

ÉTUDE DE LA POSSIBILITÉ D'ANALYSE 3D EN IMAGERIE BIOLOGIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE TOF-SIMS AVEC L'AIDE D'UN FAISCEAU D'IONS FULLERÈNES

Alain Brunelle, Delphine Debois, Olivier Laprèvote

Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Gif-sur-Yvette, France

Contexte:

L'imagerie biologique par spectrométrie de masse connaît depuis quelques années un grand essor. La spectrométrie de masse TOF-SIMS, avec l'augmentation récente de sa sensibilité grâce à l'apport des nouvelles sources d'agrégats de bismuth, permet aujourd'hui de cartographier lipides et métabolites à la surface de coupes de tissus avec une résolution spatiale de l'ordre du micron [1,2].

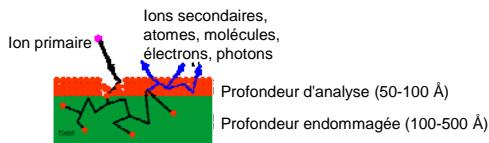
L'analyse en 3 dimensions existe depuis longtemps pour des matériaux non organiques, mais reste un challenge pour ce qui concerne les cellules ou les coupes de tissus, bien que des études récentes tentent d'en démontrer la faisabilité sur des matériaux modèles [3]. Le principe consiste à creuser ("pulvériser") la surface de l'échantillon couche après couche, afin de donner accès, au moyen d'analyses intercalées entre chaque pulvérisation, à une cartographie en trois dimensions. Cependant, les faisceaux jusqu'à présent utilisés pour la pulvérisation produisaient en deçà de l'épaisseur ablatée un endommagement des couches sous-jacentes tel que toutes les molécules organiques présentes étaient détruites et qu'aucune analyse organique en profondeur n'était possible.

Un faisceau d'ions fullerènes C_{60}^+ à une énergie de 10 keV est très efficace pour pulvériser une surface. De plus les fragments du projectile ne pénètrent que très peu en deçà de l'épaisseur pulvérisée. Une analyse en profondeur a donc été tentée directement sur une coupe de cerveau de rat, en utilisant un faisceau de C_{60} pour la pulvérisation, et un faisceau d'agrégats de bismuth pour l'analyse.

Définitions:

En SIMS, les projectiles (ions primaires) pénètrent sur seulement quelques centaines d'Ångströms. Ils *endommagent* la matière sur toute cette profondeur, car ils se *ralentissent* par des successions de *collisions élastiques* avec des atomes de l'échantillon, lesquels sont *déplacés* et des molécules sont donc détruites.

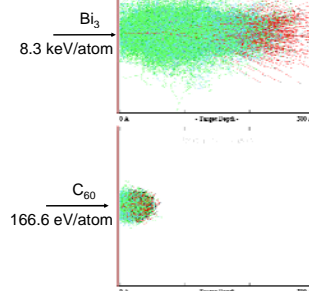
Les ions secondaires ne proviennent seulement que des premiers 50-100 Å.



Simulations:

Simulations en utilisant le logiciel SRIM (www.srim.org) de la pénétration d'un ion bismuth, élément de Bi_3 , et d'un ion carbone, élément de C_{60}^+ , dans du tissu adipeux.

Un ion fullerène, qui est très efficace pour pulvériser la matière, pénètre beaucoup moins profondément dans la matière qu'un ion bismuth, et donc l'endommagement beaucoup moins en deçà de la surface.

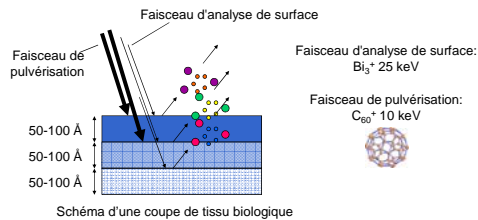


	C_{60}	Bi_3
Energie/atome (eV)	166,6	8333
Energie (keV)	10	25
(dE/dx) (eV/Å)	485	229
Parcours projeté (Å)	22	212

Concept:

Analyse en profondeur en utilisant deux faisceaux d'ions:

1. Un faisceau de C_{60} pour pulvériser avec un endommagement limité
2. Un faisceau de Bi_3^+ pour analyser efficacement



Matériel et méthodes:

Expériences réalisées avec un spectromètre de masse par temps de vol TOF-SIMS IV (Ion-Tof GmbH, Münster, Allemagne), localisé dans la société Tascon GmbH (Münster, Allemagne) et équipé de deux sources d'ions:

- Une source d'ions à pointe liquide munie d'un émetteur de bismuth. Les ions Bi_3^+ sont sélectionnés
- Une source d'ions fullerènes, pour laquelle les ions C_{60}^+ sont sélectionnés.

Les expériences sont réalisées comme suit:

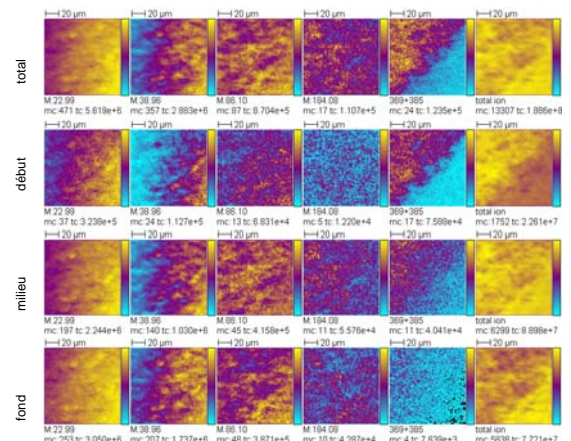
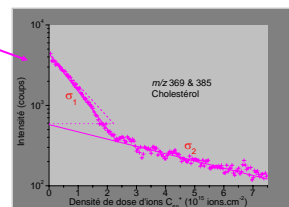
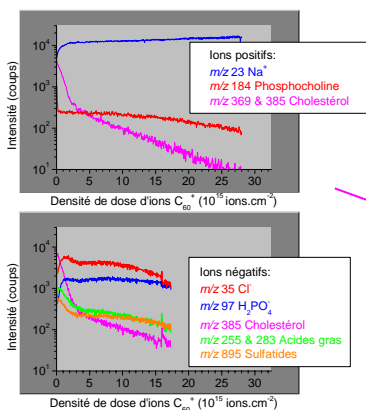
- Irradiations de 1 sec par C_{60}^+ 10 keV (2nA) sur $300 \times 300 \mu m^2$; 2.8×10^{13} ions.cm⁻² à chaque point,
- Suivies par des analyses par Bi_3^+ 25 keV (0.1 pA à 200 µsec) sur $110 \times 110 \mu m^2$, 1.5×10^{10} ions.cm⁻² à chaque point d'analyse.

La dose totale d'ions C_{60}^+ atteint quelques 10^{16} ions.cm⁻².

Irradiation en bordure du *corps calleux* à la surface d'une coupe de cerveau de rat déposée sur une plaque en inox.

L'épaisseur pulvérisée est mesurée après l'irradiation avec l'aide d'un profilomètre KLA Tencor (Surface Profilometer - Alpha Step 500, précision ~1.5 %).

Résultats expérimentaux:



Images ioniques totale (somme tout au long de l'irradiation), et enregistrées successivement au début, au milieu et à la fin de l'irradiation.

C_{60} comme sonde pour une analyse en profondeur ?

Malgré une section efficace d'endommagement plus faible qu'avec un ion tel que des agrégats de bismuth, et malgré une profondeur de pénétration beaucoup plus faible que ce dernier (22 Å au lieu de 212 Å), l'endommagement de l'échantillon reste important et les rendements de désorption-ionisation diminuent fortement.

Deux régimes semblent exister: au début, jusqu'à une dose de 2.8×10^{15} ions.cm⁻², les rendements décroissent ~10 fois plus vite qu'au delà de cette valeur frontrière. Il semble donc qu'un certain nombre de lipides aient pu être concentrés à la surface, et qu'en dessous de cette épaisseur, les rendements sont trop faibles pour donner des images suffisamment contrastées. La profondeur creusée étant estimée à 2-3 µm, la profondeur de cette couche de surface est estimée à 200-300 nm.

Conclusion:

Contrairement aux résultats publiés sur des matériaux modèles [3], il s'avère que l'endommagement de l'échantillon restant important d'une part, et que de nombreux lipides étant concentrés à la surface d'autre part, l'analyse en profondeur sur une coupe de tissu reste délicate.

Références:

- [1] Brunelle, A.; Touboul, D.; Laprèvote, O. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40*, 985-999
- [2] Touboul, D.; Kollmer, F.; Niehuis, E.; Brunelle, A.; Laprèvote, O. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 1608,1618
- [3] Cheng, J.; Winograd, N. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 3651-3659