



Principe et perspectives de la microscopie électronique en biologie

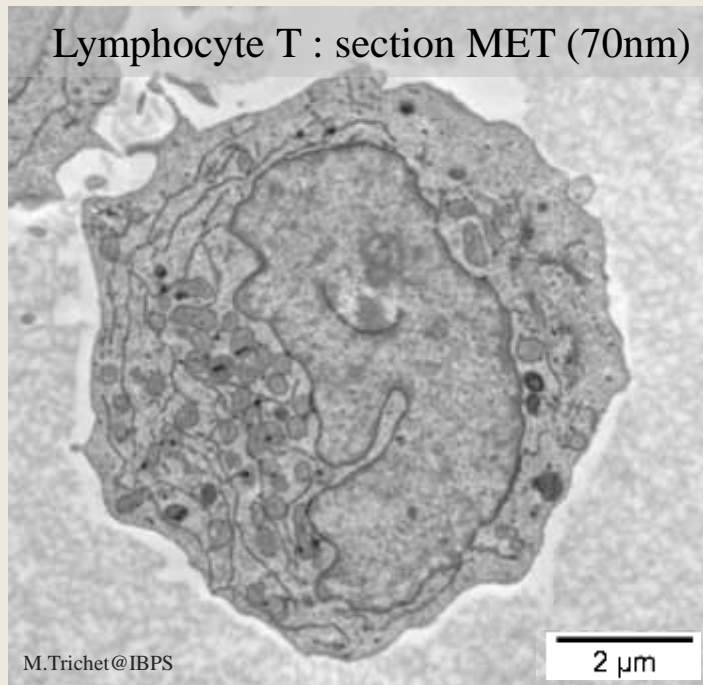
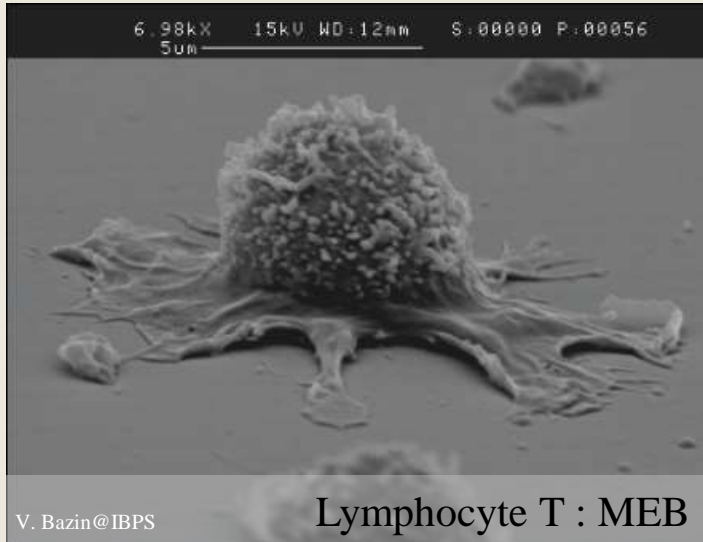
Michaël Trichet

Service de Microscopie Electronique

Institut de Biologie Paris-Seine



1) L'échantillon biologique

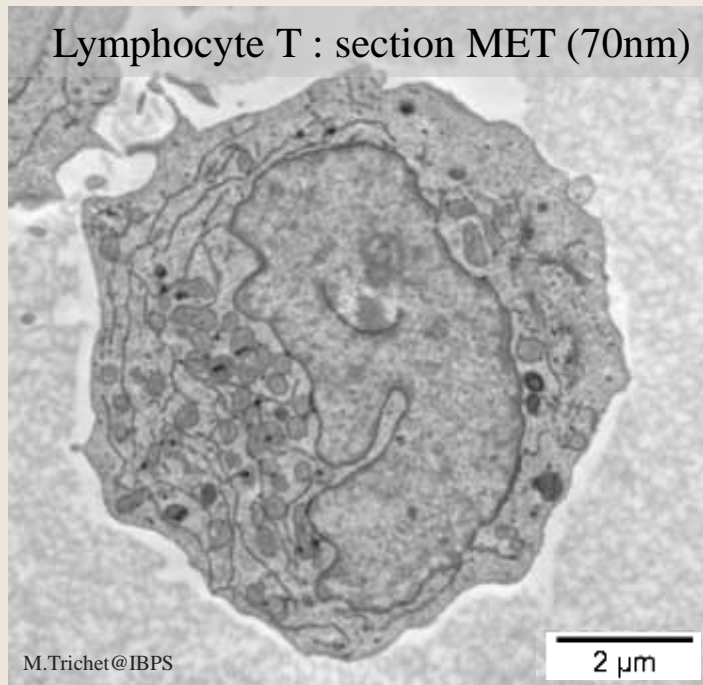
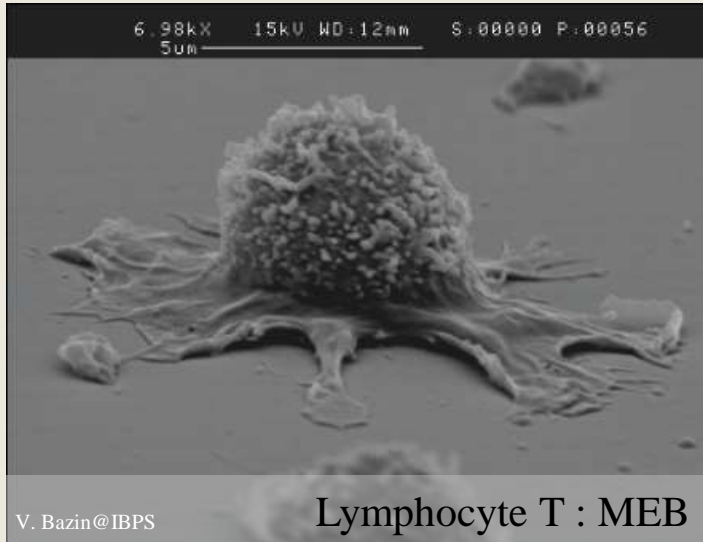


Echantillons biologiques :

Composition générale :

- Eau, sels et minéraux
- Lipides (bicouches, gouttelettes)
- Acides nucléiques (ADN / ARN)
- polymères d'acides aminés (protéines)
- Sucres variés
- Composés variés (vitamines, hormones ...)
- Très dynamique
- Compartimentation

1) L'échantillon biologique



Echantillons biologiques :

Contraintes pour la microscopie :

- Mous
- Hydratés
- Taille, structure et organisation variables et complexes
- Sensibilité : osmolarité, pH, température, salinité, hydrophobicité, contraintes mécaniques, rayonnements, ...
- Non conducteurs

**Préparation d'échantillons
indispensable**

1) Préparation d'échantillons conventionnelle en ME

Préparation MEB

Fixation chimique
aldéhydes

Post-fixation
tétroxyde d'osmium

Déshydratation
éthanol

Séchage
Contournement point critique
Évaporation HMDS

Métallisation
Au, Pt, C, Au/Pd

Préparation MET

Fixation chimique
aldéhydes

Post-fixation
tétroxyde d'osmium

Déshydratation
éthanol / acétone

Inclusion
Résines époxy ou acryliques

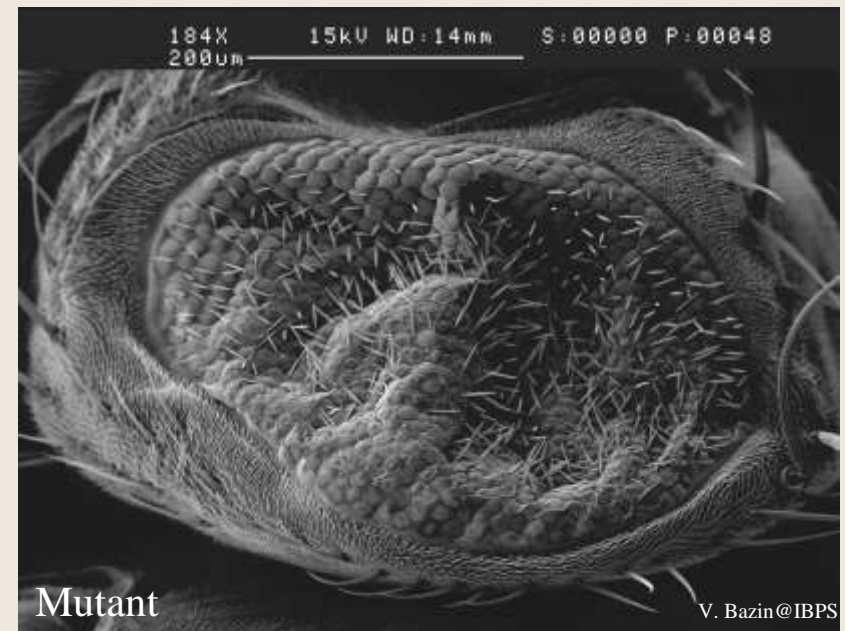
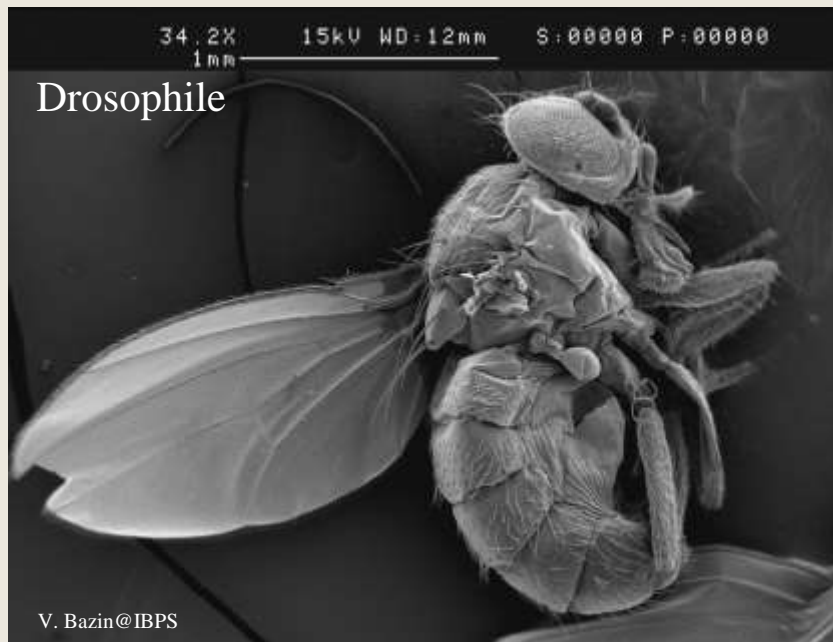
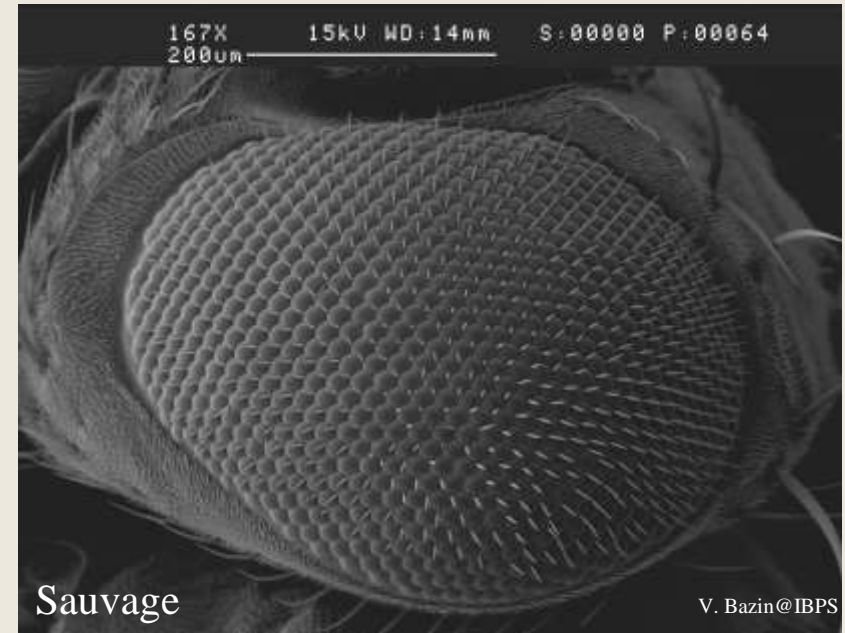
Ultramicrotomie

Contraste
Pb, U, Lanthanes

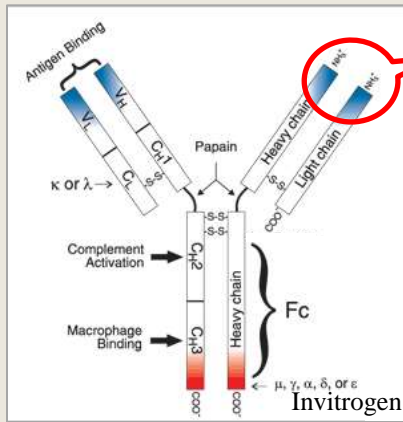
1) Exemples d'applications en biologie : la description

Démarche scientifique en biologie :

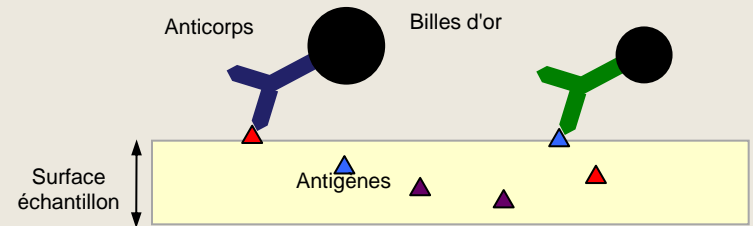
- Etudier des modèles de dysfonctionnements de processus biologiques
- Dysfonctionnements pathologiques ou induits (mutations, lésions, stress)



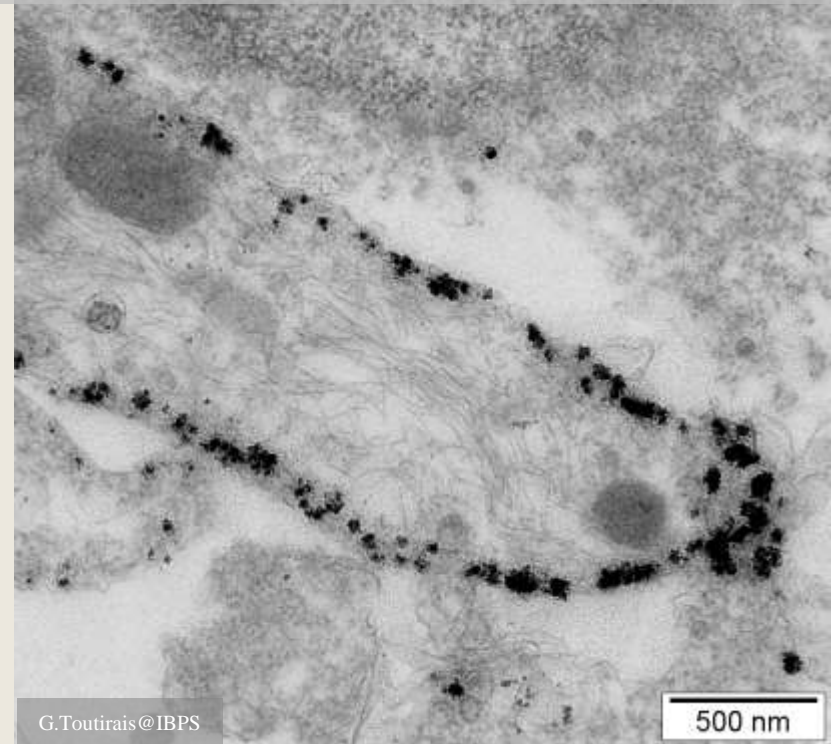
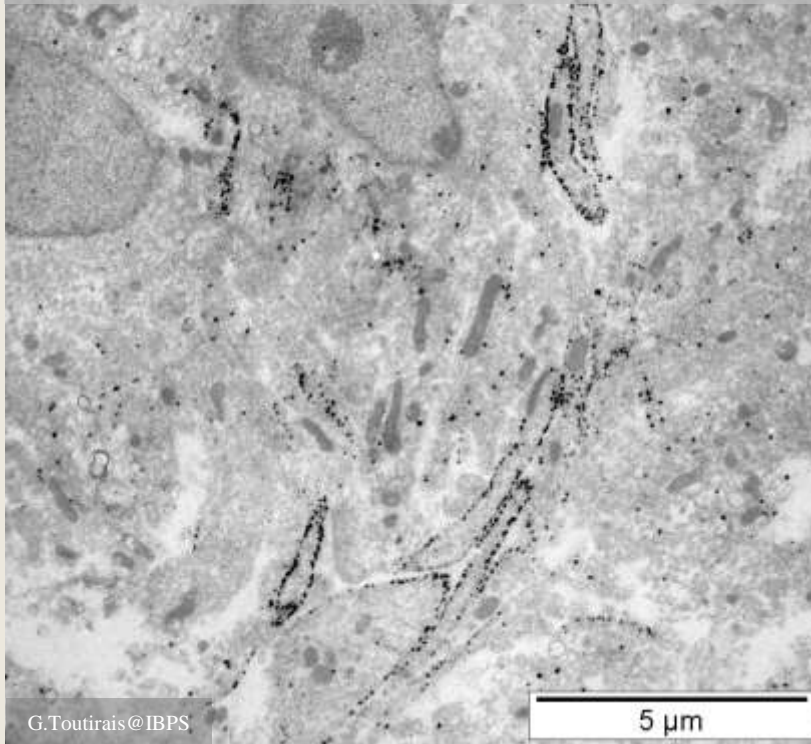
1) Exemples d'applications en biologie : la localisation



Domaine variable :
forte affinité et
spécificité pour
l'Antigène



Moelle épinière embryo de souris (MET) : localisation Ank-G



1) Préparation d'échantillons conventionnelle en ME

Préparation MEB

Fixation chimique
aldéhydes

Post-fixation
tétroxyde d'osmium

Déshydratation
éthanol

Séchage
Contournement point critique
Évaporation HMDS

Métallisation
Au, Pt, C, Au/Pd

Préparation MET

Fixation chimique
aldéhydes

Post-fixation
tétroxyde d'osmium

Déshydratation
éthanol / acétone

Inclusion
Résines époxy ou acryliques

Ultramicrotomie

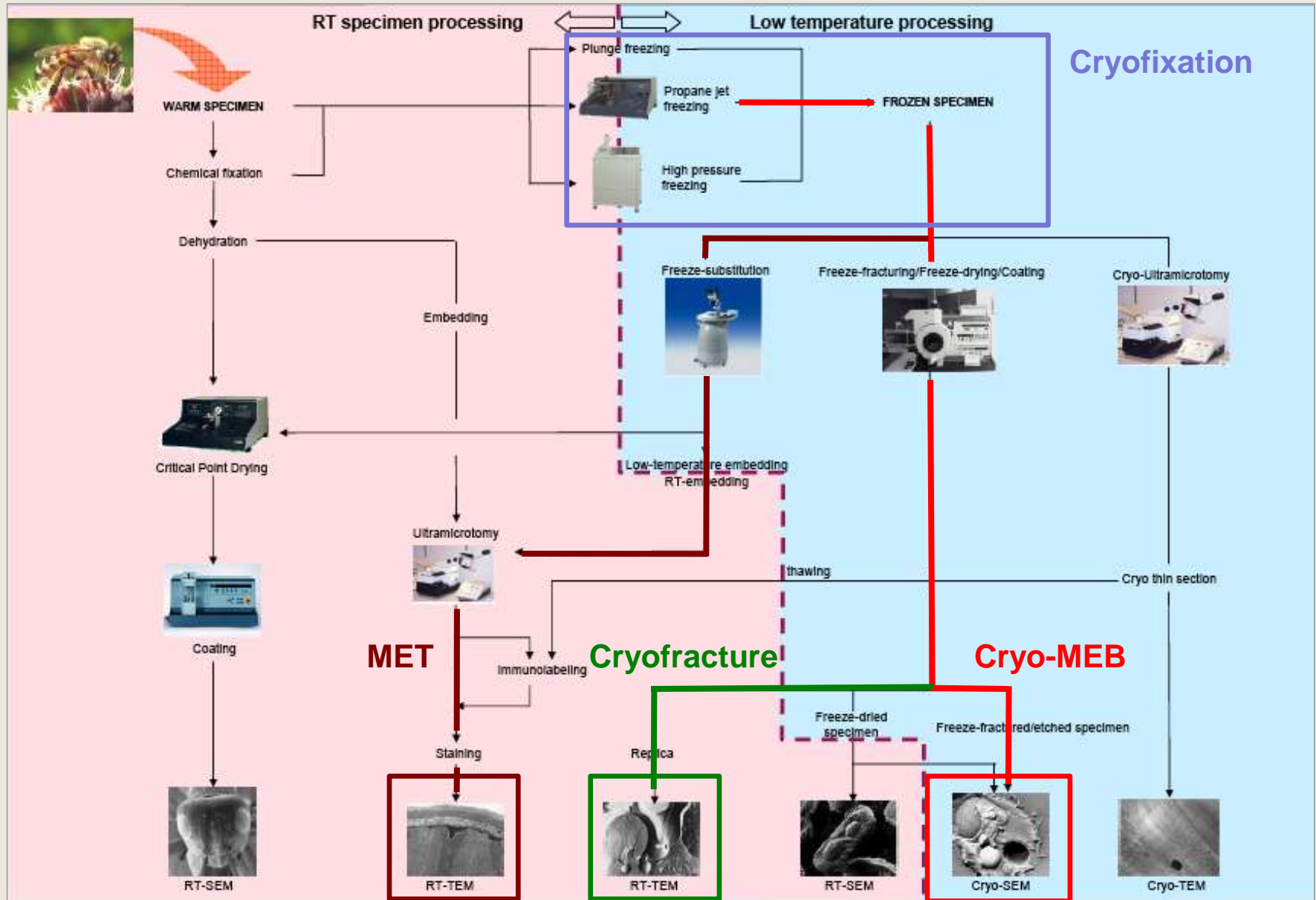
Contraste
Pb, U, Lanthanes

Artefacts

- Pénétration lente + gradients de diffusion
- Cellule n'a pas un pH uniforme
- Extraction / modifications constituants
- Déformations structures

2) Pourquoi la cryo en microscopie électronique ?

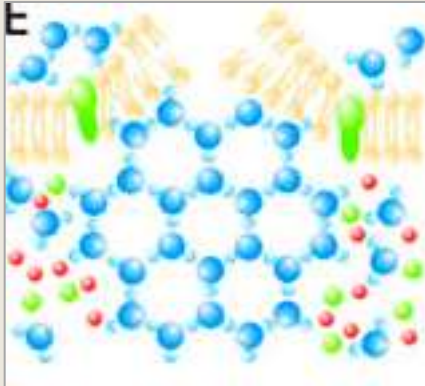
Comment observer des échantillons massifs préparés à minima ?



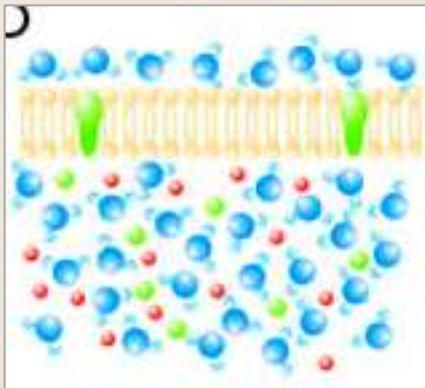
2) Cryofixation

Peut-on congeler un échantillon aqueux sans en altérer la structure ?

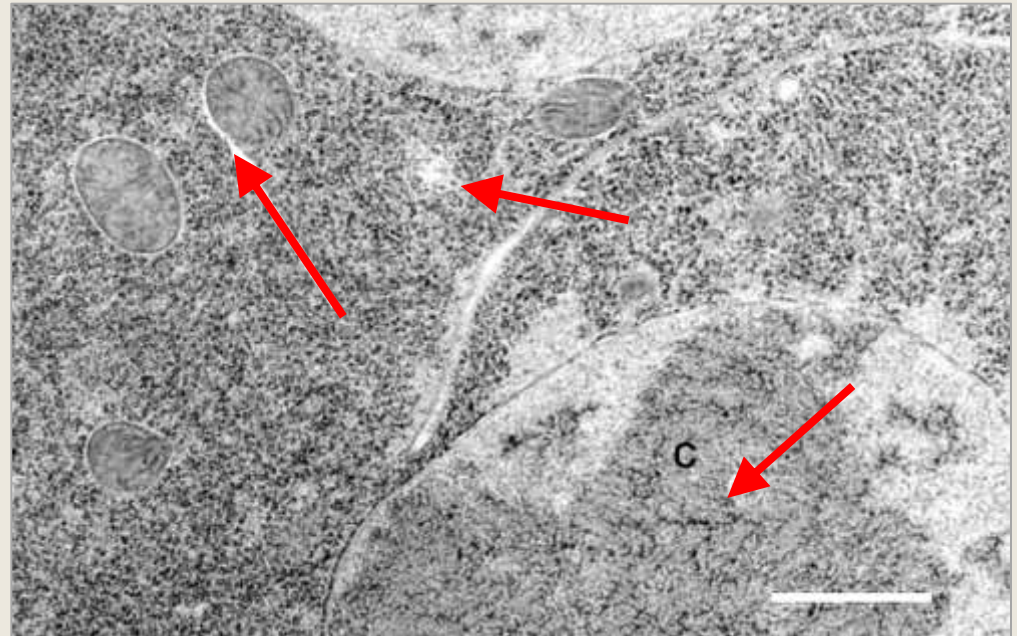
Glace hexagonale



Eau vitreuse amorphe



Han et coll., 2012



Mc Donald, 2007

Congélation et préservation structures :

Vitrification : "congélation" sans formation de cristaux

- Cryofixation rapide
- Taille échantillons
- Modifier propriétés de l'eau
- (Cryoprotection)

2) Cryofixation

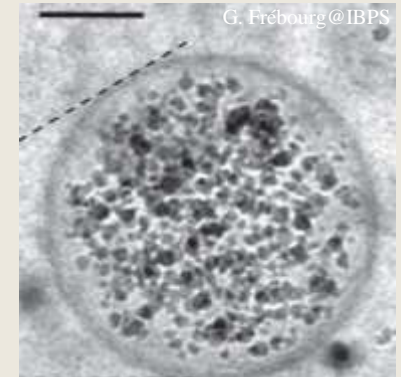
Plonge dans l'azote pâteux

- Congélation +-
- Echantillons massifs de taille et de composition variée



Plonge dans l'éthane liquide

- Congélation ++
- Echantillons de composition varié
- Echantillons biologiques de tailles restreintes (< 200 nm)



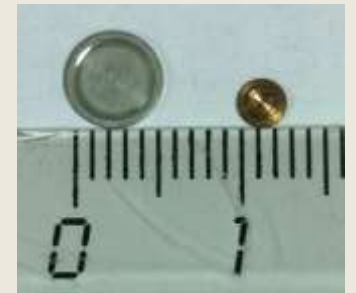
Marie and al., 2015, Adv. Funct. Mater.

La cryo-fixation haute-pression

- Congélation ++++
- Vitrification : épaisseur 200 μm , largeur 3 à 6 mm



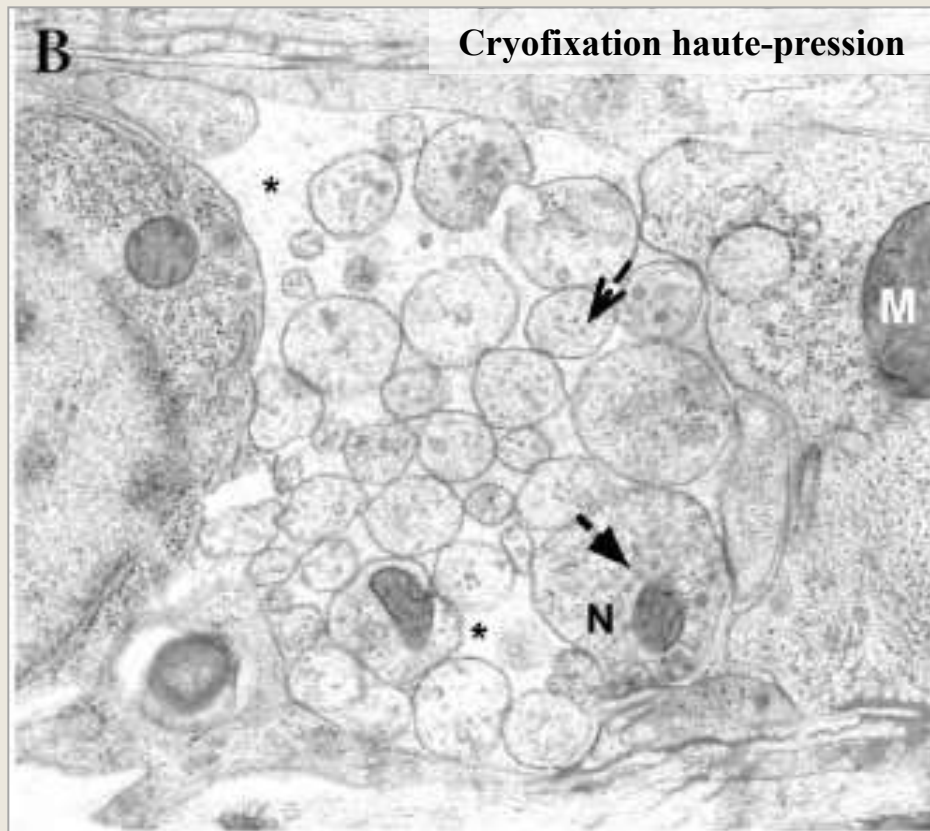
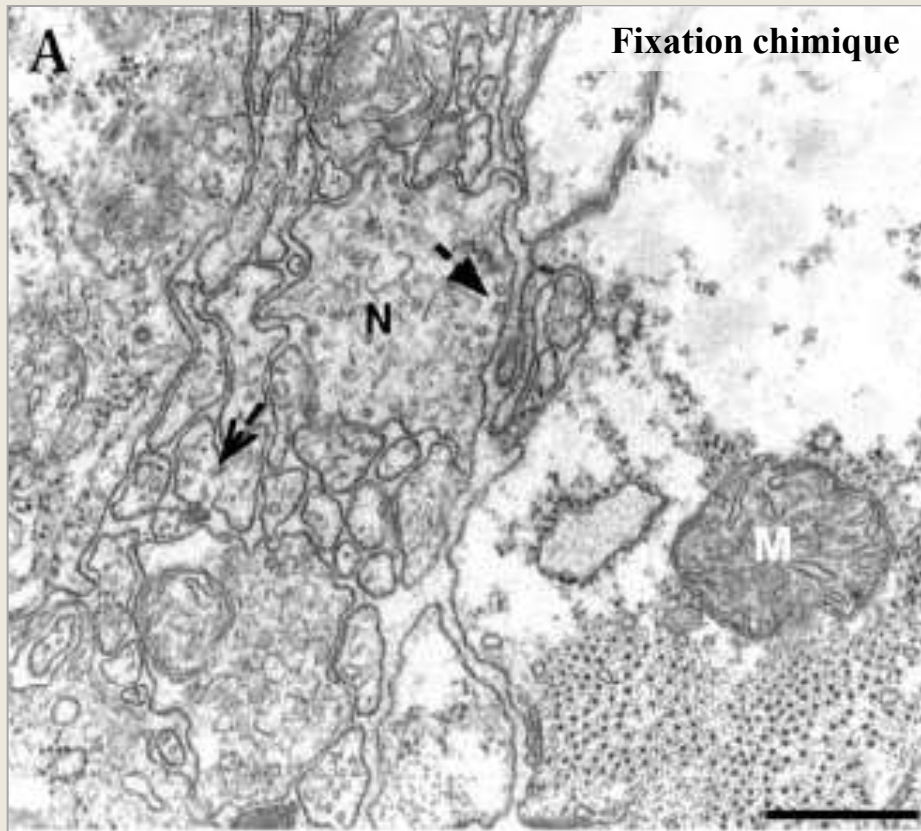
Leica



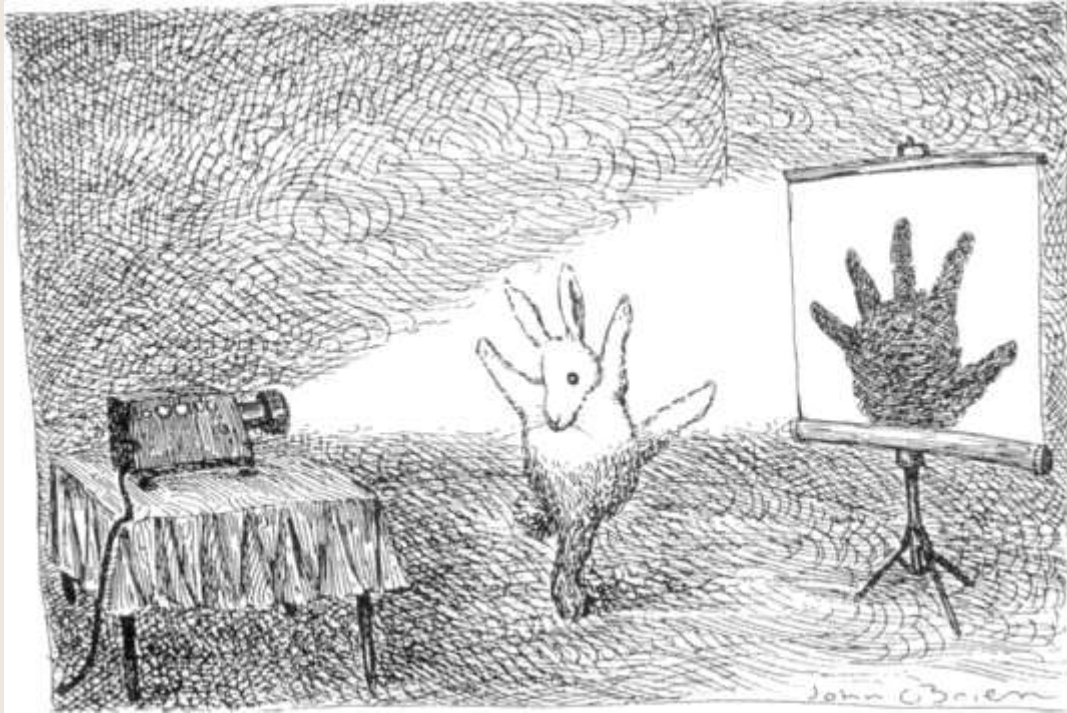
2) Cryo-préparation d'échantillons en MET

Principe :

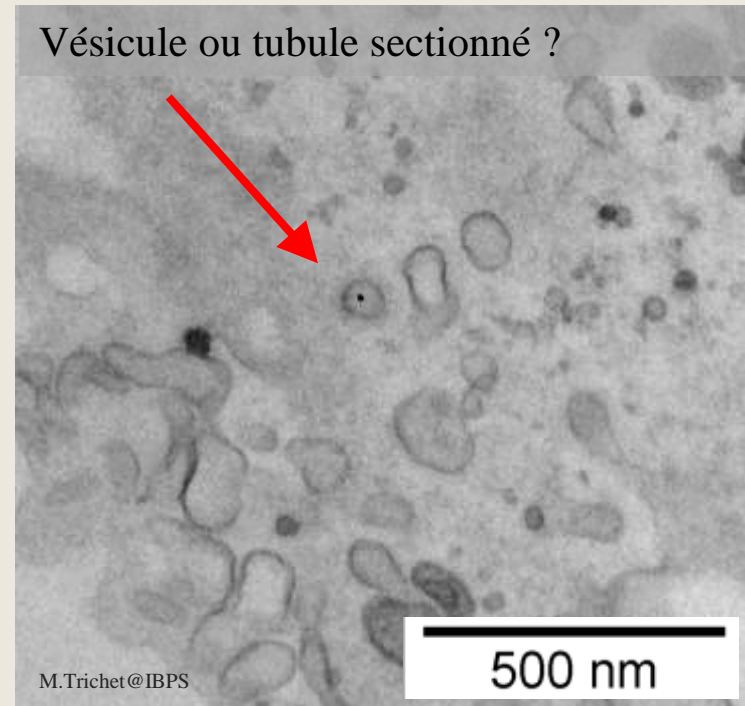
- Cryofixation haute-pression
- Cryosubstitution progressive de l'eau par un solvant
- Montée en température et inclusion en résine



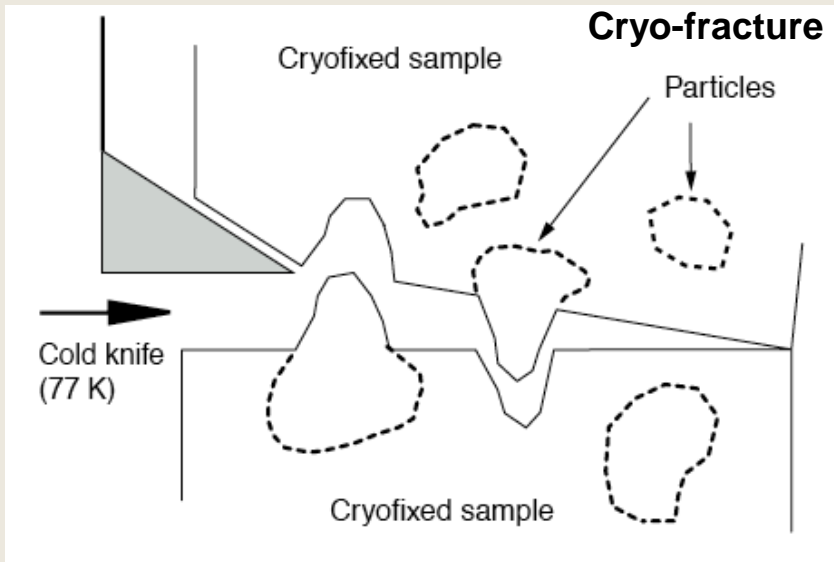
3) L'intérêt de la topologie en ME



Micrographes en MET :
projections 2D de structures 3D



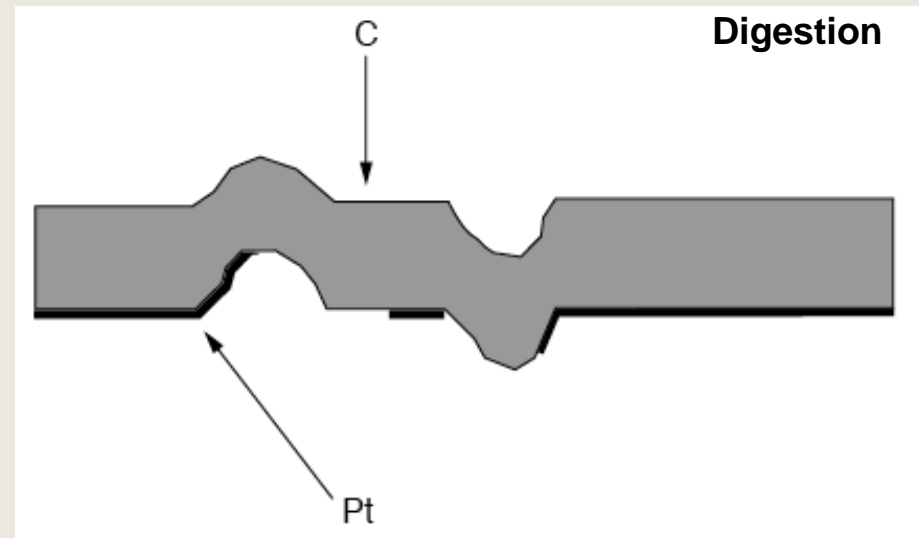
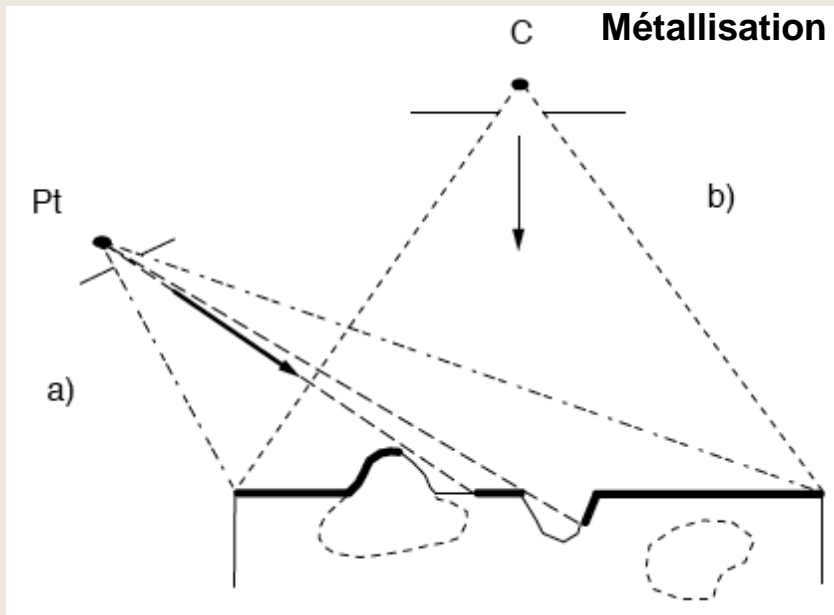
3) Topologie en cryo-ME : la cryofracture



Principe :

- casser un échantillon durci par congélation
- observation en MET

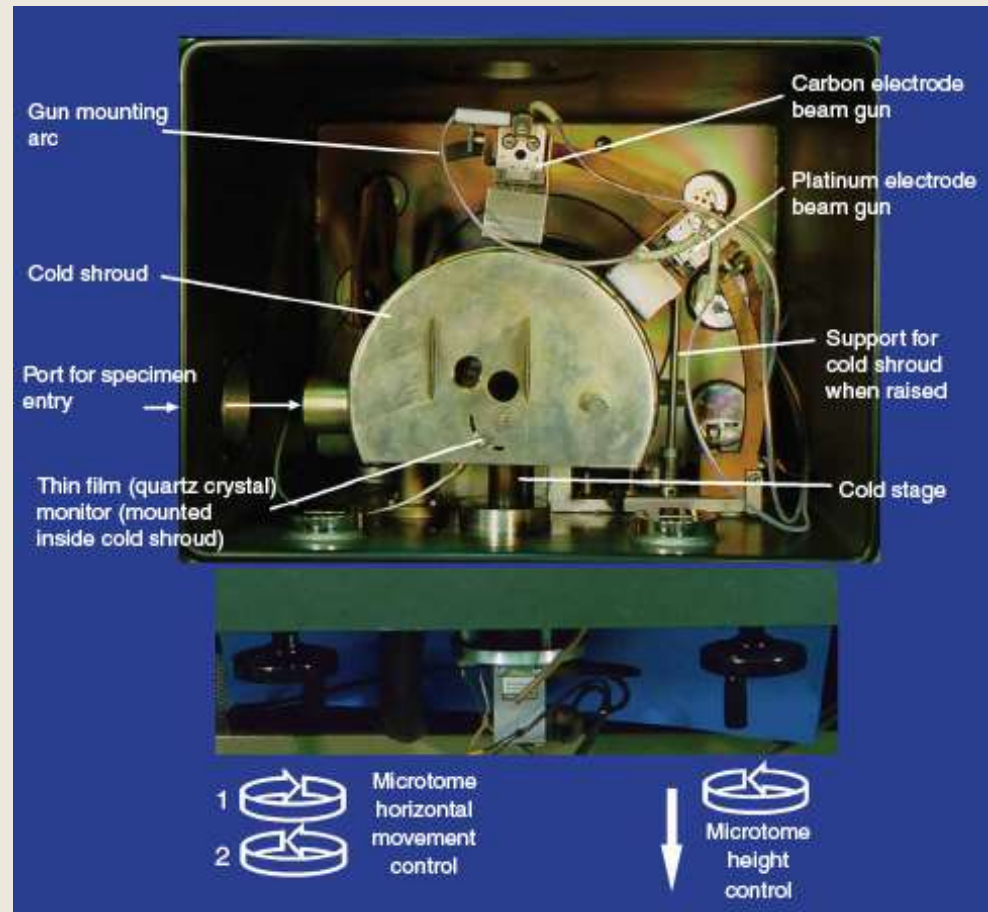
- Cryofixation
- Transfert dans appareil de cryofracture
- Cryofracture (-150°C)
- Métallisation de la surface (Pt + C)
- Digestion échantillon
- Observation de la réplique en MET



3) Topologie en cryo-ME : la cryofracture



BAF400T de Bal-Tec (IBPS)



3) Topologie en cryo-ME : la cryofracture

La cryofracture :

Avantages :

- échantillon dans son état natif
- structure de l'échantillon en 3-D

Inconvénients :

- Digestion (temps + "recette à adapter")
- Champs d'observation réduits



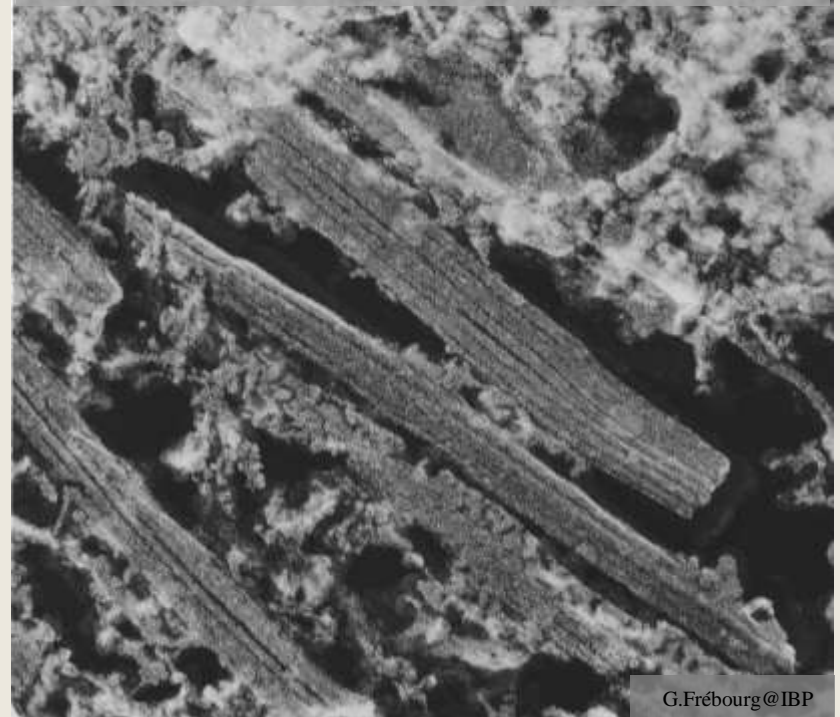
Hotworm/Larve 2000

Chitine de *Riftia pachyptila*



G.Frébourg@IBP
S

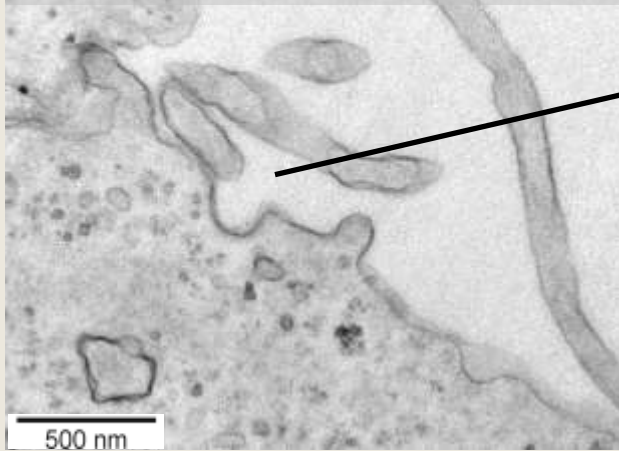
Chitine de *Riftia pachyptila*



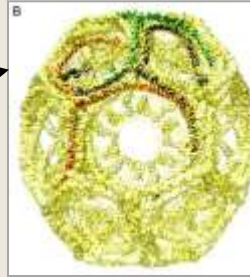
G.Frébourg@IBP
S

3) Topologie en cryo-ME : la cryofracture

Puit de clathrine, surface cellulaire
MET



Modèle Cryo-
MET



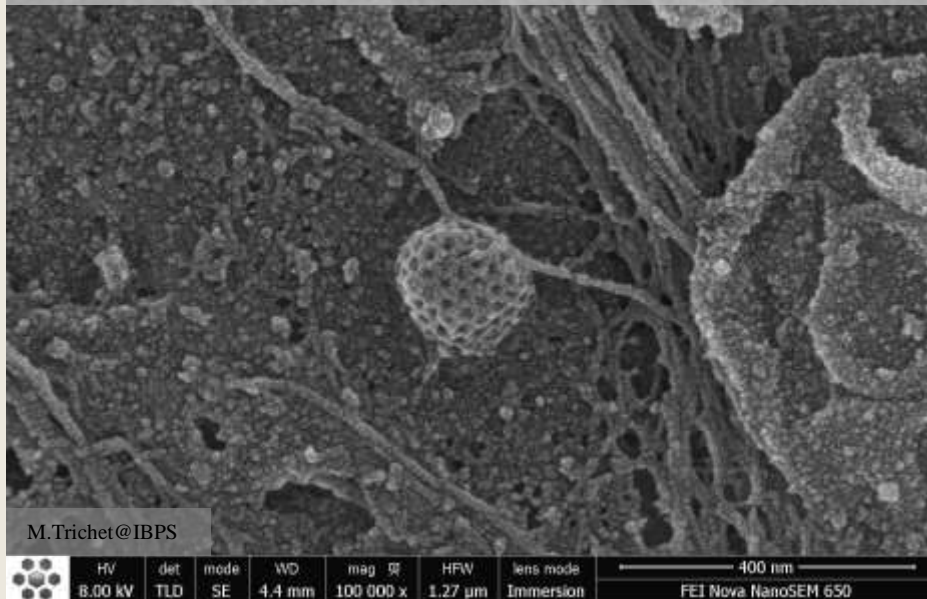
Cheng & Walz, 2007

Clathrine :

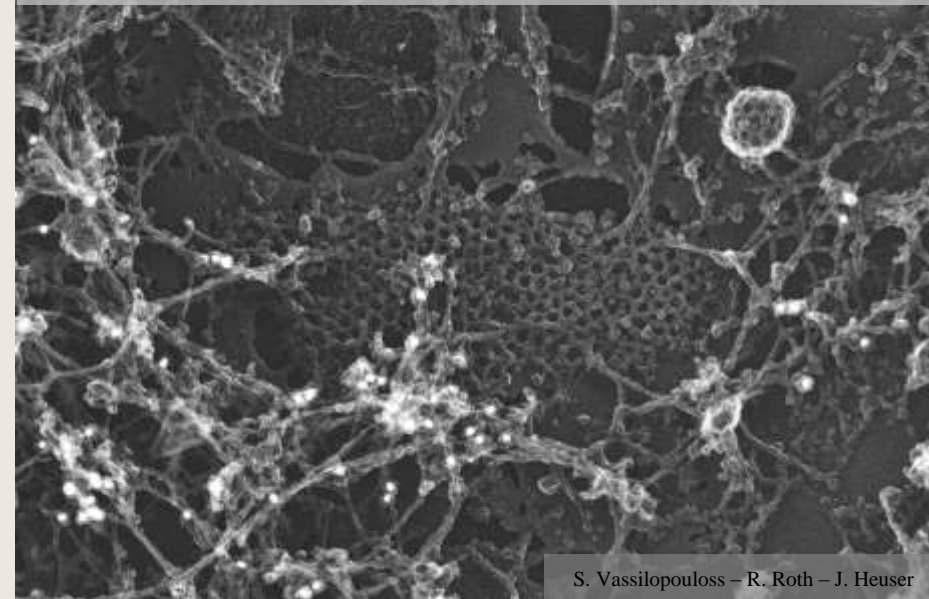
- Protéine assemblée en cages
- Déformation membranes pour internalisation de molécules extracellulaires

Vassilopoulos et coll., JCB 2014

Membrane purifiée – MEB conventionnel



Membrane purifiée – cryo + MET



3) Introduction au cryo-MEB

Le cryo-MEB :

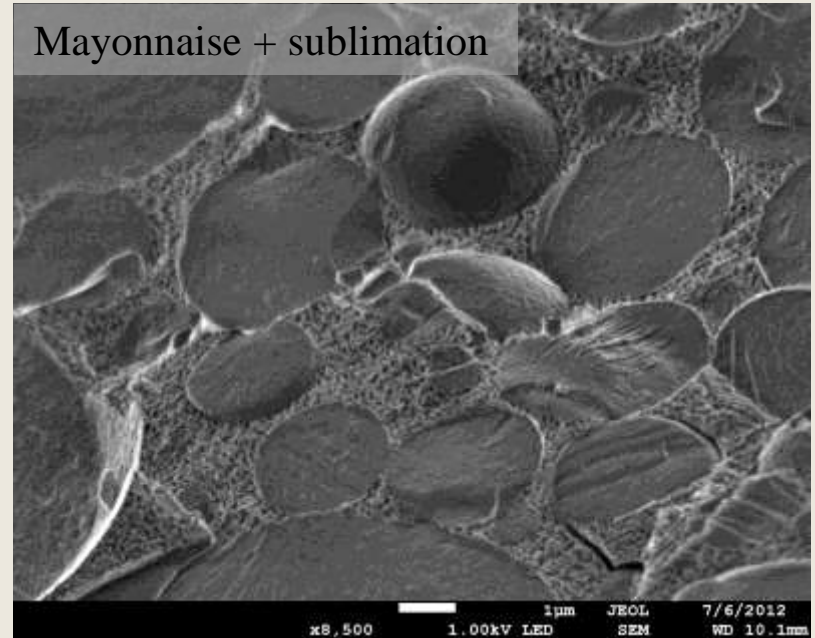
Avantages :

- échantillon dans son état natif
- structure de l'échantillon en 3-D
- Ø digestion, Ø manipulation de répliques
- champs d'observation étendus

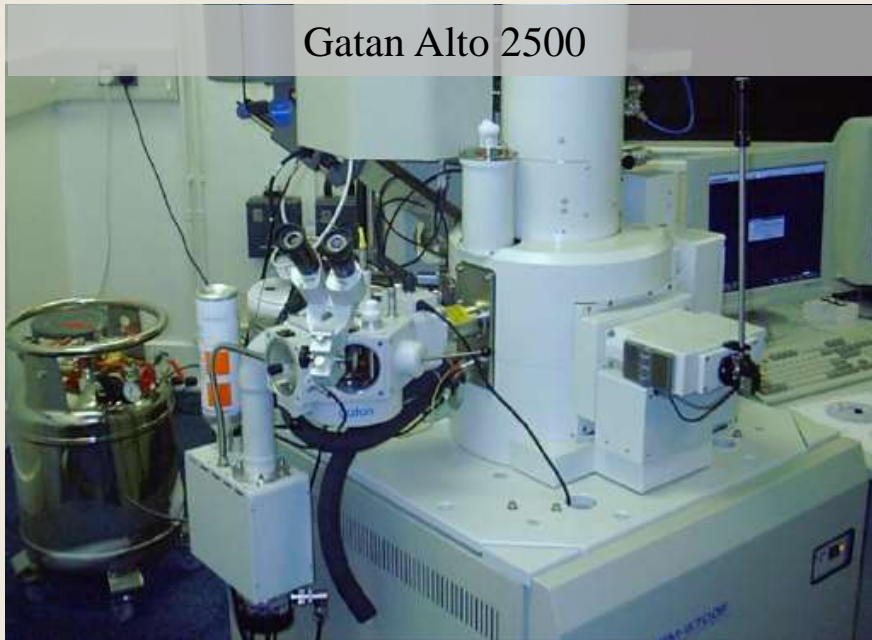
Inconvénients :

- résolution MEB vs MET
- finesse du dépôt métallique

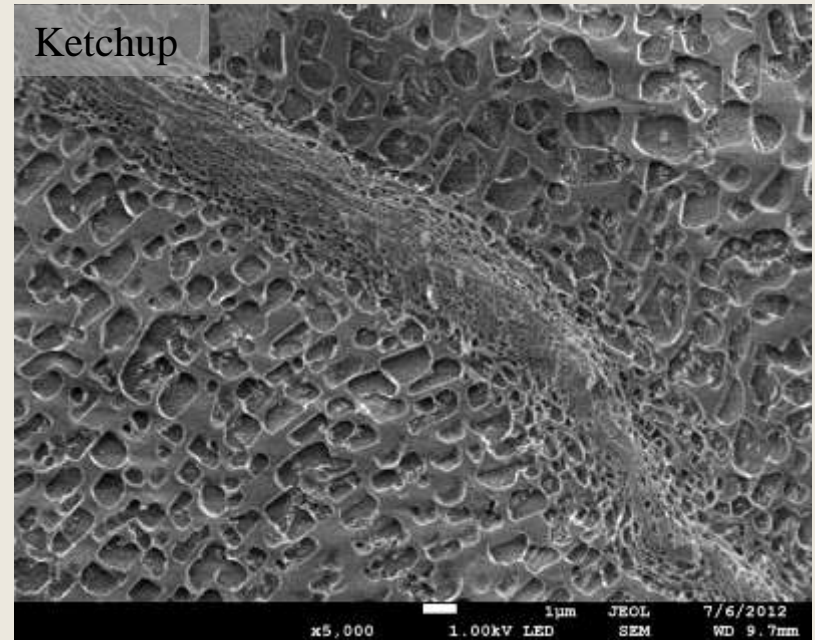
Mayonnaise + sublimation



Gatan Alto 2500



Ketchup



3) Introduction au cryo-MEB

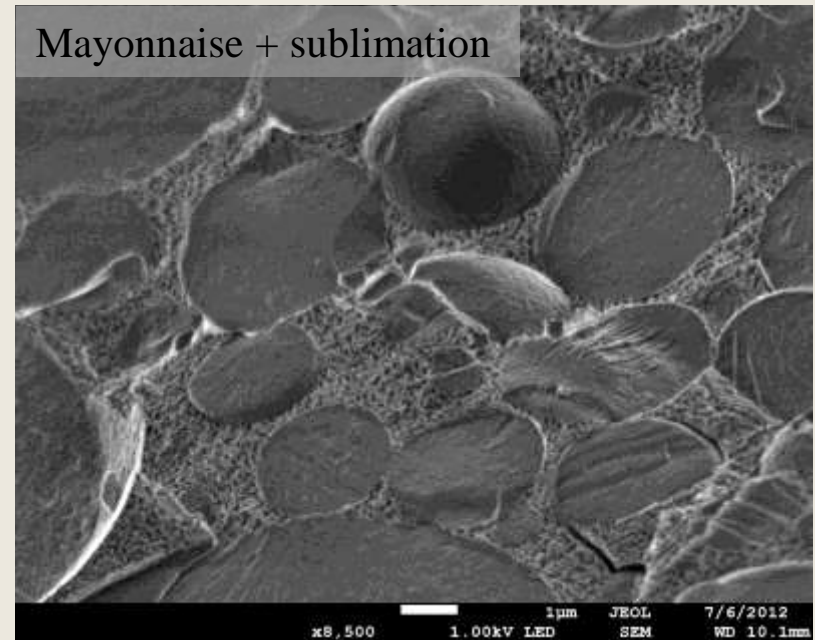
Le cryo-MEB :

Avantages :

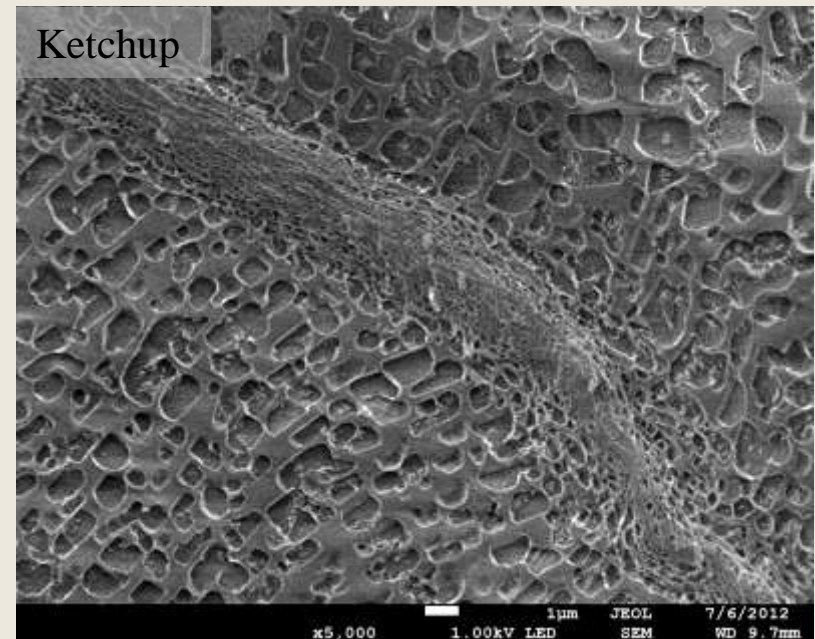
- échantillon dans son état natif
- structure de l'échantillon en 3-D
- Ø digestion, Ø manipulation de répliques
- champs d'observation étendus

Inconvénients :

- résolution MEB vs MET
- finesse du dépôt métallique



Quorum Technologies



3) Introduction au cryo-MEB

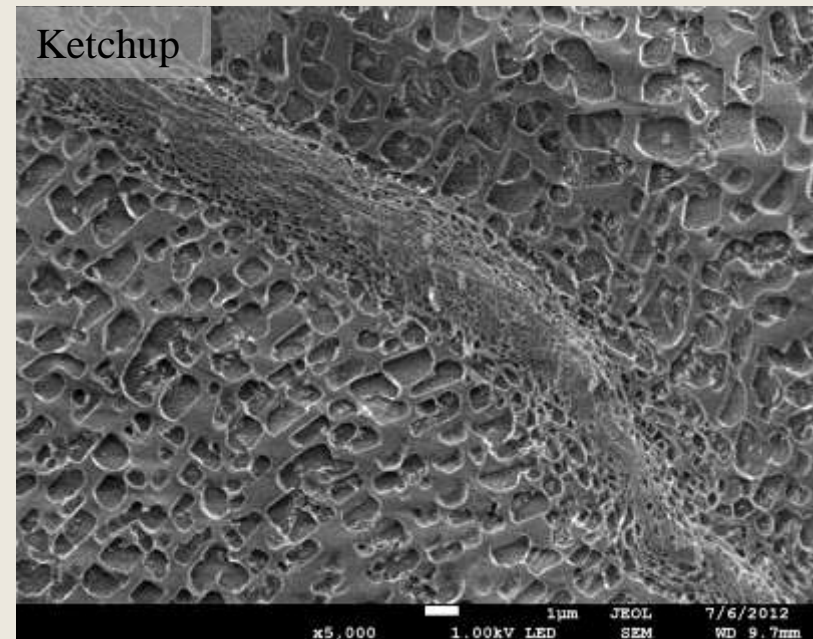
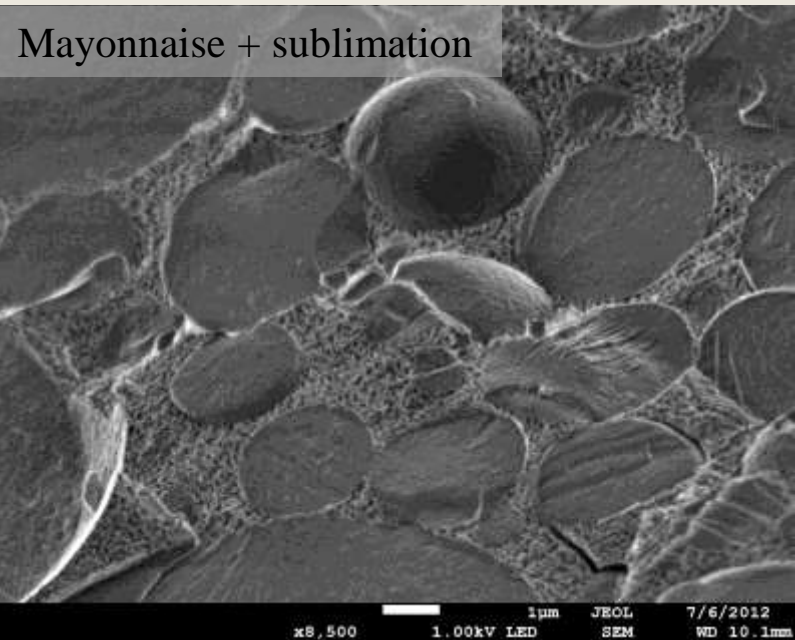
Le cryo-MEB :

Avantages :

- échantillon dans son état natif
- structure de l'échantillon en 3-D
- Ø digestion, Ø manipulation de répliques
- champs d'observation étendus

Inconvénients :

- résolution MEB vs MET
- finesse du dépôt métallique



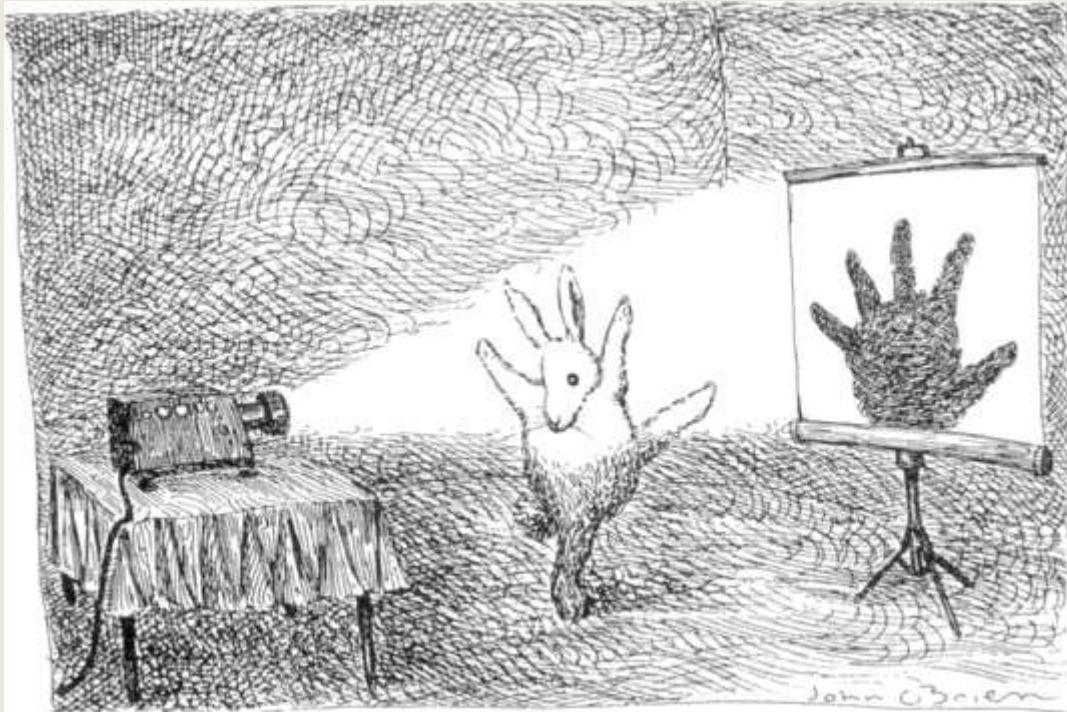
Solution Leica Microsystems



Mc Gill University

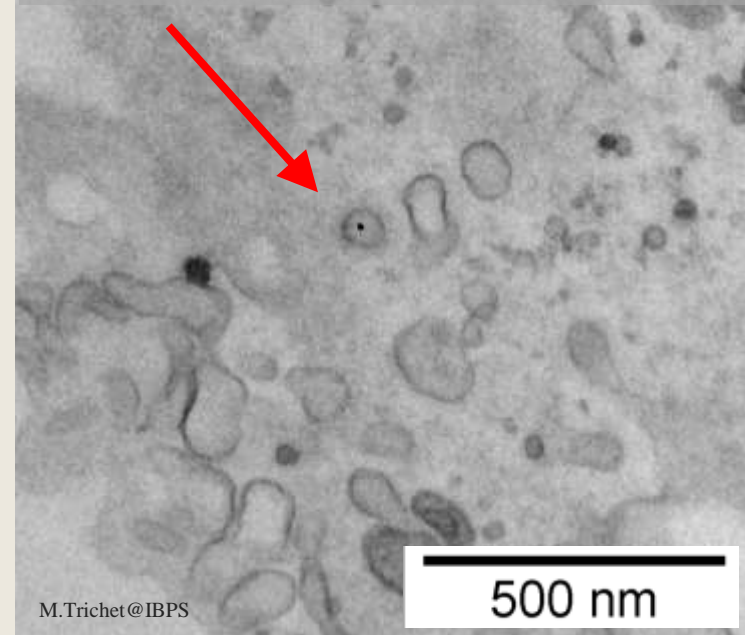


4) 3D en ME : le serial imaging en MEB

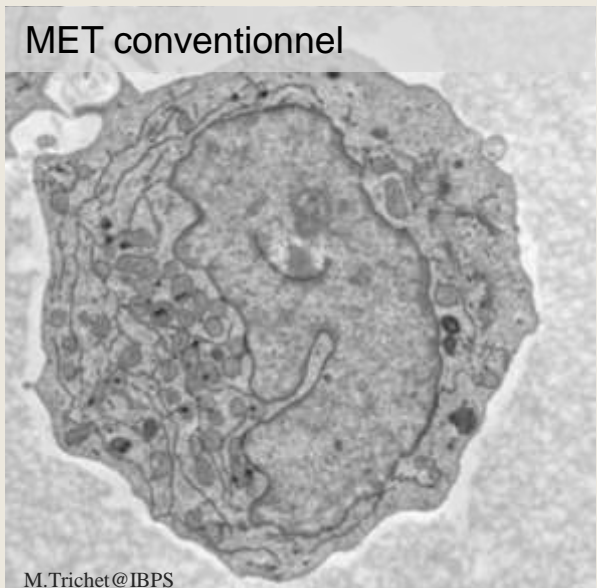
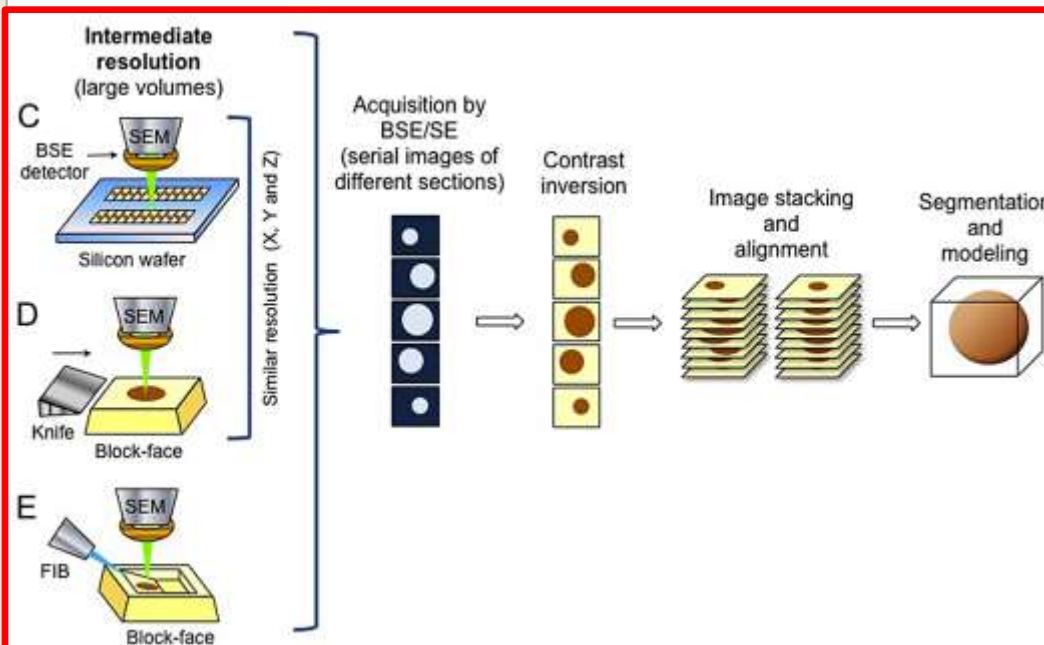
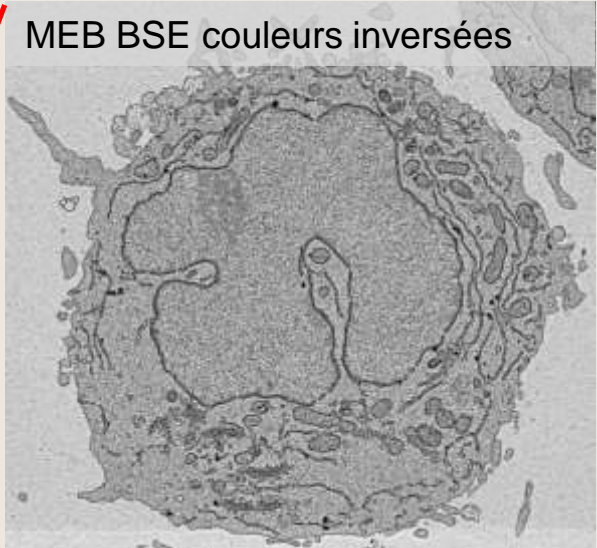
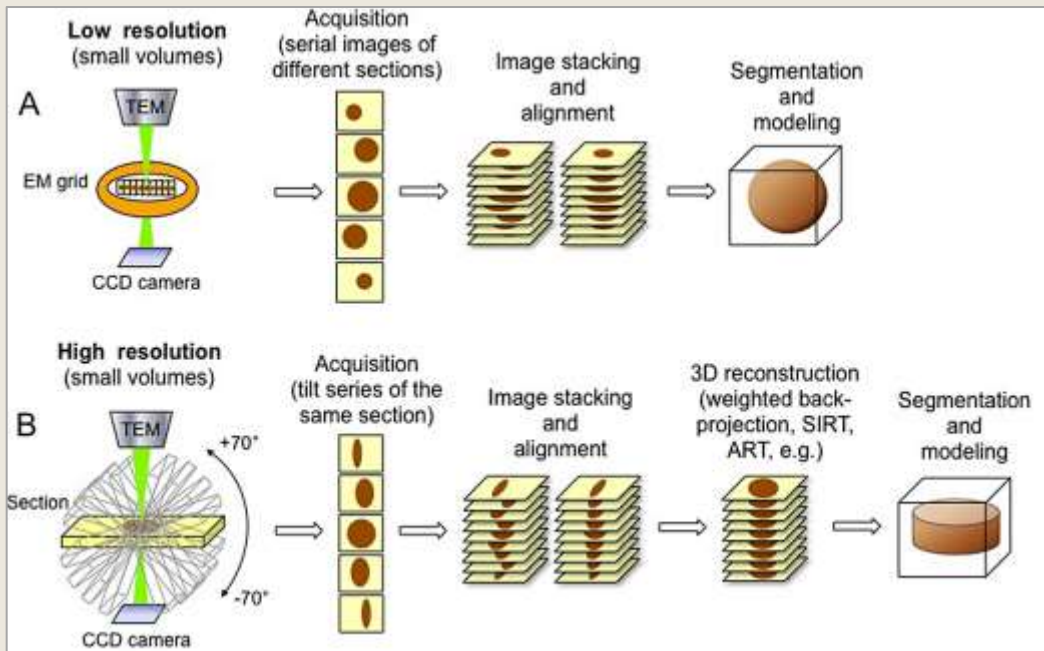


Micrographes en MET :
projections 2D de structures 3D

Vésicule ou tubule sectionné ?



4) 3D en ME : le serial imaging en MEB



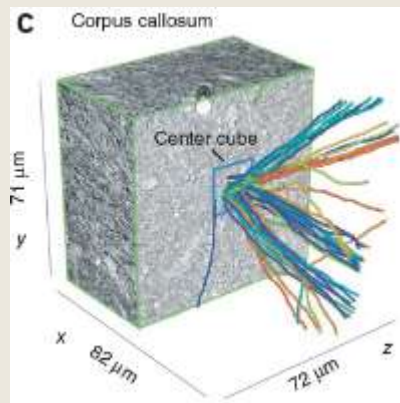
Miranda et coll., 2015

4) serial imaging en MEB : serial block-face SEM



Zankel et coll., 2008

- Ultramicrotome dans chambre du MEB
- Acquisition images s riees (résolution Z < 50nm)



Mikula et coll., 2012

