

Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d' « émission ionique secondaire »

PAR

P. GALLE

*Centre de Recherches sur l'Insuffisance Rénale, Professeur J. Hamburger
Hôpital Necker, Paris*

et

*Laboratoire de physique du solide, Professeur R. Castaing
Faculté des Sciences de Paris, Centre d'Orsay*

RÉSUMÉ

La méthode de microanalyse par émission ionique secondaire permet d'obtenir, à partir d'une coupe histologique, des images agrandies trois cents fois environ. Chacune des images obtenues représente la distribution à la surface de la coupe des particules élémentaires recherchées.

On peut ainsi obtenir successivement la cartographie de tous les éléments de la classification périodique présents dans une coupe histologique avec une précision topographique de l'ordre de grandeur du micron. Cette cartographie est obtenue sans qu'il soit besoin de recourir à un quelconque artifice de balayage électronique ou mécanique. Seules sont exploitées ici les possibilités offertes actuellement par l'optique corpusculaire : une première optique utilisant les principes de la microscopie ionique à émission est utilisée pour former l'image, une deuxième optique utilisant les principes de la spectographie de masse est utilisée pour sélectionner dans le faisceau transportant l'image les seuls ions ayant la charge spécifique recherchée.

Cette méthode d'analyse élémentaire locale offre en biologie des possibilités entièrement nouvelles qui tiennent surtout :

- 1° à sa très haute sensibilité : 10^{-20} gramme de sodium (soit 300 atomes environ) peuvent être décelés sous une surface de 1 micron carré, et
- 2° au fait qu'elle permet d'analyser séparément les différents isotopes stables ou non d'un même élément présent localement dans une cellule donnée.

SUMMARY

Castaing's and Slodzian's Secondary Ion Emission Micro-analyser offers the biologist new possibilities due 1°) to its very high sensitivity and 2°) to the fact that it allows separate measurements of isotopes. These possibilities are particularly interesting for the study of the distribution of diffusible ions existing in biological tissues.

The secondary ion emission of sodium and potassium has been studied from a sample of renal tissue and a smear of human red blood cells. The renal tissue has been frozen « in vivo » by means of isopentane cooled with liquid nitrogen; sections three microns thick have been cut with a freezing microtome, placed on a carefully polished stainless steel support and dryfrozen. The blood smear has also been placed on a stainless steel support.

In the renal tissue, four different parts are observed: 1°) extra-cellular space (lumen of tubules and interstitial space), 2°) nucleus, 3°) Cytoplasm and 4°) arteriolar Wall.

The extra-cellular space appears very bright from the beginning of the analysis; this light however decreases within ten seconds. As soon as this light has disappeared, the intracellular space can be clearly seen: the nuclei then appear as very bright limited areas surrounded by less luminous areas which represent the cytoplasm. The cytoplasm remains then the only luminous part of the cell, and will remain thus for another ten minutes. Thus, the desintegration speed of the different areas in the tissues varies greatly; therefore, brightness cannot be considered as a criterion for assessing the local concentration of a given element; in order to measure the concentration in a selected area, it is necessary to integrate the total number of electrons incident throughout the whole process of desintegration.

A study of the emission of sodium from a red blood cells smear shows that, in the first phase, the areas corresponding to plasma appear very bright whereas those corresponding to cytoplasm are darker. After three minutes, the plasma picture vanishes and only the cells can be seen; complete disintegration of these cells has taken place within about fifteen minutes.

Taking into consideration that the sodium concentration in a red blood cell is about $3 \cdot 10^{-16}$ gram per cubic micron, that the average thickness of a cell is 1 micron, and that the disintegration time is about 900 seconds, it can be calculated that, for a surface of 1 square micron, a disintegration of 3.3×10^{-19} gram of Na per second takes place; the necessary exposure for a photographic picture is 0.03 sec.: thus a very small amount, i.e. as small as $3.3 \times 10^{-19} \times 0.03 = 10^{-20}$ gram of sodium (around 300 atoms), is enough to produce a significant picture.

INTRODUCTION

On dispose actuellement d'un certain nombre de méthodes permettant de déterminer à l'échelon microscopique ou submicroscopique la composition chimique de très petits volumes de matière contenus dans une cellule ; parmi celles-ci, on peut distinguer les méthodes chimiques et les méthodes physiques.

Les méthodes cytochimiques classiques se proposent de mettre en évidence les molécules présentes au sein d'une cellule, avec un corps chimique susceptible de réagir électivement avec les molécules recherchées. Secondairement, le petit volume intracellulaire dans lequel la réaction a eu lieu est, si besoin est, « révélé » par un corps repérable par le système de visualisation utilisé : corps coloré pour la microscopie optique ; corps dense de poids atomique élevé si on utilise un microscope électronique. Ces méthodes ont été de très loin les plus utilisées jusqu'à présent, mais elles n'ont pu résoudre certains problèmes fondamentaux pour deux raisons principales : elles ne permettent pas l'analyse élémentaire et elles ne sont pas quantitatives.

L'intérêt des méthodes physiques est apparu plus récemment. On peut actuellement, grâce à la microanalyse par sonde électronique bombarder un très petit volume intracellulaire (inférieur au micron cube) avec un faisceau d'électrons extrêmement délié ; le volume bombardé joue le rôle d'antithode : on peut déduire de l'analyse spectrale des raies caractéristiques X émises la composition chimique élémentaire de ce volume et éventuellement doser les éléments présents. La sensibilité est de l'ordre de 10^{-16} gramme. Cette quantité de matière peut paraître très faible, mais si on prend l'exemple du potassium extracellulaire dont la concentration moyenne est de l'ordre de $2,10^{-16}$ gr. par micron cube, on s'aperçoit qu'on est ici à la limite des possibilités de l'appareil.

Nous présentons ici une nouvelle méthode dont la sensibilité est dix mille fois plus élevée et qui permet en outre de distinguer entre eux les différents isotopes stables ou non d'un même élément présent localement dans une cellule.

Cette méthode utilise le phénomène d'« émission ionique secondaire » : elle permet d'obtenir la carte de distribution d'un élément de nombre de masse A au sein d'une coupe histologique avec une précision topographique de l'ordre de grandeur du micron, sans recourir à un quelconque artifice de balayage électronique ou mécanique ; on exploite simplement ici les possibilités offertes actuellement en optique corpusculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. PRINCIPES DE LA MÉTHODE D'ANALYSE PONCTUELLE UTILISANT LE PHÉNOMÈNE D'ÉMISSION IONIQUE SECONDAIRE.

En 1962, R. CASTAING et G. SLODZIAN ont présenté une nouvelle méthode d'analyse des surfaces solides que nous résumons brièvement ici.

La surface plane d'un échantillon solide est bombardée sur une étendue limitée (0,5 millimètre carré) par un faisceau d'ions « primaires » (protons, ions, argon) dont l'énergie est voisine de 6,5 K e V au point d'impact. Sous

L'influence de ce bombardement, les couches atomiques les plus superficielles de la cible se pulvérisent sous forme de particules dont certaines sont électriquement neutres alors que d'autres sont ionisées. Ces particules appelées ions « secondaires » sont donc caractéristiques des atomes constituant la surface de l'échantillon. Ces ions « secondaires » sont ultérieurement accélérés par une différence de potentiel et focalisés en un faisceau à l'aide d'une optique ionique appropriée comportant une lentille électrostatique. Ce faisceau transporte l'image représentant la distribution à la surface de l'échantillon de tous les ions arrachés.

Cette image n'est pas formée mais auparavant, un dispositif utilisant les principes de la spectrographie de masse sépare ce premier faisceau ionique en autant de faisceaux secondaires qu'il y a initialement d'ions de charge spécifique (charge par unité de masse) donnée. Le spectographe de masse est à double focalisation, radiale et transversale ; il permet de conserver dans chacun des faisceaux secondaires l'image représentant la répartition topographique des ions. On peut donc, par emplacement judicieux de la fente de sortie, isoler pour former l'image définitive le seul faisceau comportant les ions de charge spécifique donnée ; cette image représente la carte de distribution à la surface de l'échantillon des seuls ions recherchés ; sur l'appareil expérimental utilisé, cette image est agrandie 300 fois environ ; le pouvoir de résolution est de l'ordre du micron.

Pour l'observation de l'image, un dispositif supplémentaire a dû être rajouté car les écrans fluorescents, très sensibles aux électrons, sont par contre d'une sensibilité très faible aux ions ; dans ce dispositif, l'image ionique initiale est transformée en une image électronique par un « convertisseur d'image ».

Le schéma de prototype expérimental construit par CASTAING et SLODZIAN est représenté sur la figure 1.

II. PROBLÈMES POSÉS PAR LES APPLICATIONS BIOLOGIQUES.

L'analyse des échantillons biologiques soulève deux difficultés principales : la première est due au fait que de tels échantillons ne sont pas conducteurs de l'électricité, l'autre concerne les modalités de préparation des échantillons et leur conservation dans un état aussi proche que possible de celui existant « in vivo ».

a) *Conductibilité de l'échantillon.*

L'analyse ne peut s'effectuer en principe que sur des échantillons conducteurs dont la surface est parfaitement plane et équipotentielle. Sous l'influence du bombardement ionique primaire, la surface d'un échantillon non conducteur est susceptible de se charger irrégulièrement ; il en résulte une disparition de l'image. Pour l'analyse des corps isolants, on peut utiliser l'artifice suivant (G. SLODZIAN) : une grille métallique formée de fils parallèles est déposée sur la surface et polie de l'échantillon par évaporation sous vide ;

La couche de métal évaporée est de quelques microns d'épaisseur, la grille a environ 0,08 millimètres de pas et 0,003 millimètres de largeur de barreaux. Cette grille permet ainsi l'écoulement des charges électriques à la surface de l'échantillon. L'expérience nous a montré cependant que cette grille n'était pas toujours indispensable ; lorsque l'isolant (coupe histologique) est examiné

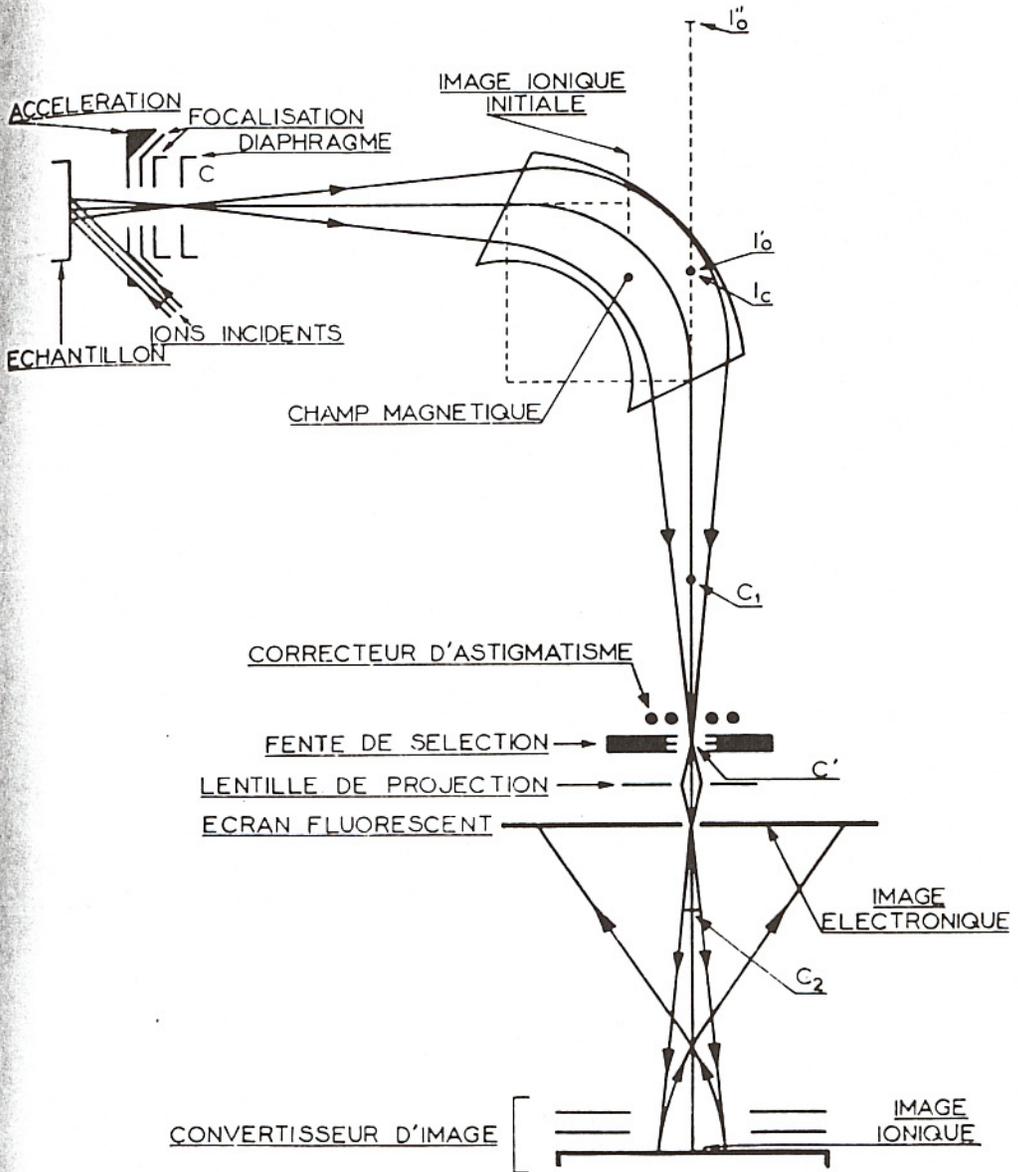


FIG. 1. — Représentation schématique du micro analyseur à émission ionique secondaire (d'après G. Slodzian).

sous forme de lames très minces (épaisseur de l'ordre de grandeur du micron) et déposé sur un support conducteur, il n'est pas nécessaire d'utiliser l'artifice précédent. La coupe histologique peut être considérée comme une lame à faces parallèles et le support comme l'une des armatures d'un condensateur plan portée à un certain potentiel ; dans ces conditions, les faces de la lame (dont sa surface libre) coïncident chacune avec une surface équipotentielle ; l'écoulement des charges a lieu par le support et l'analyse peut en principe s'effectuer sans inconvénient. Les coupes que nous avons analysées de cette façon ont permis l'obtention d'images stables. Les coupes avaient environ un micron d'épaisseur et une surface de quatre millimètres carrés ; elles étaient déposées sur une surface en acier inoxydable soigneusement polie. L'examen des coupes plus épaisses est apparu impossible.

b) Préparation de l'échantillon.

L'échantillon doit être préparé de telle sorte que la répartition et la concentration des éléments présents dans les différents compartiments cellulaires ou extra-cellulaires soit la même que celle existant *in vivo*, faute de quoi toute analyse locale perdrait son sens. Cette condition n'est habituellement pas réalisée lorsqu'on utilise les techniques classiques de fixation et d'inclusion. Les fixateurs les plus puissants (Os O₄) fixent sur place les protéines et les lipides mais laissent diffuser librement de part et d'autre des membranes, les éléments présents à l'état soluble ionisé (Na, K, Cl, etc...) dans les tissus. La déshydratation par l'alcool suivie d'inclusions doit être également prohibée pour les mêmes raisons ; la seule méthode utilisable est la congélation brutale suivie de dessiccation sous vide.

Les premières expériences ont été faites sur du tissu rénal. Le rein a été fixé « *in vivo* » par versement direct d'isopentane à -180° sur l'organe intra-abdominal ayant conservé son irrigation sanguine. Le tissu rénal, conservé à basse température a été coupé au microtome à congélation à une température de -20° environ. Les coupes ont été déposées sur la surface parfaitement polie d'un support métallique lui-même préalablement refroidi à -10° . Les coupes ont été ensuite deshydratées au froid et sous vide, puis conservées sous vide.

La deuxième préparation étudiée (étalement de globules rouges) a été fixée et deshydratée de façon identique.

RÉSULTATS

I. ÉTUDE D'UNE COUPE DE TISSU RÉNAL.

Nous avons étudié tout d'abord l'émission ionique secondaire du sodium produite à la surface d'une coupe de tissu rénal (rein de lapin) par bombardement d'ions Argon. Lorsque l'épaisseur de la coupe est de un micron,

l'image du cytoplasme dure environ dix minutes ; cette durée correspond à la pulvérisation successive des différentes couches atomiques, soit une pulvérisation de 15 couches atomiques chaque seconde. Mais la durée des images varie suivant les différents compartiments. On a pu distinguer dans ce tissu quatre compartiments évoluant très différemment : Le milieu extra-cellulaire, le cytoplasme des cellules, leur noyau et la paroi des artérioles.

Le milieu extra-cellulaire (lumière des tubules et milieu interstitiel) paraît extrêmement brillant dès le début du bombardement primaire ; ce milieu contraste avec le milieu cellulaire dont l'ensemble est beaucoup plus sombre ; très rapidement cependant, cet éclat s'estompe pour disparaître complètement en dix secondes environ. La pulvérisation s'effectue donc très rapidement ici, au rythme de mille couches atomiques par seconde environ.

Lorsque l'éclat très brillant du milieu extra-cellulaire a disparu, le milieu cellulaire apparaît plus clairement et on distingue dans celui-ci des petites plages très brillantes correspondant aux noyaux et des plages moins brillantes correspondant au cytoplasme. Les taches correspondant aux noyaux restent apparentes pendant deux minutes environ puis disparaissent, laissant apparaître alors le seul cytoplasme dont la désintégration se poursuit en une dizaine de minutes en moyenne.

Enfin la paroi des artérioles apparaît extrêmement brillante pendant quinze minutes environ. On voit donc que la vitesse de désintégration est très variable suivant les compartiments ; très rapide (10 secondes) pour le milieu extra-cellulaire, rapide (deux minutes) pour les noyaux, lente (10 à 15 minutes) pour le cytoplasme et la paroi des artérioles : il en résulte qu'il n'est pas possible de déduire, de la brillance instantanée des différents compartiments, la concentration relative de l'élément recherché. Une plage peut apparaître plus brillante qu'une autre, soit parce que la région correspondante de l'échantillon est plus riche en élément recherché, soit parce que sa désintégration a été plus rapide. Il est donc nécessaire, pour apprécier une concentration locale de mesurer non pas le nombre d'électrons arrivant par seconde sur l'écran (intensité du courant responsable de la brillance de l'écran), mais le nombre total d'électrons incidents depuis le début jusqu'à la fin de l'analyse.

La figure 2 est une image obtenue à la 8^e seconde du bombardement ionique ; elle représente la distribution du sodium à la surface de cette coupe de tissu rénal.

II. ÉTUDE D'UN ÉTALEMENT DE GLOBULES ROUGES HUMAINS.

Après étalement sur la surface métallique parfaitement polie, les globules rouges sont séparés les uns des autres par une couche de plasma. Lorsqu'on étudie l'émission ionique du sodium $^{23}\text{Na}^+$, on observe au début que les plages correspondant au plasma apparaissent très brillantes, alors que les plages correspondant aux globules sont plus sombres (figure 3) ; les plages correspondant au plasma s'estompent par la suite et disparaissent complètement en trois minutes en moyenne ; seuls apparaissent alors les globules rouges

dont la désintégration totale s'effectue en quinze minutes environ (figures 4, 5 et 6). Là encore, la plus grande brillance des plages correspond au plasma est due, d'une part à la plus grande concentration de ce milieu en sodium, et d'autre part à sa plus rapide désintégration.



FIG. 2

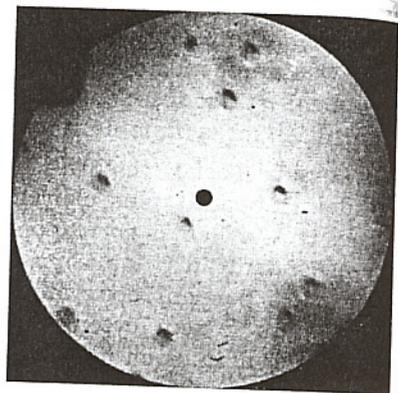


FIG. 3

FIG. 2. — Répartition du sodium $^{23}\text{Na}^+$ à la surface d'une coupe histologique d'un rein de lapin. L'image a été obtenue à la 8^e seconde du bombardement ionique ; la coupe a été faite au microtome à congélation. Les plages correspondant au milieu extra cellulaire (lumière des tubes : L, et milieu interstitiel) apparaissent très brillante, de même que les noyaux cellulaires ; les plages correspondant au cytoplasme : C, apparaissent sombres. Grossissement = $\times 500$.

FIG. 3. — Répartition du sodium $^{23}\text{Na}^+$ à la surface d'un étalement des globules rouges humains. L'image a été obtenue à la 6^e seconde du bombardement ionique. Le plasma apparaît très clair, les globules rouges sont plus sombres.

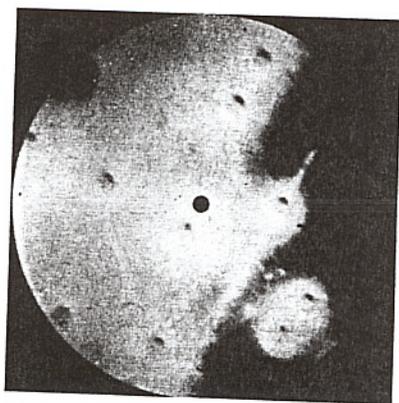


FIG. 4

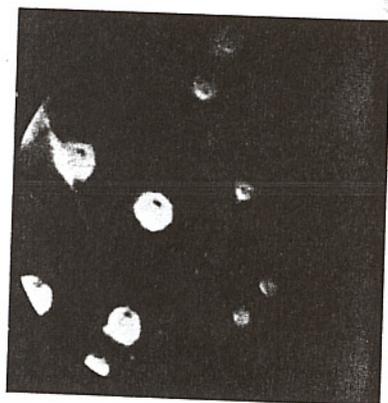


FIG. 5

FIG. 4. — Répartition du sodium $^{23}\text{Na}^+$ à la surface d'un étalement de globules rouges humains. La région analysée est la même que sur la figure 2, mais la photographie a été plus tardive ; le plasma commence à disparaître.

FIG. 5. — Répartition du sodium $^{23}\text{Na}^+$. Même région que sur la figure 2. L'image a été prise à la 40^e seconde du bombardement ionique.

Sur un autre étalement de globules rouges, l'émission ionique secondaire des deux isotopes naturels du potassium, $^{39}\text{K}+$ 95 % et $^{41}\text{K}+$ (5 %), a été étudiée. Les figures 7 et 8 ont été obtenues sur une même plage et respectivement à la 9^e et à la 10^e minute du bombardement ionique. La figure 7 montre la

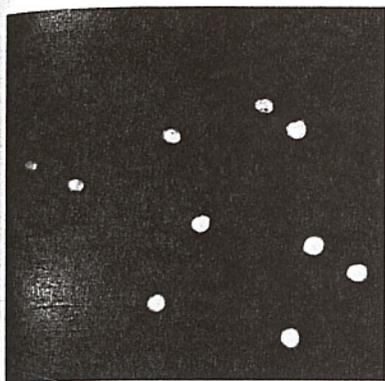


FIG. 6



FIG. 7



FIG. 8

- FIG. 6. — Répartition du sodium $^{23}\text{Na}+$. Même région que sur la figure 2. L'image a été prise à la 10^e minute du bombardement ionique. Le plasma a entièrement disparu ; seuls persistent les globules rouges.
- FIG. 7. — Répartition du potassium $^{39}\text{K}+$ à la surface d'un étalement de globules rouges humains. Image prise à la 9^e minute du bombardement ionique.
- FIG. 8. — Répartition du potassium $^{41}\text{K}+$. Même région que sur la figure 6. Image prise à la 8^e minute du bombardement ionique.

répartition du potassium 39, la figure 8, la répartition du potassium 41. On voit donc que l'analyse isotopique locale est aisée et si, comme on peut l'espérer, il sera ultérieurement possible de doser localement ces isotopes avec une précision suffisante, cette méthode permettra peut-être de vérifier dans quelle mesure la proportion respective de ces différents isotopes observée dans les milieux vivants est identique à celle observée dans la matière inerte.

DISCUSSION

Il résulte des expériences effectuées que l'analyseur ionique permet, sans difficulté majeure, l'étude d'échantillons biologiques variés. L'interprétation qualitative et quantitative des résultats présente cependant un certain nombre de problèmes qui vont être successivement envisagés.

A. INTERPRÉTATION QUALITATIVE.

L'appareil a la propriété de séparer entre eux les ions ayant des charges spécifiques différentes. Des ions de nature différente, mais portant des charges spécifiques identiques pourront donc être confondus ; or, outre le fait que les éléments de nature différente peuvent avoir des isotopes de même masse, les ions secondaires émis sont susceptibles de porter plusieurs charges ou d'être émis sous forme d'ions moléculaires ; ainsi pour un élément pur tel que l'aluminium, SŁODZIAN observe, outre l'émission des ions Al^+ , celle des ions Al^{++} , Al^{+++} , Al_2^+ et Al_3^+ ; l'émission des ions Al^+ étant cependant largement prédominante.

La production d'ions moléculaires doit inciter à la prudence dans l'interprétation des résultats obtenus sur des corps chimiques très complexes tels que ceux présents à l'intérieur ou à l'extérieur des cellules. Il n'est pas impossible en effet qu'on provoque dans ces tissus une émission non négligeable de radicaux organiques ionisés constitués de plusieurs atomes dont l'ensemble peut avoir une masse identique à celle du sodium, du potassium ou de tout autre élément recherché.

Des études systématiques concernant l'émission ionique secondaire des milieux organiques seront nécessaires pour l'interprétation définitive des résultats. Notons cependant ici qu'on peut être aidé dans l'interprétation de ces résultats lorsque l'élément recherché est formé de plusieurs isotopes ; ainsi pour le potassium ayant deux isotopes naturels stables de masses respectives 39 (95 %) et 41 (5 %), on peut vérifier si les images obtenues avec les particules de masse 39 sont identiques ou non à celles obtenues avec les particules de masse 41.

B. INTERPRÉTATION QUANTITATIVE.

On a vu que le convertisseur d'image avait pour but de transformer le faisceau ionique secondaire transportant l'image des ions spécifiques en un faisceau électronique de même distribution spatiale et destiné à impressionner l'écran fluorescent. L'intensité du faisceau électronique est dépendant de l'intensité du faisceau ionique secondaire et par conséquent du nombre d'ions spécifiques arrachés à l'échantillon. On peut donc en principe déduire de l'intensité du faisceau électronique la concentration locale de l'élément recherché.

Nous avons vu cependant que, pour le cas particulier des échantillons biologiques (coupe histologique mince), la vitesse de pulvérisation était très variable suivant les compartiments : très rapide (10 secondes) pour le milieu extra-cellulaire, rapide (2 minutes) pour les noyaux, lente 10 à 15 minutes, pour le cytoplasme et la paroi des artérioles : nous avons vu qu'il était donc nécessaire, pour apprécier une concentration locale, de mesurer le nombre total d'électrons arrivés sur une région donnée de l'écran pendant toute la durée de la désintégration. Une telle mesure nécessite l'utilisation de diaphragmes spéciaux permettant de sélectionner une région limitée de l'image et de recueillir ainsi les seuls électrons correspondant à cette région. Cette mesure n'a pas pu être effectuée avec l'appareil expérimental utilisé.

Par ailleurs, l'interprétation quantitative doit tenir compte d'un certain nombre d'autres facteurs encore mal connus et concernant le phénomène d'émission ionique secondaire des corps chimiques complexes. C'est ainsi que dans les alliages cuivre-beryllium à 2 % de beryllium, SŁODZIAN a observé une émission d'ions Cu^+ soixante fois plus intense que sur le cuivre pur ; on observe donc une exaltation de l'émission ionique secondaire du cuivre, du fait de la présence de beryllium. L'intensité de l'émission ionique secondaire ne dépend donc pas uniquement de la concentration de l'élément étudié, mais également des liaisons chimiques auxquelles participe cet élément. Il en résulte que l'appréciation quantitative des résultats est un problème généralement délicat ; cependant, le fait que l'intensité de l'émission ionique secondaire soit sous la dépendance des liaisons chimiques peut dans certains cas permettre d'obtenir certains renseignements concernant la nature de ces liaisons.

C. SENSIBILITÉ.

La sensibilité de cette analyse locale est extrêmement élevée et dépasse de très loin celle de toutes les autres méthodes utilisées jusqu'à présent. Cette sensibilité dépend de différents facteurs dont deux principaux ; la nature de l'ion analysé et la liaison chimique de l'élément à l'intérieur de l'échantillon.

Ces deux facteurs déterminent en définitive le rapport $\frac{n_i}{n_o}$ entre le nombre n_i d'ions caractéristique qui contribuent à l'image et le nombre n_o d'atomes neutres qui sont arrachés dans le même temps de la même région de la préparation. Il est clair que la sensibilité sera d'autant meilleure que ce rapport sera plus élevé.

Le rapport $\frac{n_i}{n_o}$ varie beaucoup d'un échantillon à l'autre ; les valeurs expérimentales obtenues par SŁODZIAN sont par exemple de 10^{-3} pour l'aluminium pur et 10^{-7} pour le cuivre pur. Pour les éléments alcalins, le rapport est vraisemblablement très élevé (voisin de 1) et ceci explique tout l'intérêt que peut présenter cette méthode dans l'étude de la répartition de ces ions dans les tissus.

Nous avons pu apprécier cette sensibilité dans le cas du sodium intracellulaire à l'intérieur des globules rouges. On connaît en effet la teneur en sodium de ces cellules (environ 3.10^{-16} grammes par micron cube); l'épaisseur du globule est de l'ordre de grandeur du micron. La durée de désintégration est en moyenne de 900 secondes. Sous une surface de 1 micron (limite actuelle de résolution de l'image), on provoque donc la pulvérisation de $\frac{3.10^{-16}}{900} = 3,3.10^{-19}$ gramme de sodium par seconde. Le temps d'exposition nécessaire pour obtenir une image photographique est de 0,03 seconde : une quantité aussi faible que $3,3.10^{-19} \times 0,03 = 10^{-20}$ grammes de sodium est donc suffisante pour obtenir une image. Par rapport aux autres méthodes d'analyse locale (micro-analyse pour sonde électronique), la sensibilité est donc améliorée d'un facteur 10.000. Pour mettre l'accent sur cette sensibilité, précisons que 10^{-20} grammes correspond approximativement à 300 atomes de sodium; ceci signifie qu'il est donc possible de mettre en évidence, sous chaque micron carré d'une coupe histologique, des quantités infimes de matière, correspondant à quelques centaines d'atomes seulement.

BIBLIOGRAPHIE

1. CASTAING (R.) et SLODZIAN (G.). — *J. Microscopie*, **1**: 395-410 (1962).
2. GALLE (P.), BLAISE (G.) and SLODZIAN (G.). — *Proc. fourth nat. Conf ou Electron Microprobe Analysis*, 35-36 (Pasadena, 1969).
3. SLODZIAN (G.). — *Thèse Sci.*, Paris (1963).