APPLICATION DE LA SPECTROSCOPIE DE PERTES D'ÉNERGIE D'ÉLECTRONS À HAUTE TENSION À L'ANALYSE DE MICROPARTICULES DANS DES COUPES DE TISSUS BIOLOGIQUES

J.P. Berry, P. Galle, Y. Kihn*, G. Zanchi*, J. Sevely* et B. Jouffrey*

*Laboratoire de Biophysique, Université du Val de Marne, 6 rue du Général Sarrail, 94010 Créteil, France***Laboratoire d'Optique Electronique du CNRS, 29 rue Jeanne Marvig, B.P. 4347, 31055 Toulouse Cedex, France*

Résumé : La spectroscopie de pertes d'énergie d'électrons à haute tension est appliquée pour la caractérisation de microparticules intracellulaires observées dans les coupes de tissus biologiques. Elle permet de montrer que ces microparticules correspondent à des dépôts contenant divers éléments : ici de l'aluminium, du gallium, du nickel et de l'uranium.

Abstract : High voltage electron energy loss spectroscopy has been used for the chemical analysis of small intracellular particles observed in thin biological tissue sections. The technique has allowed the characterization of aluminium, gallium, nickel and uranium.

Associée à l'observation des micrographies électroniques, la technique de spectroscopie de pertes d'énergie d'électrons est maintenant largement utilisée comme méthode d'analyse chimique à l'échelle submicrométrique. L'expérience montre que l'utilisation de hautes tensions accélératrices (> 300 kV) des électrons primaires permet l'analyse d'échantillons plus épais que ceux qui peuvent être étudiés aux tensions plus classiques de 100 kV. L'étude de la visibilité des signaux caractéristiques d'excitation de niveaux atomiques profonds exploités pour l'analyse met bien en évidence cet avantage (1). Elle montre, en particulier, que le contraste de ce signal par rapport au fond continu auquel il se superpose, varie en raison inverse du paramètre t/λ , épaisseur t de l'échantillon mesurée en unité de libre parcours moyen λ du processus de diffusion inélastique principal dans l'échantillon. λ correspond en général au processus de diffusion par plasmons. Il est multiplié par un facteur de l'ordre de 3 entre 100 et 1000 kV (2,3). Il faut s'attendre à un rapport du même ordre entre les épaisseurs des coupes qui peuvent être exploitées à 1000 et 100 kV. L'épaisseur des coupes de préparations biologiques qui peuvent être analysées à 1000 kV par cette méthode, est de l'ordre de 250 nm. Les effets de diffusions multiples dans l'échantillon font qu'au delà de 500 nm, les spectres ne sont plus utilisables pour l'analyse.

Le mode de variation du contraste des distributions caractéristiques en fonction de t/λ permet aussi de conclure à une amélioration de la visibilité des raies pour un même échantillon, observé dans des conditions comparables lorsque la tension accélératrice des électrons primaires augmente. Ainsi la valeur limite des pertes d'énergie utilisables devient plus grande. A 1000 kV, elle atteint 3000 eV.

La technique a été utilisée pour la détection de divers types d'éléments, de numéros atomiques aussi différents que l'aluminium ($Z = 13$) et l'uranium ($Z = 92$), dans des coupes de différents tissus. Elle a été appliquée à la caractérisation de microparticules intracellulaires en général constituées d'amas de fins granules dont la taille est de l'ordre de 10 nm. Les coupes étudiées étaient d'une épaisseur de l'ordre de 200 nm. La partie de l'échantillon sélectionnée pour l'analyse correspondait à une aire de l'objet de 100 à 200 nm de diamètre.

I - DETECTION DE L'ALUMINIUM DANS DES COUPES DE MACROPHAGES ALVEOLAIRES (4)

L'observation en microscopie électronique classique de coupes de macrophages alvéolaires fait apparaître des inclusions intracellulaires de nature lysosomiale de quelques nm de diamètre (Fig. 1 A). Le spectre de pertes d'énergie associé à cette partie de l'image permet de mettre en évidence la présence d'aluminium par la distribution caractéristique d'excitation du niveau K dont le seuil apparaît dans le spectre à 1540 eV (Fig 1 B). Le spectre montre également que, dans les inclusions, l'aluminium est associé à du phosphore (seuil K à 2150 eV) et à de l'oxygène (seuil K à 530 eV).

II - MISE EN EVIDENCE DU GALLIUM (5)

La répartition du gallium dans les cellules rénales a été recherchée dans les lysosomes de cellules tubulaires. Cet élément apparaît également sous forme d'amas de fins granules (Fig. 2A) et se caractérise dans le spectre par la distribution L_{23} dont le seuil apparaît à 1140 eV. Il est aussi associé à du phosphore et à de l'oxygène (Fig 2B).

III - CARACTERISATION DU NICKEL (6)

La membrane de cellules tumorales en culture est soulignée par une précipitation dense (Fig. 3 A). L'analyse par pertes d'énergie d'électrons a permis de montrer que cette structure correspond à une forte concentration en nickel - mis en évidence par son seuil L_{23} à 810 eV - associé à de l'oxygène, (Fig. 3 B).

IV - CARACTERISATION DE L'URANIUM (7)

Les images de lysosomes de cellules tubulaires rénales font apparaître des amas de fines aiguilles (Fig. 4 A). La nature chimique de ces amas, essentiellement constitués d'uranium, a pu être confirmée par le spectre des pertes d'énergie. L'uranium est caractérisé par deux distributions - la distribution N_{45} à 730 eV et la distribution N_{23} à 1045 eV, (Fig. 4 B).

V - CONCLUSION

Nous avons donc tenté de préciser grâce à la spectrométrie des pertes d'énergie d'électrons utilisée à haute tension, la nature des inclusions submicroscopiques intracellulaires contenant des éléments minéraux très divers (Al, Ni, Ga, U) dans les différents tissus de mammifères (rein, poumon, cellules tumorales) ayant donné lieu à des protocoles expérimentaux très différents. Dans tous les cas étudiés, les éléments minéraux ont été mis en évidence, parfois associés à d'autres éléments confirmant un mécanisme de concentration et de précipitation dans les inclusions intracellulaires. La mise en évidence de très nombreux éléments de la classification périodique offre donc de nouvelles perspectives dans l'étude des tissus biologiques. Dans le cas de cette étude, les données fournies par cette méthode de microanalyse apportent de nouvelles connaissances dans le domaine de la pathologie cellulaire.

REFERENCES

- (1) ZANCHI G., KIHN Y., SEVELY J., JOUFFREY B., Proc. 7th Inter. Conference on High Voltage Electron Microscopy, Berkeley (1983) 85.
- SEVELY J., KIHN Y., ZANCHI G., JOUFFREY B., these Proceedings.
- (2) MISELL D.L., CRICK R.A., J. Phys. C 2 (1969) 2290.
- (3) SEVELY J., PEREZ J.Ph., JOUFFREY B., Proc 3rd Intern. Conference on High Voltage Electron Microscopy, Oxford (1974) 32.
- (4) BERRY J.P., HENOC P., GALLE P., PARIENTE R., J. Microsc. 17 (1973) 11.
- (5) BERRY J.P., GALLE S., ESCAIG F., these Proceedings.
- (6) BERRY J.P., POUPON M.F., POT-DEPRUN J., Le Nickel dans l'environnement humain, Lyon, Mars 1983.
- (7) GALLE P., J; Microsc. 19 (1974) 87.

Fig. 1 : A - Image en champ clair à 100 kV de coupe de macrophages alvéolaires présentant des inclusions intracellulaires.

B - Spectre des pertes d'énergie associé à une de ces inclusions dans la zone des pertes 400 - 2500 eV - mise en évidence des seuils de l'oxygène, de l'aluminium et du phosphore.

Fig. 2 : A - Image en champ clair à 100 kV d'amas de granules observés dans le lysosome de cellules tubulaires rénales.

B - Spectre des pertes d'énergie associé à cette zone - mise en évidence de l'oxygène, du gallium et du phosphore.

Fig. 3 : A - Image en champ clair à 100 kV d'une portion de cellule tumorale. La membrane de la cellule apparaît en noir.

B - Spectre de pertes d'énergie à 1 MV sur une portion de l'image contenant la membrane dans la bande de pertes d'énergie 400 - 1400 eV - mise en évidence de l'oxygène et du nickel.

Fig. 4 : A - Image en champ clair à 100 kV d'amas d'aiguilles à analyser dans des coupes de lysosomes de cellules tubulaires.

B - Spectre de pertes d'énergie obtenu à 1 MV sur une portion de l'image dans la fenêtre des pertes 600 - 2400 eV - mise en évidence des seuils N_{23} et N_{45} de l'uranium.