

Nora TAHALLAH<sup>1</sup>, Alain BRUNELLE<sup>1</sup>, Sabine DE LA PORTE<sup>2</sup>, Olivier LAPREVOTE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN-CNRS)

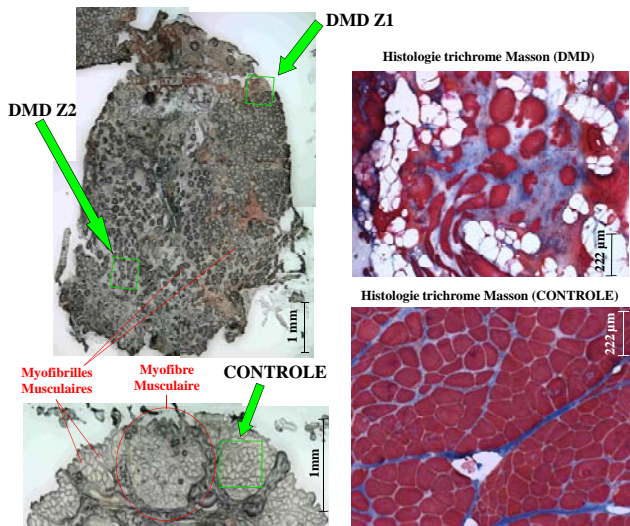
<sup>2</sup> Institut de Neurobiologie Alfred Fressard (INAF-CNRS) - Gif-sur-Yvette - FRANCE

## INTRODUCTION

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), pathologie sévère liée au chromosome X et incurable à ce jour, touche 1 garçon sur 3500<sup>1</sup>. Cette maladie est provoquée par le clivage partiel ou l'absence de la dystrophine, protéine impliquée dans un complexe transmembranaire, induisant une dégénérescence musculaire rapide due à un dysfonctionnement des membranes des cellules musculaires (perméabilité, perturbation des flux ioniques et stress oxydatif). Le modèle de recherche le plus répandu est la souris *mdx* (X-linked muscular dystrophy) présentant des taux de créatine et pyruvate kinases anormalement élevés<sup>2</sup>. Ce modèle est peu coûteux, facilement disponible et à temps de vie relativement court. L'imagerie ToF-SIMS s'impose de plus en plus dans les domaines de la lipidomique et de la cartographie de biomarqueurs et médicaments sur des tissus biologiques à l'échelle du micron<sup>3,4</sup>. Les phospholipides et, plus particulièrement les glycérophosphatidylcholines (PCs), sont les constituants de base de la paroi cellulaire. La composition et la combinaison de leurs chaînes d'acides gras déterminent la flexibilité, la structure et la résistance des membranes. Dans le but de valider l'approche imagerie ToF-SIMS couplée au modèle murin comme méthodologie de recherche adéquate sur la pathologie humaine, nous rapportons ici nos résultats préliminaires sur des coupes de muscle strié paravertébral humain et les comparons à ceux obtenus sur la souris *mdx*.

## RESULTATS

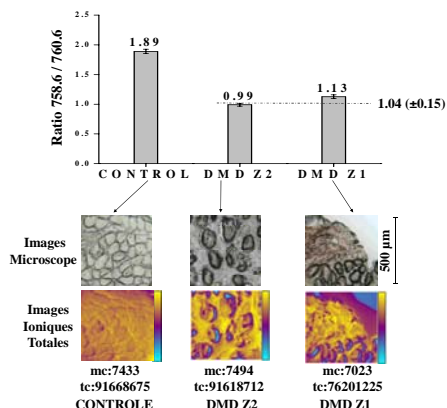
### Coupes de Muscle Humain Strié Paravertébral



Même tendance que chez le modèle de la souris *mdx*<sup>5</sup>:

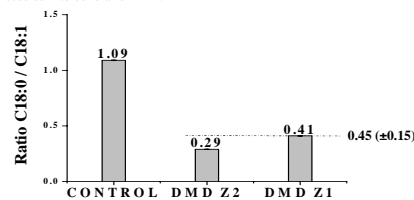
- Dans chaque ROI, les cellules DMD humaines adoptent un comportement similaire à celui des cellules de la souris *mdx* dans les zones contrôle et saine,
- Les PCs s'accumulent majoritairement dans les zones nécrosées ou intercellulaire DMD, de la même manière que dans les zones détruites chez la souris *mdx* ⇒ intense activité de régénérescence.

### Rapport Global d'Intensités 758 / 760

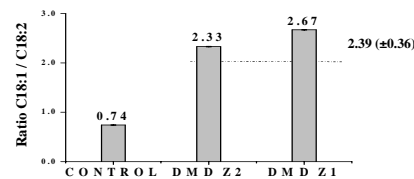


### Rapport Global d'Intensités C18:0 / C18:1 et C18:1 / C18:2

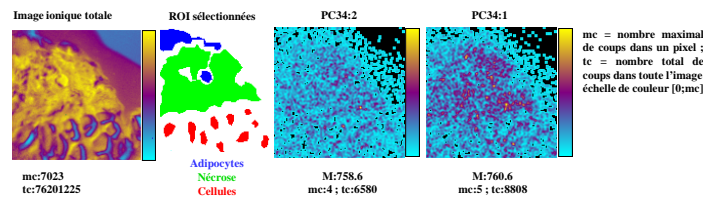
- Intense régénération pour le contrôle et dégénérescence pour le DMDZ2,
- Inflammation dans les DMD : accumulation de C18:1 et C18:0 dans les régions nécrosées ou intercellulaire DMD.



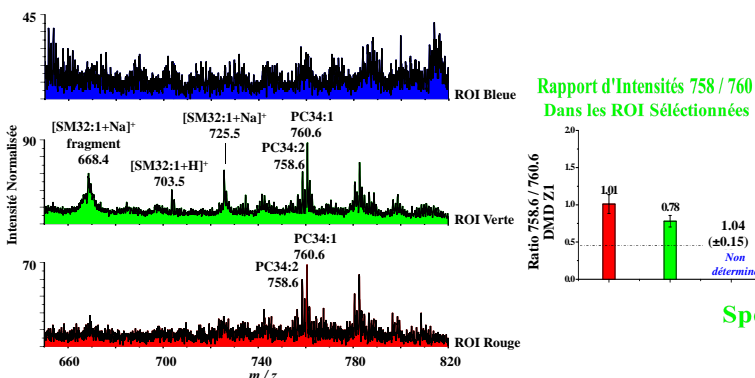
Similairement au spectre de la souris *mdx*<sup>7</sup>, le spectre du contrôle humain révèle un signal intense pour C18:2, ce qui n'est pas le cas des spectres DMD humains. Ceci est très probablement dû à l'aptitude de régénération exceptionnelle du muscle murin même affecté par la myopathie de Duchenne, tandis que la régénération des muscles humains DMD est considérablement plus lente.



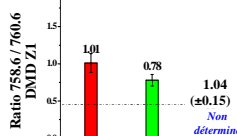
### Images ToF-SIMS en Mode Positif des Ions 758 et 760 du Spot DMDZ1



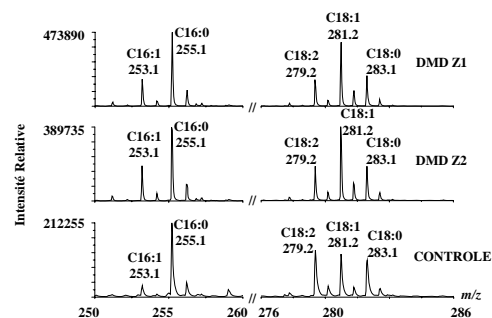
### Spectres ToF-SIMS en Mode Positif des ROI Sélectionnées



### Rapport d'Intensités 758 / 760 Dans les ROI Sélectionnées



### Spectres ToF-SIMS globaux en Mode Négatif



La sphingomyéline SM est présente dans les régions DMD nécrosées (ROI verte) ou intercellulaires, mais pas sur l'échantillon contrôle.  
⇒ dérégulation de la composition des sphingolipides membranaires (c.à.d. de la structure) et/ou dysfonctionnement des réactions apoptotiques liées aux céramides<sup>7</sup>.

### Matériels et Méthodes

Nous remercions la Banque de Tissus pour la Recherche (BTR, AFM) de nous avoir fourni les biopsies de muscle humain prélevées sur des patients atteints de la DMD et des patients contrôle. La BTR est partenaire du EuroBioBank network financé par l'UE à travers le Fifth Framework Programme (QLRI-CT-2002-02769). Des coupes de 20 µm effectuées à -20°C, dans un cryostat CM3050-S (Leica Microsystems SA, Rueil-Malmaison, France) ont été conservées à -80°C. Les images optiques ont été prises avec un microscope Olympus BX51 (Rungis, France). Les expériences, sans aucun traitement préalable sur des spectromètre de masse ToF-SIMS IV (ION-TOF GmbH, Münster, Germany) muni d'une source d'agrégats bismuth (Bi<sup>3+</sup>) avec un angle d'incidence de 45° et un trajet d'ions effectif de 2m, une densité de dose d'ions primaires de 2x10<sup>14</sup> ions/cm<sup>2</sup>, un courant à 0.27 pA et un cycle de 150 µs. Un canon à électrons de basse énergie neutralise la surface durant l'analyse. Les ions secondaires sont extraits avec une énergie cinétique de 2 keV et post-accelérés à 10 keV. Grâce à la très faible énergie cinétique initiale des ions secondaires, la relation entre le temps de vol et la racine carrée de m/z est linéaire sur toute la gamme de masse. Les images d'ions secondaires sont de 500x500 µm<sup>2</sup> (256x256 pixels) ; elles sont ensuite compressées lors du retraitement (128x128 pixels) pour augmenter le contraste, résultant en une résolution latérale finale de 4 µm. Une histologie trichrome Masson (kit Sigma No. HT15) a été réalisée afin de visualiser les tissus conjonctifs, les fibres musculaires et le collagène (avec du bleu d'aniline). Les images ont été prises avec un microscope Leica DMRX2A.

## CONCLUSIONS

- Préservation complète de l'intégrité moléculaire et structurale de l'échantillon : pas de traitement préalable à l'analyse,
- Analyse et imagerie moléculaire directe et relativement rapide de coupes de tissus biologiques ou organes intacts,
- Analyse simultanée et indépendante de différentes cellules musculaires à l'échelle du micron,
- Haute spécificité moléculaire et sensibilité ; pas de délocalisation moléculaire
- Localisation spécifique de différents composés sur les images en mode positif et confirmation par les images en mode négatif,
- L'association de spectres et d'images fournit des informations moléculaires même avec un signal trop faible sur l'image et des informations spatiales même avec un rapport signal/bruit insuffisant,
- Confirmation chez l'humain de tendances similaires à celles précédemment observées chez le modèle de la souris *mdx*.

### Références

1. Blake DJ, Weir A, Newey SE, KE D. *Physiol Rev.* 2002;82(2):291-329.
2. Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore JK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984;81(4):1189-1192.
3. Touboul D, Halgand F, Brunelle A, Kersting R, Tallarek E, Hagenhoff B, Laprevote O. *Anal Chem* 2004;76(6):1550-1559.
4. Brunelle A, Touboul D, Laprevote O. *J Mass Spectrom.* 2005;40(8):985-999.
5. Touboul D, Piednoel H, Voisin V, De La Porte S, Brunelle A, Halgand F, Laprevote O. *Eur J Mass Spectrom* 2004;10(5):657-664.
6. Touboul D, Brunelle A, Halgand F, De La Porte S, Laprevote O. *J Lipid Res* 2005;46(7):1388-1395.
7. Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu Rev Physiol.* 1998;60:643-665.