La métabolomique par spectrométrie de masse et imagerie *in situ*

Dimitri Heintz

Dimitri.heintz@ibmp-cnrs.unistra.fr

Activité

Institut de botanique

- Chromatographie
- Spectrométrie de masse

Plan

- **Définition:** La métabolomique par spectrométrie de masse et imagerie *in situ*

- **Principe**
  - Modes d'ionisation
  - Instruments

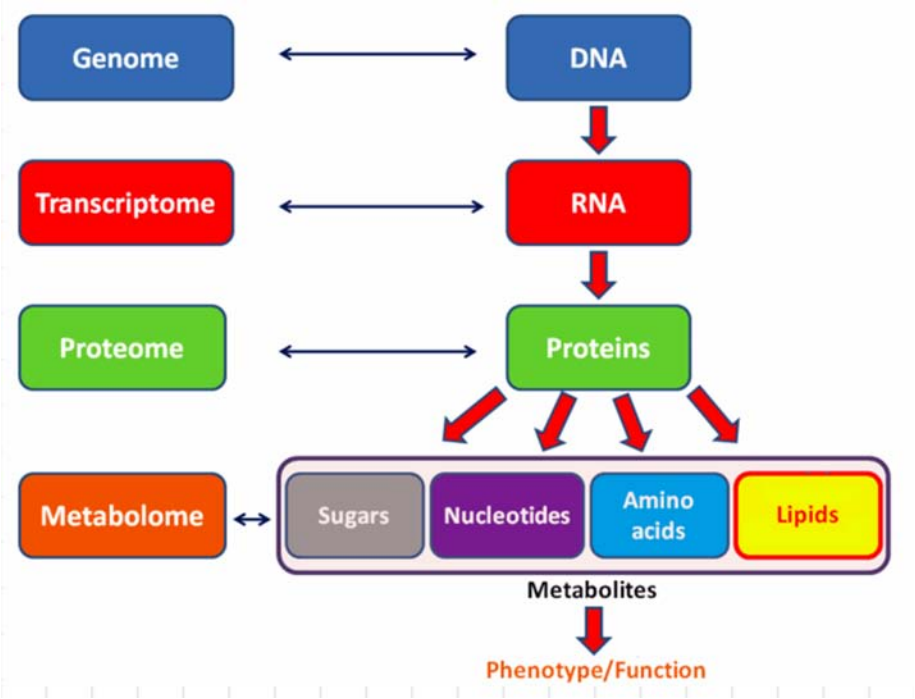
- **Préparation de l'échantillon** (étape clés)

- **Applications**:
  - Surface de tissus animaux
  - Surface de tissus végétaux
  - Autres surfaces (biologique ou non, plastique, forage et carottage…)

Définition de la métabolomique

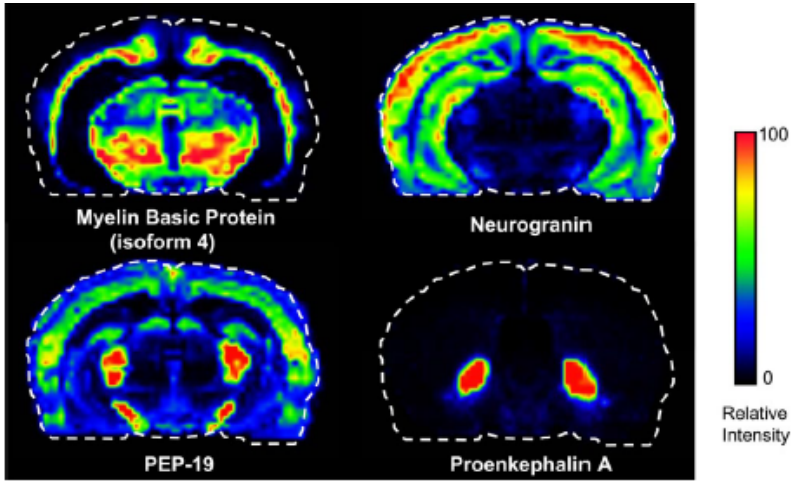
- **Le métabolome:** l'ensemble des petites molécules (métabolites) d'un système vivant.

- **La métabolomique:** l'analyse de l'ensemble des molécules de petite masse moléculaire (une limite arbitraire est fixée à 1000 ou 3 000 uma) d'un système biologique.



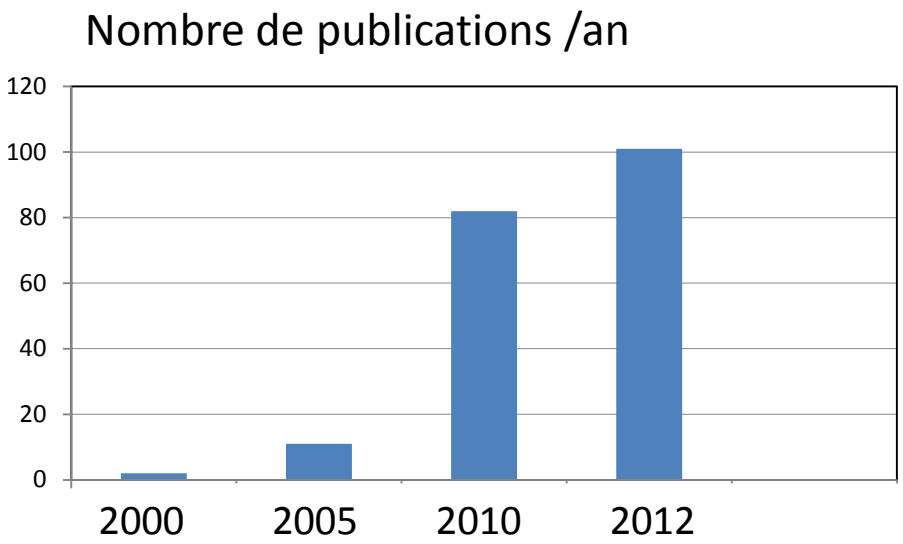
Définition de la spectrométrie de masse et imagerie *in situ*

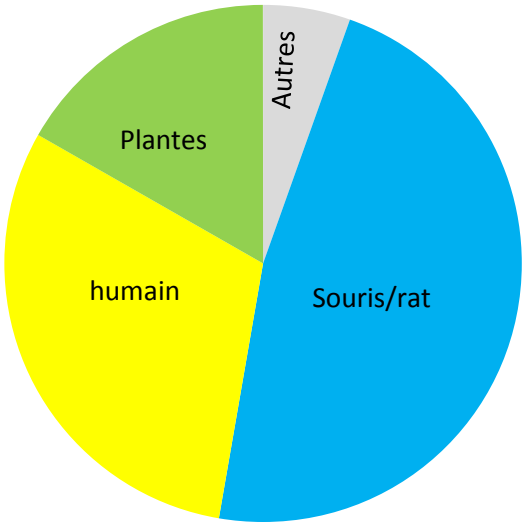
- Technologie émergente
- possibilité d'identifier des molécules sur des échantillons solides
- Permet d'analyser directement des molécules à la surface des tissus
- Les molécules:
  - Métabolites
  - Médicaments
  - Protéines,
  - Peptides,
  - Lipides,
  - tRNA
  - RNAs,



- Permet de déterminer la distribution spatiale et temporelle de molécules dans des tissus, sans marquage préalable
- Résolution spatiale (5µm)

Imagerie pas spectrométrie de masse *in situ*





Article pionnier: Caprioli RM *et al* Anal. Chem (1997)

Ancêtre: Hillenkamp F el al Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process (1975)

Stoeckli, M., Chaurand, P., Hallahan, D. E., and Caprioli, R. M. (2001) Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat. Med.* ***7, 493–496***

Chaurand, P., Schwartz, S. A., and Caprioli, R. M. (2002) Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Curr. Opin. Chem. Biol.***6, 676–681**

Fournier, I., Day, R., and Salzet, M. (2003) Direct analysis of neuropeptides by in situ MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *Neuro Endocrinol.Lett.* ***24, 9–14***

Définition de la spectrométrie de masse et imagerie *in situ*

- **Identification-spatiotemporelle de molécules dans des tissus biologiques**

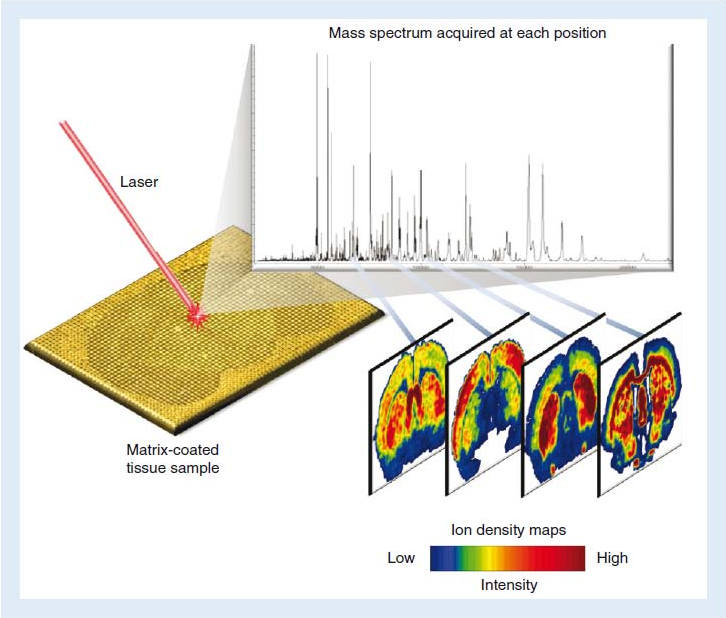
Image moléculaire

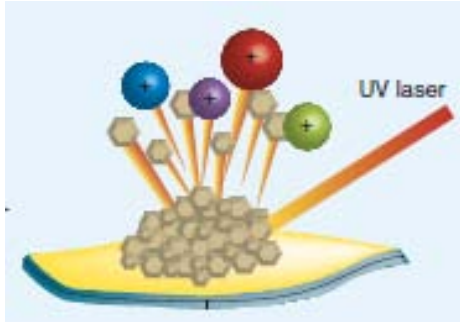
- Identification de plusieurs molécules dans une même analyse
- Identification de molécules dans un organisme entier ou dans un organe

- Couplage possible avec la microscopie classique
- Compatible avec les techniques histologiques (oui en Protéomique)
- Compatible avec les méthodes Protéomiques & Métabolomiques
- Obtention d'images moléculaires > 100 Mbytes / Gbytes/échantillon

Principe de la spectrométrie de masse et imagerie *in situ*: MALDI Imaging

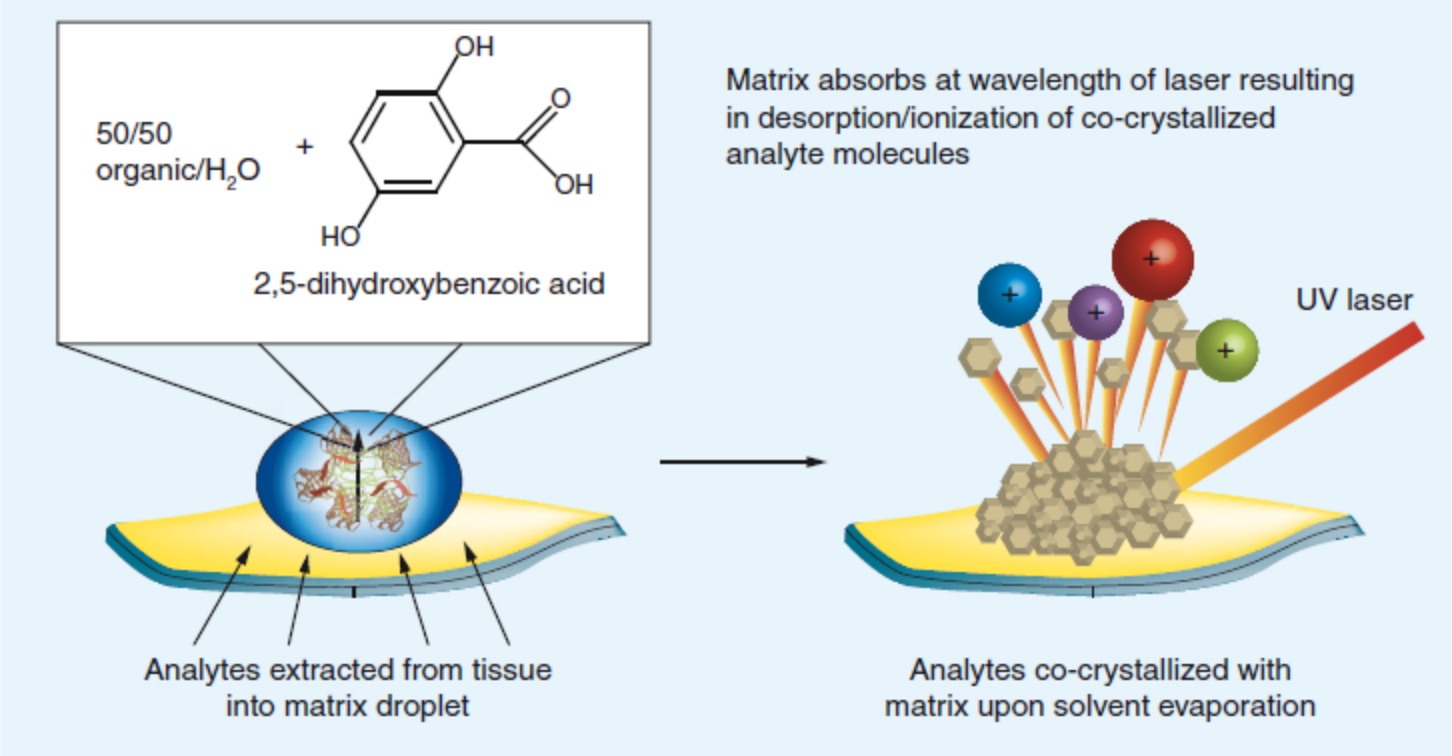
- **Il existe différentes méthodologies**
  - MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
  - *SIMS (secondary ion mass spectrometry)*
  - *DESI (Desorption electrospray Ionization)*
  - *Mobilité ionique (à suivre)*



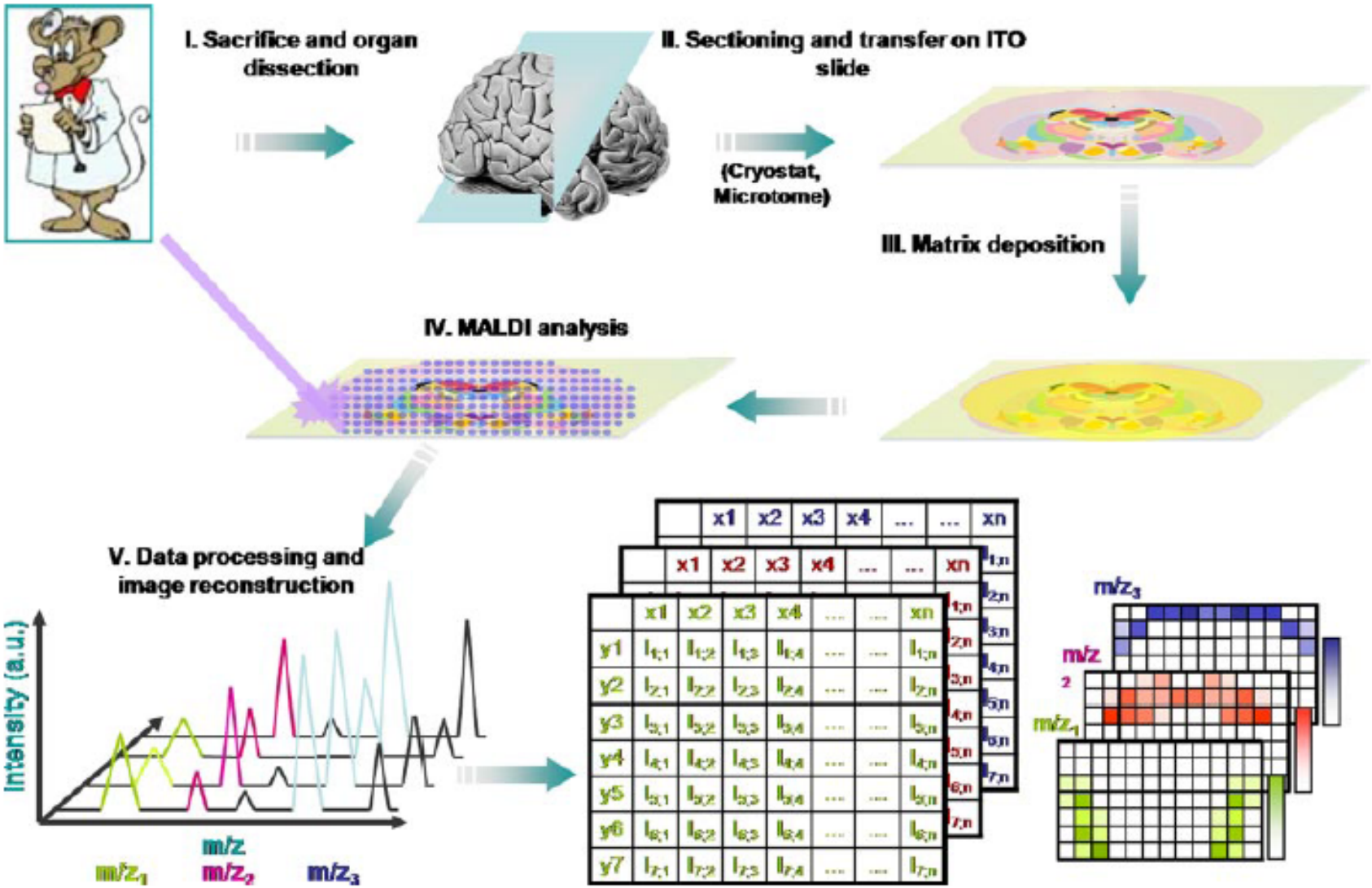


L'ionisation en MALDI Imaging

Le choix de la matrice est un point clés



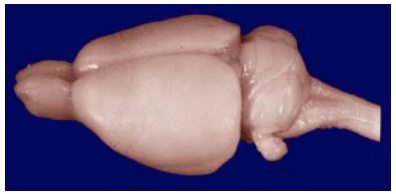
Comment ca marche l'Imagerie MALDI



Franck J et al *Molecular & Cellular Proteomics 2009*

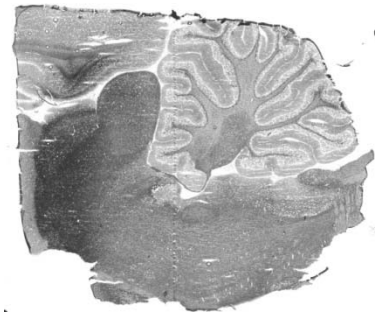
Imagerie métabolique par “MALDI Imaging” workflow

preparation



Congélation

Cryo-microtome

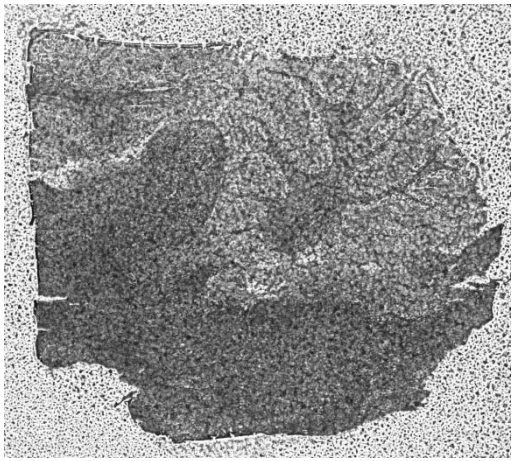


Cryosections (8-12µm)

MALDI matrix preparation
(SA, DHB or HCCA)

Air brush pistol

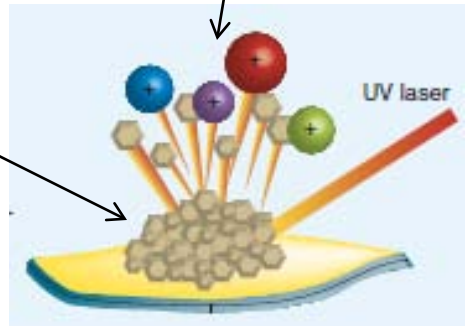
TLC sprayer



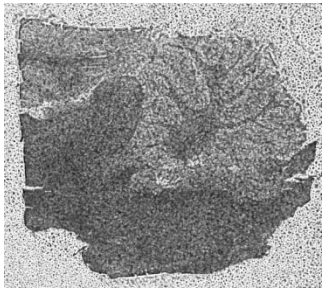
Matrix coated section (8-12µm)

La coupe est recouverte de matrice

Les molécules s’ionisent

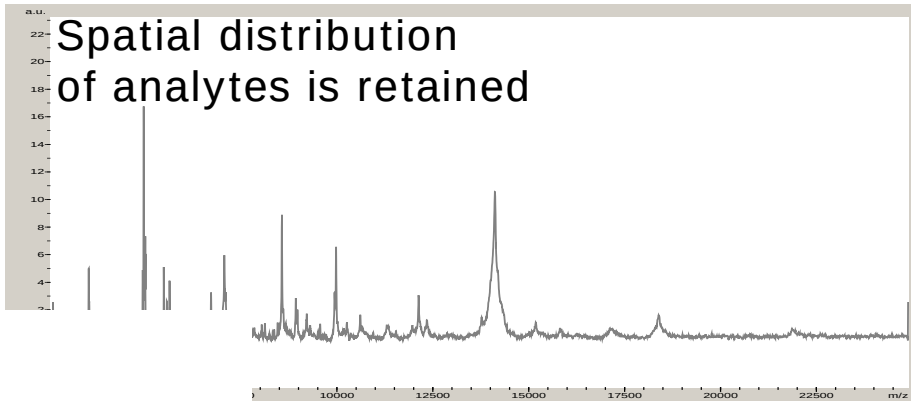


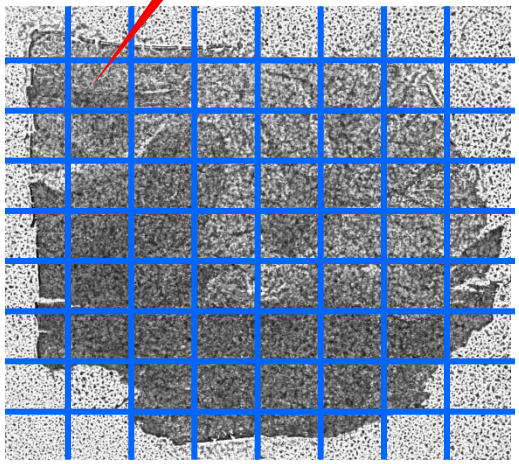
MALDI Imaging workflow



Matrix coated tissue section

MALDI target adapter for slides

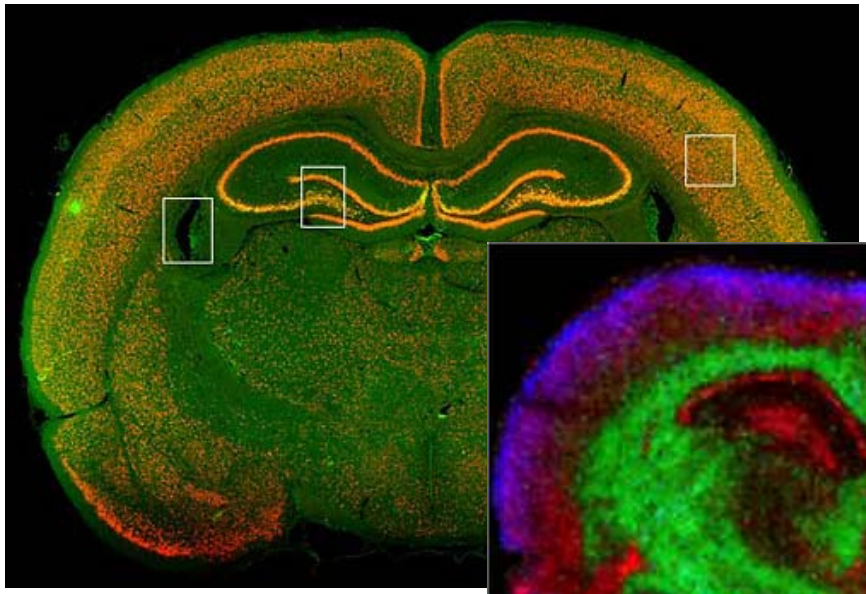




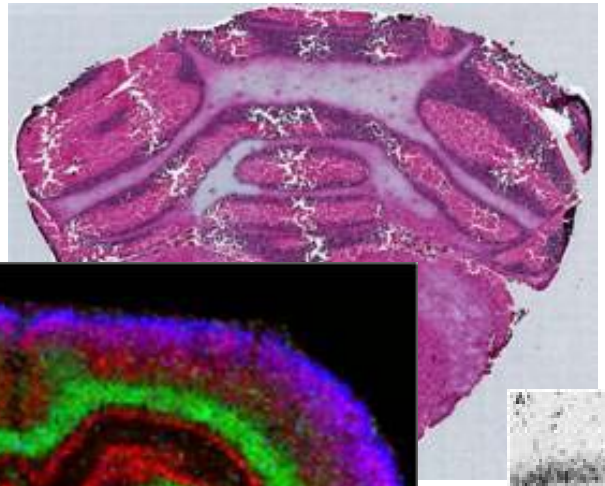
Raster size ~30-300 µm

MALDI Imaging

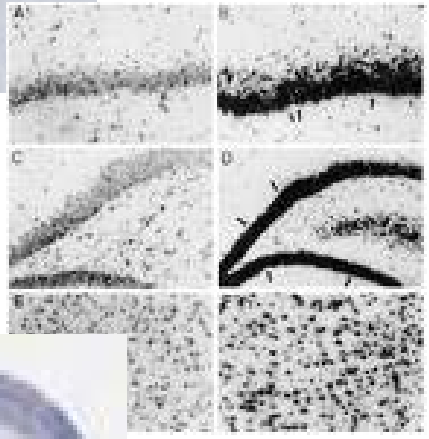
Immunohistochemistry



H & E stain



In situ hybridization

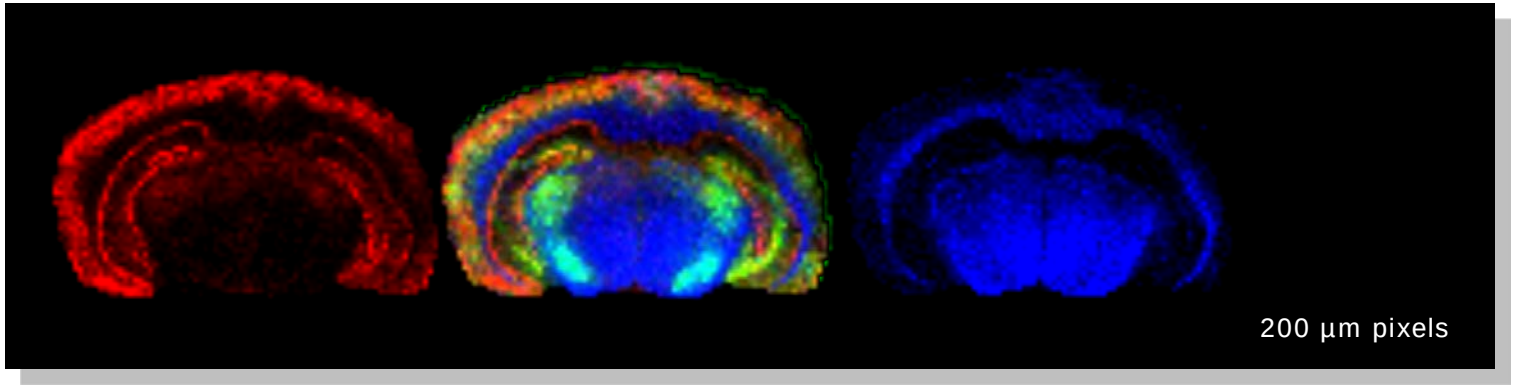


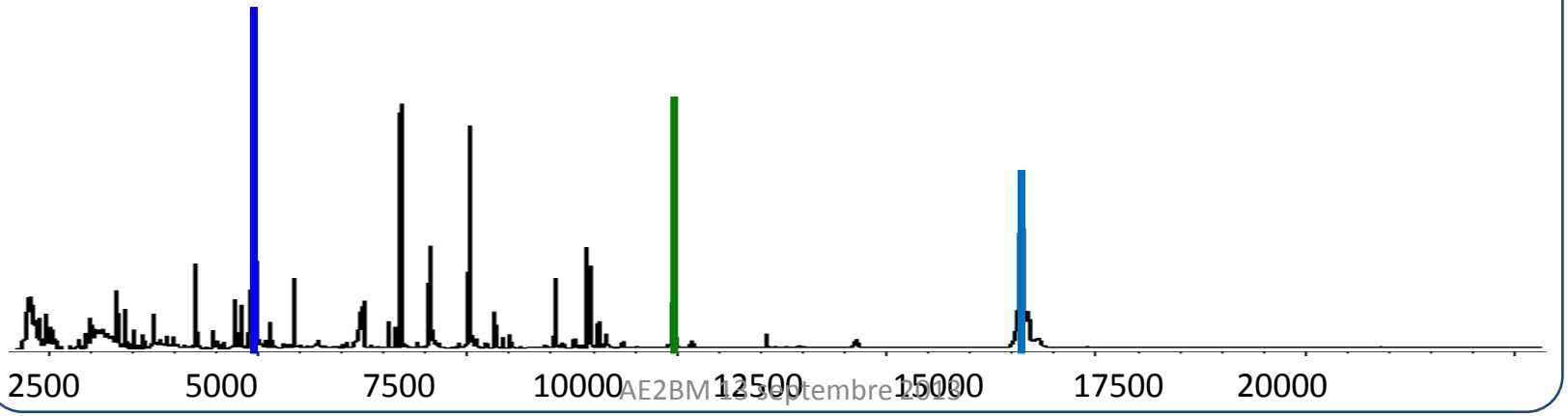
MALDI Imaging:

- Approche ciblée/non ciblée
- pas de marquage
- Plusieurs molécules identifiées dans une même analyse
- Statistiques(PCA etc…)

Comment obtenir une image moléculaire

- **Préparation d'une coupe d'un tissus recouvert de matrice déposée sur une plaque MALDI**
- **On tire sur la coupe avec un lazer UV (source MALDI)**
- **On obtient des spectres MALDI MS ou MS/MS**
- **Conversion des spectres en pixels**





On peut identifier différentes molécules dans différentes régions du cerveau

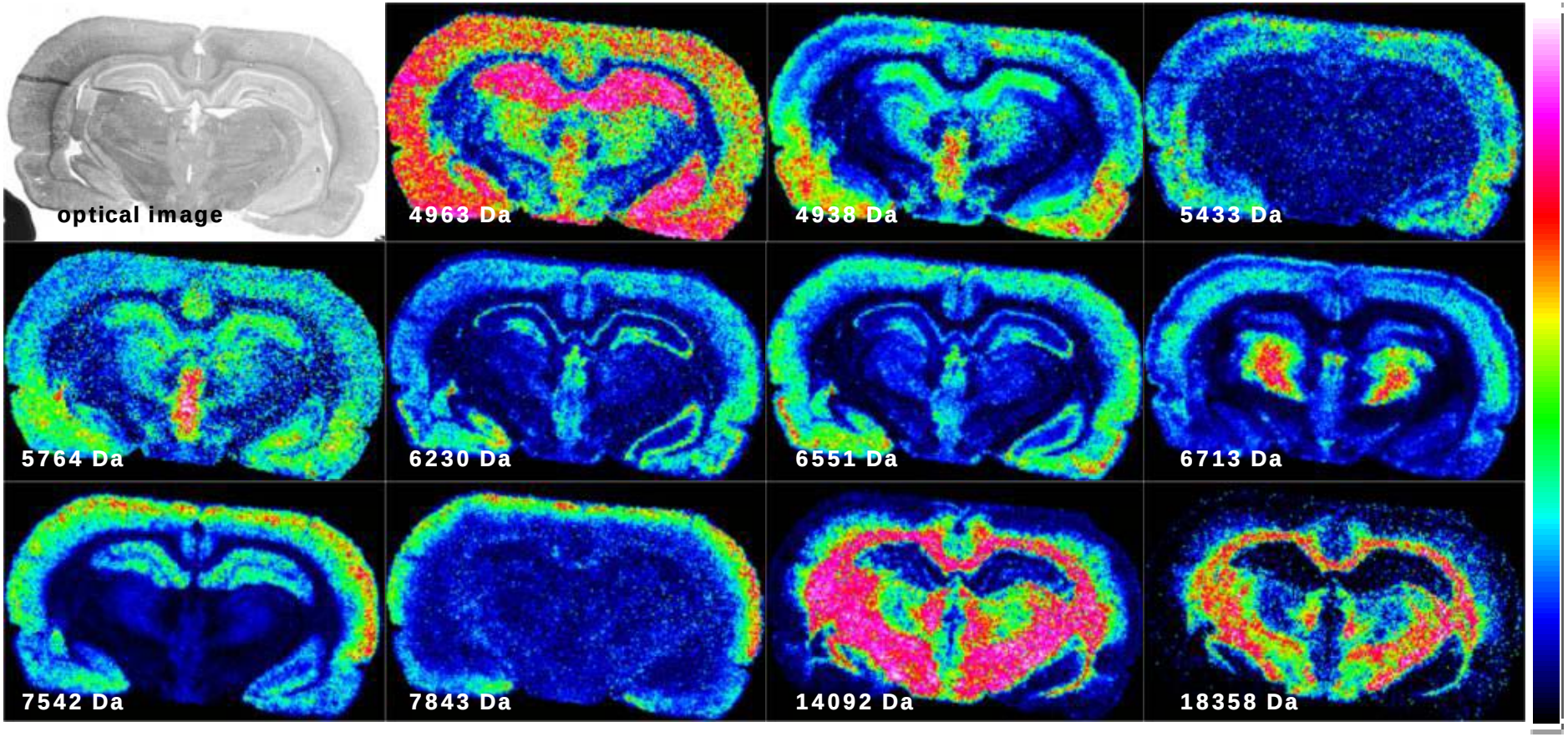
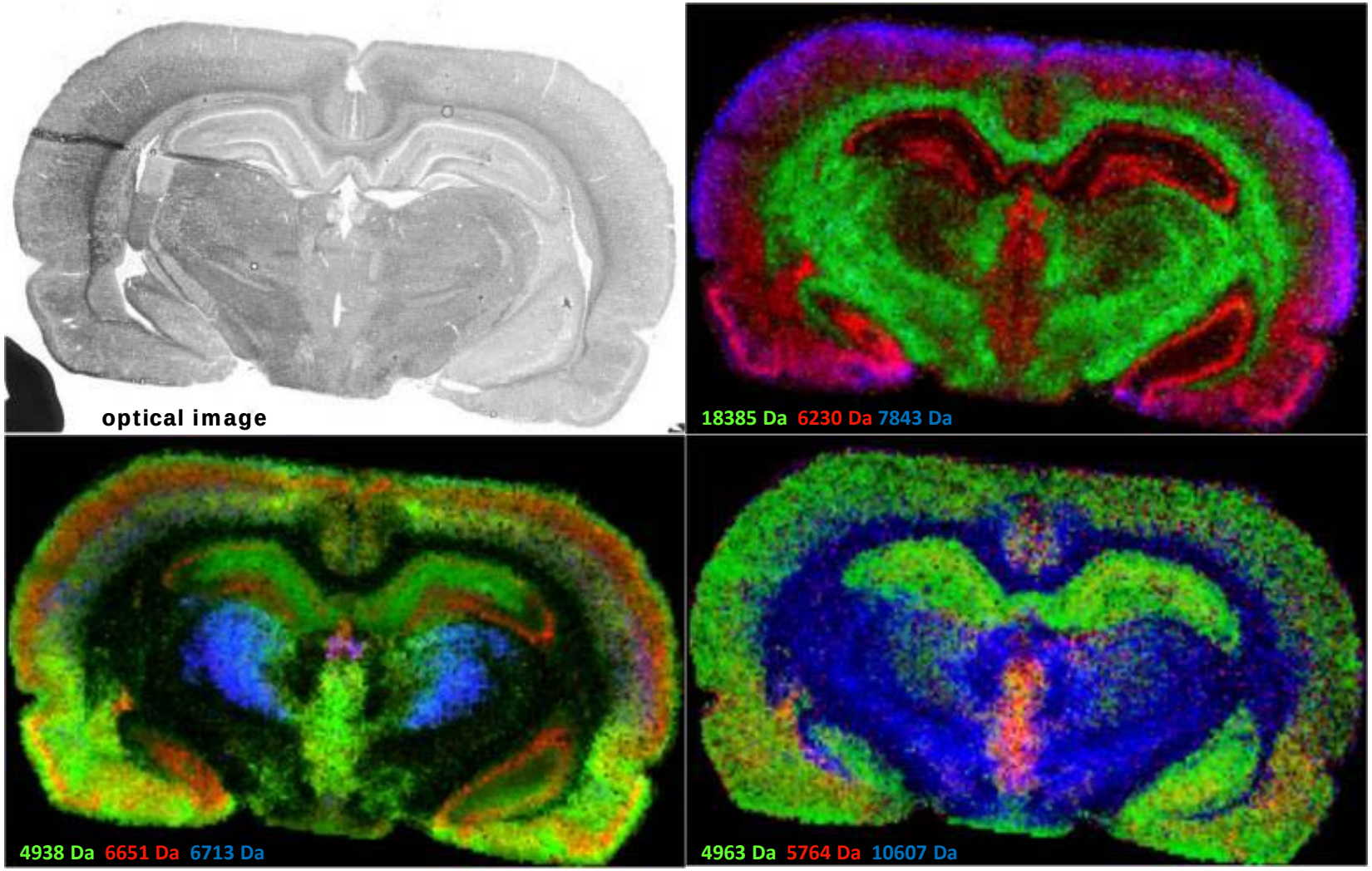


Image resolution 80µm

On peut analyser simultanément plusieurs molécules ou alors faire une recherche à l'aveugle (profiling)



MALDI Imaging

Table 2 Listing of commercially available mass analyzers for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry imaging

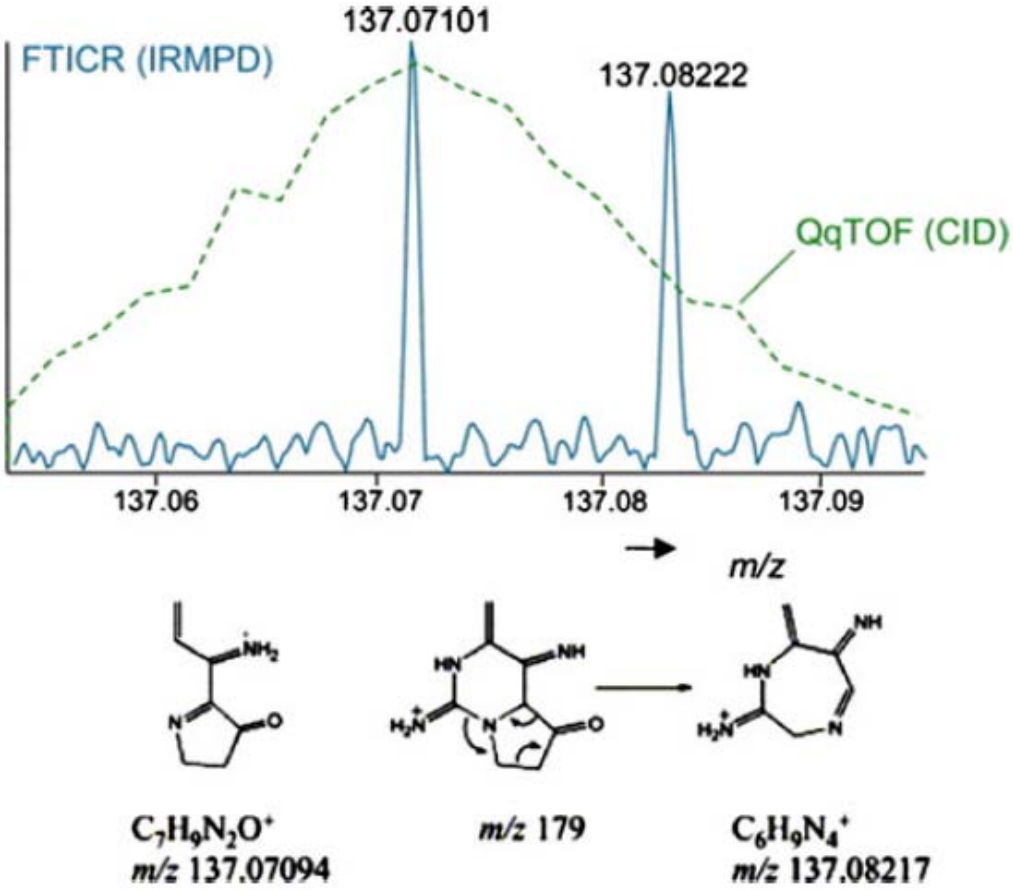
Mass analyzer	Manufacturer[a]	MS/MS	MS*n*	Resolution ($m/\Delta m$)[b]	Relative mass spectra acquisition speed[g]	Other notes[h]
TOF	Bruker Daltonics	No	No	2500/40 000[c]	Fast	High vacuum
TOF/TOF	Bruker Daltonics/AB Sciex	Yes	No	>26 000[d]	Fast	High vacuum
Ion trap – TOF	Shimadzu Scientific	Yes	Yes	10 000	Fast	Moderate pressure
Ion trap	Thermo Scientific	Yes	Yes	~1000	Medium	Moderate Pressure
Ion trap – Orbitrap	Thermo Scientific	Yes	Yes	100 000	Slow	Moderate Pressure
FTICR	Bruker Daltonics	Yes	Yes	>200 000[e]	Slow	Moderate pressure
IM-Q-TOF	Waters	Yes	No	13 000/40 000[f]	Fast	Ion mobility separation

- Résolution sur la masse m/z la plus élevée (FT-ICR, FT-Orbitrap)
- Les analyseurs rapides (TOF)

- En métabolomique les molécules sont petites
- Les métabolomes sont souvent des matrices complexes

Importance de la resolution en métabolomique

Il faut pouvoir identifier un métabolite avec la plus grande précision (0.0112 Da différence)



Les matrices

En métabolomique le problème est que la matrice est un métabolite

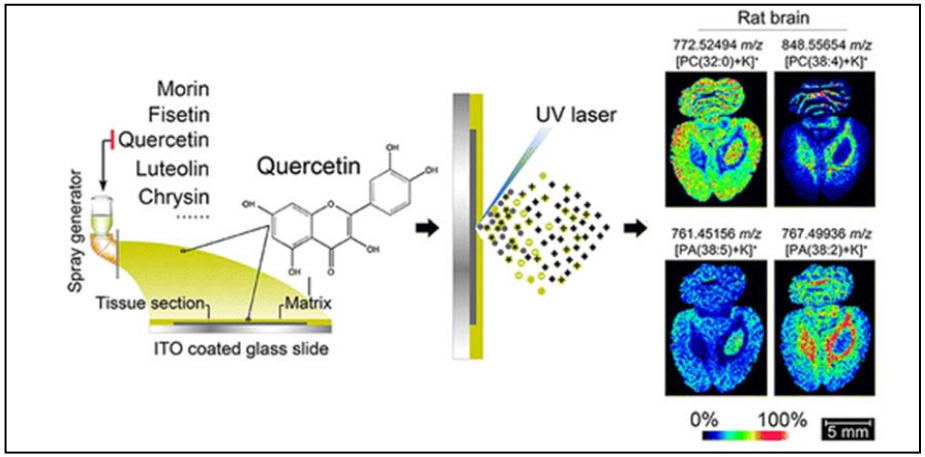
En métabolomique il n'y a pas de matrice universelle

On utilise les matrices de la proteomique

- sinapinic acid (SA)
- cyano-4-hydroxycinnamic acid
- 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB

Choix de la matrice est fonction de la molécule à analyser
Développement majeure des prochaines années

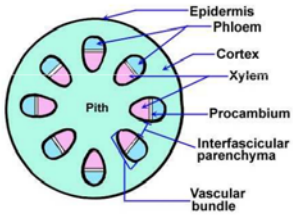
Hydroxyflavones as a New Family of Matrices for MALDI Tissue Imaging



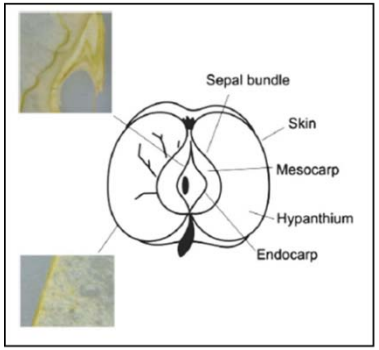
Anal. Chem. 2013, 85, 7566−7573

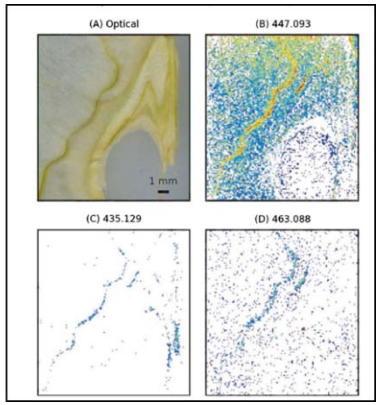
Préparation de l'échantillon: étape clés

- Faire une coupe d'un tissu n'est pas toujours facile
  - Il est plus difficile de faire une coupe sur des tissus végétaux que animaux
  - Besoin de l'expertise en histologie
  - Microtome/cryomicrotome, fixations, inclusions….
  - Les constructeurs et les plateformes n'ont souvent pas cette expertise

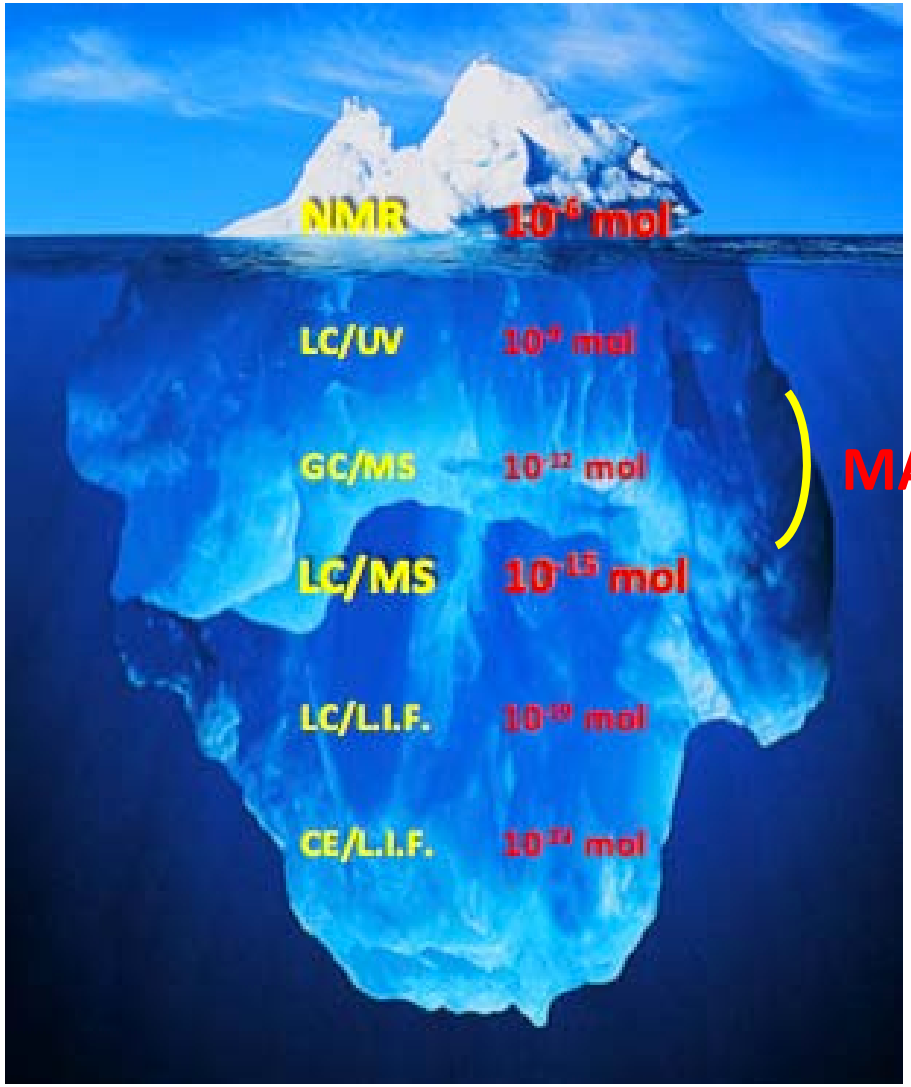


  - Lavage des tissus (enlever les sels)
  - délipidation (baisser la suppression d'ions)





Sensibilité de l'imagerie par spectrométrie de masse

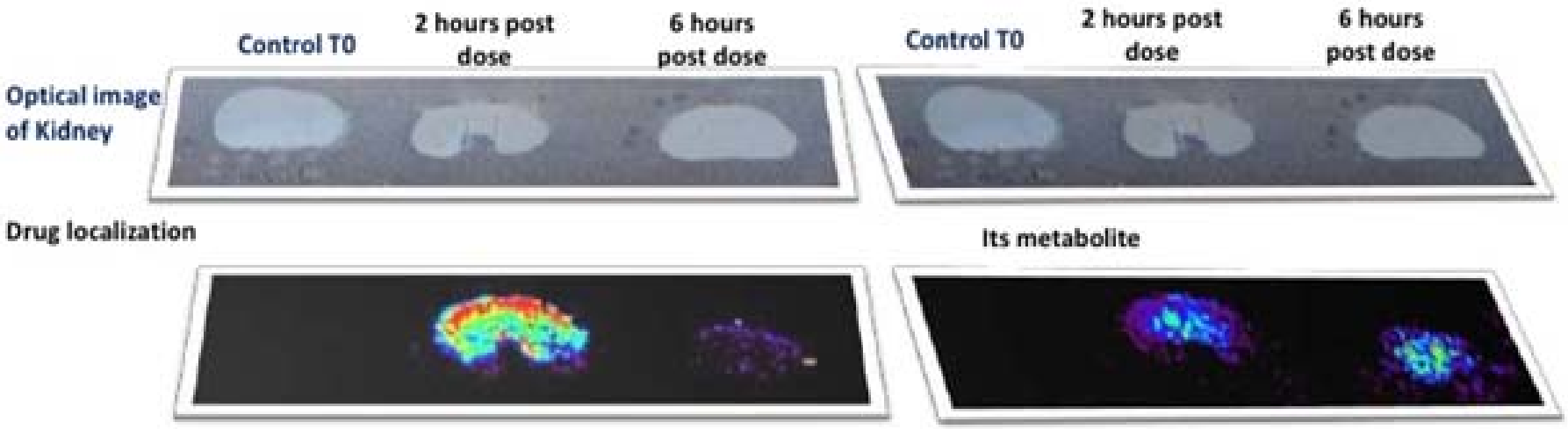


IM-FTICR

MALDI Imaging

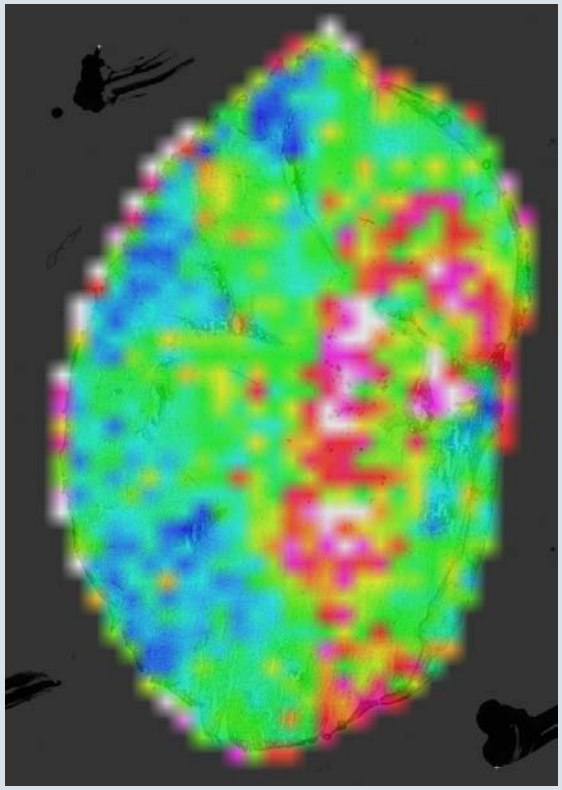
IM-MS/MS ?

Imagerie MALDI: Etudes pharmacocinétiques



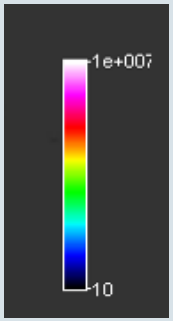
Imagerie MALDI: Etudes pharmacocinétiques

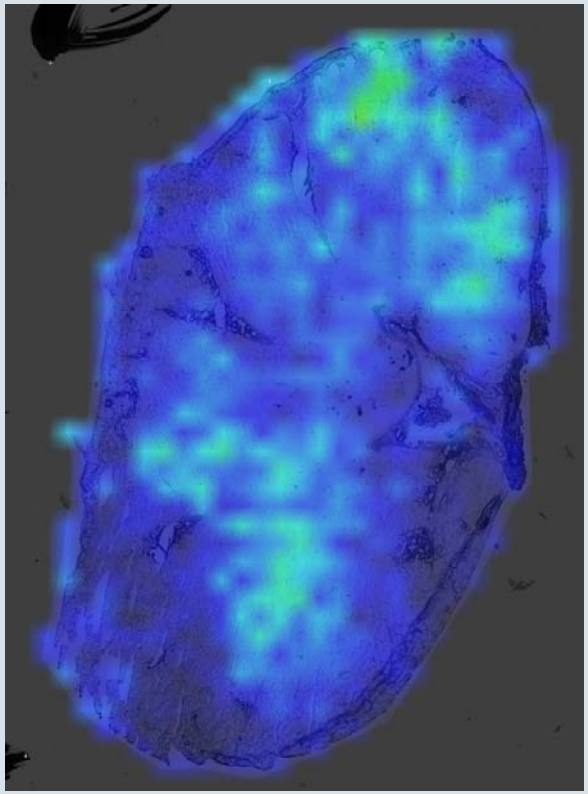
Etude de la distribution spatiale et temporelle d'un médicament dans le rein d'un rat à 30 min et à 2h



T= 2h

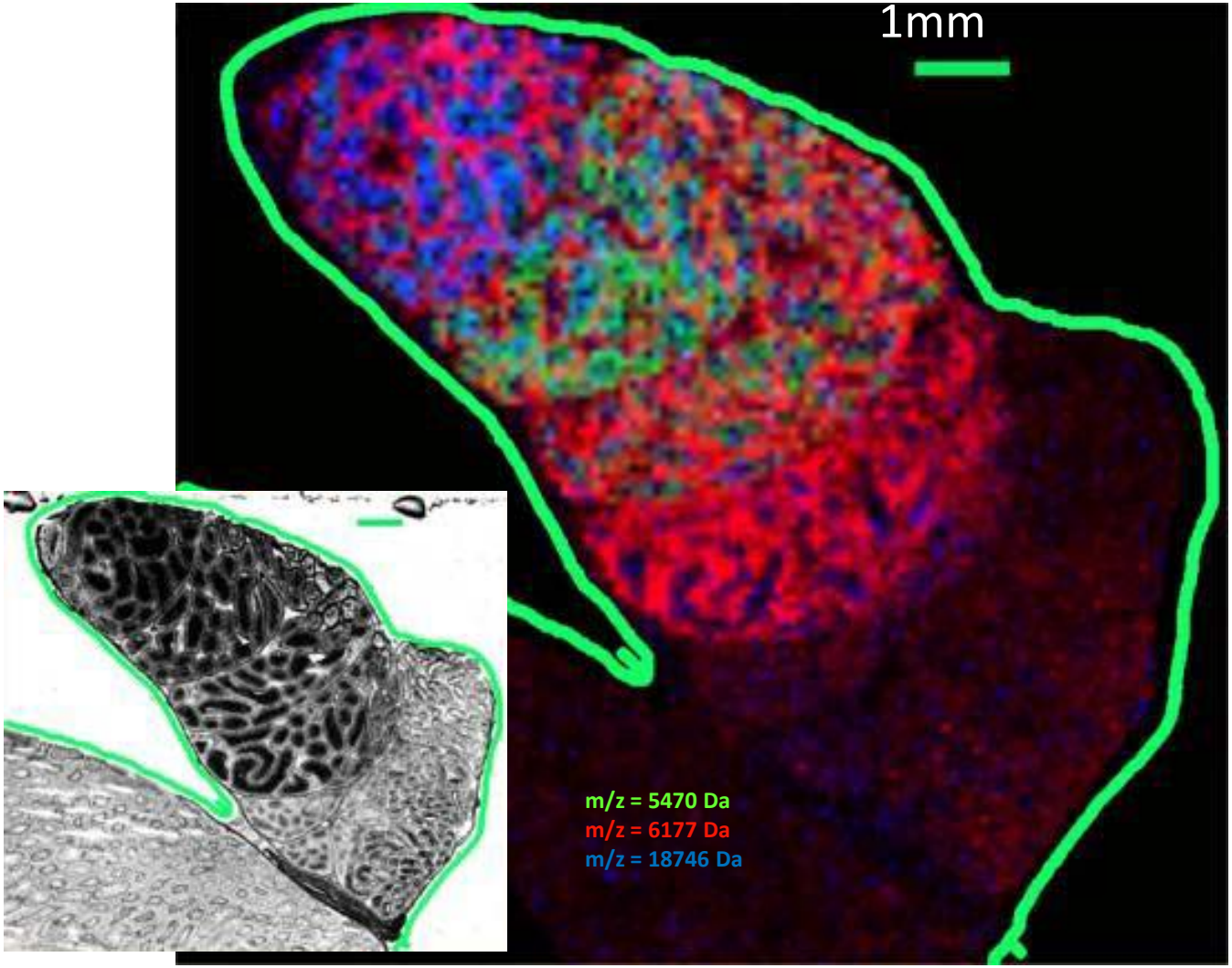
m/z = 313.1485





T = 30 min

Plusieurs molécules sont co-localisées dans une zone particuliére: distribution région – spécifique des molécules



Etude pharmacocinétique par MALDI Imaging

Distribution spatio-temporelle d'un médicament chez la souris

Famotidine
médicament utilisé dans le traitement des ulcères (estomac ou du duodénum). Il réduit la production d'acide et de pepsine ainsi que le volume de la sécrétion gastrique

Administration de Famotidine à une souris

3 minutes

La sourie est sacrifiée

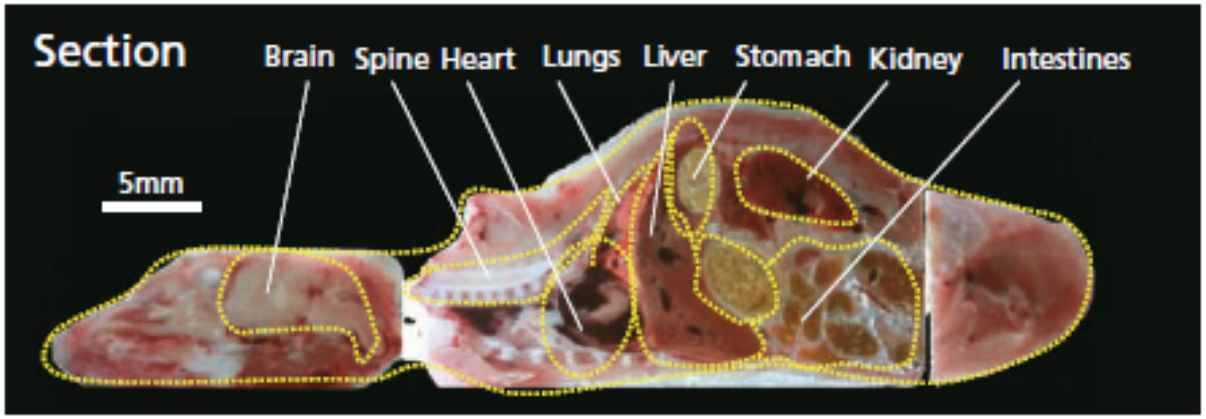
Etude pharmacocinétique par MALDI Imaging

Distribution spatio-temporelle par MALDI Imaging de la Famotidine

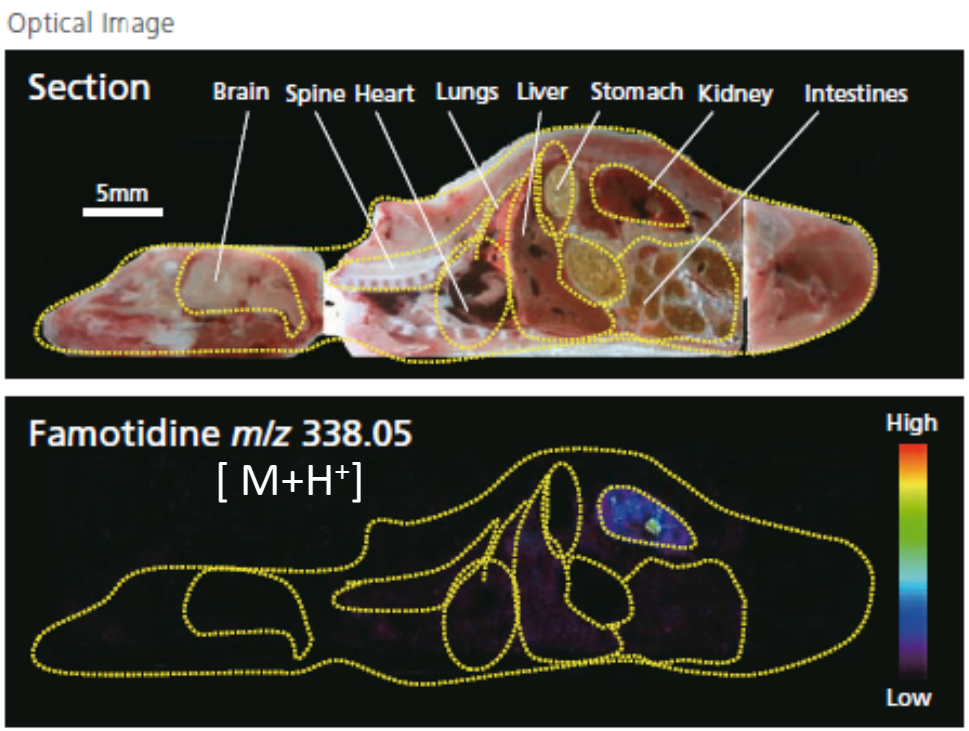
Questions:

- ou se trouve la Famotidine , dans quel(s) tissus au bout de 3 minutes ?
- à quelle concentration ?
- quels sont les produits du catabolisme de la Famotidine (confugués…) ?

Optical Image

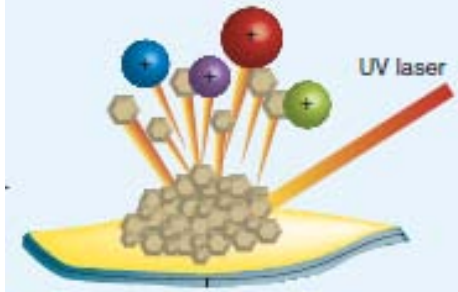


Distribution spatio-temporelle par MALDI Imaging de la Famotidine chez la souris



Famotidine
MW= 337.449 g/mol

Les molécules s'ionisent



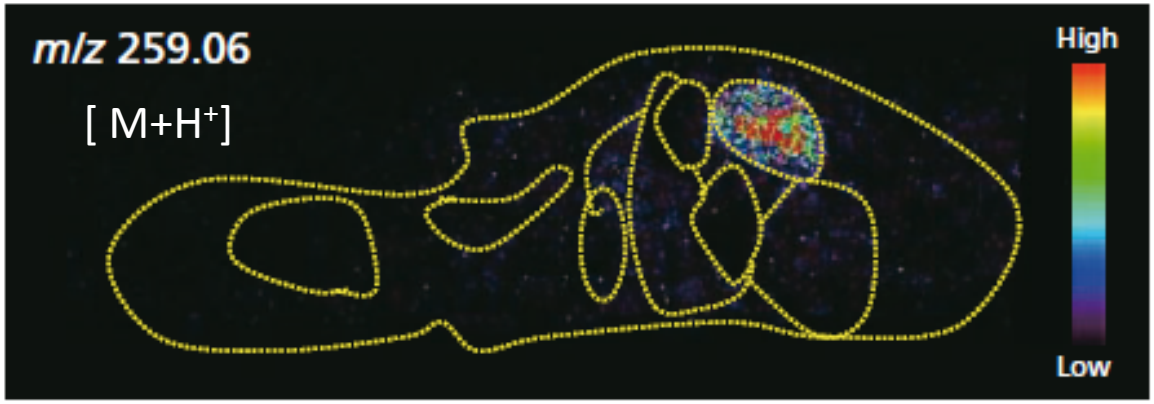
La coupe est recouverte de matrice DHB

Résolution spatiale basse: 200µm

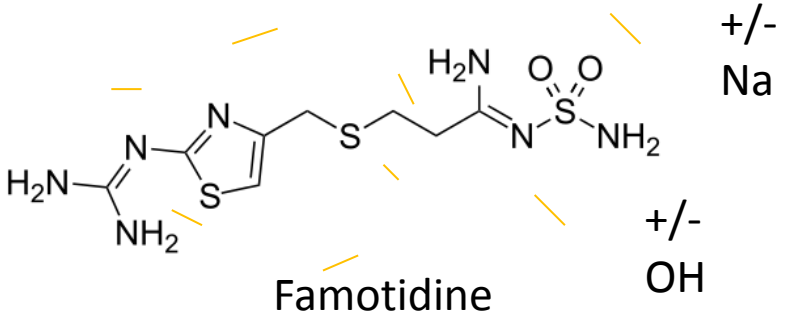
Accumulation de la Famotidine dans les reins

Distribution spatio-temporelle par MALDI Imaging de la Famotidine chez la souris

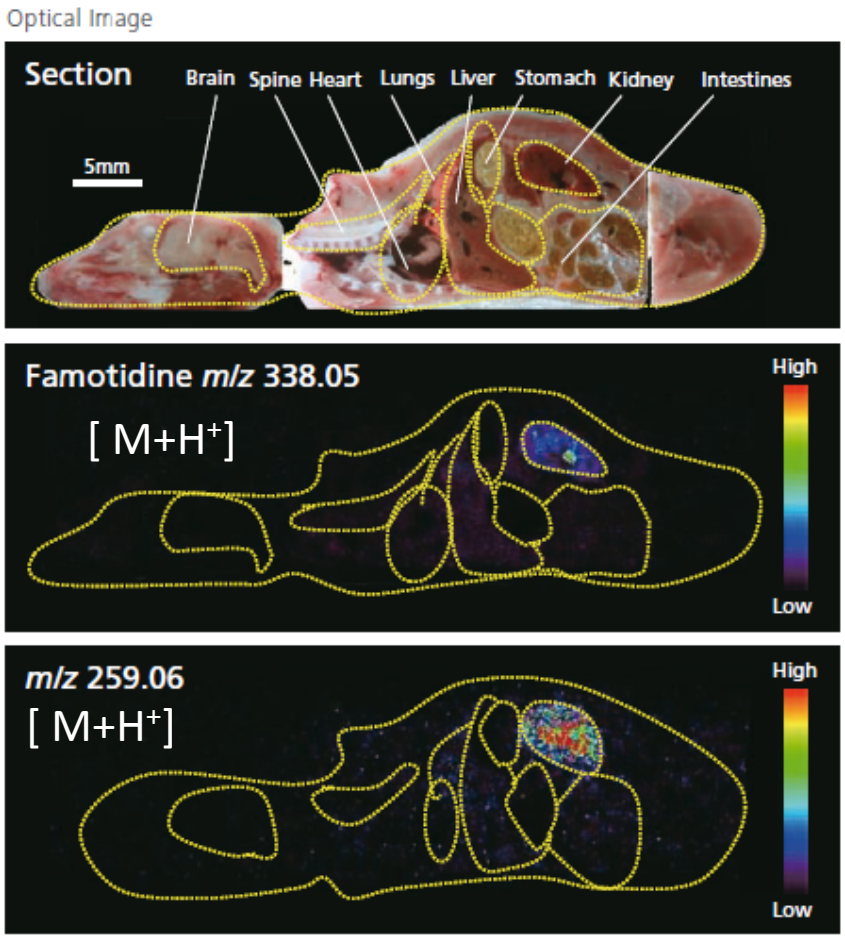
Accumulation de produits du catabolisme de la Famotidine dans les reins



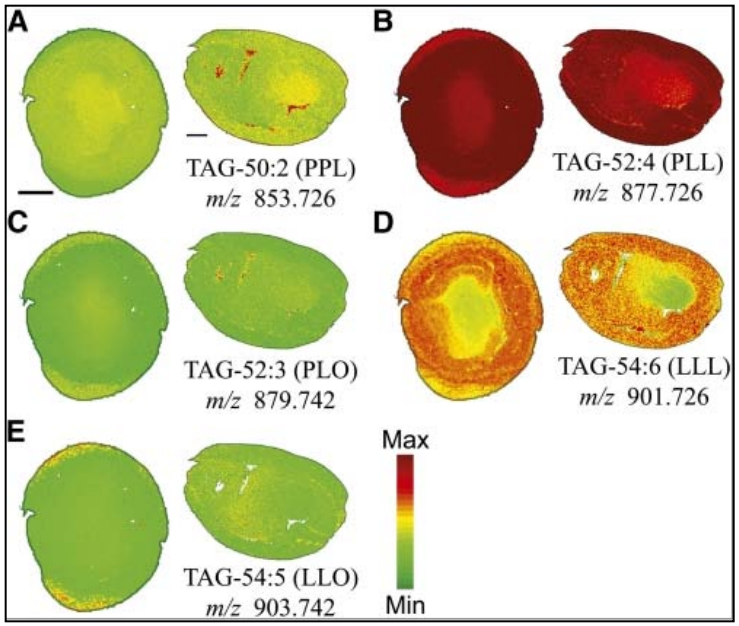
338.05> 259.06



338.05> 259.06

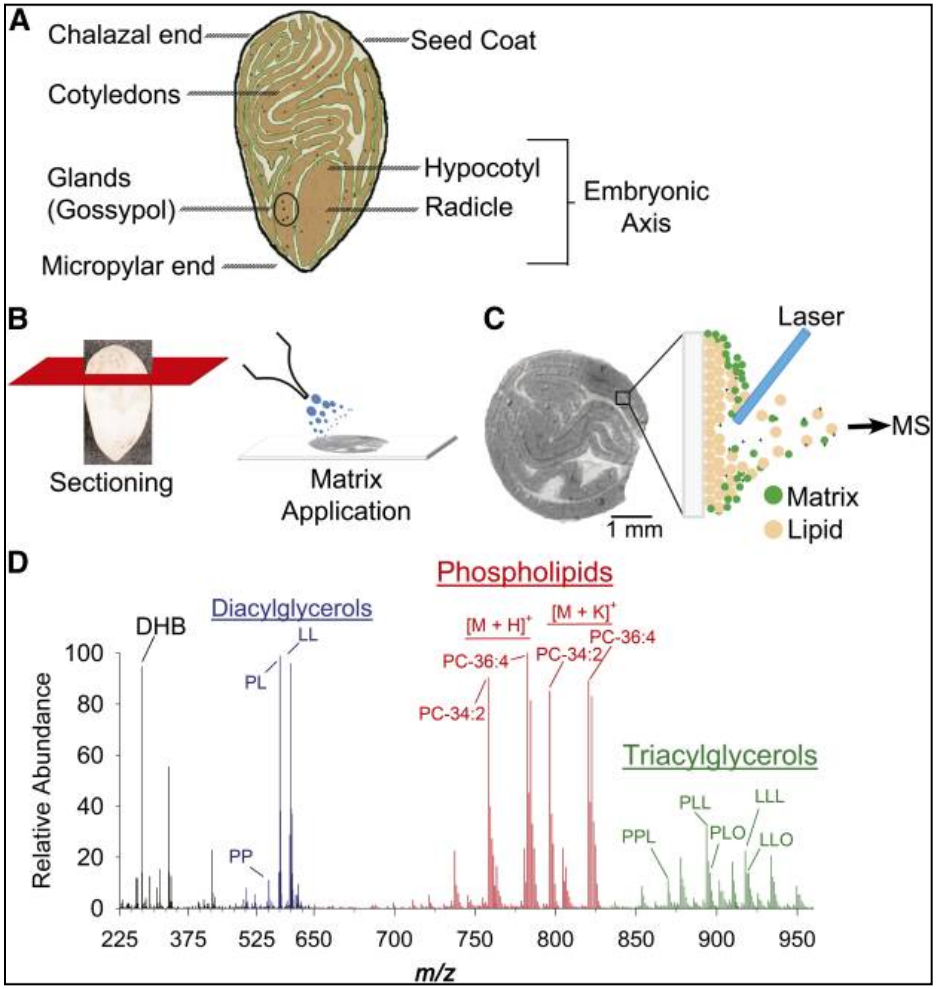

Optical Image
Section
Brain
Spine
Heart
Lungs
Liver
Stomach
Kidney
Intestines
5mm
Famotidine m/z 338.05
[M+H+]
High
Low
m/z 259.06
[M+H+]
High
Low

Spatial mapping of lipids at cellular resolution in embryos of cotton



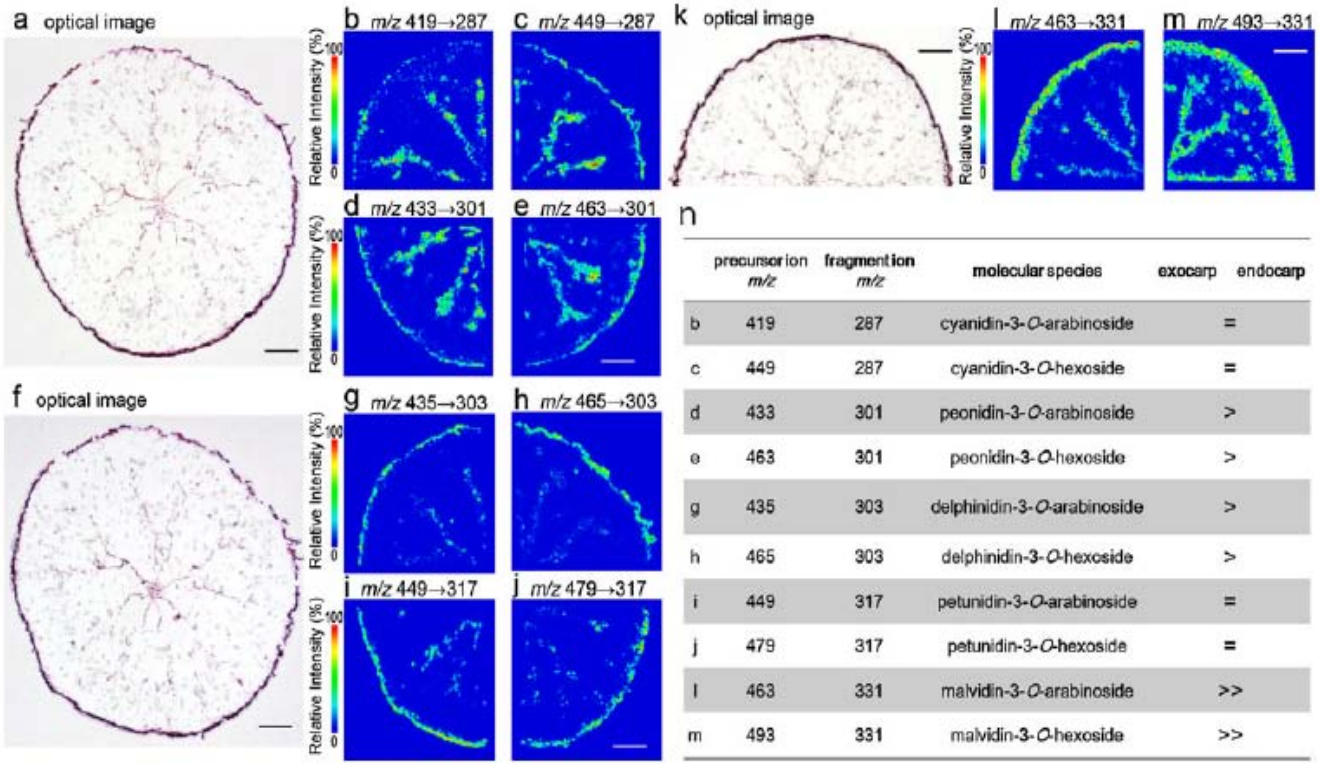
Distribution of Selected TAG Molecular Species.

Plant Cell, 2012,24(2):622-36



MALDI–IMS–MS analysis of anthocyanins in a rabbiteye blueberry section

MALDI-TOF/TOF



n

	precursor ion m/z	fragment ion m/z	molecular species	exocarp	endocarp
b	419	287	cyanidin-3-*O*-arabinoside	=	
c	449	287	cyanidin-3-*O*-hexoside	=	
d	433	301	peonidin-3-*O*-arabinoside	>	
e	463	301	peonidin-3-*O*-hexoside	>	
g	435	303	delphinidin-3-*O*-arabinoside	>	
h	465	303	delphinidin-3-*O*-hexoside	>	
i	449	317	petunidin-3-*O*-arabinoside	=	
j	479	317	petunidin-3-*O*-hexoside	=	
l	463	331	malvidin-3-*O*-arabinoside	>>	
m	493	331	malvidin-3-*O*-hexoside	>>	

Identification de bio-marqueurs du cancer du foie

Modèle: souris/ xénogreffe de cellules / cancer colorectal humain

Injection par la veine porte de cellules
HCT116
(GFP-tagged human colon cancer cells)

Tumor Model Mice

2 semaines →

Tumor Growth

Souris âgée de
13 semaines

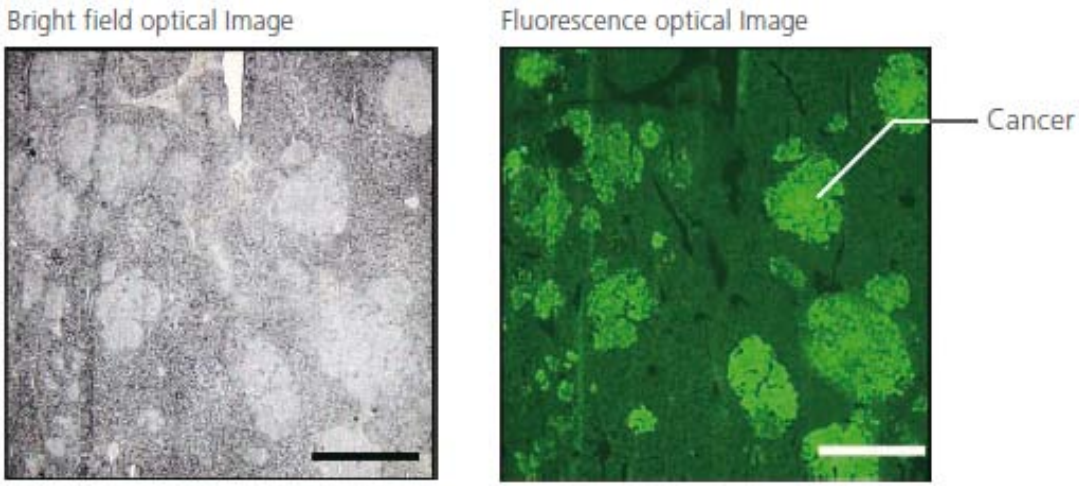
Propagation du
cancer dans le foie

↓

Animal est sacrifié 2 semaines après
injection

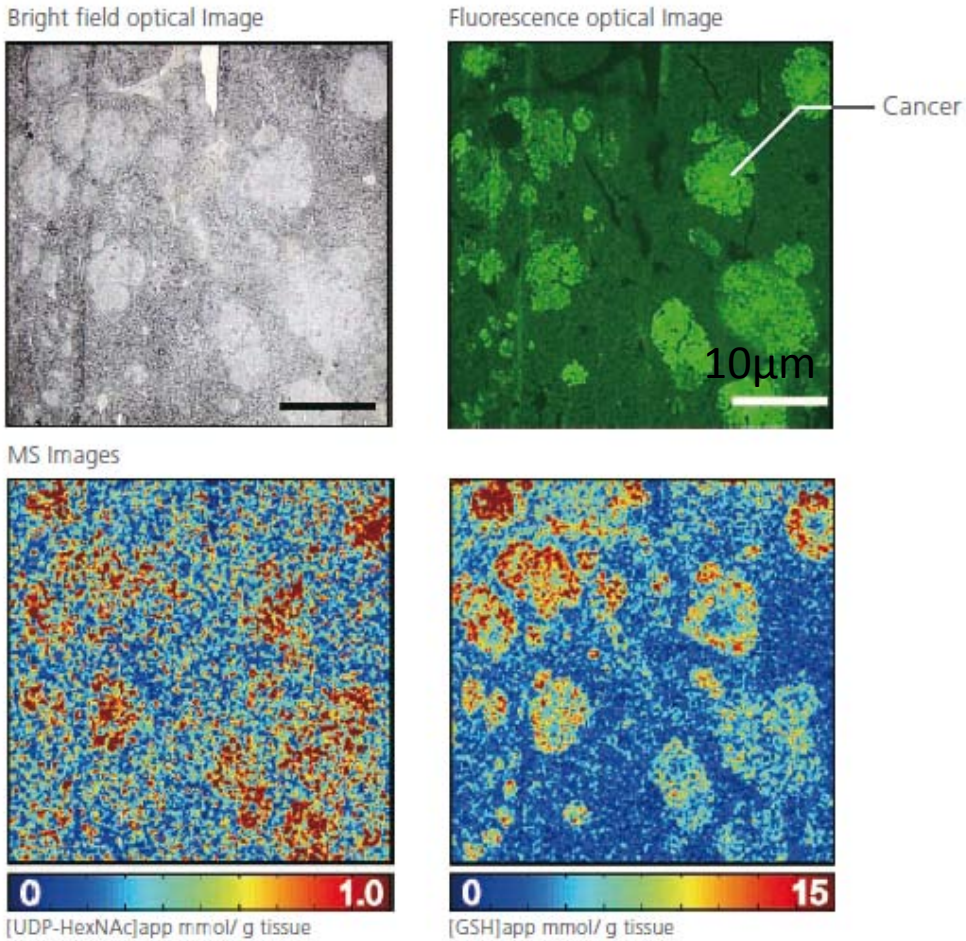
Identification de bio-marqueurs du cancer du foie

Identification des zones cancéreuses par microscopie à fluorescence ou par microscope optique



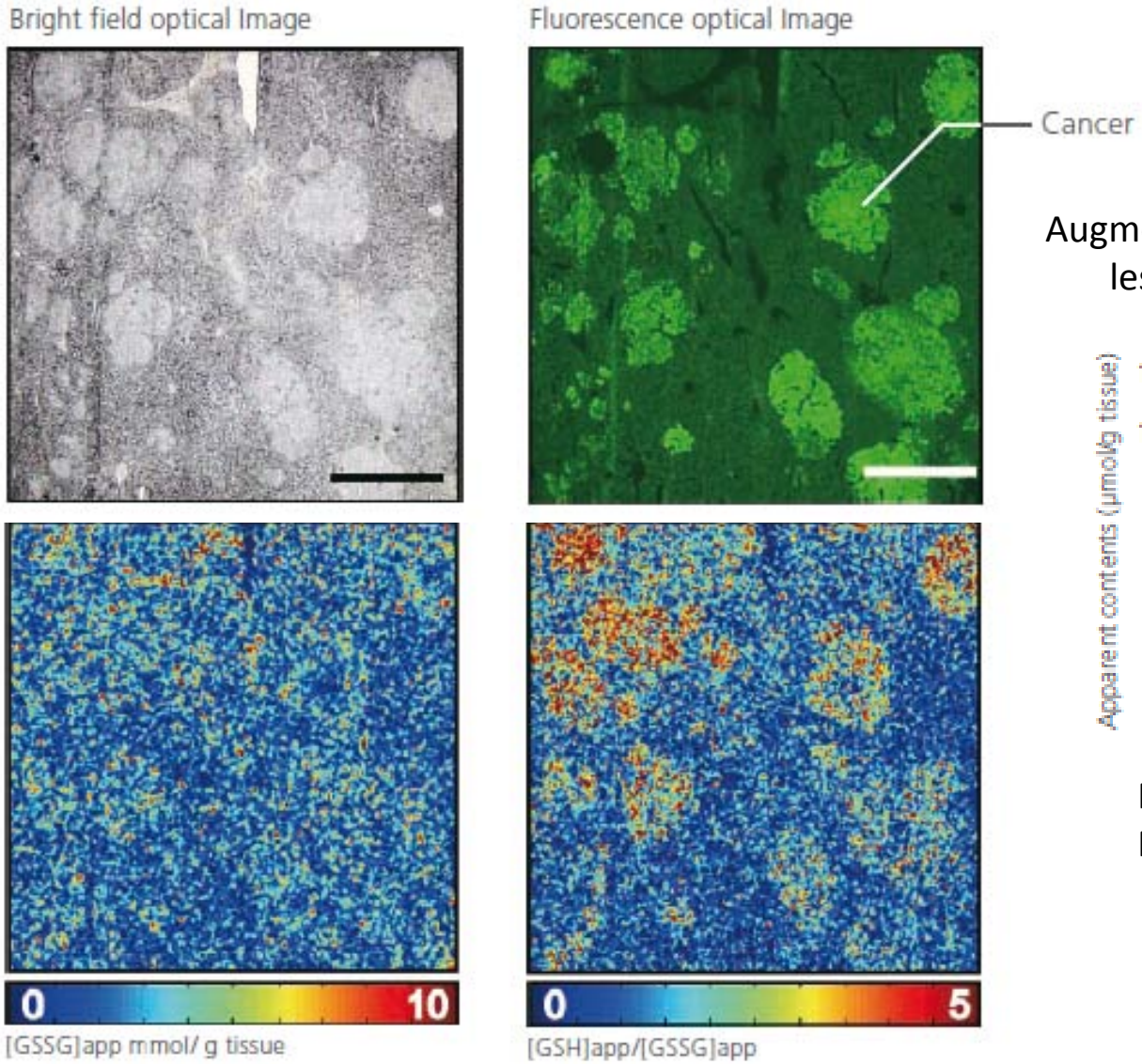
Identification de bio-marqueurs du cancer du foie par MALDI Imaging

Dosage du gluthation dans le foie (GSH)

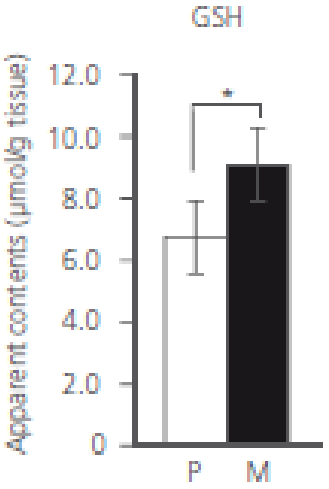


Échantillon: foie de souris
Résolution spatiale: 10µm
Matrice: 9-AA(aminoacridine)

Dosage du glutation dans le foie (GSH) par MALDI Imaging



Augmentation de GSH dans les tissus cancéreux



P: parenchyme
M:Metastase

Facteurs importants dans la réalisation d'images

2 parties:

- l'acquisition des données

  facteur limitant reste le temps d'analyse

  lui-même est tributaire de:

  - la fréquence de répétition des tirs
  - la rapidité de déplacement de la cible
  - temps d'acquisition de l'éléctronique

  Ex: à 1Hz l'acquisition durera une journée
  à 100Hz l'acquisition durera quelques heures

+ la durée d'analyse est importante: + l'échantillon sera dégradé + il y aura évaporation de la matrice sous vide

- le traitement des données

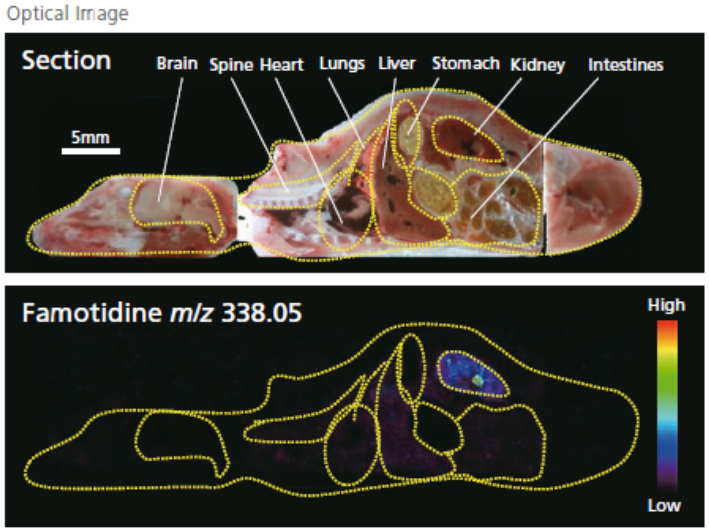
Metabolomics Strasbourg

conclusion

La métabolomique par spectrométrie de masse et imagerie *in situ*

- Technologie émergente
- possibilité d'identifier des molécules sur des échantillons solides
- Résolution tissulaire (5µm)
- MALDI Imaging est la technique la plus avancée

  - Ce qui est nouveau: Combinaison de différentes expertises
    - spectrométrie de masse
    - Métabolomique
    - Imagerie & microscopie
    - Histologie
    - Bioinformatique



Merci