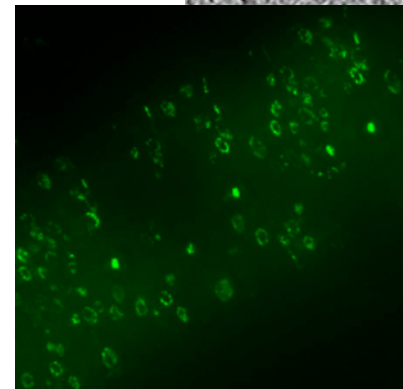
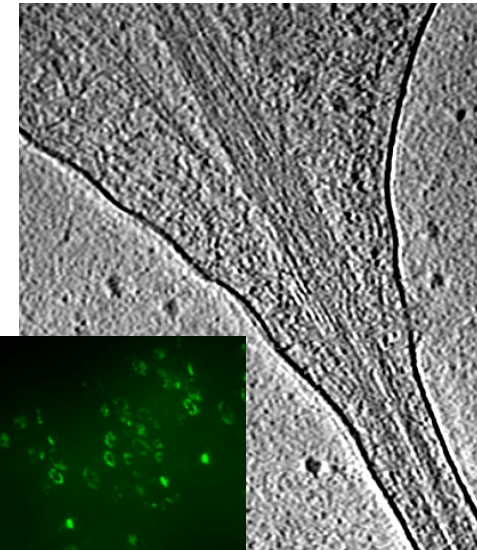
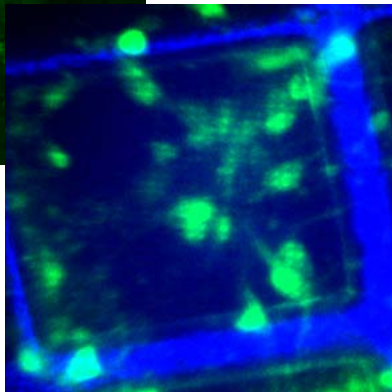
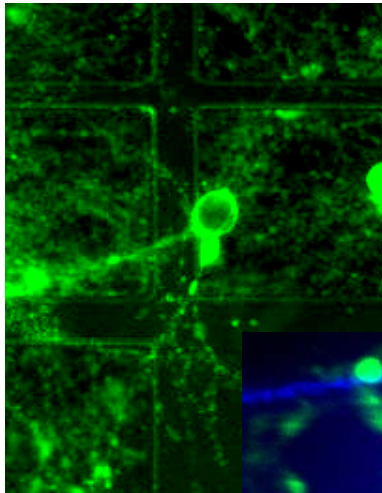




# Microscopie Corrélative à Températures Cryogéniques: Etudes Structurelles et Morphologiques de Cellules Intactes

**Anna Sartori**

Max Planck Institut de Biochimie  
Département de Biologie Structurale  
Munich, Allemagne



# Plan de la Présentation

- Introduction à la cryo-Tomographie Électronique (cryo-ET)
- Corrélation: Microscopie à Fluorescence (FM) et cryo-ET
  - Méthode
  - Application à cellules intactes
- Conclusions et plans futures



# Plan de la Présentation

- Introduction à la cryo-Tomographie Électronique (cryo-ET)
- Corrélation: Microscopie à Fluorescence (FM) et cryo-ET
  - Méthode
  - Application à cellules intactes
- Conclusions et plans futures



# Principe de la tomographie électronique

**Cryo-tomographie électronique (cryo-ET)**  
d' échantillons biologiques congelés dans la glace vitreuse



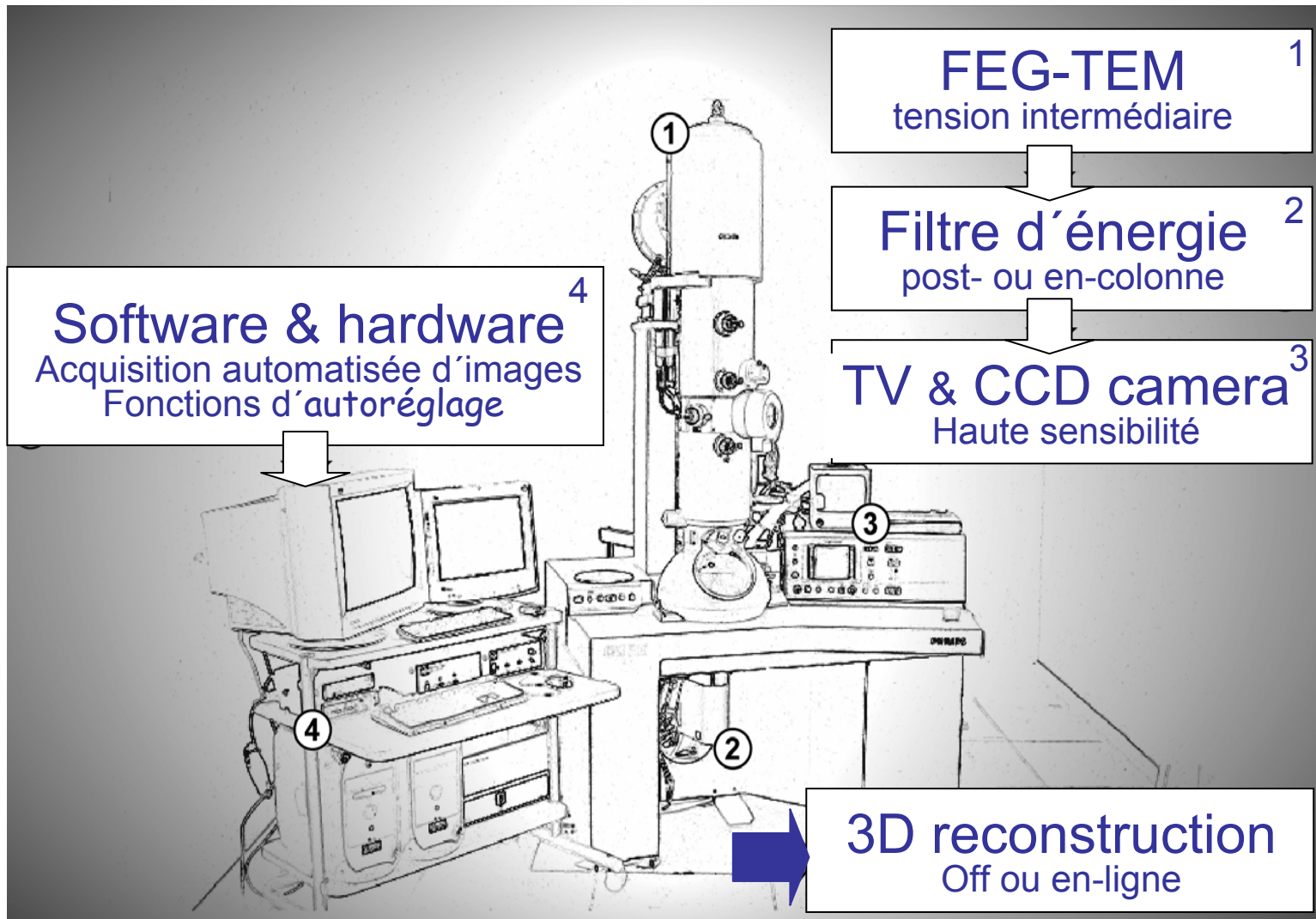
3D investigation d' échantillons biologiques près de leur état natif  
résolution à l' échelle du nanomètre

**I.** Objet 3D →  
set projections 2D

**II.** Set projections 2D →  
reconstruction 3D



# Setup Instrumental



# Cryo-ET: Procédure

- **Préservation de l'échantillon vivant dans son état natif** avant la congélation
  - aucune fixation chimique
  - aucune utilisation de ions lourds
  - aucune coloration négative
- **Vitrification de l'échantillon**
  - revêtement de glace amorphe par congélation rapide en **éthane liquide** ( $T \sim -195 \text{ } ^\circ\text{C}$ )
- **Investigation par cryo-EM and cryo-ET**
  - contraste bas du matériel biologique dans la glace
  - low-dose basse d'électrons  $25\text{-}50 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$

LIMITATION MAJEUR EPAISSEUR DE LA GLACE (→ de l'ECHANTILLON)  $\leq 500 \text{ nm}$



# Plunge-Freezing



# Correlation: FM et cryo-ET

**Cryo-Tomographie  
Electronique (cryo-ET)**  
de cellules intactes vitrifiées



Récupération et identification de  
structures marquées d'intérêt

## Défis

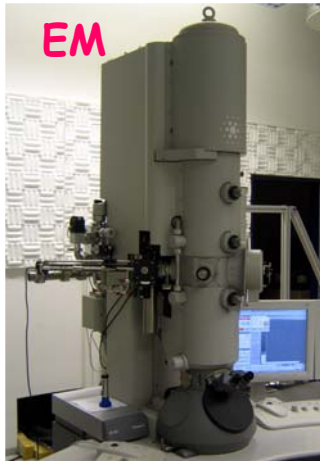
- Identification de structures
- Qualité de l'échantillon
- Épaisseur de la glace  $< 1 \mu\text{m}$

**Cryo-Microscopie à  
Fluorescence (cryo-FM)**

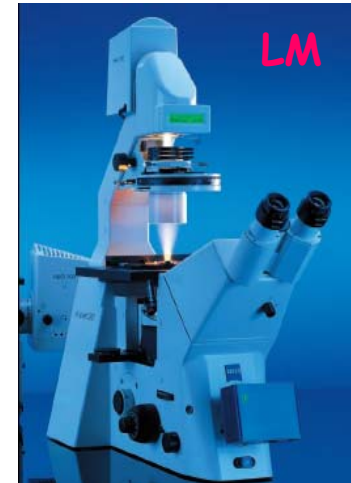
Marquage avec des  
marqueurs fluorescents  
(et e<sup>-</sup>dense) denses



Image with Cryo-FM



EM



LM

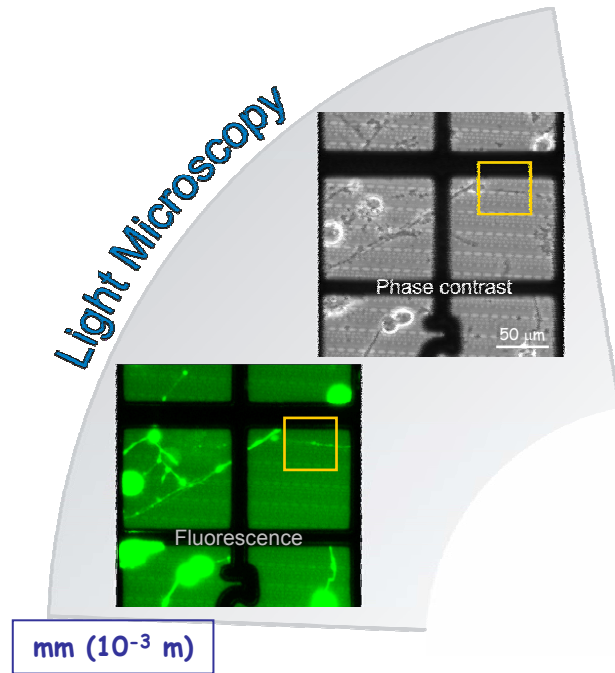


# Plan de la Présentation

- Introduction à la cryo-Tomographie Électronique (cryo-ET)
- Corrélation: Microscopie à Fluorescence (FM) et cryo-ET
  - Méthode
  - Application à cellules intactes
- Conclusions et plans futures



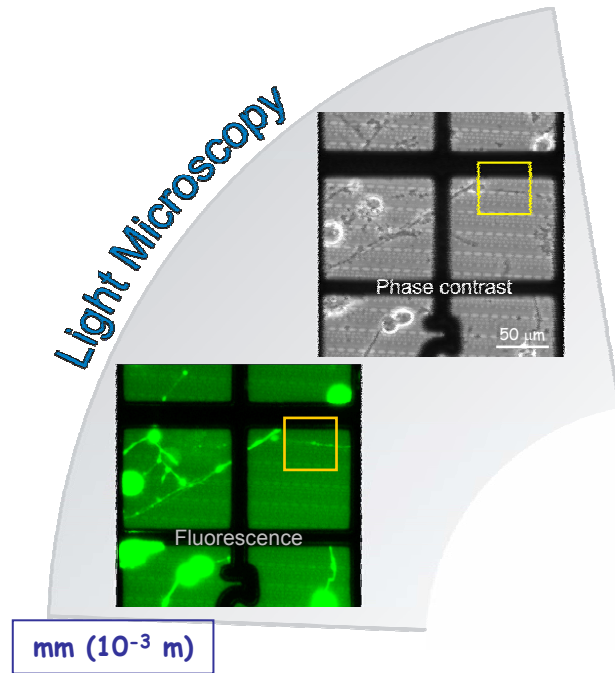
# Correlation FM et cryo-ET: LM - cultures cellulaires sur grilles TEM



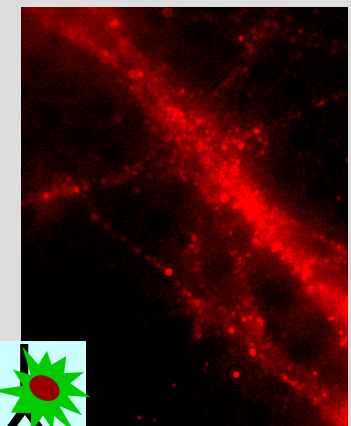
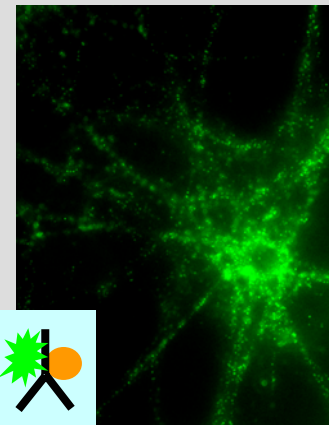
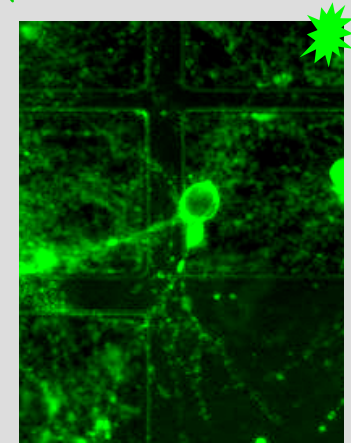
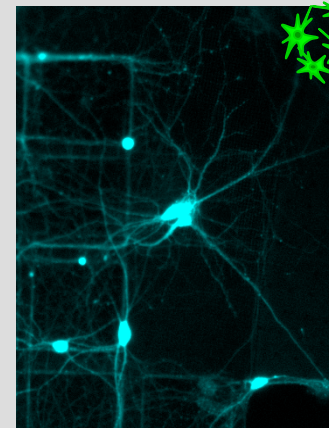
- Revêtement de grille EM avec ECM
- Culture cellulaires sur grilles revêtues
- Marquage fluorescent de cellules vivantes

NG108 lignée cellulaire  
neuroblastome




# Correlation FM et cryo-ET: LM - Marquage à fluorescence



## Neurones d'hippocampe d'embryon rat

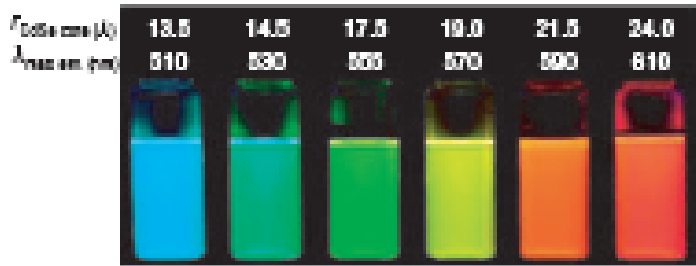


## Marquage en vivant de cellules sur grilles EM

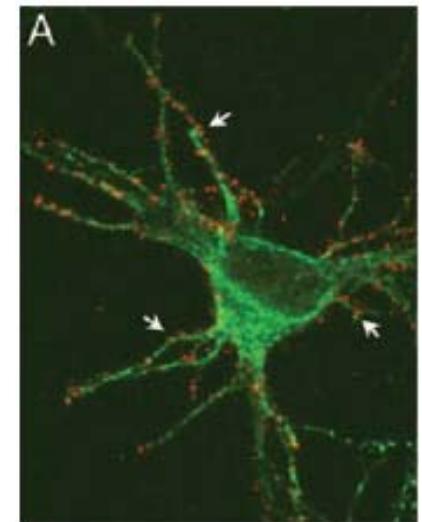
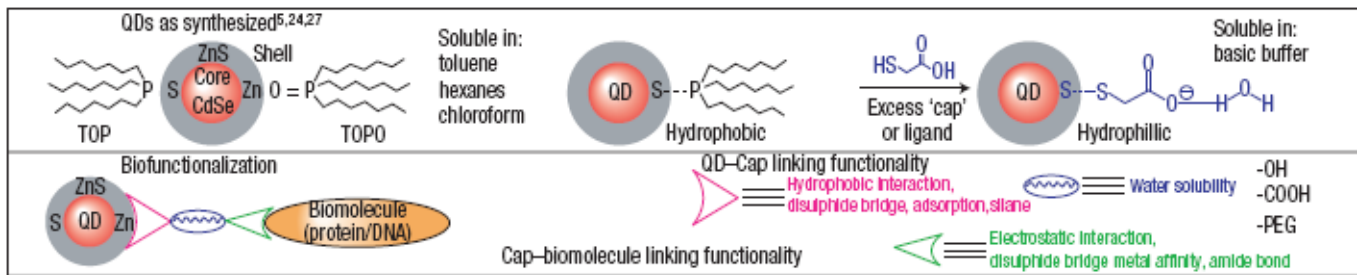
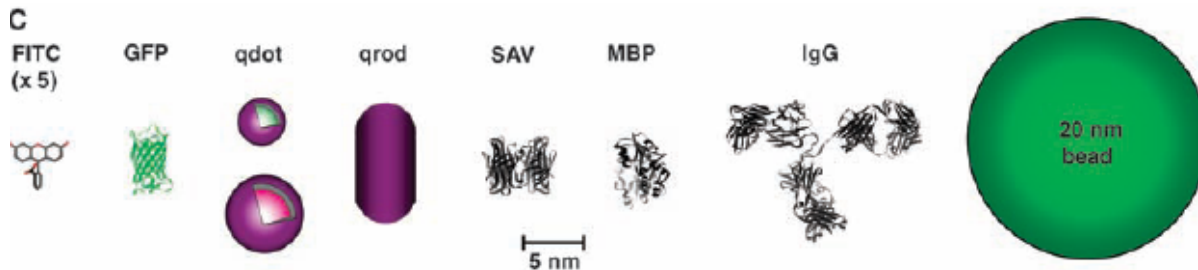
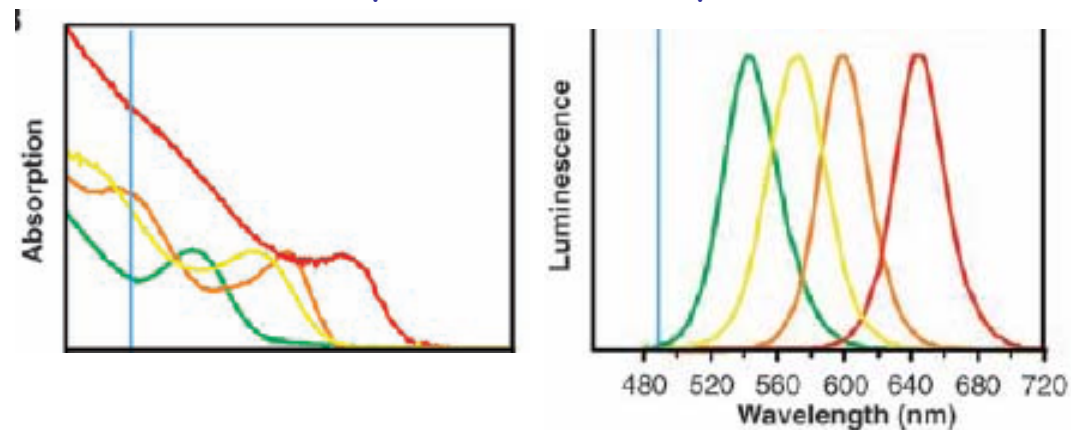
Expression de protéines fluo (ex. GFP)  
Marquage à fluo de échantillons vivants  
Immunomarquage avec Ab couplés à  
(colloidal gold  + fluo  ) ou  
aux QDs 

# Quantum dots

Longueur d'onde d'émission réglable avec la taille



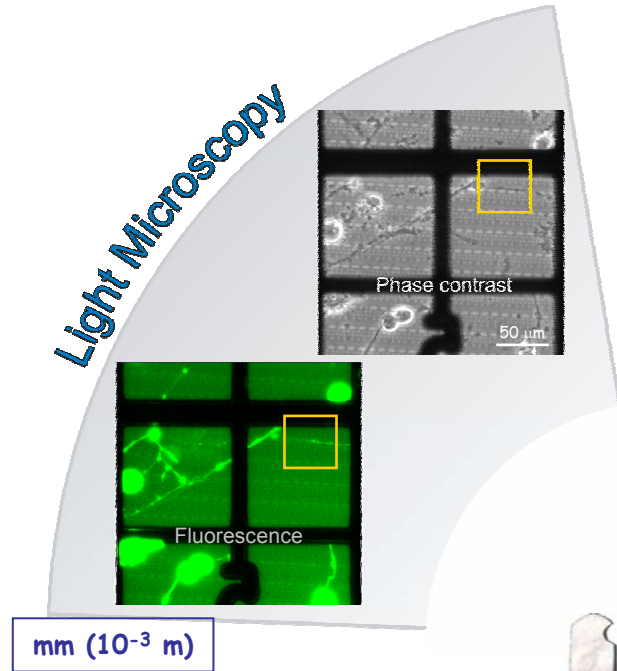
CdSe/ZnS QDs: spectres d'adsorption et d'émission



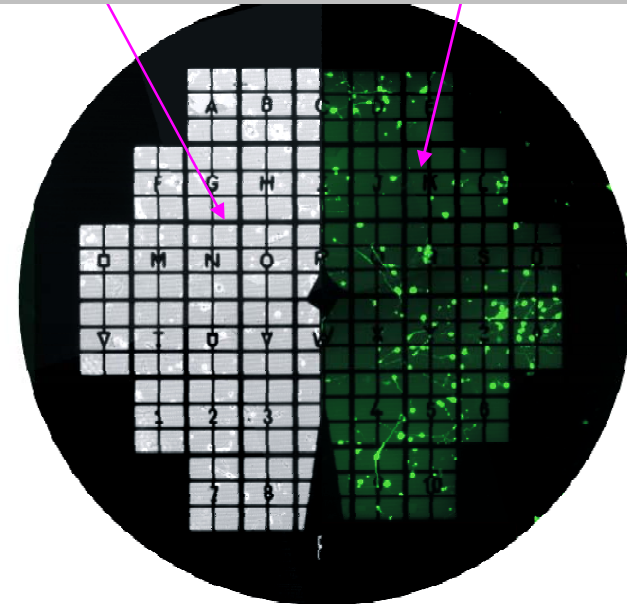
I. Medintz et al., Nature materials 4 (2005) p. 435

M. Dahan et al., Science 302 (2003) 442

# Corrélation FM et cryo-ET: LM - balayages des grilles et vitrification



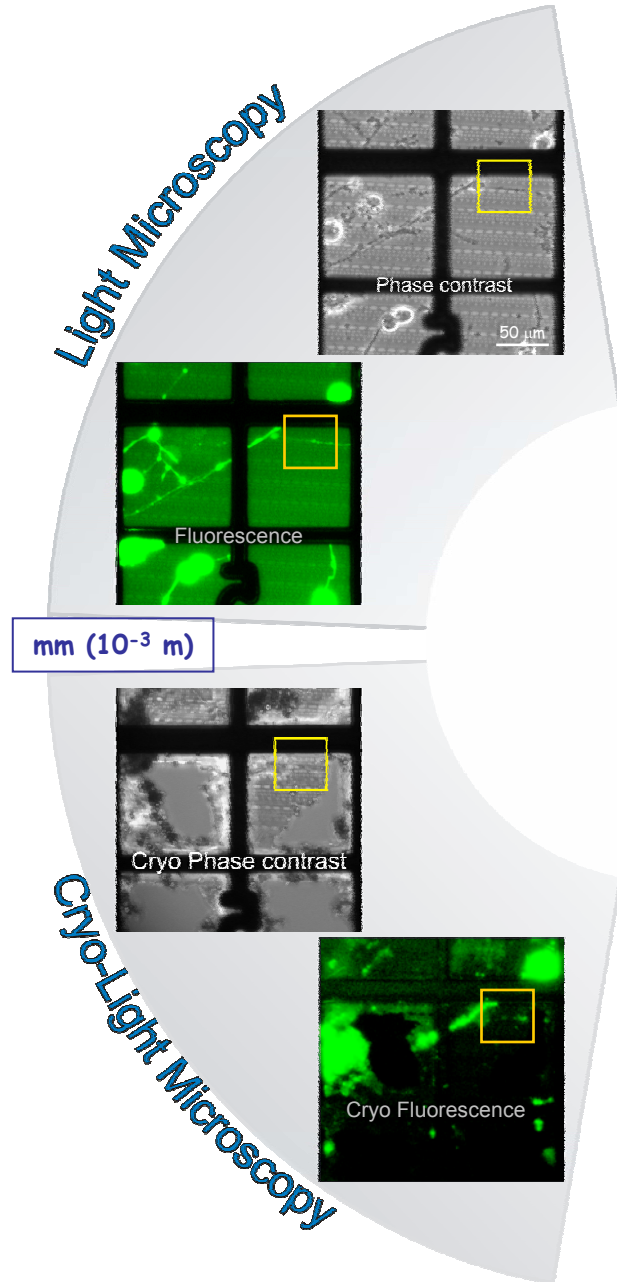
Balayage de l'échantillon sur la grille par microscopie à fluorescence et Contraste de Phase à faible grossissement



Vitrification de l'échantillon par congélation rapide dans l'éthane liquide ( $T \sim -196^{\circ}\text{C}$ )

NG108 lignée cellulaire neuroblastome

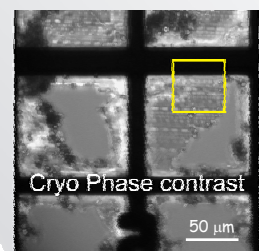
# Corrélation FM et cryo-ET: LM - Cryo-Microscopie Optique



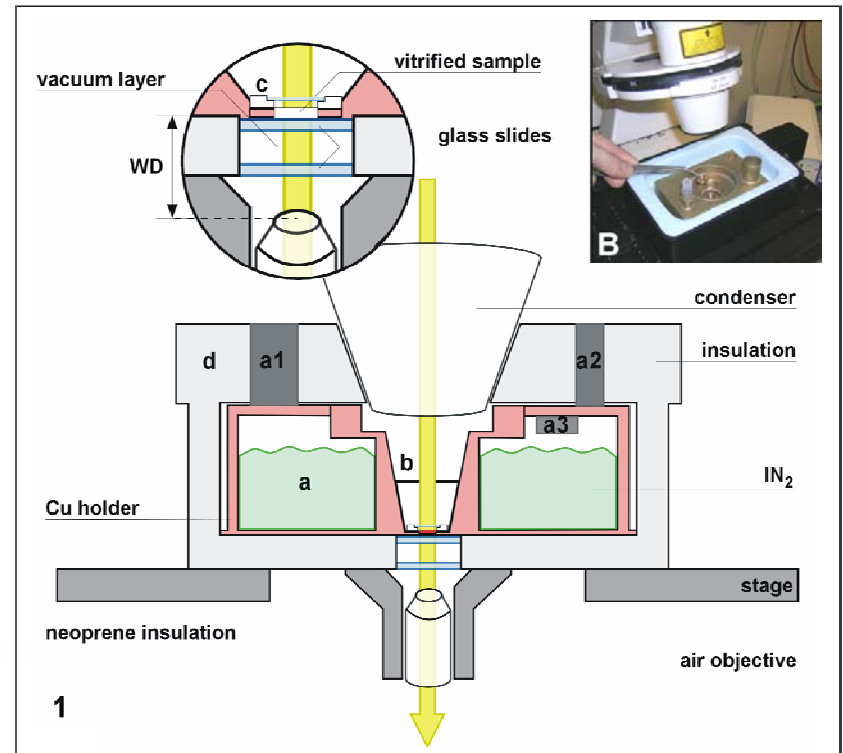
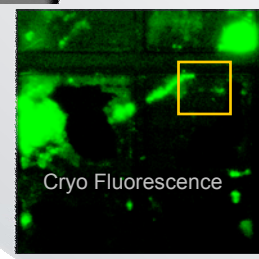
NG108 lignée cellulaire  
neuroblastome

# Corrélation FM et cryo-ET: LM - Cryo-Microscopie Optique

mm ( $10^{-3}$  m)



Cryo-Light Microscopy



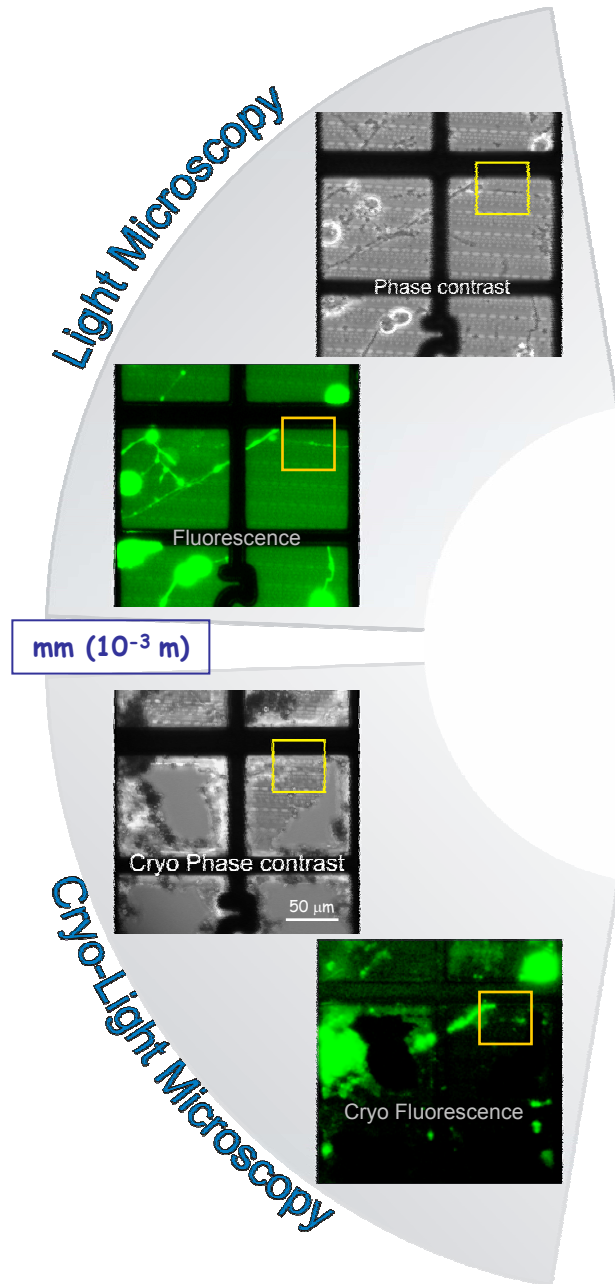
## Requises

1. Manutention de la grille à la T de l'azote liquide pendant l'acquisition d'images
2. Bon isolement de façon à éviter la contamination

## Caractéristiques:

- *Seulement objectifs à air: W.D. ≥ 6 mm (max 40x, N.A.=0.55)*
- *Photobleaching réduit (temps de exposition: 50x > RT)*
- *Résolution ~ 1 μm*

# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-LM - Control de qualité de l'échantillon

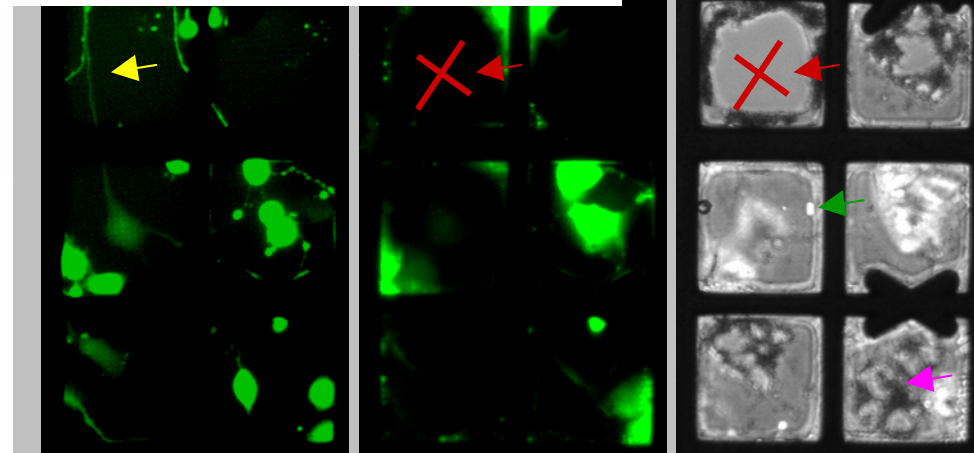


- Control des conditions de la grille  $\leftarrow$  et des cellules  $\rightarrow$
- Estimation de l'épaisseur de la glace à partir de mesures de lumière transmise: 80 %  $\rightarrow \Delta t < 1 \mu\text{m}$   $\leftarrow$
- Détection de la contamination par glace cristalline  $\leftarrow$

FM

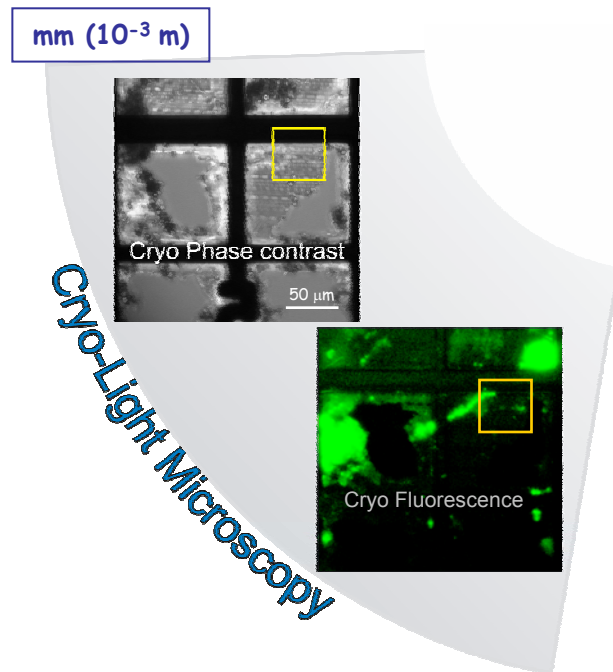
Cryo-FM

Cryo-Ph2

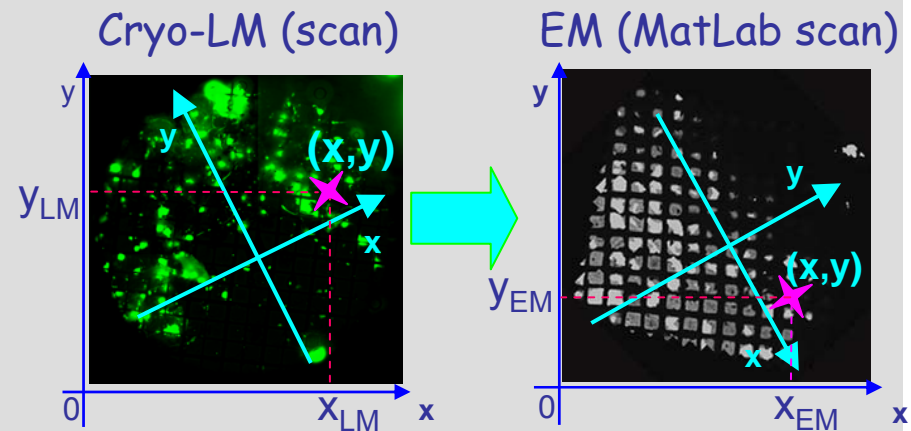


Cellules NG108 de neuroblastome vivantes marquées par Fura-2 indicateur de calcium

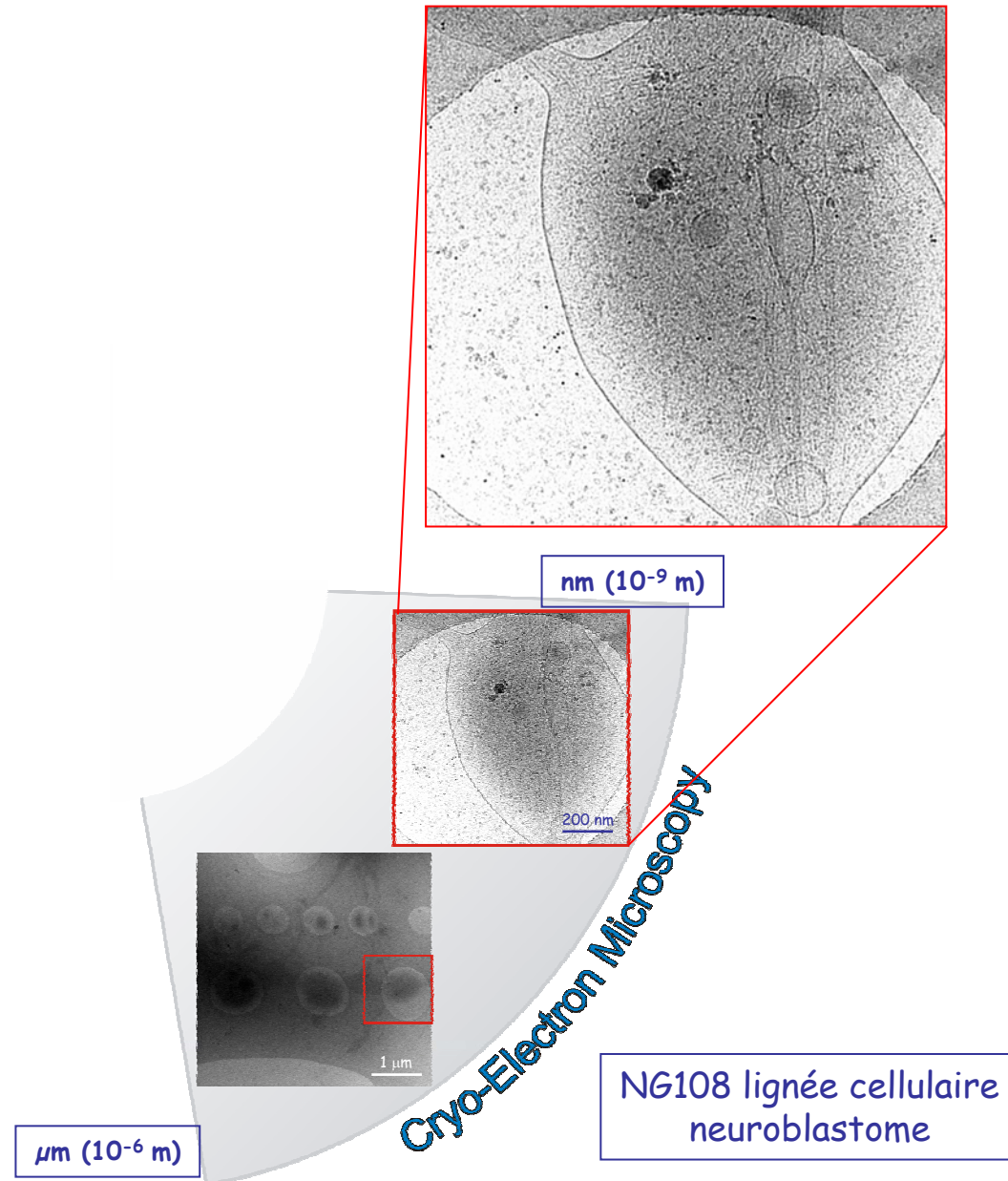
# Corrélation FM et cryo-ET: Transfert de coordonnées du LM au EM



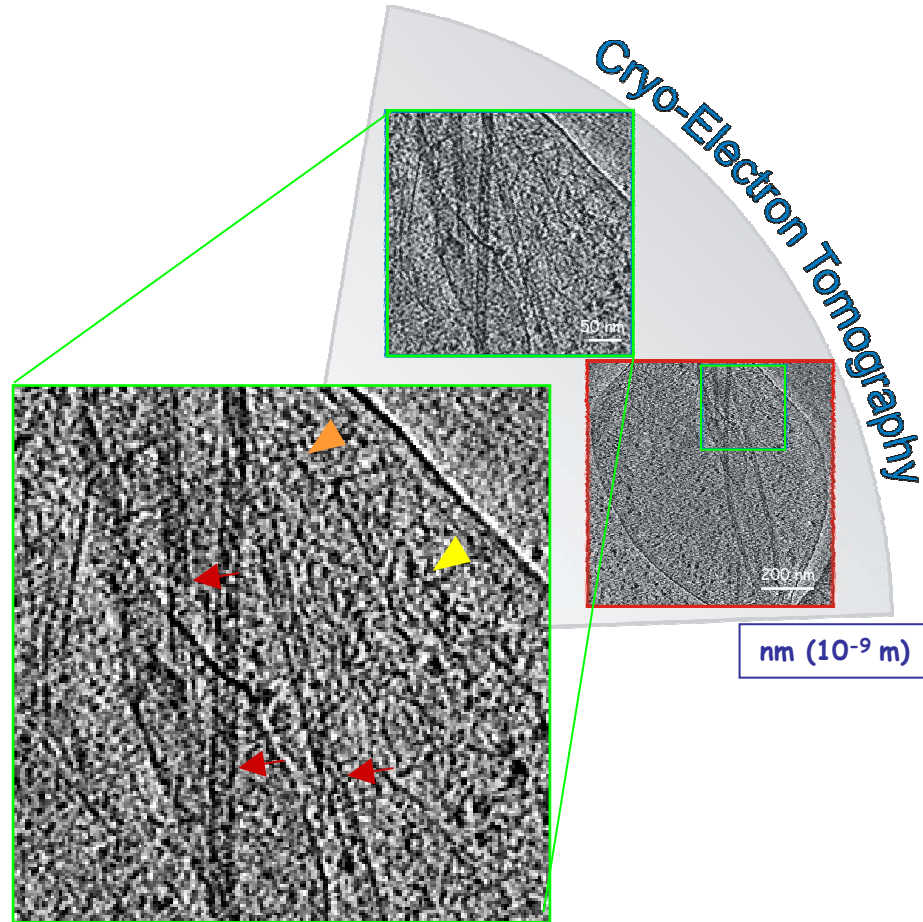
1. Identification des structures marquées d'intérêt
2. Détermination de leur position absolue sur la grille
3. Transfert de la grille au EM & scanning
4. Récupération de la position (x,y) au EM



# Corrélation FM et cryo-ET: Cryo-Microscopie Electronique



# Corrélation FM et cryo-ET: Cryo-Tomographie Electronique



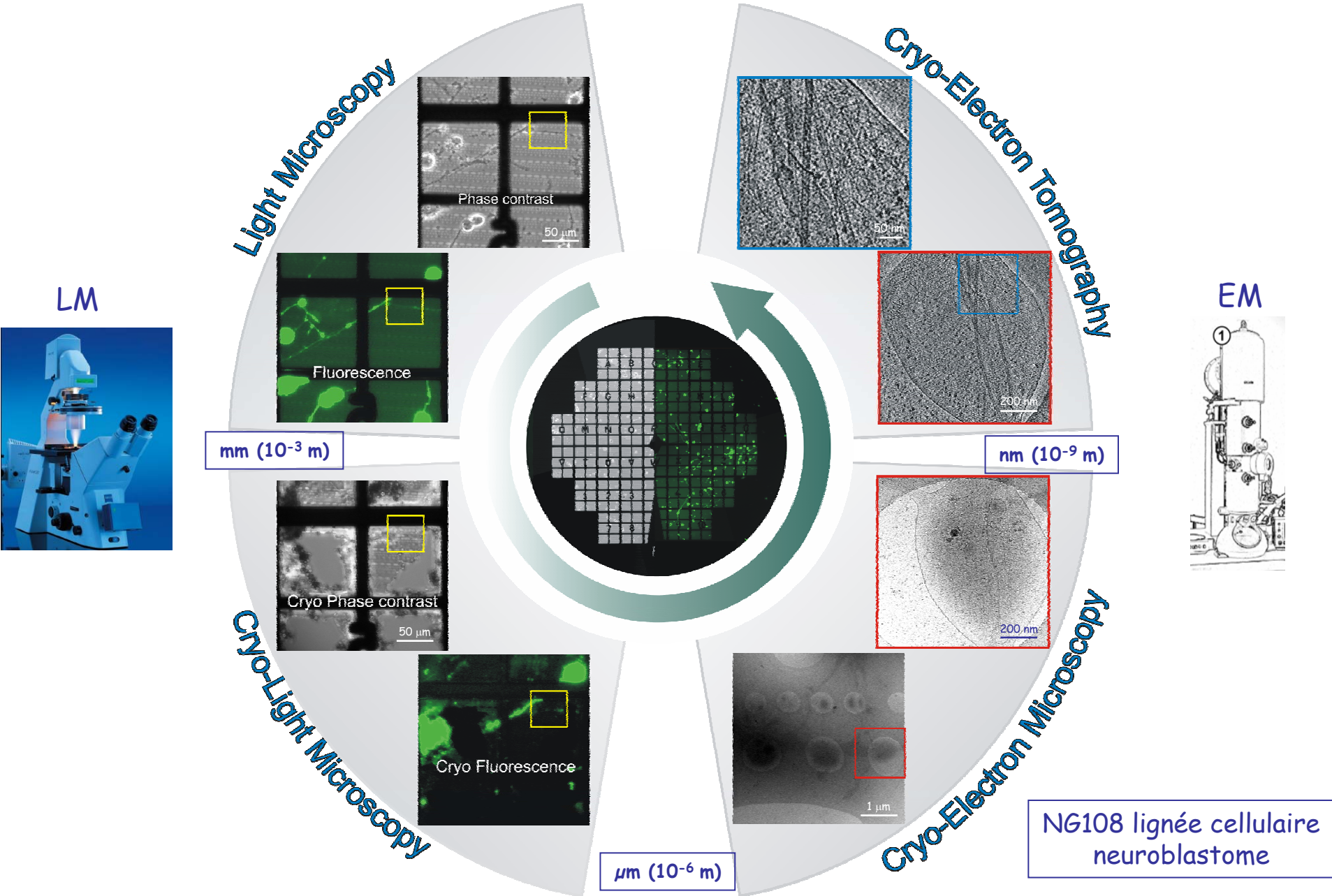
■ Ballot d'actine

■ Microtubules

■ Réseau dense d'actine

NG108 lignée cellulaire neuroblastome

# Corrélation FM et cryo-ET: Cycle corrélatif complet



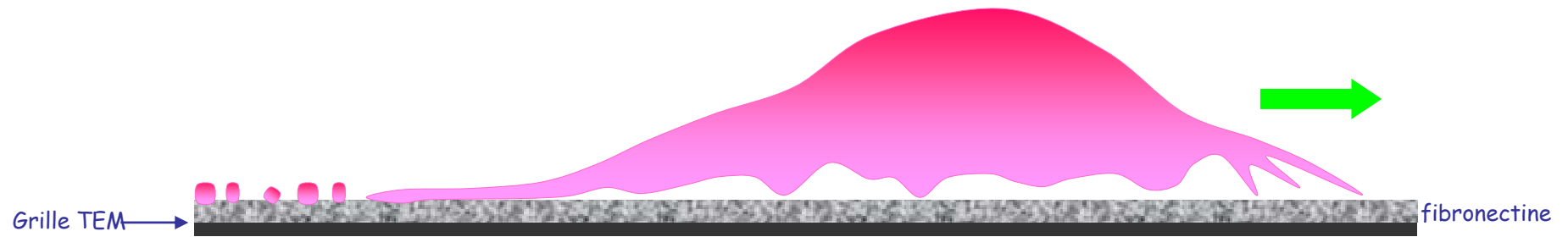
# Plan de la Présentation

- Introduction à la cryo-Tomographie Électronique (cryo-ET)
- Corrélation: Microscopie à Fluorescence (FM) et cryo-ET
  - Méthode
  - Application à cellules intactes
- Conclusions et plans futures



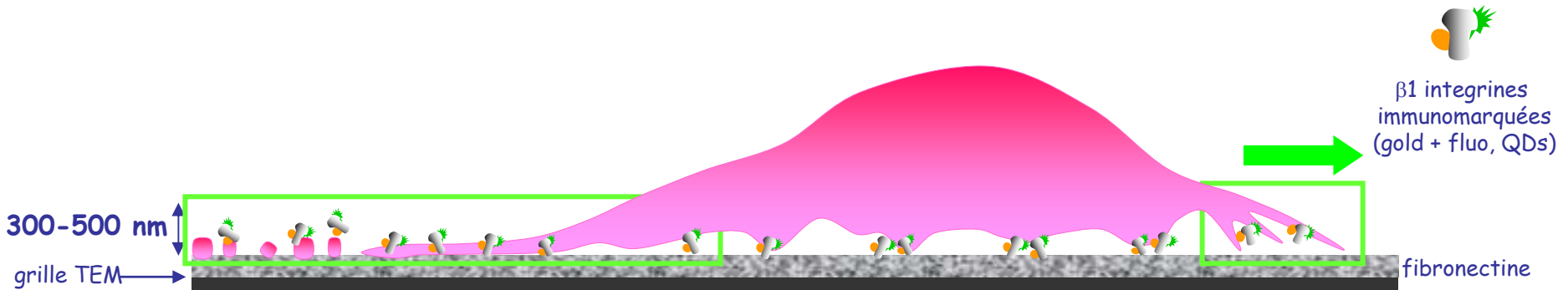
# Corrélation FM et cryo-ET: Adhésion et organisation du cytosquelette

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine



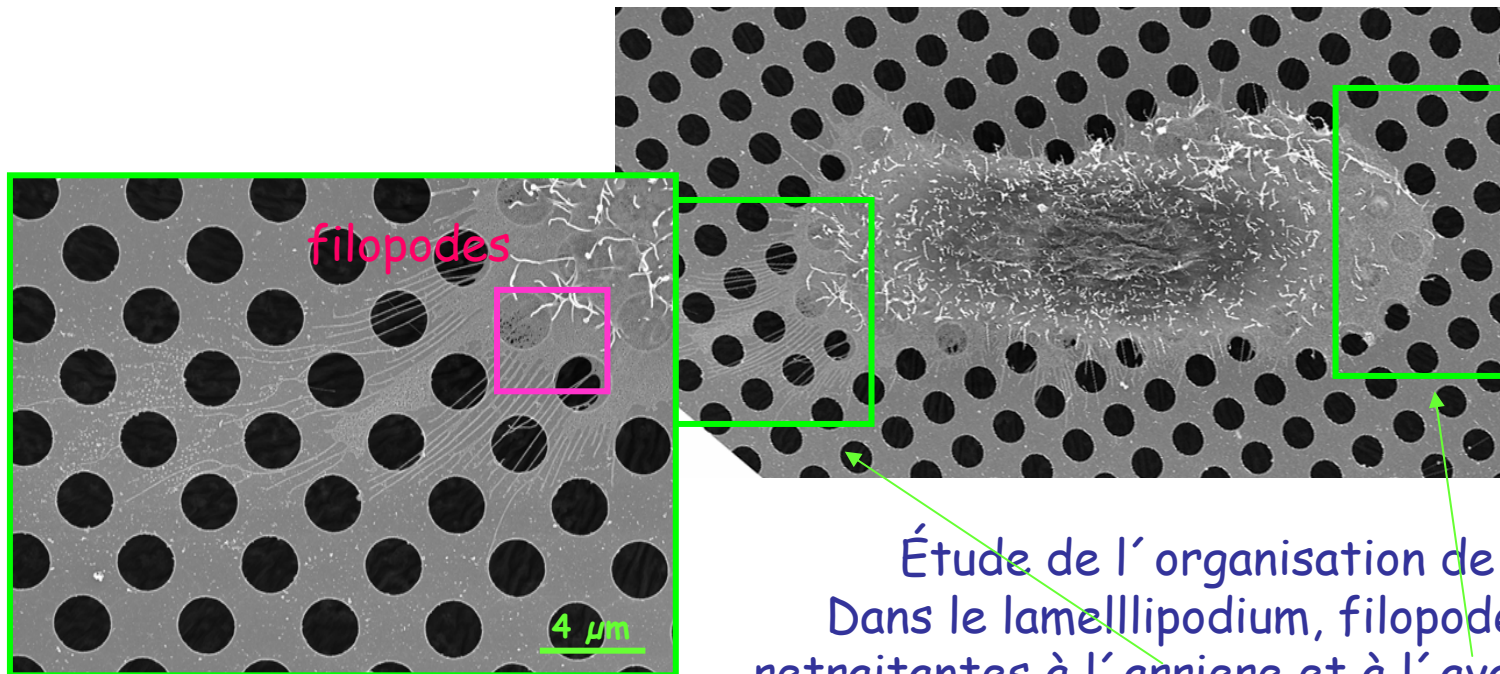
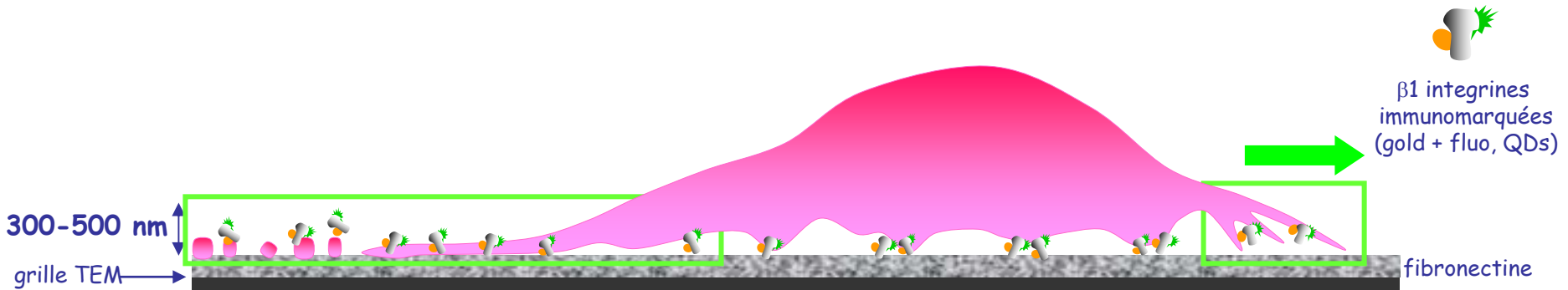
# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine



# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine

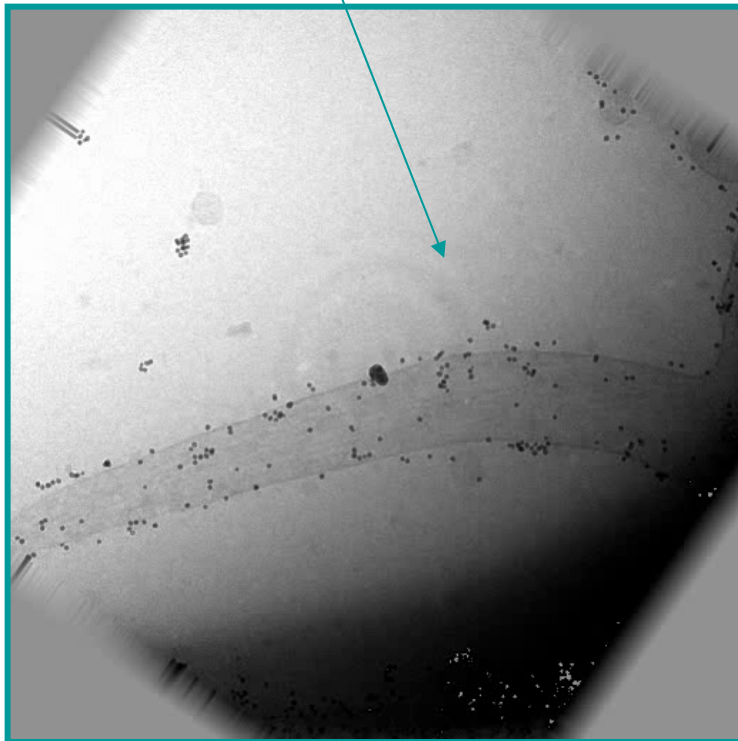
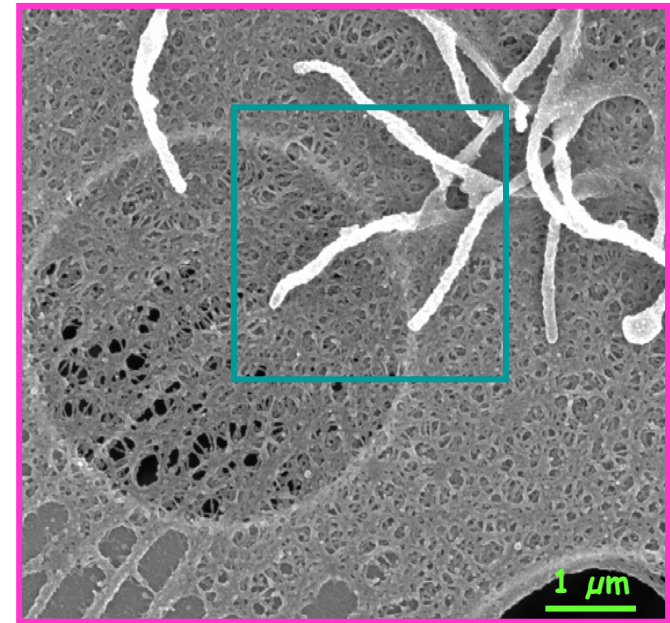
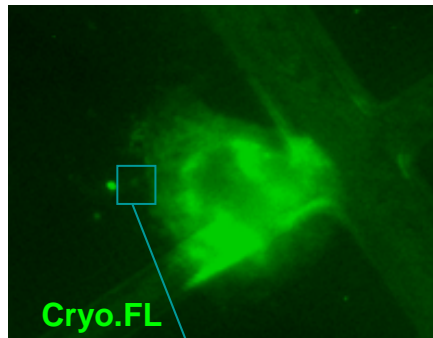


Étude de l'organisation de l'actine  
Dans le lamellipodium, filopodes et fibres  
retraitantes à l'arrière et à l'avant des cellules

# Corrélation FM et cryo-ET: marquage (or colloïdal + fluorescence) & QD

Filopode de keratinocyte

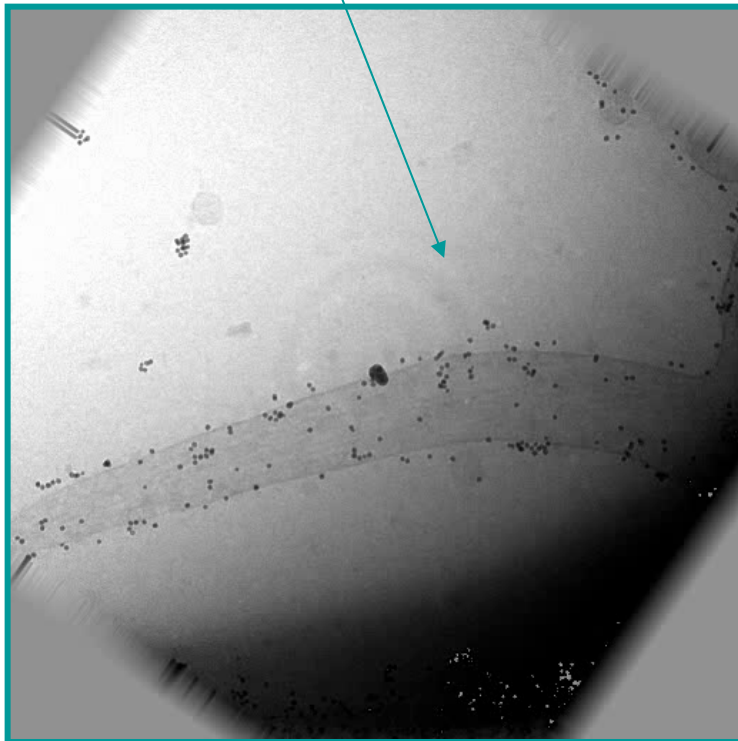
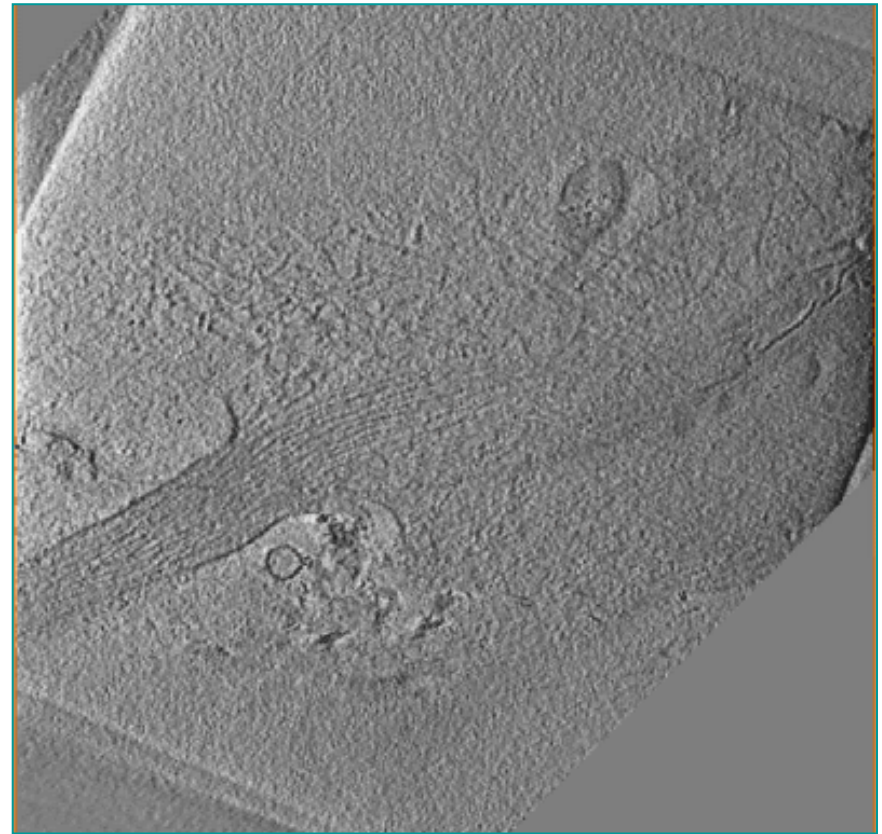
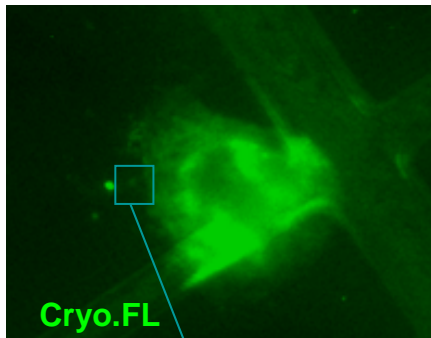
Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  intégrines  
(Ab conj. à 5 nm Au colloïdale/Alexa 488)



# Corrélation FM et cryo-ET: marquage (or colloïdal + fluorescence) & QD

Filopode de keratinocyte

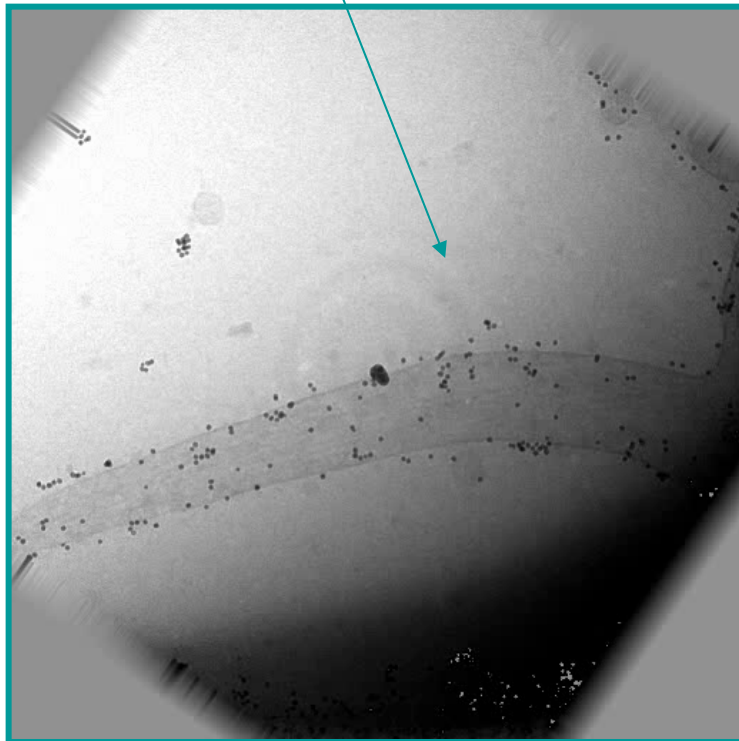
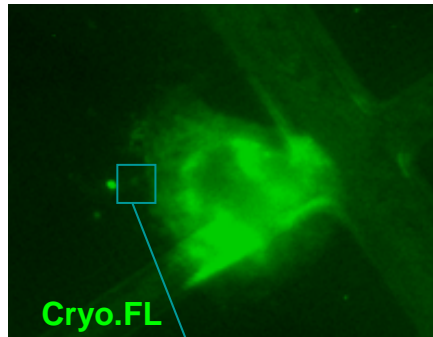
Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  intégrines  
(Ab conj. à 5 nm Au colloïdale/Alexa 488)



# Corrélation FM et cryo-ET: marquage (or colloïdal + fluorescence) & QD

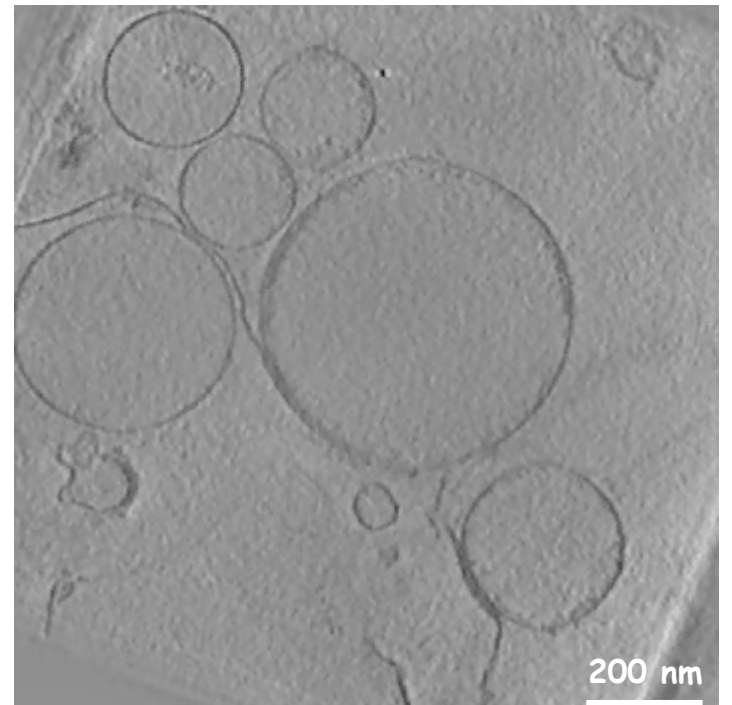
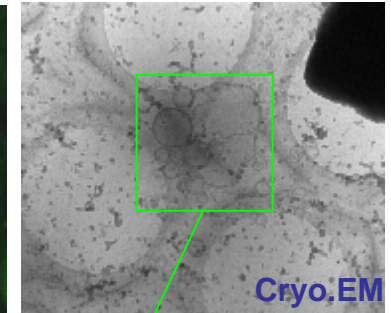
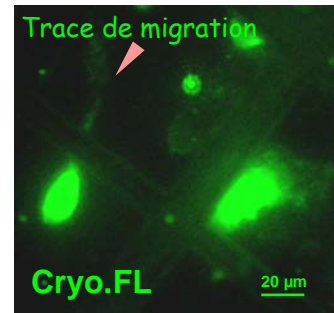
Filopode de keratinocyte

Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  integrines  
(Ab conj. à 5 nm Au colloïdale/Alexa 488)



Vesicules dans la trace de migration

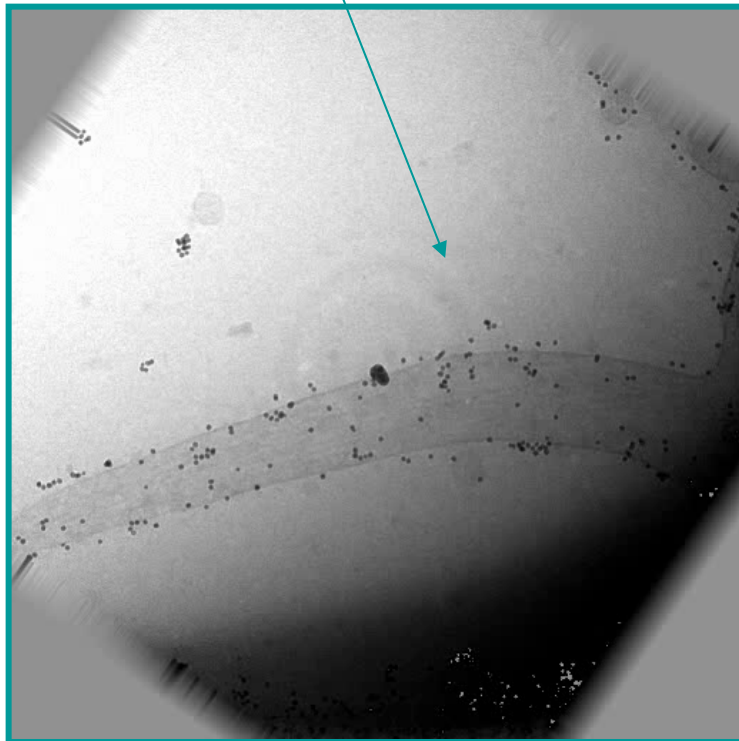
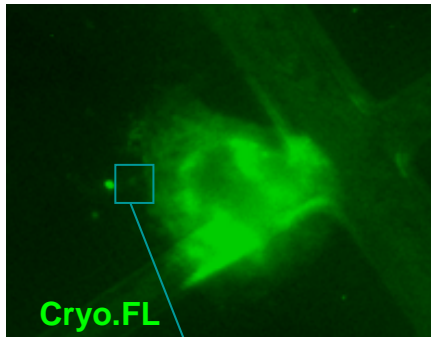
Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  integrines  
(Ab couplés à Quantum Dots 605 (Cd/Se))



# Corrélation FM et cryo-ET: marquage (or colloïdal + fluorescence) & QD

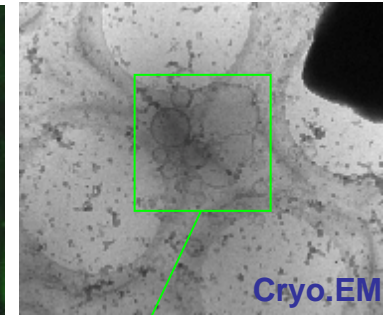
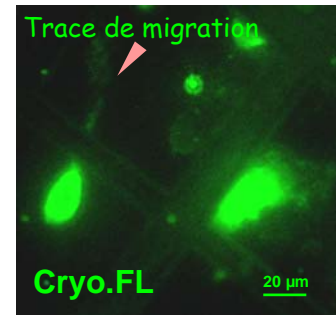
Filopode de keratinocyte

Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  integrines  
(Ab conj. à 5 nm Au colloïdale/Alexa 488)



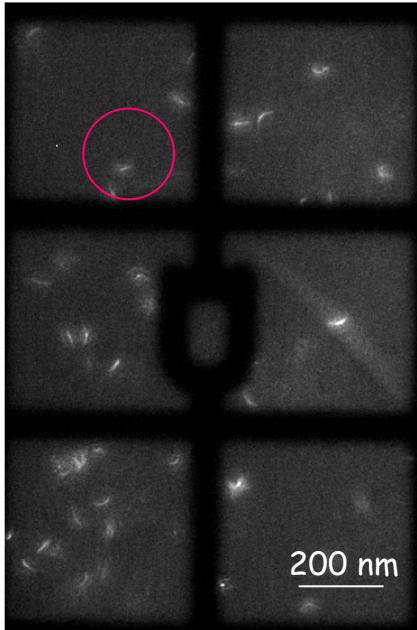
Vesicules dans la trace de migration

Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  integrines  
(Ab couplés à Quantum Dots 605 (Cd/Se))



# Corrélation FM et cryo-ET: transféction GFP de Plasmodium Berghei

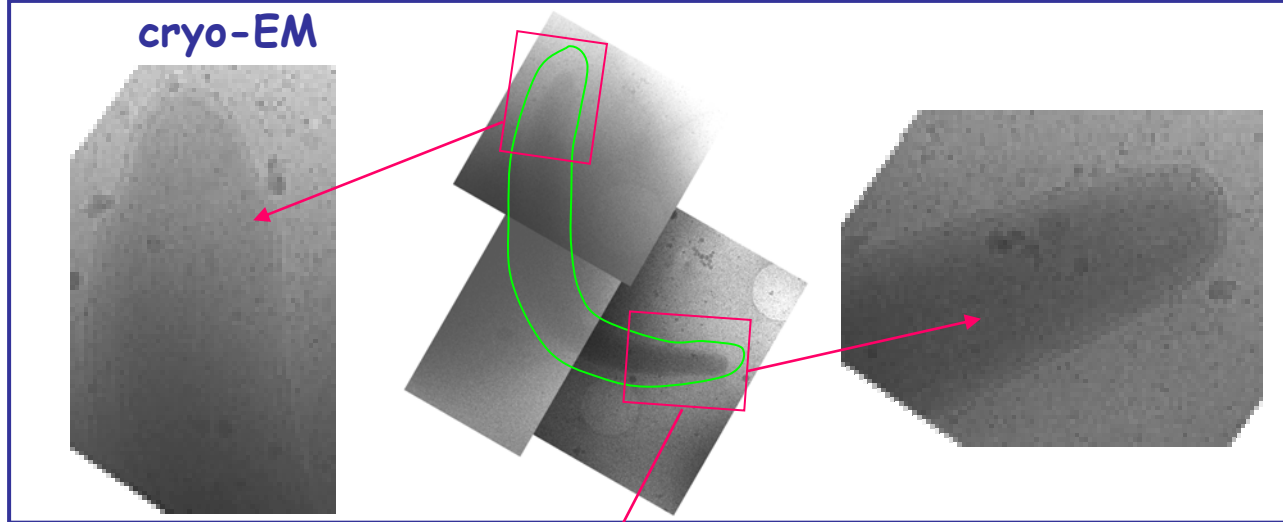
Vidéomicroscopie  
à fluorescence



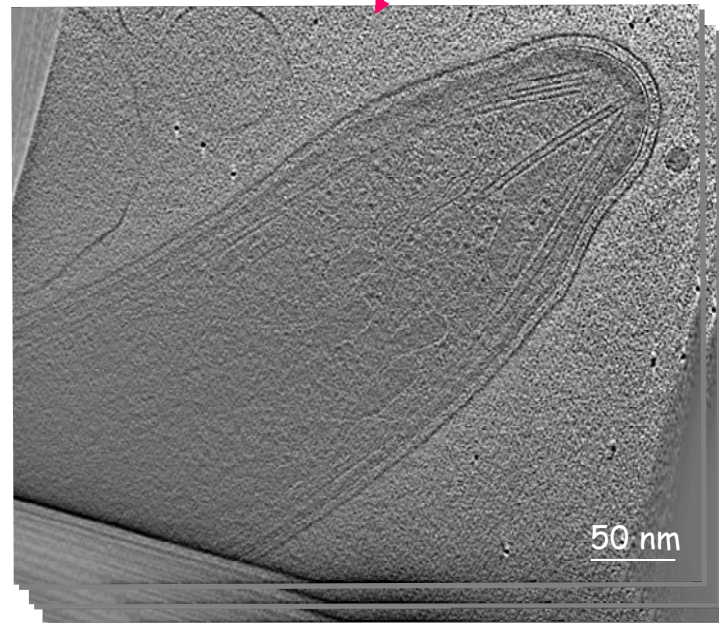
cryo-LM



cryo-EM



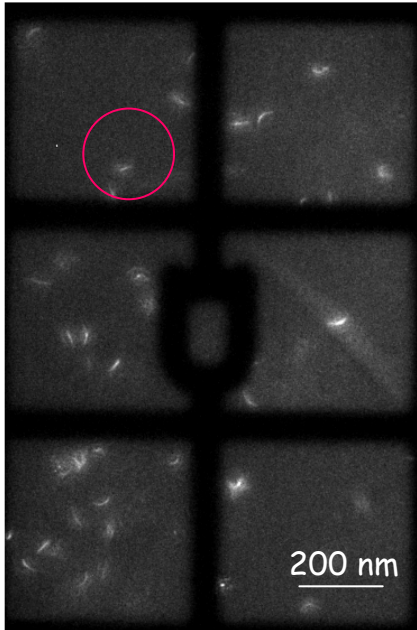
cryo-tomographie électronique



*Marek Cyrklaff & Friedrich Frischknecht*

# Corrélation FM et cryo-ET: transféction GFP de Plasmodium Berghei

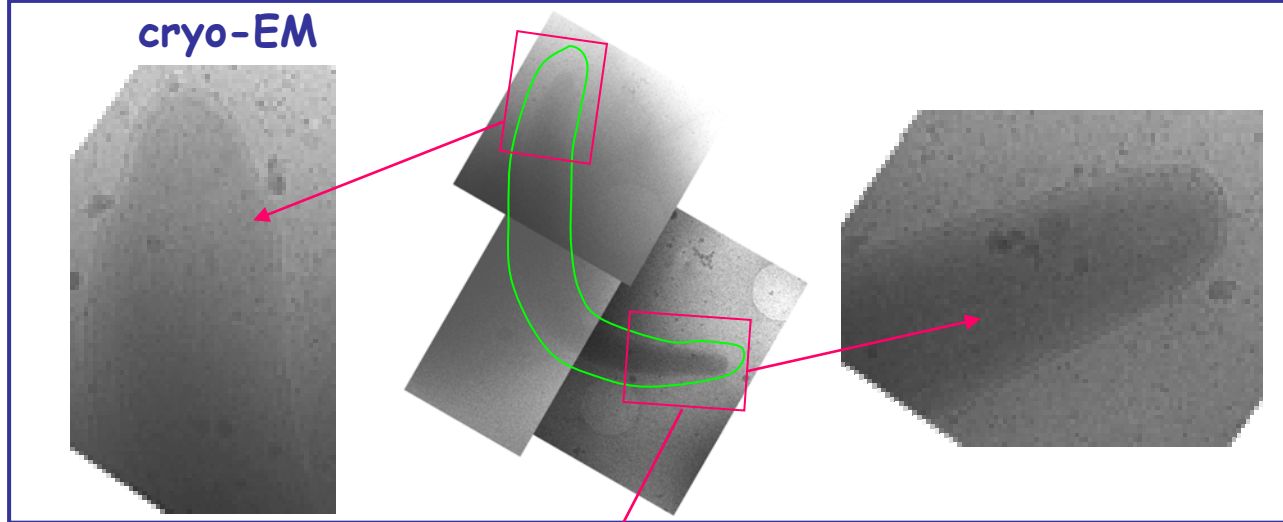
Vidéomicroscopie  
à fluorescence



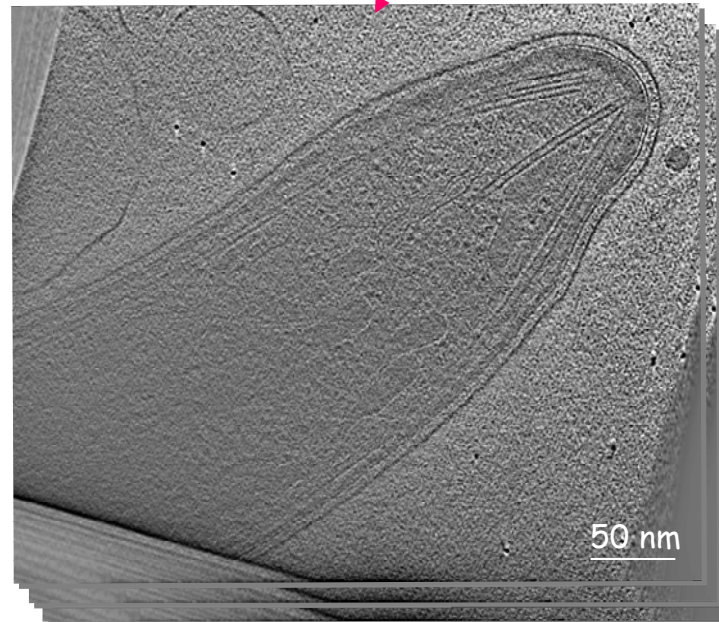
cryo-LM



cryo-EM

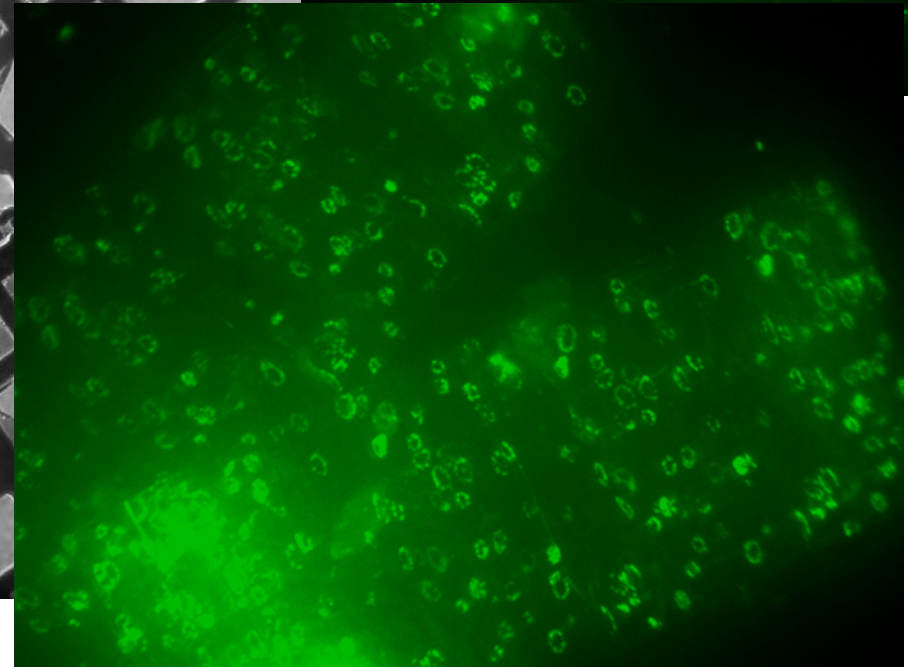
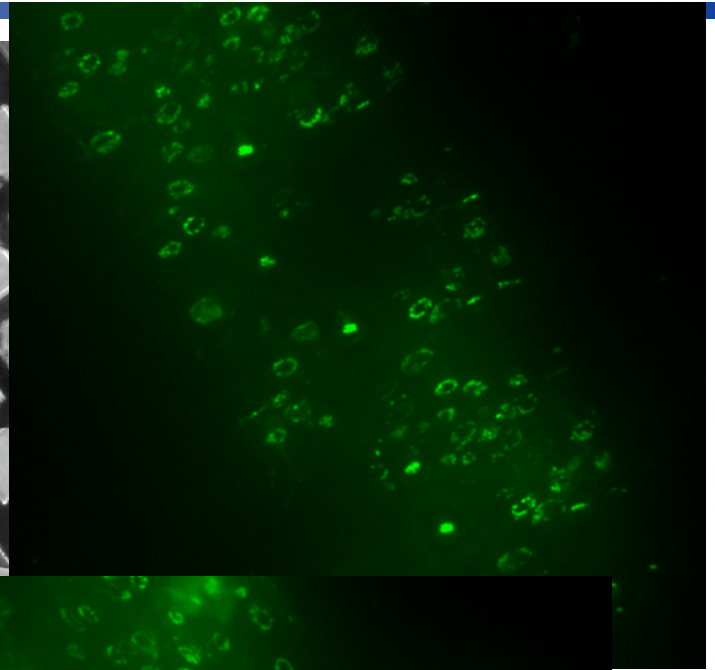
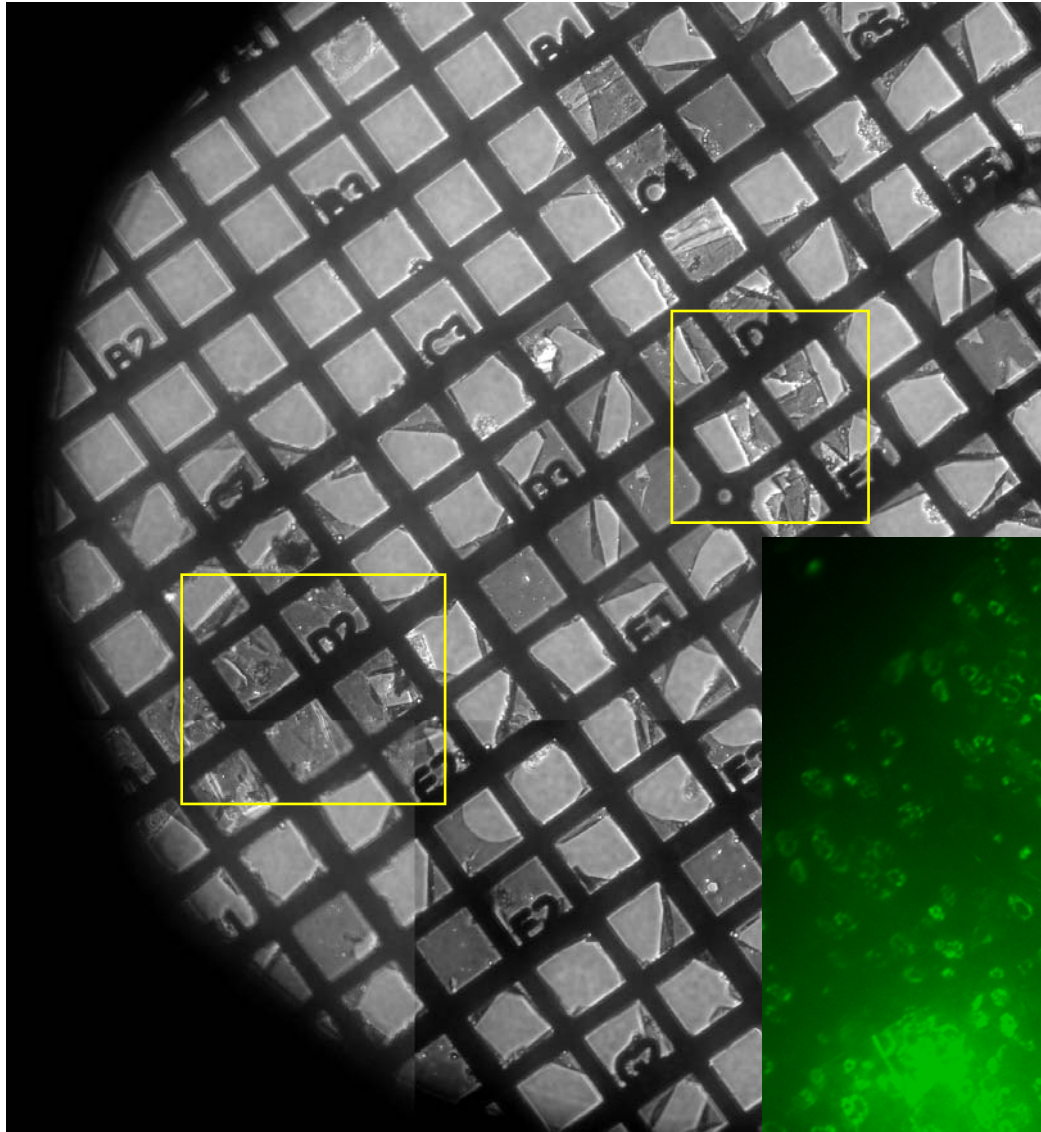


cryo-tomographie électronique



*Marek Cyrklaff & Friedrich Frischknecht*

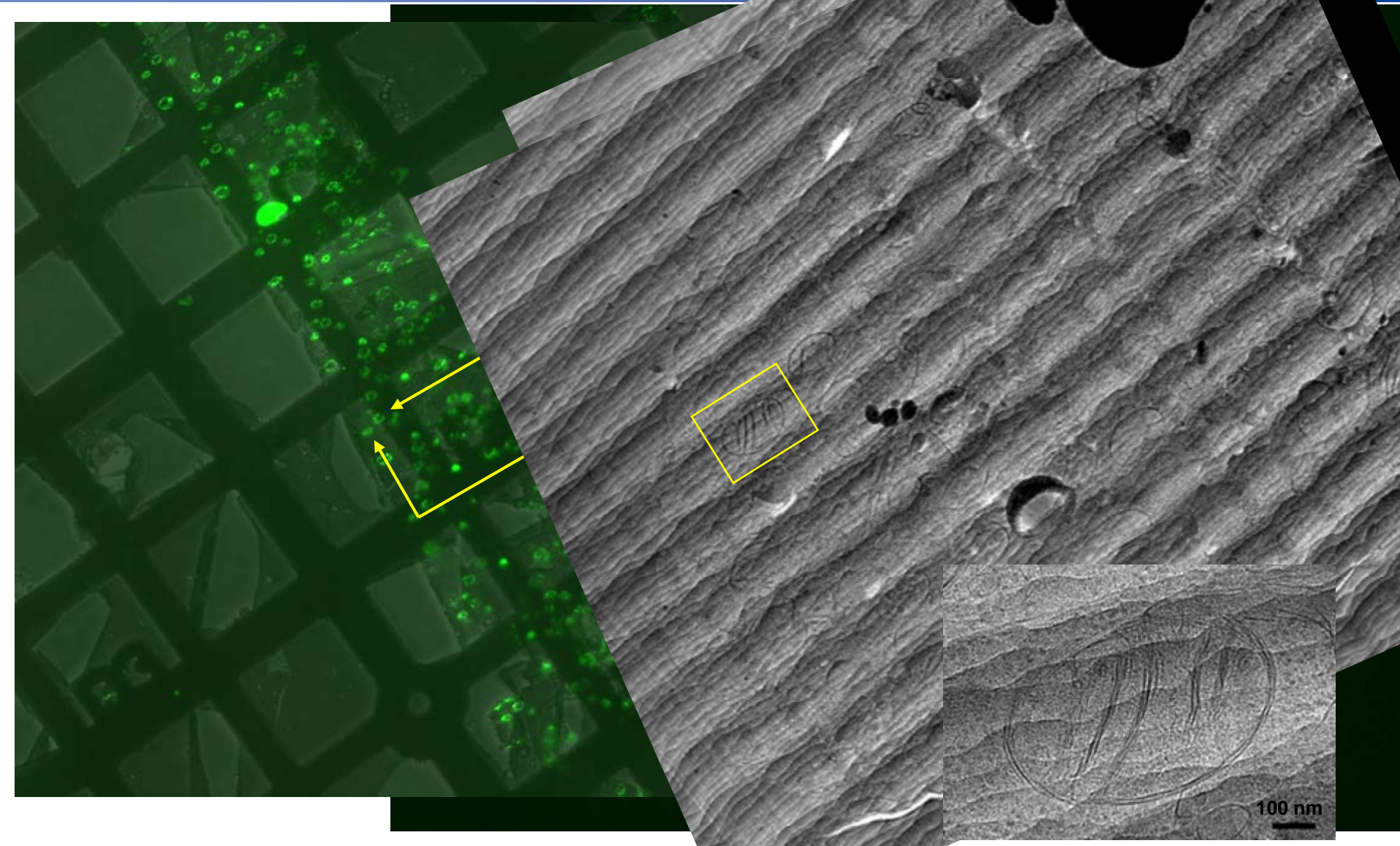
# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-coupes de cellules eucaryotes marquées



Marquage de mitochondrie  
sur cellules HL-1

*Andrew Leis & Manuela Gruska*

# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-coupes de cellules HL-1



Marquage de mitochondrie  
sur cellules HL-1

*Andrew Leis & Manuela Gruska*

# Plan de la Présentation

- Introduction à la cryo-Tomographie Électronique (cryo-ET)
- Corrélation: Microscopie à Fluorescence (FM) et cryo-ET
  - Méthode
  - Application à cellules intactes
- Conclusions et plans futurs



# Conclusions

## ➤ Etablissement d'une nouvelle méthode correlative entre la cryo-LM et la cryo-EM & ET

Nouvelle cryo-platine FM: identification de structures marquées à fluorescence sur échantillons vitrifiées  
transfert et récupération automatisée de positions en EM

## ➤ Résolution de cryo-LM and FM:

laterale  
~ 1  $\mu\text{m}$   
(glace fine)

- LWD objectives (N.A. réduite, max 40x avec N.A. = 0.55, théor. R ~0.5  $\mu\text{m}$ )
- Différence en indice de réfraction de glace amorphe par rapport à de milieux classiques
- Bruit de fond due aux non homogénéités & microcristaux dans la glace, surface inégale de la glace et adsorption non spécifique de la coloration et de l'or sur des grilles TEM
- Autofluorescence de cristaux de glace (contamination)
- Présence de deux lamelles de verre dans le parcours optique de fluorescence

co-localisation: • Ciblage de molécules unique marquées → besoin de marqueurs dense aussi e-  
~ 2-2.5  $\mu\text{m}$

# Plans Actuels et Futurs

- Développements supplémentaires de la cryo-platine pour utiliser objectifs à plus haute N.A.
- Denoising: déconvolution 2D and 3D (de z-stacks), confocale
- Gamme plus vaste d'applications de sondes pour la microscopie corrélative (ex. QDs)
- Application de la microscopie corrélative à:
  - *ciblage de synapses* sur des cultures neuronales primaires (marquage en vivant de terminaux pre & post-synaptiques)
  - *Organisation de l'actine* dans le cytosquelette et dans les fibres retraitantes de keratinocytes et dans les neurites de cellules NG108
  - *cryo-coupes* de cellules
  - GFP transféction de l'actine dans le *Plasmodium* (traitement au Jasplakinolide)

# Remerciements

*Max Planck Institut de Biochimie*

*Département de Biologie Moléculaire Structurale, Munich, Allemagne*

Chefs de projet: Wolfgang Baumeister et Jürgen Pitzko

Cryo-platine: Rudolf Gatz

Neurones: Vladan Lucic et Marek Cyrlaff

Plasmodium: Marek Cyrlaff et Friedrich Frischknecht (Un. de Heidelberg)

Progr. MatLab: Florian Beck

Cryo-coupes: Andrew Leis et Manuela Gruska

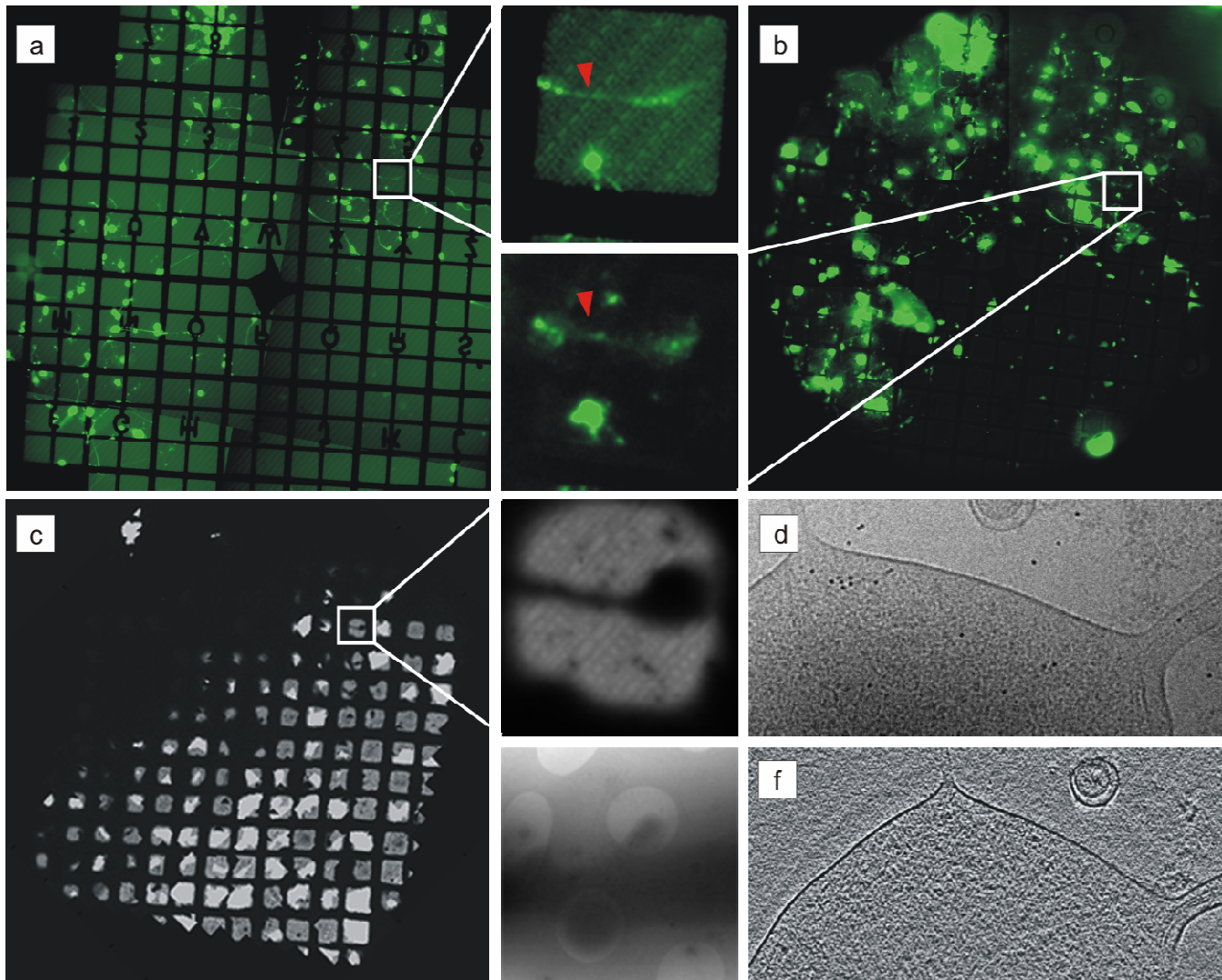
Keratinocytes: Alexander Rigort





# Corrélation FM et cryo-ET: ciblage de neurites

Cellules neuroblastoma NG108, grandies sur grilles TEM recouvertes de laminin

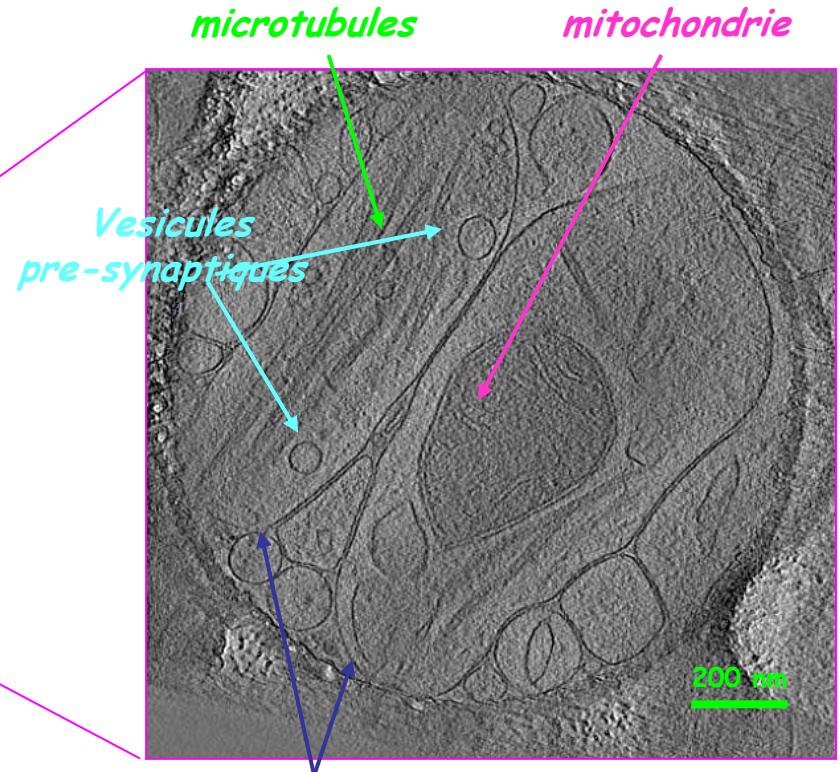
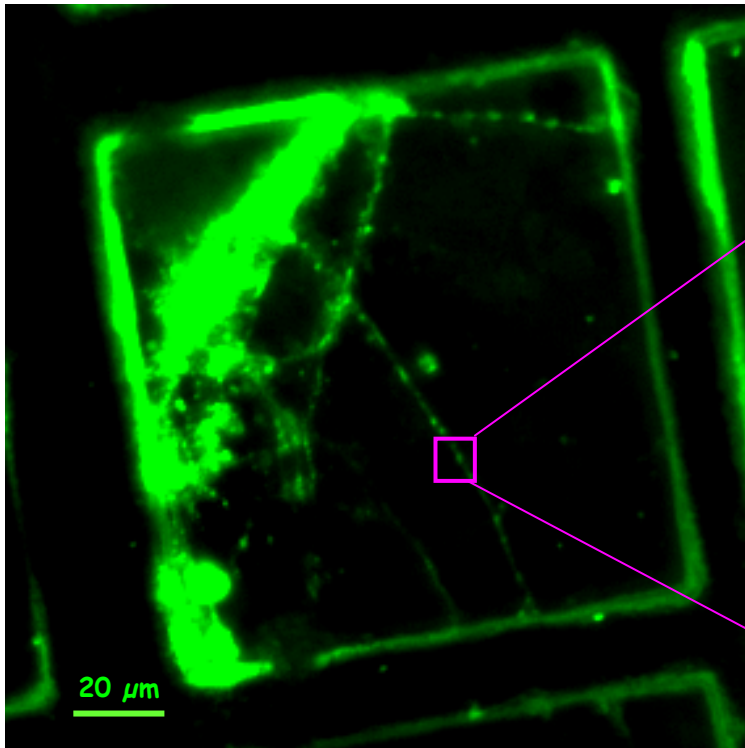


# Corrélation FM et cryo-ET: ciblage de terminaux pre-synaptiques

Cultures primaire de neurones, grandies sur grilles TEM recouvertes de polylysine

Cryo-FM

Cryo-ET:  
Récupération des structures marquées fluo



FM1-43: marquage de vésicules pre-synaptiques

*Varicosités Neuronales*

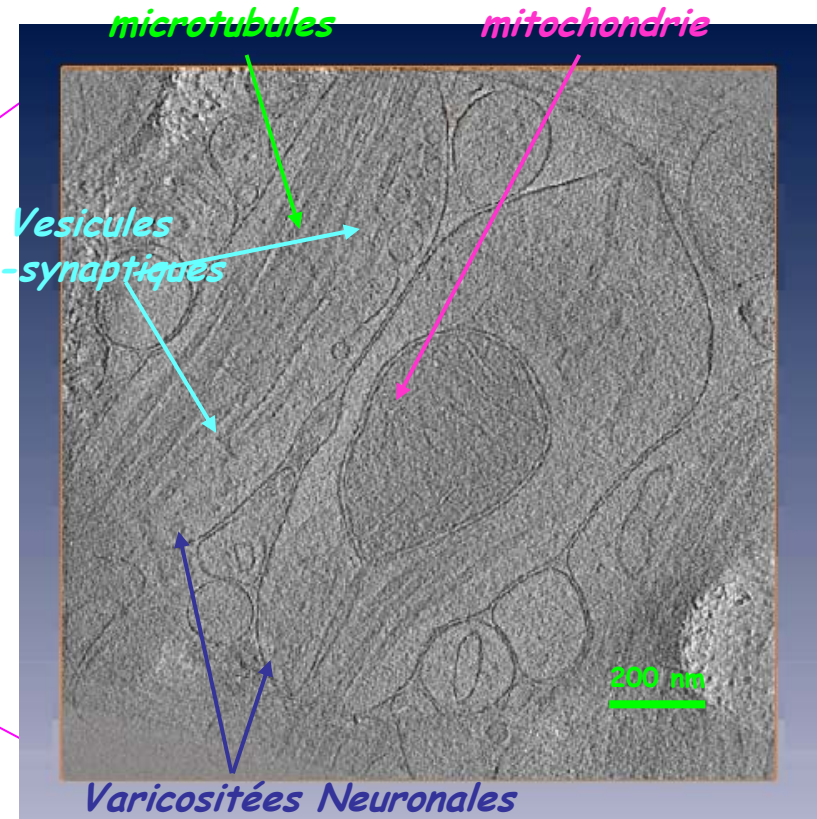
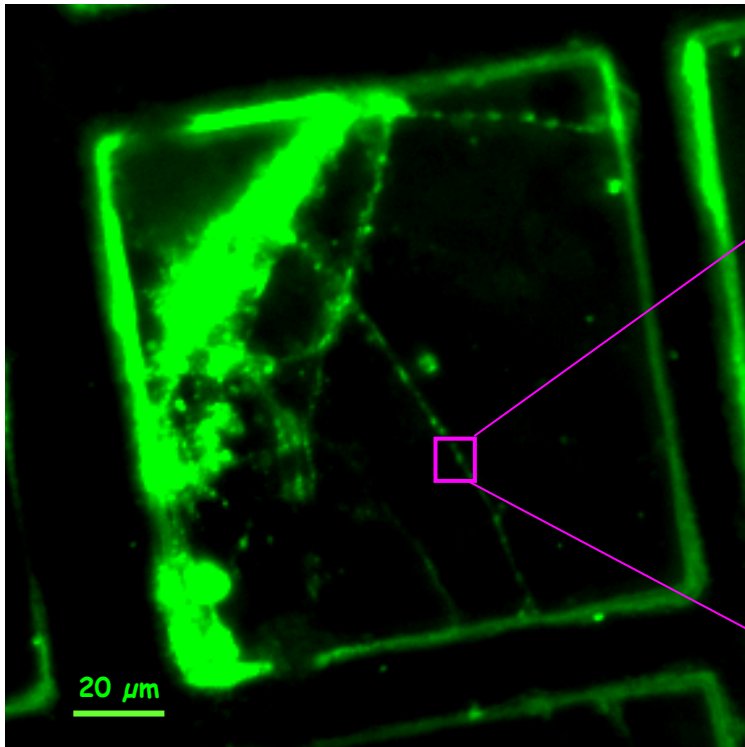
(en coll. avec Vladan Lucic)

# Corrélation FM et cryo-ET: ciblage de terminaux pre-synaptiques

Cultures primaire de neurones, grandies sur grilles TEM recouvertes de polylysine

Cryo-FM

Cryo-ET:  
Récupération des structures marquées fluo



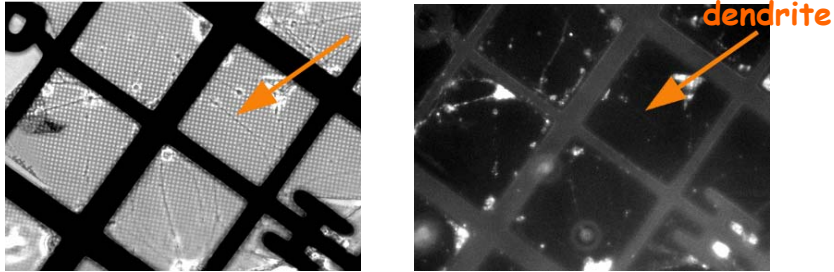
FM1-43: marquage de vésicules pre-synaptiques

(en coll. avec Vladan Lucic)

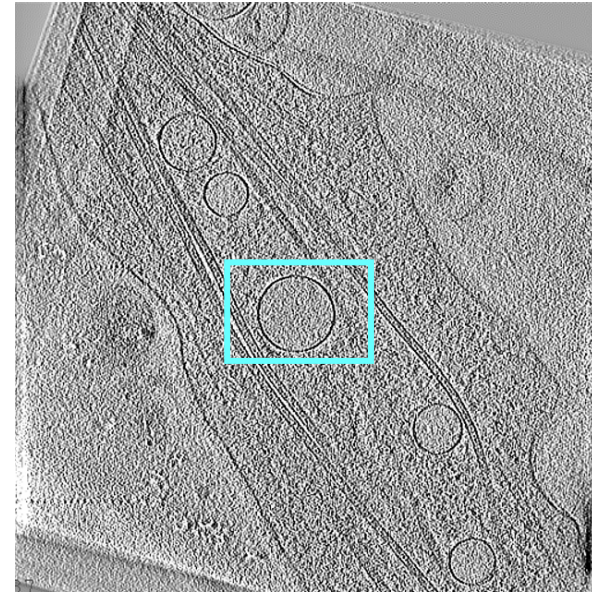
# Corrélation FM et cryo-ET: ciblage de terminaux pre-synaptiques

Cultures primaire de neurones, grandies sur grilles TEM recouvertes de polylysine

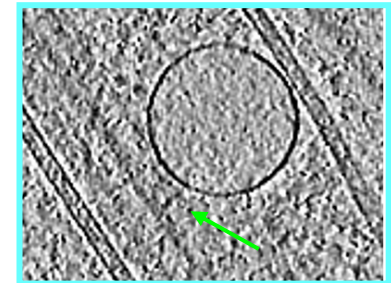
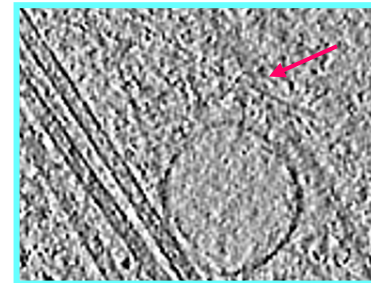
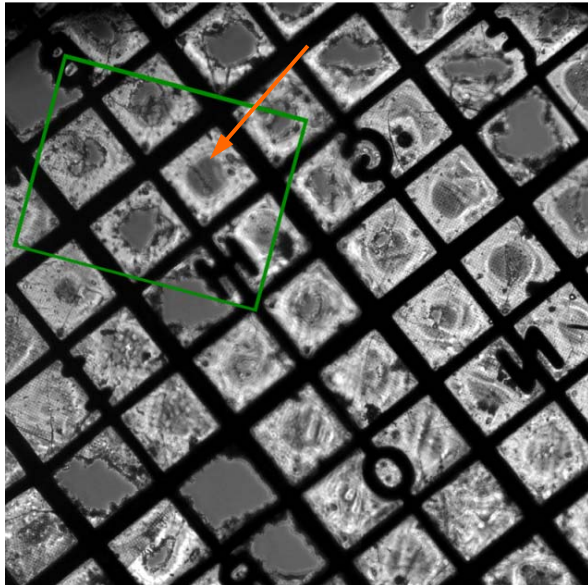
LM & FM



Cryo-ET



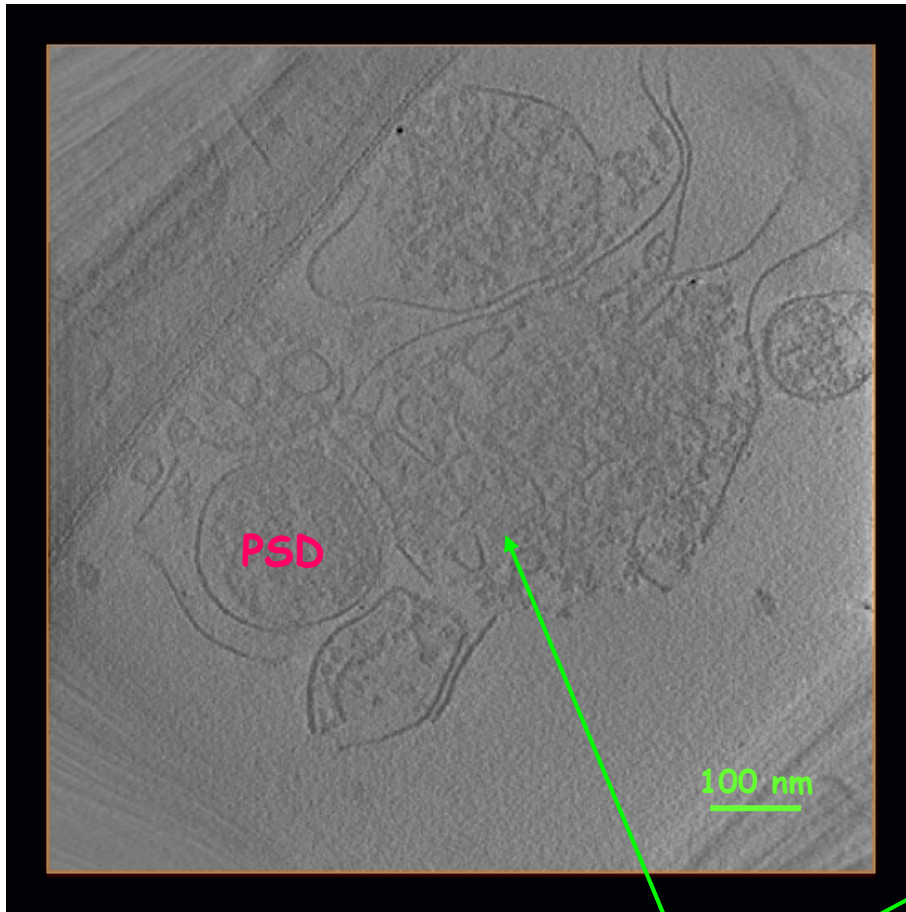
Cryo-Ph



(en coll. avec Vladan Lucic)

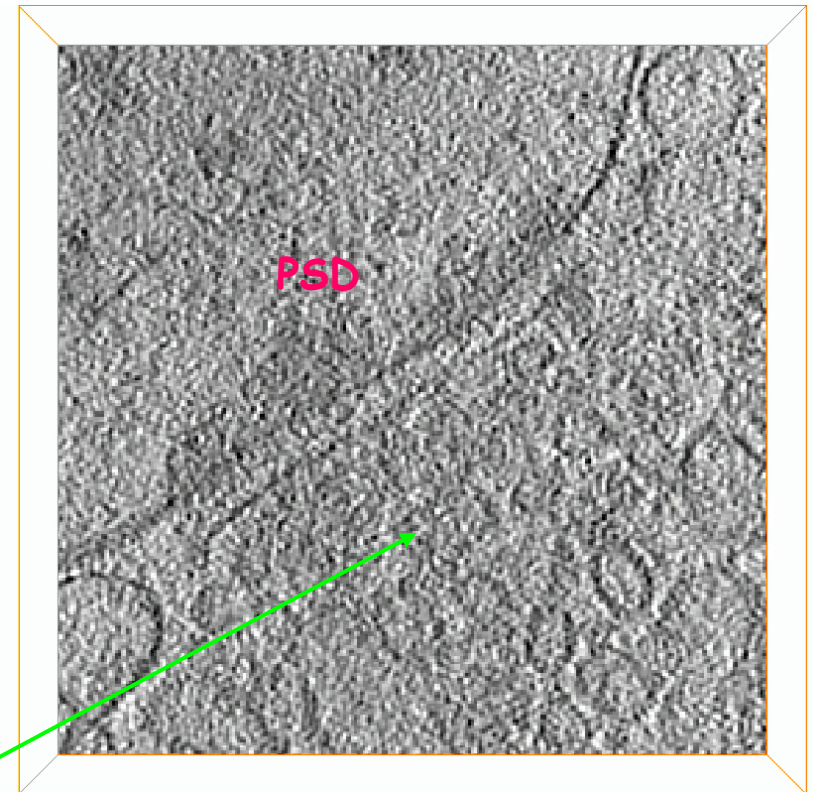
# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-ET de synapses dans le synaptosome

Cryo-ET de synapses dans le synaptosome (fraction synaptique)



Terminal pre-synaptique  
(vésicules)

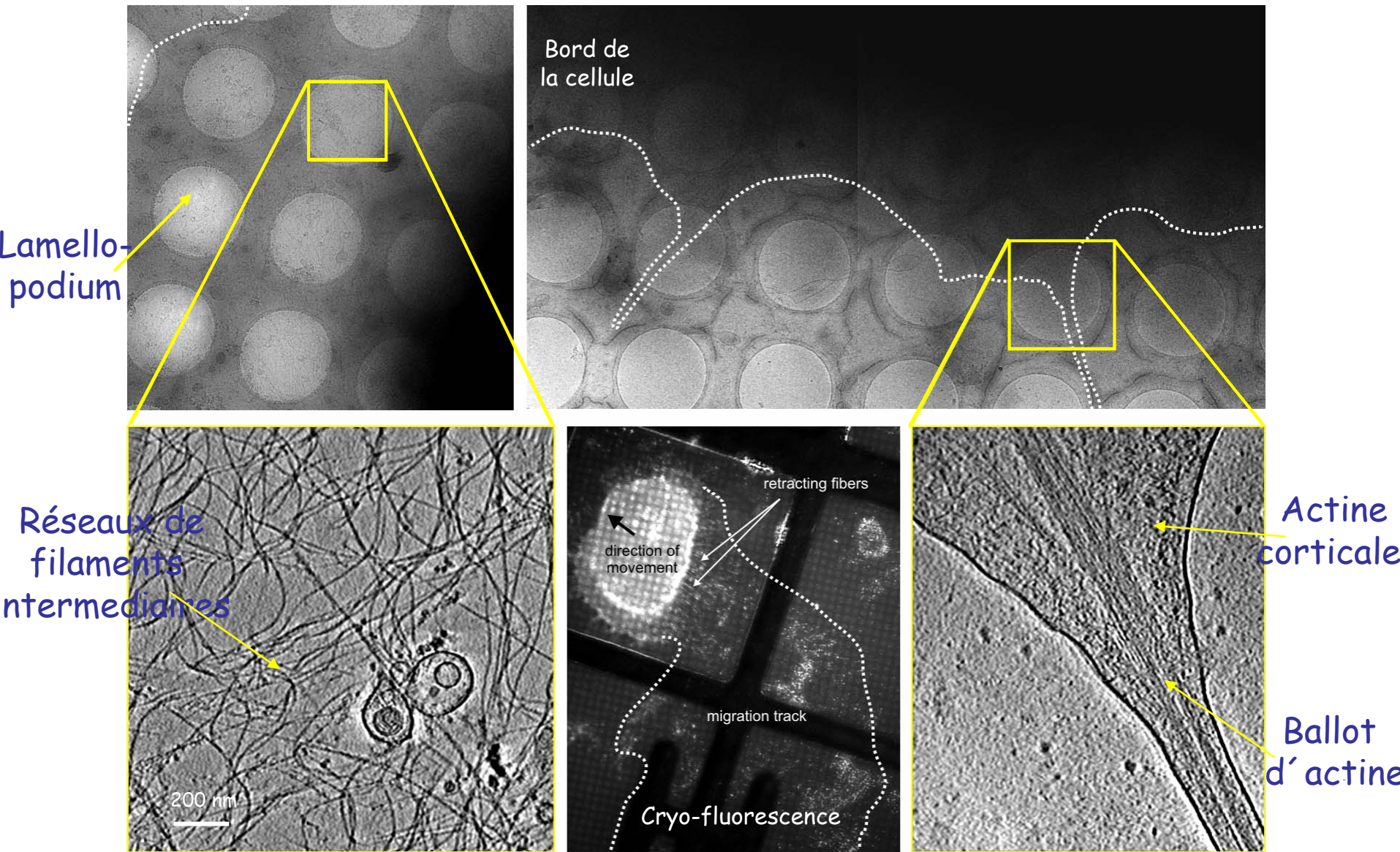
Terminal post-synaptique  
(densité post-synaptique PSD)



(en coll. avec Vladan Lucic)

# Corrélation FM et cryo-ET: Cytosquelette de keratinocytes

Cultures primaires de keratinocytes, immunomarquage de  $\beta 1$  integrines avec Alexa488

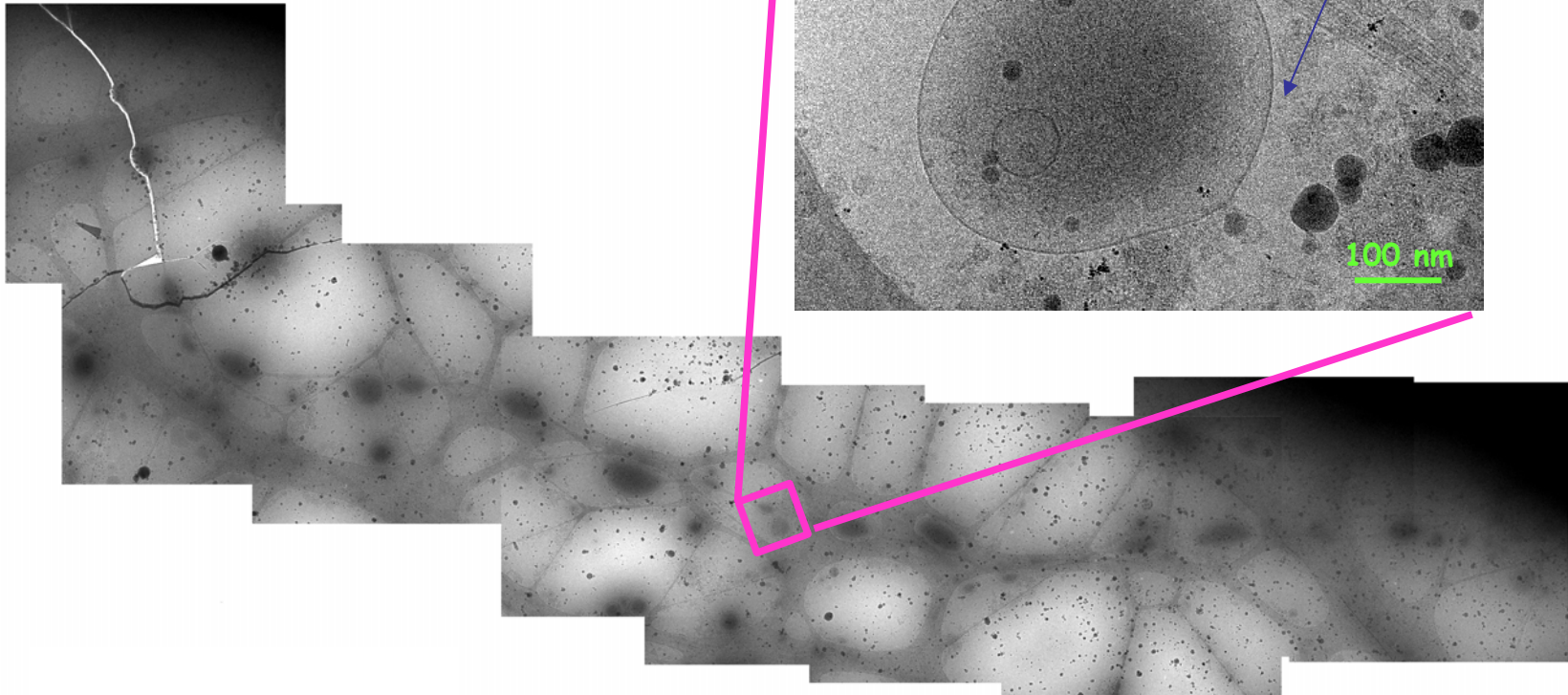
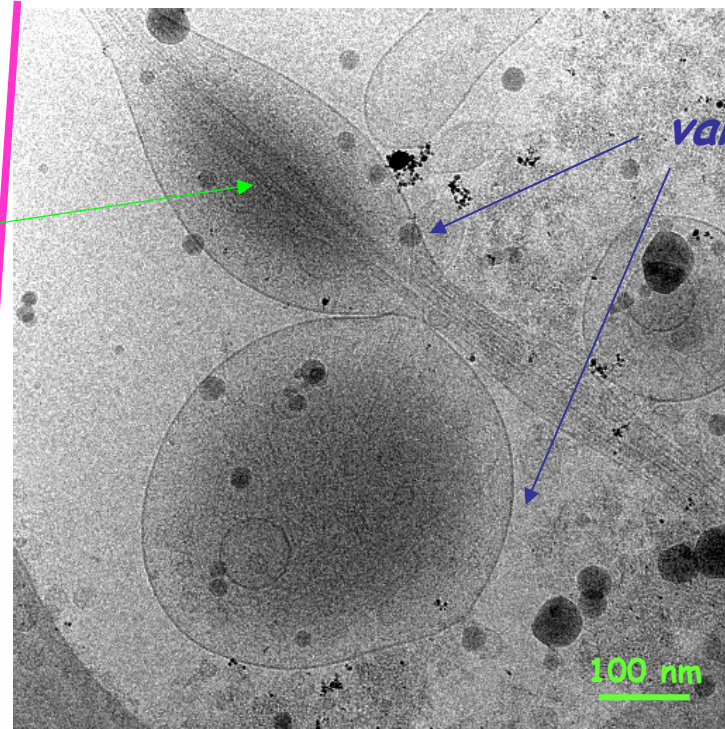


# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-EM de neurites

-Long neurites mais pas de synapses

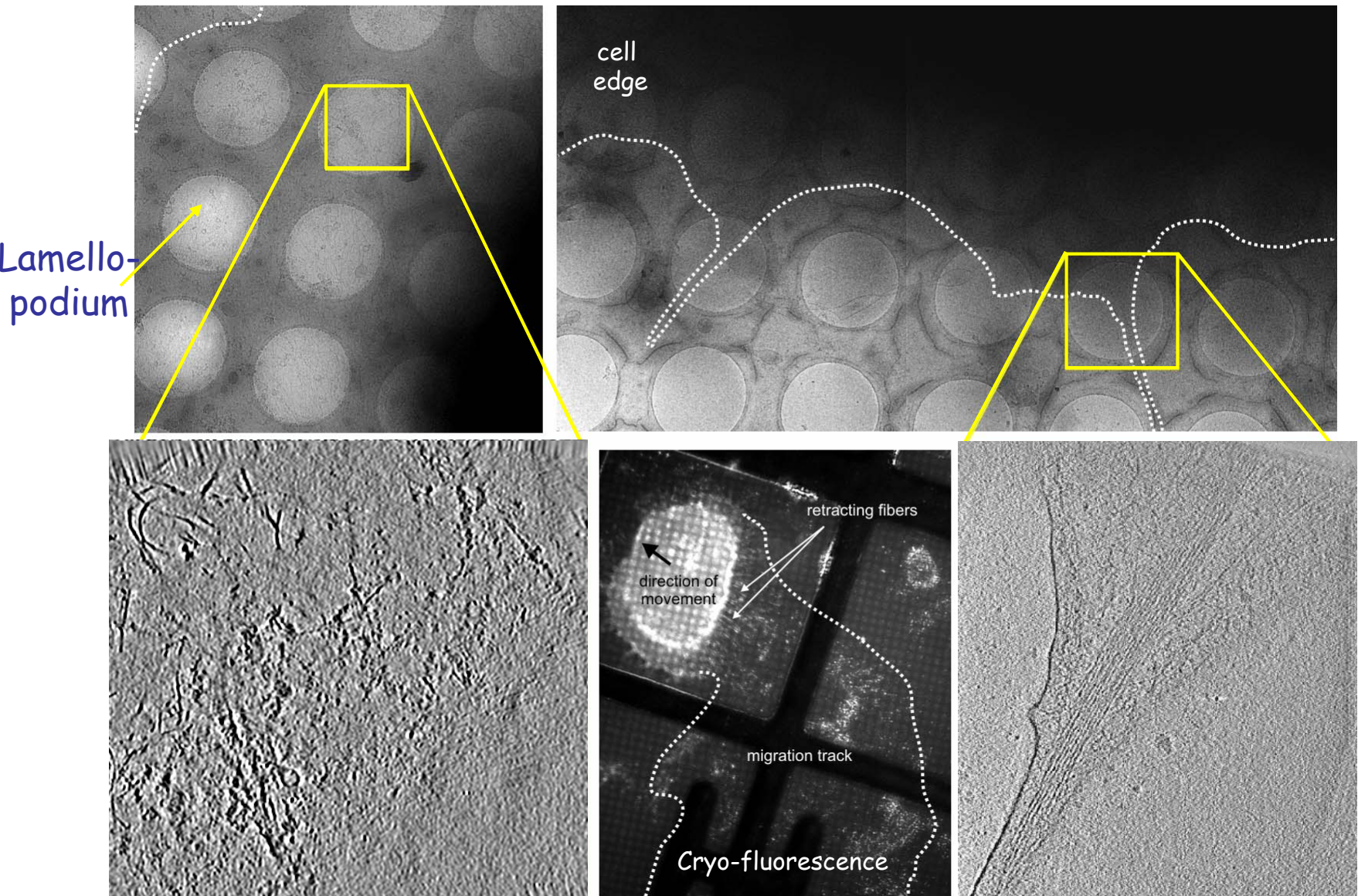
*microtubules*

*varicosités*



# Correlating FM and cryo-ET: Cytoskeleton organisation in keratinocytes

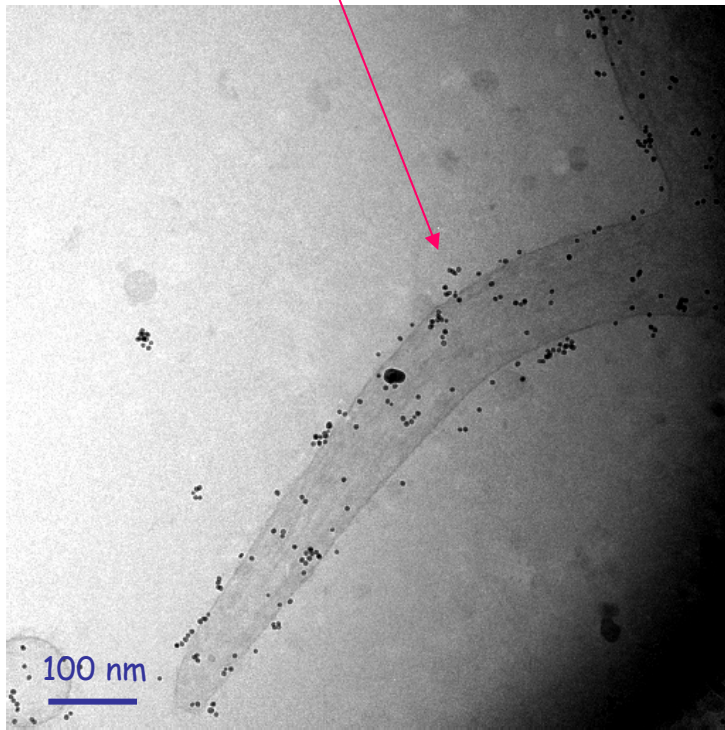
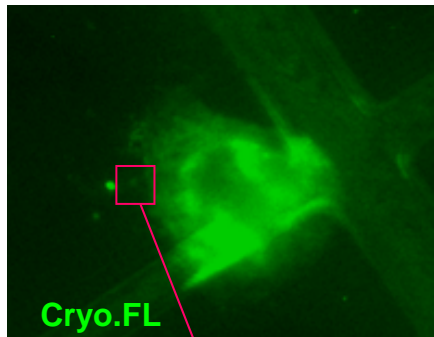
Primary Keratinocytes immunolabelled against  $\beta 1$  integrins with Alexa488



# Corrélation FM et cryo-ET: marquage (or colloïdal + fluorescence) & QD

Filopode de keratinocyte



Immunomarquage vivant de  $\beta 1$  intégrines  
(Ab conj. à 5 nm Au colloïdale/Alexa 488)

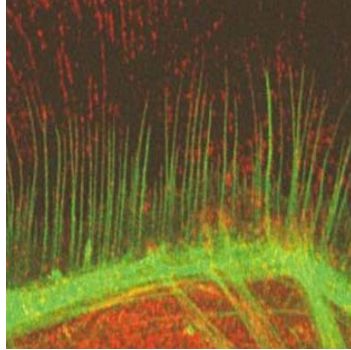


# Correlating FM and cryo-ET: Cryo-ET of actin bundle in retracting fibres

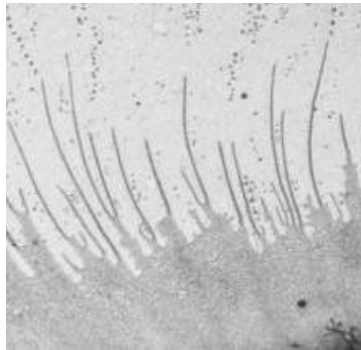
## Cryo-TEM

Immuno-fluorescence on fixed cells

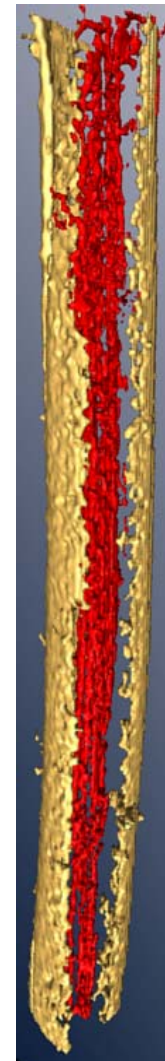
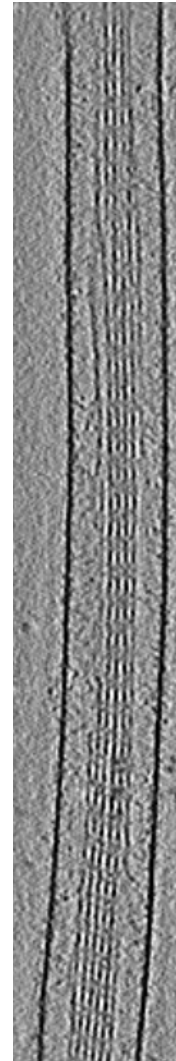
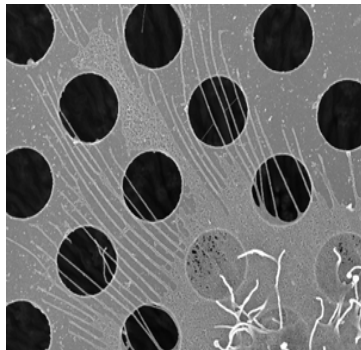
 Alexa-488-phalloidin  
 Anti- $\beta_1$  integrin Ab



TEM  
neg. stain

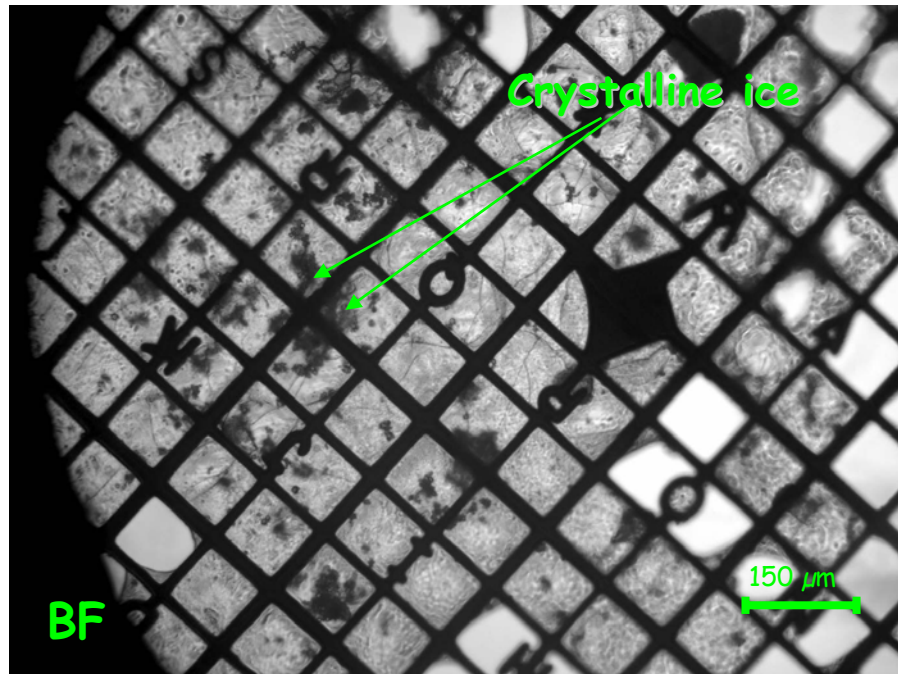


SEM



# Correlating FM and Cryo-ET: Check Sample Quality and ice thickness

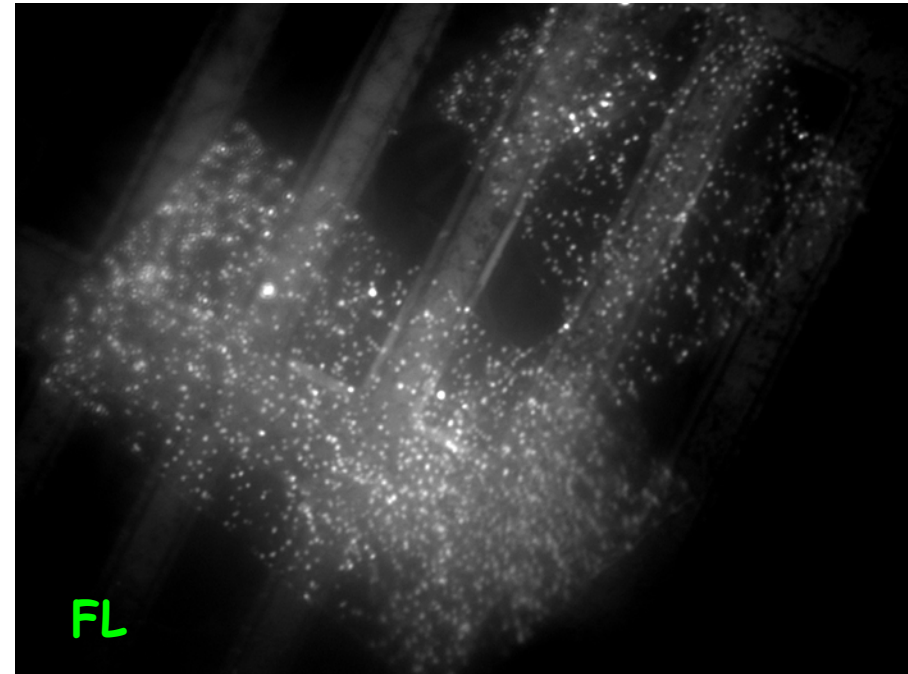
Estimate ice thickness by light transmission measurements



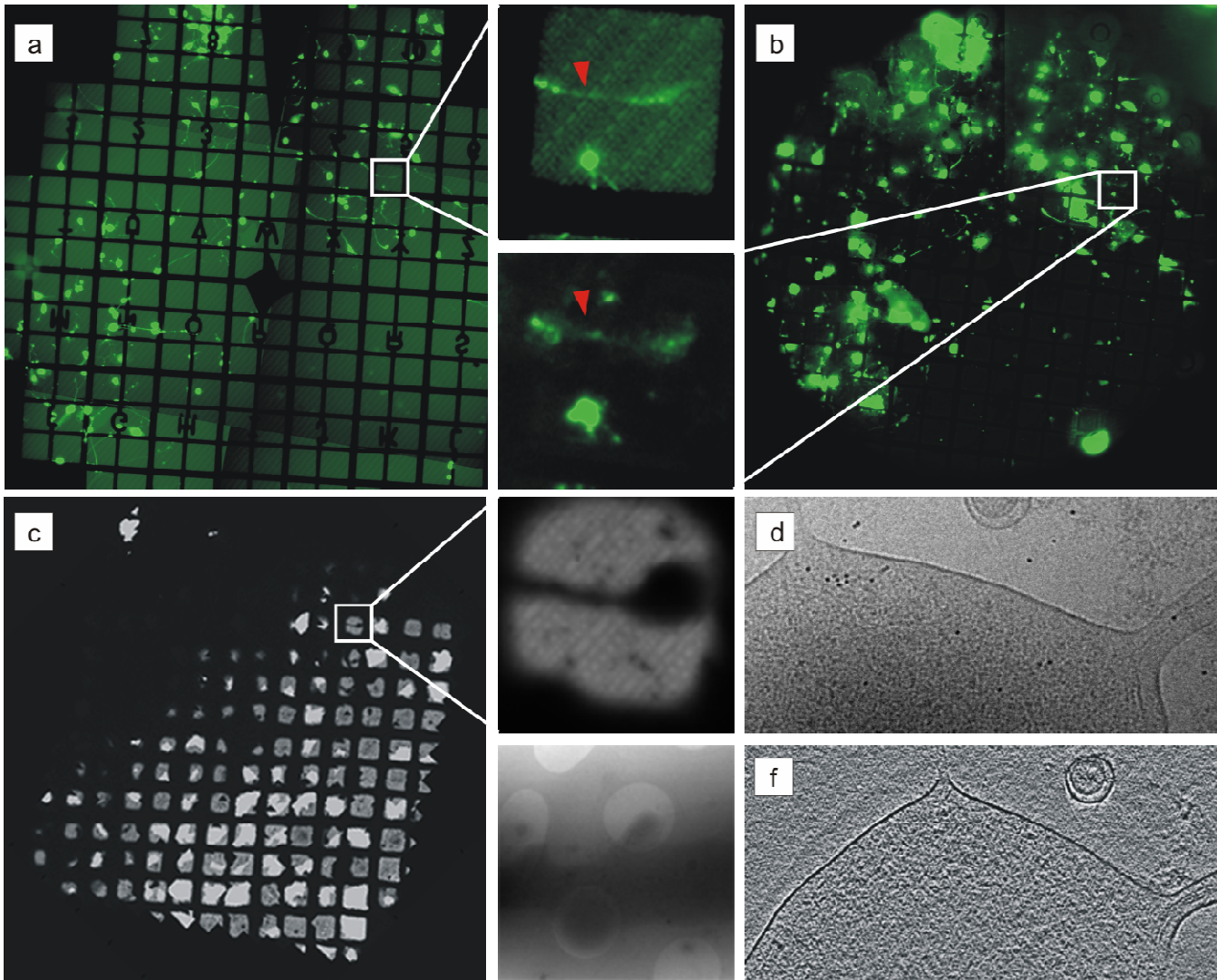
Neurons vitrified in thick ice (no transmission in EM) and ice contamination.

Estimated thickness of the ice  $\sim 70 \mu\text{m}$

Cryo-FM: cryo-sections of autofluorescent alga  
- 100 nm thick -

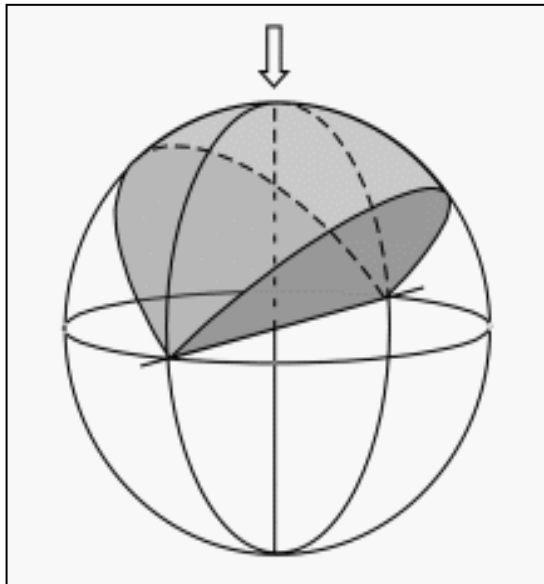


Estimated thickness of the ice  $< 1 \mu\text{m}$



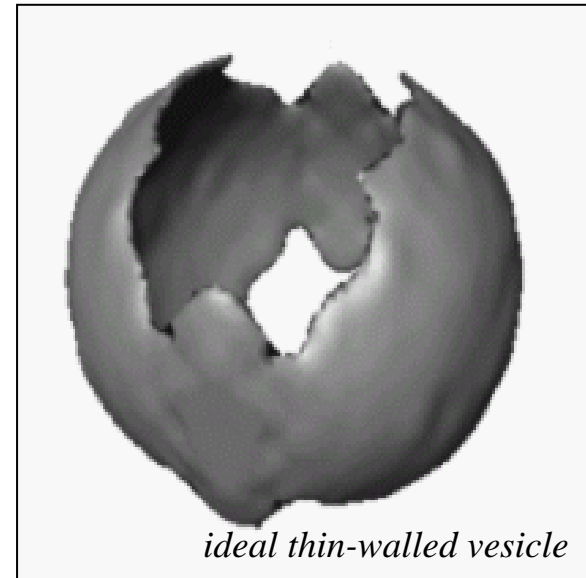
# Missing wedge

Fourier space



- limited tilt range  
(here  $\pm 60^\circ$ , max  $\pm 75^\circ$ )
- full angular range ( $180^\circ$ ) not accessible

Real space



- artifacts from missing information during reconstruction
- elongation of structures along z
- blurring of the object boundaries

# Resolution and weighting

## Crowther criterion

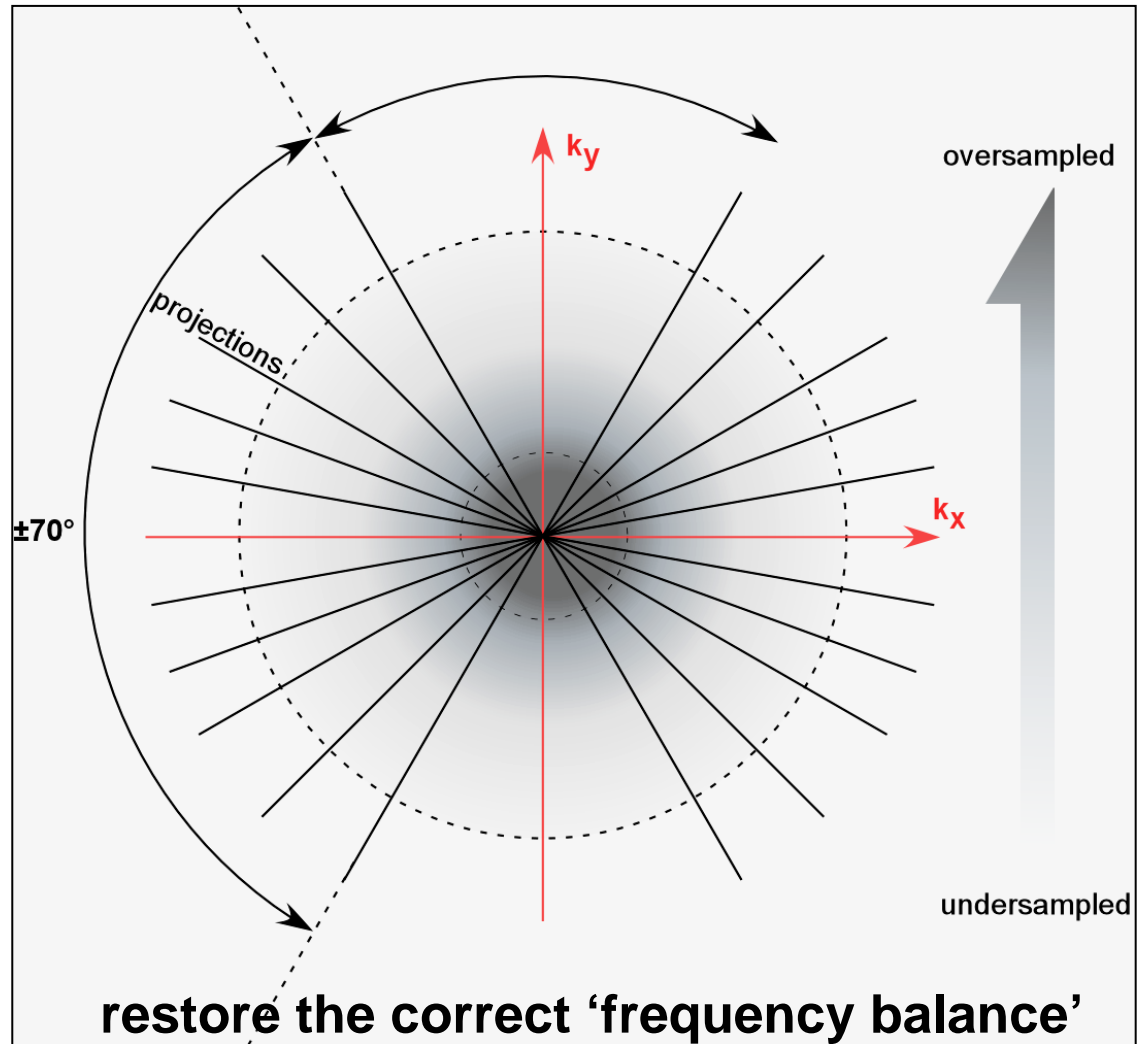
$$d_y = \pi \cdot \frac{D}{N}$$

## Elongation factor

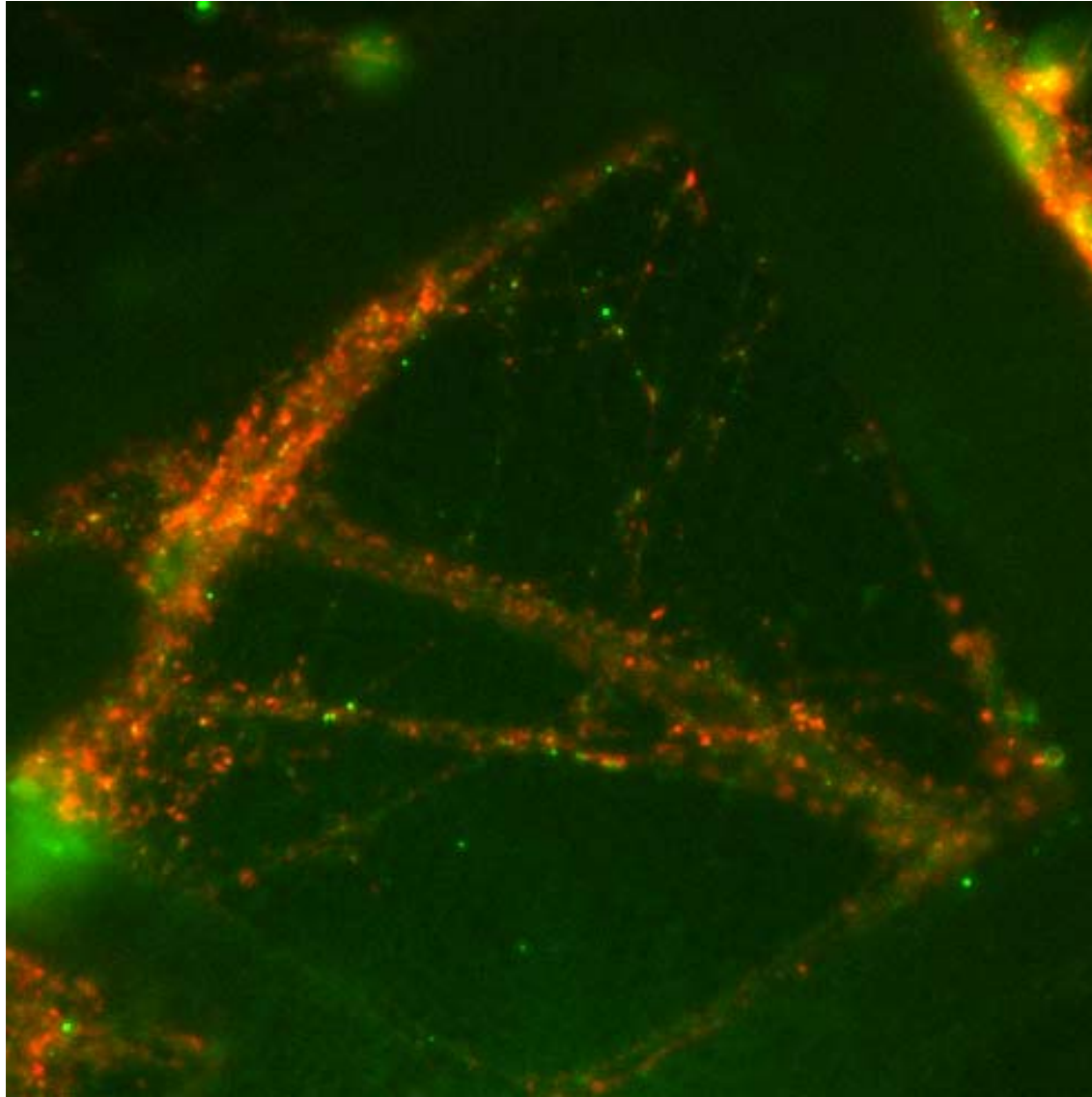
$$e_{yz} = \sqrt{\frac{\alpha + \sin \alpha \cdot \cos \alpha}{\alpha - \sin \alpha \cdot \cos \alpha}}$$

$$d_z = d_y \cdot e_{yz}$$

->Anisotropic resolution



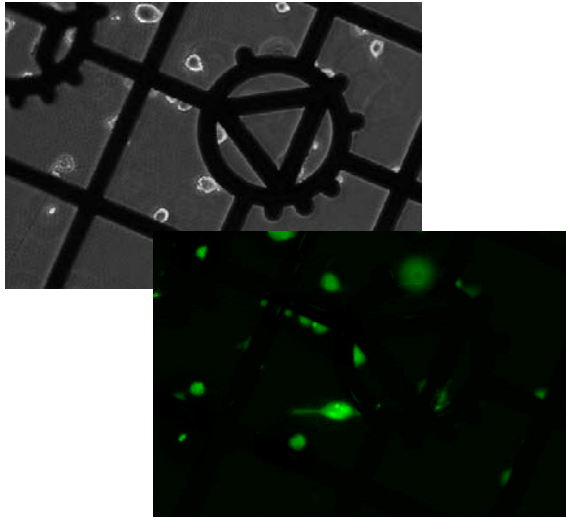
# Correlating FM and Cryo-ET: Targeting of pre- & post-synaptic terminals



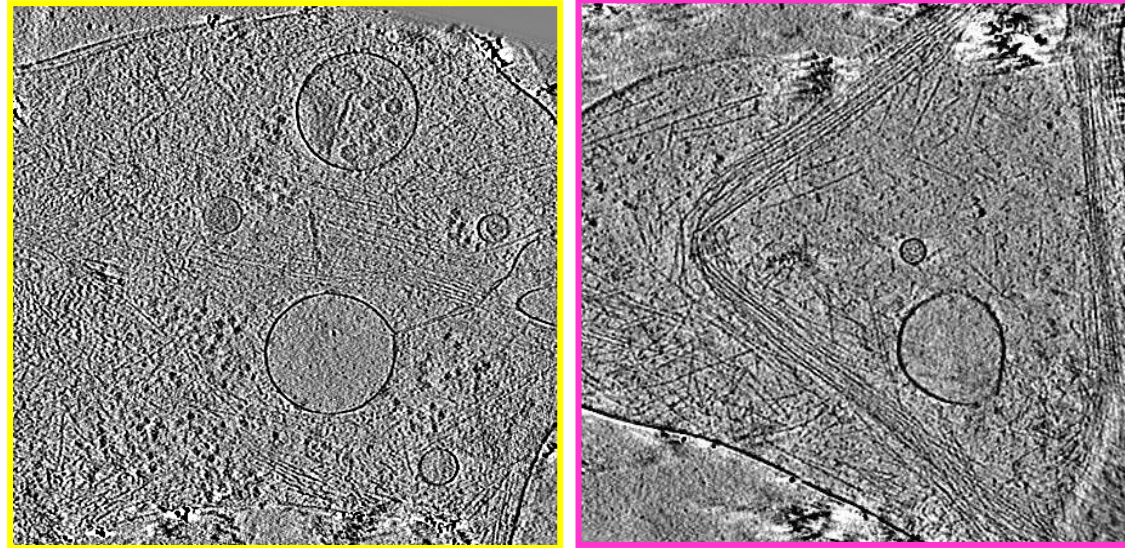
# Correlating FM and cryo-ET: Recover position of interest in cryo-EM

## 2. Culture of NG108 neuroblastoma cell line grown on a TEM grid: label with Fura

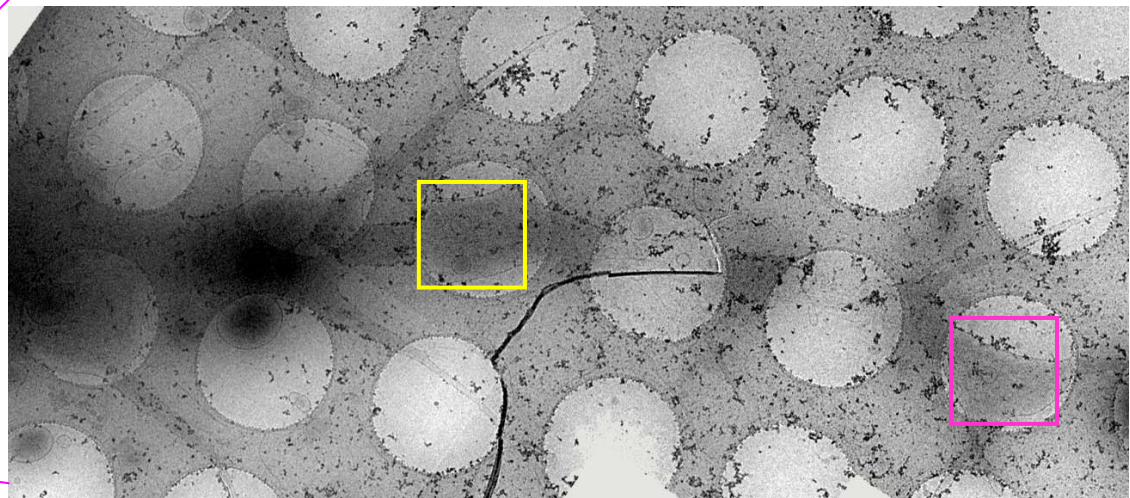
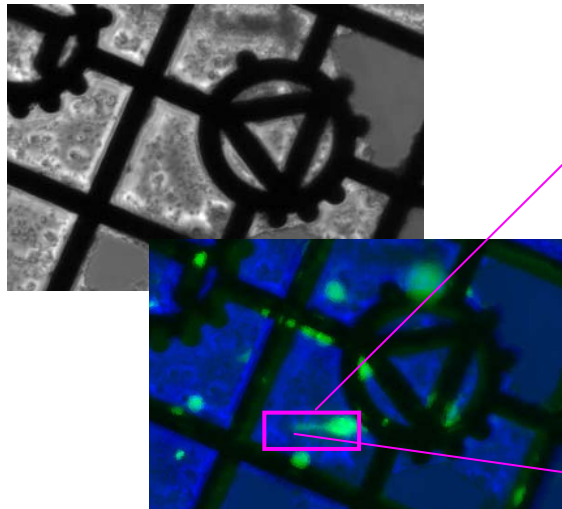
PhC & FM: scan of grid



Cryo-ET: recovery of fluorescently labelled structure



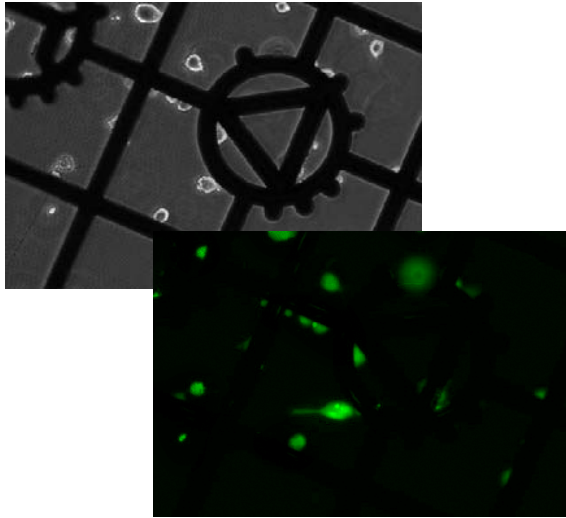
Cryo-PhC & FM: scan of grid



# Correlating FM and cryo-ET: Recover position of interest in cryo-EM

## 2. Culture of NG108 neuroblastoma cell line grown on a TEM grid: label with Fura

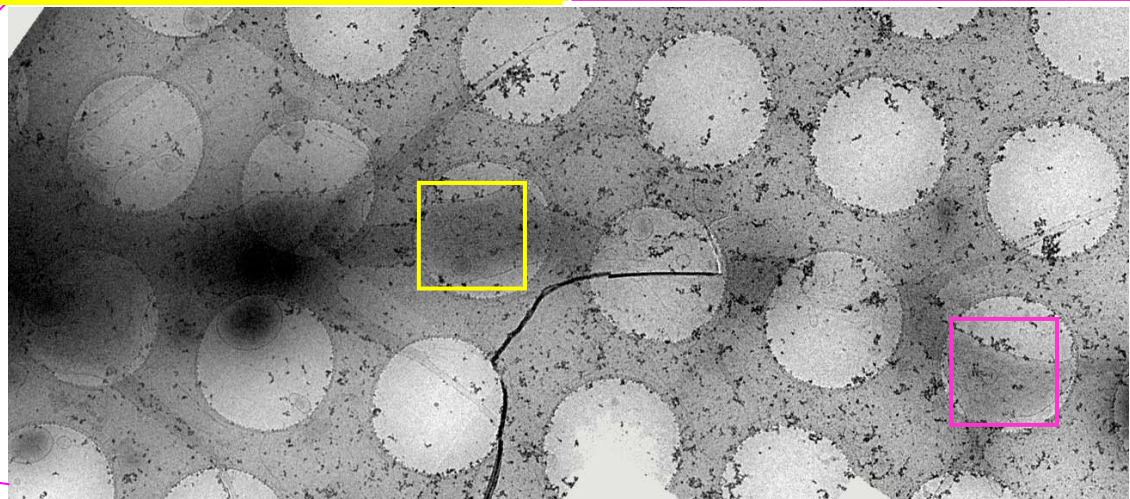
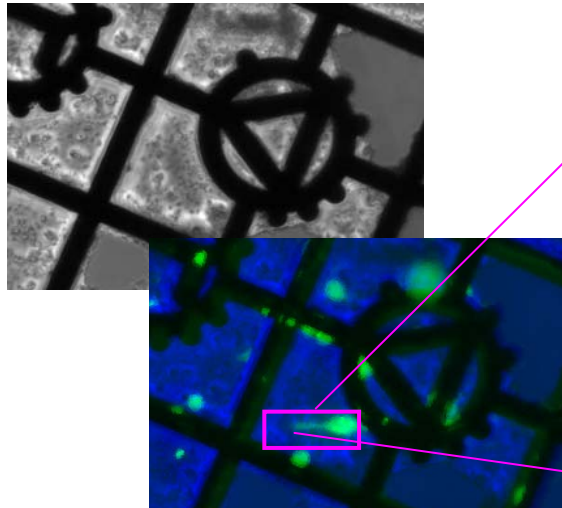
PhC & FM: scan of grid

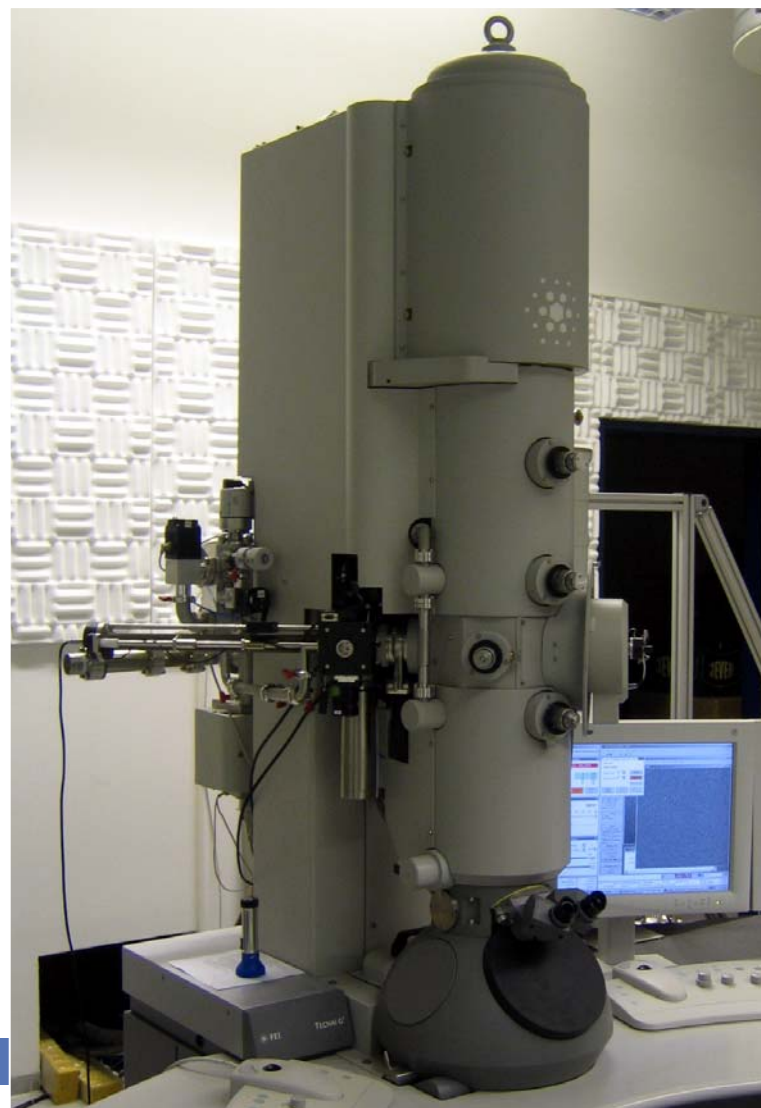


Cryo-ET: recovery of fluorescently labelled structure

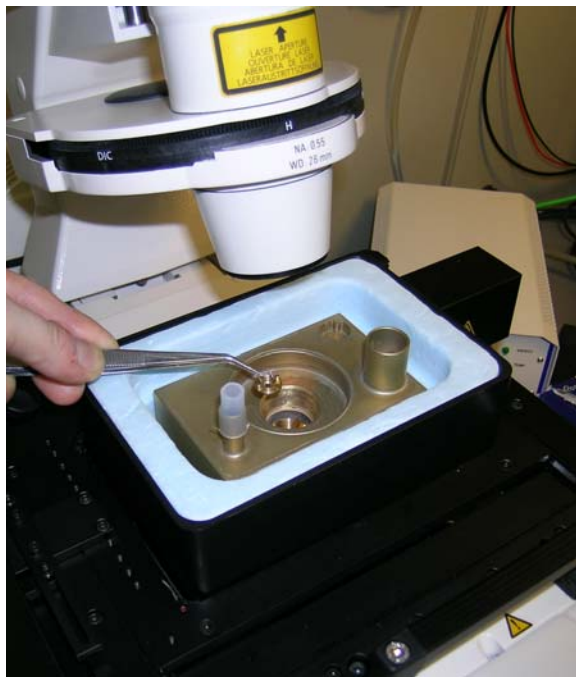


Cryo-PhC & FM: scan of grid





# Correlating FM and cryo-ET: Cryo-Holder for Light Microscopy

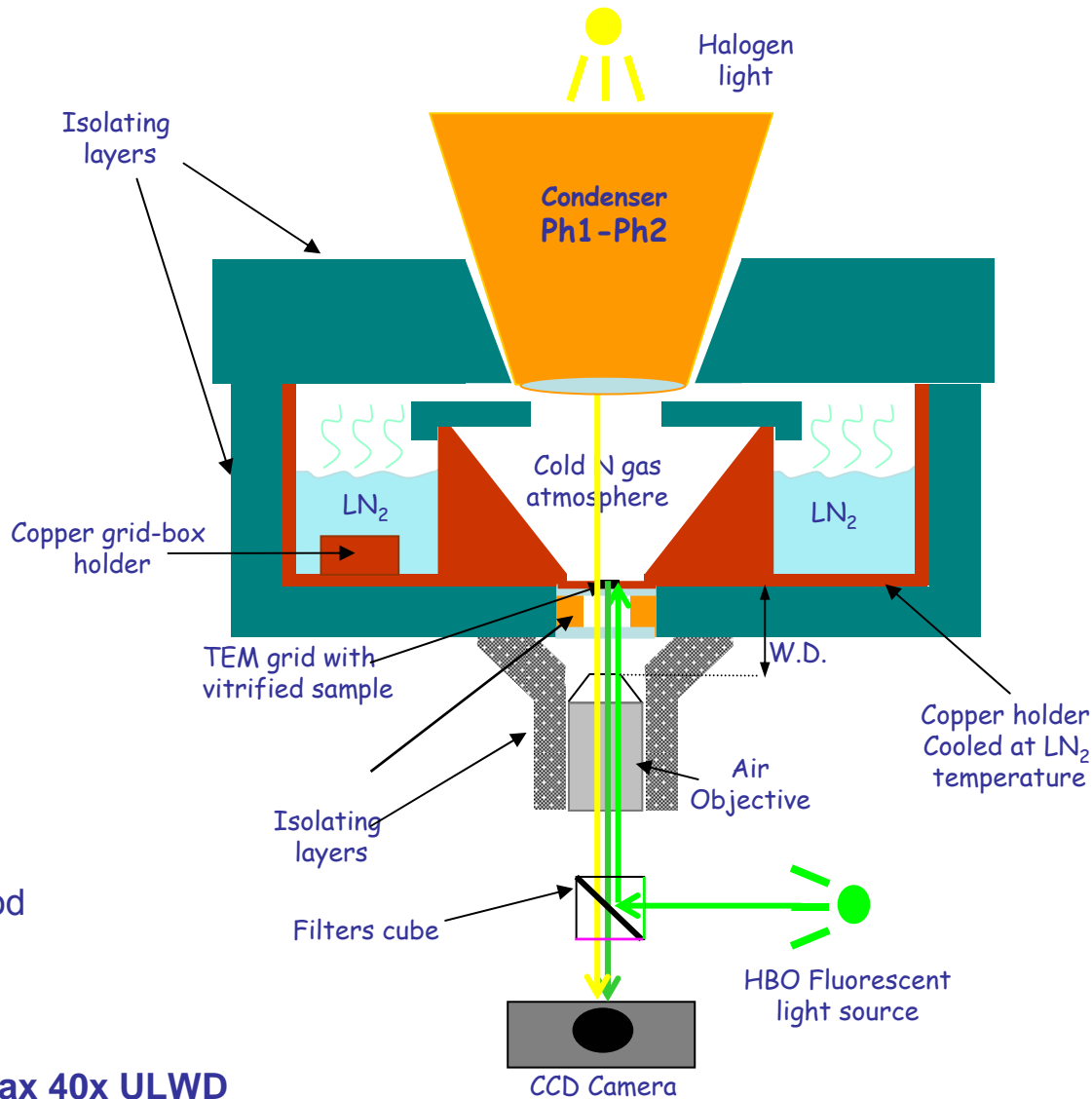


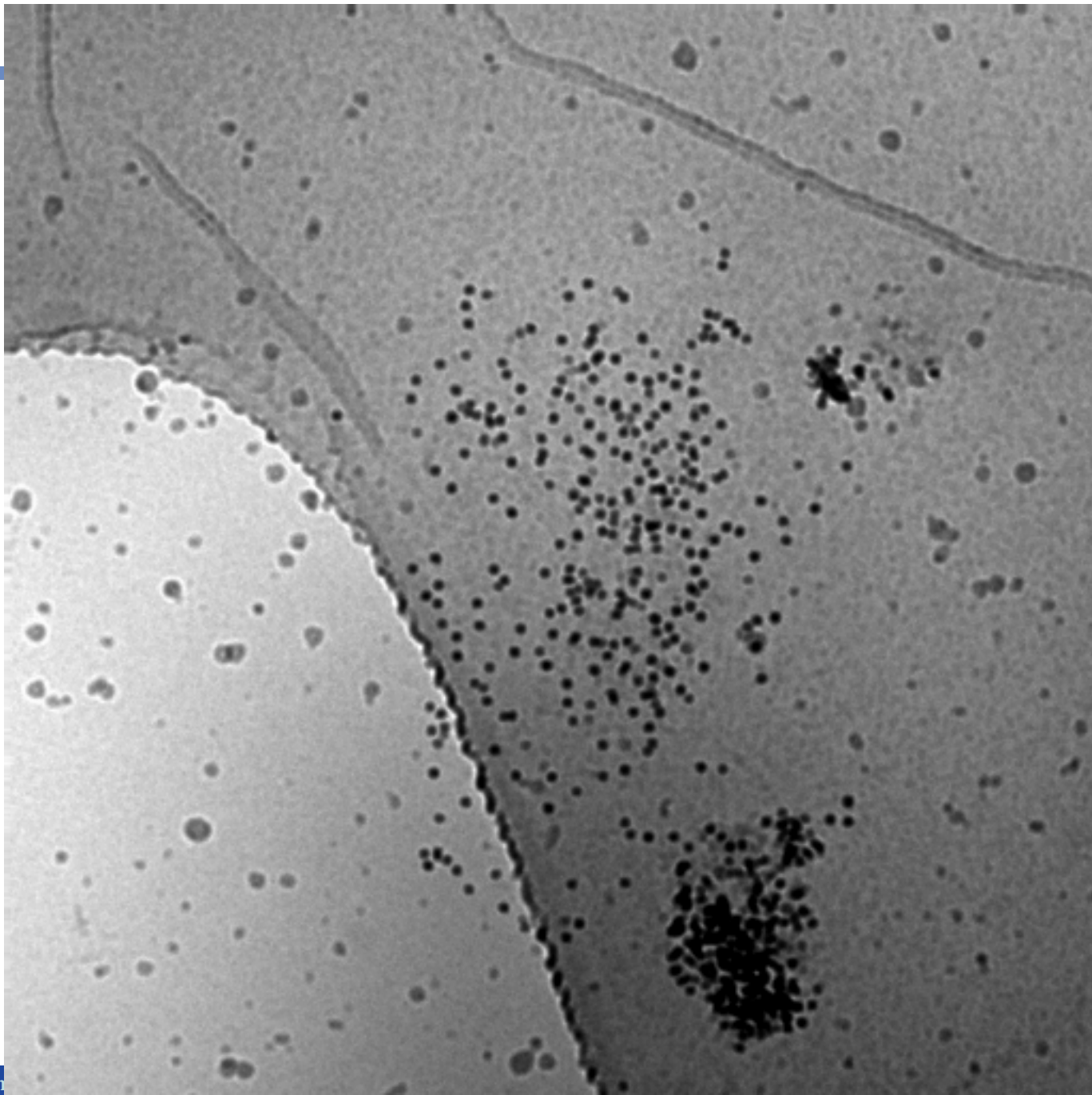
## Requirements

1. Keep grid at LN<sub>2</sub> T during imaging
2. Avoid crystalline ice contamination (good isolation)

## Main limitation:

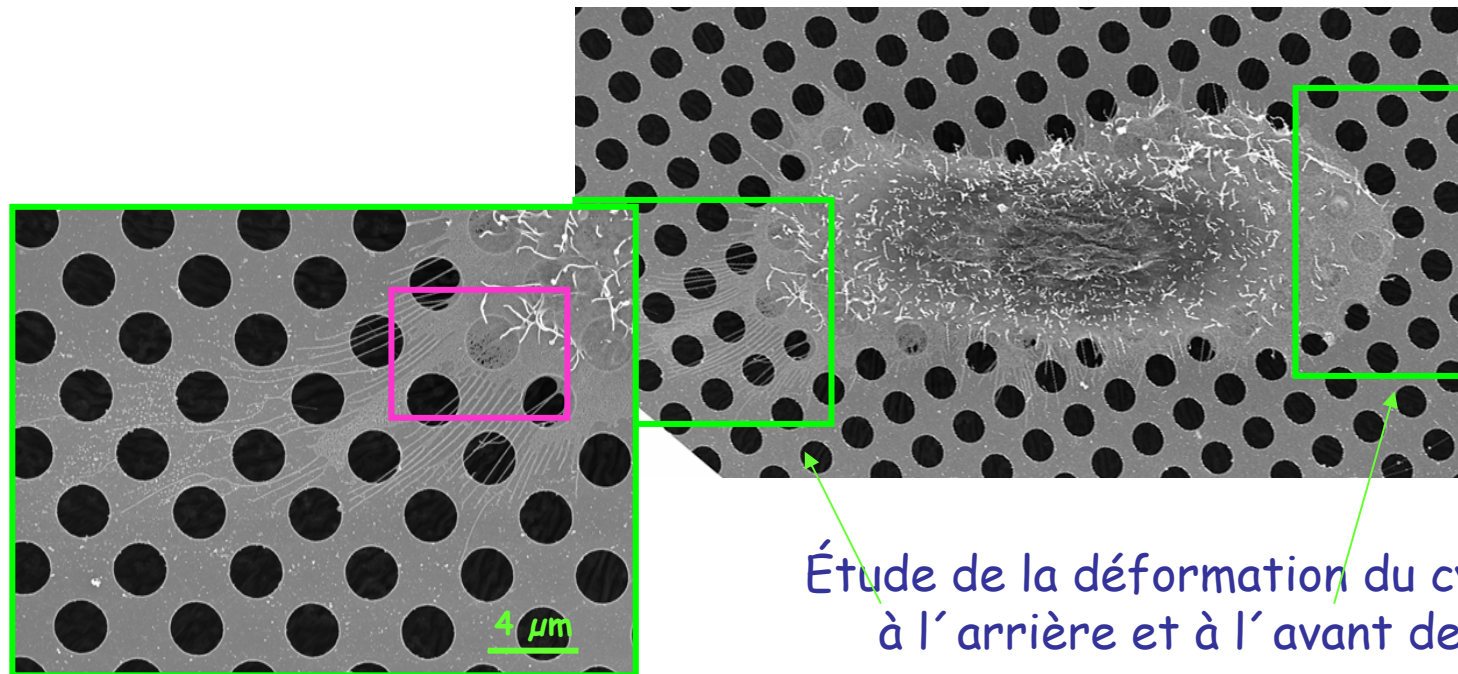
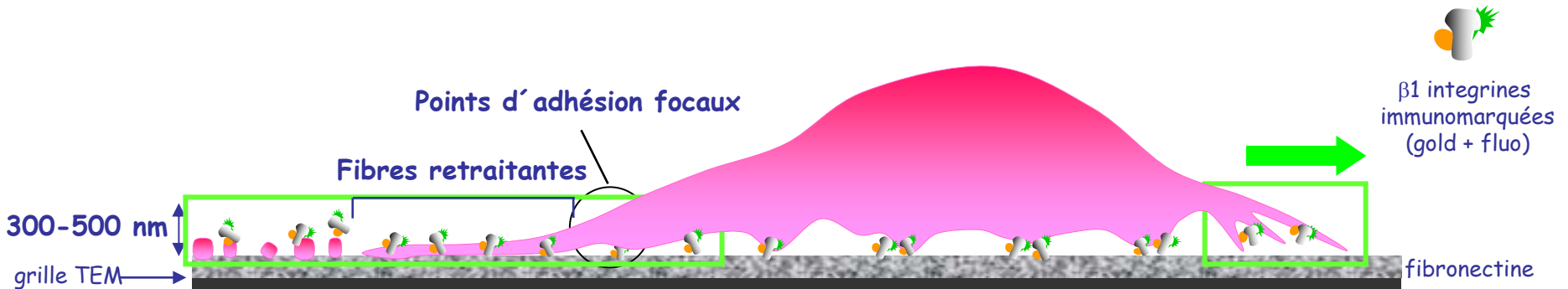
- Working distance for the air objectives -> **max 40x ULWD**





# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine



Étude de la déformation du cytosquelette à l'arrière et à l'avant des cellules

# Principe de la tomographie électronique

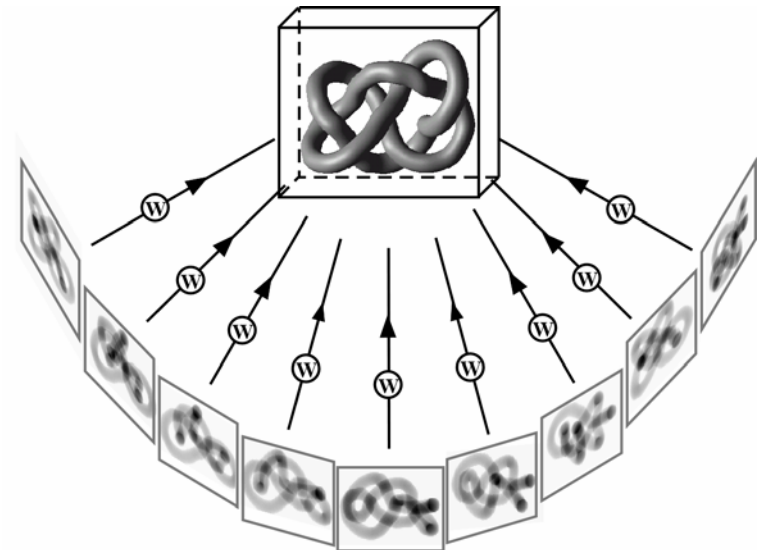
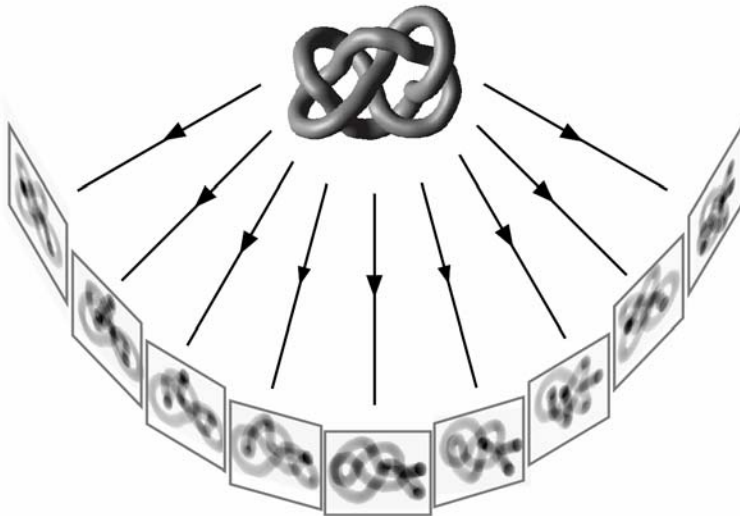
## Cryo-tomographie électronique (cryo-ET) d'échantillons biologiques congelés dans la glace vitreuse



3D investigation d'échantillons biologiques près de leur état natif :  
résolution à l'échelle du nanomètre

Objet 3D → set de projections 2D

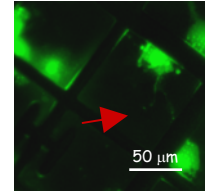
Set de projections 2D → reconstruction-3D



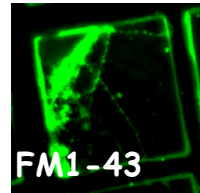
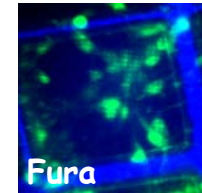
# Corrélation FM et cryo-ET: Application à cellules intactes

Cryo-FM

**Lignée cellulaire de neuroblastoma NG108**  
Marquage Fura → soulignement de neurites

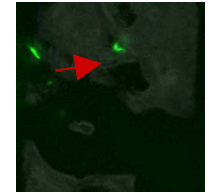


**Cultures primaires de neurones (Vladan Lucic)**  
Marquage Fura → soulignement de axons et dendrites  
Marquage colorant FM → soulignement de terminaux pre-synaptiques  
Immunomarquage sur neurones vivants de récepteurs AMPA  
et de vésicules pre-synaptiques (synaptotagmin)

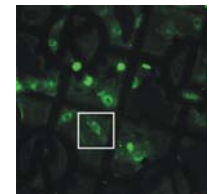


**Plasmodium Berghei (Marek Cyrklaff & Friedrich Frischknecht)**

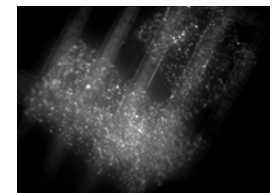
Transféción GFP → soulignement du corps cellulaire



**Cultures primaires de Keratinocytes (Alexander Rigort)**  
Immunomarquage de  $\beta$ 1-integrins sur keratinocytes vivants →  
organisation de l'actine dans les fibres retraits

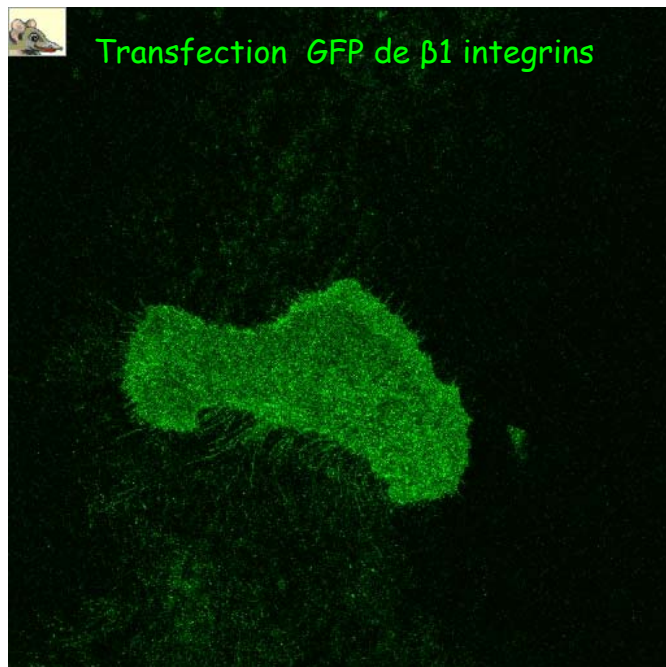
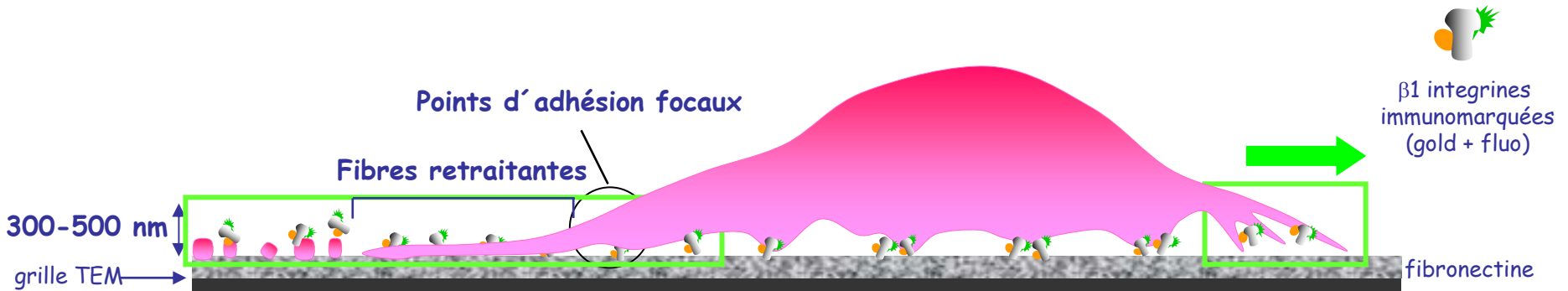


**Cryo-coups de cellules eucaryotes (Andrew Leis & Manuela Gruska)**  
Marquage de mitochondries dans cellules HL-1 (cardiomyocytes) en  
suspension

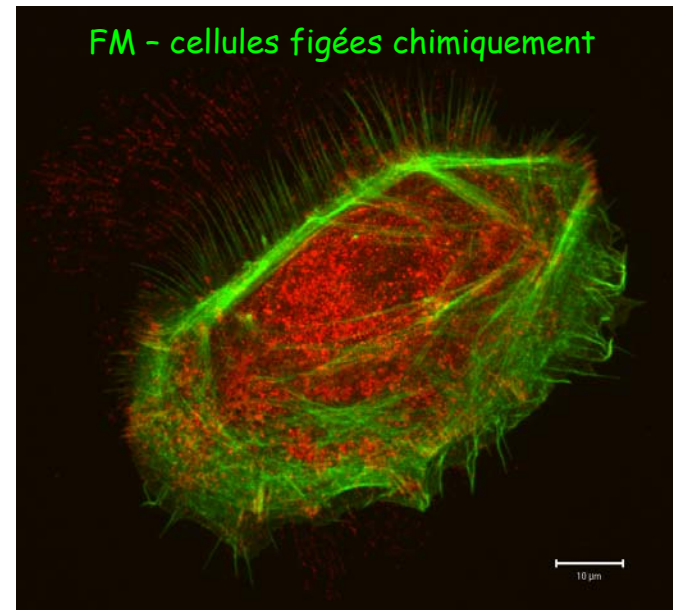


# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine

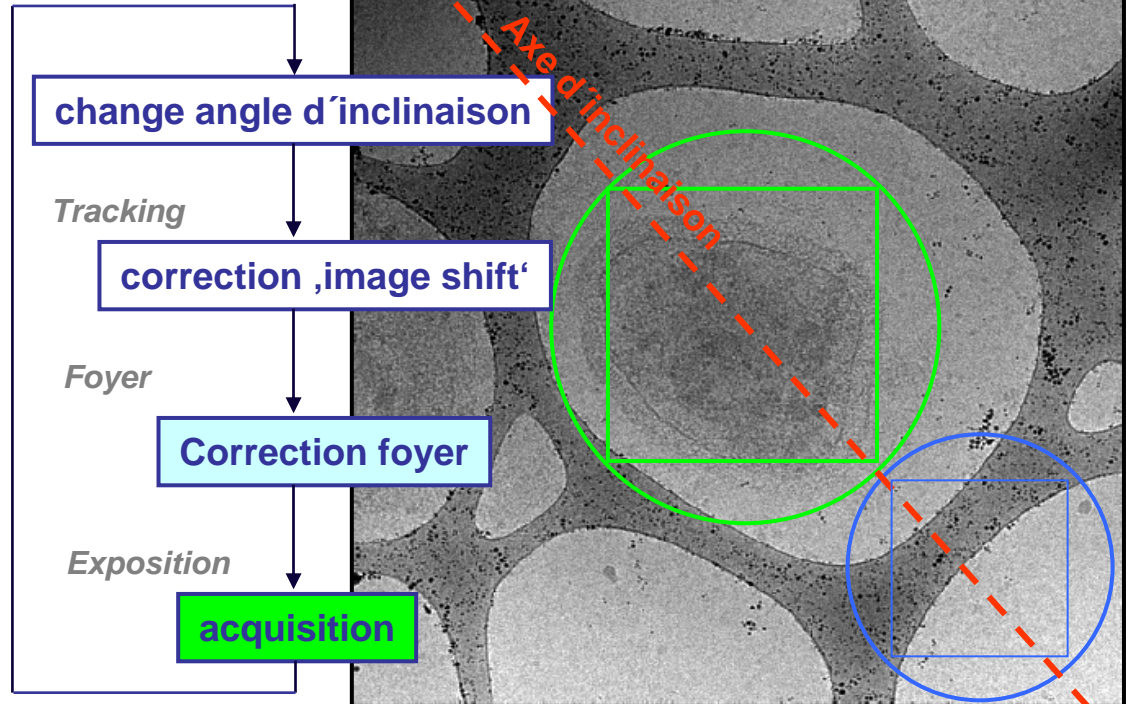
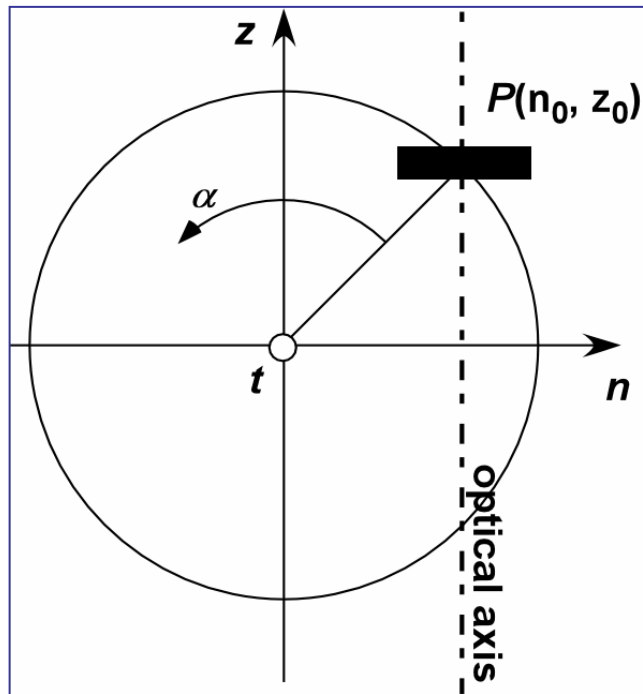


Keratinocytes transfectés GFP pour β1 intégrins  
Stimulation avec Epidermal Growth Factor (EGF)



Keratinocytes immunomarqués pour l'actine avec Alexa 488 phalloïdine (vert) and pour β1 intégrins (rouge)

# Schéma acquisition

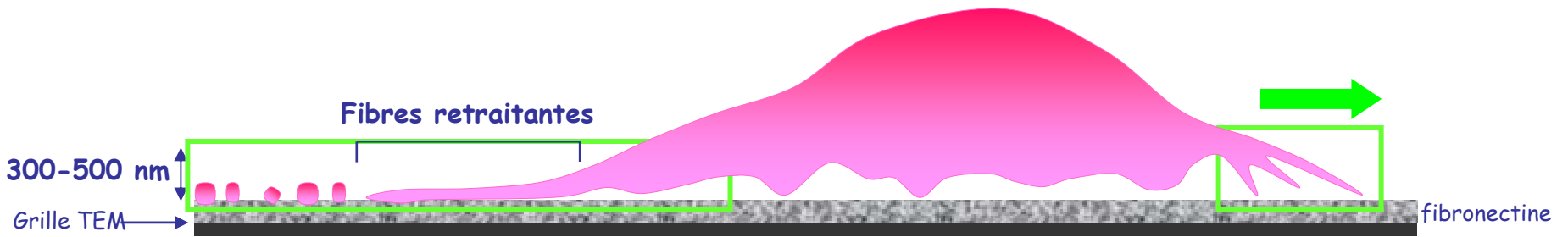


## Ensemble typique de données

- Dose faible d'  $\epsilon \sim 50-100 \text{ e}^-/\text{\AA}^2$   
(sur  $\sim 150$  images de projection)
- 97% de la dose pour l'acquisition d'images
- Résolution typique  $\sim 4 \text{ nm}$
- Tiltseries de 100-150 projections filtrées d'énergie
- Incrément de  $\sim 1^\circ$
- Gamme d'inclinaison  $\pm 70^\circ$
- Taille de CCD 2048 x 2048
- Volume 3D de 1024 x 1024 x 256 voxel

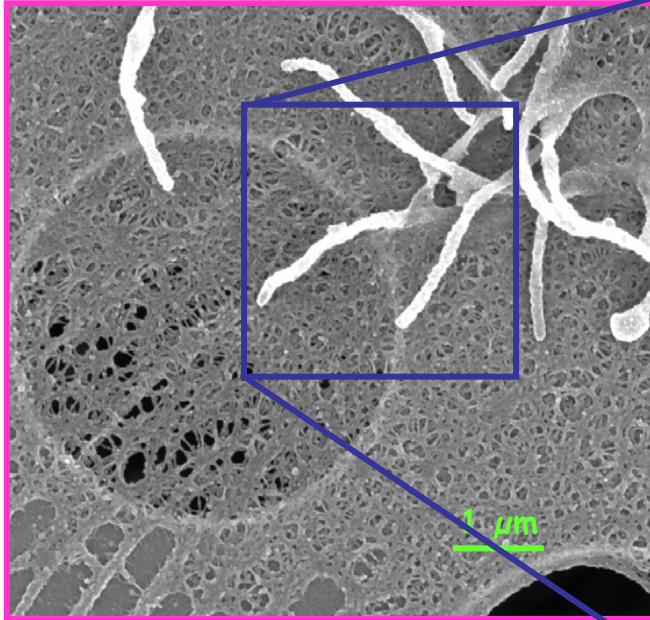
# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine

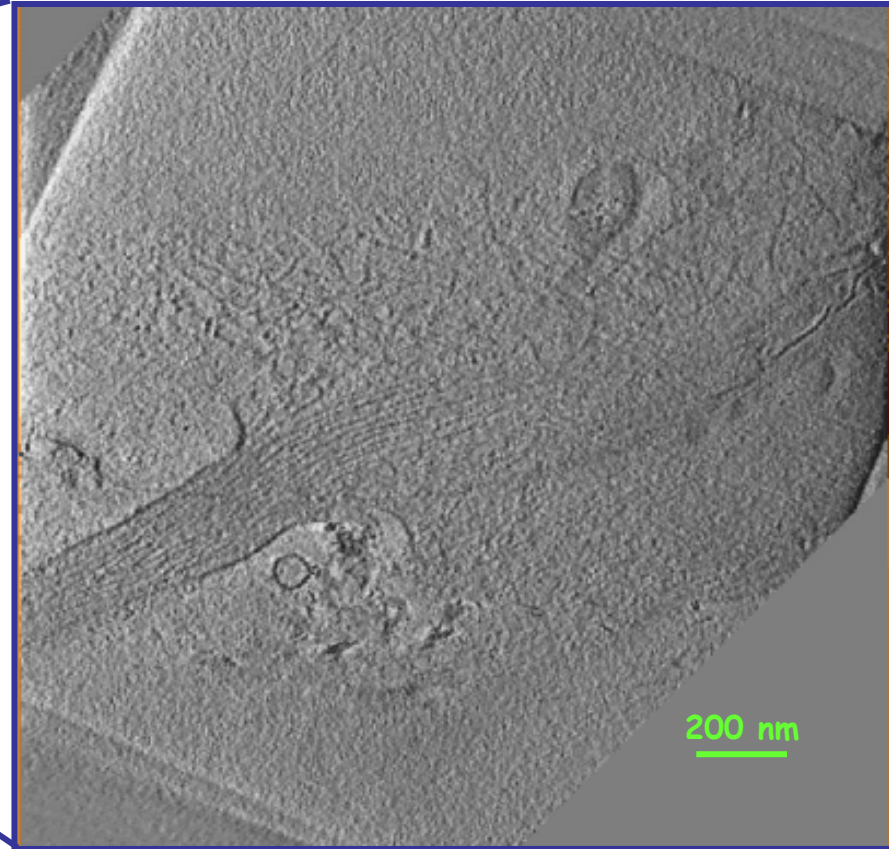


# Corrélation FM et cryo-ET: Cryo-ET de filopodes

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine

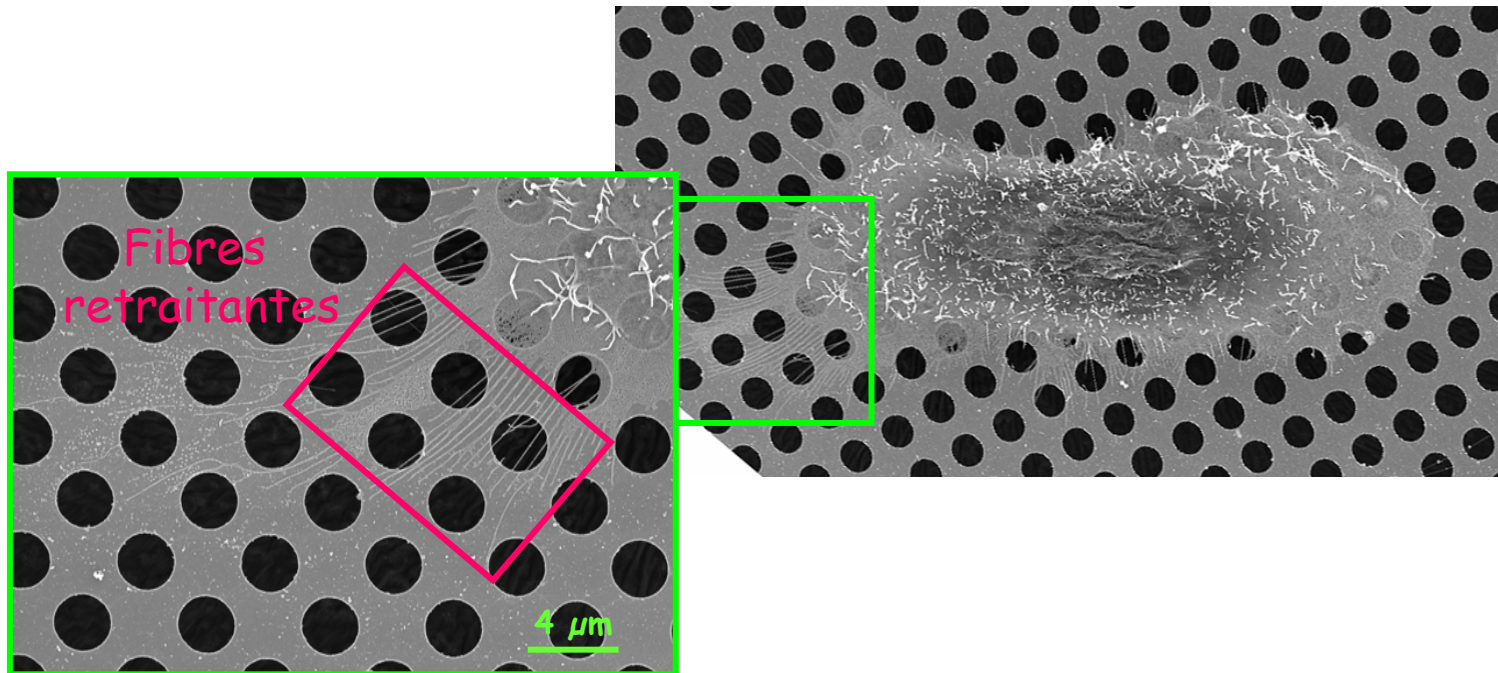
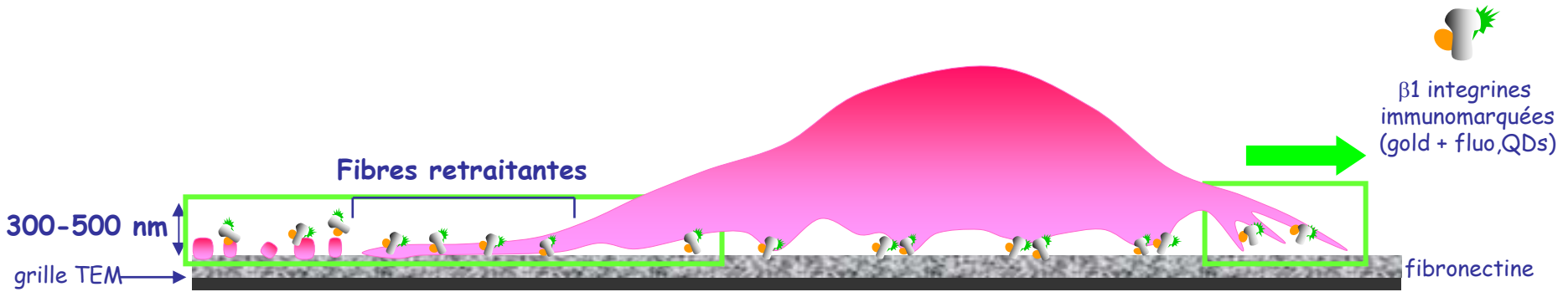


Filopodes à l'arrière  
d'un keratinocyte migrant  
sur une grille TEM



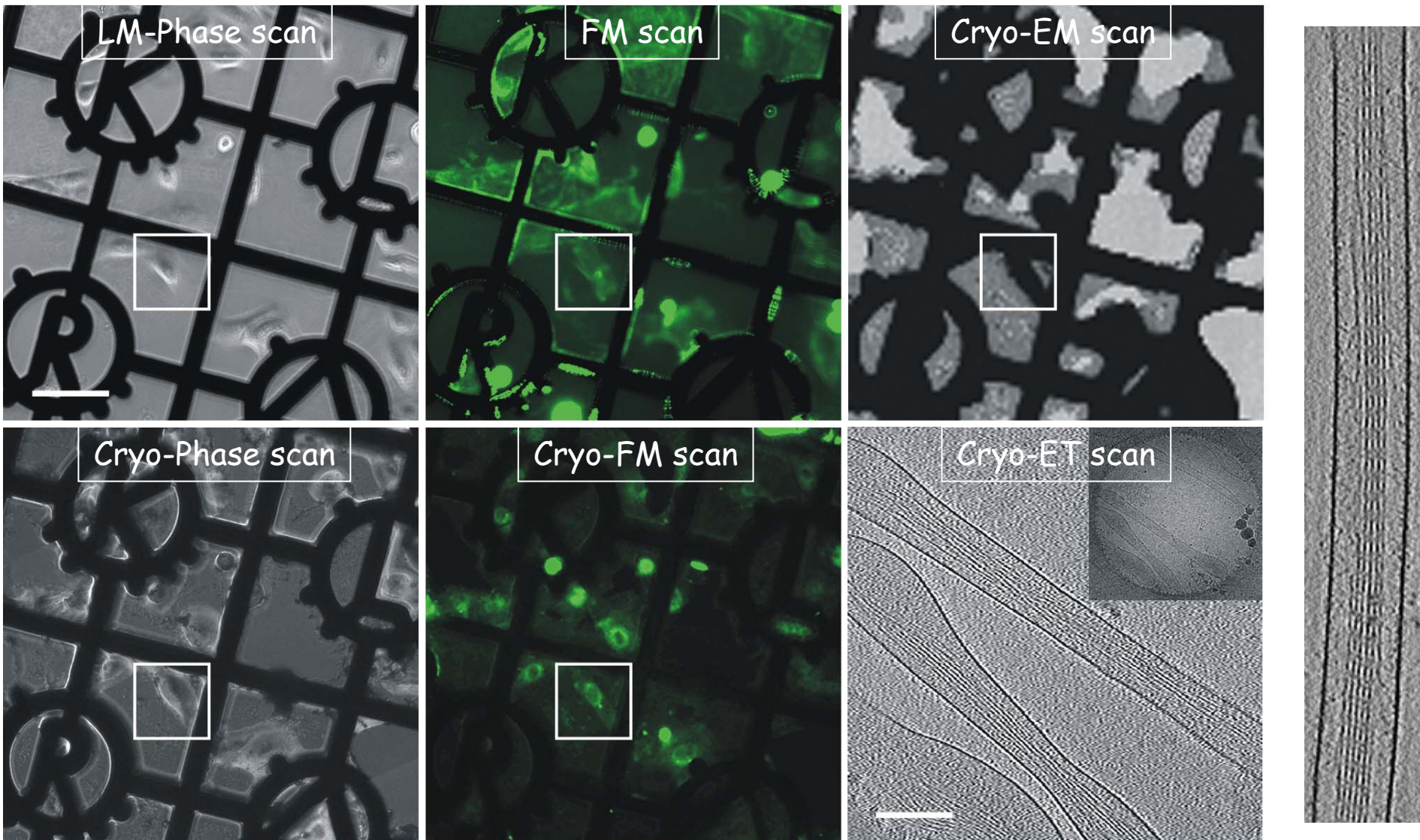
# Correlation FM et cryo-ET: Mécanismes d'adhésion

Cultures primaires de keratinocytes, migrant sur grilles TEM revêtues de fibronectine

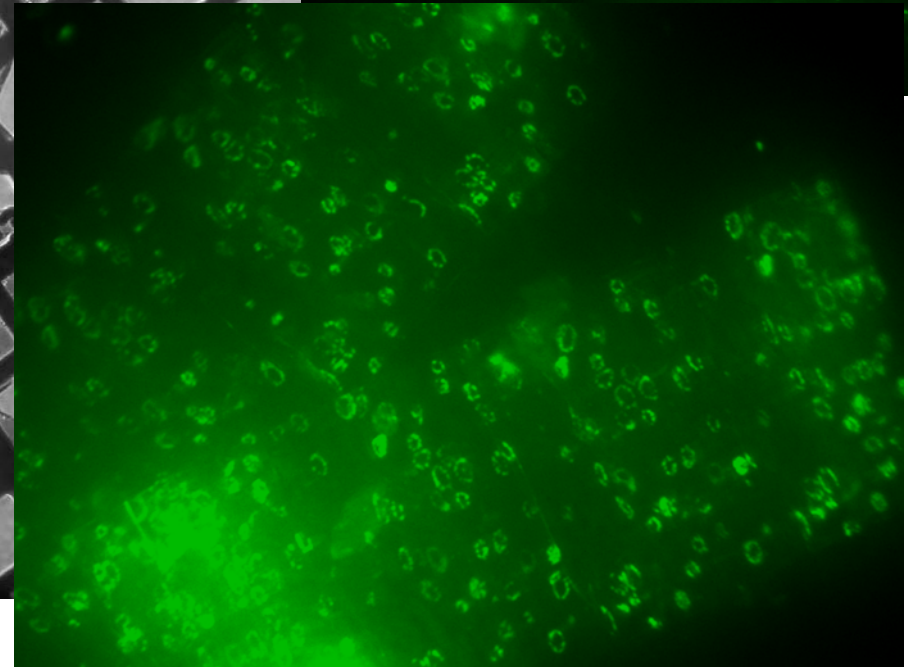
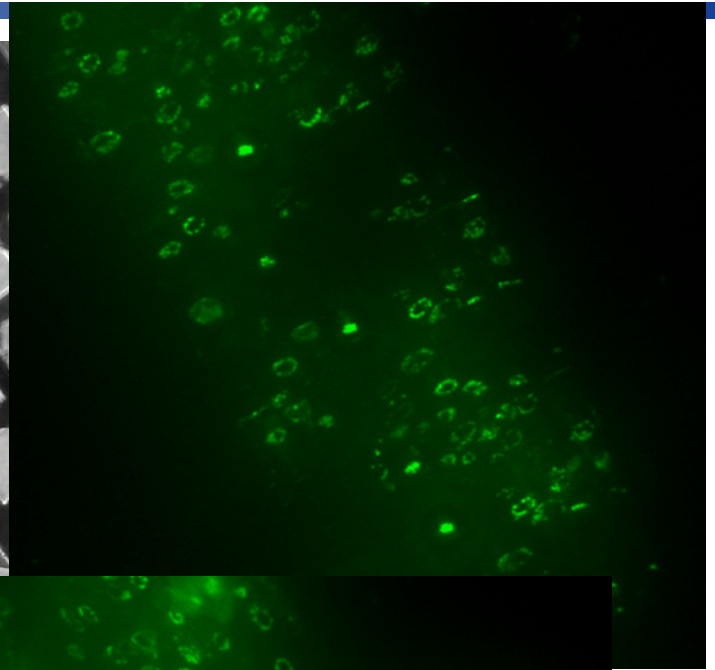
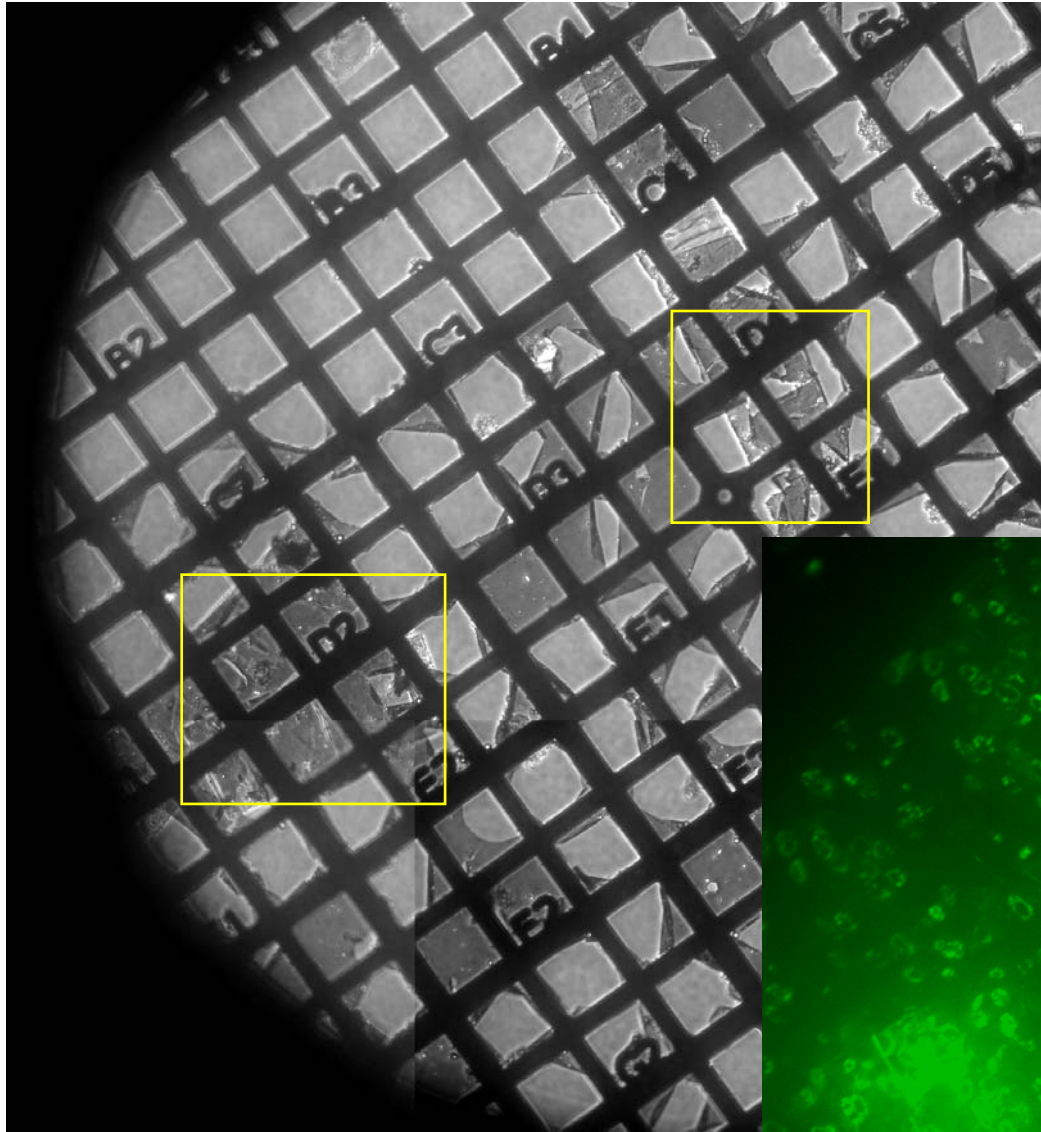


# Corrélation FM et cryo-ET: Cycle corrélatif complet pour keratinocytes

Cultures primaires de keratinocytes, immunomarqués pour  $\beta 1$  integrines avec Alexa488



# Corrélation FM et cryo-ET: cryo-coupes de cellules eucaryotes marquées



Marquage de mitochondrie  
sur cellules HL-1

*Andrew Leis & Manuela Gruska*