



# Observations de différents échantillons en microscopie corrélative intégrée : fluorescence et MEB (iLSEM)

Isabelle PIGNOT-PAINTRAND



# Plan

- ▶ Introduction à la microscopie corrélative
- ▶ Intégration d'un microscope de fluorescence dans un MEB
- ▶ Journée thématique sur l'iLSEM au LMGP
- ▶ Solution ZEISS pour CLSEM (shuttle & find)

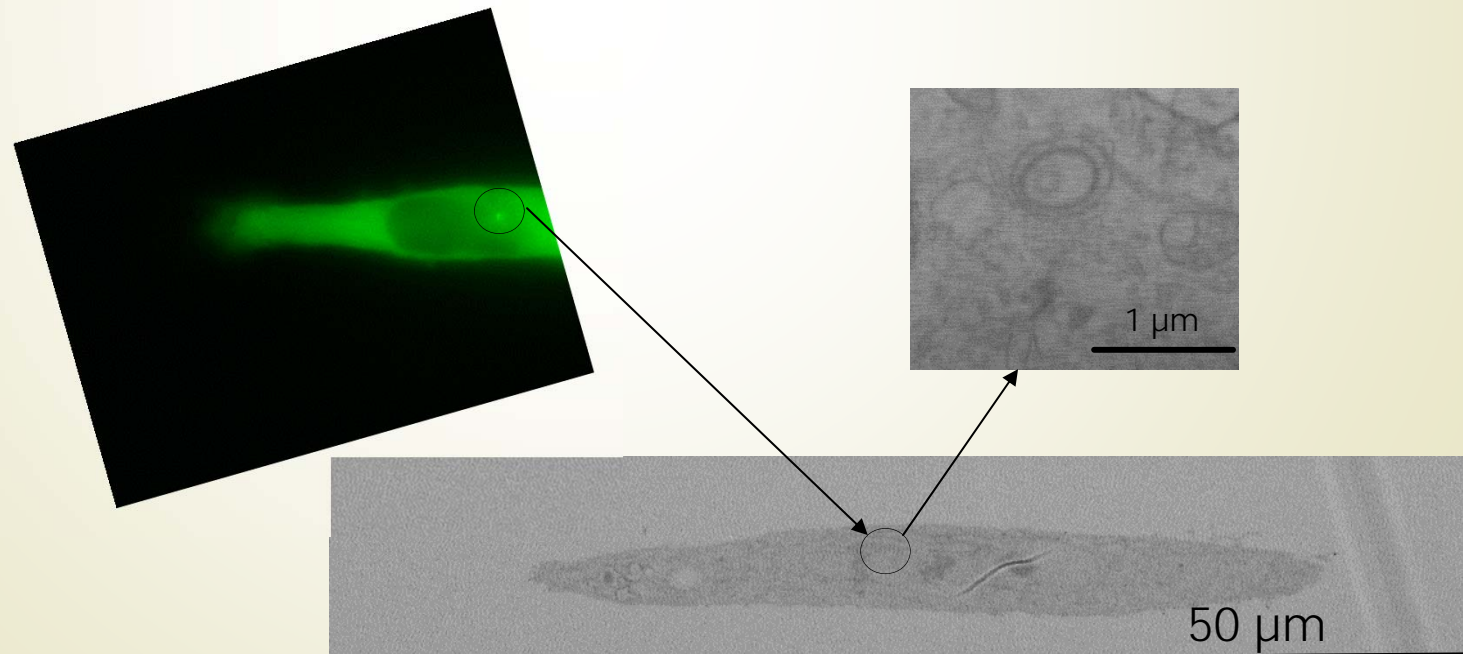
# Dynamique moléculaire, fonction et résolution

## ▶ Microscopie de fluorescence

- ▶ Dynamique moléculaire : localisation et fonction
- ▶ Pas de structure détaillée
- ▶ Résolution 200nm latérale, 500nm axiale

## ▶ Microscopie électronique

- ▶ Ne contient aucune information fonctionnelle dynamique
- ▶ Ultrastructure détaillée
- ▶ Résolution (biologie) 2-6nm latérale, 50-70nm axiale



# Applications et avantages de la microscopie corrélative

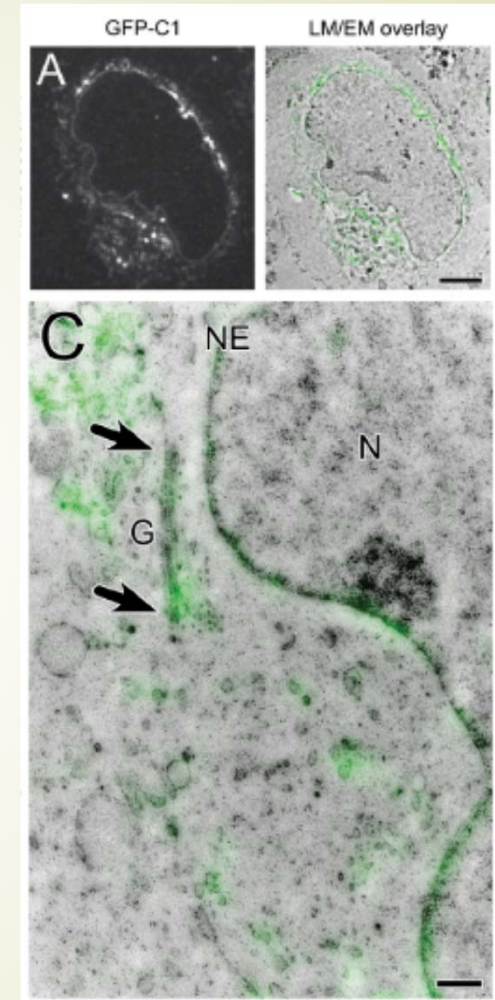
- Révéler des événements petits et rares
- Améliorer la représentativité du marquage
- Relier structure et fonction
- Obtenir un marquage multi-couleur en microscopie électronique



Human Umbilical Vein Cells grown on ITO slides. Immunolabeled for vWF and stained for actin.

Samples courtesy of M.J. Mourik, Leiden University Medical Center

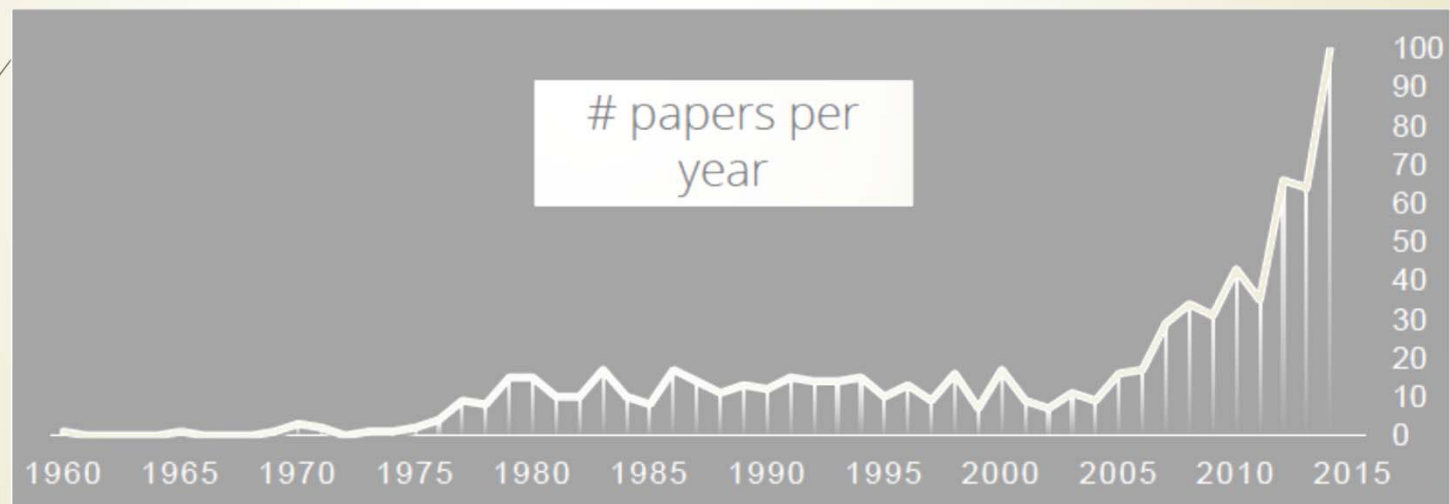
Secondary electron detector, 60x /0.95, LED light engine, EMCCD camera



Immunolocalisation du diacylglycerol, C. Peddie, Ultramicroscopy 2014

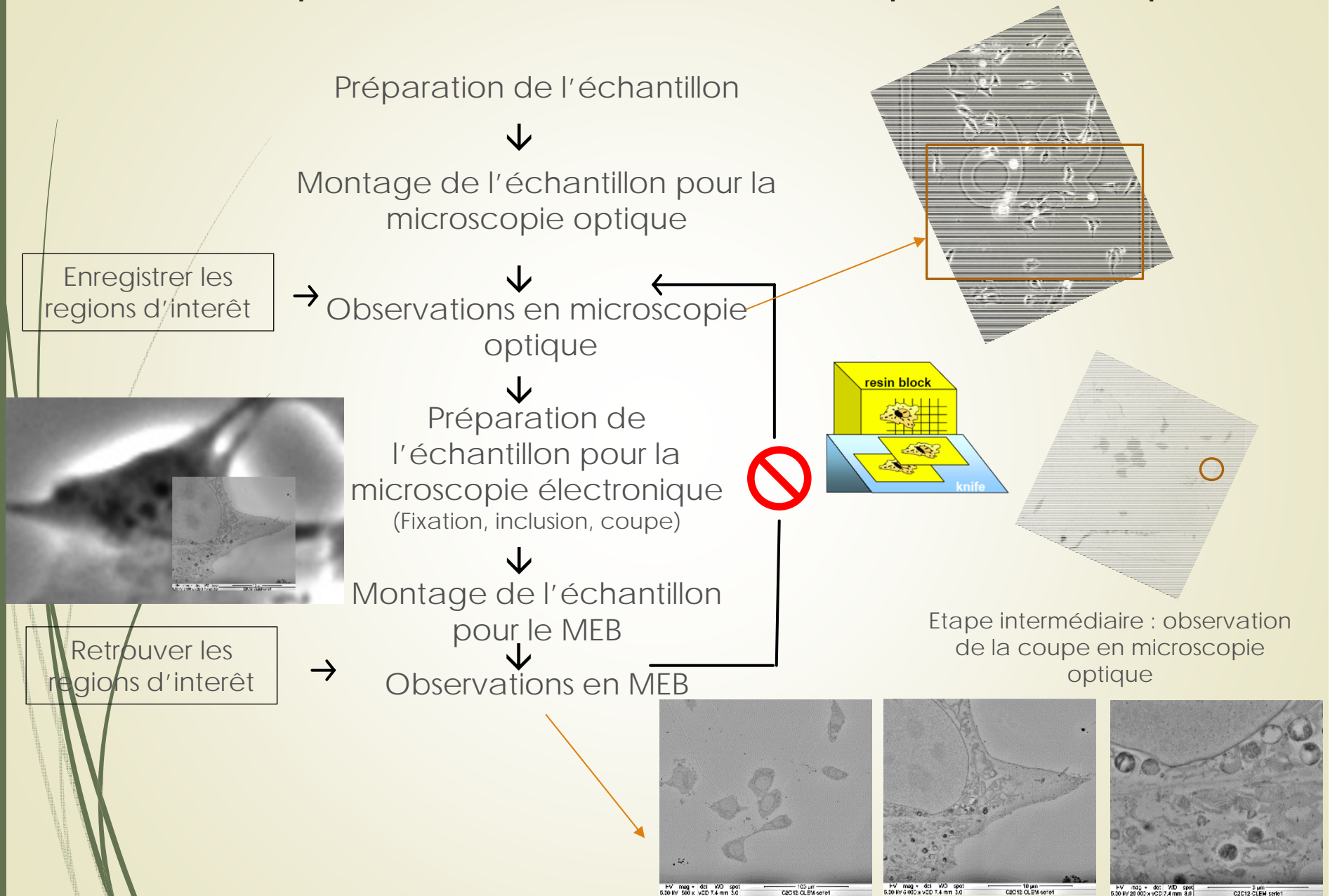
# La microscopie corrélative gagne en popularité

- Augmentation du nombre de publications
- 1960 première publication combinant la microscopie optique et la microscopie électronique
- 2014 100 publications



Nombre de publications par an en CLEM avec « corrélative » et « microscopie électronique » dans le titre ou le résumé (PubMed)

# Microscopie corrélative : Les étapes classiques

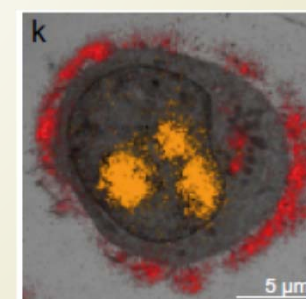
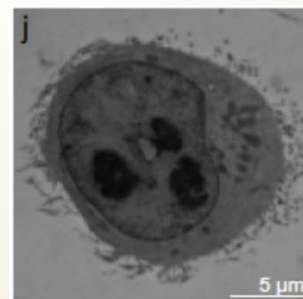
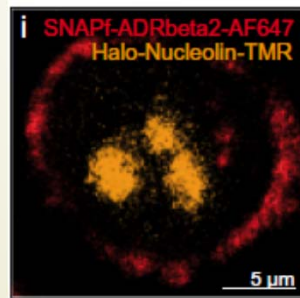


# Les limites en microscopie corrélative

- ▶ Etapes manuelles entre microscopie optique et électronique
- ▶ Artéfacts de préparation de l'échantillon lors de la coupe (plis, poussière, compression/distortion)
- ▶ Limite de résolution entre microscopie optique et électronique
- ▶ Précision de relocalisation entre les images d'optique et d'électronique

## Les défis en microscopie corrélative

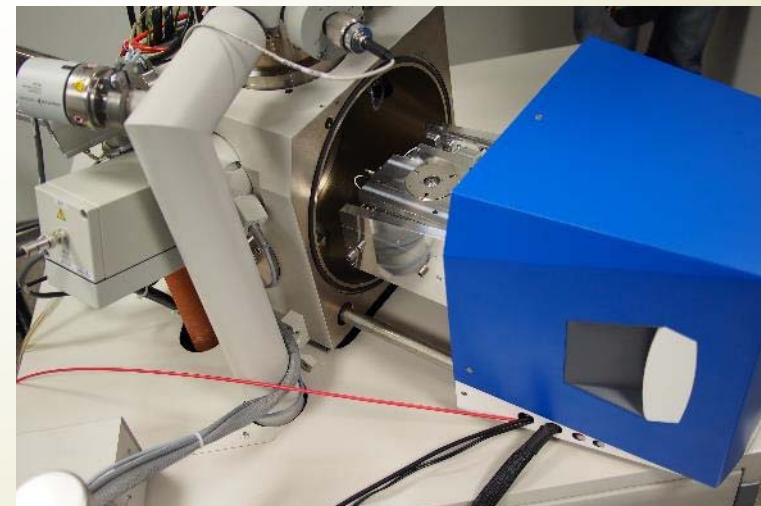
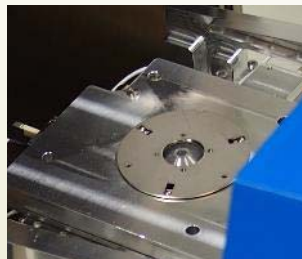
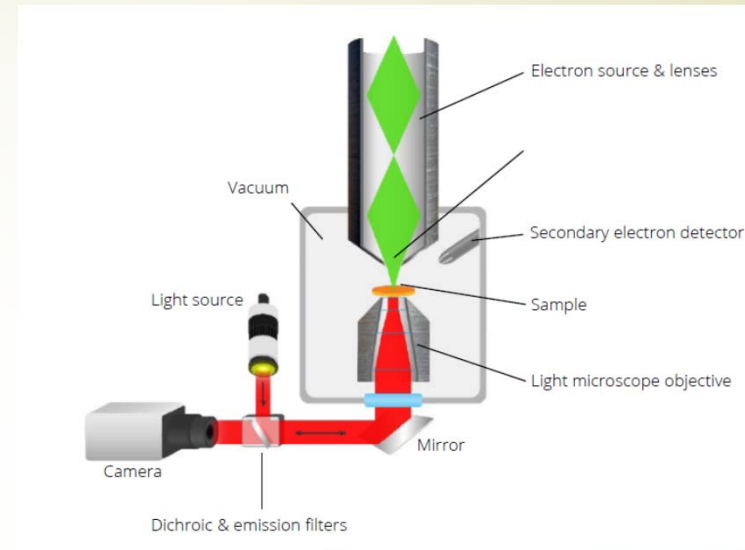
- ▶ Précision du recouvrement
- ▶ Rapidité pour obtenir les informations
- ▶ Retrouver la région d'intérêt
- ▶ Utilisateurs « Expert »



Localisation de protéines intra-cellulaires et intra-nucléaires : M. Perkovic et al, J. Struct. Biol. 2014,186, 205-213

# Intégration de la plateforme SECOM dans le microscope à balayage Quanta FEG 250

delmic



# Spécifications technique de la plateforme SECOM

## ► Fluorescence :

- Configuration multiband optimisée pour DAPI , FITC, TRITC , et autres fluorophores Cy5 et similaires.
- Quatre canaux : source d'excitation ( LED), contrôle de l'allumage et de l'intensité.
- Longueurs d'onde par défaut : 387/11 , 485/20 , 560/25 et 650 / 13 nm.
- D'autres sont disponibles sur demande.

## ► Objectif :

- Objectif Plan Apochromat, grossissement 40x , ouverture numérique 0,95.
- Autres objectifs, y compris à immersion (jusqu'à NA 1.4 ), disponibles sur demande.
- Échangeable par l'utilisateur

## ► Platine objectif :

- Moteurs pas à pas piézoélectriques : faible dérive.
- Mouvement incrémental minimum en XY inférieure à 500 nm.
- Répétabilité de l'axe Z ( mise au point) 50 nm.

## ► Platine échantillon :

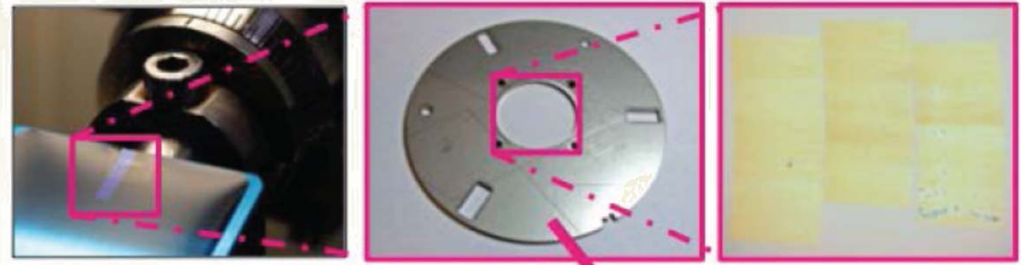
- Course totale de 18x18mm en XY.
- Equipée avec moteurs pas à pas piézoélectriques et codeurs linéaires optiques.
- Mouvement incrémental minimum de 300 nm (la répétabilité de 500 nm).

## ► Caméra :

- Caméra CMOS avec faible bruit de fond et large champ de vue
- 2048/2048 pixels, taille des pixels 6,5µm (330x330µm avec objectif x40)

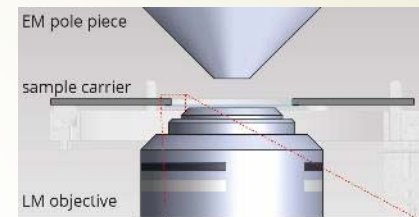
# Les étapes en microscopie intégrée (iSEM)

Préparation de l'échantillon



Montage de l'échantillon sur la plateforme SECOM

Observation en fluorescence pour trouver l'objet d'intérêt

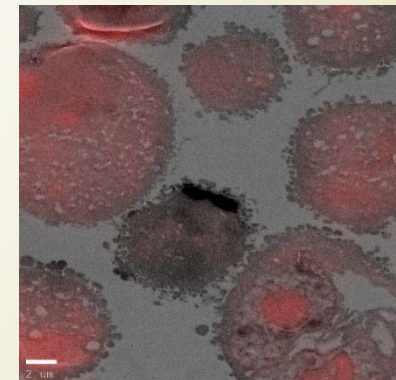
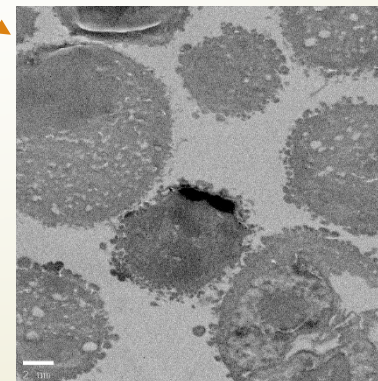
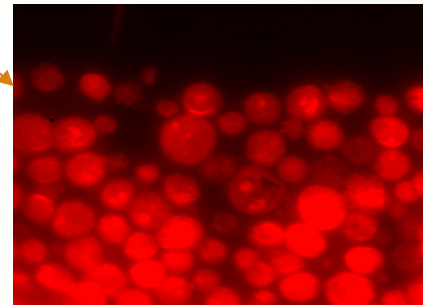


Observation en microscopie électronique à balayage (choix du grossissement)

3 kV – haut vide – WD 11

Observations en optique

Observations en microscopie électronique à balayage

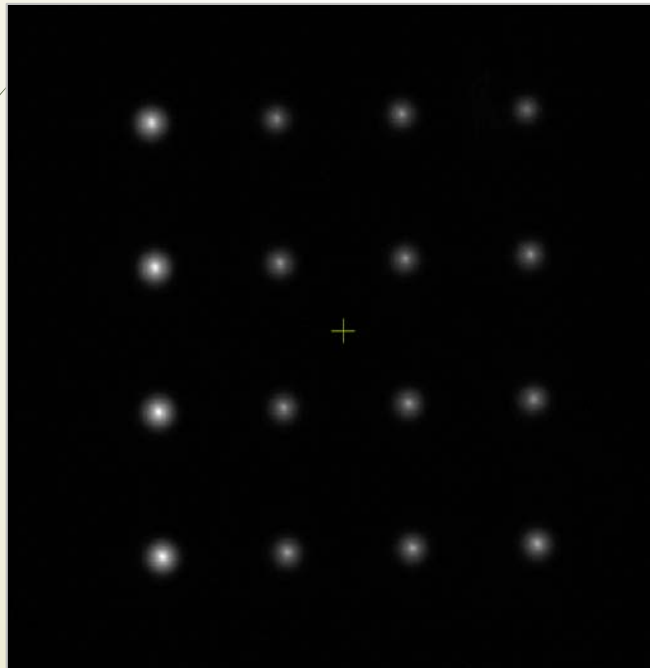


Cellules HeLa marquage nucleoline mcherry (K. Monier)

# Superposition automatisée

On utilise la cathodoluminescence pour imprimer des tâches : le faisceau d'électrons est récupéré sur la caméra du microscope de fluorescence.

Chacune de ces tâches joue alors le rôle d'un repère de calage temporaire. Ce qui permet de corréliser exactement les images de microscopie électronique et de fluorescence



La corrélation est :

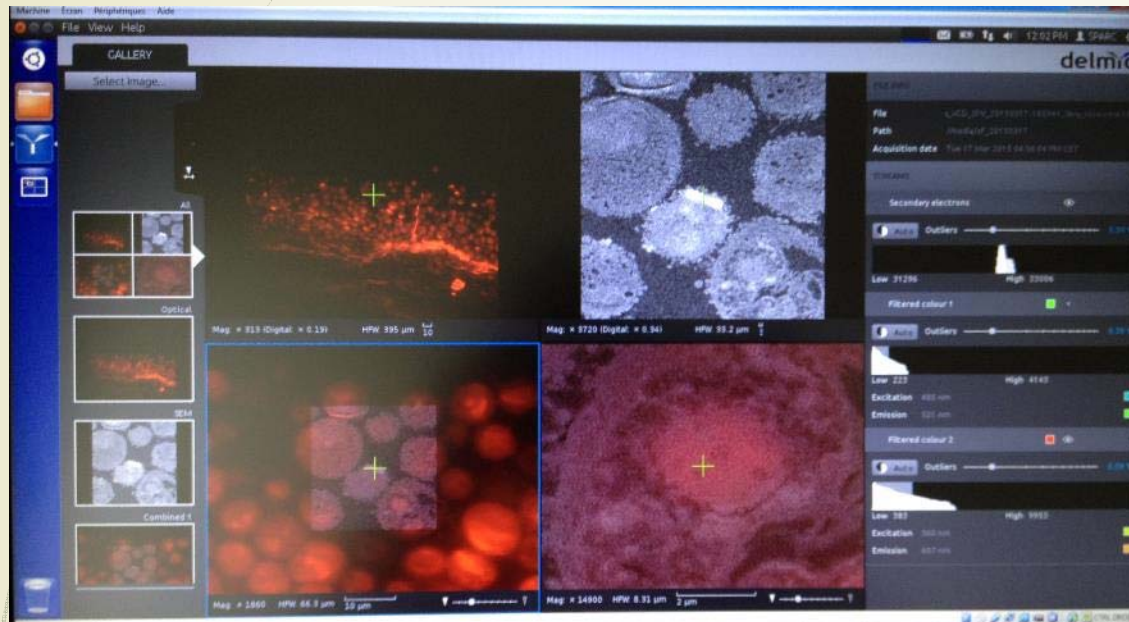
- Indépendante de l'échantillon
- Complètement automatique
- Très précise < 50nm

Les corrections possibles sont :

- La rotation
- La mise à l'échelle
- La position

# Logiciel ODEMIS

Utilisation d'un logiciel Open-source pour contrôler la navigation sur l'échantillon, le microscope de fluorescence (FM) et le MEB.



Le logiciel comprend :

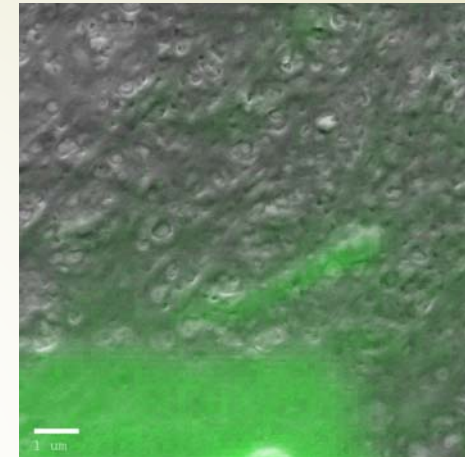
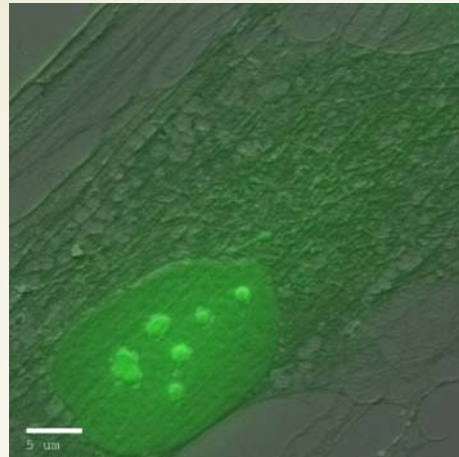
- Procédure d'alignement automatique
- Mode "Live" et acquisition pour mode pour FM et MEB
- Plusieurs canaux de couleurs
- Visualisation direct de la superposition des images FM et MEB
- Fichier aux formats OME-TIFF et HDF5

Ce qui pourrait être amélioré:

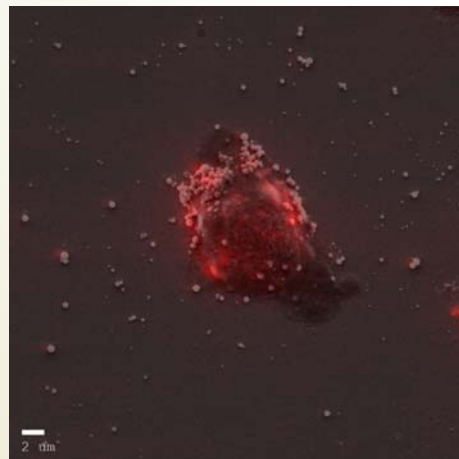
- Inversion du contraste des images faites en BSE
- Enregistrement de l'image avec la barre d'échelle
- Exportation de chaque canal au format tiff (possibilité de retravailler chaque image dans image J)
- Possibilité de modifier la WD

# iLSEM Worskshop at LMGP

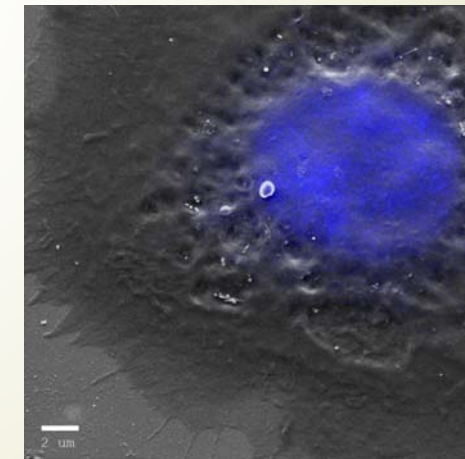
Cellules entières : culture sur lamelle de verre ou lamelle ITO



**Cellules hASC avec cil primaire** : Fixation Roti-Histofix (Roth) 4% 20 min. Saturation/lyse: PBS, 3% BSA, 0.1% tween, 0.1% triton 30 min. Immuno-marquage alpha tubuline et alexa 488. (F. Orange)



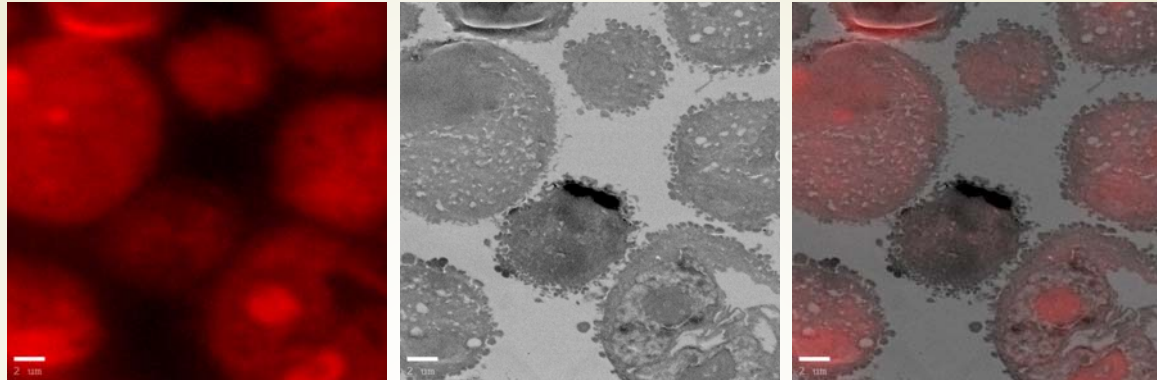
**Cellules dendritiques avec nanoparticules de PLA bodipy bismuth**  
(G. Carron)



**Cellules de peau avec nanofils d'argent** (S. Lehmann)

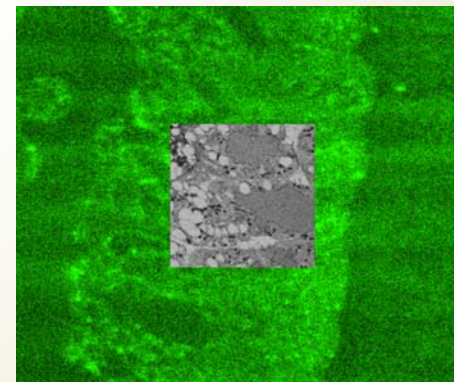
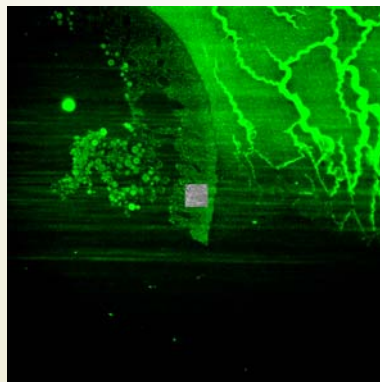
# iLSEM Worskshop at LMGP

## Sections : sur lamelle de verre



**Cellules HeLa marquage nucleoline mcherry** : Fixation glutaraldéhyde 0.25% tampon cacodylate à tre ambiante 10min, 3 rinçages tampon cacodylate, post-fixation ( 0.1% OsO4+0.15% Potassium hexacyanoferrate (II) trihydrate (P9387, Stigma) dans l'eau) 30min à 4°C , déshydratation EtOH 70% 10min, EtOH 95% 10 min, 3x10min EtOH 100%, imprégnation (v/v) HM20/alcool à 100% 60 min, inclusion HM20 sous UV 4°C 72h

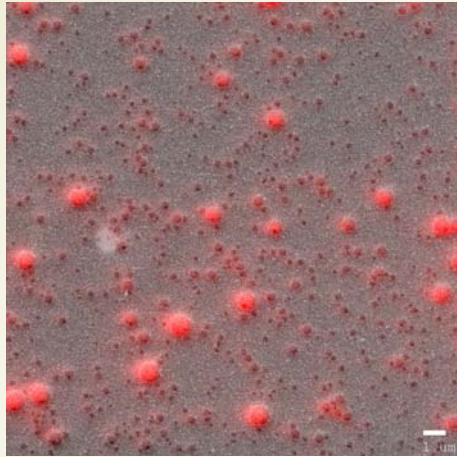
Faire toute les étapes à l'obscurité. Coupes de 200nm d'épaisseur déposées sur lamelle de verre (K. Monier)



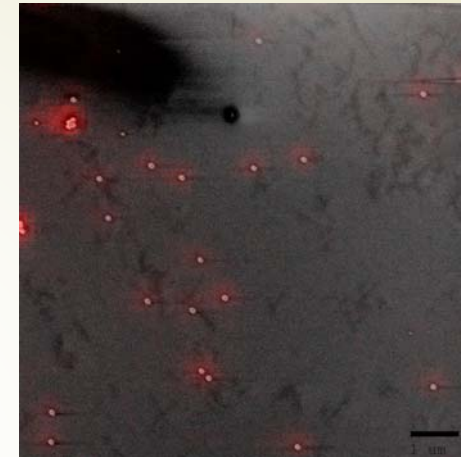
**Embryon de drosophile avec un marquage membranaire A488** : Technique Tokuyasu : fixation PAF 4% glutaraldéhyde 0.1% en tampon phosphate 0.1M. Cryo protection sucrose 2.3M. Cryo Coupes (à -90°C) de 250nm d'épaisseur déposées sur lamelle de verre. Séchage à l'air (pas d'enrobage methyl cellulose)(J. P. Chauvin)

# iLSEM Workshop at LMGP

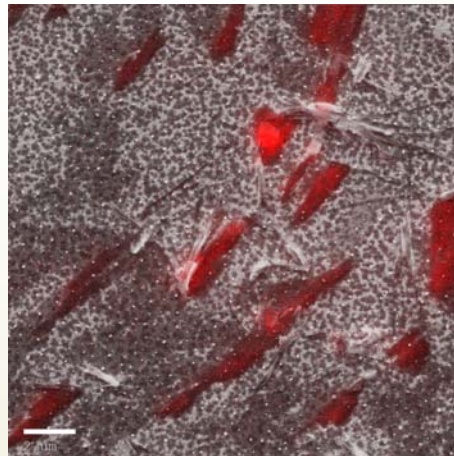
## Nanogels, nanoparticules : dépôt sur lamelle de verre



**Nanogels HA modifié + poly(DEGMA-co-BMA) + Nile red (M. Rippe)**



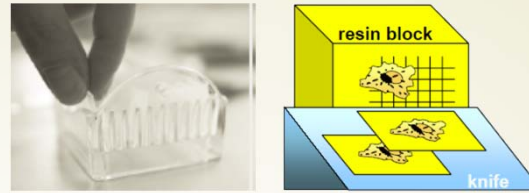
**Nanoparticules de 80-100nm (or+polymère+fluorochrome rouge lointain) (K. Monier)**



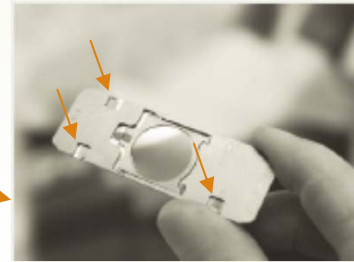
**Electrodes modifiées par sonde fluorescente (polypyrrole fluo rouge) :**  
L'échantillon a été préparé sur lamelle de verre recouverte d'une couche de titane de 2nm et d'une couche d'or de 40nm (K. Gorgy)

# CLSEM étapes Zeiss (Shuttle & find)

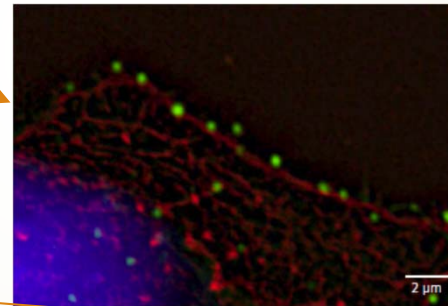
Préparation de l'échantillon



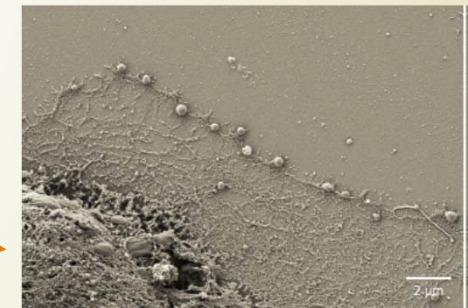
Montage sur un support avec 3 references



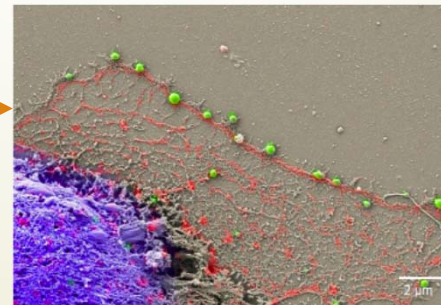
Observation en fluorescence  
(CLSM, Haute résolution)



Observations en MEB



Reconstruction



# Remerciements



➤ Le CMTC (INP Grenoble) et B. Doisneau (LMGP, Grenoble) pour la mise à disposition du microscope électronique à balayage

➤ S. Aguy de la société EDEN-Instruments pour les relations avec la société DELMIC.



➤ K. Monier, laboratoire Joliot Curie, ENS Lyon



➤ G. Carron, IBCP, Lyon,

➤ K. Gorgy, DCM, Grenoble,

➤ D. Falconet, LPCV, Grenoble,

➤ F. Orange, CCMA, Université de Nice Sophia,

➤ M. Rippe, CERMAV, Grenoble.

## MERCI POUR VOTRE ATTENTION

