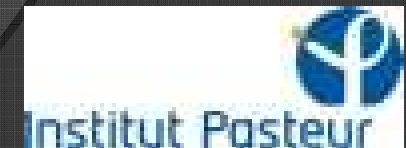


# LE CYCLE CELLULAIRE D'ASPERGILLUS FUMIGATUS VISUALISÉ PAR CRYO-MEB

Stéphanie GUADAGNINI  
Institut Pasteur, IMAGOPOLE, PFMU



GNMEBA Strasbourg juin 2011



# ECHANTILLON BIOLOGIQUE VS MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

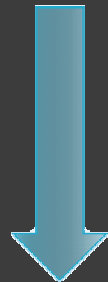
## Echantillon biologique

Composition CHONP...

Hydraté

« mou »

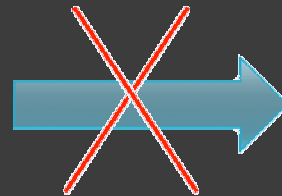
Non conducteurs



Préparation des échantillons biologiques

....

Pour les rendre stables, solides et conducteurs

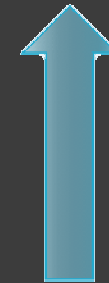


## Microscope électronique

Haut vide

Faisceau d'électrons

Sensible aux vibrations

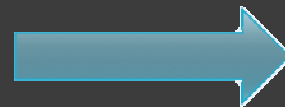


Résistants au haut vide

Résistants au faisceau d'électrons

Stables

Contrastés



# PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON BIOLOGIQUES « CONVENTIONNELLE »

## Fixation Chimique

immobilisation et préservation des structures

## Post fixation

Fixation des lipides et augmentation de la conductivité de l'échantillon

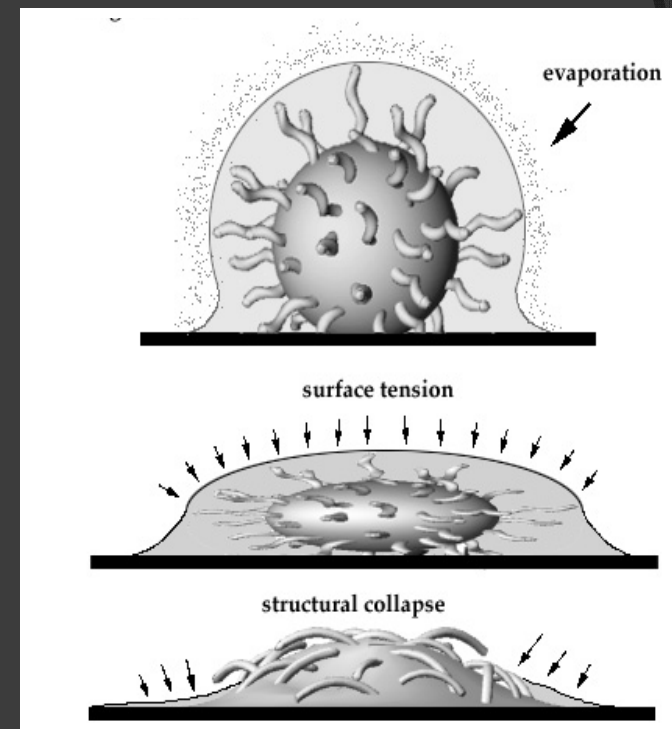
## Déshydratation

## Dessication

## Metallisation

VS

Séchage à l'air



# PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE « CONVENTIONNELLE »

Fixation Chimique

**Post fixation**

Fixation des lipides et augmentation de la conductivité de l'échantillon

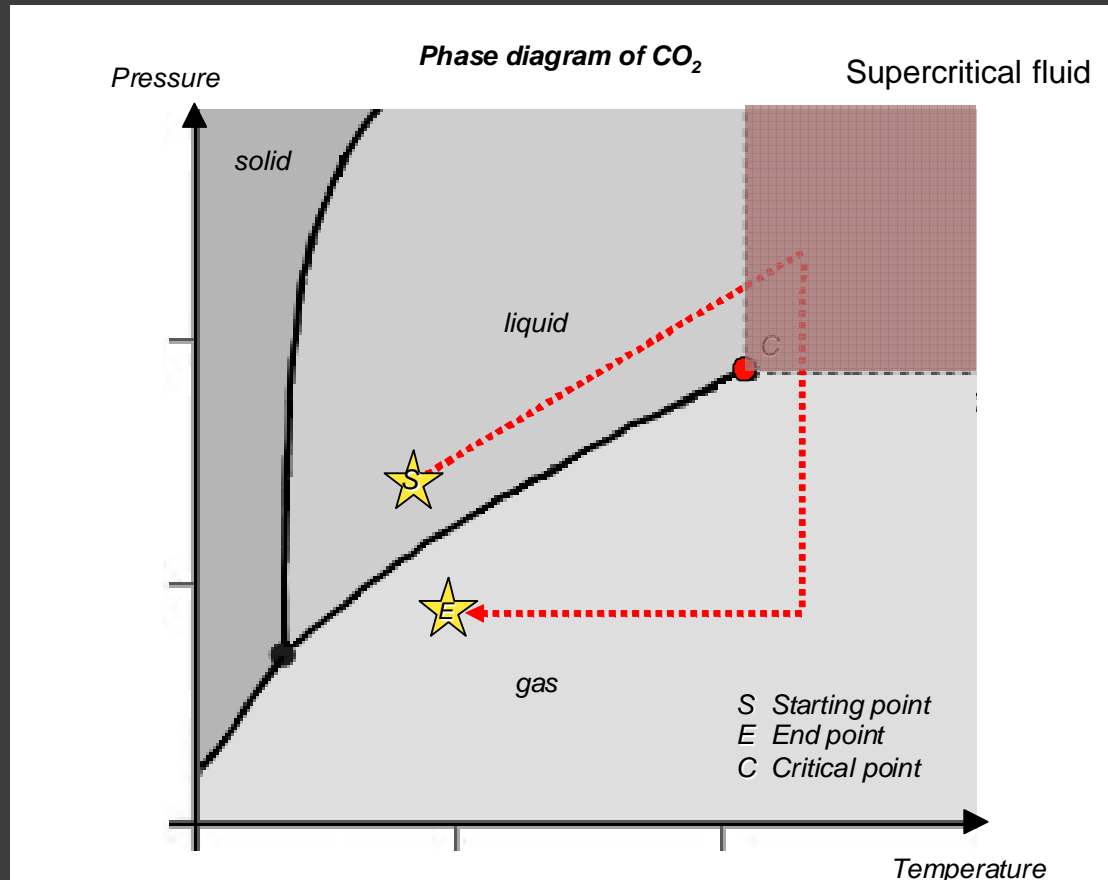
**Déshydratation**

**Dessication**

Contournement du point critique du CO<sub>2</sub>

**Métallisation**

# DESSICATION



Point critique du  
CO<sub>2</sub> : 31,4°C 74  
bar

Point critique de  
l'eau H<sub>2</sub>O : 374°C  
221 bar

# PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE « CONVENTIONNELLE »

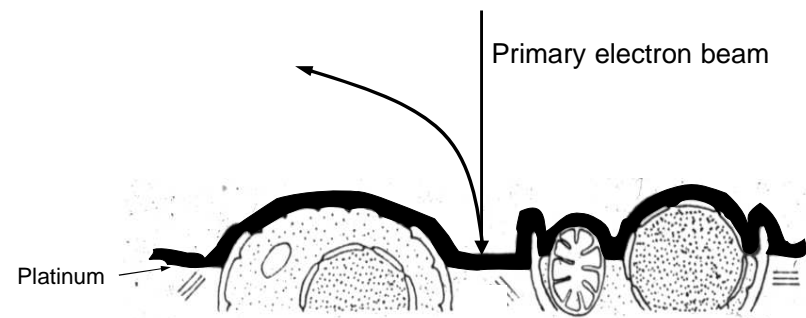
Fixation Chimique

Post fixation

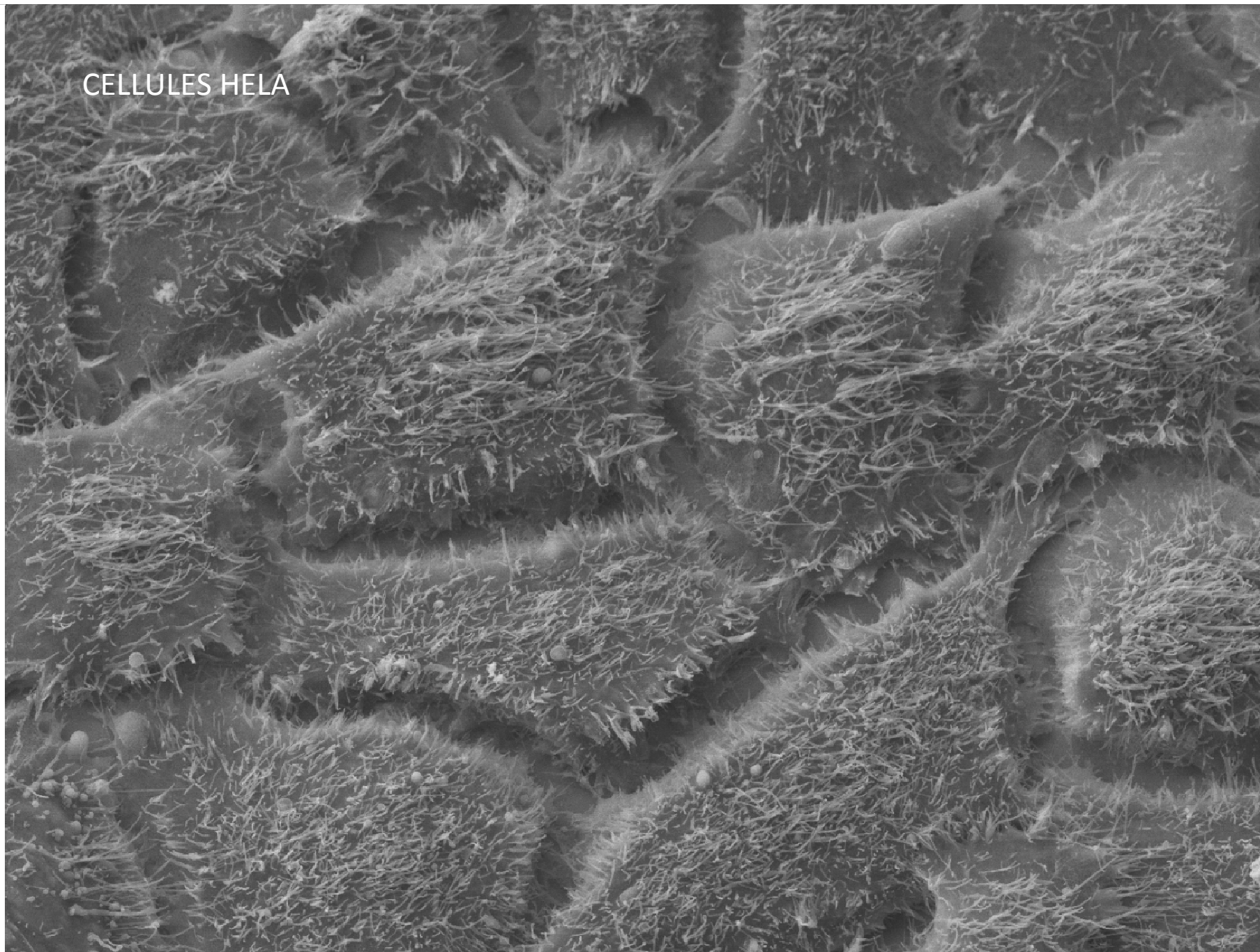
Déshydratation

Dessication

Métallisation



CELLULES HELA



PFME

LEI

5.0kV

X1,500

10 $\mu$ m

WD 15.1mm

CELLULES HELA

PFME

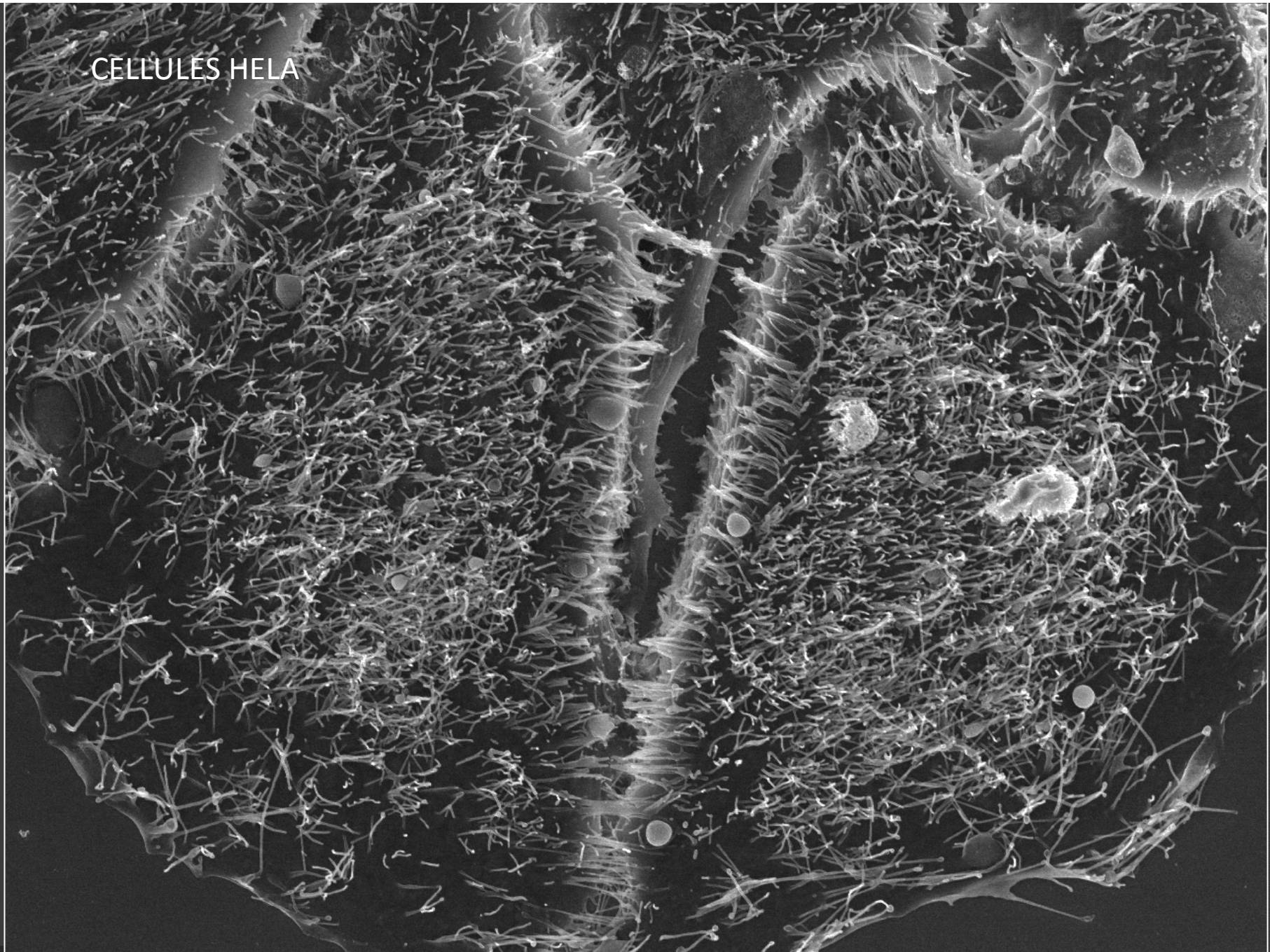
SEI

5.0kV

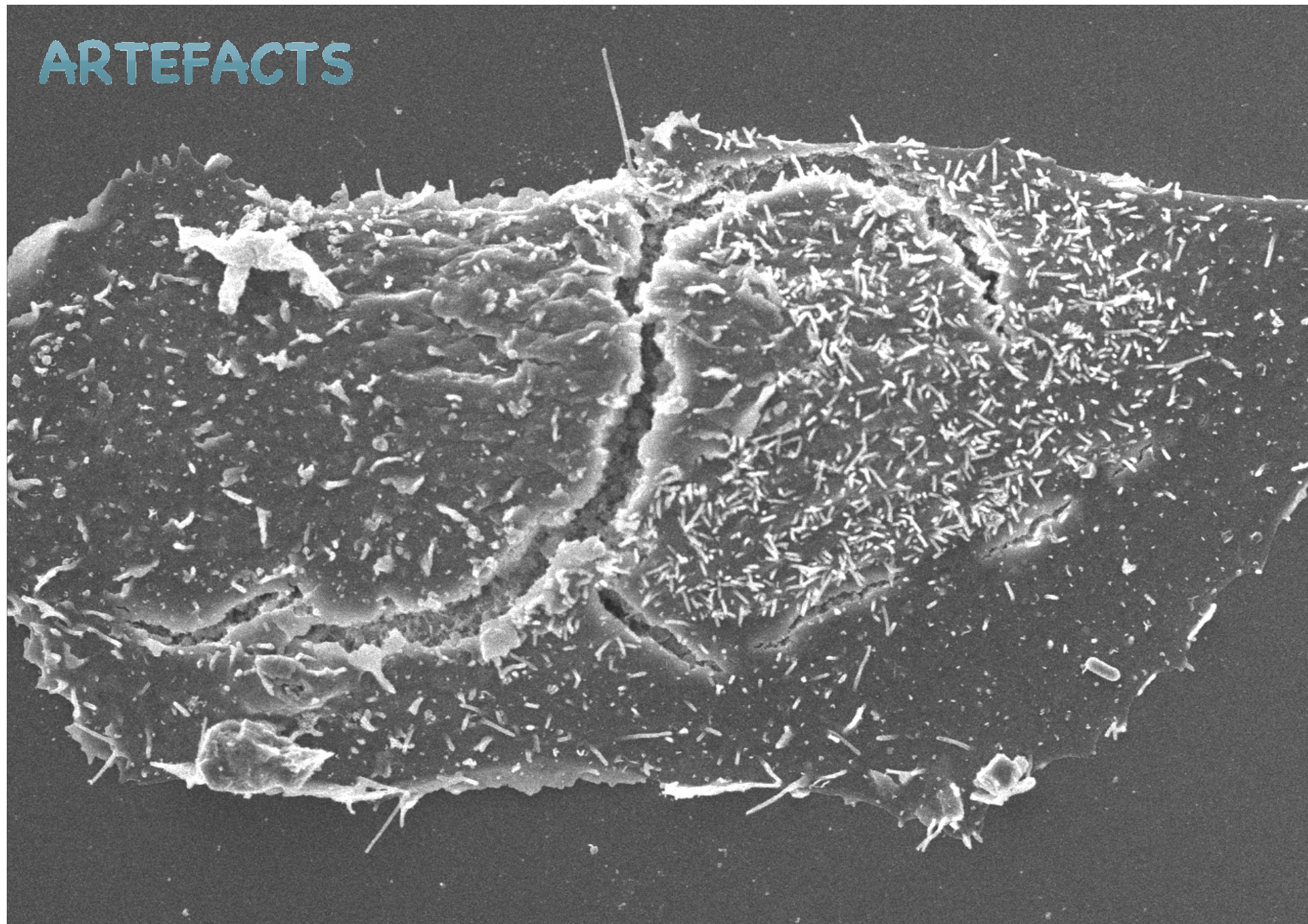
X1,900

10 $\mu$ m

WD 8.2mm



# ARTEFACTS



SEI 5.0kV X2,200 10 $\mu$ m WD 8.1mm

# PRÉPARATION D'ÉCHANTILLON BIOLOGIQUE « CONVENTIONNELLE »

- Durée de traitement des échantillons :  
4heures avant visualisation
- Échantillons ré-observables à court ou long terme.
- Échantillons stables sous le faisceau.

Mais :

- Possible dénaturation de l'échantillon biologique par les traitements chimiques
- Risque d'artéfacts de déshydratation : rétractation des volumes , cassure des structures fines.

## CRYO SEM

Méthode alternative d'observation au froid

Chambre refroidie (cryochambre) attachée à un port du MEB.

Module de préparation d'échantillon avec canne de transfert cryochambre – platine MEB refroidie

Pas d'étapes de fixation chimique ( sauf si pathogènes),  
pas de déshydratation ni dessiccation

Observation – 120°C



Platine Cryo transfert Alto 2500 sur MEB FEG 6700F JEOL

# MÉTHODOLOGIE CRYOSEM

**Congélation**

Transfert platine à froid

Sublimation

Métallisation

Transfert MEB



# CONGÉLATION DE L'ÉCHANTILLON

Congélation rapide et homogène pour éviter la formation de glace cubique.

**Azote pâteux** : solidification de l'azote : meilleure conduction thermique

**Congélation éthane refroidi** : échantillon très fin

**Congélation HP** : propriété physique à 2100 bars, point de congélation de l'eau 22°C, viscosité de l'eau plus importante, réduction du taux de croissance des cristaux

**Permet congélation échantillon plus massif !**

# MÉTHODOLOGIE

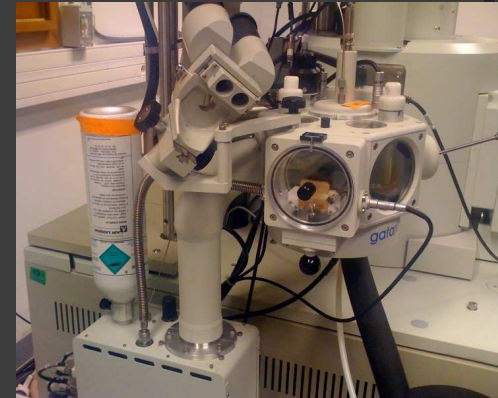
Congélation

**Transfert platine à froid**

Sublimation

Métallisation

Transfert MEB



# MÉTHODOLOGIE

Congélation

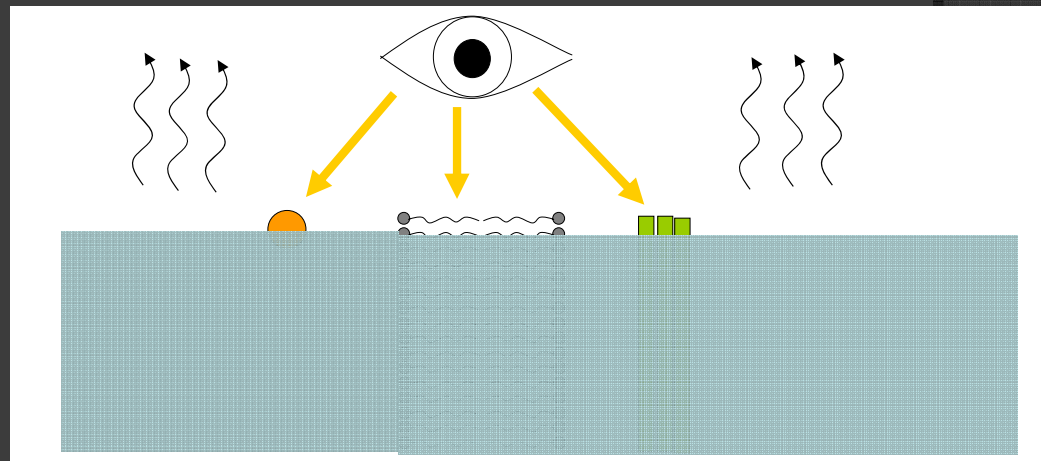
Transfert platine à froid

**Sublimation**

Métallisation

Transfert MEB

Evaporation des composants  
hydratés recouvrant l'échantillon



# SUBLIMATION

## Facteur clef de la préparation

Chauffage de l'échantillon ( $\approx T^{\circ} -95^{\circ}\text{C}$  )

Permet d'évaporer la glace présente à la surface de l'échantillon ( milieu de culture ou tampon)

Cryofracture : permet la visualisation des constituants cellulaires.

Méthode empirique :

-En surface par visualisation de la modification de l'état de la surface ( blanc à brillant) à l'aide d'une loupe binoculaire.

# SUBLIMATION

-Abaque d'épaisseur d'évaporation en fonction de la température

Temperature [°C]	Saturation pressure [mbar]	Sublimation rate [g/cm <sup>2</sup> *s]	Increase of dry layer = Etch rate [1/s]
-10		2,98 x 10 <sup>-2</sup>	
-20	2,60	1,21 x 10 <sup>-2</sup>	324 µm
-30	1,03	4,54 x 10 <sup>-3</sup>	131 µm
-40	3,81 x 10 <sup>-1</sup>	1,57 x 10 <sup>-3</sup>	49,3 µm
-50	1,29 x 10 <sup>-1</sup>	4,90 x 10 <sup>-4</sup>	17,0 µm
-60	3,93 x 10 <sup>-2</sup>	1,37 x 10 <sup>-4</sup>	5,30 µm
-70	1,08 x 10 <sup>-2</sup>	3,37 x 10 <sup>-5</sup>	1,48 µm
-80	2,59 x 10 <sup>-3</sup>	7,16 x 10 <sup>-6</sup>	364 nm
-85	5,36 x 10 <sup>-4</sup>	3,10 x 10 <sup>-6</sup>	77,0 nm
-90	2,29 x 10 <sup>-4</sup>	1,28 x 10 <sup>-6</sup>	33,3 nm
-95	9,35 x 10 <sup>-5</sup>	5,02 x 10 <sup>-7</sup>	13,7 nm
-100	3,61 x 10 <sup>-5</sup>	1,87 x 10 <sup>-7</sup>	5,39 nm
-105	1,32 x 10 <sup>-5</sup>	6,55 x 10 <sup>-8</sup>	2,00 nm
-110	4,57 x 10 <sup>-6</sup>	2,15 x 10 <sup>-8</sup>	0,70 nm
-115	1,48 x 10 <sup>-6</sup>	6,58 x 10 <sup>-9</sup>	0,23 nm
-120	4,45 x 10 <sup>-7</sup>	1,86 x 10 <sup>-9</sup>	70,4 pm
-130	1,24 x 10 <sup>-7</sup>	1,15 x 10 <sup>-10</sup>	19,9 pm
-140	7,38 x 10 <sup>-9</sup>	4,64 x 10 <sup>-12</sup>	1,22 pm
-150	2,88 x 10 <sup>-10</sup>	1,12 x 10 <sup>-13</sup>	49,5 fm
-160	6,68 x 10 <sup>-12</sup>	1,40 x 10 <sup>-15</sup>	1,19 fm
	8,02 x 10 <sup>-14</sup>		0,01 fm

Balance entre la vapeur d'eau de l'échantillon ( dépendante de la température ) et le vide du système

# MÉTHODOLOGIE

Congélation

Transfert platine à froid

**Sublimation**

Métallisation

Transfert MEB

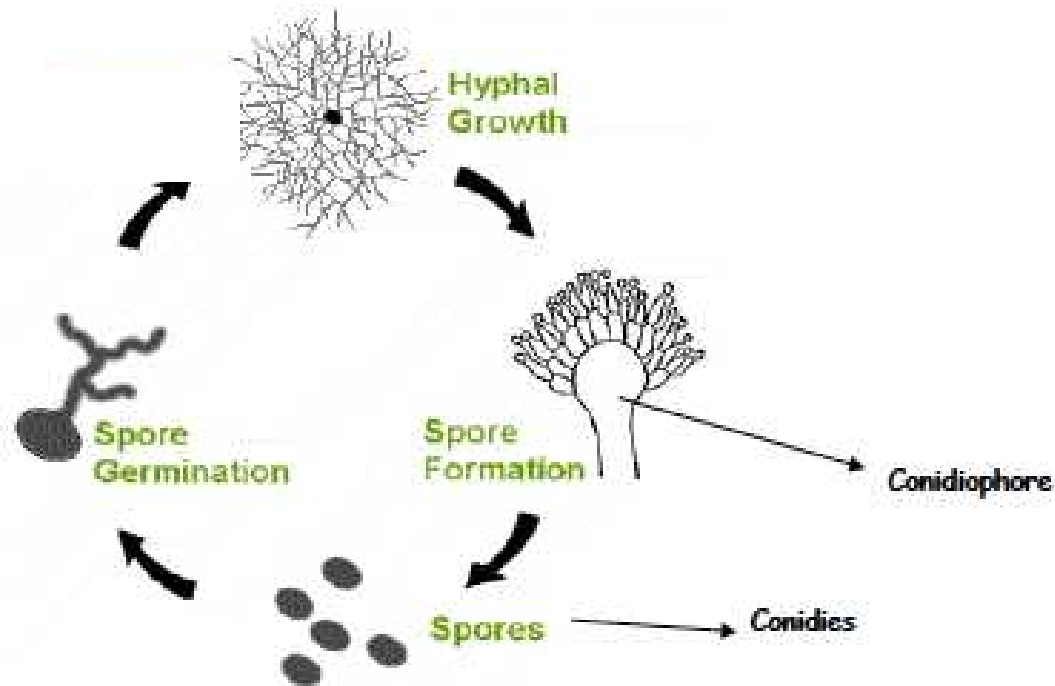


# ASPERGILLUS FUMIGATUS

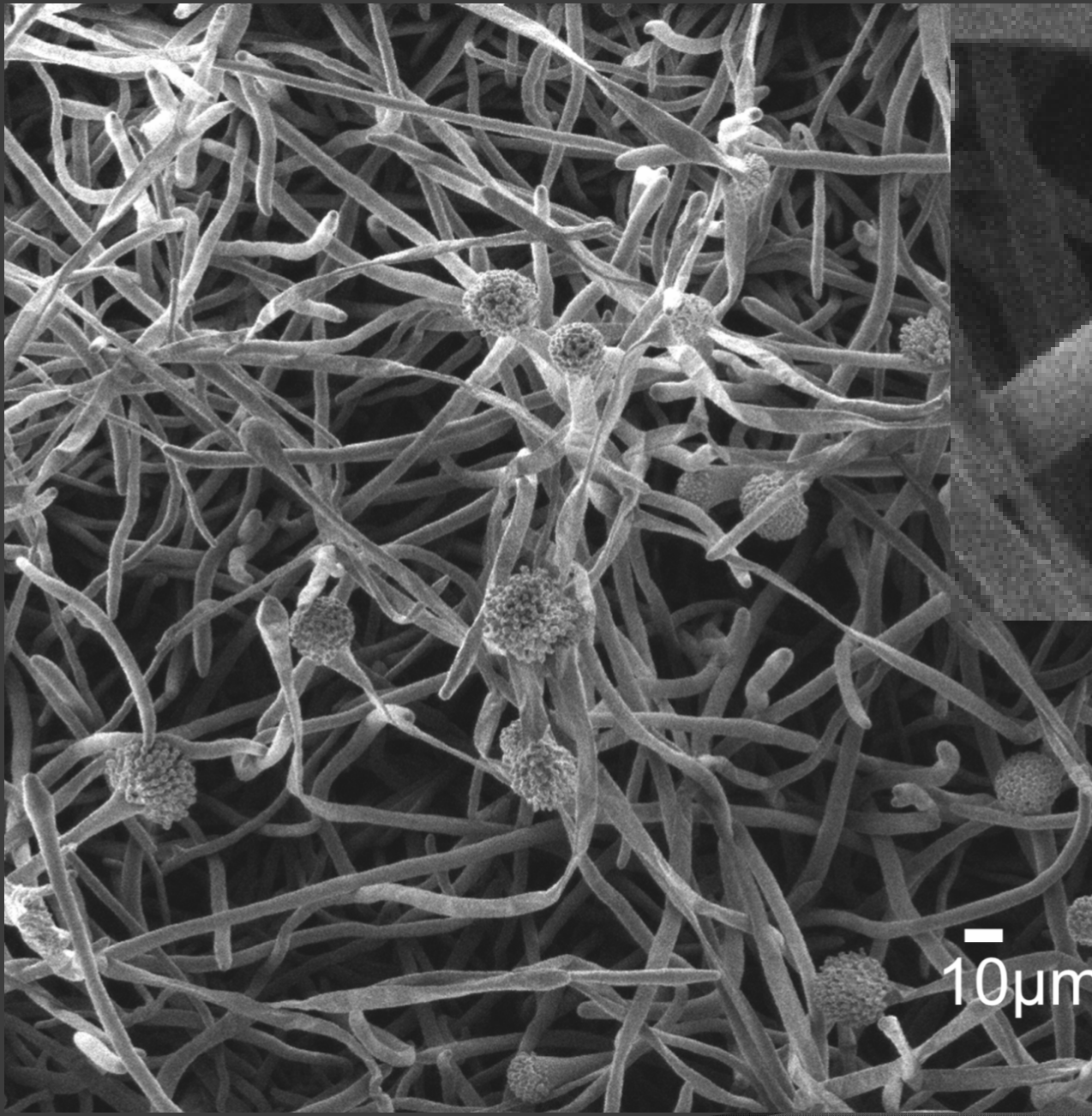
*COLLABORATION JP LATGÉ & A. BEAUVAIS*

- Champignon filamenteux (moisissure)
- Spores véhiculées par l'air et inhalées par tous les individus.
- Totalement inoffensif pour la majorité de la population, il peut cependant provoquer différentes formes de mycoses chez certains individus.
- L'espèce *Aspergillus fumigatus* est responsable de plus de 80% des Aspergilloses humaines.

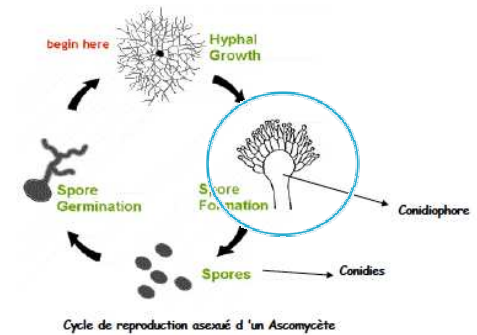
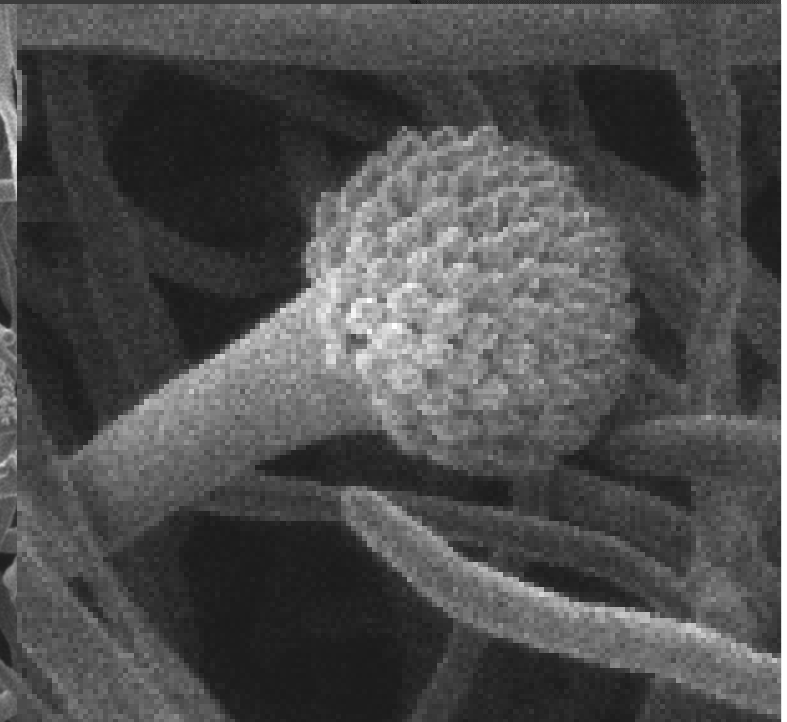
# CYCLE CELLULAIRE D'ASPERGILLUS FUMIGATUS

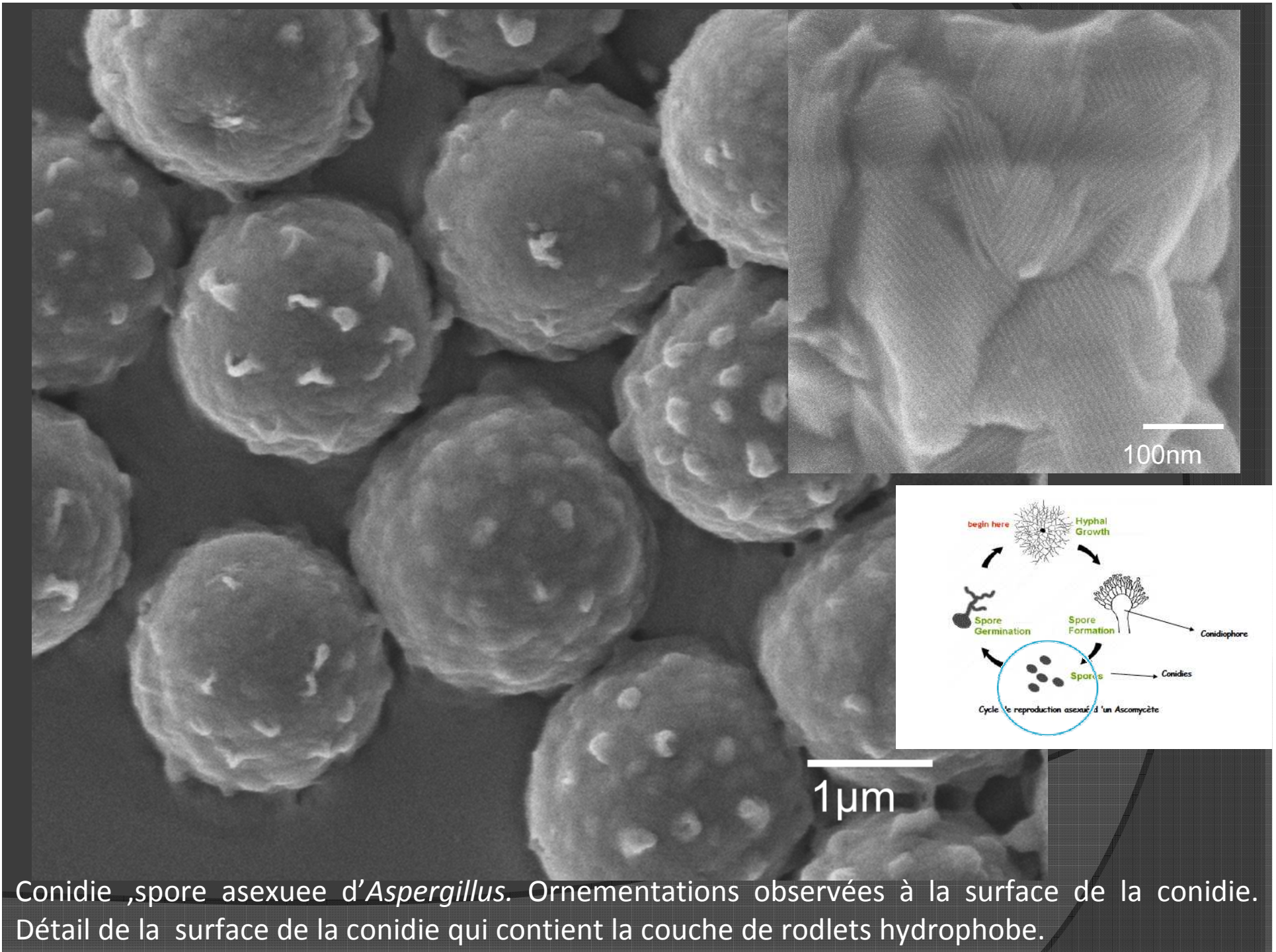


Cycle de reproduction asexué d'un Ascomycète

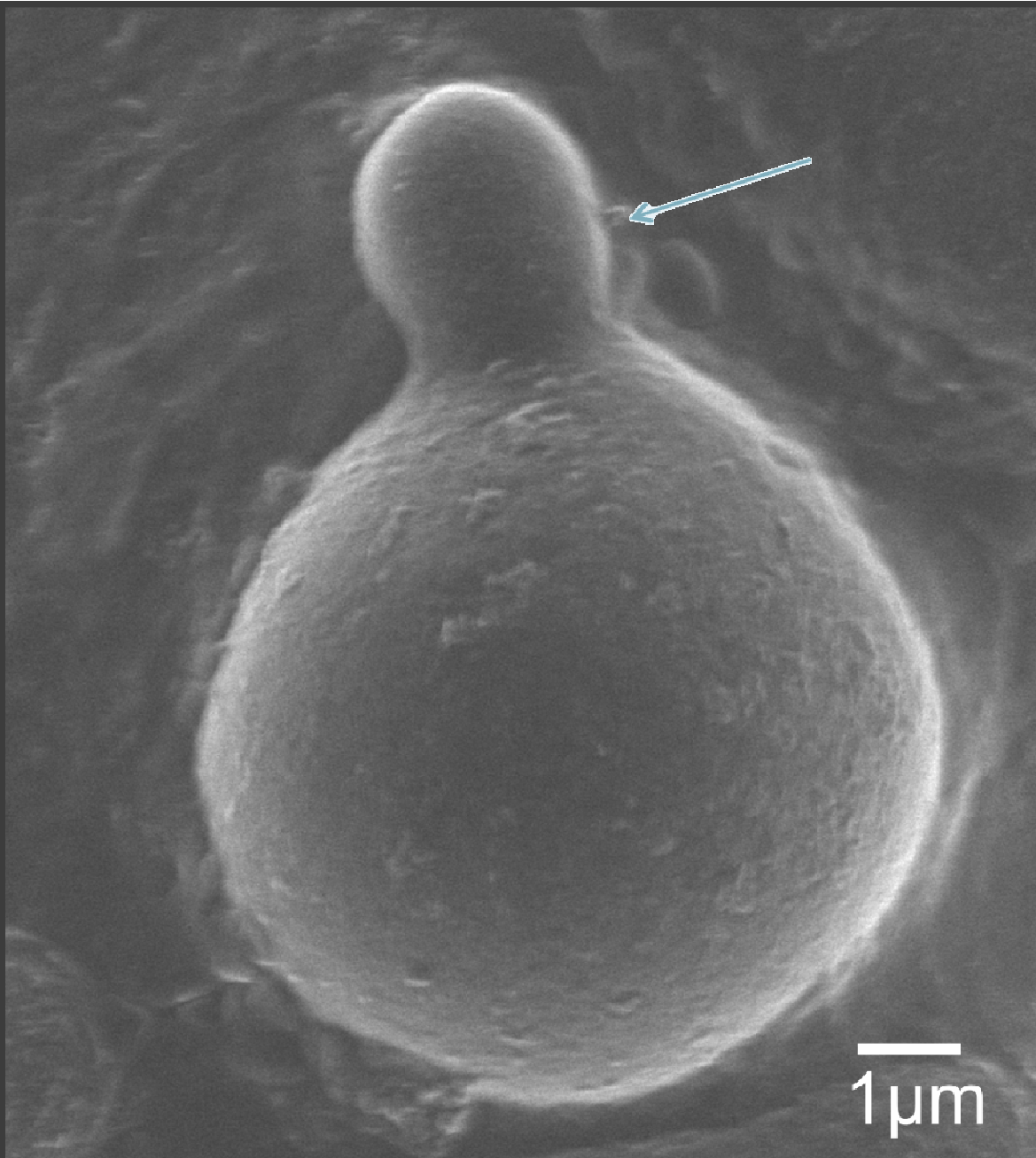


Mycelium d'Aspergillus

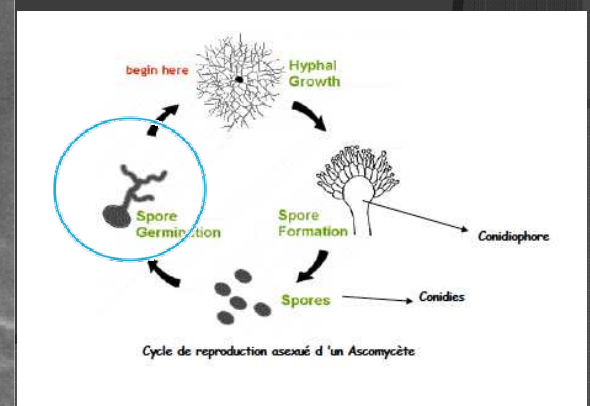


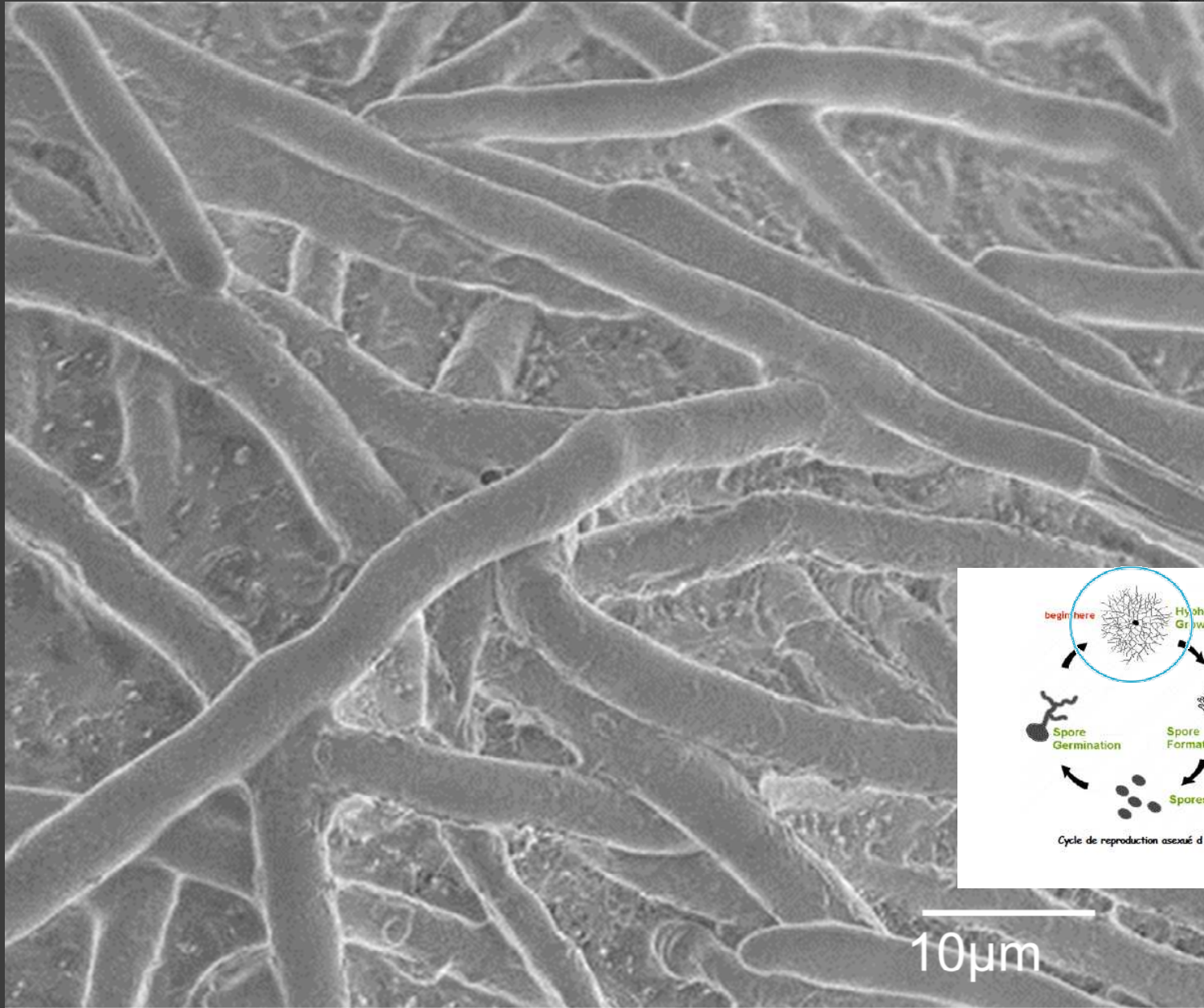


Conidie ,spore asexuee d'*Aspergillus*. Ornementations observées à la surface de la conidie. Détail de la surface de la conidie qui contient la couche de rodlets hydrophobe.

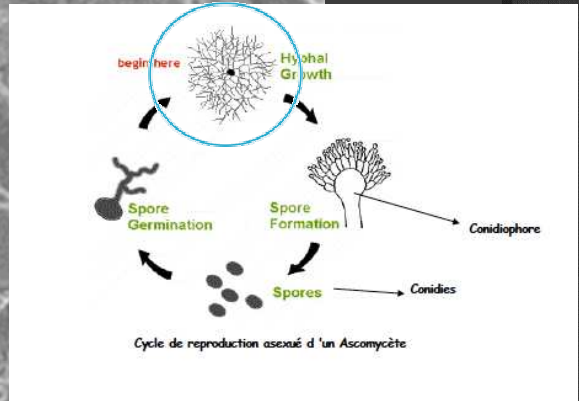


Germination de la conidie : la surface devient amorphe et hydrophile. Apparition du tube germinatif

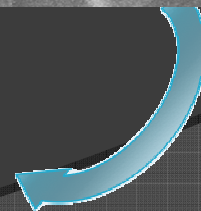
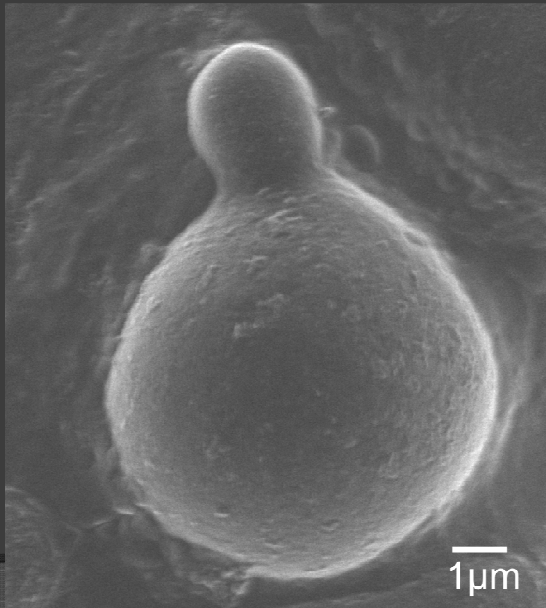
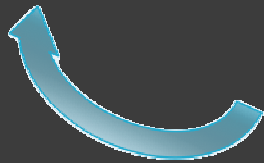
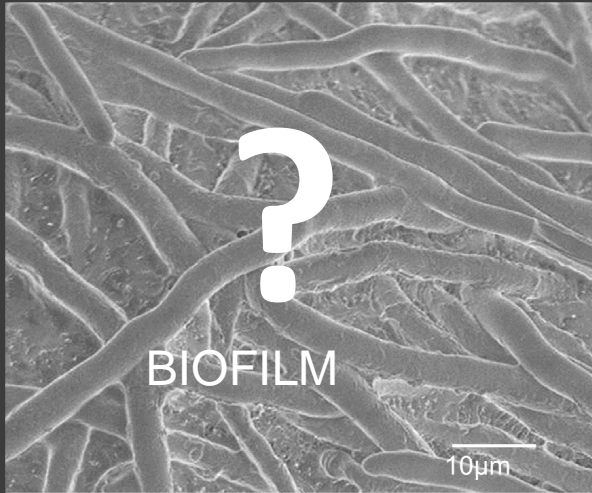
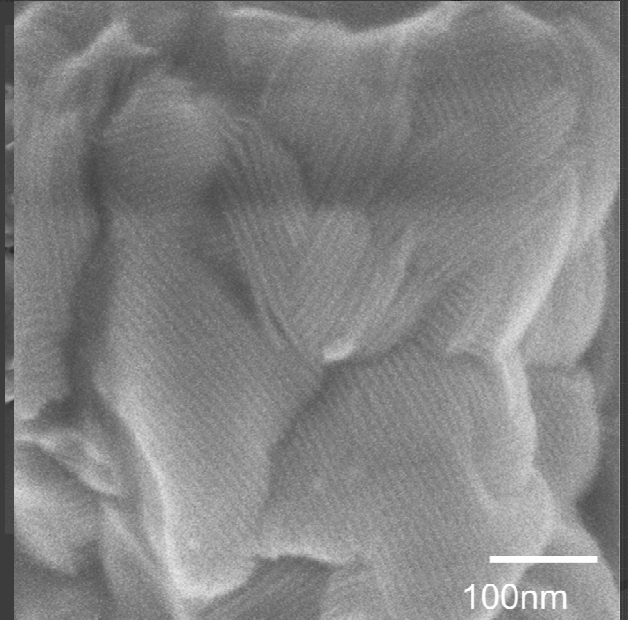
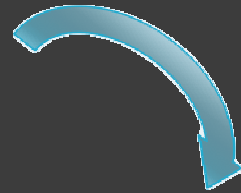
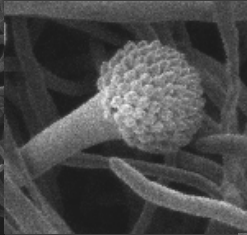
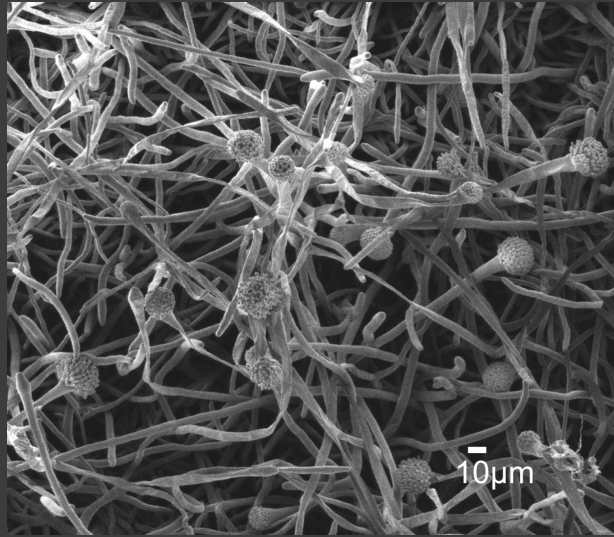




Mycelium



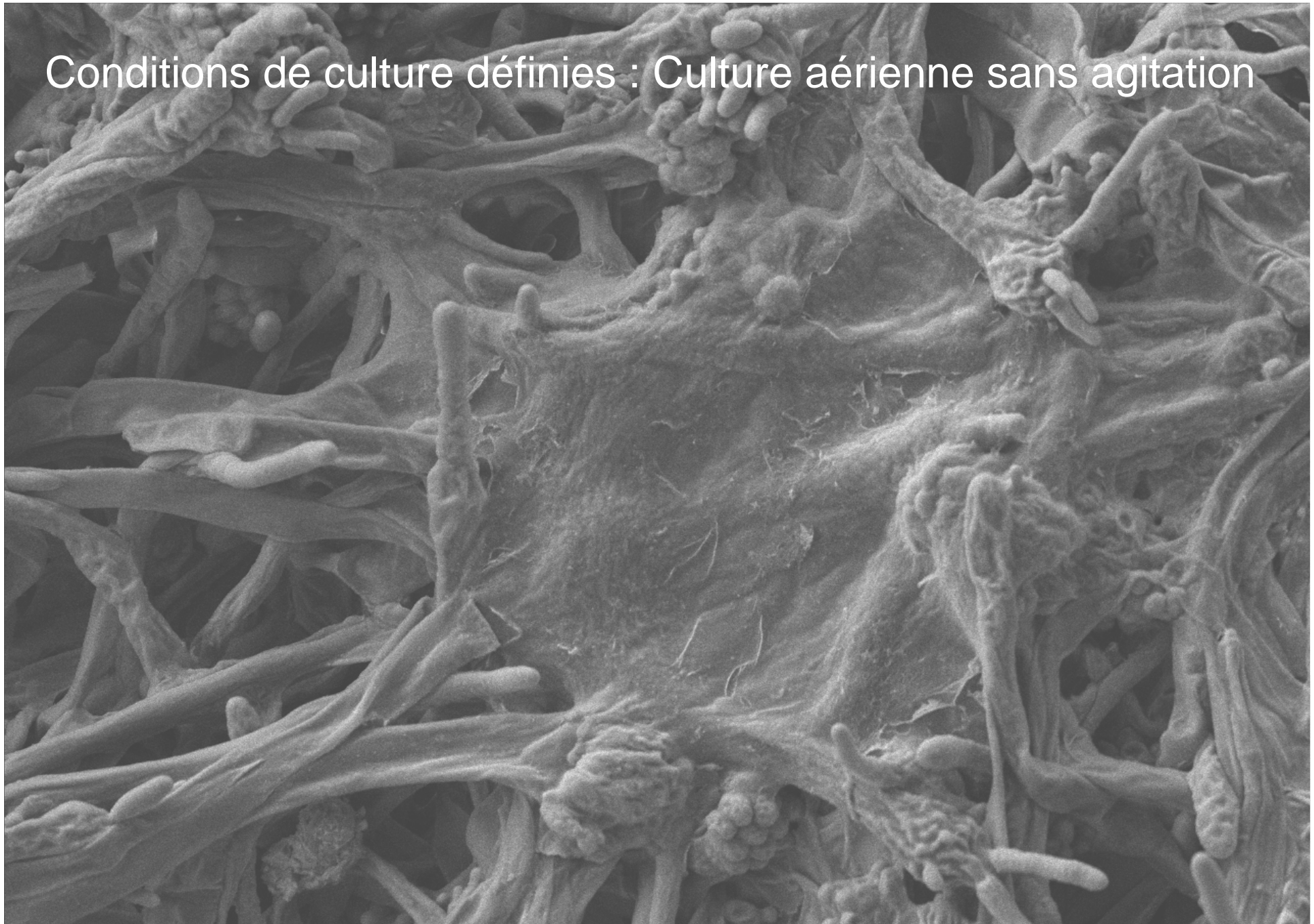
10µm



# BIOFILM ?

- ✓ Communauté de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice.
- ✓ Structure hétérogène : matrice extracellulaire composée de substances polymères
- ✓ Conditions d'observations en MEB classique incompatible avec la composition polysaccharidique de cette matrice.
- ✓
- ✓ Conditions de culture spécifiques.

Conditions de culture définies : Culture aérienne sans agitation



PFME

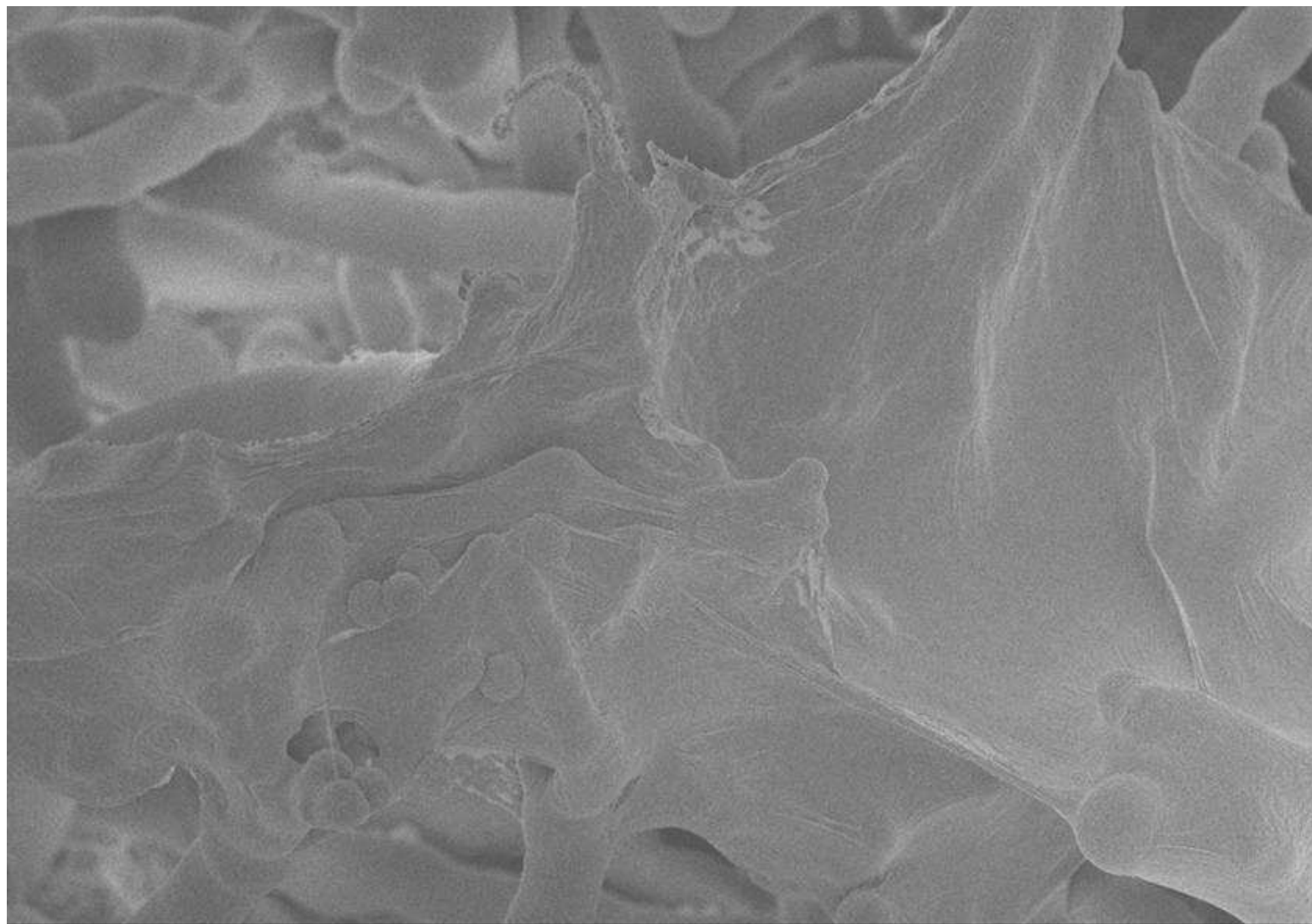
LEI

5.0kV

X1,100

10 $\mu$ m

WD 16.4mm



PFME

SEI

2.0kV

X1,600

10 $\mu$ m

WD 11.0mm

Conditions de culture définies : milieu liquide en agitation



PFME

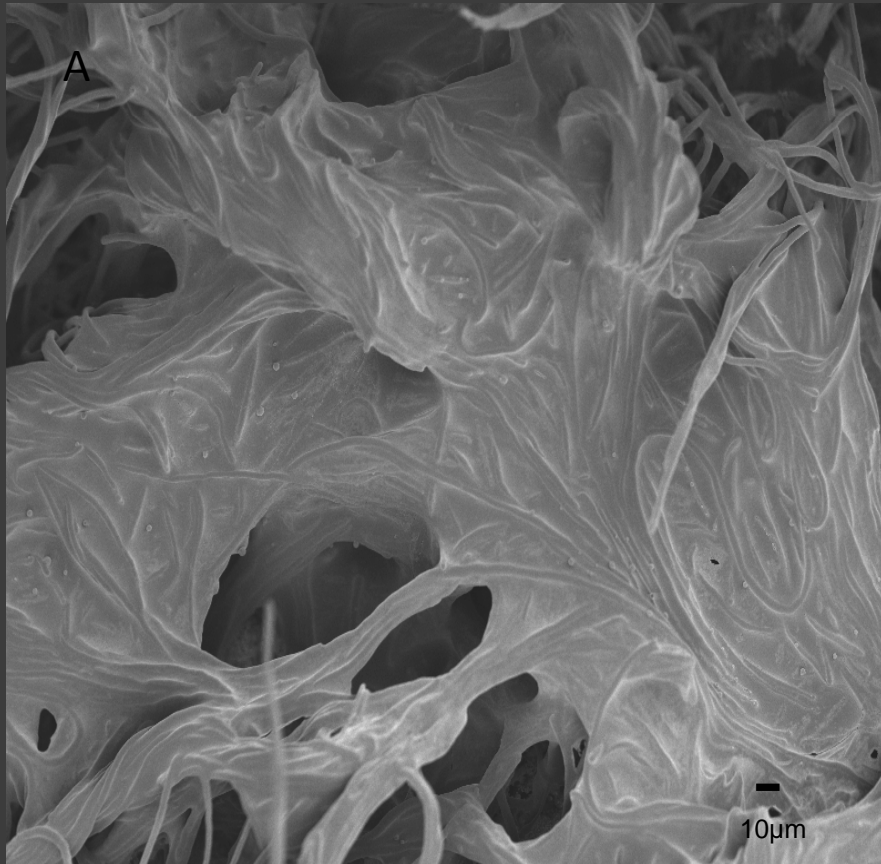
LEI

5.0kV

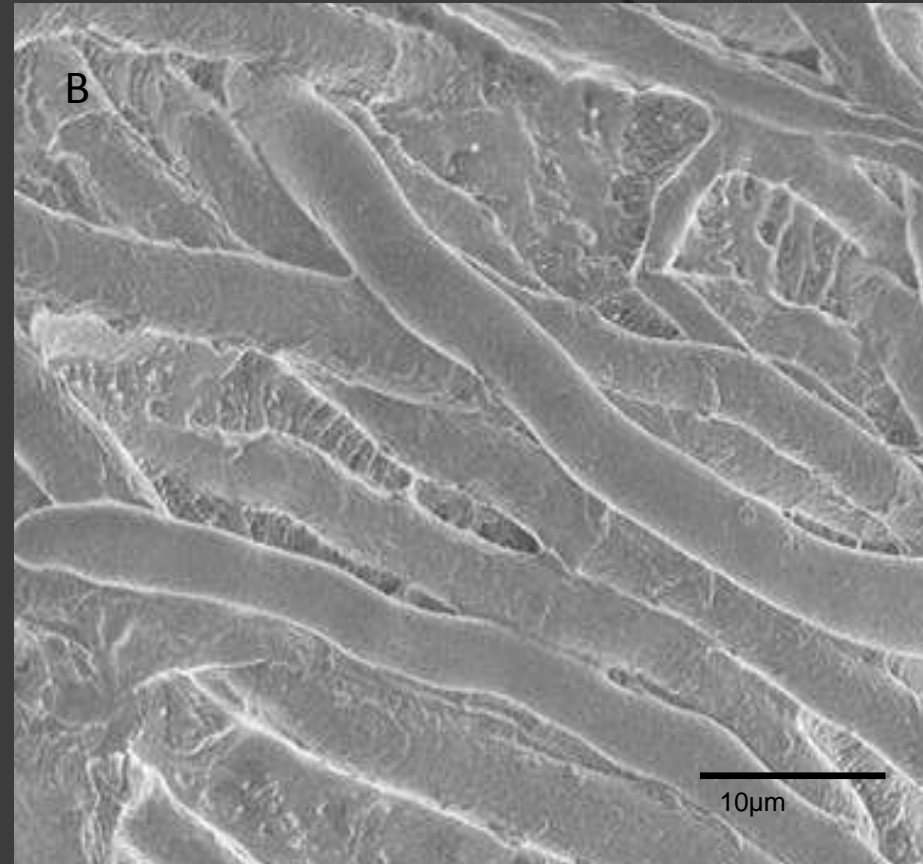
X2,000

10 $\mu$ m

WD 16.5mm

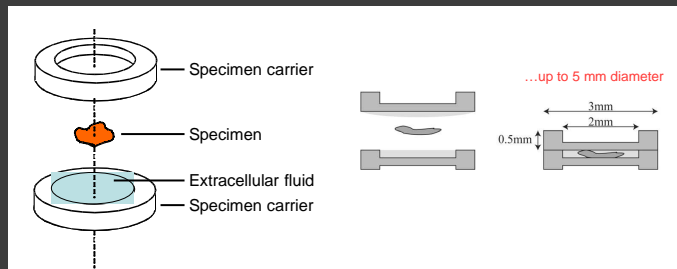


Culture aérienne et sans agitation :  
croissance de matrice extracellulaire



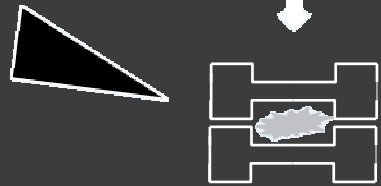
Culture milieu liquide sous agitation :  
pas de croissance de matrice  
extracellulaire

# CRYOFRACTURE

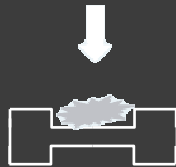


Congélation Haute Pression  
Préservation des structures **HPM10**

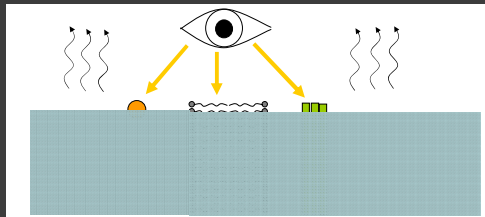
↓  
Transfert dans la prepchambre



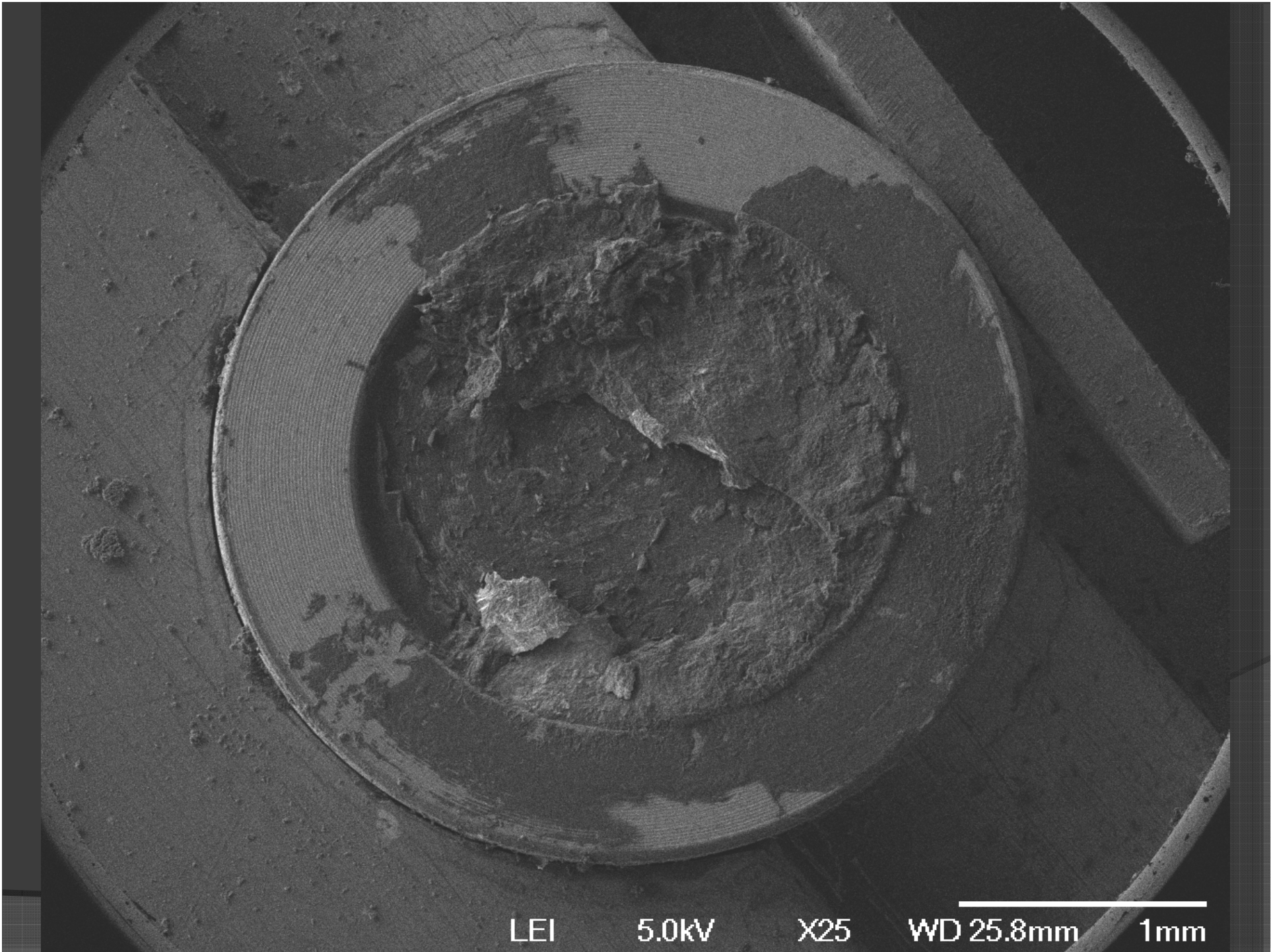
↓  
Fracture



↓  
Sublimation



↓  
Métallisation puis observation



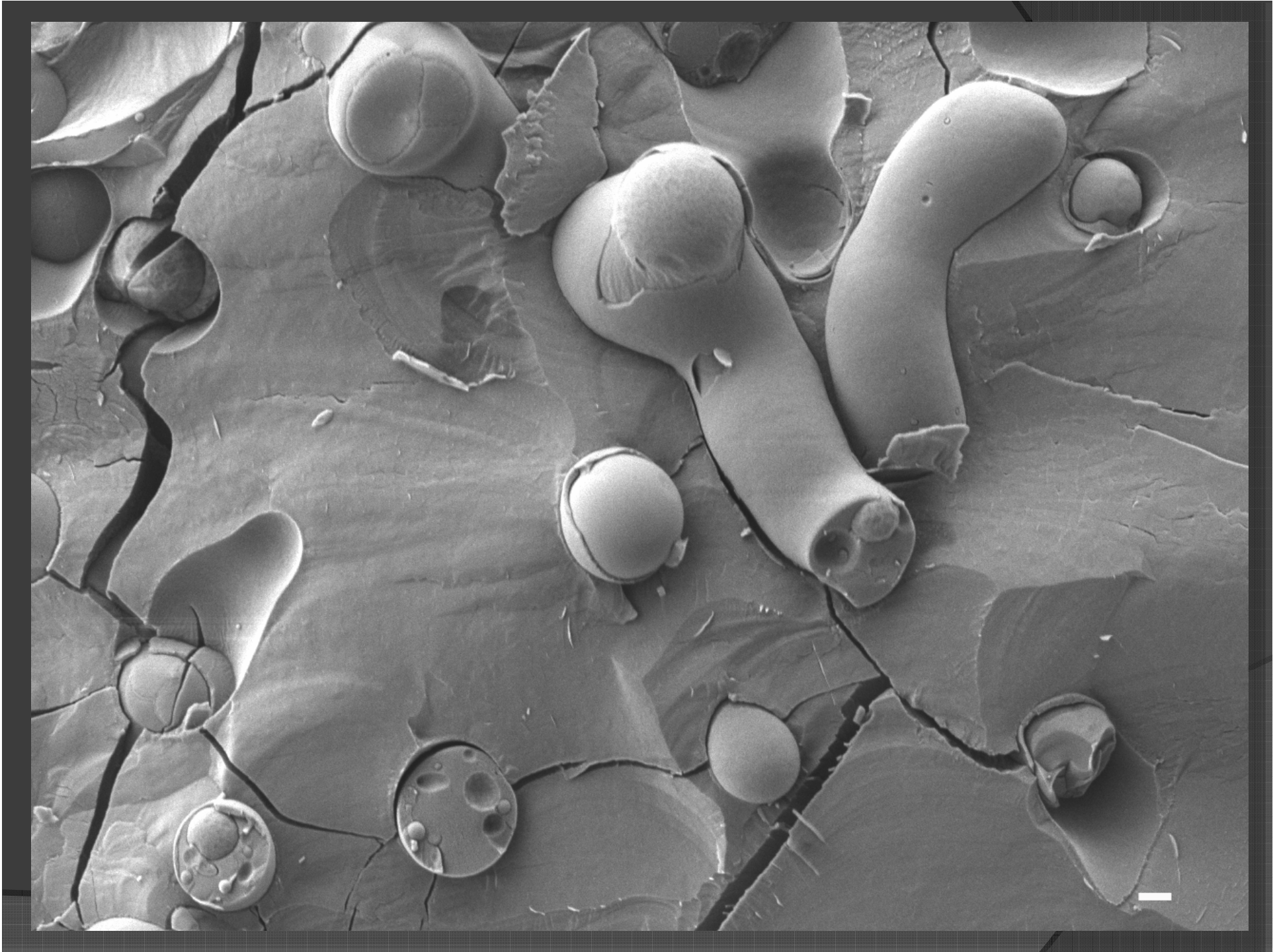
LEI

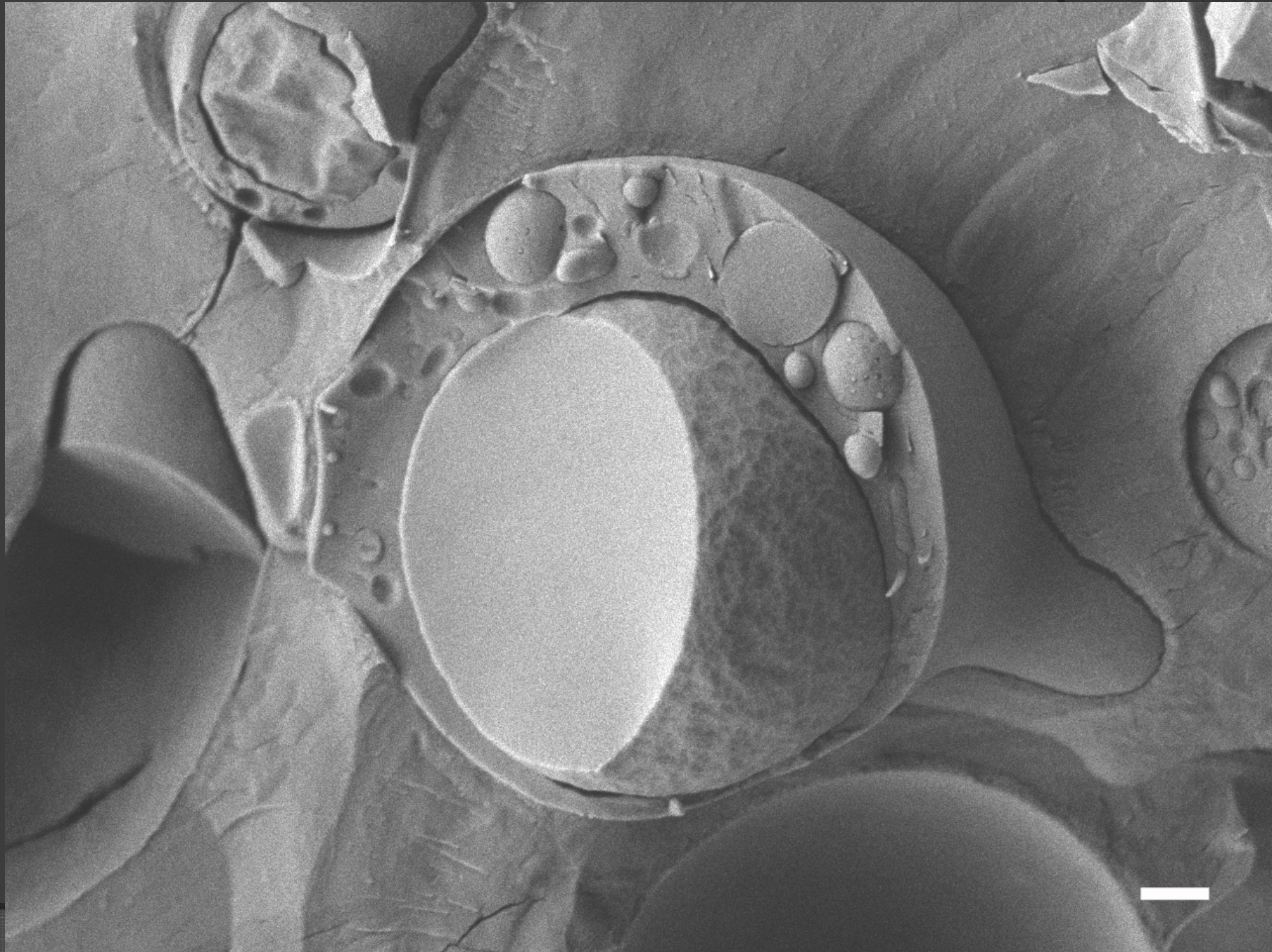
5.0kV

X25

WD 25.8mm

1mm

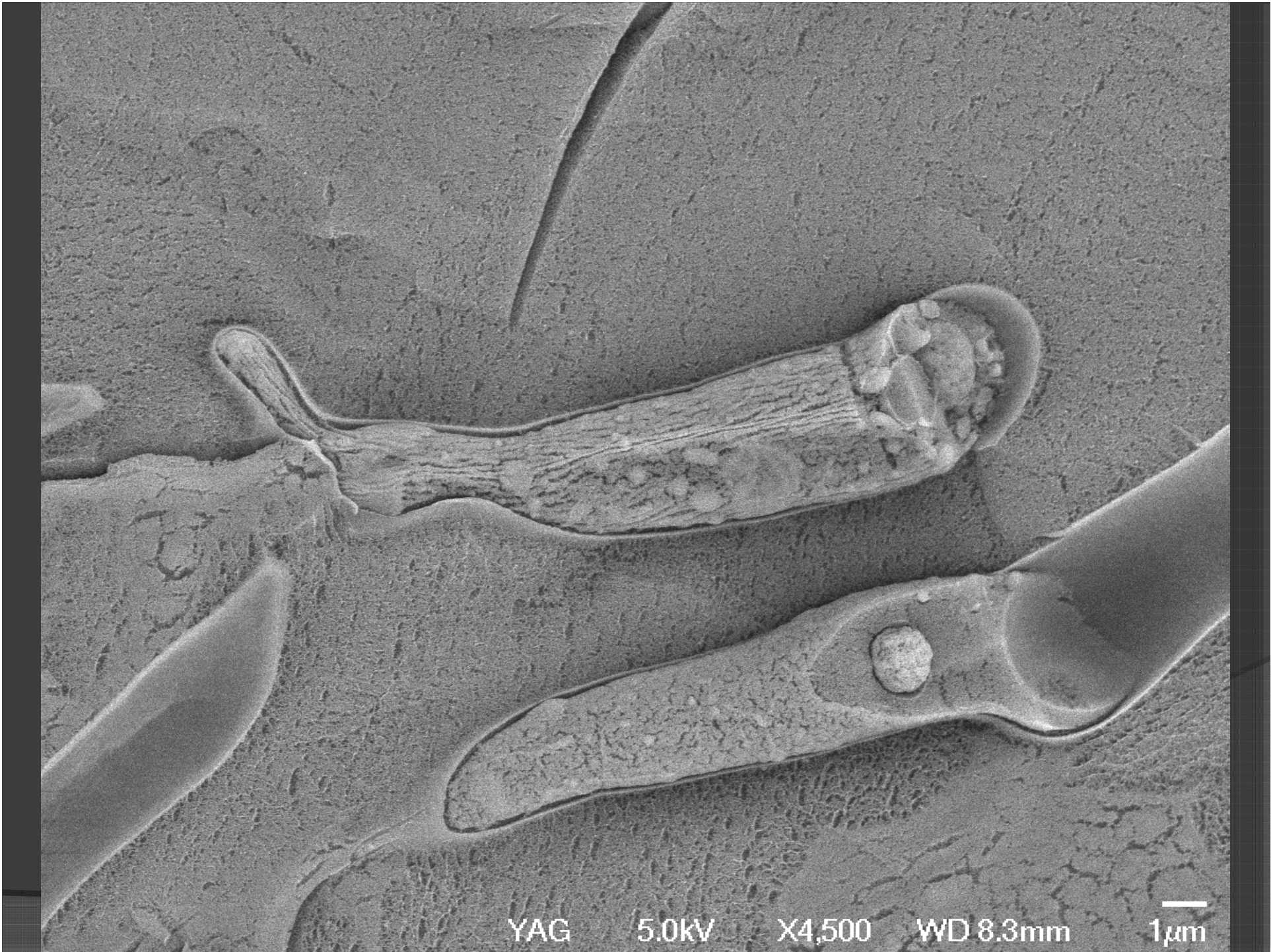




# Plus de détails d'organisation interne ???

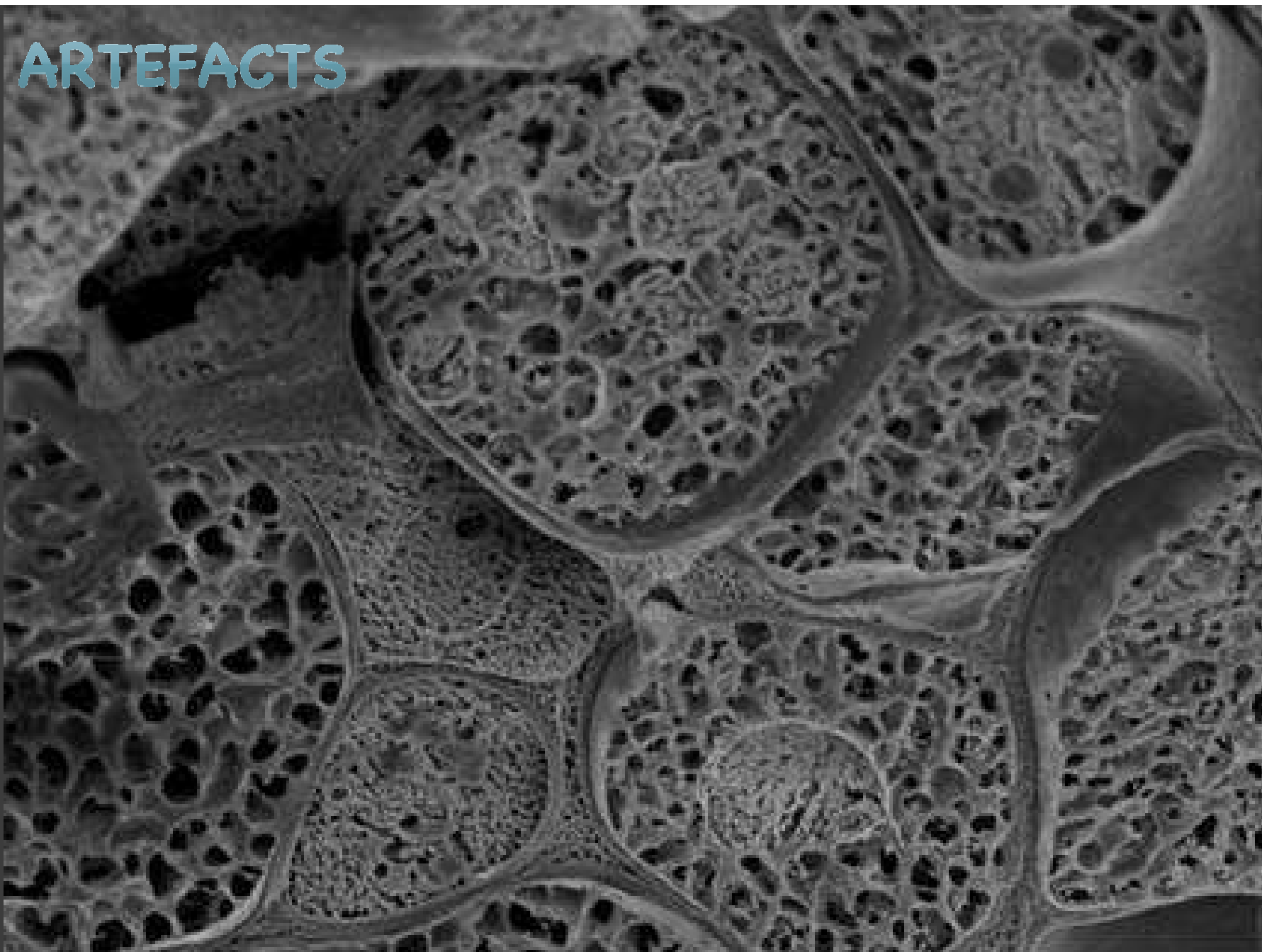
Variation des paramètres de sublimation : accessibilité et meilleure visualisation des constituants internes

Influence du détecteur SEM utilisé : SE , BSE





# ARTEFACTS



PFME

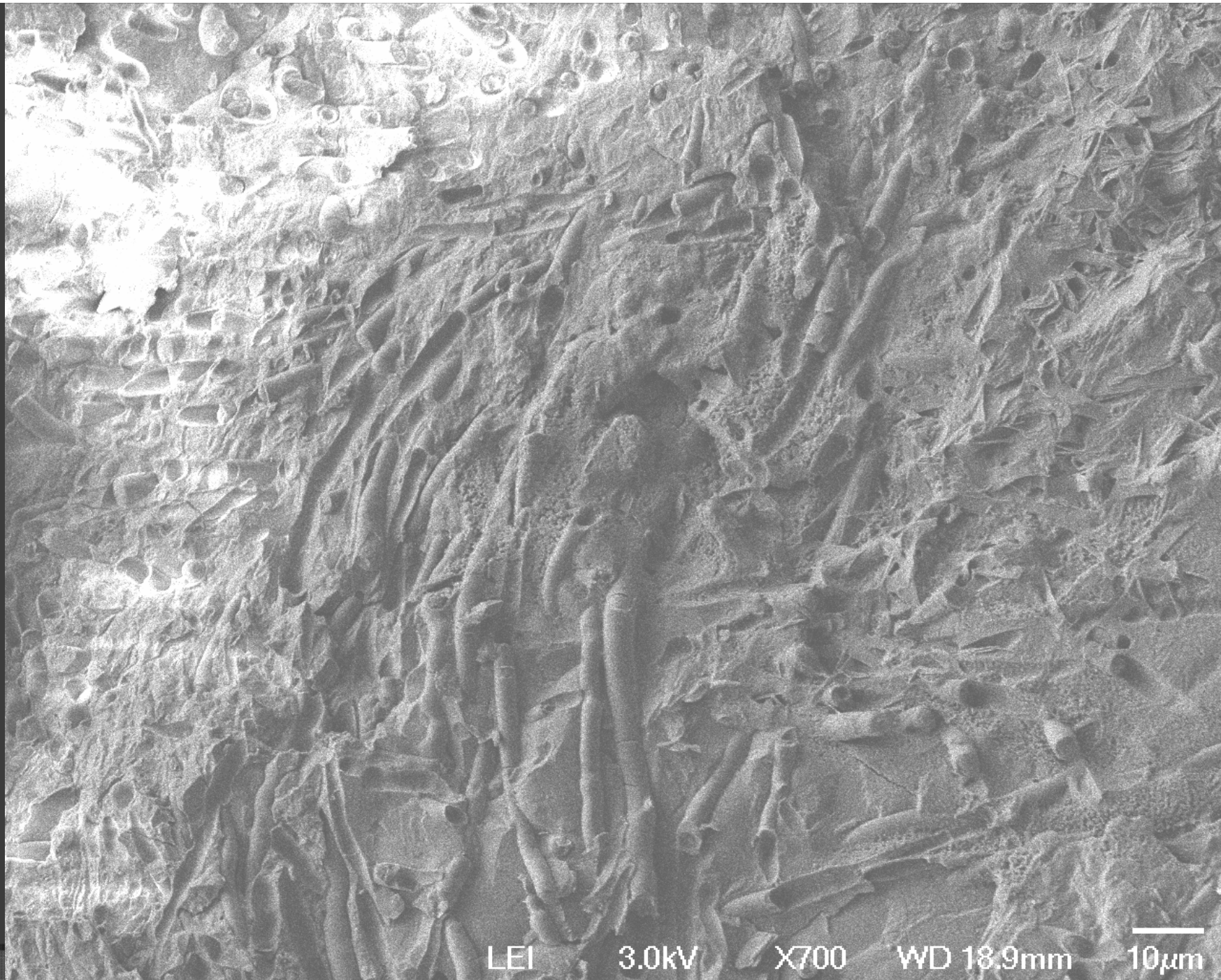
SEI

2.0kV

X9,500

1 $\mu$ m

WD 10.7mm



# CONCLUSION / PERSPECTIVES

## CONCLUSION CryoSEM

Préservation de l'échantillon biologique ( pas de fixation deshydratation....)

Assez rapide à mettre en œuvre ( microscope dédié à cette application)

Observation d'un échantillon plus rapide qu'en conventionnel

## MAIS ...

Nécessite une connaissance des artefacts (congélation / glace)

Étape de sublimation à maîtriser

Conditions d'observation à maîtriser

Echantillon non reobservable

## PERSPECTIVES

Améliorer les conditions de cryofracture : plus de détail de structure et répétabilité

# REMERCIEMENTS

Jean Paul LATGE , Anne BEAUVAIS  
Unité des Aspergillus, iNSTITUT PASTEUR

Martin Sachse , Marie Christine PREVOST  
PFMU/IMAGOPOLE

Merci de votre attention....

