



**HAL**  
open science

## Imagerie par spectrométrie de masse : principes et applications

Landry Blanc, Alain Brunelle, Cecile Courreges, Nicolas Desbenoit, Isabelle Fournier, Julien Franck, Laurie Labeyrie, Sandra Mounicou, Jean-Yves Salpin, Dirk Schaumlöffel, et al.

► **To cite this version:**

Landry Blanc, Alain Brunelle, Cecile Courreges, Nicolas Desbenoit, Isabelle Fournier, et al.. Imagerie par spectrométrie de masse : principes et applications. 2021. hal-03954524

**HAL Id: hal-03954524**

**<https://hal.science/hal-03954524v1>**

Preprint submitted on 24 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial 4.0 International License

# 1

## Imagerie par spectrométrie de masse : principes et applications

**Landry Blanc,<sup>1</sup> Alain Brunelle,<sup>2</sup> Cécile Courrèges,<sup>3</sup> Nicolas Desbenoit,<sup>1</sup>  
Isabelle Fournier,<sup>4,5</sup> Julien Franck,<sup>4</sup> Laurie Labeyrie,<sup>3</sup> Sandra  
Mounicou,<sup>3</sup> Jean-Yves Salpin,<sup>6,7</sup> Dirk Schaumlöffel,<sup>3</sup> Maria Angels  
Subirana,<sup>3</sup> David Touboul,<sup>8</sup> Michael David Tuck,<sup>1</sup> Sebastiaan Van  
Nuffel,<sup>9,10</sup> et Maxence Wisztorski<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Université de Bordeaux, CNRS, Institut de Chimie et Biologie des Membranes et des Nano-objets, CBMN UMR 5248, Allée Geoffroy de Saint-Hilaire, 33600 Pessac, France.

<sup>2</sup> Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Archéologie Moléculaire et Structurale, LAMS UMR 8220, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France.

<sup>3</sup> Université de Pau et des Pays de l'Adour, E2S UPPA, CNRS, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie Pour l'Environnement et les Matériaux, IPREM UMR 5254, 2 avenue du Président Pierre Angot, 64053, Pau, France.

<sup>4</sup> Université de Lille, Inserm, CHU Lille, U1192 - Protéomique Réponse Inflammatoire Spectrométrie de Masse - PRISM, F-59000 Lille, France.

<sup>5</sup> Institut Universitaire de France (IUF), Paris, France.

<sup>6</sup> Université Paris-Saclay, UEVE, CNRS, LAMBE, 91025 Evry-Courcouronnes, France.

<sup>7</sup> LAMBE, CY Cergy Paris Université, CNRS, 95000 Cergy, France.

<sup>8</sup> Université Paris-Saclay, CNRS, Institut de Chimie des Substances Naturelles, UPR 2301, 91198, Gif-sur-Yvette, France.

<sup>9</sup> Faculty of Science and Engineering, Maastricht University, 6229EN Maastricht, Pays-Bas.

<sup>10</sup> Maastricht MultiModal Molecular Imaging Institute (M4i), Maastricht University, 6229ER Maastricht, Pays-Bas.

[Titre de l'ouvrage],

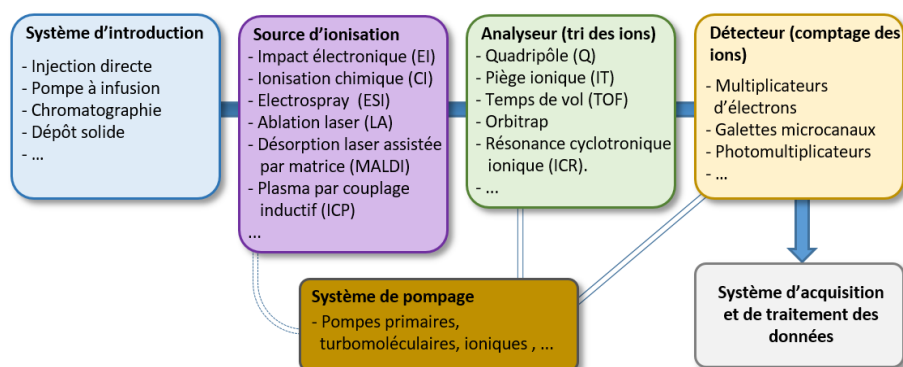
coordonné par [nom du coordonnateur]. © ISTE Editions [année de publication].

La spectrométrie de masse est une technique versatile permettant l'identification et la caractérisation structurale des espèces chimiques. L'imagerie par spectrométrie de masse va permettre d'ajouter une nouvelle dimension avec un accès direct à la visualisation de la distribution spatiale de ces mêmes espèces chimiques. Cette stratégie d'imagerie a connu un rapide essor avec toujours plus d'enjeux analytiques qui sont au cœur de ce chapitre. Celui-ci s'adresse aussi bien à des débutants qu'à des chercheurs initiés, et a pour vocation de vous décrire et illustrer l'ensemble des technologies utilisées dans le domaine de l'imagerie par spectrométrie de masse. Cet état de l'art se veut être une introduction pédagogique à l'imagerie par spectrométrie de masse afin de se familiariser avec cette stratégie analytique et ses bonnes pratiques. Pour tirer pleinement parti de cette formidable approche, des sujets généraux seront abordés de la préparation des échantillons au traitement des données, en passant par les dernières avancées méthodologiques et technologiques propres à chaque instrument.

### 1.1. Introduction à la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse, dont les prémices ont vu le jour à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, est devenue au cours du siècle dernier un outil incontournable de l'analyse structurale. Discipline relevant de la Physique pour tout ce qui confère à la conception des instruments (modes d'introduction de l'échantillon, sources d'ionisation, méthodes d'activation des ions, analyseurs permettant le tri des ions, détection des ions puis conversion des courants ioniques mesurés en spectres de masse), elle a bénéficié tout au long de sa courte histoire d'innovations majeures, récompensées par de nombreux prix Nobel en Physique et en Chimie. En termes de ruptures technologiques, on peut citer l'apparition de l'ionisation par impact électronique ou de l'ionisation chimique permettant l'analyse de molécules organiques, la mise au point de la spectrométrie de masse en tandem, et plus récemment l'avènement de l'ionisation par électronébulisation (ou electrospray ESI) ou de la désorption laser assistée par matrice (MALDI), qui ont ouvert le champ de l'analyse des macromolécules naturelles ou synthétiques (protéines, acides nucléiques, sucres, polymères,...). Par ailleurs, son couplage avec une multitude de techniques chromatographiques (chromatographie gazeuse, liquide, supercritique) ou électrophorétiques, combiné à sa grande sensibilité, ont contribué à son adoption par une très grande majorité des laboratoires d'analyse, et son application à un large éventail de domaines (analyse élémentaire, isotopique, caractérisation de surfaces, produits pharmaceutiques, cosmétiques, polluants, dopage, chimie prébiotique, techniques « omiques », *etc.*). Enfin, la fin du 20<sup>ème</sup> siècle a vu l'apparition des techniques d'imagerie par spectrométrie de masse, qui depuis connaissent un développement incessant, et dont les différents aspects sont développés dans ce chapitre.

Avant d'aborder dans le détail les différents concepts de l'imagerie par spectrométrie de masse, les principaux éléments constitutifs d'un spectromètre de masse seront brièvement rappelés. Il est important de souligner que la spectrométrie de masse n'est pas une technique universelle, en ce sens qu'il n'existe pas d'instrument dont la polyvalence permette l'analyse de tout type d'échantillons. Selon l'analyse à réaliser, la bonne combinaison introduction/source/analyseur/détecteur doit être choisie. Un spectromètre de masse se compose de six parties distinctes, schématisées par la **Figure 1.1**. Une description détaillée de ces différentes parties n'est pas l'objet de ce chapitre, mais quelques grandes lignes peuvent cependant être rappelées.



**Figure 1.1.** Schéma de principe d'un spectromètre de masse.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse sous vide poussé dont l'objectif premier est la détermination de la masse des molécules par la mesure du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) d'ions produits, analysés et détectés en phase gazeuse. Elle permet, moyennant le mode d'introduction adapté, l'analyse de tout type d'échantillons, qu'ils soient initialement solides, liquides ou gazeux. En fonction de l'échantillon à analyser, le choix de la source d'ionisation est une étape clé. La première partie du 20<sup>ème</sup> siècle a vu l'avènement de deux grands modes d'ionisation, l'impact électronique (EI) et l'ionisation chimique (CI). Leur principale limitation est qu'ils requièrent la vaporisation de l'échantillon en amont de l'ionisation. De ce fait, ces techniques d'ionisation ne permettent pas l'analyse des molécules thermosensibles ( $> 1000$  uma), mais sont aujourd'hui facilement combinables à la chromatographie en phase gazeuse, et sont particulièrement adaptées à l'analyse de petites molécules. La deuxième partie du 20<sup>ème</sup> siècle a vu l'apparition de deux méthodes d'ionisation qui ont révolutionné la spectrométrie de masse, et ont élargi son spectre d'applications à l'analyse des macromolécules synthétiques et biologiques. La première est l'ionisation par électronébulisation (ESI ou electrospray), qui permet d'une part, de produire des ions gazeux à partir

d'échantillons liquides, et d'autre part, un couplage aisé avec la chromatographie en phase liquide. La seconde, permettant d'analyser un échantillon déposé sur un support solide est la désorption laser assistée par matrice (MALDI). Ce mode d'ionisation est largement utilisé en imagerie par spectrométrie de masse, de même que d'autres techniques de désorption-ionisation (ou ablation-ionisation), telles que l'ablation laser (LA) ou la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS). Alors que ces méthodes permettent de préserver l'intégrité des molécules analysées, d'autres, au contraire, consistent à pulvériser l'échantillon afin de réaliser des analyses élémentaires. C'est le cas ainsi de l'ionisation à couplage à plasma inductif (ICP). Cette méthode d'ionisation, combinée à l'ablation laser, est également utilisée en imagerie, et sera décrite plus loin dans ce chapitre.

Outre la détermination de la masse moléculaire des échantillons, la spectrométrie de masse peut également fournir des informations sur la structure des composés, moyennant l'obtention de spectres de fragmentations. A cette fin, la stratégie consiste à transférer de l'énergie aux ions formés en phase gazeuse afin qu'ils puissent se fragmenter à l'intérieur de l'instrument. Ce transfert d'énergie peut se produire lors de l'étape d'ionisation et ainsi générer des ions fragments dans la source. C'est le cas notamment pour les méthodes EI et ICP. Lorsque la méthode d'ionisation n'est pas suffisamment énergétique, un spectre de fragmentation peut être obtenu par la réalisation d'une expérience dite de spectrométrie de masse en tandem. Celle-ci comporte plusieurs phases, démarrant par la sélection du rapport  $m/z$  de l'ion d'intérêt, son activation par une méthode d'activation (la plus répandue étant l'activation par collision avec un gaz cible : dissociation induite par collision ou CID) qui conduit à sa fragmentation, puis l'analyse des rapports  $m/z$  des ions fragments lors d'une dernière étape. Ces différentes étapes peuvent se produire au sein du même analyseur mais à des temps différents (piège ionique, orbitrap), ou dans différents analyseurs séparés spatialement. Ces analyseurs peuvent alors être du même type (les instruments les plus répandus sont les instruments dits triple-quadripôles) ou bien de type différent. Dans ce dernier cas, les instruments sont dits hybrides. Pour de plus amples détails sur ces différents concepts, le lecteur pourra notamment se référer au site internet de la Société Française de Spectrométrie de Masse (SFSM ; <https://www.sfsm.fr>).

Enfin, la phase d'interprétation des spectres et du traitement des données est particulièrement importante, notamment dans le contexte actuel de l'augmentation considérable du volume de données générées. C'est particulièrement le cas en imagerie par spectrométrie de masse, où à chaque pixel peut correspondre plusieurs spectres. Ces aspects, qui constituent une étape à part entière de l'analyse, seront également abordés dans ce chapitre.

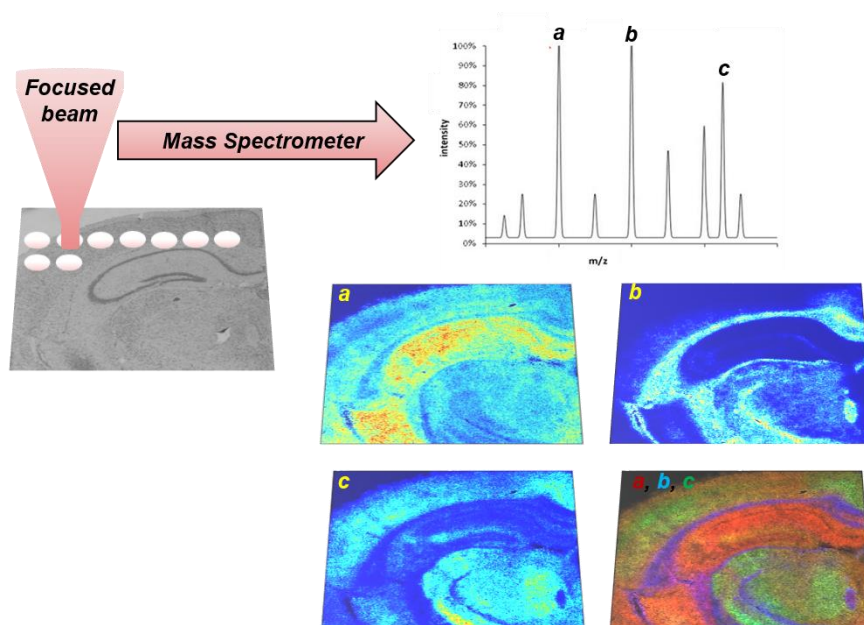
## 1.2. Contexte de l'imagerie par spectrométrie de masse

### 1.2.1. Historique

Nous pouvons considérer que l'imagerie par spectrométrie de masse ou MSI existe depuis 1962, année de la publication par Raimond Castaing et Georges Slodzian « Microanalyse par émission ionique secondaire » dans le Journal de Microscopie (Castaing et Slodzian, 1962), marquant le début de l'ère du SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry). Généralement, toute méthode de spectrométrie de masse permettant une analyse localisée, en surface ou en volume, peut aujourd'hui être qualifiée d'imagerie par spectrométrie de masse, même si ce terme n'était au début quasiment pas employé. C'est ainsi que dans les années 70 ont été mis au point les spectromètres de masse LAMMA (Laser Microprobe Mass Analyser) par Franz Hillenkamp et Raimund Kaufman, basés cette fois-ci sur une désorption par laser (Hillenkamp *et al.*, 1975), alors que parallèlement Alfred Benninghoven continuait à développer le SIMS (Benninghoven et Loebach, 1971). Avec l'avènement de la méthode MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization) et des faisceaux d'ions polyatomiques, un palier en gamme de rapport masse sur charge accessible par ces méthodes est franchi, permettant alors l'essor que nous connaissons aujourd'hui pour les méthodes d'imagerie par spectrométrie de masse MALDI et TOF-SIMS (Time-of-Flight-SIMS), en particulier dans le domaine des applications biologiques. En MALDI, c'est d'abord Bernhard Spengler en 1994 (Spengler, Hubert et Kaufmann, 1994), qui a présenté la première image, puis c'est Richard Caprioli (Caprioli, Farmer et Gile, 1997) en 1997 qui a permis d'automatiser l'imagerie MALDI *via* le développement d'un logiciel conçu par Markus Stoeckli. C'est à partir de ce moment, que le terme d'imagerie par spectrométrie de masse a été employé (Stoeckli, Farmer et Caprioli, 1999). À ces deux méthodes qui, par leur nombre d'utilisateurs, dominant énormément ce domaine, s'ajoutent aussi quatre autres méthodes, non moins importantes. Le NanoSIMS, mis au point par Georges Slodzian, et qui permet des analyses élémentaires et isotopiques à un niveau de résolution spatiale inégalé de quelques dizaines de nanomètres, le LA-ICP-MS (Laser Ablation Inductively Coupled Plasma), capable de détecter des éléments, en particulier des métaux, avec une très grande sensibilité, la sonde atomique tomographique, technique d'imagerie par spectrométrie de masse en 3-D à l'échelle sub-nanométrique, et enfin les techniques d'imagerie à pression atmosphérique telles que le DESI (Desorption ElectroSpray Ionization), le DART (Direct Analysis in Real Time), le DAPPI (Desorption Atmospheric Pressure Photoionization), *etc.*

### 1.2.2. Principe et applications

L'imagerie élémentaire ou moléculaire d'une surface correspond à la visualisation directe de la distribution des éléments, de leurs isotopes ou de molécules (endogènes ou exogènes). Plusieurs techniques (di- et tridimensionnelles) permettent de déterminer la composition élémentaire ou moléculaire des échantillons, comme la spectrométrie de fluorescence des rayons X, l'immunohistochimie, la tomographie (PET, CT), l'autoradiographie, l'imagerie par résonance magnétique (MRI), *etc.* Cependant, avec certaines de ces techniques le nombre d'éléments ou de molécules qui peuvent être cartographiés simultanément demeure limité. Par ailleurs, ces techniques nécessitent la présence préalable d'un marquage ou d'un agent de contraste. L'imagerie par spectrométrie de masse se présente comme une alternative attractive ne nécessitant pas de marquage spécifique préalable pour accéder à la distribution, la composition, la structure chimique et la quantité d'un grand nombre d'éléments ou espèces moléculaires en mélange, qu'elles soient organiques ou minérales, sur une surface ou dans un volume, de manière ciblée ou sans à priori. Son principe est le suivant : l'irradiation par un faisceau focalisé (laser pour le MALDI ou le LA pour l'ICP-MS, ions pour le SIMS, ou de solvant pour le DESI, *etc.*) de la surface d'un échantillon induisant un phénomène de désorption/ionisation en phase gazeuse des analytes. Ces derniers (sous forme ionisée) sont alors transférés et séparés selon leur rapport masse sur charge  $m/z$  dans l'analyseur. Le faisceau balaye une surface délimitée dans laquelle un spectre de masse sera généré pour chacun des pixels formant l'image acquise. Finalement, pour une valeur de  $m/z$  donnée, une carte de densité des ions détectés peut être construite sur laquelle l'intensité du signal est représentée par une échelle de couleur. Le principe en est schématisé sur la **Figure 1.2**.



**Figure 1.2.** Principe de l'imagerie par spectrométrie de masse.

Cette méthode est capable d'évaluer de subtils changements élémentaires, isotopiques, et/ou moléculaires, permettant notamment une caractérisation qualitative et quantitative d'une grande variété d'éléments et de classes de molécules minérales ou organiques (métabolites, petites molécules, polysaccharides, lipides et peptides/protéines, polymères, *etc.*). Cette approche innovante a la capacité de révolutionner notre compréhension de la matière dans de nombreux champs d'applications (recherche médicale, biologie végétale et animale, microbiologie, environnement, semi-conducteurs, analyses de surface, géologie, astrophysique, patrimoine, *etc.*) en élucidant la complexité élémentaire, isotopique, et/ou moléculaire d'un échantillon avec des résolutions spatiales allant de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres.

### 1.3. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est une étape essentielle pour l'imagerie par spectrométrie de masse. Si les précautions ne sont pas prises lors de cette étape, la distribution spatiale des composés ainsi que leur abondance peuvent s'en trouver altérées (Goodwin, 2012; O'Rourke *et al.*, 2019). La standardisation des protocoles est également fondamentale mais difficile car elle dépend de la nature de l'échantillon



et des composés à analyser. De nombreuses revues ont été publiées sur la préparation des échantillons en vue de l'analyse en imagerie par spectrométrie de masse (Chughtai et Heeren, 2010; Goodwin, 2012; Norris et Caprioli, 2013; Buchberger *et al.*, 2018; Yoon et Lee, 2018; Swales *et al.*, 2019). Nous allons passer en revue les différentes étapes de préparation à savoir : le prélèvement, la stabilisation et la conservation, la réalisation des coupes et leurs traitements. Cette partie se veut générale, quelle que soit la méthode d'imagerie MS utilisée. Des spécificités pourront être données dans les parties suivantes consacrées aux différents spectromètres de masse.

### **1.3.1. Prélèvement des échantillons**

L'imagerie par spectrométrie de masse peut s'adapter à tout type d'échantillon biologique qu'il soit animal ou végétal. Le prélèvement de l'échantillon suit les mêmes règles générales que celles de l'imagerie histologique conventionnelle. Le temps de prélèvement doit être le plus court possible et une stratégie de conservation doit être mise en œuvre rapidement. Il est donc nécessaire de planifier les différentes étapes à suivre. Pour les biopsies ou le prélèvement d'organe, la présence de sang en abondance ou de fragments d'autres tissus peuvent nécessiter un lavage avec des solutions physiologiques, généralement le PBS (tampon phosphate salin). Une alternative est la perfusion de l'animal avec une solution saline pour retirer le sang de l'organe. Il convient néanmoins de ne pas réaliser cette étape lors de la recherche de molécules (hydro)solubles pour éviter toute perte ou délocalisation. Pour certains composés, comme les métabolites, des précautions supplémentaires peuvent s'avérer nécessaires, la régulation de ces composés étant extrêmement dynamique.

### **1.3.2. Stabilisation et conservation de l'échantillon**

Dès que l'échantillon est retiré de son milieu d'origine, des cascades de processus biologiques se déclenchent. Différentes stratégies sont applicables pour le stabiliser et le conserver au plus proche de l'état initial. Le délai de mise en place de ces étapes doit être le plus court possible. Il a en effet été démontré que très rapidement à température ambiante, des molécules pouvaient être dégradées (Goodwin *et al.*, 2008; Goodwin, Iverson et Andren, 2012; Lukowski *et al.*, 2020) entraînant la disparition des signaux provenant des molécules d'intérêts et l'apparition d'artefacts.

La technique de stabilisation la plus utilisée est la congélation rapide. Le tissu est plongé dans un liquide préalablement refroidi. Un soin particulier sera apporté pour ne pas induire de déformation à cette étape. Le plus souvent, l'échantillon est mis en contact avec de l'azote liquide ou plongé dans l'isopentane refroidi avec de la glace carbonique. La température de congélation se situe entre  $-45^{\circ}\text{C}$  et  $-70^{\circ}\text{C}$ . Le temps de congélation va dépendre de la taille et de la composition de l'échantillon et varie entre 2 min et 20 min. À la suite de cette congélation rapide, les échantillons sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  et sont stables pendant environ une année. Cette stabilisation présente

l'avantage d'être directement compatible avec les différentes stratégies d'imagerie par spectrométrie de masse. Une autre alternative est une montée en température rapide, contrôlée et réalisée sous vide (Goodwin *et al.*, 2010). Cette méthode entraîne une dénaturation de la plupart des enzymes et évite la dégradation des molécules. Elle peut néanmoins altérer la structure et la forme des échantillons du fait des contraintes de la mise sous vide.

Pour augmenter la stabilité des molécules, des méthodes de fixation chimique peuvent être employées. Historiquement, la fixation au paraformaldéhyde est la technique la plus utilisée notamment pour les tissus provenant du milieu hospitalier. Cette fixation, accompagnée d'un enrobage à la paraffine (tissus FFPE, Formalyn-Fixed Paraffin-Embedded), permet une conservation sur plusieurs dizaines d'années et offre l'avantage d'une morphologie mieux préservée. Cette stabilisation repose sur la création de pontages chimiques entre les protéines, ce qui est un avantage pour la stabilité mais s'avère être un véritable défi pour l'utilisation de tels échantillons en imagerie MS. Ces tissus nécessitent donc des traitements particuliers avant l'analyse qui seront détaillés dans la partie 1.3.5.

D'autres méthodes de préservation des tissus utilisant des mélanges d'alcool ont également montré une bonne efficacité de conservation (Chaurand *et al.*, 2008) pour l'analyse des protéines et des métabolites (Urban *et al.*, 2018).

### 1.3.3. Enrobage

L'enrobage permet de stabiliser la structure morphologique de l'échantillon lors de la conservation et de l'étape de réalisation des coupes. Si l'échantillon est suffisamment grand, il peut être coupé sans enrobage. Pour les pièces les plus petites ou fragiles, il peut être nécessaire d'utiliser un milieu qui va venir entourer le tissu. Cet enrobage doit être compatible avec l'analyse en spectrométrie de masse et ne doit pas entraîner de contamination de l'échantillon. Le milieu d'enrobage couramment utilisé en histologie pour la réalisation de coupes congelées est l'OCT (Optimal cutting temperature polymer). Néanmoins, il entraîne l'apparition, sur le spectre de masse, de pics de polymères (PolyÉthylène Glycol notamment) recouvrant toute la gamme de masse entre  $m/z$  800 et  $m/z$  2000 et également responsable d'un effet de suppression de signal (Schwartz, Reyzer et Caprioli, 2003). Son emploi doit donc être exclusivement réservé pour coller l'organe à couper sur le support sans entrer en contact avec la région qui sera analysée afin d'éviter les problèmes de contaminations. D'autres composés peuvent être utilisés et ont montré une compatibilité plus importante avec l'imagerie MS. Il est possible d'enrober les échantillons dans la gélatine, l'eau pure ou la carboxyméthylcellulose (CMC). Ce dernier composé est notamment utilisé pour la réalisation de coupes sur animaux entiers. Des milieux d'enrobage spécifiques pour l'imagerie MS ont également été développés, tel que le Poly[N-(2-hydroxypropyl)méthacrylamide] (pHPMA) (Strohalm *et al.*, 2011). Ce

milieu permet d'analyser aussi bien les petites molécules que les protéines, et ne présente pas de contamination du spectre de masse. En ce qui concerne les tissus fixés au paraformaldéhyde, ils sont habituellement enrobés juste après la fixation et conservés dans la paraffine. Cette dernière devra être retirée des coupes avant l'analyse. Ces tissus ne nécessitent pas une conservation à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour assurer leur stabilité.

#### **1.3.4. Réalisation des coupes**

Pour les échantillons conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$ , l'utilisation d'un cryostat est nécessaire. Il convient de bien choisir la température de coupes en fonction des tissus. L'épaisseur des coupes varie entre 3 et 40  $\mu\text{m}$  (Sugiura, Shimma et Setou, 2006). Cette épaisseur peut influencer grandement l'analyse en entraînant des artefacts au niveau des mesures de masses. En ce qui concerne l'imagerie MALDI-TOF, l'épaisseur couramment utilisée est de 12  $\mu\text{m}$ , mais des études ont montré qu'une épaisseur inférieure pouvait contribuer à l'obtention de spectres de plus grandes qualités (Sugiura, Shimma et Setou, 2006; Shimma et Sugiura, 2014). Les coupes sont ensuite transférées sur un support compatible avec l'analyse envisagée. Ce support nécessite d'être conducteur pour une utilisation en MALDI-TOF, contrairement aux autres types de spectromètre de masse. Des précautions sont à prendre au moment du transfert de la coupe sur le support pour éviter la délocalisation des molécules ou la déformation de la coupe. En effet, une migration de lipides (Debois, Brunelle et Laprévotte, 2007) peut être observée lors du montage des coupes sur le support qui sont rapidement décongelées et peut altérer la qualité des images à haute résolution spatiale. Les coupes sont ensuite conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à utilisation. En ce qui concerne les tissus FFPE, les coupes sont réalisées en utilisant un microtome et conservées à température ambiante si les coupes sont analysées rapidement, sinon à  $4^{\circ}\text{C}$ . Avant utilisation, la paraffine est retirée (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007; Groseclose *et al.*, 2008; Wisztorzski *et al.*, 2010) et le tissu est réhumidifié en utilisant des bains de solvant.

#### **1.3.5. Traitement des coupes**

Au moment de leur utilisation, les coupes sont déshydratées, le plus souvent sous-vide, et des étapes de lavages peuvent être intégrées. Ces étapes sont à considérer avec attention suivant la classe de molécules à analyser. Pour l'analyse de petites molécules endogènes (métabolites ou lipides) ou exogènes (*e.g.* médicaments), aucun traitement des tissus n'est habituellement employé, et les lavages utilisant des solvants organiques sont à proscrire. Néanmoins, des traitements peuvent être mis en œuvre dans des cas particuliers. En effet, des études ont montré qu'il était possible d'améliorer la détection des lipides en employant des lavages avec des solutions à différents pH, comme le formiate d'ammonium (pH 6.4) ou l'acétate d'ammonium (pH 6.7) (Wang, Liu et Wu, 2011; Angel *et al.*, 2012). Pour l'imagerie TOF-SIMS, le

fait de soumettre les coupes à des vapeurs d'acide trifluoroacétique ou d'ammoniac permet d'améliorer les localisations des sulfatides, en diminuant le signal du cholestérol (Angerer, Mohammadi et Fletcher, 2016).

Pour améliorer la détection des peptides et protéines, des lavages utilisant le plus souvent des solutions d'éthanol à différentes concentrations (Schwartz, Reyzer et Caprioli, 2003), du chloroforme (Lemaire, Wisztorski, *et al.*, 2006) ou d'autres solvants ont été employés pour retirer les sels et lipides majoritaires à partir des coupes congelées (Seeley *et al.*, 2008). Concernant la détection des protéines, elles ne peuvent être détectées que jusqu'à une gamme de masse de 25 à 30 kDa sur les coupes de tissus congelées. Au-dessus de cette limite, il est nécessaire de réaliser une digestion *in situ* des protéines. La détection des protéines se fera alors indirectement à travers les peptides issus de la digestion avec la trypsine (Groseclose *et al.*, 2007; Takats *et al.*, 2008). Cette thématique sera détaillée dans la partie 5. Concernant les tissus FFPE, la digestion enzymatique *in-situ* est également employée (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007; Stauber *et al.*, 2008). Les premières études ont utilisé cette approche, permettant ainsi des analyses dans le domaine de la protéomique (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007; Groseclose *et al.*, 2008; Wisztorski *et al.*, 2010). Il est à noter qu'il est souvent nécessaire de réaliser une étape de démasquage d'antigène pour améliorer la digestion de ces tissus (Gustafsson *et al.*, 2010). Pour les tissus fixés depuis moins d'un an, des protéines peuvent également être détectées sans digestion enzymatique préalable, en utilisant des matrices réactives (ex : 2,4-dinitrophenylhydrazine) interagissant avec les pontages chimiques (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007) ou le chlorhydrate d'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH.HCl) permettant d'inverser les pontages inter- et intramoléculaires (Lee *et al.*, 2020). En ce qui concerne la détection d'autres familles de molécules comme les métabolites et les médicaments, les étapes de fixations et de déparaffinage/réhydratation peuvent entraîner une perte ou une délocalisation. Néanmoins, des lipides et des métabolites ont pu être détectés à partir de tissus FFPE (Carter, McLeod et Bunch, 2011; Ly *et al.*, 2016; Pietrowska *et al.*, 2016).

Plus récemment, différents groupes se sont attelés à l'étude de la glycosylation et notamment à la détection et la localisation des N-glycanes. Il est nécessaire dans ce cas de réaliser une digestion enzymatique en utilisant la peptide-N-glycosidase (PNGase) (Powers *et al.*, 2013; Drake *et al.*, 2018) pour libérer les polysaccharides et pouvoir les localiser. Actuellement, d'autres enzymes sont testées pour élucider les différentes structures comme les isomères de fucosylation (West *et al.*, 2020).

Des dérivations chimiques sur tissu peuvent être aussi employées pour améliorer la détection (Harkin *et al.*, 2021; Zhou, Fülöp et Hopf, 2021) ou l'identification (J. Franck *et al.*, 2009) de différentes classes de molécules (métabolites, ou molécules exogènes) plus difficilement analysables.

Ces traitements concernent essentiellement la préparation des échantillons animaux ou humains. Concernant les plantes, des préparations spécifiques peuvent être nécessaires (Dong *et al.*, 2016; Heyman et Dubery, 2016). Des traitements supplémentaires peuvent dépendre de la technique d'imagerie MS utilisée et leurs spécificités seront explicitées dans les parties suivantes.

### **1.3.6. Spécificités de la préparation des échantillons pour l'analyse NanoSIMS**

Le NanoSIMS fonctionne sous un vide poussé inférieur à  $10^{-10}$  hPa où l'échantillon est exposé à un faisceau d'ions à haute énergie, ce qui nécessite des stratégies spécifiques pour la préparation de l'échantillon. Afin de résister au vide poussé, l'échantillon doit être déshydraté. En outre, les échantillons doivent être plats sans aucune topographie pour éviter les artefacts lors de l'ionisation, et enfin la surface de l'échantillon doit être conductrice pour éviter les effets de charge par l'impact du faisceau d'ions primaires. Les échantillons secs et solides tels que les roches en géologie ou les alliages en science des matériaux, peuvent être polis ultrafin à l'aide d'une polisseuse. Les échantillons non conducteurs sont revêtus de métal (Au, Pt) à l'aide d'un métalliseur pour fournir la conductivité. Les échantillons amorphes et humides tels que les sédiments doivent être séchés et incorporés dans un matériau stable sous vide tel que la résine époxy avant le polissage et le revêtement métallique.

Le plus difficile est la préparation d'échantillons biologiques (Grovenor *et al.*, 2006; Schaumlöffel *et al.*, 2016). En raison de leur teneur en eau, les tissus biologiques ne sont pas compatibles avec NanoSIMS. Le principal objectif de l'échantillonnage et de la préparation d'échantillons biologiques pour NanoSIMS est de maintenir les éléments chimiques à leur place d'origine et à leur site physiologique actif dans une cellule ou un tissu. Une stratégie adéquate doit donc empêcher toute délocalisation de molécules biologiquement pertinentes telles que les protéines ou les lipides ainsi que les ions métalliques. Les différentes étapes sont le prélèvement, l'immobilisation de la structure biologique (fixation), l'élimination de l'eau (déshydratation et enrobage de résine) et la coupe ultra-fine de l'échantillon.

L'échantillonnage de tissus biologiques entraîne une perturbation de l'approvisionnement en sang et un changement soudain de l'osmolarité ionique des fluides environnants, ce qui est d'une importance particulière lors de la bioimagerie d'éléments hautement diffusibles, y compris les métaux. L'étape d'échantillonnage, si elle est réalisée dans des conditions expérimentales inadéquates ou prolongées dans le temps, peut entraîner de sérieuses modifications de la distribution des ions diffusibles inorganiques tels que  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Certains oligo-éléments, tels que les métaux essentiels, peuvent être liés plus fortement aux macromolécules

(acides nucléiques, protéines, enzymes) et aux structures (membranes) ; cependant, une fixation efficace du tissu doit être effectuée immédiatement après le prélèvement.

Le but de la fixation des échantillons biologiques est de préserver l'intégrité structurelle et chimique (y compris la distribution d'origine des éléments chimiques) des cellules et de leurs composants avec un minimum d'altération et de redistribution par rapport à l'état vivant. Cela comprend l'arrêt de toutes les réactions biochimiques ainsi que la prévention de la putréfaction et de l'autolyse. En outre, la fixation protège les échantillons de la perturbation pendant la déshydratation, l'inclusion de résine et la coupe. Plusieurs méthodes de fixation existent sur une base chimique ou physique. La fixation chimique est réalisée en créant des réticulations artificielles entre des protéines (en utilisant des aldéhydes) ou des lipides / acides nucléiques (en utilisant du tétraoxyde d'osmium), afin de rendre ces molécules insolubles dans l'eau et les solvants organiques, et bloquer les systèmes enzymatiques pour éviter tout changement ultérieur. Les méthodes chimiques procèdent à la déshydratation en plaçant des échantillons dans des bains de solvant avec des concentrations croissantes, puis en les incorporant dans une résine hydrophobe. Cependant, cette procédure peut conduire à une redistribution des éléments diffusibles tels que les métaux. Cette dernière peut être limitée par des techniques de cryo-fixation, qui reposent sur la diminution rapide de la température en dessous de  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pour réaliser l'immobilisation à un moment connu et fixer les éléments diffusibles à leurs sites d'action intracellulaires. La cryo-fixation vise à éviter la formation de cristaux de glace afin de ne pas détruire la structure des cellules biologiques. La technique la plus avancée pour la cryo-fixation est la congélation à haute pression, où l'échantillon est pressurisé à 2100 bars et refroidi séquentiellement avec de l'azote liquide pendant quelques millisecondes (Kaech, 2008). De cette manière, l'eau est transformée à l'état vitreux (glace amorphe) et la formation de cristaux de glace est considérablement réduite. Les étapes suivantes sont la cryo-substitution ou la lyophilisation pour la déshydratation et l'incorporation de résine.

La dernière étape est la section de l'échantillon biologique inclus dans la résine à l'aide d'un couteau en diamant sur un ultra-microtome. L'épaisseur habituelle d'une coupe pour l'analyse NanoSIMS est de 300 nm. Les coupes sont placées sur des wafers de silicium, ce qui assure la conductivité. Ainsi, un revêtement métallique n'est pas nécessaire. Ces échantillons préparés peuvent être stockés jusqu'à l'analyse pendant une longue période à température ambiante dans un environnement propre et sans poussière.

### **1.3.7. Spécificités de la préparation des échantillons biologiques pour l'analyse TOF-SIMS**

La préparation des échantillons est une étape cruciale pour les expériences TOF-SIMS. Cette technique nécessite tout d'abord que l'échantillon soit compatible avec un environnement ultra-vide (UHV), ce qui est incompatible avec la teneur élevée en eau des cellules et des tissus. Il faut donc avoir recours à des méthodes de préparation spécifiques aux échantillons biologiques, inspirées de celles utilisées depuis les années 1950 en microscopie électronique (EM) (Steere, 1957), qui respectent à la fois l'intégrité physique mais aussi chimique du matériau étudié. Deux voies d'introduction des échantillons biologiques sous vide, se distinguent : à l'état déshydraté ou à l'état congelé. Toutefois, la déshydratation induit des changements importants de composition en raison de l'élimination complète des composants volatils, et soumet l'échantillon à des contraintes mécaniques. Il a aussi été montré que l'introduction sous vide d'une coupe de tissu déshydratée peut conduire à la migration de certains lipides en surface (Sjövall, Johansson et Lausmaa, 2006). Au contraire, l'échantillon dans un état hydraté congelé peut être analysé avec un porte-échantillon refroidi par cryogénie à une température inférieure à  $-120^{\circ}\text{C}$ , en dessous de laquelle la recristallisation ne se produit pas. Ceci est appelé le cryo-TOF-SIMS et est conceptuellement analogue à la cryo-microscopie électronique. Ce cryo-TOF-SIMS permet d'analyser l'échantillon dans un état aussi natif que possible. Ces références (Winograd et Bloom, 2015; Yoon et Lee, 2018) fournissent des informations détaillées sur les protocoles de préparation d'échantillons pour l'imagerie chimique TOF-SIMS de cellules ou autres tissus biologiques.

## **1.4. Ablation laser couplée à la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (LA-ICP-MS)**

### **1.4.1. Principe**

#### **1.4.1.1. Principe général du couplage LA-ICP-MS**

La technique d'ablation laser permet de prélever une partie d'un échantillon solide qui est transportée vers un spectromètre de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS) pour son analyse élémentaire (Gray, 1985; Durrant, 1999; Russo *et al.*, 2002; Koch et Günther, 2011). Cette technique a vu le jour pour la caractérisation des matériaux réfractaires qui ne peuvent pas être mis en solution avant analyse. Ainsi, un des avantages majeurs de la technique est qu'elle ne nécessite pas ou peu de préparation d'échantillon. De ce fait, l'intégrité de l'échantillon peut être préservée et les risques de contamination sont limités. Aussi sa haute sensibilité de détection ( $10^{-4}$  -  $10^{-1}$  ppm) et sa résolution spatiale ( $\mu\text{m}$ ) permettent de limiter la quantité de matière ablatée de seulement quelques femtogrammes à quelques microgrammes. Le mode

imagerie en LA-ICP MS consiste à ablater totalement la surface d'un échantillon selon des trajectoires linéaires espacées de façon régulière pour ainsi déterminer la distribution des éléments chimiques et leurs isotopes dans l'échantillon solide.

#### **1.4.1.2. Descriptif du dispositif**

##### **a) Le module laser**

La source laser est constituée d'un milieu amplificateur qui peut être de différentes natures (gaz, solide, liquide) et dont le principe est basé sur le processus d'émission stimulée (Durrant, 1999). Le module est composé d'une cellule d'ablation étanche, montée sur un plateau qui se déplace dans les trois directions de l'espace. Un système de lentilles permet de focaliser le faisceau laser à la surface de l'échantillon et de régler sa taille. Un microscope équipé d'une caméra permet de régler la zone à ablater et de suivre la qualité de l'ablation. L'interaction entre le laser et la matière dépend des paramètres du laser et des propriétés de l'échantillon (optiques, mécaniques et thermiques) (Durrant, 1999). Lorsque le laser interagit avec la matière, trois phénomènes successifs interviennent. La première étape consiste en l'absorption de l'énergie incidente provoquant l'échauffement de la surface du solide. Si l'énergie incidente ne peut pas être dissipée, le matériau subit une fusion puis une évaporation. Lorsque l'énergie est suffisamment importante et l'impulsion du laser suffisamment courte, une sublimation de la surface a lieu, provoquant ainsi l'explosion du matériau et l'éjection de particules solides. La seconde étape se caractérise par la formation d'un micro-plasma au-dessus de la surface de l'échantillon. L'expansion de ce plasma va générer l'onde de choc observée dans la troisième étape.

##### **b) Le couplage de l'ablation laser avec le détecteur ICP-MS**

Le module d'ablation laser est traversé par un flux de gaz (argon ou hélium) (Horn et Günther, 2003; Luo *et al.*, 2017, 2018) qui emporte la matière ablatée vers le spectromètre de masse grâce à un simple tuyau. L'analyse peut se faire en plasma sec ou en plasma humide. Ce dernier est caractérisé par l'addition d'une solution nébulisée avant l'entrée dans la torche à plasma. Ce plasma d'argon à très haute température permet de vaporiser, atomiser et ioniser les particules introduites. Les ions formés passent ensuite par une interface composée de cônes et de lentilles qui permettent respectivement d'abaisser la pression à un vide primaire, et de refocaliser le faisceau d'ions avant son entrée dans l'analyseur où les ions sont séparés avant d'être détectés.



## 1.4.2. Instrumentation et spécificités

### 1.4.2.1. Caractéristiques du module laser

Il existe plusieurs types de laser (**Tableau 1.1.**) se différenciant par le milieu actif, leur longueur d'onde d'émission, la durée de l'impulsion et leur fréquence de tir. La durée d'impulsion est de l'ordre de la nanoseconde ou de la femtoseconde. Le rubis a été la première source laser utilisée mais son application s'en est trouvée limitée à cause des faibles résolutions spatiales et des fréquences de tir réduites. Les lasers nanosecondes Nd:YAG émettant à 213 et 266 nm ainsi que l'excimère (ArF, 193 nm) sont les plus couramment utilisés de nos jours dans le domaine de l'analytique. Les lasers femtosecondes combinés à une haute fréquence de tir, offrent l'avantage de réaliser des ablations plus nettes mais ils sont moins répandus du fait de leur coût plus onéreux (Fernández *et al.*, 2007; Glaus *et al.*, 2010; d'Abzac *et al.*, 2020; Luo *et al.*, 2020). La cellule d'ablation est aussi une pièce maîtresse du dispositif, car elle impacte la sensibilité de détection de la technique. Différentes cellules d'ablation sont disponibles et continuent d'être développées (Van Malderen *et al.*, 2016; Van Malderen, Van Acker et Vanhaecke, 2020). Elles varient selon leur géométrie qui détermine l'efficacité du transport de l'aérosol, leur volume et leur temps de rinçage, paramètres particulièrement importants en imagerie. Des cellules cryogéniques peuvent être utilisées avec des températures avoisinant  $-100^{\circ}\text{C}$ , ce qui est particulièrement intéressant pour l'analyse d'échantillons biologiques frais (Feldmann, Kindness et Ek, 2002; Monk et Lev, 2013; Konz, Fernández, Fernández, Pereiro et Sanz-Medel, 2014).

### 1.4.2.2. Performances des couplages LA-ICP-MS avec différents analyseurs

Il existe diverses configurations de couplage de lasers avec les différents ICP-MS. Les lasers UV couplés à des ICP-MS quadripolaire (Q) sont les plus démocratisés (Van Acker *et al.*, 2016; Arnaudguilhem *et al.*, 2021). Le couplage de lasers à un ICP-MS avec un analyseur à temps de vol (ICP TOF MS) permet l'acquisition du spectre de masse élémentaire entier en quelques dizaines de  $\mu\text{s}$ , faisant de cet instrument le détecteur idéal pour l'imagerie élémentaire à haut débit (Gundlach-Graham *et al.*, 2015; Bauer *et al.*, 2019). Des images 3D sont également réalisables (Burger *et al.*, 2015). Les ICP-MS à secteur magnétique (ICP-SF MS) (Konz, Fernández, Fernández, Pereiro, González-Iglesias, *et al.*, 2014; Löhr *et al.*, 2018; Pisonero *et al.*, 2019), ou triple quadripolaire (ICP-QQQ MS) (Bishop *et al.*, 2016; Crone *et al.*, 2019) sont aussi utilisés en couplage laser pour éliminer les interférences isobariques ou polyatomiques, et atteindre des limites de détection les plus basses. Enfin, les couplages laser avec l'ICP MS à multicollecion (MC-ICP-MS) sont aussi développés pour l'étude des rapports isotopiques (Lugli *et al.*, 2017; C. Zhang *et al.*, 2020). Les performances de couplages sont présentées dans le **Tableau 1.1.** à titre d'exemples.

D'une façon générale, avec des tailles de faisceau laser de quelques  $\mu\text{m}$  à  $100 \mu\text{m}$ , des limites de détection absolues de quelques femtogrammes à quelques attogrammes et des limites de détection de quelques  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , à quelques  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  peuvent être atteintes en fonction de l'élément mesuré (Van Acker *et al.*, 2016, 2019).

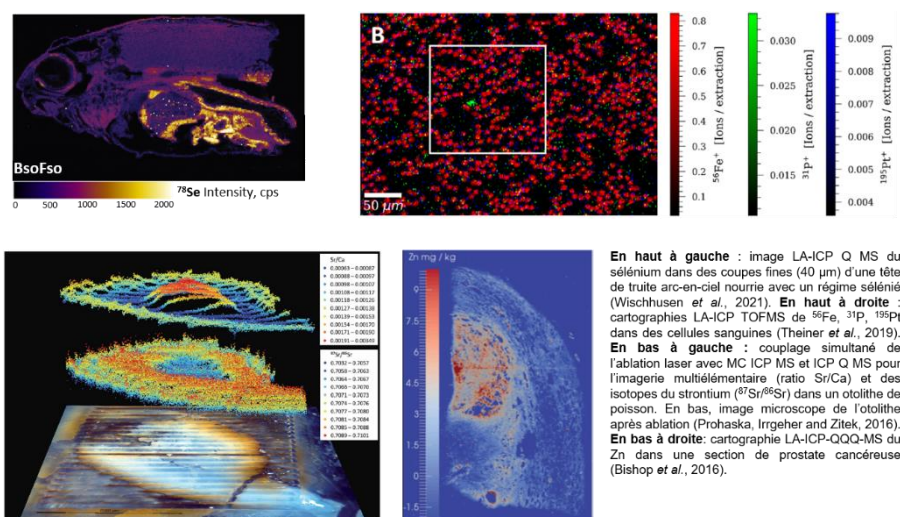
Nature de la source laser	Longueur d'onde (nm)	Durée de l'impulsion Fréquence de tir Energie par tir - Fluence	Analyseur	Performances
Nd:YAG	1064, 532 355, 266, 213	4-100 ns 1-100 Hz (Shimma et Sugiura, 2014) 1 mJ (UV) - 0,5 J (IR) - 25 J/cm <sup>2</sup>	Q	266 nm - 100 $\mu\text{m}$ - 20 Hz - 100 $\mu\text{m/s}$ - 17.9 J/cm <sup>2</sup> 50 ng/g (Voss <i>et al.</i> , 2017)
			SF	213 nm - 10 $\mu\text{m}$ - 20 Hz - 5 $\mu\text{m/s}$ - 2.38 J/cm <sup>2</sup> Quelques ng/g (Cruz-Alonso <i>et al.</i> , 2019)
			QQQ	213 nm - 100 $\mu\text{m}$ - 20 Hz - 400 $\mu\text{m/s}$ - 0.3 J/cm <sup>2</sup> 10 $\mu\text{g/L}$ - 12,5 cm <sup>2</sup> en 8 à 14h (Kysenius <i>et al.</i> , 2019)
Excimère (UV)	XeCl 308	10-100 ns 1-100 Hz 2 mJ - 15 J/cm <sup>2</sup>	Q	193 nm - 10 $\mu\text{m}$ - 20 Hz - 23 $\mu\text{m/s}$ - 1.4 mJ Dizaine de ng/g (González de Vega <i>et al.</i> , 2017)
	KrF 248		TOF	193 nm - 5 $\mu\text{m}$ - 100 Hz - 500 $\mu\text{m/s}$ - 15 J/cm <sup>2</sup> 0.2 $\mu\text{g/g}$ - 60 mm <sup>2</sup> (2,4 millions de pixels) en 12h (Rubatto <i>et al.</i> , 2020)
	ArF 193		QQQ	193 nm - 50 et 5 $\mu\text{m}$ - 200 et 20 $\mu\text{m/s}$ 1 ng/g (50 $\mu\text{m}$ ) et 48 ng/g (5 $\mu\text{m}$ ) (détection atome oxydé) (Clases <i>et al.</i> , 2019)
	F <sub>2</sub> 157		MC	193 nm - 20-53 $\mu\text{m}$ - 4 Hz - 3 J/cm <sup>2</sup> <0.026% ( <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb/ <sup>206</sup> Pb) et <0.41‰ ( <sup>34</sup> S/ <sup>32</sup> S) (Bao <i>et al.</i> , 2017)
Ti:Saphir	800, 795, 266, 265, 200, 196, etc ...	0,0001 - 0,0004 ns 1-100 000 Hz (Aramendía <i>et al.</i> , 2015)	MC	775 nm quadruplé en 194 nm - 30 $\mu\text{m}$ - 100 Hz - 20 $\mu\text{m/s}$ - jusqu'à 3,5 mJ 2‰ ( $\delta^7\text{Li}$ ) (Steinmann <i>et al.</i> , 2019)
KGW dopé Yb	1030, 515, 257	0,5 mJ	SF	1030 nm - 21 $\mu\text{m}$ - 30 000 Hz - 30 $\mu\text{m/s}$ - 39 J/cm <sup>2</sup> 40 à 500 ng/L (Aramendía <i>et al.</i> , 2015)

**Tableau 1.1.** Caractéristiques des lasers nanosecondes (Nd:YAG, Excimère) et femtosecondes (Ti:Saphir et KGW dopé Yb) et les performances associées à leur couplage avec les divers analyseurs en ICP-MS. Caractéristiques : Paramètres de l'appareillage = Longueur d'onde – Taille du faisceau – Fréquence de tir – Vitesse de

scan – Energie ; Performances analytiques = Limite de détection – Taille de l'échantillon et durée de l'acquisition – Précision.

#### 1.4.2.4. Applications

En mode imagerie, la technique de LA-ICP-MS permet d'étudier différents types d'échantillons dans des domaines très variés. Elle est utilisée en géologie, en archéologie (signature isotopique), en sciences des matériaux (caractérisation chimique), en environnement (suivi de pollution), en biologie ainsi que dans le domaine médical (étude de pénétration de médicaments, localisation de marqueurs). La **Figure 1.3.** illustre des exemples de cartographies obtenues par cette technique avec différents analyseurs en ICP-MS.



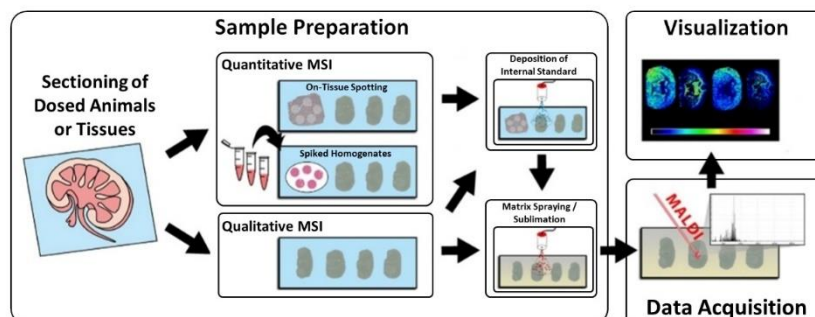
**Figure 1.3.** Exemple de cartographies élémentaires et isotopiques obtenues par le couplage de l'ablation laser avec différents ICP MS (quadripôle (Q), à temps de vol (TOF), multi-collecteur (MC) et triple quadripolaire (QQQ)) (Bishop *et al.*, 2016; Prohaska, Irrgeher et Zitek, 2016; Theiner *et al.*, 2019; Wischhusen *et al.*, 2021).

### 1.5. Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

#### 1.5.1. Principe

Alors que l'imagerie par spectrométrie de masse peut être effectuée avec de nombreuses sources d'ions (détaillées tout au long de ce chapitre), l'imagerie MALDI est la plus populaire à ce jour. L'imagerie MALDI commence suite à l'application d'une matrice sur un substrat, le plus souvent une section de tissu biologique comprise

entre 10 et 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les matrices MALDI partagent généralement des propriétés similaires : un faible poids moléculaire, la capacité de recevoir ou de donner un proton, des doubles liaisons conjuguées pour une forte absorption optique, et sont couramment fonctionnalisées avec des groupes polaires permettant leur dissolution dans des solutions aqueuses. Bien que le mécanisme exact de ce processus physique soit toujours en questionnement, il est postulé que la matrice (Lin *et al.*, 2021) absorbe l'énergie laser induisant un phénomène de désorption et ionisation en phase gazeuse des analytes de la surface des tissus. Les lasers MALDI, tels que les lasers à l'azote ( $\text{N}_2$ ) ou au grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:YAG) fonctionnent généralement dans la gamme ultraviolette, mais peuvent également être appliqués dans les longueurs d'onde proche infrarouge (NIR) avec des lasers Nd:YAG. En phase gazeuse, des molécules ionisées sont alors introduites dans l'analyseur du spectromètre de masse à travers un système de vide ou un guide ionique. Les analytes sont ensuite détectés par un analyseur de masse spécifique, tels que les analyseurs à temps de vol (TOF), les pièges à ions, les quadripôles, ou encore les analyseurs de masse à haute résolution de masse basés sur la transformée de Fourier (FT), incluant les spectromètres de masse à résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) ou Orbitrap. Pour en revenir au principe, l'impulsion laser déclenche l'événement MALDI, ce qui donne un spectre de masse qui comprend des petites molécules ionisées et une matrice, des métabolites et jusqu'à des molécules de plus haut poids moléculaires comme des protéines, glycanes et saccharides. Le laser va balayer une surface délimitée d'un tissu en collectant des spectres de masse à chaque position (chaque pixel MSI), les cartes ioniques de valeurs  $m/z$  sont alors construites et permettent d'accéder à un profil moléculaire *in situ*. La **Figure 1.4.** illustre l'approche qualitative et quantitative d'imagerie MALDI. Le traitement des données et la quantification sont présentés respectivement en partie 9 et 10.



**Figure 1.4.** Principe schématique de l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI. Adapté de la publication de Schulz (Schulz *et al.*, 2019) Sous la licence Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### 1.5.2. *Choix de la matrice et méthode de dépôt*

La préparation des échantillons est une partie essentielle voire cruciale de l'imagerie MALDI. Il n'existe pas de méthode unique pour couvrir l'ensemble des classes de biomolécules. L'un des plus grands défis de la préparation d'échantillons concerne la délocalisation des analytes et la préservation de la distribution *in vivo* des biomolécules d'intérêt.

Suite aux préceptes de la préparation des échantillons décrits précédemment, une étape supplémentaire et spécifique de préparation sera nécessaire avant toute acquisition en imagerie MALDI. En effet, le choix de la matrice MALDI est critique tout autant que sa méthode d'application. La matrice doit répondre aux deux critères suivants : une bonne absorption à la longueur d'onde du faisceau laser, et induire efficacement l'ionisation de l'analyte tout en limitant sa fragmentation. Le développement de nouvelles matrices MALDI est toujours en cours ; une revue de Calvano *et al.* donne un aperçu des dernières avancées dans le développement de matrices MALDI pour les composés de bas poids moléculaires (Calvano *et al.*, 2018). Selon les données du site Metaspac2020 (<https://metaspac2020.eu/datasets/summary?tab=Summary>) collectant des données de plus de 4000 expériences MALDI-MSI, les matrices MALDI les plus fréquemment utilisées par cette communauté sont l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) pour le mode d'ionisation positif. Ces matrices sont populaires car elles permettent l'analyse d'un large éventail de composés tels que les lipides, les métabolites, les médicaments, les peptides, ou les N-glycanes. La 9-amino acridine (9AA) et le 1,5-diaminonaphtalène (1,5-DAN) sont les deux matrices les plus courantes pour le mode d'ionisation négatif toujours selon ce même site. Ces matrices ont une large application pour les molécules de faible masse, telles que les métabolites ou les lipides. Cependant, la sensibilité pour des classes distinctes de biomolécules peut varier lors de l'utilisation de différentes matrices MALDI, et certaines études se sont efforcées de déchiffrer la spécificité des analytes selon les matrices couramment appliquées (Perry *et al.*, 2020). Une alternative à ces matrices dites conventionnelles, serait l'utilisation de matrices ioniques (Meriaux *et al.*, 2010). Celles-ci peuvent être liquides ou solides et doivent permettre d'améliorer significativement le rendement d'ionisation. Ces matrices sont également utilisées pour les familles de molécules précédemment mentionnées ainsi que pour les polysaccharides (Veličković *et al.*, 2014). Concernant les molécules de plus haut poids moléculaire telles que les protéines native, l'acide sinapinique (SA) sera préférentiellement utilisée en mode d'ionisation positif.

Après le choix de la matrice, son application est primordiale et des paramètres doivent être pris en compte tels que la taille des cristaux, l'homogénéité du dépôt de la matrice, l'extraction de l'analyte et la reproductibilité de l'application. La taille des cristaux de matrice (Trimpin, Räder et Müllen, 2006) ainsi que l'épaisseur de la couche

de matrice sur la surface de l'échantillon, auront un impact sur la résolution latérale et la sensibilité de l'analyte. Malheureusement, aucune application de matrice universelle n'existe, et celles présentées ci-dessous ont leurs forces et leurs faiblesses. En utilisant un appareil de sublimation, un dépôt homogène et des cristaux de matrice fins sont obtenus (Benettoni *et al.*, 2019). Plus la taille des cristaux est petite, plus il sera aisé d'atteindre des résolutions spatiales élevées. Cependant, cela se fera au détriment de l'extraction de l'analyte car il n'y a pas d'interface de solvant avec la surface du tissu et de la matrice (Gemperline, Rawson et Li, 2014). Le processus est effectué en chauffant la matrice sous vide et en refroidissant le substrat afin que les molécules de la matrice en phase gazeuse se condensent sur le tissu. Pour pallier le manque de solvant, une étape de recristallisation peut être réalisée si nécessaire (Yang et Caprioli, 2011).

La matrice peut également être déposée par nébulisation sur le tissu, soit par un aérographe de peintre (Warren, Mitchell et Gates, 2018), soit par un système conçu artisanalement (Bouschen *et al.*, 2010; Stoeckli et Staab, 2015), ou bien par des nébuliseurs automatiques commerciaux. Cette méthode de nébulisation est basée sur l'utilisation d'un solvant ou d'un mélange de solvants pour appliquer la matrice, et nécessite des optimisations pour extraire les analytes spécifiques. En fonction du mélange de solvants et de « l'humidité » du nébulisât, l'extraction des molécules pourra être optimisée, mais avec une éventuelle délocalisation qu'il faudra considérer pour définir la résolution spatiale avant acquisition. Un équilibre approprié doit être trouvé entre nébulisât, considéré trop humide ou trop sec. Dans ce dernier cas, il se peut que l'extraction des analytes ne soient pas suffisamment efficace. La reproductibilité est une préoccupation pour la nébulisation manuelle, en particulier d'une personne à l'autre. Les nébuliseurs automatiques permettent de résoudre ce problème de variabilité humaine tout en contrôlant des variables telles que la distance de pulvérisation, la température de la buse, les conditions de pression et la température du substrat. A travers ces quelques lignes, il est aisé de comprendre qu'il s'agit bien là d'une histoire de compromis afin d'obtenir le meilleur rendement d'ionisation à la meilleure résolution spatiale.

### **1.5.3. Imagerie MALDI des lipides, métabolites, et petites molécules**

Les lipides, métabolites et les petites molécules telles que, à titre d'exemple, les neurotransmetteurs ou encore les principes actifs, sont les classes de molécules les plus étudiées dans le domaine de l'imagerie MALDI (Aichler et Walch, 2015). Cela s'explique en raison de leur abondance relative au sein du tissu comparée à celle des macromolécules décrites dans le paragraphe suivant (protéines, glycanes, polysaccharides, *etc.*), ainsi qu'à la disponibilité des méthodes adéquates et déjà bien établies afin de les détecter. Comme décrit dans les paragraphes précédents, les étapes en amont sont primordiales. De nombreuses applications ont été répertoriées dans la littérature.

Les lipides sont les composés entrant majoritairement dans l'architecture de toutes les membranes cellulaires et jouent un rôle crucial dans le métabolisme des cellules de tous les organismes. En particulier, les phospholipides ont un rôle important dans la transduction du signal et sont donc d'une grande importance dans de nombreux processus pathologiques (Lee, Olson et Evans, 2003; Abrass, 2004). Un autre exemple est l'étude du cancer dans lequel les modifications du métabolisme lipidique en sont les principaux facteurs (Paradisi *et al.*, 2010; Santos et Schulze, 2012). L'analyse des profils de métabolites endogènes dans les tissus peut conduire à une compréhension plus approfondie des mécanismes liés à la maladie. Contrairement aux méthodes conventionnelles de chromatographie liquide ou gazeuse, le développement de l'imagerie MALDI a permis d'accéder à la distribution d'une large variété de composants du métabolisme cellulaire. Dans un modèle de troubles de la perfusion cérébrale chez le rat, 30 métabolites ont été répertoriés avec des distributions individuelles spécifiques (Miura *et al.*, 2010). Les études traditionnelles de distribution de médicaments étaient principalement menées par autoradiographie. Cette dernière nécessitait l'utilisation d'un marquage avec des produits chimiques radioactifs et permettait de suivre seulement un seul composé. Il ne fait aucun doute que l'imagerie MALDI a révolutionné ce champ d'application. A titre d'exemple, Blanc *et al.* ont étudié la distribution d'antibiotiques dans le cadre d'une pathologie infectieuse, la tuberculose (Blanc, Lenaerts, *et al.*, 2018).

Cependant, il est à noter que certaines de ces molécules ont une faible efficacité d'ionisation en imagerie MALDI. Plusieurs groupes ont adopté des stratégies prometteuses afin d'améliorer la sensibilité sur l'ensemble du spectre, des analytes spécifiques ou des classes d'analytes. A titre d'exemple, la dérivation chimique a été appliquée à divers composés comme les neuropeptides (Zimmerman *et al.*, 2018), les neurotransmetteurs (Shariatgorji *et al.*, 2014), les métabolites (Fülöp *et al.*, 2020), *etc.* Cela permet à ces molécules d'être détectées plus facilement qu'elles ne le seraient sans ces modifications en ajoutant un groupe fonctionnel favorisant significativement l'ionisation (Manier *et al.*, 2011).

#### **1.5.4. Imagerie MALDI des peptides/protéines et Stratégie d'identification des protéines**

Afin de mieux comprendre les processus physiologiques et physiopathologiques ainsi que les mécanismes moléculaires impliqués, il est important de pouvoir étudier les biomolécules concernées directement dans leur microenvironnement. Parmi ces biomolécules, les protéines sont des acteurs essentiels du trafic cellulaire et s'associent en complexes protéiques pour exercer une activité biologique. Elles assurent un très grand nombre de fonctions incluant des rôles structurels, de soutien, de transport ou de signalisation. Une grande partie va également servir à l'élaboration ou la

dégradation d'autres molécules par des activités enzymatiques. Dans ce contexte, l'imagerie par spectrométrie de masse MALDI est une technique parfaitement adaptée pour détecter et localiser des protéines dans leur contexte biologique tel que des régions localisées de coupes de tissus issues de biopsies. Les protéines étant très dynamiques, une préparation particulière de l'échantillon doit être réalisée pour éviter toute perte ou dégradation. La conservation de l'échantillon va donc jouer un rôle important tout comme la réalisation des coupes et leur préparation. Ces différents points ont été précédemment évoqués notamment au niveau de la partie 1.3. La détection des protéines intactes est réalisable à partir de tissus congelés en considérant que les tissus fixés et enrobés dans la paraffine (FFPE) contiennent des protéines pontées chimiquement. Il convient alors de réaliser des lavages pour simplifier la matrice biologique notamment en retirant les lipides, les sels et autres interférents pouvant empêcher la bonne détection des protéines (partie 1.3.5) à l'aide de solvants organiques. La matrice MALDI la plus couramment utilisée pour les analyses de MALDI-MSI des protéines est l'acide sinapinique (SA) (Beavis, Chait et Fales, 1989) bien que d'autres matrices telles que la 2,5-dihydroxyacetophénone a également été utilisée (Wenzel *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'utilisation de matrices ioniques pouvaient améliorer la détection des protéines jusqu'à environ 30kDa par rapport à la matrice SA (Julien Franck *et al.*, 2009). Associées à des détecteurs de haut poids moléculaire certaines préparations d'échantillons incluant le HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol) et le TFE (2,2,2-trifluoroéthanol) ont permis de localiser des protéines intactes jusqu'à 70kDa et d'en détecter jusqu'à 110kDa (Franck *et al.*, 2010; Remoortere *et al.*, 2010).

Une stratégie permettant l'analyse des protéines de plus de 30kDa repose sur la digestion enzymatique *in situ*. Dans ce cas la digestion doit être réalisée préalablement au dépôt de la matrice. Cette approche permet de localiser les protéines sur la base des peptides de digestion ainsi générés. La préparation de l'échantillon est alors identique à celle employée pour la détection de protéines intactes avec une étape de dépôt de l'enzyme mais la matrice utilisée sera alors adaptée à la détection de peptides. Les matrices les plus couramment utilisées sont l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) et l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB). Également, l'utilisation de matrices ioniques solides ont permis d'améliorer la détection des peptides notamment dans le cas d'application de la matrice par micro-dépôts et par nébulisation (Lemaire, Tabet, *et al.*, 2006; Julien Franck *et al.*, 2009). Cette méthode est la seule actuellement utilisée pour analyser les protéines à partir de tissu FFPE.

Les protéines ainsi détectées et localisées peuvent également être identifiées et de nombreuses stratégies ont ainsi été développées à travers des approches top-down et bottom-up *in situ*.



L'identification des protéines imagées en MS est un aspect majeur puisque l'imagerie MS met en évidence des marqueurs de processus physiologiques ou patho-physiologiques. L'identification des protéines reste cependant bien plus complexe que celle des composés de faible poids moléculaire, endogènes ou exogènes, tels les métabolites, les lipides et les médicaments entre autres. L'imagerie MS des protéines est principalement réalisée à l'aide d'une source MALDI générant des ions faiblement chargés ( $<2$ ) et dans la plupart des cas monochargés. Par conséquent, l'analyse MS/MS par les méthodes d'activation utilisés dans les approches top-down (*e.g.* ETD, ECD, UV-PD) ne sont pas adaptées, et l'analyse MS/MS par CID/HCD est quant à elle fortement limitée. Cette difficulté a poussé le développement de stratégies d'identification spécifiques qui peuvent être regroupées en deux approches principales, dites *in situ* ou hors tissus. Ces approches seront sélectionnées en fonction des besoins de résolution spatiale et de profondeur d'identification.

#### **1.5.4.1. Approches *in situ***

Les approches d'identification des protéines *in situ* consistent à détecter, localiser et identifier les protéines directement sur les coupes de tissus. De la même manière que les analyses protéomiques à grandes échelles, les approches bottom-up et top-down *in situ* peuvent également être envisagées. Le choix de la stratégie dépendra de l'information recherchée mais également de la source d'ionisation et des méthodes d'activation à disposition.

##### **a) Bottom-up *in situ***

L'imagerie MS des protéines est principalement réalisée avec des instruments équipés d'une source MALDI. Dans ce contexte, une approche reposant sur la digestion enzymatique *in situ* des protéines est l'une des stratégies utilisées et l'une des premières proposées (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007). Cette stratégie permet à la fois de détecter, de localiser et d'identifier les protéines sur la base de l'analyse MS/MS des peptides issus de la digestion via des interrogations en banques de données. Cette stratégie présente l'avantage de pouvoir être appliquée à la fois sur des coupes de tissus frais congelés (Groseclose *et al.*, 2007) et de tissus fixés et enrobés dans la paraffine (FFPE) (Lemaire, Desmons, *et al.*, 2007). Cette approche nécessite un contrôle particulier sur l'étape de digestion, afin d'obtenir un rendement de digestion efficace tout en limitant la délocalisation des peptides générés. L'enzyme (le plus souvent trypsine) doit ainsi être appliquée de façon homogène et reproductible sur l'ensemble de la coupe à l'aide de nébuliseurs automatiques (Judd *et al.*, 2019), ou d'un robot de micro-dépôt permettant de déposer des microgouttelettes de solution d'enzyme (Aerni, Cornett et Caprioli, 2006; Julien Franck *et al.*, 2009).<sup>Erreur ! Signet non défini.</sup> La matrice MALDI appropriée à l'analyse de peptides (*e.g.* HCCA, HCCA/ANI (Aerni, Cornett et Caprioli, 2006; Lemaire, Tabet, *et al.*, 2006)) est ensuite appliquée

sur l'ensemble de la coupe en suivant la même méthodologie que pour le dépôt de l'enzyme. Pour les tissus FFPE, une étape préalable à la digestion de démasquage des antigènes est souvent nécessaire pour améliorer l'accès de l'enzyme aux sites de digestion masqués par les ponts chimiques existants et liés à la fixation. Les peptides sont analysés par imagerie MALDI et identifiés en suivant une approche conventionnelle de MS/MS (*e.g.* CID). De nombreux exemples de cette approche ont été présentés dans différents domaines d'application comme les maladies neurodégénératives (Ho Kim *et al.*, 2015; Devaux *et al.*, 2016; Kelley *et al.*, 2016; Ucal *et al.*, 2017) ou le cancer (Kriegsmann, Kriegsmann et Casadonte, 2015) Cette stratégie peut être optimisée en améliorant le rendement de digestion enzymatique *via* l'ajout de détergents compatibles avec la MS tels que l'octyl- $\alpha$ / $\beta$ -glucoside (Djidja, Francese, *et al.*, 2009). Afin d'améliorer l'identification en augmentant les rendements de fragmentation (ions monochargés) et en orientant la fragmentation, des stratégies de dérivation N-Terminale *in situ* des peptides de digestion ont été proposées. Différents réactifs peuvent-être utilisés, comme par exemple, le TMPP-NHS. L'ajout d'une étape de dérivation après la digestion, augmente le nombre d'identification et limite le nombre de faux positifs (J. Franck *et al.*, 2009). La mobilité ionique (IMS) s'est également montrée efficace pour améliorer l'analyse de mélanges complexes par imagerie MALDI, puisqu'elle offre une dimension de séparation supplémentaire sur la base de la section efficace de collision des ions en phase gazeuse. Il a ainsi été montré que l'IMS permettait de différencier des ions isobares et de les imager séparément (Stauber *et al.*, 2010). L'imagerie MALDI-IMS a notamment été appliquée à l'étude du cancer du pancréas, permettant de mettre en évidence l'implication de la protéine GrP78 (Djidja, Claude, *et al.*, 2009).

### **b) Top-down *in situ***

La digestion *in situ* des protéines reste certainement la stratégie la plus couramment utilisée pour l'identification des protéines. Cependant, l'approche est longue et demande une automatisation maîtrisée des différentes étapes afin de garantir une très bonne reproductibilité. Ainsi, des approches top-down *in situ* se sont progressivement développées pour l'identification des protéines avec moins d'étapes de préparation.

**In source decay.** L'ISD (In Source Decay) est une méthode d'activation qui consiste à fragmenter les ions dans la source MALDI très rapidement après l'irradiation laser et avant leur accélération. L'ISD est obtenue en augmentant l'énergie du laser et est indépendante du poids moléculaire du composé étudié, et, par conséquent, permet le séquençage de protéines intactes et de hauts poids moléculaires (Brown et Lennon, 1995). L'imagerie MALDI ISD a été appliquée sur des coupes d'yeux de cochons et a permis d'identifier et de localiser la  $\beta$  cristalline S, la  $\beta$  cristalline B2 et l' $\alpha$ -cristalline (Debois *et al.*, 2010). Une autre étude portant sur la caractérisation de glioblastomes a permis de mettre en évidence l'implication de la

thymosin  $\beta$ 4 et de la calyculine (S100A6) (Ait-Belkacem *et al.*, 2013). L'imagerie MALDI ISD se révèle intéressante pour la détection et l'identification de protéines en une seule acquisition avec peu de préparation d'échantillon. Cependant, elle est limitée à la détection des quelques protéines les plus majoritaires puisqu'elle ne permet pas la sélection d'ions précurseurs, même s'il est toutefois possible de sélectionner des ions fragments ISD pour une analyse MS/MS supplémentaire soit pseudo MS3 encore nommée « T3 sequencing » (Suckau et Resemann, 2003).

**Perspectives.** Les protéines présentes dans les tissus FFPE étant fixées à l'aide d'agents pontants tels que le paraformaldéhyde, les approches top-down ne sont par conséquent pas applicables. Dans ce contexte, les stratégies top-down ont tout d'abord été développées à partir de coupes de tissus frais. Récemment, les méthodes d'activation couramment utilisées dans les analyses protéomiques top-down, incluant l'ETD et l'UV-PD, ont été également appliquées pour l'identification *in situ* des protéines. Ces analyses ont pu être réalisées avec l'utilisation des sources ambiantes en imagerie MS telles que le DESI (Garza *et al.*, 2018) et le LESA (Liquid Extraction Surface Analysis) (Griffiths *et al.*, 2016). Récemment, une stratégie permettant d'inverser la réticulation des protéines dans les tissus FFPE a permis la détection de protéines entières par imagerie MS (Lee *et al.*, 2020). Toutes les stratégies top-down développées à partir de tissus frais pourront certainement être appliquées aux tissus FFPE.

#### 1.5.4.2. Approches hors tissu

Les stratégies d'identification *in situ*, qu'elles soient bottom-up ou top-down, permettent de conserver une grande résolution spatiale à l'identification, mais elles s'avèrent limitées en nombre de protéines identifiables aux plus majoritaires. Afin d'augmenter la profondeur d'identification, une stratégie consiste à corrélérer les  $m/z$  des protéines ou peptides de digestion détectés par imagerie MS, avec ceux identifiés par des approches protéomiques conventionnelles, après avoir extraits les protéines de l'ensemble du tissu/coupe de tissu ou de régions localisées sur les coupes. Cette approche permet de générer une banque de  $m/z$  de composés identifiés pouvant être corrélées avec les  $m/z$  mesurés par imagerie MS pour une rétro-attribution d'identification. Au cours du temps, l'approche hors tissu s'est développée et déclinée à différentes échelles, de sections entières à des régions très limitées. Elle a comblé le vide entre les identifications protéomiques qui n'ont pas de dimension spatiale à l'imagerie MALDI pour laquelle l'identification *in situ* des protéines reste complexe, pour donner naissance au champ de la protéomique dite « Résolue Spatialement » (Spatially-Resolved Proteomics).

### a) Homogénéisation du tissu

Cette approche qui consiste à extraire l'ensemble des protéines d'un tissu ou de coupes de tissus, a longtemps été pratiquée afin de comparer les protéines identifiées par des approches protéomiques conventionnelles à grande échelle, avec celles détectées par imagerie MS à partir de coupes de tissus frais congelés (Lemaire, Ait Menguellet, *et al.*, 2007) ou de tissus FFPE (Stauber *et al.*, 2008). L'utilisation de spectromètres de masse à haute résolution spectrale a grandement amélioré la stratégie en apportant une plus grande fiabilité aux corrélations des données de LC-MS/MS et d'imagerie MALDI. Une étude a notamment comparé le nombre de protéines identifiées par l'approche bottom-up *in situ* et la ré-identification des  $m/z$  détectés par imagerie MALDI-Orbitrap *via* les peptides identifiés par LC-MS/MS, montrant que seules 4 protéines étaient identifiées *in situ* contre 101 par ré-identification *via* les données de LC-MS/MS en considérant un  $\Delta m/z$  de 0.01 Th (Schober *et al.*, 2011). Certains analyseurs à très haute résolution tel que les FT-ICR permettent la détection de protéines intactes avec une source MALDI jusqu'à environ  $m/z$  20 000. La comparaison des  $m/z$  détectés par imagerie MALDI peut alors être directement réalisée à partir des protéines entières sans nécessité de digestion enzymatique *in situ* en utilisant deux sections histologiques consécutives, l'une pour l'imagerie MALDI, et la seconde pour l'extraction et la protéomique top-down (Spraggins *et al.*, 2015, 2016). Cette stratégie offre une nouvelle dimension pour l'identification de protéines par imagerie MALDI, mais trouve des limitations pour les protéines spécifiques de petites régions très localisées du tissu, ou minoritaires à cause de l'effet de dilution à l'échelle de l'extrait total.

### b) Microdissection laser

La microdissection laser (LCM) est une approche qui permet l'analyse d'un type cellulaire particulier ou de régions spécifiques de tissus à partir de sections histologiques, en excisant puis en catapultant les cellules hors du tissu à l'aide d'un laser UV ou IR pour collection. Les cellules colligées peuvent ensuite être utilisées pour tout type d'analyse, habituellement des expériences de protéomiques bottom-up ou top-down conventionnelles. Cette stratégie a notamment été utilisée à partir de tissus FFPE afin de mettre en évidence des protéines pouvant être impliquées dans différents cancers tels que le cancer du foie, des reins et des poumons (Longuespée *et al.*, 2016). En suivant une stratégie bottom-up, les auteurs ont identifié plus de 1000 protéines à partir de régions contenant moins de 3000 cellules. Un autre exemple d'application de cette approche a été réalisée sur des modèles de gliomes de souris, où les auteurs ont réalisé l'identification par bottom-up à partir de régions tumorales et saines d'environ 0.8 mm<sup>2</sup>, pour réassigner les identifications aux données d'imagerie MALDI FT-ICR (M. Dilillo *et al.*, 2017).

### c) Micro-extraction liquide

Dans une stratégie alternative, la micro-extraction peut être préférée à la LCM. Cette stratégie ne permet pas d'analyser un type cellulaire particulier, mais offre l'accès à des analyses à une échelle très localisée, en limitant l'endommagement des protéines. Dans cette stratégie, la micro-extraction se fait au travers de la création d'une micro-jonction liquide (LMJ) utilisée par exemple dans la technique du LESA. Après micro-extraction, les échantillons peuvent être collectés ou injectés directement dans le spectromètre. S'ils sont collectés, ils peuvent ensuite être soumis à analyse bottom-up ou top-down. Initialement cette stratégie a été proposée par collection et analyse bottom-up sur tissus frais puis FFPE. Dans ce cas, la micro-extraction est précédée d'une micro-digestion localisée des protéines sur des régions d'environ 1 mm<sup>2</sup>, à l'aide d'un micro-spotteur pour déposer l'enzyme (*e.g.* trypsine). Les peptides de digestion générés de façon *in situ* sont ensuite extraits par LMJ puis analysés par LC-MS/MS. Les *m/z* des peptides de digestion ainsi identifiés permettent la ré-identification des peptides sur les images MALDI. La première étude réalisée par cette stratégie a montré la possibilité d'identifier plus de 1200 groupes de protéines à partir de régions d'environ 600 µm correspondant à environ 1900 cellules (Quanico *et al.*, 2013), puis de réassigner sur les images MALDI-Orbitrap 61 protéines grâce à la haute résolution spectrale. Cette stratégie a été mise en œuvre dans différentes applications cliniques en oncologie pour le cancer de l'ovaire, à partir de tissus FFPE (Wisztorski *et al.*, 2013) ou les gliomes (Le Rhun *et al.*, 2017). La stratégie de micro-extraction a ensuite été appliquée aux protéines entières via des approches top-down avec ou sans préfractionnement de l'échantillons sur gel 1D (Wisztorski *et al.*, 2016). Une étude sur le cancer de l'ovaire a permis de mettre en évidence des protéines présentant des modifications post-traductionnelles, ainsi que des protéines traduites à partir de cadres de lectures non canoniques (Protéines Alternatives) (Cardon, Fournier et Salzet, 2021) spécifiques des régions tumorales du cancer de l'ovaire (Delcourt *et al.*, 2017).

### d) Micro-excision manuelle

Une alternative simple et peu coûteuse aux techniques de micro-extraction ou micro-dissection repose sur l'utilisation de lames histologiques recouvertes de parafilm M, sur lesquelles sont montées les coupes de tissus. Cette technique permet la micro excision manuelle de morceaux de parafilm M (PAM) contenant les régions spécifiques du tissu devant être soumises à des analyses de protéomique bottom-up ou top-down. Cette stratégie, qui ne nécessite aucun appareil de préparation a permis d'identifier plus de 1000 protéines à partir de régions d'environ 1 mm<sup>2</sup> (Franck *et al.*, 2013). Appliquée à l'ensemble de la coupe, la stratégie PAM permet la reconstruction d'images sur la base de la quantification relative des protéines identifiées par LC-MS/MS en Label Free Quantification (LFQ). 1221 protéines ont ainsi pu être identifiées dans une étude du cancer de la prostate par la méthode PAM (Quanico *et al.*, 2015). Elle a aussi permis d'identifier des protéines alternative dans le cas du

cancer de l'ovaire (Delcourt *et al.*, 2017) et de l'étude du physiome du cerveau de rat (Delcourt *et al.*, 2018) par approche top-down.

### e) Hydrogels

Les hydrogels sont des polymères super absorbants capables de retenir une grande quantité de liquide (Fiddes *et al.*, 2012). Les hydrogels préalablement déshydratés peuvent être réhydratés avec une solution d'enzyme, et sont ensuite placés sur des régions spécifiques de coupes de tissus, permettant à la fois la digestion des protéines mais également l'extraction concomitante des peptides de digestion à partir de tissus frais congelés (Taverna, Norris et Caprioli, 2015) ou FFPE (Taverna, Norris et Caprioli, 2015). Les peptides sont ensuite extraits des hydrogels pour être analysés par LC-MS/MS. Des hydrogels de 3 mm de diamètre ont par exemple été préparés avec de l'acrylamide/bis-acrylamide contenant une solution de trypsine, puis ont été appliqués sur des régions de coupes de cerveau de rat permettant l'identification de protéines membranaires (Nicklay *et al.*, 2013). Une étude sur l'impact du diamètre des hydrogels sur le rendement d'identification des protéines a conduit à l'identification de 671 protéines et 1051 protéines, respectivement pour des hydrogels d'environ 260 µm et 1.6 mm de diamètre (Rizzo *et al.*, 2017).

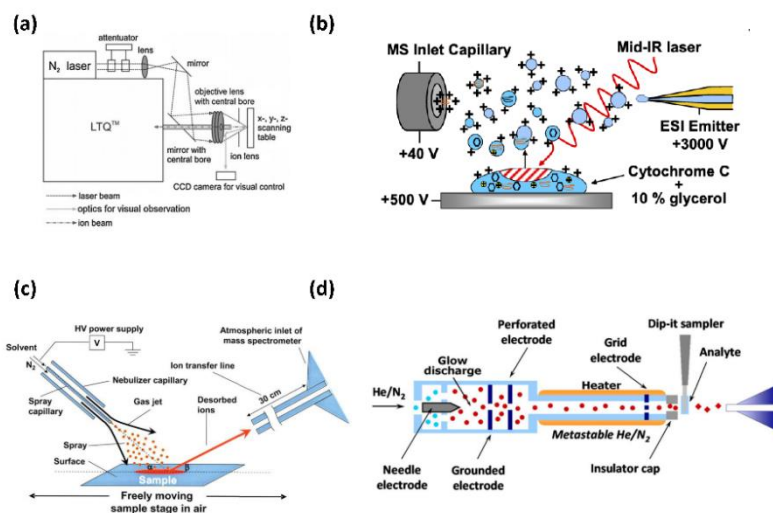
#### 1.5.5. Imagerie MALDI des glycanes et des polysaccharides

Ces dernières années, les N-glycanes ont constitué une autre cible privilégiée du MALDI-MSI. En effet, la glycosylation post-traductionnelle s'est avérée être une indication de la croissance tumorale et de la progression du cancer (Briggs *et al.*, 2019). Les scientifiques ont donc cherché à identifier ces biomarqueurs et leurs localisations dans les tissus. Par analogie à la détection des peptides en MALDI-MSI, explicité précédemment, une enzyme est requise. Celle-ci est le peptide N Glycosidase F (PNGase F). Les chercheurs ont ainsi pu cliver les biomarqueurs glycanes de leur support protéique et les détecter par imagerie MALDI *via* des tissus FFPE (Scott *et al.*, 2019). L'un des défis dans l'analyse de ce type de composé réside dans le fait qu'ils ont une tendance à se fragmenter en source (ISD). Pour pallier cette contrainte, Holst *et al.* ont effectué une dérivation chimique *in situ* du groupe acide sialique labile pour stabiliser le glycanes pendant qu'il subissait une analyse par spectrométrie de masse, augmentant ainsi la sensibilité (Holst *et al.*, 2016). La glycosylation des protéines est impliquée dans de nombreux processus cellulaires et le MALDI-MSI a été utilisé pour identifier des changements dans les N-glycanes en fonction du temps d'exposition suite à un rayonnement induit dans les lésions pulmonaires (Carter *et al.*, 2020). Dans une approche dite multimodale, Heijs *et al.* ont effectué une digestion par l'enzyme PNGase puis une digestion trypsique sur la même coupe de tissu (Heijs *et al.*, 2016). La principale crainte dans ce style d'approche, est que la préparation supplémentaire d'échantillon ne provoque la délocalisation des peptides. Cependant,

les chercheurs ont démontré que plusieurs peptides étaient hautement localisés. Pour finir, la dernière cible privilégiée concerne les polysacchararides. Arnaud et coll. ont adopté une approche similaire pour réaliser une digestion enzymatique de la paroi cellulaire polysaccharidique dans les tiges de maïs, en désacétylant avec de l'hydroxyde de sodium et en traitant avec une combinaison d'enzymes telles que l'endoxylanase et la lichénase (Arnaud *et al.*, 2020). Ce travail a été important pour élucider les mécanismes derrière la dégradation de la paroi cellulaire, ce qui constitue une approche importante pour l'industrie des biocarburants.

### 1.6. Technique d'imagerie à pression ambiante

L'imagerie MS à pression ambiante marque un réel tournant pour l'imagerie, en ouvrant l'analyse à des échantillons dont la taille est moins limitée et, pour certaines de ces techniques, une préparation d'échantillons moins lourde. Ces technologies sont classées dans la catégorie Spectrométrie de Masse avec Ionisation Ambiante (Ambient Ionization Mass Spectrometry ou AIMS). Les AIMS se sont développées au début des années 2000 avec pour vocation de permettre l'analyse directe, rapide, à haut débit et avec un minimum de traitement à l'échantillon (Feider *et al.*, 2019). Elles ont ouvert une voie distincte dans l'approche de l'imagerie. Les AIMS utilisées en imagerie peuvent être classées en fonction de la nature du faisceau analytique utilisé pour produire le passage de l'échantillon en phase gazeuse, voire son ionisation concomitante (Wu *et al.*, 2013). Nous aborderons dans ce chapitre les deux grandes classes de techniques d'imagerie à pression ambiante ; celles basées sur l'utilisation d'un faisceau laser, et celles utilisant le bombardement par des particules, neutres ou chargées (**Figure 1.5.**, et **Tableau 1.2.**).



**Figure 1.5.** Représentation de quelques sources AIMS utilisées pour l'imagerie (a) UV AP-MALDI (source SMALDI) (Guenther et al., 2010), (b) IR-MALDESI (Sampson, Murray et Muddiman, 2009), (c) DESI (Takáts et al., 2004), and (d) DART (Hajslova, Cajka et Vaclavik, 2011).

Source	Résolution Spatiale	Préparation d'échantillons	Molécules analysables	Ions	Applications
UV-AP-MALDI	1-10 $\mu\text{m}$	Matrices idem UV-MALDI sous-vide	Petites molécules organiques, métabolites, lipides, peptides, protéines	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $/[\text{M}-\text{H}]^-$ Adduits $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ en mode positif	Biologie, Biomédical
IR-AP-MALDI	>100 $\mu\text{m}$ mais jusque 20 $\mu\text{m}$ en sur-échantillonnage	Matrices IR-MALDI mais en particulier, eau ou glycérol	Petites molécules organiques, métabolites, lipides,	$[\text{M}+\text{H}]^+$ $/[\text{M}-\text{H}]^-$ Adduits $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ en mode positif Plus de formation d'ions à charges multiples, et d'adduits de matrice	Biologie, Biomédical (plantes, fluides corporels)



UV-MALDESI	60 $\mu\text{m}$ publié mais résolution plus élevée possible	Matrices idem UV-MALDI sous-vide (ex. 2,5-DHB)	Petites molécules organiques, métabolites, lipides, peptides, protéines	$\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$ Ions à charges multiples pour les composés de hautes masses, similaire à l'ESI	Peu utilisée Principalement démontrée sur peptides et protéines
IR-MALDESI	150 $\mu\text{m}$ mais jusque 10 $\mu\text{m}$ en sur- échantillonnage	Matrices idem IR-MALDI (Glacé, Glycérol)	Petites molécules organiques, métabolites, lipides, peptides, protéines, N- Glycane, Carbohydrites	$[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$ Ions à charges multiples pour les composés de hautes masses, similaire à l'ESI	Biologie et biomédical (plantes, cheveu, graines, tissus cancéreux, médicaments)
LAESI	>100 $\mu\text{m}$ mais jusque 20 $\mu\text{m}$ en sur- échantillonnage	Aucune	Petites molécules organiques, métabolites	$[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$ Adduits $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ en mode positif	Biologie et en particulier plantes ou relations hôte/pathogène
DART	1-2 mm	Aucune	Petites molécules organiques, métabolites	$[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$	Biologie, surface chimiquement modifiée (CCM, colorant sur fibre ou billet de banque)
DAPPI / DAPCI	1-2 mm	Aucune	Petites molécules organiques, métabolites	$[\text{M}+\text{H}]^+ / \text{M}^{++}$	Biologie (plante, insecte, œuf), colorants sur surface
DESI / nanoDESI	200 $\mu\text{m}$ / 10 $\mu\text{m}$	Aucune	Petites molécules organiques, métabolites	$[\text{M}+\text{H}]^+ / [\text{M}-\text{H}]^-$	Biomédicale, Microbiologie, plante

**Tableau 1.2.** Comparaison des principales caractéristiques et applications des sources ambiantes utilisées en imagerie MS.

### 1.6.1. Désorption laser

Ces techniques dérivent d'une adaptation de la Désorption/ionisation Laser (LDI) et de la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI). Le développement dans les années 2000 des sources MALDI à pression atmosphérique (AP-MALDI) (Laiko, Baldwin et Burlingame, 2000; Laiko, Moyer et Cotter, 2000) a donné l'impulsion aux développements de ces méthodes qui ont, par la suite, évolué pour des utilisations en imagerie, seule ou combinée avec l'Ionisation par Electronébulisation (ESI).

Concernant l'AP-MALDI, deux grandes familles de source se sont développées en fonction de la gamme de longueur d'onde utilisée. La source SMALDI (Scanning Microprobe Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) développée par l'équipe de B. Spengler, fonctionne dans l'UV à 337 nm, longueur d'onde classique en MALDI sous vide. Cette source a été initialement développée sous vide en 2002 (Spengler et Hubert, 2002) comme étant une combinaison du MALDI UV conventionnel et de la technique plus ancienne du LAMMA (Laser Microprobe Mass Analyzer) (Kaufmann, Hillenkamp et Wechsung, 1979), afin de pouvoir réaliser de l'imagerie MALDI à haute résolution spatiale. En 2008 (Koestler *et al.*, 2008), une version à pression ambiante a été proposée. Cette source AP-SMALDI a été la première démonstration d'une imagerie MALDI à une résolution spatiale subcellulaire (jusqu'à 8  $\mu\text{m}$ ) et à une haute résolution spectrale (FT MS) (Schober *et al.*, 2012). L'augmentation de la résolution a non seulement nécessité des développements instrumentaux, mais également en termes de préparation d'échantillons, puisque les cristaux de matrice doivent rester à l'échelle de la résolution spatiale désirée, et le film poly-cristallin de matrice produit, particulièrement homogène. Cette source est actuellement commercialisée par la société Transmit (TransMIT AP-SMALDI10). Elle atteint 1,4  $\mu\text{m}$  de résolution (Kompauer, Heiles et Spengler, 2017) et a été utilisée dans diverses applications, dans le domaine de la biologie ou du biomédical (Li *et al.*, 2016; Kadesch *et al.*, 2020). En parallèle, A. Vertes a développé une source AP-MALDI pour l'imagerie fonctionnant dans le moyen IR (mid-IR, 2-20  $\mu\text{m}$ ) (Li, Shrestha et Vertes, 2007). Bien qu'aux longueurs d'onde utilisées en IR, la limite de résolution spatiale (à cause de la limite de diffraction) ne soit pas aussi grande qu'en UV, le mid-IR présente d'autres avantages, comme celui d'accéder à un plus grand panel de molécules pouvant servir de matrice, et de présenter un processus de désorption plus doux, permettant de préserver les molécules fragiles (*e.g.* oligonucléotides) et les interactions non-covalentes. Cette source a été utilisée dans des applications d'imagerie en biologie des plantes avec une résolution spatiale de 40  $\mu\text{m}$  en fonctionnant en mode de sur-échantillonnage (Li, Shrestha et Vertes, 2007). La source mid-IR AP-MALDI a démontré son efficacité pour l'analyse des différentes familles de métabolites (carbohydrates simples, oligosaccharides, acides aminés, acides organiques, lipides et autres). L'AP-MALDI, qu'il soit réalisé dans l'UV ou l'IR, conserve des caractéristiques proches du MALDI sous vide pour les espèces formées.

Il est à noter que l'IR-MALDI tend à faciliter l'observation des dimères d'analytes et adduits de matrices, et peut sous certaines conditions conduire à l'observation d'ions multichargés.

Un second développement important a été celui des méthodes hybrides d'ionisation combinant l'efficacité de la désorption pour la transition en phase gazeuse avec une seconde source pour assurer une post-ionisation. La première de ces méthodes est la source MALDESI, développée en 2006 par D.C. Muddiman (Sampson, Hawkrigde et Muddiman, 2006). En MALDESI, une préparation dans une matrice MALDI-UV conventionnelle (*e.g.* 2,5-DHB) est irradiée par un laser typiquement utilisé en MALDI (337 nm) et la plume de désorption est capturée par un jet de gouttelettes de solvant chargées arrivant horizontalement, et donc placé perpendiculairement à la surface où s'effectue la désorption. Initialement développée pour bénéficier des avantages de la création d'ions multichargés, comme en ESI, la source MALDESI a été utilisée pour l'imagerie dès 2008 (Sampson, Hawkrigde et Muddiman, 2008) avec un régime de désorption dans l'UV. La source MALDESI a ensuite été proposée en régime mid-IR (IR-MALDESI) permettant l'utilisation de l'eau comme simple matrice à la désorption (Sampson, Murray et Muddiman, 2009). Erreur ! Signet non défini. La source MALDESI est versatile et peut-être utilisée en régime UV ou IR avec ou sans matrice, en matrice solide ou liquide. Des applications d'imagerie en mode UV et IR-MALDESI ont été publiées (Robichaud, Barry, *et al.*, 2013). La technique présente une large gamme d'application en termes de molécules analysables, allant des petits composés peu polaires aux biomolécules polaire de haut poids moléculaire, même si en imagerie elle a principalement été utilisée pour l'analyse de petits composés, endogènes types métabolites et lipides (Bagley *et al.*, 2018), et exogènes (*e.g.* biodistribution de médicaments) (Barry *et al.*, 2015). En termes de résolution spatiale, des images de 10  $\mu\text{m}$  à l'échelle cellulaire ont été produites par méthode de sur-échantillonnage (Nazari et Muddiman, 2015). En parallèle, sous l'impulsion de A. Vertes la source LAESI (Laser Ablation ElectroSpray Ionization) a été introduite (Nemes et Vertes, 2007). La source LAESI est une source hybride qui correspond à la combinaison de l'ablation laser et de l'ESI dans le mid-IR, et dérive conceptuellement de l'IR-AP-MALDI même si les mécanismes de production des ions sont différents. La source LAESI se veut plus facile que la source MALDESI puisqu'elle n'utilise pas de matrice et ne nécessite donc pas de préparation d'échantillon. Le laser n'a pour fonction que d'assurer une ablation résonnante de neutres et les charges sont apportées en post-ionisation par l'ESI. Pour les échantillons biologique, un laser de type Er:YAG émettant à 2,94  $\mu\text{m}$  est utilisé pour obtenir une excitation résonnante de la bande d'absorption la plus intense de la molécule d'eau. La géométrie des sources LAESI et MALDESI est proche, cependant la source MALDESI est basée sur un processus de désorption alors que la source LAESI repose sur une ablation. Conventionnellement, le cône de gouttelettes de l'ESI capture la plume qui se développe perpendiculairement. Les échantillons sont habituellement placés sur une lame à environ 3 cm en-dessous du

spray ESI, et de 3 à 5 mm devant l'aiguille de nébulisation. Rapidement après son introduction, la source LAESI a été développée en mode imagerie (Nemes et Vertes, 2007) et atteint des performances relativement similaires à la source MALDESI, tant en termes de sensibilité que de résolution spatiale (Shrestha, Patt et Vertes, 2011). Celle-ci est typiquement de 250  $\mu\text{m}$  mais peut-être diminuée jusque 20  $\mu\text{m}$ , par sur-échantillonnage ou en utilisant un laser fibré dont l'extrémité a été aiguisée à quelques dizaines de microns permettant ainsi des analyses à l'échelle de la cellule unique (Samarah *et al.*, 2020). La source MALDESI, tout comme la source LAESI, conserve des caractéristiques proches de l'ESI en termes d'ions observés. La technique a été montrée pour l'imagerie 3D (Nemes, Barton et Vertes, 2009). Pour éviter les problèmes de déshydratation pendant les expériences, l'eau étant nécessaire pour le processus, l'échantillon est directement congelé sur le porte échantillon et est maintenu à basse température pendant l'acquisition. Le LAESI a beaucoup été appliqué à l'analyse des métabolites et des lipides et pour des applications dans le domaine de la biologie végétale, par exemple (Etalo *et al.*, 2018) ou l'étude de bactéries (Li, Balan et Vertes, 2016). La source LAESI est maintenant disponible commercialement auprès de la société Protea Biosciences.

### 1.6.2. Bombardement par des particules neutres ou chargées

En parallèle des méthodes d'imagerie basées sur le processus de désorption laser, des techniques d'imagerie MS à pression atmosphérique basées sur le bombardement de surface par des particules neutres ou chargées ont émergé dans la littérature.

Dans le cas de la source d'ionisation DART (Direct Analysis in Real-Time) (Cody, Laramée et Durst, 2005), des atomes d'hélium métastable réagissent avec l'eau atmosphérique pour produire des agrégats d'eau protonés, entraînant la désorption/ionisation des molécules en surface. Le DART permet d'ioniser différentes classes de composés avec peu de fragmentation, sur des surfaces aussi diverses que la peau humaine, un billet de banque, le verre, des plaques de chromatographie sur couche mince (CCM), des vêtements et des métaux (Gross, 2014; Pavlovich, Musselman et Hall, 2018). La source DART a cependant une résolution spatiale relativement faible de 1 à 2 mm, car elle est limitée par la difficulté à focaliser le faisceau initial d'hélium. Néanmoins, cette technique permet l'acquisition d'images MS sur des échantillons de grandes tailles à pression atmosphérique. Par exemple, Yun *et al.* ont obtenu en 2020 la localisation des principaux alcaloïdes des parties aériennes d'*Ephedra sinica*, qui est inscrite dans la pharmacopée chinoise pour ses propriétés stimulantes, grâce au couplage entre une source DART et un spectromètre de masse à temps de vol (Yun *et al.*, 2021).

Une autre méthode permettant la désorption de composés depuis une surface organique, consiste à la bombarder par un faisceau de gouttelettes neutres issus d'un spray. La désorption / photoionisation à pression atmosphérique (DAPPI) est une

technique de spectrométrie de masse ambiante, qui peut être utilisée pour la détection efficace des composés polaires et apolaires (Haapala *et al.*, 2007). La surface d'échantillonnage est exposée à un solvant chaud sous la forme d'un aérosol, provoquant une désorption des composés de la surface. Les composés vaporisés sont ionisés par une série de réactions physico-chimiques à pression atmosphérique, initiées par les photons émis par l'ultraviolet (VUV) selon des mécanismes similaires à la photoionisation à pression atmosphérique (APPI). Le solvant (acétone ou toluène) utilisé pour le spray agit comme un dopant, participant au processus d'ionisation et améliorant l'efficacité d'ionisation. Quand le toluène est utilisé comme dopant, les composés d'intérêt sont ionisés sous la forme d'ion moléculaire  $M^{+}$  ou d'espèces protonées  $[M+H]^{+}$  alors que la formation des ions  $[M+H]^{+}$ , est privilégiée dans le cas de l'acétone. Le DAPPI a été utilisée avec succès pour l'analyse de métabolites spécialisés de plantes (bois, feuille, graine) (Vaikkinen *et al.*, 2015; Räsänen *et al.*, 2019) ou d'insectes (surface et glande) (Rejšek *et al.*, 2015) à l'échelle du millimètre.

En suivant un schéma similaire, la technique de désorption / ionisation chimique à pression atmosphérique (DAPCI) a été développée au début des années 2000 en se basant sur les principes de l'APCI (Song et Cooks, 2006). Un flux d'azote passe le long d'une électrode qui va créer une décharge corona et charger le gaz. Ce gaz chargé interagit alors avec l'échantillon, conduisant à l'ionisation des molécules d'intérêt en surface. Cette technique permet d'analyser à la fois les espèces volatiles et non volatiles et est particulièrement adaptée à la détection des composés de faible polarité et de petite masse. En 2007, Chen *et al.* ont développé une source DAPCI ne nécessitant pas d'apport de gaz (Chen *et al.*, 2007). L'ionisation est alors réalisée en utilisant une électrode en acier inoxydable insérée dans un matériau isolant, et en laissant l'air ambiant passer sur l'électrode pour créer la décharge corona. Malgré de nombreux exemples dans la littérature d'analyse de surface par DAPCI (Pitman et LaCourse, 2020), seules deux études rapportent l'utilisation du DAPCI en imagerie par spectrométrie de masse pour l'analyse d'encre pour l'authentification de documents, et pour la distribution de mélanine sur des coupes d'œuf cuit à l'échelle du millimètre.

Pour conclure, la technique la plus populaire dans la littérature en imagerie par spectrométrie de masse basée sur l'utilisation de spray est la désorption / électrospray (DESI). Le DESI utilise le principe originel de l'ionisation par électrospray, mais en focalisant les gouttelettes de solvant chargées directement à la surface de l'échantillon pour conduire à la désorption et l'ionisation des analytes (Takáts *et al.*, 2004). En fonction de la polarité des composés d'intérêt, différentes compositions de solvant peuvent être utilisées pour l'imagerie. Des solvants standards tels que le méthanol ou l'acétonitrile avec l'ajout de 2 à 5 % d'eau sont classiquement utilisés, mais des mélanges plus complexes comprenant de l'éthanol ou de l'isopropanol ont aussi été décrits pour la désorption/ionisation de certains analytes. Dans le cadre d'analyse d'acides aminés, il a été montré que l'efficacité du DESI dépend linéairement de la

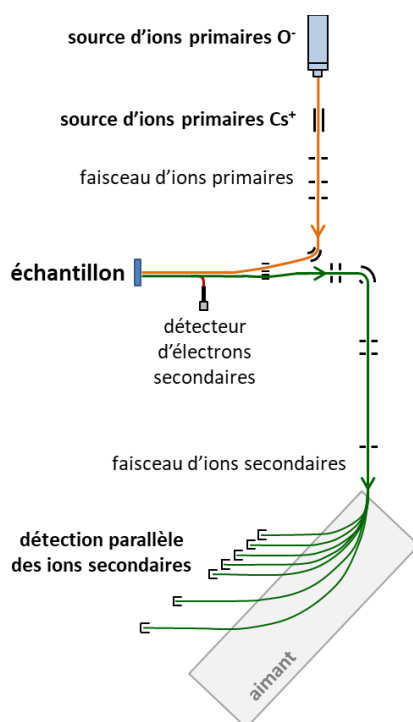
solubilité dans les solvants du nébulisât, et que les diamètres d'érosion du matériel étaient de l'ordre de quelques centaines de microns limitant la résolution spatiale latérale en mode imagerie (Green *et al.*, 2010). L'optimisation des conditions de spray permet d'atteindre en routine des résolutions spatiales moyennes d'environ 50  $\mu\text{m}$ . Le nano-DESI permet d'obtenir une meilleure résolution ( $< 12 \mu\text{m}$ ) grâce à l'utilisation d'émetteurs de type nanospray délivrant des gouttelettes chargées à un débit plus faible et donc une vitesse plus faible (4 m/s), limitant ainsi l'effet « d'éclaboussure » quand les gouttelettes rentrent en contact avec la surface (Roach, Laskin et Laskin, 2010). Les applications de l'imagerie DESI sont vastes : surface de plantes, culture de microorganismes, coupe histologique de tissus animaux ou humains, *etc.*

## 1.7. Spectrométrie de masse des ions secondaires : NanoSIMS

### 1.7.1. Principe

La spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) est une technique analytique qui repose sur la pulvérisation d'ions à partir d'une surface solide par des faisceaux d'ions primaires positifs ou négatifs focalisés, et l'analyse ultérieure des ions secondaires produits par un spectromètre de masse sous vide poussé. Dans NanoSIMS, le faisceau d'ions primaires de  $\text{Cs}^+$  ou  $\text{O}^-$  est balayé sur la surface de l'échantillon et les ions secondaires sont dirigés vers un analyseur à double secteur. Ce double secteur est composé d'un champ électrostatique qui homogénéise l'énergie cinétique et focalise le faisceau d'ions, et d'un champ magnétique qui va dévier les ions en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). De nombreux autres composants (lentilles, déflecteurs, diaphragmes, hexapole) sont utilisés dans le trajet ionique pour façonner et focaliser le faisceau ionique et pour optimiser la transmission et la résolution. Enfin, les ions sont comptés à l'aide de multiplicateurs d'électrons parallèles ou de détecteurs à cavité de Faraday, permettant une détection simultanée, ce qui est une condition nécessaire pour des rapports isotopiques de haute précision (**Figure 1.6.**) (Musat *et al.*, 2012; Schaumlöffel, 2015; Nuñez *et al.*, 2018). Ainsi, le NanoSIMS peut être décrit comme une microsonde ionique à balayage, capable de produire des images élémentaires et isotopiques en 2D et 3D de presque tous les éléments du tableau périodique avec une résolution latérale jusqu'à 50 nm. L'analyseur de masse à double secteur fournit une résolution de masse élevée  $M/\Delta M$  jusqu'à  $>9000$  selon la configuration des fentes d'entrée et d'ouverture, l'optique ionique, *etc.* Cela permet la séparation des interférences de masse, en particulier pour des rapports isotopiques précis, et une détection au niveau de trace. De plus, la configuration de l'optique ionique secondaire fournit une transmission ionique élevée qui permet une détection élémentaire hautement sensible de la gamme  $\text{mg kg}^{-1}$  à  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , en fonction de l'élément.

Cet instrument a été introduit dans les années 1990 (Slodzian *et al.*, 1990, 1992; Slodzian, Daigne et Girard, 1992) et commercialisé par Cameca Ametek d'abord sous le nom de NanoSIMS 50 avec 5 détecteurs parallèles, puis sous le nom de NanoSIMS 50L avec 7 détecteurs. Les développements instrumentaux ultérieurs ont ajouté de nouvelles fonctionnalités, telles que, le plus important, une nouvelle source d'ions oxygène pour une résolution latérale améliorée qui a ouvert de nombreuses nouvelles possibilités de recherche.

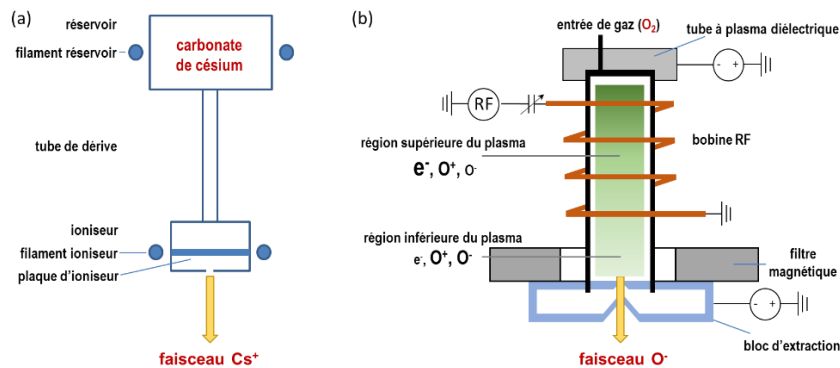


**Figure 1.6.** Schéma du principe NanoSIMS avec sept détecteurs d'ions secondaires parallèles et un détecteur d'électrons secondaire.

### 1.7.2. Source d'ions

Pour le NanoSIMS, la qualité la plus importante de la source d'ions est d'atteindre des densités de courant élevées dans de petites zones sur l'échantillon. Différentes sources peuvent être utilisées en fonction des éléments à analyser. Le NanoSIMS est équipé de deux sources d'ions primaires différentes : (1) une source d'ions césium positifs ( $Cs^+$ ) (Storms, Brown et Stein, 1977) qui génère préférentiellement des ions secondaires négatifs, par ex. pour des éléments électro-négatifs tels que C, O, S, Si, et

(2) une source d'ions oxygène négatifs ( $O^-$ ) (Benninghoven, Rudenauer et Werner, 1987) qui favorise la formation d'ions secondaires positifs, par ex. pour les métaux alcalins et de transition. Grâce à l'utilisation de ces deux sources d'ions, l'analyse de presque tous les éléments du tableau périodique est possible. La source  $Cs^+$  repose sur l'ionisation thermique du césium d'un réservoir de carbonate de césium, qui permet environ un an de fonctionnement (**Figure 1.7.a**). En ce qui concerne la source d'ions oxygène, les instruments NanoSIMS étaient généralement équipés d'une source duoplasmatron qui reposait sur un plasma confiné magnétiquement à basse pression. Cependant, il existe des différences importantes entre les deux sources d'ions en ce qui concerne leurs spécifications et leur fonctionnement pratique. La source de césium fournit une densité de courant plus élevée que la source duoplasmatron donc une meilleure résolution latérale (jusqu'à 50 nm pour la source Cs et 200 nm pour la source duoplasmatron), et une sensibilité plus élevée. De plus, un entretien fréquent et une faible robustesse étaient un inconvénient connu pour la source duoplasmatron. Par conséquent, une nouvelle source oxygène à radiofréquence (Smith *et al.*, 2008; Malherbe *et al.*, 2016) a été introduite à partir d'un plasma d'oxygène à haute densité avec des ions à basse température (**Figure 1.7.b**). Sa mise en œuvre sur le NanoSIMS a entraîné des améliorations importantes car la densité de courant améliorée conduit à un gain en résolution latérale (jusqu'à 37 nm) et en sensibilité pour les métaux. De plus, par rapport à la source duoplasmatron, pratiquement aucun entretien n'est requis.



**Figure 1.7.** (a) Schéma de la source primaire d'ions césium. (b) Schéma de la source d'ions primaires d'oxygène à radiofréquence. Les ions  $O^-$  sont concentrés dans la région inférieure du plasma d'oxygène et extraits pour créer un faisceau d'ions  $O^-$  (Malherbe *et al.*, 2016).



### 1.7.3. Processus d'ionisation

Le NanoSIMS est une technique SIMS dynamique, ce qui signifie qu'un faisceau d'ions primaires à haute énergie et à haute densité est utilisé. Le bombardement de la surface de l'échantillon avec une forte dose d'ions primaires focalisés entraîne une cascade de collision de 10 à 20 nm de profondeur avec implantation simultanée des ions primaires et pulvérisation de plusieurs monocouches atomiques. En raison du faisceau d'ions primaires à haute énergie, toutes les molécules sont brisées au cours de ce processus et des atomes, des clusters et des électrons sont éjectés. Une petite fraction de ces atomes et clusters est ionisée. Ils sont chargés positivement ou négativement, selon la source d'ions primaires. Ces ions secondaires sont disponibles pour la spectrométrie de masse. Contrairement aux autres techniques SIMS, dans le NanoSIMS, le faisceau d'ions primaires est focalisé perpendiculairement à la surface de l'échantillon et les ions secondaires sont extraits dans la direction opposée au spectromètre de masse. Cette configuration coaxiale est spécifique au NanoSIMS, qui améliore la focalisation du faisceau d'ions primaires et par conséquent la résolution latérale, diminue les aberrations et augmente l'efficacité de transmission des ions secondaires jusqu'à 80% et donc la sensibilité. En outre, l'efficacité d'ionisation et le rendement en ions secondaires, qui est défini comme la fraction d'atomes pulvérisés qui sont ionisés, dépendent fortement des éléments chimiques, en raison de leurs différentes énergies d'ionisation, ainsi que de la matrice de l'échantillon. Ce dernier point important est à considérer si une analyse quantitative est envisagée car, par conséquent, cela nécessite des étalons adaptés à la matrice.

### 1.7.4. Champs d'application

Plusieurs articles de synthèse sur la diversité des applications utilisant le NanoSIMS ont été publiés (Watrous et Dorrestein, 2011; Hoppe, Cohen et Meibom, 2013; Nuñez *et al.*, 2018). Le NanoSIMS a été principalement utilisé jusqu'à présent dans cinq domaines scientifiques différents, à savoir la biologie, la géologie, la cosmochimie, la géochimie et les sciences des matériaux.

En géologie, la résolution latérale du NanoSIMS permet la détermination du gradient chimique dans de grains d'olivine uniques pour les études de volcanologie (Lloyd *et al.*, 2014), la datation U-Pb de petits zircons et/ou de zones particulières à l'intérieur d'un zircon (Lyon *et al.*, 2019), et la partition des éléments en différentes phases pour les études des terres profondes (Badro *et al.*, 2007). En outre, le NanoSIMS permet la détermination des rapports isotopiques dans des échantillons très petits et rares tels que les météorites (Duprat *et al.*, 2014) et les grains pré-solaires (Kodolányi *et al.*, 2014), et a donc ouvert des possibilités uniques dans le domaine de la cosmochimie.

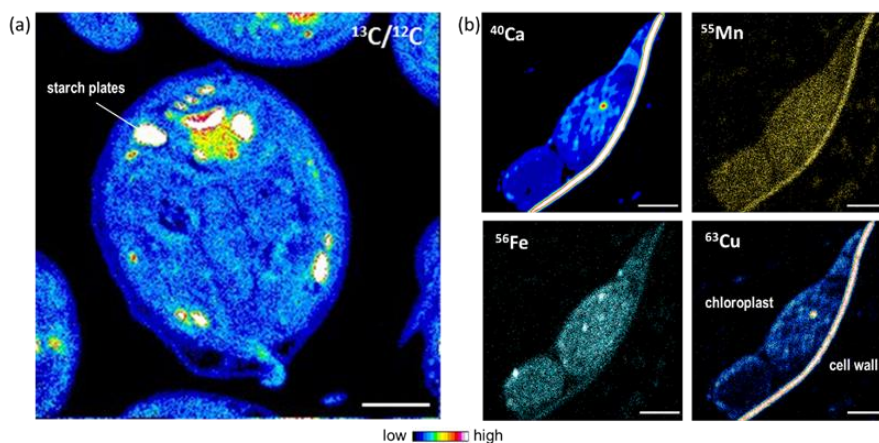
En géochimie, et plus particulièrement dans le domaine des proxys géochimiques, la possibilité d'enregistrer jusqu'à 7 éléments en même temps permet de déterminer des rapports inter-éléments pour reconstruire les conditions environnementales passées à l'aide d'otolithes (Sano *et al.*, 2008), de coraux (Brahmi *et al.*, 2012) ou de foraminifères (Tachikawa *et al.*, 2013).

En science des matériaux, la haute résolution latérale est très utile pour étudier par exemple la migration des éléments aux joints de grains (Christien *et al.*, 2013) des alliages ou les propriétés électrochimiques des électrodes pour les batteries (Chunga *et al.*, 2013). Les processus de corrosion peuvent également être surveillés dynamiquement en utilisant des isotopes stables enrichis ( $^{18}\text{O}$ ,  $^2\text{H}$ ) comme le montrent Yardley (Yardley *et al.*, 2013).

En biologie, les échantillons nécessitent une préparation sophistiquée pour résister à l'environnement de vide poussé du NanoSIMS. De nombreuses études appliquant le NanoSIMS à des échantillons biologiques utilisent des isotopes stables préparés dans un milieu de culture enrichi de  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$  pour étudier le métabolisme des organismes. En utilisant NanoSIMS, des cartes isotopiques de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  et  $^{12}\text{C}^{15}\text{N}/^{12}\text{C}^{14}\text{N}$  peuvent être obtenues ; il est alors possible d'étudier la dynamique des organismes à l'échelle submicrométrique (Musat *et al.*, 2012). L'étude de Penen (Penen *et al.*, 2020) est un bon exemple de l'utilisation d'isotopes stables pour étudier les processus métaboliques d'assimilation du carbone des microalgues (**Figure 1.8.a**). La même approche a été utilisée par Zhang (Zhang *et al.*, 2012) pour quantifier le renouvellement des protéines dans les cellules ciliées. Cette approche peut être combinée avec l'utilisation de sondes fluorescentes contenant des halogènes (tels que  $^{81}\text{Br}$  et  $^{127}\text{I}$ ) pour suivre des cibles spécifiques, une technique connue sous le nom d'hybridation *in situ* par fluorescence (FISH). À titre d'exemple, cette approche a permis à Li (Li *et al.*, 2008) de déterminer simultanément l'identité et la fonction microbiennes.

Un nombre d'études relativement restreint a traité de l'analyse des métaux dans des échantillons biologiques par NanoSIMS car la plupart des métaux nécessitent une source d'ions primaires d'oxygène pour obtenir une bonne sensibilité, les métaux dans ces échantillons étant généralement présents en faible concentration. La nouvelle source d'oxygène RF (Malherbe *et al.*, 2016) a montré des améliorations majeures par rapport à l'ancienne source duoplasmatron en termes de résolution latérale et de sensibilité plus élevées, et permet ainsi même l'imagerie des éléments traces au niveau subcellulaire. Malherbe (Malherbe *et al.*, 2016) l'ont démontré de manière impressionnante par la détection sensible et la localisation de métaux essentiels aux niveaux basaux dans les chloroplastes d'une cellule de feuille d'*Arabidopsis thaliana* (**Figure 1.8.b**). Le potentiel d'analyse des éléments à des concentrations traces avec les deux sources d'ions étend également les possibilités de recherche au domaine des

sciences de l'environnement, permettant la détection de l'accumulation de polluants dans les organismes vivants (Ender *et al.*, 2019). Enfin, compte tenu de l'utilisation croissante des nanoparticules dans les produits quotidiens, on s'attend à ce que le NanoSIMS, de par son excellente résolution latérale, représente un instrument de choix pour étudier leurs effets sur les organismes (Lozić *et al.*, 2016; Mehennaoui *et al.*, 2018).



**Figure 1.8.** Exemples d'imagerie NanoSIMS. (a) Image isotopique du carbone d'une cellule de micro-algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) montrant l'assimilation du carbone dans des plaques d'amidon sous exposition au cadmium (Penen *et al.*, 2020). (b) Accumulation de 30 images consécutives (plans) pour la détection sensible et la localisation des métaux essentiels aux niveaux basaux dans les chloroplastes d'une cellule de feuille d'*Arabidopsis thaliana* (Malherbe *et al.*, 2016). Barres d'échelle 2  $\mu\text{m}$ .

### 1.8. Imagerie par spectrométrie de masse des ions secondaires TOF-SIMS (Time-Of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry)

Au cours des dernières années, l'imagerie par spectrométrie de masse est apparue comme un outil puissant de recherche dans le domaine biomédical. Cette technique permet en effet de réaliser de l'imagerie chimique sans avoir recours à des marqueurs spécifiques, comme c'est le cas en microscopie, et fournit des informations à la fois élémentaires et moléculaires. Parmi les techniques de MSI adaptées à l'analyse cellulaire et tissulaire, la spectrométrie de masse des ions secondaires à temps de vol (TOF-SIMS) peut détecter de nombreuses espèces chimiques avec une sensibilité élevée (ppm-ppb) et une résolution latérale pouvant atteindre 100 nm. Le TOF-SIMS peut détecter à la fois des molécules organiques et inorganiques, ainsi que des éléments traces tels que des espèces métalliques (Lee *et al.*, 2017). C'est une technique

particulièrement efficace pour l'imagerie des lipides, mais aussi d'acides nucléiques, d'acides aminés, de métabolites, de médicaments, de toxines et d'éléments (Gilmore, 2013). Son application pour l'imagerie biologique est relativement récente. À la fin des années 70, la technique était largement utilisée pour l'étude des semi-conducteurs, puis dans les années 90, son champ d'application s'est élargi aux matériaux organiques tels que les polymères. Enfin, au début des années 2000, les premières images TOF-SIMS de systèmes biologiques ont été publiées grâce notamment au développement des faisceaux d'ions polyatomiques. De nombreuses publications se sont alors concentrées sur l'imagerie tissulaire et unicellulaire mais les récents développements technologiques, en particulier l'analyse structurale couplée à l'imagerie, offrent de nouvelles perspectives analytiques pour la recherche en biologie et en médecine (Massonnet et Heeren, 2019).

### **1.8.1. Principes de base de la technique TOF-SIMS**

Commençons par l'acronyme SIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry), qui définit la base de la technique, à savoir la formation d'ions dits secondaires lors de l'irradiation d'une surface solide par un faisceau focalisé d'ions dits primaires (dont l'énergie varie de plusieurs keV à dizaines de keV) (Vickerman et Briggs, 2013; Fearn, 2015; Gilmore, Heiles et Pieterse, 2019). Lors de l'impact, le phénomène physique appelé « cascade de collisions » se produit, provoquant la transition de molécules de l'échantillon en phase gazeuse et l'ionisation de certaines d'entre-elles. Le SIMS est donc une méthode dite de désorption-ionisation. Les ions secondaires émis peuvent être chargés positivement ou négativement. Ainsi, il faut réaliser l'analyse séparément dans les deux polarités, positive et négative, afin de récolter et caractériser l'ensemble des ions émis de la surface. La probabilité d'ionisation est spécifique à chaque composé et dépend de son environnement au sein de l'échantillon, on parle d'effet de matrice (Shard *et al.*, 2015); ce phénomène est encore mal compris, ce qui rend quasi-impossible l'analyse quantitative en SIMS. Il faut généralement se contenter de mesures relatives ou comparatives lors de l'étude d'échantillons biologiques. Très souvent, l'imagerie TOF-SIMS est utilisée pour identifier un composé qui est plus ou moins abondant dans un tissu ou une cellule, et par la suite la LC-MS/MS est utilisée pour obtenir des informations quantitatives concernant ce composé (Newman *et al.*, 2017). Il est également possible d'obtenir des informations quantitatives relatives en utilisant des marqueurs isotopiques (Philipsen *et al.*, 2018). La topographie de l'échantillon ainsi que les effets de charge en surface sont également des facteurs importants pour l'analyse. Une surface plane (de quelques  $\mu\text{m}$ ) doit être privilégiée dans la mesure du possible et l'utilisation de systèmes de compensation de charges développés par les différents constructeurs (simple faisceau  $e^-$  ou double faisceau  $e^-$ /ions de faible énergie) permet de réduire ces effets de charges en surface et d'analyser tous types d'échantillons conducteurs, semi-conducteurs et isolants. Parce que le faisceau d'ions primaires focalisé a un petit diamètre, il peut être utilisé pour scanner la surface de l'échantillon afin de générer une image où chaque

pixel représente un spectre de masse ; en d'autres termes, les images ioniques en TOF-SIMS sont des données hyperspectrales, qui permettent de visualiser la distribution des composants chimiques à la surface en montrant l'intensité des ions détectés par pixel. La résolution spatiale ou latérale des images 2D est déterminée par le diamètre du faisceau d'ions primaires car la taille des pixels doit correspondre à la taille du spot du faisceau incident. La source d'analyse la plus utilisée actuellement est la source d'ions à pointe liquide (liquid metal ion gun, LMIG) en raison de sa petite taille de faisceau et de son courant élevé. Cette source peut être équipée d'un émetteur Gallium, Or ou Bismuth (le plus répandu actuellement). Une source LMIG permet de sélectionner des ions primaires monoatomiques ( $\text{Ga}^+$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Bi}^+$ ) ou des petits agrégats/clusters d'ions ( $\text{Au}_n^+$ ,  $\text{Bi}_n^+$ ). Les clusters d'ions ont une énergie par atome incident plus faible, ce qui limite la profondeur de la cascade de collisions et améliore la densité d'énergie déposée près de la surface, et donc le rendement d'émission d'ions secondaires (Touboul *et al.*, 2005). Le diamètre du faisceau d'une source à pointe liquide de bismuth peut être focalisé jusqu'à 150 nm. Cependant, comme de courtes impulsions d'ionisation sont nécessaires ( $<1$  ns) pour une résolution en masse optimale, le faisceau d'ions est condensé et pulsé avec des plaques défectrices (« bunched » mode). Cela crée des impulsions très courtes et intenses mais élargit la distribution d'énergie cinétique, conduisant à un spot de faisceau de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . Cela signifie qu'il existe un compromis entre les résolutions en masse et latérale dans un instrument TOF-SIMS typique tel que les appareils de chez IONTOF (TOF-SIMS V) ou de chez Physical Electronics (NanoTOF II). Pour augmenter la résolution spatiale sans compromettre la résolution en masse, il est possible d'utiliser un faisceau d'ions primaires non condensé (« unbunched » mode) et d'appliquer le principe de l'extraction retardée (utilisée dans les instruments MALDI-TOF depuis déjà deux décennies), dont l'efficacité sur les instruments TOF-SIMS a été démontrée par Vanbellingen (Vanbellingen *et al.*, 2015) Ce développement a permis d'étudier de plus fines caractéristiques dans des matériaux biologiques, avec un faisceau d'analyse sub-micrométrique, et sans compromettre la résolution en masse (Blockhuys, Malmberg et Wittung-Stafshede, 2018; Henss *et al.*, 2018). La dose d'ions primaires (ions/ $\text{cm}^2$ ) est également un paramètre important car elle conduit à deux modes d'analyse très distincts, qui sont appelés SIMS statique et SIMS dynamique. L'énergie de plusieurs keV des ions primaires est suffisante pour rompre toute liaison chimique. On estime que l'endommagement par collision d'un ion primaire s'étend sur une zone de plusieurs nm autour de sa trajectoire, et les structures moléculaires dans ce volume ne correspondent plus à celles de l'échantillon d'origine (Van Vaeck, Adriaens et Gijbels, 1999). En limitant le nombre d'ions primaires pour éviter d'impacter plus d'une fois la même zone, les spectres de masse conservent les informations moléculaires. Il s'agit de la limite dite statique, qui est déterminée empiriquement et estimée à  $10^{12}$  ions primaires/ $\text{cm}^2$  pour les échantillons organiques (Benninghoven, Jaspers et Sichtermann, 1976). En mode statique, seules les deux à trois premières couches atomiques ( $\approx 1\text{nm}$ ) de l'échantillon sont analysées ce qui fait du TOF-SIMS une technique d'analyse d'extrême surface.

### 1.8.2. Profilage en profondeur

Il est également possible de faire des analyses en profondeur de la surface d'un échantillon par TOF-SIMS en réalisant des profilages à simple ou double faisceaux (Dual Beam Depth Profiling). Dans ce dernier cas, un faisceau d'analyse (LMIG Bi par exemple) à haute énergie par atome, est utilisé en alternance avec un faisceau de pulvérisation, à basse énergie par atome pour éviter des dommages sous la surface (Brison, Muramoto et Castner, 2010). Les ions agrégats tels que  $C_{60}^+$  ou  $Ar_n^+$  ( $n= 500$  à 5000) permettent des faisceaux de pulvérisation plus appropriés pour l'analyse de molécules biologiques que les ions monoatomiques ( $Ar^+$ ,  $O_2^+$ ,  $Cs^+$ ...), en raison de leur plus grande taille, de leur profondeur d'implantation plus faible et de leurs rendements de pulvérisation particulièrement élevés, causant moins de dommages chimiques résiduels (Delcorte *et al.*, 2020). Avec une source de pulvérisation telle qu'un faisceau d'ions agrégats d'argon, la reconstruction d'images chimiques en 3D à partir des profils en profondeur devient alors possible avec une résolution en profondeur de l'ordre de 5 nm. Cela a permis l'imagerie 3D de cellules individuelles (Tian *et al.*, 2017), de tissus (Starr *et al.*, 2019), de végétaux (Péresse *et al.*, 2017) et de biofilms (Benettoni *et al.*, 2019) avec une résolution spatiale élevée. Il faut noter que la vitesse d'érosion de l'échantillon étant dépendante de sa composition chimique (organique, inorganique, mix organique/inorganique), il est difficile de déterminer avec précision la profondeur réellement décapée ; le recours à des échantillons de référence, dont le taux de pulvérisation est connu, peut-être une solution mais difficilement adaptable aux échantillons biologiques dont la composition est complexe.

### 1.8.3. Principe de l'analyseur à temps de vol

Un analyseur de masse à temps de vol accélère les ions secondaires en appliquant un champ électrique statique avec une différence de potentiel qui est d'environ 2000 V. L'énergie potentielle est convertie en énergie cinétique et accélère les ions vers l'extracteur. Après cela, les ions se déplacent librement dans un tube sans champ vers le détecteur. La vitesse de chaque ion dans ce tube de vol dépendra de sa masse. Les ions les plus légers ont des vitesses plus élevées et atteignent le détecteur en premier, tandis que les ions plus lourds ont des vitesses plus faibles et atteignent le détecteur les derniers. Ce temps de parcours de l'ordre de la microseconde est enregistré par le détecteur et peut être converti en un rapport masse sur charge ( $m/z$ ) à l'aide de la formule suivante :  $\frac{m}{z} = 2eV \left(\frac{t}{D}\right)^2$  avec  $m$  la masse de l'ion,  $z$  le nombre de charges de l'ion,  $e$  la charge électrique d'un électron,  $V$  le potentiel d'accélération,  $t$  le temps de vol et  $D$  la longueur de la trajectoire de vol. La longueur du tube de vol est généralement d'environ 2 m, ce qui signifie que la pression dans le système doit être suffisamment basse pour assurer aux ions un libre parcours moyen d'au moins cette distance. C'est la raison pour laquelle le TOF-SIMS est une technique dite à

ultravide (UHV) avec des pressions dans la chambre principale de  $10^{-9}$  hPa. La résolution en masse dépend de trois paramètres : le temps de formation de l'ion (nécessité de courtes impulsions d'ionisation  $<1\text{ns}$ ), de sa position dans le champ d'extraction (nécessité d'une surface plane) et de son énergie cinétique initiale ; pour réduire les effets de celle-ci, une tension d'extraction élevée (2000 V) est appliquée et un réflectron ou un analyseur électrostatique à triple focalisation (TRIFT) est utilisé. En effet un TOF linéaire n'a qu'une résolution en masse de 300 à 400 alors qu'elle peut atteindre 10 000 ou plus avec un réflectron ou un TRIFT (Cotter, 1993). La grande transmission des analyseurs de masse par temps de vol rend ceux-ci particulièrement adaptés au SIMS statique, en plus d'être une technique « panoramique », qui détecte tous les signaux simultanément avec une gamme masse détectable de 1 à 10 kDa. Les spectres de masse TOF-SIMS sont souvent complexes et dépendent des conditions d'analyse utilisées (type d'ions primaires, énergie du faisceau incident, nature de l'échantillon...) mais ils présentent certaines caractéristiques : à  $m/z$  élevé, sont détectées des molécules protonées  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , des molécules cationisées  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $[\text{M}+\text{K}]^+$ ... parfois des espèces radicalaires  $\text{M}^{\bullet}$ , ainsi qu'une grande quantité d'ions fragments. Ces observations peuvent être rationalisées comme une combinaison d'ionisation par impact électronique et de cationisation comme cela est décrit par le modèle de désorption-ionisation de Cooks et Busch (Cooks et Busch, 1983).

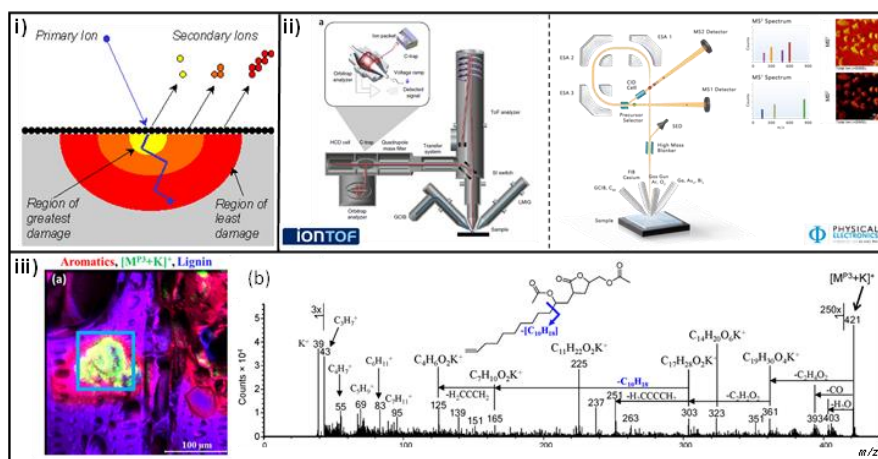
#### 1.8.4. Traitement des données

L'une des raisons pour lesquelles l'imagerie par spectrométrie de masse TOF-SIMS est sous-utilisée est le manque d'outils puissants de traitement des données, dont le volume généré par analyse est impressionnant (un spectre de masse typique contient environ 1000 pics et une image 3D se compose en moyenne de  $256 \times 256 \times 256$  voxels soit plus de 16 milliards de points) (Henderson, Moore et Vickerman, 2013). Les spectres de masse TOF-SIMS sont également difficiles à interpréter et les approches à l'aide de bibliothèques spectrales ont montré leur limite en raison des effets de matrice mal compris et du mécanisme complexe de formation d'ions. De plus, les systèmes biologiques sont constitués de molécules qui contiennent souvent les mêmes éléments constitutifs, difficiles à différencier. Pour réduire la complexité des ensembles de données, des outils d'analyse multivariée (MVA), telle que l'analyse en composante principale (ACP) (Trindade, Abel et Watts, 2018), ont été adoptés depuis le début des années 2000. Graham *et al.* fournissent une vue d'ensemble des études TOF-SIMS qui ont été menées à l'aide d'au moins une méthode MVA (Graham et Castner, 2012).

#### 1.8.5. Tandem MS

Pour améliorer l'identification spectrale, des technologies basées sur la spectrométrie de masse en tandem ont été récemment développées par les différents

constructeurs TOF-SIMS. Cette technique permet de sélectionner un ion dans le premier analyseur puis de le fragmenter par dissociation induite par collision (CID) à travers une cellule de collision gazeuse. Le spectre de masse obtenu est spécifique à l'ion précurseur choisi (tant qu'il n'y a pas d'interférences isobariques) et peut être directement comparé à une bibliothèque de références MS/MS. Les principaux fabricants ont opté pour des approches différentes ; on citera les appareils NanoToF MS/MS de chez Physical Electronics et SIMS Hybride/OrbiSIMS d'IONTOF, qui combinent un instrument TOF-SIMS traditionnel avec pour le premier une cellule CID et un analyseur TOF linéaire (Fisher *et al.*, 2016) (permettant l'imagerie parallèle  $MS^1/MS^2$  simultanément), et pour le second un analyseur Orbitrap (avec une résolution en masse jusqu'à 240 000 à  $m/z$  200 et une précision en masse  $< 1$  ppm) (Passarelli *et al.*, 2017). Cette technologie Tandem MS trouve actuellement de plus en plus d'applications biologiques. Fu *et al.* ont ainsi pu caractériser et localiser des  $\gamma$ -lactones bioactives dans le bois tropical *Sextonia rubra* (Figure 1.9.) (Fu *et al.*, 2018) et Shi *et al.* ont confirmé l'identité des diacylglycérols et des sphingomyélines dans les artères en resténose (Shi *et al.*, 2019). Zhang *et al.* ont également réalisé par cryo-OrbiSIMS l'imagerie moléculaire 3D d'un biofilm de *P. aeruginosa* dans son état natif (J. Zhang *et al.*, 2020).



**Figure 1.9.** Schéma de principe de la cascade de collision lors de l'ionisation-désorption d'une surface analysée par TOF-SIMS ii) Configurations des appareils 3D OrbiSIMS d'IONTOF et NanoToF II Tandem MS de Physical Electronics iii) Images ioniques et spectre MS/MS enregistrés à la surface d'une coupe transversale de bois tropical *Sextonia rubra* : (a) superposition des images  $MS^1$  et  $MS^2$  d'ions fragments aromatiques ( $MS^1$ ,  $m/z$  77.04 et 91.06, rouge), des ions  $[M^{P3}+K]^+$  ( $MS^2$ ,  $m/z$  421, vert), et des ions fragments de lignine ( $MS^1$ ,  $m/z$  137,06, 151,08, 167,07 et 181,05, bleu), sur un champ de vision de  $300 \times 300 \mu m^2$  acquis à  $512 \times 512$  pixels. (b) Spectre  $MS^2$  résultant de la fragmentation CID des ions  $[M^{P3}+K]^+$  ( $m/z$  421). La



*structure moléculaire proposée de la  $\gamma$ -lactone pour  $M^{P3}$  est indiquée dans l'encart.  
Figure extraite de Fu (Fu et al., 2018) avec permission.*

## 1.9. Traitement des données d'imagerie

Les approches d'imagerie par spectrométrie de masse, selon l'instrument utilisé, génèrent de grands volumes de données pouvant atteindre jusqu'à quelques dizaines voire centaines de giga octets par image. La taille des données rend souvent leurs analyses insolubles d'un point de vue informatique. Il existe différentes solutions disponibles pour les chercheurs ; certaines sont commerciales tandis que d'autres sont libres/open-source (Free Open Source Software), ou encore développés en interne. Le traitement des données entre les différentes techniques MSI fait appel à une stratégie computationnelle assez similaire : une étape de traitement du signal, visualisation des données, analyses statistiques, et identification élémentaire/moléculaire (Buchberger *et al.*, 2018; Alexandrov, 2020; Verbeeck, Caprioli et Van de Plas, 2020).

### 1.9.1. Prétraitement

Avant l'analyse des données, le prétraitement peut aider à réduire la variance expérimentale induite par l'effet de la matrice tissulaire ou les artefacts de mesure. Le prétraitement peut également être utile pour réduire la taille des données afin d'être traitées plus efficacement par des outils de calcul et gagner du temps de traitement. Comme décrit par Norris (Norris *et al.*, 2007), les étapes de prétraitement telles que la correction de la ligne de base ou l'alignement spectral doivent être appliquées pour garantir une analyse précise des données. Pour l'alignement spectral, au lieu d'être effectué pendant le prétraitement, une autre approche courante consiste à utiliser une masse connue pour effectuer une calibration en temps réel pendant l'acquisition (Olsen *et al.*, 2005). Ce calibrant interne peut être, à titre d'exemple, un pic de matrice ou un analyte exogène appliqué lors du dépôt de matrice. Plus récemment, Brochu *et al.*, ont développé un algorithme basé sur un calibrant virtuel pour l'alignement spectral dans le but de pouvoir prétraiter un grand ensemble de données (Brochu *et al.*, 2019). À la suite de ces étapes de prétraitement, la normalisation spectrale est effectuée pour compenser les variations d'intensité de pic pixel à pixel dues aux erreurs environnementales et expérimentales (Taylor, Dexter et Bunch, 2018), comme décrit dans la section de quantification (1.10.1).

### 1.9.2. imzML – Un format commun pour les données de MSI

Les formats de données uniformisées facilitent grandement la manipulation et le traitement de grands ensembles de données. Un des formats de fichier commun utilisé pour les données de spectrométrie de masse est le format mzML. Celui-ci a été développée dans le cadre de la HUman Proteome Organization (HUPO) (Martens *et*

*al.*, 2011). Pour les besoins de la MSI et par extension de ce format mzML, un format de données plus spécifique a été établi : le format imzML (Römpf *et al.*, 2011; Schramm *et al.*, 2012). Toutes les informations sur ce dernier, y compris les spécifications techniques, les logiciels disponibles et les exemples de mise en œuvre, sont disponibles sur le site [www.imzml.org](http://www.imzml.org). Les données imzML sont divisées en deux fichiers. Les métadonnées sont stockées dans un fichier xml (\*.imzml) basé sur la structure du mzML. En plus du mzML, le vocabulaire contrôlé de l'imzML comprend des informations spécifiques à l'imagerie, telles que le nombre de pixels, les dimensions d'image x/y et la taille de pixel. Les données spectrales de masse de l'imzML sont stockées dans un fichier binaire séparé (\*.ibd) stockant efficacement de grands ensembles de données. Ces deux fichiers sont liés par un identificateur unique universel (UUID) qui garantit que les fichiers correspondants peuvent être distingués. Les données imzML sont obtenues en convertissant simplement les données propriétaires, liés à chaque constructeur de MS, en imzML avec un outil dédié. Ces outils de conversion, au même titre que les logiciels supportant ce format, sont disponibles *via* le site internet mentionné ci-dessus. De par la multitude de logiciels associé à leur spécificités, l'imzML offre plus de flexibilité dans le traitement des données car l'utilisateur n'est plus limité aux logiciels propriétaires et peut choisir l'option de traitement qui correspond le mieux à sa problématique. Un aspect important pour assurer l'interopérabilité est le respect des spécifications de format de données. Afin de faciliter ce processus, un validateur a été développé qui compare la structure d'un ensemble de données imzML avec les spécifications (Race et Römpf, 2018). Le résultat est une liste détaillée des erreurs par rapport aux spécifications standards, qui pourront être corrigées de façon automatique ou directement par l'utilisateur. Pour finir, ce format offre la possibilité d'un échange efficace et facile des données MSI. En effet, des ensembles de données complets peuvent être partagés entre les collaborateurs sans perte d'informations, qui se produit uniquement en partageant des images. Les résultats de différentes plates-formes d'instruments peuvent être affichés avec des paramètres identiques dans un seul logiciel pour une comparaison plus facile. Ceci est démontré par une étude multicentrique sur des coupes cérébrales de souris qui comprenait six plates-formes d'instruments différentes (Römpf *et al.*, 2015). L'instrumentation comprenait différentes sources d'ionisation telles que MALDI et SIMS ainsi que différents analyseurs de masse tels que TOF, FT-ICR et Orbitrap de quatre constructeurs différents. La comparaison de ces données à l'aide du logiciel propriétaire respectif pour chaque instrument est difficile car l'échelle de couleur et l'interpolation diffèrent considérablement. Dans cette étude, tous les ensembles de données ont été convertis en imzML puis affichés dans le logiciel open-source MSiReader (Robichaud, Garrard, *et al.*, 2013). Par conséquent, tous les ensembles de données peuvent être affichés avec des paramètres identiques pour l'échelle de couleur, l'interpolation et la normalisation. Il permet également à tous les partenaires de collaboration de visualiser et d'analyser les données complètes, c'est-à-dire les spectres de masse, facilitant une discussion plus détaillée des résultats.

### 1.9.3. Visualisation

En MSI, plusieurs étapes de traitement sont nécessaires pour obtenir une image de carte de densité des ions reflétant la distribution spatiale de divers éléments ou molécules à travers un tissu avec leur abondance relative. Un logiciel dédié est nécessaire pour gérer la visualisation de ce type de jeu de données. La revue de Weiskirchen *et al.* offre une description détaillée et une évaluation des différents logiciels dédiés à la MSI qu'ils soient open-source et/ou gratuits ou commerciaux (Weiskirchen *et al.*, 2019). Certains d'entre eux sont décrits brièvement dans le paragraphe suivant.

MSiReader est l'un des logiciels les plus convivial pour la lecture des données (Bokhart *et al.*, 2018). Il est disponible gratuitement et en open-source, et a été construit à partir du langage de programmation MATLAB. Il permet évidemment la visualisation des données MSI, mais intègre également de nombreuses fonctionnalités pour l'analyse des données, notamment la superposition avec des images histologiques, la normalisation, l'annotation, la sélection de régions d'intérêt, ainsi qu'un outil d'exportation pour la quantification. Plus récemment, SpectralAnalysis (Race *et al.*, 2016), un autre logiciel open source MATLAB a été développé. Celui-ci inclut plusieurs collections d'algorithmes pour le prétraitement et l'analyse multivariée des données d'imagerie. Plusieurs formats de données sont pris en charge tels que l'imzML le format du constructeur IONTOF pour la lecture des images TOF-SIMS, ainsi que l'importation de données ASCII dédié à la lecture de données Raman. SpectralAnalysis est capable de gérer plusieurs modalités d'imagerie spectrale, ce qui en fait une plate-forme potentielle pour développer et intégrer des données d'imagerie multimodale. Cardinal, développé *via* le langage de programmation R, est un logiciel également disponible librement et en open-source pour la visualisation et l'analyse statistique des expériences MSI (Bemis *et al.*, 2015). Il permet une modélisation statistique multivariée pour la segmentation d'image, l'inférence et la visualisation basée sur un modèle. L'avantage avec ce logiciel est qu'il offre une base pour les développeurs afin de concevoir et de mettre en œuvre de nouvelles méthodes d'analyse computationnelle et statistique. METASPACE2020 est une application web gratuite pour la visualisation et l'identification. Des ensembles de données à haute résolution de masse sont nécessaires pour permettre au logiciel d'interroger les bases de données essentiellement orientées sur les lipides, petites molécules ou métabolites (HMDB, Lipid Map, *etc.*). Il intègre également des fonctionnalités intéressantes comme un outil de colocalisation pour identifier les composés qui partagent la même distribution (Ovchinnikova *et al.*, 2020). Ce logiciel sert également de banque d'expériences MSI car les ensembles de données imzML sont téléchargés, publiquement ou en accès privé, sur les serveurs METASPACE. Les ensembles de données (fichiers \*.imzML et \*.ibd) peuvent ensuite être partagés avec la communauté METASPACE. Enfin, différents logiciels commerciaux comme High Definition Imaging (Waters), Multimaging (Imabiotech), IMAGEREVEAL MS (Shimadzu), MALDIVision

(PREMIER Biosoft), SCiLS Lab (Bruker) et SurfaceLab (IONTOF), *etc.*, ont été développés. Ils fournissent des interfaces conviviales avec des pipelines d'analyse de données complets tels que la visualisation, les outils d'enregistrement d'images, la segmentation spatiale, la quantification et / ou l'analyse statistique.

#### 1.9.4. Analyse computationnelle et statistique

La validation des différences statistiques inter- ou intra-échantillon est bénéfique dans de nombreuses applications. Le choix de l'analyse univariée appropriée dépendra de l'ensemble de données MSI et de l'hypothèse de l'expérience. Le test de Student démontre des différences quantitatives pour une  $m/z$  spécifique entre deux échantillons différents (Yajima *et al.*, 2018). Dans le cas d'une analyse sur des régions au sein d'une coupe de tissu, un test d'analyse de variance (ANOVA) peut être utilisé pour comparer trois régions ou plus (Blanc, Daudelin, *et al.*, 2018). Ces deux tests exigent que les données aient une distribution gaussienne, mais dans les échantillons biologiques, de telles distributions ne sont pas systématiquement obtenues et un test non paramétrique comme le test U de Mann-Whitney doit alors être effectué. Des tests de diagnostic spécifiques tels que l'analyse de la courbe ROC (receiver operating characteristic) peuvent également être appliqués pour déterminer la différence statistique (Hoo, Candlish et Teare, 2017). Dans de nombreux cas, un seul  $m/z$  ne suffit pas pour identifier correctement différentes conditions. Une analyse multivariée sera alors nécessaire pour générer les profils élémentaires ou moléculaire en combinant plusieurs  $m/z$  (Wang et Li, 2013).

Des outils d'analyse multivariée ou MVA ont été adoptés depuis le début des années 2000 afin de réduire la complexité des ensembles de données. La méthode la plus largement appliquée pour la MSI reste l'analyse en composantes principales (ACP) (Trindade, Abel et Watts, 2018). Celle-ci s'est avérée utile pour segmenter les données d'image et trouver des corrélations linéaires entre les pics de masse (Van Nuffel *et al.*, 2016). Elle fonctionne bien pour l'analyse exploratoire des données car elle n'est pas basée sur l'établissement d'un modèle, et constitue généralement un excellent point de départ avant d'appliquer d'autres méthodes pour analyser les données MSI (Graham et Castner, 2012). D'autres méthodes d'analyse multivariée qui sont liées à l'ACP et qui ont été appliquées aux données MSI comprennent la régression par les moindres carrés partiels (PLS) (Hook *et al.*, 2015), l'ACP avec partitionnement, le k-means (Palmer, Bunch et Styles, 2015), la classification ascendante hiérarchique (Urbini *et al.*, 2017), la factorisation matricielle non négative (NMF) (Trindade *et al.*, 2018), *etc.* Au fil du temps, les chercheurs ont développé diverses méthodes d'analyse de données non supervisées. La revue de Verbeeck (Verbeeck, Caprioli et Van de Plas, 2020) offre un examen détaillé des dernières avancées en termes d'intelligence artificielle tel que le « machine learning ».

### **1.9.5. Identification et validation des biomolécules**

Une fois que les outils statistiques ont désigné les caractéristiques potentielles d'un rapport  $m/z$  d'intérêt, l'attention se tourne vers leur identification et leur validation. En fonction de l'analyte, il existe une multitude de technologies disponibles pour transformer un  $m/z$  d'une caractéristique moléculaire en une molécule ayant une signification biologique.

L'identification des lipides, petites molécules ou métabolites se fera en considérant la résolution et l'exactitude en masse, ainsi qu'avec des expériences en tandem ou MS/MS. Cela dépendra du type de spectromètre de masse utilisé. De par ses spécificités, un spectromètre de masse haute résolution permettra de réduire le nombre d'annotations possibles. Des expériences complémentaires en tandem pourront éventuellement permettre une annotation plus fiable. Ces critères seront essentiels afin d'interroger des bases de données. L'annotation pourra se faire alors en utilisant des bases de données MS telles que lipidsMaps (Sud *et al.*, 2007), SwissLipids (Aimo *et al.*, 2015), ou Human Metabolome Database (Wishart *et al.*, 2018). METLIN (Guijas *et al.*, 2018) est plus une plateforme technologique qu'une base de données MS et MS/MS standard, car elle comprend également des outils pour les données isotopiques stables et pour rechercher les similitudes au niveau des fragments. A noter que la plateforme web METASPACE utilise notamment ces bases de données pour l'annotation des spectres de masse (Palmer *et al.*, 2017). Une approche plus conventionnelle consiste à effectuer une analyse en LC-MS avec expériences MS/MS sur une section adjacente afin de parfaire l'annotation.

L'identification des protéines présente plusieurs avantages par rapport aux molécules précédemment citées, à savoir qu'il existe un code génétique qui peut être référencé. Les protéines ont également des schémas de fragmentation en phase gazeuse prévisibles (Mekecha, Amunugama et McLuckey, 2006), ainsi que des mécanismes enzymatiques (Zhang *et al.*, 2013), permettant des recherches à partir de bases de données *in silico* telles que Protalizer (Heaven *et al.*, 2018), MASCOT (Perkins *et al.*, 1999), et UniProt (UniProt Consortium, 2019). Les protéines bénéficient également d'un taux de faux positif calculable. Une identification et validation par LC-MS sera requise et basée sur les méthodes d'extraction décrites dans la partie 1.5.4.2.

## **1.10. Futur et attentes en MSI**

### **1.10.1. Quantification par imagerie MALDI**

L'imagerie MALDI est principalement utilisée pour l'analyse qualitative en raison des problèmes d'hétérogénéité tissulaire / matrice, de suppression ionique et

d'extraction d'analytes perturbant la quantification précise des analytes. Au cours de la dernière décennie, les chercheurs ont développé des méthodes pour minimiser ces perturbations afin de rendre la MALDI-MSI quantitative. Les revues de Rzagalinski (Rzagalinski et Volmer, 2017), ou de Tobias & Hummon (Tobias et Hummon, 2020) se sont concentrées sur cet aspect de l'imagerie MALDI. Buchberger (Buchberger *et al.*, 2018) séparent la quantification en deux thèmes : la quantification relative et la quantification absolue émergente. Dans la plupart des cas, la comparaison avec la quantification établie par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (LC-MS) obtenue à partir de coupes sériées est toujours effectuée.

Concernant la quantification relative, l'idée principale est de pouvoir comparer la quantité d'un analyte donné dans différentes structures anatomiques au sein d'un même tissu (Blanc, Daudelin, *et al.*, 2018), ou sur différents tissus. De nombreux paramètres peuvent perturber l'intensité du signal de l'analyte, tels que les matrices tissulaires et la concentration locale de sel (Deininger *et al.*, 2011), compliquant les comparaisons directes à partir de différentes zones. Pour atténuer ce problème, les chercheurs ont développé différentes stratégies de normalisation des pixels pour compenser les perturbations du signal. La quasi-totalité des logiciels incluent des fonctionnalités de normalisation pendant le pré ou le post-traitement des données. L'une des stratégies de normalisation des pixels la plus communément utilisée est basée sur le courant ionique total (TIC) (Deininger *et al.*, 2011), divisant chaque pic par la somme de l'intensité de l'ensemble des spectres. Néanmoins, pour une approche non ciblée, une autre stratégie de semi-quantification consiste à utiliser un pic de référence, généralement un pic de matrice ou un pic d'une molécule endogène connue pour être homogène sur l'ensemble du tissu (Fonville *et al.*, 2012). Dans ce cas, les standards internes pourraient être utilisés comme pics de référence. Ces standards doivent être chimiquement similaires aux composés d'intérêt et exogènes pour éviter la diaphonie avec les spectres endogènes (Bokhart *et al.*, 2015). Hamm *et al.* démontrent une autre approche pour les analytes exogènes, comme les médicaments, basée sur le calcul d'un coefficient d'extinction tissulaire ou TEC (Hamm *et al.*, 2012). Dans ce but, une solution de l'analyte ciblé est pulvérisée sur une section témoin. Ensuite, le TEC correspondant à des zones tissulaires spécifiques (par exemple la substance blanche *vs.* la substance grise d'un cerveau) est calculé en divisant l'intensité moyenne du signal d'analyte de la zone de tissu spécifique par l'intensité moyenne d'une région de référence (de tissu). Pour les approches ciblées, l'utilisation d'un analogue marqué par un isotope stable (SIL) de l'analyte d'intérêt à quantifier, est devenue l'approche la plus fiable (Prideaux *et al.*, 2015; Schulz *et al.*, 2019). Celui-ci sera appliqué de manière homogène sur les tissus, parfois lors de l'application de la matrice. Cet analogue SIL conserve les propriétés chimiques et imite l'efficacité d'ionisation de l'analyte d'intérêt, mais se présente sous la forme d'un rapport  $m/z$  décalé, aisément détectable par MS.

La quantification absolue sera quant à elle basée sur la détermination d'une

concentration d'analyte par volume (ou poids) de tissu, la création d'une courbe d'étalonnage et la normalisation par des étalons internes. Trois stratégies de courbe d'étalonnage ont été développées par les chercheurs (Rzagalinski et Volmer, 2017). La méthode « *in solution* » consiste à déposer la gamme de concentration d'étalon à proximité de la section d'échantillon, puis à analyser. Cette méthode est facile à mettre en œuvre et a été utilisée pour divers analytes (Signor *et al.*, 2007), mais ne tient pas compte de l'effet de la matrice biologique sur le rendement d'extraction, ou l'efficacité des ions, et pourrait ainsi conduire à une mauvaise évaluation de la concentration de l'analyte. Cependant, la combinaison de la méthode en solution avec la normalisation TEC, tend à prendre en compte ces effets de matrice biologique (Hamm *et al.*, 2012). La méthode « *on-tissue* » repose sur le dépôt de la gamme de concentration directement sur un tissu de référence (Chumbley *et al.*, 2016). En cas de dosage d'un analyte exogène (comme des produits pharmaceutiques), une courbe standard peut être faite directement avec le composé d'intérêt sur un tissu témoin ou non traité. Dans le cas des analytes endogènes (lipides ou métabolites), les courbes standards sont réalisées avec un analogue SIL et peuvent être déposées sur des coupes adjacentes. Un deuxième analogue SIL doit être utilisé pour la normalisation. Cette méthode prend en compte les effets de l'ionisation de la matrice et de la suppression des ions, mais sa capacité à compenser l'extraction des analytes est encore débattue (Tobias et Hummon, 2020). Enfin, la méthode « *in-tissue* » vise à compenser les effets de l'ionisation de la matrice, la suppression des ions et l'extraction de l'analyte, en dopant la courbe standard directement dans un tissu mimétique (Jadoul *et al.*, 2015). Dans l'article de Barry *et al.*, des homogénats tissulaires contenant les concentrations en série de l'étalon interne sont congelés l'un après l'autre dans un moule (Barry, Groseclose et Castellino, 2019). Ensuite, ce tissu mime est coupé et déposé à proximité du tissu d'intérêt afin d'analyser ensemble l'échantillon d'intérêt et les tissus homogénéisés. Il a été montré que l'homogénat de tissu pour un type de tissu donné ne conviendra que pour le même type de tissu à étudier. A noter que la quantification sur différents types de tissus pourrait ne pas s'avérer fiable en raison de la liaison aux protéines (Hansen et Janfelt, 2016).

Afin de valider les résultats issus de l'imagerie MALDI, la LC-MS est utilisée pour permettre une quantification absolue des analytes ciblés au détriment des informations spatiales. Cela se fait à partir de coupes de tissus adjacentes et après une étape d'extraction conventionnelle. Cette méthode permet de comparer la concentration entre les coupes de tissu. La quantification absolue par LC-MS guidée par la MALDI-MSI est également une alternative intéressante. L'idée est de déterminer à l'avance la distribution des analytes cibles dans l'échantillon pour disséquer les régions d'intérêt (ROI), manuellement à macro-échelle ou par microdissection laser (LCM). La MALDI-MSI et la dissection, généralement effectuées sur des sections adjacentes (Zimmerman *et al.*, 2018), peuvent également être effectuées sur la même section de tissu (Marialaura Dilillo *et al.*, 2017). Le LESA, décrit précédemment, peut également être envisagé pour cette validation.

### 1.10.2. Défis et développements futurs en NanoSIMS

L'analyse quantitative est un défi majeur dans le NanoSIMS car le rendement en ions secondaires dépend fortement de l'énergie d'ionisation de l'élément chimique à analyser ainsi que de la matrice environnante, ce qui ne permet pas l'utilisation d'étalons génériques. Afin de surmonter ce problème, des facteurs de sensibilité relative pour les éléments peuvent être appliqués. Pour l'analyse semi-quantitative, les rapports d'intensité du signal des éléments ou de leurs isotopes sont utilisés. Par exemple, en biologie cellulaire, le marquage isotopique stable ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) des substrats permet la quantification des processus métaboliques. À l'avenir, des stratégies de quantification plus nouvelles sont attendues, telles que l'analyse de dilution isotopique dans le NanoSIMS, ainsi que le développement de matrix-matched standards. De plus, les logiciels performants de traitement d'image jouent un rôle majeur dans les stratégies de quantification.

D'autres développements futurs devraient inclure une nouvelle augmentation de la résolution latérale, une augmentation de la sensibilité, une préparation optimisée des échantillons ainsi qu'une imagerie 3D. Puisqu'une nouvelle source d'ions oxygène à plasma RF pour le NanoSIMS permet une résolution de 37 nm, de nouveaux concepts pour une nouvelle source d'ions césium permettent de s'attendre à une nouvelle diminution de la résolution pour atteindre 20 nm. La préparation des échantillons pour le NanoSIMS est encore assez laborieuse ; cependant, le développement futur d'un cryo-stage dans le NanoSIMS permettra l'analyse d'échantillons cryo-fixés sans procédures d'enrobage de résine et minimisera le risque de redistribution des éléments. Le NanoSIMS a la caractéristique spécifique que le faisceau d'ions enlève de la matière de la surface de l'échantillon au cours de chaque processus de balayage. Une analyse successive de la même zone et une combinaison des images des plans successifs, assistée par l'informatique, facilitera l'imagerie tridimensionnelle.

### 1.10.3. Imagerie multimodale

L'imagerie multimodale est une stratégie novatrice d'acquisition d'images combinant des informations chimiques provenant de différentes plateformes d'imagerie. Cette récente approche d'imagerie intégrée génère des informations combinées (somme de données provenant de méthodes individuelles), qui permet l'évaluation de changements chimiques subtils, et ouvre la voie à une vue d'ensemble multi-omique qualitative et quantitative pour un échantillon donné. En d'autres termes, la combinaison de plusieurs plateformes peut permettre de compenser les limitations liées aux techniques individuelles rendant cette stratégie analytique attractive. Cette approche intégrée, peu répandue, a déjà été initiée et mérite d'être clairement exploitée et proposée comme thématique d'avenir. À titre d'exemple, voici



quelques applications d'associations possibles entre les différentes technologies. Le TOF-SIMS et la MALDI-MSI ont été utilisés dans le cadre d'un développement méthodologique pour une étude lipidomique à partir d'une unique coupe de côlon humain cancéreux (Desbenoit *et al.*, 2018). Cette même association a été utilisée notamment pour l'étude de la distribution dans l'œil d'un additif de collyre (Brignole-Baudouin *et al.*, 2012), mais également dans des échantillons de roches pour l'étude de matière organique d'origine biologique ou abiotique (Ménez *et al.*, 2018). Une autre association prometteuse concerne la MALDI-MSI avec la LA-ICP-MS. Les auteurs ont utilisé cette stratégie pour étudier la distribution et la pénétration d'anticancéreux dans des échantillons humains tumoraux (Bianga *et al.*, 2014) Les enjeux analytiques sont nombreux et concernent essentiellement la préparation des échantillons qui doit idéalement être commune aux technologies utilisées, et compatible avec chacune ou présenter une compatibilité dans la chronologie des analyses successives. En effet, il faut être conscient que les récentes avancées instrumentales en termes de résolution spatiale montrent que nous nous rapprochons d'une taille de pixel comprise entre quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres selon les technologies utilisées. Il devient donc primordial de considérer ce type d'approche en utilisant, autant que faire se peut et au regard des technologies d'imagerie impliquées, une unique coupe d'échantillon. Les paramètres des acquisitions ont également leur importance car ces technologies, selon les paramètres utilisés, peuvent dégrader l'échantillon rendant son utilisation plus compliquée pour la suite de cette stratégie. Finalement, le dernier défi concerne le traitement des données d'imagerie issus de deux ou plusieurs technologies. Ces expériences sont actuellement considérablement freinées car menées sur des instruments le plus souvent différents, ne partageant pas le même format de fichier. Il est par conséquent nécessaire de travailler à la conversion de ces différents types de fichier en un seul format commun et flexible, afin de simplifier le traitement potentiellement simultané des données et leur corrélation. Comme mentionné précédemment, nous pourrions utiliser un format commun appelé « imzML ». L'utilisation d'un unique format permettra de traiter les données dans un unique logiciel afin d'utiliser des paramètres similaires pour la visualisation, normalisation, etc. Cette thématique d'imagerie multimodale peut également s'ouvrir à d'autres technologies d'imagerie en incorporant par exemple la microscopie, les spectroscopies vibrationnelles (Tuck *et al.*, 2021), l'ultraviolet (Petit *et al.*, 2010), la MRI (Grélard *et al.*, 2021), ou encore la microscopie électronique (da Cunha *et al.*, 2016).

#### **1.10.4. Imagerie in vivo**

Les nombreux développements réalisés depuis le début des années 2000 sur les sources ambiantes a conduit à revisiter la conception de la spectrométrie de masse en offrant des sources plus flexibles et situées à l'extérieur de l'analyseur de masse ; et ont poussé à des applications qui jusque-là n'auraient pas été envisageables. Ainsi, un intérêt particulier, faisant écho à un besoin important en termes d'applications, s'est

progressivement formé pour la translation de l'analyse *ex vivo* à l'analyse *in vivo*. Ces analyses *in vivo* se sont d'abord réalisées en mode « profiling » avec la source DESI (Roach, Laskin et Laskin, 2010), et d'autres comme le LAESI (Nemes et Vertes, 2007). Hormis pour le DESI qui dès 2004 avait été testé *in vivo* sur les mains de volontaires, la plupart des techniques ont été d'abord appliquées aux végétaux. La difficulté de la translation de l'analyse MS du contexte *ex vivo* à l'*in vivo*, réside dans la capacité trouver des conditions de biocompatibilité avec un minimum d'invasivité tout en préservant les performances analytiques. Les systèmes iKnife (Schäfer *et al.*, 2009; Balog *et al.*, 2013), puis SpiderMass (Fatou *et al.*, 2016; Saudemont *et al.*, 2018), et enfin MasSpec Pen (Zhang *et al.*, 2017; Sans *et al.*, 2019) ont apporté la preuve que la spectrométrie de masse *in vivo* devient possible. Par ailleurs ces trois technologies poussent même jusqu'à amener le spectromètre de masse au bloc opératoire (Zhang *et al.*, 2021). Le iKnife est limité à certaines utilisations puisque la technologie repose sur le couplage d'un spectromètre de masse à des outils chirurgicaux pour l'exérèse comme le bistouri électrique (St John *et al.*, 2017). Ainsi, les fumées émises par le système de chirurgie sont collectées et analysées en temps-réel par la MS. A l'inverse le SpiderMass et le MasSpec Pen sont mini-invasifs. Le SpiderMass utilise une micro-désorption par excitation résonnante des bandes d'absorption de l'eau à une longueur d'onde de 2.94  $\mu\text{m}$ . Ainsi, l'eau endogène aux tissus biologiques et très abondante (>50% quel que soit le tissu) est utilisée comme matrice MALDI pour assurer la désorption/ionisation. Le MasSpec Pen, quant à lui, repose sur une micro-extraction par de l'eau. Le système qui prend la forme d'un stylo permet d'envoyer une goutte de liquide en contact avec le tissu, puis de l'aspirer pour l'envoyer en analyse. Ces trois systèmes présentent la particularité d'amener une déportation de la source du corps du spectromètre. Ainsi pour l'iKnife et le SpiderMass la sonde (bistouri électrique et faisceau laser, respectivement) se trouve à plusieurs mètres et les aérosols produits (via le bistouri ou le laser) sont simplement aspirés jusqu'au spectromètre grâce à la différence de pression entre l'instrument et l'extérieur. Pour le MasSpec Pen, le stylo est également déporté et la goutte envoyée vers le spectromètre par aspiration pour analyse, mais la distance de déportation reste plus courte car le transfert de liquide s'avère plus difficile sur de longues distances sans pertes que les aérosols. Comme la technologie SpiderMass est basée sur un laser, la technologie permet de réaliser de l'imagerie *in vivo*. En adaptant le laser sur un bras robotisé, il s'est avéré possible de réaliser des images de surfaces, non planes et non préparées, en déplaçant la sonde au-dessus de la surface (Ogrinc *et al.*, 2020). Si ce système a été développé pour des applications comme outil d'aide à la chirurgie, d'autres applications sont envisageables dans de nombreux domaines comme la biologie végétale, les analyses médico-légales ou encore les études pharmacocinétiques ou la dermato/cosmétologie. L'imagerie *in vivo* ouvrira indéniablement à de nouveaux domaines non encore accessibles par les approches conventionnelles.

### 1.11. Références bibliographiques

Abrass, C. K. (2004) « Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. », *American journal of nephrology*, 24(1), p. 46-53. doi: 10.1159/000075925.

Van Acker, T. *et al.* (2016) « High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects », *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2016.10.014.

Van Acker, T. *et al.* (2019) « High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers », *Analytica Chimica Acta*, 1074, p. 43-53. doi: 10.1016/j.aca.2019.04.064.

Aerni, H.-R., Cornett, D. S. et Caprioli, R. M. (2006) « Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation », *Analytical Chemistry*, 78(3), p. 827-834. doi: 10.1021/ac051534r.

Aichler, M. et Walch, A. (2015) « MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice », *Laboratory Investigation*, 95(4), p. 422-431. doi: 10.1038/labinvest.2014.156.

Aimo, L. *et al.* (2015) « The SwissLipids knowledgebase for lipid biology. », *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(17), p. 2860-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btv285.

Ait-Belkacem, R. *et al.* (2013) « Tubulin isoforms identified in the brain by MALDI in-source decay », *Journal of Proteomics*, 79, p. 172-179. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.026.

Alexandrov, T. (2020) « Spatial Metabolomics and Imaging Mass Spectrometry in the Age of Artificial Intelligence », *Annual Review of Biomedical Data Science*, 3(1), p. 61-87. doi: 10.1146/annurev-biodatasci-011420-031537.

Angel, P. M. *et al.* (2012) « Enhanced sensitivity for high spatial resolution lipid analysis by negative ion mode matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac202383m.

Angerer, T. B., Mohammadi, A. S. et Fletcher, J. S. (2016) « Optimizing sample preparation for anatomical determination in the hippocampus of rodent brain by ToF-SIMS analysis », *Biointerphases*. doi: 10.1116/1.4941064.

Aramendía, M. *et al.* (2015) « Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(1), p. 296-309. doi: 10.1039/C4JA00313F.

Arnaud, B. *et al.* (2020) « Imaging Study by Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures in Corn Stalks », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), p. 4042-4050. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07579.

Arnaudguilhem, C. *et al.* (2021) « Toward a comprehensive study for multielemental quantitative LA-ICP MS bioimaging in soft tissues », *Talanta*. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121537.

Badro, J. *et al.* (2007) « Chemical imaging with NanoSIMS: A window into deep-Earth geochemistry », *Earth and Planetary Science Letters*, 262(3-4), p. 543-551. doi: 10.1016/j.epsl.2007.08.007.

Bagley, M. C. *et al.* (2018) « IR-MALDESI mass spectrometry imaging of underivatized neurotransmitters in brain tissue of rats exposed to tetrabromobisphenol A », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(30), p. 7979-7986. doi: 10.1007/s00216-018-1420-0.

Balog, J. *et al.* (2013) « Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry », *Science Translational Medicine*, 5(194), p. 194ra93-194ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3005623.

Bao, Z. *et al.* (2017) « Development of pressed sulfide powder tablets for in situ sulfur and lead isotope measurement using LA-MC-ICP-MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 421, p. 255-262. doi: 10.1016/j.ijms.2017.07.015.

Barry, J. A. *et al.* (2015) « Assessing drug and metabolite detection in liver tissue by UV-MALDI and IR-MALDESI mass spectrometry imaging coupled to FT-ICR MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, p. 448-455. doi: 10.1016/j.ijms.2014.05.012.

Barry, J. A., Groseclose, M. R. et Castellino, S. (2019) « Quantification and assessment of detection capability in imaging mass spectrometry using a revised mimetic tissue model. », *Bioanalysis*, 11(11), p. 1099-1116. doi: 10.4155/bio-2019-0035.

Bauer, O. B. *et al.* (2019) « LA-ICP-TOF-MS for rapid, all-elemental and quantitative bioimaging, isotopic analysis and the investigation of plasma processes », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00288f.

Beavis, R. C., Chait, B. T. et Fales, H. M. (1989) « Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), p. 432-435. doi: 10.1002/rcm.1290031207.

Bemis, K. D. *et al.* (2015) « Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments: Fig. 1. », *Bioinformatics*, 31(14), p. 2418-2420. doi: 10.1093/bioinformatics/btv146.

Benettoni, P. *et al.* (2019) « Identification of nanoparticles and their localization in algal biofilm by 3D-imaging secondary ion mass spectrometry », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(6), p. 1098-1108. doi: 10.1039/C8JA00439K.

Benninghoven, A., Jaspers, D. et Sichtermann, W. (1976) « Secondary-ion emission of amino acids », *Applied Physics*, 11(1), p. 35-39. doi: 10.1007/BF00895013.

Benninghoven, A. et Loebach, E. (1971) « Tandem mass spectrometer for secondary ion studies », *Review of Scientific Instruments*. doi: 10.1063/1.1684875.

Benninghoven, A., Rudenauer, F. G. et Werner, H. W. (1987) *Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications and Trends*. John Wiley & Sons Inc.

Bianga, J. *et al.* (2014) « Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor », *Metallomics*, 6(8), p. 1382-1386. doi: 10.1039/C4MT00131A.

Bishop, D. P. *et al.* (2016) « Elemental bio-imaging using laser ablation-triple quadrupole-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c5ja00293a.

Blanc, L., Daudelin, I. B., *et al.* (2018) « High-resolution mapping of fluoroquinolones in TB rabbit lesions reveals specific distribution in immune cell types », *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.41115.

Blanc, L., Lenaerts, A., *et al.* (2018) « Visualization of Mycobacterial Biomarkers and Tuberculosis Drugs in Infected Tissue by MALDI-MS Imaging », *Analytical Chemistry*, 90(10), p. 6275-6282. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00985.

Blockhuys, S., Malmberg, P. et Wittung-Stafshede, P. (2018) « Copper distribution in breast cancer cells detected by time-of-flight secondary ion mass spectrometry with delayed extraction methodology », *Biointerphases*, 13(6), p. 06E412. doi: 10.1116/1.5053814.

Bokhart, M. T. *et al.* (2015) « Quantitative mass spectrometry imaging of emtricitabine in cervical tissue model using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2073-84. doi: 10.1007/s00216-014-8220-y.

Bokhart, M. T. *et al.* (2018) « MSiReader v1.0: Evolving Open-Source Mass Spectrometry Imaging Software for Targeted and Untargeted Analyses », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(1), p. 8-16. doi: 10.1007/s13361-017-1809-6.

Bouschen, W. *et al.* (2010) « Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells », *Rapid Communications*

*in Mass Spectrometry*, 24(3), p. 355-364. doi: 10.1002/rcm.4401.

Brahmi, C. *et al.* (2012) « Pulsed <sup>86</sup>Sr-labeling and NanoSIMS imaging to study coral biomineralization at ultra-structural length scales », *Coral Reefs*, 31(3), p. 741-752. doi: 10.1007/s00338-012-0890-3.

Briggs, M. T. *et al.* (2019) « MALDI Mass Spectrometry Imaging of Early- and Late-Stage Serous Ovarian Cancer Tissue Reveals Stage-Specific N- Glycans », *PROTEOMICS*, 19(21-22), p. 1800482. doi: 10.1002/pmic.201800482.

Brignole-Baudouin, F. *et al.* (2012) « A New Safety Concern for Glaucoma Treatment Demonstrated by Mass Spectrometry Imaging of Benzalkonium Chloride Distribution in the Eye, an Experimental Study in Rabbits », *PLoS ONE*. Édité par B. V. Bui, 7(11), p. e50180. doi: 10.1371/journal.pone.0050180.

Brison, J., Muramoto, S. et Castner, D. G. (2010) « ToF-SIMS Depth Profiling of Organic Films: A Comparison between Single-Beam and Dual-Beam Analysis », *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(12), p. 5565-5573. doi: 10.1021/jp9066179.

Brochu, F. *et al.* (2019) « Mass spectra alignment using virtual lock-masses », *Scientific Reports*, 9(1), p. 8469. doi: 10.1038/s41598-019-44923-8.

Brown, R. S. et Lennon, J. J. (1995) « Sequence-Specific Fragmentation of Matrix-Assisted Laser-Desorbed Protein/Peptide Ions », *Analytical Chemistry*, 67(21), p. 3990-3999. doi: 10.1021/ac00117a027.

Buchberger, A. R. *et al.* (2018) « Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04733.

Burger, M. *et al.* (2015) « High-Speed, High-Resolution, Multielemental LA-ICP-TOFMS Imaging: Part II. Critical Evaluation of Quantitative Three-Dimensional Imaging of Major, Minor, and Trace Elements in Geological Samples », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01977.

Calvano, C. D. *et al.* (2018) « MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(17), p. 4015-4038. doi: 10.1007/s00216-018-1014-x.

Caprioli, R. M., Farmer, T. B. et Gile, J. (1997) « Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac970888i.

Cardon, T., Fournier, I. et Salzet, M. (2021) « Shedding Light on the Ghost Proteome », *Trends*

in *Biochemical Sciences*, 46(3), p. 239-250. doi: 10.1016/j.tibs.2020.10.003.

Carter, C. L. *et al.* (2020) « MALDI-MSI spatially maps N-glycan alterations to histologically distinct pulmonary pathologies following irradiation », *Scientific Reports*, 10(1), p. 11559. doi: 10.1038/s41598-020-68508-y.

Carter, C. L., McLeod, C. W. et Bunch, J. (2011) « Imaging of phospholipids in formalin fixed rat brain sections by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1007/s13361-011-0227-4.

Castaing, R. et Slodzian, G. (1962) « Microanalyse par emission ionique secondaire », *Journal of Microscopie*.

Chaurand, P. *et al.* (2008) « Imaging mass spectrometry of intact proteins from alcohol-preserved tissue specimens: Bypassing formalin fixation », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr800286z.

Chen, H. *et al.* (2007) « Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination », *Journal of Mass Spectrometry*, 42(8), p. 1045-1056. doi: 10.1002/jms.1235.

Christien, F. *et al.* (2013) « Quantitative grain boundary analysis of bulk samples by SIMS », *Surface and Interface Analysis*, 45(1), p. 305-308. doi: 10.1002/sia.4884.

Chughtai, K. et Heeren, R. M. A. (2010) « Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis », *Chemical Reviews*. doi: 10.1021/cr100012c.

Chumbley, C. W. *et al.* (2016) « Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues. », *Analytical chemistry*, 88(4), p. 2392-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04409.

Chunga, E. H. *et al.* (2013) « Structural and electrochemical properties of carbon-coated Li<sub>4</sub>Ti<sub>5</sub>O<sub>12</sub> anodic material obtained using chitosan for potential lithium ion rechargeable battery applications », *Journal of Ceramic Processing Research*, 14, p. 304-310.

Clases, D. *et al.* (2019) « LA-ICP-MS/MS improves limits of detection in elemental bioimaging of gadolinium deposition originating from MRI contrast agents in skin and brain tissues », *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 51, p. 212-218. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.10.021.

Cody, R. B., Laramée, J. A. et Durst, H. D. (2005) « Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions », *Analytical Chemistry*, 77(8), p. 2297-2302. doi: 10.1021/ac050162j.

Cooks, R. G. et Busch, K. L. (1983) « Matrix effects, internal energies and MS/MS spectra of molecular ions sputtered from surfaces », *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 53, p. 111-124. doi: 10.1016/0020-7381(83)85106-7.

Cotter, R. J. (1993) « Time-of-Flight Mass Spectrometry », in, p. 16-48. doi: 10.1021/bk-1994-0549.ch002.

Crone, B. *et al.* (2019) « Quantitative imaging of platinum-based antitumor complexes in bone tissue samples using LA-ICP-MS », *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.04.011.

Cruz-Alonso, M. *et al.* (2019) « Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease », *Talanta*, 197, p. 413-421. doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.056.

da Cunha, M. M. L. *et al.* (2016) « Overview of chemical imaging methods to address biological questions. », *Micron (Oxford, England : 1993)*, 84, p. 23-36. doi: 10.1016/j.micron.2016.02.005.

d'Abzac, F. X. *et al.* (2020) « Comparison of 1030 nm and 257 nm wavelengths for U-Pb zircon dating by femtosecond laser ablation – Inductively coupled plasma mass spectrometry with support of 3D crater imaging », *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. doi: 10.1016/j.sab.2020.105863.

Debois, D. *et al.* (2010) « MALDI-In Source Decay Applied to Mass Spectrometry Imaging: A New Tool for Protein Identification », *Analytical Chemistry*, 82(10), p. 4036-4045. doi: 10.1021/ac902875q.

Debois, D., Brunelle, A. et Laprévotte, O. (2007) « Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams », *International Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.ijms.2006.09.026.

Deininger, S.-O. *et al.* (2011) « Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: practical considerations. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(1), p. 167-81. doi: 10.1007/s00216-011-4929-z.

Delcorte, A. *et al.* (2020) « Large cluster ions: soft local probes and tools for organic and bio surfaces », *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(31), p. 17427-17447. doi: 10.1039/D0CP02398A.

Delcourt, V. *et al.* (2017) « Combined Mass Spectrometry Imaging and Top-down Microproteomics Reveals Evidence of a Hidden Proteome in Ovarian Cancer », *EBioMedicine*, 21, p. 55-64. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.06.001.



Delcourt, V. *et al.* (2018) « Spatially-Resolved Top-down Proteomics Bridged to MALDI MS Imaging Reveals the Molecular Physiome of Brain Regions », *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(2), p. 357-372. doi: 10.1074/mcp.M116.065755.

Desbenoit, N. *et al.* (2018) « Correlative mass spectrometry imaging, applying time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization to a single tissue section », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(2), p. 159-166. doi: 10.1002/rcm.8022.

Devaux, S. *et al.* (2016) « Proteomic Analysis of the Spatio-temporal Based Molecular Kinetics of Acute Spinal Cord Injury Identifies a Time- and Segment-specific Window for Effective Tissue Repair », *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(8), p. 2641-2670. doi: 10.1074/mcp.M115.057794.

Dilillo, Marialaura *et al.* (2017) « Mass Spectrometry Imaging, Laser Capture Microdissection, and LC-MS/MS of the Same Tissue Section », *Journal of Proteome Research*, 16(8), p. 2993-3001. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00284.

Dilillo, M. *et al.* (2017) « Ultra-High Mass Resolution MALDI Imaging Mass Spectrometry of Proteins and Metabolites in a Mouse Model of Glioblastoma », *Scientific Reports*, 7(1), p. 603. doi: 10.1038/s41598-017-00703-w.

Djidja, M.-C., Francese, S., *et al.* (2009) « Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections », *PROTEOMICS*, 9(10), p. 2750-2763. doi: 10.1002/pmic.200800624.

Djidja, M.-C., Claude, E., *et al.* (2009) « MALDI-Ion Mobility Separation-Mass Spectrometry Imaging of Glucose-Regulated Protein 78 kDa (Grp78) in Human Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Pancreatic Adenocarcinoma Tissue Sections », *Journal of Proteome Research*, 8(10), p. 4876-4884. doi: 10.1021/pr900522m.

Dong, Y. *et al.* (2016) « Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: A review », *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00060.

Drake, R. R. *et al.* (2018) « MALDI mass spectrometry imaging of N-linked glycans in tissues », in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-981-13-2158-0\_4.

Duprat, J. *et al.* (2014) « Isotopic analysis of organic matter in ultracarbonaceous Antarctic micrometeorites », in *7th Annual Meeting of the Meteoritical-Society*. Casablanca, Morocco, p. A103.

Durrant, S. F. (1999) « Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry:

Achievements, problems, prospects », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/a901765h.

Ender, E. *et al.* (2019) « Why is NanoSIMS elemental imaging of arsenic in seaweed (*Laminaria digitata*) important for understanding of arsenic biochemistry in addition to speciation information? », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(11), p. 2295-2302. doi: 10.1039/C9JA00187E.

Etalo, D. W. *et al.* (2018) « Laser Ablation Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Imaging (LAESI-MS) for Spatially Resolved Plant Metabolomics », in, p. 253-267. doi: 10.1007/978-1-4939-7819-9\_18.

Fatou, B. *et al.* (2016) « In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application », *Scientific Reports*, 6(1), p. 25919. doi: 10.1038/srep25919.

Fearn, S. (2015) *An Introduction to Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) and its Application to Materials Science*. IOP Publishing. doi: 10.1088/978-1-6817-4088-1.

Feider, C. L. *et al.* (2019) « Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications », *Analytical Chemistry*, 91(7), p. 4266-4290. doi: 10.1021/acs.analchem.9b00807.

Feldmann, J., Kindness, A. et Ek, P. (2002) « Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/b201960d.

Fernández, B. *et al.* (2007) « Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS », *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2007.08.008.

Fiddes, L. K. *et al.* (2012) « Hydrogel discs for digital microfluidics », *Biomicrofluidics*, 6(1), p. 014112. doi: 10.1063/1.3687381.

Fisher, G. L. *et al.* (2016) « A New Method and Mass Spectrometer Design for TOF-SIMS Parallel Imaging MS/MS », *Analytical Chemistry*, 88(12), p. 6433-6440. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01022.

Fonville, J. M. *et al.* (2012) « Robust data processing and normalization strategy for MALDI mass spectrometric imaging. », *Analytical chemistry*, 84(3), p. 1310-9. doi: 10.1021/ac201767g.

Franck, Julien *et al.* (2009) « Improving Tissue Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging. Part 1: Using Microspotting », *Analytical Chemistry*, 81(19), p. 8193-8202. doi: 10.1021/ac901328p.

Franck, J. *et al.* (2009) « On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies », *Analytical Chemistry*, 81(20), p. 8205-8317. doi: 10.1021/ac901043n.

Franck, J. *et al.* (2010) « MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. », *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 16(9), p. BR293-9. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802405>.

Franck, J. *et al.* (2013) « Quantification-Based Mass Spectrometry Imaging of Proteins by Parafilm Assisted Microdissection », *Analytical Chemistry*, 85(17), p. 8127-8134. doi: 10.1021/ac4009397.

Fu, T. *et al.* (2018) « Tandem Mass Spectrometry Imaging and in Situ Characterization of Bioactive Wood Metabolites in Amazonian Tree Species *Sextonia rubra* », *Analytical Chemistry*, 90(12), p. 7535-7543. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01157.

Fülöp, A. *et al.* (2020) « New Derivatization Reagent for Detection of free Thiol-groups in Metabolites and Proteins in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging », *Analytical Chemistry*, 92(9), p. 6224-6228. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05630.

Garza, K. Y. *et al.* (2018) « Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging of Proteins Directly from Biological Tissue Sections », *Analytical Chemistry*, 90(13), p. 7785-7789. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00967.

Gemperline, E., Rawson, S. et Li, L. (2014) « Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging », *Analytical Chemistry*, 86(20), p. 10030-10035. doi: 10.1021/ac5028534.

Gilmore, I. S. (2013) « SIMS of organics—Advances in 2D and 3D imaging and future outlook », *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 31(5), p. 050819. doi: 10.1116/1.4816935.

Gilmore, I. S., Heiles, S. et Pieterse, C. L. (2019) « Metabolic Imaging at the Single-Cell Scale: Recent Advances in Mass Spectrometry Imaging », *Annual Review of Analytical Chemistry*, 12(1), p. 201-224. doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115516.

Glaus, R. *et al.* (2010) « Phenomenological studies on structure and elemental composition of nanosecond and femtosecond laser-generated aerosols with implications on laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry », *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. doi: 10.1016/j.sab.2010.07.005.

González de Vega, R. *et al.* (2017) « Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(3), p. 671-677. doi: 10.1039/C6JA00390G.

Goodwin, R. J. A. *et al.* (2008) « Time-dependent evolution of tissue markers by MALDI-MS imaging », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200800201.

Goodwin, R. J. A. *et al.* (2010) « Stopping the clock on proteomic degradation by heat treatment at the point of tissue excision. », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200900641.

Goodwin, R. J. A. (2012) « Sample preparation for mass spectrometry imaging: Small mistakes can lead to big consequences », *Journal of Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.012.

Goodwin, R. J. A., Iverson, S. L. et Andren, P. E. (2012) « The significance of ambient-temperature on pharmaceutical and endogenous compound abundance and distribution in tissues sections when analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. doi: 10.1002/rcm.6125.

Graham, D. J. et Castner, D. G. (2012) « Multivariate Analysis of ToF-SIMS Data from Multicomponent Systems: The Why, When, and How », *Biointerphases*, 7(1), p. 49. doi: 10.1007/s13758-012-0049-3.

Gray, A. L. (1985) « Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry », *The Analyst*. doi: 10.1039/AN9851000551.

Green, F. M. *et al.* (2010) « The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution », *The Analyst*, 135(4), p. 731. doi: 10.1039/b924208b.

Grélard, F. *et al.* (2021) « Esmraldi: efficient methods for the fusion of mass spectrometry and magnetic resonance images », *BMC Bioinformatics*, 22(1), p. 56. doi: 10.1186/s12859-020-03954-z.

Griffiths, R. L. *et al.* (2016) « LESA FAIMS Mass Spectrometry for the Spatial Profiling of Proteins from Tissue », *Analytical Chemistry*, 88(13), p. 6758-6766. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01060.

Groseclose, M. R. *et al.* (2007) « Identification of proteins directly from tissue:in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 42(2), p. 254-262. doi: 10.1002/jms.1177.

Groseclose, M. R. *et al.* (2008) « High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200800495.

Gross, J. H. (2014) « Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1), p. 63-80. doi: 10.1007/s00216-013-7316-0.

Grovenor, C. R. M. *et al.* (2006) « Specimen preparation for NanoSIMS analysis of biological materials », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/j.apsusc.2006.02.180.

Guenther, S. *et al.* (2010) « Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging », *International Journal of Mass Spectrometry*, 294(1), p. 7-15. doi: 10.1016/j.ijms.2010.03.014.

Guijas, C. *et al.* (2018) « METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. », *Analytical chemistry*, 90(5), p. 3156-3164. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04424.

Gundlach-Graham, A. W. *et al.* (2015) « High-Speed, High-Resolution, Multi-Elemental LA-ICP-TOFMS Imaging: Part I. Instrumentation and Two-Dimensional Imaging of Geological Samples. », *Analytical chemistry*.

Gustafsson, J. O. R. *et al.* (2010) « Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr9011766.

Haapala, M. *et al.* (2007) « Desorption Atmospheric Pressure Photoionization », *Analytical Chemistry*, 79(20), p. 7867-7872. doi: 10.1021/ac071152g.

Hajslova, J., Cajka, T. et Vaclavik, L. (2011) « Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis », *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), p. 204-218. doi: 10.1016/j.trac.2010.11.001.

Hamm, G. *et al.* (2012) « Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. », *Journal of proteomics*, 75(16), p. 4952-4961. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.035.

Hansen, H. T. et Janfelt, C. (2016) « Aspects of Quantitation in Mass Spectrometry Imaging Investigated on Cryo-Sections of Spiked Tissue Homogenates. », *Analytical chemistry*, 88(23), p. 11513-11520. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02711.

Harkin, C. *et al.* (2021) « On-tissue chemical derivatization in mass spectrometry imaging », *Mass Spectrometry Reviews*. doi: 10.1002/mas.21680.

Heaven, M. R. *et al.* (2018) « Micro-Data-Independent Acquisition for High-Throughput Proteomics and Sensitive Peptide Mass Spectrum Identification. », *Analytical chemistry*, 90(15), p. 8905-8911. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01026.

Heijs, B. *et al.* (2016) « Multimodal Mass Spectrometry Imaging of N -Glycans and Proteins from the Same Tissue Section », *Analytical Chemistry*, 88(15), p. 7745-7753. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01739.

Henderson, A., Moore, J. D. et Vickerman, J. C. (2013) « SIMS informatics », *Surface and Interface Analysis*, 45(1), p. 471-474. doi: 10.1002/sia.5065.

Henss, A. *et al.* (2018) « High resolution imaging and 3D analysis of Ag nanoparticles in cells with ToF-SIMS and delayed extraction », *Biointerphases*, 13(3), p. 03B410. doi: 10.1116/1.5015957.

Heyman, H. M. et Dubery, I. A. (2016) « The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review », *Phytochemistry Reviews*. doi: 10.1007/s11101-015-9416-2.

Hillenkamp, F. *et al.* (1975) « Laser microprobe mass analysis of organic materials », *Nature*. doi: 10.1038/256119a0.

Ho Kim, J. *et al.* (2015) « Proteome-wide characterization of signalling interactions in the hippocampal CA4/DG subfield of patients with Alzheimer's disease », *Scientific Reports*, 5(1), p. 11138. doi: 10.1038/srep11138.

Holst, S. *et al.* (2016) « Linkage-Specific in Situ Sialic Acid Derivatization for N-Glycan Mass Spectrometry Imaging of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues », *Analytical Chemistry*, 88(11), p. 5904-5913. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00819.

Hoo, Z. H., Candlish, J. et Teare, D. (2017) « What is an ROC curve? », *Emergency medicine journal : EMJ*, 34(6), p. 357-359. doi: 10.1136/emered-2017-206735.

Hook, A. L. *et al.* (2015) « Multivariate ToF-SIMS image analysis of polymer microarrays and protein adsorption. », *Biointerphases*, 10(1), p. 019005. doi: 10.1116/1.4906484.

Hoppe, P., Cohen, S. et Meibom, A. (2013) « NanoSIMS: Technical Aspects and Applications in Cosmochemistry and Biological Geochemistry », *Geostandards and Geoanalytical Research*, 37(2), p. 111-154. doi: 10.1111/j.1751-908X.2013.00239.x.

Horn, I. et Günther, D. (2003) « The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: Implications for LA-ICP-MS », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/S0169-4332(02)01324-7.

Jadoul, L. *et al.* (2015) « A spiked tissue-based approach for quantification of phosphatidylcholines in brain section by MALDI mass spectrometry imaging. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2095-106. doi: 10.1007/s00216-014-8232-7.

Judd, A. M. *et al.* (2019) « A recommended and verified procedure for in situ tryptic digestion of formalin-fixed paraffin-embedded tissues for analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 54(8), p. 716-727. doi: 10.1002/jms.4384.

Kadesch, P. *et al.* (2020) « Intracellular Parasites *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti* , Unveiled in Single Host Cells Using AP-SMALDI MS Imaging », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 31(9), p. 1815-1824. doi: 10.1021/jasms.0c00043.

Kaech, A. (2008) « BAL-TEC HPm 010 high-pressure freezing machine », in Cavalier, A.; Spohner, D.; Humbel, B. M. (éd.) *Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy*. Boca Raton, Fla., US: CRC Press, p. 101-128. doi: 10.1201/9781420006735.CH5.

Kaufmann, R., Hillenkamp, F. et Wechsung, R. (1979) « The laser microprobe mass analyzer (LAMMA): a new instrument for biomedical microprobe analysis. », *Medical progress through technology*, 6(3), p. 109-21. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/481360>.

Kelley, A. R. *et al.* (2016) « Molecular Mapping Alzheimer's Disease: MALDI Imaging of Formalin-fixed, Paraffin-embedded Human Hippocampal Tissue », *The Open Neurology Journal*, 10(1), p. 88-98. doi: 10.2174/1874205X01610010088.

Koch, J. et Günther, D. (2011) « Review of the state-of- The-art of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry », *Applied Spectroscopy*. doi: 10.1366/11-06255.

Kodolányi, J. *et al.* (2014) « The Mg isotope composition of presolar silicate grains from red giant stars », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 140, p. 577-605. doi: 10.1016/j.gca.2014.05.053.

Koestler, M. *et al.* (2008) « A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(20), p. 3275-3285. doi: 10.1002/rcm.3733.

Kompauer, M., Heiles, S. et Spengler, B. (2017) « Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- $\mu$ m lateral resolution », *Nature Methods*, 14(1), p. 90-96. doi: 10.1038/nmeth.4071.

Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R. et Sanz-Medel, A. (2014) « Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control », *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2013.11.040.

Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R., González-Iglesias, H., *et al.* (2014) « Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-014-7617-y.

Kriegsmann, J., Kriegsmann, M. et Casadonte, R. (2015) « MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (Review) », *International Journal of Oncology*, 46(3), p. 893-906. doi: 10.3892/ijo.2014.2788.

Kysenius, K. *et al.* (2019) « A versatile quantitative microdroplet elemental imaging method optimised for integration in biochemical workflows for low-volume samples », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(3), p. 603-616. doi: 10.1007/s00216-018-1362-6.

Laiko, V. V., Baldwin, M. A. et Burlingame, A. L. (2000) « Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 72(4), p. 652-657. doi: 10.1021/ac990998k.

Laiko, V. V., Moyer, S. C. et Cotter, R. J. (2000) « Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 72(21), p. 5239-5243. doi: 10.1021/ac000530d.

Lee, C.-H., Olson, P. et Evans, R. M. (2003) « Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. », *Endocrinology*, 144(6), p. 2201-7. doi: 10.1210/en.2003-0288.

Lee, D. K. *et al.* (2020) « Removing Formaldehyde-Induced Peptidyl Crosslinks Enables Mass Spectrometry Imaging of Peptide Hormone Distributions from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues », *Angewandte Chemie - International Edition*. doi: 10.1002/anie.202008847.

Lee, R. F. S. *et al.* (2017) « Application of imaging mass spectrometry approaches to facilitate metal-based anticancer drug research », *Metallomics*, 9(4), p. 365-381. doi: 10.1039/C6MT00231E.

Lemaire, R., Wisztorski, M., *et al.* (2006) « MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac060565z.

Lemaire, R., Tabet, J. C., *et al.* (2006) « Solid Ionic Matrixes for Direct Tissue Analysis and MALDI Imaging », *Analytical Chemistry*, 78(3), p. 809-819. doi: 10.1021/ac0514669.

Lemaire, R., Desmons, A., *et al.* (2007) « Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections », *Journal of Proteome Research*, 6(4), p. 1295-1305. doi: 10.1021/pr060549i.

Lemaire, R., Ait Menguellet, S., *et al.* (2007) « Specific MALDI Imaging and Profiling for Biomarker Hunting and Validation: Fragment of the 11S Proteasome Activator Complex, Reg Alpha Fragment, Is a New Potential Ovary Cancer Biomarker », *Journal of Proteome Research*, 6(11), p. 4127-4134. doi: 10.1021/pr0702722.

Li, B. *et al.* (2016) « High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of gallotannins and monoterpene glucosides in the root of *Paeonia lactiflora* », *Scientific Reports*, 6(1), p. 36074. doi: 10.1038/srep36074.



Li, H., Balan, P. et Vertes, A. (2016) « Molecular Imaging of Growth, Metabolism, and Antibiotic Inhibition in Bacterial Colonies by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Angewandte Chemie International Edition*, 55(48), p. 15035-15039. doi: 10.1002/anie.201607751.

Li, T. *et al.* (2008) « Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. », *Environmental microbiology*, 10(3), p. 580-8. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01478.x.

Li, Y., Shrestha, B. et Vertes, A. (2007) « Atmospheric Pressure Molecular Imaging by Infrared MALDI Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 79(2), p. 523-532. doi: 10.1021/ac061577n.

Lin, H.-Y. *et al.* (2021) « Temperature Dependence of Desorbed Ions and Neutrals and Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(1), p. 95-105. doi: 10.1021/jasms.0c00101.

Lloyd, A. S. *et al.* (2014) « NanoSIMS results from olivine-hosted melt embayments: Magma ascent rate during explosive basaltic eruptions », *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 283, p. 1-18. doi: 10.1016/j.jvolgeores.2014.06.002.

Löhr, K. *et al.* (2018) « Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00191j.

Longuespée, R. *et al.* (2016) « A laser microdissection-based workflow for FFPE tissue microproteomics: Important considerations for small sample processing », *Methods*, 104, p. 154-162. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.12.008.

Lozić, I. *et al.* (2016) « Enabling dual cellular destinations of polymeric nanoparticles for treatment following partial injury to the central nervous system », *Biomaterials*, 74, p. 200-216. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.001.

Lugli, F. *et al.* (2017) « In situ high spatial resolution  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio determination of two Middle Pleistocene (c.a. 580 ka) Stephanorhinus hundsheimensis teeth by LA-MC-ICP-MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 412, p. 38-48. doi: 10.1016/j.ijms.2016.12.012.

Lukowski, J. K. *et al.* (2020) « Storage Conditions of Human Kidney Tissue Sections Affect Spatial Lipidomics Analysis Reproducibility », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1021/jasms.0c00256.

Luo, T. *et al.* (2017) « Comparison of signal intensities and elemental fractionation in 257 nm femtosecond LA-ICP-MS using He and Ar as carrier gases », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c7ja00190h.

Luo, T. *et al.* (2018) « Reassessment of the influence of carrier gases He and Ar on signal intensities in 193 nm excimer LA-ICP-MS analysis », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00163d.

Luo, T. *et al.* (2020) « Determination of major and trace elements in alloy steels by nanosecond and femtosecond laser ablation ICP-MS with non-matrix-matched calibration », *Atomic Spectroscopy*. doi: 10.46770/as.2020.01.002.

Ly, A. *et al.* (2016) « High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue », *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2016.081.

Lyon, I. C. *et al.* (2019) « Pb nanospheres in ancient zircon yield model ages for zircon formation and Pb mobilization », *Scientific Reports*, 9(1), p. 13702. doi: 10.1038/s41598-019-49882-8.

Van Malderen, S. J. M. *et al.* (2016) « Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bioimaging applications », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c5ja00430f.

Van Malderen, S. J. M., Van Acker, T. et Vanhaecke, F. (2020) « Sub-micrometer Nanosecond LA-ICP-MS Imaging at Pixel Acquisition Rates above 250 Hz via a Low-Dispersion Setup », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05056.

Malherbe, J. *et al.* (2016) « A New Radio Frequency Plasma Oxygen Primary Ion Source on Nano Secondary Ion Mass Spectrometry for Improved Lateral Resolution and Detection of Electropositive Elements at Single Cell Level », *Analytical Chemistry*, 88(14), p. 7130-7136. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01153.

Manier, M. L. *et al.* (2011) « Reagent Precoated Targets for Rapid In-Tissue Derivatization of the Anti-Tuberculosis Drug Isoniazid Followed by MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(8), p. 1409-1419. doi: 10.1007/s13361-011-0150-8.

Martens, L. *et al.* (2011) « mzML—a Community Standard for Mass Spectrometry Data », *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), p. R110.000133. doi: 10.1074/mcp.R110.000133.

Massonnet, P. et Heeren, R. M. A. (2019) « A concise tutorial review of TOF-SIMS based molecular and cellular imaging », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(11), p. 2217-2228. doi: 10.1039/C9JA00164F.

Mehennaoui, K. *et al.* (2018) « Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea

Amphipoda)? », *Science of The Total Environment*, 643, p. 1200-1215. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.208.

Mekecha, T. T., Amunugama, R. et McLuckey, S. A. (2006) « Ion trap collision-induced dissociation of human hemoglobin alpha-chain cations. », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(7), p. 923-31. doi: 10.1016/j.jasms.2006.01.004.

Ménez, B. *et al.* (2018) « Abiotic synthesis of amino acids in the recesses of the oceanic lithosphere. », *Nature*, 564(7734), p. 59-63. doi: 10.1038/s41586-018-0684-z.

Meriaux, C. *et al.* (2010) « Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids », *Journal of Proteomics*, 73(6), p. 1204-1218. doi: 10.1016/j.jprot.2010.02.010.

Miura, D. *et al.* (2010) « Ultrahighly Sensitive in Situ Metabolomic Imaging for Visualizing Spatiotemporal Metabolic Behaviors », *Analytical Chemistry*, 82(23), p. 9789-9796. doi: 10.1021/ac101998z.

Monk, S. M. et Lev, S. M. (2013) « Toxicological applications of cryogenic laser ablation inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry (CLA-ICP-TOF-MS) », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c2ja30218g.

Musat, N. *et al.* (2012) « Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS », *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), p. 486-511. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00303.x.

Nazari, M. et Muddiman, D. C. (2015) « Cellular-level mass spectrometry imaging using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (IR-MALDESI) by oversampling », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(8), p. 2265-2271. doi: 10.1007/s00216-014-8376-5.

Nemes, P., Barton, A. A. et Vertes, A. (2009) « Three-Dimensional Imaging of Metabolites in Tissues under Ambient Conditions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 81(16), p. 6668-6675. doi: 10.1021/ac900745e.

Nemes, P. et Vertes, A. (2007) « Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 79(21), p. 8098-8106. doi: 10.1021/ac071181r.

Newman, C. F. *et al.* (2017) « Intracellular Drug Uptake—A Comparison of Single Cell Measurements Using ToF-SIMS Imaging and Quantification from Cell Populations with LC/MS/MS », *Analytical Chemistry*, 89(22), p. 11944-11953. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01436.

Nicklay, J. J. *et al.* (2013) « MALDI Imaging and in Situ Identification of Integral Membrane

Proteins from Rat Brain Tissue Sections », *Analytical Chemistry*, 85(15), p. 7191-7196. doi: 10.1021/ac400902h.

Norris, J. L. *et al.* (2007) « Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis », *International Journal of Mass Spectrometry*, 260(2-3), p. 212-221. doi: 10.1016/j.ijms.2006.10.005.

Norris, J. L. et Caprioli, R. M. (2013) « Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research », *Chemical Reviews*. doi: 10.1021/cr3004295.

Van Nuffel, S. *et al.* (2016) « Multivariate analysis of 3D ToF-SIMS images: method validation and application to cultured neuronal networks », *The Analyst*, 141(1), p. 90-95. doi: 10.1039/C5AN01743B.

Nuñez, J. *et al.* (2018) « NanoSIMS for biological applications: Current practices and analyses », *Biointerphases*, 13(3), p. 03B301. doi: 10.1116/1.4993628.

O'Rourke, M. B. *et al.* (2019) « “What did i do wrong?” An empirical evaluation of sample preparation methodologies in matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging », *Future Science OA*. doi: 10.4155/fsoa-2018-0095.

Ogrinc, N. *et al.* (2020) « Robot-Assisted SpiderMass for in vivo Real-Time Topography Mass Spectrometry Imaging », *BioRxiv*. doi: 10.1101/2020.12.15.422889.

Olsen, J. V. *et al.* (2005) « Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap », *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(12), p. 2010-2021. doi: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.

Ovchinnikova, K. *et al.* (2020) « ColocML: machine learning quantifies co-localization between mass spectrometry images », *Bioinformatics*. Édité par A. Valencia, 36(10), p. 3215-3224. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa085.

Palmer, A. *et al.* (2017) « FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. », *Nature methods*, 14(1), p. 57-60. doi: 10.1038/nmeth.4072.

Palmer, A. D., Bunch, J. et Styles, I. B. (2015) « The use of random projections for the analysis of mass spectrometry imaging data. », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(2), p. 315-22. doi: 10.1007/s13361-014-1024-7.

Paradisi, G. *et al.* (2010) « Longitudinal changes of adiponectin, carbohydrate and lipid metabolism in pregnant women at high risk for gestational diabetes », *Gynecological Endocrinology*, 26(7), p. 539-545. doi: 10.3109/09513591003632084.

Passarelli, M. K. *et al.* (2017) « The 3D OrbiSIMS—label-free metabolic imaging with subcellular lateral resolution and high mass-resolving power », *Nature Methods*, 14(12), p. 1175-1183. doi: 10.1038/nmeth.4504.

Pavlovich, M. J., Musselman, B. et Hall, A. B. (2018) « Direct analysis in real time-Mass spectrometry (DART-MS) in forensic and security applications », *Mass Spectrometry Reviews*, 37(2), p. 171-187. doi: 10.1002/mas.21509.

Penen, F. *et al.* (2020) « Pyrenoidal sequestration of cadmium impairs carbon dioxide fixation in a microalga », *Plant, Cell & Environment*, 43(2), p. 479-495. doi: 10.1111/pce.13674.

Péresse, T. *et al.* (2017) « Dual Beam Depth Profiling and Imaging with Argon and Bismuth Clusters of Prenylated Stilbenes on Glandular Trichomes of *Macaranga vedeliana* », *Analytical Chemistry*, 89(17), p. 9247-9252. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02020.

Perkins, D. N. *et al.* (1999) « Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. », *Electrophoresis*, 20(18), p. 3551-67. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.

Perry, W. J. *et al.* (2020) « Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments », *Journal of Mass Spectrometry*, 55(4), p. e4491. doi: 10.1002/jms.4491.

Petit, V. W. *et al.* (2010) « Multimodal Spectroscopy Combining Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry, Synchrotron-FT-IR, and Synchrotron-UV Microspectroscopies on the Same Tissue Section », *Analytical Chemistry*, 82(9), p. 3963-3968. doi: 10.1021/ac100581y.

Philipsen, M. H. *et al.* (2018) « Relative quantification of deuterated omega-3 and -6 fatty acids and their lipid turnover in PC12 cell membranes using TOF-SIMS », *Journal of Lipid Research*, 59(11), p. 2098-2107. doi: 10.1194/jlr.M087734.

Pietrowska, M. *et al.* (2016) « Tissue fixed with formalin and processed without paraffin embedding is suitable for imaging of both peptides and lipids by MALDI-IMS », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201500424.

Pisonero, J. *et al.* (2019) « Critical evaluation of fast and highly resolved elemental distribution in single cells using LA-ICP-SFMS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00096d.

Pitman, C. N. et LaCourse, W. R. (2020) « Desorption atmospheric pressure chemical ionization: A review », *Analytica Chimica Acta*, 1130, p. 146-154. doi: 10.1016/j.aca.2020.05.073.

Powers, T. W. *et al.* (2013) « Matrix assisted laser desorption ionization imaging mass

spectrometry workflow for spatial profiling analysis of N-linked Glycan expression in tissues », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac402108x.

Prideaux, B. *et al.* (2015) « The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. », *Nature medicine*, 21(10), p. 1223-7. doi: 10.1038/nm.3937.

Prohaska, T., Irrgeher, J. et Zitek, A. (2016) « Simultaneous multi-element and isotope ratio imaging of fish otoliths by laser ablation split stream ICP-MS/MC ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(8), p. 1612-1621. doi: 10.1039/C6JA00087H.

Quanico, J. *et al.* (2013) « Development of liquid microjunction extraction strategy for improving protein identification from tissue sections », *Journal of Proteomics*, 79, p. 200-218. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.025.

Quanico, J. *et al.* (2015) « Parafilm-assisted microdissection: a sampling method for mass spectrometry-based identification of differentially expressed prostate cancer protein biomarkers », *Chemical Communications*, 51(22), p. 4564-4567. doi: 10.1039/C4CC08331H.

Race, A. M. *et al.* (2016) « SpectralAnalysis: Software for the Masses. », *Analytical chemistry*, 88(19), p. 9451-9458. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01643.

Race, A. M. et Römpf, A. (2018) « Error-Free Data Visualization and Processing through imzML and mzML Validation », *Analytical Chemistry*, 90(22), p. 13378-13384. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03059.

Räsänen, R.-M. *et al.* (2019) « Chemical profiles of birch and alder bark by ambient mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(28), p. 7573-7583. doi: 10.1007/s00216-019-02171-9.

Rejšek, J. *et al.* (2015) « The detection and mapping of the spatial distribution of insect defense compounds by desorption atmospheric pressure photoionization Orbitrap mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 886, p. 91-97. doi: 10.1016/j.aca.2015.06.007.

Remoortere, A. van *et al.* (2010) « MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(11), p. 1922-1929. doi: 10.1016/j.jasms.2010.07.011.

Le Rhun, E. *et al.* (2017) « Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(7), p. 875-890. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.012.

Rizzo, D. G. *et al.* (2017) « Enhanced Spatially Resolved Proteomics Using On-Tissue Hydrogel-Mediated Protein Digestion », *Analytical Chemistry*, 89(5), p. 2948-2955. doi:

10.1021/acs.analchem.6b04395.

Roach, P. J., Laskin, J. et Laskin, A. (2010) « Molecular Characterization of Organic Aerosols Using Nanospray-Desorption/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 82(19), p. 7979-7986. doi: 10.1021/ac101449p.

Robichaud, G., Barry, J. A., *et al.* (2013) « Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization (IR-MALDESI) Imaging Source Coupled to a FT-ICR Mass Spectrometer », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(1), p. 92-100. doi: 10.1007/s13361-012-0505-9.

Robichaud, G., Garrard, K. P., *et al.* (2013) « MSiReader: An Open-Source Interface to View and Analyze High Resolving Power MS Imaging Files on Matlab Platform », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(5), p. 718-721. doi: 10.1007/s13361-013-0607-z.

Römpf, A. *et al.* (2011) « imzML: Imaging Mass Spectrometry Markup Language: A Common Data Format for Mass Spectrometry Imaging », in, p. 205-224. doi: 10.1007/978-1-60761-987-1\_12.

Römpf, A. *et al.* (2015) « Mass spectrometry imaging of biological tissue: an approach for multicenter studies. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2329-35. doi: 10.1007/s00216-014-8410-7.

Rubatto, D. *et al.* (2020) « Identification of growth mechanisms in metamorphic garnet by high-resolution trace element mapping with LA-ICP-TOFMS », *Contributions to Mineralogy and Petrology*, 175(7), p. 61. doi: 10.1007/s00410-020-01700-5.

Russo, R. E. *et al.* (2002) « Laser ablation in analytical chemistry - A review », *Talanta*. doi: 10.1016/S0039-9140(02)00053-X.

Rzagalinski, I. et Volmer, D. A. (2017) « Quantification of low molecular weight compounds by MALDI imaging mass spectrometry - A tutorial review. », *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1865(7), p. 726-739. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.12.011.

Samarah, L. Z. *et al.* (2020) « Single-Cell Metabolic Profiling: Metabolite Formulas from Isotopic Fine Structures in Heterogeneous Plant Cell Populations », *Analytical Chemistry*, 92(10), p. 7289-7298. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00936.

Sampson, J. S., Hawkrige, A. M. et Muddiman, D. C. (2006) « Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(12), p. 1712-1716. doi: 10.1016/j.jasms.2006.08.003.

Sampson, J. S., Hawkrigde, A. M. et Muddiman, D. C. (2008) « Construction of a versatile high precision ambient ionization source for direct analysis and imaging », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(10), p. 1527-1534. doi: 10.1016/j.jasms.2008.06.013.

Sampson, J. S., Murray, K. K. et Muddiman, D. C. (2009) « Intact and top-down characterization of biomolecules and direct analysis using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization coupled to FT-ICR mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(4), p. 667-673. doi: 10.1016/j.jasms.2008.12.003.

Sano, Y. *et al.* (2008) « Ion microprobe Sr isotope analysis of carbonates with about 5µm spatial resolution: An example from an ayu otolith », *Applied Geochemistry*, 23(8), p. 2406-2413. doi: 10.1016/j.apgeochem.2008.02.027.

Sans, M. *et al.* (2019) « Performance of the MasSpec Pen for Rapid Diagnosis of Ovarian Cancer », *Clinical Chemistry*, 65(5), p. 674-683. doi: 10.1373/clinchem.2018.299289.

Santos, C. R. et Schulze, A. (2012) « Lipid metabolism in cancer », *FEBS Journal*, 279(15), p. 2610-2623. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.

Saudemont, P. *et al.* (2018) « Real-Time Molecular Diagnosis of Tumors Using Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Technology », *Cancer Cell*, 34(5), p. 840-851.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2018.09.009.

Schäfer, K.-C. *et al.* (2009) « In Vivo, In Situ Tissue Analysis Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry », *Angewandte Chemie International Edition*, 48(44), p. 8240-8242. doi: 10.1002/anie.200902546.

Schaumlöffel, D. (2015) « The -Omics Tool Box », in Krauss, Gerd-Joachim; Nies, D. H. (éd.) *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, GmbH, p. 343-365.

Schaumlöffel, D. *et al.* (2016) « Novel Methods for Bioimaging Including LA-ICP-MS, NanoSIMS, TEM/X-EDS, and SXRF », in *Metallomics Analytical Techniques and Speciation Methods*. doi: 10.1002/9783527694907.ch4.

Schober, Y. *et al.* (2011) « Protein identification by accurate mass matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(17), p. 2475-2483. doi: 10.1002/rcm.5135.

Schober, Y. *et al.* (2012) « Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging », *Analytical Chemistry*, 84(15), p. 6293-6297. doi: 10.1021/ac301337h.

Schramm, T. *et al.* (2012) « imzML--a common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. », *Journal of proteomics*, 75(16), p. 5106-5110.



doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.026.

Schulz, S. *et al.* (2019) « Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development », *Current Opinion in Biotechnology*, 55, p. 51-59. doi: 10.1016/j.copbio.2018.08.003.

Schwartz, S. A., Reyzer, M. L. et Caprioli, R. M. (2003) « Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Practical aspects of sample preparation », *Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1002/jms.505.

Scott, D. A. *et al.* (2019) « Specific N-linked glycosylation patterns in areas of necrosis in tumor tissues », *International Journal of Mass Spectrometry*, 437, p. 69-76. doi: 10.1016/j.ijms.2018.01.002.

Seeley, E. H. *et al.* (2008) « Enhancement of Protein Sensitivity for MALDI Imaging Mass Spectrometry After Chemical Treatment of Tissue Sections », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.jasms.2008.03.016.

Shard, A. G. *et al.* (2015) « The matrix effect in organic secondary ion mass spectrometry », *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, p. 599-609. doi: 10.1016/j.ijms.2014.06.027.

Shariatgorji, M. *et al.* (2014) « Direct Targeted Quantitative Molecular Imaging of Neurotransmitters in Brain Tissue Sections », *Neuron*, 84(4), p. 697-707. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.011.

Shi, Y. *et al.* (2019) « Mass Spectrometric Imaging Reveals Temporal and Spatial Dynamics of Bioactive Lipids in Arteries Undergoing Restenosis », *Journal of Proteome Research*, 18(4), p. 1669-1678. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00941.

Shimma, S. et Sugiura, Y. (2014) « Effective Sample Preparations in Imaging Mass Spectrometry », *Mass Spectrometry*. doi: 10.5702/massspectrometry.s0029.

Shrestha, B., Patt, J. M. et Vertes, A. (2011) « In Situ Cell-by-Cell Imaging and Analysis of Small Cell Populations by Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 83(8), p. 2947-2955. doi: 10.1021/ac102958x.

Signor, L. *et al.* (2007) « Analysis of erlotinib and its metabolites in rat tissue sections by MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry. », *Journal of mass spectrometry : JMS*, 42(7), p. 900-9. doi: 10.1002/jms.1225.

Sjövall, P., Johansson, B. et Lausmaa, J. (2006) « Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/j.apsusc.2006.02.126.

Slodzian, G. *et al.* (1990) « Parallel Mapping of Several Elements or Isotopes by Scanning with a Submicron Ion Probe - 1st Results », *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. II*, 1990, 311, 57–64, 311, p. 57-64.

Slodzian, G. *et al.* (1992) « Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection », *Biology of the Cell*, 74(1), p. 43-50. doi: 10.1016/0248-4900(92)90007-N.

Slodzian, G., Daigne, B. et Girard, F. (1992) « From direct ion images to ion probe scanning », *Microscopy Microanalysis Microstructures*, 3(2-3), p. 99-118. doi: 10.1051/mmm:0199200302-309900.

Smith, N. S. *et al.* (2008) « A high brightness source for nano-probe secondary ion mass spectrometry », *Applied Surface Science*, 255(4), p. 1606-1609. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.05.141.

Song, Y. et Cooks, R. G. (2006) « Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(20), p. 3130-3138. doi: 10.1002/rcm.2714.

Spengler, B. et Hubert, M. (2002) « Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6), p. 735-748. doi: 10.1016/S1044-0305(02)00376-8.

Spengler, B., Hubert, M. et Kaufmann, R. (1994) « MALDI ion imaging and biological ion imaging with a new scanning UV-laser microprobe », in *Proc. 42nd Annual Conf. Mass Spectrom. and Allied Topics*, p. 1041.

Spraggins, J. M. *et al.* (2015) « MALDI FTICR IMS of Intact Proteins: Using Mass Accuracy to Link Protein Images with Proteomics Data », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), p. 974-985. doi: 10.1007/s13361-015-1147-5.

Spraggins, J. M. *et al.* (2016) « Next-generation technologies for spatial proteomics: Integrating ultra-high speed MALDI-TOF and high mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis », *PROTEOMICS*, 16(11-12), p. 1678-1689. doi: 10.1002/pmic.201600003.

St John, E. R. *et al.* (2017) « Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: towards an intelligent knife for breast cancer surgery », *Breast Cancer Research*, 19(1), p. 59. doi: 10.1186/s13058-017-0845-2.

Starr, N. J. *et al.* (2019) « Enhanced vitamin C skin permeation from supramolecular hydrogels, illustrated using in situ ToF-SIMS 3D chemical profiling », *International Journal of Pharmaceutics*, 563, p. 21-29. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.028.

Stauber, J. *et al.* (2008) « MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to model animals of parkinson disease for biomarker hunting », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr070464x.

Stauber, J. *et al.* (2010) « On-tissue protein identification and imaging by MALDI-Ion mobility mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(3), p. 338-347. doi: 10.1016/j.jasms.2009.09.016.

Steere, R. L. (1957) « ELECTRON MICROSCOPY OF STRUCTURAL DETAIL IN FROZEN BIOLOGICAL SPECIMENS », *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(1), p. 45-60. doi: 10.1083/jcb.3.1.45.

Steinmann, L. K. *et al.* (2019) « In situ high-precision lithium isotope analyses at low concentration levels with femtosecond-LA-MC-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(7), p. 1447-1458. doi: 10.1039/C9JA00088G.

Stoeckli, M., Farmer, T. B. et Caprioli, R. M. (1999) « Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/S1044-0305(98)00126-3.

Stoeckli, M. et Staab, D. (2015) « Reproducible Matrix Deposition for MALDI MSI Based on Open-Source Software and Hardware », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), p. 911-914. doi: 10.1007/s13361-015-1099-9.

Storms, H. A., Brown, K. F. et Stein, J. D. (1977) « Evaluation of a cesium positive ion source for secondary ion mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, 49(13), p. 2023-2030. doi: 10.1021/ac50021a034.

Strohalm, M. *et al.* (2011) « Poly[ N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-based tissue-embedding medium compatible with MALDI mass spectrometry imaging experiments », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac2011679.

Suckau, D. et Resemann, A. (2003) « T<sub>3</sub>-Sequencing: Targeted Characterization of the N- and C-Termini of Undigested Proteins by Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 75(21), p. 5817-5824. doi: 10.1021/ac034362b.

Sud, M. *et al.* (2007) « LMSD: LIPID MAPS structure database. », *Nucleic acids research*, 35(Database issue), p. D527-32. doi: 10.1093/nar/gkl838.

Sugiura, Y., Shimma, S. et Setou, M. (2006) « Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry », *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. doi: 10.5702/massspec.54.45.

Swales, J. G. *et al.* (2019) « Mass spectrometry imaging and its application in pharmaceutical

research and development: A concise review », *International Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.ijms.2018.02.007.

Tachikawa, K. *et al.* (2013) « Microscale neodymium distribution in sedimentary planktonic foraminiferal tests and associated mineral phases », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 100, p. 11-23. doi: 10.1016/j.gca.2012.10.010.

Takats, Z. *et al.* (2008) « In situ desorption electrospray ionization (DESI) analysis of tissue sections », *Cold Spring Harbor Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot4994.

Takáts, Z. *et al.* (2004) « Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization », *Science*, 306(5695), p. 471-3. doi: 10.1126/science.1104404.

Taverna, D., Norris, J. L. et Caprioli, R. M. (2015) « Histology-Directed Microwave Assisted Enzymatic Protein Digestion for MALDI MS Analysis of Mammalian Tissue », *Analytical Chemistry*, 87(1), p. 670-676. doi: 10.1021/ac503479a.

Taylor, A. J., Dexter, A. et Bunch, J. (2018) « Exploring Ion Suppression in Mass Spectrometry Imaging of a Heterogeneous Tissue », *Analytical Chemistry*, 90(9), p. 5637-5645. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05005.

Theiner, S. *et al.* (2019) « Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry Imaging of Trace Elements at the Single-Cell Level for Clinical Practice », *Analytical Chemistry*, 91(13), p. 8207-8212. doi: 10.1021/acs.analchem.9b00698.

Tian, H. *et al.* (2017) « Subcellular Chemical Imaging of Antibiotics in Single Bacteria Using C 60 -Secondary Ion Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 89(9), p. 5050-5057. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00466.

Tobias, F. et Hummon, A. B. (2020) « Considerations for MALDI-Based Quantitative Mass Spectrometry Imaging Studies. », *Journal of proteome research*, 19(9), p. 3620-3630. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00443.

Touboul, D. *et al.* (2005) « Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(10), p. 1608-1618. doi: 10.1016/j.jasms.2005.06.005.

Trimpin, S., Räder, H. J. et Müllen, K. (2006) « Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation », *International Journal of Mass Spectrometry*, 253(1-2), p. 13-21. doi: 10.1016/j.ijms.2005.10.008.

Trindade, G. F. *et al.* (2018) « A Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry/Multivariate Analysis (ToF-SIMS/MVA) Approach To Identify Phase

Segregation in Blends of Incompatible but Extremely Similar Resins. », *Analytical chemistry*, 90(6), p. 3936-3941. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04877.

Trindade, G. F., Abel, M.-L. et Watts, J. F. (2018) « simsMVA: A tool for multivariate analysis of ToF-SIMS datasets », *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 182, p. 180-187. doi: 10.1016/j.chemolab.2018.10.001.

Tuck, M. *et al.* (2021) « Multimodal Imaging Based on Vibrational Spectroscopies and Mass Spectrometry Imaging Applied to Biological Tissue: A Multiscale and Multiomics Review », *Analytical Chemistry*, 93(1), p. 445-477. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04595.

Ucal, Y. *et al.* (2017) « Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(7), p. 795-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.01.005.

UniProt Consortium (2019) « UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. », *Nucleic acids research*, 47(D1), p. D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.

Urban, C. *et al.* (2018) « PAXgene fixation enables comprehensive metabolomic and proteomic analyses of tissue specimens by MALDI MSI », *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.005.

Urbini, M. *et al.* (2017) « ToF-SIMS and principal component analysis of lipids and amino acids from inflamed and dysplastic human colonic mucosa. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(26), p. 6097-6111. doi: 10.1007/s00216-017-0546-9.

Van Vaeck, L., Adriaens, A. et Gijbels, R. (1999) « Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation », *Mass Spectrometry Reviews*, 18(1), p. 1-47. doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-W.

Vaikkinen, A. *et al.* (2015) « Analysis of neonicotinoids from plant material by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(5), p. 424-430. doi: 10.1002/rcm.7123.

Vanbellingen, Q. P. *et al.* (2015) « Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(13), p. 1187-1195. doi: 10.1002/rcm.7210.

Veličković, D. *et al.* (2014) « New insights into the structural and spatial variability of cell-wall polysaccharides during wheat grain development, as revealed through MALDI mass spectrometry imaging », *Journal of Experimental Botany*, 65(8), p. 2079-2091. doi: 10.1093/jxb/eru065.

Verbeeck, N., Caprioli, R. M. et Van de Plas, R. (2020) « Unsupervised machine learning for

exploratory data analysis in imaging mass spectrometry », *Mass spectrometry reviews*, 39(3), p. 245-291. doi: 10.1002/mas.21602.

Vickerman, J. C. et Briggs, D. (2013) *ToF-SIMS: Materials Analysis by Mass Spectrometry*. 2nd editio. Édité par I. P. LLP.

Voss, M. *et al.* (2017) « A new approach to calibration and determination of selected trace elements in food contact polymers by LA-ICP-MS », *Talanta*, 170, p. 488-495. doi: 10.1016/j.talanta.2017.04.048.

Wang, H. Y. J., Liu, C. Bin et Wu, H. W. (2011) « A simple desalting method for direct MALDI mass spectrometry profiling of tissue lipids », *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.D013060.

Wang, M.-C. et Li, S. (2013) « ROC analysis for multiple markers with tree-based classification. », *Lifetime data analysis*, 19(2), p. 257-77. doi: 10.1007/s10985-012-9233-5.

Warren, A. D., Mitchell, D. J. et Gates, P. J. (2018) « Methodologies for the airbrush application of MALDI matrices », *European Journal of Mass Spectrometry*, 24(1), p. 89-95. doi: 10.1177/1469066717750031.

Watrous, J. D. et Dorrestein, P. C. (2011) « Imaging mass spectrometry in microbiology. », *Nature reviews. Microbiology*, 9(9), p. 683-94. doi: 10.1038/nrmicro2634.

Weiskirchen, R. *et al.* (2019) « Software solutions for evaluation and visualization of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging (LA-ICP-MSI) data: a short overview. », *Journal of cheminformatics*, 11(1), p. 16. doi: 10.1186/s13321-019-0338-7.

Wenzel, T. *et al.* (2006) « 2,5-Dihydroxyacetophenone: a matrix for highly sensitive matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of proteins using manual and automated preparation techniques », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), p. 785-789. doi: 10.1002/rcm.2378.

West, C. A. *et al.* (2020) « New Enzymatic Approach to Distinguish Fucosylation Isomers of N-Linked Glycans in Tissues Using MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00024.

Winograd, N. et Bloom, A. (2015) « Sample Preparation for 3D SIMS Chemical Imaging of Cells », in, p. 9-19. doi: 10.1007/978-1-4939-1357-2\_2.

Wischhusen, P. *et al.* (2021) « Tissue localization of selenium of parental or dietary origin in rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) fry using LA-ICP MS bioimaging », *Metallomics*, 13(2). doi: 10.1093/mtomcs/mfaa008.

Wishart, D. S. *et al.* (2018) « HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. », *Nucleic acids research*, 46(D1), p. D608-D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089.

Wisztorski, M. *et al.* (2010) « MALDI direct analysis and imaging of frozen versus FFPE tissues: What strategy for which sample? », *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-60761-746-4\_18.

Wisztorski, M. *et al.* (2013) « Microproteomics by liquid extraction surface analysis: Application to FFPE tissue to study the fimbria region of tubo-ovarian cancer », *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 7(3-4), p. 234-240. doi: 10.1002/prca.201200070.

Wisztorski, M. *et al.* (2016) « Spatially-resolved protein surface microsampling from tissue sections using liquid extraction surface analysis », *PROTEOMICS*, 16(11-12), p. 1622-1632. doi: 10.1002/pmic.201500508.

Wu, C. *et al.* (2013) « Mass spectrometry imaging under ambient conditions », *Mass Spectrometry Reviews*, 32(3), p. 218-243. doi: 10.1002/mas.21360.

Yajima, Y. *et al.* (2018) « Region of Interest analysis using mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue », *Scientific Reports*, 8(1), p. 7493. doi: 10.1038/s41598-018-25817-7.

Yang, J. et Caprioli, R. M. (2011) « Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution », *Analytical Chemistry*, 83(14), p. 5728-5734. doi: 10.1021/ac200998a.

Yardley, S. S. *et al.* (2013) « An investigation of the oxidation behaviour of zirconium alloys using isotopic tracers and high resolution SIMS », *Journal of Nuclear Materials*, 443(1-3), p. 436-443. doi: 10.1016/j.jnucmat.2013.07.053.

Yoon, S. et Lee, T. G. (2018) « Biological tissue sample preparation for time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) imaging », *Nano Convergence*. doi: 10.1186/s40580-018-0157-y.

Yun, N. *et al.* (2021) « Localization of Major Ephedra Alkaloids in Whole Aerial Parts of Ephedrae Herba Using Direct Analysis in Real Time-Time of Flight-Mass Spectrometry », *Molecules*, 26(3), p. 580. doi: 10.3390/molecules26030580.

Zhang, C. *et al.* (2020) « A high performance method for the accurate and precise determination of silicon isotopic compositions in bulk silicate rock samples using laser ablation MC-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35(9), p. 1887-1896. doi: 10.1039/D0JA00036A.

Zhang, D.-S. *et al.* (2012) « Multi-isotope imaging mass spectrometry reveals slow protein

turnover in hair-cell stereocilia », *Nature*, 481(7382), p. 520-524. doi: 10.1038/nature10745.

Zhang, J. *et al.* (2017) « Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system », *Science Translational Medicine*, 9(406), p. eaan3968. doi: 10.1126/scitranslmed.aan3968.

Zhang, J. *et al.* (2020) « Cryo-OrbiSIMS for 3D Molecular Imaging of a Bacterial Biofilm in Its Native State », *Analytical Chemistry*, 92(13), p. 9008-9015. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01125.

Zhang, J. *et al.* (2021) « MASS SPECTROMETRY TECHNOLOGIES TO ADVANCE CARE FOR CANCER PATIENTS IN CLINICAL AND INTRAOPERATIVE USE », *Mass Spectrometry Reviews*, 40(5), p. 692-720. doi: 10.1002/mas.21664.

Zhang, Y. *et al.* (2013) « Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. », *Chemical reviews*, 113(4), p. 2343-94. doi: 10.1021/cr3003533.

Zhou, Q., Fülöp, A. et Hopf, C. (2021) « Recent developments of novel matrices and on-tissue chemical derivatization reagents for MALDI-MSI », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-020-03023-7.

Zimmerman, M. *et al.* (2018) « Spatial Quantification of Drugs in Pulmonary Tuberculosis Lesions by Laser Capture Microdissection Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCM-LC/MS) », *Journal of Visualized Experiments*, (134). doi: 10.3791/57402.

Abrass, C. K. (2004) « Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. », *American journal of nephrology*, 24(1), p. 46-53. doi: 10.1159/000075925.

Van Acker, T. *et al.* (2016) « High-resolution laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry imaging of cisplatin-induced nephrotoxic side effects », *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2016.10.014.

Van Acker, T. *et al.* (2019) « High-resolution imaging and single-cell analysis via laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for the determination of membranous receptor expression levels in breast cancer cell lines using receptor-specific hybrid tracers », *Analytica Chimica Acta*, 1074, p. 43-53. doi: 10.1016/j.aca.2019.04.064.

Aerni, H.-R., Cornett, D. S. et Caprioli, R. M. (2006) « Automated Acoustic Matrix Deposition for MALDI Sample Preparation », *Analytical Chemistry*, 78(3), p. 827-834. doi: 10.1021/ac051534r.

Aichler, M. et Walch, A. (2015) « MALDI Imaging mass spectrometry: current frontiers and perspectives in pathology research and practice », *Laboratory Investigation*, 95(4), p. 422-431. doi: 10.1038/labinvest.2014.156.



Aimo, L. *et al.* (2015) « The SwissLipids knowledgebase for lipid biology. », *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(17), p. 2860-6. doi: 10.1093/bioinformatics/btv285.

Ait-Belkacem, R. *et al.* (2013) « Tubulin isoforms identified in the brain by MALDI in-source decay », *Journal of Proteomics*, 79, p. 172-179. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.026.

Alexandrov, T. (2020) « Spatial Metabolomics and Imaging Mass Spectrometry in the Age of Artificial Intelligence », *Annual Review of Biomedical Data Science*, 3(1), p. 61-87. doi: 10.1146/annurev-biodatasci-011420-031537.

Angel, P. M. *et al.* (2012) « Enhanced sensitivity for high spatial resolution lipid analysis by negative ion mode matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac202383m.

Angerer, T. B., Mohammadi, A. S. et Fletcher, J. S. (2016) « Optimizing sample preparation for anatomical determination in the hippocampus of rodent brain by ToF-SIMS analysis », *Biointerphases*. doi: 10.1116/1.4941064.

Aramendía, M. *et al.* (2015) « Direct analysis of dried blood spots by femtosecond-laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Feasibility of split-flow laser ablation for simultaneous trace element and isotopic analysis », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(1), p. 296-309. doi: 10.1039/C4JA00313F.

Arnaud, B. *et al.* (2020) « Imaging Study by Mass Spectrometry of the Spatial Variation of Cellulose and Hemicellulose Structures in Corn Stalks », *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(13), p. 4042-4050. doi: 10.1021/acs.jafc.9b07579.

Arnaudguilhem, C. *et al.* (2021) « Toward a comprehensive study for multielemental quantitative LA-ICP MS bioimaging in soft tissues », *Talanta*. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121537.

Badro, J. *et al.* (2007) « Chemical imaging with NanoSIMS: A window into deep-Earth geochemistry », *Earth and Planetary Science Letters*, 262(3-4), p. 543-551. doi: 10.1016/j.epsl.2007.08.007.

Bagley, M. C. *et al.* (2018) « IR-MALDESI mass spectrometry imaging of underivatized neurotransmitters in brain tissue of rats exposed to tetrabromobisphenol A », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(30), p. 7979-7986. doi: 10.1007/s00216-018-1420-0.

Balog, J. *et al.* (2013) « Intraoperative Tissue Identification Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry », *Science Translational Medicine*, 5(194), p. 194ra93-194ra93. doi: 10.1126/scitranslmed.3005623.

Bao, Z. *et al.* (2017) « Development of pressed sulfide powder tablets for in situ sulfur and lead

isotope measurement using LA-MC-ICP-MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 421, p. 255-262. doi: 10.1016/j.ijms.2017.07.015.

Barry, J. A. *et al.* (2015) « Assessing drug and metabolite detection in liver tissue by UV-MALDI and IR-MALDESI mass spectrometry imaging coupled to FT-ICR MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, p. 448-455. doi: 10.1016/j.ijms.2014.05.012.

Barry, J. A., Groseclose, M. R. et Castellino, S. (2019) « Quantification and assessment of detection capability in imaging mass spectrometry using a revised mimetic tissue model. », *Bioanalysis*, 11(11), p. 1099-1116. doi: 10.4155/bio-2019-0035.

Bauer, O. B. *et al.* (2019) « LA-ICP-TOF-MS for rapid, all-elemental and quantitative bioimaging, isotopic analysis and the investigation of plasma processes », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00288f.

Beavis, R. C., Chait, B. T. et Fales, H. M. (1989) « Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 3(12), p. 432-435. doi: 10.1002/rcm.1290031207.

Bemis, K. D. *et al.* (2015) « Cardinal: an R package for statistical analysis of mass spectrometry-based imaging experiments: Fig. 1. », *Bioinformatics*, 31(14), p. 2418-2420. doi: 10.1093/bioinformatics/btv146.

Benettoni, P. *et al.* (2019) « Identification of nanoparticles and their localization in algal biofilm by 3D-imaging secondary ion mass spectrometry », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(6), p. 1098-1108. doi: 10.1039/C8JA00439K.

Benninghoven, A., Jaspers, D. et Sichtermann, W. (1976) « Secondary-ion emission of amino acids », *Applied Physics*, 11(1), p. 35-39. doi: 10.1007/BF00895013.

Benninghoven, A. et Loebach, E. (1971) « Tandem mass spectrometer for secondary ion studies », *Review of Scientific Instruments*. doi: 10.1063/1.1684875.

Benninghoven, A., Rudenauer, F. G. et Werner, H. W. (1987) *Secondary Ion Mass Spectrometry: Basic Concepts, Instrumental Aspects, Applications and Trends*. John Wiley & Sons Inc.

Bianza, J. *et al.* (2014) « Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor », *Metallomics*, 6(8), p. 1382-1386. doi: 10.1039/C4MT00131A.

Bishop, D. P. *et al.* (2016) « Elemental bio-imaging using laser ablation-triple quadrupole-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c5ja00293a.

Blanc, L., Daudelin, I. B., *et al.* (2018) « High-resolution mapping of fluoroquinolones in TB rabbit lesions reveals specific distribution in immune cell types », *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.41115.

Blanc, L., Lenaerts, A., *et al.* (2018) « Visualization of Mycobacterial Biomarkers and Tuberculosis Drugs in Infected Tissue by MALDI-MS Imaging », *Analytical Chemistry*, 90(10), p. 6275-6282. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00985.

Blockhuys, S., Malmberg, P. et Wittung-Stafshede, P. (2018) « Copper distribution in breast cancer cells detected by time-of-flight secondary ion mass spectrometry with delayed extraction methodology », *Biointerphases*, 13(6), p. 06E412. doi: 10.1116/1.5053814.

Bokhart, M. T. *et al.* (2015) « Quantitative mass spectrometry imaging of emtricitabine in cervical tissue model using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2073-84. doi: 10.1007/s00216-014-8220-y.

Bokhart, M. T. *et al.* (2018) « MSiReader v1.0: Evolving Open-Source Mass Spectrometry Imaging Software for Targeted and Untargeted Analyses », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(1), p. 8-16. doi: 10.1007/s13361-017-1809-6.

Bouschen, W. *et al.* (2010) « Matrix vapor deposition/recrystallization and dedicated spray preparation for high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry (SMALDI-MS) of tissue and single cells », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(3), p. 355-364. doi: 10.1002/rcm.4401.

Brahmi, C. *et al.* (2012) « Pulsed <sup>86</sup>Sr-labeling and NanoSIMS imaging to study coral biomineralization at ultra-structural length scales », *Coral Reefs*, 31(3), p. 741-752. doi: 10.1007/s00338-012-0890-3.

Briggs, M. T. *et al.* (2019) « MALDI Mass Spectrometry Imaging of Early- and Late-Stage Serous Ovarian Cancer Tissue Reveals Stage-Specific N- Glycans », *PROTEOMICS*, 19(21-22), p. 1800482. doi: 10.1002/pmic.201800482.

Brignole-Baudouin, F. *et al.* (2012) « A New Safety Concern for Glaucoma Treatment Demonstrated by Mass Spectrometry Imaging of Benzalkonium Chloride Distribution in the Eye, an Experimental Study in Rabbits », *PLoS ONE*. Édité par B. V. Bui, 7(11), p. e50180. doi: 10.1371/journal.pone.0050180.

Brison, J., Muramoto, S. et Castner, D. G. (2010) « ToF-SIMS Depth Profiling of Organic Films: A Comparison between Single-Beam and Dual-Beam Analysis », *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(12), p. 5565-5573. doi: 10.1021/jp9066179.

Brochu, F. *et al.* (2019) « Mass spectra alignment using virtual lock-masses », *Scientific Reports*, 9(1), p. 8469. doi: 10.1038/s41598-019-44923-8.

- Brown, R. S. et Lennon, J. J. (1995) « Sequence-Specific Fragmentation of Matrix-Assisted Laser-Desorbed Protein/Peptide Ions », *Analytical Chemistry*, 67(21), p. 3990-3999. doi: 10.1021/ac00117a027.
- Buchberger, A. R. *et al.* (2018) « Mass Spectrometry Imaging: A Review of Emerging Advancements and Future Insights », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04733.
- Burger, M. *et al.* (2015) « High-Speed, High-Resolution, Multielemental LA-ICP-TOFMS Imaging: Part II. Critical Evaluation of Quantitative Three-Dimensional Imaging of Major, Minor, and Trace Elements in Geological Samples », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01977.
- Calvano, C. D. *et al.* (2018) « MALDI matrices for low molecular weight compounds: an endless story? », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(17), p. 4015-4038. doi: 10.1007/s00216-018-1014-x.
- Caprioli, R. M., Farmer, T. B. et Gile, J. (1997) « Molecular Imaging of Biological Samples: Localization of Peptides and Proteins Using MALDI-TOF MS », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac970888i.
- Cardon, T., Fournier, I. et Salzet, M. (2021) « Shedding Light on the Ghost Proteome », *Trends in Biochemical Sciences*, 46(3), p. 239-250. doi: 10.1016/j.tibs.2020.10.003.
- Carter, C. L. *et al.* (2020) « MALDI-MSI spatially maps N-glycan alterations to histologically distinct pulmonary pathologies following irradiation », *Scientific Reports*, 10(1), p. 11559. doi: 10.1038/s41598-020-68508-y.
- Carter, C. L., McLeod, C. W. et Bunch, J. (2011) « Imaging of phospholipids in formalin fixed rat brain sections by matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1007/s13361-011-0227-4.
- Castaing, R. et Slodzian, G. (1962) « Microanalyse par emission ionique secondaire », *Journal of Microscopie*.
- Chaurand, P. *et al.* (2008) « Imaging mass spectrometry of intact proteins from alcohol-preserved tissue specimens: Bypassing formalin fixation », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr800286z.
- Chen, H. *et al.* (2007) « Surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for direct ambient sample analysis without toxic chemical contamination », *Journal of Mass Spectrometry*, 42(8), p. 1045-1056. doi: 10.1002/jms.1235.
- Christien, F. *et al.* (2013) « Quantitative grain boundary analysis of bulk samples by SIMS »,

*Surface and Interface Analysis*, 45(1), p. 305-308. doi: 10.1002/sia.4884.

Chughtai, K. et Heeren, R. M. A. (2010) « Mass spectrometric imaging for biomedical tissue analysis », *Chemical Reviews*. doi: 10.1021/cr100012c.

Chumbley, C. W. *et al.* (2016) « Absolute Quantitative MALDI Imaging Mass Spectrometry: A Case of Rifampicin in Liver Tissues. », *Analytical chemistry*, 88(4), p. 2392-8. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04409.

Chunga, E. H. *et al.* (2013) « Structural and electrochemical properties of carbon-coated Li<sub>4</sub>Ti<sub>5</sub>O<sub>12</sub> anodic material obtained using chitosan for potential lithium ion rechargeable battery applications », *Journal of Ceramic Processing Research*, 14, p. 304-310.

Clases, D. *et al.* (2019) « LA-ICP-MS/MS improves limits of detection in elemental bioimaging of gadolinium deposition originating from MRI contrast agents in skin and brain tissues », *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 51, p. 212-218. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.10.021.

Cody, R. B., Laramée, J. A. et Durst, H. D. (2005) « Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions », *Analytical Chemistry*, 77(8), p. 2297-2302. doi: 10.1021/ac050162j.

Cooks, R. G. et Busch, K. L. (1983) « Matrix effects, internal energies and MS/MS spectra of molecular ions sputtered from surfaces », *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, 53, p. 111-124. doi: 10.1016/0020-7381(83)85106-7.

Cotter, R. J. (1993) « Time-of-Flight Mass Spectrometry », in, p. 16-48. doi: 10.1021/bk-1994-0549.ch002.

Crone, B. *et al.* (2019) « Quantitative imaging of platinum-based antitumor complexes in bone tissue samples using LA-ICP-MS », *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. doi: 10.1016/j.jtemb.2019.04.011.

Cruz-Alonso, M. *et al.* (2019) « Laser ablation ICP-MS for simultaneous quantitative imaging of iron and ferroportin in hippocampus of human brain tissues with Alzheimer's disease », *Talanta*, 197, p. 413-421. doi: 10.1016/j.talanta.2019.01.056.

da Cunha, M. M. L. *et al.* (2016) « Overview of chemical imaging methods to address biological questions. », *Micron (Oxford, England: 1993)*, 84, p. 23-36. doi: 10.1016/j.micron.2016.02.005.

d'Abzac, F. X. *et al.* (2020) « Comparison of 1030 nm and 257 nm wavelengths for U-Pb zircon dating by femtosecond laser ablation – Inductively coupled plasma mass spectrometry with support of 3D crater imaging », *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. doi:

10.1016/j.sab.2020.105863.

Debois, D. *et al.* (2010) « MALDI-In Source Decay Applied to Mass Spectrometry Imaging: A New Tool for Protein Identification », *Analytical Chemistry*, 82(10), p. 4036-4045. doi: 10.1021/ac902875q.

Debois, D., Brunelle, A. et Lapr evote, O. (2007) « Attempts for molecular depth profiling directly on a rat brain tissue section using fullerene and bismuth cluster ion beams », *International Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.ijms.2006.09.026.

Deininger, S.-O. *et al.* (2011) « Normalization in MALDI-TOF imaging datasets of proteins: practical considerations. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 401(1), p. 167-81. doi: 10.1007/s00216-011-4929-z.

Delcorte, A. *et al.* (2020) « Large cluster ions: soft local probes and tools for organic and bio surfaces », *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22(31), p. 17427-17447. doi: 10.1039/D0CP02398A.

Delcourt, V. *et al.* (2017) « Combined Mass Spectrometry Imaging and Top-down Microproteomics Reveals Evidence of a Hidden Proteome in Ovarian Cancer », *EBioMedicine*, 21, p. 55-64. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.06.001.

Delcourt, V. *et al.* (2018) « Spatially-Resolved Top-down Proteomics Bridged to MALDI MS Imaging Reveals the Molecular Physiome of Brain Regions », *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(2), p. 357-372. doi: 10.1074/mcp.M116.065755.

Desbenoit, N. *et al.* (2018) « Correlative mass spectrometry imaging, applying time-of-flight secondary ion mass spectrometry and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization to a single tissue section », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 32(2), p. 159-166. doi: 10.1002/rcm.8022.

Devaux, S. *et al.* (2016) « Proteomic Analysis of the Spatio-temporal Based Molecular Kinetics of Acute Spinal Cord Injury Identifies a Time- and Segment-specific Window for Effective Tissue Repair », *Molecular & Cellular Proteomics*, 15(8), p. 2641-2670. doi: 10.1074/mcp.M115.057794.

Dilillo, Marialaura *et al.* (2017) « Mass Spectrometry Imaging, Laser Capture Microdissection, and LC-MS/MS of the Same Tissue Section », *Journal of Proteome Research*, 16(8), p. 2993-3001. doi: 10.1021/acs.jproteome.7b00284.

Dilillo, M. *et al.* (2017) « Ultra-High Mass Resolution MALDI Imaging Mass Spectrometry of Proteins and Metabolites in a Mouse Model of Glioblastoma », *Scientific Reports*, 7(1), p. 603. doi: 10.1038/s41598-017-00703-w.

Djidja, M.-C., Francese, S., *et al.* (2009) « Detergent addition to tryptic digests and ion mobility separation prior to MS/MS improves peptide yield and protein identification for in situ proteomic investigation of frozen and formalin-fixed paraffin-embedded adenocarcinoma tissue sections », *PROTEOMICS*, 9(10), p. 2750-2763. doi: 10.1002/pmic.200800624.

Djidja, M.-C., Claude, E., *et al.* (2009) « MALDI-Ion Mobility Separation-Mass Spectrometry Imaging of Glucose-Regulated Protein 78 kDa (Grp78) in Human Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Pancreatic Adenocarcinoma Tissue Sections », *Journal of Proteome Research*, 8(10), p. 4876-4884. doi: 10.1021/pr900522m.

Dong, Y. *et al.* (2016) « Sample preparation for mass spectrometry imaging of plant tissues: A review », *Frontiers in Plant Science*. doi: 10.3389/fpls.2016.00060.

Drake, R. R. *et al.* (2018) « MALDI mass spectrometry imaging of N-linked glycans in tissues », in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. doi: 10.1007/978-981-13-2158-0\_4.

Duprat, J. *et al.* (2014) « Isotopic analysis of organic matter in ultracarbonaceous Antarctic micrometeorites », in *7th Annual Meeting of the Meteoritical-Society*. Casablanca, Morocco, p. A103.

Durrant, S. F. (1999) « Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Achievements, problems, prospects », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/a901765h.

Ender, E. *et al.* (2019) « Why is NanoSIMS elemental imaging of arsenic in seaweed ( *Laminaria digitata* ) important for understanding of arsenic biochemistry in addition to speciation information? », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(11), p. 2295-2302. doi: 10.1039/C9JA00187E.

Etalo, D. W. *et al.* (2018) « Laser Ablation Electrospray Ionization-Mass Spectrometry Imaging (LAESI-MS) for Spatially Resolved Plant Metabolomics », in, p. 253-267. doi: 10.1007/978-1-4939-7819-9\_18.

Fatou, B. *et al.* (2016) « In vivo Real-Time Mass Spectrometry for Guided Surgery Application », *Scientific Reports*, 6(1), p. 25919. doi: 10.1038/srep25919.

Fearn, S. (2015) *An Introduction to Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS) and its Application to Materials Science*. IOP Publishing. doi: 10.1088/978-1-6817-4088-1.

Feider, C. L. *et al.* (2019) « Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications », *Analytical Chemistry*, 91(7), p. 4266-4290. doi: 10.1021/acs.analchem.9b00807.

- Feldmann, J., Kindness, A. et Ek, P. (2002) « Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/b201960d.
- Fernández, B. *et al.* (2007) « Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS », *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. doi: 10.1016/j.trac.2007.08.008.
- Fiddes, L. K. *et al.* (2012) « Hydrogel discs for digital microfluidics », *Biomicrofluidics*, 6(1), p. 014112. doi: 10.1063/1.3687381.
- Fisher, G. L. *et al.* (2016) « A New Method and Mass Spectrometer Design for TOF-SIMS Parallel Imaging MS/MS », *Analytical Chemistry*, 88(12), p. 6433-6440. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01022.
- Fonville, J. M. *et al.* (2012) « Robust data processing and normalization strategy for MALDI mass spectrometric imaging. », *Analytical chemistry*, 84(3), p. 1310-9. doi: 10.1021/ac201767g.
- Franck, Julien *et al.* (2009) « Improving Tissue Preparation for Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry Imaging. Part 1: Using Microspotting », *Analytical Chemistry*, 81(19), p. 8193-8202. doi: 10.1021/ac901328p.
- Franck, J. *et al.* (2009) « On-tissue N-terminal peptide derivatizations for enhancing protein identification in MALDI mass spectrometric imaging strategies », *Analytical Chemistry*, 81(20), p. 8205-8317. doi: 10.1021/ac901043n.
- Franck, J. *et al.* (2010) « MALDI mass spectrometry imaging of proteins exceeding 30,000 daltons. », *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 16(9), p. BR293-9. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20802405>.
- Franck, J. *et al.* (2013) « Quantification-Based Mass Spectrometry Imaging of Proteins by Parafilm Assisted Microdissection », *Analytical Chemistry*, 85(17), p. 8127-8134. doi: 10.1021/ac4009397.
- Fu, T. *et al.* (2018) « Tandem Mass Spectrometry Imaging and in Situ Characterization of Bioactive Wood Metabolites in Amazonian Tree Species *Sextonia rubra* », *Analytical Chemistry*, 90(12), p. 7535-7543. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01157.
- Fülöp, A. *et al.* (2020) « New Derivatization Reagent for Detection of free Thiol-groups in Metabolites and Proteins in Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging », *Analytical Chemistry*, 92(9), p. 6224-6228. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05630.
- Garza, K. Y. *et al.* (2018) « Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging of Proteins Directly from Biological Tissue Sections », *Analytical Chemistry*, 90(13), p. 7785-7789. doi: 10.1021/acs.analchem.8b00967.



Gemperline, E., Rawson, S. et Li, L. (2014) « Optimization and Comparison of Multiple MALDI Matrix Application Methods for Small Molecule Mass Spectrometric Imaging », *Analytical Chemistry*, 86(20), p. 10030-10035. doi: 10.1021/ac5028534.

Gilmore, I. S. (2013) « SIMS of organics—Advances in 2D and 3D imaging and future outlook », *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 31(5), p. 050819. doi: 10.1116/1.4816935.

Gilmore, I. S., Heiles, S. et Pieterse, C. L. (2019) « Metabolic Imaging at the Single-Cell Scale: Recent Advances in Mass Spectrometry Imaging », *Annual Review of Analytical Chemistry*, 12(1), p. 201-224. doi: 10.1146/annurev-anchem-061318-115516.

Glaus, R. *et al.* (2010) « Phenomenological studies on structure and elemental composition of nanosecond and femtosecond laser-generated aerosols with implications on laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry », *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*. doi: 10.1016/j.sab.2010.07.005.

González de Vega, R. *et al.* (2017) « Quantitative bioimaging of Ca, Fe, Cu and Zn in breast cancer tissues by LA-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 32(3), p. 671-677. doi: 10.1039/C6JA00390G.

Goodwin, R. J. A. *et al.* (2008) « Time-dependent evolution of tissue markers by MALDI-MS imaging », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200800201.

Goodwin, R. J. A. *et al.* (2010) « Stopping the clock on proteomic degradation by heat treatment at the point of tissue excision. », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200900641.

Goodwin, R. J. A. (2012) « Sample preparation for mass spectrometry imaging: Small mistakes can lead to big consequences », *Journal of Proteomics*. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.012.

Goodwin, R. J. A., Iverson, S. L. et Andren, P. E. (2012) « The significance of ambient-temperature on pharmaceutical and endogenous compound abundance and distribution in tissues sections when analyzed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry imaging », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. doi: 10.1002/rcm.6125.

Graham, D. J. et Castner, D. G. (2012) « Multivariate Analysis of ToF-SIMS Data from Multicomponent Systems: The Why, When, and How », *Biointerphases*, 7(1), p. 49. doi: 10.1007/s13758-012-0049-3.

Gray, A. L. (1985) « Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry », *The Analyst*. doi: 10.1039/AN9851000551.

Green, F. M. *et al.* (2010) « The effect of electrospray solvent composition on desorption electrospray ionisation (DESI) efficiency and spatial resolution », *The Analyst*, 135(4), p. 731.

doi: 10.1039/b924208b.

Grélard, F. *et al.* (2021) « Esmraldi: efficient methods for the fusion of mass spectrometry and magnetic resonance images », *BMC Bioinformatics*, 22(1), p. 56. doi: 10.1186/s12859-020-03954-z.

Griffiths, R. L. *et al.* (2016) « LESA FAIMS Mass Spectrometry for the Spatial Profiling of Proteins from Tissue », *Analytical Chemistry*, 88(13), p. 6758-6766. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01060.

Groseclose, M. R. *et al.* (2007) « Identification of proteins directly from tissue:in situ tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 42(2), p. 254-262. doi: 10.1002/jms.1177.

Groseclose, M. R. *et al.* (2008) « High-throughput proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissue microarrays using MALDI imaging mass spectrometry », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.200800495.

Gross, J. H. (2014) « Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1), p. 63-80. doi: 10.1007/s00216-013-7316-0.

Grovenor, C. R. M. *et al.* (2006) « Specimen preparation for NanoSIMS analysis of biological materials », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/j.apsusc.2006.02.180.

Guenther, S. *et al.* (2010) « Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging », *International Journal of Mass Spectrometry*, 294(1), p. 7-15. doi: 10.1016/j.ijms.2010.03.014.

Guijas, C. *et al.* (2018) « METLIN: A Technology Platform for Identifying Knowns and Unknowns. », *Analytical chemistry*, 90(5), p. 3156-3164. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04424.

Gundlach-Graham, A. W. *et al.* (2015) « High-Speed, High-Resolution, Multi-Elemental LA-ICP-TOFMS Imaging: Part I. Instrumentation and Two-Dimensional Imaging of Geological Samples. », *Analytical chemistry*.

Gustafsson, J. O. R. *et al.* (2010) « Citric acid antigen retrieval (CAAR) for tryptic peptide imaging directly on archived formalin-fixed paraffin-embedded tissue », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr9011766.

Haapala, M. *et al.* (2007) « Desorption Atmospheric Pressure Photoionization », *Analytical Chemistry*, 79(20), p. 7867-7872. doi: 10.1021/ac071152g.

Hajslova, J., Cajka, T. et Vaclavik, L. (2011) « Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis », *TrAC Trends in Analytical*

*Chemistry*, 30(2), p. 204-218. doi: 10.1016/j.trac.2010.11.001.

Hamm, G. *et al.* (2012) « Quantitative mass spectrometry imaging of propranolol and olanzapine using tissue extinction calculation as normalization factor. », *Journal of proteomics*, 75(16), p. 4952-4961. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.035.

Hansen, H. T. et Janfelt, C. (2016) « Aspects of Quantitation in Mass Spectrometry Imaging Investigated on Cryo-Sections of Spiked Tissue Homogenates. », *Analytical chemistry*, 88(23), p. 11513-11520. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02711.

Harkin, C. *et al.* (2021) « On-tissue chemical derivatization in mass spectrometry imaging », *Mass Spectrometry Reviews*. doi: 10.1002/mas.21680.

Heaven, M. R. *et al.* (2018) « Micro-Data-Independent Acquisition for High-Throughput Proteomics and Sensitive Peptide Mass Spectrum Identification. », *Analytical chemistry*, 90(15), p. 8905-8911. doi: 10.1021/acs.analchem.8b01026.

Heijs, B. *et al.* (2016) « Multimodal Mass Spectrometry Imaging of N -Glycans and Proteins from the Same Tissue Section », *Analytical Chemistry*, 88(15), p. 7745-7753. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01739.

Henderson, A., Moore, J. D. et Vickerman, J. C. (2013) « SIMS informatics », *Surface and Interface Analysis*, 45(1), p. 471-474. doi: 10.1002/sia.5065.

Henss, A. *et al.* (2018) « High resolution imaging and 3D analysis of Ag nanoparticles in cells with ToF-SIMS and delayed extraction », *Biointerphases*, 13(3), p. 03B410. doi: 10.1116/1.5015957.

Heyman, H. M. et Dubery, I. A. (2016) « The potential of mass spectrometry imaging in plant metabolomics: a review », *Phytochemistry Reviews*. doi: 10.1007/s11101-015-9416-2.

Hillenkamp, F. *et al.* (1975) « Laser microprobe mass analysis of organic materials », *Nature*. doi: 10.1038/256119a0.

Ho Kim, J. *et al.* (2015) « Proteome-wide characterization of signalling interactions in the hippocampal CA4/DG subfield of patients with Alzheimer's disease », *Scientific Reports*, 5(1), p. 11138. doi: 10.1038/srep11138.

Holst, S. *et al.* (2016) « Linkage-Specific in Situ Sialic Acid Derivatization for N-Glycan Mass Spectrometry Imaging of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues », *Analytical Chemistry*, 88(11), p. 5904-5913. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00819.

Hoo, Z. H., Candlish, J. et Teare, D. (2017) « What is an ROC curve? », *Emergency medicine journal : EMJ*, 34(6), p. 357-359. doi: 10.1136/emered-2017-206735.

Hook, A. L. *et al.* (2015) « Multivariate ToF-SIMS image analysis of polymer microarrays and protein adsorption. », *Biointerphases*, 10(1), p. 019005. doi: 10.1116/1.4906484.

Hoppe, P., Cohen, S. et Meibom, A. (2013) « NanoSIMS: Technical Aspects and Applications in Cosmochemistry and Biological Geochemistry », *Geostandards and Geoanalytical Research*, 37(2), p. 111-154. doi: 10.1111/j.1751-908X.2013.00239.x.

Horn, I. et Günther, D. (2003) « The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: Implications for LA-ICP-MS », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/S0169-4332(02)01324-7.

Jadoul, L. *et al.* (2015) « A spiked tissue-based approach for quantification of phosphatidylcholines in brain section by MALDI mass spectrometry imaging. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2095-106. doi: 10.1007/s00216-014-8232-7.

Judd, A. M. *et al.* (2019) « A recommended and verified procedure for in situ tryptic digestion of formalin-fixed paraffin-embedded tissues for analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry », *Journal of Mass Spectrometry*, 54(8), p. 716-727. doi: 10.1002/jms.4384.

Kadesch, P. *et al.* (2020) « Intracellular Parasites *Toxoplasma gondii* and *Besnoitia besnoiti*, Unveiled in Single Host Cells Using AP-SMALDI MS Imaging », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 31(9), p. 1815-1824. doi: 10.1021/jasms.0c00043.

Kaech, A. (2008) « BAL-TEC HPM 010 high-pressure freezing machine », in Cavalier, A.; Spohner, D.; Humbel, B. M. (éd.) *Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy*. Boca Raton, Fla., US: CRC Press, p. 101-128. doi: 10.1201/9781420006735.CH5.

Kaufmann, R., Hillenkamp, F. et Wechsung, R. (1979) « The laser microprobe mass analyzer (LAMMA): a new instrument for biomedical microprobe analysis. », *Medical progress through technology*, 6(3), p. 109-21. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/481360>.

Kelley, A. R. *et al.* (2016) « Molecular Mapping Alzheimer's Disease: MALDI Imaging of Formalin-fixed, Paraffin-embedded Human Hippocampal Tissue », *The Open Neurology Journal*, 10(1), p. 88-98. doi: 10.2174/1874205X01610010088.

Koch, J. et Günther, D. (2011) « Review of the state-of- The-art of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry », *Applied Spectroscopy*. doi: 10.1366/11-06255.

Kodolányi, J. *et al.* (2014) « The Mg isotope composition of presolar silicate grains from red giant stars », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 140, p. 577-605. doi: 10.1016/j.gca.2014.05.053.

Koestler, M. *et al.* (2008) « A high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization ion source for imaging analysis on an ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(20), p. 3275-3285. doi: 10.1002/rem.3733.

Kompauer, M., Heiles, S. et Spengler, B. (2017) « Atmospheric pressure MALDI mass spectrometry imaging of tissues and cells at 1.4- $\mu\text{m}$  lateral resolution », *Nature Methods*, 14(1), p. 90-96. doi: 10.1038/nmeth.4071.

Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R. et Sanz-Medel, A. (2014) « Design and evaluation of a new Peltier-cooled laser ablation cell with on-sample temperature control », *Analytica Chimica Acta*. doi: 10.1016/j.aca.2013.11.040.

Konz, I., Fernández, B., Fernández, M. L., Pereiro, R., González-Iglesias, H., *et al.* (2014) « Quantitative bioimaging of trace elements in the human lens by LA-ICP-MS », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-014-7617-y.

Kriegsmann, J., Kriegsmann, M. et Casadonte, R. (2015) « MALDI TOF imaging mass spectrometry in clinical pathology: A valuable tool for cancer diagnostics (Review) », *International Journal of Oncology*, 46(3), p. 893-906. doi: 10.3892/ijo.2014.2788.

Kysenius, K. *et al.* (2019) « A versatile quantitative microdroplet elemental imaging method optimised for integration in biochemical workflows for low-volume samples », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(3), p. 603-616. doi: 10.1007/s00216-018-1362-6.

Laiko, V. V., Baldwin, M. A. et Burlingame, A. L. (2000) « Atmospheric Pressure Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 72(4), p. 652-657. doi: 10.1021/ac990998k.

Laiko, V. V., Moyer, S. C. et Cotter, R. J. (2000) « Atmospheric Pressure MALDI/Ion Trap Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 72(21), p. 5239-5243. doi: 10.1021/ac000530d.

Lee, C.-H., Olson, P. et Evans, R. M. (2003) « Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. », *Endocrinology*, 144(6), p. 2201-7. doi: 10.1210/en.2003-0288.

Lee, D. K. *et al.* (2020) « Removing Formaldehyde-Induced Peptidyl Crosslinks Enables Mass Spectrometry Imaging of Peptide Hormone Distributions from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues », *Angewandte Chemie - International Edition*. doi: 10.1002/anie.202008847.

Lee, R. F. S. *et al.* (2017) « Application of imaging mass spectrometry approaches to facilitate metal-based anticancer drug research », *Metallomics*, 9(4), p. 365-381. doi: 10.1039/C6MT00231E.

Lemaire, R., Wisztorski, M., *et al.* (2006) « MALDI-MS direct tissue analysis of proteins: Improving signal sensitivity using organic treatments », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac060565z.

Lemaire, R., Tabet, J. C., *et al.* (2006) « Solid Ionic Matrixes for Direct Tissue Analysis and MALDI Imaging », *Analytical Chemistry*, 78(3), p. 809-819. doi: 10.1021/ac0514669.

Lemaire, R., Desmons, A., *et al.* (2007) « Direct analysis and MALDI imaging of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections », *Journal of Proteome Research*, 6(4), p. 1295-1305. doi: 10.1021/pr060549i.

Lemaire, R., Ait Menguellet, S., *et al.* (2007) « Specific MALDI Imaging and Profiling for Biomarker Hunting and Validation: Fragment of the 11S Proteasome Activator Complex, Reg Alpha Fragment, Is a New Potential Ovary Cancer Biomarker », *Journal of Proteome Research*, 6(11), p. 4127-4134. doi: 10.1021/pr0702722.

Li, B. *et al.* (2016) « High-resolution MALDI mass spectrometry imaging of gallotannins and monoterpene glucosides in the root of *Paeonia lactiflora* », *Scientific Reports*, 6(1), p. 36074. doi: 10.1038/srep36074.

Li, H., Balan, P. et Vertes, A. (2016) « Molecular Imaging of Growth, Metabolism, and Antibiotic Inhibition in Bacterial Colonies by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Angewandte Chemie International Edition*, 55(48), p. 15035-15039. doi: 10.1002/anie.201607751.

Li, T. *et al.* (2008) « Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. », *Environmental microbiology*, 10(3), p. 580-8. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01478.x.

Li, Y., Shrestha, B. et Vertes, A. (2007) « Atmospheric Pressure Molecular Imaging by Infrared MALDI Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 79(2), p. 523-532. doi: 10.1021/ac061577n.

Lin, H.-Y. *et al.* (2021) « Temperature Dependence of Desorbed Ions and Neutrals and Ionization Mechanism of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 32(1), p. 95-105. doi: 10.1021/jasms.0c00101.

Lloyd, A. S. *et al.* (2014) « NanoSIMS results from olivine-hosted melt embayments: Magma ascent rate during explosive basaltic eruptions », *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 283, p. 1-18. doi: 10.1016/j.jvolgeores.2014.06.002.

Löhr, K. *et al.* (2018) « Quantification of metals in single cells by LA-ICP-MS: Comparison of single spot analysis and imaging », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00191j.

Longuespée, R. *et al.* (2016) « A laser microdissection-based workflow for FFPE tissue microproteomics: Important considerations for small sample processing », *Methods*, 104, p. 154-162. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.12.008.

Lozić, I. *et al.* (2016) « Enabling dual cellular destinations of polymeric nanoparticles for treatment following partial injury to the central nervous system », *Biomaterials*, 74, p. 200-216. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.001.

Lugli, F. *et al.* (2017) « In situ high spatial resolution  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$  ratio determination of two Middle Pleistocene (c.a. 580 ka) *Stephanorhinus hundsheimensis* teeth by LA–MC–ICP–MS », *International Journal of Mass Spectrometry*, 412, p. 38-48. doi: 10.1016/j.ijms.2016.12.012.

Lukowski, J. K. *et al.* (2020) « Storage Conditions of Human Kidney Tissue Sections Affect Spatial Lipidomics Analysis Reproducibility », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1021/jasms.0c00256.

Luo, T. *et al.* (2017) « Comparison of signal intensities and elemental fractionation in 257 nm femtosecond LA-ICP-MS using He and Ar as carrier gases », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c7ja00190h.

Luo, T. *et al.* (2018) « Reassessment of the influence of carrier gases He and Ar on signal intensities in 193 nm excimer LA-ICP-MS analysis », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00163d.

Luo, T. *et al.* (2020) « Determination of major and trace elements in alloy steels by nanosecond and femtosecond laser ablation ICP-MS with non-matrix-matched calibration », *Atomic Spectroscopy*. doi: 10.46770/as.2020.01.002.

Ly, A. *et al.* (2016) « High-mass-resolution MALDI mass spectrometry imaging of metabolites from formalin-fixed paraffin-embedded tissue », *Nature Protocols*. doi: 10.1038/nprot.2016.081.

Lyon, I. C. *et al.* (2019) « Pb nanospheres in ancient zircon yield model ages for zircon formation and Pb mobilization », *Scientific Reports*, 9(1), p. 13702. doi: 10.1038/s41598-019-49882-8.

Van Malderen, S. J. M. *et al.* (2016) « Recent developments in the design of rapid response cells for laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and their impact on bioimaging applications », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c5ja00430f.

Van Malderen, S. J. M., Van Acker, T. et Vanhaecke, F. (2020) « Sub-micrometer Nanosecond LA-ICP-MS Imaging at Pixel Acquisition Rates above 250 Hz via a Low-Dispersion Setup », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/acs.analchem.9b05056.

Malherbe, J. *et al.* (2016) « A New Radio Frequency Plasma Oxygen Primary Ion Source on Nano Secondary Ion Mass Spectrometry for Improved Lateral Resolution and Detection of Electropositive Elements at Single Cell Level », *Analytical Chemistry*, 88(14), p. 7130-7136. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01153.

Manier, M. L. *et al.* (2011) « Reagent Precoated Targets for Rapid In-Tissue Derivatization of the Anti-Tuberculosis Drug Isoniazid Followed by MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 22(8), p. 1409-1419. doi: 10.1007/s13361-011-0150-8.

Martens, L. *et al.* (2011) « mzML—a Community Standard for Mass Spectrometry Data », *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1), p. R110.000133. doi: 10.1074/mcp.R110.000133.

Massonnet, P. et Heeren, R. M. A. (2019) « A concise tutorial review of TOF-SIMS based molecular and cellular imaging », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(11), p. 2217-2228. doi: 10.1039/C9JA00164F.

Mehennaoui, K. *et al.* (2018) « Do the pristine physico-chemical properties of silver and gold nanoparticles influence uptake and molecular effects on *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda)? », *Science of The Total Environment*, 643, p. 1200-1215. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.208.

Mekecha, T. T., Amunugama, R. et McLuckey, S. A. (2006) « Ion trap collision-induced dissociation of human hemoglobin alpha-chain cations. », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(7), p. 923-31. doi: 10.1016/j.jasms.2006.01.004.

Ménez, B. *et al.* (2018) « Abiotic synthesis of amino acids in the recesses of the oceanic lithosphere. », *Nature*, 564(7734), p. 59-63. doi: 10.1038/s41586-018-0684-z.

Meriaux, C. *et al.* (2010) « Liquid ionic matrixes for MALDI mass spectrometry imaging of lipids », *Journal of Proteomics*, 73(6), p. 1204-1218. doi: 10.1016/j.jprot.2010.02.010.

Miura, D. *et al.* (2010) « Ultrahighly Sensitive in Situ Metabolomic Imaging for Visualizing Spatiotemporal Metabolic Behaviors », *Analytical Chemistry*, 82(23), p. 9789-9796. doi: 10.1021/ac101998z.

Monk, S. M. et Lev, S. M. (2013) « Toxicological applications of cryogenic laser ablation inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry (CLA-ICP-TOF-MS) », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c2ja30218g.

Musat, N. *et al.* (2012) « Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS », *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), p. 486-511. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00303.x.



Nazari, M. et Muddiman, D. C. (2015) « Cellular-level mass spectrometry imaging using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (IR-MALDESI) by oversampling », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(8), p. 2265-2271. doi: 10.1007/s00216-014-8376-5.

Nemes, P., Barton, A. A. et Vertes, A. (2009) « Three-Dimensional Imaging of Metabolites in Tissues under Ambient Conditions by Laser Ablation Electrospray Ionization Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 81(16), p. 6668-6675. doi: 10.1021/ac900745e.

Nemes, P. et Vertes, A. (2007) « Laser Ablation Electrospray Ionization for Atmospheric Pressure, in Vivo, and Imaging Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 79(21), p. 8098-8106. doi: 10.1021/ac071181r.

Newman, C. F. *et al.* (2017) « Intracellular Drug Uptake—A Comparison of Single Cell Measurements Using ToF-SIMS Imaging and Quantification from Cell Populations with LC/MS/MS », *Analytical Chemistry*, 89(22), p. 11944-11953. doi: 10.1021/acs.analchem.7b01436.

Nicklay, J. J. *et al.* (2013) « MALDI Imaging and in Situ Identification of Integral Membrane Proteins from Rat Brain Tissue Sections », *Analytical Chemistry*, 85(15), p. 7191-7196. doi: 10.1021/ac400902h.

Norris, J. L. *et al.* (2007) « Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis », *International Journal of Mass Spectrometry*, 260(2-3), p. 212-221. doi: 10.1016/j.ijms.2006.10.005.

Norris, J. L. et Caprioli, R. M. (2013) « Analysis of tissue specimens by matrix-assisted laser desorption/ionization imaging mass spectrometry in biological and clinical research », *Chemical Reviews*. doi: 10.1021/cr3004295.

Van Nuffel, S. *et al.* (2016) « Multivariate analysis of 3D ToF-SIMS images: method validation and application to cultured neuronal networks », *The Analyst*, 141(1), p. 90-95. doi: 10.1039/C5AN01743B.

Nuñez, J. *et al.* (2018) « NanoSIMS for biological applications: Current practices and analyses », *Biointerphases*, 13(3), p. 03B301. doi: 10.1116/1.4993628.

O'Rourke, M. B. *et al.* (2019) « “What did i do wrong?” An empirical evaluation of sample preparation methodologies in matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry imaging », *Future Science OA*. doi: 10.4155/fsoa-2018-0095.

Ogrinc, N. *et al.* (2020) « Robot-Assisted SpiderMass for in vivo Real-Time Topography Mass Spectrometry Imaging », *BioRxiv*. doi: 10.1101/2020.12.15.422889.

Olsen, J. V. *et al.* (2005) « Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap », *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(12), p. 2010-2021. doi: 10.1074/mcp.T500030-MCP200.

Ovchinnikova, K. *et al.* (2020) « ColocML: machine learning quantifies co-localization between mass spectrometry images », *Bioinformatics*. Édité par A. Valencia, 36(10), p. 3215-3224. doi: 10.1093/bioinformatics/btaa085.

Palmer, A. *et al.* (2017) « FDR-controlled metabolite annotation for high-resolution imaging mass spectrometry. », *Nature methods*, 14(1), p. 57-60. doi: 10.1038/nmeth.4072.

Palmer, A. D., Bunch, J. et Styles, I. B. (2015) « The use of random projections for the analysis of mass spectrometry imaging data. », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(2), p. 315-22. doi: 10.1007/s13361-014-1024-7.

Paradisi, G. *et al.* (2010) « Longitudinal changes of adiponectin, carbohydrate and lipid metabolism in pregnant women at high risk for gestational diabetes », *Gynecological Endocrinology*, 26(7), p. 539-545. doi: 10.3109/09513591003632084.

Passarelli, M. K. *et al.* (2017) « The 3D OrbiSIMS—label-free metabolic imaging with subcellular lateral resolution and high mass-resolving power », *Nature Methods*, 14(12), p. 1175-1183. doi: 10.1038/nmeth.4504.

Pavlovich, M. J., Musselman, B. et Hall, A. B. (2018) « Direct analysis in real time-Mass spectrometry (DART-MS) in forensic and security applications », *Mass Spectrometry Reviews*, 37(2), p. 171-187. doi: 10.1002/mas.21509.

Penen, F. *et al.* (2020) « Pyrenoidal sequestration of cadmium impairs carbon dioxide fixation in a microalga », *Plant, Cell & Environment*, 43(2), p. 479-495. doi: 10.1111/pce.13674.

Péresse, T. *et al.* (2017) « Dual Beam Depth Profiling and Imaging with Argon and Bismuth Clusters of Prenylated Stilbenes on Glandular Trichomes of *Macaranga vedeliana* », *Analytical Chemistry*, 89(17), p. 9247-9252. doi: 10.1021/acs.analchem.7b02020.

Perkins, D. N. *et al.* (1999) « Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. », *Electrophoresis*, 20(18), p. 3551-67. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(19991201)20:18<3551::AID-ELPS3551>3.0.CO;2-2.

Perry, W. J. *et al.* (2020) « Uncovering matrix effects on lipid analyses in MALDI imaging mass spectrometry experiments », *Journal of Mass Spectrometry*, 55(4), p. e4491. doi: 10.1002/jms.4491.

Petit, V. W. *et al.* (2010) « Multimodal Spectroscopy Combining Time-of-Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry, Synchrotron-FT-IR, and Synchrotron-UV Microspectroscopies on the

Same Tissue Section », *Analytical Chemistry*, 82(9), p. 3963-3968. doi: 10.1021/ac100581y.

Philipsen, M. H. *et al.* (2018) « Relative quantification of deuterated omega-3 and -6 fatty acids and their lipid turnover in PC12 cell membranes using TOF-SIMS », *Journal of Lipid Research*, 59(11), p. 2098-2107. doi: 10.1194/jlr.M087734.

Pietrowska, M. *et al.* (2016) « Tissue fixed with formalin and processed without paraffin embedding is suitable for imaging of both peptides and lipids by MALDI-IMS », *Proteomics*. doi: 10.1002/pmic.201500424.

Pisonero, J. *et al.* (2019) « Critical evaluation of fast and highly resolved elemental distribution in single cells using LA-ICP-SFMS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. doi: 10.1039/c8ja00096d.

Pitman, C. N. et LaCourse, W. R. (2020) « Desorption atmospheric pressure chemical ionization: A review », *Analytica Chimica Acta*, 1130, p. 146-154. doi: 10.1016/j.aca.2020.05.073.

Powers, T. W. *et al.* (2013) « Matrix assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry workflow for spatial profiling analysis of N-linked Glycan expression in tissues », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac402108x.

Prideaux, B. *et al.* (2015) « The association between sterilizing activity and drug distribution into tuberculosis lesions. », *Nature medicine*, 21(10), p. 1223-7. doi: 10.1038/nm.3937.

Prohaska, T., Irrgeher, J. et Zitek, A. (2016) « Simultaneous multi-element and isotope ratio imaging of fish otoliths by laser ablation split stream ICP-MS/MC ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(8), p. 1612-1621. doi: 10.1039/C6JA00087H.

Quanico, J. *et al.* (2013) « Development of liquid microjunction extraction strategy for improving protein identification from tissue sections », *Journal of Proteomics*, 79, p. 200-218. doi: 10.1016/j.jprot.2012.11.025.

Quanico, J. *et al.* (2015) « Parafilm-assisted microdissection: a sampling method for mass spectrometry-based identification of differentially expressed prostate cancer protein biomarkers », *Chemical Communications*, 51(22), p. 4564-4567. doi: 10.1039/C4CC08331H.

Race, A. M. *et al.* (2016) « SpectralAnalysis: Software for the Masses. », *Analytical chemistry*, 88(19), p. 9451-9458. doi: 10.1021/acs.analchem.6b01643.

Race, A. M. et Römpf, A. (2018) « Error-Free Data Visualization and Processing through imzML and mzML Validation », *Analytical Chemistry*, 90(22), p. 13378-13384. doi: 10.1021/acs.analchem.8b03059.

Räsänen, R.-M. *et al.* (2019) « Chemical profiles of birch and alder bark by ambient mass spectrometry », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(28), p. 7573-7583. doi: 10.1007/s00216-019-02171-9.

Rejšek, J. *et al.* (2015) « The detection and mapping of the spatial distribution of insect defense compounds by desorption atmospheric pressure photoionization Orbitrap mass spectrometry », *Analytica Chimica Acta*, 886, p. 91-97. doi: 10.1016/j.aca.2015.06.007.

Remoortere, A. van *et al.* (2010) « MALDI imaging and profiling MS of higher mass proteins from tissue », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(11), p. 1922-1929. doi: 10.1016/j.jasms.2010.07.011.

Le Rhun, E. *et al.* (2017) « Evaluation of non-supervised MALDI mass spectrometry imaging combined with microproteomics for glioma grade III classification », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(7), p. 875-890. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.012.

Rizzo, D. G. *et al.* (2017) « Enhanced Spatially Resolved Proteomics Using On-Tissue Hydrogel-Mediated Protein Digestion », *Analytical Chemistry*, 89(5), p. 2948-2955. doi: 10.1021/acs.analchem.6b04395.

Roach, P. J., Laskin, J. et Laskin, A. (2010) « Molecular Characterization of Organic Aerosols Using Nanospray-Desorption/Electrospray Ionization-Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 82(19), p. 7979-7986. doi: 10.1021/ac101449p.

Robichaud, G., Barry, J. A., *et al.* (2013) « Infrared Matrix-Assisted Laser Desorption Electrospray Ionization (IR-MALDESI) Imaging Source Coupled to a FT-ICR Mass Spectrometer », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(1), p. 92-100. doi: 10.1007/s13361-012-0505-9.

Robichaud, G., Garrard, K. P., *et al.* (2013) « MSiReader: An Open-Source Interface to View and Analyze High Resolving Power MS Imaging Files on Matlab Platform », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 24(5), p. 718-721. doi: 10.1007/s13361-013-0607-z.

Römpp, A. *et al.* (2011) « imzML: Imaging Mass Spectrometry Markup Language: A Common Data Format for Mass Spectrometry Imaging », in, p. 205-224. doi: 10.1007/978-1-60761-987-1\_12.

Römpp, A. *et al.* (2015) « Mass spectrometry imaging of biological tissue: an approach for multicenter studies. », *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(8), p. 2329-35. doi: 10.1007/s00216-014-8410-7.

Rubatto, D. *et al.* (2020) « Identification of growth mechanisms in metamorphic garnet by high-resolution trace element mapping with LA-ICP-TOFMS », *Contributions to Mineralogy and*

*Petrology*, 175(7), p. 61. doi: 10.1007/s00410-020-01700-5.

Russo, R. E. *et al.* (2002) « Laser ablation in analytical chemistry - A review », *Talanta*. doi: 10.1016/S0039-9140(02)00053-X.

Rzagalinski, I. et Volmer, D. A. (2017) « Quantification of low molecular weight compounds by MALDI imaging mass spectrometry - A tutorial review. », *Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics*, 1865(7), p. 726-739. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.12.011.

Samarah, L. Z. *et al.* (2020) « Single-Cell Metabolic Profiling: Metabolite Formulas from Isotopic Fine Structures in Heterogeneous Plant Cell Populations », *Analytical Chemistry*, 92(10), p. 7289-7298. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00936.

Sampson, J. S., Hawkrige, A. M. et Muddiman, D. C. (2006) « Generation and detection of multiply-charged peptides and proteins by matrix-assisted laser desorption electrospray ionization (MALDESI) fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 17(12), p. 1712-1716. doi: 10.1016/j.jasms.2006.08.003.

Sampson, J. S., Hawkrige, A. M. et Muddiman, D. C. (2008) « Construction of a versatile high precision ambient ionization source for direct analysis and imaging », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(10), p. 1527-1534. doi: 10.1016/j.jasms.2008.06.013.

Sampson, J. S., Murray, K. K. et Muddiman, D. C. (2009) « Intact and top-down characterization of biomolecules and direct analysis using infrared matrix-assisted laser desorption electrospray ionization coupled to FT-ICR mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(4), p. 667-673. doi: 10.1016/j.jasms.2008.12.003.

Sano, Y. *et al.* (2008) « Ion microprobe Sr isotope analysis of carbonates with about 5µm spatial resolution: An example from an ayu otolith », *Applied Geochemistry*, 23(8), p. 2406-2413. doi: 10.1016/j.apgeochem.2008.02.027.

Sans, M. *et al.* (2019) « Performance of the MasSpec Pen for Rapid Diagnosis of Ovarian Cancer », *Clinical Chemistry*, 65(5), p. 674-683. doi: 10.1373/clinchem.2018.299289.

Santos, C. R. et Schulze, A. (2012) « Lipid metabolism in cancer », *FEBS Journal*, 279(15), p. 2610-2623. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x.

Saudemont, P. *et al.* (2018) « Real-Time Molecular Diagnosis of Tumors Using Water-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Technology », *Cancer Cell*, 34(5), p. 840-851.e4. doi: 10.1016/j.ccell.2018.09.009.

Schäfer, K.-C. *et al.* (2009) « In Vivo, In Situ Tissue Analysis Using Rapid Evaporative Ionization Mass Spectrometry », *Angewandte Chemie International Edition*, 48(44), p.

8240-8242. doi: 10.1002/anie.200902546.

Schaumlöffel, D. (2015) « The -Omics Tool Box », in Krauss, Gerd-Joachim; Nies, D. H. (éd.) *Ecological Biochemistry: Environmental and Interspecies Interactions*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, GmbH, p. 343-365.

Schaumlöffel, D. *et al.* (2016) « Novel Methods for Bioimaging Including LA-ICP-MS, NanoSIMS, TEM/X-EDS, and SXRF », in *Metallomics Analytical Techniques and Speciation Methods*. doi: 10.1002/9783527694907.ch4.

Schober, Y. *et al.* (2011) « Protein identification by accurate mass matrix-assisted laser desorption/ionization imaging of tryptic peptides », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(17), p. 2475-2483. doi: 10.1002/rcm.5135.

Schober, Y. *et al.* (2012) « Single Cell Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Imaging », *Analytical Chemistry*, 84(15), p. 6293-6297. doi: 10.1021/ac301337h.

Schramm, T. *et al.* (2012) « imzML--a common data format for the flexible exchange and processing of mass spectrometry imaging data. », *Journal of proteomics*, 75(16), p. 5106-5110. doi: 10.1016/j.jprot.2012.07.026.

Schulz, S. *et al.* (2019) « Advanced MALDI mass spectrometry imaging in pharmaceutical research and drug development », *Current Opinion in Biotechnology*, 55, p. 51-59. doi: 10.1016/j.copbio.2018.08.003.

Schwartz, S. A., Reyzer, M. L. et Caprioli, R. M. (2003) « Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Practical aspects of sample preparation », *Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1002/jms.505.

Scott, D. A. *et al.* (2019) « Specific N-linked glycosylation patterns in areas of necrosis in tumor tissues », *International Journal of Mass Spectrometry*, 437, p. 69-76. doi: 10.1016/j.ijms.2018.01.002.

Seeley, E. H. *et al.* (2008) « Enhancement of Protein Sensitivity for MALDI Imaging Mass Spectrometry After Chemical Treatment of Tissue Sections », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.jasms.2008.03.016.

Shard, A. G. *et al.* (2015) « The matrix effect in organic secondary ion mass spectrometry », *International Journal of Mass Spectrometry*, 377, p. 599-609. doi: 10.1016/j.ijms.2014.06.027.

Shariatgorji, M. *et al.* (2014) « Direct Targeted Quantitative Molecular Imaging of Neurotransmitters in Brain Tissue Sections », *Neuron*, 84(4), p. 697-707. doi: 10.1016/j.neuron.2014.10.011.

Shi, Y. *et al.* (2019) « Mass Spectrometric Imaging Reveals Temporal and Spatial Dynamics of Bioactive Lipids in Arteries Undergoing Restenosis », *Journal of Proteome Research*, 18(4), p. 1669-1678. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00941.

Shimma, S. et Sugiura, Y. (2014) « Effective Sample Preparations in Imaging Mass Spectrometry », *Mass Spectrometry*. doi: 10.5702/massspectrometry.s0029.

Shrestha, B., Patt, J. M. et Vertes, A. (2011) « In Situ Cell-by-Cell Imaging and Analysis of Small Cell Populations by Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 83(8), p. 2947-2955. doi: 10.1021/ac102958x.

Signor, L. *et al.* (2007) « Analysis of erlotinib and its metabolites in rat tissue sections by MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry. », *Journal of mass spectrometry : JMS*, 42(7), p. 900-9. doi: 10.1002/jms.1225.

Sjövall, P., Johansson, B. et Lausmaa, J. (2006) « Localization of lipids in freeze-dried mouse brain sections by imaging TOF-SIMS », *Applied Surface Science*. doi: 10.1016/j.apsusc.2006.02.126.

Slodzian, G. *et al.* (1990) « Parallel Mapping of Several Elements or Isotopes by Scanning with a Submicron Ion Probe - 1st Results », *Comptes Rendus Acad. Sci. Ser. II*, 1990, 311, 57-64, 311, p. 57-64.

Slodzian, G. *et al.* (1992) « Scanning secondary ion analytical microscopy with parallel detection », *Biology of the Cell*, 74(1), p. 43-50. doi: 10.1016/0248-4900(92)90007-N.

Slodzian, G., Daigne, B. et Girard, F. (1992) « From direct ion images to ion probe scanning », *Microscopy Microanalysis Microstructures*, 3(2-3), p. 99-118. doi: 10.1051/mm:0199200302-309900.

Smith, N. S. *et al.* (2008) « A high brightness source for nano-probe secondary ion mass spectrometry », *Applied Surface Science*, 255(4), p. 1606-1609. doi: 10.1016/j.apsusc.2008.05.141.

Song, Y. et Cooks, R. G. (2006) « Atmospheric pressure ion/molecule reactions for the selective detection of nitroaromatic explosives using acetonitrile and air as reagents », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(20), p. 3130-3138. doi: 10.1002/rcm.2714.

Spengler, B. et Hubert, M. (2002) « Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(6), p. 735-748. doi: 10.1016/S1044-0305(02)00376-8.

Spengler, B., Hubert, M. et Kaufmann, R. (1994) « MALDI ion imaging and biological ion

imaging with a new scanning UV-laser microprobe », in *Proc. 42nd Annual Conf. Mass Spectrom. and Allied Topics*, p. 1041.

Spraggins, J. M. *et al.* (2015) « MALDI FTICR IMS of Intact Proteins: Using Mass Accuracy to Link Protein Images with Proteomics Data », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), p. 974-985. doi: 10.1007/s13361-015-1147-5.

Spraggins, J. M. *et al.* (2016) « Next-generation technologies for spatial proteomics: Integrating ultra-high speed MALDI-TOF and high mass resolution MALDI FTICR imaging mass spectrometry for protein analysis », *PROTEOMICS*, 16(11-12), p. 1678-1689. doi: 10.1002/pmic.201600003.

St John, E. R. *et al.* (2017) « Rapid evaporative ionisation mass spectrometry of electrosurgical vapours for the identification of breast pathology: towards an intelligent knife for breast cancer surgery », *Breast Cancer Research*, 19(1), p. 59. doi: 10.1186/s13058-017-0845-2.

Starr, N. J. *et al.* (2019) « Enhanced vitamin C skin permeation from supramolecular hydrogels, illustrated using in situ ToF-SIMS 3D chemical profiling », *International Journal of Pharmaceutics*, 563, p. 21-29. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.03.028.

Stauber, J. *et al.* (2008) « MALDI imaging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to model animals of parkinson disease for biomarker hunting », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/pr070464x.

Stauber, J. *et al.* (2010) « On-tissue protein identification and imaging by MALDI-Ion mobility mass spectrometry », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21(3), p. 338-347. doi: 10.1016/j.jasms.2009.09.016.

Steere, R. L. (1957) « ELECTRON MICROSCOPY OF STRUCTURAL DETAIL IN FROZEN BIOLOGICAL SPECIMENS », *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(1), p. 45-60. doi: 10.1083/jcb.3.1.45.

Steinmann, L. K. *et al.* (2019) « In situ high-precision lithium isotope analyses at low concentration levels with femtosecond-LA-MC-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(7), p. 1447-1458. doi: 10.1039/C9JA00088G.

Stoeckli, M., Farmer, T. B. et Caprioli, R. M. (1999) « Automated mass spectrometry imaging with a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight instrument », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/S1044-0305(98)00126-3.

Stoeckli, M. et Staab, D. (2015) « Reproducible Matrix Deposition for MALDI MSI Based on Open-Source Software and Hardware », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 26(6), p. 911-914. doi: 10.1007/s13361-015-1099-9.



Storms, H. A., Brown, K. F. et Stein, J. D. (1977) « Evaluation of a cesium positive ion source for secondary ion mass spectrometry », *Analytical Chemistry*, 49(13), p. 2023-2030. doi: 10.1021/ac50021a034.

Strohalm, M. *et al.* (2011) « Poly[ N -(2-hydroxypropyl)methacrylamide]-based tissue-embedding medium compatible with MALDI mass spectrometry imaging experiments », *Analytical Chemistry*. doi: 10.1021/ac2011679.

Suckau, D. et Resemann, A. (2003) « T<sub>3</sub>-Sequencing: Targeted Characterization of the N- and C-Termini of Undigested Proteins by Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 75(21), p. 5817-5824. doi: 10.1021/ac034362b.

Sud, M. *et al.* (2007) « LMSD: LIPID MAPS structure database. », *Nucleic acids research*, 35(Database issue), p. D527-32. doi: 10.1093/nar/gkl838.

Sugiura, Y., Shimma, S. et Setou, M. (2006) « Thin Sectioning Improves the Peak Intensity and Signal-to-Noise Ratio in Direct Tissue Mass Spectrometry », *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*. doi: 10.5702/massspec.54.45.

Swales, J. G. *et al.* (2019) « Mass spectrometry imaging and its application in pharmaceutical research and development: A concise review », *International Journal of Mass Spectrometry*. doi: 10.1016/j.ijms.2018.02.007.

Tachikawa, K. *et al.* (2013) « Microscale neodymium distribution in sedimentary planktonic foraminiferal tests and associated mineral phases », *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 100, p. 11-23. doi: 10.1016/j.gca.2012.10.010.

Takats, Z. *et al.* (2008) « In situ desorption electrospray ionization (DESI) analysis of tissue sections », *Cold Spring Harbor Protocols*. doi: 10.1101/pdb.prot4994.

Takáts, Z. *et al.* (2004) « Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization », *Science*, 306(5695), p. 471-3. doi: 10.1126/science.1104404.

Taverna, D., Norris, J. L. et Caprioli, R. M. (2015) « Histology-Directed Microwave Assisted Enzymatic Protein Digestion for MALDI MS Analysis of Mammalian Tissue », *Analytical Chemistry*, 87(1), p. 670-676. doi: 10.1021/ac503479a.

Taylor, A. J., Dexter, A. et Bunch, J. (2018) « Exploring Ion Suppression in Mass Spectrometry Imaging of a Heterogeneous Tissue », *Analytical Chemistry*, 90(9), p. 5637-5645. doi: 10.1021/acs.analchem.7b05005.

Theiner, S. *et al.* (2019) « Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry Imaging of Trace Elements at the Single-Cell Level for Clinical Practice »,

*Analytical Chemistry*, 91(13), p. 8207-8212. doi: 10.1021/acs.analchem.9b00698.

Tian, H. *et al.* (2017) « Subcellular Chemical Imaging of Antibiotics in Single Bacteria Using C 60 -Secondary Ion Mass Spectrometry », *Analytical Chemistry*, 89(9), p. 5050-5057. doi: 10.1021/acs.analchem.7b00466.

Tobias, F. et Hummon, A. B. (2020) « Considerations for MALDI-Based Quantitative Mass Spectrometry Imaging Studies. », *Journal of proteome research*, 19(9), p. 3620-3630. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00443.

Touboul, D. *et al.* (2005) « Improvement of biological time-of-flight-secondary ion mass spectrometry imaging with a bismuth cluster ion source », *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 16(10), p. 1608-1618. doi: 10.1016/j.jasms.2005.06.005.

Trimpin, S., Räder, H. J. et Müllen, K. (2006) « Investigations of theoretical principles for MALDI-MS derived from solvent-free sample preparation », *International Journal of Mass Spectrometry*, 253(1-2), p. 13-21. doi: 10.1016/j.ijms.2005.10.008.

Trindade, G. F. *et al.* (2018) « A Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry/Multivariate Analysis (ToF-SIMS/MVA) Approach To Identify Phase Segregation in Blends of Incompatible but Extremely Similar Resins. », *Analytical chemistry*, 90(6), p. 3936-3941. doi: 10.1021/acs.analchem.7b04877.

Trindade, G. F., Abel, M.-L. et Watts, J. F. (2018) « simsMVA: A tool for multivariate analysis of ToF-SIMS datasets », *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 182, p. 180-187. doi: 10.1016/j.chemolab.2018.10.001.

Tuck, M. *et al.* (2021) « Multimodal Imaging Based on Vibrational Spectroscopies and Mass Spectrometry Imaging Applied to Biological Tissue: A Multiscale and Multiomics Review », *Analytical Chemistry*, 93(1), p. 445-477. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04595.

Ucal, Y. *et al.* (2017) « Clinical applications of MALDI imaging technologies in cancer and neurodegenerative diseases », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1865(7), p. 795-816. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.01.005.

UniProt Consortium (2019) « UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. », *Nucleic acids research*, 47(D1), p. D506-D515. doi: 10.1093/nar/gky1049.

Urban, C. *et al.* (2018) « PAXgene fixation enables comprehensive metabolomic and proteomic analyses of tissue specimens by MALDI MSI », *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.10.005.

Urbini, M. *et al.* (2017) « ToF-SIMS and principal component analysis of lipids and amino acids from inflamed and dysplastic human colonic mucosa. », *Analytical and bioanalytical*

*chemistry*, 409(26), p. 6097-6111. doi: 10.1007/s00216-017-0546-9.

Van Vaeck, L., Adriaens, A. et Gijbels, R. (1999) « Static secondary ion mass spectrometry (S-SIMS) Part 1: methodology and structural interpretation », *Mass Spectrometry Reviews*, 18(1), p. 1-47. doi: 10.1002/(SICI)1098-2787(1999)18:1<1::AID-MAS1>3.0.CO;2-W.

Vaikkinen, A. *et al.* (2015) « Analysis of neonicotinoids from plant material by desorption atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(5), p. 424-430. doi: 10.1002/rcm.7123.

Vanbellinghen, Q. P. *et al.* (2015) « Time-of-flight secondary ion mass spectrometry imaging of biological samples with delayed extraction for high mass and high spatial resolutions », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 29(13), p. 1187-1195. doi: 10.1002/rcm.7210.

Veličković, D. *et al.* (2014) « New insights into the structural and spatial variability of cell-wall polysaccharides during wheat grain development, as revealed through MALDI mass spectrometry imaging », *Journal of Experimental Botany*, 65(8), p. 2079-2091. doi: 10.1093/jxb/eru065.

Verbeeck, N., Caprioli, R. M. et Van de Plas, R. (2020) « Unsupervised machine learning for exploratory data analysis in imaging mass spectrometry », *Mass spectrometry reviews*, 39(3), p. 245-291. doi: 10.1002/mas.21602.

Vickerman, J. C. et Briggs, D. (2013) *ToF-SIMS: Materials Analysis by Mass Spectrometry*. 2nd editio. Édité par I. P. LLP.

Voss, M. *et al.* (2017) « A new approach to calibration and determination of selected trace elements in food contact polymers by LA-ICP-MS », *Talanta*, 170, p. 488-495. doi: 10.1016/j.talanta.2017.04.048.

Wang, H. Y. J., Liu, C. Bin et Wu, H. W. (2011) « A simple desalting method for direct MALDI mass spectrometry profiling of tissue lipids », *Journal of Lipid Research*. doi: 10.1194/jlr.D013060.

Wang, M.-C. et Li, S. (2013) « ROC analysis for multiple markers with tree-based classification. », *Lifetime data analysis*, 19(2), p. 257-77. doi: 10.1007/s10985-012-9233-5.

Warren, A. D., Mitchell, D. J. et Gates, P. J. (2018) « Methodologies for the airbrush application of MALDI matrices », *European Journal of Mass Spectrometry*, 24(1), p. 89-95. doi: 10.1177/1469066717750031.

Watrous, J. D. et Dorrestein, P. C. (2011) « Imaging mass spectrometry in microbiology. », *Nature reviews. Microbiology*, 9(9), p. 683-94. doi: 10.1038/nrmicro2634.

Weiskirchen, R. *et al.* (2019) « Software solutions for evaluation and visualization of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry imaging (LA-ICP-MSI) data: a short overview. », *Journal of cheminformatics*, 11(1), p. 16. doi: 10.1186/s13321-019-0338-7.

Wenzel, T. *et al.* (2006) « 2,5-Dihydroxyacetophenone: a matrix for highly sensitive matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of proteins using manual and automated preparation techniques », *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), p. 785-789. doi: 10.1002/rcm.2378.

West, C. A. *et al.* (2020) « New Enzymatic Approach to Distinguish Fucosylation Isomers of N-Linked Glycans in Tissues Using MALDI Imaging Mass Spectrometry », *Journal of Proteome Research*. doi: 10.1021/acs.jproteome.0c00024.

Winograd, N. et Bloom, A. (2015) « Sample Preparation for 3D SIMS Chemical Imaging of Cells », in, p. 9-19. doi: 10.1007/978-1-4939-1357-2\_2.

Wischhusen, P. *et al.* (2021) « Tissue localization of selenium of parental or dietary origin in rainbow trout ( *Oncorhynchus mykiss* ) fry using LA-ICP MS bioimaging », *Metallomics*, 13(2). doi: 10.1093/mtomcs/mfaa008.

Wishart, D. S. *et al.* (2018) « HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. », *Nucleic acids research*, 46(D1), p. D608-D617. doi: 10.1093/nar/gkx1089.

Wisztorski, M. *et al.* (2010) « MALDI direct analysis and imaging of frozen versus FFPE tissues: What strategy for which sample? », *Methods in Molecular Biology*. doi: 10.1007/978-1-60761-746-4\_18.

Wisztorski, M. *et al.* (2013) « Microproteomics by liquid extraction surface analysis: Application to FFPE tissue to study the fimbria region of tubo-ovarian cancer », *PROTEOMICS - Clinical Applications*, 7(3-4), p. 234-240. doi: 10.1002/prca.201200070.

Wisztorski, M. *et al.* (2016) « Spatially-resolved protein surface microsampling from tissue sections using liquid extraction surface analysis », *PROTEOMICS*, 16(11-12), p. 1622-1632. doi: 10.1002/pmic.201500508.

Wu, C. *et al.* (2013) « Mass spectrometry imaging under ambient conditions », *Mass Spectrometry Reviews*, 32(3), p. 218-243. doi: 10.1002/mas.21360.

Yajima, Y. *et al.* (2018) « Region of Interest analysis using mass spectrometry imaging of mitochondrial and sarcomeric proteins in acute cardiac infarction tissue », *Scientific Reports*, 8(1), p. 7493. doi: 10.1038/s41598-018-25817-7.

Yang, J. et Caprioli, R. M. (2011) « Matrix Sublimation/Recrystallization for Imaging Proteins by Mass Spectrometry at High Spatial Resolution », *Analytical Chemistry*, 83(14), p.

5728-5734. doi: 10.1021/ac200998a.

Yardley, S. S. *et al.* (2013) « An investigation of the oxidation behaviour of zirconium alloys using isotopic tracers and high resolution SIMS », *Journal of Nuclear Materials*, 443(1-3), p. 436-443. doi: 10.1016/j.jnucmat.2013.07.053.

Yoon, S. et Lee, T. G. (2018) « Biological tissue sample preparation for time-of-flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS) imaging », *Nano Convergence*. doi: 10.1186/s40580-018-0157-y.

Yun, N. *et al.* (2021) « Localization of Major Ephedra Alkaloids in Whole Aerial Parts of Ephedrae Herba Using Direct Analysis in Real Time-Time of Flight-Mass Spectrometry », *Molecules*, 26(3), p. 580. doi: 10.3390/molecules26030580.

Zhang, C. *et al.* (2020) « A high performance method for the accurate and precise determination of silicon isotopic compositions in bulk silicate rock samples using laser ablation MC-ICP-MS », *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35(9), p. 1887-1896. doi: 10.1039/D0JA00036A.

Zhang, D.-S. *et al.* (2012) « Multi-isotope imaging mass spectrometry reveals slow protein turnover in hair-cell stereocilia », *Nature*, 481(7382), p. 520-524. doi: 10.1038/nature10745.

Zhang, J. *et al.* (2017) « Nondestructive tissue analysis for ex vivo and in vivo cancer diagnosis using a handheld mass spectrometry system », *Science Translational Medicine*, 9(406), p. eaan3968. doi: 10.1126/scitranslmed.aan3968.

Zhang, J. *et al.* (2020) « Cryo-OrbiSIMS for 3D Molecular Imaging of a Bacterial Biofilm in Its Native State », *Analytical Chemistry*, 92(13), p. 9008-9015. doi: 10.1021/acs.analchem.0c01125.

Zhang, J. *et al.* (2021) « MASS SPECTROMETRY TECHNOLOGIES TO ADVANCE CARE FOR CANCER PATIENTS IN CLINICAL AND INTRAOPERATIVE USE », *Mass Spectrometry Reviews*, 40(5), p. 692-720. doi: 10.1002/mas.21664.

Zhang, Y. *et al.* (2013) « Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. », *Chemical reviews*, 113(4), p. 2343-94. doi: 10.1021/cr3003533.

Zhou, Q., Fülöp, A. et Hopf, C. (2021) « Recent developments of novel matrices and on-tissue chemical derivatization reagents for MALDI-MSI », *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. doi: 10.1007/s00216-020-03023-7.

Zimmerman, M. *et al.* (2018) « Spatial Quantification of Drugs in Pulmonary Tuberculosis Lesions by Laser Capture Microdissection Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCM-LC/MS) », *Journal of Visualized Experiments*, (134). doi: 10.3791/57402.