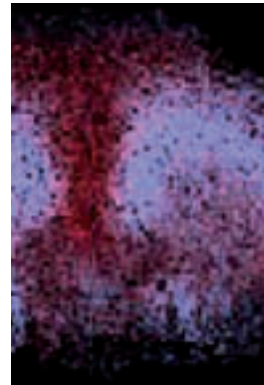


➤ À l'heure de la protéomique, la spectrométrie de masse s'est révélée un outil puissant pour la recherche et l'identification des protéines et des peptides à partir d'échantillons purifiés. Une nouvelle ère s'ouvre, avec l'imagerie MALDI, permettant à la fois la recherche, l'identification et maintenant la localisation de biomolécules telles que les peptides, les protéines ou les lipides au sein des tissus. Des développements cruciaux au niveau de la préparation des échantillons permettent l'analyse de tissus ou biopsies conservées congelées (-80°C) depuis plus de 6 mois ou conservés après fixation au paraformaldéhyde et inclus en paraffine. Le verrou technologique permettant l'exploitation des ressources présentes dans les tumorothèques semble ainsi enfin levé. Le rapprochement des techniques d'imagerie MALDI de celles utilisées en routine par les anatomopathologistes (colorations ou utilisation d'anticorps) est également un objectif important. Le développement de l'imagerie spécifique grâce à l'utilisation de sondes appelées *Tag-Mass* ouvre des perspectives potentielles pour cette technologie. En effet, il est dorénavant possible de localiser une protéine et son ARNm de façon spécifique ainsi que les voies de signalisation sur une même coupe ou l'expression du phénotype pathologique à partir d'une biopsie. Le développement de ce type de technologie rappelle les travaux similaires effectués il y a plusieurs années en résonance magnétique nucléaire (RMN) et qui ont conduit au développement des techniques d'imagerie dites IRM dont l'implantation en milieu médical est considérable pour le diagnostic de certaines pathologies. ◀

Imagerie MALDI

Une nouvelle technologie pour découvrir et valider de nouveaux biomarqueurs

Maxence Wisztorski, Rémi Lemaire,
Jonathan Stauber, Sonia Ait Menguellet,
Olivia Jardin-Mathé, Robert Day, Michel Salzet,
Isabelle Fournier



M. Wisztorski, R. Lemaire,
J. Stauber, S. Ait Menguellet,
O. Jardin-Mathé, M. Salzet,
I. Fournier : Laboratoire
de Neuro-immunologie
des Annélides, FRE CNRS 2933,
Équipe Imagerie MALDI,
Bâtiment SN3, Cité Scientifique,
Université des Sciences
et Technologies de Lille,
59650 Villeneuve d'Ascq, France.
isabelle.fournier@univ-lille1.fr

R. Day : Département
de Pharmacologie,
Faculté de médecine,
Université de Sherbrooke,
Sherbrooke, Québec,
J1H 5N4, Canada.

Les récents développements réalisés dans le domaine de la spectrométrie de masse et plus particulièrement sur le plan instrumental font actuellement de cette technique un outil analytique de choix pour l'application aux recherches biologiques [1]. Les nombreux efforts menés ces dernières années pour développer l'étude du protéome ont démontré le rôle incontournable de cette technologie [2]. Grâce aux connaissances croissantes sur les génomes, la combinaison des méthodes de biochimie classique et de la spectrométrie de masse a déjà permis l'identification de nombreuses protéines [3]. Néanmoins, de telles méthodes conduisent principalement à l'identification de nouvelles protéines sans obtenir d'informations sur leur localisation ou encore de suivre l'évolution du profil d'expression de l'ensemble des peptides/protéines au sein d'un tissu ou de groupes cellulaires, voire même de cellule unique. Les nouvelles technologies émergentes permettent à l'heure actuelle de développer des méthodes alternatives pouvant répondre à ces questions. À ce titre, le développement d'analyse directe sur tissus ou sur cellules par *matrix assisted laser desorption/ionization time of flight* (MALDI-TOF) est extrêmement prometteur [4]. En effet, de telles analyses permettent, tout



en s'affranchissant des lourdes étapes d'extraction, purifications et séparation, d'obtenir directement les profils d'expression cellulaires sans perdre la localisation des composés au sein du tissu. Une telle stratégie d'étude est parfaitement adaptée à la spectrométrie de masse au travers de l'utilisation de sources MALDI. Le MALDI utilise une méthode d'ionisation parfaitement adaptée à l'étude des composés biologiques de hautes masses moléculaires sous leur forme intacte. Son principe de fonctionnement nécessite la formation d'un réseau cristallin de matrice dans lequel sont diluées les molécules biologiques à analyser. Ainsi, cette méthode permet l'introduction d'analytes sous leur forme solide et ne nécessite pas de disposer de composés en solution pour obtenir des ions en phase gazeuse. Elle est donc adaptable à l'utilisation de matériel biologique, comme par exemple des cellules isolées ou des coupes de tissu. Les images sont obtenues par ionisation de l'échantillon grâce à un faisceau laser qui parcourt toute la coupe (Figure 1). Après acquisition des données, un logiciel permet de sélectionner des gammes de masse correspondant à des molécules d'intérêt et de reconstruire des images de localisation. Chaque point correspondra à 1 pixel de l'image et la distance entre chaque point définira la résolution latérale de l'image.

Cette technique ne se limite pas seulement à la localisation des peptides. Elle peut aussi s'appliquer aux lipides, aux protéines et à des métabolites et permet à partir d'une seule coupe l'obtention des informations de localisation de ces différents composés. Dans ces

conditions, il est possible d'analyser sur un même tissu les différentes zones le constituant de manière hautement spécifique.

De l'analyse directe de tissu par spectrométrie de masse vers l'imagerie MALDI

Depuis longtemps évoquée, la faisabilité de l'analyse directe de tissus biologiques par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a été démontrée pour la première fois en 1993 par l'équipe du Pr van der Greef grâce à des travaux sur des neurones de *Lymnaea stagnalis* [5]. Il a fallu attendre 1996 et la reprise de ces travaux par le groupe de Jonathan Sweedler [6] puis les développements de l'équipe de Richard Caprioli [7] pour que le *profiling* de tissu par spectrométrie de masse voit le jour. Les études menées par ce dernier groupe ont permis de montrer la faisabilité de la méthode pour suivre les profils d'expression des peptides/protéines directement au sein de tissus sans traitement préalable [8]. Les résultats obtenus par d'autres équipes ont porté sur la cartographie, la distribution spatiale ou la modulation, suite à des traitements, de la libération de neuropeptides dans le système nerveux de différents modèles

d'études [9-11]. Sur des modèles invertébrés (*Aplysia californica* et *Lymnaea stagnalis*), des analyses directes ont été réalisées sur les cellules exprimant les gènes de l'hormone de ponte [12, 13]. Une caractérisation complète des mécanismes de maturation de cette hormone au niveau d'un neurone a pu être réalisée. Du point de vue clinique, cette technique de *peptides profiling* est en plein essor [4, 14-17].

Le développement récent de logiciels informatiques spécifiques a montré la possibilité de suivre l'expression d'un peptide/protéine au sein du tissu et d'obtenir ainsi des cartographies de l'expression de la molécule. L'imagerie par spectrométrie de masse consiste en une automatisation de l'analyse directe [7, 18, 19]. Tout comme pour l'analyse directe, le faisceau laser va irradier l'échantillon en un endroit, ce qui va définir un *spot* et un spectre de masse sera enregistré. Le plateau du support de l'échantillon va ensuite se déplacer d'une distance définie par avance, puis un nouveau spectre sera enregistré à l'endroit du nouveau *spot*. Le support va

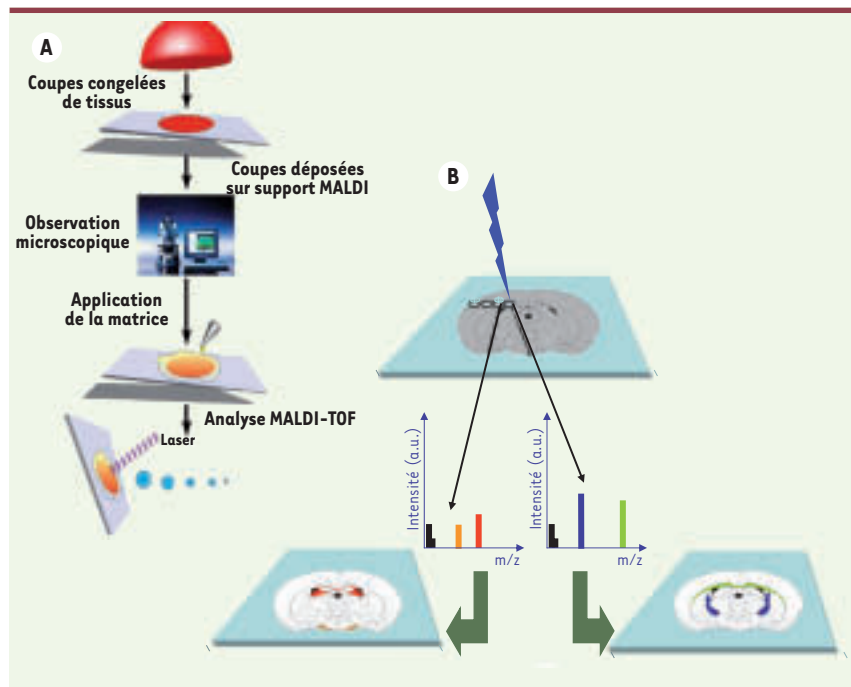


Figure 1. Principe de l'imagerie MALDI-TOF. A. Une coupe congelée est déposée sur un support. Une analyse microscopique est effectuée. La coupe est recouverte de matrice avant d'être analysée en MALDI-TOF. B. Le laser va balayer la surface de la coupe et un logiciel informatique va permettre de reconstituer une image bidimensionnelle de la répartition des molécules. Une superposition entre la carte de répartition des molécules et l'observation microscopique peut être réalisée pour obtenir une localisation précise de la molécule dans le tissu.

ainsi se déplacer à intervalles réguliers jusqu'à « scanner » toute la zone d'analyse préalablement choisie. Une fois toute la zone analysée, un logiciel va reconstruire une image de la répartition d'un rapport masse sur charge choisi (Figure 1). Trois éléments sont décisifs dans cette technique : (1) la préparation de l'échantillon, (2) la matrice et (3) son mode de dépôt.

Développement

L'utilisation de l'imagerie MALDI au niveau clinique oblige les groupes à développer de nouveaux protocoles, de nouveaux supports ainsi que de nouvelles matrices compatibles avec les colorations histologiques et les procédures mises en œuvre par les pathologistes.

Supports conducteurs transparents

La comparaison des données histologiques, obtenues par l'observation des coupes après coloration en microscopie optique et des images moléculaires, obtenues par spectrométrie de masse, montre une très bonne corrélation et une compatibilité presque totale [20], une fois résolus les problèmes liés aux supports d'analyse. En effet, il est difficile de localiser beaucoup d'éléments tissulaires par microscopie optique quand les coupes sont montées sur un support opaque. C'est pourquoi il est devenu impératif que les tissus soient montés sur des supports transparents et conducteurs tels que des lames ITO, Nickel ou des lames classiques recouvertes d'or [21] (Figure 2). Effectivement, la propriété conductrice des lames est indispensable en MALDI pour l'utilisation d'analyseurs temps de vol, car des différences de tension sur la surface de l'échantillon peuvent induire des variations

dans la mesure des temps de vol des ions empêchant éventuellement par la suite des analyses structurales par MS/MS. La caractérisation structurale des peptides au sein de la coupe par des études de la fragmentation de ceux-ci directement à partir des tissus est possible suite à l'arrivée d'instruments de type MALDI-TOF/TOF.

Préparation de l'échantillon et digestion trypsique

Un des points critiques de l'imagerie, comme toutes les techniques biochimiques, est la conservation de l'échantillon, c'est-à-dire son mode et son temps de conservation. En effet, les tissus peuvent être, dès leur prélèvement, congelés puis coupés et ensuite analysés. À l'heure actuelle, la plupart des travaux utilisent cette procédure [22].

Dans le cas de coupes congelées ayant été conservées plus de 6 mois, des traitements par des solvants organiques peuvent être réalisés pour éliminer la couche de lipides qui saturent la coupe [23] et ainsi obtenir un meilleur signal. De plus la possibilité de faire de la digestion trypsique *in situ* sur coupes fraîches [24] par le biais ou non d'un transfert sur membrane [25] devra permettre l'accès à l'information moléculaire. Cependant, la plupart des échantillons conservés par les pathologistes au sein des hôpitaux sont des tissus fixés au formaldéhyde puis inclus dans la paraffine. Le formaldéhyde forme au cours du temps des ponts méthylènes intra- et inter-pro-

téines. Pour résoudre ce problème, des stratégies alliant l'emploi de matrice active [26] et la microdigestion à la trypsine déposée par microspotteur, ont été développées [27] (Figure 3). Ces stratégies sont couplées à la caractérisation par ESI-Trap des protéines issues d'une coupe de tissu adjacente ayant subi un déparaffinage puis une digestion enzymatique [27]. Le développement de ce type d'études et l'amélioration de cette méthode permettront directement, à partir des tissus prélevés, de déterminer les peptides exprimés dans une zone bien définie du tissu puis de les identifier en obtenant leur séquence en acides aminés.

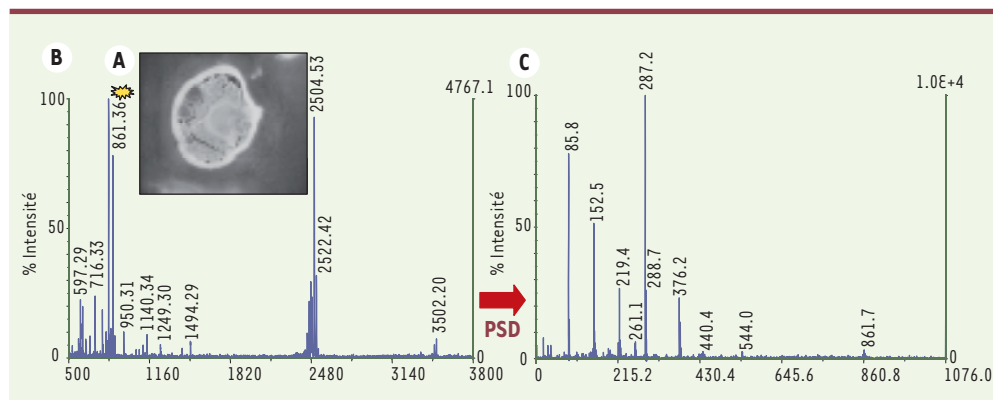


Figure 2. Supports transparents et conducteurs. A. Image par microscopie optique d'une coupe de ganglion de sangsue déposée sur une lame conductrice recouverte de nickel. B. Analyse directe de la coupe en mode réflecteur. C. Mode PSD de l'ion m/z 861.7

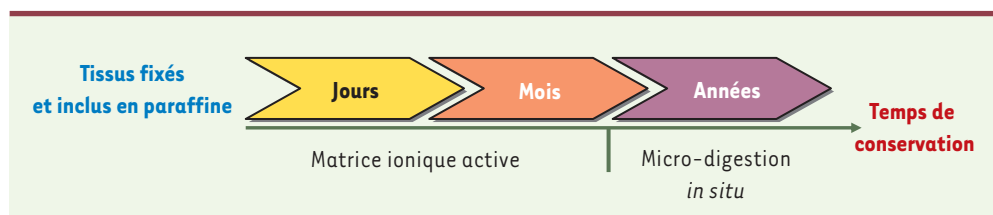


Figure 3. Étapes permettant l'analyse par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF de tissus fixés et paraffinés dépendantes du temps de stockage de l'échantillon.

A Mode positif



B Mode négatif

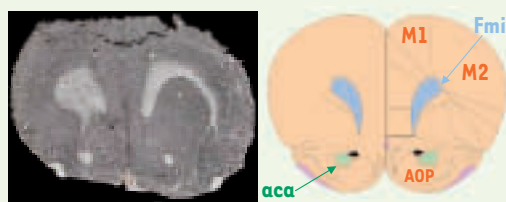
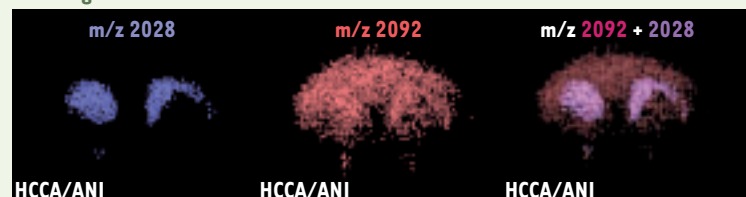


Figure 4. Images moléculaires reconstruites de la répartition de différents ions au sein de la coupe de cerveau de rat obtenue par balayage de 10 000 points à 50 Hz et 200 tirs par position pour la matrice ionique HCCA/ANI. A. Première acquisition en mode positif. B. Seconde acquisition en mode négatif (avec la permission de Analytical Chemistry).

La matrice

Un autre développement consiste en la mise au point de nouvelles matrices mieux adaptées aux contraintes de l'imagerie [26]. Pour réaliser une image moléculaire, les matrices doivent entraîner une délocalisation réduite des composés, et donc une cristallisation rapide et homogène sur le tissu [26]. De plus, la quantité de matériel présent sur la coupe est limitée, donc les nouvelles matrices doivent permettre une augmentation de la sensibilité du signal et supporter des fréquences de tir laser élevées (200 Hz), ainsi que le vide poussé de la source, durant le temps nécessaire à la réalisation d'une image. Les matrices ioniques répondent parfaitement à l'ensemble de ces critères [28] (Figure 4).

Le dépôt de matrice

Le dépôt de matrice est un point important pour l'imagerie MALDI. En effet la matrice doit extraire les analytes du tissu de façon verticale et des cristaux doivent être formés pour éviter la délocalisation des molécules. Plusieurs approches ont été testées, comme recouvrir toute la surface de la coupe avec

de la matrice par application à la micropipette, déposer la matrice par spray pneumatique [16] ou par *electrospray* [7]. Ces méthodes peuvent s'avérer difficiles à mettre en place et à optimiser. Actuellement différents groupes de recherche s'orientent vers un dépôt de matrice localisé. Des microgouttes de matrices vont être déposées et espacées d'un pas régulier. Ces microgouttes sont obtenues par dépôts manuels ou automatiquement par des systèmes robotiques de microdépôts, dépôt piezo, voire dépôt par éjection acoustique de microdépôts [29]. Ces microdépôts de

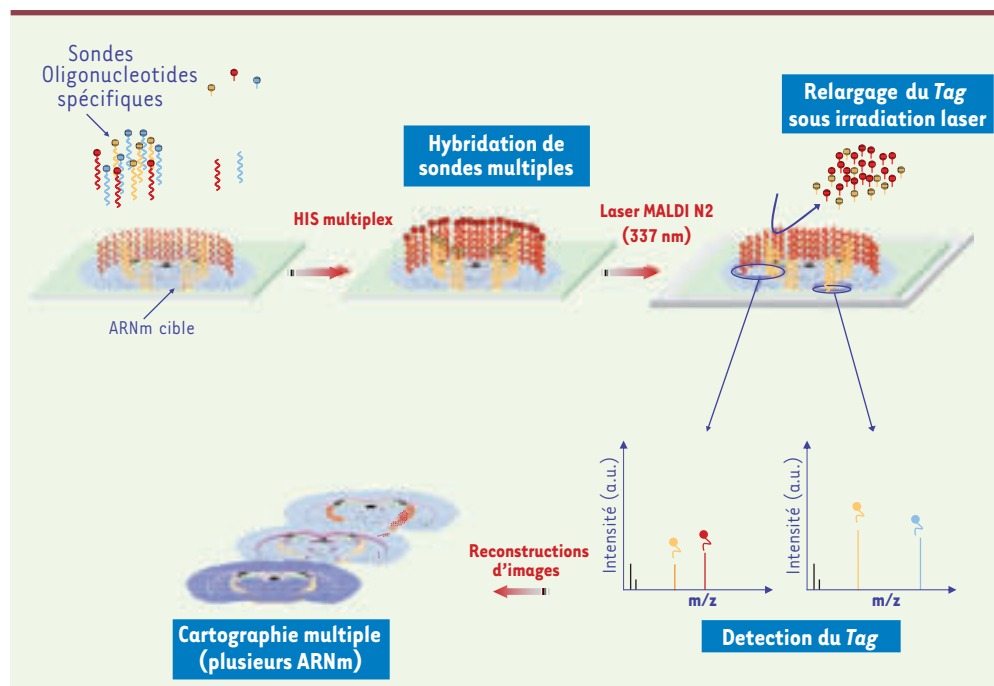


Figure 5. Principe de détection de plusieurs ARNm sur une coupe de tissu en utilisant des sondes marquées à l'aide d'UTP-lié par une liaison photoclivable par le laser UV et un rapporteur peptidique.

matrices vont permettre à la fois de limiter la délocalisation d'analytes mais aussi de réduire artificiellement la taille de la zone d'éjection de matière due à l'irradiation par le laser.

Tous ces développements en imagerie MALDI permettent la reconstruction de cartes bidimensionnelles. Si on étudie toute une série de coupes d'un organe, grâce à un procédé informatique [30], il est alors possible de reconstruire non plus une image en 2D mais en 3D. En corrélant ces résultats aux images de ces coupes obtenues en histologie, il est désormais possible de voyager à l'intérieur de l'organe et de faire une localisation précise d'une molécule dans celui-ci.

Perspectives

Les études réalisées jusqu'ici utilisent la technologie de MALDI-UV. Des travaux sont en cours pour développer l'imagerie MALDI infrarouge [21]. L'imagerie par MALDI-IR permettrait de combiner les potentialités de l'imagerie MALDI et les récents développements dans l'utilisation des lasers IR [31, 32]. En effet en MALDI-IR, les mécanismes conduisant à l'obtention

d'ions en phase gazeuse reposent sur de l'excitation vibrationnelle, principalement des liaisons O-H et N-H. Ainsi, de nombreux composés sont potentiellement de bonnes matrices, comme par exemple l'eau. Ce mode autorise donc l'utilisation de matrices liquides ou solides se rapprochant des conditions physiologiques. De plus, de part la nature des processus physicochimiques mis en jeu en IR, cette méthode a permis d'obtenir des résultats prometteurs dans le cadre de l'analyse d'oligonucléotides et d'ADN.

Pour pallier les limitations de la technologie MALDI-UV, l'un des développements les plus prometteurs est ce que l'on appelle l'imagerie spécifique (Figure 6). Sous cette appellation se cache l'utilisation de sondes (anticorps, ribosondes, aptamères, lectines) marqués à l'aide d'un lien photoclivable et d'un peptide rapporteur [33]. Ce lien photoclivable est clivé à la longueur d'onde du laser du MALDI. L'utilisation de ces sondes spécifiques permet de réaliser des images en multiplexes d'ARNm spécifiques, d'associer la répartition d'un ligand avec son récepteur, ou d'un précurseur avec ses enzymes de maturation. Ce concept appelé *Tag-mass* permet également d'étudier la répartition et l'expression au sein d'un tissu de biomarqueurs après les avoir identifiés. La corrélation de leur expression avec celle de facteurs de transcription conduit à la localisation au sein du tissu des cellules saines, des cellules exprimant le phénotype tumeur ou de celles en cours de changement de phénotype (Figure 5).

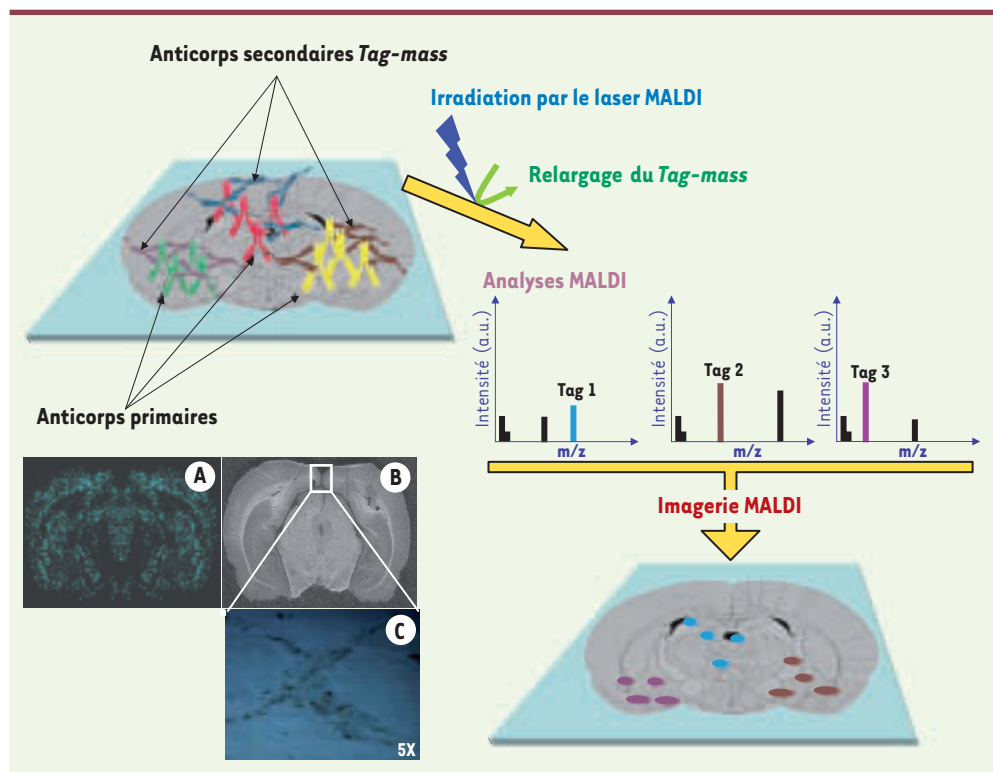


Figure 6. Principe de l'imagerie spécifique en utilisant des anticorps taggés (lies à une liaison photoclivable par le laser du MALDI et comportant un peptide rapporteur). **A.** Répartition moléculaire de la carboxypeptidase D (protéine membranaire de 160 kDa) détectée par le concept du *Tag-mass*. **B.** Scanner de la coupe adjacente. **C.** Immunodétection avec un anticorps marqué à la peroxydase et immunorévélé par le chloronaphtol.

Conclusions

La comparaison des résultats provenant de l'imagerie par spectrométrie de masse avec ceux obtenus par des méthodes biologiques classiques telles que l'immunocytochimie confirme la fiabilité de la méthode puisque les images d'expressions obtenues sont très semblables. Ainsi, l'imagerie par spectrométrie de masse pourra par sa haute spécificité, sa rapidité et sa sensibilité être un nouvel outil d'investigation pour l'analyse et l'étude des biomolécules. Le couplage de l'analyse du transcriptome et du peptidome directement sur des coupes de tissu ou au niveau d'une cellule unique est le prochain développement de l'analyse MALDI. ♦

SUMMARY

MALDI imaging:

a new technology to discover and validate new biomarkers

Within the growing field of proteomics, mass spectrometry is now established as a powerful tool for peptide and protein identification and discovery from purified samples. A new era is now beginning, with the development of MALDI imaging, maintaining the sensitivity and efficacy of both discovery and identification while additionally preserving the anatomical integrity of biomolecules like peptides, proteins, oligonucleotides and lipids within tissues. Crucial developments for sample preparations have made leaps and bounds, as it is now possible to work with freeze-dried conserved biopsies (-80°C) of more than 6 months or even conserved after paraformaldehyde fixation and paraffin embedding. The latter development has opened the door to archived tissues in hospital libraries and biomarkers hunting from tissues derived from these libraries are now a key objective. The relationship between MALDI imaging and immunocytochemistry used by the pathologist is important. The development of specific MALDI imaging using probes with a tag (peptide or organic) called «Tag-Mass» adds a whole new perspective. It is possible henceforth to localize a protein with its specific mRNA and more specifically, with its signalling pathway on the same sections or within a pathology expression phenotype from a biopsy. Development of such a technology is similar to the one that occurred several years ago for nuclear magnetic resonance (NMR) that leads the development of imaging technologies called MRI in hospital which is intensively used for pathology diagnostics. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient pour leur soutien financier le CNRS, le Ministère de la Recherche (ACI, I. Fournier), la région Nord-Pas de Calais (M. Wisztorski). Ils remercient également M. D. Maréchal (Eurogentec, Belgique), M. W. Amoyal (Société Disruptive Technology Inc, France) et M. G. Rubel (Bruker Daltonic, France) pour leur soutien et leur coopération dans ce projet.

RÉFÉRENCES

1. Karas M. Matrix-assisted laser desorption/ionization MS: a progress report. *Biochem Soc Trans* 1996 ; 24 : 897-900.
2. Aebersold R, Goodlett DR. Mass spectrometry in proteomics. *Chem Rev* 2001 ; 101 : 269-95.
3. Kuster B, Mortensen P, Andersen JS, Mann M. Mass spectrometry allows direct identification of proteins in large genomes. *Proteomics* 2001 ; 1 : 641-50.
4. Chaurand P, Stoeckli M, Caprioli RM. Direct profiling of proteins in biological tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Anal Chem* 1999 ; 71 : 5263-70.
5. Van Veelen PA, Jimenez CR, Li KW, et al. Direct peptide profiling of single neurons by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry* 1993 ; 28 : 1542-6.
6. Garden RW, Moroz LL, Moroz TP, et al. Excess salt removal with matrix rinsing: direct peptide profiling of neurons from marine invertebrates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996 ; 31 : 1126-30.
7. Caprioli RM, Farmer TB, Gile J. Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS. *Anal Chem* 1997 ; 69 : 4751-60.
8. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry: a review of methodology and applications. *Mol Cell Proteomics* 2005 ; 4 : 394-401.
9. Fournier I, Day R, Salzet M. Direct analysis of neuropeptides by *in situ* MALDI-TOF mass spectrometry in the rat brain. *NeuroEndocrinol Lett* 2003 ; 24 : 9-14.
10. Kruse R, Sweedler JV. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. *J Am Soc Mass Spectrom* 2003 ; 14 : 752-9.
11. Sweedler JV, Li L, Floyd P, Gilly W. Mass spectrometric survey of peptides in cephalopods with an emphasis on the FMRamide-related peptides. *J Exp Biol* 2000 ; 203 : 3565-73.
12. Garden RW, Shippy SA, Li L, et al. Proteolytic processing of the Aplysia egg-laying hormone prohormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 3972-7.
13. Li L, Garden RW, Floyd PD, et al. Egg-laying hormone peptides in the aplysiidae family. *J Exp Biol* 1999 ; 202 : 2961-73.
14. Reyzer ML, Caprioli RM. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. *J Proteome Res* 2005 ; 4 : 1138-42.
15. Reyzer ML, Hsieh Y, Ng K, et al. Direct analysis of drug candidates in tissue by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003 ; 38 : 1081-92.
16. Schwartz SA, Reyzer ML, Caprioli RM. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *J Mass Spectrom* 2003 ; 38 : 699-708.
17. Meistermann H, Norris JL, Aerni HR, et al. Biomarker discovery by imaging mass spectrometry: transthyretin is a biomarker for gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. *Mol Cell Proteomics* 2006 ; 5 : 1876-86.
18. Stoeckli M, Chaurand P, Hallahan DE, Caprioli RM. Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues. *Nat Med* 2001 ; 7 : 493-6.
19. Stoeckli M, Farmer TB, Caprioli RM. Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight instrument. *J Am Soc Mass Spectrom* 1999 ; 10 : 67-71.
20. Chaurand P, Schwartz SA, Billheimer D, et al. Integrating histology and imaging mass spectrometry. *Anal Chem* 2004 ; 76 : 1145-55.
21. Wisztorski M, Dreiserwer BL, Hillenkamp K, et al. Effect of metals coating for YV MALDI-a-TOF mass spectrometry imaging (MALDI MSI) and direct tissue analysis in UV/IR MALDI-o-TOF mass spectrometry. Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry, May 30-June 2, 2006, Seattle, Washington.
22. Chaurand P, Cornett DS, Caprioli RM. Molecular imaging of thin mammalian tissue sections by mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol* 2006 ; 17 : 431-6.
23. Lemaire R, Tabet WM, Day JC, et al. Organic treatments: a way for improving signal sensitivity for profiling on tissue. *Anal Chem* 2007 (sous presse).
24. Aerni HR, Caprioli RM. *In situ* proteomics in artificially created tissue microwells. Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, June 5-9, 2005. San Antonio, Texas : ASMS, 2005.
25. Rohner TC, Staab D, Stoeckli M. MALDI mass spectrometric imaging of biological tissue sections. *Mech Ageing Dev* 2005 ; 126 : 177-85.
26. Lemaire R, Wisztorski DP, Hendra M, et al. Exploring direct analysis using ionic matrices. In : Proceedings of 53rd ASMS conference on Mass Spectrometry, June 5-9, 2005. San Antonio, Texas : ASMS, 2005.
27. Lemaire RDA, Ducroy P, Tabet JC, et al. Direct analysis and MALDI imaging on formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE): application to Parkinson disease. Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry, May 30-June 2, 2006. Seattle, Washington : ASMS, 2006.
28. Lemaire R, Tabet JC, Ducroy P, et al. Solid ionic matrices for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Anal Chem* 2006 ; 78 : 809-19.
29. Aerni HR, Cornett DS, Caprioli RM. Automated acoustic matrix deposition for MALDI sample preparation. *Anal Chem* 2006 ; 78 : 827-34.
30. Crecelius AC, Cornett DS, Caprioli RM, et al. Three-dimensional visualization of protein expression in mouse brain structures using imaging mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2005 ; 16 : 1093-9.
31. Berkenkamp S, Karas M, Hillenkamp F. Ice as a matrix for IR-matrix-assisted laser desorption/ionization: mass spectra from a protein single crystal. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7003-7.
32. Kraft P, Alimpiev S, Dratz E, Sunner J. Infrared, surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry on frozen aqueous solutions of proteins and peptides using suspensions of organic solids. *J Am Soc Mass Spectrom* 1998 ; 9 : 912-24.
33. Fournier I, Wisztorski LR, Stauber M, et al. New insight in sample preparation for MALDI imaging and new developments to approach specific MALDI imaging of the transcriptome. Proceedings of 54th ASMS conference on Mass Spectrometry May 30-June 2, 2006. Seattle, Washington : ASMS, 2006.

TIRÉS À PART

I. Fournier