



RAPPORT

Développement de méthodes pour la détection de polluants par imagerie Maldi : « Projet Maldi »

**Théo-Bob Muller
Daniel Lafitte
Emmanuel Wafo
Pierre Boissery
Marc Bouchoucha
Laurent Noé**

Table des matières

INTRODUCTION.....	3
OBJECTIF DU PROJET	3
POURQUOI AVOIR CHOISI LA MOULE ?	4
ETUDE DES ANTICANCEREUX.....	5
PRESENTATION DE LA METHODE.....	5
POURQUOI L'IMAGERIE MALDI	9
PRESENTATION DES ANTICANCEREUX	10
PROTOCOLE IMAGERIE MALDI	11
TEST DE LIMITE DE DETECTION	13
DUREE ET COUT DE L'ANALYSE.....	15
CONCLUSION.....	15

Introduction

Objectif du projet

Le développement de ces méthodes est fait dans le cadre du « *Réseau Intégrateurs Biologiques* » (*RINBIO*).

Le milieu marin est le réceptacle final des contaminants organiques et minéraux produits par l'activité humaine. Véhiculés par les fleuves vers les embouchures ou concentrés dans des stations d'épuration incapables d'effectuer une dégradation totale de ces biocides, ces derniers se retrouvent principalement dans les zones côtières. Les premiers biocides organiques à avoir été mis en évidence furent les composés pesticides organo-chlorés dont le principal fût le DDT. L'utilisation intensive de ce pesticide en Italie au cours de la 2^{ème} guerre mondiale a conduit les chercheurs à contrôler sa présence dans les eaux et les organismes marins tels que moules et poissons. Le développement de la chromatographie gazeuse équipée de détecteurs spécifiques tels que les captures d'électrons ont contribué à cette recherche. Quelques années plus tard, l'apparition du couplage chromatographie gazeuse-spectrométrie de masse a permis de mettre en évidence une autre famille de contaminants qui se sont révélés très largement répandus sur notre globe : les PCB. La présence de ces derniers dans l'ensemble des échantillons prélevés dans le milieu marin : sédiments, bivalves, poissons... a conduit la Communauté Scientifique mondiale à lancer un vaste programme de recherches de ce polluant. Ce programme le Mussel watch a confirmé la dispersion planétaire de ce biocide. En France, sous l'égide du Ministère de l'Environnement, une étude complémentaire a été menée de 1974 à 1976. Elle a consisté à la cartographie de nos côtes par ce polluant. Comme pour le Mussel watch, les moules mytilus edulis ou galloprovincialis ont été analysées. Cette cartographie a mis en évidence le rôle primordial des fleuves et en particulier du Rhône mais surtout l'influence des émissaires, rejetant les eaux usées des grandes agglomérations avec ou sans traitement. Les bivalves ont l'avantage d'être largement présents le long de nos côtes et leurs pouvoirs filtrant qui concentrent les polluants en font d'excellentes sentinelles du milieu marin.

Considérés avec les métaux lourds comme les biocides les plus répandus dans les milieux marins, il apparaît toutefois que de nombreuses autres molécules de synthèse doivent également être évacuées vers le milieu marin. L'utilisation très importante de médicaments porte à croire que de très nombreuses molécules sont véhiculées vers les mers par l'intermédiaire des réseaux d'assainissement. Les composés présents dans les traitements anti-cancéreux, mais aussi les antidépresseurs et les molécules utilisés en contraception font partis des molécules qui doivent être recherchées en priorité.

Leur faible concentration et la complexité de leur formule est un frein à leur mise en évidence. Certains ont toutefois déjà été détectés en milieu aqueux tels que :

<u>Produits :</u>	<u>Utilisations</u>
Estriol	Œstrogène
Estrone	Œstrogène
Ibuprofène	Anti-inflammatoire
Naproxen	Anti-inflammatoire
17A-ethynylestradiol	Contraceptif

Pourquoi avoir choisi la moule ?

Il n'est pas aisé de trouver un indicateur de pollution qui satisfait à toutes les exigences. En revanche, il est classique d'évaluer la pollution d'une région par l'étude de l'eau, des sédiments ou des organismes marins. Toutefois, aucun des trois n'est idéal :

-Les analyses de l'eau sont souvent longues et onéreuses (il faut multiplier les prélèvements afin d'éliminer les variations de concentration en polluant liées à différents paramètres tels : date de prélèvement ; position de la station choisie, la courantologie, le rythme des marées, ...)

-L'utilisation des sédiments peut conduire à des fautes d'interprétation en rapport avec des variations locales, soit du taux de sédimentation, soit de l'évolution de la matière organique.

-Il reste donc l'indicateur biologique, dont l'utilisation paraît plus intéressante. En effet, les organismes aquatiques sont capables de concentrer les polluants dissouts, en intégrant toutes les variations de la pollution en fonction du temps. De plus, il permet d'étudier divers modes de pénétration des polluants (inhibition et ingestion de l'eau du milieu, ingestion des aliments et du matériel particulaire). Il permet également de recueillir des renseignements sur le phénomène de transfert dans une chaîne trophique (maillons inférieur et supérieur par rapport à l'espèce étudiée).

La sélection des espèces dans une étude devient dès lors, on le comprend, fondamentale. Ce choix repose sur plusieurs critères : les habitudes alimentaires, la position dans la chaîne trophique, l'abondance des individus, la répartition géographique, leur situation par rapport à la colonne d'eau.

A titre d'illustration, Butler et Coll, a codifié les indicateurs de pollution. Ils doivent en effet :

- accumuler et tolérer une forte pollution
- être sédentaire
- être abondants dans la région étudiée

Mus Mytilis est abondante le long des côtes Méditerranéennes. On les utilise dans les programmes d'analyse de la qualité du milieu et sont donc considérés comme un indicateur global de la pollution.

Dès 1973, le programme de recherche sur le milieu marin, soutenu par le programme de recherche des nations unies, considère le Mytilus Galloprovincialis comme « une sentinelle de pollution organique et minérale ».

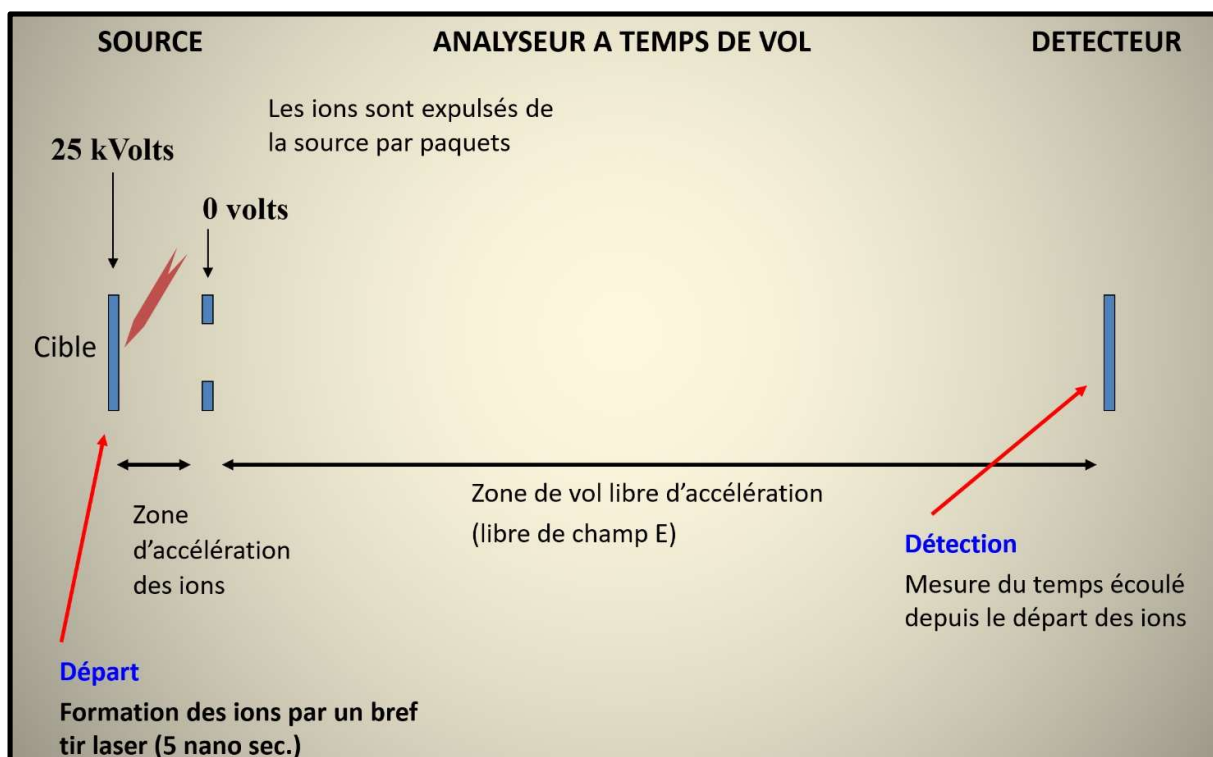
Etude des anticancéreux

Diverses études ont été initiées dans le laboratoire afin de détecter les anticancéreux à l'émissaire de Cortiou. Par LCMSMS ou par GCMS et n'ont pas donné lieu à une détection notoire des anticancéreux. Il a donc été décidé de recourir au Maldi

Présentation de la méthode

Fonctionnement de la technologie Maldi-TOF MS

Voici la structure d'un spectromètre de type Maldi-TOF MS :

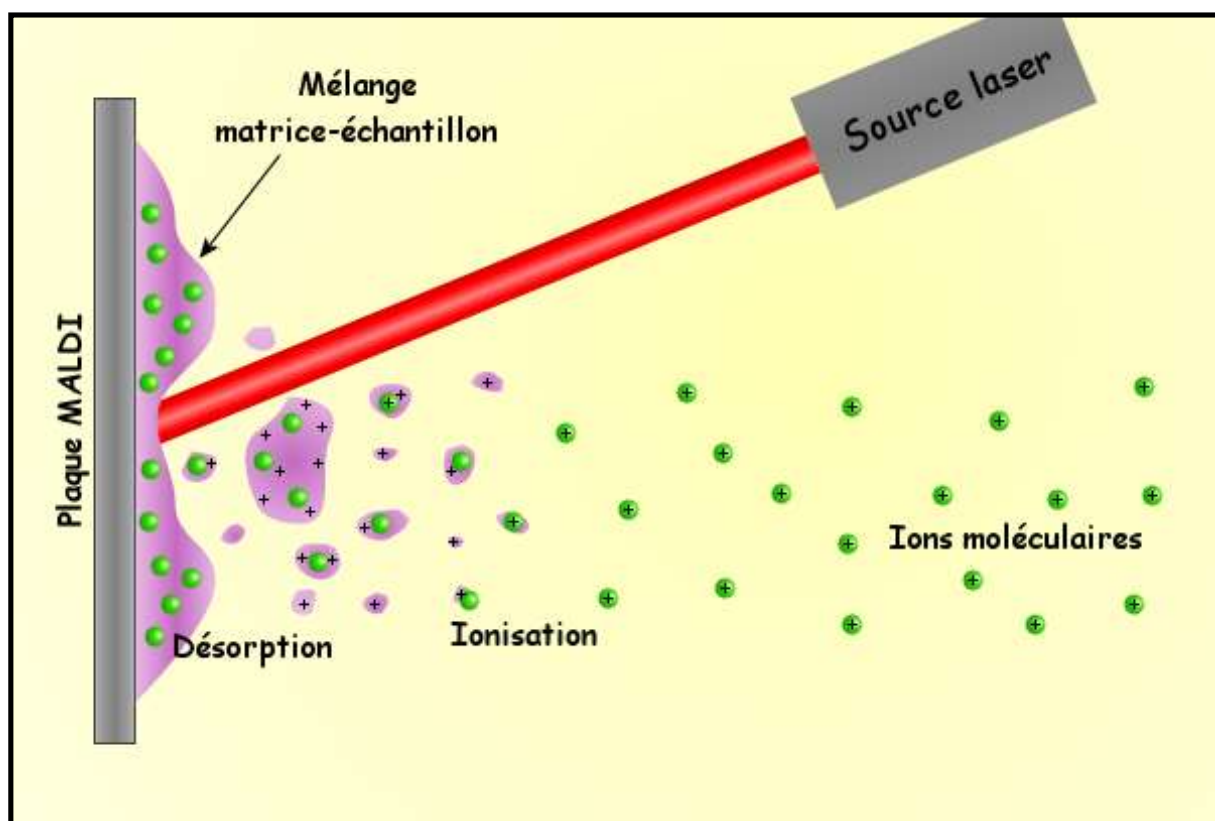


Celui-ci est composé d'une source de type Maldi, d'un tube de temps de vol (ici appelé Zone de vol libre d'accélération) et d'un détecteur relié à un ordinateur qui va convertir le signal du détecteur en spectre de masse.

MALDI est l'abréviation de "Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization."

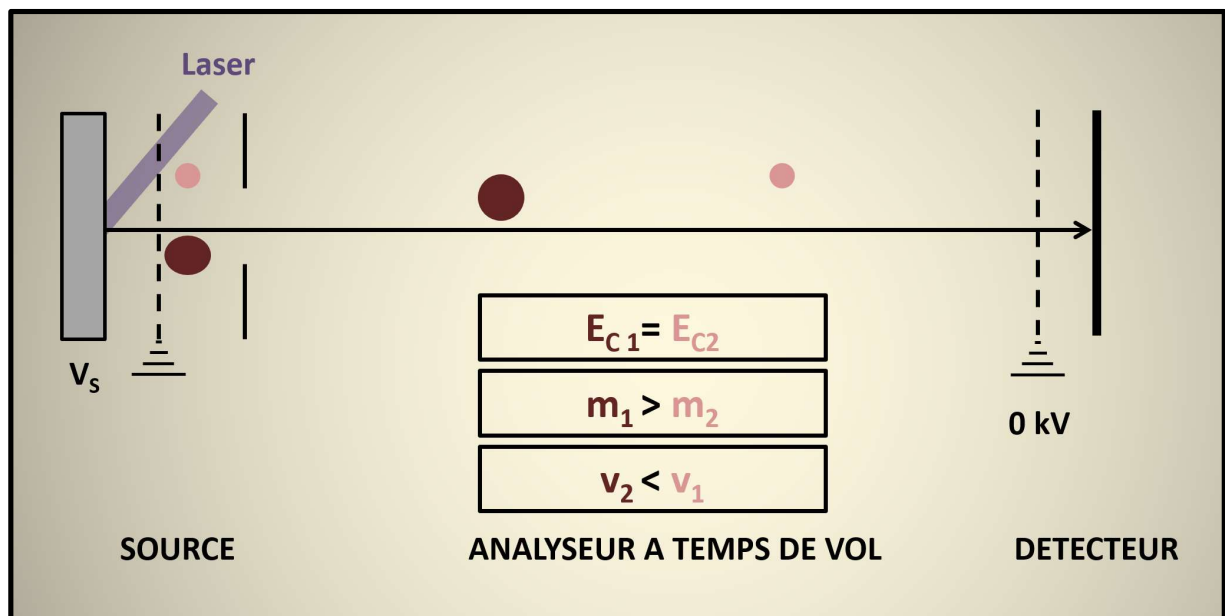
L'échantillon pour le MALDI est mélangé uniformément dans une grande quantité de matrice.

La matrice absorbe la lumière ultraviolette (lumière laser de l'azote, longueur d'onde 337 nm) et la convertit en énergie thermique. Une petite partie de la matrice s'échauffe rapidement (en quelques nanosecondes) et est vaporisée avec l'échantillon. Cette matrice en se vaporisant va s'ioniser. Elle va ensuite transférer sa charge à l'échantillon.

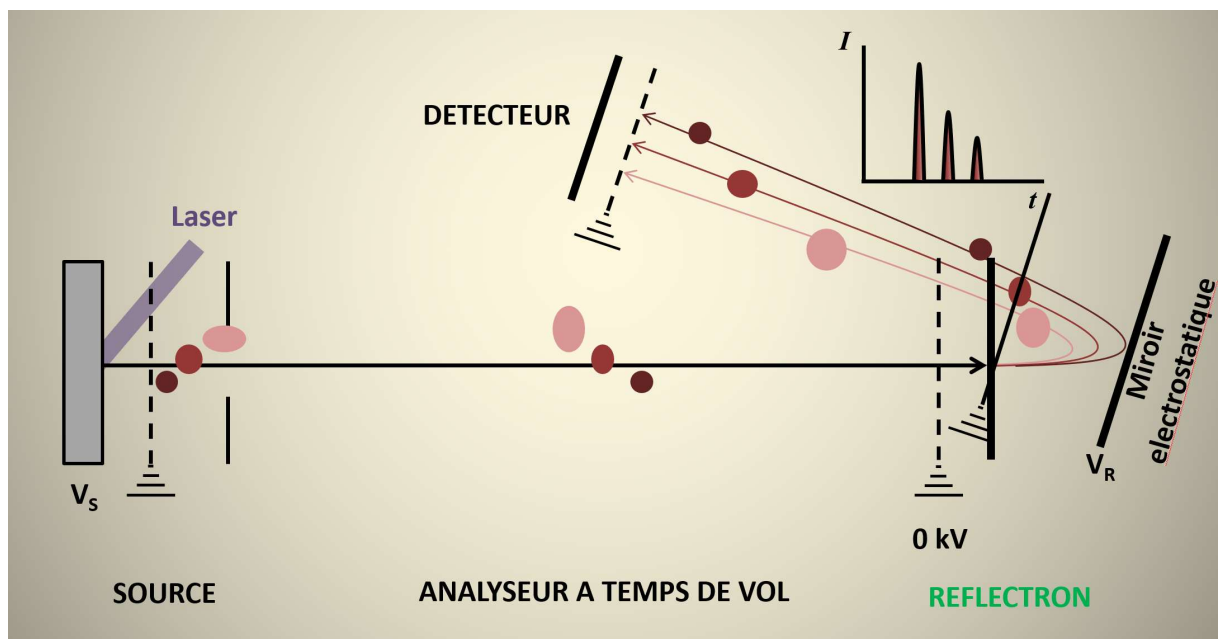


TOF est l'abréviation de Time of Flight Mass Spectrometry (spectrométrie de masse par temps de vol).

Le transfert de charge entre la matrice et l'échantillon fait que des ions chargés de différentes tailles sont générés sur la lame d'échantillon. Une différence de potentiel V_0 entre la lame d'échantillon et la terre attire les ions dans la direction indiquée dans le diagramme. La vitesse des ions attirés v est déterminée par la loi de conservation de l'énergie. Comme la différence de potentiel V_0 est constant pour tous les ions, les ions ayant une valeur m/z plus faible (ions plus légers) et les ions plus fortement chargés se déplacent plus rapidement dans l'espace de dérive (le tube appelé temps de vol) jusqu'à ce qu'ils atteignent le détecteur. Par conséquent, le temps de vol de l'ion diffère en fonction de la valeur du rapport masse/charge (m/z) de l'ion.



Les masses recherchées étant de petites tailles leurs temps de vol doivent être prolongés pour permettre leur séparation, cela se fait avec l'utilisation d'un miroir électrostatique appelé réflectron.



Choix de la matrice

Une matrice pour analyse Maldi doit avoir 3 caractéristiques :

- Il doit s'agir d'un composé organique ;
- Elle doit avoir une absorption à la longueur d'onde du laser (dans notre cas 337nm) ;
- Elle doit être une échangeuse de proton.

Il existe un grand nombre de matrices utilisables. Le tableau suivant présente les plus communes ainsi que les conditions dans lesquelles nous les utilisons.

Matrice	Analyte	Poids moléculaire (Da)	λ (nm)	Autre nom
Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique	Peptides/protéines Carbohydrates	189,20	337, 355	CHCA
Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	Peptides/protéines Carbohydrates Polymères synthétiques Molécules inorganiques	154,12	266, 337, 355	DHB
Acide 3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamique	Peptides/protéines	224,21	337, 355	Acide sinapinique (AS)
2,4,6-Trihydroxyacétophénone	Oligonucléotides Carbohydrates	168,15	266, 337, 355	THAP
Acide 3-hydroxypicolinique	Oligonucléotides	139,11	266, 337, 355	3-HPA
Acide trans-3-indole acrylique	Polymères synthétiques	187,20	337, 355	IAA
Dithiuranol	Polymères synthétiques Lipides	226,23	266, 337, 355	DIT
T-2-[3-(4-t-butyl-phényl)-2-méthyl-2-propénylidène]malononitrile	Molécules inorganiques	250,34	266, 337, 355	DCTB
1,5-diaminonaphthalene	Peptides/protéines	158,20	266, 337, 355	1,5-DAN

Généralement pour des molécules de cet ordre de grandeur nous utilisons soit de la CHCA soit de la DHB. Les deux matrices ont été testées au cours de ce projet. Les résultats obtenus nous ont dirigé vers une utilisation de la DHB, et plus précisément de la super DHB, un mélange de DHB et d'acide 2-hydroxy-5-methoxybenzoic dans une proportion de 9 :1 et qui améliore le signal.

Une fois les cassettes levées, elles sont stockées sous glace et rapidement acheminées au laboratoire où ils vont subir diverses manipulations avant l'analyse proprement dite. Au cours de cette période préliminaire, il convient d'éviter toute contamination soit par le matériel (instruments, récipients...), soit par l'eau de lavage...

C'est la partie molle de l'individu qui constitue l'échantillon. Il faut éviter tout risque de contamination par contact entre la partie molle et l'extérieur de la coquille. Elle est délicatement séparée de la coquille avant d'être plongée dans de l'azote liquide pour permettre une congélation rapide sans dégradation des tissus puis stockées dans un congélateur -80.

Pourquoi l'imagerie Maldi

Les techniques d'imagerie conventionnelles pour la caractérisation de petites molécules utilisent généralement des radioisotopes ou des produits optiquement actifs. La tomographie par émission de positons, l'imagerie X et gamma, l'imagerie photonique et biphotonique ou l'autoradiographie permettent d'identifier les composés. Cependant aucune de ces techniques ne combine résolution et sensibilité pour enregistrer une empreinte moléculaire de tissus comportant plusieurs centaines de molécules sans marquage et sans a priori. L'identification des molécules dans les tissus repose généralement sur une technique d'analyse protéomique différentielle couplée à la spectrométrie de masse comprenant des étapes de broyage d'extraction, de purification des composés et d'identification par spectrométrie de masse. Toutefois, cette stratégie présente un inconvénient majeur puisqu'elle nécessite l'homogénéisation de l'échantillon avant extraction des composés. Ces protocoles expérimentaux suppriment la relation directe entre une zone morphologique et une biomolécule spécifique.

L'imagerie par spectrométrie de masse est aujourd'hui la seule technique permettant de réaliser un criblage des molécules sans marquage donc sans a priori tout en conservant une corrélation spatiale sur une coupe de tissu. Cette technique compatible avec une grande variété d'échantillon biologiques ou chimiques, permet de détecter des contaminants, biomarqueurs ou encore localiser des drogues dans des tumeurs. Cette technique est aujourd'hui standardisée grâce aux nouveaux équipements de préparation d'échantillons permettant des analyses répétables et même significatives avec des traitements statistiques avancés intégrés dans les logiciels de retraitement. Cette technique permet

L'imagerie par spectrométrie de masse, en permettant l'acquisition d'un spectre de masse tous les 20 à 200 micromètres (μM) d'une coupe tissulaire, permet d'identifier des centaines de composés présents sur la coupe sans en connaître à priori la nature. Les produits pharmaceutiques, des protéines, des lipides, des sucres, des acides nucléiques ainsi que des polluants tels que les métaux peuvent être identifiés et localisés.

La reconstitution de la cartographie de chacune des masses et leurs superpositions à l'image obtenue par scanner optique permet alors d'allier reconnaissance et distribution spatiale. Cette approche, sans hypothèse *a priori*, est différente des approches *à posteriori* comme l'autoradiographie qui nécessite une identification préalable d'un composé et ne permet pas la localisation des métabolites.

Cette technologie en plein essor est disponible au sein de Marseille protéomique. Les moyens actuels permettent d'obtenir des images à 20 μm de résolution spatiale en routine.

La réalisation technique comporte les étapes suivantes : des sections de tissu congelé de 10 à 16 μm d'épaisseur sont déposées sur un support de verre rendu conducteur par dépôt d'un matériau transparent. Cette technique permet l'acquisition préalable à l'analyse d'une image histologique classique. Un dépôt de matrice est ensuite réalisé par nébulisation à pression atmosphérique de la solution de matrice. L'échantillon est introduit dans la source sous vide du spectromètre de masse. Un faisceau laser UV irradie l'échantillon durant quelques secondes définissant ainsi une zone ablatée, ou « spot ». Chaque spot correspond à un pixel de l'image et la distance entre chaque spot à la résolution spatiale de la technique (20 à 200 μm). Le spectre de masse de chaque spot (MS simple) est alors enregistré. Une fois la totalité de la zone d'analyse balayée, un logiciel de retraitement permet de sélectionner des gammes de masse sur les différents spectres et de reconstituer des cartes de densité ionique. Cette technique permet de localiser simultanément plusieurs composés biologiques d'intérêt (métabolites, peptides, protéines), directement sur un tissu. Superposée à l'image histologique de la coupe acquise au préalable, elle permet la réalisation d'une cartographie protéique. Le spectre de masse associé au profil d'intensité et à la topologie permet ensuite de sélectionner les molécules d'intérêt. L'ensemble des résultats sont retraités avec les logiciels FlexImaging et SCILS pour conserver une résolution optimale des spectres.

Présentation des anticancéreux

À mesure que l'incidence du cancer augmente à l'échelle mondiale, l'utilisation de médicaments contre le cancer augmente également à un rythme d'environ 10 % par an dans les pays développés.

Les produits pharmaceutiques contribuent de manière significative à l'amélioration de la santé humaine. Cependant, leurs impacts environnementaux sont également devenus une préoccupation majeure.

La recherche récente de l'UE a montré que les médicaments anticancéreux et les produits dérivés dans les eaux usées influencent de façon négative la reproduction et la survie de nombreux organismes d'eau douce.

En Europe, le nombre de cancers dépistés est en constante évolution ce qui amène à une augmentation des traitements liés à ces maladies. Les bases de ces traitements sont la chimiothérapie et la radiothérapie seules ou en associations. Les chimiothérapies sont effectuées à l'aide de médicaments anticancéreux qui ont des propriétés toxiques pour les cellules et dont un grand nombre sont classés par le Centre international de recherches sur le cancer (CIRC) soit : cancérogènes pour l'homme ; soit cancérogènes probables pour ou cancérogènes possibles pour l'homme. Lors de la préparation

des solutions de ces médicaments pour le traitement des patients, certains déchets (contaminations accidentelles, surplus de préparations non administrées, matériel souillé...) sont générés, mais il est facile de les maîtriser. De plus, lors de l'administration aux patients, certains de ces médicaments peuvent être excrétés en proportions importantes (jusqu'à 70 %) et ils se retrouvent dans les urines, les fèces, et sur le linge souillé des malades, cela parfois pendant plusieurs jours. Ces derniers déchets ne sont en général pas maîtrisés actuellement : la plupart sont concentrés dans les effluents hospitaliers, mais on les retrouve aussi, avec le développement de la médecine ambulatoire et de l'utilisation des chimiothérapies en médecine vétérinaire, au niveau de tous les réseaux d'égouts.

Les anticancéreux que nous avons utilisés pour développer cette méthode étaient ceux que nous avons déjà étudiés pour d'anciens projets de recherche et que nous avons donc en quantité suffisante sur la plateforme. Il s'agit de :

5-fluorouracil, dacarbazine, temozolomide, cytosine β -D-arabinofuranoside, cyclophosphamide, ifosfamide, gemcitabine, methotrexate, doxorubicin, epirubicin, irinotecan, etoposide, docetaxel, vinblastine, vincristine et paclitaxel.

Protocole imagerie MALDI

Coupe des tissus au cryostat

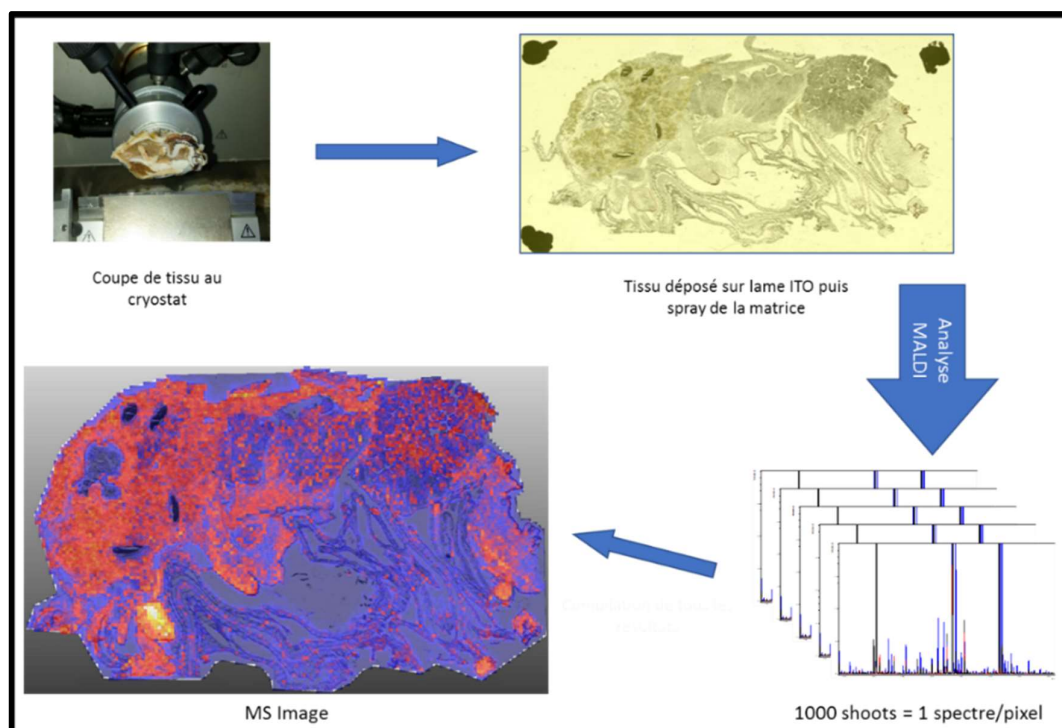
Le cryostat utilisé est le LM1900 (Leica Biosystem). L'épaisseur de coupe est fixée à 10 μ m, l'échantillon est coupé à une température de -20°C. Les échantillons sont placés dans le cryostat toute la nuit avant la phase de coupe afin que le tissu sèche en maintenant son intégrité structurale. Les coupes obtenues sont déposées sur lame ITO (Bruker Daltonics). Pour maintenir le tissu fixé sous vide poussé dans la source Maldi ces lames sont prétraitées avec de la poly-L-Lysine. Les coupes sont fixées sur les lames par la méthode thaw-mounted (freeze-drying method). Les coupes ainsi obtenues sont placées directement au dessiccateur à température ambiante pendant au moins 30 minutes pour séchage. Pour augmenter le signal et diminuer la présence de sel dans le tissu les lames sont lavées dans de l'eau pendant 45 secondes puis placées de nouveau au dessiccateur pendant au moins 20 minutes.

Test de limite de détection

Des tests de limites de détection ont été effectués sur plaque puis sur tissus, pour chaque produit 1 μ L de solution à différentes concentrations a été déposé sur une coupe, après le séchage de la coupe au dessiccateur. Chaque dépôt a été fait en deux endroits éloignés de l'échantillon et comparés avec une coupe témoin issue du même échantillon. Une nouvelle étape de séchage de minimum 20 minutes a eu lieu après le dépôt. Les anticancéreux utilisés ont été dilués avec de l'eau.

Imagerie Maldi

Le Maldi-TOF UltraFlex extreme (Bruker Daltonics) a été utilisé lors de cette étude. L'acquisition a été réalisée en mode réflectron positif sur une gamme de masse de 0 à 1400 Da à 1000Hz de fréquence de tir laser. La résolution spatiale a été fixée à 100 μ m et le signal a été accumulé sur 2000 spectres sur un diamètre de 15 μ m. Le calibrant utilisé est du phosphore rouge. L'ensemble des résultats sont retraités avec les logiciels FlexImaging et SCILS Lab.



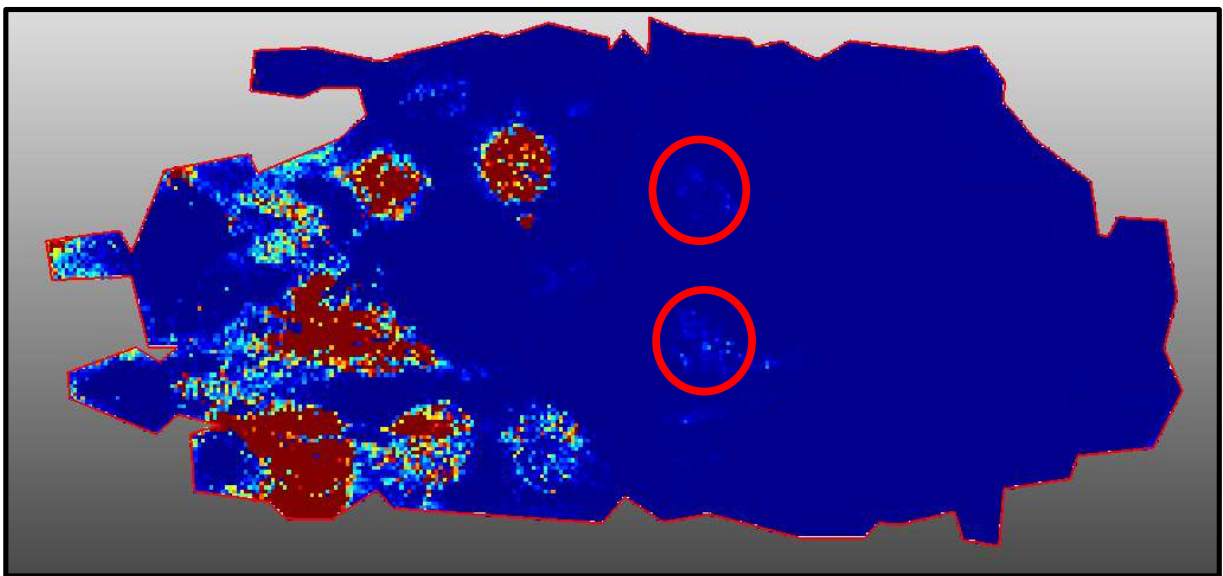
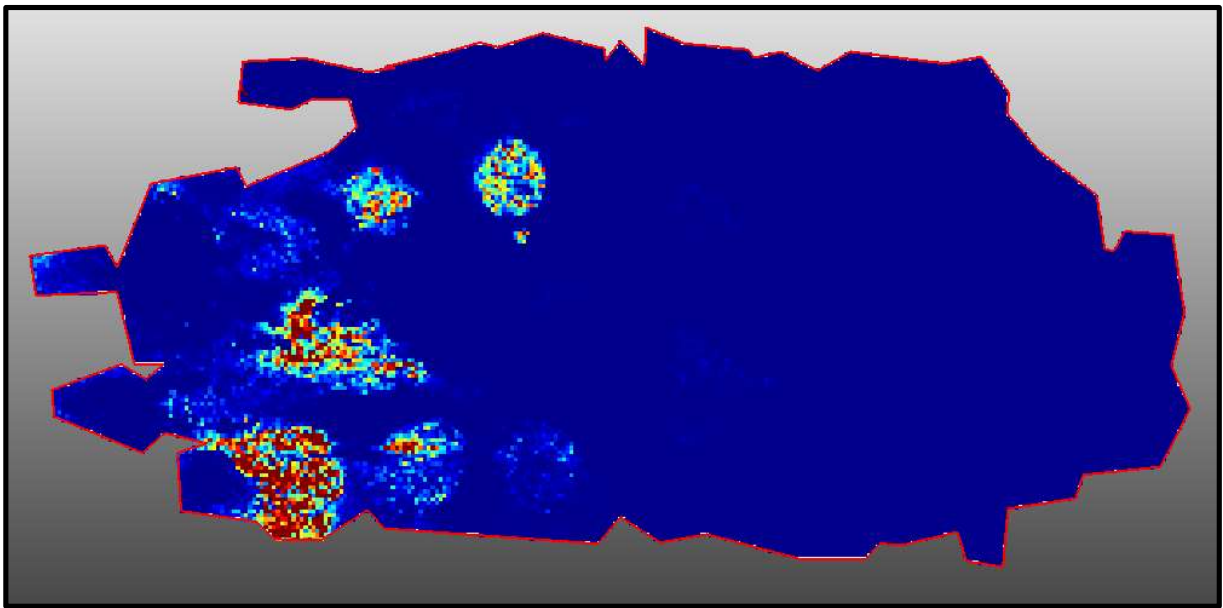
Recherche des anticancéreux

La matrice utilisée est la super-DHB à 30mg/ml dans un mélange 50/50/0.1 H₂O/ACN/TFA. Ce choix de matrice a été optimisé en comparant les signaux obtenus avec différentes matrices et solvants et en tenant compte de l'intensité du signal mais aussi de la reproductibilité du signal (3 répliques pour chaque condition). Les matrices ont été déposées uniformément grâce au TM-sprayer (HTX Imaging) sur l'ensemble des lames qui ont été directement analysées.

Test de limite de détection

anticancéreux	MM (en g/mol)	quantité minimale par spot (pour 1 μ L de solution)
5-fluorouracil	130,078	500ng
dacarbazine	182,18	100pg
temozolomide	194,15	1ng
cytosine β -D-arabinofuranoside	243,22	50ng
ifosfamide	261,086	1ng
cyclophosphamide	261,086	1ng
gemcitabine	263,198	1ng
methotrexate	454,44	5ng
epirubicin	543,52	500ng
doxorubicin	543,52	500ng
irinotecan	586,68	100pg
etoposide	588,56	50ng
docetaxel	807,88	500ng
vinblastine	810,97	100pg
vincristine	824,96	50pg
paclitaxel	853,91	100ng

Cette table nous montre pour chaque anticancéreux la limite de détection que nous avons observée. La CHCA étant un échangeur de proton, les molécules ont été détecté à 1Da de plus que leur masse moléculaire. Le test a ensuite été répété sur tissus et la concentration par pixel est similaire à celle observée sur plaque (la surface de dépôt étant d'environ 3mm et celle d'analyse du laser de 15 μ m, nous pouvons extrapoler, en partant du principe que la répartition des molécules a été uniforme, que les limites de détection réelles sont 200 fois inférieures au volume déposé).



Nous avons ici une image issue des tests de limite de détection de la vincristine. La première image est ce que nous obtenons en laissant le logiciel fixé l'échelle d'intensité de l'analyse, la seconde a été obtenue en modifiant cette échelle afin de faire ressortir l'endroit où se trouve la limite de détection. Nous avons encerclé ceux-ci, le dépôt total était de 10ng, en faisant le rapport entre le diamètre de la goutte et celui du diamètre du laser, nous arrivons à une concentration d'environ 50pg, soit les résultats obtenus sur plaque. Ce même test a également été fait sur les autres anticancéreux et ont donné des résultats similaires, nous pouvons donc conclure que les limites de détection sur plaque sont également valables en imagerie.

Durée et coût de l'analyse

Les analyses LCMS/MS sur les moules ont un coût analytique entre 500 et 1000 euros et durent une vingtaine de journées. Pour le Maldi l'analyse a été faite sur deux matrices pour un coût analytique par anticancéreux de 13000 euros (2 matrices x3) = 2200 euros par analyse. La durée d'analyse d'un anticancéreux est estimée à 2 jours.

Conclusion

Le développement de ces méthodes nous a permis de mettre au point une méthode fiable pour détecter les anticancéreux. Nous avons donc décidé d'ajouter à ceux étudiés ici la liste des anticancéreux les plus utilisés afin d'élargir notre champ de recherche et de lancer le projet « étude des contaminants marins avec l'agence de l'eau » avec cette méthode et avec comme objectif la détection d'anticancéreux dans les moules du projet RINBIO. La liste finale de molécules recherchées contient 37 anticancéreux et d'étendre les études sur d'autres sites ciblés par l'Ifremer :

5-fluorouracil, mercaptopurine, dacarbazine, temozolomide, cytarabine, cytosine β -D-arabinofuranoside, cyclophosphamide, ifosfamide, gemcitabine, ruxolitinib, bendamustine, capecitabine, fludarabine, tamoxifène, erlotinib, sunirinib, idelalisib, topotecan, pemetrexed, ibrutinib, crizotinib, methotrexate, sorafenib, dasatinib, imatinib, dabrafenib, nilotinib, cobimetinib, doxorubicin, epirubicin, irinotecan, etoposide, tramétinib, docetaxel, vinblastine, vincristine et paclitaxel.