

Université de Montréal

**Développement d'une méthode de transfert de protéines
présentes dans des sections tissulaires minces sur des cibles
fonctionnalisées pour augmenter la spécificité de l'imagerie
MS du protéome**

Par
Érik Fournaise

Département de chimie
Faculté des arts et sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales en vue de l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.) en chimie

Août, 2014

© Érik Fournaise, 2014

Résumé

L'imagerie par spectrométrie de masse (IMS) est une technique en pleine expansion et utilisée dans beaucoup d'études effectuées sur des systèmes biologiques tels que la corrélation entre l'expression moléculaire et l'état de santé d'un tissu et pour étudier la biologie du développement. Cependant, plus particulièrement lors de l'analyse de protéines, seulement les molécules les plus abondantes et/ou les plus facilement ionisables seront détectées. L'une des approches utilisées pour éviter cette limitation est de transférer les protéines de manière sélective à partir d'une section tissulaire mince vers une surface fonctionnalisée tout en maintenant leur organisation spatiale. Dans ce cas, seulement les protéines possédant une affinité pour la surface seront alors retenues alors que les autres seront éliminées. Donc, la nature chimique de cette surface est critique. Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire portent sur le développement d'une méthode de transfert des protéines d'une section tissulaire vers une surface composée de nitrocellulose. Cette méthode utilise un système permettant d'effectuer le transfert sans contact physique direct entre les surfaces. De plus, lors du transfert, une pression physique est appliquée. Dans une première approche, la méthode développée a été appliquée en utilisant une section de rein de souris comme échantillon modèle. Des sections sérielles ont été collectées, soit pour être colorées à l'aide d'hématoxyline et d'éosine (H&E) afin de démontrer la régiospécificité du transfert, soit pour être analysées directement par IMS afin de déterminer si les protéines détectées après transfert sont également détectées dans les sections analysées directement. Les résultats obtenus ont démontré qu'un sous-ensemble de protéines a été transféré tout en conservant leur position spatiale initiale dans les sections. Certains signaux observés pour les protéines transférées sont uniques et/ou sont nettement mieux détectés que lors de l'analyse directe d'une section.

Mots-clés : Spectrométrie de masse, MALDI, protéines, chimie de surface, imagerie

Abstract

Imaging mass spectrometry (IMS) is a technique in full expansion that is used in a large range of studies such as the correlation between molecular expression and the health status of a tissue and developmental biology. A common limitation of the technology is that only the more abundant and/or more easily ionisable molecules are usually detected, in particular in protein analysis. One of the methods used to alleviate this limitation is the direct specific transfer of proteins from a tissue section to a functionalized surface with high spatial fidelity. In this case, only proteins with an affinity for the surface will be retained whereas others will be removed. The chemical nature of the surface is therefore critical. The research work presented in this document proposes a high spatial fidelity transfer method for proteins from a tissue section onto a nitrocellulose surface. The method uses a homebuilt apparatus that allows the transfer process to be done without any direct physical contact between the tissue section and the transfer surface while still using physical pressure to help protein migration. In subsequent work, the developed method was used to transfer proteins from a mouse kidney section onto the nitrocellulose surface. Serial sections were also collected either to be colored with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the high spatial fidelity of the transfer process, or to be directly analyzed as a control sample to access the different signals detected after transfer. Results showed a high spatial fidelity transfer of a subset of proteins. Some of the detected transferred proteins were not observed after direct tissue analysis and/or showed an increase in sensitivity.

Keywords : Mass spectrometry, MALDI, proteins, surface chemistry, imaging

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	v
Liste des figures.....	vi
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	ix
Chapitre 1 : Introduction.....	10
1.1 Historique de la spectrométrie de masse.....	10
1.2 Théorie de la spectrométrie de masse.....	11
1.3 Ionisation MALDI.....	14
1.4 Analyseurs de masse.....	22
1.5 Théorie de l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse des échantillons biologiques.....	27
1.5.1 Manipulation, préservation des tissus.....	30
1.5.2 Découpe des tissus.....	32
1.5.3 Lavage des sections.....	33
1.5.4 Choix et déposition de la matrice.....	34
1.5.5 Acquisition et traitement des données.....	39
1.6 Objectifs de recherche.....	40
Chapitre 2 : Augmentation de la spécificité en imagerie par spectrométrie de masse : Transfert régiospécifique de protéines présentes dans des sections tissulaires vers des surface fonctionnalisées.....	42
2.1 Abstract.....	43
2.2 Introduction.....	44
2.3 Methods.....	46
2.3.1 Chemicals and Reagents.....	46
2.3.2 Tissue Sampling and Sectioning.....	46
2.3.3 Nitrocellulose Surface Preparation.....	46

2.3.4 Atomic Force Microscopy (AFM)	46
2.3.5 Transfer Process and Matrix Coating	47
2.3.6 MALDI Mass Spectrometry	47
2.4 Results and Discussion	47
2.4.1 Protein Transfer Method Optimization	47
2.4.2 Profiling and Imaging Mass Spectrometry of Transferred Proteins	50
2.5 Conclusions and perspectives	54
2.6 Acknowledgments	55
Chapitre 3 : Conclusions	56
3.1 Perspectives de recherche	56
Bibliographie	58
Annexe 1 : Figures supplémentaires	65

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux composés utilisés comme matrice en MALDI MS selon la classe de molécules étudiées et le mode d'ionisation.....	16
---	----

Liste des figures

Fig. 1 : Les composantes d'un spectromètre de masse	12
Fig. 2: Spectres de masse de la neurotensine enregistrés avec une résolution spectrale de 1000 (gauche) et de 10000 (droite)	13
Fig. 3: Structure des matrices les plus utilisées en MALDI MS, soit l'acide sinapinique (A), l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (B), l'acide 2,5-dihydroxibenzoïque (C), la 2,6-dihydroxyacetophénone (D), la 2-mercaptobenzothiazole (E), le 1,5-diaminonaphtalène (F), le dithranol (G), l'acide 3-hydroxypicolinique (H), l'acide férulique (I)	16
Fig. 4: Schéma d'une source MALDI	17
Fig. 5: Schémas de la géométrie d'une plume de désorption/ionisation MALDI en fonction du temps mesurée par fluorescence induite par laser	18
Fig. 6: Modèle du « <i>Lucky Survivor</i> »	20
Fig. 7: Schéma d'un tube de temps de vol linéaire	23
Fig. 8: Schéma d'un spectromètre de masse par de temps de vol avec un réflectron	25
Fig. 9: Schémas des différentes géométries des réflectrons et de la force du champ électrique selon la distance parcourue par les ions.	25
Fig. 10: Comparaison de spectres MALDI-TOF MS obtenus pour l'angiotensine I (m/z : 1296.68) quand l'acquisition est faite en utilisant un champ d'extraction constant (static) et un réflectron (reflector), en utilisant l'extraction retardée (delayed) en TOF linéaire (linear), puis finalement en combinant l'extraction retardée et un réflectron	27
Fig. 11: Étapes nécessaires pour effectuer une analyse par imagerie MALDI-TOF MS	29
Fig. 12: Schéma d'un montage de sublimation	36
Fig. 13: Schéma d'un cycle de déposition par ImagePrep (A) et graphique de la variation de la diffusion de la lumière à l'intérieur d'un cycle (B)	38
Fig. 14: MALDI-TOF MS spectra comparing kidney protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (red) to those directly acquired from a serial section (black).	51

Fig. 15: MALDI-TOF MS spectra comparing liver protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (red) to those directly acquired from a serial section (black).	52
Fig. 16: MALDI IMS results comparing common kidney protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (red) to those directly acquired from a serial section (black).	53
Fig. 17: MALDI IMS results for kidney protein signals uniquely observed after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface.	54
Fig. 18: MALDI IMS results obtained after protein transfer onto nitrocellulose surfaces from thin sections cut from three different kidneys. These two protein signals presented were uniquely observed in the kidney cortex region. Scale bar: 5 mm.	54
Suppl. figure 1. Scheme of the home-built press used to transfer proteins from thinly cut tissue sections to a nitrocellulose coated MALDI conductive glass slide.	66
Suppl. figure 2. Histogram showing the average MALDI MS spectrum total ion count obtained after protein transfer from a liver tissue section onto a nitrocellulose membrane as a function of time.	66
Suppl. figure 3: MALDI-TOF MS spectra comparing protein signals from mouse liver tissue sections after transfer onto a nitrocellulose surface using 3 different buffers.	67
Suppl. figure 4: MALDI-TOF MS spectra comparing protein signals from mouse liver tissue sections after transfer onto a nitrocellulose surface deposited on 3 different target slides.	67
Suppl. figure 5: Histogram showing the average MALDI MS spectrum total ion count obtained after protein transfer from liver tissue section of different thicknesses onto a nitrocellulose membrane.	68

Liste des sigles et abréviations

Note : Pour simplifier la consultation des références, les abréviations en anglais sont utilisées dans ce mémoire. La description en français est donnée, puis celle en anglais est inscrite en *italique*.

APCI: Ionisation chimique à pression atmosphérique, *Atmospheric pressure chemical ionization*

CHCA : Acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique, *Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid*

CI : Ionisation chimique, *Chemical ionization*

DESI : Désorption/ionisation par électronébulisation, *Desorption electrospray ionization*

DHB : Acide 2,5-dihydroxybenzoïque, *2,5-dihydroxybenzoic acid*

EI : Impact électronique, *Electronic impact*

ESI : Ionisation par électronébulisation, *Electrospray ionization*

FAB : Bombardement d'atomes rapides, *Fast atom bombardment*

FFPE : Fixation par formaline et encastrement dans de la paraffine, *formalin fixed paraffin embedded*

ICP : Ionisation à l'aide d'une torche à plasma, *Ion coupled plasma*

ITO : Indium-étain oxydé, *Indium-tio oxyde*

IMS : Imagerie par spectrométrie de masse, *Imaging mass spectrometry*

MALDI : Désorption/ionisation laser assistée par matrice, *Matrix assisted laser desorption/ionization*

MS : Spectrométrie de masse, *Mass spectrometry*

MW : poids moléculaire, *molecular weight*

m/z : Masse sur charge

OCT : *Optimal cutting temperature*

SA: Acide sinapinique, *Sinapinic acid*

SIMS : Spectrométrie de masse d'ions secondaires, *Secondary ion mass spectrometry*

S/N : Signal sur bruit

TIC : Courant total d'ions, *Total ion current*

TOF : Temps de vol, *Time-of-flight*

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mes parents, Sylvain Fournaise et Chantal Ponton, qui m'ont toujours apporté leur soutien et conseils dans tous mes projets. Sans eux, je ne serais pas rendu où je suis aujourd'hui. Je voudrais aussi remercier mon frère Maxime Fournaise pour toutes les discussions, tant philosophique soient-elles, qui m'ont permis d'augmenter mon intérêt pour une multitude de sujets et ma sœur Stéphanie Fournaise qui m'a beaucoup aidé à m'épanouir tant socialement que psychologiquement.

Je voudrais aussi remercier les membres du groupe de recherche (Martin, Nidia et Heath) ainsi que notre ancien post-doc, Aurélien Thomas, qui m'ont aidé lors des jours plus difficiles et apportés leurs précieux conseils. De plus, je leur exprime ma gratitude avec un brin de surprise d'avoir réussi à me supporter à chaque jour de la semaine pendant aussi longtemps.

Finalement, je voudrais grandement remercier mon directeur de recherche, le professeur Pierre Chaurand, pour m'avoir donné la chance de faire mes études dans son groupe et pour son aide très précieuse tout au long de ma maîtrise. De plus, je tiens à le remercier pour toutes les opportunités qu'il m'a permis d'obtenir ainsi que les nombreux conseils qu'il m'a donnés.

Chapitre 1 : Introduction

Les travaux exposés dans ce mémoire portent sur le développement d'une méthode de transfert régiospécifique de protéines à partir d'une section tissulaire mince vers une surface fonctionnalisée qui sera par la suite analysée par imagerie par spectrométrie de masse (IMS). Ce mémoire est divisé en trois sections. Le chapitre 1 portera sur la présentation de la spectrométrie de masse (MS) et plus particulièrement de l'imagerie MS afin de montrer la pertinence ainsi que les objectifs de développer cette approche expérimentale. Le chapitre 2, qui a été accepté pour publication au périodique *Analytical and bioanalytical Chemistry* le 24 octobre 2014, portera sur la méthodologie développée pour effectuer le transfert de protéine à partir de la section vers la surface fonctionnalisée. Le dernier chapitre sera la conclusion et les perspectives de recherche.

1.1 Historique de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a été découverte par J.J. Thomson alors qu'il travaillait sur la transmission de l'électricité au travers des gaz.¹ En 1897, l'instrument qu'il a développé mesurait le ratio charge sur masse, puis, deux ans plus tard, un deuxième instrument lui a permis de mesurer le ratio charge sur masse et la charge seule. Le premier spectromètre de masse construit permettait de mesurer la masse d'atomes chargés en utilisant un tube de décharges gazeuses pour générer des ions. Les ions étaient ensuite transmis dans des champs électrique et magnétique parallèles pour finalement être détectés sur une plaque photographique. Cette méthode a été utilisée pour séparer et prouver l'existence des isotopes. Plus tard dans le 20^e siècle, grâce à la découverte de nouvelles techniques d'ionisation telles que l'impact électronique et l'ionisation chimique, les petites molécules organiques ont commencé à être analysées par MS, mais c'est dans les années 1980 que les développements les plus marquants de l'histoire de la spectrométrie de masse ce produisent.

Au début des années 1980, les protéines et autres macromolécules telles que les acides nucléiques étaient difficilement analysables. En effet, des techniques d'ionisation telles que le bombardement d'atomes rapides (FAB), la désorption plasma et ionisation par nébulisation

thermique arrivaient à ioniser faiblement les petites protéines, mais nécessitaient une concentration très élevée d'échantillons. Le développement de l'ionisation par électro-nébulisation (ESI) et de la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) ont révolutionné la spectrométrie de masse en permettant l'analyse de macromolécule avec beaucoup plus de facilité et de sensibilité. Des progrès majeurs en instrumentation et informatique permettent de nos jours d'effectuer l'analyse et l'identification de mélanges moléculaires complexes avec une haute précision et sensibilité et de manière semi-automatisée.

1.2 Théorie de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique analytique qui permet de détecter et d'identifier divers composés d'intérêt en mesurant leur ratio masse sur charge (m/z) après les avoir ionisés. Outre la détermination du poids moléculaire, la MS permet également de faire des analyses structurales. La MS est aussi qualifiée pour donner des informations quantitatives d'un analyte avec une très grande spécificité, précision, exactitude et une excellente sensibilité. En addition, il est possible d'étudier la dynamique de réaction et la chimie des ions, afin de donner de l'information sur les propriétés physiques telles que l'énergie d'ionisation, l'énergie apparente, l'enthalpie d'une réaction, l'affinité pour des protons et des ions et plus encore; et de vérifier les prédictions théoriques des orbitales moléculaires. Donc la MS est considérée comme étant l'une des techniques analytiques les plus puissantes et versatiles.²

Les mesures en MS sont effectuées sur des ions et non des molécules neutres. Grâce aux différentes géométries des sources d'ionisation et des analyseurs de masses, il est facile de manipuler leur vitesse ainsi que leur direction expérimentalement et par la suite de les détecter. Il y a quatre étapes requises lors d'une analyse par MS tel que montré à la figure 1. Après l'introduction de l'échantillon dans l'appareil, il y a l'ionisation de ses constituants. Il s'agit de l'étape critique puisque, sans elle, aucune détection ne pourrait être effectuée. Cette étape consiste à convertir les molécules d'analyte en ions en phase gazeuses. Il y a plusieurs techniques d'ionisation telles que nommées dans la section 1.3. Dans certaines techniques, l'ionisation est effectuée par l'éjection ou la capture d'un électron par l'analyte, ce qui va produire un cation radicalaire $[M^{+\bullet}]$ ou un anion radicalaire $[M^{\bullet-}]$. Dans d'autres techniques,

l'ionisation est effectuée par addition ou abstraction de proton, ce qui permet d'obtenir respectivement des ions $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Il est aussi possible que l'ionisation soit effectuée par l'adduit de cations métalliques tels que Na^+ et K^+ ainsi que d'anions tels que Cl^- .

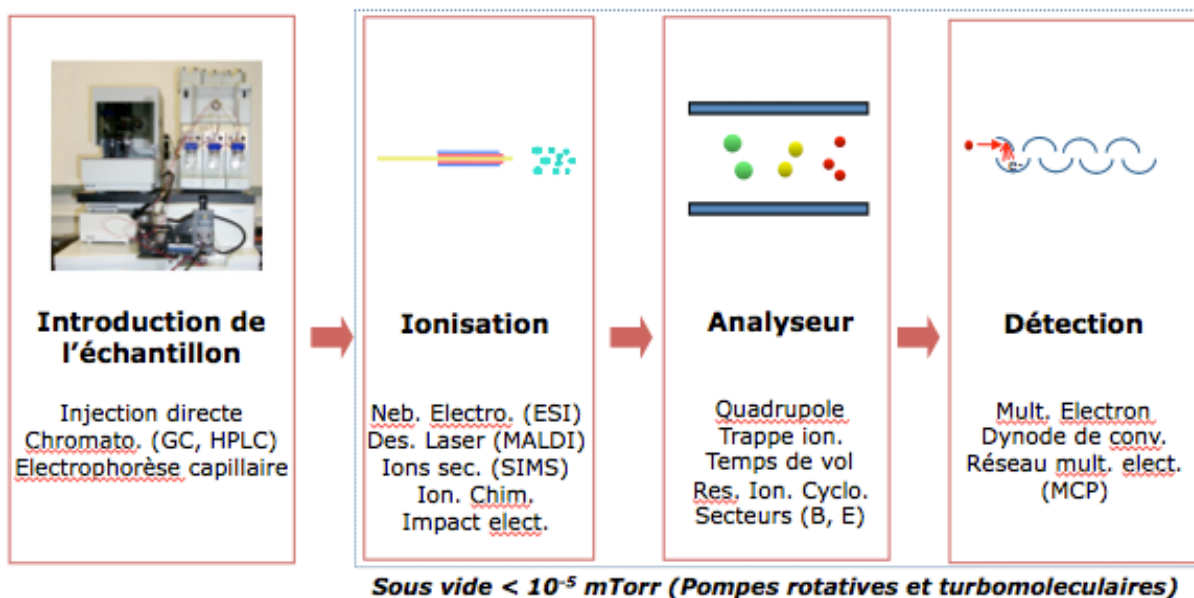


Fig. 1: Les composantes d'un spectromètre de masse (Note de cours CHM6160 - reproduction autorisée par Pierre Thibault)

La deuxième étape est la séparation des ions selon leur ratio masse sur charge (m/z) dans l'analyseur puis ceux-ci sont envoyés vers le détecteur. Cette étape sera expliquée plus en détails dans la section 1.4.

La dernière étape est la détection. Celui-ci mesure soit la charge induite ou le courant produit lorsqu'un ion passe près ou touche sa surface. Dans les détecteurs où les m/z sont balayés, le signal produit dans le détecteur pendant le balayage va permettre de produire le spectre de masse, c'est-à-dire le compte d'ions en fonction du rapport m/z . Typiquement, le détecteur utilisée est un détecteur électro-multiplicateur, mais il est aussi possible d'utiliser un détecteur qui transforme les ions en photons ainsi que des coupes de Faraday. De plus, puisque le nombre d'ions détectés à un instant précis est relativement petit, le signal obtenu doit être amplifié. Par exemple, dans les instruments commerciaux, les galettes de microcanaux sont fréquemment utilisées.³

Chaque ion détecté est représenté par sa distribution atomique et chaque atome possède une distribution d'isotopes naturels. Par exemple, le carbone possède 2 isotopes stables soit le ^{12}C et le ^{13}C qui pèsent respectivement 12.0000u et 13.0034u. En plus de la différence en masse, chaque isotope possède une abondance naturelle. Par exemple, le ^{12}C et le ^{13}C possèdent respectivement une abondance naturelle de 98.9% et de 1,08%. Dans les molécules biologiques, la distribution isotopique est essentiellement due à l'abondance du carbone et à l'abondance naturelle élevée du ^{13}C . Quand la résolution spectrale est assez élevée, il est alors possible de visualiser les différences d'abondance isotopique pour les molécules analysées en fonction de leur composition élémentaire. La résolution spectrale (R) est classiquement définie comme étant la masse du pic de masse observé (M) divisé par sa largeur à la mi-hauteur (ΔM , équation 1). Par exemple, un spectre de masse enregistré avec une résolution spectrale de 1000 pour la neurotensine ($MW_{\text{mono}} = 1671.9$) va ne montrer qu'un seul pic large, tandis que si la même molécule est mesurée avec une résolution spectrale de 10,000, la distribution isotopique de la neurotensine va être observée tel que montré par la figure 2.

$$R = \frac{M}{\Delta M} \quad [1]$$

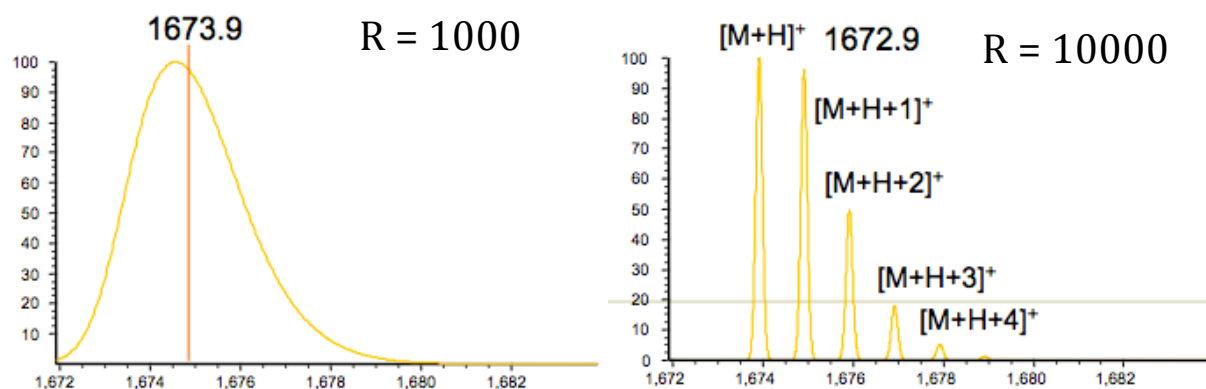


Fig. 2: Spectres de masse de la neurotensine enregistrés avec une résolution spectrale de 1000 (gauche) et de 10000 (droite)

1.3 Ionisation MALDI

Plusieurs sources d'ionisation sont disponibles en MS : L'impact électronique (EI)^{4,5,6}, l'ionisation chimique (CI)⁷, l'ionisation par bombardement d'atomes rapides (FAB)⁸, l'ionisation par électroébulisaison (ESI)⁹, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI), la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)^{10,11,12}, l'ionisation à l'aide d'une torche à plasma (ICP) et la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS). Cependant, parmi ces possibilités, il n'y a que trois sources d'ionisation qui sont couramment utilisées pour faire de l'imagerie MS, soit le MALDI, le SIMS et la désorption/ionisation par électroébulisaison (DESI), malgré que l'ICP avec ablation laser gagne lentement en popularité pour l'analyse de métaux.¹³ Donc, par soucis de concision, seulement l'ionisation par MALDI sera expliquée en détails.

Le terme MALD (qui par la suite est devenu MALDI) a été utilisé pour la première fois en 1985 par Franz Hillenkamp, Michael Karas et collègues.¹⁴ Ces chercheurs ont découvert que l'acide aminé alanine peut être ionisé plus facilement quand il est mélangé avec l'acide aminé tryptophane et ensuite irradié à l'aide d'un laser à 266 nm. Le tryptophane absorbait l'énergie du laser et aidait à ioniser l'alanine, qui n'absorbait pas la longueur d'onde du laser. Les peptides jusqu'à la mélittine (2843 Da) ont pu être ionisés de cette façon.¹⁵ Une avancée clé pour la désorption/ionisation de plus larges molécules a été effectuée en 1987 quand Koichi Tanaka et ses collègues de la corporation Shimadzu ont utilisés comme matrice une méthode utilisant des nanoparticules de cobalt de 30 nm mélangées dans du glycérol. Ils ont ensuite irradié ce mélange avec un laser à azote (N₂) qui émet à une longueur d'onde de 337 nm pour générer les phénomènes de désorption/ionisation.¹⁰ En utilisant cette combinaison, Tanaka a réussi à ioniser des biomolécules avec un poids moléculaire allant jusqu'à 34,472 Da, soit la protéine carboxypeptidase-A. Tanaka a reçu un quart du prix Nobel en 2002 en chimie pour avoir démontré, qu'avec la bonne combinaison de matrice et de longueur d'onde laser, il est possible d'ioniser les protéines de manière intacte. La même année, Karas et Hillenkamp ont réussi à ioniser l'albumine (67 kDa) en utilisant l'acide nicotinique comme matrice et un laser à 266 nm.¹¹ D'autres développements ont été réalisés en utilisant un laser à 355 nm ainsi que l'acide férulique, l'acide caféique et l'acide sinapinique comme matrice.¹⁶ L'introduction des lasers à azote peu chers possédant une longueur d'onde de 337 nm et les

premiers spectromètres de masse à temps de vol introduits dans le début des années '90 ont permis au MALDI d'être plus facilement accessible à un plus grand nombre de chercheurs.¹⁷

Le MALDI est la source d'ionisation la plus utilisée en imagerie MS. Le MALDI possède plusieurs avantages tels qu'une préparation rapide et simple, la possibilité de désorber et d'ioniser des molécules de hauts poids moléculaires (≥ 150 kDa) de manière intacte, la possibilité d'analyser des mélanges complexes et une bonne tolérance aux impuretés tels que les tampons et les sels classiquement utilisés lors de la préparation ou purification des échantillons biologiques. Cependant, le MALDI possède le désavantage de ne pas pouvoir être directement couplé en ligne avec les systèmes de chromatographie.

En MALDI la matrice idéale doit être capable d'absorber la longueur d'onde du laser (de 337 à 355 nm pour les laser UV), d'isoler et de co-cristalliser avec les analytes, d'avoir une faible tension de vapeur, de produire peu d'ions interférents surtout pour l'analyse de petites molécules, d'être inerte avec les molécules présentes dans l'échantillon, d'avoir une bonne solubilité dans le système de solvant utilisé et d'être un donneur ou receveur de protons.¹⁸ Les petites molécules organiques sont généralement de bons candidats comme matrice et sont principalement utilisées. Les matrices les plus utilisées en MALDI sont l'acide sinapinique (SA), l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA).¹⁹ Cependant, des études récentes ont évalué le potentiel de différentes matrices afin d'augmenter l'information moléculaire accessible.^{20,21,22} Par exemple, le 1,5-diaminonaphtalène augmente l'information lipidique obtenue en polarité positive et négative.²³ De plus, cette matrice a été étudiée pour l'analyse des protéines et des peptides en utilisant la fragmentation dans la source MALDI, sans prétraitement.^{24,25} Le tableau 1 montre les principales matrices utilisées pour l'analyse de différents types de molécules organiques et biologiques ainsi que le mode d'ionisation positif et/ou négatif. La figure 3 présente leurs structures.

Tableau 1: Principaux composés utilisés comme matrice en MALDI MS selon la classe de molécules étudiées et le mode d'ionisation .²⁶

Nom	Poids Moléculaire	Classes de molécules	Mode d'ionisation
Acide sinapinique ²⁷	224,21	Protéines	Positif
Acide alpha-cyano-4-hydrocinnamique ²⁷	189,17	Peptides, protéines et drogues	Positif
Acide 2,5-dihydroxibenzoïque ²⁷	154,12	Drogues, lipides et peptides	Négatif
2,6-dihydroxyacetophénone ²⁸	152,15	Lipides	Positif et Négatif
2-mercaptobenzothiazole ²⁹	167,15	Lipides	Positif
1,5-diaminonaphtalène ^{23,24}	158,20	Lipides et protéines	Positif et Négatif
Dithranol ³⁰	226,06	Polymères	Positif
Acide 3-hydroxypicolinique ³¹	129,03	Nucléotides	Négatif
Acide férulique ³¹	194,08	Nucléotides	Négatif

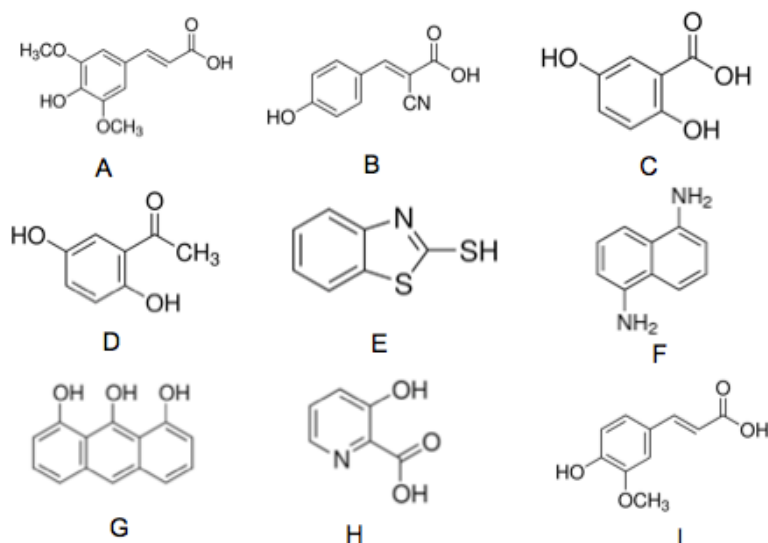


Fig. 3: Structure des composés les plus utilisées comme matrice en MALDI MS, soit l'acide sinapinique (A), l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (B), l'acide 2,5-dihydroxibenzoïque (C), la 2,6-dihydroxyacetophénone (D), la 2-mercaptobenzothiazole (E), le 1,5-diaminonaphtalène (F), le dithranol (G), l'acide 3-hydroxypicolinique (H), l'acide férulique (I)

La matrice est généralement préparée à une concentration variant de 5 à 20 mg/ml dans une solution aqueuse contenant environ 50 à 70% d'un solvant organique tel l'acétonitrile ou le méthanol. Il est aussi possible d'ajouter 0,1 à 0,2% d'acide acétique ou d'acide trifluoroacétique dans la solution.²⁷ La composition du solvant est importante pour solubiliser efficacement les molécules à analyser, mais peut dans certains cas affecter la co-cristallisation de la matrice et de l'analyte.^{32,33,34} De plus, il est possible d'ajouter un ou plusieurs détergents dans la solution de matrice, par exemple pour augmenter la détection des protéines insolubles.^{35,36}

Une fois la matrice choisie et préparée, l'échantillon est mélangé avec la matrice et une microgoutte de ce mélange est déposée sur une plaque échantillon. Suite à l'évaporation des solvants, il se produit une co-cristallisation entre la matrice et l'analyte. Typiquement, pour qu'il y ait formation de co-cristaux et production d'ions avec des rendements maximaux, le rapport moléculaire entre les molécules de matrice et d'analyte doit être de l'ordre de 5000/1. Il y a 2 principales méthodes pour préparer les échantillons. La première est de mélanger la matrice et l'échantillon dans les proportions voulues préalablement à la déposition du mélange sur la plaque. Ensuite, environ 1 µl du mélange est déposé sur la plaque jusqu'à évaporation du solvant. La deuxième méthode consiste à déposer l'échantillon sur la plaque (0.5-1 µl), puis y est ajoutée la solution matrice. Pendant le séchage, l'analyte sera co-cristallisé avec la matrice. Une fois l'échantillon sec, il sera introduit dans la source MALDI du spectromètre.

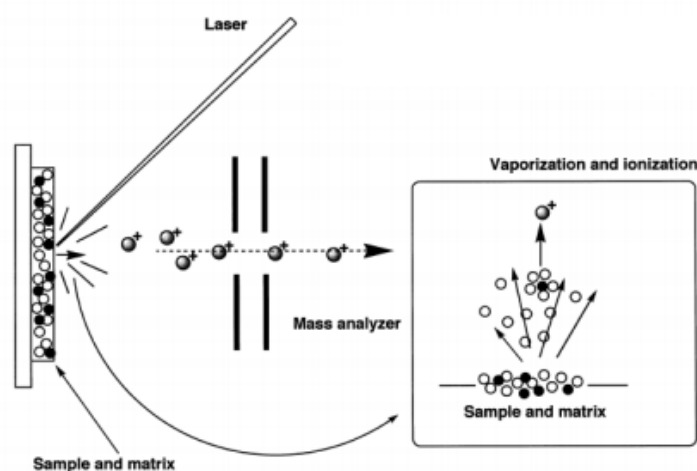


Fig. 4: Schéma d'une source MALDI³⁷

Le MALDI (figure 4) est une méthode d'ionisation relativement douce qui fonctionne en deux étapes. La première étape est la désorption. Cette étape est causée par l'irradiation des co-cristaux et l'absorption de l'énergie d'un pulse laser (0.5-2 ns) par la matrice, causant l'ablation de la couche supérieure. Le matériel ainsi désorbé formera un cône d'éjection sous forme de plume. Les études de plumes ont montrées que celles-ci sont formées de deux sections distinctes, (figure 5).³⁸ La première section, composée principalement de la matrice et des petites molécules, a une expansion semi-elliptique tant vers l'avant que latéralement. La pression à la surface de la cible irradiée par le laser diminue rapidement avec l'expansion des vapeurs de la matrice. D'autre part, la deuxième section, composée principalement des molécules plus lourdes telles que les protéines, possède la forme d'un jet fin.³⁸

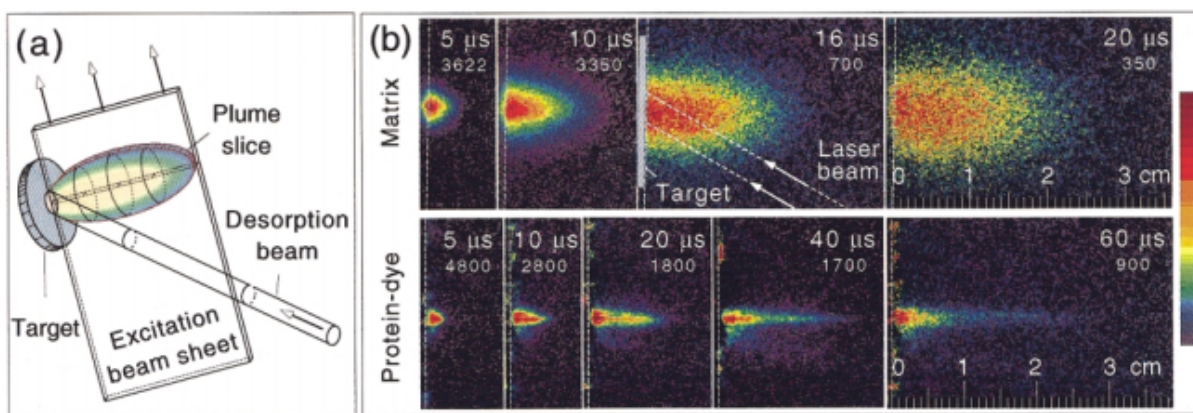


Fig. 5: Schémas de la géométrie d'une plume de désorption/ionisation MALDI en fonction du temps mesurée par fluorescence induite par laser.³⁸

La deuxième étape est l'ionisation des molécules. Les réactions physicochimiques qui ont lieu lors du processus d'ionisation sont influencées par la basicité de la phase gazeuse, de l'affinité pour les protons et électrons de la matrice utilisée^{39,40,41,42,43,44} et celle des analytes.^{45,46,47,48,49} Un modèle théorique généré à partir de méthodes informatiques a été validée à partir de données expérimentales.^{50,51} À partir de ces travaux, il y a deux théories principales qui sont encore discutées aujourd'hui, le modèle du « *Lucky Survivor* »⁵², et celui de la protonation en phase gazeuse.^{53,54,55}

Le modèle original du « *Lucky Survivor* » propose que les analytes soient incorporés dans les cristaux de matrice selon leur charge préservée telle qu'en solution. Avec une préparation standard d'échantillon, les peptides et les protéines sont protonés et seraient donc

incorporés en tant qu'analytes préchargés avec leurs contre-ions. L'incorporation des analytes avec leur charge en solution a pu être confirmée en utilisant une sonde à pH⁵⁶ et en détectant des adduits d'analytes préchargés avec des anions d'acides forts provenant d'une solution.^{57,58} Le modèle original différencie entre deux possibilités. Dans la première, les agrégats générés lors de l'irradiation laser contiennent des analytes préchargés avec leur contre-ion correspondant. La dissociation des agrégats cause une séparation des charges et la génération d'adduits dans le cas de molécules initialement neutres. Dans la deuxième possibilité, les agrégats possèdent une charge nette suite à la désorption de la matrice et de l'analyte.^{59,60,61}

Le modèle original du « *Lucky Survivor* » (figure 6) possède cependant des limitations dans la description de la génération d'anions d'analyte. Des agrégats avec des charges négatives en excès peuvent neutraliser les analytes préchargés positivement, mais les déprotonations subséquentes des analytes par des contre-ions seront endergonique puisque le groupement acide carboxylique des peptides et des protéines est moins acide que les contre-ions communs tels que les trifluoroacétates ou les chlorures. Pour prendre en compte cette limitation, un deuxième modèle du « *Lucky Survivor* » a été développé.⁶² Ce modèle propose que les charges en excès de la matrice incluses dans les agrégats mènent à la génération d'analytes protonés par la neutralisation du contre-ion ou d'analytes déprotonés. Les anions de matrice consistent alors de groupements carboxylates ou de phénolates délocalisés dont les contreparties neutralisées montrent environ la même acidité que le groupement acide carboxylique de l'analyte. Conséquemment, la déprotonation de l'analyte ne devrait pas être très efficace, ce qui est en accord avec les faibles signaux anioniques qui sont obtenus lorsqu'une matrice acide est utilisée.^{63,64}

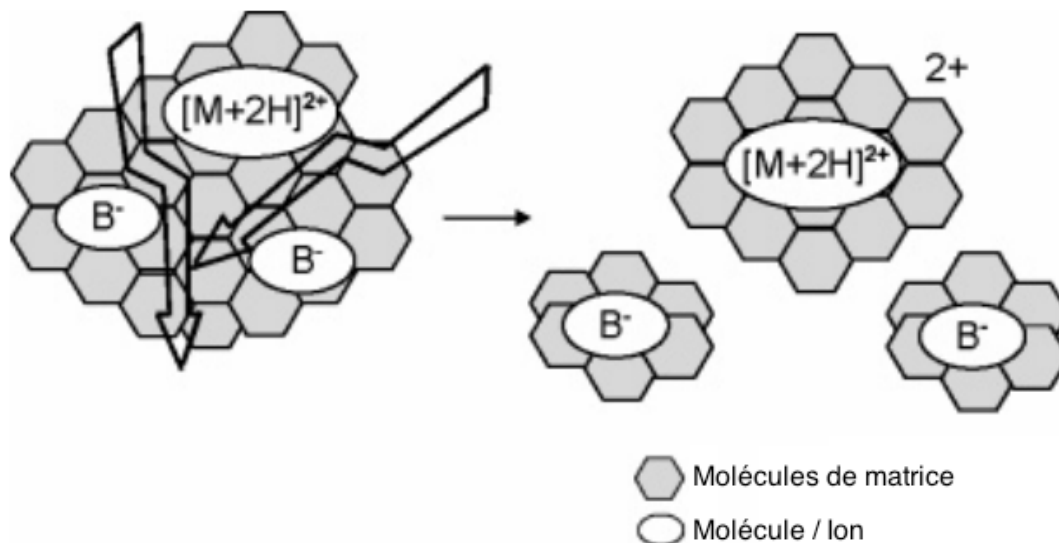
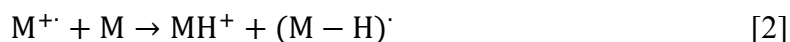


Fig. 6: Modèle du « *Lucky Survivor* »⁵²

Le modèle de la protonation en phase gazeuse prédit que les analytes neutres dans la phase gazeuse qui proviennent de l'incorporation d'espèces neutres dans les cristaux de matrices ou bien de la recombinaison de charges avec les contre-ions respectifs dans le cas des analytes préchargés. Ce modèle comprend deux types de réactions se produisant dans la phase gazeuse, soit les réactions matrice/matrice et les réactions analyte/matrice. Tel que rapporté par Ehring et al. en 1992,⁵³ les réactions matrice/matrice sont importantes afin de servir d'intermédiaires pour, subséquemment, protoner les analytes. Si les ions primaires sont des cations radicalaires, un transfert d'hydrogène ou un transfert de proton peut mener à une protonation très efficace de la matrice, tel que montré par l'équation 2.⁶⁵



Le radical résultant peut capturer un électron libre pour former une molécule $(M-H)^{\cdot}$. Dans le cas des matrices comportant un groupement phénol, il est possible que la molécule subisse une « perte d'eau », c'est à dire qu'il forme un ion $(M-OH)^+$.⁵⁴ Les protons sont particulièrement mobiles lorsqu'ils sont dans un milieu possédant beaucoup de ponts hydrogènes, tel que l'eau. Dans les agrégats, ils sont beaucoup moins mobiles, mais tout de même assez pour migrer une certaine distance jusqu'à ce qu'ils soit captés par un analyte possédant une meilleur affinité pour les protons.⁶⁶

Il est aussi possible que la matrice effectue une réaction dissociative telle que montré par l'équation 3. Dans ce cas, l'atome d'hydrogène s'est dissocié d'un groupement hydroxyle, ce qui forme un anion centré sur l'oxygène.⁶⁷



Les réactions en phase gazeuse sont donc des voies importante de formation des ions en MALDI.⁵³ Bökelmann et al. ont investigué la distribution angulaire ainsi que la vitesse des ions dans une plume MALDI et ont découvert une diminution de la présence des ions de matrices dans les zones où la densité d'analytes protonés était importante.⁶⁸ D'autre part, les études sur la photodissociation⁶⁹ et sur le temps de vol⁷⁰ des analytes MALDI protonés ont appuyé la théorie des réactions en phase gazeuses. Ces études ont permis de conclure que lorsque la réaction de transfert de proton (équation 4) possède un $\Delta G < 0$, elle est généralement très efficace en phase gazeuse.⁶⁵ Le transfert de proton à un peptide neutre en phase gazeuse est presque toujours thermodynamiquement favorable. De plus, la sensibilité peut être améliorée si la protéine ou le peptide contient un résidu basique⁷¹ et/ou possiblement avec une augmentation de la longueur de la chaîne.⁷² Le transfert de protons peut être favorable pour les molécules organiques possédant au moins un atome d'hydrogène. Ceux-ci possèdent généralement une affinité plus élevée pour les protons que pour la matrice. Les analytes possédant un ou plusieurs groupements aromatiques et/ou un oxygène ne possèdent pas nécessairement une affinité protonique plus élevée que les matrices communes, mais l'utilisation de matrices possédant une affinité protonique plus faible permet d'augmenter la sensibilité.⁷³



Lorsque la différence d'affinité protonique entre l'analyte et la matrice est grande, la réaction de transfert protonique est très exothermique. L'excès d'énergie cause alors une excitation interne et favorise de la fragmentation des analytes. De plus, il a été démontré que l'utilisation d'une matrice possédant une faible affinité protonique cause la formation d'ions multiples chargés, causée par de multiples protonations.⁴¹

En bref, une fois dans la plume, les analytes neutres vont réagir avec la matrice protonée (mode positif). Les collisions en phase gazeuse des analytes neutres avec les ions de la matrice mène à un transfert de protons entre ces espèces.^{54,74,75}

1.4 Analyseurs de masse

Une fois les ions formés, ceux-ci sont séparés par vers l'analyseur de masse. Il existe plusieurs types d'analyseur de masse tels que le quadripôle⁷⁶, le tube de temps de vol (TOF)^{77,78}, la trappe ionique⁷⁶, l'orbitrappe^{79,80}, et la résonance cyclotronique ionique.⁸¹ Encore une fois, pour des fins de simplicité et pour rester concis, seul le tube de temps de vol utilisé sera expliqué en détails.

Suite à l'accélération des ions dans un champ électrostatique, l'analyseur de temps de vol permet de déterminer le ratio m/z selon le temps requis pour sa détection. Pour cela, le tube est composé de deux régions, soit la région source et la région libre de champ, tel que montré par la figure 7. Dans ce schéma, l'irradiation laser est représentée par le cône bleu pâle. Dans le cas le plus simple, une différence de potentiel stable (typiquement de 20 à 25 kV) est appliquée entre la plaque échantillon conductrice, représentée par la large bande à gauche, et une électrode d'extraction située à une distance fixe d_{source} à l'autre extrémité de la source. Les ions sont d'abord accélérés selon l'équation 5, où a représente l'accélération, E est le champs électrique, q est la charge de l'ion et m est la masse de l'ion. Il est donc possible d'obtenir la position de l'ion dans la source en effectuant une double intégrale de l'accélération selon le temps, tel que montré par l'équation 6 où t représente le temps. Cette intégrale permet d'obtenir l'équation 7 où d_0 représente la position initiale et V_0 représente la vitesse initiale. Finalement, si d_0 et V_0 sont considérés infiniment petit, il est possible d'obtenir le temps passé dans la source (t_s) avec l'équation 8.

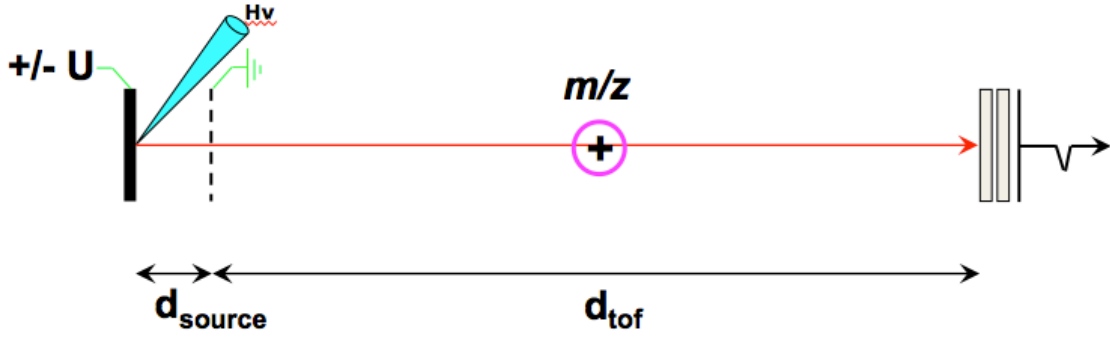


Fig. 7: Schéma d'un tube de temps de vol linéaire.

$$a = Eq/m \quad [5]$$

$$d_{\text{source}} = \iint a \, dt \quad [6]$$

$$d_{\text{source}} = d_0 + V_0 t + 0,5 \left(\frac{Eq}{m} \right) t^2 \quad [7]$$

$$t_s = \sqrt{\frac{2d_{\text{source}}m}{qE}} \quad [8]$$

Une fois que les ions sont accélérés, ils entrent dans la région libre de champ de longueur d_{tof} fixe, et délimitée à son autre extrémité par le détecteur d'ions. Les ions de même charge possèdent alors la même énergie cinétique E_c qui est représentée par l'équation 9 où U représente le potentiel d'accélération. Il est donc possible de déterminer le temps de dérive t_{tof} des ions à l'aide de l'équation 10. Finalement, en additionnant le temps que l'ion passe dans la source avec celui passé dans la zone libre de champs, le temps de vol total de l'ion est obtenu tel que montré par l'équation 11. Il est alors possible de simplifier la formule obtenue en considérant le temps que l'ion passe dans la source comme négligeable par rapport au temps passé dans l'analyseur, et de convertir le potentiel d'accélération en différence de potentiel P selon l'équation 12 où eV représente la l'énergie de l'électron, ce qui permet d'obtenir un calcul simple du temps de vol t_{vol} d'un ion tel que montré par l'équation 10.⁸² Donc, il est possible d'obtenir la masse de l'ion à l'aide de l'équation 13.

$$E_c = qU = \frac{1}{2} mV^2 \quad [9]$$

$$t_{\text{tof}} = \frac{d_{\text{tof}}}{V} = d_{\text{tof}} \sqrt{\frac{m}{2qU}} \quad [10]$$

$$t_{\text{vol}} = \sqrt{\frac{2d_{\text{source}}m}{qE}} + d_{\text{tof}}\sqrt{\frac{m}{2qU}} \approx d_{\text{tof}}\sqrt{\frac{m}{2qeVP}} \quad [11]$$

$$U = eVP \quad [12]$$

$$m = \frac{2t_{\text{vol}}^2qeVP}{d_{\text{tof}}^2} \quad [13]$$

Afin d'améliorer la résolution spectrale en spectrométrie de masse MALDI temps de vol, deux améliorations majeures ont été apportées. La première amélioration est l'utilisation d'un réflectron. Celui-ci conceptualisé dans les années '50 par Alikhanov⁸³ et par la suite développé par Mamyrin^{84,85}, est utilisé afin de corriger des variations d'énergie cinétique des ions acquise lors de l'étape de désorption/ionisation et de l'accélération initiale. Tel que montré par la figure 8, un réflectron est composé d'une série d'électrodes qui vont causer le ralentissement progressif des ions puis leur ré-accélération dans le sens opposé vers un deuxième détecteur. Il existe 3 principaux types de réflexion, soit le réflectron à champ uniforme, à deux étages ou à champ progressif. Tel que montré par la figure 9, Le réflectron à champ uniforme fonctionne à l'aide d'un champ électrique de croissance linéaire formé à partir d'un réseau de résistances de valeur constante entre les électrodes d'entrée et de fond du réflectron. Ensuite, le réflectron à deux étapes utilise deux champs de retardement à croissance linéaire séparés par une électrode intermédiaire. Le champ électrique est nettement plus élevé dans la première section (~2/3 du potentiel) que dans la deuxième section où la compensation en énergie se fait. L'avantage des réflectrons à deux étapes est leurs plus faibles dimensions (~1/20^{ième} de la longueur totale des espaces libres de champs) par rapport aux réflectrons à champ uniforme (~1/4^{ième} de la longueur totale des espaces libres de champs). Finalement, le réflectron à champ progressif utilise une série de résistance qui va former un champ électrique de croissance exponentielle entre l'entrée et le fond du réflectron. A cause de leurs grandes dimensions par rapport aux espaces libres de champ et de la difficulté de générer un champ électrique de croissance exponentielle parfait, ceux-ci sont peu utilisés.

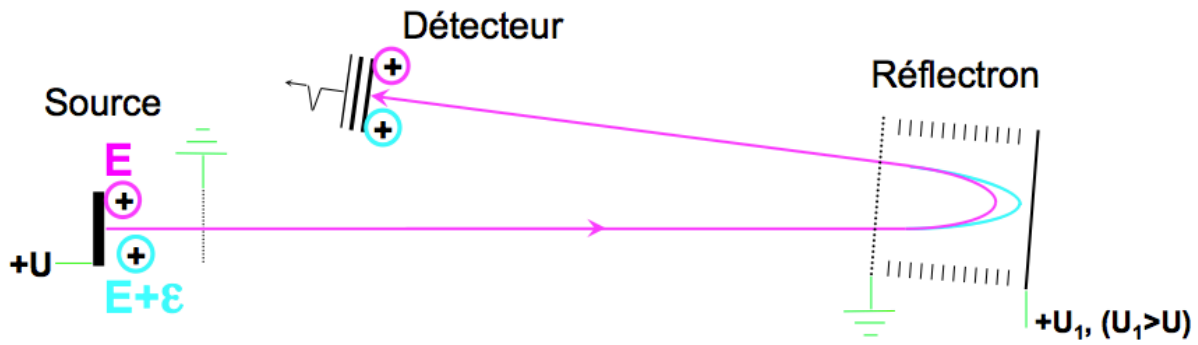


Fig. 8: Schéma d'un spectromètre de masse par de temps de vol avec un réflectron

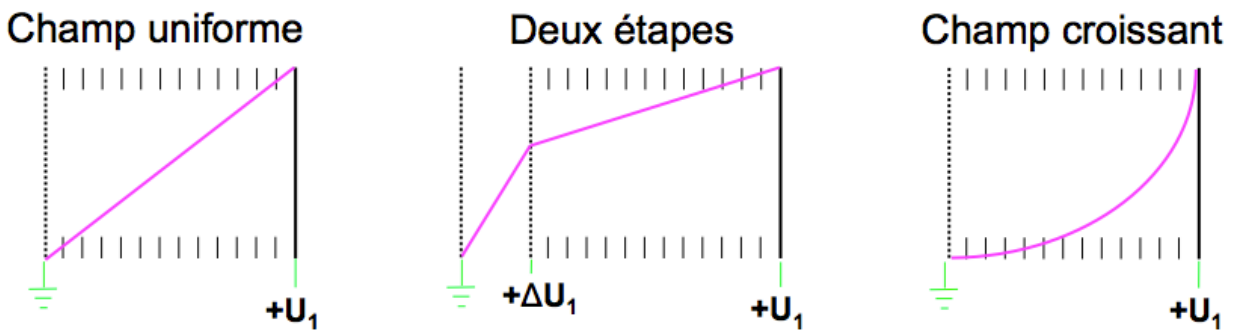


Fig. 9: Schémas des différentes géométries des réflectrons et de la force du champ électrique selon la distance parcourue par les ions.

A l'aide de l'équation 14, il est possible de déterminer le temps ($t_{\text{déc.}}$) mis par un ion pour décélérer dans le réflectron, dont le champ U grandit selon $U=ax^2$ où a est une constante et x est la position de l'ion dans le réflectron. Dans cette équation, m représente la masse de l'ion et z représente sa charge et x_{max} représente la profondeur maximale à laquelle l'ion va pénétrer.⁸⁵ Il est donc possible de déterminer le temps que l'ion passe dans le réflectron ($t_{\text{réflectron}}$) selon l'équation 15.

$$t_{\text{déc.}} = \int_0^{x_{\text{max}}} \frac{dx}{\sqrt{\frac{2q(U-ax^2)}{m}}} = \frac{\pi}{2\sqrt{\frac{2qa}{m}}} \quad [14]$$

$$t_{\text{réflectron}} = \frac{\pi}{\sqrt{\frac{2qa}{m}}} \quad [15]$$

En plus du réflectron, l'extraction retardée est aussi utilisée afin d'améliorer la résolution spectrale.⁸⁶ À partir de la théorie développée par Wiley et McLaren,⁷⁸ dans une

source ionique à deux étapes, la dépendance du temps de vol sur la vitesse initiale peut être corrigée en retardant l'extraction des ions de la source au moment approprié. Si les autres termes sont non-significatifs, la résolution en masse peut être déterminée selon le rapport du temps de vol total sur l'incertitude dans cette mesure. Dans ce cas, la résolution en masse observée peut augmenter de manière proportionnelle avec la longueur de vol effective. Dans les techniques d'ionisation de surfaces telle que le MALDI, le point focal d'espace n'est pas un facteur, donc la correction de la distribution de la vitesse des ions permet une augmentation significative de la performance.

Le temps de délai d'extraction optimal (τ) permettant une correction de vitesse de premier ordre au niveau du détecteur est présenté par l'équation 16. Dans cette équation, d_a représente la longueur du premier champ d'accélération en mm, m est la masse en daltons, z est le nombre de charges élémentaires de l'ion, V_x est l'amplitude du pulse d'extraction en volt, T_0 est l'énergie cinétique initiale la plus probable en électronvolts et w est obtenu à l'aide de l'équation 17. Dans cette équation $x=V_x/V_i$ où V_i est le potentiel appliqué sur la grille intermédiaire, L est la distance libre de champ et d_0 est la longueur du deuxième champ d'accélération. Pour focaliser la vitesse, w doit être plus élevé que 0.

$$\tau = 0,144d_a \left(\frac{m}{zV_x}\right)^{1/2} \left[\frac{1}{w} + \left(\frac{T_0}{V_x}\right)^{1/2}\right] \quad [16]$$

$$w = \left(\frac{x}{1+x}\right)^{3/2} \left[\left(\frac{L}{2d_a}\right) - \left(\frac{d_0}{d_a}\right)(1+x)\right] + x\left(\frac{d_0}{d_a}\right) - 1 \quad [17]$$

Cette théorie s'applique aussi aux analyseurs munis d'un réflectron, mais avec un ajustement des conditions d'opérations. Dans ce cas, $w=x(d_0/d_a)-1$ afin d'accomplir la focalisation de la vitesse.

L'ajustement du délai d'extraction de la source d'ions pour optimiser la résolution peut être accomplie à l'aide de l'équation 15. Selon le champ d'extraction, un délai d'extraction plus grand est requis afin de focaliser des molécules de masse plus élevée et, pour les masses plus petites, le délai d'extraction est approximativement proportionnel à la racine carré du m/z . Alternativement, les masses plus élevées peuvent être focalisées en augmentant la valeur du champ d'extraction, tout en maintenant le délai d'extraction constant.

En bref, le délai d'extraction consiste à extraire les ions de la source après un temps fixe. Ainsi, les ions seront tous accélérés au même moment. Donc, les ions situés plus près de la sortie de la source d'ionisation seront moins accélérés que ceux situés plus profondément, ce qui permettra aux ions situés à différentes positions dans la source d'arriver au même moment au détecteur.⁸⁷ La figure 10 montre les différences de résolution spectrale en MALDI-TOF MS pour un peptide de MW= 1296.68 quand l'acquisition est faite en utilisant un champ d'extraction constant et un réflectron, en utilisant l'extraction retardée en TOF linéaire, puis finalement en combinant l'extraction retardée et un réflectron. Dans ce dernier cas, on observe la meilleure résolution spectrale.

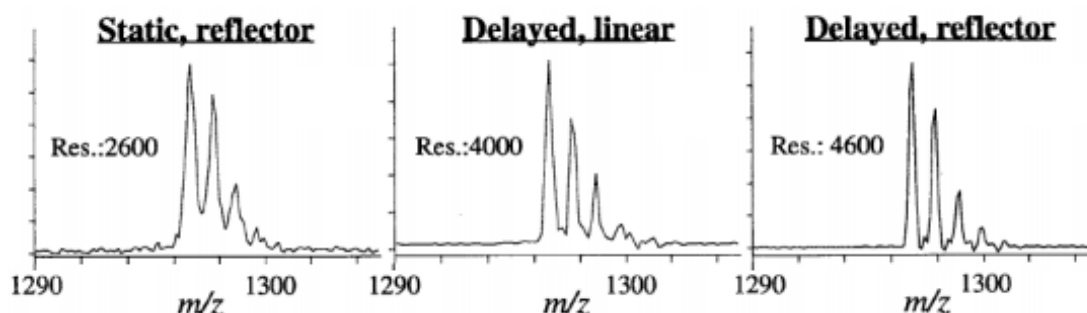


Fig. 10: Comparaison de spectres MALDI-TOF MS obtenus pour l'angiotensine I (m/z : 1296.68) quand l'acquisition est faite en utilisant un champ d'extraction constant (static) et un réflectron (reflector), en utilisant l'extraction retardée (delayed) en TOF linéaire (linear), puis finalement en combinant l'extraction retardée et un réflectron.⁸⁷

1.5 Théorie de l'imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse des échantillons biologiques

L'imagerie MS est une approche qui permet la mesure de la composition et de l'abondance des molécules de façon régiospécifique dans la gamme de m/z analysée sur une superficie préalablement choisie. Tel que mentionné précédemment, il y a trois techniques de désorption/ionisation qui sont utilisées de façon routinière en imagerie MS. Il y a le SIMS, le MALDI et le DESI. Il y a aussi d'autres techniques telles que l'ablation laser couplée à l'ionisation ICP qui gagnent lentement en popularité. Puisque les travaux de recherches ont été

effectués sur des échantillons biologiques, plus particulièrement des sections tissulaires minces, seulement cette partie de l'imagerie MS sera expliquée plus en détails.

Tel que mentionné dans la section précédente, le MALDI permet d'analyser plusieurs types de biomolécules que les lipides, les peptides et les protéines sans causer de fragmentation majeure des analytes. La possibilité d'effectuer de l'imagerie par MALDI MS a été tout d'abord démontrée par Gusev *et al.* en 1995.⁸⁸ Dans cet article, la position de divers composés, incluent des colorants et des peptides, a été analysée en deux dimensions à partir des plaques de chromatographie sur couche mince. L'imagerie de sections tissulaires par MALDI MS a été introduite en 1997 par Caprioli *et al.*⁸⁹ Plusieurs développements, tels que l'automatisation du processus d'acquisition des données⁹⁰ et les dépôts homogènes de matrices ont menés à l'acquisition d'images de protéines intactes dans des sections de cerveau de souris et d'un gliome cérébral humain avec une résolution spatiale de 25 µm.⁹¹ Depuis, ce temps, l'imagerie MS est en pleine expansion.

L'imagerie MS est utilisée dans une large gamme d'étude effectuée sur des systèmes biologiques. L'un des champs d'application les plus prometteurs est l'étude de l'expression moléculaire et de leur organisation spatiale dans l'apparition et l'évolution des maladies. Une excellente corrélation existe entre l'expression moléculaire et l'état de santé du tissu.^{92,93} Les profils moléculaires de différents analytes peuvent être corrélés avec l'histologie des sections, pour des fins de diagnostic. Plusieurs maladies telles le cancer⁹⁴ et les désordres neurologiques^{95,96} ont déjà été étudiées. De plus, de nouveaux biomarqueurs pour le cancer ont été identifiés.^{97,98} Un autre champ d'application est la cartographie de xénobiotiques et leurs métabolites dans les tissus.⁹⁹ La position exacte ainsi que la quantification absolue d'un médicament peuvent être déterminées dans une section tissulaire.¹⁰⁰ De plus, ses effets sur le protéome et le lipidome peuvent être étudiés en fonction du temps.¹⁰¹ L'imagerie MS a aussi été utilisée pour étudier la biologie du développement et de la reproduction.¹⁰² Il y a aussi un intérêt croissant pour l'étude du contenu protéique et métabolomique présent dans les tissus végétaux.¹⁰³

De nouvelles méthodologies comportant l'utilisation de réactions *in situ* avant l'analyse par imagerie MS sont aussi en développement. Le développement de méthodes de digestion enzymatique *in situ* a permis l'imagerie de protéines à l'aide de leurs peptides

protéolytiques.¹⁰⁴ La déposition de l'enzyme est effectuée de façon homogène, puis la matrice est déposée. Finalement, les peptides résultant sont analysés par imagerie MS. Dans ce cas, puisque la majorité des peptides possèdent un rapport m/z plus petit que 4000, l'imagerie des protéines membranaires et des protéines associées aux membranes est possible. Cette méthodologie permet aussi l'analyse de tissus fixés à l'aide de la formaline et encastré dans la paraffine.¹⁰⁵

L'imagerie MS est effectuée en 5 étapes (figure 11), soit la coupe des tissus, le nettoyage des sections (non présent sur la figure), la déposition de la matrice, l'acquisition des données et le traitement des données.

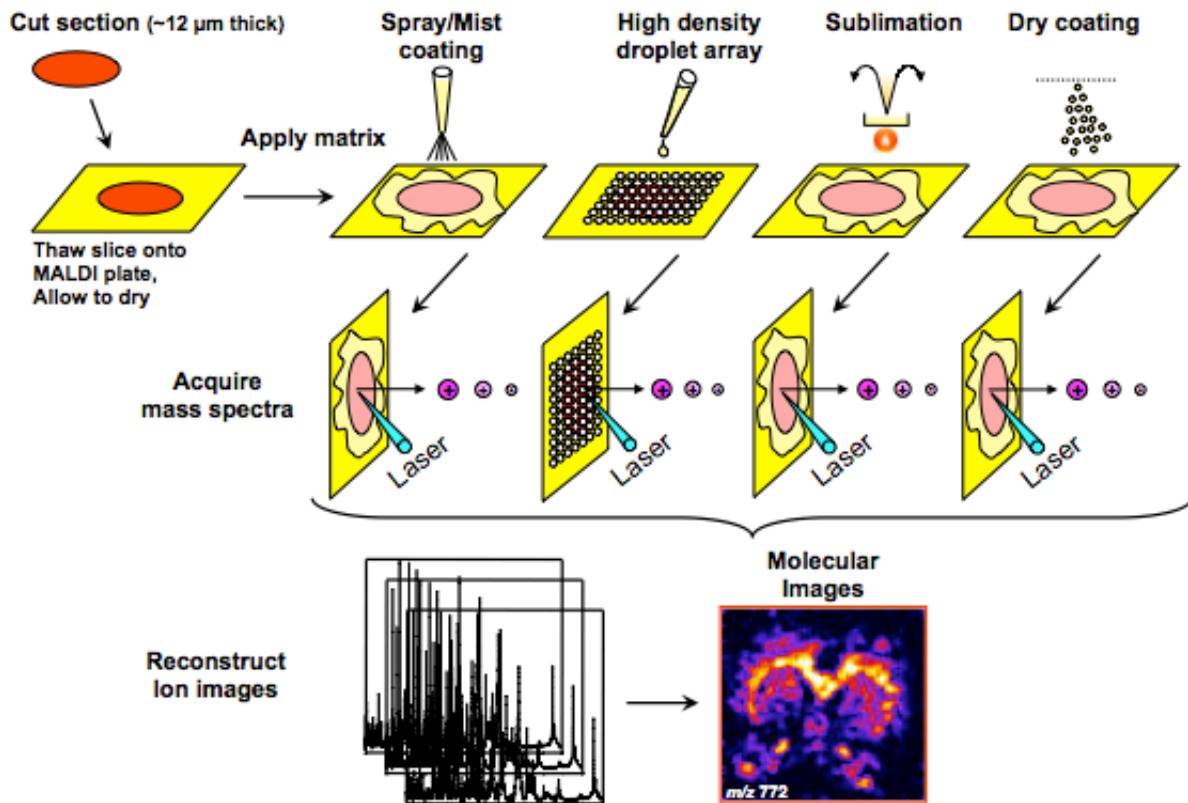


Fig.11 : Étapes nécessaires pour effectuer une analyse par imagerie MALDI-TOF MS

1.5.1 Manipulation, préservation des tissus

Il y a plusieurs facteurs qui influencent la qualité de l'imagerie MS. Cependant, l'une des étapes les plus critiques pour obtenir des images de haute fidélité et qualité à partir d'échantillons tissulaires est la coupe et la manipulation des sections.

Tout d'abord, il est possible d'effectuer une stabilisation des tissus à l'aide de la chaleur¹⁰⁶ immédiatement après le prélèvement des tissus biologiques. En principe, le tissu est stabilisé suite à l'inhibition des enzymes protéolitiques en chauffant rapidement jusqu'à 95°C sous vide.¹⁰⁷ Cette méthode peut toutefois être problématique pour la qualité des tissus, mais demeure avantageuse pour prévenir les changements biologiques postmortems.^{106,108}

Il y a différentes approches qui peuvent être utilisées pour préserver les tissus, afin de minimiser la dégradation moléculaire.²⁶ La première méthode est la congélation instantanée qui est couramment utilisée pour maintenir la forme tridimensionnelle des tissus tout en minimisant la dégradation.¹⁰⁹ Cette méthode est simple, mais requiert certaines précautions. Par exemple, lorsque les tissus sont prélevés, ils seront immergés dans une solution cryogénique telle l'isopentane refroidi ou le méthylbutane refroidi ou encore dans l'azote liquide. Au lieu d'immerger directement le tissu prélevé et induire une fracture thermique, celui-ci peut être déposé sur un bateau fait de papier d'aluminium flottant sur le liquide cryogénique.¹¹⁰ Ce montage est utile puisqu'il permet de préserver la forme des tissus tout en congelant l'échantillon rapidement. Une autre méthode plus douce est de déposer le tissu prélevé sur une feuille d'aluminium déposée sur de la glace sèche. Bien que la congélation du tissu soit plus longue avec cette méthode, elle permet une préservation parfaite de la forme du tissu. Pour certains échantillons, il est important de tenir en compte l'orientation du spécimen.¹¹¹ Par exemple, la direction du flot sanguin doit être notée pour les tissus vasculaires. Après la congélation des tissus, ceux-ci peuvent être entreposés à -80°C puisqu'il a été démontré que l'intégrité des spécimens peut être préservé pour au moins une année, selon le type de tissu.^{27,112}

La deuxième méthode est l'encastrement des tissus frais congelé dans un polymère. Dans ce cas, le tissu prélevé est immergé dans un polymère, tel que l'*optimal cutting temperature* (OCT) ou le Neg-50TM, maintenu à l'état liquide, avant congélation dans un

liquide cryogénique. Par exemple, l'OCT est utilisé pour préserver la qualité et la forme de tissus délicats tels que les tissus mammaires ou les tissus cardiovasculaires pendant la congélation et la découpe des sections. Puisque le tissu est ainsi encastré, il est alors possible de découper des sections très fines ($\leq 5 \mu\text{m}$).¹⁸ Grâce à cet avantage, cette technique est très utilisée en histochimie puisque des sections tissulaires minces sont nécessaires pour obtenir une histologie de haute qualité. Cependant, la majorité des polymères utilisés pour encastrer les tissus sont facilement ionisables en MS.¹¹³ Leur utilisation peut donc causer de l'interférence avec les molécules d'intérêt et peut causer de la suppression ionique lors de l'analyse des molécules de plus faibles poids moléculaires ainsi que dans certaines protéines.^{27,114} Différentes solutions ont été proposées pour remplacer ou améliorer les polymères utilisés pour encastrer les tissus afin de les rendre plus compatibles avec l'imagerie MS.^{115,116} Par exemple, Strohaln *et al.* ont proposé le poly(N-[2-hydroxypropyl]methacrylamide) comme polymère pour encastrer les tissus tout en minimisant l'interférence et la suppression ionique.¹¹³ De plus, l'utilisation du carboxyméthylcellulose a aussi été démontrée comme étant un agent d'encastrement efficace pour l'imagerie MS.^{117,118}

La troisième méthode est la fixation chimique des tissus pour préserver l'intégrité de la structure cellulaire et celle des organelles intactes. La procédure la plus utilisée est la fixation à l'aide de formaline ou paraformaline et l'encastrement des tissus dans la paraffine (*formalin fixed paraffin embedded*, FFPE). Cette approche est de loin la plus couramment utilisée en milieu clinique. L'encastrement dans la paraffine permet une préservation à très long terme, ce qui permet d'entreposer les tissus FFPE pendant plusieurs années à température ambiante.^{119,120} La formaline fixe les tissus en réticulant différentes biomolécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides.¹²¹ Ces réticulations attachent les protéines solubles avec les protéines structurelles insolubles en formant des ponts méthylènes, ce qui les rend immobiles et crée un microréseau stabilisé. Cette stabilisation permet la découpe des sections tissulaires très mince ($\leq 5 \mu\text{m}$) et une visualisation très précise de l'histologie après coloration.

Bien que l'imagerie MS directe des lipides dans les tissus fixés ait été rapportée, le processus de fixation est variable selon leur analyse. Des stratégies ont été développées pour analyser les protéines immobilisées dans les tissus FFPE, par l'intermédiaire d'une digestion

enzymatique directement effectuée sur les sections tissulaires.^{122,123,124,125} Pour éviter les limitations causées par la procédure de fixation FFPE, des agents fixateurs alternatifs qui ne forment pas de microréseaux ont récemment été développés, tel que le FineFIX et le fixateur moléculaire universel, pour préserver le contenu moléculaire des sections.^{126,127} De plus, l'utilisation de la préservation à l'aide d'éthanol et l'encastrement dans la paraffine pour fixer les tissus ont permis de générer des profils et images protéiques de haute qualité .¹²⁸

1.5.2 Découpe des tissus

La découpe de sections tissulaires minces se fait l'aide d'un cryostat. La température du cryostat est normalement réglée entre -12 et -30°C selon le type de tissu. Différentes approches peuvent être utilisées pour ancrer les tissus frais congelés sur la tête de coupe du cryostat en vue de leur découpe.^{27,18} Pour éviter les contaminations polymériques, les tissus sont généralement ancrés sur un support avec une petite goutte d'OCT ou de Neg-50TM. De cette façon, la lame du cryostat ne touche jamais le polymère et évite ainsi toute contamination provenant de celui-ci ne se produit. L'épaisseur des sections est très importante puisqu'elle influence la qualité des signaux MS, surtout pour les analyses à plus haute masse. Les sections d'une épaisseur variante entre 3 et 20 µm sont utilisées. Pour des épaisseurs ≥20 µm, surtout en TOF MS, une perte de conductivité provenant de l'accumulation de charges causée par le processus MALDI peut être observée.^{91,129} Pour la même raison, les sections sont préalablement déposées sur des surfaces conductrices telles que l'or ou des plaques de verre recouvertes d'une couche mince d'indium-étain oxydé (*indium-tin oxide*, ITO). Cette dernière possède l'avantage d'être compatible avec la microscopie optique puisque la surface est transparente.¹³⁰ Les plaques échantillons ou lames sont préalablement refroidies dans la chambre du cryostat. Une fois la section tissulaire placée sur une plaque, le dessous de la plaque est chauffé à l'aide d'un doigt ou d'un objet à la température de la pièce afin de faire fondre la section sur la plaque jusqu'à ce que l'eau macroscopique aie disparue, ce qui prend généralement environ 30 s.

Une fois la coupe effectuée, la stabilité chimique des sections tissulaires est critique afin d'obtenir de bons résultats en imagerie MS.¹³¹ À cause du temps nécessaire pour préparer

les échantillons et effectuer leur analyse (typiquement de quelques heures), l'imagerie MS n'est pas considérée comme étant une méthode à haut débit, à l'exception de l'imagerie MS de micro réseaux de tissus.¹²⁵ Il y a donc une limite au nombre d'échantillons pouvant être analysé en une journée. Donc, il faut prendre en considération les diverses variations expérimentales provenant non seulement de l'échantillon, mais aussi de l'instrumentation. Des recherches ont été effectuées sur la stabilité des protéines pendant l'imagerie MS sur une section.¹⁰⁶ Par exemple, Goodwin *et al.* ont démontré que l'abondance et la position de plusieurs peptides sont grandement modifiées en quelques minutes après la coupe des tissus.¹³² D'autre part, Patterson *et al.* ont étudié la composition lipidique en fonction du temps et des conditions d'entreposage des sections. Ces études ont démontré que la diminution de signal observé est causée par la température, l'humidité et le temps d'entreposage. Des méthodes de préservation des sections ont aussi été proposées.¹³³

1.5.3 Lavages des sections

Le lavage des sections permet d'enlever sélectivement des molécules qui interfèrent avec les analytes d'intérêt tout en préservant leur distribution et la qualité de la section tissulaire. Les lavages ont d'abord été utilisés en imagerie MS des protéines en utilisant des solvants organiques afin d'éliminer les sels physiologiques et la majorité des lipides.^{112,27,134} De plus, les lavages basés sur les solvants organiques aident à stabiliser le contenu protéique des sections pendant quelques jours sans pertes ou variations majeures des qualités spectrales.¹⁸ La procédure de lavage qui permet d'obtenir les meilleurs résultats utilise des lavages successifs de 30 s avec 70% puis 90% d'isopropanol. D'autres solvants organiques, tels que l'acétone, l'hexane, le chloroforme et des mélanges d'alcool, peuvent être aussi utilisés.¹³⁴ Dans une autre approche, van Hove *et al.* ont employé une méthode de lavage en utilisant un papier sans fibre imbibé de solvant. Cette approche est plus douce que les lavages conventionnels par immersion et sont donc mieux adaptés pour le lavage de sections de tissus fragiles pour l'imagerie MS des protéines.¹³⁵

D'autre part, des lavages aqueux ont aussi été développés et peuvent être utilisés pour augmenter sélectivement la détection des protéines tout en maintenant leur intégrité.¹³⁶ Par

exemple, Nicklay *et al.* ont montré que des lavages successifs avec de l'eau augmente la détection des protéines hydrophobiques par imagerie MS, telles que les protéines transmembranaires et les protéines associées aux membranes cellulaires.¹³⁷ De plus, Thomas *et al.* ont développé qu'une combinaison de lavages organiques et aqueux permettant une meilleure sensibilité par rapport aux lavages organiques conventionnels.¹³⁸

Des lavages n'ont pas seulement été développés pour améliorer la détection des protéines. Certains protocoles de lavages qui ont été développés pour l'analyse des petites molécules, incluant les lipides, tout en minimisant le risque de délocalisation et de perte d'analytes.¹³⁹ Par exemple, l'ajustement du pH du tampon utilisé pour le lavage des sections selon la solubilité des composés a permis d'améliorer drastiquement la limite de détection de différents composés pharmaceutiques en enlevant sélectivement les molécules solubles interférentes.³²

1.5.4 Choix et déposition de la matrice

La déposition de la matrice sur la section tissulaire à analyser est l'une des étapes critiques lors de la préparation des échantillons afin obtenir des images ioniques de haute qualité et fidélité. La matrice, les solvants utilisés ainsi que la technique de déposition doivent être considérés avec précaution selon les molécules d'intérêt et la résolution spatiale souhaitée.¹⁹ Historiquement, les premières dépositions de matrices ont été effectuées en trainant une goutte de la solution de matrice sur la section dans un environnement froid. Cette méthode a permis d'avoir un certain succès, mais la délocalisation des protéines était élevée.⁹¹ Des méthodes par pulvérisation pneumatique manuelle ont aussi été développée très tôt.^{117,140} Ces approches ont été remplacées par plusieurs types de pulvérisation de matrice, afin d'obtenir un meilleur contrôle de la déposition tout en limitant la délocalisation des molécules à la surface des sections tissulaires.¹⁴¹ Cependant, avant le dépôt de la matrice, il est nécessaire de faire le choix de la matrice utilisée selon les mêmes critères que pour une préparation MALDI standard.

La qualité des images obtenues peut-être limitée par l'hétérogénéité de la déposition sur l'échantillon et la formation des cristaux.¹⁴² Pour pallier à ces limitations, des recherches

ont été effectuées en imagerie MS par MALDI en utilisant des liquides ioniques comme matrice.^{143,144,145} Cette famille de matrice est obtenue en mélangeant une matrice cationique conventionnelle avec une base et possède certains avantages. Par exemple, la matrice ionique composée de CHCA et d'aniline permet d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit (S/N), une plus grande qualité d'image, une stabilité sous vide ainsi qu'une augmentation du nombre d'espèces détectées.^{146,147}

D'autre part, l'utilisation du sodium dodecyl sulfate et du Triton™ X-100 ont permis d'obtenir une augmentation des signaux de protéines lors de l'analyse directe de sections tissulaires.¹⁴⁸ Cependant, il faut porter une attention particulière au choix et à la concentration de détergent, puisque ceux-ci peuvent causer de la suppression ionique selon le type de tissu.

Il existe 3 méthodes automatisées pour déposer la matrice sur les sections tissulaires. Tout d'abord, la méthode la plus récente est la déposition de matrice sans solvant. Cette méthode est très utilisée pour l'imagerie MS de molécules de faible poids moléculaire, particulièrement les lipides.^{149,150} Il s'agit des systèmes de sublimation qui sont généralement composés d'un condensateur à fond plat dans lequel il est possible de placer les plaques échantillons sur la surface supérieure à l'aide de ruban adhésif double face, tel que montré à la figure 12. Le système comporte aussi une trappe à froid, une pompe à vide et un bain chauffant dans lequel le condensateur est immergé jusqu'au niveau de la matrice. Des systèmes de sublimations plus élaborés ont aussi été proposés.^{151,152} Le processus permet, en quelques minutes d'obtenir d'une couche de matrice mince (quelques micromètres) et homogène sur les sections. L'épaisseur de la matrice peut être contrôlée avec le temps de sublimation, la pression et la température. De plus, une fois les paramètres de sublimation déterminés, ce procédé est très reproductible. Finalement, cette approche permet d'effectuer de l'imagerie MS à haute résolution spatiale ($\leq 5 \mu\text{m}$).¹⁵³

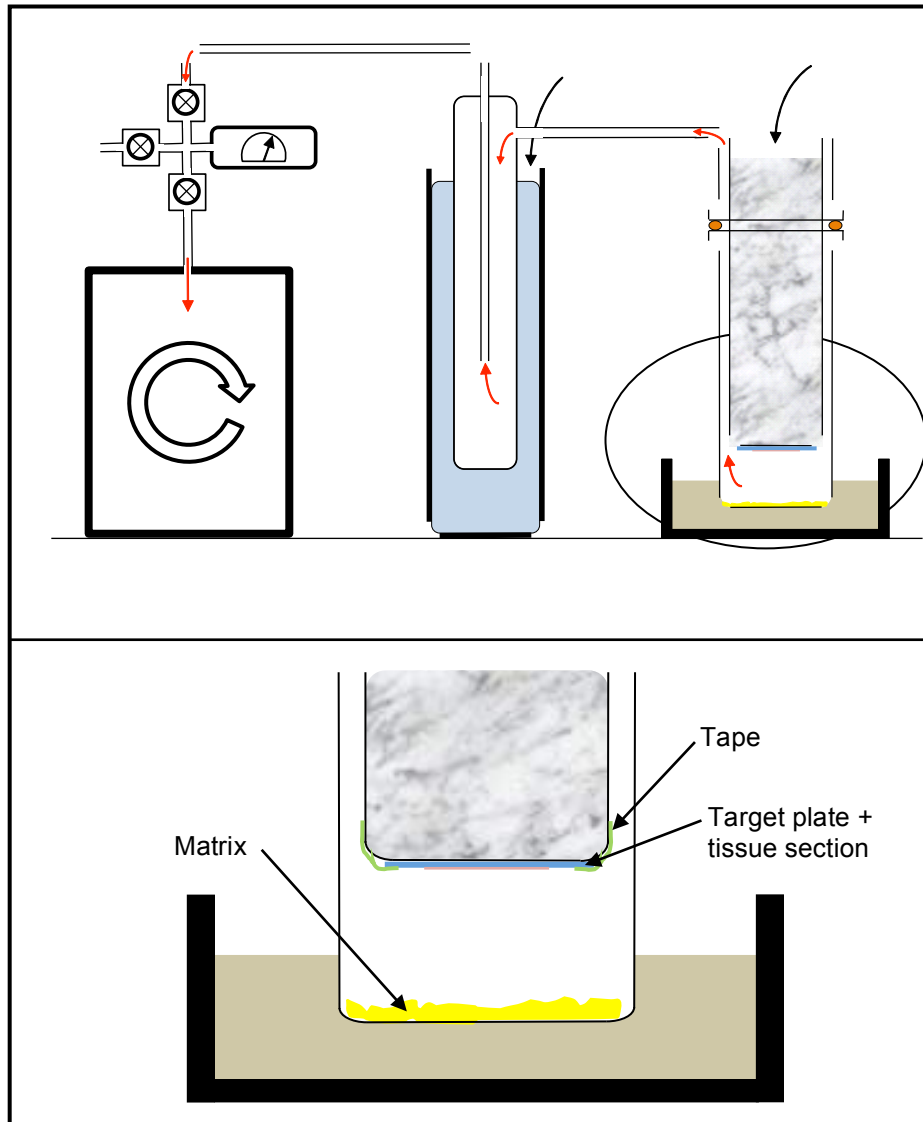


Fig. 12: Schéma d'un montage de sublimation

La deuxième méthode de dépôt automatisé de matrice est la dépôt à par impression chimique. Un robot imprimeur dépose des réseaux picogouttelettes (~ 100 pL par gouttelette) selon les coordonnées bidimensionnelles des sections. Ce type d'appareil permet de générer des points de matrice contenant une haute densité de cristaux en accumulant plusieurs dizaines (50-100) de gouttelettes à chaque coordonnée du système. L'espace entre les points ainsi générés empêche la délocalisation moléculaire. Cependant, dans ce cas la résolution spatiale obtenue en imagerie MS est délimitée par l'espacement entre les dépôts de matrice (typiquement entre 150 et 300 μm). Malgré cette limitation, l'impression chimique

possède tout de même des avantages. Tout d'abord, le ratio S/N ainsi que la sensibilité sont meilleurs que ceux obtenus lors d'une déposition par vaporisation (voir ci-dessous). De plus, les signaux MS obtenus sont très reproductibles et de haute qualité. Donc, l'impression chimique est très utile pour l'analyse d'un grand nombre d'échantillons sur une longue période de temps.²⁶

La dernière méthode de déposition, principalement utilisée lors des travaux de recherches présentés dans ce mémoire, est la déposition de matrice par vaporisation. Pour cette méthode, différents systèmes sont disponibles commercialement tels que l'ImagePrep (Bruker Daltonics) et le TM SprayerTM (HTX Imaging).^{141,154} Ces appareils permettent de vaporiser la matrice en un aérosol très fin. Avec l'ImagePrep, la matrice est vaporisée horizontalement à l'aide de vibrations sur la section. L'échantillon est placé dans une chambre fermée pour contrôler l'humidité et ainsi maintenir l'échantillon sous une atmosphère d'azote. Le cycle typique de l'imagePrep comporte 4 étapes, soit la vaporisation, l'incubation, le séchage et l'attente, tel que montré à la partie A de la figure 13. La quantité de matrice vaporisée est contrôlée à l'aide d'un capteur qui mesure la diffusion de la lumière. Tel que montré à la figure 12B, la lumière diffuse est diminuée lorsque la matrice est vaporisée. Ensuite, lors de l'incubation et du séchage, la diffusion de la lumière va augmenter, puis lorsque la mesure du capteur atteint le point de référence, le cycle recommence. À chaque couche de matrice, la diffusion de la lumière augmente lorsque l'échantillon est sec. La méthode est complétée lorsque la différence entre la diffusion finale de la lumière et sa diffusion initiale atteint la valeur spécifiée par l'utilisateur.¹⁵⁵ Les conditions de déposition sont ainsi optimisées, puis sauvegardés en une méthode, ce qui permet d'obtenir une bonne reproductibilité. Pour l'imagerie MS des protéines, il est possible d'obtenir une résolution spatiale entre 50 et 75 μm en routine selon la taille des cristaux obtenus, mais exceptionnellement il est possible d'effectuer de l'imagerie MS avec une résolution spatiale de 20 μm .¹⁵⁴

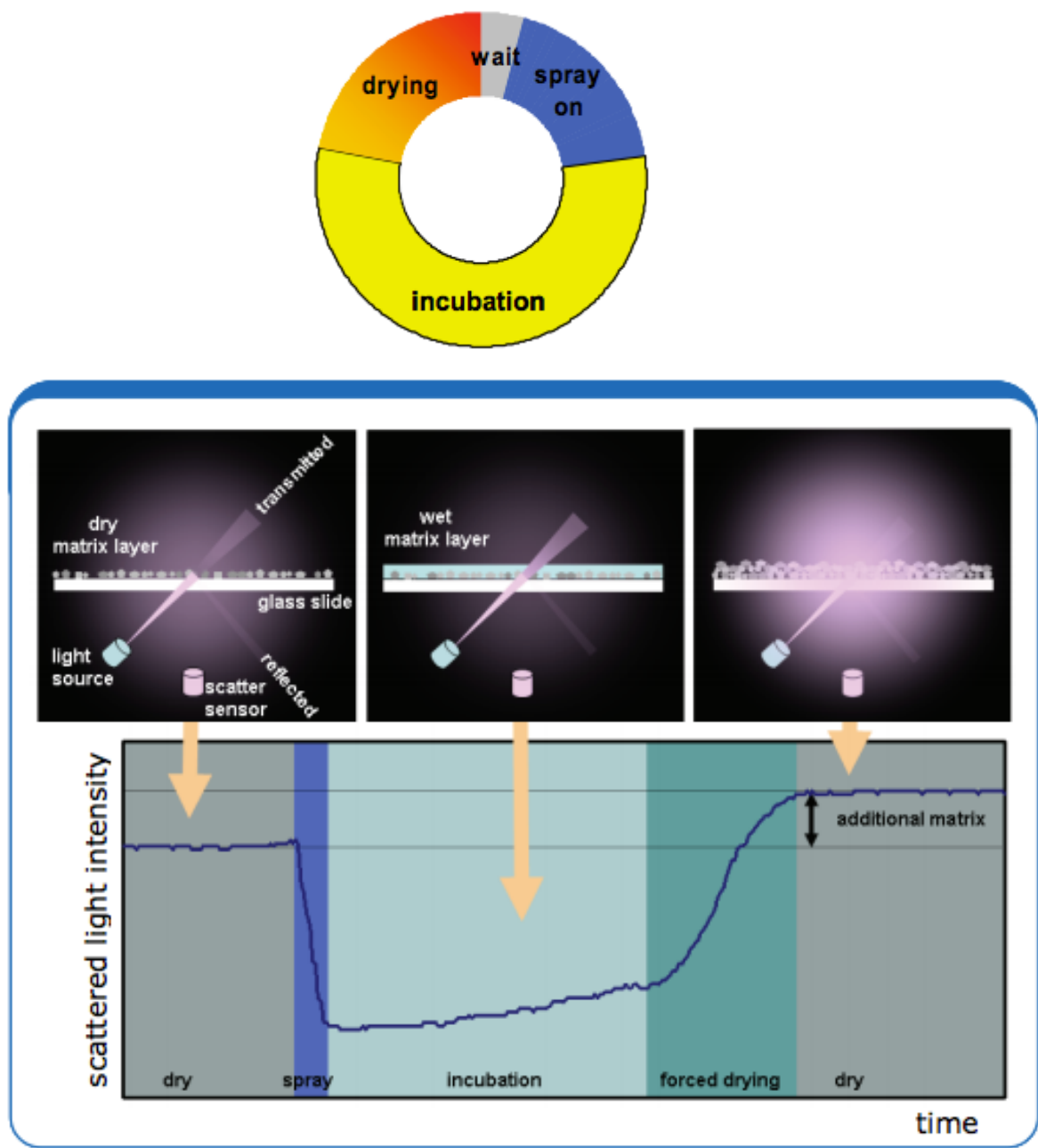


Fig. 13: Schéma d'un cycle de déposition par ImagePrep (A) et graphique de la variation de la diffusion de la lumière à l'intérieur d'un cycle (B).¹⁵⁵

1.5.5 Acquisition et traitement des données

Une fois la déposition de matrice effectuée, il faut préparer la séquence d'imagerie, c'est-à-dire le processus automatisé qui va permettre l'acquisition des données point par point sur l'intégralité de la surface en deux dimensions de l'échantillon tissulaire ou bien sur une portion de surface prédéterminée. Tout d'abord, il est nécessaire d'obtenir une image optique de la plaque contenant la section tissulaire à analyser, par exemple en la numérisant afin de pouvoir lier cette image avec le système de coordonnées du spectromètre lorsque la plaque est insérée dans la source MALDI. À l'aide d'un logiciel tel que FlexImaging, trois coordonnées de l'image de la plaque sont reliées avec le système de coordonnées du spectromètre afin de faire un alignement précis. Une fois l'alignement fait, la résolution spatiale et la région tissulaire à analyser par imagerie MS sont sélectionnées par l'utilisateur.

Dans la région choisie, des mesures sont prises de façon ponctuelle dans un système de coordonnées cartésien. Chaque point analysé dans le système représente un pixel dans l'image obtenue. Après la prise des mesures, les résultats sont représentés selon l'intensité du signal obtenu en fonction des coordonnées. Cette représentation peut être visualisée avec différents systèmes de couleurs. Donc, les résultats obtenus lors d'une analyse par imagerie MS présente les informations obtenues en 4 dimensions, c'est-à-dire deux dimensions selon le système de coordonnées pour la position analysée et, à chaque pixel, un spectre de masse bidimensionnel représentant l'intensité en fonction du ratio m/z . Avec ce système, il est donc possible de construire une image pour chaque m/z et ainsi déterminer l'intensité relative de ce m/z pour chaque pixel analysé.

Les data obtenus par imagerie MS peuvent être considérés comme étant une collection de spectres qui ont été mesurés de façon indépendante. Donc, il est généralement nécessaire d'effectuer une normalisation des spectres, plus particulièrement pour les protéines. La normalisation est un procédé mathématique lors duquel il y a la multiplication d'un spectre de masse selon une échelle d'intensité pour étendre ou réduire la gamme d'intensités. Elle est donc utilisée pour projeter des spectres d'intensités différentes dans une échelle d'intensité commune. En imagerie MS, la normalisation est utilisée afin d'éliminer les artefacts systématiques qui affectent l'intensité des spectres de masse. Ces artefacts peuvent être le résultat de la non-uniformité des cristaux.¹⁵⁶

La normalisation par le courant total d'ions (TIC) est l'une des méthodes de normalisation les plus utilisées. Tous les spectres de masse sont divisés par leur TIC. Donc, tous les spectres dans un jeu de données auront la même intégration d'aire sous la courbe. Ce concept est basé sur la présomption qu'il y a un nombre comparable de signaux dans chaque spectre. Cependant, dans les échantillons hétérogènes tels que les sections tissulaires comportant différentes histologies, la normalisation peut augmenter l'expression de certaines molécules dans une ou plusieurs histologies.¹⁵⁶ D'autres méthodes de normalisation sont aussi utilisées.¹⁵⁷ Par exemple, il y a la normalisation par la médiane, c'est-à-dire que les spectres sont normalisés selon la médiane de l'intensité des signaux dans le spectre.

Tel que mentionné précédemment, il est possible de construire une image pour chaque m/z analysé. Ces images peuvent ensuite être corrélées avec l'histologie du tissu. Il est possible de comparer la section imagée avec une section sérielle colorée.¹⁵⁸ Cependant, cette méthode comporte quelques problèmes tels que la différence en morphologie ou les différences causées lors de la préparation de l'échantillon. Ceci peut rendre difficile la corrélation des composés d'intérêt en l'image MALDI et l'histologie. L'autre approche utilise la coloration sur la même section que celle analysée, c'est-à-dire qu'après l'analyse par imagerie MS, la matrice est enlevée avec précaution, puis les sections sont colorées avec les procédures standards. Cependant, cela signifie que l'analyse par imagerie MS doit être effectuée sur une plaque transparente et conductrice (nécessaire pour les analyses faites par TOF MS), telle que les lames de verre recouverte d'ITO.¹³⁰

1.6 Objectifs de recherche

Les travaux de recherches présentés dans ce mémoire portent sur le développement d'une méthode de transfert des protéines à partir de sections tissulaires minces vers une surface composée de nitrocellulose tout en préservant l'intégrité de la distribution spatiale. Ce développement est la clé de voute de toute expérience de capture spécifique de protéines sur des surfaces qui seront par la suite fonctionnalisées.

Afin d'accomplir ces objectifs, 3 différentes étapes ont été effectuées. Tout d'abord, des recherches dans la littérature scientifique permis d'identifier des différentes approches permettant le transfert des protéines à partir de blocs tissulaires vers des surfaces

fonctionnalisées afin de les analyser par spectrométrie de masse. La littérature sur les approches bien établies (et commercialisées) qui permettent de transférer les protéines séparées par gel d'électrophorèse vers des surfaces organiques telles que la nitrocellulose ou le difluoro-polyvinylidène a aussi été consultée.

Ensuite, les différents paramètres impliqués dans le transfert des protéines à partir d'une section tissulaire mince vers une surface fonctionnalisée sans perte de l'information spatiale ont été optimisés afin d'obtenir une méthode reproductible et sensible. Les principaux paramètres qui ont été considérés dans ce travail sont : la composition chimique de la surface fonctionnalisée, la composition de la plaque échantillon sur laquelle la surface fonctionnalisée est produite, la méthode de préparation de la surface, la concentration du matériel de départ, le tampon de transfert, la température de transfert, le temps de transfert, l'épaisseur de la section tissulaire de départ, et finalement la nature du matériel sur laquelle la section est initialement déposée avant le transfert.

Finalement, la méthode développée a été utilisée pour étudier la distribution des protéines dans différents échantillons tissulaires de souris (foie, rein). Des analyses comparatives par IMS des protéines de sections tissulaires sérielles après transfert sur des surfaces fonctionnalisées ont permis de déterminer la spécificité des surfaces pour certaines des protéines et ainsi vérifier la rétention de l'information spatiale. La reproductibilité de la méthode a aussi pu être vérifiée.

Chapitre 2 : Augmentation de la spécificité en imagerie par spectrométrie de masse : Transfert de haute fidélité spatiale de protéines présentes dans des sections tissulaires vers des surface fonctionnalisées

Ce chapitre présente le développement d'une méthode de transfert régiospécifique des protéines provenant de sections tissulaires minces vers une surface fonctionnalisée. J'ai effectué la totalité des travaux de recherches à l'exception de la mesure de l'épaisseur de la surface de nitrocellulose qui a été effectuée par Maxime Couture du groupe du professeur Jean-François Masson. Pour la rédaction de l'article, j'ai participé en écrivant la section *Methods*, la section de présentation des résultats et à la rédaction de l'introduction et de la discussion. Les figures supplémentaires de l'article sont présentées à l'Annexe 1.

Increasing specificity in imaging mass spectrometry: High spatial fidelity transfer of proteins from tissue sections to functionalized surfaces

Erik Fournaise and Pierre Chaurand

Department of Chemistry, Université de Montréal, Montreal QC, Canada.

Accepted in: Analytical and Bioanalytical Chemistry on October 24, 2014

DOI: 10.1007/s00216-014-8300-z

KEYWORDS

Imaging mass spectrometry, MALDI, Proteins, Nitrocellulose, Transfer.

2.1 Abstract

Imaging mass spectrometry (IMS) is a technique in full expansion used in many clinical and biological applications. A common limitation of the technology, particularly true for protein analysis, is that only the most abundant and/or more easily ionizable molecules are typically detected. One approach to overcome this limitation is to transfer proteins contained within tissues sections onto functionalized surfaces with a high spatial fidelity for IMS analysis. In this case, only proteins with an affinity for the surface will be retained whereas others will be removed. The chemical nature of the surface is therefore critical. The research work presented herein proposes a high spatial fidelity transfer method for proteins from thin tissue sections onto a nitrocellulose surface. The method employs a home-built apparatus that allows the transfer process to be performed without any direct physical contact between the section and the transfer surface while maintaining physical pressure between the surfaces to help protein migration. The performance of this system was demonstrated using mouse liver and kidney sections. Serials sections were also collected either to be stained with hematoxylin and eosin (H&E) to assess the spatial fidelity of the transfer process or to be directly analyzed as a control sample to differentiate the signals detected after transfer. IMS results showed a high spatial fidelity transfer of a subset of proteins. Some of the detected transferred proteins were poorly observed or not observed with conventional direct tissue analysis, demonstrating an increase in detection sensitivity and specificity with the newly developed method.

2.2 Introduction

Imaging mass spectrometry (IMS) is an elegant approach to evaluate the chemical composition and its spatial organization in thin tissue sections^{110, 159}. In particular, matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) IMS allows one to profile and map a wide range of biomolecules including metabolites, lipids, peptides and proteins¹⁶⁰. Applications of the IMS technology are diverse including tissue or organ development¹⁶¹, the study of disease onset and progression¹⁶² and the monitoring of drug delivery to tissue and its local effects¹⁶³.

MALDI IMS involves the sampling and freezing of a tissue sample or biopsy, the sectioning of thin tissue sections slices subsequently mounted on a flat (conductive) target plate or slide and the homogeneous deposition of the MALDI matrix. The section is then introduced in the MS system for automated data acquisition. With variations in sample preparation, some specificity can be introduced in IMS mainly by targeting subclasses of biocompounds through matrix selection. The use of different matrices prepared in various solvent systems is one such critical sample preparation variation¹⁶⁰. For example, the use of sinapinic acid (SA) as matrix applied with a wet interface to tissue sections is the approach of choice to visualize proteins¹⁶⁴, whereas the use of 1,5-diaminonaphtalene as matrix deposited on the sections by sublimation will primarily allow the detection of different classes of phospholipids with both positive and negative ionization¹⁶⁵. We have recently developed a silver-assisted laser desorption ionization approach that allows the privileged detection and imaging of cholesterol and fatty acids from tissue sections¹⁶⁶.

Depending on the tissue type investigated, MALDI time-of-flight (TOF) IMS of intact proteins can routinely detect and image the spatial organization of 150-300 distinct MS peaks. In some cases, 500 peaks or more can be observed¹⁶⁷. Further, due to instrumentation limitations¹⁶⁸, the bulk of these signals are observed in the 2000 - 30,000 m/z range. Essentially lower molecular weight (MW), soluble and relatively abundant proteins are primarily observed. Although significant information can be derived from these, only a small fraction of the expressed proteome is detected. The biggest drawback of such a global approach is that very little compound specificity is introduced. Currently, there does not exist a means of analyzing a specific protein(s) of interest.

One approach to introduce a greater degree of molecular specificity in IMS is to combine immunohistochemistry with mass spectrometry¹⁶⁹. In this case, primary antibodies

recognizing the proteins of interests are coupled to different low MW reporter mass tags via a photocleavable linker. The release of the mass tags is induced by the laser light in the source of the mass spectrometer during the IMS process and the mass tags behave as reporter ions for their corresponding proteins. An alternative of this approach has been used to image the distribution of the serine hydrolase enzyme super family within tissue sections using a high affinity molecular probe for the enzymes active sites coupled to a photocleavable low MW reporter ion ¹⁷⁰.

An alternative strategy to increase specificity in IMS is to transfer proteins from a tissue section to an affinity surface in a regiospecific manner. Only proteins with an affinity for the surface chemistry will be selectively retained. The chemical nature of the surface is therefore critical. In the first article on MALDI IMS, Caprioli *et al.* reported the regiospecific transfer of peptides from fresh rat pituitary on a C18 coated surface ¹⁷¹. In subsequent work, Chaurand *et al.* transferred proteins from fresh tissues to a carbon embedded polyethylene membrane in a regiospecific manner ¹⁷². After transfer, the polyethylene membrane was rinsed and only proteins with affinity for the medium were retained and observed. In a similar approach, Bouamrani *et al.* thaw-mounted tissue section on different SELDI surfaces and observed significant variations in protein signal expression as a function of surface chemistry ¹⁷³.

The different chemistries one can create on surfaces are extensive. The degree of surface specificity can vary from very generic targeting, i.e. hydrophilic or hydrophobic proteins, or very specific using for example antibody functionalized surfaces. The first step of the process is to transfer proteins from thin tissue sections onto functionalized surfaces with high spatial fidelity. Retained proteins can then be analyzed by MALDI-IMS. In the present study, we developed a method for the regiospecific transfer and IMS of proteins from thinly cut tissue sections from fresh frozen tissue blocks onto a nitrocellulose surface while maintaining high spatial fidelity. IMS results acquired from the nitrocellulose surface were compared to those directly acquired from serial tissue sections.

2.3 Methods

2.3.1 Chemicals and Reagents

Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), ammonium formate, Triton X-100 detergent (Triton), trifluoroacetic acid (TFA), 2,5-Dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB), α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA), 1,5-diaminonaphthalene (1,5-DAN) and sinapinic acid (SA) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, U.S.A.).

2.3.2 Tissue Sampling and Sectioning

Mice (15 days old) were euthanized by CO₂ asphyxiation. After sacrifice, dissected livers and kidneys were flash-frozen by slow immersion in liquid nitrogen to avoid shattering. All animal studies were approved by the local Ethical Committee of the University of Montreal. For the transfer experiment, all tissues were sectioned at 20 μ m thickness using a Leica CM3050 cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and thaw-mounted onto aluminum foil (Handi-foil). Kidney sections were cut in the sagittal plane. Sections were serially washed with 70% and 90% isopropanol for 30 s respectively then dried in a desiccator prior to the transfer process. Conjointly, 12 μ m thick serial sections were collected and washed as mentioned above for direct IMS analyses, or stained with hematoxylin and eosin (H&E) using standard protocols to assess the histological accuracy of the ion images.

2.3.3 Nitrocellulose Surface Preparation

A 99% pure nitrocellulose membrane (Thermo Scientific) was dissolved in MeOH at a concentration of 20 mg/ml. Extreme caution should be used when handling this solution as it is highly flammable and potentially explosive. The surface itself was prepared using a home-built spin coating system. One ml of the nitrocellulose solution was deposited on an indium–tin oxide-coated (ITO) glass slides (Delta Technologies, Stillwater, MN). The spin coater was started at 300 rpm for 15 s, accelerated at 1000 rpm for 75 s and then stopped.

2.3.4 Atomic Force Microscopy (AFM)

Nitrocellulose surface thickness measurements were performed using an Atomic Force Microscope in contact mode (Alpha 300A, WITec Instruments Corp. Knoxville, TN). A small line was cut in the nitrocellulose surface using a razor blade. The AFM tip was then centered

on the line and a $75 \times 75 \mu\text{m}^2$ area was scanned to access the average height difference between the glass slide and the top of the surface.

2.3.5 Transfer Process and Matrix Coating

The transfer is done by using a home-built sandwich setup containing, from bottom to top: a stainless steel plate, a nitrocellulose coated ITO slide with the functionalized surface facing up, a nylon filter with $45 \mu\text{m}$ pores (Maine Manufacturing) imbibed with a 150 mM ammonium formate buffer (pH: 6.45), an aluminum foil with the tissue sections facing down and another stainless steel plate (Suppl. figure 1). Pressure was then applied for 1 h at 4°C

Deposition of matrix for profiling analyses was performed by manually spotting 3 times, in several locations, $0.5 \mu\text{L}$ of a 10 mg/mL SA in H_2O –ACN (6:4 v/v) solution either on the blotted areas or on the tissue sections. For IMS measurements, deposition of the same matrix solution was performed using the Bruker Daltonics ImagePrep™ system using a custom method to ensure matrix homogeneity and IMS measurement reproducibility across blotted areas and tissue sections.

2.3.6 MALDI Mass Spectrometry

Profiling and IMS of proteins from transfers and tissue sections were performed on a MALDI TOF/ TOF Ultraflex extreme mass spectrometer equipped with SmartBeam II Nd:YAG/355 nm laser operating at 0.5 kHz with a laser focus on target of $75 \mu\text{m}$ in diameter using the ‘large’ setting (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Profiling and IMS data acquisitions were performed in linear geometry under optimized delayed extraction conditions with a source accelerating voltage of +25 kV, in a mass range from 2 to 22 kDa. The laser fluence was set to obtain the best signal to noise (S/N) ratio, while keeping maximum signal resolution. These settings also provided optimal reproducibility across analyses.

2.4 Results and Discussion

2.4.1 Protein Transfer Method Optimization

The developed method is based roughly on the semi-dry transfer of proteins from 1 or 2 dimensional polyacrylamide gels to various membranes. One of the commonly used

membranes is nitrocellulose which is known to be an efficient protein capture membrane that is insensitive to salts, small molecules and RNA¹⁷⁴. Nitrocellulose is also readily available, soluble in most common organic solvents such as methanol and acetone and can be used to form hydrophobic surfaces¹⁷⁵. For these reasons, nitrocellulose was chosen to make thin surfaces for the capture of proteins from tissue sections.

Seven different parameters were optimized and tested in triplicate to obtain the best transferred protein signal intensity and retain spatial fidelity and reproducibility. The first parameter optimized was the nitrocellulose concentration. Initial nitrocellulose concentration significantly influences membrane thickness, which needs to be thick enough to efficiently capture proteins while retaining some conductivity to allow MALDI-TOF MS measurements. Another consideration is membrane uniformity to ensure that a homogenous transfer is achieved. 10, 20 and 30 mg/ml solutions of nitrocellulose were initially tested. Surfaces prepared with the 10 mg/ml solution were not uniform enough to be used in the transfer process. The generated membranes were too thin causing a low protein transfer rate. Surfaces prepared with the 30 mg/ml solution had an adequate thickness but were not uniform, forming many hotspots. Surfaces prepared with the 20 mg/ml solution proved to be the best since the membrane was thick enough to capture proteins, and uniform in a central area of $\sim 2 \text{ cm}^2$, sufficient to accommodate the dimensions of most tissue sections. However, there remains a concentration gradient near the outline of the membrane.

Two membrane preparation approaches were initially considered. To achieve ideal protein transfer conditions, the most important factors membrane thickness and homogeneity. The first procedure consists of simply depositing 50 μL of the nitrocellulose solution on the slide, which is then spread with a pipet tip. The pipette tip was maintained at grazing angle to provide better spreading. In some cases, resulting surfaces showed a uniform white nitrocellulose membrane the size of the spreading but always with a thicker border. Transfer results showed some inconsistency caused by the thickness variations of the resulting capture surface which proved difficult to control. The second procedure consists of spin-coating 1 ml of the nitrocellulose solution for 90 s or until dry as described in the Methods section. The resulting surface consists of a white translucent membrane covering the whole slide instead of only the center region. With this deposition approach, reproducible transfers were achieved. It is also noteworthy that the presence of the surface causes a slight increase in resistance on the

slide. To characterize the properties of the formed surface, surface resistivity and thickness were measured. On conventional ITO-coated glass slides, a surface resistivity of ~200 ohms was measured, whereas on the nitrocellulose surface, a surface resistivity of ~250 ohms was measured. The surface resistivity is therefore compatible with MALDI-TOF MS analyses even with laser repetition rates in the kilohertz range. The surface thickness was determined to be of a few micrometers by atomic force microscopy.

The temperature at which the transfer is performed was also investigated. 4 different temperatures (-20°C, 4°C, 25°C and 40°C) were initially tested using 10 minutes transfers and a mixture of 9:1 H₂O:ACN as the transfer solvent. The -20°C transfers showed membrane degradation and therefore not investigated further. The 25°C and 40°C transfer results showed transferred protein signals and no membrane degradation, but the transfer solvent evaporated during the transfer, generating inconsistent results. The 4°C transfers showed less signals than the 25°C and 40°C due to a slower transfer process, but also limited solvent evaporation and a good reproducibility. For these reasons, 4°C was chosen as the transfer temperature and time was increased to compensate the slower transfer process.

Transfer time was then optimized to maximize the yield of transferred proteins while minimizing protein degradation. 10, 25, 40, 60 and 90 min time points were tested. As shown in Suppl. figure 2, there is a steady increase in transferred protein signals from 10 min to 60 min. After 60 min, transfers results showed no significant increase in signal. Therefore, a 60 min transfer time was chosen.

The composition of the transfer solvent was also optimized considering global signal intensity and the overall number of protein peaks detected after transfer. The tested transfer solvents were a mix of 9:1 H₂O:ACN, distilled water, and 150 mM ammonium phosphate and 150 mM ammonium formate buffers. Measurements obtained after transfer using the ammonium phosphate buffer yielded no results. As shown in Suppl. figure 3, the removal of the organic solvents in the buffer provided a better sensitivity for all signal detected. The analysis of the transferred proteins when using the ammonium formate buffer as transfer solvent showed a significant increase in the number of signals detected. The ammonium formate buffer was therefore used as transfer solvent.

Three different types of target slides (Stainless steel, gold-plated stainless steel and ITO coated glass) were tested and compared. As shown in Suppl. figure 4, the results obtained

after transfer when using the different stainless steel slides were very similar to the ones obtained from the ITO coated slides. ITO coated glass slides were ultimately used because they facilitate outlining the transfer area for subsequent IMS analysis of the slide prior to fully disassembling the sandwich setup.

Finally, different tissue section thicknesses between 10 and 40 μm , were tested. As shown in Suppl. figure 5, results showed a major increase in signal intensity (total ion counts) when performing the transfer process using 20 μm thick liver tissue sections.

2.4.2 Profiling and Imaging Mass Spectrometry of Transferred Proteins

MALDI-TOF MS profiling of transferred proteins from mouse kidney and liver tissue sections onto nitrocellulose membranes following the protocol described above produced mass spectra containing numerous signals in a mass range below 20 kDa. These results show that a subset of proteins is indeed successfully transferred from the tissue sections onto the nitrocellulose surface. After protein transfer, when comparing protein profiles acquired from serial kidney tissue sections to those recovered from corresponding coordinates onto the nitrocellulose surface, major increases in sensitivity for peaks such as m/z 7005, 8455, 9914 and 12376 were observed (figure 14). Further, other signals such as m/z 8740, 8907, 11834 and 16875 were uniquely observed on the nitrocellulose surface (figure 13).

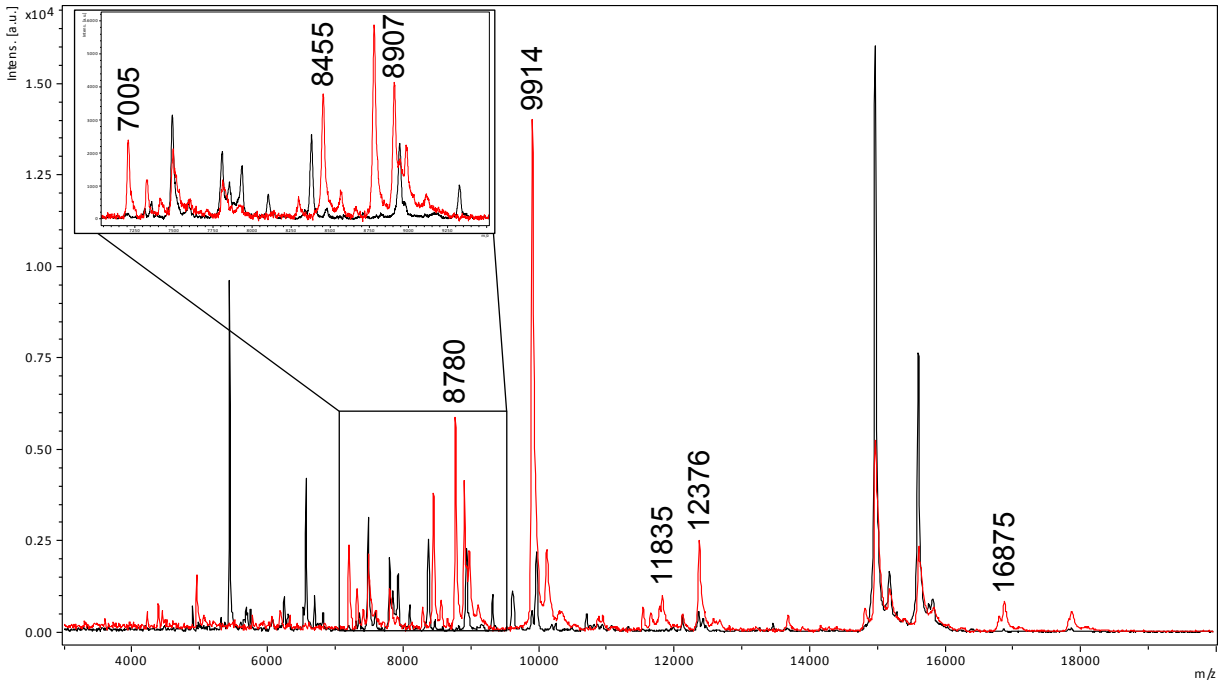


Fig. 14: MALDI-TOF MS spectra comparing kidney protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (red) to those directly acquired from a serial section (black).

Similar results were obtained when analyzing liver tissues (figure 14). Most of the signals detected on the nitrocellulose surface after protein transfer step were also detected after direct analysis of serial tissue sections. After transfer, some signals such as m/z 7149, 7208 and 9913 and 14125 showed an increase in intensity while other proteins (for example m/z 3993, 4395 and 8431) were uniquely detected (figure 14).

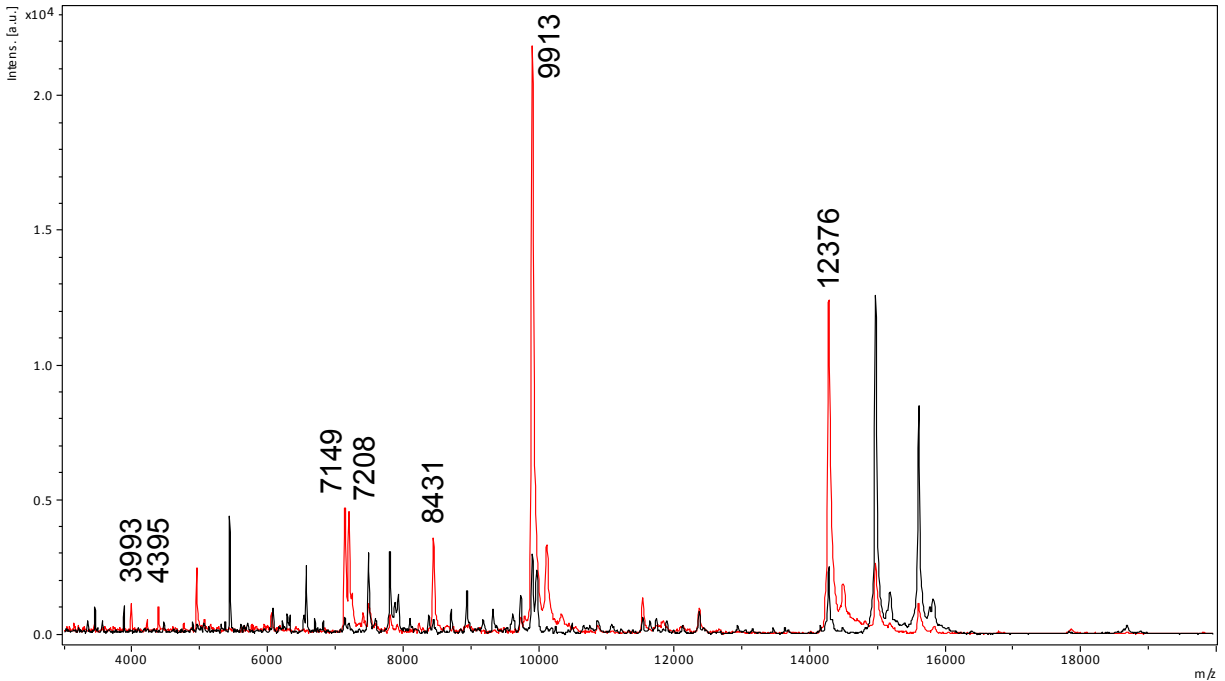


Fig. 15: MALDI-TOF MS spectra comparing liver protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (red) to those directly acquired from a serial section (black).

IMS experiments were performed to assess the spatial fidelity of the transfer process on the nitrocellulose membrane. The developed protein transfer method was systematically compared to conventional IMS measurements performed on serial tissue sections. In this case, we performed all experiments with kidney as a model tissue because it presents several clearly distinct histologies¹⁷⁶. As seen in MALDI-TOF MS profiling analyses, MALDI IMS results showed a subset of signals that were shared between the transferred proteins and the serial tissue section (figure 15). For example, the signals at m/z 2824, 8867 and 9087 were observed to localize in the cortex region whereas m/z 7174, 8941 and 14952 were observed to localize in the medulla region. From these results, no major differences in the localization of the compared signals were observed demonstrating that transferred proteins on nitrocellulose retained their spatial localization.

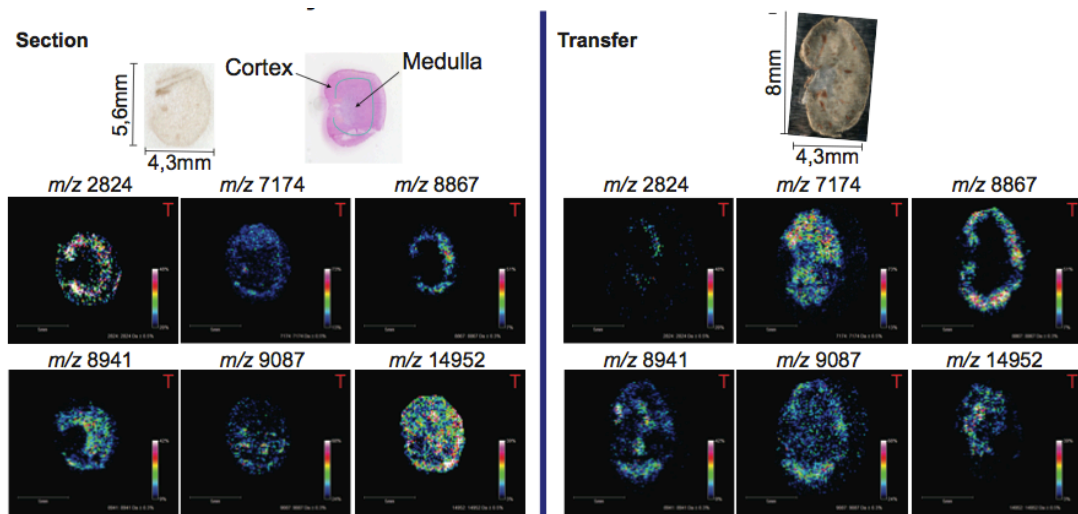


Fig. 16: MALDI IMS results comparing common kidney protein signals after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface (Transfer) to those directly acquired from a serial section (Section). A photomicrograph of the tissue section used for protein transfer onto nitrocellulose as well as photomicrographs of a serial section after matrix deposition and matching histology are also shown.

In this same analysis, several signals were uniquely detected on the nitrocellulose surface after the transfer process (Figure 16). For example, the signals at m/z 3741, 4370 and 8741 were localized in the cortex region whereas the signals at m/z 7309, 8415 and 8520 were predominant in the medulla.

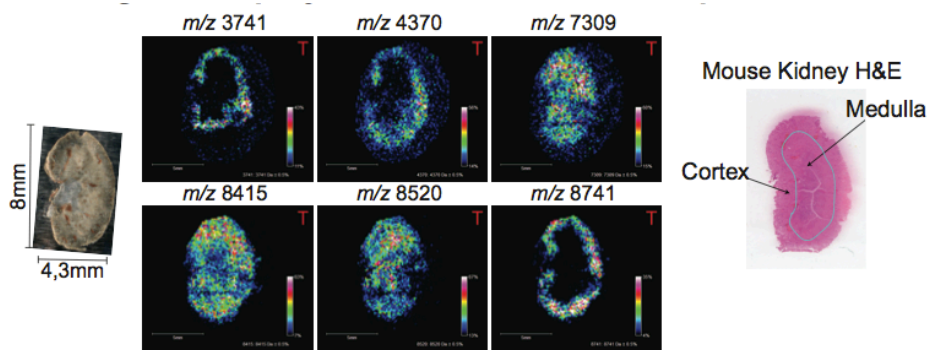


Fig. 17: MALDI IMS results for kidney protein signals uniquely observed after transfer from a tissue section onto a nitrocellulose surface. Photomicrographs of the tissue section used for protein transfer onto nitrocellulose as well as matching histology are also shown.

To assess reproducibility of the protein transfer method from tissue sections onto nitrocellulose membranes, three technical replicates were performed. Sample preparation including nitrocellulose surface generation, tissue sectioning and protein transfer followed by IMS analyses were performed on three different days. Overall, the results were found to be very reproducible. Figure 17 shows the localization of two signals (m/z 8867 and 8941) in the cortex region in each of the three tissue sections.

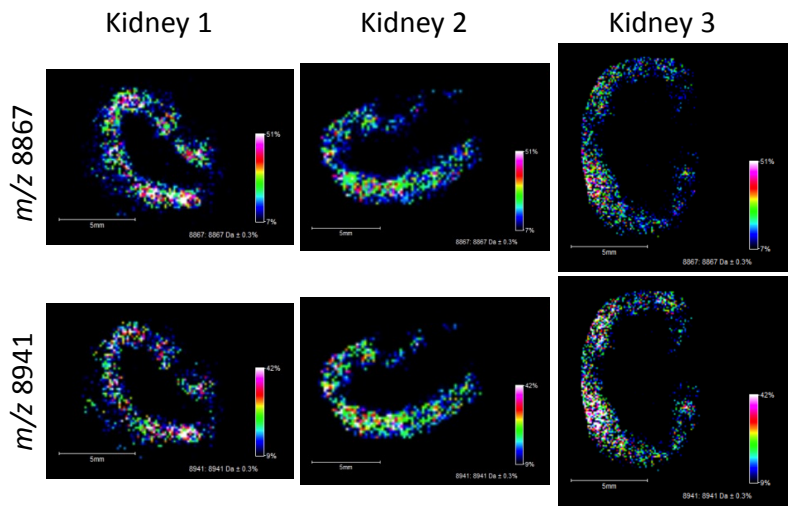


Fig. 18: MALDI IMS results obtained after protein transfer onto nitrocellulose surfaces from thin sections cut from three different kidneys. These two protein signals presented were uniquely observed in the kidney cortex region. Scale bar: 5 mm.

2.5 Conclusions and perspectives

We have proposed here a passive diffusion method that allows transfer of proteins from thinly cut tissue sections from fresh frozen blocks onto micron-thin nitrocellulose capture membranes while retaining high spatial fidelity. When analyzing the nitrocellulose membrane after the transfer process by MALDI IMS, we have found that only a subset of proteins detected after a direct MALDI MS analysis of the tissue sections were observed. Further, some protein signals detected by direct IMS analysis were more readily detected after transfer. Interestingly, a subset of proteins was uniquely observed after transfer potentially indicating their preferential affinity for the nitrocellulose membrane.

The affinity of subsets of proteins for different surfaces may be explored to detect and image by mass spectrometry specific or targeted proteins species not typically seen by IMS, bringing a greater level of specificity to the technology. This requires previous knowledge of the identity and main physical-chemistry properties of the targeted proteins. With this information, the design of generic surfaces with distinct properties is possible. Such an approach has been widely used in surface enhanced laser desorption ionization (SELDI) mass spectrometry to retain subsets of proteins from complex mixture based on properties such as hydrophobicity or ionic strength¹⁷⁷.

The design of different surface chemistries is potentially endless. An immediate possibility is to test other polymeric surfaces such as polyvinylidene fluoride (PVDF) also classically used to transfer proteins from electrophoretic gels^{175, 178}. Numerous other (conductive) polymeric surfaces can also be considered. Second, the physico-chemical properties of nitrocellulose (or PVDF) membranes can be controlled by adding to these various compounds such as ionic liquids. Another possible development would be to incorporate the MADLI matrix in the transfer surface. This would avoid the matrix deposition step that can lead to signal delocalization, and would further improve reproducibility of the transfer method.

2.6 Acknowledgments

The authors would like to thank Maxime Couture and Jean-Francois Masson (Department of Chemistry, University of Montreal) for their help with the AFM measurements, as well as Jean-Francois Myre and Louis Beaumont (Department of Chemistry, University of Montreal) for their help and useful insights in the design and building of the transfer and spin-coater apparatus. The authors also acknowledge financial support from the Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada, and the Canadian Foundation for Innovation.

Chapitre 3 : Conclusions

En conclusion, l'imagerie MS est une technique pouvant être utilisée dans beaucoup d'applications, bien qu'elle favorise la détection des protéines les plus facilement ionisables et/ou les plus abondantes. Pour pallier à ce problème, le transfert du protéome contenu dans des sections tissulaires minces vers une surface fonctionnalisée, ici la nitrocellulose, a été exploré. Les surfaces de nitrocellulose ont été choisies pour leur capacité d'adsorber les protéines.

Ces travaux de recherche ont permis de développer un protocole permettant de transférer les protéines provenant de sections tissulaires minces de foie et du rein de souris et ce de façon régiospécifique. Les résultats obtenus en profilage MALDI MS ont démontré que les signaux obtenus lors de l'analyse des protéines transférées sur une surface de nitrocellulose peuvent être différents de ceux obtenus lors de l'analyse directe d'une section sérielle. La sensibilité obtenue pour certains signaux était nettement différente entre les deux analyses. Cependant, l'avantage le plus important est la présence de signaux uniques obtenus lors de l'analyse des surfaces. Les protéines correspondantes ont probablement une forte affinité pour la surface de nitrocellulose. En bref, les résultats démontrent qu'il est possible de former des surfaces de nitrocellulose mince sur lesquelles il est possible de transférer un sous-ensemble de protéines. D'autre part, les analyses effectuées en imagerie MS sur les surfaces après transfert des protéines provenant de sections de rein de souris ont permis de démontrer que le transfert est régiospécifique et reproductible.

3.1 Perspectives de recherche

Les travaux de recherches effectués ont permis de développer une méthode de transfert rapide, reproductible et facile à mettre en œuvre. Les futurs travaux du groupe de recherche porteront sur le développement de diverses chimies de surface pour la capture de protéines ayant différentes propriétés physico-chimiques. La première possibilité est de modifier chimiquement la surface de nitrocellulose afin d'y incorporer un ou plusieurs liquides ioniques. Cela permettra de changer les propriétés physico-chimiques de la surface de manière très contrôlée. Cette famille de composés possède l'avantage d'être insensible au pH de la

section tissulaire qui peut affecter le caractère ionique des peptides et protéines. Nos collaborateurs ont récemment développés des méthodes de synthèse qui permettent de produire des sels d'imidazolium et ils travaillent sur la synthèse d'une bibliothèque de liquides ioniques à 1 ou 2 cations.¹⁷⁹ Il est aussi possible de générer d'autres surfaces génériques à base de polymères avec des composés tels que le polyfluorure de vinylidène (PVDF) et le poly-éthylène glycol. Finalement, une autre possibilité de modification de surface est l'utilisation de peptides synthétiques de longueur de chaîne variable. Dans ce cas, la surface de nitrocellulose serait remplacée par des peptides fixés sur une surface d'or. Il serait alors possible de contrôler la densité de surface des chaînes peptidiques, ainsi que leur orientation en appliquant un potentiel lors de la déposition des peptides.

D'autre part, un des objectifs à moyen terme est d'incorporer la matrice MALDI, soit l'acide sinapinique, directement dans la surface de polymère, ce qui permettrait d'éviter à ajouter la matrice ultérieurement au transfert. Cet ajout permettrait de minimiser la délocalisation qui dans certains cas peut être causée par le dépôt de matrice. De plus, l'incorporation de la matrice ouvrirait la possibilité d'effectuer de l'imagerie MS à haute résolution spatiale ($\leq \sim 20 \mu\text{m}$), car dans ce cas il serait possible de former des co-cristaux de matrice de très faibles dimensions de quelques micromètres.

Bibliographie

1. Griffiths, J. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (15), 5678-5683.
2. Bass, C. *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons: 2007.
3. Dubois, F.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R.; Brunelle, A.; Deprun, C.; Le Beyec, Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1999**, *13* (9), 786-791.
4. Dempster, A. J. *Phys. Rev.* **1919**, *11*, 316-325.
5. Bleakney, W. *Phys. Rev.* **1929**, *34*, 157-160.
6. Nier, A. O. *Rev. Sci. Instrum.* **1947**, *18*, 415.
7. Field, F. H.; Munson, M. S. B.; Becker, D. A. *Advances in Chemistry Series* **1966**, (58), 167-168.
8. Morris, H. R.; Panico, M.; Barber, M.; Bordoli, R. S.; Sedgwick, R. D.; Tyler, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, *101* (2), 623-631.
9. Whitehouse, C. M.; Dreyer, R. N.; Yamashita, M.; Fenn, J. B. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (3), 675-679.
10. Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. *Rapid Communication in Mass Spectrometry.* **1988**, *2* (8), 151-153.
11. Karas, M.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1988**, *60* (20), 2299-2301.
12. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Anal. Chem.* **1991**, *63* (24), A1193-A1202.
13. Chaurand, P. *J. Proteomics* **2012**, *75* (16), 4883-4892.
14. Karas, M.; Bachmann, D.; Hillenkamp, F. *Anal. Chem.* **1985**, *57* (14), 2935-2939.
15. Karas, M.; Bachmann, D.; Bahr, U.; Hillenkamp, F. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* **1987**, *78*, 53-68.
16. Beavis, R. C.; Chait, B. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **1989**, *3*, 432-435.
17. Hillenkamp, F.; Karas, M.; Ingendoh, A.; Stahl, B. *Biological Mass Spectrometry /* **1990**, 49-60.
18. Sugiura, Y.; Setou, M. *Preparing biological tissue sections for imaging mass spectrometry*. Springer: Tokyo, 2010.
19. Kaletas, B. K.; van der Wiel, I. M.; Stauber, J.; Dekker, L. J.; Guzel, C.; Kros, J. M.; Luiders, T. M.; Heeren, R. M. A. *Proteomics* **2009**, *9* (10), 2622-2633.
20. Cerruti, C. D.; Benabdellah, F.; Laprevote, O.; Touboul, D.; Brunelle, A. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (5), 2164-2171.
21. Francese, S.; Bradshaw, R.; Flinders, B.; Mitchell, C.; Bleay, S.; Cicero, L.; Clench, M. R. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (10), 5240-5248.
22. Le, C. H.; Han, J.; Borchers, C. H. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (19), 8391-8398.
23. Thomas, A.; Charbonneau, J. L.; Fournaise, E.; Chaurand, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (4), 2048-2054.
24. Debois, D.; Bertrand, V.; Quinton, L.; De Pauw-Gillet, M. C.; De Pauw, E. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (10), 4036-4045.
25. Lemaire, P.; Debois, D.; Smargiasso, N.; Quinton, L.; Gabelica, V.; De Pauw, E. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27* (16), 1837-1846.
26. Thomas, A., Chaurand, P. *Bioanalysis* **2014**, *6* (7), 967-982.

27. Schwartz, S. A.; Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38* (7), 699-708.
28. Colsch, B.; Woods, A. S. *Glycobiology* **2010**, *20* (6), 661-667.
29. Astigarraga, E.; Barreda-Gomez, G.; Lombardero, L.; Fresnedo, O.; Castano, F.; Giralt, M. T.; Ochoa, B.; Rodriguez-Puertas, R.; Fernandez, J. A. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 9105-9114.
30. Montaudo, G.; Samperi, F.; Montaudo, M. S. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31* (3), 277-357.
31. Tang, K.; Allman, S. L.; Chen, C. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7* (10), 943-948.
32. Shariatgorji, M.; Kallback, P.; Gustavsson, L.; Schintu, N.; Svenningsson, P.; Goodwin, R. J. A.; Andren, P. E. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (10), 4603-4607.
33. Wang, X. D.; Han, J.; Chou, A.; Yang, J. C.; Pan, J. X.; Borchers, C. H. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (15), 7566-7573.
34. Yang, J. H.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (14), 5728-5734.
35. Franck, J.; Longuespee, R.; Wisztorski, M.; Van Remoortere, A.; Van Zeijl, R.; Deelder, A.; Salzet, M.; McDonnell, L.; Fournier, I. *Med. Sci. Monitor* **2010**, *16* (9), BR293-BR299.
36. van Remoortere, A.; van Zeijl, R. J. M.; van den Oever, N.; Franck, J.; Longuespee, R.; Wisztorski, M.; Salzet, M.; Deelder, A. M.; Fournier, I.; McDonnell, L. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21* (11), 1922-1929.
37. Chughtai, K.; Heeren, R. M. A. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 3237-3277.
38. Poretzky, A. A.; Geohegan, D. B.; Hurst, G. B.; Buchanan, M. V.; Luk'yanchuk, B. S. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *83* (2), 444-447.
39. Steenvoorden, R.; Breuker, K.; Zenobi, R. *Eur. Mass Spectrom.* **1997**, *3* (5), 339-346.
40. Burton, R. D.; Watson, C. H.; Eyler, J. R.; Lang, G. L.; Powell, D. H.; Avery, M. Y. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1997**, *11* (5), 443-446.
41. Jorgensen, T. J. D.; Bojesen, G.; Rahbek-Nielsen, H. *Eur. Mass Spectrom.* **1998**, *4* (1), 39-45.
42. Breuker, K.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **1999**, *184* (1), 25-38.
43. Mormann, M.; Bashir, S.; Derrick, P. J.; Kuck, D. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11* (6), 544-552.
44. Zhang, J.; Knochenmuss, R.; Stevenson, E.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *213* (2-3), 237-250.
45. Gorman, G. S.; Speir, J. P.; Turner, C. A.; Amster, I. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (10), 3986-3988.
46. Ohair, R. A. J.; Bowie, J. H.; Gronert, S. *Int. J. Mass Spectrom.* **1992**, *117* (1-3), 23-36.
47. Wu, Z. C.; Fenselau, C. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1992**, *6* (6), 403-405.
48. Zhang, X.; Cassady, C. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1996**, *7* (12), 1211-1218.
49. Harrison, A. G. *Mass Spectrom. Rev.* **1997**, *16* (4), 201-217.
50. Yassin, F. H.; Marynick, D. S. *Theochem-J. Mol. Struct.* **2003**, *629*, 223-235.
51. Ueno-Noto, K.; Marynick, D. S. *Mol. Phys.* **2009**, *107* (8-12), 777-788.
52. Karas, M.; Gluckmann, M.; Schafer, J. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35* (1), 1-12.
53. Ehring, H.; Karas, M.; Hillenkamp, F. *Org. Mass Spectrom.* **1992**, *27* (4), 472-480.
54. Zenobi, R.; Knochenmuss, R. *Mass Spectrom. Rev.* **1998**, *17* (5), 337-366.
55. Knochenmuss, R.; Dubois, F.; Dale, M. J.; Zenobi, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1996**, *10* (8), 871-877.

56. Kruger, R.; Pfenninger, A.; Fournier, I.; Gluckmann, M.; Karas, M. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (24), 5812-5821.
57. Friess, S. D.; Zenobi, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2001**, *12* (7), 810-818.
58. Kruger, R.; Karas, M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2002**, *13* (10), 1218-1226.
59. Frankevich, V.; Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *220* (1), 11-19.
60. McCombie, G.; Knochenmuss, R. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2006**, *17* (5), 737-745.
61. Knochenmuss, R.; McCombie, G.; Faderl, M. *Journal of Physical Chemistry A* **2006**, *110* (47), 12728-12733.
62. Karas, M.; Kruger, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 427-439.
63. Dashtiev, M.; Waefler, E.; Roehling, U.; Gorshkov, M.; Hillenkamp, F.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *268* (2-3), 122-130.
64. Hillenkamp, F.; Waefler, E.; Jecklin, M. C.; Zenobi, R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, *285* (3), 114-119.
65. Harrison, A. G. *Chemical Ionization Mass Spectrometry, Second Edition*. CRC Press: Boca Raton, 1992.
66. Sunner, J. *Org. Mass Spectrom.* **1993**, *28* (8), 805-823.
67. Scott, C. T. J.; Kosmidis, C.; Jia, W. J.; Ledingham, K. W. D.; Singhal, R. P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1994**, *8* (10), 829-832.
68. Bokelmann, V.; Spengler, B.; Kaufmann, R. *Eur. Mass Spectrom.* **1995**, *1* (1), 81-93.
69. Preisler, J.; Yeung, E. S. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (21), 4390-4398.
70. Kinsel, G. R.; Edmondson, R. D.; Russell, D. H. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32* (7), 714-722.
71. Zhu, Y. F.; Lee, K. L.; Tang, K.; Allman, S. L.; Taranencko, N. I.; Chen, C. H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9* (13), 1315-1320.
72. Olumee, Z.; Vertes, A. *Journal of Physical Chemistry B* **1998**, *102* (31), 6118-6122.
73. Gross, J.; Leisner, A.; Hillenkamp, F.; Hahner, S.; Karas, M.; Schafer, J.; Lutzenkirchen, F.; Nordhoff, E. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9* (9), 866-878.
74. Knochenmuss, R. *Analyst* **2006**, *131* (9), 966-986.
75. Knochenmuss, R.; Zenobi, R. *Chem. Rev.* **2003**, *103* (2), 441-452.
76. Paul, W.; Steinwedel, H. *RZeitschrift für Naturforschung A* **1953**, *8* (7), 448-450.
77. Stephens, W. E. *Bull Am Phys Soc* **1946**, *21* (2), 22.
78. Wiley, W. C.; McLaren, I. H. *Rev. Sci. Instrum.* **1955**, *26* (12), 1150-1157.
79. Kingdon, K. H. *Physical Review* **1923**, *21* (4), 408.
80. Makarov, A. *Anal. Chem.* **2000**, *72* (6), 1156-1162.
81. Comisarow, M. B.; Marshall, A. G. *Chem. Phys. Let.* **1974**, *25*, 282.
82. Cotter, R. J. *Analytical Chemistry News & features* **1999**, *July 1*, 445A-451A.
83. Alikhanov, S. G. *Sov. Phys. JETP* **1957**, *4*, 452.
84. Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. *Sov. Phys. JETP* **1973**, 37-45.
85. Mamyrin, B. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *206* (3), 251-266.
86. Brown, R. S.; Lennon, J. J. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (13), 1998-2003.
87. Vestal, M. L.; Juhasz, P.; Martin, S. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1995**, *9* (11), 1044-1050.
88. Gusev, A. I.; Vasseur, O. J.; Proctor, A.; Sharkey, A. G.; Hercules, D. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (24), 4565-4570.

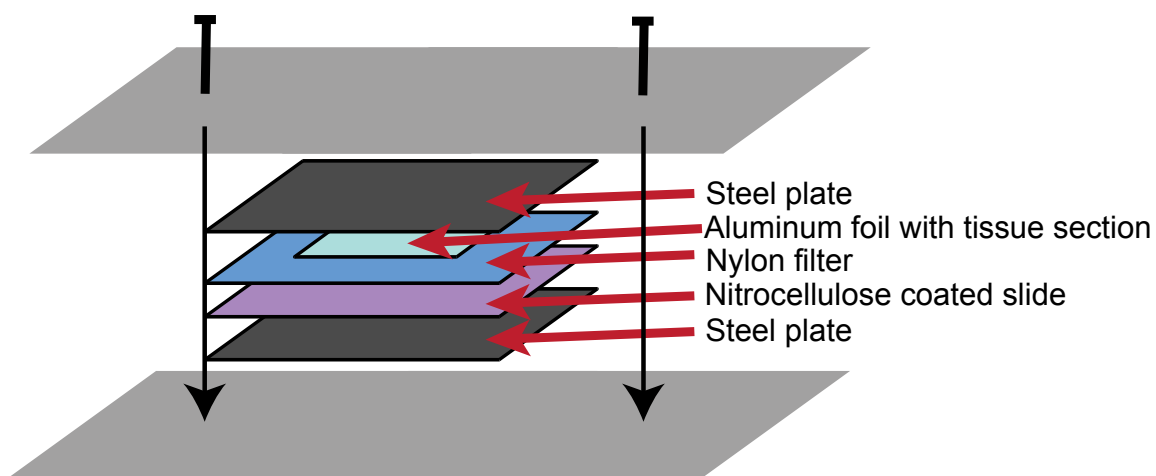
89. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
90. Stoeckli, M.; Farmer, T. B.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1999**, *10* (1), 67-71.
91. Stoeckli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* **2001**, *7* (4), 493-496.
92. Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (2), 245-252.
93. Seeley, E. H.; Caprioli, R. M. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29* (3), 136-143.
94. Schwamborn, K.; Caprioli, R. M. *Mol. Oncol.* **2010**, *4* (6), 529-538.
95. Pierson, J.; Norris, J. L.; Aerni, H. R.; Svenningsson, P.; Caprioli, R. M.; Andren, P. E. *J. Proteome Res.* **2004**, *3* (2), 289-295.
96. Wisztorski, M.; Croix, D.; Macagno, E.; Fournier, I.; Salzet, M. *Dev. Neurobiol.* **2008**, *68* (6), 845-858.
97. Lemaire, R.; Menguellet, S. A.; Stauber, J.; Marchaudon, V.; Lucot, J. P.; Collinet, P.; Farine, M. O.; Vinatier, D.; Day, R.; Ducoroy, P.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (11), 4127-4134.
98. Cazares, L. H.; Troyer, D.; Mendrinos, S.; Lance, R. A.; Nyalwidhe, J. O.; Beydoun, H. A.; Clements, M. A.; Drake, R. R.; Semmes, O. J. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (17), 5541-5551.
99. Castellino, S.; Groseclose, M. R.; Wagner, D. *Bioanalysis* **2011**, *3* (21), 2427-2441.
100. Nilsson, A.; Fehniger, T. E.; Gustavsson, L.; Andersson, M.; Kenne, K.; Marko-Varga, G.; Andren, P. E. *PLoS One* **2010**, *5* (7), 8.
101. Reyzer, M. L.; Caldwell, R. L.; Dugger, T. C.; Forbes, J. T.; Ritter, C. A.; Guix, M.; Arteaga, C. L.; Caprioli, R. M. *Cancer Res.* **2004**, *64* (24), 9093-9100.
102. Chaurand, P.; Fouhécourt, S.; DaGue, B. B.; Xu, B. G. J.; Reyzer, M. L.; Orgebin-Crist, M. C.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2003**, *3* (11), 2221-2239.
103. Lunsford, K. A.; Peter, G. F.; Yost, R. A. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (17), 6722-6730.
104. Groseclose, M. R.; Andersson, M.; Hardesty, W. M.; Caprioli, R. M. *J. Mass Spectrom.* **2007**, *42* (2), 254-262.
105. Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (4), 1295-1305.
106. Goodwin, R. J. A.; Lang, A. M.; Allingham, H.; Boren, M.; Pitt, A. R. *Proteomics* **2010**, *10* (9), 1751-1761.
107. Blatherwick, E. Q.; Svensson, C. I.; Frenguelli, B. G.; Scrivens, J. H. *Int. J. Mass Spectrom.* **2013**, *345*, 19-27.
108. Svensson, M.; Boren, M.; Skold, K.; Falth, M.; Sjogren, B.; Andersson, M.; Svenningsson, P.; Andren, P. E. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 974-981.
109. Crecelius, A.; Gotz, A.; Arzberger, T.; Frohlich, T.; Arnold, G. J.; Ferrer, I.; Kretzschmar, H. A. *Proteomics* **2008**, *8* (6), 1276-1291.
110. Norris, J. L.; Caprioli, R. M. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (4), 2309-2342.
111. Chaurand, P. *Curr. Trends Mass Spectrom.* **2011**, *suppl.*, 30-37.
112. Lemaire, R.; Wisztorski, M.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (20), 7145-7153.
113. Strohalm, M.; Strohalm, J.; Kaftan, F.; Krasny, L.; Volny, M.; Novak, P.; Ulbrich, K.; Havlicek, V. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (13), 5458-5462.
114. Chaurand, P.; Norris, J. L.; Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2006**, *5* (11), 2889-2900.

115. Chen, R. B.; Hui, L. M.; Sturm, R. M.; Li, L. J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (6), 1068-1077.
116. DeKeyser, S. S.; Kutz-Naber, K. K.; Schmidt, J. J.; Barrett-Wilt, G. A.; Li, L. J. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (5), 1782-1791.
117. Stoeckli, M.; Staab, D.; Schweitzer, A. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260* (2-3), 195-202.
118. Zaima, N.; Goto-Inoue, N.; Hayasaka, T.; Setou, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (18), 2723-2729.
119. Fox, C. H.; Johnson, F. B.; Whiting, J.; Roller, P. P. *J. Histochem. Cytochem.* **1985**, *33* (8), 845-853.
120. Wisztorski, M.; Franck, J.; Salzert, M.; Fournier, I. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *656*, 303-322.
121. Metz, B.; Kersten, G.; Hoogerhout, P.; al., e. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (8), 6235-6243.
122. Carter, C.; McLleod, C.; Bunch, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (11), 1991-1998.
123. Lemaire, R.; Desmons, A.; Tabet, J. C.; Day, R.; Salzert, M.; Fournier, I. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (4), 1295-1305.
124. Stauber, J.; Lemaire, R.; Franck, J.; al., e. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (3), 969-978.
125. Groseclose, M.; Massion, P.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2008**, *8* (18), 3715-3724.
126. Cazares, L. H.; Troyer, D. A.; Wang, B. H.; Drake, R. R.; Semmes, O. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401* (1), 17-27.
127. Nadji, M.; Nassiri, M.; Vincek, V.; Kanhoush, R.; Morales, A. R. *Appl. Immunohistochem.* **2005**, *13* (3), 277-282.
128. Chaurand, P.; Latham, J. C.; Lane, K. B.; Mobley, J. A.; Polosukhin, V. V.; Wirth, P. S.; Nanney, L. B.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (8), 3543-3555.
129. Scherl, A.; Zimmermann-Ivol, C. G.; Di Dio, J.; Vaezzadehl, A. R.; Binz, P. A.; Amez-Droz, M.; Cochard, R.; Sanchez, J. C.; Gluckmann, M.; Hochstrasser, D. F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19* (5), 605-610.
130. Chaurand, P.; Schwartz, S. A.; Billheimer, D.; Xu, B. G. J.; Crecelius, A.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (4), 1145-1155.
131. Goodwin, R. J. A. *J. Proteomics* **2012**, *75* (16), 4893-4911.
132. Goodwin, R. J. A.; Dungworth, J. C.; Cobb, S. R.; Pitt, A. R. *Proteomics* **2008**, *8* (18), 3801-3808.
133. Patterson, N. H.; Thomas, A.; Chaurand, P. *J. Mass Spectrom* **2014**, *49*, 622-627.
134. Seeley, E. H.; Oppenheimer, S. R.; Mi, D.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19* (8), 1069-1077.
135. van Hove, E. R. A.; Smith, D. F.; Fornai, L.; Glunde, K.; Heeren, R. M. A. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (10), 1885-1890.
136. Grey, A. C.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M.; Schey, K. L. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (7), 3278-3283.
137. Nicklay, J. J.; Harris, G. A.; Schey, K. L.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (15), 7191-7196.
138. Thomas, A.; Patterson, N. H.; Charbonneau, J. L.; Chaurand, P. *J. Mass Spectrom.* **2013**, *48* (1), 42-48.

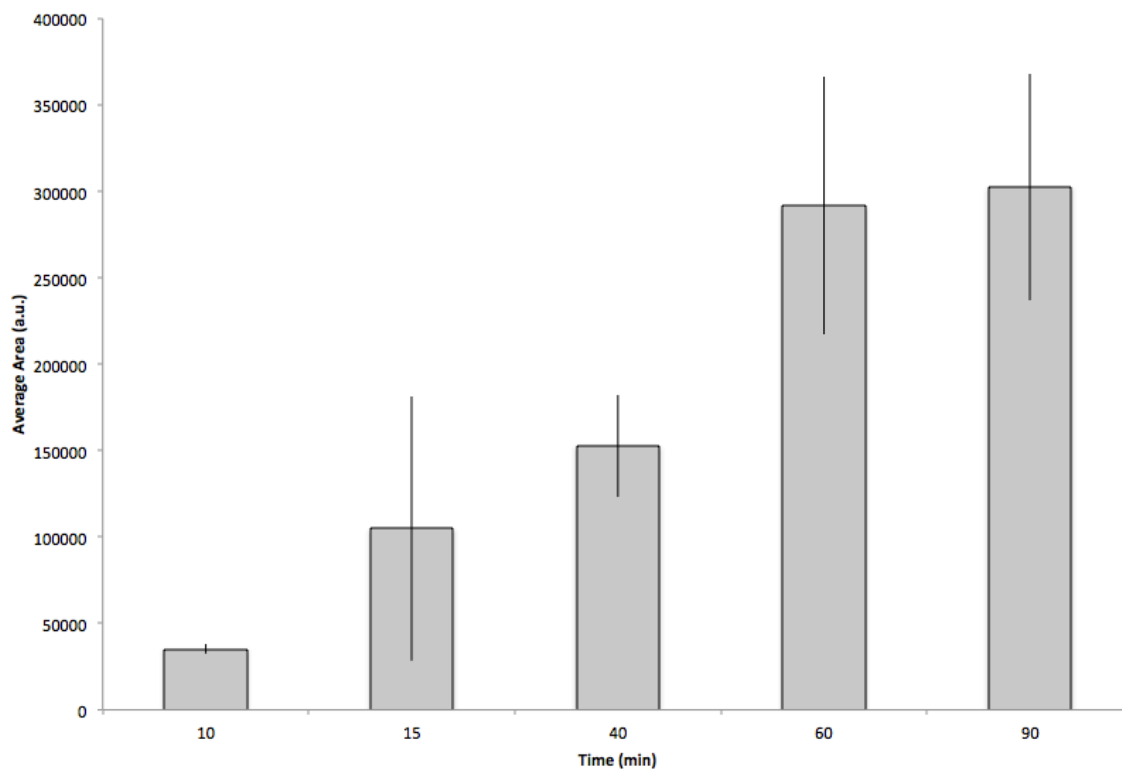
139. Angel, P. M.; Spraggins, J. M.; Baldwin, H. S.; Caprioli, R. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1557-1564.
140. Khatib-Shahidi, S.; Andersson, M.; Herman, J. L.; Gillespie, T. A.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (18), 6448-6456.
141. Norris, J. L.; Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Andersson, M.; Seeley, E. H.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260* (2-3), 212-221.
142. Tholey, A.; Heinzle, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386* (1), 24-37.
143. Meriaux, C.; Franck, J.; Wisztorski, M.; Salzert, M.; Fournier, I. *J. Proteomics* **2010**, *73* (6), 1204-1218.
144. Liu, Q.; He, L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20* (12), 2229-2237.
145. Shrivastava, K.; Hayasaka, T.; Goto-Inoue, N.; Sugiura, Y.; Zaima, N.; Setou, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (21), 8800-8806.
146. Lemaire, R.; Tabet, J. C.; Ducoroy, P.; Hendra, J. B.; Salzert, M.; Fournier, I. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (3), 809-819.
147. Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Puolitaival, S. M.; Milne, S. B.; Myers, D. S.; Tranguch, S.; Brown, H. A.; Dey, S. K.; Caprioli, R. M. *J. Lipid Res.* **2009**, *50* (11), 2290-2298.
148. Mainini, V.; Angel, P. M.; Magni, F.; Caprioli, R. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (1), 199-204.
149. Hankin, J. A.; Barkley, R. M.; Murphy, R. C. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2007**, *18* (9), 1646-1652.
150. Puolitaival, S. M.; Burnum, K. E.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19* (6), 882-886.
151. Dekker, L. J. M.; van Kampen, J. J. A.; Reedijk, M. L.; Burgers, P. C.; Gruters, R. A.; Osterhaus, A.; Luiders, T. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23* (8), 1183-1188.
152. Bouschen, W.; Schulz, O.; Eikel, D.; Spengler, B. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (3), 355-364.
153. Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Angel, P. M.; Caprioli, R. M. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (2), 11.
154. Lagarrigue, M.; Becker, M.; Lavigne, R.; Deininger, S.-O.; Walch, A.; Aubry, F.; Suckau, D.; Pineau, C. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (3), M110 005991.
155. BrukerDaltonics. *ImagePrep User Manual*. Bremen, 2007.
156. Thiele, H.; Heldmann, S.; Trede, D.; Strehlow, J.; Wirtz, S.; Dreher, W.; Berger, J.; Oetjen, J.; Kobarg, J. H.; Fischer, B.; Maass, P. *BBA-Proteins Proteomics* **2014**, *1844* (1), 117-137.
157. Deininger, S. O.; Cornett, D. S.; Paape, R.; Becker, M.; Pineau, C.; Rauser, S.; Walch, A.; Wolski, E. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401* (1), 167-181.
158. Fournier, I.; Day, R.; Salzert, M. *Neuroendocrinol. Lett.* **2003**, *24*, 9-14.
159. (a) Cornett, D. S.; Reyzer, M. L.; Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Nat. Meth.* **2007**, *4* (10), 828-833; (b) Stoekli, M.; Chaurand, P.; Hallahan, D. E.; Caprioli, R. M. *Nat. Med.* **2001**, *7*, 493-496; (c) Chughta, K.; Heeren, R. M. A. *Chemical reviews* **2010**, *110*, 3237-3277.
160. Thomas, A.; Chaurand, P. *Bioanalysis* **2014**, *6* (7), 967-982.
161. (a) Chaurand, P.; Foucheourt, S.; Dague, B. B.; Xu, B. J.; Reyzer, M. L.; Orgebin-Crist, M.-C.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2003**, *3* (2221-2239); (b) Chaurand, P.; Rahman, M. A.; Hunt, T.; Mobley, J. A.; Gu, G.; Lathan, J. C.; Caprioli, R. M.; Kasper, S. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 411-423

162. (a) Chaurand, P.; Sanders, M. E.; Jensen, R. A.; Caprioli, R. M. *Am. J. Pathol.* **2004**, *165*, 1057-1068; (b) Norris, J. L.; Caprioli, R. M. *Proteomics Clinical Applications* **2013**, *7* (11-12), 733-738; (c) Schwamborn, K.; Caprioli, R. M. *Mol. Oncol.* **2010**, *4* (6), 529-538.
163. (a) Reyzer, M. L.; Caldwell, R. L.; Dugger, T. C.; Forbes, J. T.; Ritter, C. A.; Guix, M.; Arteaga, C. L.; Caprioli, R. M. *Cancer Res.* **2004**, *64* (24); (b) Reyzer, M. L.; Caprioli, R. M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11* (1), 29-35.
164. Chaurand, P.; Norris, J. L.; Cornett, D. S.; Mobley, J. A.; Caprioli, R. M. *J. Proteome Res.* **2006**, *5*, 2889-2900.
165. Thomas, A.; Laveaux Charbonneau, J.; Fournaise, E.; Chaurand, P. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2048-2054.
166. Dufresne, M.; Thomas, A.; Breault-Turcot, J.; Masson, J.-F.; Chaurand, P. *Analytical Chemistry* **2013**, *85*, 3318-3324.
167. Chaurand, P.; Caprioli, R. M. *Electrophoresis* **2002**, *23* (18), 3125-3135.
168. Liu, R.; Li, Q.; Smith, L. M. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2014**, *25* (8), 1374-1383.
169. (a) Lemaire, R.; Stauber, J.; Wisztorski, M.; Van Camp, C.; Desmons, A.; Deschamps, M.; Proess, G.; Rudlof, I.; Woods, A. S.; Day, R.; Salzet, M.; Fournier, I. *Journal of Proteome Research* **2007**, *6* (6), 2057-2067; (b) Thiery, G.; Anselmi, E.; Audebourg, A.; Darii, E.; Abarbri, M.; Terris, B.; Tabet, J.-C.; Gut, I. G. *Proteomics* **2008**, *8* (18), 3725-3734; (c) Thiery, G.; Shchepinov, M. S.; Southern, E. M.; Audebourg, A.; Audard, V.; Terris, B.; Gut, I. G. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2007**, *21* (6), 823-829.
170. Yang, J.; Chaurand, P.; Norris, J. L.; Porter, N. A.; Caprioli, R. M. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (8), 3689-3695.
171. Caprioli, R. M.; Farmer, T. B.; Gile, J. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (23), 4751-4760.
172. (a) Chaurand, P.; Dague, B. B.; Pearsall, R. S.; Threadgill, D. W.; Caprioli, R. M. *Proteomics* **2001**, *1*, 1320-1326; (b) Chaurand, P.; Stoeckli, M.; Caprioli, R. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5263-5270.
173. Bouamrani, A.; Ternier, J.; Ratel, D.; Benabid, A.-L.; Issartel, J.-P.; Brambilla, E.; Berger, F. *Clin. Chem.* **2006**, *52*, 2103-2105.
174. (a) Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1979**, *76* (9), 4350-4354; (b) Luque-Garcia, J. L.; Zhou, G.; Sun, T.-T.; Neubert, T. A. *Analytical Chemistry* **2006**, *78* (14), 5102-5108.
175. Lobert, S.; Correia, J. J. *Electrophoresis* **1994**, *15* (7), 930-931.
176. Chaurand, P.; Cornett, D. S.; Caprioli, R. M. *Current Opinion in Biotechnology* **2006**, *17* (4), 431-436.
177. Tang, N.; Tornatore, P.; Weinberger, S. R. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 34-44.
178. Müller, M.; Gras, R.; Appel, R. D.; Bienvenut, W. V.; Hochstrasser, D. F. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2002**, *13* (3), 221-231.
179. Noujeim, N.; Leclercq, L.; Schmitzer, A. R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (10), 3784-3790.

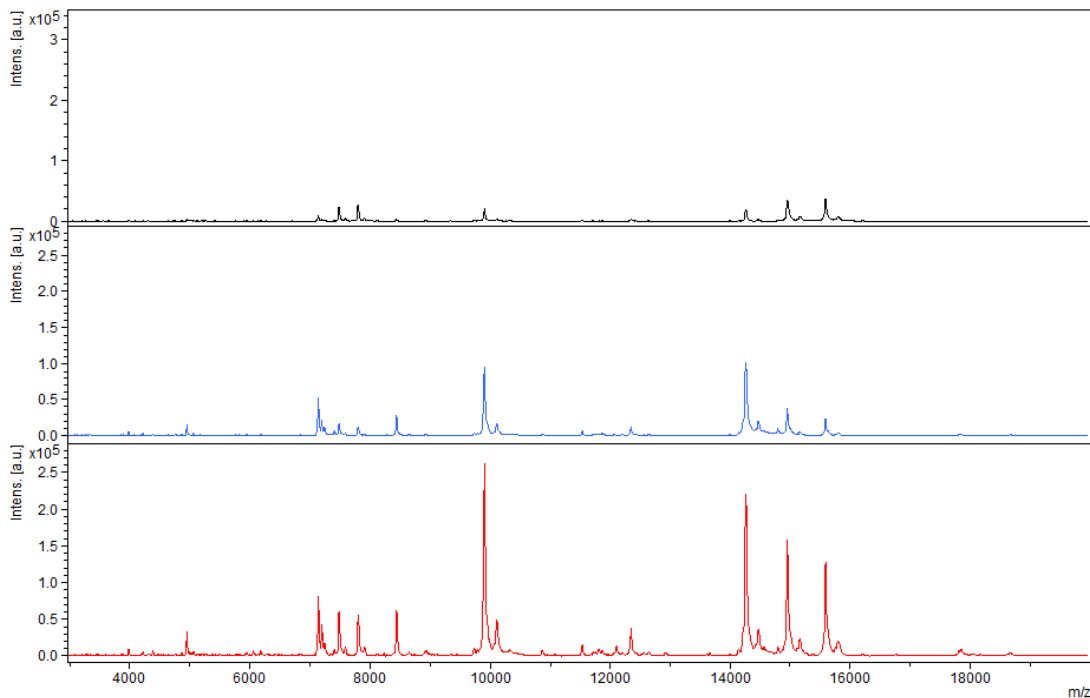
Annexe 1 : Figures supplémentaires



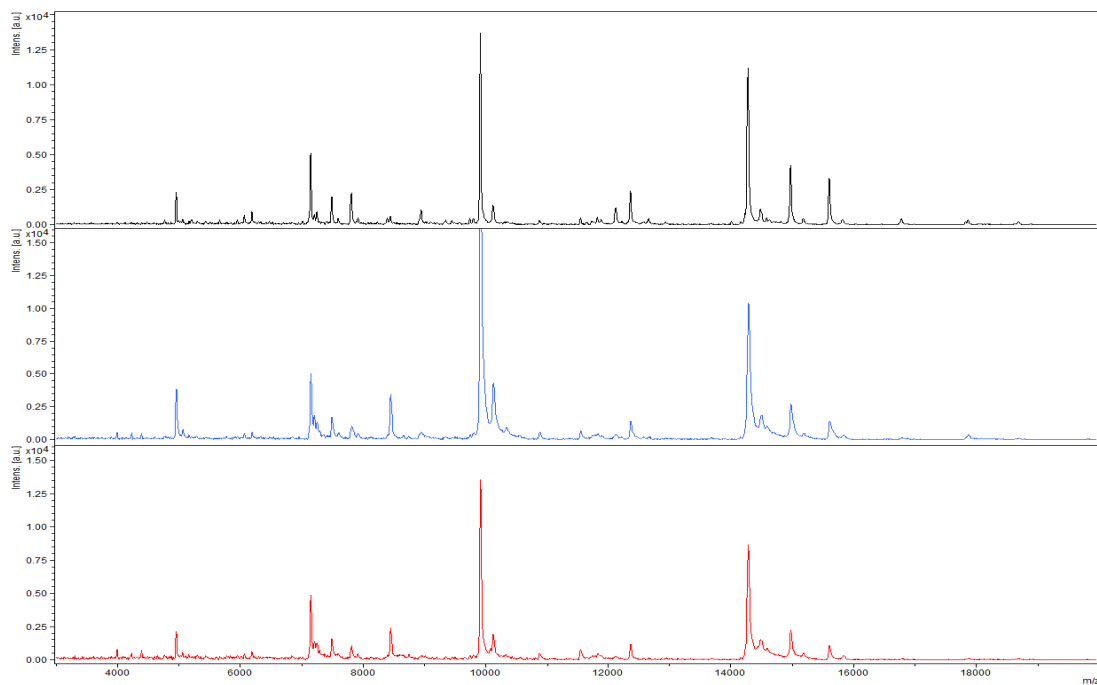
Suppl. figure 1 : Scheme of the home –built press used to transfer proteins from thinly cut tissue sections to a nitrocellulose coated MALDI conductive glass slide.



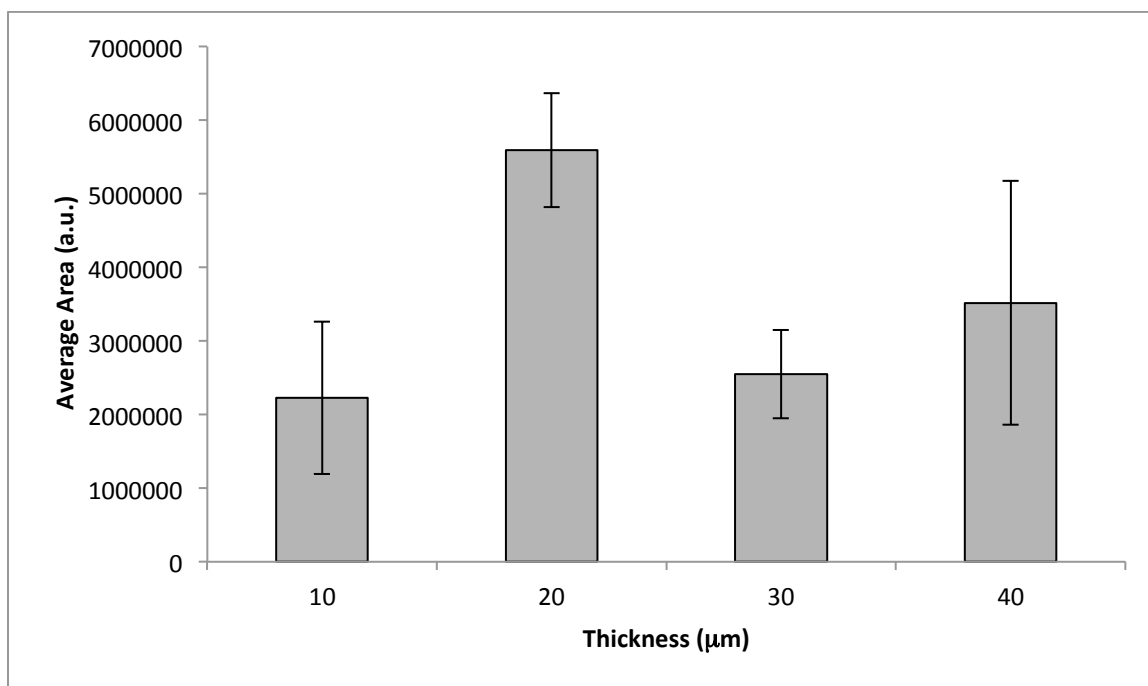
Suppl. figure 2 : Histogram showing the average MALDI-MS spectrum total ion count after protein transfer from a liver tissue section onto a nitrocellulose membrane as a function of time.



Suppl. figure 3 : MALDI-TOF MS spectra comparing protein signals from mouse liver tissue sections after transfer onto a nitrocellulose surface using 3 different buffers.



Suppl. figure 4 : MALDI-TOF MS spectra comparing protein signals from mouse liver tissue sections after transfer onto a nitrocellulose surface deposited on 3 different target slides.



Suppl. figure 5 : Histogram showing the average MALDI MS spectrum total count obtained after protein transfer from tissue section of different thicknesses onto a nitrocellulose membrane.