

## Apport des outils de chémobiologie à l'imagerie par spectrométrie de masse

**Résumé** La spectrométrie de masse (MS) est une technique sensible, robuste et rapide permettant l'analyse de mélanges complexes. Certaines MS permettent d'obtenir une analyse localisée et la réalisation d'images aboutissant à la distribution des composés sur des surfaces. Cependant, l'imagerie MS peut rencontrer des limitations pour l'analyse de composés présents en faible quantité. L'imagerie spécifique permet en s'inspirant des méthodes développées en chémobiologie de pallier ses limitations pour imager des marqueurs d'intérêt dans des tissus biologiques. Cet article présente les différents développements réalisés dans ce domaine.

La spectrométrie de masse (MS) est la science analytique permettant de mesurer la valeur de masse-sur-charge ( $m/z$ ) d'ions en phase gazeuse et ainsi d'accéder au poids moléculaire des composés avec une grande précision. Elle permet aussi d'obtenir des informations structurales générées soit par fragmentation (spectrométrie de masse tandem, MS/MS), soit par couplage de la MS avec la mobilité ionique (détermination de section efficace de collision). Cette méthodologie peut être appliquée à des échantillons gazeux, liquides ou solides. Dans ce dernier cas, les méthodes de désorption/ionisation permettent de produire les ions en phase gazeuse sous vide ou à pression atmosphérique, qui sont ensuite séparés en fonction de leur valeur  $m/z$  dans un analyseur où règnent des champs magnétiques/électriques. En effet, les trajectoires des particules chargées dans ces champs sont bien décrites par la physique classique et dépendent directement de la valeur de  $m/z$ . La formation d'ions par désorption/ionisation repose sur l'apport d'énergie en surface de l'échantillon via un faisceau primaire incident conduisant à l'éjection de la matière en phase gazeuse et l'ionisation concomitante des molécules par réactions photochimiques et/ou transferts de protons. Les sources d'énergie utilisées en désorption/ionisation sont principalement de trois types : faisceau laser (LDI, « laser desorption/ionisation » ; MALDI, « matrix-assisted laser desorption/ionisation »), faisceau de particules (SIMS, « secondary ion mass spectrometry ») ou gouttelettes chargées (DESI, « desorption electrospray ionisation »).

D'autres méthodes sont également décrites dans la littérature mais possèdent des domaines d'applications plus restreints, comme la technique LA-ICP (« laser ablation inductively coupled plasma ») pour la spéciation de métaux. Par l'utilisation de sources d'énergie focalisables, il est possible d'enregistrer des spectres de masse représentant l'intensité des signaux détectés en fonction de la valeur de  $m/z$  à des points précis d'une surface. En cartographiant point par point la surface d'un échantillon, on peut ainsi obtenir une collection de spectres de masse identifiés par leurs coordonnées (X, Y). Pour chacun des signaux ainsi détectés, une carte de densité ionique sur la surface – i.e. la distribution de l'ion sur la surface en fonction de son intensité ou son aire de pic, normalisée ou non – peut être reconstruite par des logiciels de reconstruction d'images dédiés [1].

Alors que la technique SIMS (échelle de la dizaine de nanomètres) n'est pas adaptée pour l'analyse de biomolécules de poids moléculaire élevé, telles que les peptides ou les protéines [2], le MALDI permet de déterminer la distribution

des composés de faible poids moléculaire, mais également de macromolécules sous leur forme intacte dans des tissus biologiques jusqu'à une résolution en routine de 10  $\mu\text{m}$  [3]. Même si cette technique a connu de nombreux succès depuis son introduction en 1997 par l'équipe de R. Caprioli [4], elle rencontre certaines limitations face à l'analyse de composés de poids moléculaires élevés (> 30 000-40 000 Da) ou peu abondants dans les tissus.

Afin de pallier ces limitations, la spectrométrie s'est inspirée des méthodes développées en chémobiologie afin de permettre une détection efficace et spécifique de macromolécules au sein de tissus biologiques. Un des premiers exemples dans la littérature, publié en 2007 par l'équipe d'I. Fournier et M. Salzet (Lille), a consisté au développement de sondes dirigées contre une cible spécifique et possédant un groupement photoclivable dont le rapporteur est détaché après irradiation par le faisceau laser du MALDI et détecté par MS [5-6] (voir figure). Cette méthode, appelée « Tag-Mass », permet de corréler le niveau d'expression de différents mRNA ou protéines directement sur des coupes de tissus biologiques en multipliant le nombre de sondes et de rapporteurs associés.

Plus récemment en 2016, l'équipe de B. Moon (Séoul, Corée du Sud) a développé une approche visant à détecter un ensemble de biomarqueurs en multiplex en utilisant des tests basés sur des anticorps via l'utilisation de conjugués de type dithioacétal ne nécessitant plus le dépôt de la matrice sur l'échantillon (technique LDI), comme dans le cas du MALDI [7] et limitant la détection de signaux parasites provenant de la matrice ou du système biologique. Par ailleurs, les auteurs ont montré une détection sensible en 4-plex de ces tags en synthétisant des composés proches en masse et en structure. Des niveaux de sensibilité de l'ordre de quelques fmol sont ainsi rapportés pour la détection de protéines.

Sur une même approche sans dépôt de matrice LDI, l'équipe de C. Bieniarz (Ventana Medical Systems, E.-U.) a développé une méthode permettant d'obtenir une plus grande sensibilité de détection via l'application d'une réaction enzyme/substrat. Ce test indirect repose sur l'utilisation d'un premier anticorps spécifique de la cible choisie, puis d'un second anticorps conjugué avec une enzyme [8], catalysant une réaction de bioconversion d'un substrat (dérivés de naphthol) en un produit insoluble précipitant au niveau du complexe associé et qui sera désorbé/ionisé après irradiation laser. Cette méthode a l'avantage d'avoir été validée sur des tissus enrobés dans la paraffine, qui sont ceux principalement stockés dans les

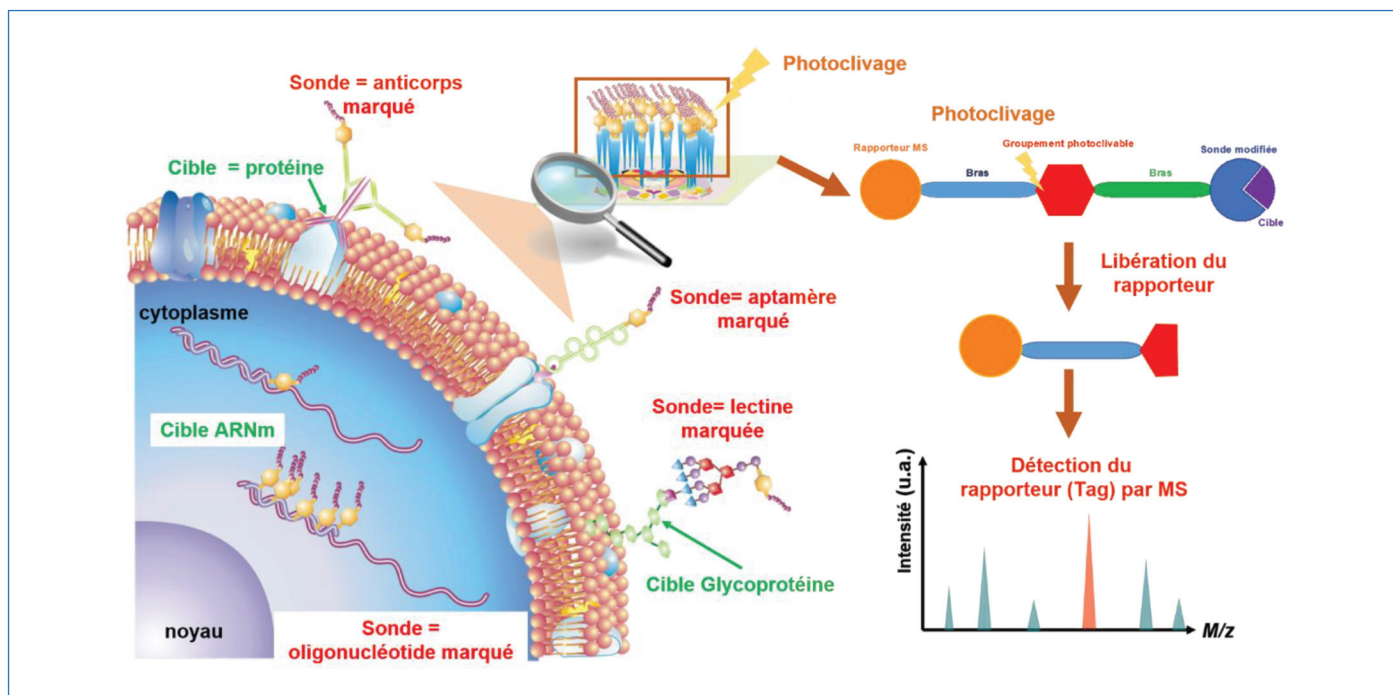


Schéma général de l'approche Tag-Mass [5] ; les sondes marquées peuvent être des anticorps, des oligonucléotides, des lectines...

banques hospitalières. Les auteurs démontrent la capacité d'obtenir la distribution de marqueurs utilisés en routine pour le diagnostic de certains cancers comme la protéine Ki67 dans des tissus ou de HER2 dans des lignées cellulaires. Cette méthode ouvre clairement une piste d'exploration dans la recherche de biomarqueurs du cancer en contexte clinique. Finalement, l'équipe d'A. Casini (Groningen, Pays-Bas) a proposé en 2020 l'utilisation de complexes de Ru(II)-polypyridine comme rapporteurs pour l'imagerie LDI. Ces complexes permettent l'émission d'un fragment chargé sous photoactivation et les fragments présentent un massif isotopique particulier qui permet une identification sans ambiguïté du signal correspondant à la sonde par rapport à des signaux endogènes provenant des tissus biologiques. Ce système a été démontré pour la détection d'intégrines  $\alpha v \beta 3$ , marqueur de métastases des tumeurs, sur des biopsies de carcinome épidermoïde de l'hypopharynx, démontrant l'intérêt en clinique de ces stratégies d'imagerie MS [9]. Il est à noter que les complexes Ru(II) peuvent être optimisés en termes de ligand afin d'absorber à la longueur d'onde UV des différents lasers présents sur les spectromètres de masse commerciaux (266, 337 et 355 nm), mais aussi dans le domaine IR afin de permettre une meilleure pénétration des photons dans les tissus. Ces développements ont d'ailleurs été source d'inspiration et ont été repris pour développer des stratégies similaires mais reposant sur d'autres techniques d'imagerie MS, comme l'imagerie LA-ICP via des anticorps couplés à des métaux, introduite par Bodenmiller *et coll.* et commercialisée par la société Fluidigm [10].

Ces exemples démontrent un dialogue fructueux entre la spectrométrie de masse et la chémobiologie. Ces travaux pionniers ouvrent la voie à des méthodes de plus en plus efficaces et sensibles de multiplexage permettant la localisation de plusieurs dizaines de cibles en parallèle à partir de tissus conservés en banque dans les hôpitaux. Au-delà de l'imagerie MS, ce dialogue est aussi important dans les

domaines plus larges que sont les sciences omiques, telles que la protéomique, la métabolomique ou l'épigénétique, ouvrant la voie à des projets interdisciplinaires innovants.

- [1] D. Touboul, A. Brunelle, O. Laprévotte, Mass spectrometry imaging: towards a lipid microscope?, *Biochimie*, **2011**, 93, p. 113-119.
- [2] C. Bich, D. Touboul, A. Brunelle, Cluster TOF-SIMS imaging as a tool for micrometric histology of lipids in tissue, *Mass Spectrom. Rev.*, **2014**, 33, p. 442-451.
- [3] J. Quanic, J. Franck, M. Wisztorski, M. Salzet, I. Fournier, Progress and potential of imaging mass spectrometry applied to biomarker discovery, *Methods Mol. Biol.*, **2017**, 1598, p. 21-43.
- [4] R.M. Caprioli, T.B. Farmer, J. Gile, Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS, *Anal. Chem.*, **1997**, 69, p. 4751-760.
- [5] R. Lemaire *et al.*, Tag-mass: specific molecular imaging of transcriptome and proteome by mass spectrometry based on photocleavable tag, *J. Proteome Res.*, **2007**, 6, p. 2057-067.
- [6] H. Gagnon *et al.*, Targeted mass spectrometry imaging: specific targeting mass spectrometry imaging technologies from history to perspective, *Prog. Histochem. Cytochem.*, **2012**, 47, p. 133-174.
- [7] N. Kang *et al.*, Design and synthesis of new mass tags for matrix-free laser desorption ionization mass spectrometry (LDI-MS) based on 6,11-dihydrothiochromeno[4,3-b]indole, *Tetrahedron*, **2016**, 72, p. 5612-619.
- [8] R. Hong, J. True, C. Bieniarz, Enzymatically amplified mass tags for tissue mass spectrometry imaging, *Anal. Chem.*, **2014**, 86, p. 1459-467.
- [9] J. Han *et al.*, Targeted imaging of integrins in cancer tissues using photocleavable Ru(II) polypyridine complexes as mass-tags, *Chem. Commun.*, **2020**, 56, p. 5941-944.
- [10] B. Bodenmiller *et al.*, Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators, *Nat. Biotechnol.*, **2012**, 30, p. 858-867.

#### David TOUBOUL,

Directeur de recherche CNRS, Université Paris-Saclay, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, Gif-sur-Yvette.

#### Isabelle FOURNIER,

Professeure, Université de Lille, Inserm, U-1192, Laboratoire Protéomique, Réponse Inflammatoire et Spectrométrie de Masse (PRISM), Lille.

\* david.touboul@cnsr.fr ; isabelle.fournier@univ-lille.fr