Microscopie et microtomographie X : application en biologie

H. Elhila, A. Zolfaghari, J. Cazaux, J. Audran, D. Mouze

► To cite this version:

H. Elhila, A. Zolfaghari, J. Cazaux, J. Audran, D. Mouze. Microscopie et microtomographie X : application en biologie. Journal de Physique IV Proceedings, 1996, 06 (C4), pp.C4-739-C4-745. 10.1051/jp4:1996471 . jpa-00254354

HAL Id: jpa-00254354

<https://hal.science/jpa-00254354>

Submitted on 1 Jan 1996

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.

Microscopie et microtomographie X : application en biologie

H. Elhila, A. Zolfaghari, J. Cazaux, J.C. Audran* et D. Mouze

Laboratoire d'Analyse des Solides Surfaces et Interfaces, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, BP. 1039, 51687 Reims, France

** Laboratoire de Biologie et Physiologie Végétale, Université de Reims Champagne Ardenne, UFR Sciences, BP. 1039, 51687 Reims, France*

Résumé : La microscopie X par projection peut être d'un grand intérêt dans le domaine de la biologie. Un microscope à projection X a été réalisé dans notre laboratoire, au moyen d'un microscope électronique à balayage, légèrement modifié. Nous présentons, comme exemple d'application, des microradiographies de tissus calcifiés. Une microradiographie simple suffit souvent à donner des informations sur l'objet étudié. Mais dans le cas d'objets trop épais une microtomographie devient indispensable. Un porte objet tournant nous permet de procéder à la tomographie. La reconstruction de l'objet se fait avec une résolution d'environ 10 μm . L'application présentée ici concerne l'étude de bourgeons de vignes aux différents stades de leur évolution. L'échantillon n'a subi aucune préparation, excepté une déshydratation à l'air. Des sections longitudinales ou transversales de l'objet peuvent être ainsi obtenues d'une manière non-destructive. Ceci est illustré par une tomographie des deux stades extrêmes de maturité du bourgeon. Ces résultats montrent les potentialités que peut offrir la microscopie et la microtomographie X aux biologistes.

Abstract : X-ray shadow projection microscopy can bring valuable results in the field of biology. An X-ray projection microscope implemented in a SEM has been developed in our laboratory. As an example, microradiographs of calcified tissue are shown. A rotating sample stage allows computer X-ray tomography to be done at a resolution of 10 μm . This technique overcomes the inherent difficulty of: microradiography, that all details are superimposed. The applications presented here concerns the study of vine buds at different stages of their maturity. The samples do not need to be fixed or stained. Only dehydration is required. Longitudinal and transverse cross-sections through the sample, can be determined non-destructively. To illustrate the capabilities of the technique, we present here two buds at stage 1 and 5. These results show the advantages that X ray microscopy and microtomography can offer to biologists.

1. INTRODUCTION

Une microradiographie est une projection bidimensionnelle d'un objet tridimensionnel. L'image obtenue, représente une fonction de l'objet intégrée sur son épaisseur, tout au long de la

traversée des rayons X dans cet objet. Ces images intégrées suffisent dans de nombreuses applications à donner une vue d'ensemble de la structure interne de l'échantillon. Mais si l'échantillon a une épaisseur importante et contient des informations internes réparties d'une façon non uniforme, celles-ci se chevauchent dans le plan d'observation et l'interprétation devient alors difficile. Dans ce cas, on ne peut se contenter d'une image bidimensionnelle, et il devient nécessaire de restituer la troisième dimension de l'objet. C'est le but de la microtomographie X.

La méthode conventionnelle utilisée par les biologistes, pour explorer l'intérieur d'un objet, consiste à faire des coupes successives qu'on observe en suite à l'aide d'un microscope optique ou électronique. L'échantillon est alors, irrécupérable pour d'ultérieures observations. Ce procédé demande un temps considérable, de plus les structures internes peuvent subir des altérations. A l'opposé de ces méthodes destructrices, nous présentons la microtomographie X comme un moyen non destructif pour l'étude de certains objets biologiques. L'application présentée concerne le domaine de la botanique.

L'appareil utilisé ici est un microscope X de laboratoire. Il présente l'avantage par rapport aux autres microscopes X utilisant une radiation synchrotron d'avoir un faible encombrement et un coût minime. De plus il est utilisable dans un assez large domaine énergétique (1 à 20 keV).

Cet appareil est également utilisé pour d'autres applications [1], [2].

2. INSTRUMENT.

L'instrument a déjà été décrit dans de nombreux articles [1]. Il s'agit d'un microscope X par projection mis en oeuvre à partir d'un microscope électronique à balayage. La source X est obtenue en bombardant une feuille métallique par le faisceau d'électrons. Le faisceau divergent de rayons X, ainsi obtenu, forme une ombre de l'objet. Celle-ci est projetée sur un écran phosphore (Y_2O_3), convertissant les photons X en photons visibles. Les distances source-objet et objet-détecteur définissent le grandissement géométrique, qui peut varier de 1 à 100. L'écran phosphore est déposé sur une galette de fibres optiques connectée à une caméra C.C.D..

L'objet se trouve dans la colonne du M.E.B.. Pour étudier un échantillon humide, il faut donc procéder à sa déshydratation. Néanmoins, une cellule étanche peut permettre l'étude de tels objets.

Le principe de la tomographie est basé sur l'acquisition d'une série d'images à différents angles de vue; aussi avons-nous équipé notre appareil d'un porte-objet tournant. La rotation se fait à l'aide d'un moteur pas à pas, permettant une rotation complète de l'objet ($0^\circ - 360^\circ$) avec un pas de 1.8° .

Avant de procéder à la reconstruction, toutes les projections subissent un traitement simple. Celui-ci consiste en une compression logarithmique du rapport de l'image d'éclairement (en l'absence de l'objet) à l'image de projection, ces deux dernières images étant, au préalable, corrigées par l'image d'obscurité. Ce traitement nous permet d'avoir pour chacun des pixels l'atténuation des rayons X lors de leur traversée dans l'échantillon ou la distribution μt ($\text{Log } I_0/I = \int \mu dt$). Toutes ces données sont envoyées, en vue de la reconstruction, vers une station de travail SUN, via le réseau Ethernet. A cause de la géométrie conique de notre système et des contraintes associées, une méthode algébrique itérative de reconstruction a été adoptée [3].

3. MICROSCOPIE X

L'énergie moyenne des rayons X produits convient particulièrement à l'examen de tissus biologiques denses tels que les tissus calcifiés. Il s'agit essentiellement de composés d'hydroxyapatite, de formule moléculaire $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ constituant majoritaire du squelette et des dents.

La figure 1. donne une illustration de microradiographies d'os spongieux, acquises à différents grossissements (temps d'exposition 120 s). On y constate que ce type d'os est composé d'un réseau de travées osseuses séparées les unes des autres par un labyrinthe d'espaces contenant la moelle osseuse. Les travées sont constituées de lamelles osseuses irrégulières. Les zones les plus sombres représentent une forte absorption des rayons X. L'épaisseur des coupes est de $10\text{ }\mu\text{m}$. L'échantillon a été déshydraté, puis inclus dans du méthacrylate de méthyle. La radiation qui permet d'obtenir un contraste optimal pour un tel échantillon est d'environ 1.5 keV . Nous avons donc utilisé une anticathode d'aluminium ($\text{Al}_{K\alpha} = 1.5\text{ keV}$). L'énergie primaire était de 15 keV . $\text{Cu}_{K\alpha}$

Figure 1. - Microradiographies de tissu osseux à différents grossissements
- Bone tissue taken at various magnification

4. MICROTOMOGRAPHIE X

En collaboration avec nos collègues de biologie végétale, nous avons étudié les stades d'évolution d'un bourgeon de vigne [4]. La tomographie X est illustrée ici, pour les deux stades extrêmes (stade 1 et stade 5). Au stade 1 le bourgeon est entièrement recouvert de bourre et d'écaillés. Ces derniers disparaissent, quand le bourgeon est bien développé, et les premières feuilles apparaissent (stade 5). Pour unique préparation, les deux échantillon ont été séchés à la température ambiante.

Pour chacun des objets, cent projections, correspondant à une rotation complète, ont été acquises avec un incrément angulaire de 3.6° . Le grandissement géométrique est choisi, de façon à ce que l'objet occupe tout le champ de la caméra. Pour le bourgeon au stade 1, le grandissement géométrique était de 17. Le bourgeon au stade 5 étant plus volumineux, le grandissement a été réduit à 2. La cible adéquate pour l'examen du stade 1 est le vanadium ($V_{K\alpha} \approx 5 \text{ keV}$). Le temps d'acquisition d'une projection était de 15 s. Pour le bourgeon au stade 5 il a fallu utiliser une énergie plus dure. Nous avons donc choisi une anticathode de cuivre ($Cu_{K\alpha} \approx 8 \text{ keV}$), avec un temps d'acquisition de 7s.

Deux images μT du bourgeon au stade 1, à des vues angulaires arbitraires sont représentées dans la figure 2.a.. Les zones les plus claires représentent les régions les plus absorbantes. Les points blancs sont dus à des précipités d'oxalate de calcium [5]. Pour la reconstruction du bourgeon au stade 1, un volume de 1 mm^3 contenant 180^3 voxels, a été choisi. Une section longitudinale résultant de la reconstruction est présentée (figure 2.b.). La dimension des points les plus clairs, attribués à l'oxalate de calcium, est de 10 à $25 \mu\text{m}$.

Nous présentons aussi quatre projections du bourgeon au stade 5, prises à différents angles de vue (fig. 3). Ce bourgeon a été reconstruit dans un volume de 5 mm^3 contenant 180^3 voxels. En haut de la figure 4 on peut voir une vue tridimensionnelle du bourgeon au stade 5. Au centre de cette figure, nous avons représenté deux sections longitudinales, une se situant au delà de l'axe embryonnaire (a), et l'autre le traversant (b). Sur la partie inférieure de la figure, nous avons représenté deux coupes transversales, la première passe dans la zone basale (c), et montre le début des premières feuilles, la deuxième passe le long de la zone sub-apicale et montre une partie de l'inflorescence (d).

CONCLUSION

Le pouvoir pénétrant des rayons X, et la forte dépendance de l'absorption à la nature chimique ou à la densité du matériau traversé explique l'impact de la microscopie X dans le domaine de la biologie. Le gros avantage de la microtomographie X est de permettre l'étude de la structure interne d'un objet épais, tout en préservant son intégrité. Ces deux techniques peuvent être mises en oeuvre au laboratoire moyennant un appareillage simple et peu coûteux.

Références

- [1] S. Rondot et J. Cazaux, "Progrès récents en microscopie X analytique", (ce volume).
- [2] D. Erre, H. Jibaoui et J. Cazaux, "Prémices d'une imagerie 2D de surface et interfaces par réflexion totale des rayons X et diffraction en faisceau divergent", (ce volume).
- [3] A. Zolfaghari - "Reconstruction tridimensionnelle en géométrie conique à l'aide d'un algorithme itératif (ART). Exemples d'application en microtomographie X", Thèse de doctorat, Université de Reims (1994)
- [3] H. Elhila et al., "X-ray microtomography : Application to a biological imaging", à paraître dans Bioimaging 3 (1995).
- [4] J. Salmon - "Contribution à la microradiographie en biologie végétale", X-ray microscopy and X-ray microanalysis", Eds.: A. Engström, V. Cosslett, H. Pattee, (1960) p. 311 - 316

a)

170 μm

b)

170 μm

Figure 2. - bourgeon de vigne au stade 1, a) images μt b) section reconstruite.
- vine bud at stage 1, a) μt distribution images, b) reconstructed cross-section

165.eps

—
600 μm

Figure 3. - images μt d'un bourgeon de vigne au stade 5
- μt images of the bud at stage 5

—
0.8 mm

Figure 4. - La Reconstruction du bourgeon au stade 5
- The reconstructed bud at stage 5.