections.....	68
3.1 Abstract	69
3.2 Introduction	69
3.3 Materials and methods	72
3.3.1 Chemicals and Reagents	72
3.3.2 Tissue sampling and sectioning	72
3.3.3 Salt deposition.....	73
3.3.4 Metal sputtering and layer characterization	73
3.3.5 Matrix deposition	73
3.3.6 LDI mass spectrometry	74
3.3.7 Data analysis	75
3.4 Results and Discussion	75
3.4.1 On tissue optimization/characterization.....	75
3.4.2 On-tissue signal identification	80
3.4.3 Mouse liver CBS-Au-LDI IMS at high spatial resolution	82
3.4.4 Rabbit adrenal gland CBS-Au-LDI IMS	84
3.5 Conclusion.....	87
3.6 Acknowledgements	88
3.7 Supplemental Informations	89

Chapitre 4: Detection of GM2 and GM3 lipid species in the brain of mucopolysaccharidosis type II mouse by imaging mass spectrometry.....**Error! Bookmark not defined.**

4.1	Abstract	111
4.2	Introduction	111
4.3	Materials and methods	115
4.3.1	Chemicals and Reagents	115
4.3.2	Tissue sampling and sectioning	116
4.3.3	Anti-GM3 Immunohistochemistry.....	116
4.3.4	Alcian blue staining	116
4.3.5	Thionin staining	117
4.3.6	Matrix deposition	117
4.3.7	MALDI mass spectrometry.....	117
4.4	Results and Discussion.....	118
4.4.1	Histological analysis	118
4.4.2	On-tissue MS signal identification.....	121
4.4.3	IMS experiments and correlation to IHC	123
4.5	Conclusion.....	129
4.6	Supporting information:	130
Chapitre 5: Conclusions et perspectives		141
5.1	Conclusions	141

5.2 Perspectives de recherche.....	143
Bibliographie.....	146

Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation MALDI.	4
Figure 1.2 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation SALDI.	6
Figure 1.3 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation SELDI.	7
Figure 1.4 : Schéma d'un spectromètre de masse LDI avec un analyseur TOF linéaire.	9
Figure 1.5 : Schéma représentant un système LDI-TOF possédant un réflectron.	10
Figure 1.6 : Schéma explicatif de l'application du délai d'extraction pour une analyse en TOF linéaire.	12
Figure 1.7 : Visualisation de l'amélioration de la résolution spectrale pour l'analyse de l'angiotensine I.	13
Figure 1.8 : Schéma explicatif d'une analyse MS/MS dans un système MALDI TOF/TOF. ...	15
Figure 1.9 : Schéma des différentes étapes d'une analyse par IMS.	17
Figure 1.10 : Schéma des cinq grandes familles de lipides et leur structure générale.	21
Figure 1.11 : Schéma des principales voies de synthèse des lipides à partir du citrate.	22
Figure 1.12 : Schéma de la biosynthèse des gangliosides.	24
Figure 1.13 : Schéma de fragmentation du cholestérol par dissociation induite par collision.	27
Figure: 2.1 : LDI-MS spectra acquired from a mouse brain section in the white matter (top) and in the grey matter (bottom) with a silver coating of 23 ± 2 nm.	47
Figure 2.2 : MS/MS spectra acquired from a mouse kidney tissue section.	51
Figure 2.3 : Imaging MS of a midsagittal mouse kidney acquired at $150\ \mu\text{m}$ spatial resolution after silver sputtered coating (16 ± 2 nm).	53

Figure 2.4 : Imaging MS of a mouse brain section cut in the horizontal plane approximately 3.0 mm from bregma. IMS was performed with a lateral resolution of 100 μm after 23 ± 2 nm silver sputter coating.	55
Figure 2.5 : High spatial resolution imaging MS acquired from a horizontal mouse cerebellum region coated with silver and acquired with a 5 μm lateral resolution.	57
Figure 3.1 : On-tissue CBS-Au-LDI MS optimisation.	77
Figure 3.2 : On-tissue CBS-Au-LDI MS/MS spectrum of TAG (52:2) at m/z 881.7 with its most probable structure based on the most abundant fragment ions.	82
Figure 3.3 : CBS-Au-LDI IMS of a mouse liver section acquired with lateral resolutions of (a) 25 μm and (b) 10 μm	84
Figure 3.4 : CBS-Au-LDI MS and IMS data from a rabbit AD tissue section.	86
Figure 4.1 : GM3 immunostained neurons in medial brain cortex (CxM).	121
Figure 4.2 : MALDI MS profile and MS/MS spectra.	122
Figure 4.3 : Comparative images of GM3 immunostaining and MALDI IMS signal for GM3-C20:0 at m/z 1207.7 in medial cerebral cortex.	125
Figure 4.4 : 5 μm spatial resolution MALDI IMS images acquired from a medial brain cortex (CxM) tissue section of the IDS-KO mouse #5.	126
Figure 4.5 : 5 μm spatial resolution MALDI IMS images acquired from a medial brain cortex (CxM) tissue section of the IDS-KO mouse #1.	128

Liste des sigles et abréviations

AA	Acide arachidonique
AB	Bleu d'alcian
ACN	Acétonitrile
AD	Glande surrénale
AgLDI	LDI assistée par argent
CB	Tampon carbonate
CBS	CB et sel
CBS-Au-LDI	LDI assistée par or et CBS
CE	Ester de cholestérol
Cer	Céramide
CHCA	Acide α -Cyano-4-hydroxycinnamique
CHO	Cholestérol
CID	Dissociation par collision
Da	Dalton
DAG	Diacylglycérol

DAN	1,5-diaminonaphtalène
DESI	Désorption ionisation par nébulisation électrostatique
DHA	Acide docosaénoïque
DHB	Acide 1,5-dihydroxybenzoïque
DIOS	Désorption/ionisation sur silicone
FA	Acide gras
FT-ICR	Résonance cyclotronique d'ion par transformé de Fourier
GAG	Glycosaminoglycane
GL	Glycérolipides
HD	Maladie de Hunter
H&E	Hématoxyline et éosine
Hz	Hertz
IHC	Immunohistochimie
IdS	Enzyme iduronate-2-sulfatase
IdS-KO	Déficience de l'enzyme iduronate-2-sulfatase
IMS	Imagerie par spectrométrie de masse
ITO	Oxide d'indium étain

LDI	Désorption par ionisation laser
<i>m/z</i>	Ratio masse sur charge
MALDI	Désorption/ionisation laser assistée par matrice
(MA)LDI	MALDI et LDI
MeOH	Méthanol
MS	Spectrométrie de masse
MS/MS	Spectrométrie de masse en tandem
NaAc	Acétate de sodium
NaOTf	Triflate de sodium
NEG	Ionisation en mode négatif
NIMS	Spectrométrie de masse par nanostructure
NL	Perte de neutre
ORO	OilRedO
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PL	Phospholipide
POL	1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol

POS	Ionisation positive
PSD	Décomposition après source
RT	Température pièce
S/N	Signal sur bruit
SALDI	Désorption/ionisation laser assistée à l'aide d'une surface
SELDI	Désorption/ionisation laser augmentée à l'aide d'une surface
SAEC	Capture par affinité assistée à l'aide d'une surface
SEND	Désorption direct assistée à l'aide d'une surface
SEM	Microscopie électronique par balayage
SIMS	Spectrométrie de masse par ion secondaire
SP	Sphingolipide
SSI	Somme des intensités de signaux
ST	Lipide stérol
TAG	Triacylglycérol
TOF	Temps de vol
TOF/TOF	TOF en tandem

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

- Carl Sagan

Remerciements

La réalisation de cette thèse fut pour moi le plus grand défi que j'ai eu à relever à ce jour. Durant les 5 dernières années, j'ai pu rencontrer plusieurs personnes qui m'ont soutenu au travers de ce travail monumental qu'est la quête du grade de Ph. D. en chimie.

Je vais commencer par remercier ma famille (Sylvie Larouche, Frédéric Dufresne et Claudine Dufresne) qui a su comprendre mon absence des 5 dernières années et qui a su me supporter au travers de mes études. Évidemment, le professeur Pierre Chaurand qui a vu, en un élève ayant une cote de 3.0, un chercheur ayant le talent et les nerfs d'entreprendre des études au cycle supérieur. Pierre m'a permis d'évoluer grandement au cours de mes années au sein de son groupe en me supportant au cours de diverses étapes de ma progression académique, en m'offrant toutes les opportunités d'avancement possible et surtout pour m'avoir fait autant confiance dans le cadre de ma recherche. Je pense aussi à Aurélien Thomas, le premier post-doc de notre groupe, avec qui j'ai commencé mon apprentissage en imagerie MS, ainsi que notre employé de l'époque Jade Laveaux Charbonneau qui nous a enseigné les différentes techniques nécessaires à l'IMS. Nathan Heath Patterson, qui a commencé son Ph. D. quelque mois après moi, sans qui je serais encore en train de me demander ce que toutes mes données veulent réellement dire. Je remercie aussi tous les membres actuels et passés du groupe soit : Érik Fournaise, Nidia Lauzon, Élisabeth-Ann Kranjec et Carine Bourget qui m'a aidé dans la rédaction de cette thèse. Je n'oublie pas mes stagiaires Sonia Sacie et Daniel Guneyasu.

Je remercie aussi mes collaborateurs qui m'ont appuyé durant mes divers projets. Spécialement, le professeur Jean-François Masson, qui a su me faire confiance en me donnant accès à son laboratoire, ainsi qu'à ses instruments. Le Dr. Martin Marcinkiewicz pour toute

son aide en compréhension histologique, ainsi qu'aux divers conseils qu'il m'a donnés. Dr. Michel Demeule et Dr. Anthony Régina qui nous ont permis de participer à l'étude de la maladie de Hunter.

Je tiens aussi à remercier Thierry Havard pour m'avoir forcé à rejoindre l'AÉDCUM en tant qu'externe, ainsi que tout l'exécutif de l'année 2014-2015. Le bureau exécutif de la FAÉCUM 2014-2015, plus particulièrement Étienne Racine et Kevin L'Espérance, pour m'avoir intégré dans un aussi grand nombre d'associations étudiantes, ayant fait de cette année universitaire celle où j'ai pu rencontrer le plus de monde venant d'autant de programmes différents. Mon exécutif 2015-2016 à l'AÉDCUM, ainsi que le bureau exécutif 2015-2016 de la FAÉCUM pour m'avoir soutenu dans mes fonctions de président de l'AÉDCUM tout au long de mon mandat. Sans oublier le bureau exécutif de l'année 2016-2017 pour avoir organisé ma dernière rentrée universitaire et pour être aussi divertissant au jour le jour. J'aimerais aussi remercier le Martine ainsi que le Chalet dans le Sud pour m'avoir fait confiance lors de moments critiques et m'avoir soutenu dans ma progression au sein des instances universitaires. Les Pré-CC 2014 à 2016 pour m'avoir diverti durant les longs CC et congrès de la FAÉCUM. J'aimerais aussi souligner l'apport essentiel d'Arnaud, Francis, Benoit et Steph pour m'avoir accueilli aussi souvent dans leur domicile tard le soir.

Finalement, tous mes amis notamment Luis-André Leal, Luis-Ernesto Leal et Jean-François Lapointe pour toutes nos petites soirées de détente ainsi que Philippe Lebel et Philippe El-Alk pour m'avoir permis de passer un aussi bon Bac/Maîtrise et bien sûr tous les Gringos (Simon Forest, Simon Laporte, François Fournel, Marc-Antoine Vaudreuil et Olivier Rousseau) pour tout le temps passé à se divertir ensemble au travers de notre vie universitaire.

J'aimerais aussi souligner l'apport de tout le monde que j'ai rencontré lors de mes 8 ans à l'Université de Montréal pour avoir fait de ces années les plus belles de ma vie.

Chapitre 1: Introduction

1.1 Spectrométrie de masse

La MS fut inventée par J.J. Thomson au cours de ses recherches portant sur la transmission de l'électricité au travers d'un gaz au début des années 1900.¹ Le premier instrument conçu a permis pour la première fois de mesurer le ratio charge sur masse d'un ion (e/m) en mesurant sa déflexion angulaire sur une plaque photographique suite à une déviation du faisceau d'ions par un champ électrique et magnétique parallèle. Cet instrument a permis, entre autres, de découvrir l'existence des deux isotopes naturels du néon en 1913.² Malgré cette faramineuse découverte, la MS mit près de 65 ans avant que deux nouvelles avancées dans la manière de produire les ions la consacrent comme technique analytique incontournable pour l'analyse de biomolécules.

Une première percée est arrivée en 1975 lorsque Hillenkamp *et al.* ont décrit l'utilisation d'une source laser UV pulsée pour l'analyse de biomolécules et d'atomes simples tel que le lithium.³ Cette découverte fut suivie, 9 ans plus tard, par la source ESI qui a permis l'analyse de biomolécules directement à partir d'une solution.⁴ Une fois couplée à un système de chromatographie liquide, cette dernière deviendra l'outil par excellence pour l'analyse de mélanges complexes ainsi que de devenir la principale source d'ionisation utilisée en métabolomique, lipidomique et protéomique.⁵⁻⁷

1.1.1 Désorption et ionisation laser

Suite à la découverte de Hillenkamp *et al.*, plusieurs avancées ont eu lieu quant au type de laser à utiliser ainsi que l'élargissement du type de biomolécules pouvant être analysé par LDI.^{8,9} C'est vers la fin des années '80 que la LDI pris réellement son envol avec la découverte du MALDI soit de l'utilisation d'une autre molécule organique dans la préparation

de l'échantillon pouvant absorber l'énergie émise par le laser et faciliter l'ionisation de l'analyte en lui transférant une charge souvent sous forme de proton.^{10,11} Cette dernière est, aujourd'hui, la forme de LDI la plus couramment utilisée due à sa large gamme de biomolécules analysable et surtout quant à sa grande compatibilité avec la technique d'IMS.¹²

1.1.1.1 “Matrix assisted laser desorption/ionization” du métabolome au protéome

Comme mentionné précédemment, le MALDI se base sur l'utilisation de molécules pouvant absorber l'énergie laser, étant stable sous vide poussé, aillant la capacité de co-cristaliser avec l'analyte et étant capable d'échanger un proton avec celui-ci afin de l'ioniser. Initialement, l'énergie laser est absorbée par la matrice ce qui crée un point de chaleur permettant la volatilisation du mélange analyte matrice (Figure 1.1A). S'en suit une expansion en phase gazeuse d'une plume de molécule générée par le point de chaleur (Figure 1.1B). Par la suite, l'analyte échange un proton avec une molécule de matrice excitée permettant ainsi son ionisation (Figure 1.1C). L'utilisation de la matrice comme molécule « sacrifice » permet au MALDI d'ioniser de façon très douce les analytes présents sur la surface d'analyse. Comme la matrice est introduite avec un grand excès par rapport à l'analyte (~5000:1), celle-ci devient alors la principale molécule permettant de dissiper le surplus d'énergie laser en se fragmentant durant les processus de désorption/ionisation. Ceci permet à l'analyte d'être désorbé de manière intacte contrairement à une analyse LDI classique où aucun véhicule ne permet la dissipation de l'énergie laser. Cette ionisation douce permet d'analyser une vaste gamme de biomolécules qui fragmenteraient dans des conditions LDI standards telles que les PL ou les TAG pour n'en nommer que deux. Ceci confère au MALDI la capacité d'analyser diverses classes de lipides,^{13,14} de peptides^{15,16} et de protéines^{10,17} rendant cette technique très versatile. Par contre, l'analyse de métabolites ou de toute molécule de faible poids moléculaire ($< m/z$

600) peut devenir très fastidieuse. La présence de la matrice dans un si grand excès a pour effet néfaste de produire une vaste variété de signaux dans les basses masses qui lui sont associée (fragments, adduits, agrégats, etc.) nuisant à la détection ainsi qu'à l'interprétation des résultats. Pour cette raison, diverses alternatives au MALDI ont vu le jour dans les années qui ont suivi sa découverte.

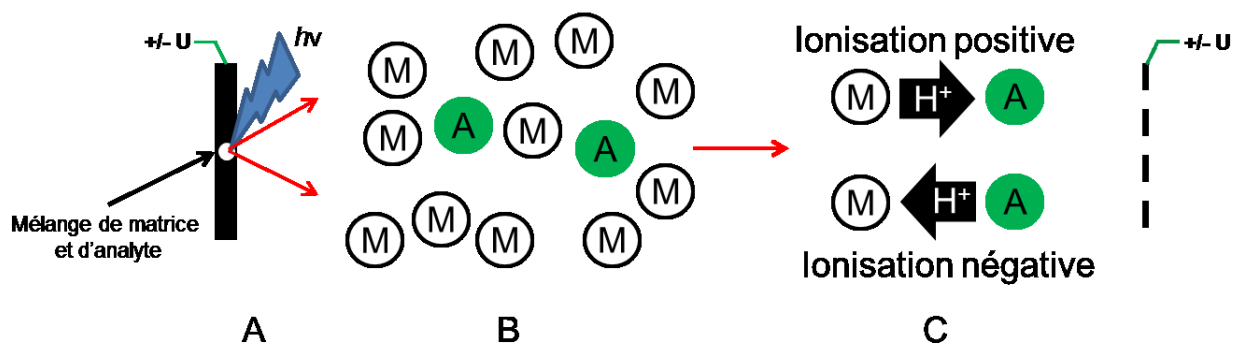


Figure 1.1 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation MALDI. (A) Vaporisation du mélange analyte matrice. (B) Plume d'expansion du mélange analyte/matrice en phase gazeuse. (C) Ionisation de l'analyte par la matrice soit de façon positive (+H⁺) ou négative (-H⁺).

1.1.1.2 “Surface assisted laser desorption/ionization” l'alternative au MALDI

Plusieurs avancés dans le domaine de la LDI sans matrice ont été effectués au fil des années pour minimiser voir éliminer la présence de signaux contaminants dans les basses masses. L'une des premières avancées fut l'utilisation d'agents dopants pour assister le processus de désorption sans toutefois participer l'ionisation de l'analyte. La première démonstration de cette technique nommée SALDI utilisait des nanoparticules de cobalt d'environ 30 nm mélangées avec l'analyte dans du glycérol pour profiter du grand ratio surface/volume de ces nanoparticules permettant la diffusion de l'énergie laser vers un très

large nombre d'analyte. Tanaka *et al.* ont ainsi pu théoriser le processus de désorption et ionisation thermique présent dans les source LDI.¹⁸ Ce processus de désorption et ionisation thermique est la distinction entre le SALDI et d'autres formes de LDI. Il implique que le substrat sur lequel repose l'analyte ou avec lequel celui-ci est mélangé puisse absorber l'énergie émise par le laser pour la diffuser et ainsi créer un point de chaleur permettant la désorption de l'analyte. Par la suite, celui-ci s'ionise par lui-même ou à l'aide de contaminant présent sur la surface et ceci seulement avec l'énergie thermique fournie lors de l'irradiation laser (Figure 1.2). Plusieurs autres types d'agents dopants tels que le nanocarbone,¹⁹ les nanotubes de carbone²⁰ ou même des oxydes métalliques²¹ furent utilisés en SALDI. L'utilisation de surface de silicone fut aussi utilisée en SALDI et, due à son large succès, cette variation du SALDI donna naissance au DIOS en 1999.²² Tout comme en SALDI, le DIOS exploite une surface de silicone chimiquement gravée pour assister le processus de désorption et d'ionisation. Le DIOS se distingue par sa grande versatilité permettant l'analyse de peptides ainsi que de petites biomolécules souvent difficiles à analyser en MALDI du aux signaux de matrice contaminant le spectre dans les basses masses.²³

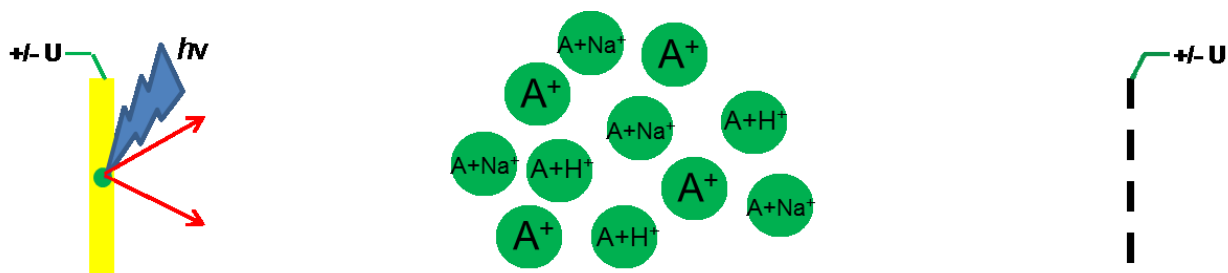


Figure 1.2 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation SALDI. Le substrat sur lequel l'analyte est déposé absorbe l'énergie laser et la transmet sous forme de chaleur à l'analyte pour lui permettre la désorption - ionisation. Le mode d'ionisation de l'analyte dépend beaucoup des contaminants présents lors de la préparation d'échantillon (Na^+ , K^+ , acide, base, etc.) ou de sa capacité à s'auto-ioniser.

1.1.1.3 “Surface enhanced laser desorption/ionization” : l'arrivée de la chimie de surface

Une deuxième forme de LDI a pris naissance en 1993 et cette fois-ci le substrat pour l'analyse LDI augmente le signal en agissant comme système de purification permettant la capture spécifique de certaines classes de biomolécules. Cette technique nommée le SELDI a été proposée par Hutchens et Yip qui ont démontré deux types de sonde SELDI soit une n'ayant pas recourt à l'ajout d'une matrice MALDI (SEND) et une autre capturant l'analyte par affinité suivi d'un ajout de matrice MALDI (SEAC).²⁴ En SEND une molécule est immobilisée sur toute la surface d'un substrat inerte, tel que du verre, sous forme de monocouche et cette surface jouera le rôle d'agent de désorption en absorbant l'énergie laser émise et en la retransmettant à l'analyte sous forme de chaleur un peu comme en SALDI (Figure 1.3A). Dans le cas du SEAC, la sonde est une fois de plus un substrat inerte qui est fonctionnalisé par un agent de capture tel qu'un brin d'ADN ou un anticorps sélectif pour une

molécule donnée. Par la suite, l'on procède à un ou plusieurs lavages pour éliminer les molécules adsorbées à la surface de manière non spécifique. Finalement, une matrice MALDI est ajoutée pour permettre la désorption et l'ionisation de l'analyte capturé (Figure 1.3B).^{24,25} Cette deuxième forme de SELDI est l'une des plus prometteuses d'un point de vue diagnostique et est souvent mentionnée sous l'appellation immuno-MALDI.²⁶

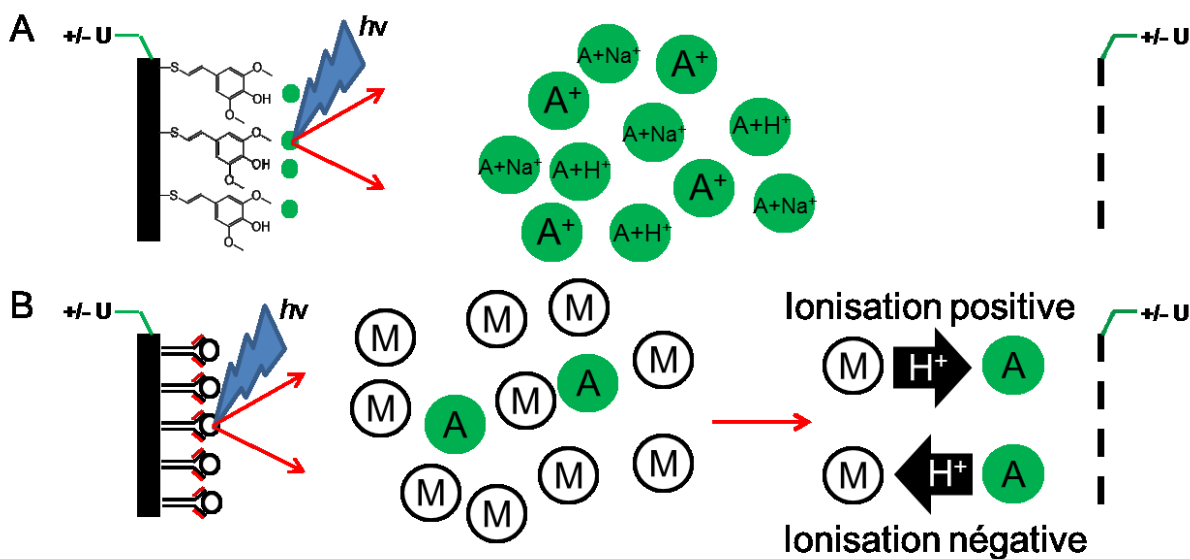


Figure 1.3 : Schéma du processus de désorption et d'ionisation SELDI. (A) Processus SEND où une molécule absorbant le laser est greffée à la surface pour permettre la désorption et l'ionisation de l'analyte. (B) Processus SEAC où l'on greffe un agent de capture sur le substrat pour purifier l'analyte avant d'y ajouter une matrice afin de permettre la désorption et l'ionisation de l'analyte.

1.1.2 L'analyseur de masse par temps de vol

Une fois les ions produits dans la source du spectromètre, ceux-ci sont transférés vers un analyseur de masse. Il existe une vaste gamme d'analyseurs tels que le quadropole,²⁷ la trappe

ionique,²⁷ le temps de vol (TOF),^{28,29} l'orbitrap,^{30,31} et la cellule de résonance cyclotronique.³² Au cours de cette thèse, seul le TOF fut utilisé et à des fins de simplicité, seul celui-ci sera présenté. Il est à noter que ces analyseurs peuvent être utilisés seuls ou de manière combinée.³³ Il est aussi possible de combiner différents analyseurs en série, nommé instrument hybride, pour profiter des différentes propriétés et capacités qu'offrent les différents analyseurs en masse.^{34,35}

$$t_{tof} = \frac{d_{tof}}{v} = \frac{d_{tof}}{\sqrt{2U}} \sqrt{\frac{m}{z}} \quad [1]$$

$$\frac{m}{z} = \frac{2t_{vol}^2 eVP}{d_{tof}^2} \quad [2]$$

Dans le cas du TOF, suite à une impulsion laser dans le cas d'un système LDI, le transfert des ions de la zone source vers l'analyseur se fait par l'application d'un champ électrostatique de l'ordre de 20-25kV. Le potentiel appliqué permet d'accélérer tous les ions en leur fournissant la même énergie initiale ce qui leur donnera une vitesse inversement proportionnelle à leur ratio m/z selon l'équation 1. Par la suite les ions traversent une zone libre de champ où ils sont séparés temporellement selon leur ratio m/z pour finir leur parcours sur un détecteur qui enregistre une intensité de signal en fonction du temps (Figure 1.4). L'équation 1 permet de lier le temps de vol au ratio m/z et il est possible de calculer le ratio m/z directement à partir du temps de vol (t_{vol}) en connaissant la longueur de la zone libre de champ et le potentiel appliqué en source (équation 2).³⁶

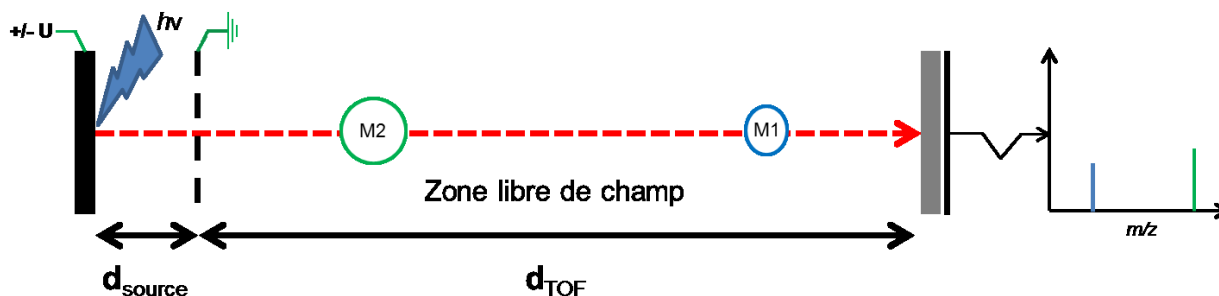


Figure 1.4 : Schéma d'un spectromètre de masse LDI avec un analyseur TOF linéaire.

1.1.2.1 L'analyse en mode réflectron

Deux grandes découvertes ont permis d'augmenter significativement la résolution spectrale obtenue à partir des systèmes TOF. En spectrométrie de masse MALDI, la résolution spectrale (R) est classiquement définie par le rapport $R = m/\Delta m$, où m est la masse et Δm la largeur du pic mesurée à mi-hauteur. La première innovation est survenue dans les années '50 après sa découverte par Alikhanov.³⁷ Lors de ses recherches, Alikhanov a constaté que l'utilisation d'un miroir électrostatique permet de corriger la dispersion d'énergie cinétique initiale que les ions acquièrent suite à la pulsation du laser ainsi que lors de l'accélération en source où la position spatiale des ions influencera la quantité d'énergie acquise. Il a fallu attendre près de deux décennies avant que Mamyrin commercialise l'utilisation du réflectron dans les analyseurs TOF.^{38,39} Trois différents systèmes de réflectron existent à ce jour (un étage, deux étages et parabolique) et afin d'être plus concis, seul le réflectron à deux étages sera discuté étant celui présent sur l'appareil utilisé lors de cette thèse. Le réflectron à deux étages est une forme plus compacte et plus facile d'intégration que les deux autres géométries dans les systèmes TOF. Quand les ions pénètrent dans un réflectron à deux étages, ceux-ci perdent environ les 2/3 de leur énergie totale dans le premier espace sous l'influence d'un champ électrostatique uniforme. Les ions pénètrent alors dans le deuxième espace du

réflectron ou l'action d'un deuxième champ électrostatique permettra la correction fine des variations énergétiques des ions. En effet, le réflectron permet de corriger la dispersion d'énergie initiale des ions de même ratio m/z en leurs permettant de résider dans le réflectron de façon proportionnelle à leur énergie totale. Les ions de mêmes ratios m/z ayant plus d'énergie (plus grande vitesse) passent donc plus de temps dans le réflectron ce qui les fera arriver de façon quasi simultanée sur le détecteur avec les ions de moins grande énergie qui résident donc moins longtemps dans le réflectron (Figure 1.5).

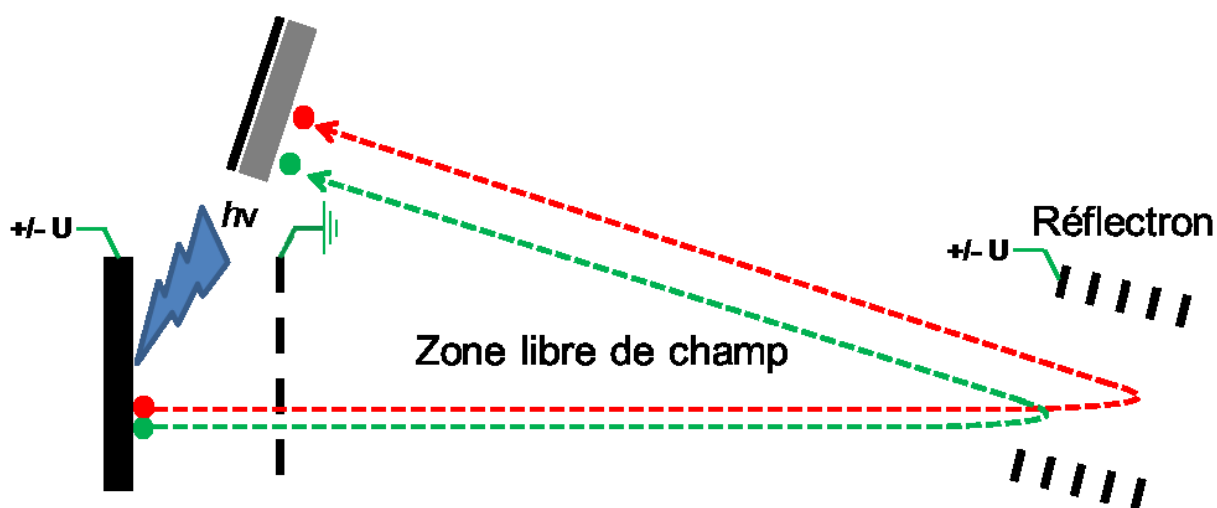


Figure 1.5 : Schéma représentant un système LDI-TOF possédant un réflectron. L'ion rouge reçoit plus d'énergie initiale que l'ion vert de même ratio m/z .

1.1.2.2 Le délai d'extraction

La deuxième avancée fut aussi découverte dans les années '50 cette fois-ci par Wiley et McLaren,⁴⁰ mais il a fallu attendre plus de 40 ans pour voir celle-ci être intégrée au système TOF commerciaux.⁴¹ Cette fois-ci, la correction de la dispersion de l'énergie cinétique initiale (Figure 1.6A) est obtenue en appliquant un délai entre la pulsation laser et l'application du potentiel d'accélération sur les électrodes de la source. Dans ce cas, la plume d'ions et de

neutres formée lors de la désorption se déplacent dans un espace libre de champ pendant un temps fixe prédéterminé. Lorsque les ions sont accélérés sans délai d'extraction ceux-ci possèdent une énergie cinétique égale à la somme de l'énergie acquise lors de la désorption (hautement hétérogène pour des ions de même ratio m/z) en plus de celle acquise par l'accélération (Figure 1.6B). Cette situation est défavorable pour une analyse par TOF et engendre des variations de temps de vol importantes qui ont comme conséquence la formation de pics de masse larges et donc une mesure de la masse imprécise. Afin d'appliquer un délai d'extraction, il est nécessaire de modifier la source pour que celle-ci ait deux étages (Figure 1.6C). Le premier étage de la source sert à la désorption des ions dans un espace initialement libre de champ alors que le deuxième étage est utilisé pour accélérer les ions. L'application d'un délai d'extraction permet aux ions plus énergétiques d'avancer plus profondément dans la source, soit plus loin de l'électrode d'accélération, ce qui se traduit par un gain moins grand d'énergie lors de l'application du potentiel d'accélération dans le premier espace de la source (Figure 1.6C).⁴² Si le délai d'extraction est bien appliqué (quelque dizaines voire centaines de nanosecondes) la somme de l'énergie cinétique initiale et celle acquise lors de l'accélération sera quasi identique pour des ions de même ratio m/z malgré le fait que leurs énergies initiales soient différentes. L'application en série du délai d'extraction suivi d'un reflectron permet d'augmenter plus encore la résolution spectrale obtenue (Figure 1.7). Les spectromètres de masse MALDI TOF modernes sont capable de résolution spectrale $>30,000$.

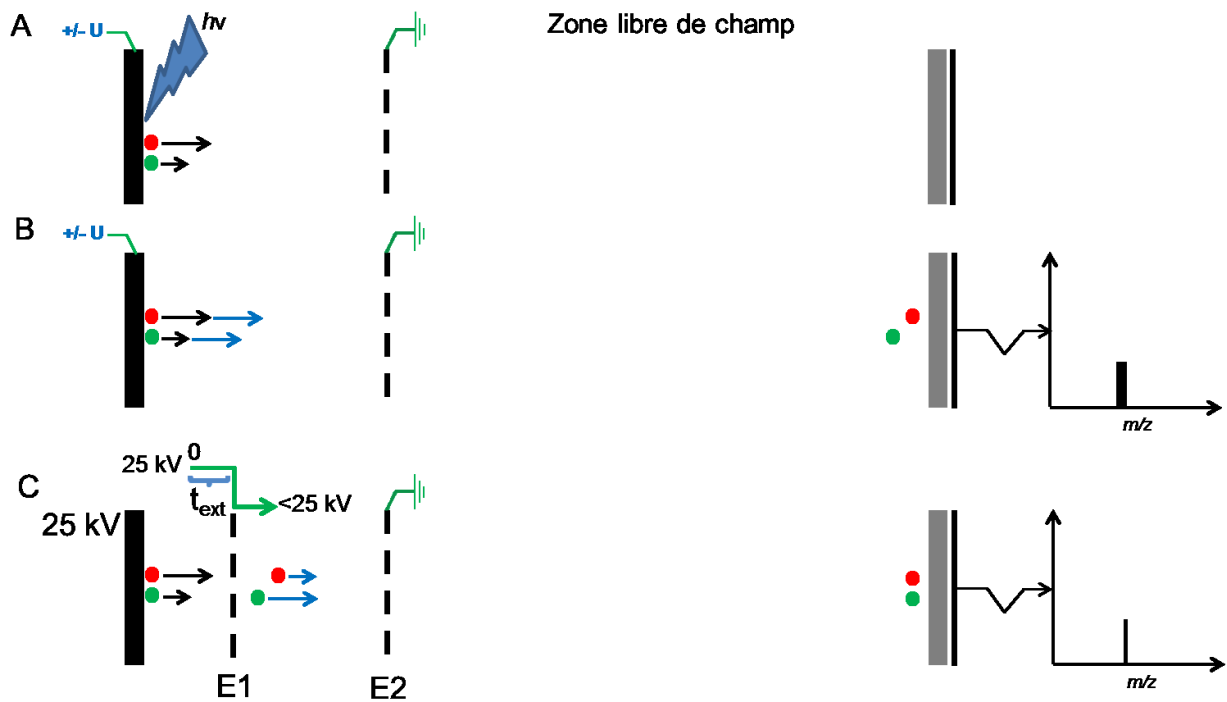


Figure 1.6 : Schéma explicatif de l'application du délai d'extraction pour une analyse en TOF linéaire. (A) Soit deux ions de même m/z ; l'ion rouge reçoit plus d'énergie cinétique initiale lors de la désorption – ionisation induite par laser (flèche noire). (B) Sans délai d'extraction, les deux ions d'énergie cinétique initiale différente, reçoivent la même énergie nominale de par la différence de potentiel appliquée (flèche bleu) et arrivent à des temps différents sur le détecteur diminuant la résolution spectrale. (C) En extraction retardée, l'ion rouge (plus énergétique) progresse plus loin dans la source que l'ion vert dans le premier étage de la source maintenu sans champ. Après le délai (t_{ext}), un potentiel d'extraction est alors appliqué dans le premier étage de la source et les ions sont accélérés. L'ion rouge recevra moins d'énergie que l'ion vert dont la position est plus proche de l'électrode d'accélération (E1). Cette compensation en énergie a pour conséquence l'arrivée quasi simultanée des ions au détecteur améliorant ainsi la résolution spectrale.

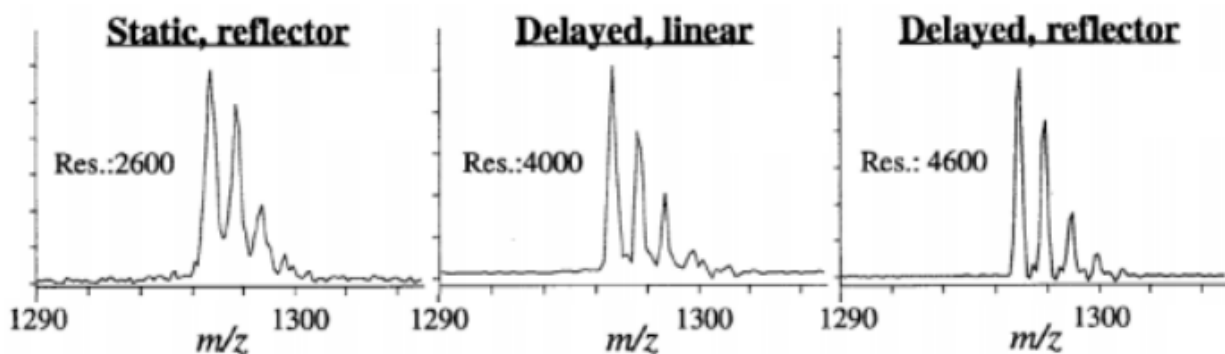


Figure 1.7 : Visualisation de l'amélioration de la résolution spectrale pour l'analyse de l'angiotensine I. Figure adaptée de Vestal *et al.*⁴¹ Static, reflector = sans délai d'extraction et avec réflectron; Delayed, linear = avec délai d'extraction et sans réflectron; Delayed, reflector = avec délai d'extraction et reflectron.

1.1.3 L'analyse par spectrométrie de masse en tandem TOF/TOF (MS/MS)

L'analyse MS en tandem permet d'obtenir de l'information sur la structure de l'analyte d'intérêt au cours d'une analyse MS. Ceci est possible en sélectionnant un ion précurseur intact à l'aide d'un premier analyseur pour ensuite le fragmenter et analyser les ions fragments dans un second analyseur. La structure générale d'une molécule ainsi que le type de groupes fonctionnels qui la composent déterminent la façon dont celle-ci fragmente. Certains groupes fonctionnels ont une meilleure capacité à retenir la charge et ainsi favoriseront la fragmentation de la molécule sur le lien adjacent au groupement fonctionnel donnant naissance à une série d'ions fragments caractéristiques de ces derniers. Ce type d'expérience est central dans l'identification d'un signal de masse donné. Pour ce faire, il est nécessaire de comparer le spectre d'ion fragment obtenu expérimentalement avec celui d'un standard de la molécule attendue ou avec celui d'une base de données de patron de fragmentation qui sont souvent

issues de données d'autres chercheurs ayant analysé et fragmenté un standard de la molécule sur leur propre instrument.

En MALDI-TOF, les expériences MS/MS sont effectuées à l'aide d'un instrument TOF/TOF par décomposition après source (PSD).¹⁵ Dans ce cas, les ions produits par MALDI sont métastables et vont avoir tendance à se fragmenter après leur accélération dans le (premier) TOF. Les systèmes TOF/TOF sont composés de deux analyseurs TOF en ligne entre lesquels est installé un système électrostatique permettant d'isoler l'ion précurseur (porte ionique). Dans un tel système, les ions produits en source sont sujets à une énergie laser optimale pour favoriser la production d'ion moléculaires afin de déterminer et d'isoler l'ion précurseur lors d'une première analyse (Figure 1.8A). Une fois l'ion précurseur isolé temporellement à l'aide de la porte ionique, une seconde analyse à plus haute énergie laser est effectuée de manière à augmenter la métastabilité des ions primaires et d'en favoriser leur fragmentation. Dans ce cas, les ions fragments résultants traversent le premier TOF à la même vitesse que l'ion précurseur et l'ensemble de ces ions seront donc isolés par la porte ionique avec le même temps de vol. L'ensemble des ions sélectionnés par la porte ionique est alors accéléré pour être analysé par le second TOF (Figure 1.8B). Cette technique est hautement performante pour l'élucidation structurale de peptides⁶ ainsi que de plusieurs autres types de molécules⁴³, mais perd en performance lorsqu'elle est utilisée pour l'analyse de molécule de faibles poids moléculaires ($m/z < 200$) ou des molécules de plus haut poids moléculaires ($m/z > 4000$). Cette limitation pour les faibles masses provient de la difficulté d'isoler des signaux séparés par seulement quelques unités de masse due à la faible résolution de la porte ionique (2-4 Da) pour permettre une bonne transmission de l'ion précurseur d'intérêt. De plus, les ions de faible masse ont tendance à être beaucoup plus rigides que les ions plus volumineux ce qui

diminue significativement le rendement de fragmentation obtenue en mode PSD. D'autres modes de fragmentation sont possibles avec d'autres types d'analyseur tel que la CID retrouvée dans tous les instruments de type quadrupolaire en tandem.^{44,45}

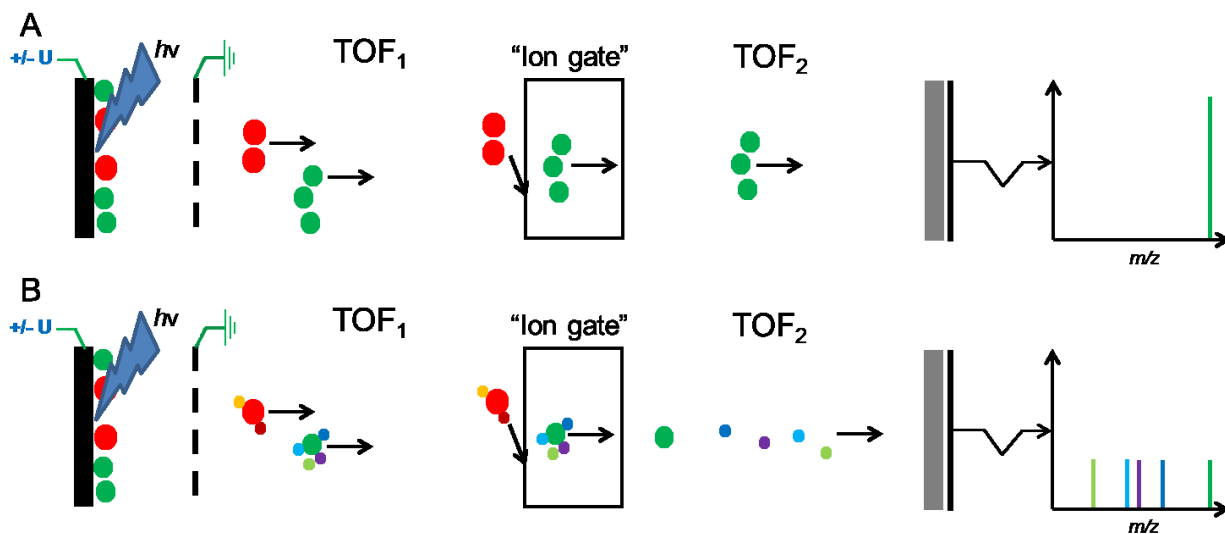


Figure 1.8 : Schéma explicatif d'une analyse MS/MS dans un système MALDI TOF/TOF. (A) Analyse et sélection de l'ion précurseur. (B) Analyse des ions fragments à plus haute énergie laser.

1.2 Imagerie par spectrométrie de masse (MA)LDI

L'imagerie MS (IMS) MALDI fut inventée vers la fin des années '90 et consiste en une analyse MS d'une surface répétée de manière systématique à chaque point d'un plan cartésien prédéfini par l'utilisateur.^{46,47} Par la suite, une image ionique est reconstruite en sélectionnant un ion d'intérêt et en transposant son intensité en fonction de la coordonnée d'acquisition où la couleur de chaque position cartésienne est proportionnelle à l'intensité du signal sélectionné (Figure 1.9). L'IMS par MALDI est à ce jour la technique la plus utilisée pour l'imagerie de

biomolécules à partir de sections tissulaires minces.⁴⁸ Dans le cas de toute technique LDI, la préparation d'échantillon reste l'étape la plus importante. En SALDI et MALDI le type de substrat, d'agent de dopage ou de matrice va contrôler le type d'analyte pouvant être analysé. Il est très important que les agents dopants ou les matrices soient déposés de la manière la plus uniforme possible tout en minimisant la délocalisation des analytes d'intérêt. Il est très important de bien contrôler ces deux paramètres, car ils peuvent limiter grandement la résolution spatiale atteignable en IMS.

Une autre technique pouvant être utilisée en IMS est le SIMS. Cette technique repose sur le bombardement de la surface par des ions primaires générant ainsi les ions secondaires provenant de la surface qui sont typiquement analysés par TOF. Cette technique offre une meilleure résolution spatiale que la LDI (≤ 200 nm) et ne nécessite pas de préparation d'échantillon, mais elle est limitée par sa faible gamme de masse observable (≤ 500 Da) et surtout par la décomposition des composés organiques en source due à l'énergie d'impact élevé des ions primaires.⁴⁹ L'avènement de source à agrégats d'atome permet d'élargir la gamme de molécules observés (≤ 2000 Da) en diminuant la fragmentation dans la source.⁵⁰

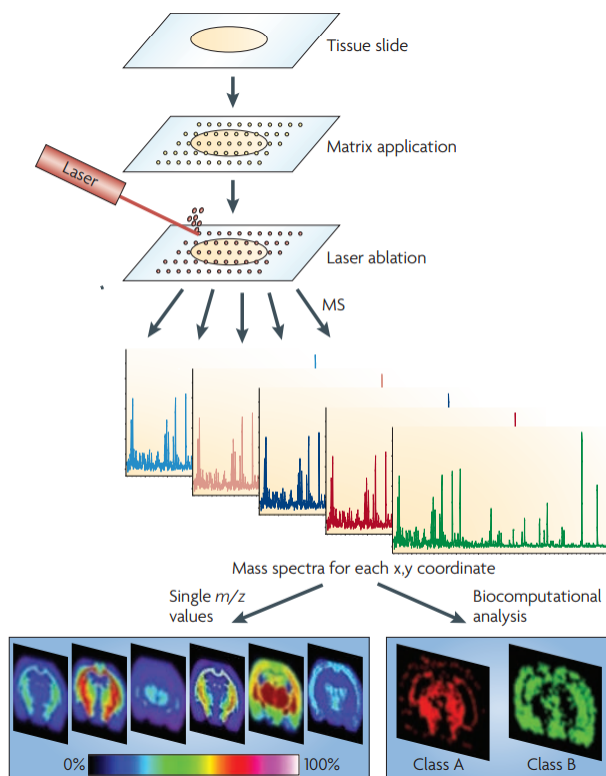


Figure 1.9 : Schéma des différentes étapes d'une analyse par IMS. La figure est adaptée de Schwamborn et Caprioli.⁵¹

Les principaux avantages de l'IMS par (MA)LDI sont la faible limite de détection, la possibilité de détecter des analytes sans marquage préalable, la spécificité pour certain type d'analyte obtenu par la préparation d'échantillon ainsi que la possibilité d'identifier par masse exacte ou MS/MS les signaux obtenu. Par contre, l'IMS est limitée par un grand manque d'information quant aux efficacités d'ionisation de plusieurs molécules ionisées simultanément. Étant donné qu'il n'y a aucune séparation des analytes préalable à l'ionisation, toutes les molécules présentes pouvant s'ioniser vont le faire en compétitionnant les unes contre les autres pour les charges disponibles. Ceci peut engendrer de la suppression ionique auprès d'espèces difficilement ionisable et ainsi modifier l'image résultant de l'IMS.⁵² Une

autre limitation est la résolution spatiale maximale pouvant être atteinte. Elle est actuellement de l'ordre de 5 μm pour les instruments commerciaux de type (MA)LDI, et est principalement limitée par l'optique utilisée sur ces systèmes, par le pas minimal pouvant être effectué par le porte échantillon ainsi que par le manque de sensibilité dû à la diminution de la zone de désorption provenant de la focalisation élevée du faisceau laser.⁵³ Des avancées récentes sur l'optique laser des instruments (MA)LDI ont permis d'analyser des lipides à une résolution spatiale de 1 μm .⁵⁴ Certains ont introduit un filtre stérique dans le chemin optique du laser d'un instrument commercial permettant l'obtention d'un point de focalisation ayant un diamètre d'environ 5 μm comparativement à un diamètre de 20 μm avant les modifications.⁵⁵ Le manque de sensibilité est plus compliqué à régler sachant qu'il dépend de l'instrument, mais aussi de la préparation d'échantillon. Les dernières avancées en terme de préparation d'échantillon commencent à pallier au manque de sensibilité en utilisant des approches plus spécifiques et donc plus sensibles, mais elles le font au détriment du nombre de signaux observés.

1.2.1 L'analyse de tissu biologique par IMS

L'application la plus répandue de l'IMS est l'analyse de sections tissulaires minces de mammifères pour révéler la distribution spatiale de divers composés endogènes et/ou exogènes pour déceler leurs rôles dans différents processus biologiques, différentes maladies et/ou leur pharmacocinétique.^{47,56} L'imagerie de sections tissulaires s'est récemment diversifiée en incluant des tissus de plantes⁵⁷⁻⁵⁹, d'insectes⁵⁹⁻⁶¹ de crustacées⁶² de poissons⁶³ et de mollusques⁶⁴. Typiquement, l'analyse IMS de sections tissulaires se fait à partir de tissus frais congelés au lieu de tissus fixés par paraffine^{65,66} ou autre, puisque les étapes nécessaires à la fixation peuvent délocaliser voire éliminer certaines molécules endogènes importantes. Pour

produire un tissu frais congelé, il suffit d'immerger l'organe voulu dans un bain d'azote liquide (-196°C), d'isopentane froid (-50°C) ou en les déposant sur de la glace sèche concassée (-78°C). Le tissu peut être par la suite conservé dans un réfrigérateur à -80°C jusqu'à son analyse. Même si le contenu moléculaire reste préservé, les tissus frais congelés ne sont en général pas aussi bon pour les analyses histologiques classiques dues à divers artefacts liés à leur découpe et au mode de congélation initialement utilisé. Les techniques histologiques classiques préfèrent la fixation au formaldéhyde suivi d'un scellage en paraffine. Ce type d'approche garde l'architecture tissulaire intacte mais rend l'analyse par IMS fastidieuse. Pour l'analyse de protéine, il est nécessaire de passer par des étapes de libération des analytes du réseau réticulé du formaldéhyde (retrait antigénique) pour ensuite faire une digestion tryptique des protéines avant d'effectuer la préparation pour l'IMS et l'imagerie des peptides.^{65,67} La nécessité de laver les tissus fixés au formaldéhyde avant, pendant et après avec diverses solutions d'eau et de solvants organiques cause un grave problème pour l'analyse des lipides. Ces lavages, surtout organiques, peuvent solubiliser les lipides et ainsi les extraire du tissu fixé rendant leur détection subséquente par IMS très difficile.

1.2.2 L'imagerie (MA)LDI de lipides neutres

L'imagerie (MA)LDI MS est une des techniques émergentes dans le domaine de la lipidomique sachant qu'il existe très peu d'alternatives en terme d'imagerie de lipide à partir de sections tissulaires minces. L'intérêt pour les lipides provient des nombreux rôles biologiques que ceux-ci possèdent soit le signallement cellulaire, l'entreposage d'énergie ainsi que la formation de la paroi cellulaire pour n'en nommer que trois.^{68,69} Due à leurs importants rôles biologiques, les lipides sont impliqués dans une large variété de maladies métaboliques telle que le cancer⁷⁰, le diabète⁷¹, l'athérosclérose^{72,73} ainsi que plusieurs autres maladies dont

la maladie de Hunter qui sera discutée dans un chapitre subséquent. Les récents développements en lipidomique démontrent l'importance grandissante que joue la compréhension du rôle qu'ont les lipides dans divers systèmes biologiques pour la recherche biomédicale. Ces grandes avancées sont principalement dues à l'avènement de la MS⁷ et de l'IMS.^{13,74}

1.2.2.1 Les acides gras

Les FAs sont composés d'une chaîne aliphatique de carbone sur laquelle est fixé un groupement acide carboxylique terminal (Figure 1.10). Les FAs sont l'un des blocs fondamentaux de la grande majorité des lipides à l'exception de certains stérols. Ils ont aussi une fonction biologique qui leur est propre en temps qu'FA libre. Dans certaines circonstances ce sont les métabolites des FAs qui sont biologiquement actifs par exemple les métabolites de l'acide arachidonique (20:4) sont impliqués dans la cascade de régulation de la tension artérielle.⁷⁵ Les FAs sont normalement synthétisés par le foie à partir d'hydrates de carbones (citrate) et servent à la synthèse de divers autres types de lipides (Figure 1.11). Les FAs libres sont normalement le résultat du clivage d'une chaîne latérale d'un lipide pour être immédiatement transporté vers leur site actif pour y induire une fonction biologique. Ceux-ci se distinguent les uns des autres par la longueur de leur chaîne aliphatique, par le nombre d'insaturations qu'ils comportent ainsi que de la position des insaturations dans la chaîne. Étant donné qu'il est très difficile de positionner les insaturations par MS,⁷⁶⁻⁷⁸ à des fins de simplicité, les acides gras seront présentés selon leur nombre de carbones suivi du nombre d'insaturations comme présenté pour l'AA plus haut dans le texte ou l'acide oléique (Figure 1.10).

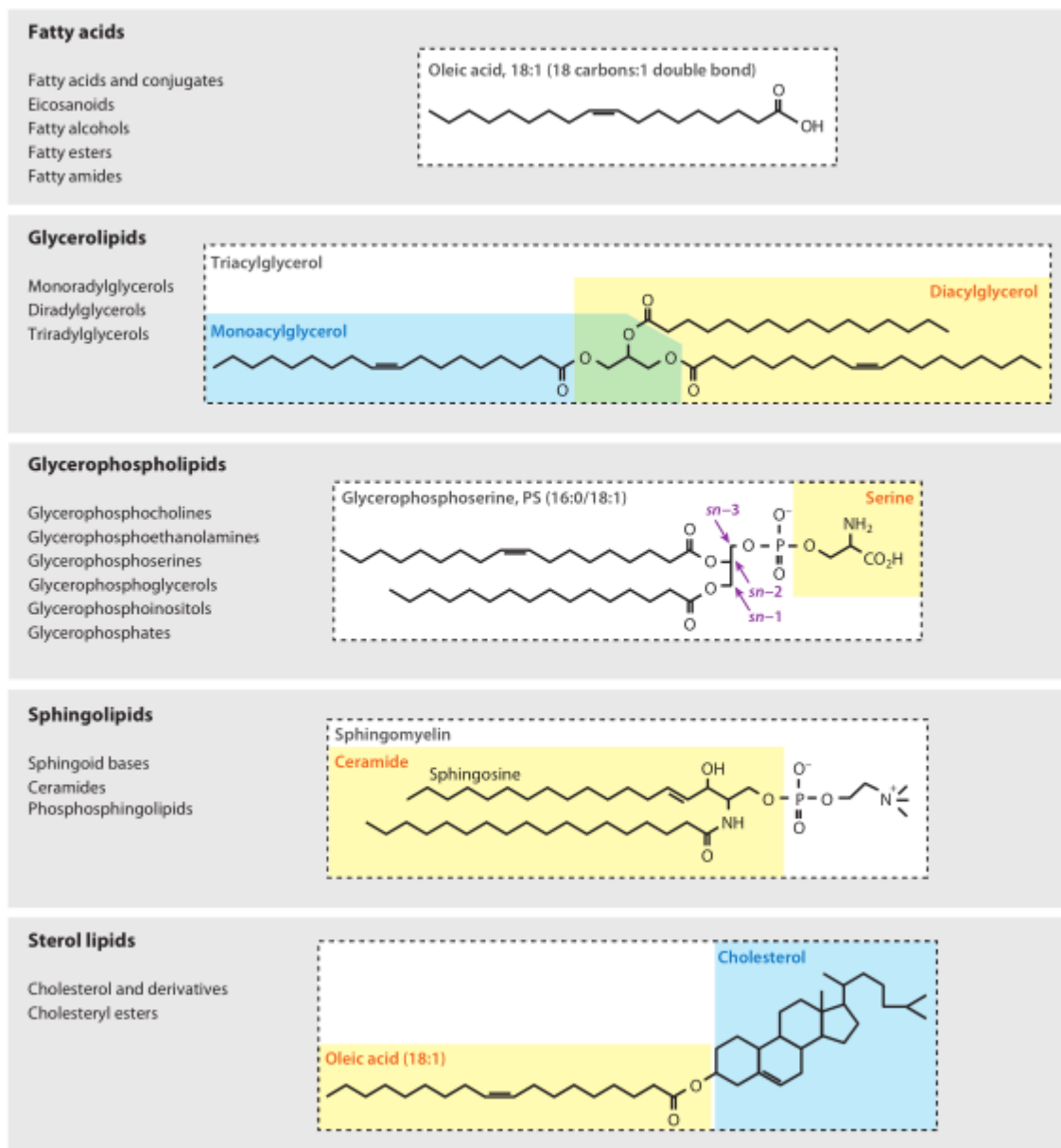


Figure 1.10 : Schéma des cinq grandes familles de lipides et leur structure générale.

Figure adaptée de Blanksby and Mitchell.⁷⁴

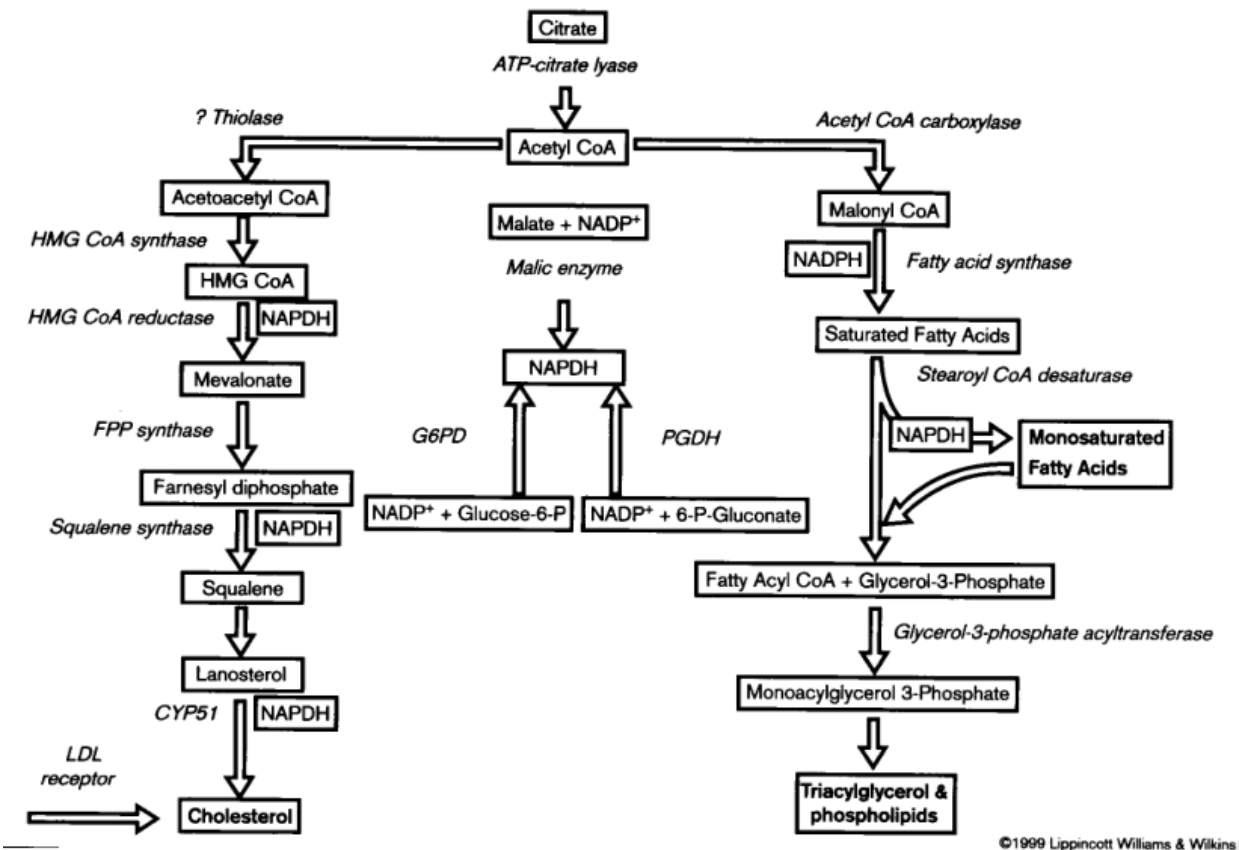


Figure 1.11 : Schéma des principales voies de synthèse des lipides à partir du citrate.

Figure adaptée de Horton et Shimomura.⁷⁹

1.2.2.2 Les glycérolipides

Les GLs composent la grande famille de lipides neutre principalement composée des TAGs et dans une moindre mesure des mono- et diacylglycérols. Ceci sont composés de un à trois FAs ainsi que d'une molécule de glycérol servant de charpente pour l'attachement des FAs (Figure 1.10). La synthèse de ces derniers s'effectue principalement au niveau du foie, mais ils peuvent aussi être produits en petite quantité de façon locale par d'autres organes lorsque nécessaire (Figure 1.11). Le rôle principal des TAGs est l'entreposage d'acide gras à des fins énergétiques pour les cellules du corps.^{80,81} Tout comme les FAs, ils sont nommés en

donnant le nombre total de carbones ainsi que le nombre d'insaturation de chaque chaîne latérale lorsqu'identifié par MS/MS ou simplement en présentant le nombre total de chacun; par exemple POL devient TAG (16:0; 18:1; 18:2) ou TAG (52:3).

1.2.2.3 Les sphingolipides

Les SLs sont une grande classe de lipides tous composés d'une chaîne latérale de type aminodialcool contenant 18 carbones appelée sphingosine (Figure 1.10). Cette classe de lipides inclut entre autres les gangliosides qui sont un type de glycolipides formé à partir d'une sphingosine modifiée en céramide par l'attachement d'un acide gras sur l'amine primaire et portant un ou plusieurs acides sialiques. Leur synthèse se fait dans toutes les cellules du corps et leur grande variété provient du nombre et des différentes positions que l'acide sialique peut adopter (

Figure 1.12). Les gangliosides sont liés à différentes maladies génétiques telles que les maladies de Hurler et de Hunter pour n'en nommer que deux.^{82,83}

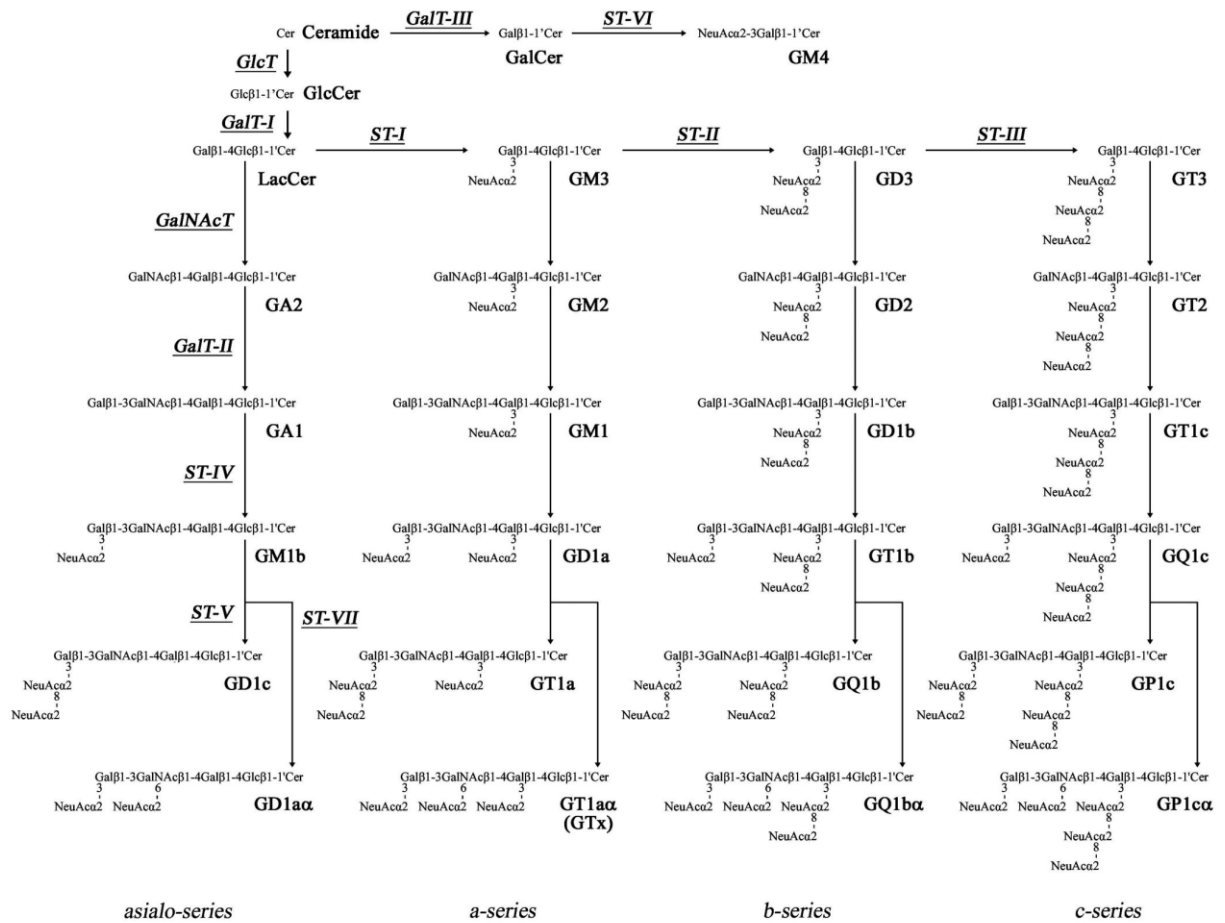


Figure 1.12 : Schéma de la biosynthèse des gangliosides. Figure adaptée de Yu *et al.*⁸⁴

1.2.2.4 Les stérols

Les SLs sont structurellement très différents des autres classes de lipides, car ils ne basent pas exclusivement leur structure sur l'incorporation de FA mais plutôt sur un système à quatre cycles aliphatique dont les deux extrémités sont les principaux sites fonctionnels (Figure 1.10). Tout comme les autres lipides, le CHO est synthétisé par toutes les cellules du corps, mais le foie est le principal site de production avec plus de la moitié de la production du corps (Figure 1.11).⁸⁵ Le meilleur exemple de SL est le CHO qui est le précurseur de la vitamine D₃, des acides biliaires en plus d'être le précurseur de toutes les hormones

stéroïdiennes. Le CHO est aussi une partie intégrale de la paroi cellulaire et lui confère sa rigidité. Le CHO peut aussi être estérifié à l'aide d'un FA pour former les CE qui jouent un rôle dans diverses maladies telles que l'athérosclérose et le cancer du rein.⁸⁶⁻⁸⁹

1.2.3 Identification par fragmentation

Due à la grande variété de signaux en (MA)LDI MS dans les basses masses (< 1000 Da), il est primordial de procéder à l'identification des signaux observés par masse exacte, mais surtout par fragmentation MS/MS. Les différentes classes de lipide se comportent toutes de façon légèrement différente durant ce type d'expérience mais une vaste littérature existe déjà sur le comportement de chaque classe et sous-classe lors d'expérience de fragmentation et ce pour plusieurs modes de fragmentation.

1.2.3.1 Les acides gras

Les FAs de par leur structure très simple possèdent des patrons de fragmentation présentant très peu de fragments en mode PSD. Par contre, leur mode de fragmentation est dépendant de la manière dont ils sont ionisés. Typiquement, les acides gras sont détectés en tant qu'ion négatif par la déprotonation de leur fonction acide carboxylique. Leur fragmentation donne lieu à deux ions diagnostiques soit un ion ayant subi une perte d'H₂O et un correspondant à une perte de CO₂. Dans le Chapitre 2, les acides gras seront ionisés par l'intermédiaire d'atome d'argent et ce type d'ionisation se rapproche plus du patron de fragmentation par adduit alcalin (Li⁺, Na⁺, etc.). Dans le cas d'un adduit alcalin, il est parfois possible d'obtenir des fragments diagnostiques provenant de la fragmentation en amont et en aval des insaturations en plus des pertes typiques de H₂O et de CO₂.⁹⁰

1.2.3.2 Les glycérolipides

Les GLs possèdent l'un des patrons de fragmentation les plus simple à élucider. Pour un TAG donné ayant trois chaînes latérales différentes, il est possible d'observer trois fragments résultant de la perte de neutre (NL) de chaque FA individuellement en plus d'observer l'absence de signaux attribuable à une tête polaire typique d'un PL. En plus de la NL des FAs, trois autres chemins de fragmentation permettent de clairement identifier un TAG; ceci sont détaillés dans le Chapitre 3. Les mono- et DAGs possèdent le même type d'ions fragments par perte de neutre en plus de signaux diagnostiques dus à la perte de H₂O provenant du ou des alcools libres sur le glycérol.

1.2.3.3 Les gangliosides

Les gangliosides quant à eux possèdent des patrons de fragmentation très simple provenant de la fragmentation successive de leur chaîne de polysaccharides. Le principal signal observé dans de tels spectres MS/MS est celui de l'acide sialique à m/z 290 et du fragment opposé suivit de la perte de chaque sucre composant la chaîne de polysaccharide. La fragmentation des gangliosides est traitée plus en détail dans le Chapitre 4 qui porte sur leur analyse à partir de sections tissulaires minces.

1.2.3.4 Les stérols

Les SLs composent la classe de lipide ayant le patron de fragmentation le plus complexe provenant de leur structure unique comparativement aux autres classes. Typiquement, les SLs fragmentent principalement leurs chaînes latérales pour ensuite produire divers fragments provenant de leur quadruple cycle aliphatique (Figure 1.13). Par contre, les

CEs fragmentent d'une façon beaucoup plus simple en produisant principalement deux ions provenant de clivage par NL du lien ester comme démontré dans le Chapitre 3.

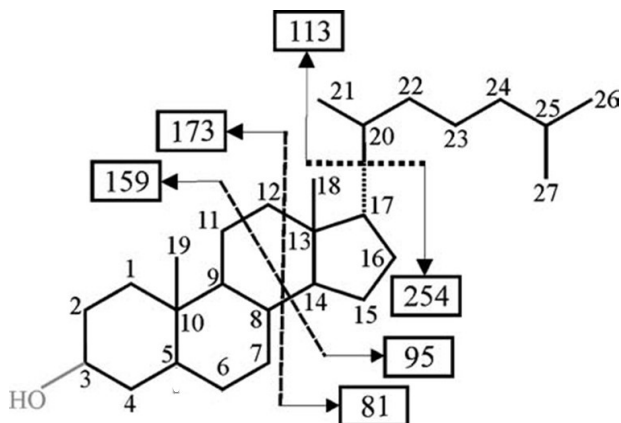


Figure 1.13 : Schéma de fragmentation du cholestérol par dissociation induite par collision. Figure adaptée de Rossmann *et al.*⁹¹

1.2.4 L'analyse biomédicale des lipides neutre par IMS

L'importance des lipides dans diverses fonctions biologiques explique de facto l'importance de leur analyse par MALDI IMS. C'est en 2005 que l'IMS des lipides par MALDI à partir de coupe tissulaires minces prit son envol et ce 6 années après les premières images de protéine.⁹² Initialement, l'IMS de lipides se focalisait principalement sur les PLs sachant que ceux-ci sont facilement ionisable par échange de proton de par la présence de leur tête polaire où se retrouve des groupements fonctionnels de types amine et/ou phosphate. L'avènement de l'IMS de lipide s'est principalement fait par la découverte de nouvelles méthodologies pour la préparation des échantillons. Comme mentionnée plus haut, la préparation des échantillons tissulaires est l'étape cruciale d'une expérience d'IMS. Pour les lipides, les premières techniques ce sont basées sur des matrices hautement polaires telles que le DHB et le 2,5-dihydroxyacétophenone (DHA) qui étaient déposées par interface liquide. Ce

n'est que deux ans plus tard que la plus grande avancé arriva lorsque Hankin *et al.* démontrèrent l'efficacité de la sublimation de matrice pour l'IMS de lipide.¹³ À ce jour, l'utilisation de la sublimation comme mode de déposition de matrice pour l'IMS de lipide est une méthode de choix. Ce mode de déposition permet d'obtenir une couche très uniforme de matrice permettant l'analyse à haute résolution spatiale ($\leq 10 \mu\text{m}$) par IMS.⁵⁴ D'autres avancés plus récentes ont permis d'augmenter la sensibilité de la sublimation en ajoutant une étape de recristallisation de la matrice après l'étape de sublimation.^{93,94} Malgré l'efficacité incontestable de ces méthodes pour l'IMS de lipides polaires, très peu d'avancés ont eu lieu pour l'IMS des lipides neutres qui sont restés jusqu'à tout récemment dans l'ombre des PLs.

1.3 Les cations métalliques comme agent d'ionisation

L'ionisation par adduit métallique est depuis toujours l'un des modes d'ionisation systématiquement observé lors d'analyses MS due à la présence de contaminant tel que le sodium dans les solvants utilisés en ESI ou comme agent dopant pour l'analyse de molécules organiques par (MA)LDI.^{3,4} Aussi bien en ESI qu'en (MA)LDI, il est facile d'observer les adduits sodium et potassium pour certains analytes mais ceci sont souvent minoritaires (et indésirables) comparativement aux adduits de proton favorisés pour l'analyse de peptides et de lipides. Les premières applications directes de la formation d'adduit métallique pour l'analyse de molécules organiques en LDI firent leurs apparitions pour l'analyse de polymères de haut poids moléculaire difficilement ionisable par protonation.^{95,96} En parallèle, des avancées en chromatographie liquide couplée à la MS ont permis de découvrir l'importance de certains métaux, autre que les métaux alcalins, pour la séparation et l'ionisation de certaines familles de molécules dû à des interactions entre les cations métalliques et certains groupements

fonctionnels.^{97,98} Ces recherches sont les débuts d'une nouvelle génération de méthodes permettant l'analyse de molécules souvent hautement apolaire par MS. Dès les débuts de l'IMS, certains chercheurs ont adapté l'utilisation des adduits métalliques pour favoriser l'ionisation de certaines biomolécules, telles que le CHO en SIMS, afin d'obtenir des images subcellulaires, et ce, en augmentant la sensibilité en utilisant la cationisation métallique.^{99,100}

1.3.1 L'interaction cation métallique-analyte

Au-delà des classes de biomolécules ciblées par certains métaux, très peu d'articles dans la littérature existe sur le comportement fondamental de cation métallique pour leurs analytes cibles. Les diverses observations portent vers une simple interaction acide-base de Lewis où le cation métallique déficient en électron est attiré par un groupement fonctionnel riche en électron afin de former une interaction assez stable pour une analyse par MS.^{98,101,102} Or, il semble aussi y avoir une dépendance quant à la taille du cation métallique comme dans le cas des TAGs où le cation sodium possède une meilleure affinité pour ceux-ci comparativement aux cations lithium ou potassium (Chapitre 3 Sup. Fig. 4). Ce serait l'équilibre entre l'attraction électrostatique et la répulsion stérique entre le cation métallique et un groupement fonctionnel donné qui contrôlerait la stabilité et le lieu de formation de l'adduit métallique sur un analyte donné. Cette hypothèse laisse entrevoir la possibilité de former préférentiellement des adduits en fonction du métal choisi.^{43,98,103,104}

1.3.2 Préparation des échantillons pour l'IMS assistée par métal

Précédemment, quelques méthodes furent développées afin d'incorporer différents métaux aux analyses (MA)LDI MS. Celles-ci exploitaient le dopage de l'échantillon avec des sels métalliques en LDI^{3,104} où dans la majorité des cas ceux-ci sont incorporés à la solution de

matrice.¹⁰⁵ Ces deux types d'approches sont aussi retrouvés en IMS, par exemple pour l'analyse du cholestérol par imagerie SIMS.^{99,100,106} L'apparition de systèmes automatiques pour la préparation d'échantillon en (MA)LDI IMS a permis de déposer par interface liquide des nanoparticules et des colloïdes d'argent pour l'IMS de différents lipides.^{107,108} Ces mêmes appareils de préparation d'échantillon ont aussi été utilisés pour déposer de la matrice dopée en sel de sodium afin de détecter les TAGs par IMS.^{59,109} Or, seules les dépositions sans matrice ont démontré la capacité d'augmenter la résolution spatiale en IMS indépendamment de l'utilisation d'une interface liquide.^{99,108}

1.4 Ionisation par adduit d'argent

L'argentation (la formation d'ions moléculaire de type $[M+Ag]^+$) est apparue en MS suite à différents tests entourant l'utilisation de colonnes d'aluminium dopées en argent afin de séparer des molécules contenant divers type d'oléfine.⁹⁷ Cette technologie se basait sur une technique de chromatographique sur couche mince dopée en argent qui permettait de séparer des FAs insaturés.¹⁰¹ La première apparition de l'argentation en MS est survenue lorsque Seedorf *et al.* utilisèrent un substrat d'argent pour l'analyse de plasma sanguin en SIMS.¹¹⁰ L'application de l'argentation en LDI est survenue lorsque Schriemer et Li utilisèrent du $AgNO_3$ pour permettre la désorption et l'ionisation de polymères pouvant atteindre 1 500 000 Da de poids moléculaire.⁹⁶ Par la suite, d'autres recherches ont démontré que l'application d'une couche mince d'argent métallique rendait possible l'analyse de divers composés organiques contenant des oléfines par LDI.¹⁰⁴ En 2003, Delcorte *et al.* ont démontré l'utilité de l'argent en imagerie SIMS pour la détection du CHO à partir de sections tissulaires minces.¹¹¹ Toutes ces applications de l'argentation reposent sur l'affinité préférentielle que le cation

d'argent possède envers les oléfines dues à sa taille ainsi qu'à sa charge. À partir des résultats provenant de la séparation chromatographique de divers lipides, il est possible de prédire l'affinité que le cation d'argent possède pour différents types d'oléfines. L'argent interagit le plus fortement avec les molécules polyinsaturées non conjuguées suivi de ceux conjugués, mais il est très difficile de prédire la différence d'affinité entre une molécule mono-insaturée et une polyinsaturée conjuguée.^{97,98} Malgré les avancés de la fin des années '90 sur l'application en LDI de l'argentation, très peu de travaux furent transféré vers l'IMS par (MA)LDI. La seule image existante d'une molécule par argentation provient de Patty *et al.* qui ont dopé leur substrat SALDI avec du nitrate d'argent (AgNO_3) pour permettre la détection du CHO à partir d'une section de cerveau de souris.¹¹²

1.4.1 Limitations pour l'IMS de sections tissulaires minces

Diverses explications permettent de comprendre le manque d'intérêt de l'argentation pour l'IMS (MA)LDI. Malgré les résultats positifs de Patty *et al.*, l'image résultante du CHO est de faible qualité au niveau de la résolution spatiale et de l'intensité du signal à travers diverses histologies du cerveau. Ceci est souvent le cas lorsque des techniques SALDI sont utilisées pour l'IMS de section tissulaire mince. Étant-donné que la surface active en SALDI se retrouve sous la section tissulaire, celle-ci est directement exposée au laser ce qui donne lieu à un comportement se rapprochant beaucoup plus de la LDI conventionnelle qui nécessite des énergies laser souvent très élevées (par rapport au MALDI) et donc non compatibles pour l'analyse de certaines biomolécules fragiles. En plus, la présence du tissu diminue fortement l'énergie laser pouvant atteindre le substrat SALDI en dessous du tissu ce qui diminue fortement sa performance. Ce type de préparation où l'on ajoute du sel d'argent serait difficilement adaptable au MALDI sachant que les matrices MALDI sont toutes des molécules

possédant des systèmes aromatiques leur permettant d'absorber le laser. Malgré que les systèmes conjugués comme ceux présent sur les matrices MALDI possèdent une affinité plus faible pour les cations d'argent, les matrices sont tout de même capables de diminuer les signaux provenant de l'argentation par la force du nombre étant donné qu'elles sont ajoutées avec un fort accès à l'échantillon (~5000:1). Malgré ces limitations, le succès de Patty *et al.* ouvre une avenue intéressante pour l'argentation par LDI. Le succès qu'ils ont connu est dû à la capacité d'une couche tissulaire mince coupée à l'aide d'un cryostat de solubiliser partiellement le sel de AgNO₃ présent sur le substrat SALDI lors de l'étape de fonte et d'adhésion de la section permettant ainsi d'intégrer le sel dans le tissu ce qui permet la détection du CHO sans nécessairement avoir besoin de faire l'ablation complète de la section. Cette observation est concrétisée dans le Chapitre 2 où les travaux de Patty *et al.* sont combinés aux travaux de Delcorte *et al.* en SIMS pour arriver à un méthode sensible et spécifique permettant l'imagerie MS par LDI du CHO ainsi que plusieurs autres molécules contenant des fonctions oléfines.

1.5 Ionisation par adduit sodium

La formation de cations sodium ($[M+Na]^+$) au cours d'expériences MS est un phénomène difficilement évitable dû à la présence de trace de cet élément dans tous les solvants utilisés. Comme mentionné plus haut, la cationisation par adduit sodium est souvent un processus involontaire et les signaux générés sont souvent considérés indésirables.^{113,114} En (MA)LDI, le sodium, comme d'autres métaux alcalins (tel le potassium), est incorporé au mélange analyte matrice pour favoriser l'ionisation de molécules ne pouvant s'ioniser par transfert de proton. Contrairement à l'argentation, l'utilisation du sodium en (MA)LDI date

des débuts de l'analyse de polymère.¹¹⁵ Depuis, très peu de travaux ont exploité cette avenue en (MA)LDI et la plupart du temps les ions détectés par cationisation au sodium sont simplement mentionnés pour démontrer la versatilité d'une nouvelle technique sans jamais en être présenté comme pièce centrale de la recherche.¹¹⁶ C'est en 2000 que l'utilisation des adduits sodium en MALDI est apparue pour l'analyse d'FAs saponifiés provenant d'huiles comestible.¹¹⁷ Le domaine de l'analyse des huiles comestible reste la principale application de la cationisation par adduit sodium en MALDI^{118,119} jusqu'en 2007 où Gidden *et al.* commencent à approfondir nos connaissances sur le comportement des TAGs lors d'analyse MALDI.¹²⁰ Cette recherche traite de la fragmentation en source des TAGs causée par la formation d'une espèce protonnée instable des TAGs qui génère un fragment ressemblant à un DAG. L'application de la sodiation à l'IMS sur section tissulaire mince est aussi très succincte. En général, l'IMS par sodiation se fait en utilisant une méthode standard par MALDI où l'on change la composition des solvants pour promouvoir la solubilisation des TAGs sans ajout de sel de sodium.^{121,122}

1.5.1 Limitations pour l'IMS de sections tissulaires minces

Ici encore, certaines limitations ont freiné l'avancement de l'ionisation par sodiation en (MA)LDI. Tout comme avec l'argentation, il est possible pour la matrice MALDI de former un adduit avec les cations sodium pour ainsi diminuer le nombre de cations sodium libre pouvant ioniser des analytes. Ce type de suppression ionique n'est pas la seule raison ayant limité l'application de la sodiation à l'IMS. La plus grosse problématique provient des matrices elle-même. Les matrices MALDI tolèrent assez bien la présence de sel lors de la préparation d'échantillon.^{115,120} Par contre, la concentration maximale n'est pas suffisante pour permettre la sodiation complète des analytes présents dans les sections tissulaires minces

comme démontré dans le Chapitre 3.¹²⁰ Ces deux facteurs combinés diminuent drastiquement la qualité des signaux observés. Ceci explique la faible présence de ce mode d'ionisation en IMS et le faible nombre de publications sur le sujet. Sachant que la sodiation fut principalement appliquée à l'analyse de TAGs, un dernier facteur limitant des préparations avec matrice provient de leur caractère acide. La protonation d'un TAG forme une espèce instable ce qui induit une fragmentation dans la source pour former un ion fragment ressemblant à un DAG comme mentionné plus haut.¹²⁰ Pour pallier à ces limitations, il faut développer un système utilisant un agent de désorption ne formant pas d'adduit avec le sodium et qui de plus n'est pas acide. Celui-ci pourrait ainsi être combiné à un mélange salin tamponné à base de sodium pour ainsi permettre la désorption et l'ionisation par cationisation au sodium directement de sections tissulaires minces comme présentée dans le Chapitre 3.

Une alternative intéressante aux matrices est d'utiliser une couche nanométrique de métal ayant une absorbance UV à la longueur d'onde du laser utilisée (355 nm). En effet, les couches métalliques ne requièrent pas d'étape de co-cristallisation avec l'analyte et n'acidifient pas le système sur laquelle elles sont déposées. Ces deux propriétés font des surfaces métalliques des candidats de choix pour remplacer les matrices MALDI. McCombie et Knochenmuss ont montré qu'une couche nanométrique d'or déposée sur la matrice MALDI permettait d'augmenter le rendement de désorption et d'ionisation de celle-ci.¹²³ Quelques années plus tard Tang *et al.* ont démontré le potentiel d'une couche nanométrique d'or sans ajout de matrice, afin de détecter les différents types d'encres imprimées sur un billet de banque.¹²⁴ D'autres groupes de recherche ont préféré utiliser le platine à l'or pour la détection de divers types d'encres et de colorants histologiques démontrant que ce dernier était plus performant que l'or et que la LDI conventionnelle.¹²⁵ Le platine et l'or présentent les mêmes

propriétés essentielles à un bon agent de désorption en LDI. Ils sont tous les deux relativement inertes et donc ne forment pas d'adduits avec les analytes ni avec les contaminants provenant de la préparation des échantillons. Ils ont également la capacité d'absorber à la longueur d'onde du laser utilisé dans les systèmes LDI commerciaux (355 nm). Ces propriétés font du platine et de l'or deux candidats intéressants comme agent de désorption en LDI.

1.6 La maladie de Hunter (HD)

La HD ou mucopolysaccharidose de type II est caractérisée par l'accumulation de GAGs due à l'absence de l'enzyme de dégradation IdS. Les GAGs sont ainsi accumulés par toutes les cellules du corps au niveau de leurs lysosomes.^{82,126} La HD est une maladie liée au chromosome X ayant une fréquence d'environ 1 pour 110 000 chez l'homme.¹²⁶ Cette accumulation de GAGs non dégradés cause plusieurs symptômes principalement une augmentation de la masse des organes et une déformation du corps pouvant amener à une défaillance complète de certains organes lorsque l'accumulation est trop importante.^{127,128} Les symptômes les plus graves sont observés au niveau du cerveau où ceux-ci causent des retards mentaux ainsi que des pertes de cognition. À ce jour aucun traitement n'est disponible pour régler tous les symptômes de la HD. Une thérapie de remplacement enzymatique a été développée au début des années 2000 ayant la capacité de prolonger grandement la durée de vie des patients.¹²⁹ Elle consiste à injecter une version recombinante de l'enzyme IdS aux patients leur conférant la capacité de dégrader les GAGs. Par contre, l'enzyme IdS est incapable de traverser la barrière hématoencéphalique ne permettant pas de ralentir la perte cognitive associée à la HD.⁸³ En plus de l'accumulation des GAGs, une accumulation secondaire de gangliosides fut observée dans diverses maladies du lysosome tel que la HD.

Plus particulièrement, GM2 et GM3 sont souvent retrouvés dans certains neurones à des niveaux beaucoup plus élevés que la normale.

1.6.1 Les défis techniques de l'imagerie à haute résolution spatiale

Depuis l'introduction de la thérapie enzymatique, les chercheurs focalisent surtout leurs efforts à comprendre la progression de la maladie au niveau du cerveau. C'est surtout dans celui-ci que l'accumulation de gangliosides est la plus marquée. De plus, cette accumulation se fait au niveau de neurone individuel. La petite dimension de ces dépôts ($\leq 15 \mu\text{m}$) pose un défi de taille aux diverses techniques d'imagerie. Historiquement, la présence de ces dépôts a été révélée par IHC en utilisant un anticorps sélectif à l'un des gangliosides (le GM3) permettant de visualiser les dépôts au sein des neurones affligés. En ce qui concerne l'IMS, aucune recherche sur la HD n'est présente dans la littérature. Il n'est pas surprenant de constater le manque d'intérêt envers une maladie présentant des défis techniques aussi grand pour l'IMS. La très faible dimension des dépôts pose deux types de problèmes difficilement contournables. Le premier est la nécessité de faire l'acquisition à haute résolution spatiale (soit à $5 \mu\text{m}$) permettant une meilleure visualisation des structures. Plus la résolution spatiale est grande, plus la zone d'analyse (pixel) est faible diminuant ainsi la sensibilité de l'analyse. Ceci nécessite le développement de méthodes instrumentales spécifiques aux signaux attendus, et ce, au détriment des signaux plus abondants présents dans le spectre MS. Le deuxième problème encouru est l'impossibilité de corréler les structures observées à l'aide de sections successives de tissu comme utilisé en IMS. Encore une fois la taille des dépôts est la cause du problème. Étant donné que les sections tissulaires sont typiquement coupées à des épaisseurs de $10\text{-}14 \mu\text{m}$ pour l'IMS, ce qui est environ de même dimension que les dépôts de gangliosides ($\leq 15 \mu\text{m}$), la distribution des dépôts se retrouvant dans une section donnée peut

être totalement différente de celle observée dans la section suivante. Le développement d'une méthodologie hautement spécifique à la détection des gangliosides couplée à une procédure d'IHC pouvant être appliquée à la même section tissulaire utilisée en IMS dans le cadre de la maladie de Hunter sera le thème du Chapitre 4.

1.7 Objectifs de recherche

Le but de cette thèse était de développer différentes approches chimiques ou instrumentales afin d'améliorer la spécificité ainsi que la sensibilité des analyses par IMS de lipides neutres.

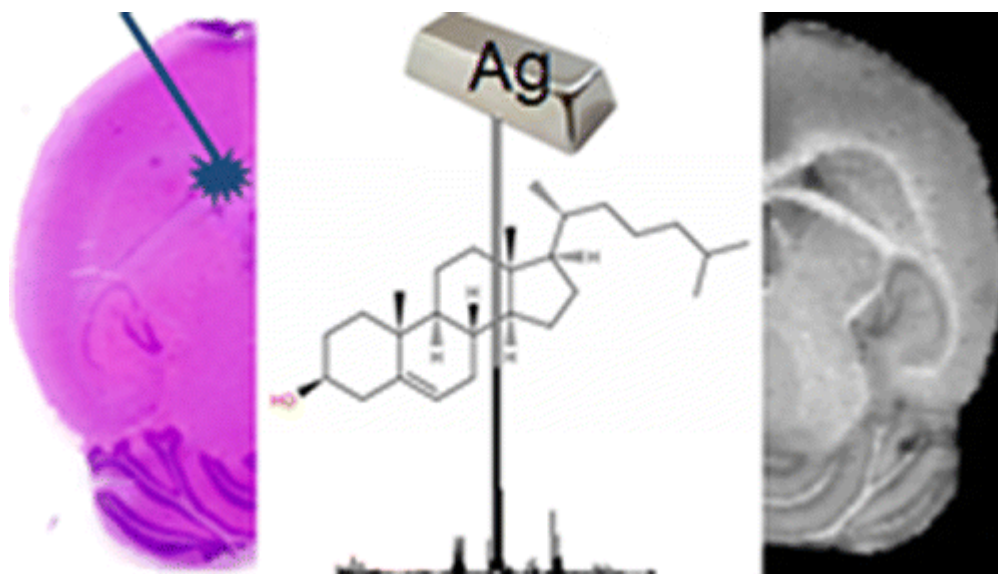
Pour ce faire, une première approche consiste à exploiter l'affinité préférentielle de certains cations métalliques, tel que l'argent (Chapitre 2), afin d'ioniser sélectivement certaines classes de biomolécules tel que les stéroles ou les acides gras. L'agent d'ionisation présentant des signaux plus intenses et/ou nouveaux subira une série d'analyse MS afin de caractériser les signaux détectés. Il sera nécessaire d'automatiser la déposition de cet agent d'ionisation sur des sections tissulaires minces afin de rendre compatible ce mode d'ionisation avec l'IMS. Finalement, une analyse de la surface générée sera de mise afin d'approfondir notre compréhension de la méthode.

Par la suite, une deuxième approche consiste à ajouter un agent de désorption à un agent d'ionisation sélectif (Chapitre 3). Dans ce cas, l'agent de désorption qui sera introduit devra être le plus chimiquement inerte possible afin de minimiser toute interaction avec le matériel biologique ainsi que l'agent d'ionisation. Il sera encore nécessaire de caractériser tous les signaux présent ainsi que de développer une procédure automatiser afin de rendre la

méthode compatible à l'IMS. Une fois de plus, il sera nécessaire de caractériser la surface résultante.

Une dernière alternative consiste à l'optimisation d'un protocole MALDI existant pour la détection d'une gamme d'analyte précis dans un échantillon donné (Chapitre 4). Dans ce cas, il est nécessaire d'identifier la matrice MALDI la plus performante pour le type d'analyte ciblé ainsi que le mode de déposition (par interface liquide ou non) le plus adéquat afin de répondre aux exigences analytiques (limite de détection, résolution spatiale, etc.). Il est nécessaire que la matrice choisie soit compatible avec les exigences du projet tel que la compatibilité avec l'IHC exécuté séquentiellement à partir de la même section tissulaire. Finalement, la procédure devra être appliquée à l'analyse d'un échantillon réel de la maladie de Hunter afin d'y détecter les dépôts de gangliosides présents dans cette pathologie.

Chapitre 2: Silver-Assisted Laser Desorption Ionization For High Spatial Resolution Imaging Mass Spectrometry of Olefins from Thin Tissue Sections



Martin Dufresne¹, Aurélien Thomas¹, Julien Breault-Turcot¹, Jean-François Masson^{1,2},
Pierre Chaurand¹, *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 3318-3324.

¹Department of Chemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²Centre for Self-Assemble Chemical Structures (CSACS), McGill University, Montreal,
Quebec, Canada

2.1 Abstract

Silver has been demonstrated to be a powerful cationization agent in mass spectrometry (MS) for various olefinic species such as cholesterol and fatty acids. This work explores the utility of metallic silver sputtering on tissue sections for high resolution imaging mass spectrometry (IMS) of olefins by laser desorption ionisation (LDI). For this purpose, sputtered silver coating thickness was optimized at 16 ± 2 nanometers for providing the best desorption/ionization efficiency on an assorted selection of mouse and rat tissues including kidney, liver, and testis. For mouse brain tissue section, the thickness was adjusted to 23 ± 2 nanometers of silver to prevent ion suppression effects associated to a higher cholesterol and lipid content. Characterization of the species by MS/MS showed a wide variety of olefinic compounds allowing the IMS of different lipid classes including cholesterol, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, and triacylglyceride 52:3. A range of spatial resolutions for IMS were investigated from $150\ \mu\text{m}$ down to the high resolution cellular range at $5\ \mu\text{m}$. The applicability of direct on-tissue silver sputtering to LDI-IMS of cholesterol and other olefinic compounds presents a novel approach to improve the amount of information that can be obtained from tissue sections. This IMS strategy is thus of interest for providing new biological insights on the role of cholesterol and other olefins in physiological pathways or disease.

2.2 Introduction

In the past decade, cholesterol has been the target of many studies because of the role it plays in multiple diseases, including Alzheimer, cancer, and atherosclerosis.^{72,86} For instance,

amyloid plaques associated to Alzheimer's disease has been shown to contain anomalies in cholesterol and lipid expression within the brain grey matter.¹³⁰ Beyond its own importance, cholesterol is a precursor of various molecules such as steroid hormones and vitamin D, which all possess fundamental biological functions.¹³¹⁻¹³³ Many different analytical methods have been developed to quantify cholesterol and its derivatives notably by liquid and gaseous chromatography coupled with various mass spectrometry platforms.¹³⁴⁻¹³⁷ To enhance olefins ionization efficiency by electrospray, silver nitrate can be added to the mobile phase.¹³⁸ The use of silver salts has equally been demonstrated to enhance both olefin and polymer ionization in laser desorption ionization (LDI) and matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) during the latter half of the 1990s.^{96,104,105,139} However, these approaches were limited to the study of homogenous samples, and consequently do not offer any spatially resolved information that could be extracted from a tissue biopsy. To mitigate this deficiency, imaging mass spectrometry (IMS) is becoming an efficient tool to spatially resolve the distribution of target analytes directly on tissue sections while retaining high correlation with histology.¹⁴⁰⁻¹⁴²

In recent times, the preferred method for cholesterol IMS has been cluster secondary ions mass spectrometry (SIMS) thanks to its robust capacity to ionize cholesterol in its dehydrated $[M-H_2O+H]^+$ state.¹⁴³⁻¹⁴⁵ To directly image native cholesterol, a metallic silver layer can be deposited on top of the sample. This deposition has demonstrated the applicability of silver cationization of cholesterol for IMS using SIMS.^{100,146} The silver layer-based approach for enhancing IMS of cholesterol was also recently applied to a LDI-IMS technique called Nanostructure-Initiator Mass Spectrometry (NIMS), where a silver nitrate layer is deposited on a porous silicon waffle target prior to mounting the tissue on the surface.^{112,147}

Colloidal silver layer deposition as also yielded interesting results for various long chain fatty acids and hydrocarbons using an LDI-IMS approach.¹⁰⁸ Further research has also been successfully carried out using silver nitrate cationization with desorption electrospray ionization (DESI) imaging for the analysis of poly-olefinic fatty acids.¹⁴⁸ Other approaches that do not rely on silver cationization have also been developed, such as a DESI-MS imaging technique that uses betaine aldehyde to charge label cholesterol through an on tissue derivatization.¹⁴⁹ Matrix enhanced surface assisted laser desorption ionization (ME-SALDI) techniques have also been reported for imaging of cholesterol but solely as its dehydrated form and with low sensitivity.¹⁵⁰ Some others have also used silver nanoparticle to analyze fatty acids with negative ion polarity.¹⁰⁷

All of the previously mentioned techniques were either able to image cholesterol or various fatty acids directly from tissue. Further research is still required to image a wider range of molecules at high resolution by silver olefin cationization. LDI seems the most appropriate technique to achieve this goal given that most modern MALDI systems are capable of laser raster focalisation below 20 μm .¹⁵¹ Few aspects need to be considered when lowering lateral resolution including the homogeneity of the matrix or metal layer, the minimum laser raster size, the resolution at which the sample carrier can move, and the inevitable diminution of the observed signals as the desorption area become smaller. This last point can be overcome by increasing laser power or by using a more efficient ionization approach for the targeted analytes such as the silver cationization discussed above.¹⁵²

Recently, novel approaches for dry matrix application such as matrix sublimation have demonstrated high spatial resolution capacity resulting in highly homogeneous matrix

deposition with minimal lateral analyte migration.^{13,152,153} Since metal sputter deposition yields a micron scale homogeneous layer, this process could provide similar conditions to those enabling high resolution IMS for matrix sublimation.¹⁵⁴ Based on previous findings involving silver cationization of cholesterol and fatty acids we have explored imaging a variety of olefinic compounds from tissue sections through metal cationization after silver sputtering for high resolution LDI imaging. For this purpose, various coating thicknesses of metallic silver were investigated on different organ tissue sections from mouse and rat. Ion images from mouse brain and kidney are presented from 150 μm down to 5 μm spatial resolution for high resolution analysis. Identification of the detected species was carried out directly from tissue sections using LDI-TOF/TOF mass spectrometry.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Chemicals and Reagents

Arachidonic acid (AA), Docosahexaenoic acid (DHA), phosphatidylethanolamine (PE) (18:1/16:0), and Triacylglyceride (TAG) (16:0/18:1/18:2) standards were purchased from Cayman chemical Co. (Ann Arbor, MI). Cholesterol (CHO) standard was purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). Stock solutions were prepared at 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in ethanol. Ethanol (EtOH) was purchased from Fisher Scientific (Pittsburgh, PA). Microscope coverslip (22 x 22 mm) were ordered from VWR (Ville Mont-Royal, QC) and the silver target 3N5 (99.95% purity) was purchased from ESPI Metals (Ashland, OR).

2.3.2 Tissue sampling and sectioning

Mice were euthanized through CO_2 asphyxiation after 15 days of growth. The dissection was carried out immediately after sacrifice to minimize molecular deterioration of

the tissues. The dissected organs were flash frozen by contact with dry ice to prevent shattering and maintain tissue shape. All animal studies were approved by the local Ethical Committee of the University of Montreal. Rat testicles were purchased from Pel-Freez biologicals (Rogers, AR). All tissues were sectioned at 14 μm thickness using Leica CM3050 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and thaw mounted on ITO coated slides. All tissues were dried in a desiccator prior to the silver deposition. Serial sections were also collected and stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard protocols.

2.3.3 Sputter coating

Silver layer were deposited on top of the tissue sections using a Cressington 308R sputter coater from de Ted Pella inc. (Redding, CA) at an argon partial pressure of 0.02 mbar and a current of 80 mA. The depositions were time controlled and layer thicknesses were estimated with the internal quartz crystal microbalance. Deposition times were of 35 s (16 ± 2 nm layer) or 55 s (23 ± 2 nm layer).

2.3.4 Silver layer characterization

Physical characterization of the thickness of the silver film was performed by atomic force microscopy (AFM) in contact mode. A microscope cover slip of 22 x 22 mm was placed on the larger microscope slides of 25 x 75 x 1.0 mm before any metal deposition and removed afterward in order to measure the metal thickness. The AFM measurements were performed using a Witec Alpha SNOM (Ulm, Germany). The thickness of the silver film was measured from multiple spots on a single sample and averaged. The absorption spectrum of each silver film and of the ITO slides were performed using a Cary 100 Bio UV/Vis spectrophotometer

from Varian Canada Inc. (Montreal, QC). A clean microscope slide with no metal was used as reference.

2.3.5 LDI mass spectrometry

Profiling and imaging MS of the tissue sections were performed on a MALDI TOF/TOF Ultraflextreme mass spectrometer equipped with SmartBeam II Nd:YAG/355 nm laser operating at 1000 Hz and providing a laser focus down to 20 μm in diameter for the “minimum” focus setting (BrukerDaltonics, Billerica, MA). Profiling data were acquired by summing 20 time 250 shots from selected tissue section. For IMS data acquisitions, 250 shots were summed per array position. High spatial IMS measurements were acquired with lateral resolution of 5 μm . Profiling and imaging data acquisitions were performed in reflectron geometry under optimized delayed extraction conditions with a source accelerating voltage of +25 kV, in a mass range of 200-1100 Da. A mass resolution (full width at half maximum definition) of $\sim M/\Delta M$ 20,000 was typically achieved across the whole mass window (i.e. 200-1100). Internal calibration was carried out in quadratic mode using the silver clusters present in the spectrum. A mass accuracy better than 20 ppm was obtained across all tissue section images. Lipid characterization was performed by comparing accurate mass measurements with the LIPID MAPS prediction tool (<http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>) and confirmed by MS/MS measurements acquired in LIFT-TOF/TOF mode. MS and MS/MS data were processed using flexAnalysis v3.3 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA). IMS data were recalibrated after acquisition with flexAnalysis Batch Process v3.3 software using the silver clusters as internal mass calibrants (Bruker Daltonics, Billerica, MA). IMS data were reconstructed and visualized using flexImaging v3.0 software (Bruker Daltonics, Billerica, MA).

2.4 Results and Discussion

2.4.1 On tissue silver layer optimization

As previously observed by Nygren and Malmberg, the necessary thickness of silver on the tissue section is dependent on its composition.¹⁵⁴ Due to the inherent lipid composition of brain, with high concentration of cholesterol in white matter regions, we performed initial optimization of the silver layer thickness for brain as a model for all lipid rich tissues. The final optimized thickness of 23 ± 2 nm showed optimal signal yield and reproducibility. Figure: 2.1 shows LDI-TOF MS ion profiles from a brain section acquired in the white and grey matter regions with an optimized silver coating of 23 ± 2 nm. Intact cholesterol signal observed as a silver adduct (m/z 493-495) dominates in the white matter while numerous signals in the range of m/z 320-500 corresponding to various fatty acids are more intense in the grey matter. The reason for stating two m/z values comes from the two highly abundant silver stable isotope ^{107}Ag and ^{109}Ag . These two isotopes come in a relative abundance of roughly 52% and 48% respectively which makes silver adducts easily noticeable through this specific isotopic pattern. Signals observed in the m/z range between 700 and 1000 correspond to either protonated or silver cationized phospholipids. These were found predominant in the white matter. Based on our observation, at the optimal silver thickness, a change in intensity between the silver clusters and the silver cationized cholesterol (i.e. the dominant ion species) was observed when profiling was performed on grey and white matter, respectively (see Figure: 2.1). This transition defines the silver thickness where the best compromise between the ionisation efficiency and the laser reflection is reached.

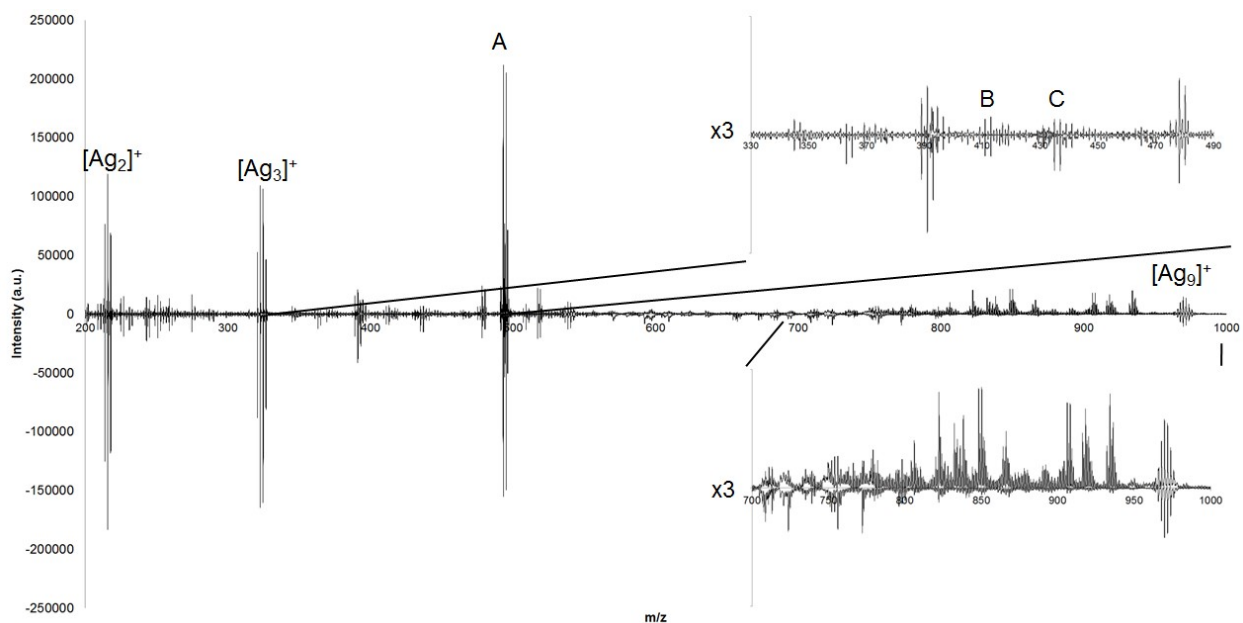


Figure: 2.1 : LDI-MS spectra acquired from a mouse brain section in the white matter (top) and in the grey matter (bottom) with a silver coating of 23 ± 2 nm. Silver clusters (Ag_2 , Ag_3 , and Ag_9) can be seen in both histological regions. Silver cationized cholesterol (A), arachidonic acid (B) and docosahexaenoic acid (C) have been label for clarity.

Figure: 2.1 also shows the presence of some silver clusters, which can be used as part of the mass calibration before or after acquisition. Software such as flexAnalysis provides the tools necessary for post-acquisition mass calibration that is able to correct the mass shift induced by the absorption variations between different histological areas. Additionally, the silver layer is still somewhat transparent to the naked eye at these thicknesses and reveals some of the anatomical region in different shades of blue (Sup. Fig. S1).

Subsequently, different silver coating thicknesses were optimized for mouse kidney, liver and rat testis tissue sections to maximize desorption/ionization efficiency. It was found that the different types of tissue did not respond in the same manner as brain suggesting again

that optimal silver coating thickness is tissue dependent.^{99,155} As a result of this observation, an optimal silver thickness of 16 ± 2 nm was achieved for the kidney, liver and testes (Sup. Fig. S2). This thickness is fairly thin to minimize reflectivity from the surface while still being able to provide enough silver ions for the cationization of the olefins. This finding gives further evidence to our theory that the quantity of silver necessary for optimal yield has some proportionality with the olefin content of the tissue.

Different studies have further demonstrated that the thickness of the metallic layer is a critical parameter for the MS efficiency.^{99,155} Due to this, UV-vis spectra of the silver layers at different thicknesses were acquired to evaluate the relationship between the silver layer thickness, the tissue section and the laser settings of the LDI process. Interestingly, the absorption band of the layers was observed around 267 nm whereas a reflection band started around 325 nm, both increasing with respect to the layer thickness (Sup. Fig. S3). The absorption profile of the silver layer is typical of a silver mirror and do not reveal the excitation of a surface plasmon. Silver nanoparticles typically support a surface plasmon within the 400-500 nm regions, a spectral range where only reflection occurs in the current silver films.¹⁵⁶ The location of the reflection band in the spectrum is problematic as most of the commercial LDI/MALDI systems use either a nitrogen laser or a tripled Nd:YAG laser, both irradiating above 325 nm. This observation concomitantly means that the silver layer is not involved in the desorption process and the coating thickness could significantly decrease the laser intensity reaching the tissue section. In light of these results, it is presumed that only the ITO surface and the molecular content of tissue itself interact with the laser in the desorption event. ITO surfaces were ruled out as they absorb with a maximum at 280 nm and the band does not reach 355 nm (Sup. Fig. S4). Further confirmation MS measurements were

done by firing the laser off tissue and observing the lack of silver signal for the same laser energy as used on tissue sections (Sup. Fig. S5). These results demonstrated that the desorption process is supported by the tissue section itself. Biological tissue UV laser ablation is known to induce photochemical dissociation and photothermal desorption of analytes. The latter process is dominant with lasers operating above 300 nm wavelength, confirming our results.¹⁵⁷ However, it is worth noting that the use of a quadrupled Nd:YAG laser irradiating at 266 nm could potentially further improve the desorption and ionisation process by allowing the silver layer to absorb the laser similarly to conventional MALDI matrices.

2.4.2 Characterization of olefins from mouse brain and kidney tissue sections

The unique affinity of silver to form weak charge transfer complexes with double bonds provides a sensitive and selective approach for the analysis of olefins by LDI-MS.^{158,159} We investigated the different species preferentially detected after sputter deposition of silver clusters. Supplementary figure S2A presents the typical positive MS profile obtained from a kidney tissue section. As demonstrated, the method provided a rich molecular pattern, especially in the 330-500 and 600-1000 Da regions. The molecular signals were then characterized from both brain and kidney tissue sections by combining MS/MS with mass prediction tools. Among the proposed molecular identifications, several lipid classes were observed (i.e. fatty acid, sterol, phospholipid, prostaglandin, and triacylglyceride) supported by a recent work performed on silver ion containing DESI spray solvent (Supplementary Table S1).¹⁴⁸ It is worth noting that only few species were assigned with respect to the number of signals. This incomplete characterization is in part explained by the TOF/TOF instrument characteristics including moderate mass resolution and imprecise precursor mass selection of the deflection lens (typically more than four Daltons of mass selection window). These

instrument limitations were further emphasized by the isotopic pattern of silver adducts complicating the mass spectra. Different MS/MS spectra and their proposed fragmentation pathways are presented in Figure 2.2. As demonstrated, on-tissue MS/MS of m/z 411-(413), 435-437, 493-495, and 963-(965) produced characteristic fragmentation patterns corresponding to the silver cationized arachidonic acid, docosahexaenoic acid, cholesterol, and triacylglyceride 52:3 (TAG 52:3), respectively. These MS/MS spectra were also confirmed with those obtained from the standards directly spotted on a MALDI plate (supplementary figure S6).

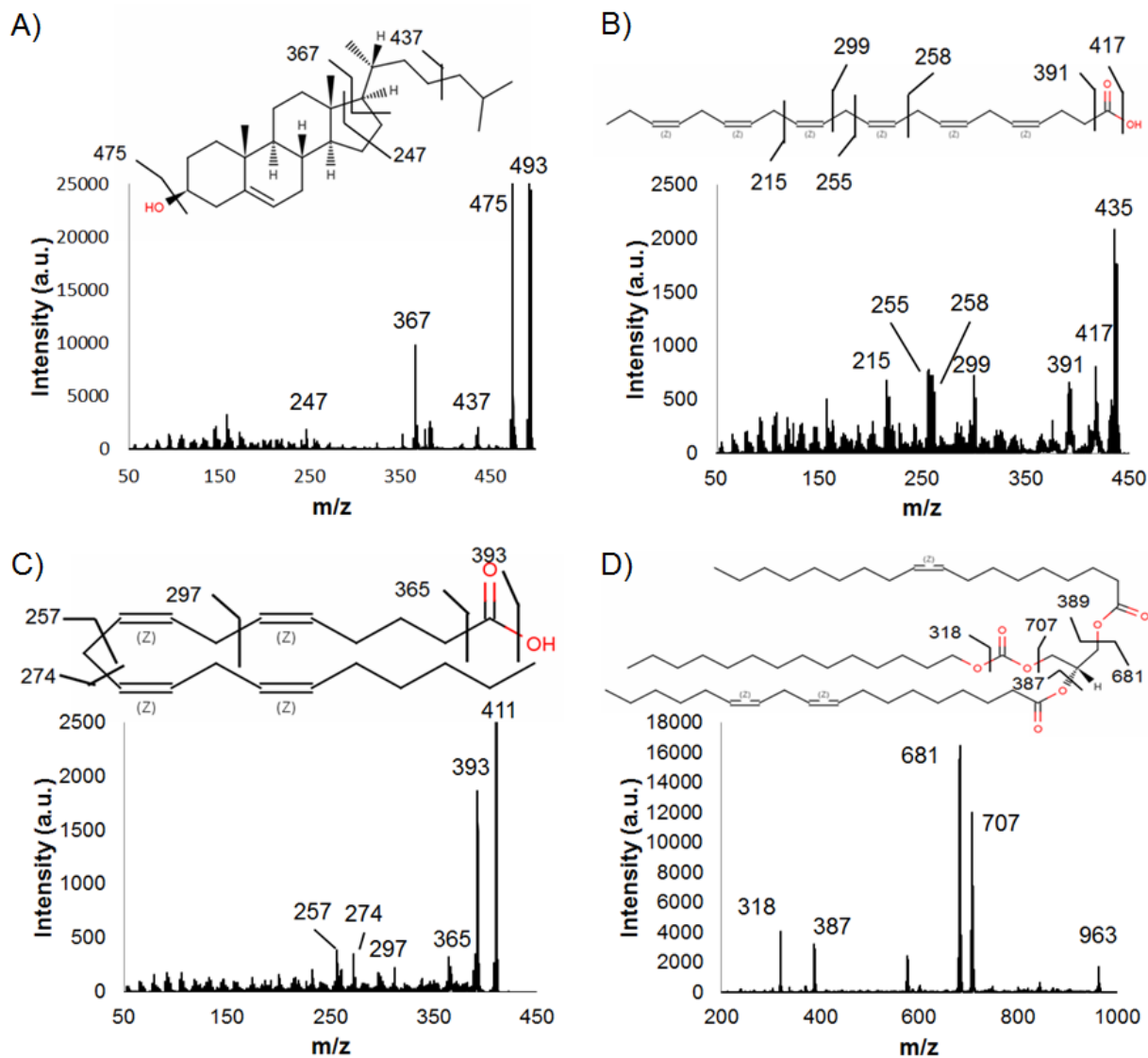


Figure 2.2 : MS/MS spectra acquired from a mouse kidney tissue section. $[M+Ag]^+$

MS/MS spectra from silver cationized cholesterol (A), docosahexaenoic acid (B), arachidonic acid (C), and triacylglyceride 52:3 (D) after silver deposition. Fragmentation pathways are proposed for each molecule.

2.4.3 IMS of a mouse kidney silver coated section

Because of its distinct histological features, the efficacy of the developed method for IMS was evaluated using kidney and testis tissue sections (supplementary figure S7). Figure 2.3 shows some regioselective ion images acquired at 150 μm lateral resolution and with a medium laser focalization setting (90 μm in diameter) from a mouse kidney midsagittal section for a coating thickness of 16 ± 2 nm. Silver cationized arachidonic acid was found throughout the kidney as shown in Figure 2.3B. The high intensity region in the middle corresponds to the pelvis and medulla regions as opposed to the cortex which shows slightly lower intensities. Interestingly, the silver cationized docosahexaenoic acid was also found in the kidney but with an opposite distribution to silver cationized arachidonic acid as shown in Figure 2.3C. The last signal shown in Figure 2.3D was also identified and corresponds to silver cationized TAG 52:3 and defines the internal area of the cortex.

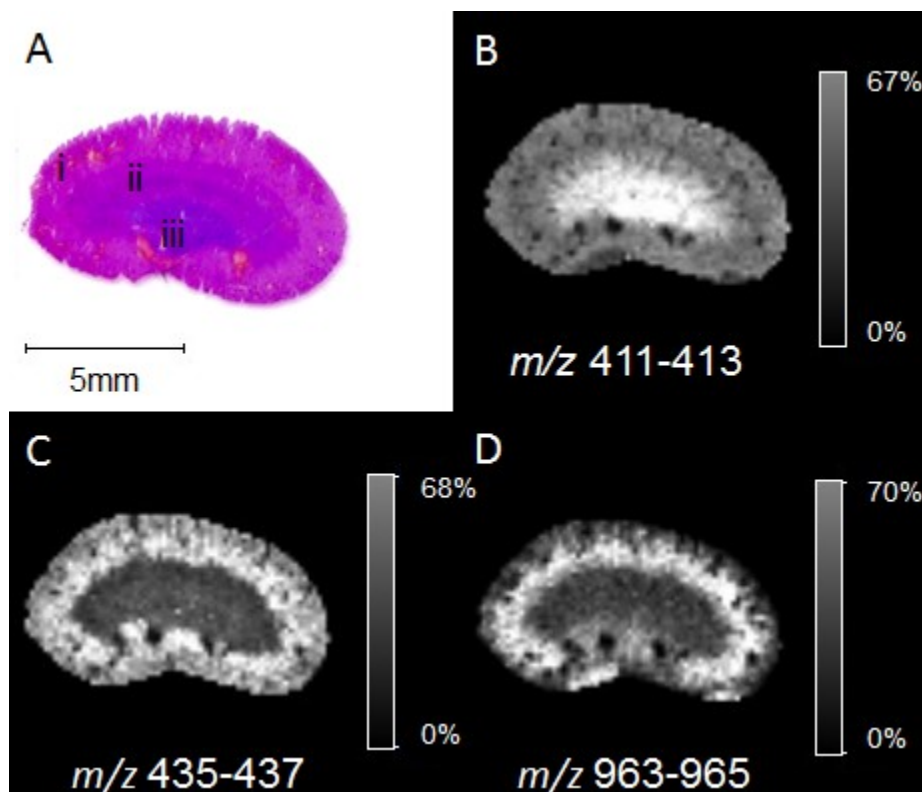


Figure 2.3 : Imaging MS of a midsagittal mouse kidney acquired at 150 μm spatial resolution after silver sputtered coating (16 ± 2 nm). Serial H&E stained section showing the cortex (i), the medulla (ii), and the pelvis (iii). Ion images of silver cationized arachidonic acid (B), docosahexaenoic acid (C), and triacylglyceride 52:3 (D).

2.4.4 IMS of a mouse brain silver coated section

As discussed previously, the approach proposed in this work is capable of detecting cholesterol in brain tissue simultaneously with a variety of fatty acids and lipids as shown in Figure: 2.1. IMS was carried out on a horizontal brain section (approximately 3.0 mm from bregma) with 100 μm lateral resolution and a small laser focalization (60 μm diameter) for a silver layer thickness of 23 ± 2 nm. Figure 2.4 shows a selection of ion images that highlight the different regioselectivity of these compounds inside the brain. The most intense signal comes

from the silver cationized cholesterol signal at m/z 493-495. Cholesterol signal is found throughout the brain and cerebellum with higher relative intensity in the white matter. This finding correlates with results obtained by other imaging MS approaches.^{143,149} Interestingly, cholesterol distribution correlates with the signal shown at m/z 906-908 in Figure 2.4F, which highly defines the white matter region. Unlike these signals, the one at m/z 654-656 is mainly expressed in the grey matter with a high affinity for the cerebellar cortex and the hippocampus region (Figure 2.4E). Moreover, silver cationized docosahexaenoic acid and arachidonic acid have slightly similar distributions as shown in Figure 2.4B and C. Both fatty acids have intense signals in the frontal lobes and the hippocampus region and unlike cholesterol, both have lower intensities in the corpus callosum.

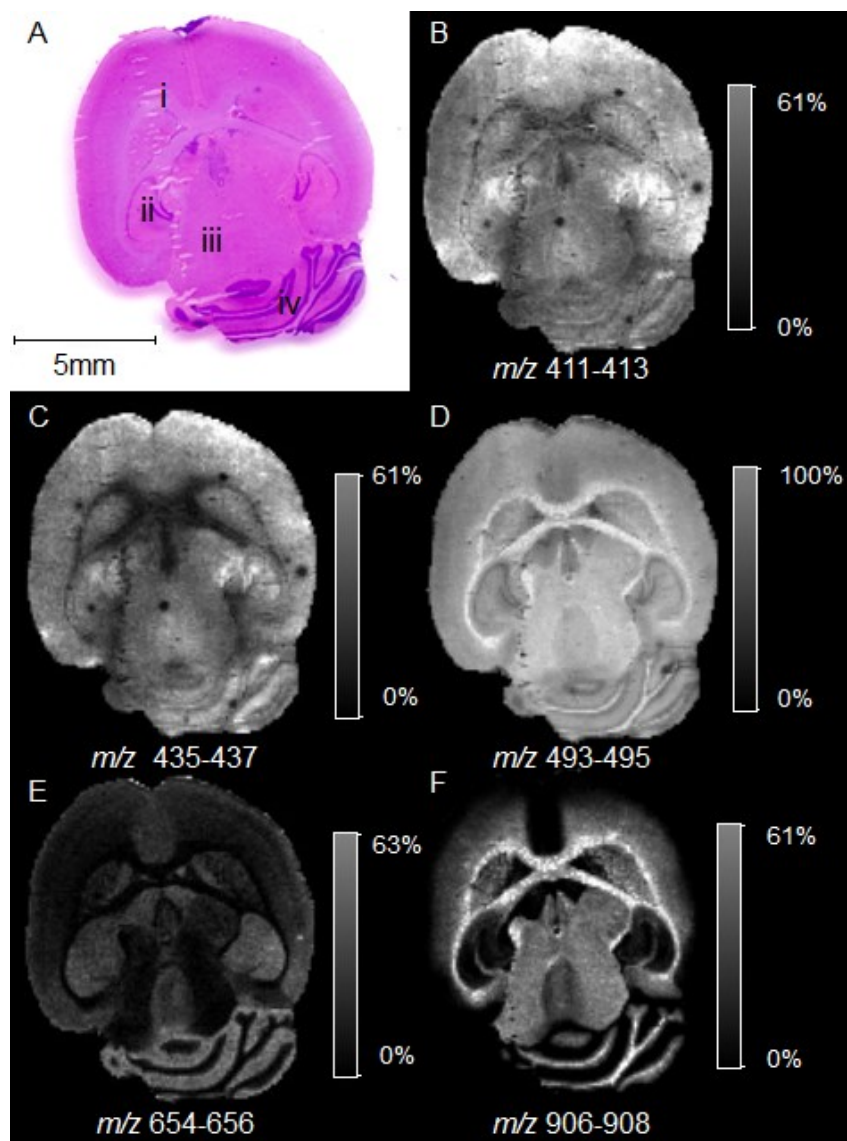


Figure 2.4: Imaging MS of a mouse brain section cut in the horizontal plane approximately 3.0 mm from bregma. IMS was performed with a lateral resolution of 100 μm after 23 ± 2 nm silver sputter coating. Serial section after H&E staining (A) showing the corpus callosum (i), the hippocampus region (ii), the midbrain region (iii), and the cerebellum (iv). Corresponding ion images of the silver cationized arachidonic acid (B), docosahexaenoic acid (C), cholesterol (D), and two unidentified lipid ion species (E and F) are presented.

2.4.5 High spatial resolution IMS of a mouse cerebellum section

High-resolution imaging allows the visualization of finer details from selected regions of interest at the cellular level and below.^{152,153} As discussed above, metal sputtering yields homogeneous layers with minimal or no lateral analyte migration on the scale of the laser beam size. In this case, spatial resolution is only limited by the diameter of the laser beam on target.¹⁶⁰ Due to this, IMS was carried out by oversampling the laser minimum raster (i.e. 20 μm) using the smallest step size of the sample stage (5 μm) on a mouse brain horizontal section in the cerebellum region (Figure 2.5). As previously demonstrated, such imaging MS approach enables us to perform a four folds improvement of the image resolution compared to the laser raster.¹⁶¹ This is possible with complete silver layer ablation per position and by overlapping each raster position prior to their acquisition.^{152,161} Figure 2.5 presents high resolution images performed in the cerebellum region of a mouse brain. The resulting ion image for silver cationized cholesterol defines different histologies within the tissue such as the cerebellar cortex, the granular region, and the cerebellar lobules. The ion image for the selected signal at m/z 906-908 demonstrates that this compound is mainly expressed in the white matter (Figure 2.5), confirming the results obtained at lower spatial resolution (Figure 2.4F).

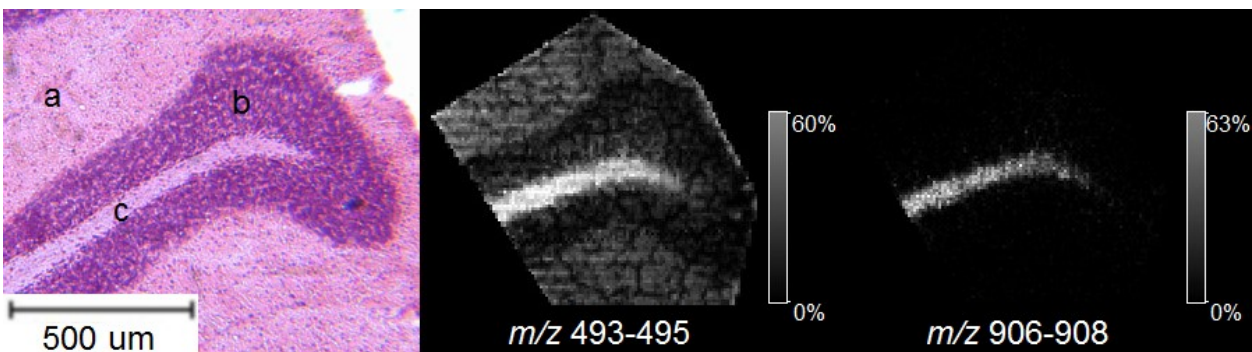


Figure 2.5 : High spatial resolution imaging MS acquired from a horizontal mouse cerebellum region coated with silver and acquired with a 5 μm lateral resolution. In the H&E staining, a, b, and c represent the cerebellar cortex, the granular region, and the cerebellar lobules, respectively. Ion images for silver cationized cholesterol (middle) and of unidentified lipid silver adduct (right) shows high correlation with the white matter.

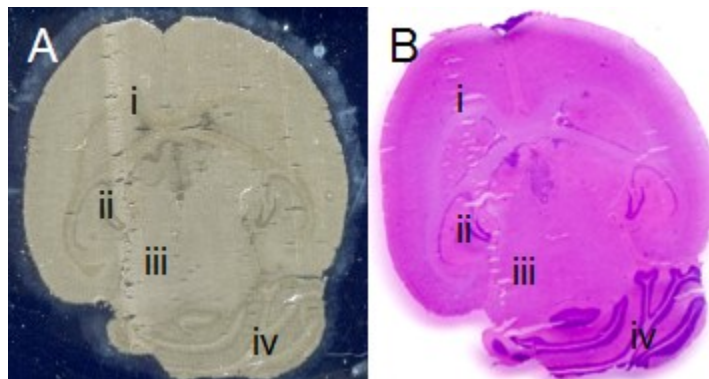
2.5 Conclusion

This work presents a simple LDI mass spectrometric approach to simultaneously image cholesterol along with other olefins from thin tissue sections with high spatial resolution capability at cellular length scale. This was achieved through the dry deposition of a nanometer scale silver layer using a sputter coating system. The ability of silver to enhance the detection of olefinic compounds in the positive ionization mode has been further demonstrated through the profiling and IMS of several tissues including brain, kidney, liver, and testis. The potential to monitor the distribution and relative abundance of olefins from a thin tissue sections at the cellular level is of interest for providing meaningful biological information. With this in mind, silver assisted metal sputtering LDI-IMS could thus be used to further understand the implication of various olefinic compounds including cholesterol, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid in numerous disorders and diseases.

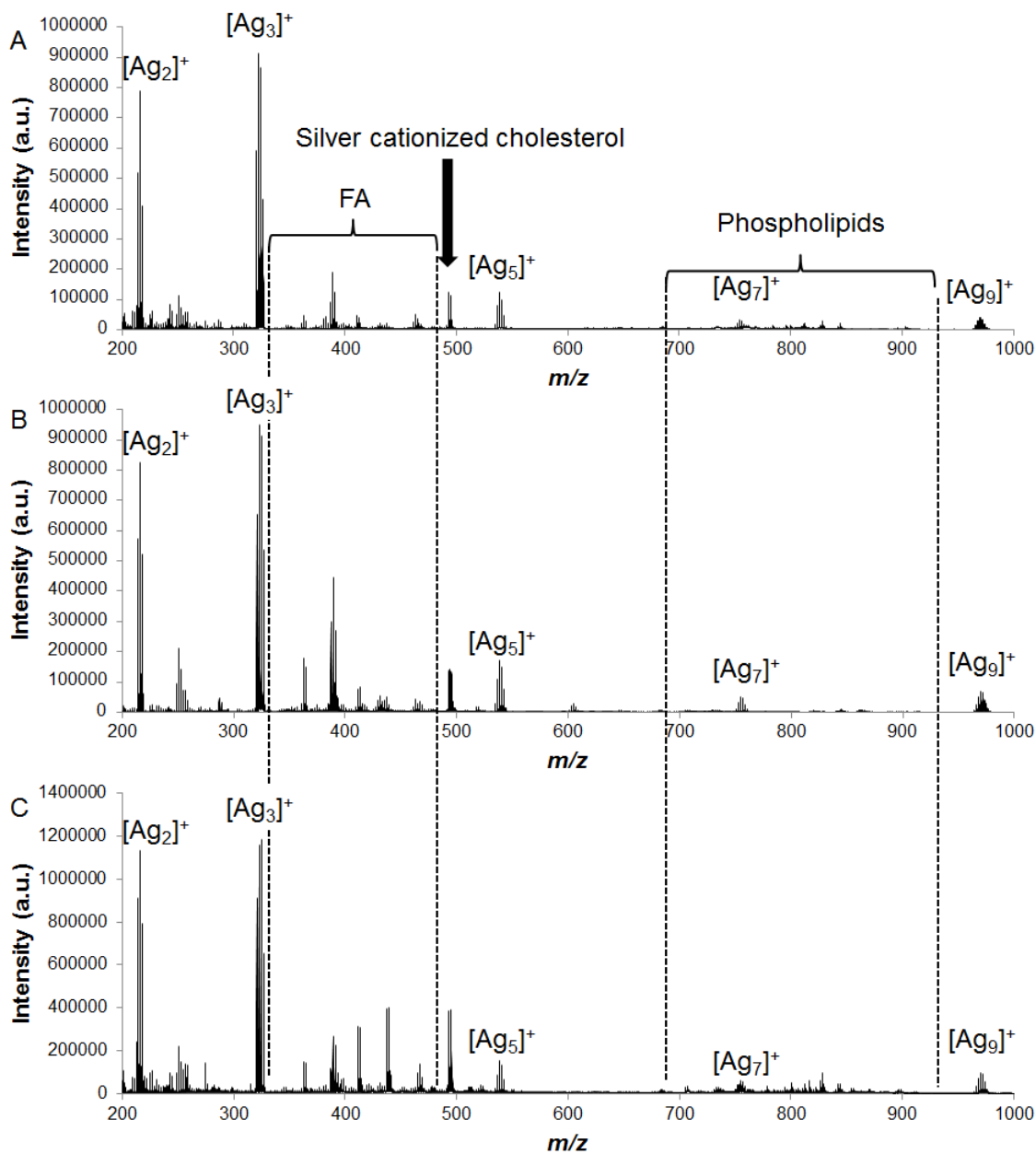
2.6 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Natan Heath Patterson, Hugo-Pierre Poirier Richard, and Érik Fournaise (Dept. of Chemistry, University of Montreal) for their helpful contributions in this work. The authors would also like to acknowledge financial support from the Canadian Foundation for Innovation, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, Le Fond de Recherche en Santé du Québec, and Le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies. Dr. A. Thomas is recipient of a fellowship awarded by the Swiss National Science Foundation.

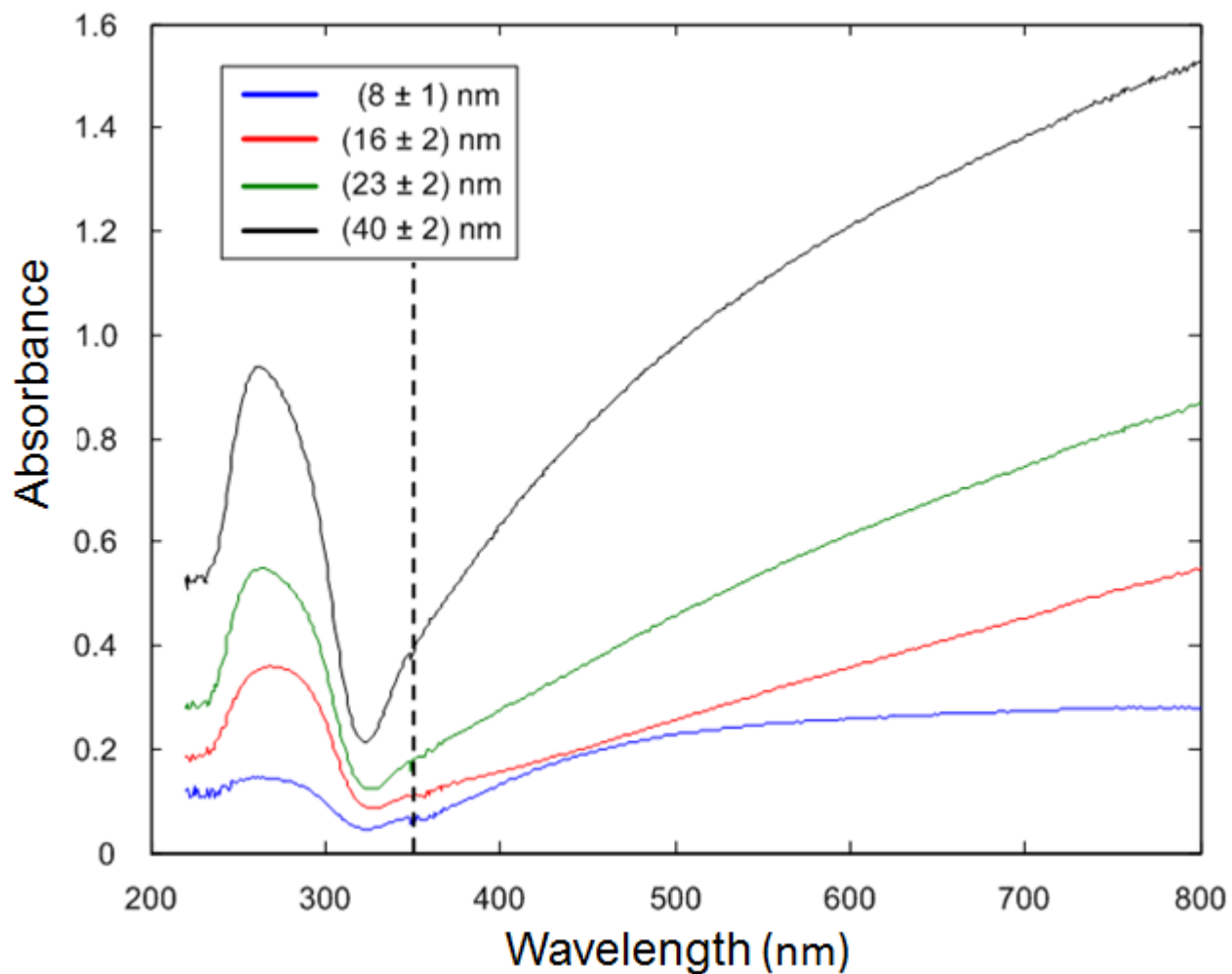
2.7 Supporting informations



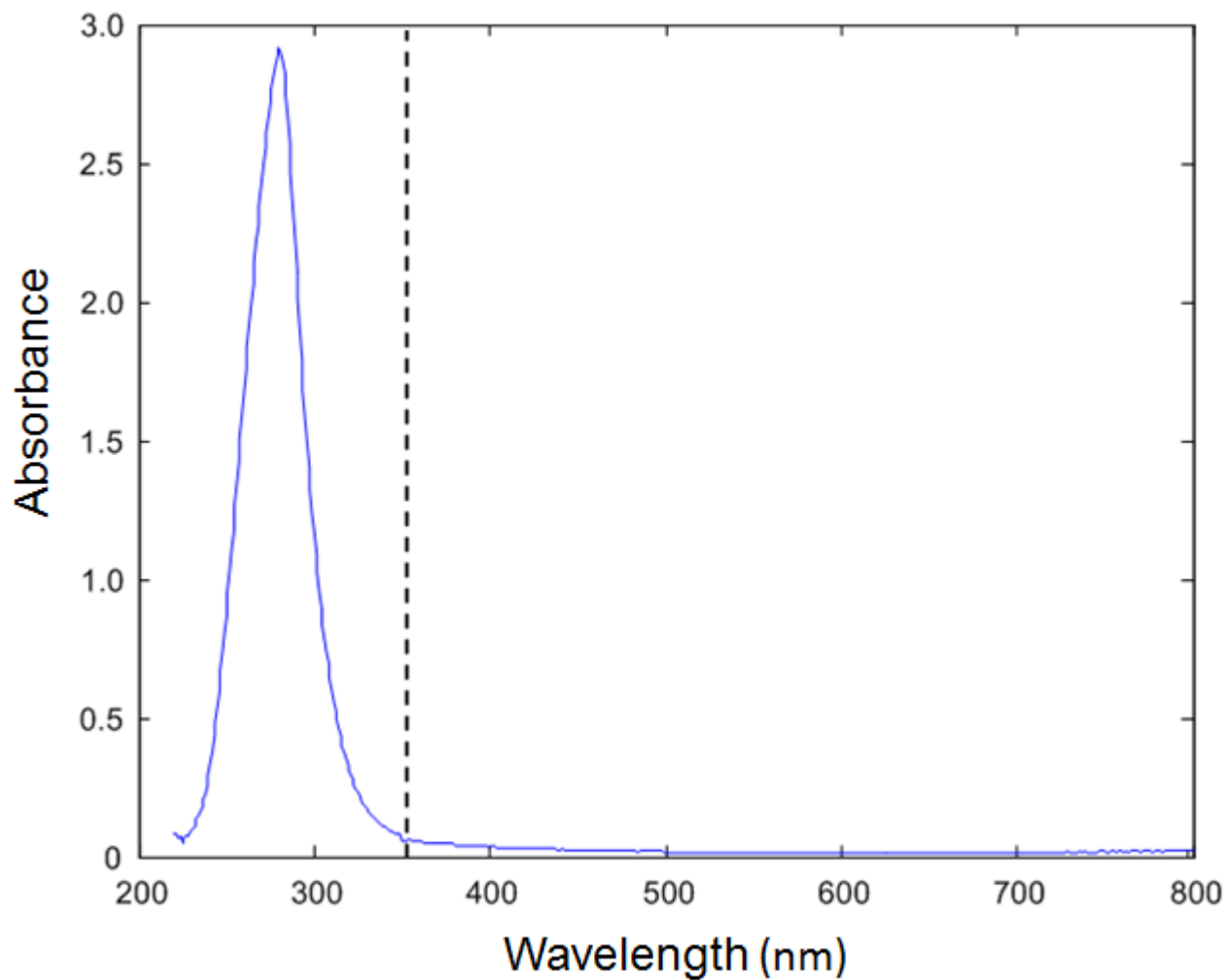
Supplementary figure S1. Scanned images of a horizontal mouse brain tissue section with 23 ± 2 nm coating layer of silver (A), and of a serial mouse brain section after H&E staining (B). The corpus callosum (i), the hippocampus region (ii), the midbrain region (iii) and the cerebellum (iv) are identified on both sections highlighting the silver layer efficacy to reveal major histological features.



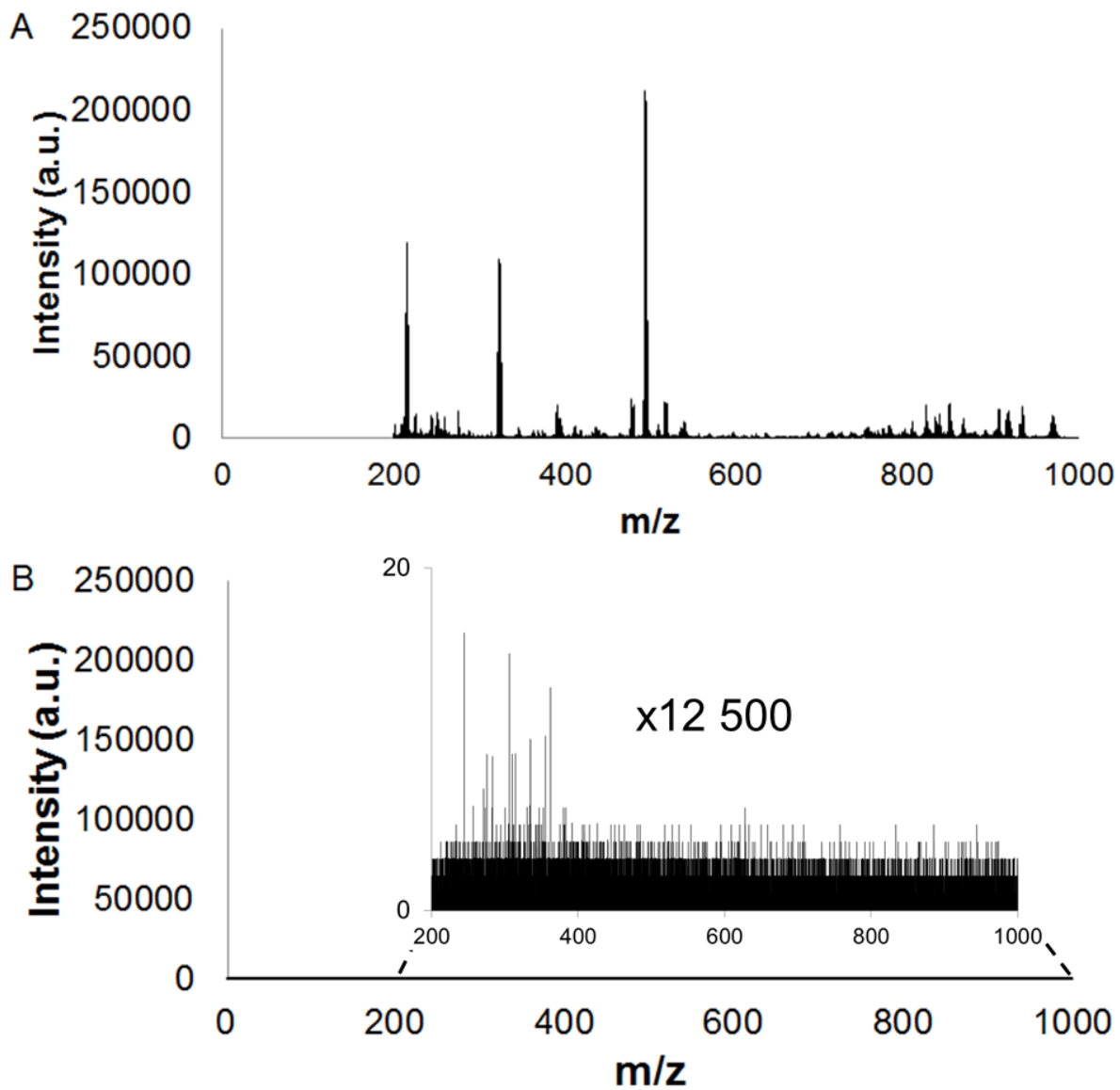
Supplementary figure S2. MS profiles acquired from mouse kidney (A), mouse liver (B), and rat testis (C) tissue sections with a silver coating thickness of 16 ± 2 nm. 5000 shots were accumulated throughout each tissue section to generate the mass spectrum. Laser fluency was adjusted for each tissue section to generate the best S/N ratio.



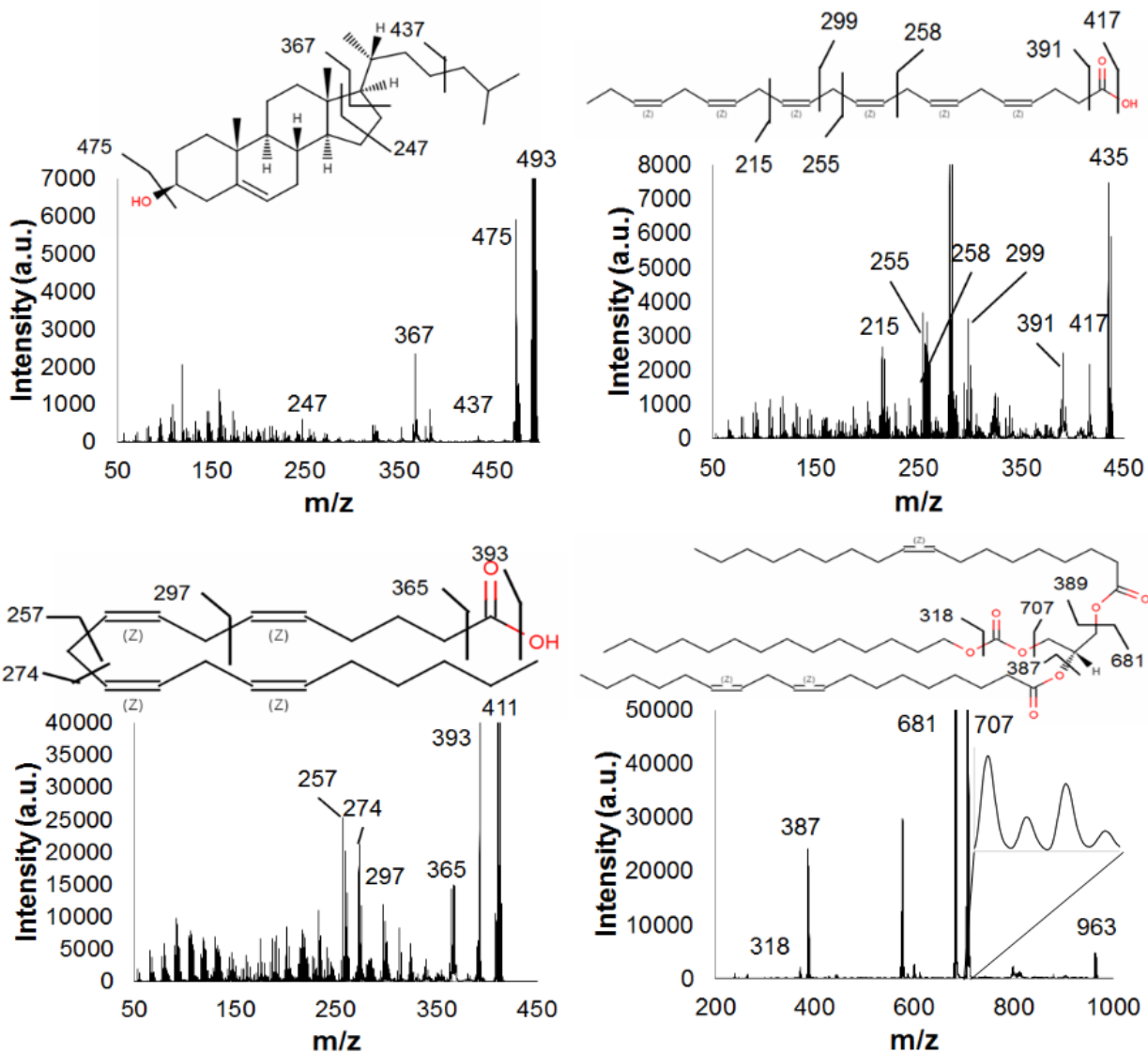
Supplementary figure S3. UV-vis absorption spectra of four different silver coating thicknesses deposited on a glass microscope slide. The average maximum of the absorption band is $\lambda=267$ nm and the dashed line represents the position of the laser irradiation at $\lambda=355$ nm.



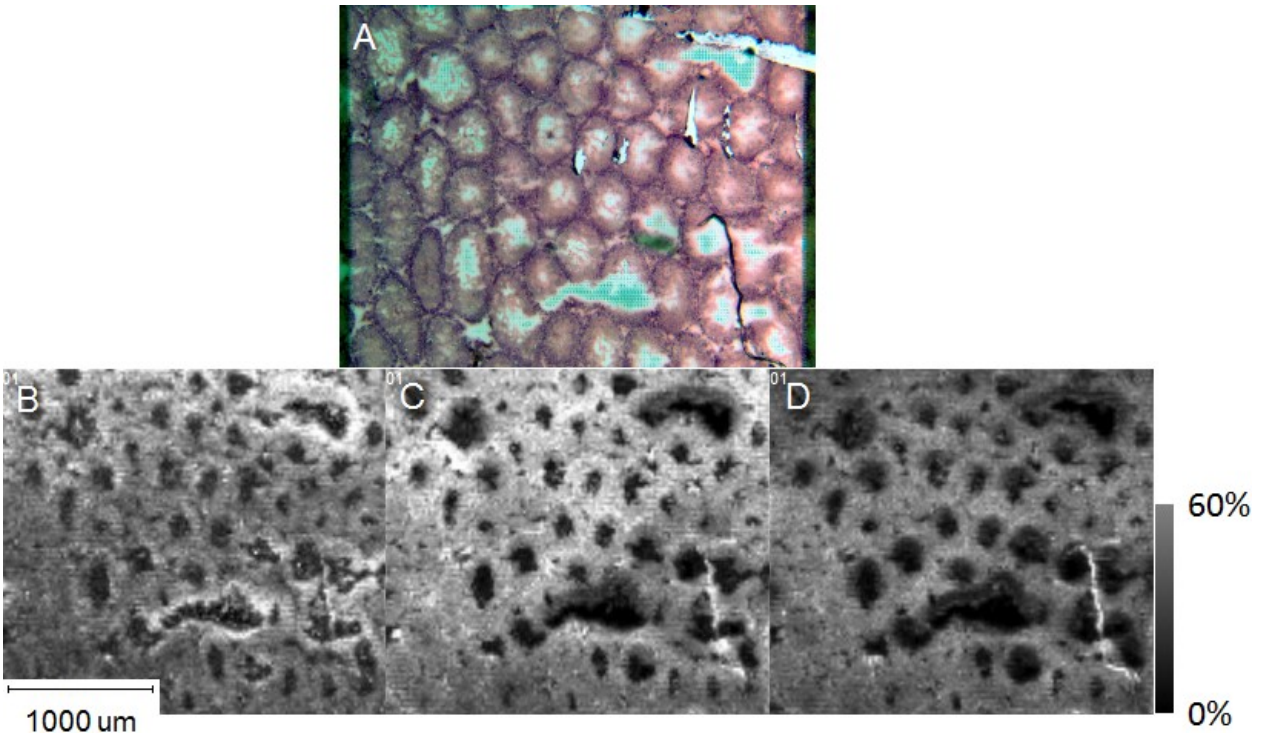
Supplementary figure S4. UV-vis absorption spectra of an ITO coated slide showing an absorption maxima at $\lambda=280$ nm. The dashed line represent the tripled Nd:YAG laser irradiation at $\lambda=355$ nm.



Supplementary figure S5. Mass spectra for typical signals found in the white matter (A) and signal obtained from firing the laser outside the tissue section (B) for a silver thickness of 23 ± 2 nm. Mass spectrum A has its lower mass cut-off by the system's Matrix Suppression feature too lower the noise level.



Supplementary figure S6. $[M+Ag]^+$ MS/MS spectra of cholesterol (A), docosahexaenoic acid (B), arachidonic acid (C), and triacylglyceride 52:3 (D) from methanolic standards in positive ionization mode after silver deposition. Fragmentation pathways are proposed for each molecule.



Supplementary figure S7. IMS of a transversal rat testis section after silver coating (16 ± 2 nm thick). H&E staining of the tissue section was performed after IMS measurements (A). The two darker zones on the side of the H&E are areas that were not analyzed and where the silver coating is still present. Ion images for palmitoleic acid (B), arachidonic acid (C), and cholesterol (D) were acquired at $20\ \mu\text{m}$ lateral resolution. The center of the seminiferous tubules can be seen as holes in the ion images indicating the absence of the three selected ion species.

m/z^i	Analyte	Molecular formula	Tissue (kidney/brain)
363/365	Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Both
387/389	Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Both
389/391	Oleic acid	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Both
411/413	Arachidonic Acid	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Both
435/437	Docosahexaenoic acid	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	Both
439/441	Docosatetraenoic acid	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	Both
461/463	Prostaglandin E1	C ₂₀ H ₃₄ O ₅	Both
493/495	Cholesterol	C ₂₇ H ₄₆ O	Both
840	PC (18:2/22:1)	C ₄₈ H ₉₀ NO ₈ P	Both
963/965	TAG(16:0/18:2/18:1)	C ₅₅ H ₁₀₀ O ₆	Kidney

ⁱ [M+¹⁰⁷Ag]⁺/[M+¹⁰⁹Ag]⁺ or [M+H]⁺

Supplementary Table S1: Molecular identifications proposed from on-tissue MS/MS and mass prediction tool. MS/MS were performed on mouse brain or/and kidney tissue sections in positive ionisation mode. PC and TAG correspond to phosphatidylcholine and triacylglyceride, respectively.

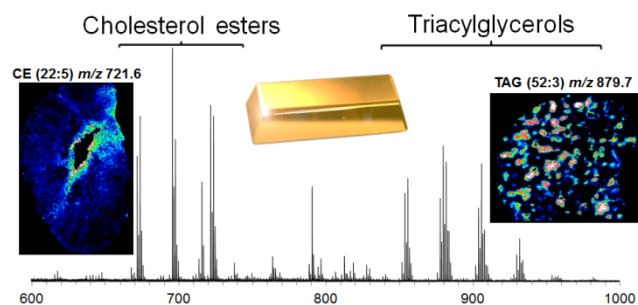
Chapitre 3: Sodium doped gold assisted laser desorption ionization for enhanced imaging mass spectrometry of triacylglycerols from thin tissue sections

Martin Dufresne¹, Jean-François Masson^{1,2} and Pierre Chaurand¹,

Analytical Chemistry **2016**, 88(11), 6018-6025.

¹Department of Chemistry, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

²Centre for Self-Assemble Chemical Structures (CSACS), McGill University, Montreal, Quebec, Canada



3.1 Abstract

The deposition of sodium salts followed by a sputtered layer of gold has been demonstrated to be a power combination for the analysis of triacylglycerols (TAGs) from tissue sections by laser desorption ionization (LDI) imaging mass spectrometry (IMS). Various sodium salts were tested for their capability to ionize TAGs and their ability to produce fast drying, small crystals ($\leq 3 \mu\text{m}$). The spray deposition of a sodium acetate and carbonate buffer mixture at pH 10.3 on which a $28 \pm 3 \text{ nm}$ sputtered layer of gold (Au-CBS) is subsequently deposited was found to provide the most effective combination for TAG analysis by high imaging resolution IMS. Under these conditions, a 30-fold increase in TAG signal intensity was observed when compared to matrix assisted LDI (MALDI) methods using 2,5-dihydrobenzoic acid as matrix. Furthermore, Au-CBS led to an increase in the number of detected TAG species from ~ 7 with DHB to more than 25 with the novel method, while few phospholipid signals were observed. These results were derived from the IMS investigation of fresh frozen mouse liver and rabbit adrenal gland tissue sections with a range of higher spatial resolutions between 35 and $10 \mu\text{m}$. Au-CBS-LDI MS presents a highly sensitive and specific alternative to MALDI MS for imaging of TAGs from tissue sections. This novel approach has the potential to provide new biological insights on the role of TAGs in both health and disease.

3.2 Introduction

Essential to all living organisms, lipids play key roles in cellular membranes, signaling and energy storage. Among lipids, triacylglycerols (TAGs) are a major component of mammalian nutrition and are implicated in the development of life-style associated diseases such as atherosclerosis, non-alcoholic fatty liver disease, and type II diabetes.^{68,69} For lipid

analysis, mass spectrometry (MS) has been an essential tool and the leading technology in the relatively new field of “lipidomics”, which aims to comprehensively analyze lipids in biological systems.⁷ Many different analytical approaches have been developed enabling both detection and quantitation of lipids, primarily driven by the advent of shotgun type methods with electrospray ionization or derivatization approaches using gas chromatography separation.^{7,162} However, these approaches are limited to the study of homogenized samples and consequently all information related to a given lipid’s anatomical distribution is lost. Imaging mass spectrometry (IMS) is rapidly becoming the prevalent technique for the direct analysis of a wide variety of biomolecules directly from thin tissue sections including lipids. It retains biomolecules’ spatial distribution and is untargeted, allowing the simultaneous detection of a numerous molecules.^{47,163,164}

To date, matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) has been the most popular IMS technique for the analysis of TAGs from thin tissue section. TAG analysis has been demonstrated with MALDI using either α -cyano-4-hydroxycinnamic acid or 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB).^{119,165} Further research has shown that the addition of sodium salts such as sodium chloride (NaCl) increases sensitivity for the analysis of TAGs when using DHB as a matrix.^{166,167} It was also observed that TAGs are prone to in-source fragmentation and that the addition of a strong alkaline such as sodium hydroxide (NaOH) reduces this phenomenon and thus increases signal.^{120,168} Despite the advances in TAG analysis overviewed above, especially with regards to additives, DHB preparations without additives remains the gold standard for TAG analysis by IMS.¹⁶⁹⁻¹⁷¹ IMS sample preparations may have yet to incorporate these additives because the concentration required could prevent proper

matrix crystallization when using automated matrix deposition methods. While matrix based methods have been the most widely used in the field, they are still plagued by ionic suppression stemming from phospholipids present in the sample.¹⁷² Recently, a manual matrix-free approach has been demonstrated by Son and al. for TAG analysis from tissue lipid extracts using citrate stabilized gold nanoparticles to specifically ionize TAGs, with a 100-fold increase when compared to standard DHB sample preparations.¹⁷³ The idea of using metal-based laser desorption-ionization (LDI) for biomolecule analysis dates back to the initial work of Tanaka where an ultra-fine cobalt powder was used to analyze proteins.¹⁸ Recent works from our group have demonstrated that the use of sputtered silver on tissue sections enables the specific ionization of olefin containing molecules as silver adducts.^{174,175} Others have also found that implanted silver nanoparticles enable IMS of TAGs as sodium adducts of rat heart sections.¹⁷⁶

On the basis of these previous findings on TAGs analysis by either MALDI or LDI approaches, we have developed a novel matrix-free sample preparation using sodium salt tissue doping to force and increase sodium adduct formation with the addition of a carbonate buffer to reduce in-source fragmentation of TAGs and the use of a sputtered gold layer over the tissue section to enhance the desorption process. Method optimisation was performed on an artificial tissue reconstructed with liver tissue homogenates as proposed by Groseclose and Castellino to minimise tissue variability and better control the optimisation process.¹⁷⁷ This novel sample preparation method enables the selective IMS of TAGs down to 10 μm lateral resolution with enhanced sensitivity as demonstrated directly from mouse liver and adrenal gland sections using LDI TOF mass spectrometry.

3.3 Materials and methods

3.3.1 Chemicals and Reagents

All sodium salts, all HPLC grade solvents, and eosin intensified solution were purchased from the Fisher Scientific Company (Ottawa, ON). 2,5-dihydrobenzoic acid (DHB), Oil RedO and hematoxylin were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON). The triglyceride standard 1-Palmitoyl-2-oleoyl-3-linoleoyl-rac-glycerol (POL) was purchased from Cayman chemical Co. (Ann Arbor, MI). The gold sputter target was purchased from ESPI Metals (Ashland, OR).

3.3.2 Tissue sampling and sectioning

Twelve weeks old mice were euthanized by CO₂ asphyxiation. Necropsy was carried out immediately after sacrifice to minimize molecular degradation of the tissues. Organs were placed in aluminum foil and deposited on dry ice to prevent shattering and conserve tissue integrity. Rabbit adrenal glands (AD) were purchased from Pel-Freeze Biologicals (Rogers, AR). All animal studies were approved by the local Ethical Committee of the University of Montreal. Tissue homogenate blocks were produced by following the procedure of Groseclose and Castellino.¹⁷⁷ 14 µm-thick tissue sections were cut at -15°C using a Leica CM3050 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and thaw mounted on indium-tin-oxide (ITO) microscope slides for LDI-TOF MS (Delta Technologies, Loveland, CO). Tissue sections were then dried in a desiccator for 20 minutes prior to salt and gold deposition. Serial sections were also collected for either H&E and/or Oil RedO (ORO) standard staining using established protocols (Sup. Table 1).

3.3.3 Salt deposition

All salts depositions were carried out using a TM-Sprayer 1st generation instrument (HTX Technologies, Chapel Hill, NC). The optimal layer of salt was found to be 675 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ of carbonate buffer pH 10.3 (CB) at 85 mM and sodium acetate (NaAc) at 250 mM in a 1:1 ratio (CBS). The specific method parameters of the instrument can be found in the Sup. Figure 1. Salt density was evaluated by weighting a 25mm x 25mm (n=3 for weight accuracy) glass slide containing the tissue section before and after salt solution spray deposition with the same instrumental parameters. The weight difference was then divided by the area of the glass slide. This experiment was performed in triplicate.

3.3.4 Metal sputtering and layer characterization

Gold layers were deposited on the tissue sections using a Cressington 308R sputter coater from Ted Pella inc. (Redding, CA) at an argon partial pressure of 0.02 mbar and a current of 40 mA. The depositions were time-controlled and layer thicknesses were evaluated by atomic force microscopy (AFM) in contact mode using a Witec Alpha SNOM (Ulm, Germany). Optimized deposition time was of 40 s corresponding to a layer thickness of 28 ± 3 nm of gold. Absorption spectrums were obtained using a Cary 100 Bio UV/Vis spectrophotometer from Varian Canada Inc. (Montreal, QC). The morphology of the resulting gold layers were further characterised by scanning electron microscopy (SEM) using a JSM-7400F system (Jeol, Peabody, MA).

3.3.5 Matrix deposition

DHB matrix deposition on tissue sections was performed with an ImagePrep system (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Initial DHB solution was prepared at 30 mg/ml in a 7:3 -

MeOH:H₂O solvent mixture. Optimized ImagePrep spray conditions are given in Sup. Table 1 and resulted in a homogeneous matrix layer (DHB density of 1.1±0.1 mg/cm²) which gave reproducible TAG signals with maximum signal-to-noise ratio. DHB matrix density was evaluated in the same manner as the salt layer.

3.3.6 LDI mass spectrometry

Profiling and IMS of the tissue sections were performed on a MALDI TOF/TOF Ultraflextreme mass spectrometer equipped with a SmartBeam II Nd:YAG/355 nm laser operating at 1000 Hz, which provides a laser focus down to 15 µm in diameter for the “minimum” focus setting (Bruker Daltonics, Billerica, MA). MS and IMS data acquisition were performed using the reflectron geometry with flexControl 3.4 and flexImaging 4.0, respectively (Bruker Daltonics, Billerica, MA). For LDI analysis, laser fluency was set in the range of a few microjoules on target similar to conventional MALDI analysis. Acceleration voltage was set to 25 kV and all other instrumental parameters (delayed extraction parameters, source voltages, detector gain, laser energy, etc.) were optimized for maximum signal to noise ratio. Profiling data were acquired by summing 10 times 250 shots (2500 summed) with a random walk of 1000 µm in diameter in a mass range of 300-1100 Da. A mass accuracy better than 10 ppm was achieved using the gold clusters present in all spectra to perform internal mass calibration. IMS data were acquired using 250 shots per pixels with spatial resolution ranging from 20-100 µm under the same instrumental conditions. All images are presented without data normalization. Lipid identification was performed by comparing accurate mass measurement with the LIPID MAPS prediction tool (<http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>) and confirmation was obtained by tandem MS measurements using the Ultraflextreme LIFT-TOF/TOF mode. Data acquisition for DHB

versus CBS-Au method comparison experiments consisted of imaging a 5 by 5 pixel array space by 100 μm on 3 tissue sections coated with DHB and 3 tissue sections coated with salts and gold.

3.3.7 Data analysis

Data analysis was performed with flexAnalysis 3.4 and flexImaging 4.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Reported signal to noise ratio (S/N) were calculated using flexAnalysis. For the DHB/MALDI versus CBS-Au-LDI TAG intensity comparisons, the intensity from the three main detectable TAG ions (m/z 853.7, 881.7, and 907.8) were summed within a given sample. The obtained TAG sum signal intensity (SSI) was then averaged throughout the replicates to obtain an average TAG SSI for a given experimental condition. This final average TAG SSI is then compared across all the different sample preparations for method optimization. Statistical significance of the displayed average was verified using Student t-test's.

3.4 Results and Discussion

3.4.1 On tissue optimization/characterization

As with conventional MALDI matrices, our goal was to initially find suitable UV absorbing compounds that assist in the desorption of biomolecules such as TAGs. However, in this case where desorption and ionization are split between the gold layer and the CBS buffer, respectively, it is especially important that the desorption agent does not interact with the ionization agent as the adducts formed may cause ionic suppression of the targeted analyte(s). For this purpose, we selected sputtered gold as it presents an absorption band in the UV region of the tripled Nd:YAG laser (355 nm) installed on our MS system (Sup. Fig. 2). Further, gold

is relatively chemically inert thus making it an ideal choice for a desorption agent that will not interfere with the ionization process. Previous work has clearly shown that the addition of a sputtered gold layer over the matrix can enhance MALDI MS signals for certain compounds without observable gold adduct formation.^{178,179} We therefore initially optimized the amount of gold necessary to generate proper desorption without the addition of a MALDI matrix or salt. Salt addition without gold was not found to yield signal under LDI conditions. Figure 3.1a shows the SSI of the dominant m/z from the three most abundant TAG signal clusters as a function of the gold layer thickness. Maximum yield was achieved with a gold layer thickness of 28 ± 3 nm. The optimal thickness did not produce a homogenous layer of gold on the nanometer scale but rather covers the surface with “nanoislands” of gold (Sup. Fig. 3).¹¹¹ However, the gold layer is homogenous enough for imaging applications down to at least 10 microns. Two major tendencies can be seen on Figure 3.1a; the gradual increase of TAG signal with the increase in gold layer thickness up to 28 ± 3 nm, and a decrease in signal thereafter. The initial SSI increase can be explained by an increase in UV absorption stemming from the gold surface while the decrease can be attributed to steric effects from too thick of a gold layer preventing the proper desorption of the underlying analytes. While these two effects need to be taken into account, Figure 3.1a shows that even though there is an apex at 28 ± 3 nm we can reliably work between 20 to 60 nm of gold without major losses in TAG signal.

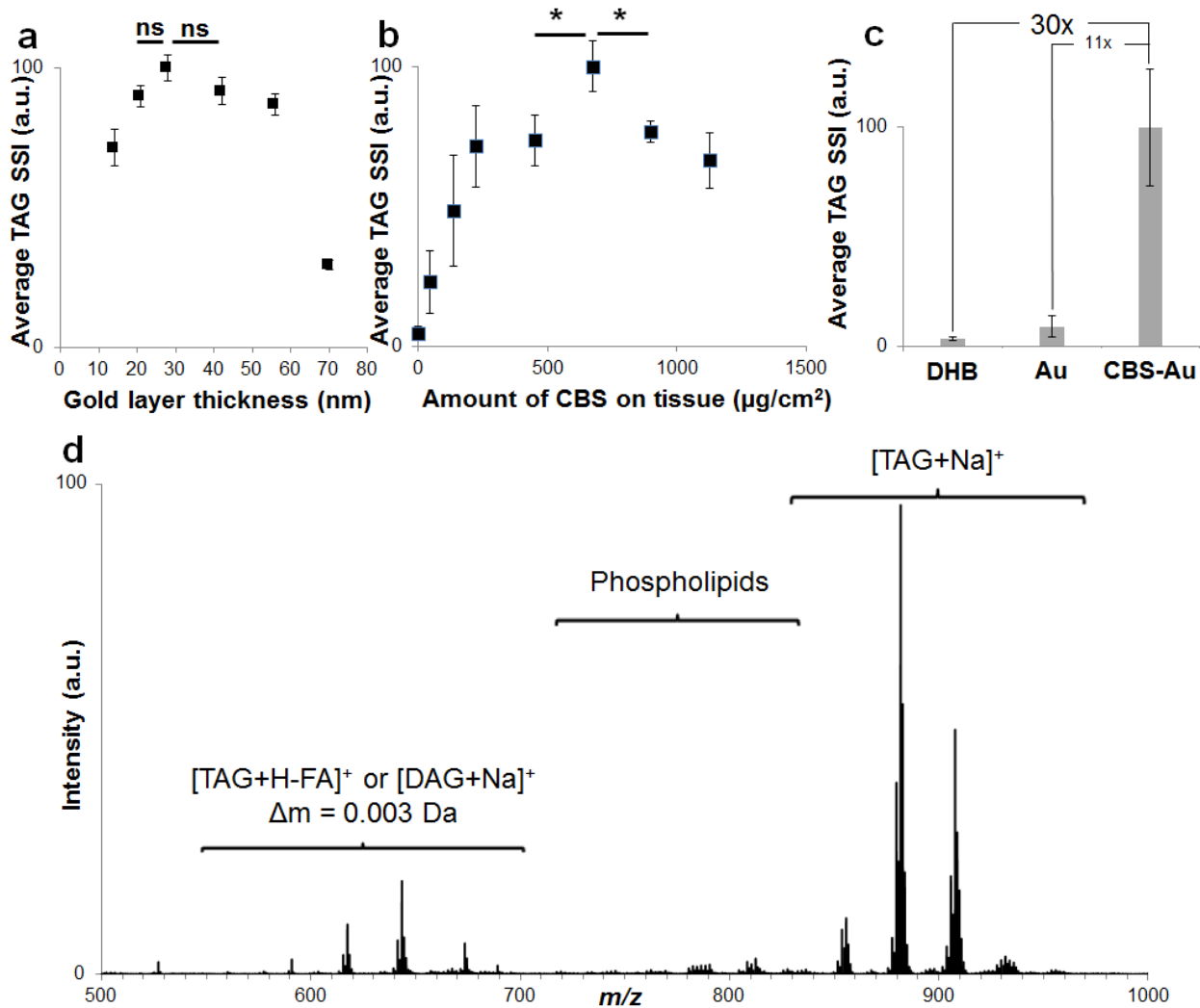


Figure 3.1 : On-tissue CBS-Au-LDI MS optimisation. (a) On-tissue sputtered gold layer thickness optimization. (b) On-tissue CBS optimization. (c) SSI of TAG (50:2) at m/z 853.7, TAG (52:3) at m/z 879.7, and TAG (54:3) at m/z 907.8 for DHB, Au, and CBS-Au methods where the latter one gave a 30-fold increase in signal with 10% lower total on-tissue laser fluency when compared to DHB and an 11-fold increase with similar laser fluency when compared to Au without CBS. Error bars represent the standard deviation of triplicate measurements. (d) Typical CBS-Au-LDI MS spectrum acquired from a mouse liver tissue section. ns = not significant, * = p value ≤ 0.05

With this in mind, the next parameter to optimise is the TAG ionization yield. Several lithium, sodium and potassium salts were initially tested. Sodium proved to be by far the most useful ionizing agent (Sup. Fig. 4). Several ionic and organic sodium salts were then tested from which it was concluded that sodium tetrafluoroborate (NaBF_4), sodium trifluoromethanesulfonate (NaOTf), NaAc and CB were all ideal candidates. Our choice between these salts came down to their solubility in the deposition spray solvent and drying efficiency. NaBF_4 was by far the best salt in terms of solubility (13:7 - water:ACN solvent system) and was also notable for its very short drying time (<6 s). However, NaBF_4 was observed to delocalize TAGs by a couple of millimetres on fatty tissue sections (Sup. Fig. 5). Interestingly, this behavior was also observed when using purely aqueous solutions. As TAGs are insoluble in water they should not delocalize in an aqueous solution, therefore it is highly likely the salt was responsible. Sup. Fig. 5 also shows the behavior of the TAG using another salt NaOTf , which did not induce delocalization as an aqueous solution. Although NaBF_4 was not considered for IMS purposes, its usefulness for non-IMS profiling application remains interesting. NaOTf was also discarded from the list of possible salt candidate due to its very high hygroscopicity, necessitating a drying time of 10-15 min within a vacuum desiccator between each of the 15 spray passes. We also tested CB for its buffering capacity with the aim of minimizing TAG in-source fragmentation. Indeed, CB protects against TAG protonation and subsequent in-source fragmentation (Sup. Fig. 6).¹²⁰ NaAc was also tested and displayed acceptable properties with high solubility and short drying time (<18 s). The optimal sodium salt solution was found to be a 1:1 - $\text{CB}:\text{NaAc}$ mixture (CBS). This solution achieved the optimal sodium density, had a short drying time, produced small salt crystals (≤ 3 μm) as seen on Sup. Fig. 7, and did not produce TAG delocalization down to the 10 μm scale. Figure 3.1b

shows the evolution of the SSI of the dominant m/z signals from the three most abundant TAG signal clusters under different on-tissue CBS concentrations. The initially observed increases of SSI can be attributed to the increase of available ionizing agent (Na^+) allowing more TAG molecules to be ionized per desorption event. The maximum amount of signal is obtained after the addition of $675 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of CBS to the sections ($n=3$). This maximum is then followed by a steady decrease in signal with increasing amounts of salt. This can be tentatively attributed to desorption suppression effects due to thicker salt layers forming over the tissue section. The observed TAG signal maximum can thus be viewed as the equilibrium between increased ionization efficiency from added Na^+ ions and suppression of desorption by the progressively thicker crystalline salt layer over the section.

Figure 3.1c shows that for optimized CBS and gold amounts, a 30-fold increase ($n=3$) in signal intensity for the SSI of TAG (50:2) at m/z 853.7, TAG (52:3) at m/z 879.7, and TAG (54:3) at m/z 907.8 was observed when compared to DHB deposited by ImagePrep on homogenised mouse liver tissue sections. These signals were chosen because they are consistently detected with both methods with the highest intensities. When considering all TAG signals detected in DHB-MALDI (7 signals) and CBS-Au (25 signals) (see Sup. Table 3 and Sup. Fig. 8), some of which are detected with very low intensity, a similar 30-fold increase was found. For this experiment, all instrumental parameters were kept identical except for the laser fluency which was adjusted in each case to obtain maximum signal-to-noise ratios. An increase of 10% in laser fluency was used for DHB matrix with respect to CBS-Au. With this in mind, not only does the presented method surpass optimized MALDI methods for all detected TAGs but it does so with lower laser fluency. This can be tentatively explained by the use of a much higher on-tissue salt density enabling increased TAG

ionization efficiency compared to use of MALDI matrices, which have limitations in terms of salt doping as increased salt concentrations affect proper matrix crystallization and thus desorption and ionization yields.¹⁸⁰ The use of gold as the desorption agent also increases TAG ion yields in comparison to DHB and other MALDI matrices due to its non-competition in sodium adduction (i.e. there is significant [MALDI matrix+Na]⁺ cluster formation and no [Au+Na]⁺ formation).

3.4.2 On-tissue signal identification

Figure 3.1d shows a typical CBS-Au-LDI profile spectrum from mouse liver which displays two distinct mass regions where signal is observed (Sup. Fig. 6). The first region (m/z 400-700) contains primarily diglycerides (DAG) and/or in-source fragments of TAGs. Indeed, TAG in-source fragment ion signals overlap with the DAGs and can only be distinguished by high mass resolving power instruments ($\Delta m/z = 0.003$). This observation coupled with the fact that DAGs and TAGs have numerous possible unsaturations for a given fatty acid (FA) chain length makes signal identification for this region very difficult without a high spectral resolution instrument. A second signal intense spectral region ($m/z \sim 850-950$) is dominated by TAGs. In this mass range, our TOF/TOF MS system cannot provide a 1 amu mass window for MS/MS precursor ion selection. Depending on the TAG ion intensity, precursor ion selection widths were set between 2-4 amu. Lower values were used for high TAG signal intensities. Therefore, all on-tissue identification of TAGs are to a certain degree contaminated by their surrounding neighbors. This makes MS/MS data quite challenging to interpret as more than one TAG species are filtered through the mass selection window simultaneously. Thus all proposed TAG identifications are given in the form of number of carbons on the FA chains with the number of unsaturation, as this is the only reliable information recovered.

Nonetheless, we were able to confirm the presence of numerous TAGs due to their specific fragmentation pattern and the use of TAG standards.^{181,182} Figure 3.2 shows the identification of TAG (52:2) by MS/MS where the FA composition is assigned by the neutral loss (NL) occurring between the ester function and the glycerol backbone and the acylium ions formation from the FA side chains. When the NL occurs with one of the glycerol backbone hydrogens, it can lead to DAG-like fragment ions retaining the sodium cation more efficiently generating a much more intense signal than its corresponding FA fragment (Figure 3.2 and Sup. Fig. 9ab). A second pathway can be observed where the NL of the FA occurs with the sodium cation, which in this case gives a DAG-like fragment ion 22 Da lower in MW (Figure 3.2 and Sup. Fig. 9c). The third observable pathway is a simple cleavage of the TAG ester functions, which generate acylium (R_nCO^+) fragment ions (Figure 3.2 and Sup. Fig. 9d). The combination of these three fragmentation pathways gives up to 4 reporting ions for a given FA chain and provides a more robust identification of the TAG species investigated. We also correlated on-tissue TAG MS/MS fragmentation patterns with MS/MS data from a TAG methanolic standard to confirm the 3 fragmentation pathways observed (Sup. Fig. 10). While the precise FA composition is slightly different between the on-tissue TAGs and the standards, we can observe that both TAGs fragment by the same pathways and present no low-mass polar head-group signals typical of phospholipids detected in tissue sections over the same mass range. MS/MS measurements therefore confirm that the signals observed by Au-CBS-LDI MS are indeed TAGs of various chain length and degrees of unsaturations.

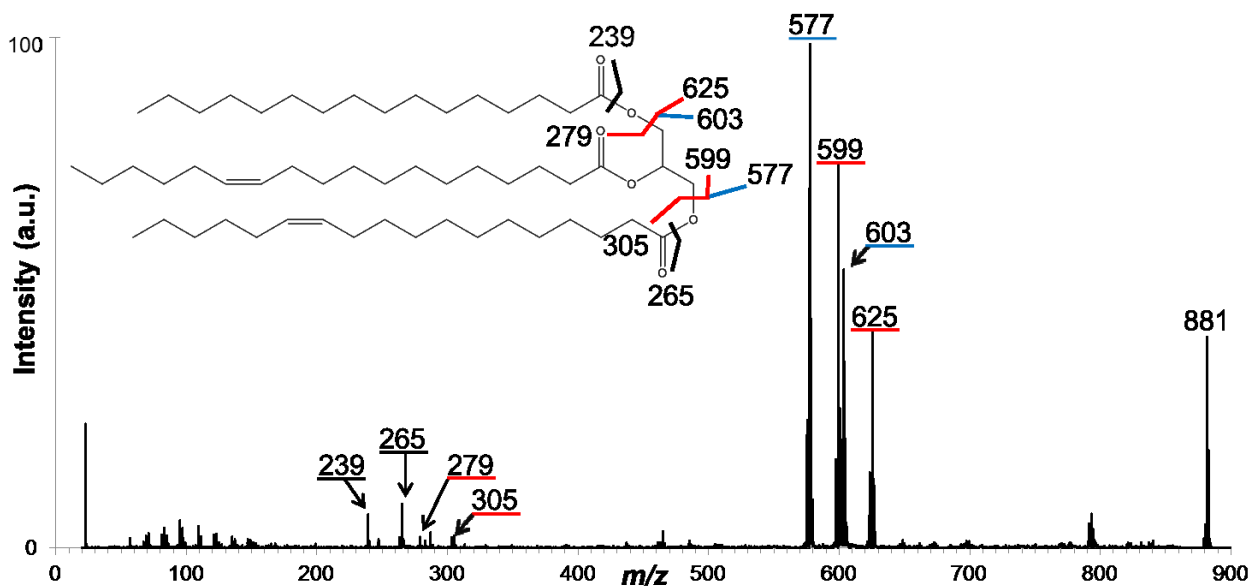


Figure 3.2 : On-tissue CBS-Au-LDI MS/MS spectrum of TAG (52:2) at m/z 881.7 with its most probable structure based on the most abundant fragment ions. Fragment ions issued from the first fragmentation pathway are underlined in red (see Sup. Fig. 9ab). Fragment ions underlined in blue come from the second fragmentation pathway (see Sup. Fig. 9c). Acylium fragment ions are underlined in black (see Sup. Fig. 9d). The exact location of the double bounds within the fatty acid side chains cannot be attributed with this method.

3.4.3 Mouse liver CBS-Au-LDI IMS at high spatial resolution

Previous MALDI analyses of whole-body sections have demonstrated that TAGs are more abundant in the liver and brown adipose tissues using a mouse embryo model.¹⁶⁹ This is expected considering that the liver and adipose tissues are the primary storage sites for TAGs within the body.^{183,184} Figure 3.3 and Sup. Fig. 11 show numerous TAG ion images acquired by CBS-Au-LDI IMS from a 9 month old mouse liver section at 25 and 10 μm of lateral resolution. The ion image for the TAG (52:3) signal at m/z 879.74 is representative of all TAG MS images typically found in mature livers. The overlap of this signal (or that of any other

TAG ion) with ORO staining is in good agreement with the neutral lipid histological staining and the distribution of this TAG within the liver section. These measurements show that there is no measurable TAG delocalization within the liver section at the lowest spatial resolution used ($\geq 10 \mu\text{m}$). Unlike other types of molecules, TAGs tend to colocalize in the liver where fat deposits are primarily detected. These fat deposits store various types of TAGs for later use by the liver or to be transported to other organs by lipoproteins. Due to its high sensitivity, CBS-Au-LDI MS is also capable of detecting lower concentrations of TAGs between the lipid islands (Figure 3.3) with acceptable signal-to-noise ratios (Sup. Fig. 12). Signals corresponding to phospholipids were also detected co-localized with the TAG signals. For example, the PC found at m/z 788.5 shows the distribution of these phospholipids within the liver section. While phospholipids are not the primary targets of the method at hand, when abundant it is possible to detect these albeit with less performance than conventional MALDI approaches for phospholipids IMS.¹⁵³

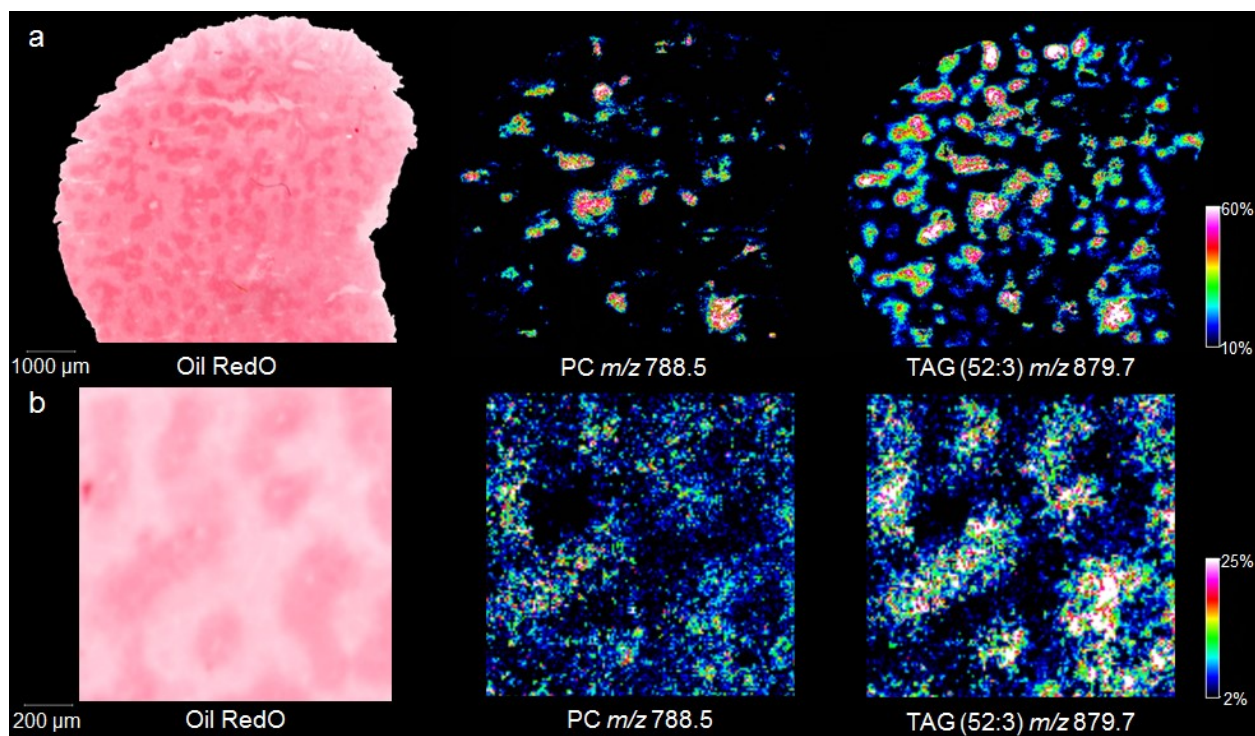


Figure 3.3 : CBS-Au-LDI IMS of a mouse liver section acquired with lateral resolutions of (a) 25 μm and (b) 10 μm . The distribution of TAG (52:3) at m/z 879.7 is mainly associated with lipid islands (darker red Oil RedO areas). This distribution is highly similar for most of the TAGs detected from the section (Sup.Fig. 10). The signal observed at m/z 788.5 corresponding to a sodiated PC displays the same distribution as the TAGs but with much lower absolute signal intensity.

3.4.4 Rabbit adrenal gland CBS-Au-LDI IMS

The adrenal gland (AD) is the site of the biosynthesis of many biologically active molecules such as adrenaline and some steroid hormones.^{185,186} Recent work by MALDI IMS has revealed a wealth of lipids present in the pig AD including triacylglycerols.¹⁸⁷ As such, Figure 3.4 shows CBS-Au-LDI-MS ion images for intact cholesterol, a typical TAG and previously undetected cholesterol esters (CE) from a rabbit AD section acquired at a lateral

resolution of 25 μm . Additional ion images can be found in Sup. Fig. 13. The CEs signals were confirmed by exact mass database search along with on-tissue MS/MS. Examples are shown in Sup. Fig. 14. The ion image for cholesterol as a sodium adduct gives a defining image for the AD medulla histology. CEs ion images in Figure 3.4 have highly similar distributions within the cortex region of the AD showing higher abundances within the reticularis zona near the medulla for all detected CEs except for CE (20:4) and CE (22:4) at m/z 695.6 and 723.6 respectively, which both display an extra region of high intensity within the glomerulosa zona near the edges of the AD when compared to the H&E of the next serial section. These were mostly likely not previously detected due to ion suppression effects from phospholipid ionization.¹⁸⁷ A similar effect is seen in our dataset but here ion suppression effects come from the TAGs present in visceral fat surrounding the AD and detected at the border of the AD tissue section. The red arrows in the ion images of CE (18:2) and TAG (52:3) in Figure 3.4 highlight one of these visceral fat bundles. Identical ion suppression effects can be seen throughout the CEs' ion images for every visceral fat bundle presenting intense TAG signals. It is important to note that the TAGs found at the border of the AD tissue section do not belong to a specific histology but are most likely delocalized during the thaw-mounting procedure from the visceral fat surrounding the AD. Most of the fat layers were carefully shaved off with a razor blade after post necropsy freezing but not all can be removed without damaging the frozen tissue hence residual TAG were detected in some tissues. Similar suppression effects were also observed in mouse kidney CBS-Au-LDI IMS experiments where delocalized visceral fat also suppressed some signals near the border of the kidney (Sup. Fig. 15).

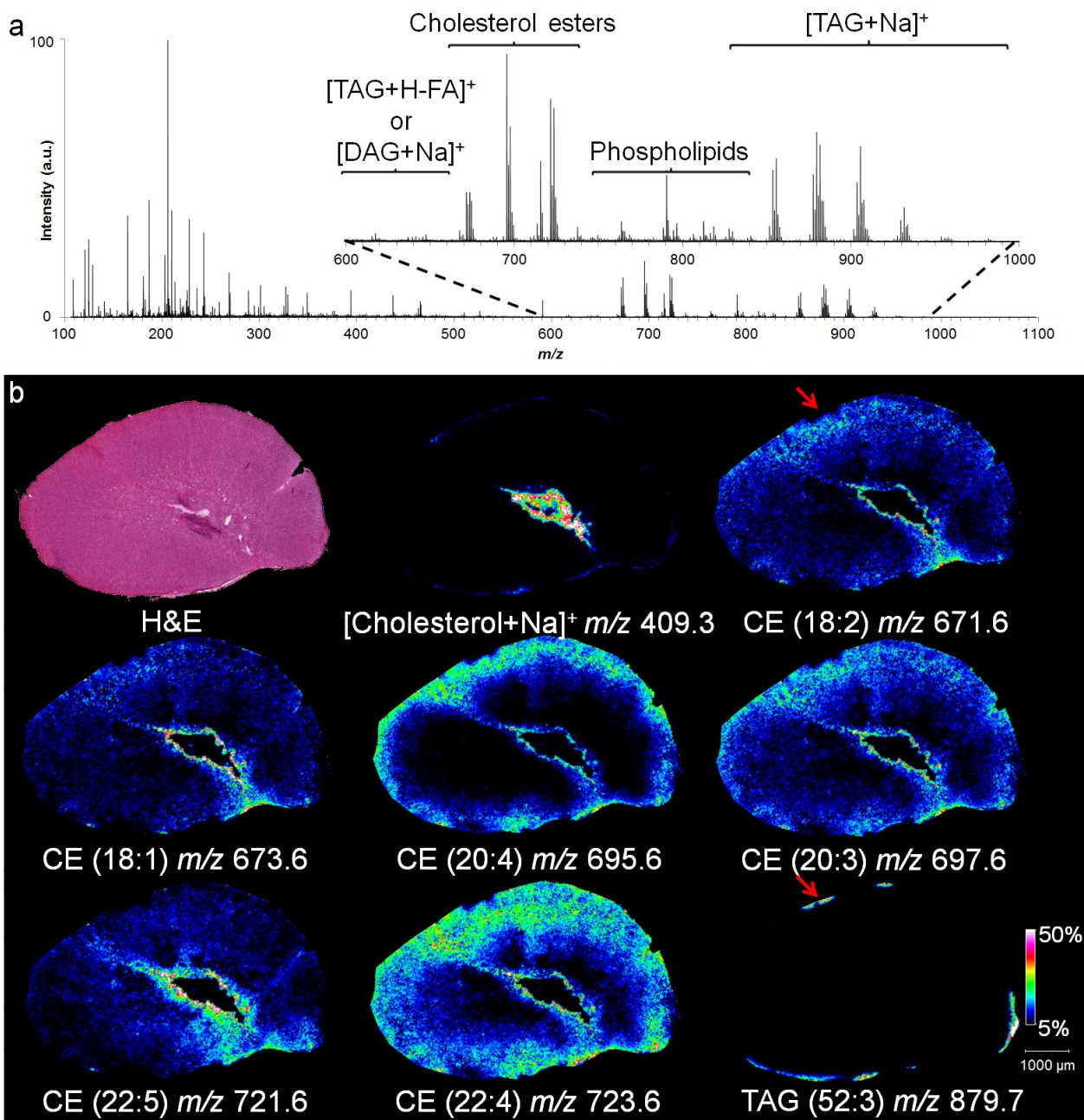


Figure 3.4 : CBS-Au-LDI MS and IMS data from a rabbit AD tissue section. (a) MS spectrum and (b) IMS with a lateral resolution of 25 μ m, acquired from a rabbit AD tissue section. Based on exact mass and on-tissue MS/MS (Sup. Fig. 14), intact cholesterol as a sodium adduct (m/z 409.3) along with several different CE (m/z 671.5, 673.5, 695.5, 697.5, 721.5, and 723.5) and TAGs (m/z 879.7) were found to be the dominant signals within the

adrenal gland. H&E of the next serial section is provided in the top left corner. The red arrow highlights one of the ion suppression sites of CEs by TAGs.

3.5 Conclusion

Highly specific and sensitive sample preparations for IMS are still needed to image the vast number and varied classes of metabolites present in biological systems. The road forward in this branch of IMS research is not likely to be a “one size fits all” approach but more likely to be one of sample preparations tailored to specific analytes. In this aim, our work presents a highly specific and sensitive LDI mass spectrometric approach for TAG imaging from thin tissue sections with cellular scale spatial resolution potential and a signal increase of ~30-fold compared to conventional MALDI methods. This was achieved by first depositing a carbonate buffer and sodium acetate solution on the tissue section, providing the necessary sodium cations to privilege the formation of $[\text{TAG}+\text{Na}]^+$ molecular ions, and then covering the salt layer with a nanometer scale gold layer for the necessary UV absorption required for TAG desorption. This combination increases specificity at the price of fewer MS signals compared to conventional MALDI methods but with a considerable increase in specificity and sensitivity for the detection of TAG molecules as well as increase in the total number detected. Analysis performed on tissue samples with a low abundance of TAGs also revealed the method’s ability to detect CEs normally suppressed in the presence of TAGs. The potential to monitor the distribution, relative abundance and composition of TAG molecules at cellular length scales opens new analytical possibilities for the study of numerous biological systems where TAGs are thought to be implicated. Sodium-doped gold-assisted LDI IMS is thus expected to provide

new meaningful biological insights and further extend our understanding of numerous metabolic disorders and diseases.

3.6 Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Nathan Heath Patterson for his assistance with the editing of the manuscript, Hugo-Pierre Poirier Richard for his assistance with SEM image acquisition and Jean-François Myre, Louis Beaumont, Yves Teasdale and Martin Lambert (Dept. of Chemistry, Université de Montréal) for their help with the maintenance and repairs on the TM-Sprayer. The authors also acknowledge funding from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the Canadian Foundation for Innovation (CFI).

3.7 Supplemental Informations

Supplementary Table 1: H&E and ORO staining protocols.

H&E staining protocol		Oil RedO staining protocol	
Steps (immersion)	Time	Steps (immersion)	Time
90% EtOH	30s	10% Formaldehyde	7.5 min
70% EtOH	30s	Dry	30 min
Water	30s	Water wash	30 sec
Hematoxylin	2.5 min	Dry	30 min
Water	20s	ORO 60 °C	5 min
70% EtOH	30s	85% glycerol	2 min
90% EtOH	30s	Water wash	30 sec
Eosin	2 min	Water wash	30 sec
90% EtOH	30s	Dry	fully dry
100% EtOH	30s		
Xylene	2 min		

Hematoxylin stock solution was prepared by dissolving 4 g of hematoxylin along with 6 g of potassium alum and 0.6 g of sodium iodate in 200 mL of 95% EtOH. Once complete dissolution was achieved, 200 mL of glycerol was added along with 20 mL of glacial acetic acid. The final solution was filter through a Whatman paper #1. Eosin was used as purchased.

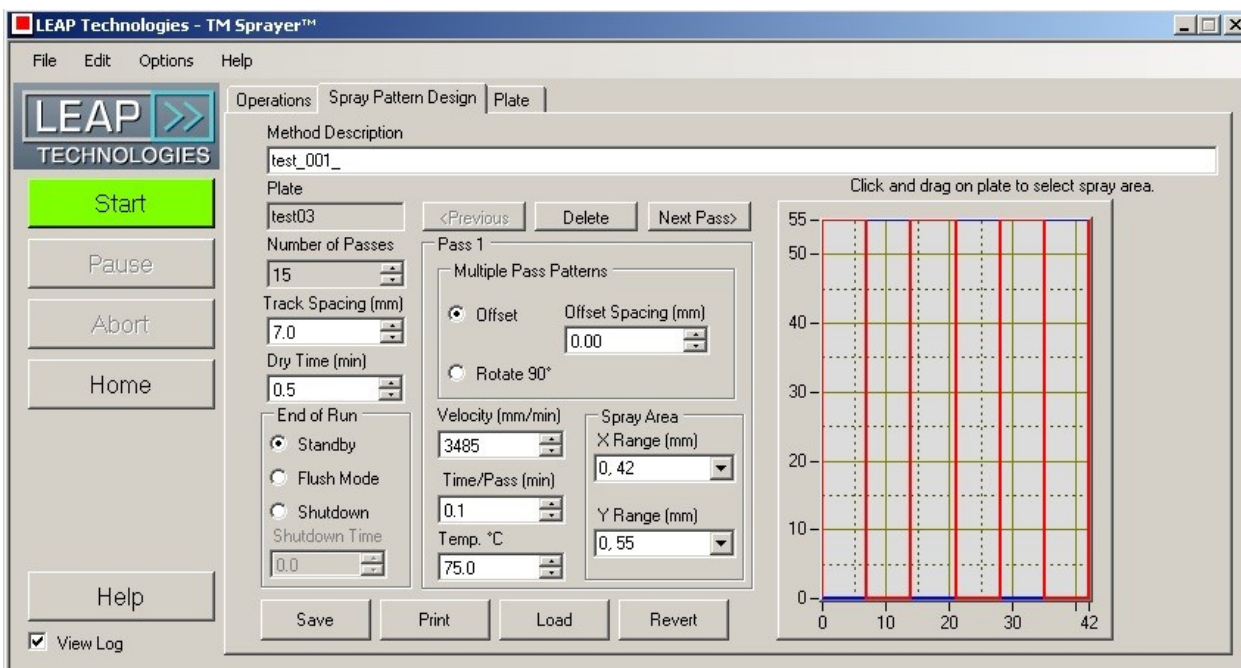
ORO stock solution was produced by dissolving 0.7 g of Oil RedO in 100 mL of hot glycerol (100°C) for a few minutes. The solution was left still until it reached room temperature after which it was filtered with a Whatman paper #1 to remove any leftover solid suspension.

Supplementary Table 2: ImagePrep parameters for the homogeneous deposition of DHB on tissue sections. This method routinely achieves a matrix density of 1.1 ± 0.1 mg/cm².

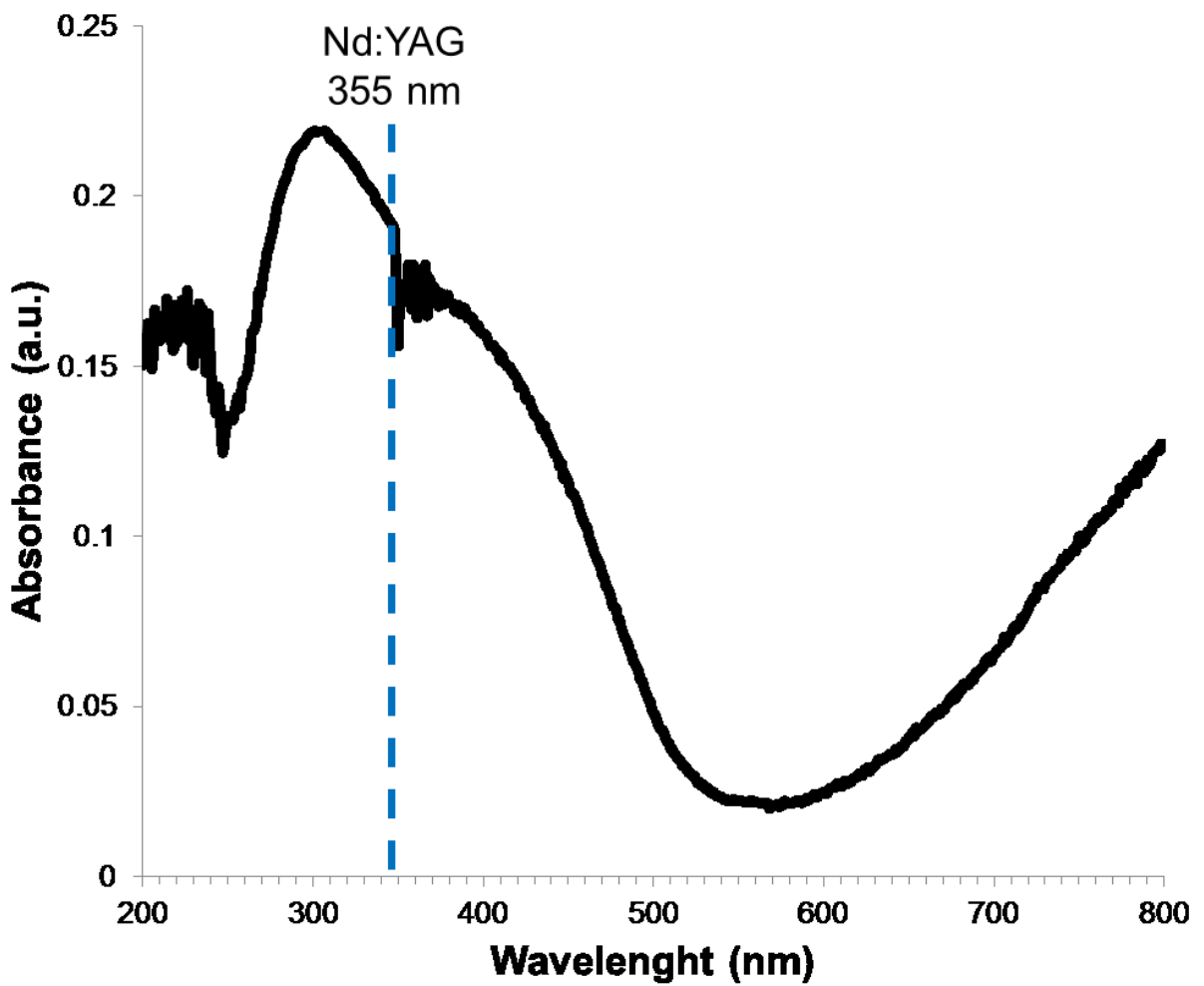
Step	Nb cycles	Spray power (%)	Spray time (s)	Incubation time (s)	Dying time (s)
1	15	15	0.75	20	75
2	1	0	0.10	0	30
3	12	15	0.75	10	25
4	18	10	1.00	0	40
5	18	10	1.00	0	45
6	1	0	0.10	0	30
7	30	10	1.50	0	75

Supplementary Table 3: Compound identification from the mouse liver (liver) and rabbit adrenal gland (AD) tissue sections.

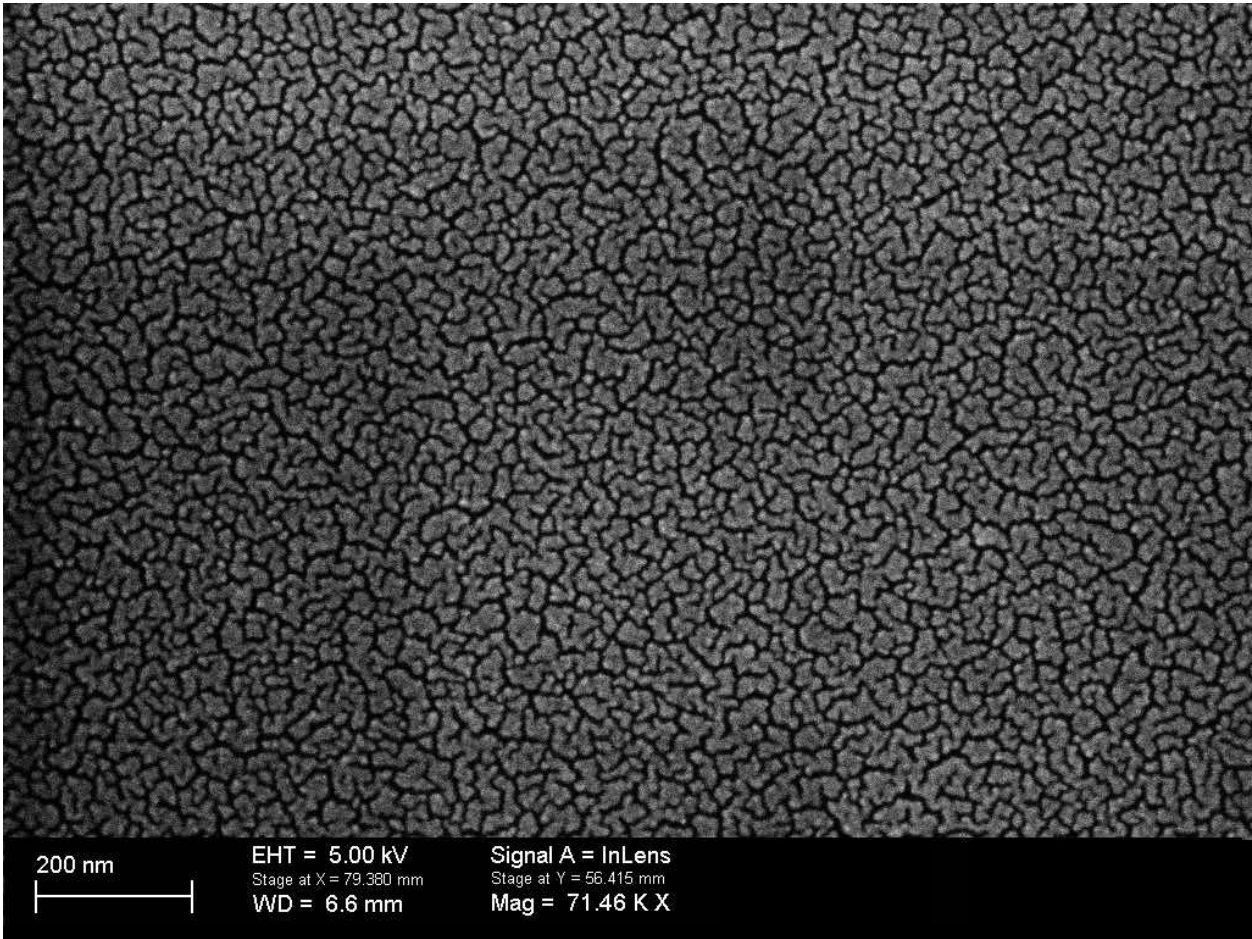
AD and Liver	Cholesterol+Na ⁺	409.358	409.344	34.2	MS/MS and exact mass	CBS-Au and DHB
AD	CE (18:2)+Na ⁺	671.571	671.574	-4.5	MS/MS and exact mass	CBS-Au
AD	CE (18:1)+Na ⁺	673.586	673.589	-4.5	Exact Mass	CBS-Au
AD	CE (20:4)+Na ⁺	695.572	695.574	-2.9	MS/MS and exact mass	CBS-Au
AD	CE (20:3)+Na ⁺	697.587	697.589	-2.9	Exact Mass	CBS-Au
AD	CE (22:5)+Na ⁺	721.583	721.589	-8.3	MS/MS and exact mass	CBS-Au
AD	CE (22:4)+Na ⁺	723.602	723.605	-4.1	Exact Mass	CBS-Au
Liver	TAG (48:2)+Na ⁺	825.692	825.694	-2.4	Exact Mass	CBS-Au
Liver	TAG (48:1)+Na ⁺	827.715	827.710	6.0	Exact Mass	CBS-Au
Liver	TAG (48:0)+Na ⁺	829.732	829.726	7.2	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (50:4)+Na ⁺	849.689	849.694	-5.9	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (50:3)+Na ⁺	851.707	851.710	-3.5	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (50:2)+Na ⁺	853.725	853.726	-1.2	Exact Mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (50:1)+Na ⁺	855.743	855.741	2.3	MS/MS and exact mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (52:4)+Na ⁺	877.720	877.726	-6.8	Exact Mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (52:3)+Na ⁺	879.739	879.741	-2.3	MS/MS and exact mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (52:2)+Na ⁺	881.759	881.757	2.3	MS/MS and exact mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (54:6)+Na ⁺	901.724	901.726	-2.2	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (54:5)+Na ⁺	903.733	903.741	-8.9	Exact Mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (54:4)+Na ⁺	905.748	905.757	-9.9	Exact Mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (54:3)+Na ⁺	907.769	907.773	-4.4	MS/MS and exact mass	CBS-Au and DHB
AD and Liver	TAG (56:8)+Na ⁺	925.717	925.726	-9.7	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (56:7)+Na ⁺	927.738	927.741	-3.2	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (56:6)+Na ⁺	929.755	929.757	-2.2	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (56:5)+Na ⁺	931.768	931.773	-5.4	Exact Mass	CBS-Au
AD and Liver	TAG (56:4)+Na ⁺	933.783	933.788	-5.4	Exact Mass	CBS-Au
Liver	TAG (58:9)+Na ⁺	951.737	951.741	-4.2	Exact Mass	CBS-Au
Liver	TAG (58:8)+Na ⁺	953.753	953.757	-4.2	Exact Mass	CBS-Au



Supplementary Figure 1: TM Sprayer CBS deposition parameters. All even passes were offset by 3.5 mm and the pumping speed for the salt solution was of 0.225 mL/min.

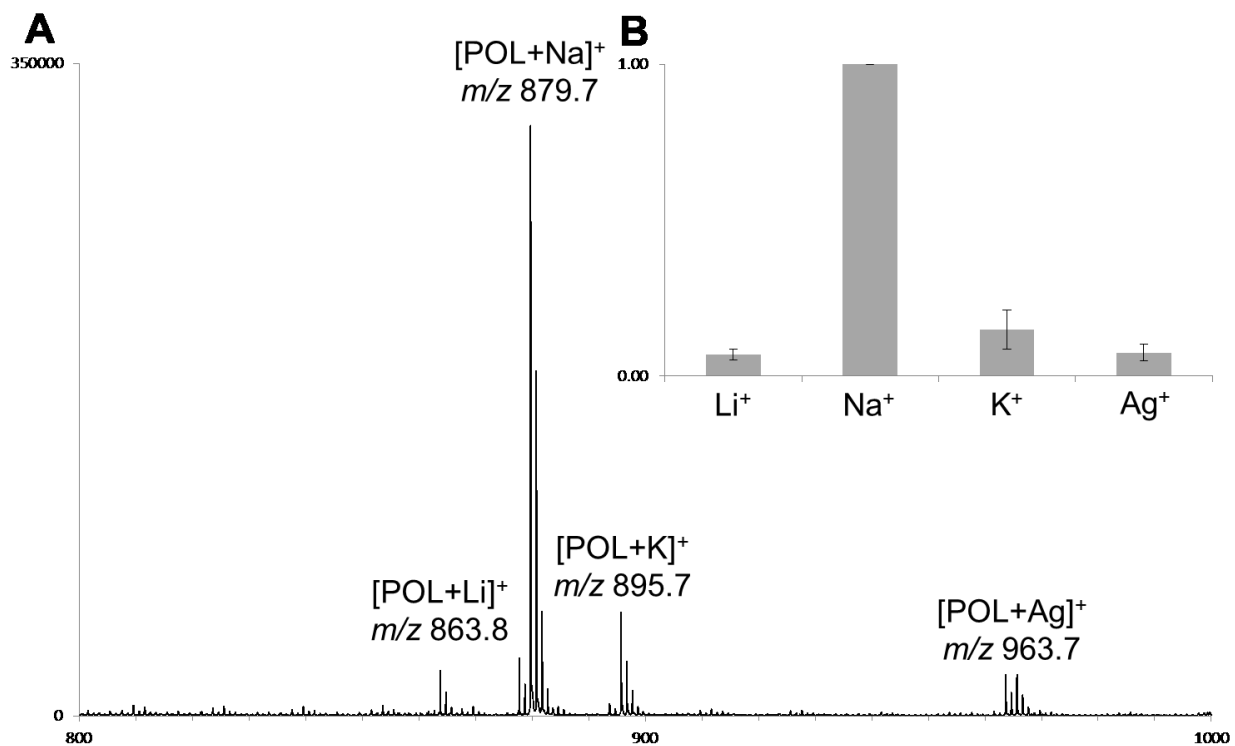


Supplemental Figure 2: UV-vis absorbance spectrum of a 28±3 nm thick sputtered gold layer on a glass slide.

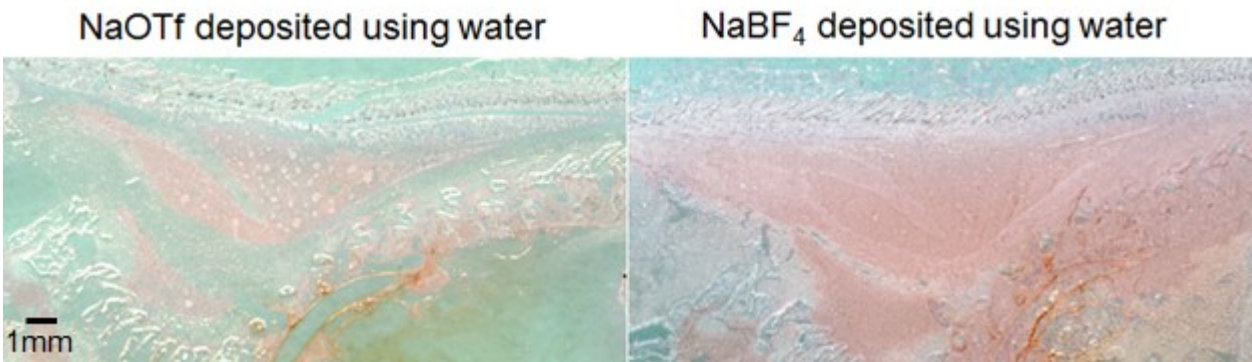


Supplemental Figure 3: Off-tissue SEM image of a 28 ± 3 nm thick gold layer on a glass slide at a magnification of 71 460X. When visualized on the nanometer scale, the gold nanolayer clearly assembles as nanoislands and does not form a homogenous film.

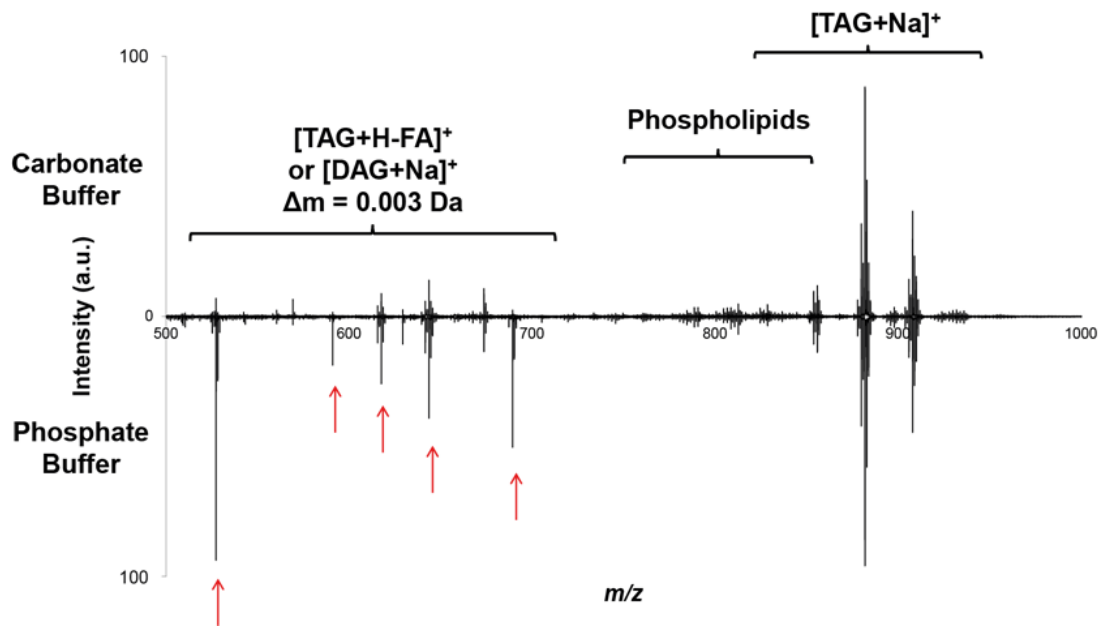
On-tissue SEM images did not produce any interpretable data. Low magnification only displayed the tissue section morphology and higher magnification images were not clear enough to assess the morphological details of the gold layer.



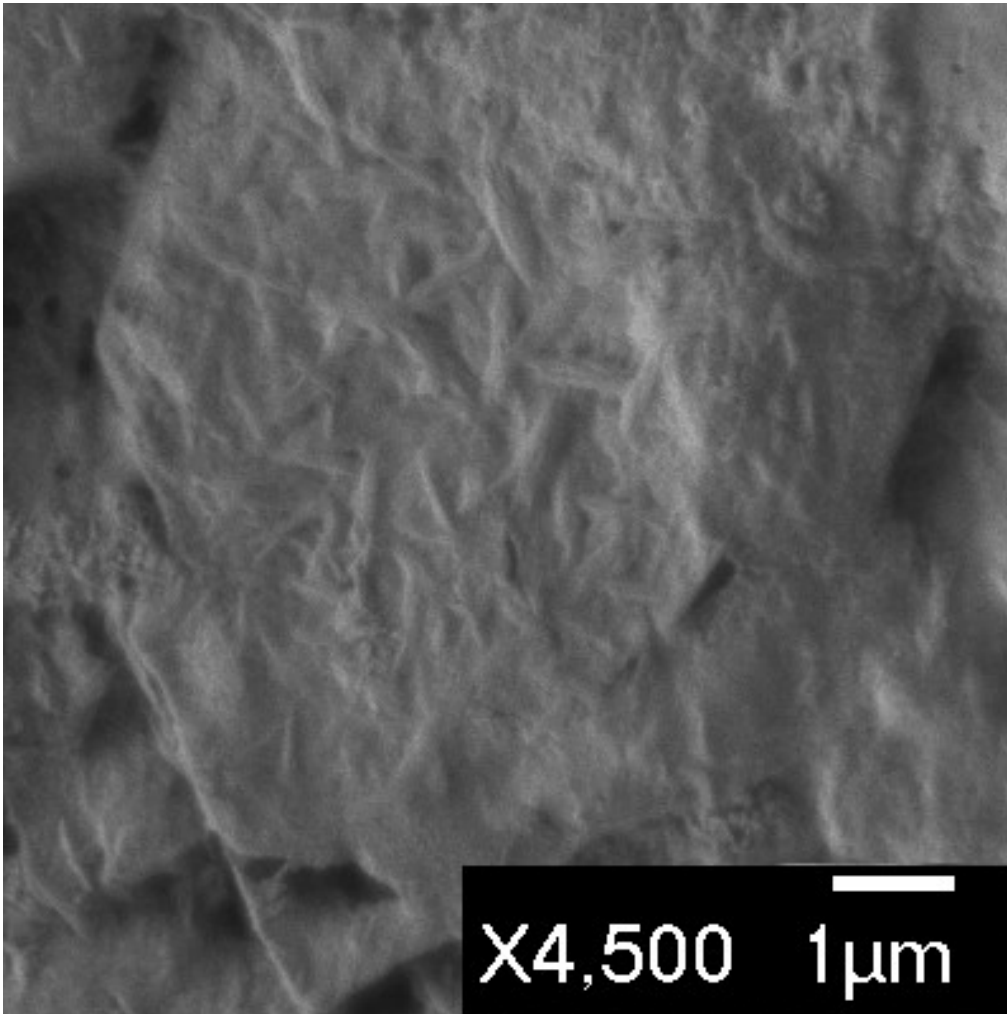
Supplemental Figure 4: (a) Typical Au-LDI MS of POL standard (10 μM) mixed with a fixed excess of LiCl, NaCl, KCl, and AgNO₃ (each salts at 50 μM). (b) Intensities from each POL cation signals normalised to the sodium cationized signal (n=5).



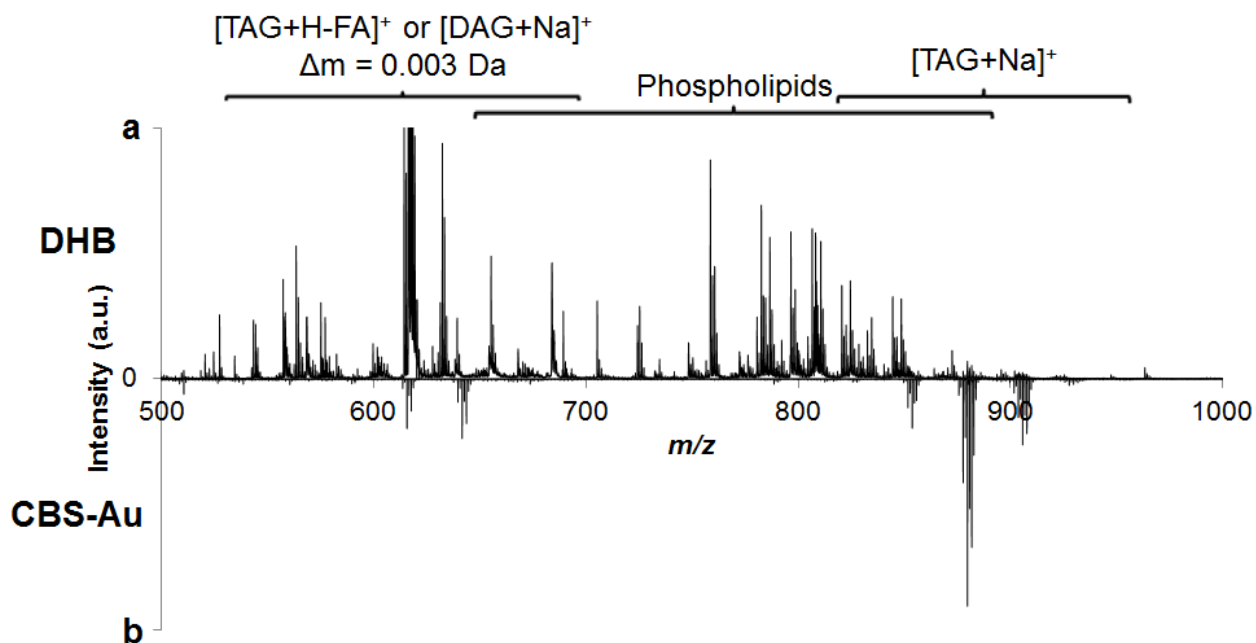
Supplemental Figure 5: Optical images from the neck region of mouse whole body sections after either NaOTf or NaBF₄ spray deposition followed by gold sputtering under identical conditions. NaBF₄ induces TAG delocalization over the scale of a few millimeters as shown by the delocalized red color in the right image compared to the image on the left. This behavior has however only been observed for tissue sections with large fat deposits.



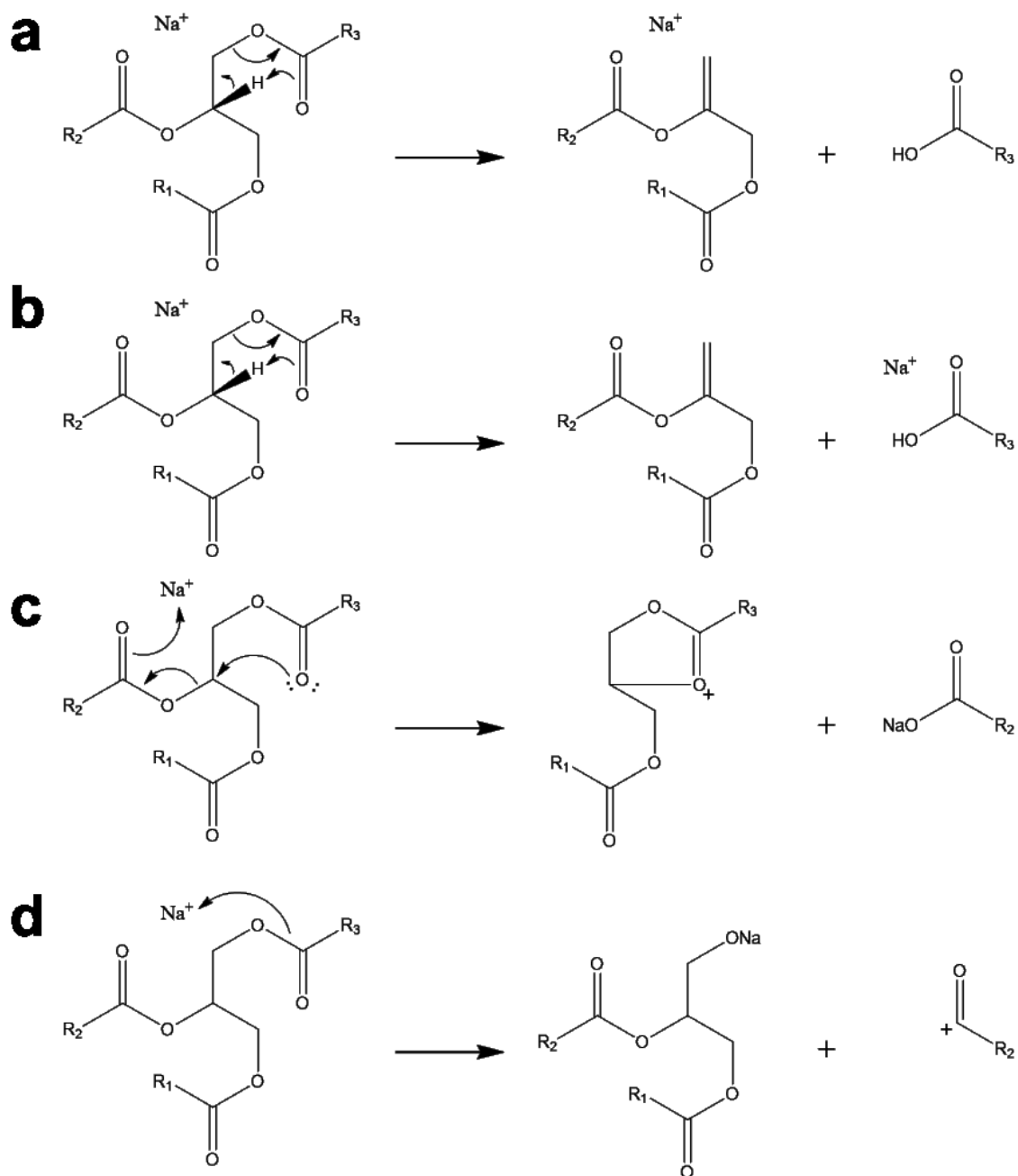
Supplemental Figure 6: On tissue LDI MS spectra acquired from frozen mouse liver homogenate 14 μm thick sections after carbonate buffer (CB, top, pH 10.3) or phosphate buffer (PB, bottom, pH 7.4) doping followed by the addition of a 28 nm sputtered gold layer. The red arrows show the peaks that are the most affected by the change in pH between the CB and the PB. The more alkaline CB shows less TAG in-source fragmentation compared to the nearly neutral PB.



Supplemental Figure 7: On-tissue SEM image of a liver homogenate tissue section after CBS deposition ($675 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) at a 4500X magnification. To minimize sample charging effects, a 2 nm sputtered layer of chrome was added. When visualized on the micrometer scale, the on-tissue CBS layer presents needle-shaped crystals with dimensions ranging from $0.5 \mu\text{m}$ up to $\sim 3 \mu\text{m}$ in length and widths smaller than $0.5 \mu\text{m}$. These can be observed across the tissue section but also off-tissue (data not shown).

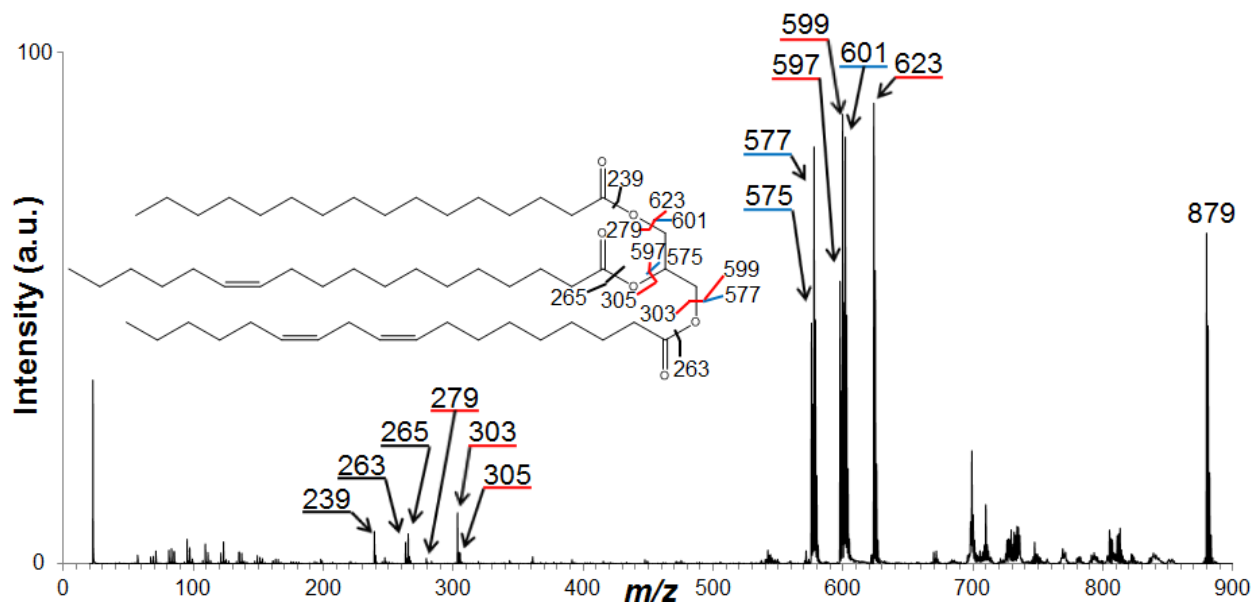


Supplemental Figure 8: On tissue (a) DHB-MALDI MS and (b) CBS-Au-LDI MS selected spectra from the fold change experiment (Figure 1) acquired from frozen mouse liver homogenate 14 μm thick sections under optimal MS condition for both methods. The intensity scale is the same for both spectra. The DHB-MALDI spectrum shows a high abundance of high intensity phospholipid signals in the m/z range of $\sim 600\text{-}900$, while the CBS-Au spectrum shows few low intensity phospholipid signals but very high intensity TAG signals compared to the DHB-MALDI spectrum.

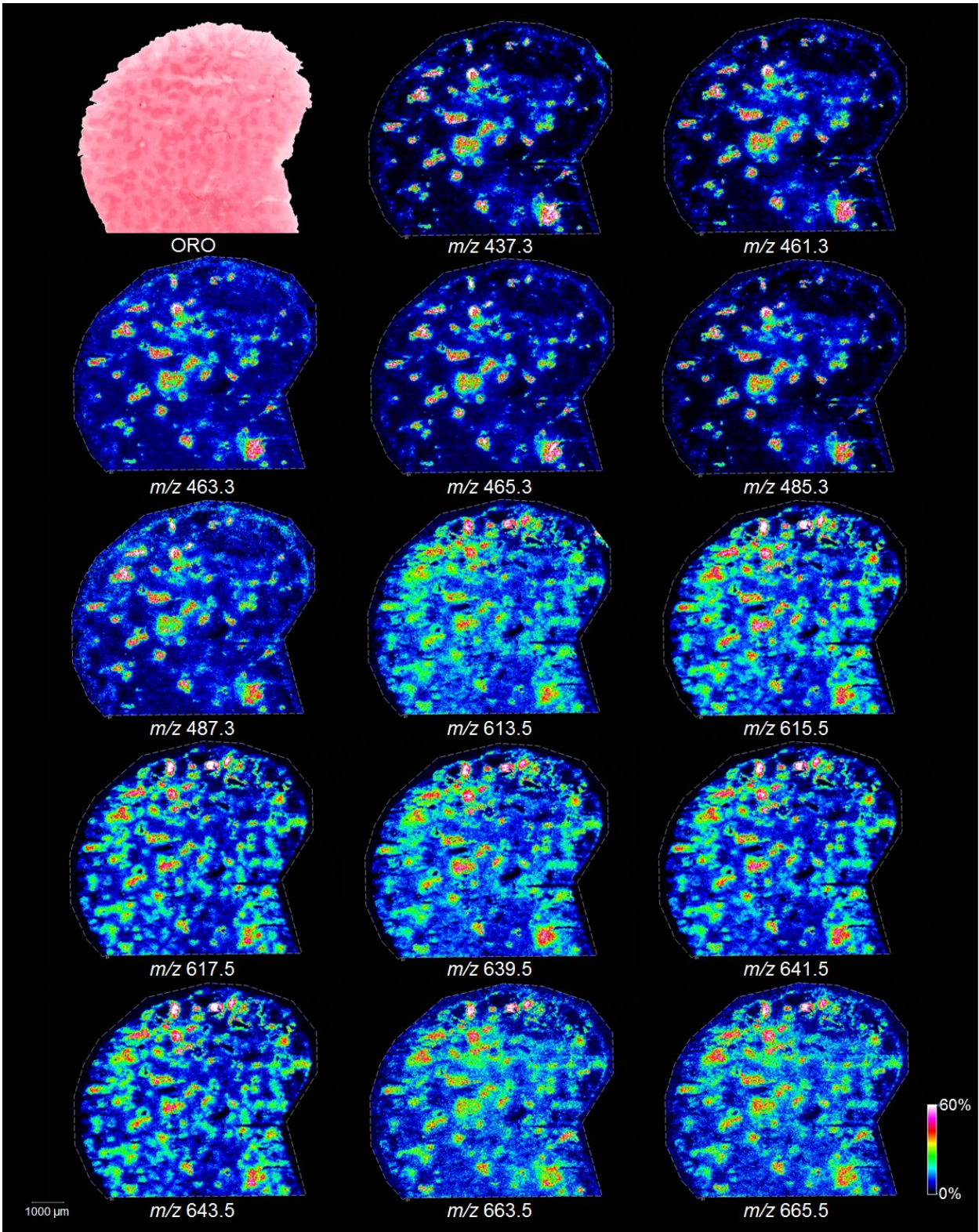


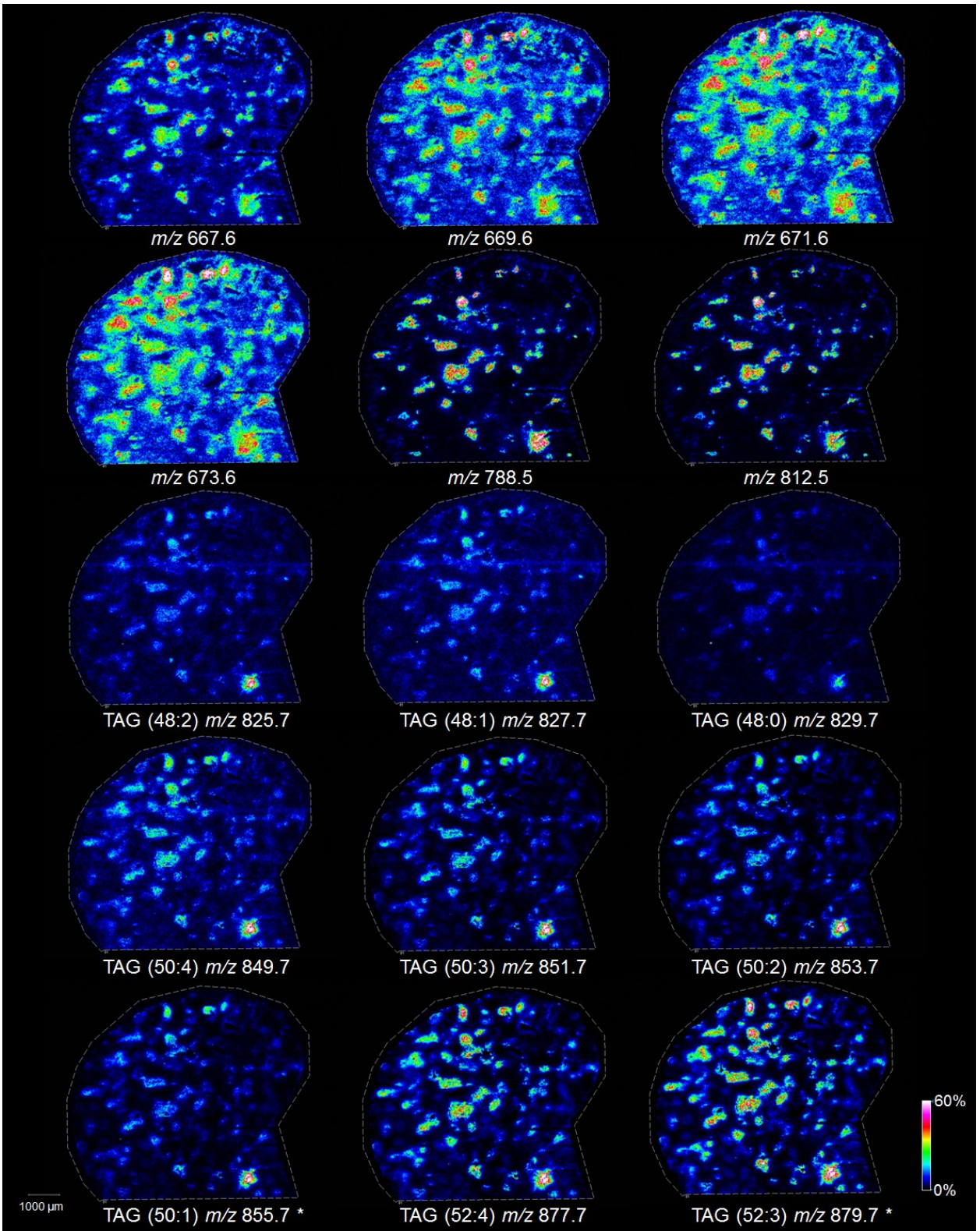
Supplemental Figure 9: Proposed principal TAG fragmentation reactions by LDI MS/MS.

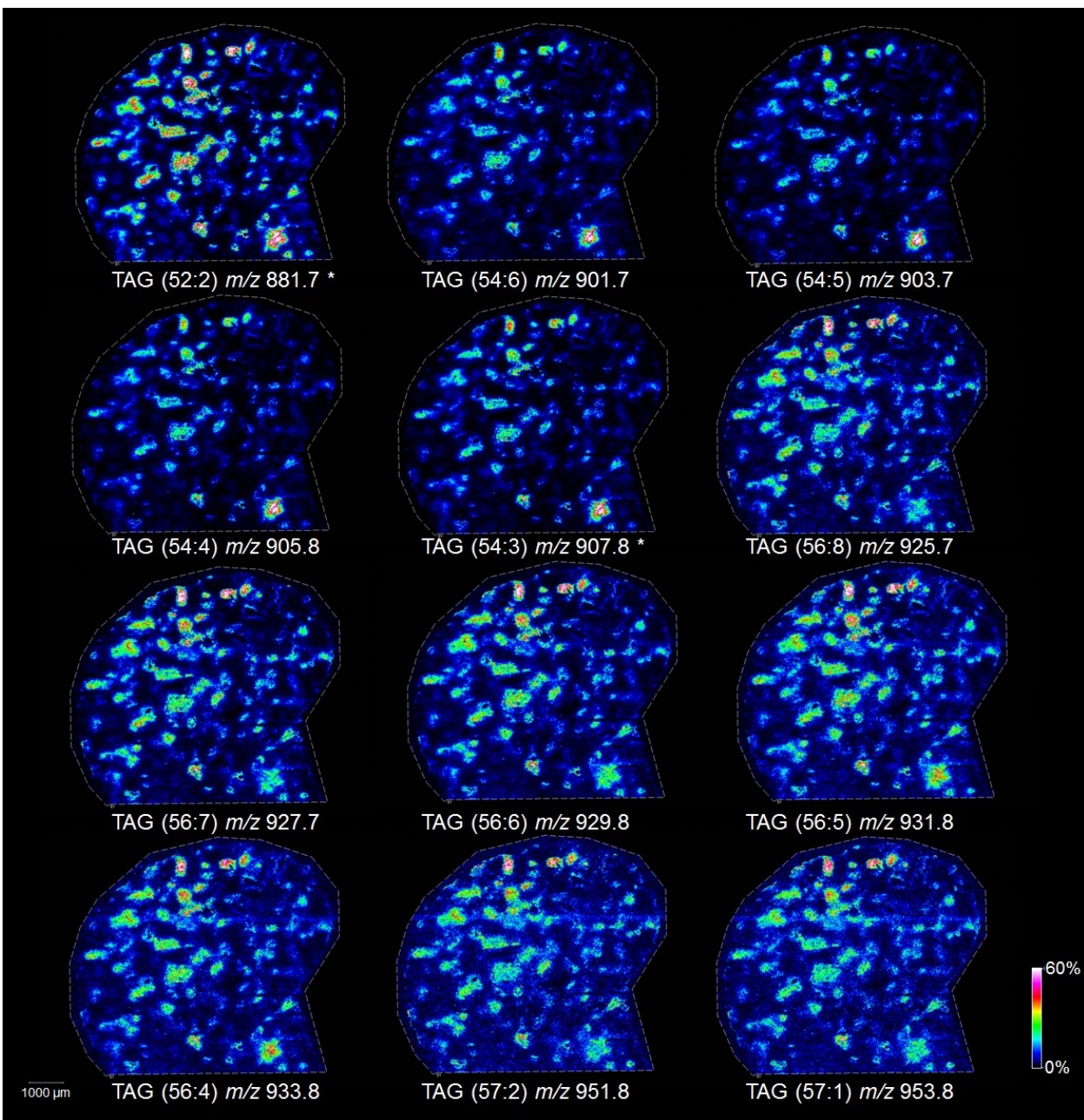
(a) Formation of sodiated DAG like fragment ions. (b) Formation of sodiated fatty acid fragment ions. (c) Formation of DAG like fragment ions. (d) Formation of acylium fragment ions.



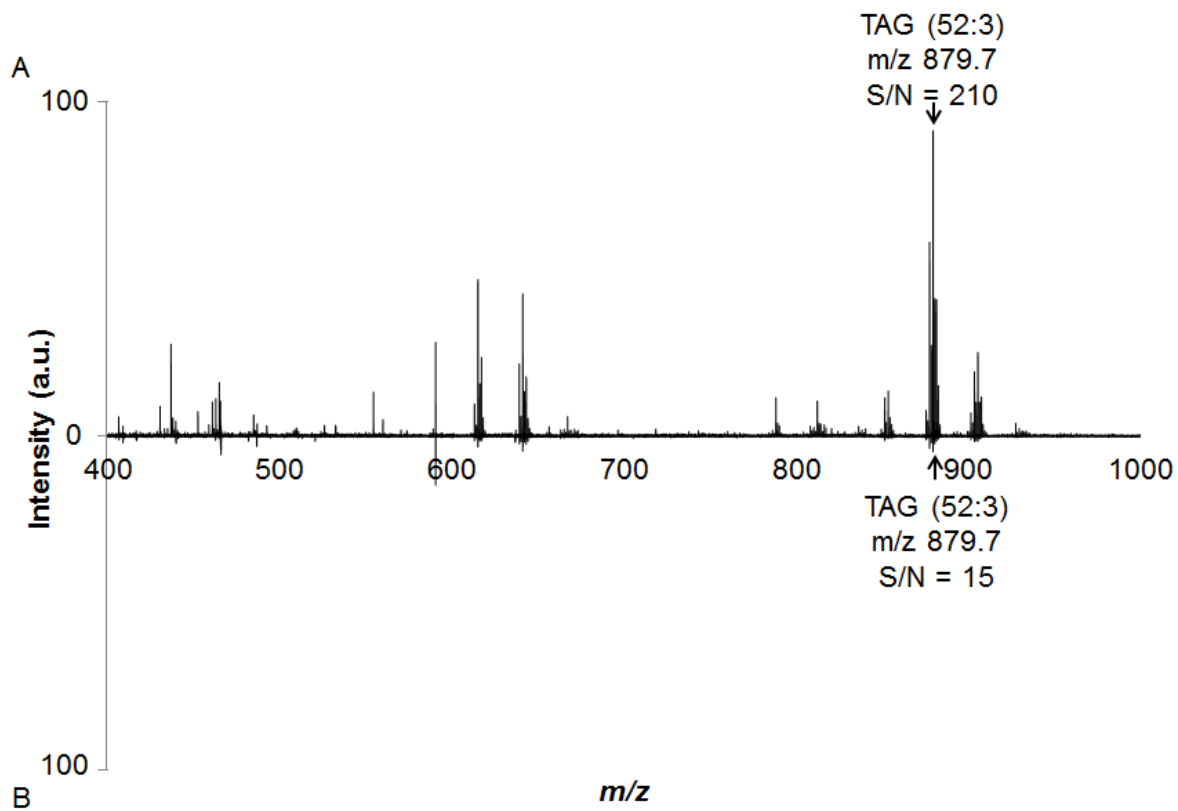
Supplemental Figure 10: CBS-Au-LDI MS/MS spectrum of POL at m/z 879.7 with its fragment ion assignments. Fragment ions issued from the first fragmentation pathway are underlined in red (Sup. Fig. 9ab). Fragment ions underlined in blue come from the second fragmentation pathway (Sup. Fig. 9c). Acylium fragment ions are underlined in black (Sup. Fig. 9d). The exact location of the double bonds within the fatty acid side chains cannot be attributed with this method.



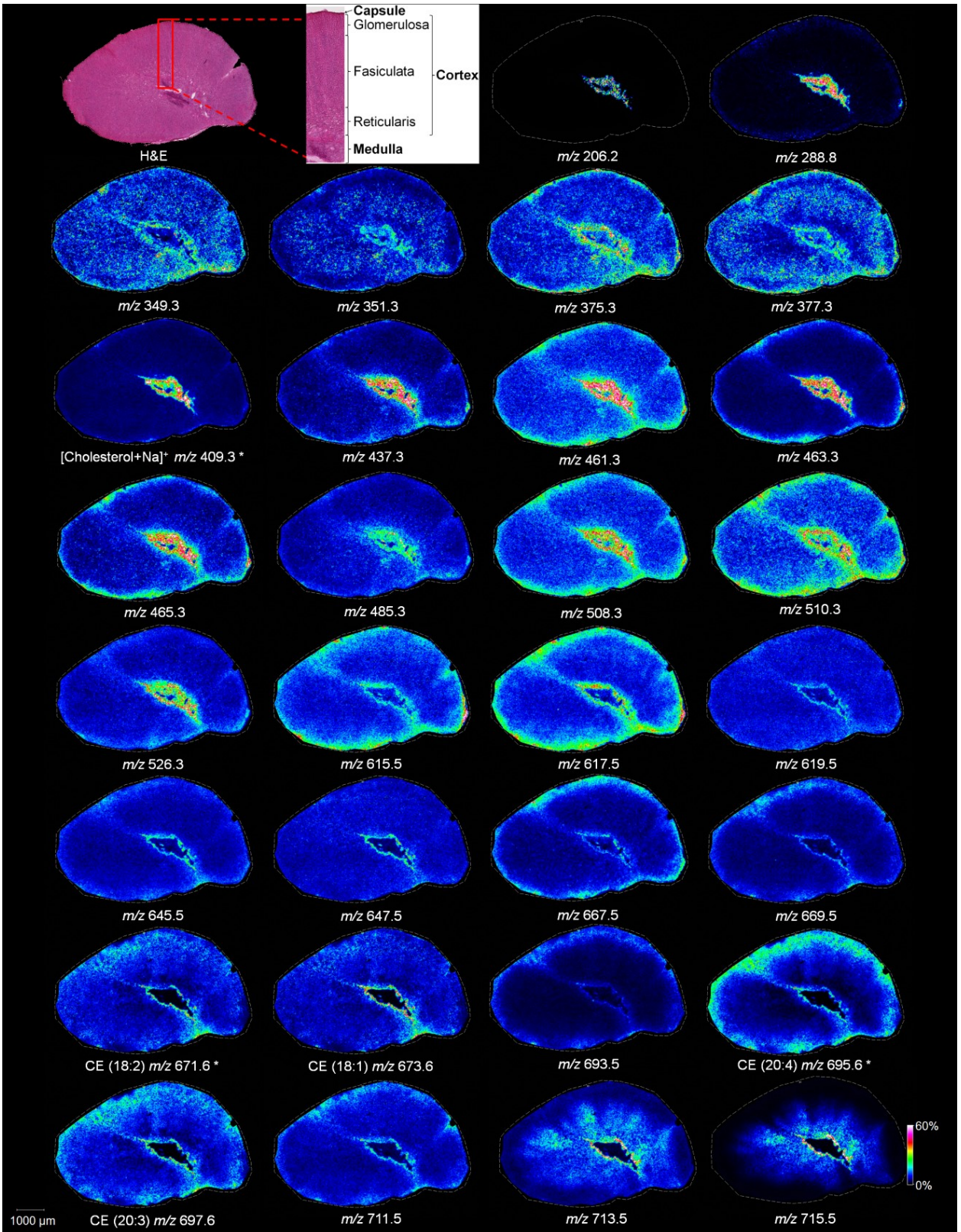


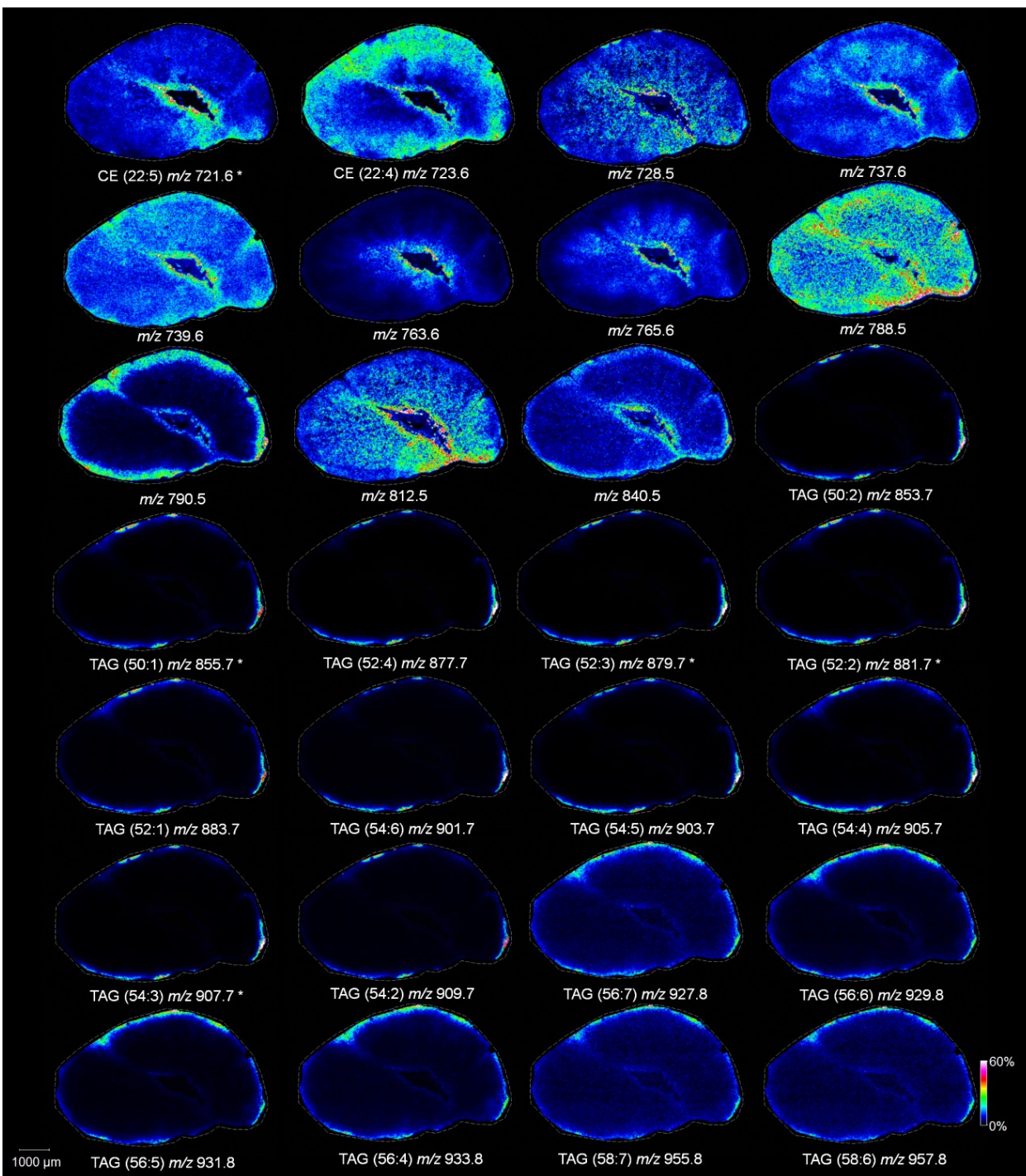


Supplemental Figure 11: CBS-Au-LDI IMS with a lateral resolution of 25 μ m of a mouse liver section. Proposed identifications are based on exact mass and database search unless indicated otherwise. *MS/MS confirmed (see Sup. Table 3).

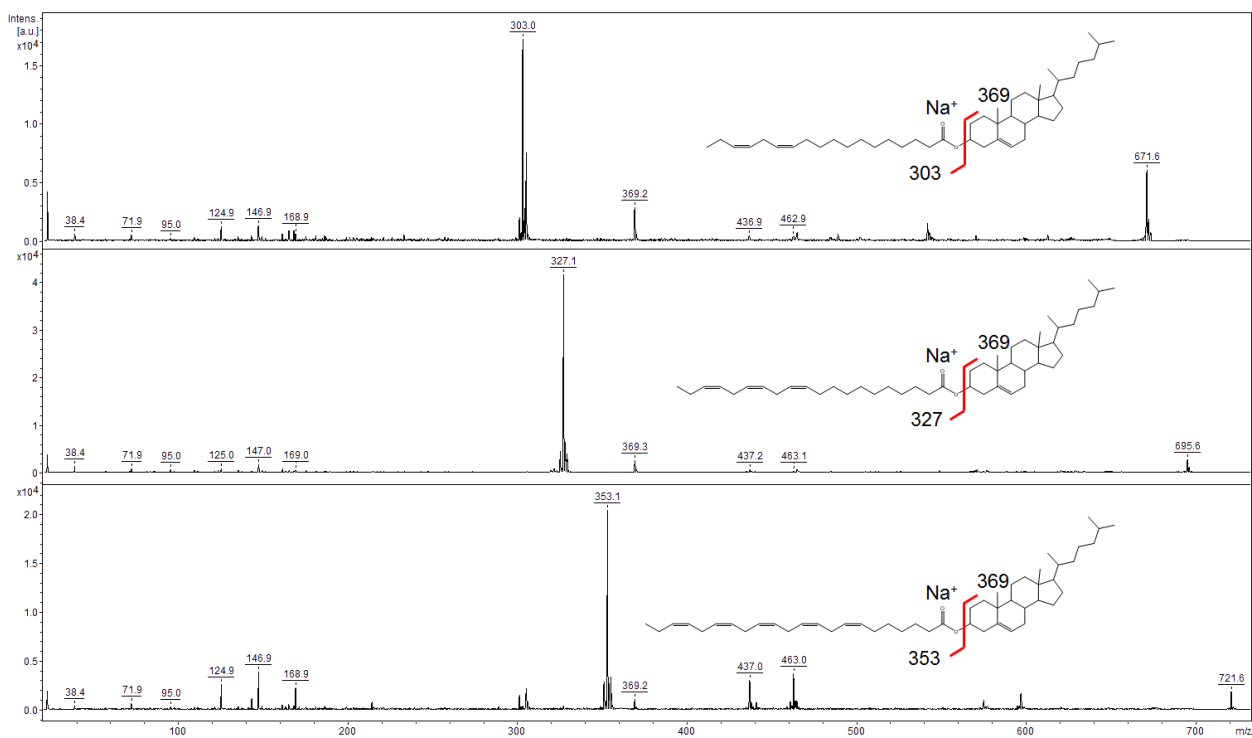


Supplemental Figure 12: Typical CBS-Au-LDI MS spectra acquired from a mouse liver section from within a lipid island (A) compared to the surrounding liver tissue (B). The signal at m/z 879.7 is detectable within both histologies but with very different intensities highlighting the sensitivity of the method.

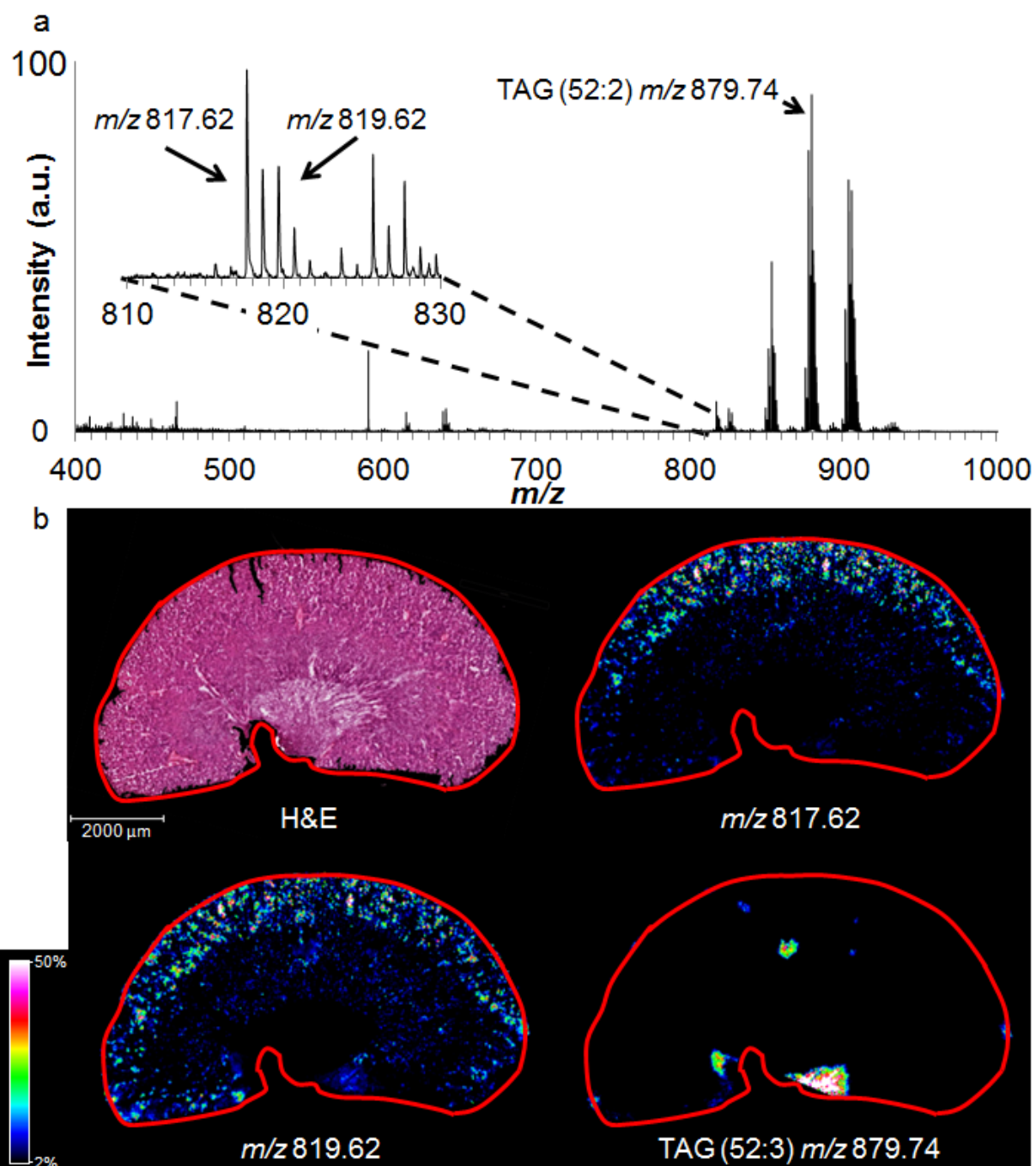




Supplemental Figure 13: CBS-Au-LDI IMS with a lateral resolution of 25 μm of a sagittal rabbit adrenal gland section. Proposed identifications are based on exact mass and database search unless indicated otherwise. *MS/MS confirmed (see Sup. Table 3).



Supplemental Figure 14: On-tissue CBS-Au-LDI MS/MS spectra of three CEs at m/z 671.6, 695.6, and 721.6 with their fragment ion assignments, respectively. The exact location of the double bonds within the fatty acid side chains cannot be attributed with this method.



Supplemental Figure 15: CBS-Au-LDI IMS with a lateral resolution of 30 μ m of a midsagittal mouse kidney section. Based on exact mass and MS/MS, the signal at m/z 879.74 is TAG (52:3).

Chapitre 4: Multimodal detection of GM2 and GM3 lipid species in the brain of mucopolysaccharidosis type II mouse by serial imaging mass spectrometry and immunohistochemistry

Martin Dufresne¹, Daniel Guneysu^{1,2}, Nathan H. Patterson¹, Mieczyslaw Martin Marcinkiewicz³, Anthony Regina⁴, Michel Demeule⁴ et Pierre Chaurand¹, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2017**, *409*, 1425-1433

¹Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada

²Département de Chimie, Université P. et M. Curie, Paris, France

³Cytochem Inc., Montreal, Quebec, Canada

⁴Angiochem Inc., Montreal, Quebec, Canada

4.1 Abstract

Mucopolysaccharidosis type II (Hunter's disease) mouse model (IdS-KO) was investigated by both imaging mass spectrometry (IMS) and immunohistochemistry (IHC) performed on the same tissue sections. For this purpose, IdS-KO mice brain sections were coated with sublimated 1,5-diaminonaphtalene and analysed by high spatial resolution IMS (5 μm) and anti-GM3 IHC on the same tissue sections to characterize the ganglioside monosialated ganglioside (GM) deposits found in the Hunter's disease. IMS analysis have found that two species of GM3 and GM2 that are only different due to the length of their fatty acid residue (stearic or arachidic residue) were overexpressed in the IdS-KO mice compared to a control mouse. GM3 and GM2 were characterized by on-tissue exact mass and MS/MS compared to a GM3 standard. Realignment of both IMS and IHC data sets further confirmed the observed regioselective signal previously detected by providing direct correlation of the IMS image for the two GM3 overly expressed MS signals with the anti-GM3 IHC image. Furthermore, these regioselective GM MS signals were also found to have highly heterogeneous distributions within the GM3-IHC staining. Some deposits showed high content in GM3 and GM2 stearic species ($r = 0,74$) and other had more abundant GM3 and GM2 arachidic species ($r = 0,76$). Same section analysis of Hunter's disease mouse model by both high spatial resolution IMS and IHC provides a more in depth analysis of the composition of the GM aggregates while providing spatial distribution of the observed molecular species.

4.2 Introduction

Hunter's disease (HD) belongs to a family of human hereditary progressive diseases termed mucopolysaccharidosis. HD is due to a gene mutation within chromosome X causing

inactivation of the enzyme iduronate-2-sulfatase (IdS).¹⁸⁸ In normal conditions, IdS is responsible for glycosaminoglycans (GAGs) degradation throughout the body. Without the presence of IdS, GAGs accumulate within the cell and form the aggregates that ultimately impair normal cellular functions.⁸² One of those impairments is the inhibition of some enzymes such as the hexosaminidase enzyme responsible for the degradation of gangliosides.^{189,190} Replacement therapy during which the inactive IdS secreted by the cells is replaced by an active recombinant form of IdS has been demonstrated to remediate many symptoms of HD.¹²⁹ Unfortunately, the most advanced enzyme replacement therapy still as issues remediating GAG and ganglioside accumulation in the brain due to the poor transmission efficiency of the recombinant IdS through the blood brain barrier.⁸³ To perform therapeutic assays, mutant mice with genetically inactivated IdS (IdS-KO) were developed as a clinical model for human HD.¹⁹¹⁻¹⁹³ These mice develop disease symptoms similar to those observed in humans in the form of GAG and ganglioside deposits visible in all its organs along with the physical impairment that accompanies this accumulation. Historically, these deposits have been characterized through standard biochemistry approaches and were visualised through histological staining.^{126,188,194}

Glycosphingolipids (GSLs) known as gangliosides have been documented to accumulate in a wide range of lysosomal storage disorders, including those with and without primary defects in ganglioside degradation.¹⁸⁹ The same two gangliosides, GM2 and GM3, are often found elevated in diseased and a common feature associated with neuropathology in a number of lysosomal storage diseases.^{190,195} In human brain, GM2 and GM3 are normally very minor components and represent about 1–2% of the total gangliosides. In such diseases, GM2 and GM3 have been found to accumulate in a variety of neurons and glia, with both

gangliosides typically occurring within the same cells. Unexpectedly, GM2 and GM3 gangliosides, while often being sequestered within the same neurons, have been consistently found to reside in separate vesicle populations in those cells. The GM2 and GM3 which are not co-sequestered has been interpreted to mean either that these gangliosides are sequentially processed in separate compartments within the endosomal/lysosomal system, or that these two gangliosides are being generated by separate and independent processes, e.g., in synthetic vs. degradative compartments in cells.^{189,196} Determining which species of gangliosides are altered in Hunter's disease as well as their localization in brain regions remain to be established in order to better understand the lysosomal disease pathogenesis.

Mass spectrometry (MS) has been a leading technology in the relatively new field of "lipidomics", which aims to comprehensively analyse lipids in biological systems.⁷ Several analytical approaches have been developed to enable the quantitative detection of lipids, most notably driven by shotgun type methods with electrospray ionization or gas chromatography with or without chemical derivatization.^{7,197,198} Nevertheless, these methods are limited to the study of homogenized samples and the anatomical distribution information is lost in the process. In recent years, imaging mass spectrometry (IMS) has become the leading technique for the analysis of biomolecules directly from thin tissue sections while retaining the biomolecules' anatomical distributions.^{47,164} With the use of a transparent ITO coated glass slide both IMS and histological staining can be performed directly on the same tissue section when proper procedures are used.¹⁴⁰

To date, matrix assisted laser desorption/ionisation (MALDI) has been the method of choice for ganglioside on-tissue imaging. Gangliosides are a type of ceramide which contains

a sphingosine and a fatty acid residue to which the head group is a variable chain of sugars composed of one to four sialic acid residues. Gangliosides are comprised of a wide variety of (x)-sialo-(y)-hexosylganglioside where x ranges between one and four along with y ranging from two to four. When x varies, the names for the gangliosides are GM, GD, GT, and GQ.⁸⁴ This refers to mono-, di-, tri, and tetra- sialated gangliosides. When y varies a number is added to the contraction like in the cases of monosialated gangliosides (GM) where the longest hexose chain being the smallest number (GM1, monosialotetrahexosylganglioside) and the smallest chain having the biggest number (GM3, monosialodihexosylganglioside). The first reported image of gangliosides goes back to 2008 when Chen *et al.* used 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix to visualise these in a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease.¹⁹⁹ Further advancements in sample preparation made possible the visualisation of GDs and GTs in mouse brain using an ionic liquid equivalent of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid.²⁰⁰ The detection of four classes of gangliosides (GM, GD, GQ, and GT) in mouse brain using 2,6-dihydroxyacetophenone mixture as the matrix was also reported.²⁰¹ More recently, the use of 1,5-diaminonaphthalene (DAN) sublimation was used to detect both GM1 d18:1 and d20:1 in rat brain.²⁰² In all of these studies, gangliosides were imaged in the negative ionization mode at spatial resolutions ranging between 70 to 100 μm with Weishaupt *et al.* reporting the best spatial resolution with sublimated DAN.²⁰²

In recent years, IMS has greatly improved in spatial resolution due to the advancement in both sample preparations and instruments to the point of reaching cellular level capabilities ($\leq 10 \mu\text{m}$).^{54,203} The need to develop tools for consecutive imaging molecular features by IMS and IHC on a single tissue section becomes a necessity to observe and characterize smaller tissue structures. This is especially true when looking at diseases like Hunter's syndrome

where single cell GAG accumulation along with secondary accumulation of gangliosides is the hallmark pathology. In this regard and based on previous findings on ganglioside analysis by MALDI IMS approaches, we have examined GMs storage in young adult IdS-KO mice brain combining MALDI IMS and IHC approaches. Typically, MALDI IMS requires 10-20 μm thick tissue sections for optimal biomolecular detection and cryosectioning reproducibility when using standard sample protocols.¹² GAG and ganglioside deposits found in IdS-KO mice are in the range of 20 μm in size with some of these sometimes smaller than 10 μm . Performing both IMS and IHC on the same tissue sections becomes therefore necessary to enable precise realignment of these very fine anatomical structures.

To this aim, 3 male IdS-KO mice and one WT mouse were examined using high spatial resolution MALDI IMS (5 μm) using sublimated DAN followed by GM3 IHC on the same tissue section to unravel the molecular distribution of GMs within a biologically relevant animal model of HD. Such knowledge may contribute to a better understanding of the disease onset and progression along with enabling pharmacokinetic study of new drug candidate.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Chemicals and Reagents

All solvents and materials, unless otherwise noted, were purchased from Fisher Scientific Company (Ottawa, ON). 1,5-diaminonaphtalene (DAN) and Alcian blue 8GX were purchased from Sigma-Aldrich Canada. (Oakville, ON). Monosialoganglioside GM3 sodium salt was purchased from Adipogen Corporation (San Diego, CA). Monoclonal antibody to GM3 (neuAc) M2590 was purchased from Cosmo bio (San Diego, CA). Biotinylated anti-mouse IgG, the Elite ABC reagent and Kit ImmPACT DAB were purchased from Vector

Laboratories Canada (Burlington, ON).

4.3.2 Tissue sampling and sectioning

Mouse brains from normal and IDS-KO mice aged between 14-20 weeks with no special diet were extracted under deep anaesthesia performed by inhalation of isofluran and following heart perfusion with 0.9% NaCl, Ethical Committee Permit Number #767 requested by Dr. Anthony Régina at Angiochem Inc. To this aim, brains were embedded in OCT medium and frozen in deep-cold (-40°C) isopentane liquid. Brain tissue was cryostat cut into 12 µm serial coronal sections and tissue array sets were mounted on glass and ITO -coated slides (25 x 75 mm). Tissue arrays were stained with alcian blue or by immunohistochemistry to GM3.

4.3.3 Anti-GM3 Immunohistochemistry

GM3 immunocytochemistry was performed using monoclonal antibody to GM3 (NeuAc) M2590. The immunoreaction was revealed using a horseradish peroxidase technique, which consists on the production of a dark diamino-benzidine precipitate within cells. Following optimization, the immunostaining was carried out at antibody dilution 1:1000. For more detail see supplemental section.

4.3.4 Alcian blue staining

Tissue sections were initially fixed in a 4% formaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer for 60 minutes at room temperature (RT). Preincubation was performed in 0.1 N hydrochloric acid for 30 seconds. Staining by 1% Alcian blue 8GX solution was performed in hydrochloric acid 0.1 N (pH~1.0) at RT followed by a wash in water, 5 changes within 10 minutes. Water washes were followed by dehydration in 95% and 100% alcohol and clearing

in xylene, 2 changes each. This method provides a more selective staining of sulphated mucosubstances, which appear light blue in brain tissue.

4.3.5 Thionin staining

Thionin stains DNA (cell nuclei) and primarily ribosomal RNA (cytoplasm Nissl substance). Staining was performed using 1% thionin solution at pH=4.0.

4.3.6 Matrix deposition

The DAN matrix was sublimated over the tissue sections using a previously reported procedure.¹⁵³ In short, DAN matrix was sublimated until a density of $\sim 110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ was reached using a sublimation apparatus (Chemglass Life Science, Vineland, NJ). Matrix density was measured by weighting the amount of matrix over a 25x75 cm glass slide after 11 min 45 seconds of sublimation at 150°C. Matrix removal prior to IHC was achieved by plunging the slide in successive ethanol gradients (90 and 70%) for 30 seconds each. Matrix sublimations should be performed under a fume hood due to the possible cancerogenic effects of the DAN matrix.

4.3.7 MALDI mass spectrometry

Profiling and IMS of the tissue sections were performed on a MALDI TOF/TOF Ultraflextreme mass spectrometer equipped with a SmartBeam II Nd:YAG/355 nm laser operating at 1000 Hz, which provides a laser focus down to $\sim 10 \mu\text{m}$ in diameter for the “minimum” focus setting (Bruker Daltonics, Billerica, MA). MS and IMS data acquisition were performed using the reflectron geometry with flexControl 3.4 and flexImaging 4.0, respectively (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Acceleration voltage was set to -25 kV and all other instrumental parameters (delayed extraction parameters, source voltages, detector gain,

laser energy, etc.) were optimized for maximum signal to noise ratio of the detected monosialoganglioside GM1 over a normal mouse brain tissue section. Profiling data were acquired by summing 10 times 100 shots (1000 summed) in the m/z 500-2000 mass range. IMS data were acquired in the oversampling mode using 100 shots per pixels with a spatial resolution of 5 μm (raster step size) under the same instrumental conditions. All images were produced using flexImaging 4.0 with TIC data normalization. Ganglioside identification was performed by comparing accurate mass measurements with both the LIPID MAPS (<http://www.lipidmaps.org/tools/index.html>) and Human Metabolome Database (<http://www.hmdb.ca/spectra/ms/search>) prediction tools and confirmation was obtained by on-tissue tandem MS measurements using the Ultraflex extreme LIFT-TOF/TOF mode. To monitor co-localized expression, numeric values of correlation (r) between GMs were calculated by Pearson's correlation across all samples using the IMS data. Results and discussion

4.4 Results and Discussion

4.4.1 Histological analysis

GM3 immunostaining (GM3-IHC) has revealed the presence of GM3 accumulation within neurons throughout several brain regions of the 3 examined IdS-KO mice while no GM3-IHC stains were observed in the WT mouse brain (Figure 4.1, Sup. Fig. 1-4). At the anatomical level, GM3-IHC was mostly heterogeneous, with higher-levels of GM3 storage within some specific brain regions. Sup. Table 1 presents relative intensities of cellular GM3 immunostaining in 16 brain regions and GAG staining by Alcian blue. This suggests that progression of the disease is not the same throughout the brain regions for IdS-KO mice. Since

the studied structures are due to single cell GM3 accumulation, even serial tissue sections cannot be overlaid with good precision when using two or more histological staining methods. Nevertheless, we can observe with a low magnification scan on Sup. Fig. 5 and with Sup. Table 1 that both GM3 immunostaining and GAG Alcian blue staining exhibit similar histological distributions within a given IdS-KO mouse brain region. At higher magnification, GM3-IHC appears to be concentrated within cell cytoplasm in accordance with previous findings on HD being an intracellular accumulation of gangliosides (Sup. Fig. 1-4).^{82,127} In some cells, the staining even appears within proximal dendrites along with the main cellular body, as indicated by the black arrow in Sup. Fig. 4d, showing that accumulation of GM3 within the cell is indiscriminate of the intra-cellular histology. Intensity of GM3 immunostaining was seen to vary between each individual mice but the overall distribution within the brain regions remained similar between all studied specimens.

GM3-IHC

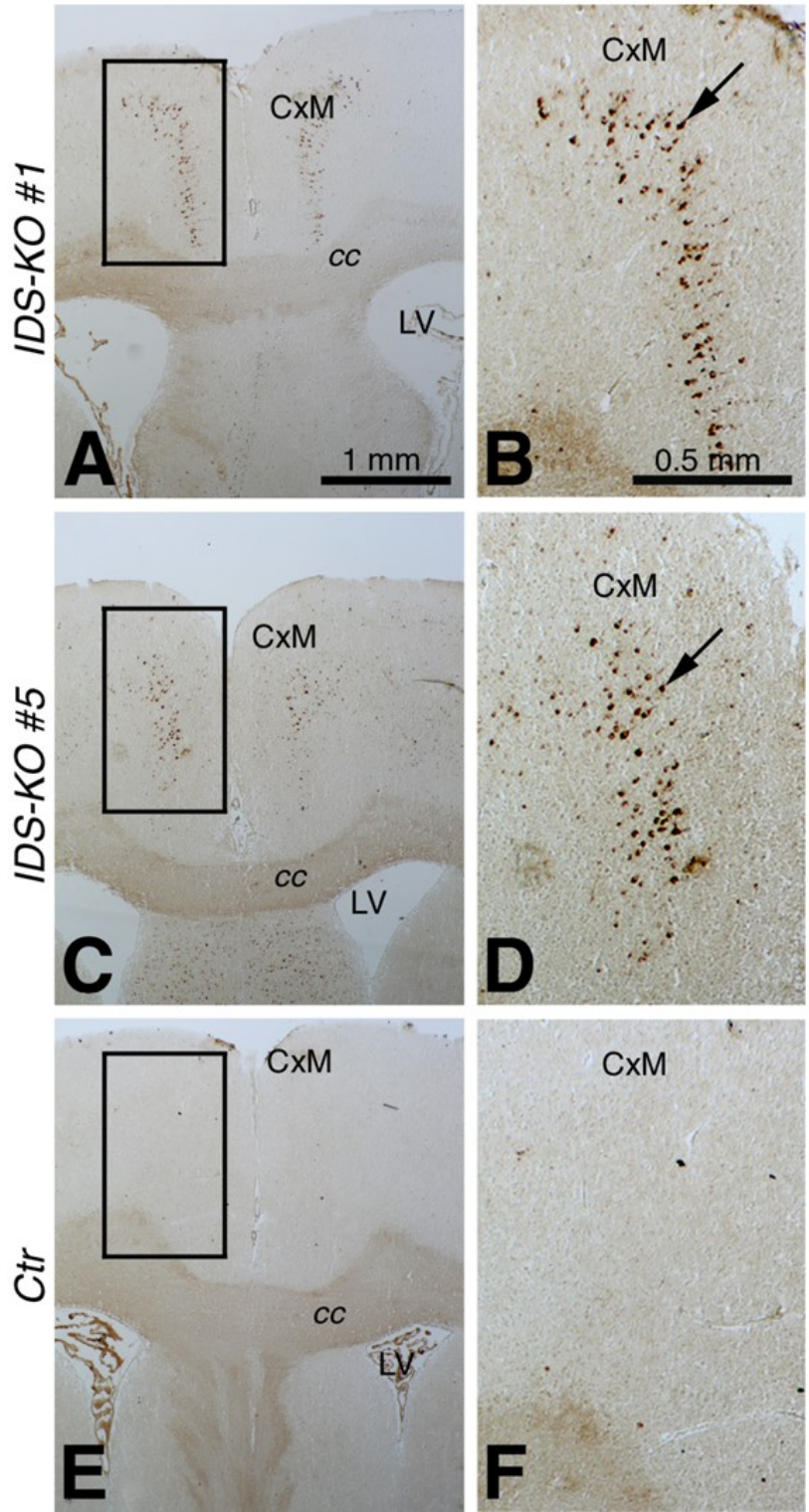


Figure 4.1 : GM3 immunostained neurons in medial brain cortex (CxM). **A:** GM3 neurons in CxM of IDS-KO mouse #1. Squared region is shown at high magnification in (B). Note GM3 staining in a specific set of pyramidal neurons with other regions unstained. **B:** Magnification of (A) with GM3 immunostained neurons (arrows). **C:** For comparison GM3 neurons in CxM of IDS-KO mouse #5. Squared region is shown at high magnification in (D). Note a similarity of GM3 distribution pattern to that in #1 (A). **D:** Magnification of (A) with GM3 immunostained neurons (arrows). **E:** GM3 neurons in CxM of control wild-type mouse (Ctr). Squared region is shown at high magnification in (F). Note the absence of GM3 immunostaining. **F:** Magnification of (E) with unstained tissue. Magnifications: (A, C and D) x20 and (B, D and F) x50. CC: corpus callosum, LV: left ventricle.

4.4.2 On-tissue MS signal identification

Initial MS measurements on IdS-KO mice revealed several signals in the mass range of GMs between m/z 1100-1600 that were absent from the WT mouse and were solely detected in the regions highlighted by GM3-IHC measured on a serial section (Figure 4.2a). Initial identification through exact mass revealed that these signals could be attributed to one form of GM1, two forms of GM2, as well as two forms of GM3 with either a stearic (C18:0) or arachidic (C20:0) fatty acid residues. It is important to note that no structural information on the fatty acid side chain or the sphingosine chain was obtained during the MS/MS experiments. The allocation of the two extra $-CH_2$ found here was made through the results of the exact mass search using both LIPID MAPS and the HMDB databases results. Further analysis by MS/MS shown in Figure 4.2bc and Sup. Fig. 6 confirmed the identification of the GMs directly from IdS-KO brain sections. For GM3-C18:0, MS/MS experiments showed an intense sialic acid fragment (C_{18}) at m/z 290.1 along with its opposite fragmentation pathway

(Y_{2a}) at m/z 888.6. Signal for the Y_1 and Y_0 fragments at m/z 726.6 and 564.5 respectively were also detected in both the on-tissue MS/MS and from the GM3 standard. GM2-C18:0 and GM1-C18:0 also displayed all of their respective glycosidic fragments albeit with lower signal intensities (Sup. Fig. 6). Figure 4.2a also shows very good quality phospholipid signals upon MS analysis of the IdS-KO brain.

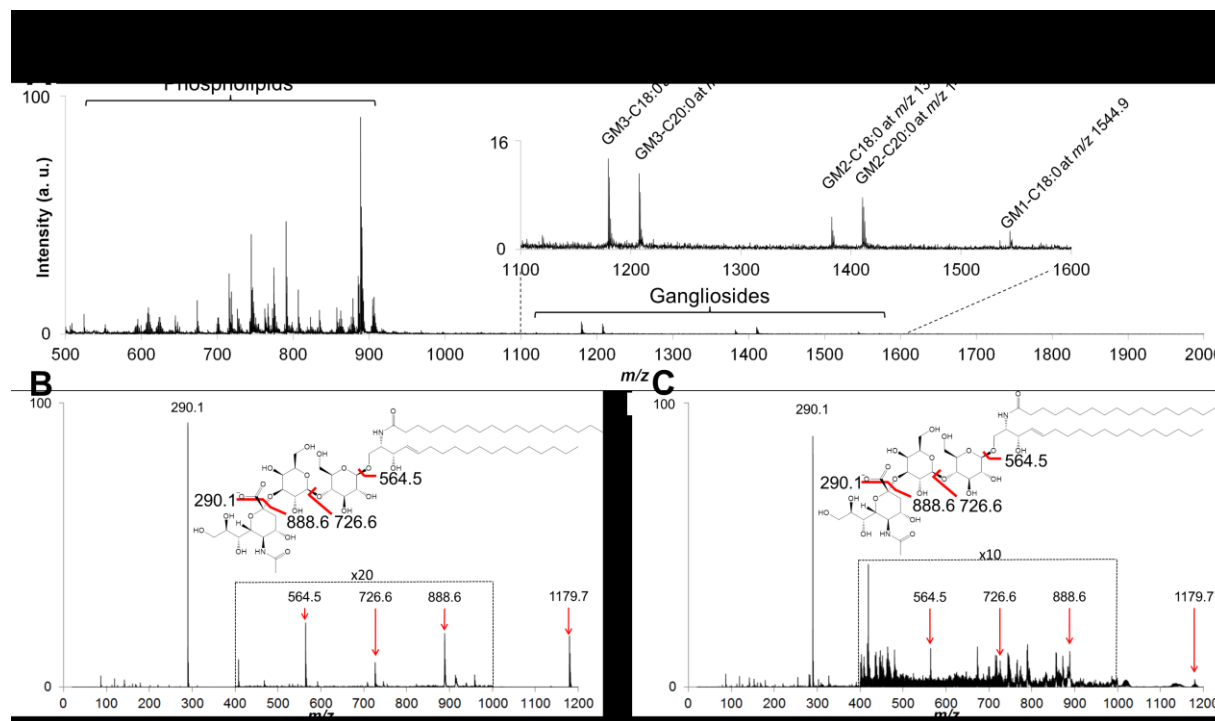


Figure 4.2 : MALDI MS profile and MS/MS spectra. A: On-tissue MALDI MS spectrum from a ganglioside deposit (baseline subtracted and denoised). The spectrum shows the relatively low abundance of the ganglioside signals compared to the phospholipids found in the lower mass range ($< m/z$ 1000). **B:** GM3-C18:0 standard off-tissue MS/MS showing the successive fragmentation of each sugar from the ganglioside headgroup. The sialic acid initially fragments leading to either the main chain or the acid retaining the charge. **C:** GM3-

C18:0 MS/MS, which displays all four diagnostic fragments found in the GM3 standard MS/MS: Sia → Hex → Hex.

4.4.3 IMS experiments and correlation to IHC

Since profiling experiments have very little spatial information related to them aside from gross histological features and because they are prone to user bias when selecting which spectra are kept and which one are discarded, high spatial resolution IMS experiments (5 μm) on triplicate sections from each of the three IdS-KO and one WT control mice were performed. This way of acquiring data not only provides accurate molecular spatial information but is also unbiased since the only decision made by the user is the area being investigated. In the case of this study, the regions of interest were chosen based on the presence of GMs deposits in a given histology after revelation by GM3-IHC performed on a serial section. These experiments further reinforced on-tissue exact mass MS and MS/MS results by adding a direct correlation between the GM ion images and the GM3-IHC from serial tissue sections.

To precisely align the ion images acquired for GMs with the deposits, the sections used for IMS were further used for GM3-IHC after matrix removal. To this end, both data sets were manually realigned using the tissue visible morphology such as the edges or white to gray matter transition zones. This way of realigning two separate acquisitions isn't flawless especially when considering the possibility of the tissue warping and tearing either during the IMS sample preparation, the IMS acquisition, and/or the IHC procedure. This tissue warping and tearing is visible in Figure 4.3b and was found to be caused by the IMS acquisition which created initial tearing of the sections. The following IHC procedure was found to further

enhance the tears in the sections. IHC performed on tissue that did not undergo IMS analysis did not show any sign of tearing. When considering these artefacts and the small dimension of the GM deposits (~15 μm), tight realignment of the IMS and IHC data sets can be extremely tedious. Nonetheless, realignment of both data sets was achieved enabling the direct correlation of anti-GM3-IHC stain to the GM2 and GM3 IMS ion images. Figure 4.3 shows the realigned ion image for GM3-C20:0 at m/z 1207.6 with its corresponding GM3-IHC where it can be observed that significant portions of the highlighted features of the IHC staining were found in the IMS ion image. Looking at the second arrow from the bottom of the IMS data (Figure 4.3a), a one to two pixel wide deposit is observed that may have been ruled as an imaging artifact (one pixel with high intensity) without the realigned IHC information showing that indeed a GM3 deposit is present at the location where signal was detected. Others have performed same section staining and realignment but never for such small features.^{204,205} In the case of HD, because of the small three dimensional structure of the deposits, such an IMS / IHC realignment is crucial when considering that serial 12 μm thick sections display highly different GMs deposits distributions.

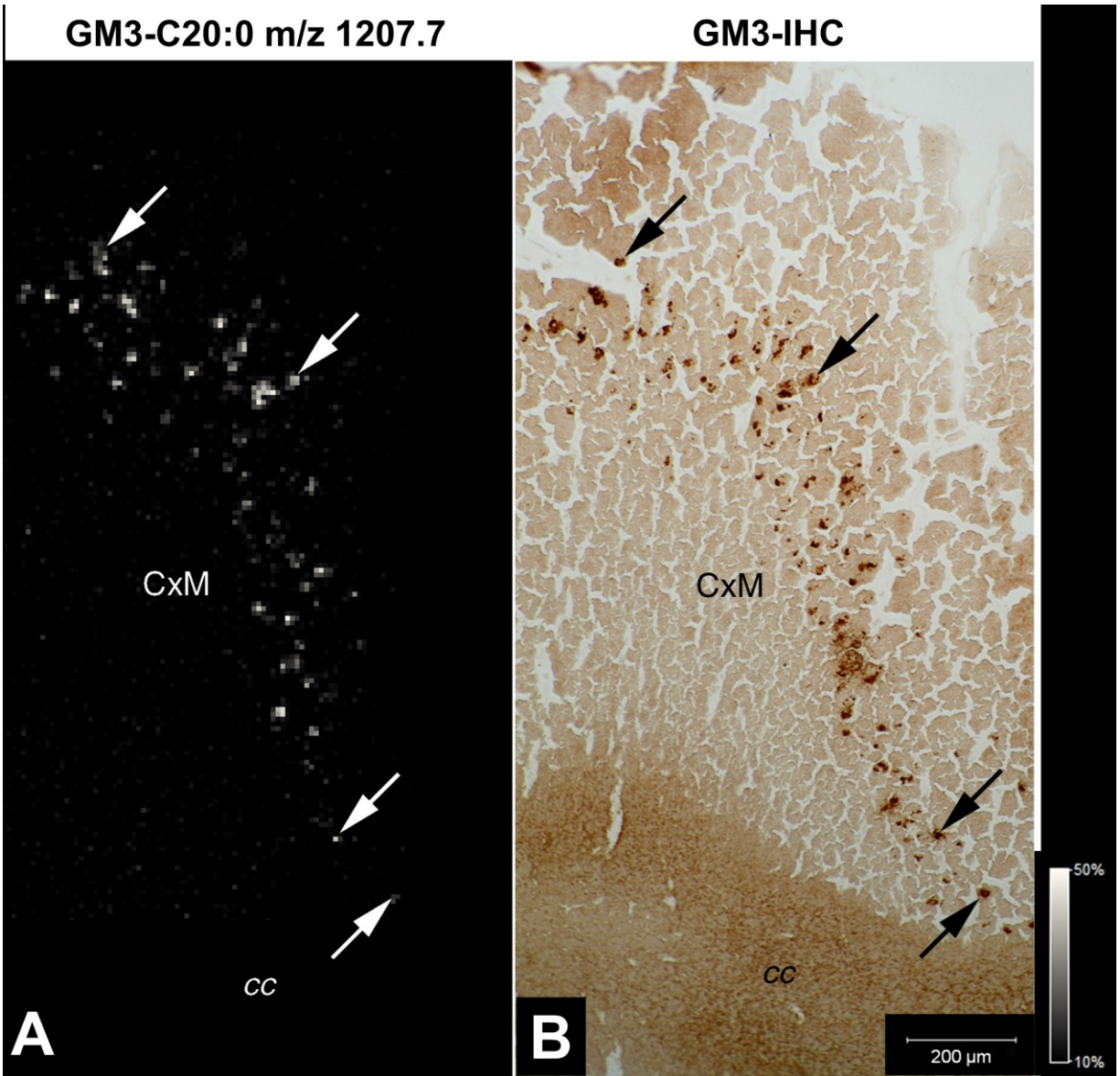


Figure 4.3 : Comparative images of GM3 immunostaining and MALDI IMS signal for GM3-C20:0 at m/z 1207.7 in medial cerebral cortex. A: MALDI-MS image of GM3-C20:0 at m/z 1207.7 in CxM obtained with 5 μm spatial resolution. B: image of GM3 immunostaining in pyramidal neurons in CxM (arrows). Magnification: x75. GM3 co-localization is evident (arrows). Abbreviations: cc- corpus callosum; CxM – medial cortex.

As previously stated, not only GM3 but also GM2 and GM1 were detected during the MS and IMS analyses. Overall, GM3 and GM2 species ion images were found to correlate well with the GM3-IHC (Figure 4.4). GM1 IMS analysis presented a homogenous distribution throughout each studied histological features without any correlation with GM3-IHC (Sup. Fig. 7). Similarly, all of the observed phospholipid signals had identical distributions between the IDS-KO mice and the control mouse again without any noticeable correlation with GM3-IHC staining (not shown).

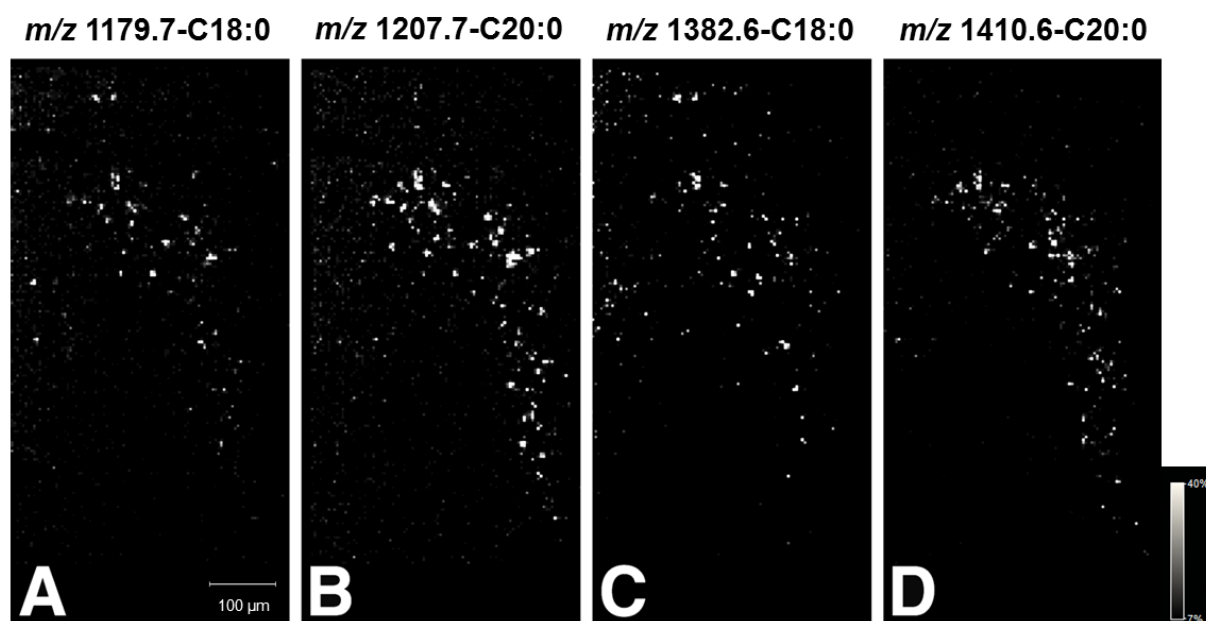


Figure 4.4 : 5 μ m spatial resolution MALDI IMS images acquired from a medial brain cortex (CxM) tissue section of the IDS-KO mouse #5. A: Ion image of GM3-C18:0 at m/z 1179.7. This image overlaps partially with images in (B, C and D), suggesting molecular heterogeneity of ganglioside deposits. **B:** Ion image of GM3-C20:0 at m/z 1207.7. When comparing IMS spatial distribution and signal intensity, GM3-C20:0 seems to predominate over its 18-carbon chain counterpart (in A). **C:** Ion image of GM2-C18:0 at m/z 1382.6. Partial

overlapping is evident with its C20:0 chain counterpart (in D). **D:** Ion image of GM2-C20:0 species at m/z 1410.6. Partial overlapping is evident with (C). Magnification x45

We also wanted to verify the spatial correlation of all of the GM2 and GM3 species identified. Interestingly, the ion signals between GM2-C18:0 and GM3-C18:0 were found to have the highest correlation ($r = 0.74$). The correlation between the ion signals for GM2-C20:0 and GM3-C20:0 species was also very good ($r = 0.76$) indicating that C18:0 as well as C20:0 GMs correlated better with each other. While a very good correlation is achieved between both of the C18:0 and C20:0 GMs in respect to the anti-GM3 IHC staining, none of the two perfectly correlates with all individual deposits found in the IHC (Figure 4.5, Sup. Table 2, and Sup. Fig. 8). Even though C18:0 and C20:0 GMs correlated better with each other, the correlations factors for the combinations between C18:0 and C20:0 GMs are also quite satisfactory but of lower r values (Sup. table 2). This indicates that in IdS-KO mice, certain neurons preferentially accumulate similar levels of either the C18:0 or C20:0 GM3 and GM2. In certain GM deposits, only one of the two GMs specie fatty acid chain lengths was detected, which either indicates the absence of the other chain length specie or that its amounts are below the limit of detection. This could induce some bias in the correlation values however, this further demonstrates or confirms the differential expression of GM2 and GM3 species with different fatty acid chain length in certain neurons. This is to our knowledge the first observation in HD of a heterogeneous distribution of GMs based on their fatty acid chain length. Current IHC approaches can only differentiate GMs based on the composition of their sugar head groups.

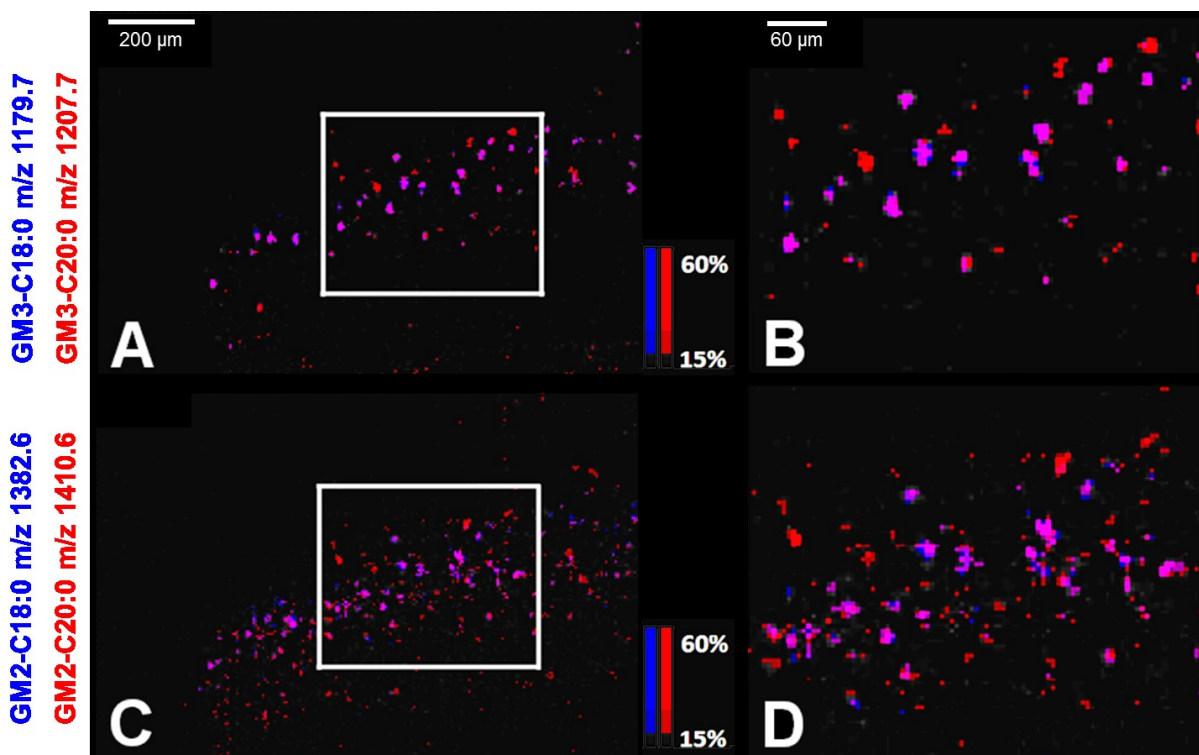


Figure 4.5 : 5 μm spatial resolution MALDI IMS images acquired from a medial brain cortex (CxM) tissue section of the IDS-KO mouse #1. A: Overlay of Ion images from GM3-C18:0 (blue) and GM3-C20:0 (red) species at m/z 1179.7 and m/z 1207.7, respectively (magnification $\times 75$). Squared area is further shown in **B**: at higher magnification ($\times 210$). Several deposits exclusively show GM3-C20:0 accumulation. When the two forms of ganglioside GM3 co-localize the colour is pink. **C:** Overlay of Ion images from GM2-C18:0 (blue) and GM2-C20:0 (red) species at m/z 1382.6 and m/z 1410.6, respectively (magnification $\times 75$). Squared area is further shown in **D**: at higher magnification ($\times 210$). A few deposits exclusively show GM2-C20:0 accumulation. When two forms of ganglioside GM2 co-localize the colour is pink.

4.5 Conclusion

On-tissue high spatial resolution (5 μm) MALDI IMS analyses can enable the detection of key molecules in perfect correlation with very fine (<15 μm) underlying histological features. High spatial resolution lipid IMS followed by GM3-IHC was performed on the same IdS-KO mouse brain sections to reveal the molecular composition of ganglioside deposits found in this HD animal model. Realignment of both data sets was done using tissue specific features (edge, visible histologies, etc.) and has revealed that two species of GM3 and GM2 (C18:0 and C20:0) highly correlated with the IHC-revealed GM3 deposits. It was also observed that levels of C18:0 and C20:0 GM3 and GM2 were highly heterogeneous within these GM3 deposits with certain neurons having higher correlation with GM3 and GM2 C18:0 ($r = 0.74$) or with GM3 and GM2 C20:0 ($r = 0.76$). To confirm the identity of the observed signals, characterisation by both exact mass and MS/MS fragmentation performed directly on tissue and the results compared to a standard of GM3. The ability to apply two different imaging methods on a single tissue section was seen here to increase the information at the cellular level from a given sample. In the case of HD, it also provided a new way of identifying and correlating GM signals involved in the pathology. The serial IMS and IHC methods developed here should enable further research into the molecular composition of afflicted neurons in the context of HD and other neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease where deposits or plaques are observed.

4.6 Supporting information:

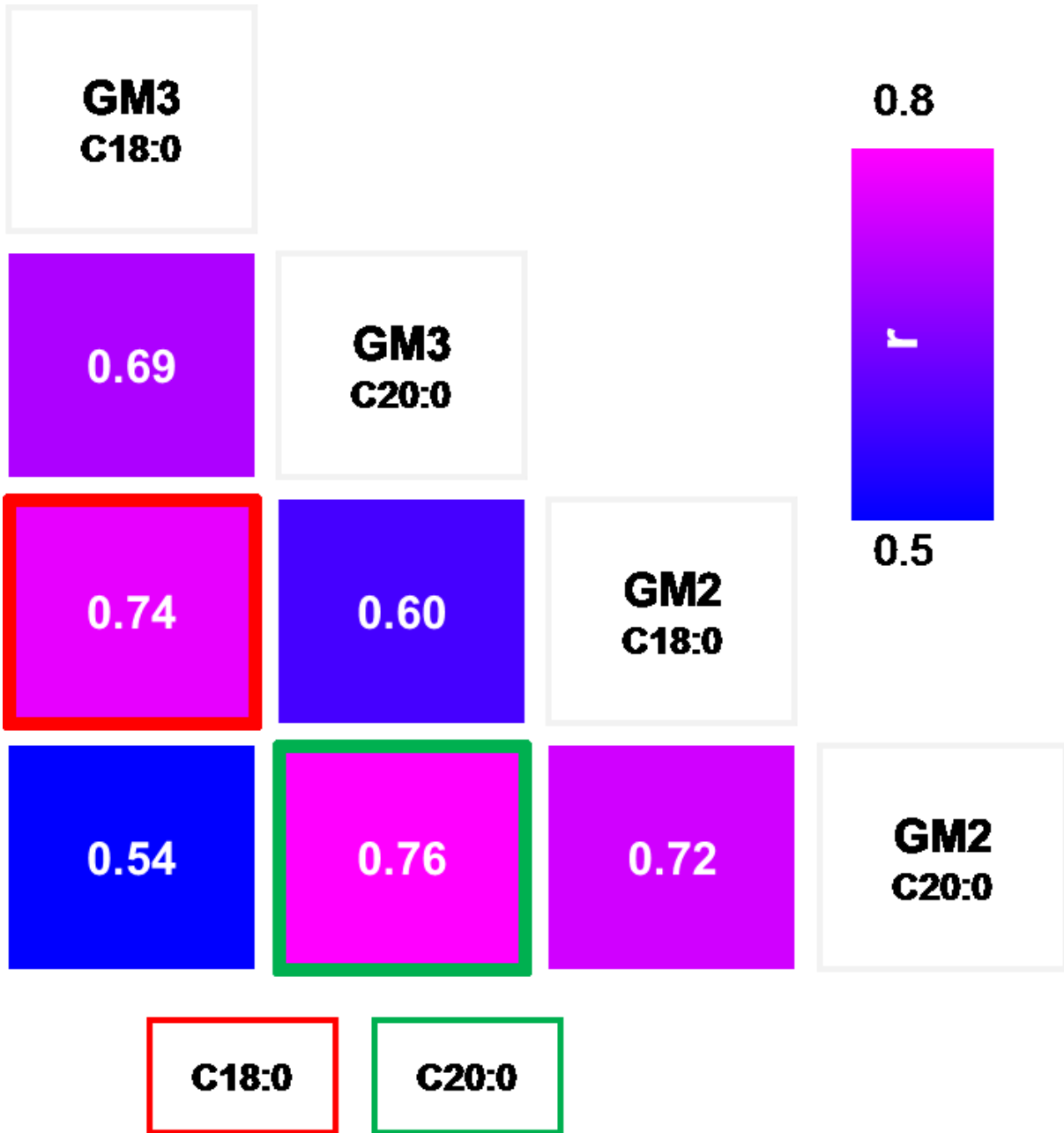
Anti-GM3 Immunohistochemistry

1. Fixation tissue in 4% formaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer, 60 minutes at room temperature (RT) followed by a dehydration step in a series of alcohols 50%, 70%, 80%, 90%, 100%, 100% 20 seconds each.
2. Second fixation of the tissue in 4% formaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer, for 30 minutes followed by a wash in 1x Phosphate buffered saline (PBS x1) 3 x 5 minutes.
3. Immersion slides in boiling PBS 1x for 2 minutes and left off to RT followed by wash in PBS 1x for a few seconds.
4. Incubation overnight at 4°C with GM3 antibody diluted 1:300 in PBS 1x containing 1% bovine serum albumin (BSA). GM3 (NeuAc) monoclonal antibody clone M2590 was purchased from the COSMO BIO CO (cat. # NBT-M101/1023) followed by wash in BPS 1x 3 times for 5 minutes.
5. Incubation for 20 minutes at RT in a presence of second antibody biotinylated anti-mouse IgG affinity purified diluted 1:300 (cat. # BA-9200, Vector Laboratories) followed by a wash in PBS 1x 3 times 3 minutes.
6. Incubation for 30 minutes at RT in a presence of the Elite ABC Reagent (cat. # PK-7100, Vector Laboratories) followed by a wash in PBS 1x 3 times for 3 minutes.
7. Enzymatic reaction of the horseradish peroxidase was revealed using a Kit ImmPACT DAB (cat. #SK-4105, Vector Laboratories) followed by wash in PBS 1x.

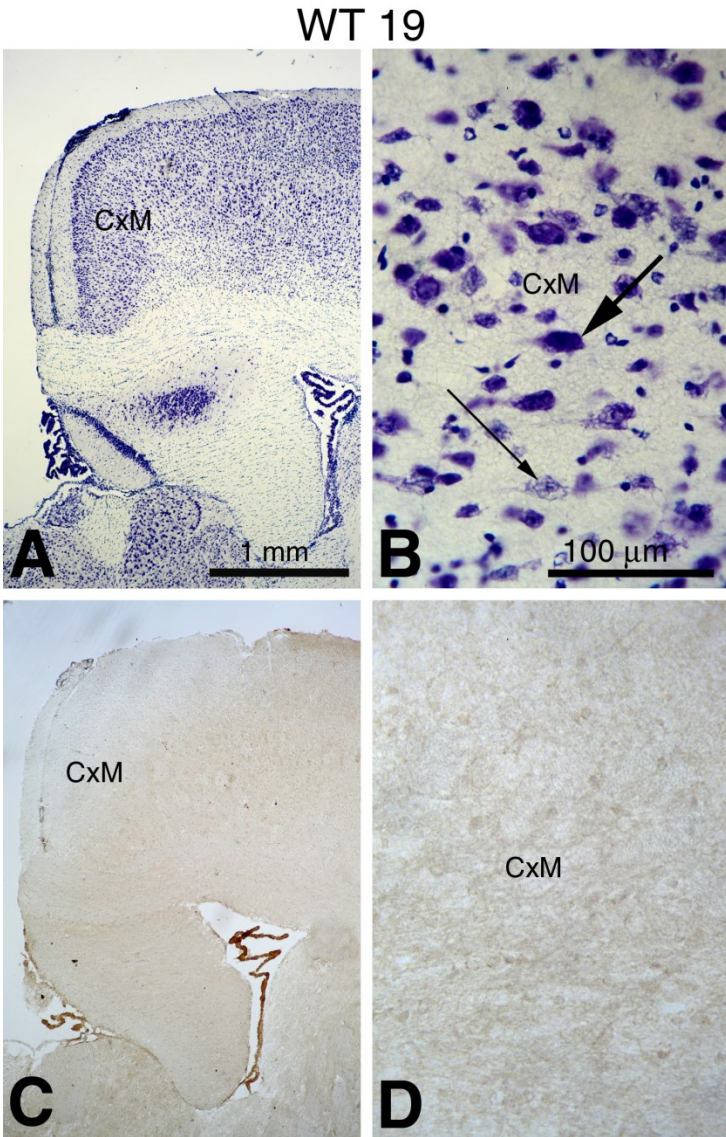
8. Dehydration in a series of alcohols, clearance in xylene and mounting in Permount.

#	Brain structure	Abbreviation	Average Alcian blue	Average GM3
1	Mitral cells, olfactory lobe	Mi	+	++
2	Prefrontal cortex	<u>PfCx</u>	++	+++
3	Cerebral cortex, medial	<u>CxM</u>	++++	+++++
4	Cerebral cortex, parietal	<u>CxP</u>	++	+++
5	Cerebral cortex, occipital	<u>CxO</u>	+++	+++
6	Striatum	<u>Str</u>	+++	+++
7	Subiculum	<u>Su</u>	+++	++++
8	Bed n. <u>stria terminalis</u> , hypothalamus	BST	+++	+++
9	Medial preoptic area, hypothalamus	MPO	+++	+++
10	Lateral preoptic area, hypothalamus	LPO	+++	+++
11	N. septum <u>lateralis</u> , hypothalamus	NSL	++++	++++
12	<u>Substantia nigra</u>	SN	++	+++
13	N. <u>amygdaloideus, centralis</u>	<u>AmCe</u>	++	+++
14	N. <u>amygdaloideus corticalis</u>	<u>AmCx</u>	++	+++
15	<u>Stratum pyramidalis hippocampi</u>	<u>SPHi</u>	+++	+++
16	Lamina <u>principalis externa presubiculi</u>	<u>LPEpS</u>	++++	+++++

Supplemental Table 1: Alcian blue staining and GM3 immunostaining in IDS-KO mouse brain. Key to score immunostaining intensity per cell: - = undetectable; + = very weak; ++ = weak; +++ = medium; ++++ = strong; +++++ very strong; ne = not examined.

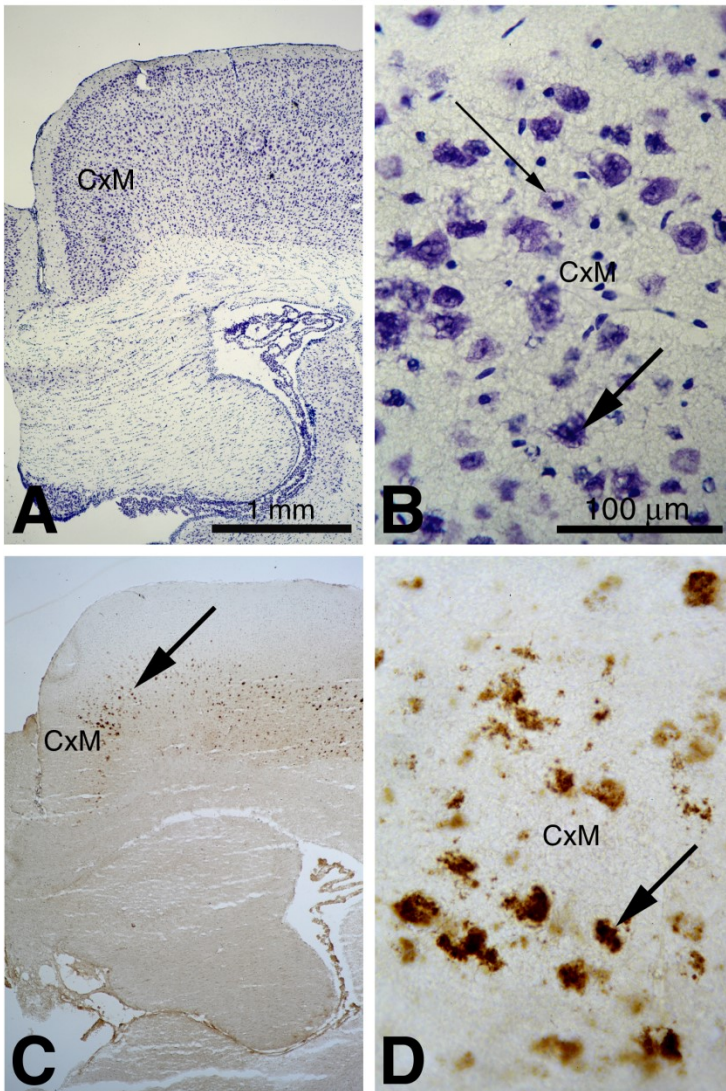


Supplemental Table 2: Pearson correlation r value of GM 2 and GM 3 species correlogram. The red and green boxes highlight the correlation values between C18:0 and C20:0 species, respectively.



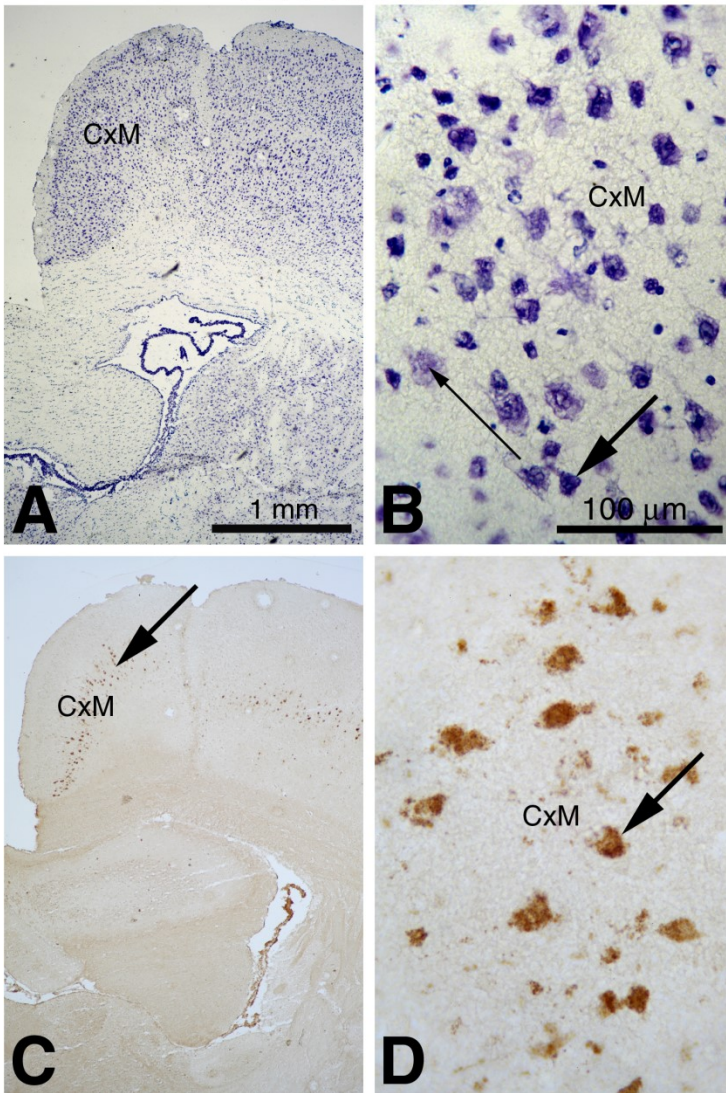
Supplemental Figure 1: Comparative histochemical study in the cerebral cortex medial region (CxM) in wild-type mouse. **A:** CxM region with thionin staining at low magnification. **B:** Fragment of (A) with thionin staining at high magnification. Heavy arrow points neuron with intense cytoplasmic staining. Thin arrow points neuron with weak cytoplasmic staining. **C:** CxM following GM3 immunostaining at low magnification. No GM3 storage is evident. **D:** Fragment of (C) at high magnification. Magnifications: (A and C) = 25 and (B and D) x300.

ISD-KO M19



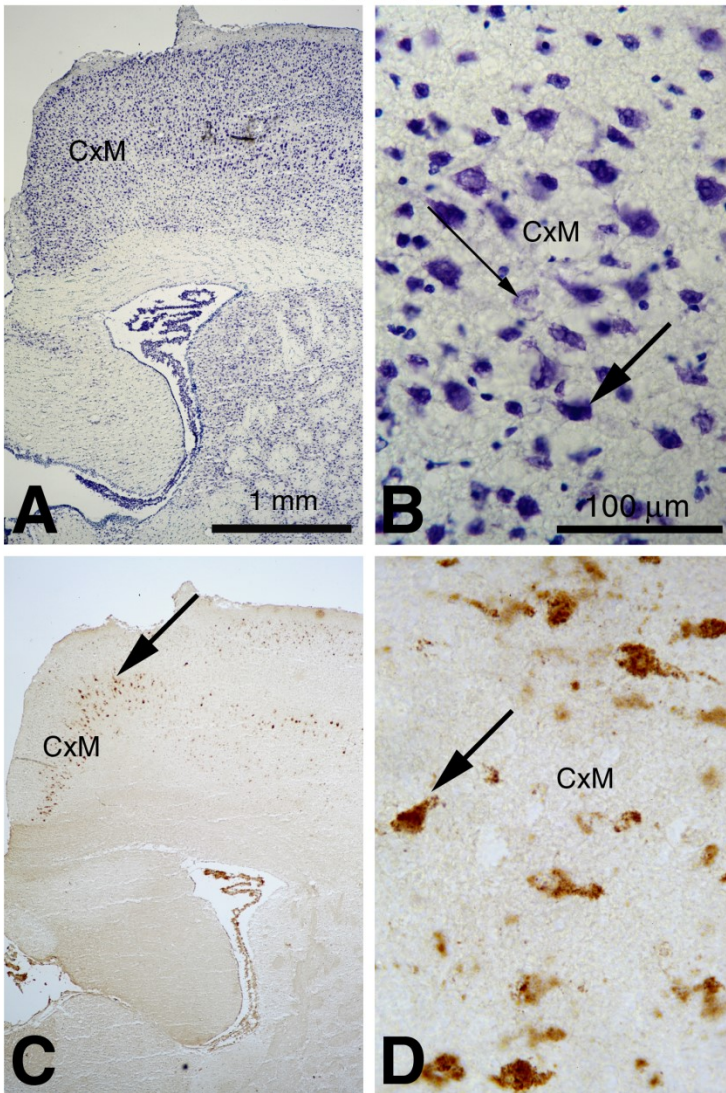
Supplemental Figure 2: Comparative histochemical study in the cerebral cortex medial region (CxM) of IDS-KO 19- week male mouse. **A:** CxM region with thionin staining at low magnification. **B:** Fragment of (A) with thionin staining at high magnification. Heavy arrow points neuron with intense cytoplasmic staining. Thin arrow points neuron with weak cytoplasmic staining. **C:** CxM following GM3 immunostaining at low magnification. Dense GM3 immunostaining is evident (arrow). **D:** Fragment of (C) at high magnification showing dense GM3 immunostaining. Magnifications: (A and C) = 25 and (B and D) x300.

ISD-KO M24

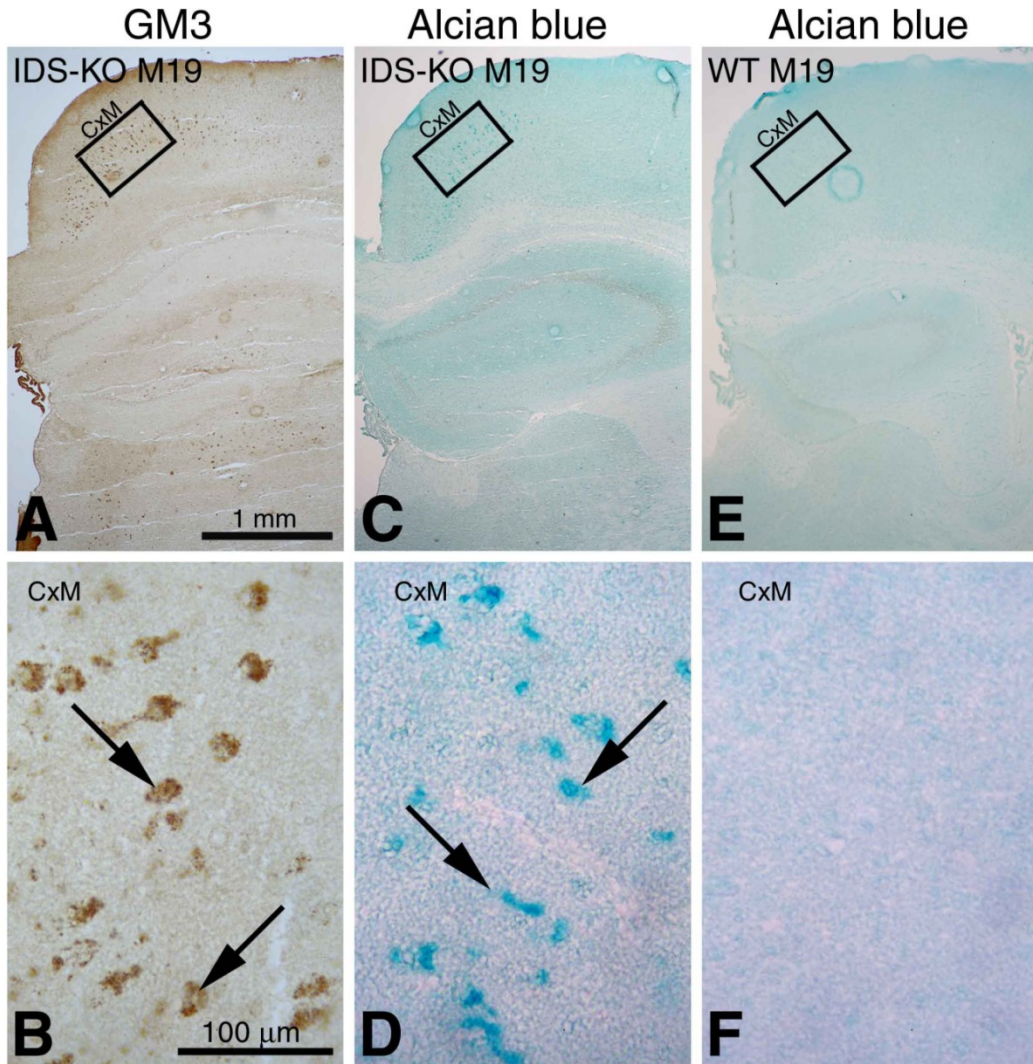


Supplemental Figure 3: Comparative histochemical study in the cerebral cortex medial region (CxM) of ISD-KO 24- week male mouse. A: CxM region with thionin staining at low magnification. **B:** Fragment of (A) with thionin staining at high magnification. Heavy arrow points neuron with intense cytoplasmic staining. Thin arrow points neuron with weak cytoplasmic staining. **C:** CxM following GM3 immunostaining at low magnification. Dense GM3 immunostaining is evident (arrow). **D:** Fragment of (C) at high magnification showing dense GM3 immunostaining. Magnifications: (A and C) = 25 and (B and D) x300.

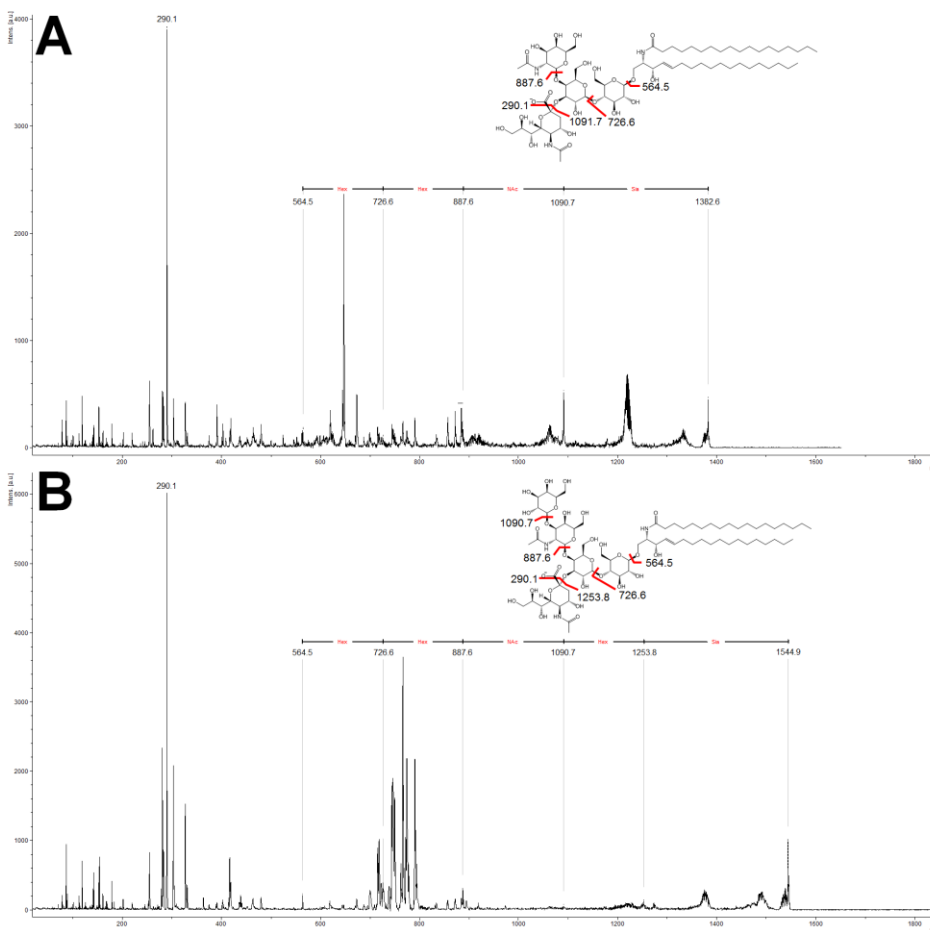
ISD-KO M30



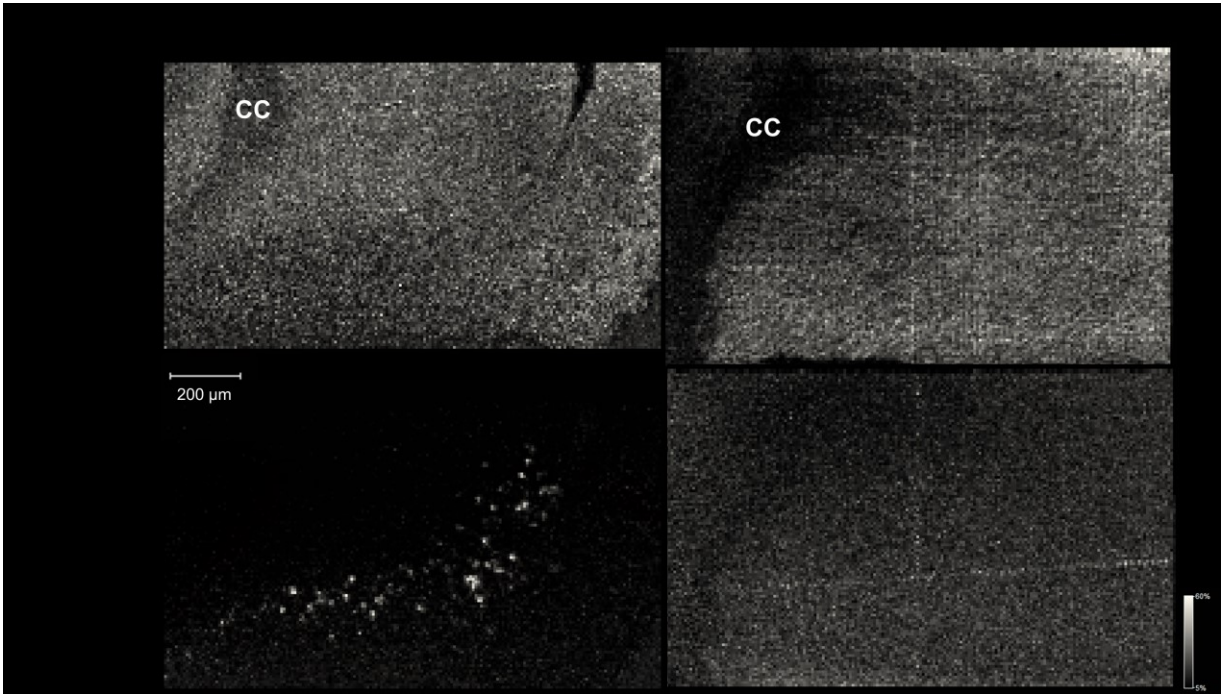
Supplemental Figure 4: Comparative histochemical study in the cerebral cortex medial region (CxM) of IDS-KO 30- week male mouse. A: CxM region with thionin staining at low magnification. **B:** Fragment of (A) with thionin staining at high magnification. Heavy arrow points neuron with intense cytoplasmic staining. Thin arrow points neuron with weak cytoplasmic staining. **C:** CxM following GM3 immunostaining at low magnification. Dense GM3 immunostaining is evident (arrow). **D:** Fragment of (C) at high magnification showing dense GM3 immunostaining. Magnifications: (A and C) = 25 and (B and D) x300.



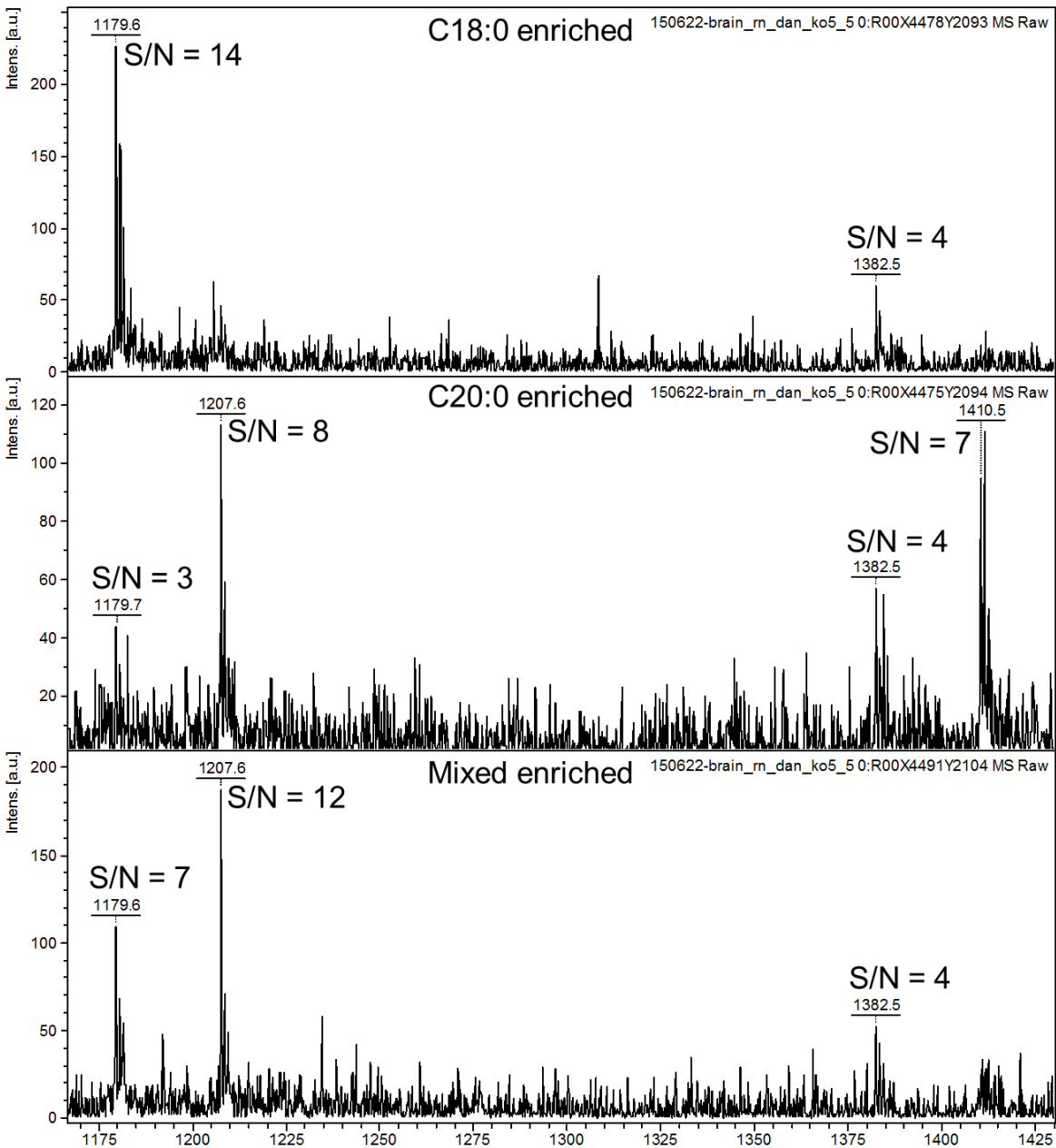
Supplemental Figure 5: Comparative staining with GM3 and alcian blue in medial brain cortex (CxM). A: GM3 immunostaining in IDS-KO mouse. Squared region is shown at high magnification in (B). B: Fragment of (A) with GM3 immunostained neurons (arrows). C: Alcian blue staining in IDS-KO mouse. Squared region is shown at high magnification in (D). D: Fragment of (C) with alcian blue stained neurons (arrows). E: Alcian blue staining in wild-type mouse. No stained neurons are seen. F: Fragment of (E) at higher magnification with unstained tissue. Magnifications: (A, C and E) x 25 and (B, D and F) x300.



Supplemental Figure 6: On-tissue MS/MS identification of the three major ganglioside species. A: GM2-18C MS/MS, which displays the expected 5 diagnostic fragment ions. GM2 fragmentation confirms that the sialic acid leaves first followed by the fragmentation of the residual chain starting from the terminal N-acetylated glucosamine. Sia → NAc → Hex → Hex. **B:** GM1-18C MS/MS which displays the expected 6 diagnostic fragments. GM1 Also displays a similar fragmentation behavior to GM2 with the sialic acid leaving first followed by the glucose and the remainder of the residual sugar chain. Sia → Hex → NAc → Hex → Hex



Supplemental Figure 7: μm spatial resolution MALDI IMS images acquired from a medial brain cortex (CxM) tissue section of the IDS-KO mouse #5 and the control mouse. Ion images for GM1 and GM3-C20 are presented for both animals. The distribution of GM1 in the IDS-KO mouse brain section present the same distribution as in the control brain. No correlation could be inferred between the signal for GM1 and GM3-C20.



Supplemental Figure 8: Representative MALDI MS spectra of the three types of enriched neurons found in IdS-KO mice. C18:0 enriched neurons show very low to no signals attributed to C20:0 GM2 and GM3. C20:0 enriched neurons do show some signals attributed C18:0 GM2 and GM3 species throughout the studied region but with significantly lower intensities than the signals attributed to C20:0 GM2 and GM3. The mixed enriched neurons show quite variable mixtures of C18:0 and C20:0 GM2 and GM3.

Chapitre 5: Conclusions et perspectives

5.1 Conclusions

Dans cette thèse, nous avons développé deux nouvelles méthodes de préparation d'échantillons hautement spécifiques à certaines classes de lipides et une méthode permettant l'analyse par IMS suivie d'une préparation IHC de la même section tissulaire mince. L'importance des lipides dans divers processus biologiques et le développement de méthodes d'IMS permettant leur visualisation ouvrent la porte à de nouvelles découvertes et applications. Nous avons dans un premier temps développé une approche permettant l'imagerie à haute résolution spatiale du cholestérol (CHO) ainsi que de plusieurs acides gras (FAs) à partir de sections tissulaires minces, et ce, après l'application d'une couche nanométrique d'argent. Par la suite, nous avons démontré l'utilité de l'ajout d'un tampon carbonate dopé en sel de sodium couplé à une couche nanométrique d'or pour permettre l'analyse spécifique des TAGs ainsi que des CEs à partir de sections tissulaires minces. Finalement, nous avons adapté la technique de sublimation du 1,5-DAN afin de permettre l'analyse spécifique des gangliosides à partir de sections de cerveau de souris IdS-KO simulant les pathologies de la maladie de Hunter. Ces trois nouvelles méthodes s'inscrivent dans un nouveau mouvement au sein de la communauté MALDI visant le développement de méthodes plus spécifiques et ainsi plus sensible contrairement aux méthodes actuelles qui sont beaucoup plus universel dans leur détection.

L'IMS par argentation est devenue une méthode très robuste pour l'analyse du CHO et des FAs et permet leur détection à de hautes résolutions spatiales (5 μm). L'argentation tire

sa force de la haute reproductibilité de dépôts métallique par pulvérisation en plus d'être hautement spécifique due à l'affinité préférentielle des cations d'argent pour les oléfines. Cette méthode est la première méthode sans matrice permettant l'IMS de section tissulaire mince à haute résolution spatial. Elle fait partie d'un chapitre de livre de méthodologie pour l'IMS à haute résolution spatiale²⁰⁶ en plus d'être décrite dans un deuxième chapitre de méthodologie pour l'IMS de sections tissulaires cancéreuses (Dufresne *et al.*, soumis). Cette méthode a déjà fait ses preuves pour l'analyse de plaque d'athérosclérose¹⁶⁴, pour l'analyse de dépôt lipidique retrouvé dans le cerveau de souris transgénique reproduisant la maladie d'Alzheimer²⁰⁷, et pour l'analyse d'empreinte digitale¹⁷⁵.

L'IMS par CBS-Au-LDI permet la visualisation à haute résolution spatiale des TAGs et des CEs directement à partir de couches tissulaires minces. Cette méthode permet d'augmenter significativement la quantité de sodium présent dans l'échantillon pour permettre l'ionisation des TAGs. Elle exploite aussi un tampon basique afin de diminuer la fragmentation en source des TAGs provenant de la formation d'une espèce protonée instable. Le couplage avec l'or facilite la désorption des analytes tout en s'assurant qu'aucune interaction n'a lieu entre l'agent d'ionisation et l'or limitant ainsi les sources de suppression ionique. Cette méthode représente le premier exemple d'un système où l'ionisation est totalement découplée de la désorption en imagerie LDI. Elle est aussi la première méthode permettant la détection des CEs par LDI IMS. Cette méthode a été appliquée avec succès à l'imagerie de dépôt lipidique se retrouvant dans le cerveau de souris transgénique reproduisant la maladie d'Alzheimer. Grâce à l'IMS, nous avons démontré l'implication de l'acide oléique dans la formation des TAGs se retrouvant dans ces dépôts.²⁰⁷ De plus, notre laboratoire utilise actuellement cette méthode pour l'analyse de la stéatose hépatique humaine.

Finalemment, nous avons développé une méthodologie permettant l'IMS d'une section tissulaire mince par 1,5-DAN-MALDI IMS compatible avec l'application d'un protocole IHC après l'analyse IMS de la section. Cette méthode a permis de visualiser et de réaligner les signaux de gangliosides observés par IMS avec les dépôts de GM3 révélé par IHC. Afin de permettre l'IHC après l'IMS, il a été nécessaire de développer des étapes de lavage afin de retirer le surplus de matrice MALDI avant de pouvoir effectuer le protocole d'IHC. Malgré cela, certains artefacts issus de l'IMS, dont la formation de fissures sur le tissu, sont encore à élucider. Cette recherche représente le premier exemple de l'utilisation de l'IMS par MALDI couplé à une analyse par IHC appliqué à une même section tissulaire afin de réaligner des structures très fine ($\leq 10 \mu\text{m}$).

5.2 Perspectives de recherche

L'IMS est encore aujourd'hui une technique émergente dans le domaine de l'analyse de tissus biologiques. À ce jour, les études histologiques restent le standard dans ce domaine, cependant l'IMS devient petit à petit un outil complémentaire indispensable. Le futur de l'IMS dépend surtout du développement de nouvelles méthodes de préparations d'échantillons qui permettront l'analyse de nouvelles classes de biomolécules actuellement difficiles à détecter. Dans cette optique, le développement de méthodes plus spécifiques et plus sensibles à un petit nombre d'analytes ciblés semble être une meilleure alternative aux approches qui permettent l'analyse simultanée d'un grand nombre d'analytes.

Avec comme objectif l'amélioration de la spécificité et de la sensibilité, l'étude d'autres métaux pouvant agir comme agent d'ionisation et/ou de désorption est attrayante. Certains métaux alcalins ont déjà montré une affinité préférentielle pour certaines molécules

telle que le césium pour les cardiolipides.¹⁰³ D'autres métaux comme le platine ont déjà été utilisé comme agent de désorption en LDI.¹²⁵ Finalement, les oxydes de fer présentent des propriétés optiques dans l'UV qui sont exploitable en LDI IMS. L'étude des métaux reste donc encore peu étudiée en IMS malgré leur grand potentiel.

L'application des méthodes d'IMS par métallisation à l'étude de diverses conditions biologiques reste aussi un domaine à explorer. Des travaux sont actuellement en cours mais il reste encore beaucoup à faire notamment dans l'étude des cancers et de leurs métastases. Nos analyses préliminaires avec l'Ag-LDI et le CBS-Au-LDI IMS ont démontré un grand potentiel surtout à haute résolution spatiale où aucune autre technique (MA)LDI ne permettait de visualiser les espèces détectées. Au-delà du cancer, les maladies neurologiques constituent aussi une avenue de recherche où il est très important d'utiliser des méthodes à la fois hautement reproductibles et très sensibles.

Finalement, il sera important de poursuivre le développement de méthodes permettant l'imagerie multimodale telles que le couplage IMS avec IHC. Le couplage entre l'IMS et d'autres types d'imagerie telles que l'imagerie raman²⁰⁸ ou l'imagerie par plasmon de surface²⁰⁹ sont en cours d'étude. Ces couplages demandent non seulement des modifications aux procédures déjà existantes, mais aussi le développement d'outils permettant de réaligner et de visualiser ces différents jeux de données de façon simultanée.

L'intérêt grandissant pour l'imagerie moléculaire de sections tissulaires minces stimule le développement de méthodes afin de satisfaire aux demandes toujours plus grandes du nombre de molécules à détecter ainsi que des classes de molécules détectables par IMS. Malgré le fait que l'IMS par MALDI reste l'approche la plus utilisée, les avancées récentes en

LDI IMS démontrent le potentiel de celle-ci dans le domaine de l'imagerie à haute spécificité et sensibilité. L'IMS ne se limite pas seulement aux techniques LDI, ce qui lui confère tout son potentiel. La grande variété dans les techniques d'ionisation ainsi que la grande variété d'analyseurs de masse confère de plus en plus de flexibilité à l'IMS soit au niveau de la résolution spatiale atteignable soit au niveau des analytes détectables. Au final, il est encore essentiel de développer de nouvelles méthodologies pour l'IMS de biomolécules ainsi que de développer des méthodes permettant la combinaison de différentes techniques d'imagerie telles que présentées dans cette thèse.

Bibliographie

- (1) Griffiths, J. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 5678-5683.
- (2) Thomson, J. J. *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1913**, *89*, 1-20.
- (3) Hillenkamp, F.; Unsold, E.; Kaufmann, R.; Nitsche, R. *Applied Physics* **1975**, *8*, 341-348.
- (4) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4451-4459.
- (5) Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 850-858.
- (6) Perkins, D. N.; Pappin, D. J. C.; Creasy, D. M.; Cottrell, J. S. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3551-3567.
- (7) Han, X. L.; Gross, R. W. *Mass Spectrometry Reviews* **2005**, *24*, 367-412.
- (8) Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* **1985**, *57*, 2935-2939.
- (9) Posthumus, M. A.; Kistemaker, P. G.; Meuzelaar, H. L. C.; Tennoeverdebrauw, M. C. *Analytical Chemistry* **1978**, *50*, 985-991.
- (10) Karas, M.; Hillenkamp, F. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.
- (11) Zenobi, R.; Knochenmuss, R. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337-366.
- (12) McDonnell, L. A.; Heeren, R. M. A. *Mass Spectrometry Reviews* **2007**, *26*, 606-643.
- (13) Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 1646-1652.
- (14) Schiller, J.; Arnhold, J.; Benard, S.; Muller, M.; Reichl, S.; Arnold, K. *Anal. Biochem.* **1999**, *267*, 46-56.
- (15) Chaurand, P.; Luetzenkirchen, F.; Spengler, B. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 91-103.
- (16) Berndt, P.; Hobohm, U.; Langen, H. *Electrophoresis* **1999**, *20*, 3521-3526.
- (17) Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 5263-5270.
- (18) Koichi Tanaka, H. W., Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida and Tamio Yoshida. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1988**, *2*, 151.
- (19) Sunner, J.; Dratz, E.; Chen, Y. C. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 4335-4342.
- (20) Pan, C. S.; Xu, S. Y.; Hu, L. G.; Su, X. Y.; Ou, J. J.; Zou, H. F.; Guo, Z.; Zhang, Y.; Guo, B. C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 883-892.
- (21) Chen, C. T.; Chen, Y. C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 1956-1964.
- (22) Wei, J.; Buriak, J. M.; Siuzdak, G. *Nature* **1999**, *399*, 243-246.
- (23) Shen, Z. X.; Thomas, J. J.; Averbuj, C.; Broo, K. M.; Engelhard, M.; Crowell, J. E.; Finn, M. G.; Siuzdak, G. *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 612-619.
- (24) Hutchens, T. W.; Yip, T. T. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1993**, *7*, 576-580.
- (25) Jiang, J.; Parker, C. E.; Hoadley, K. A.; Perou, C. M.; Boysen, G.; Borchers, C. H. *Proteomics Clinical Applications* **2007**, *1*, 1651-1659.
- (26) Reid, J. D.; Holmes, D. T.; Mason, D. R.; Shah, B.; Borchers, C. H. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 1680-1686.
- (27) Paul, W.; Steinwedel, H. *RZeitschrift für Naturforschung A* **1953**, *8*, 448-450.
- (28) Stephens, W. E. *Physical Review* **1946**, *69*, 691-691.
- (29) Wiley, W. C.; McLauren, I. H. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150-1157.

- (30) Kingdon, K. H. *Physical Review* **1923**, *21*, 408-418.
- (31) Makarov, A. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 1156-1162.
- (32) Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chemical Physics Letters* **1974**, *25*, 282.
- (33) Yost, R. A.; Enke, C. G. *Journal of the American Chemical Society* **1978**, *100*, 2274-2275.
- (34) Schweikhard, L.; Lindinger, M.; Kluge, H. J. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1990**, *98*, 25-33.
- (35) Shevchenko, A.; Chernushevich, I.; Ens, W.; Standing, K. G.; Thomson, B.; Wilm, M.; Mann, M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 1015-1024.
- (36) Cotter, R. J. *Analytical Chemistry* **1999**, *71*, 445A-451A.
- (37) Alikhanov, S. G. *Soviet Phys. JETP* **1957**, Medium: X; Size: Pages: 452-453.
- (38) Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* *64: No. 1, 82-89(Jan 1973)*. **1973**, Medium: X.
- (39) Mamyrin, B. A. *International Journal of Mass Spectrometry* **2001**, *206*, 251-266.
- (40) Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Review of Scientific Instruments* **1955**, *26*, 1150-1157.
- (41) Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1995**, *9*, 1044-1050.
- (42) Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 1998-2003.
- (43) Al-Saad, K. A.; Zabrouskov, V.; Siems, W. F.; Knowles, N. R.; Hannan, R. M.; Hill, H. H. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2003**, *17*, 87-96.
- (44) Mitchell Wells, J.; McLuckey, S. A. In *Methods in Enzymology*; Academic Press, 2005, pp 148-185.
- (45) Sleno, L.; Volmer, D. A. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39*, 1091-1112.
- (46) Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Analytical Chemistry* **1997**, *69*, 4751-4760.
- (47) Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493-496.
- (48) Chaurand, P. *Journal of Proteomics* **2012**, *75*, 4883-4892.
- (49) Senoner, M.; Unger, W. E. S. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2012**, *27*, 1050-1068.
- (50) Brunelle, A.; Laprevote, O. *Current Pharmaceutical Design* **2007**, *13*, 3335-3343.
- (51) Schwamborn, K.; Caprioli, R. M. *Nature Reviews Cancer* **2010**, *10*, 639-646.
- (52) Stauber, J.; MacAleese, L.; Franck, J.; Claude, E.; Snel, M.; Kaletas, B. K.; Wiel, I.; Wisztorski, M.; Fournier, I.; Heeren, R. M. A. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 338-347.
- (53) Trim, P. J.; Snel, M. F. *Methods* **2016**, *104*, 127-141.
- (54) Zavalin, A.; Todd, E. M.; Rawhouser, P. D.; Yang, J. H.; Norris, J. L.; Caprioli, R. M. *Journal of Mass Spectrometry* **2012**, *47*, 1473-1481.
- (55) Zavalin, A.; Yang, J. H.; Caprioli, R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2013**, *24*, 1153-1156.
- (56) Castellino, S.; Groseclose, M. R.; Wagner, D. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2427-2441.
- (57) Kaspar, S.; Peukert, M.; Svatos, A.; Matros, A.; Mock, H. P. *Proteomics* **2011**, *11*, 1840-1850.
- (58) Li, Y.; Shrestha, B.; Vertes, A. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 407-420.
- (59) Vrkoslav, V.; Muck, A.; Cvacka, J.; Svatos, A. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 220-231.
- (60) Niehoff, A. C.; Kettling, H.; Pirkl, A.; Chiang, Y. N.; Dreisewerd, K.; Yew, J. Y. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 11086-11092.

- (61) Bhandari, D. R.; Schott, M.; Rompp, A.; Vilcinskas, A.; Spengler, B. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 2189-2201.
- (62) Schey, K. L.; Hachey, A. J.; Rose, K. L.; Grey, A. C. *Proteomics* **2016**, *16*, 1767-1774.
- (63) van Amerongen, Y. F.; Roy, U.; Spaink, H. P.; de Groot, H. J. M.; Huster, D.; Schiller, J.; Alia, A. *Zebrafish* **2014**, *11*, 240-247.
- (64) Meriaux, C.; Arafah, K.; Tasiemski, A.; Wisztorski, M.; Bruand, J.; Boidin-Wichlacz, C.; Desmons, A.; Debois, D.; Laprevote, O.; Brunelle, A.; Gaasterland, T.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M. *PLoS One* **2011**, *6*, 1-20.
- (65) Groseclose, M. R.; Massion, P. P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2008**, *8*, 3715-3724.
- (66) Chughtai, K.; Heeren, R. M. A. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3237-3277.
- (67) Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Journal of Proteome Research* **2007**, *6*, 1295-1305.
- (68) Libby, P. *Nature* **2002**, *420*, 868-874.
- (69) Hamaguchi, M.; Kojima, T.; Takeda, N.; Nakagawa, T.; Taniguchi, H.; Fujii, K.; Omatsu, T.; Nakajima, T.; Sarui, H.; Shimazaki, M.; Kato, T.; Okuda, J.; Ida, K. *Ann. Intern. Med.* **2005**, *143*, 722-728.
- (70) Baenke, F.; Peck, B.; Miess, H.; Schulze, A. *Disease Models & Mechanisms* **2013**, *6*, 1353-1363.
- (71) Saltiel, A. R.; Kahn, C. R. *Nature* **2001**, *414*, 799-806.
- (72) Lusis, A. J. *Nature* **2000**, *407*, 233-241.
- (73) Mas, S.; Touboul, D.; Brunelle, A.; Aragoncillo, P.; Egido, J.; Laprevote, O.; Vivanco, F. *Analyst* **2007**, *132*, 24-26.
- (74) Blanksby, S. J.; Mitchell, T. W. In *Annual Review of Analytical Chemistry, Vol 3*, Yeung, E. S.; Zare, R. N., Eds., 2010, pp 433-465.
- (75) Park, S. J.; Yoo, H. Y.; Earm, Y. E.; Kim, S. J.; Kim, J. K.; Kim, S. D. *British Journal of Anaesthesia* **2011**, *106*, 31-37.
- (76) Thomas, M. C.; Mitchell, T. W.; Harman, D. G.; Deeley, J. M.; Murphy, R. C.; Blanksby, S. J. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 5013-5022.
- (77) Hsu, F. F.; Turk, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2008**, *19*, 1673-1680.
- (78) Castro-Perez, J.; Roddy, T. P.; Nibbering, N. M. M.; Shah, V.; McLaren, D. G.; Previs, S.; Attygalle, A. B.; Herath, K.; Chen, Z.; Wang, S. P.; Mitnaul, L.; Hubbard, B. K.; Vreeken, R. J.; Johns, D. G.; Hankemeier, T. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2011**, *22*, 1552-1567.
- (79) Horton, J. D.; Shimomura, I. *Curr. Opin. Lipidology* **1999**, *10*, 143-150.
- (80) Ahmadian, M.; Duncan, R. E.; Jaworski, K.; Sarkadi-Nagy, E.; Sul, H. S. *Future Lipidology* **2007**, *2*, 229-237.
- (81) Brasaemle, D. L.; Wolins, N. E. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287*, 2273-2279.
- (82) Fratantoni, J.; Hall, C. W.; Neufeld, E. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1968**, *60*, 699-706.
- (83) Wraith, J. E.; Scarpa, M.; Beck, M.; Bodamer, O. A.; De Meirleir, L.; Guffon, N.; Lund, A. M.; Malm, G.; Van der Ploeg, A. T.; Zeman, J. *Eur. J. Pediatr.* **2008**, *167*, 267-277.
- (84) Yu, R. K.; Tsai, Y. T.; Ariga, T.; Yanagisawa, M. *Journal of Oleo Science* **2011**, *60*, 537-544.
- (85) Dietschy, J. M.; Turley, S. D.; Spady, D. K. *Journal of Lipid Research* **1993**, *34*, 1637-1659.

- (86) Maxfield, F. R.; Tabas, I. *Nature* **2005**, *438*, 612-621.
- (87) Chang, T. Y.; Chang, C. C. Y.; Ohgami, N.; Yamauchi, Y. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology*; Annual Reviews: Palo Alto, 2006, pp 129-157.
- (88) Faust, P. L.; Kovacs, W. J. *Biochimie* **2014**, *98*, 75-85.
- (89) Tosi, M. R.; Tugnoli, V. *Clin. Chim. Acta* **2005**, *359*, 27-45.
- (90) Murphy, R. C. In *Tandem Mass Spectrometry of Lipids: Molecular Analysis of Complex Lipids*, Murphy, R. C., Ed.; The Royal Society of Chemistry, 2015, pp 1-39.
- (91) Rossmann, B.; Thurner, K.; Luf, W. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly* **2007**, *138*, 437-444.
- (92) Jackson, S. N.; Wang, H.-Y. J.; Woods, A. S. *Analytical Chemistry* **2005**, *77*, 4523-4527.
- (93) Yang, J.; Caprioli, R. M. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 5728-5734.
- (94) Angel, P. M.; Spraggins, J. M.; Baldwin, H. S.; Caprioli, R. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 1557-1564.
- (95) Bahr, U.; Deppe, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 2866-2869.
- (96) Schriemer, D. C.; Li, L. *Analytical Chemistry* **1996**, *68*, 2721-2725.
- (97) Christie, W. W. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1987**, *10*, 148-150.
- (98) Dobson, G.; Christie, W. W.; Nikolovadamyanova, B. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* **1995**, *671*, 197-222.
- (99) Delcorte, A.; Bour, J.; Aubriet, F.; Muller, J. F.; Bertrand, P. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 6875-6885.
- (100) Nygren, H.; Eriksson, C.; Malmberg, P.; Sahlin, H.; Carlsson, L.; Lausmaa, J.; Sjövall, P. *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **2003**, *30*, 87-92.
- (101) Inomata, M.; Takaku, F.; Nagai, Y.; Saito, M. *Anal. Biochem.* **1982**, *125*, 197-202.
- (102) Řezanka, T. *Journal of Chromatography A* **1996**, *727*, 147-152.
- (103) Wang, H. Y. J.; Jackson, S. N.; Woods, A. S. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18*, 567-577.
- (104) Lai, E. P. C.; Owega, S.; Kulczycki, R. *Journal of Mass Spectrometry* **1998**, *33*, 554-564.
- (105) Yalcin, T.; Schriemer, D. C.; Li, L. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1997**, *8*, 1220-1229.
- (106) Nygren, H.; Johansson, B. R.; Malmberg, P. *Microsc. Res. Tech.* **2004**, *65*, 282-286.
- (107) Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Shrivasa, K.; Kashiwagi, Y.; Yamamoto, M.; Nakamoto, M.; Setou, M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2010**, *21*, 1446-1454.
- (108) Jun, J. H.; Song, Z. H.; Liu, Z. J.; Nikolau, B. J.; Yeung, E. S.; Lee, Y. J. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 3255-3265.
- (109) Cerruti, C. D.; Touboul, D.; Guerineau, V.; Petit, V. W.; Laprevote, O.; Brunelle, A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *401*, 75-87.
- (110) Seedorf, U.; Fobker, M.; Voss, R.; Meyer, K.; Kannenberg, F.; Meschede, D.; Ullrich, K.; Horst, J.; Benninghoven, A.; Assmann, G. *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 548-552.
- (111) Delcorte, A.; Medard, N.; Bertrand, P. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4955-4968.
- (112) Patti, G. J.; Woo, H.-K.; Yanes, O.; Shriver, L.; Thomas, D.; Uritboonthai, W.; Apon, J. V.; Steenwyk, R.; Manchester, M.; Siuzdak, G. *Analytical Chemistry* **2010**, *82*, 121-128.
- (113) Emmert, J.; Pfluger, M.; Wahl, F. *Spectroscopy* **2006**, *21*, 62-66.

- (114) Leitner, A.; Emmert, J.; Boerner, K.; Lindner, W. *Chromatographia* **2007**, *65*, 649-653.
- (115) Bahr, U.; Deppe, A.; Karas, M.; Hillenkamp, F.; Giessmann, U. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 2866-2869.
- (116) Kusano, M.; Kawabata, S.-i.; Tamura, Y.; Mizoguchi, D.; Murouchi, M.; Kawasaki, H.; Arakawa, R.; Tanaka, K. *Mass Spectrometry* **2014**, *3*, A0026.
- (117) Ayorinde, F. O.; Garvin, K.; Saeed, K. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, *14*, 608-615.
- (118) Jakab, A.; Nagy, K.; Héberger, K.; Vékey, K.; Forgács, E. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2002**, *16*, 2291-2297.
- (119) Lay, J. O.; Liyanage, R.; Durham, B.; Brooks, J. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20*, 952-958.
- (120) Gidden, J.; Liyanage, R.; Durham, B.; Lay, J. O. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21*, 1951-1957.
- (121) Miyamura, N.; Nakamura, T.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Hayasaka, T.; Yamasaki, T.; Terai, S.; Sakaida, I.; Setou, M.; Nishina, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, *408*, 120-125.
- (122) Horn, P. J.; Sturtevant, D.; Chapman, K. D. *Biochimie* **2014**, *96C*, 28-36.
- (123) McCombie, G.; Knochenmuss, R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2006**, *17*, 737-745.
- (124) Tang, H. W.; Wong, M. Y. M.; Chan, S. L. F.; Che, C. M.; Ng, K. M. *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 453-458.
- (125) Kawasaki, H.; Ozawa, T.; Hisatomi, H.; Arakawa, R. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2012**, *26*, 1849-1858.
- (126) Friso, A.; Tomanin, R.; Alba, S.; Gasparotto, N.; Puicher, E. P.; Fusco, M.; Hortelano, G.; Muenzer, J.; Marin, O.; Zacchello, F.; Scarpa, M. *J. Gene. Med.* **2005**, *7*, 1482-1491.
- (127) Vanhoof, F.; Hers, H. G. *European Journal of Biochemistry* **1968**, *7*, 34-44.
- (128) Crow, J.; Gibbs, D. A.; Cozens, W.; Spellacy, E.; Watts, R. W. E. *J. Clin. Pathol.* **1983**, *36*, 415-430.
- (129) Muenzer, J.; Wraith, J. E.; Beck, M.; Giugliani, R.; Harmatz, P.; Eng, C. M.; Vellodi, A.; Martin, R.; Ramaswami, U.; Gucevav-Calikoglu, M.; Vijayaraghavan, S.; Wendt, S.; Puga, A.; Ulbrich, B.; Shinawi, M.; Cleary, M.; Piper, D.; Conway, A. M.; Kimura, A. *Genet. Med.* **2006**, *8*, 465-473.
- (130) Jack, C. R.; Garwood, M.; Wengenack, T. M.; Borowski, B.; Curran, G. L.; Lin, J.; Adriany, G.; Grohn, I. H. J.; Grimm, R.; Poduslo, J. F. *Magn. Reson. Med.* **2004**, *52*, 1263-1271.
- (131) Thompson, I. M.; Goodman, P. J.; Tangen, C. M.; Lucia, M. S.; Miller, G. J.; Ford, L. G.; Lieber, M. M.; Cespedes, R. D.; Atkins, J. N.; Lippman, S. M.; Carlin, S. M.; Ryan, A.; Szczepanek, C. M.; Crowley, J. J.; Coltman, C. A. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 215-224.
- (132) Espenshade, P. J.; Hughes, A. L. In *Annual Review of Genetics*; Annual Reviews: Palo Alto, 2007, pp 401-427.
- (133) Bischoff-Ferrari, H. A.; Giovannucci, E.; Willett, W. C.; Dietrich, T.; Dawson-Hughes, B. *Am. J. Clin. Nutr.* **2006**, *84*, 18-28.
- (134) Daeseleire, E.; Vandeputte, R.; Van Peteghem, C. *Analyst* **1998**, *123*, 2595-2598.
- (135) Raith, K.; Brenner, C.; Farwanah, H.; Muller, G.; Eder, K.; Neubert, R. H. H. *Journal of Chromatography A* **2005**, *1067*, 207-211.

- (136) Liebisch, G.; Binder, M.; Schifferer, R.; Langmann, T.; Schulz, B.; Schmitz, G. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2006**, *1761*, 121-128.
- (137) Saldanha, T.; Sawaya, A.; Eberlin, M. N.; Bragagnolo, N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4107-4113.
- (138) Seal, J. R.; Porter, N. A. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378*, 1007-1013.
- (139) Owega, S.; Lai, E. P. C. *Journal of Mass Spectrometry* **1999**, *34*, 872-879.
- (140) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. G. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M. *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 1145-1155.
- (141) Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. A. *Toxicol. Pathol.* **2005**, *33*, 92-101.
- (142) Rubakhin, S. S.; Jurchen, J. C.; Monroe, E. B.; Sweedler, J. V. *Drug Discov. Today* **2005**, *10*, 823-837.
- (143) Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprevote, O. *Journal of Mass Spectrometry* **2005**, *40*, 985-999.
- (144) Debois, D.; Brunelle, A.; Laprevote, O. *International Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *260*, 115-120.
- (145) Brunelle, A.; Laprevote, O. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, *393*, 31-35.
- (146) Sjoval, P.; Lausmaa, J.; Nygren, H.; Carlsson, L.; Malmberg, P. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 3429-3434.
- (147) Patti, G. J.; Shriver, L. P.; Wassif, C. A.; Woo, H. K.; Uritboonthai, W.; Apon, J.; Manchester, M.; Porter, F. D.; Siuzdak, G. *Neuroscience* **2010**, *170*, 858-864.
- (148) Jackson, A. U.; Shum, T.; Sokol, E.; Dill, A.; Cooks, R. G. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2011**, *399*, 367-376.
- (149) Wu, C.; Ifa, D. R.; Manicke, N. E.; Cooks, R. G. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 7618-7624.
- (150) Liu, Q.; Xiao, Y. S.; Pagan-Miranda, C.; Chiu, Y. M.; He, L. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 80-88.
- (151) Chaurand, P.; Schriver, K. E.; Caprioli, R. M. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 476-489.
- (152) Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Angel, P. M.; Caprioli, R. M. *Molecular & Cellular Proteomics* **2011**, *10*.
- (153) Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 2048-2054.
- (154) Nygren, H.; Malmberg, P. *J. Microsc.-Oxf.* **2004**, *215*, 156-161.
- (155) Nygren, H.; Malmberg, P.; Kriegeskotte, C.; Arlinghaus, H. F. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 291-293.
- (156) Petryayeva, E.; Krull, U. J. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *706*, 8-24.
- (157) Vogel, A.; Venugopalan, V. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 577-644.
- (158) Nikolova-Damyanova, B. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 1815-1824.
- (159) Sherrod, S. D.; Diaz, A. J.; Russell, W. K.; Cremer, P. S.; Russell, D. H. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 6796-6799.
- (160) Chaurand, P. *Current Trends in Mass Spectrometry* **2011**, *July*, 30-37.
- (161) Jurchen, J. C.; Rubakhin, S. S.; Sweedler, J. V. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1654-1659.
- (162) Danielsson, A. P. H.; Moritz, T.; Mulder, H.; Spegel, P. *Metabolomics* **2012**, *8*, 50-63.
- (163) Norris, J. L.; Caprioli, R. M. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 2309-2342.

- (164) Patterson, N. H.; Doonan, R. J.; Daskalopoulou, S. S.; Dufresne, M.; Lenglet, S.; Montecucco, F.; Thomas, A.; Chaurand, P. *Proteomics* **2016**, 1642-1651.
- (165) Ayorinde, F. O.; Elhilo, E.; Hlongwane, C. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 737-739.
- (166) Picariello, G.; Paduano, A.; Sacchi, R.; Addeo, F. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5391-5400.
- (167) Pittenauer, E.; Allmaier, G. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2009**, *20*, 1037-1047.
- (168) Pannkuk, E. L.; Gilmore, D. F.; Savary, B. J.; Risch, T. S. *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* **2012**, *90*, 1117-1127.
- (169) Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Zaima, N.; Kimura, Y.; Setou, M. *Lipids* **2009**, *44*, 837-848.
- (170) Horn, P. J.; Silva, J. E.; Anderson, D.; Fuchs, J.; Borisjuk, L.; Nazarenus, T. J.; Shulaev, V.; Cahoon, E. B.; Chapman, K. D. *Plant J.* **2013**, *76*, 138-150.
- (171) Nishikawa, K.; Hashimoto, M.; Itoh, Y.; Hiroi, S.; Kusai, A.; Hirata, F.; Sakamoto, T.; Iwaya, K. *FEBS open bio* **2014**, *4*, 179-184.
- (172) Emerson, B.; Gidden, J.; Lay, J. O.; Durham, B. *Journal of Lipid Research* **2010**, *51*, 2428-2434.
- (173) Son, J.; Lee, G.; Cha, S. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, *25*, 891-894.
- (174) Dufresne, M.; Thomas, A.; Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F.; Chaurand, P. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 3318-3324.
- (175) Lauzon, N.; Dufresne, M.; Chauhan, V.; Chaurand, P. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2015**, *26*, 878-886.
- (176) Jackson, S. N.; Baldwin, K.; Muller, L.; Womack, V. M.; Schultz, J. A.; Balaban, C.; Woods, A. S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2014**, *406*, 1377-1386.
- (177) Groseclose, M. R.; Castellino, S. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 10099-10106.
- (178) Altelaar, A. F. M.; Klinkert, I.; Jalink, K.; de Lange, R. P. J.; Adan, R. A. H.; Heeren, R. M. A.; Piersma, S. R. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 734-742.
- (179) Jackson, S. N.; Ugarov, M.; Egan, T.; Post, J. D.; Langlais, D.; Schultz, J. A.; Woods, A. S. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 1093-1098.
- (180) Kallweit, U.; Bornsen, K. O.; Kresbach, G. M.; Widmer, H. M. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1996**, *10*, 845-849.
- (181) Cheng, C. F.; Gross, M. L. *Analytical Chemistry* **1998**, *70*, 4417-4426.
- (182) Hsu, F. F.; Turk, J. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1999**, *10*, 587-599.
- (183) Coleman, R. A.; Lee, D. P. *Prog. Lipid Res.* **2004**, *43*, 134-176.
- (184) Hammond, L. E.; Gallagher, P. A.; Wang, S. L.; Hiller, S.; Kluckman, K. D.; Posey-Marcos, E. L.; Maeda, N.; Coleman, R. A. *Molecular and Cellular Biology* **2002**, *22*, 8204-8214.
- (185) Wood, J. G. *American Journal of Anatomy* **1963**, *112*, 285-303.
- (186) Silvestre, J. S.; Robert, V.; Heymes, C.; Aupetit-Faisant, B.; Mouas, C.; Moalic, J. M.; Swynghedauw, B.; Delcayre, C. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, 4883-4891.
- (187) Wang, X.; Han, J.; Pan, J.; Borchers, C. H. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 638-646.
- (188) Neufeld, E. F.; Muenzer, J. In *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Scriver, C. R., Ed.; McGraw-Hill: New York, 2001, pp 3421-3452.

- (189) Walkley, S. U. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **2004**, *15*, 433-444.
- (190) Walkley, S. U.; Vanier, M. T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **2009**, *1793*, 726-736.
- (191) Muenzer, J.; Fu, H. *American Journal of Human Genetics* **1999**, *65*, A427-A427.
- (192) Muenzer, J.; Lamsa, J. C.; Garcia, A.; Dacosta, J.; Garcia, J.; Treco, D. A. *Acta Paediatrica* **2002**, *91*, 98-99.
- (193) Jung, S.-C.; Park, E.-S.; Choi, E. N.; Kim, C. H.; Kim, S. J.; Jin, D.-K. *Molecules and Cells* **2010**, *30*, 13-18.
- (194) McGlynn, R.; Dobrenis, K.; Walkley, S. U. *The Journal of Comparative Neurology* **2004**, *480*, 415-426.
- (195) Kreutz, F.; Petry, F. d. S.; Camassola, M.; Schein, V.; Guma, F. C. R.; Nardi, N. B.; Trindade, V. M. T. *Gene* **2013**, *527*, 109-114.
- (196) Walkley, S. U. *Acta Paediatrica* **2007**, *96*, 26-32.
- (197) Borrull, A.; López-Martínez, G.; Poblet, M.; Cordero-Otero, R.; Rozès, N. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2015**, *117*, 274-280.
- (198) Krone, N.; Hughes, B. A.; Lavery, G. G.; Stewart, P. M.; Arlt, W.; Shackleton, C. H. L. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **2010**, *121*, 496-504.
- (199) Chen, Y. F.; Allegood, J.; Liu, Y.; Wang, E.; Cachon-Gonzalez, B.; Cox, T. M.; Merrill, A. H.; Sullards, M. C. *Analytical Chemistry* **2008**, *80*, 2780-2788.
- (200) Chan, K.; Lanthier, P.; Liu, X.; Sandhu, J. K.; Stanimirovic, D.; Li, J. J. *Analytica Chimica Acta* **2009**, *639*, 57-61.
- (201) Colsch, B.; Woods, A. S. *Glycobiology* **2010**, *20*, 661-667.
- (202) Weishaupt, N.; Caughlin, S.; Yeung, K. K. C.; Whitehead, S. N. *Front. Neuroanat.* **2015**, *9*, 1-20.
- (203) Zavalin, A.; Yang, J.; Hayden, K.; Vestal, M.; Caprioli, R. M. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 2337-2342.
- (204) Abdelmoula, W. M.; Carreira, R. J.; Shyti, R.; Balluff, B.; van Zeijl, R. J. M.; Tolner, E. A.; Lelieveldt, B. F. P.; van den Maagdenberg, A. M. J. M.; McDonnell, L. A.; Dijkstra, J. *Analytical Chemistry* **2014**, *86*, 3947-3954.
- (205) Heijs, B.; Abdelmoula, W. M.; Lou, S.; Briaire-de Bruijn, I. H.; Dijkstra, J.; Bovée, J. V. M. G.; McDonnell, L. A. *Analytical Chemistry* **2015**, *87*, 11978-11983.
- (206) Thomas, A.; Patterson, N. H.; Dufresne, M.; Chaurand, P. In *Advances in MALDI and laser-induced soft ionization mass spectrometry*, Cramer, R., Ed.; Springer International Publishing: Switzerland, 2016, pp 129-147.
- (207) Hamilton, L. K.; Dufresne, M.; Joppe, S. E.; Petryszyn, S.; Aumont, A.; Calon, F.; Barnabe-Heider, F.; Furtos, A.; Parent, M.; Chaurand, P.; Fernandes, K. J. L. *Cell stem cell* **2015**, *17*, 397-411.
- (208) Bocklitz, T.; Braeutigam, K.; Urbanek, A.; Hoffmann, F.; von Eggeling, F.; Ernst, G.; Schmitt, M.; Schubert, U.; Guntinas-Lichius, O.; Popp, J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 7865-7873.
- (209) Forest, S.; Breault-Turcot, J.; Chaurand, P.; Masson, J. F. *Analytical Chemistry* **2016**, *88*, 2072-2079.