

Nouvelles Applications Biologiques du TOF-SIMS avec les Sources d'Ions Polyatomiques



01 décembre 2006

Alain BRUNELLE

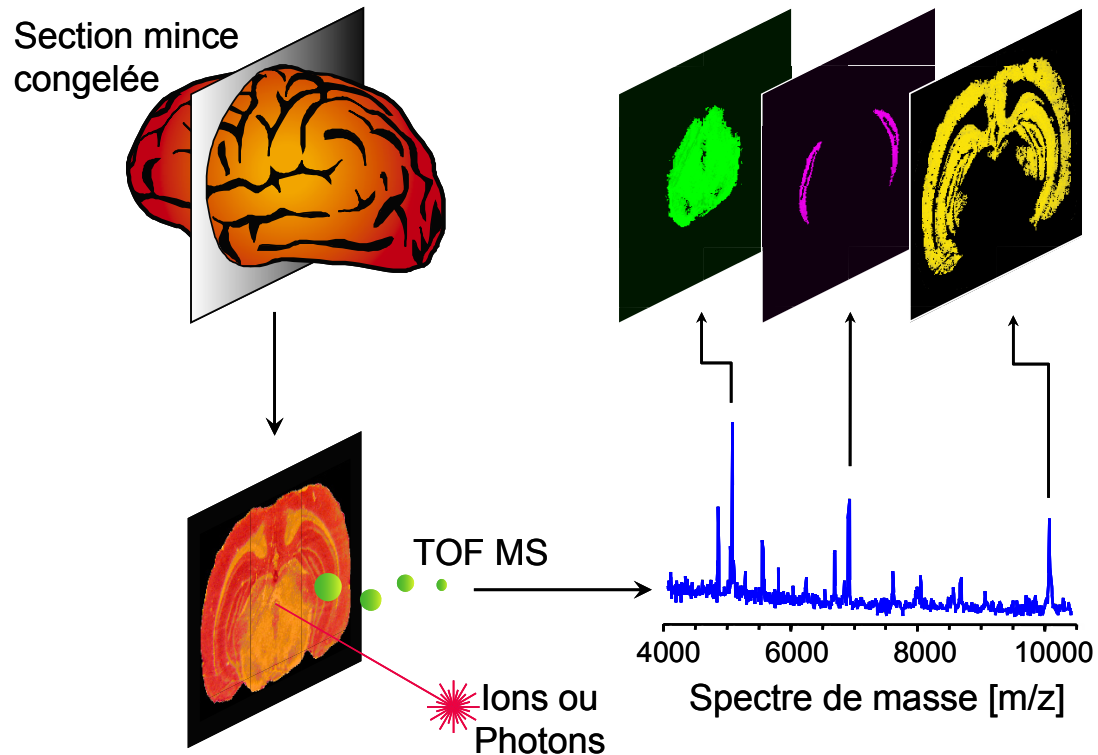


Laboratoire de Spectrométrie de Masse
Institut de Chimie des Substances Naturelles
Gif sur Yvette

Alain.Brunelle@icsn.cnrs-gif.fr



Imagerie par Spectrométrie de Masse par Temps de Vol



- **Images TOF-MS**
 - Cartes de densité ionique
 - Analyseur par temps de vol (TOF): analyse parallèle de tous les ions
 - 1 acquisition = autant d'images potentielles qu'il y a de pics dans les spectres ! et autant de spectres que de pixels...
 - Très grande quantité de données
- **Laser UV: MALDI-TOF**
- **Sonde ionique: TOF-SIMS**

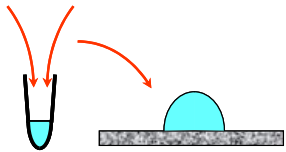
Stoeckli, Chaurand, Hallahan, Caprioli, Nature Medecine **2001**, 7, 493-496.

Comparaison MALDI et SIMS



Le MALDI* "intègre" sur plusieurs microns de profondeur

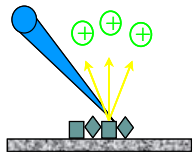
*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization



Mélange entre la MATRICE et une molécule échantillon (5000 pour 1)



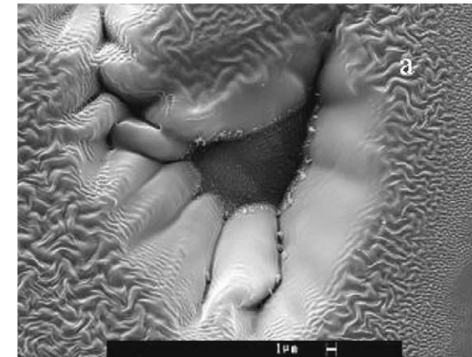
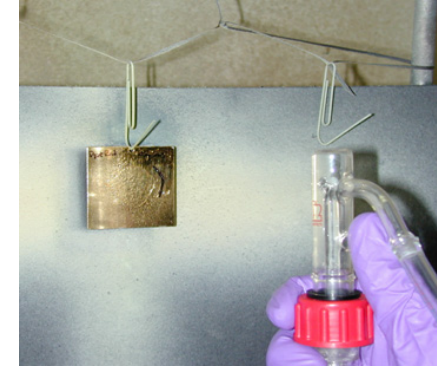
Co cristallisation (échantillon solide)



Impulsion Laser UV (10^6 W.cm^{-2})

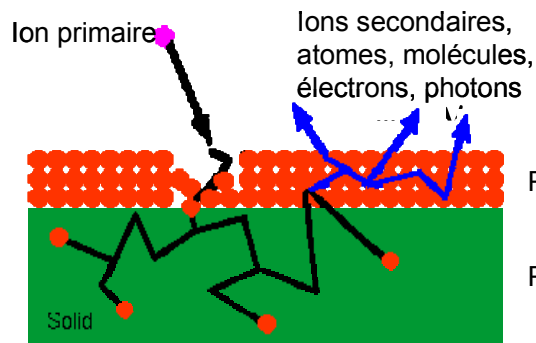
Désorption - Ionisation des molécules échantillons (Ions moléculaires $[M+H]^+$)

Analyse des ions moléculaires par spectrométrie de masse par temps de vol



Surface d'un cristal d'acide sinapinique après irradiation par 256 tirs laser (N_2 337 nm, $2.5 \mu\text{J/pulse}$)
I. Fournier, J.C. Tabet, G. Bolbach, Int. J. Mass Spectrom. 2002, 219, 515-524

Le SIMS est une analyse de surface (mode statique)



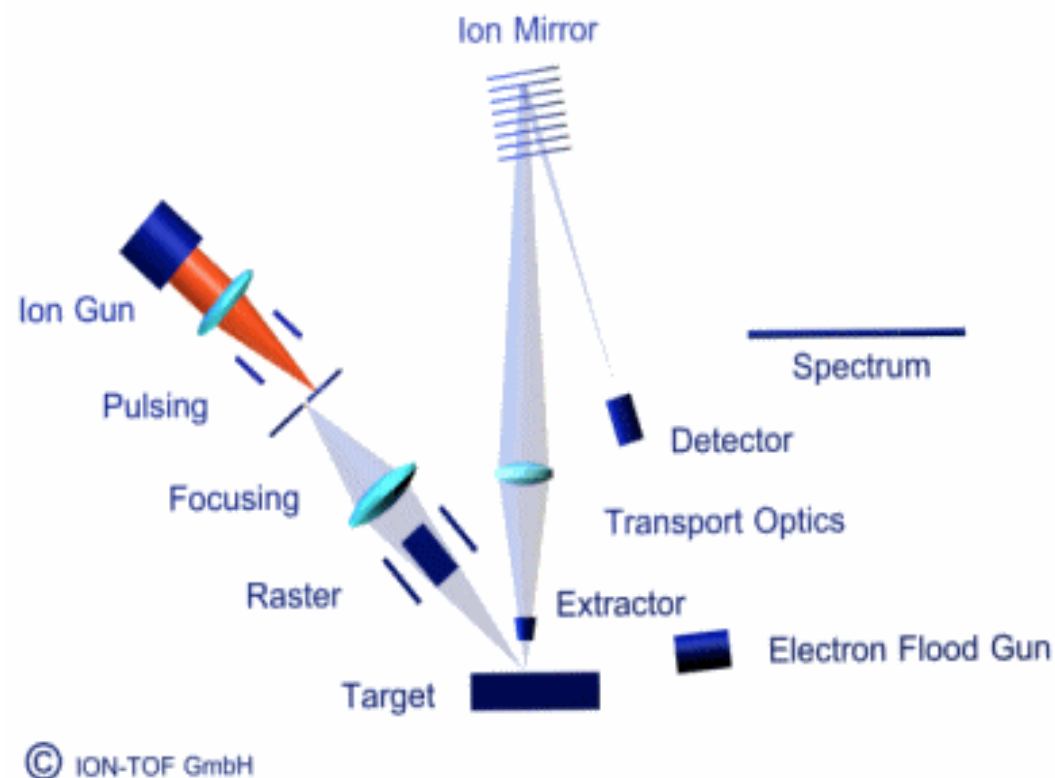
Profondeur d'analyse (50-100 Å)

Profondeur endommagée (100-500 Å)

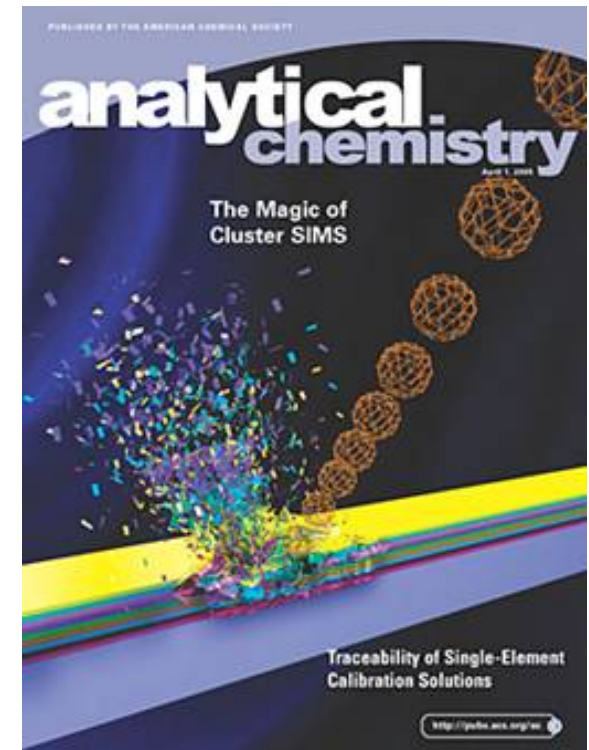
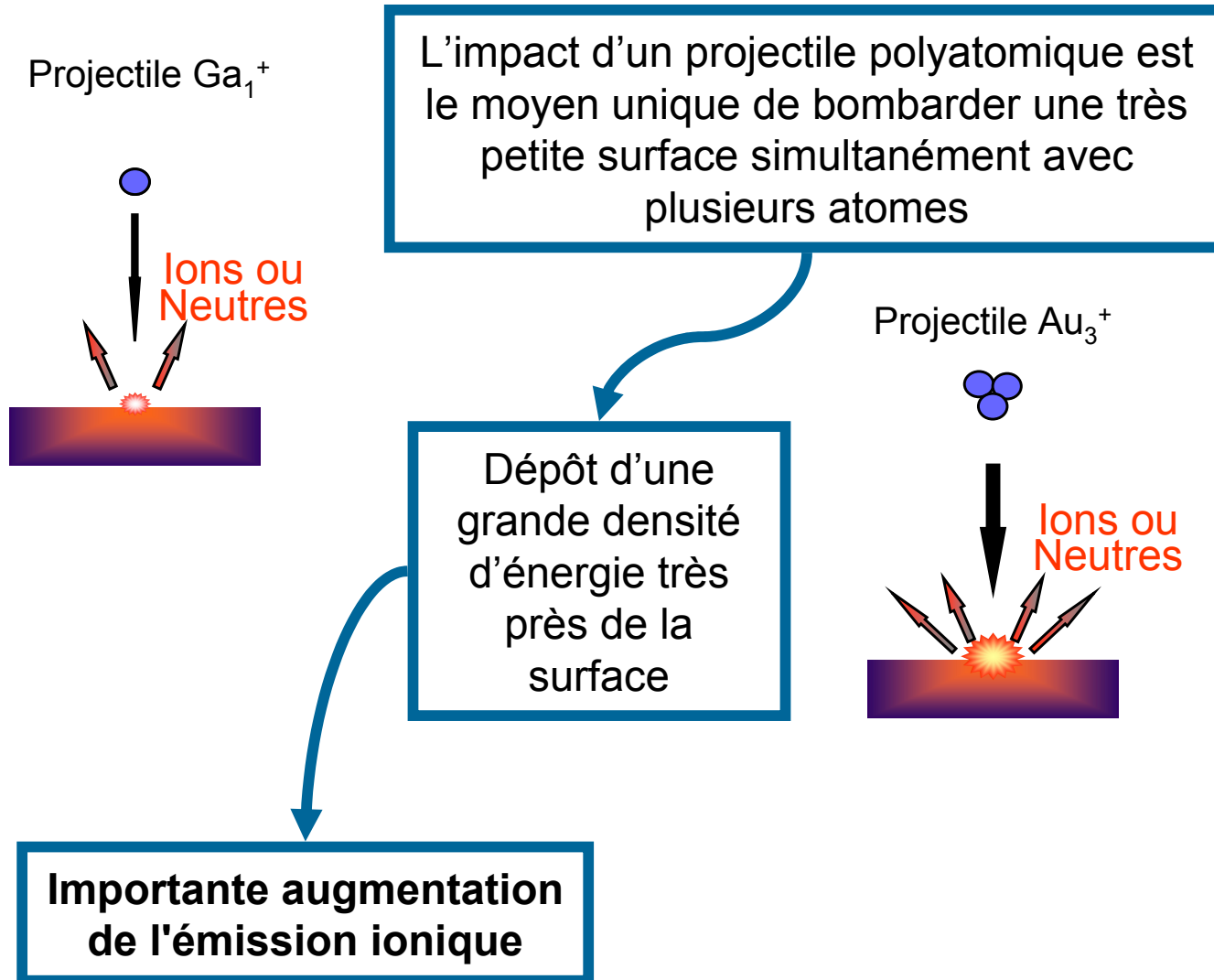
- Pas de matrice
- Les ions secondaires ne proviennent que des premiers 50-100 Å
(G. Bolbach & al, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 112 (1992) 93-100)
- Seulement quelques centaines d'Ångströms sont endommagés

Imagerie TOF-SIMS

- Spectromètres de masse TOF-SIMS équipés de sources d'ions à métal liquide (ions Ga^+) permettant des résolutions latérales $\ll 1\mu\text{m}$
- Très peu utilisés en spectrométrie de masse organique:
 - Faible efficacité des sources d'ions Ga^+ au-delà de 100-200 Da
 - Éloignement de communautés scientifiques différentes



Augmenter l'émission ionique avec des agrégats

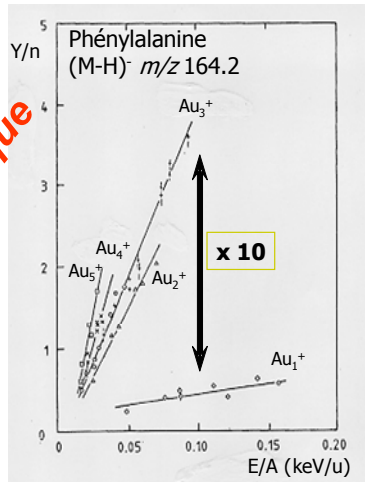


N. Winograd, *Anal. Chem.* 2005, 77, 143A-149A

Augmenter l'émission ionique avec des agrégats

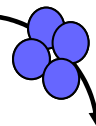


Emission ionique

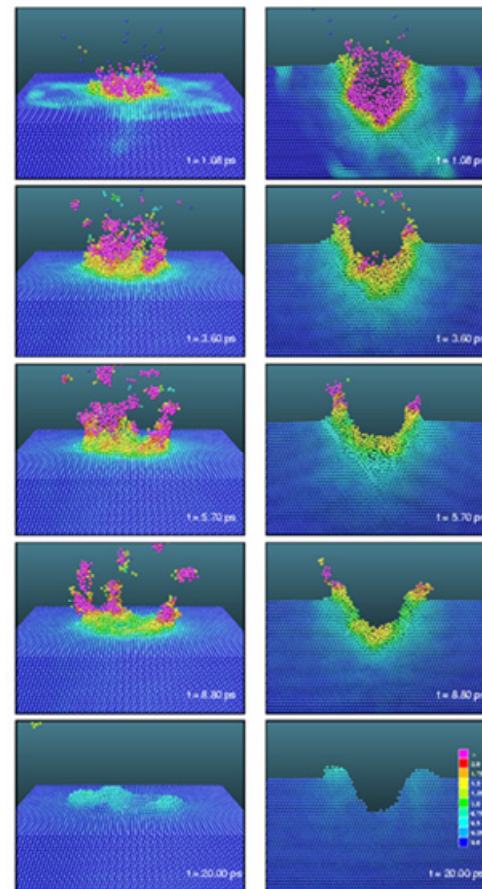


Dynamique moléculaire

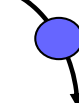
Au₄ 16 keV



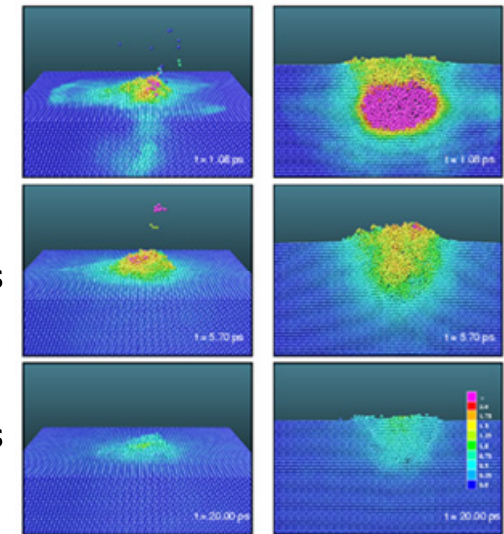
(Y=317)



Au₁ 16 keV

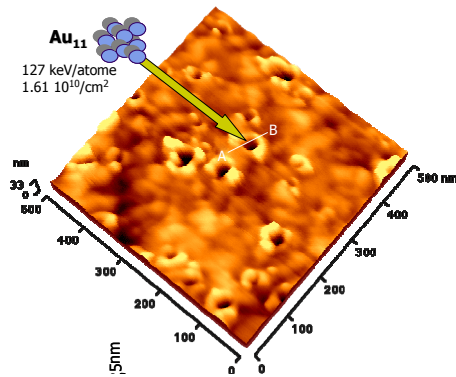


(Y=26)



M. Benguerba, A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, H. Joret, Y. Le Beyec, M.G. Blain, E.A. Schweikert, G. Ben Assayag, P. Sudraud
Nucl. Instrum. Methods. Phys. Res. B 1991, 62, 8-22

Pulvérisation



S. Bouneau, A. Brunelle, S. Della-Negra, J. Depauw, D. Jacquet, Y. Le Beyec, M. Pautrat, M. Fallavier, J.C. Poizat and H.H. Andersen,
Phys. Rev. B 2002, 65, 144106 1-10

1.08 ps
3.60 ps
5.70 ps
8.80 ps
20.0 ps

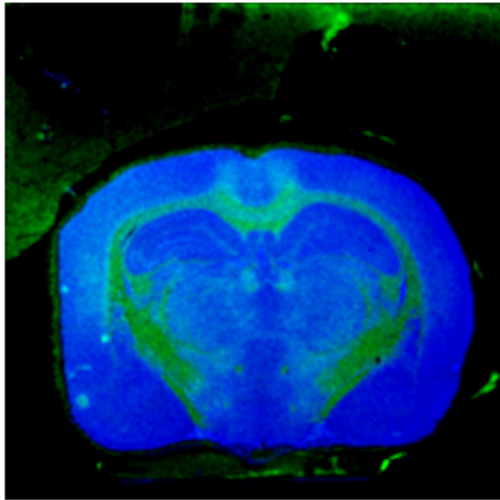
Les couleurs représentent la température en unités de la température de fusion de l'or (1338K).

T.J. Colla, R. Aderjan, R. Kissel, H.M. Urbassek,
Phys. Rev. B. 2000, 62, 8487-8493

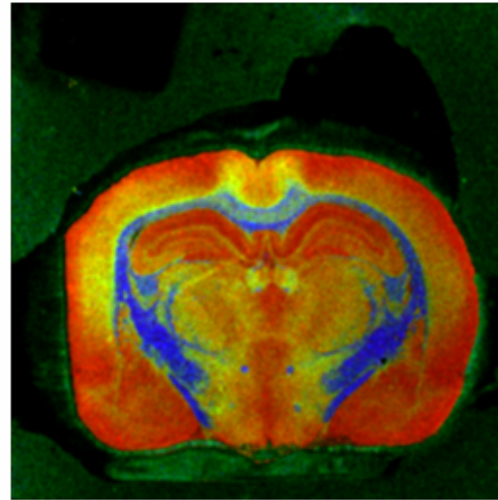
Imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS Agrégats Coupe de cerveau de rat



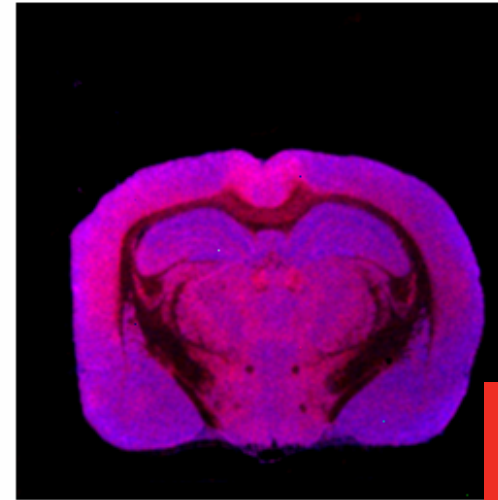
Field of view: 18000.0 x 18000.0 μm^2



Blue=184
Green=769



red=(255+283)
green=892 blue=771



red=283
blue=255

Superpositions
256x256 pixels
Taille de pixel 70x70 μm^2
Ions primaires Bi_3^+
Densité de dose d'ions primaires $10^9 \text{ ions.cm}^{-2}$
Temps d'acquisition ~3h
Aucune matrice

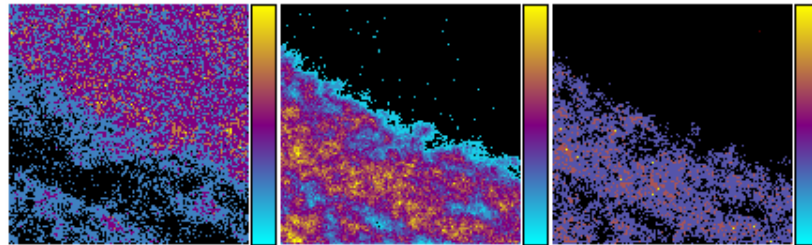


D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, O. Laprévote, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2005, 16, 1608-1618

Imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS Agrégats Coupe de cerveau de rat



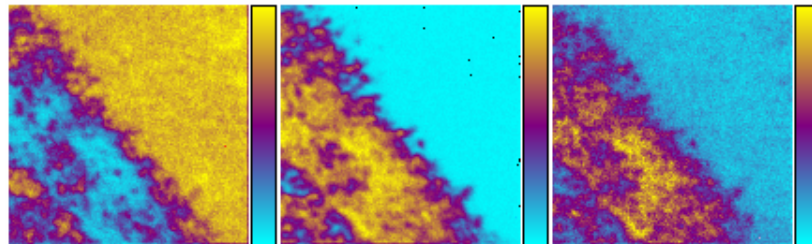
Field of view: 256.0 x 256.0 μm^2



Bi_1^+

M:184 mc:8 tc:1.099e+5 M:369 mc:16 tc:1.924e+5 M:755 mc:7 tc:4.690e+4

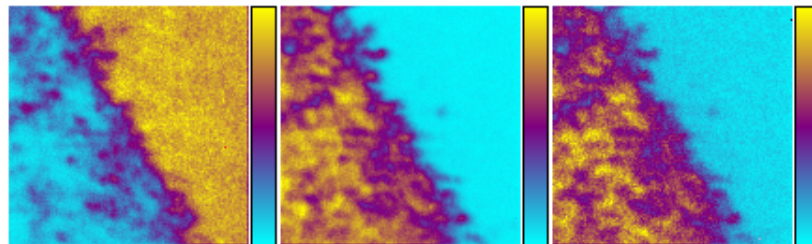
Field of view: 255.9 x 255.9 μm^2



Bi_3^+

M:184 mc:44 tc:1.656e+6 M:369 mc:118 tc:2.366e+6 M:755 mc:45 tc:7.969e+5

Field of view: 256.0 x 256.0 μm^2



Bi_5^{2+}

M:184 mc:91 tc:2.654e+6 M:369 mc:190 tc:4.205e+6 M:755 mc:61 tc:1.168e+6

Images enregistrées en bordure du
corps calleux

256x256 pixels

Taille de pixel 1x1 μm^2

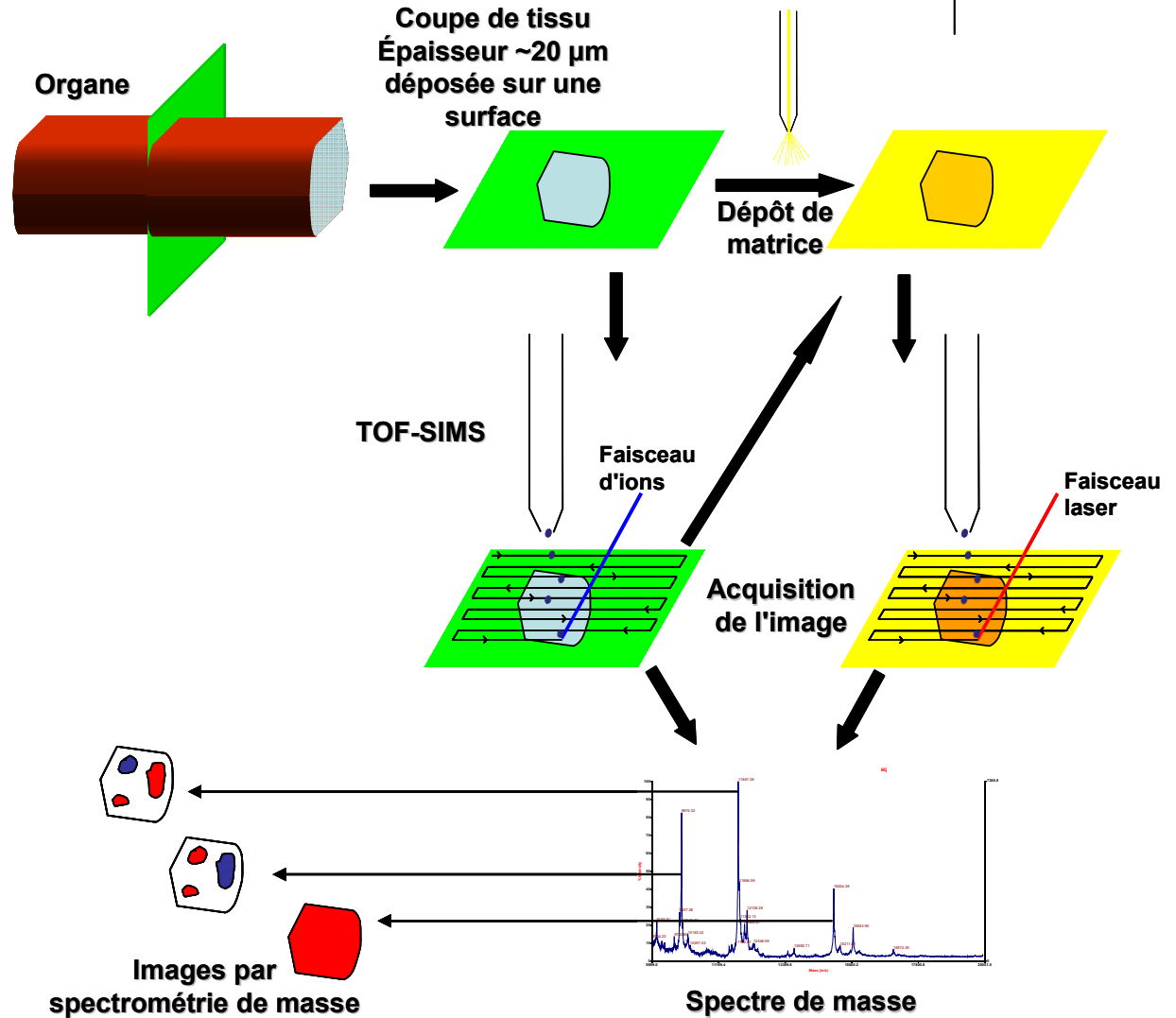
Densité de dose d'ions primaires
 10^{12} ions. cm^{-2}

Temps d'acquisition : 4, 10 et 100
minutes

D. Touboul, F. Kollmer, E. Niehuis, A. Brunelle, O. Laprèvote, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2005, 16, 1608-1618

Pourquoi deux méthodes d'imagerie TOF-SIMS et MALDI-TOF ?

- Gammas de masse différentes
 - SIMS:
 - Lipides et métabolites
 - < 1000 Daltons
 - *Profondeur* < 500 Å
 - MALDI:
 - Peptides et protéines
 - > 1000 Daltons
 - *Profondeur* qq μm
- → Complémentarité



Complémentarité des 2 méthodes d'imagerie TOF-SIMS et MALDI

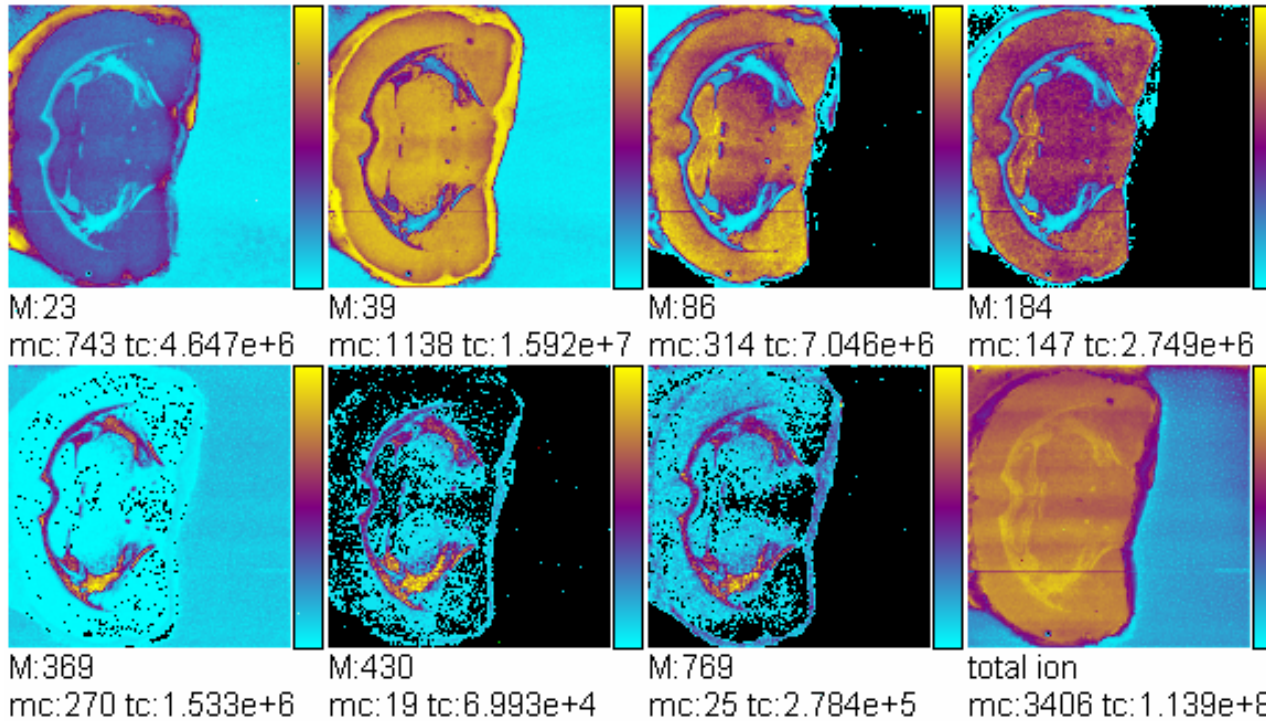
- Acquisition successives sur la même coupe de cerveau de rat
 - SIMS
 - 1^{ère} image :
 - ions positifs, 16x16 mm², 256x256 pixels de 62,5x62,5 μm², faible dose non destructrice
 - 2nde image:
 - ions négatifs, mêmes conditions
 - 3^{ème} image:
 - ions positifs, "zoom" sur une petite zone de 500x500 μm², 256x256 pixels de 1,95x1,95 μm², dose 100 fois plus grande mais toujours non destructrice (de même pour le cumul des trois images SIMS)
 - MALDI
 - 4^{ème} image :
 - ions positifs, 13x13 mm², 114x 114 pixels de 115x115 μm², avec application de la matrice donc échantillon détruit après l'analyse

16 x 16 mm²,
256 x 256 pixels
Pixels : 62,5 x 62,5 μm²
Dose : 4.10⁸ ions Au₃⁺.cm⁻²

TOF-SIMS Cerveau de rat ions positifs



Field of view: 16000.0 x 16000.0 μm²



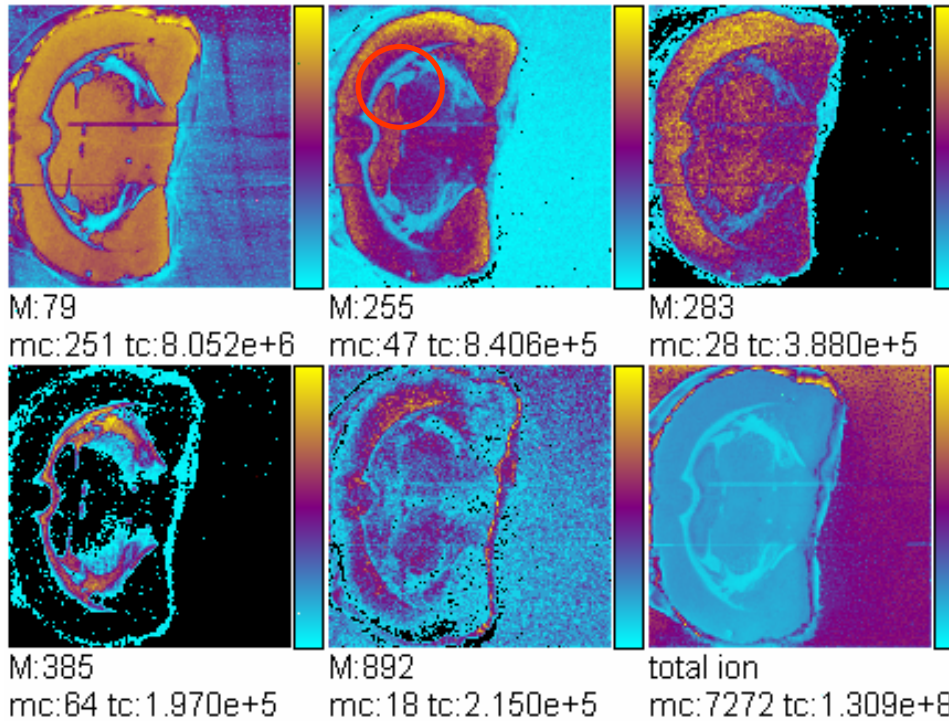
A. Brunelle, D. Touboul, O. Lapr evote, J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

16 x 16 mm²,
256 x 256 pixels
Pixels : 62,5 x 62,5 μm²
Dose : 4.10⁸ ions Au₃⁺.cm⁻²

TOF-SIMS Cerveau de rat ions négatifs (même coupe)



Field of view: 16000.0 x 16000.0 μm²



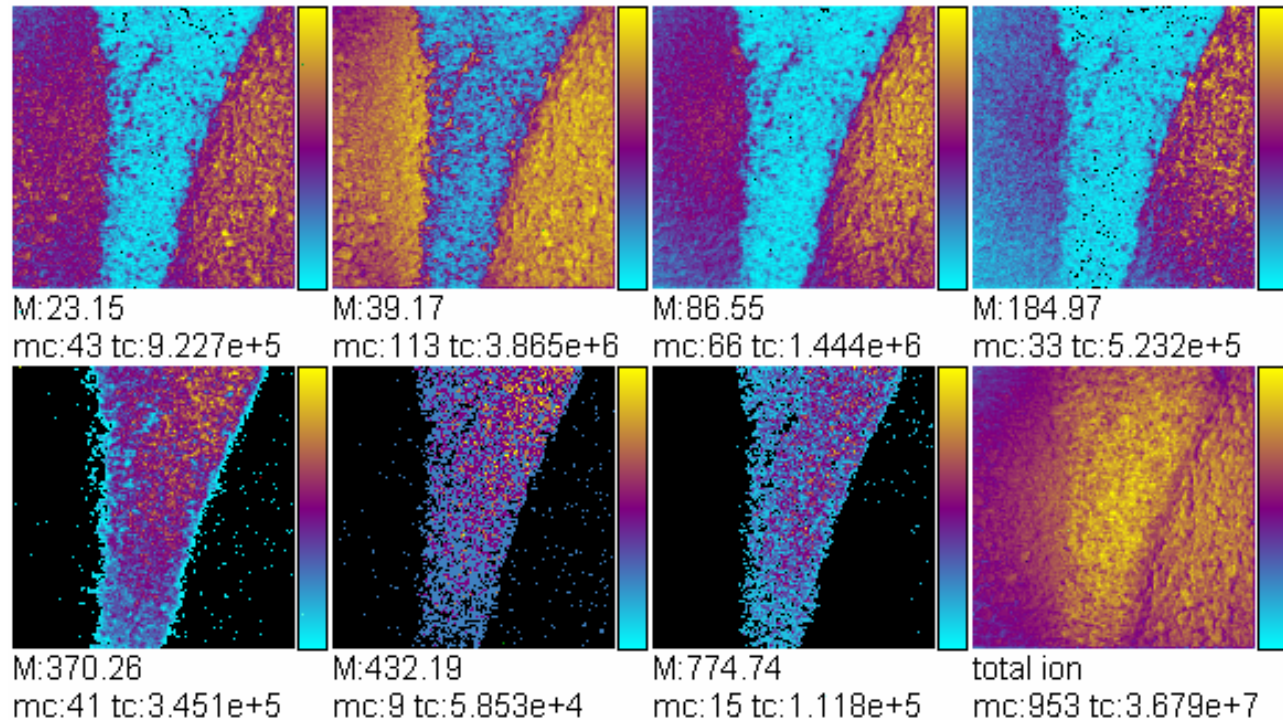
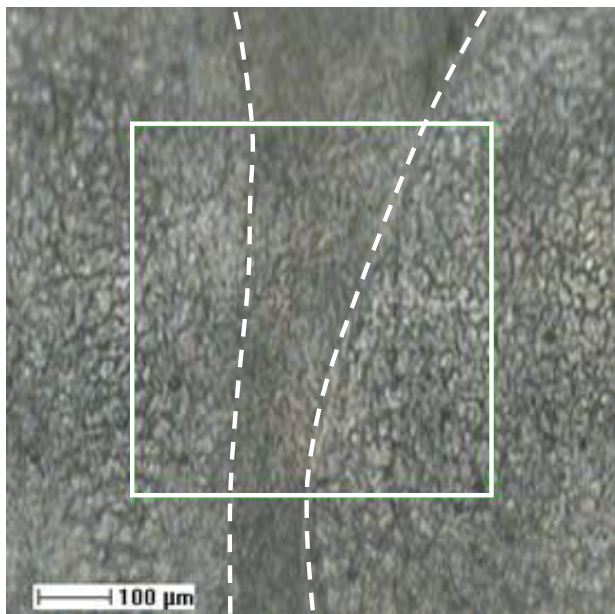
A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprêvote, J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

500 x 500 μm^2 ,
 256 x 256 pixels
 Pixels : 1,95 x 1,95 μm^2
 Dose : $6 \cdot 10^{10}$ ions $\text{Au}_3^+ \cdot \text{cm}^{-2}$

TOF-SIMS Cerveau de rat ions positifs (même coupe)



Field of view: 500.0 x 500.0 μm^2

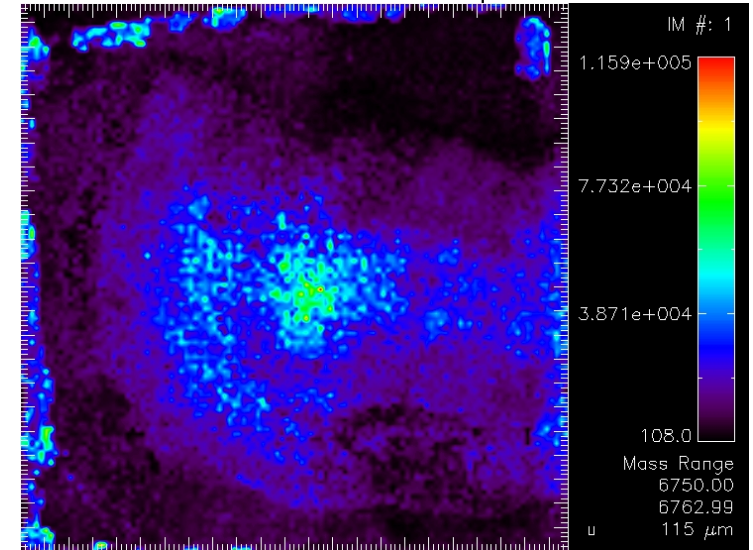
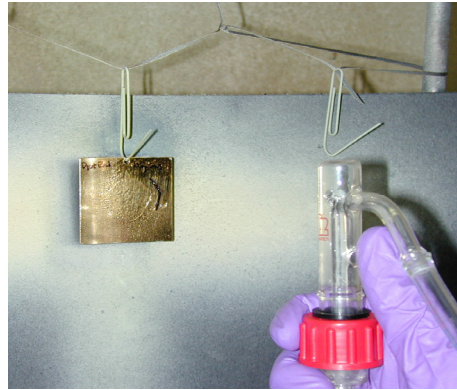
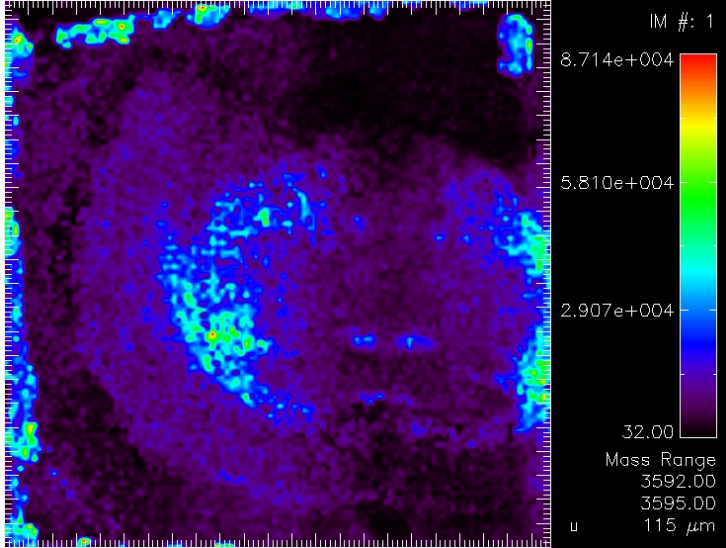


"Zoom" zone rouge de la diapo précédente

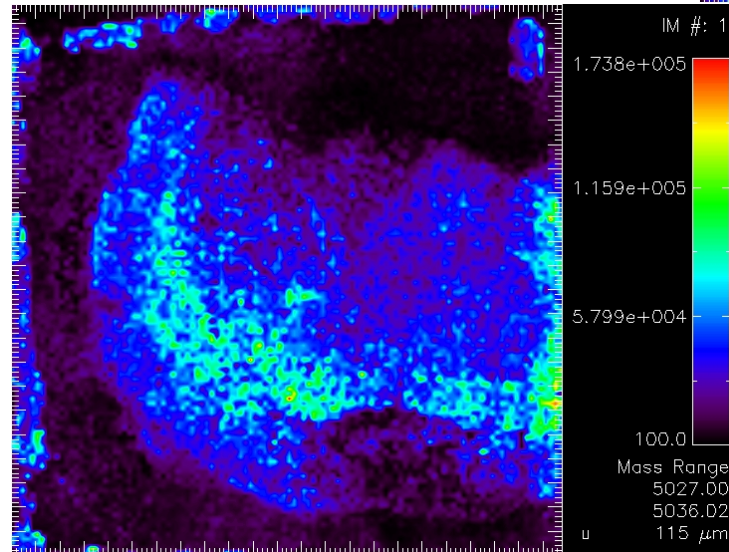
A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote, J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

13 x 13 mm²,
114 x 114 pixels
Pixels : 115 x 115 μm²
150 tirs laser par pixel

MALDI Cerveau de rat ions positifs (même coupe)



m/z 3593.5



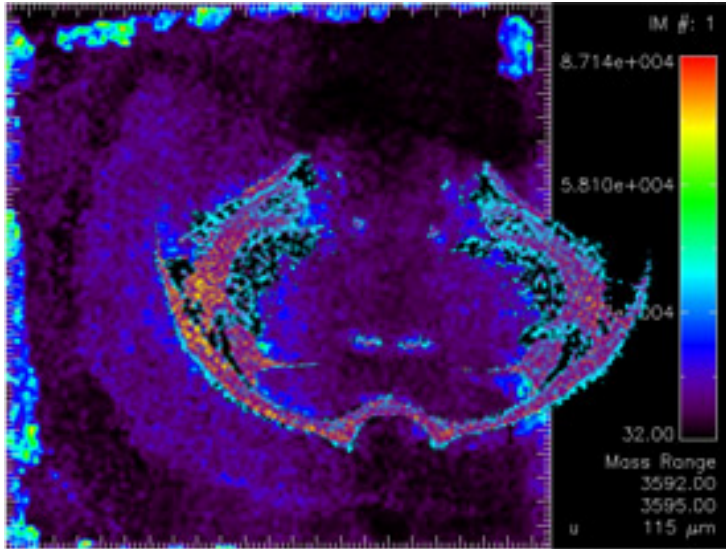
m/z 6756.5

*Images MALDI obtenues en utilisant
le logiciel de traitement IMT
développé à l'ICSN et déposé à
l'Agence pour la Protection des
Programmes, Paris*

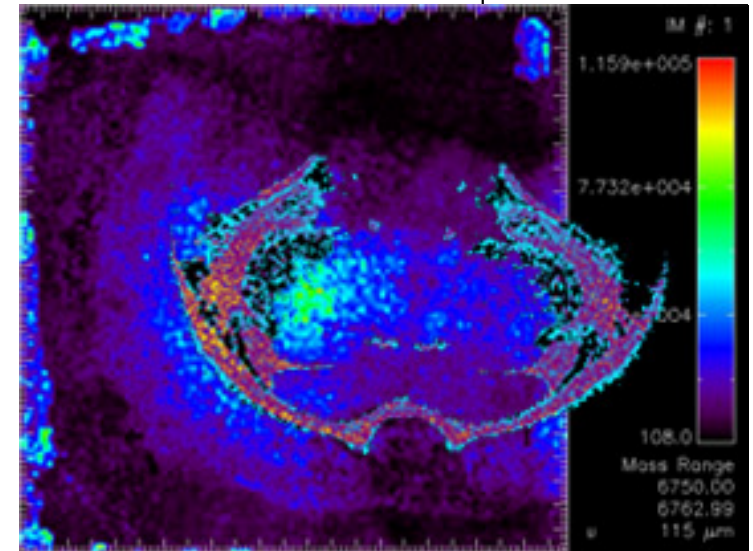
m/z 5031.5

A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote,
J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

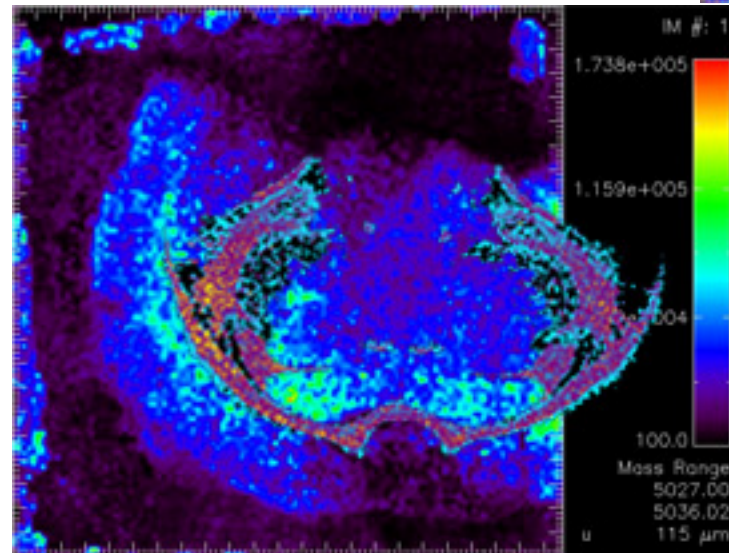
Superposition TOF-SIMS & MALDI Cerveau de rat ions positifs (même coupe)



Cholestérol
 m/z 369



m/z 3593.5



m/z 6756.5

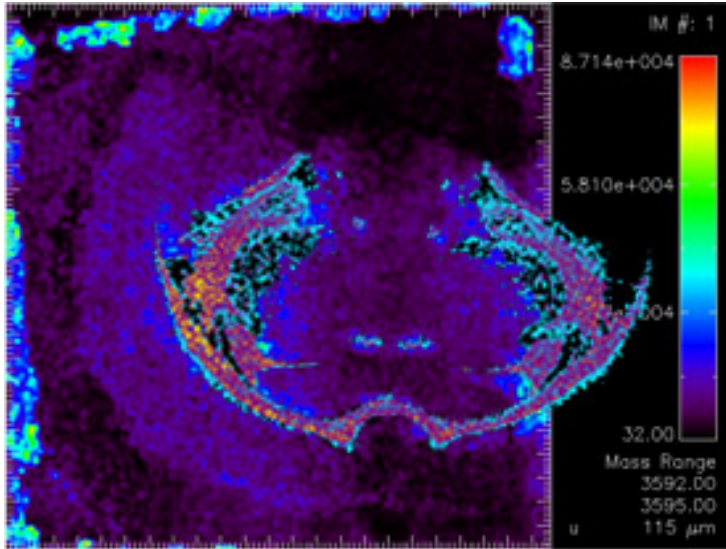
*Images MALDI obtenues en utilisant
le logiciel de traitement IMT
développé à l'ICSN et déposé à
l'Agence pour la Protection des
Programmes, Paris*

m/z 5031.5

A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote,
J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

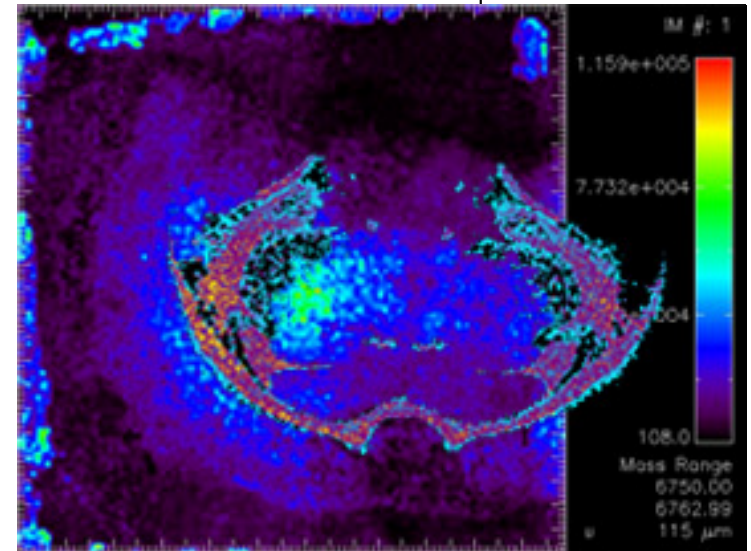
Superposition TOF-SIMS & MALDI

Cerveau de rat ions positifs (même coupe)

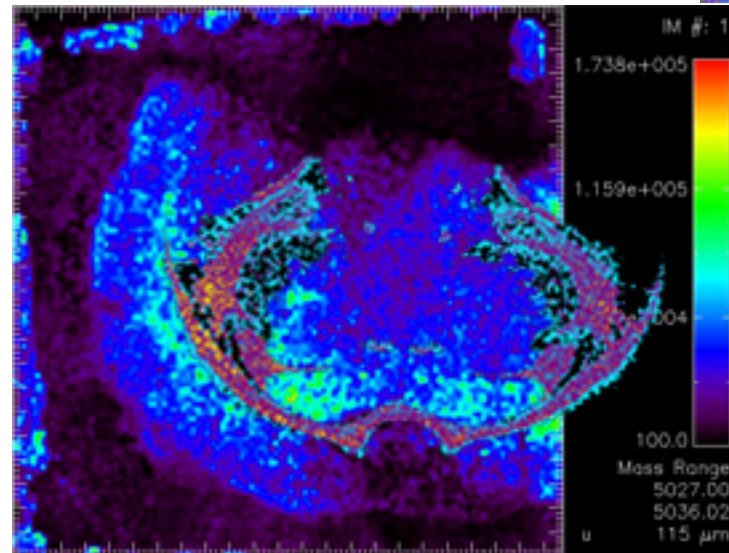


m/z 3593.5

MALDI	Cluster-SIMS
~50μm	~1μm
Matrice	Pas de Matrice
Peptides Protéines	Lipides Métabolites



m/z 6756.5



m/z 5031.5

Images MALDI obtenues en utilisant le logiciel de traitement IMT développé à l'ICSN et déposé à l'Agence pour la Protection des Programmes, Paris

A. Brunelle, D. Touboul, O. Laprévote,
J. Mass Spectrom. 2005, 40, 985-999

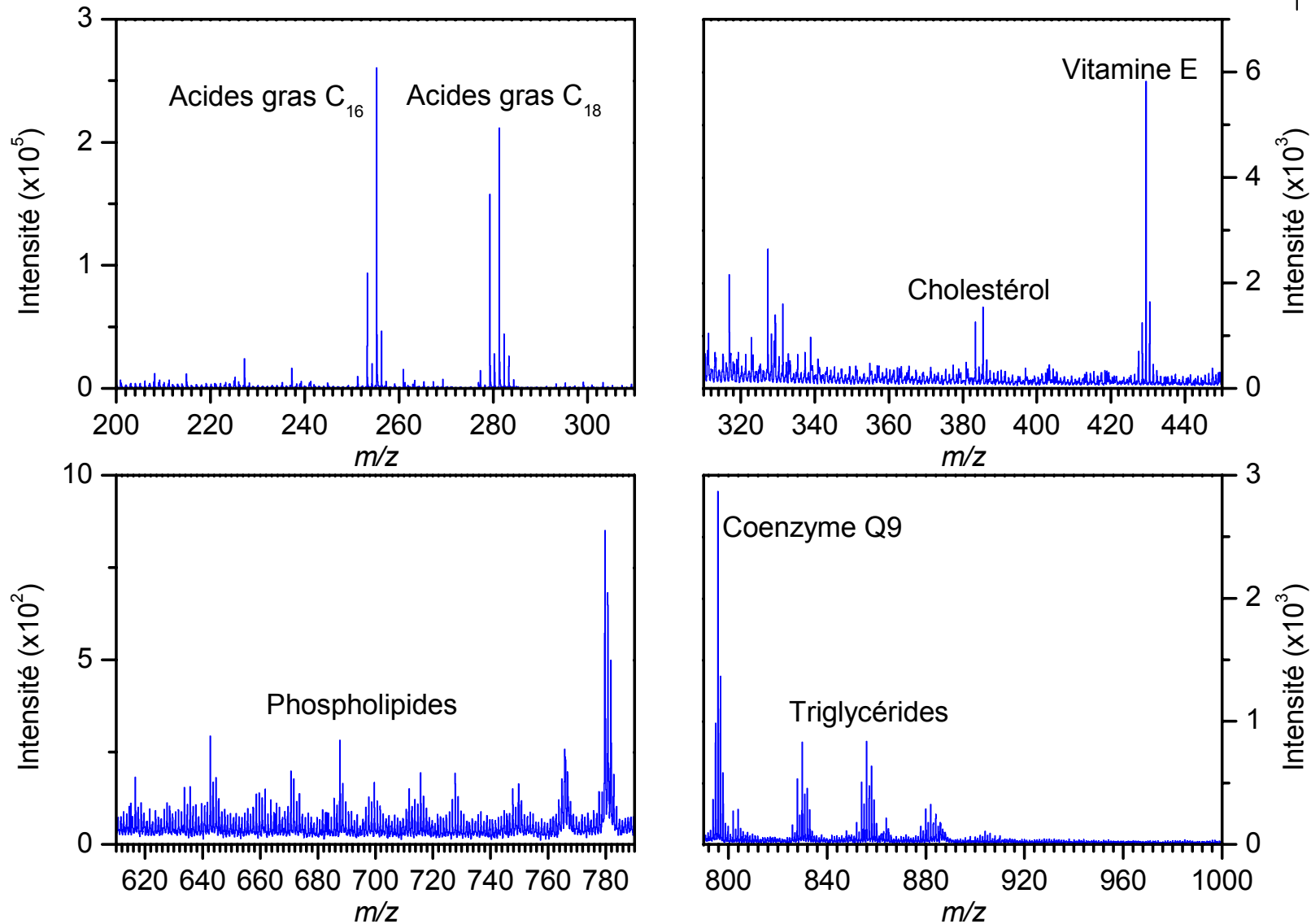


La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

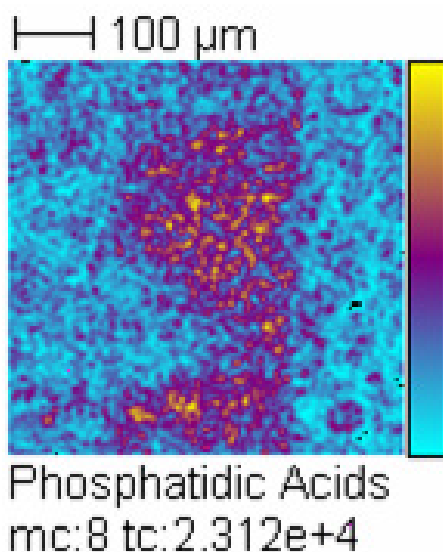
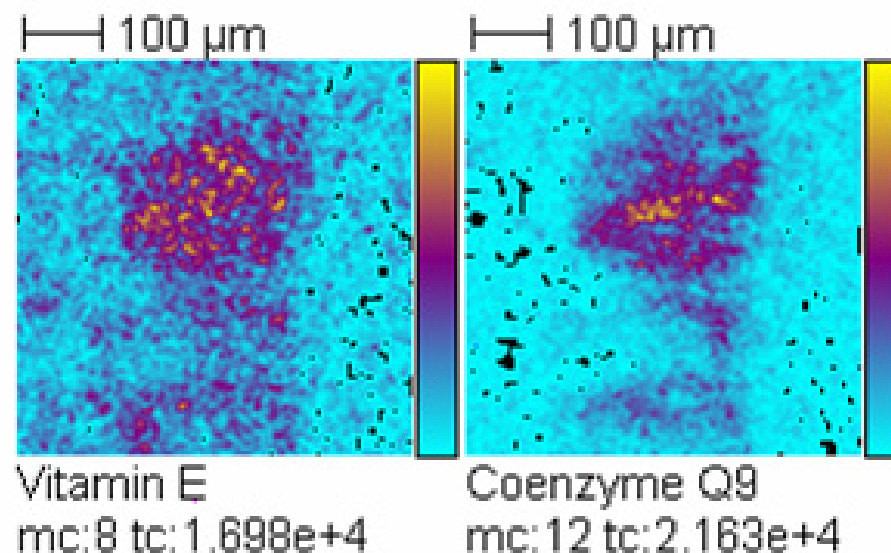
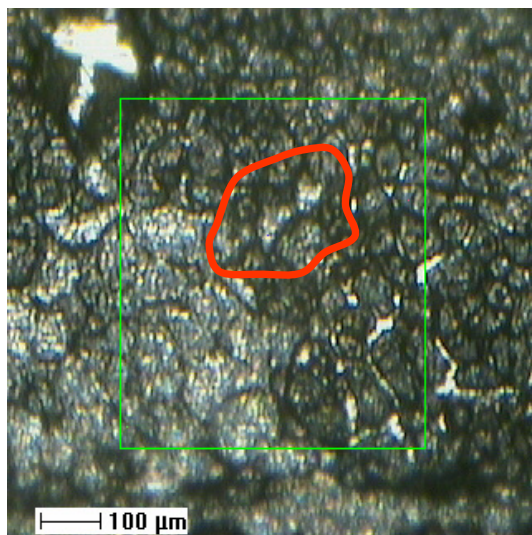


- La maladie
 - Pour la première fois décrite par un médecin et photographe français, Guillaume Duchenne de Boulogne (1806-1875)
 - Maladie génétique liée à une mutation sur le chromosome X (1 garçon / 3500)
 - Absence de la Dystrophine (~ 427 kDa), protéine sub-membranaire
 - Faiblesse musculaire généralisée
 - Mort vers l'âge de 30 ans (insuffisances cardiaques et pulmonaires)
- Au niveau cellulaire
 - Destruction des muscles due à une perte d'intégrité des membranes cellulaires
 - Déficience du métabolisme lipidique

Myopathie de Duchenne et Imagerie TOF-SIMS-Agrégats: Spectre de masse des ions négatifs



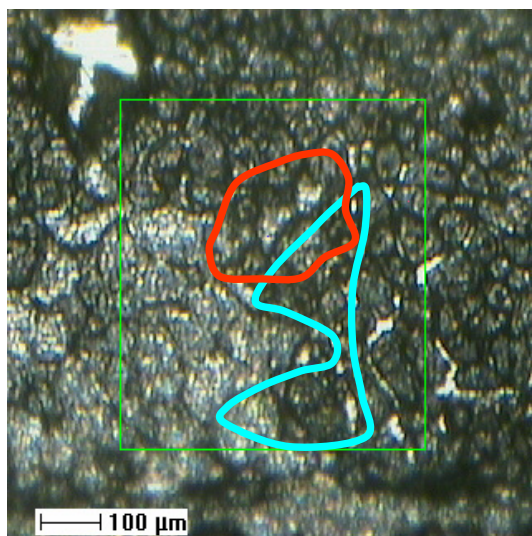
Imagerie TOF-SIMS-Agrégats: Ions négatifs



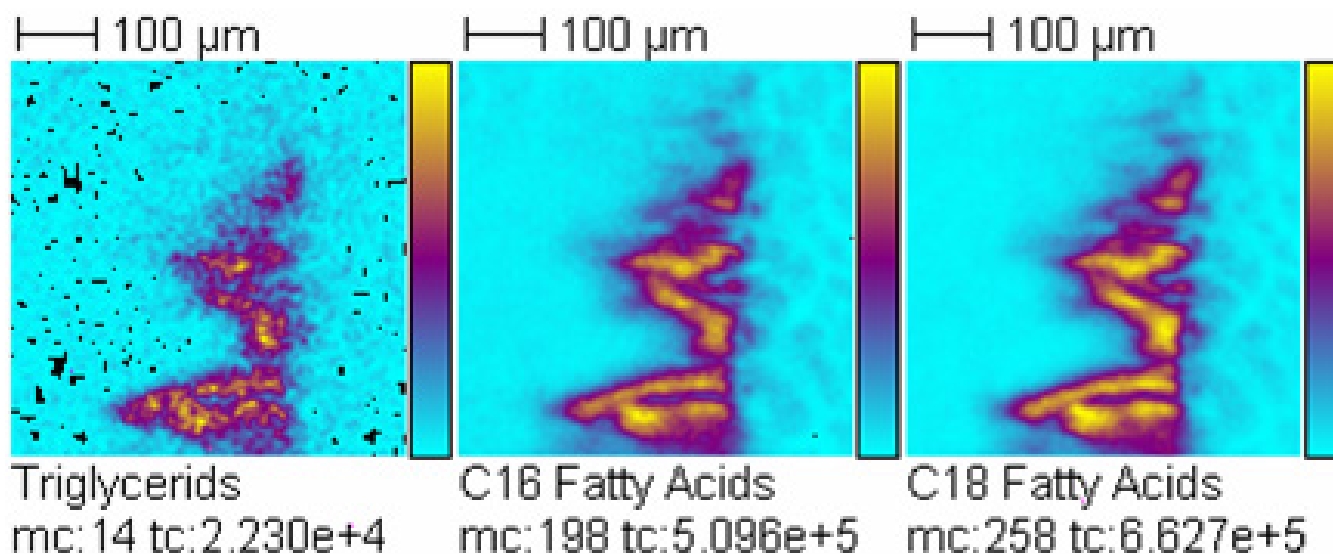
- La présence de tocophérol (Vitamine E) et d'ubiquinone signe, dans une région particulière de la coupe, l'existence d'un **stress oxydant**.
- La sur - concentration, dans cette zone, d'acides phosphatidiques souligne l'action des phospholipases D activée par l'**augmentation du calcium intracellulaire**
- Ces deux facteurs correspondent à un processus de dégénérescence cellulaire

D. Touboul, A. Brunelle, F. Halgand, S. De La Porte, O. Laprèvote, J. Lipid Res. 2005, 46, 1388-1395

Imagerie TOF-SIMS-Agrégats: Ions négatifs

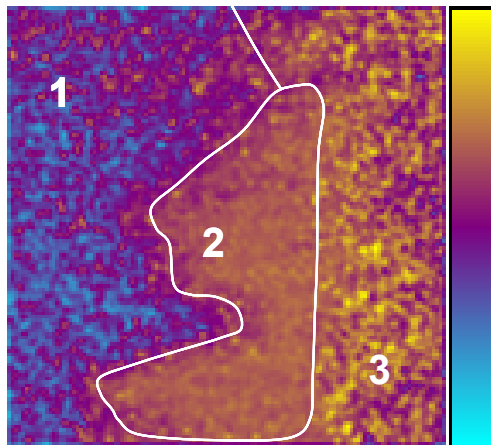
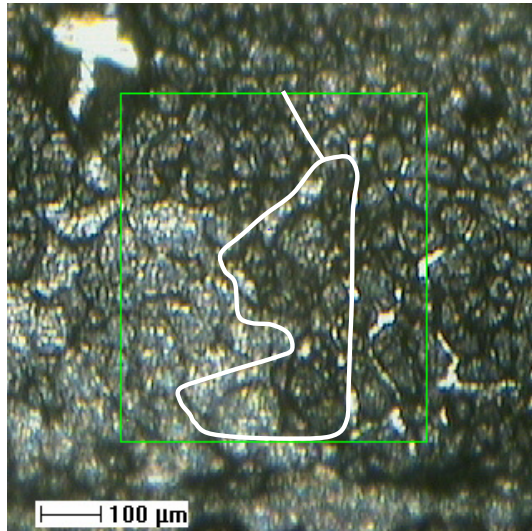


- L'accumulation de triglycérides dans une région particulière de la coupe correspond à une différenciation de fibroblastes en adipocytes.
- L'image des acides gras associée à celle des triglycérides fournit une indication fiable et directe de la composition en acides gras de ces triglycérides



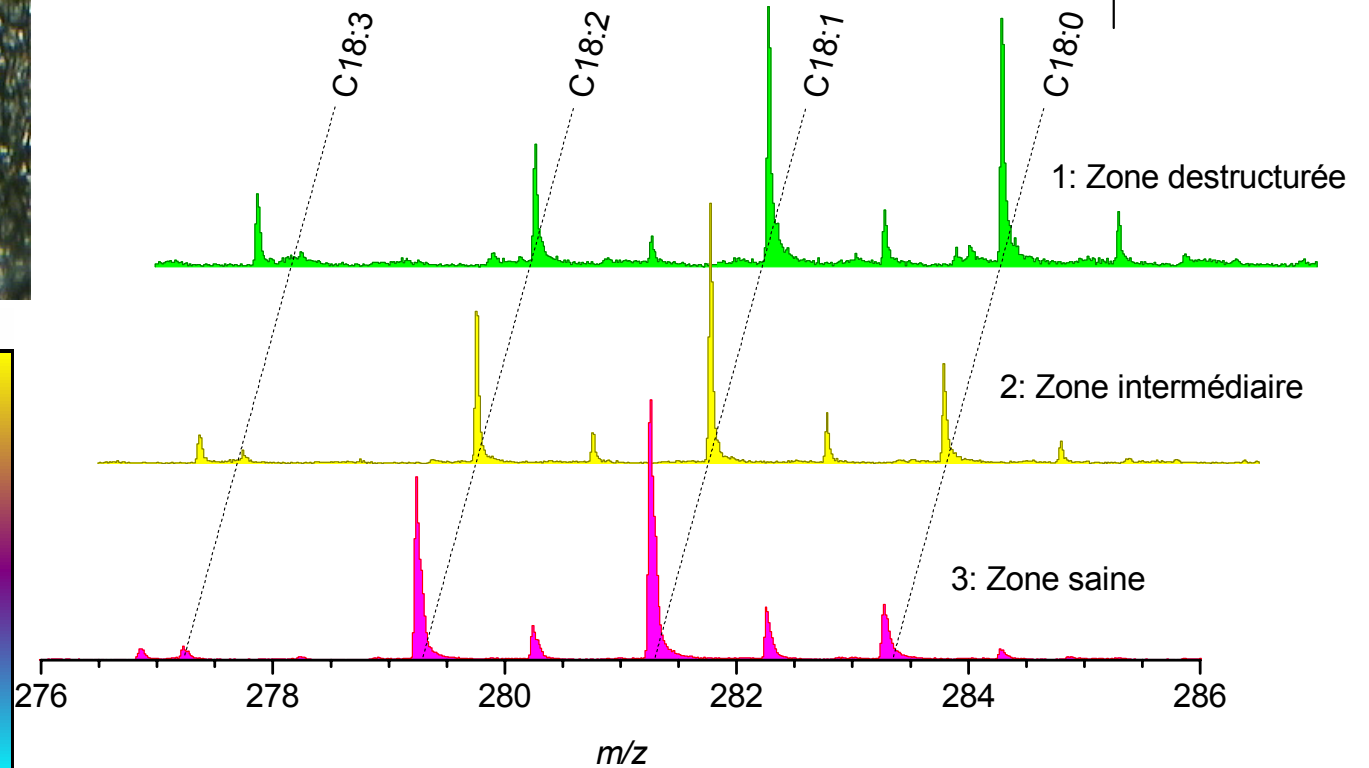
D. Touboul, A. Brunelle, F. Halgand, S. De La Porte, O. Laprévote, J. Lipid Res. 2005, 46, 1388-1395

Rapport de concentration acide oléique/acide stéarique (C18:1/C18:0)



Log(C18:1 / C18:0)
mc:67 tc:7.293e+4

Le rapport C18:1/C18:0 décroît entre zones saines et zones déstructurées et présente une valeur intermédiaire dans la région « frontière »



Diminution de l'activité des $\Delta 9$ -désaturases (corrélée avec celle des NO synthases musculaires)

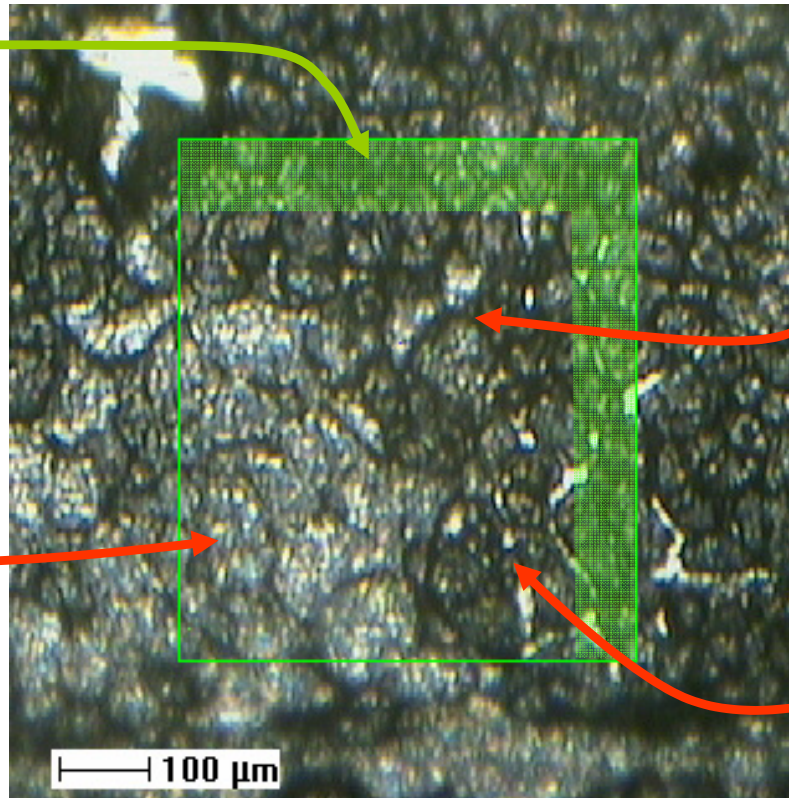
Tentative des cellules de stabiliser leur membranes en produisant un taux plus important d'acides gras saturés

D. Touboul, A. Brunelle, F. Halgand, S. De La Porte, O. Laprévote, J. Lipid Res. 2005, 46, 1388-1395

Zone saine

Zone déstructurée

K⁺
Na⁺
Cl⁻
F⁻



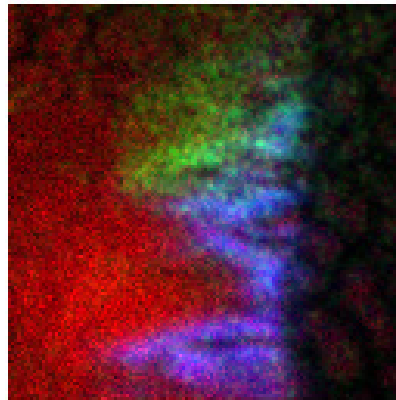
**Cellules en
dégénérescence**

Vitamine E
Ubiquinone
Ac. phosphatidiques

Adipocytes

Triglycérides
Acides Gras

Rouge = Cl



Vert = Coenzyme Q9

Bleu = Acides gras C18

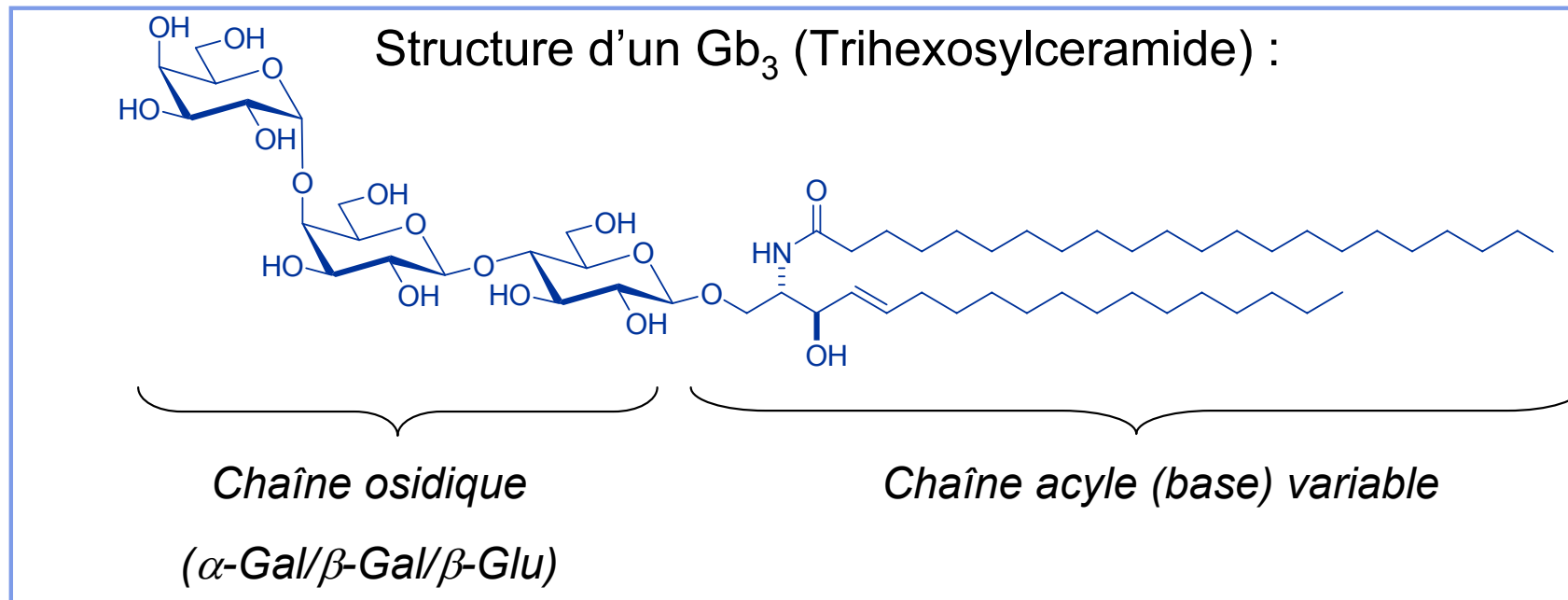
Red=Cl Green= CoQ9
Blue=C18 FA

La maladie de Fabry



Maladie lysosomale de la famille des sphingolipidoses due à un déficit en α -D-galactosidase-A (α -GALA) de transmission récessive liée au chromosome X (1 cas sur 120 000 naissances)

Accumulations de glycosphingolipides Gb₃ et Ga₂



Ga₂ (digalactosylcéramide), enchaînement Gal/Gal

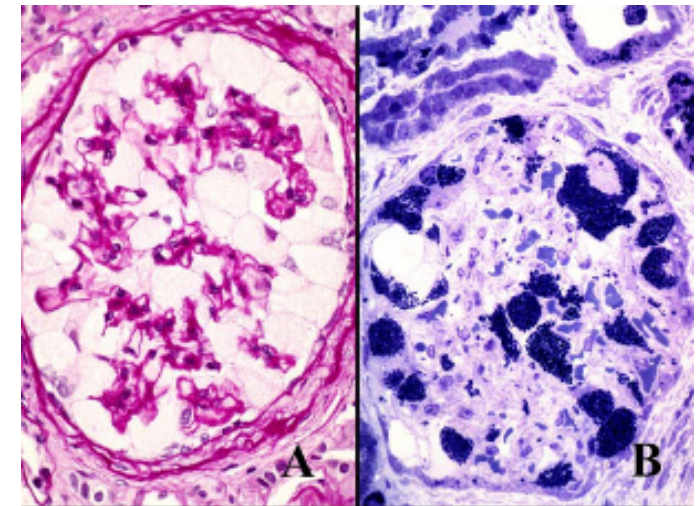
La maladie de Fabry



Atteinte multi systémique sévère dominée par une insuffisance rénale inexorable, des lésions neurologiques et cardiaques évolutives et des angiokératomes



Peau

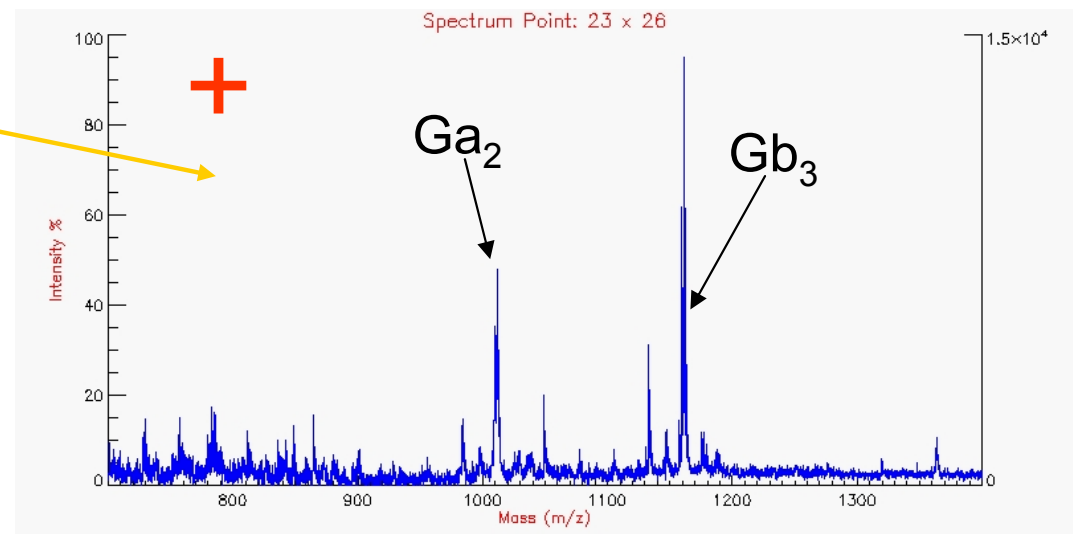
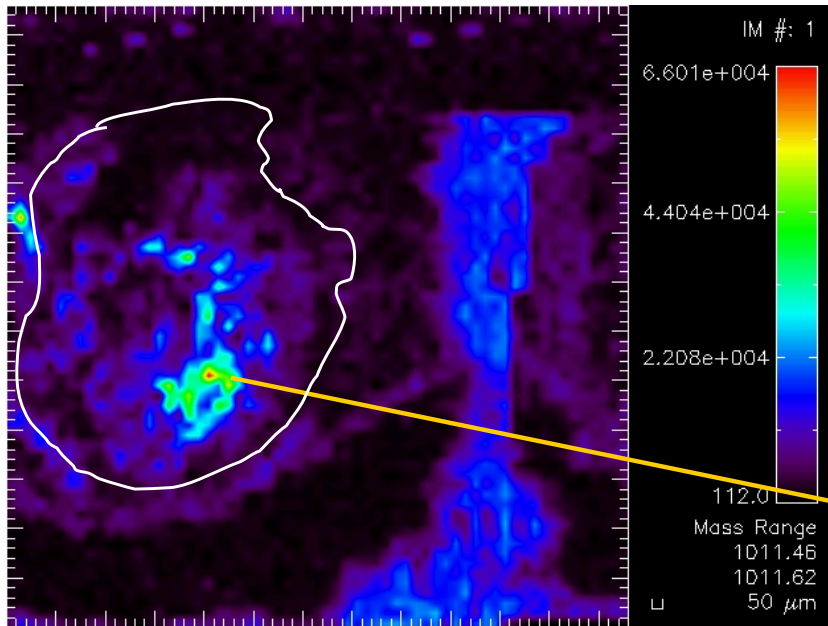


Cellule saine

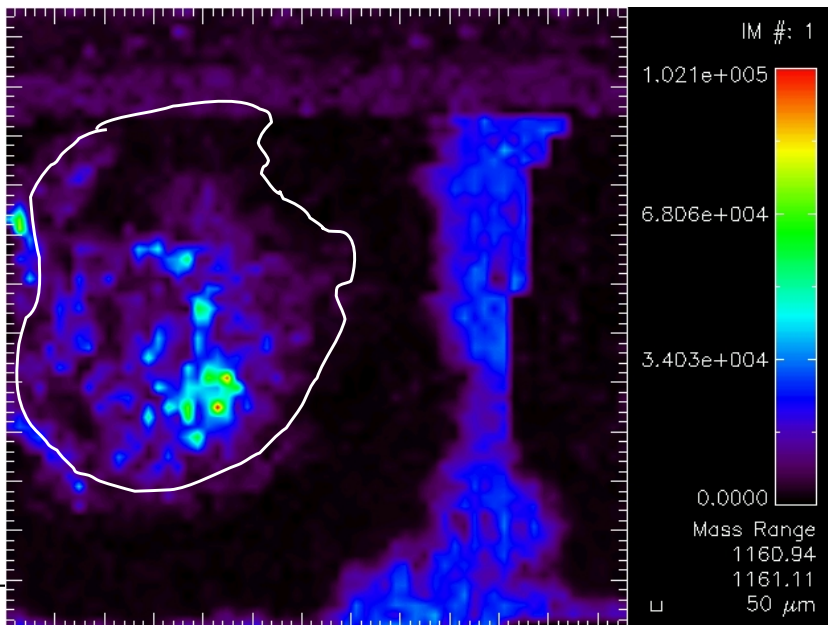
Cellule Fabry

Biopsie cutanée de patient atteint de la maladie de Fabry (MALDI-TOF)

Coupe de 20 μm d'épaisseur, dépôt de matrice HCCA par spray atmosphérique, résolution spatiale de 50 μm

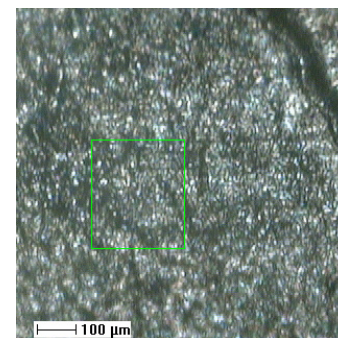
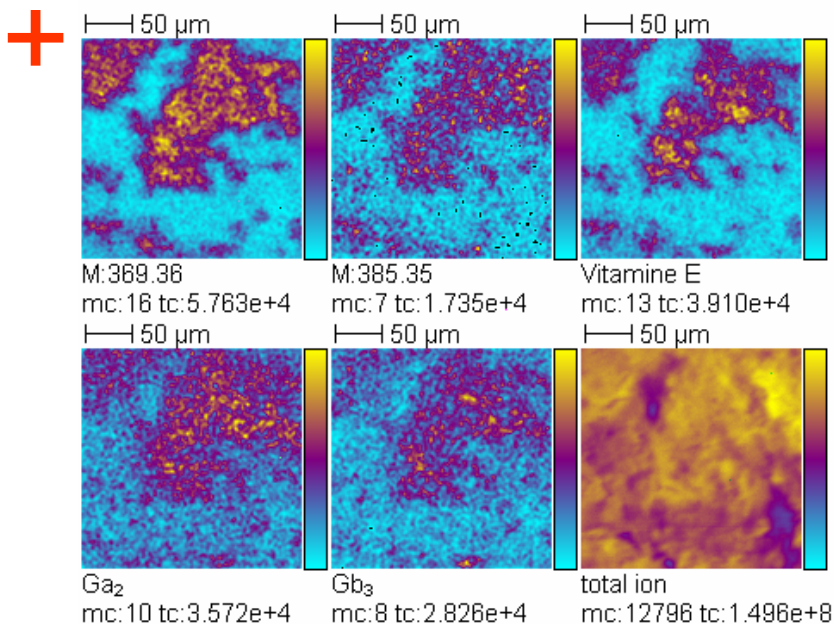


Spectre correspondant à un unique pixel

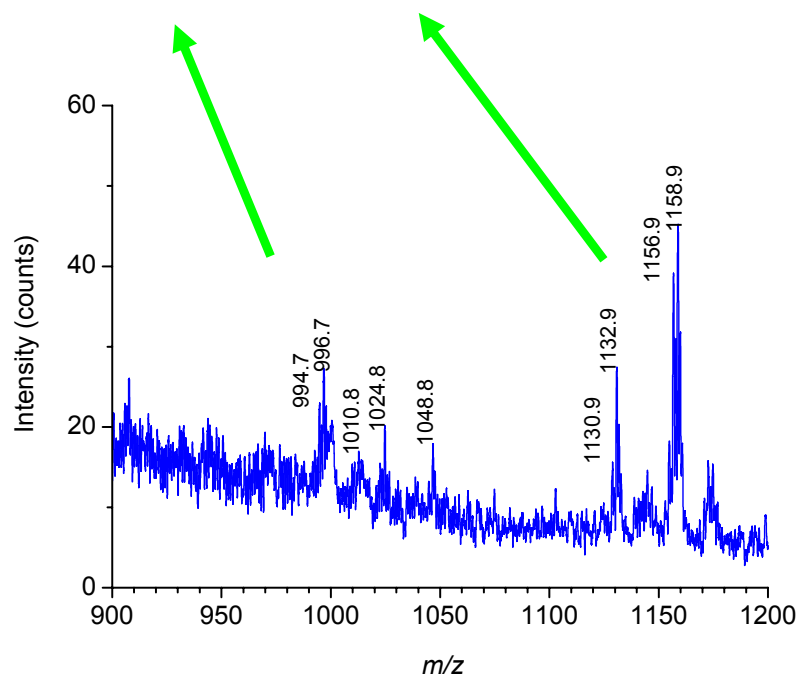
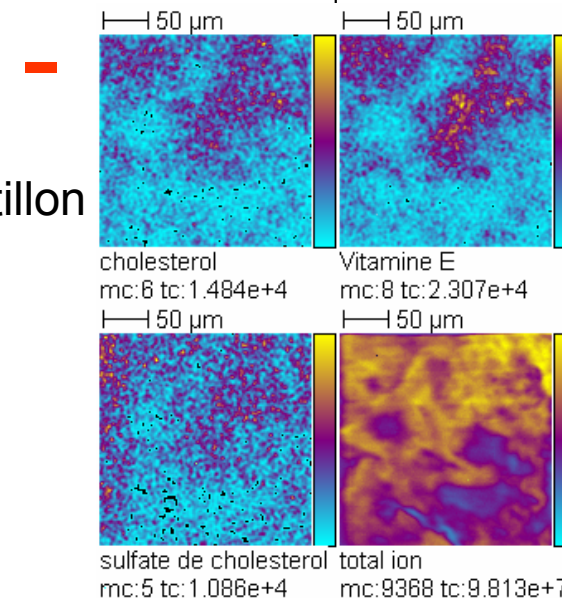


D. Touboul, S. Roy, D.P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévotte, Int. J. Mass Spectrom. in press

Biopsie cutanée de patient atteint de la maladie de Fabry



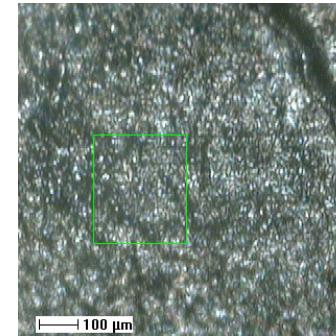
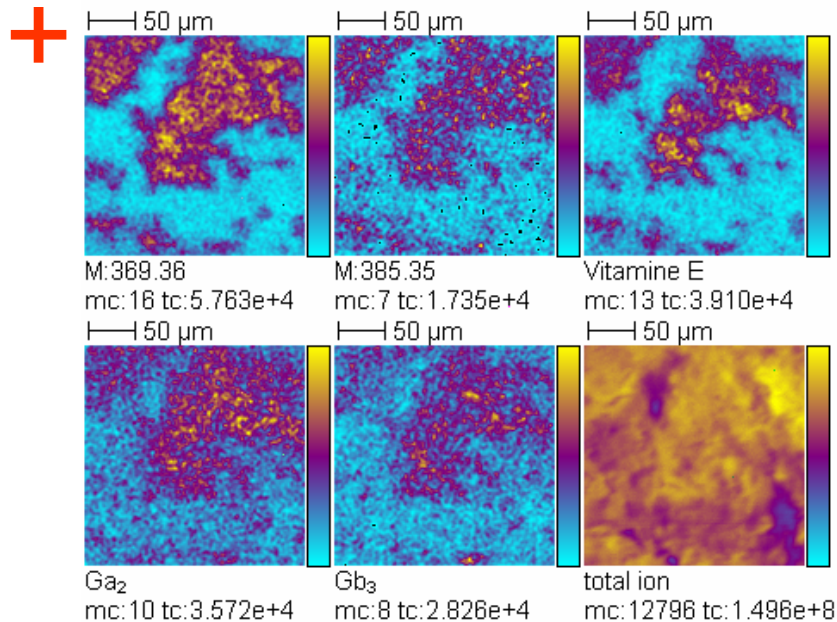
Aucun traitement de l'échantillon
 236x236 µm²
 Résolution: 1 µm
 15 min d'acquisition
 Dose: 1.25 x 10¹² ions.cm⁻²



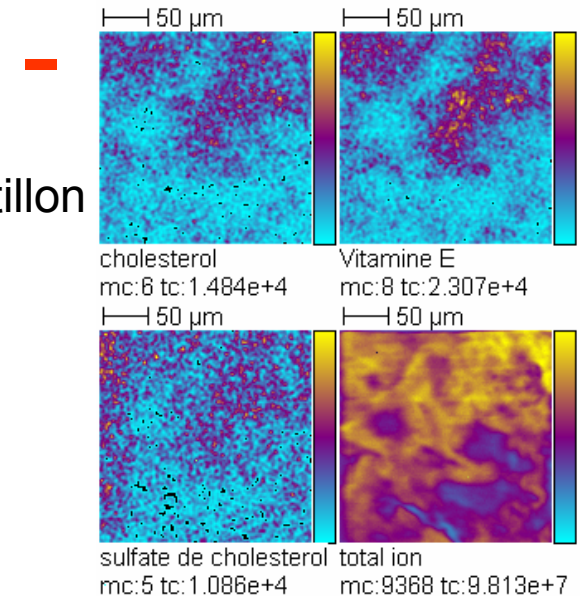
- Détection d'un faible signal de Ga₂ et Gb₃
- Localisation uniquement d'une famille moléculaire avec une résolution de 1 µm
- Colocalisation avec la vitamine E, le cholestérol et le sulfate de cholestéryl

D. Touboul, S. Roy, D.P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévotte, Int. J. Mass Spectrom. in press

Biopsie cutanée de patient atteint de la maladie de Fabry



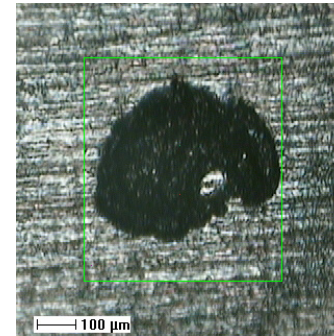
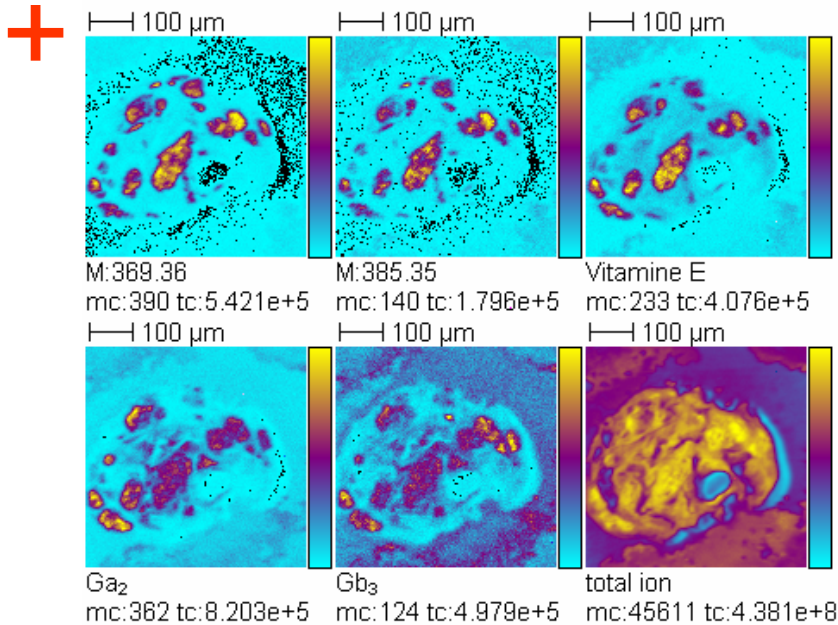
Aucun traitement de l'échantillon
 236x236 µm²
 Résolution: 1 µm
 15 min d'acquisition
 Dose: 1.25 x 10¹² ions.cm⁻²



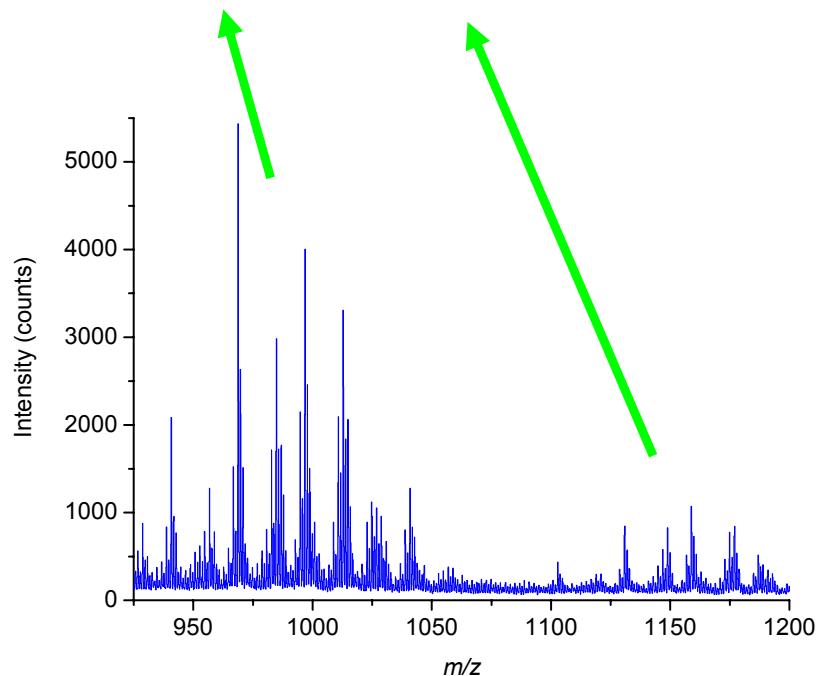
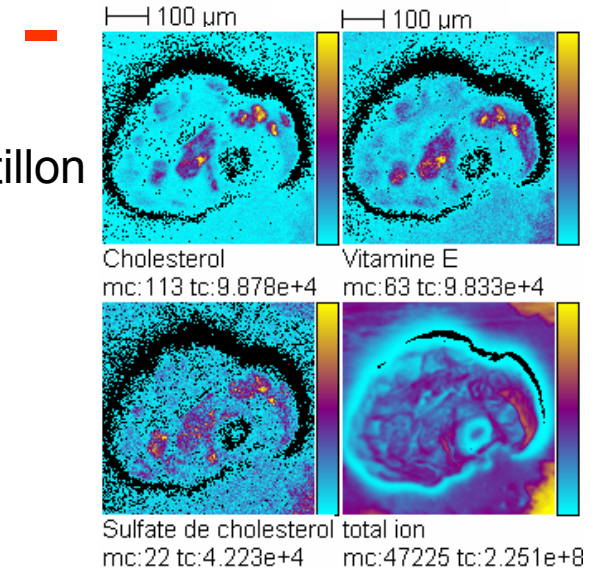
- Pour des cellules de peau en culture, il existe un lien entre l'accumulation de Ga₂ et de cholestérol. Ceci est observé directement sur des coupes de peau de patients atteints par la maladie de Fabry
- La présence de vitamine E est le signe d'une réaction inflammatoire locale et intense. Une dérégulation des NO-synthases, une réduction de la chaîne respiratoire enzymatique et une augmentation de la fréquence de la mutation génétique eNOSG894T ont déjà été démontrées.
- Le sulfate de cholestéryl intervient dans la différenciation cellulaire et dans la formation de la barrière épidermale au niveau de la peau.

D. Touboul, S. Roy, D.P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévotte, Int. J. Mass Spectrom. in press

Biopsie rénale de patient atteint de la maladie de Fabry



Aucun traitement de l'échantillon
 500x500 µm²
 Résolution: 1 µm
 30 min d'acquisition
 Dose: 1.06 x 10¹² ions.cm⁻²

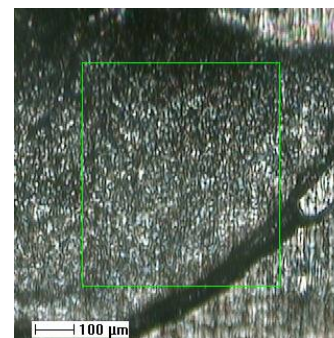
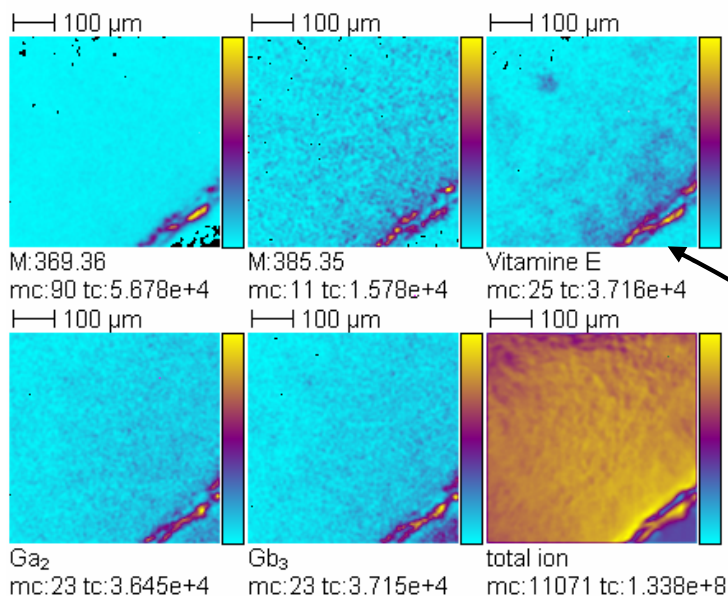


- Détection d'un signal très intense de Ga₂ et Gb₃
- Localisation possible d'une seule espèce moléculaire avec une résolution de 1 µm
- Colocalisation avec la vitamine E, le cholestérol et le sulfate de cholestéryl

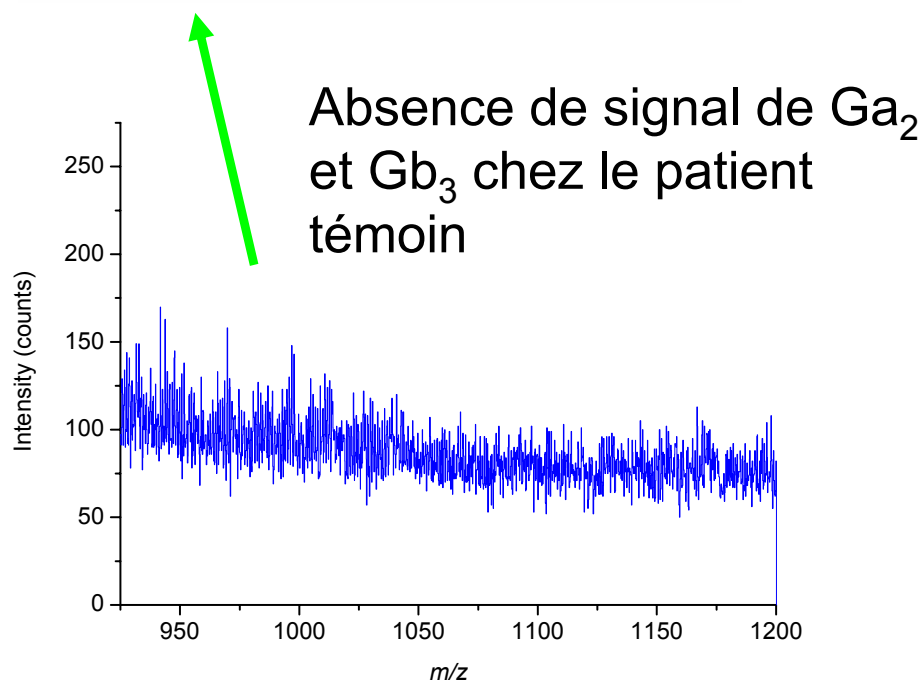
D. Touboul, S. Roy, D.P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévotte, Int. J. Mass Spectrom. in press

Biopsie cutanée de patient témoin

Field of view: 500.0 x 500.0 μm^2

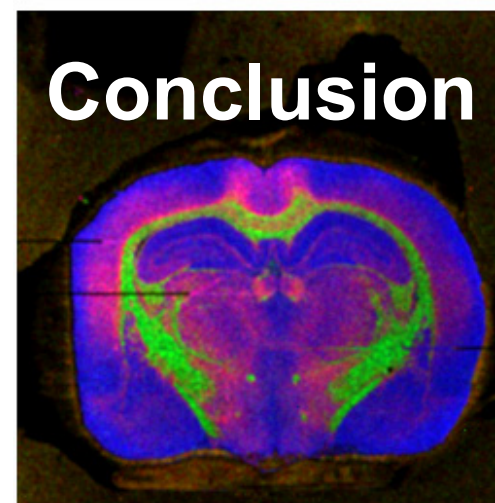


Signal de la colle OCT



- Méthode fiable, rapide et non invasive de diagnostic de la maladie de Fabry
- Localisation des espèces moléculaires des Ga₂ et Gb₃ sur des tissus
- Mis en évidence des accumulations de vitamine E, cholestérol et sulfate de cholestéryl, qui n'avaient été décrites que sur des cultures cellulaires.

D. Touboul, S. Roy, D.P. Germain, P. Chaminade, A. Brunelle, O. Laprévote, Int. J. Mass Spectrom. in press



L'imagerie par spectrométrie de masse :

- Outil en pleine évolution
 - instrumental
 - méthodologique
- Méthode sans équivalent pour obtenir des images simultanément sur plusieurs ions :
 - MALDI applications en génomique et protéomique
 - TOF-SIMS-Agrégats applications en métabolomique et lipidomique
- Possibilité unique de **co-localiser** plusieurs molécules d'intérêt à l'échelle du micron
- Méthode complémentaire des autres techniques d'analyses biochimiques
- Applications dans les domaines:
 - de la santé humaine
 - de la biologie
 - de la pharmacologie