

## NanoSIMS et Biologie

Jean-Luc Guerquin-Kern, Ting-Di Wu, Alain Croisy  
INSERM U759/Institut Curie Recherche, Lab. de Microscopie Ionique, 91405 Orsay Cedex.  
*Courriel : Jean-Luc.Guerquin-Kern@curie.u-psud.fr*

Les techniques SIMS, basées sur l'émission de particules secondaires provenant de la surface d'un échantillon solide bombardée par un faisceau d'ions primaires, permettent une analyse chimique locale de l'échantillon. Très répandues dans les domaines des Sciences des Matériaux et des Sciences de la Terre, ces techniques restent en revanche encore mal connues et peu utilisées dans le domaine des Sciences du Vivant. Ce domaine offre toutefois un fort potentiel d'applications pour l'identification, la localisation et la quantification intracellulaires d'éléments chimiques.

La compréhension des systèmes biologiques dépend en effet de plus en plus des possibilités d'identifier, de quantifier et de localiser avec une bonne résolution les molécules dans leur contexte cellulaire. Les techniques d'imagerie sub-cellulaire ont été longtemps restreintes aux techniques basées sur les phénomènes d'immunomarquage et notamment celles utilisant des sondes fluorescentes. Bien que très sensibles, ces méthodes requièrent des sondes volumineuses qui, s'associant aux molécules d'intérêt, peuvent en modifier significativement les propriétés chimiques et physiques et affecter le transport et la distribution des molécules ainsi marquées. Malgré cela, ces méthodes d'imagerie de type fluorescence ou « immunogold » s'avèrent tout à fait performantes et sont largement utilisées pour la localisation de protéines mais elles échouent en revanche dans la détection de certaines molécules comme notamment les lipides, puisqu'il n'y a pas pour l'instant de sondes spécifiques pour la plupart des molécules de ce type.

Les techniques SIMS, statiques et dynamiques, peuvent représenter des méthodes alternatives plus universelles pour identifier et cartographier les différentes molécules d'intérêt (protéines, lipides ou drogues) contournant ainsi les problèmes et les limitations associés aux complexes des sondes fluorescentes. L'imagerie SIMS a été considérée à ses débuts comme une méthode marginale pour les sciences de la vie en raison notamment du pouvoir de séparation qui était associé à cette technique. Cependant les progrès réalisés dans les dernières générations d'appareils offrent des performances qui permettent à présent des applications en biologie cellulaire, en pharmacologie à des niveaux de résolution sub-cellulaire auparavant inaccessibles.

Le SIMS statique [2] utilise un bombardement primaire dont les doses sont inférieures à  $10^{13}$  ions par  $\text{cm}^2$ , limitant ainsi le phénomène de fragmentation et permettant, par spectrométrie de masse, une analyse chimique de molécules organiques dans leur état quasi-initial. Cette technique permet de détecter des molécules sans aucun type de marquage. Cependant la diversité des molécules et des fragments ioniques émis, rend les analyses particulièrement complexes et entraîne une limitation pour la résolution spatiale.

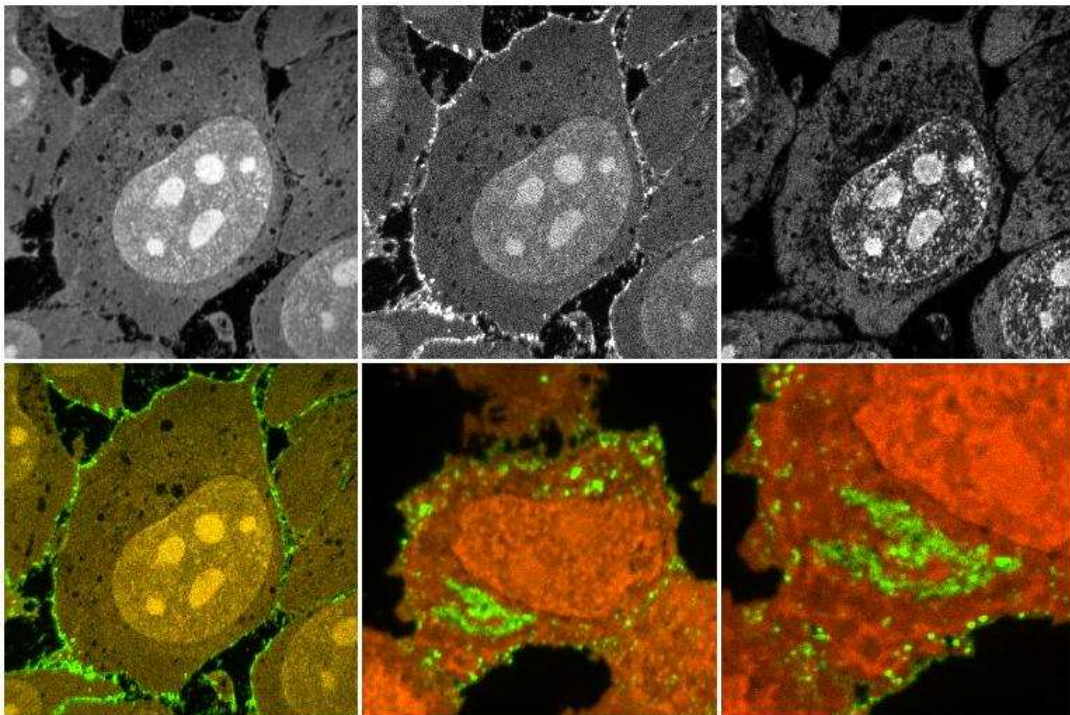
En revanche, avec des doses d'ions primaires supérieures à  $10^{16}$  ions par  $\text{cm}^2$ , provoquant une fragmentation importante des molécules ainsi bombardées, le SIMS dynamique [1] fournit exclusivement des informations sur les éléments et en ce sens se rapproche des techniques de micro analyse réalisées par microscopie électronique. Pour identifier une molécule spécifique, il faudra donc que cette molécule possède des atomes qui ne soient pas naturellement présents ou alors à faible concentration dans le milieu environnant. Ces éléments rares peuvent être introduits dans les molécules en substituant un ou plusieurs atomes par un isotope. Pour les molécules biologiques l'enrichissement se fait essentiellement

par l'intermédiaire des isotopes stables de  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  et  $^2\text{H}$ , mais des éléments exogènes (I, Br, Pt, As ...) peuvent être utilisés comme marqueur.

Les échantillons doivent être préparé avant analyse et les techniques de préparation, incluant la fixation (chimique ou cryo), la déshydratation et l'inclusion dans une résine, sont en de nombreux points similaires à celles utilisées en microscopie électronique. Cependant, comme pour toutes les méthodes de microanalyse, il est essentiel, hormis la préservation de la morphologie, de porter un soin particulier à la préservation de la distribution des éléments chimiques dans l'échantillon.

Le NanoSIMS-50 correspond à la dernière génération des microsondes ioniques fonctionnant sur un processus d'émission dynamique [3]. Cet instrument est équipé d'un système multi détection permettant les cartographies simultanées de cinq éléments avec une résolution spatiale d'environ 100nm. Dans notre groupe, cette microsonde est principalement utilisée pour des études d'échantillons biologiques au niveau sub-cellulaire recouvrant trois axes principaux d'application [5]: i) l'analyse élémentaire ii) la pharmacologie, et iii) l'analyse isotopique.

L'analyse élémentaire correspond à l'étude de la distribution cellulaire d'un élément (Fe, Ca, ...) qui nous permet de réaliser notamment des études de bio minéralisation au niveau de zones cérébrales dans des cas de maladies neurologiques [6] ou dans des cultures de cellules pour localiser les premières phases de bio minéralisation. Au niveau pharmacologique, le ciblage de molécules à visée diagnostique et thérapeutique est étudié comme par exemple celui des molécules la famille des iodobenzamides qui viennent se fixer sur la mélanine dans des colonies pulmonaires de mélanome B16 [4] ou de vecteur comme la sous-unité B de la toxine de Shiga (STxB) [7] qui a permis notamment de visualiser les phases d'adhésion et d'internalisation de vecteur potentiel marquée au  $^{15}\text{N}$  (cf figure). Enfin, la caractéristique tout à fait spécifique de cette technique est soulignée par les analyses isotopiques permettant d'étudier la distribution rapide des isotopes de l'iode dans la thyroïde ou d'identifier des organismes comme des bactéries et de caractériser leurs spécificités fonctionnelles pour optimiser le traitement des déchets dans des «décharges- bio réacteur».



Internalisation de la STxB marquée au  $^{15}\text{N}$  dans des cellules HeLa en culture. (a-d) t=0 minutes (adhésion de STXb sur les récepteurs membranaires), 40  $\mu\text{m}$  (e) t=40 minutes internalisation de la STxB), 40  $\mu\text{m}$  (f) t=40 minutes, 20  $\mu\text{m}$ .

(W. Römer, T-D Wu, et al, Appl. Surf. Sci, 252, (2006), 6925-6930).

Ces résultats montrent les potentialités de cette technique de microanalyse permettant une détection de la plupart des éléments et de leurs isotopes et soulignent la complémentarité qu'il peut y avoir avec d'autres méthodes d'analyse comme le TOF-SIMS, le PIXE, l'EDX, EELS .....

#### Références :

- [1]R. Castaing, G. Slodzian, Microanalyse par émission ionique secondaire, J. Microsc. 1, (1962) 395-410
- [2]A. Benninghoven, Surface investigation of solids by the statical method of secondary ion mass spectroscopy (SIMS), Surf. Sci. 35, (1973) 427-437.
- [3]G.Slodzian, B. Daigne, F. Girard, F. Boust, F. Hillion, Cartographie parallèle de plusieurs éléments ou isotopes par balayage avec une sonde ionique submicronique : premiers résultats, C.R.Acad.Sc. **311**(série II), (1990) 57-64
- [4]J.L. Guerquin-Kern, F. Hillion, J.C. Madelmont, P. Labarre, J. Papon, A. Croisy, Ultra-structural cell distribution of the melanoma marker iodobenzamide : improved potentiality of SIMS imaging in life sciences, Biomed. Eng. on line, **3**, (2004), 10 (1-7).
- [5]J.L. Guerquin-Kern, T.D. Wu, C. Quintana, A. Croisy, Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy), BBA, 1724, (2005), 228-238.
- [6]C. Quintana, S. Bellefqih, JY Laval, C. Patiño, R. Arranz, J. Avila, I. Ferrer, J.L. Guerquin-Kern, T-D Wu, Study of the localization of iron, ferritin and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at subcellular level, J. Struc. Biol., 153, (2006), 42-54.
- [7]W. Römer, T-D Wu, P. Duchambon, M. Amessou, D. Carrez, L. Johannes, J-L Guerquin-Kern, Sub-cellular localization of a  $^{15}\text{N}$ -labelled peptide vector using NanoSIMS imaging, Appl. Surf. Sci., 252, (2006), 6925-6930.