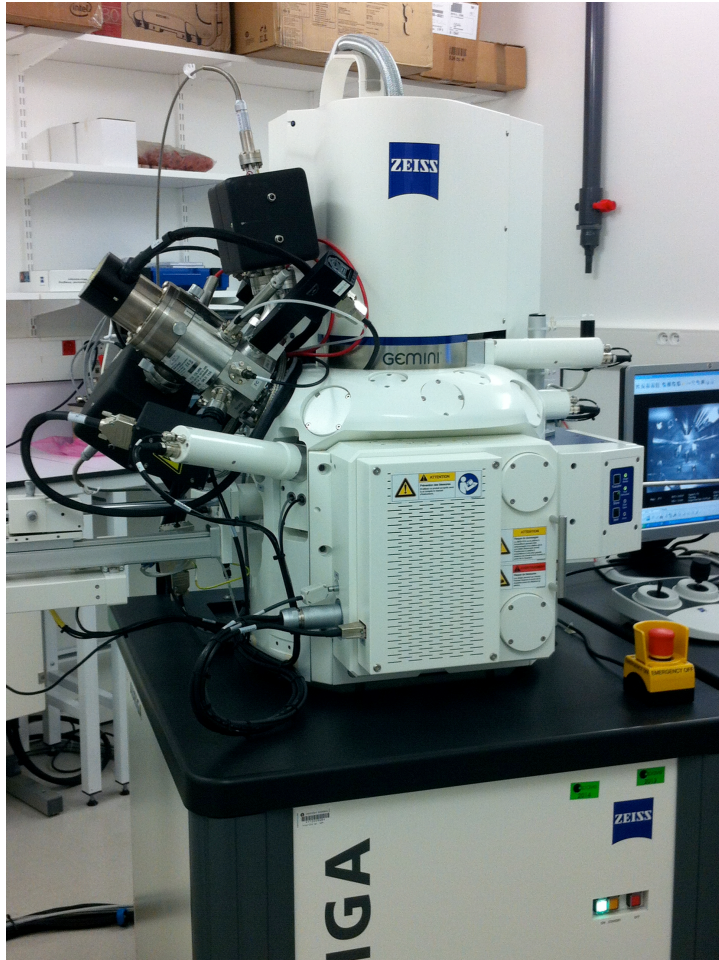


Les applications du FIB-SEM en biologie :

Organismes isolés et Interactions hôte-pathogène

SEM Carl Zeiss, Auriga



Détecteurs :

In Lens

SE2

STEM

BSD

EsB

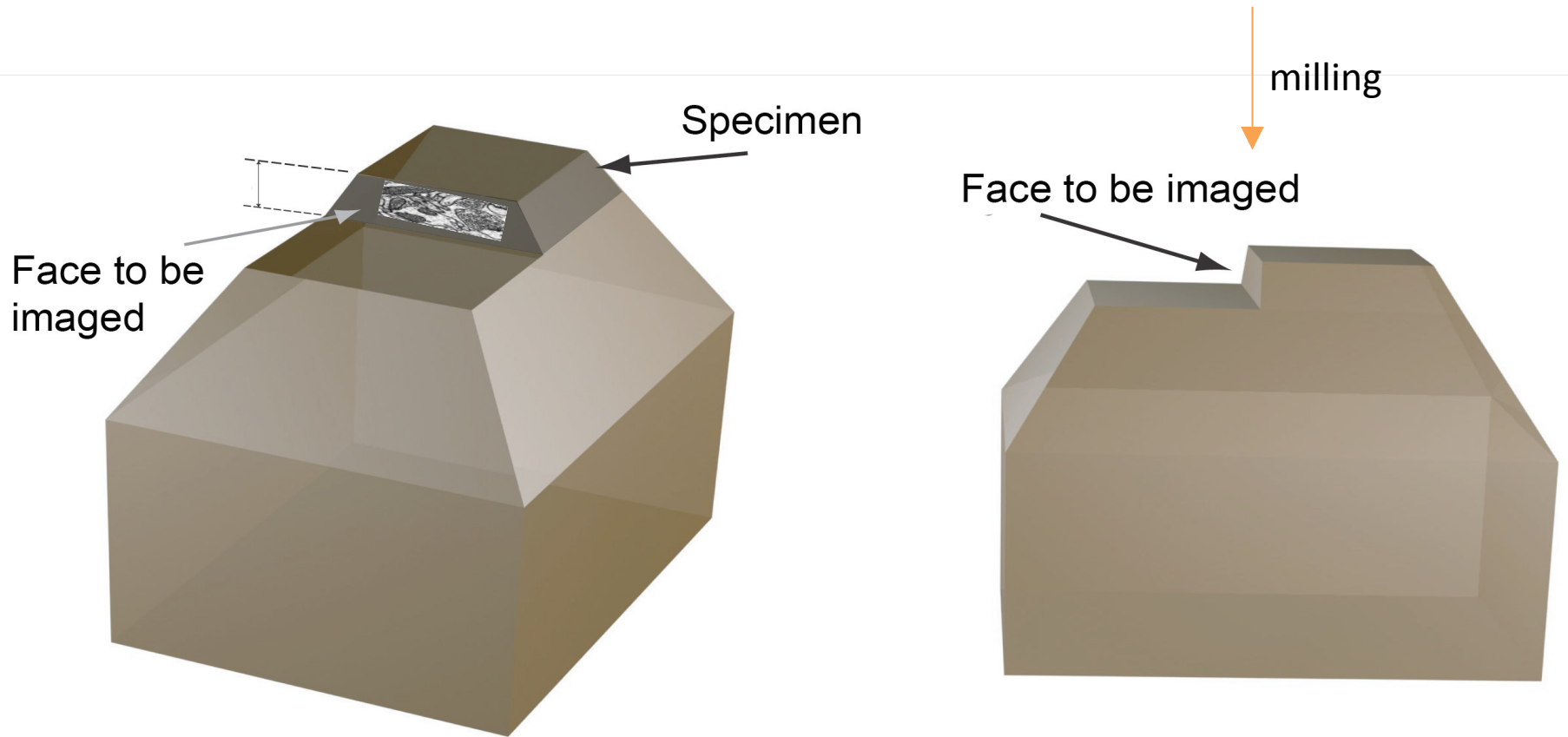
Options :

« microscopie corrélative »

FIB-SEM + ATLAS3D (FIBICS)

→ Optimisation du système FIB-SEM aux contraintes biologiques

Principe FIB-SEM



+ de contraste
- d'effet de charge

(Graham Knott)

FIB-SEM en biologie



Préparation des échantillons

Paramètres FIB-SEM à définir

Préparation de la surface à imager : Atlas 3D

Acquisition / analyse

Modélisation 3D

2 Etapes clés en biologie : préparation & interprétation

FIB-SEM en biologie

Préparation

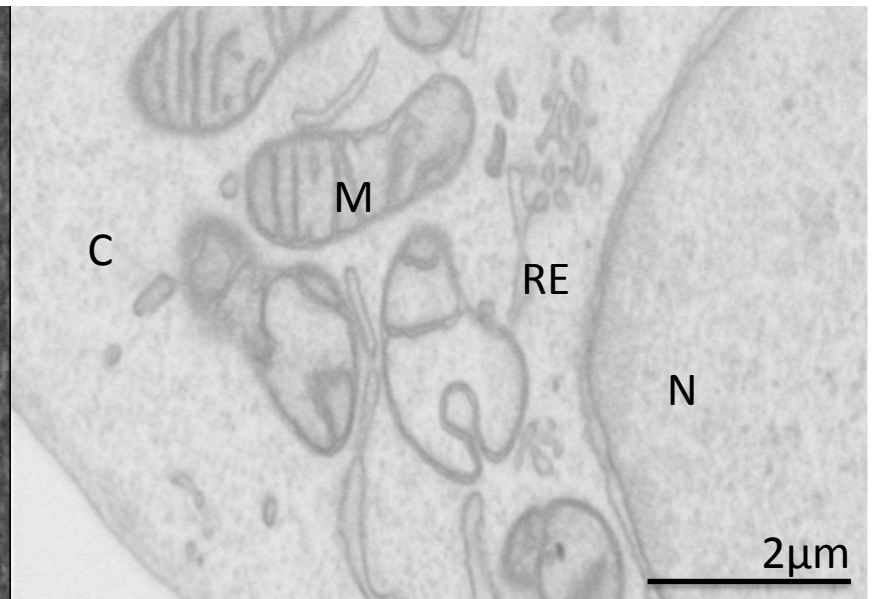
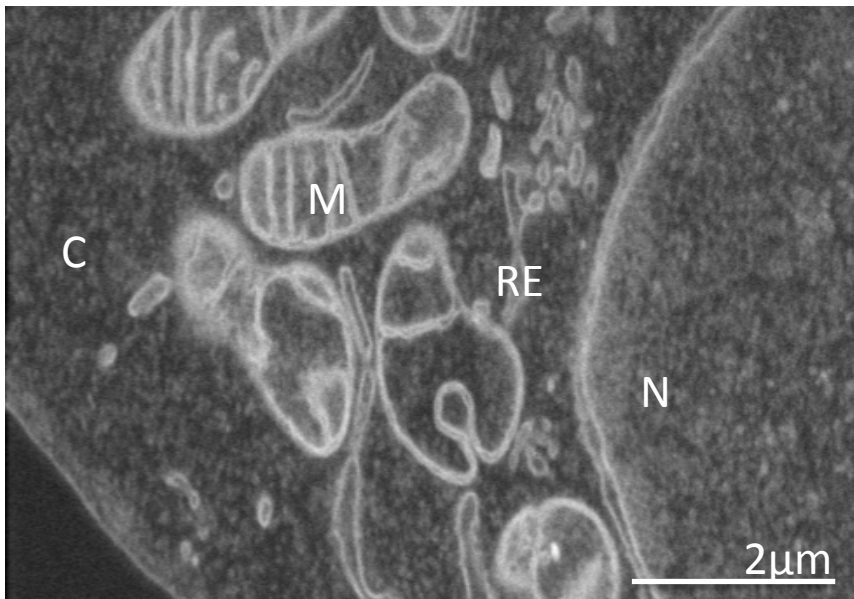
Contraintes échantillons biologiques :

- Pathogènes
- non conducteurs
- Hydratés

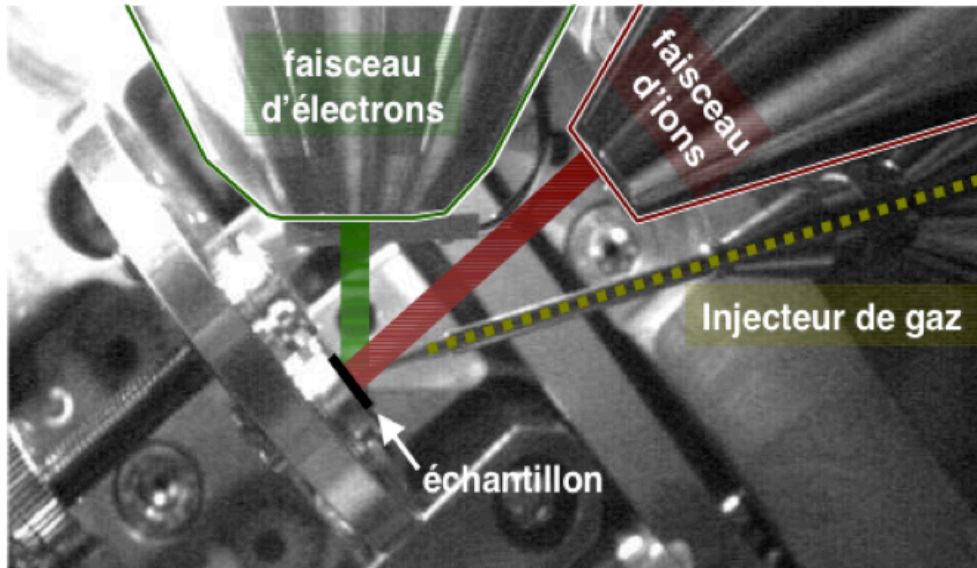
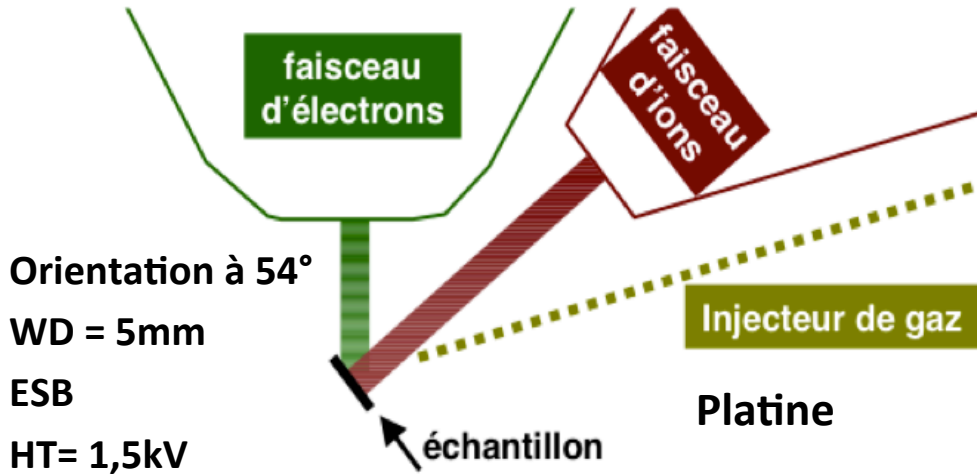
Préparation des échantillons :

- Fixation
- Contrastants
- Déshydratation
- Inclusion en resine

Pixel size 4nm

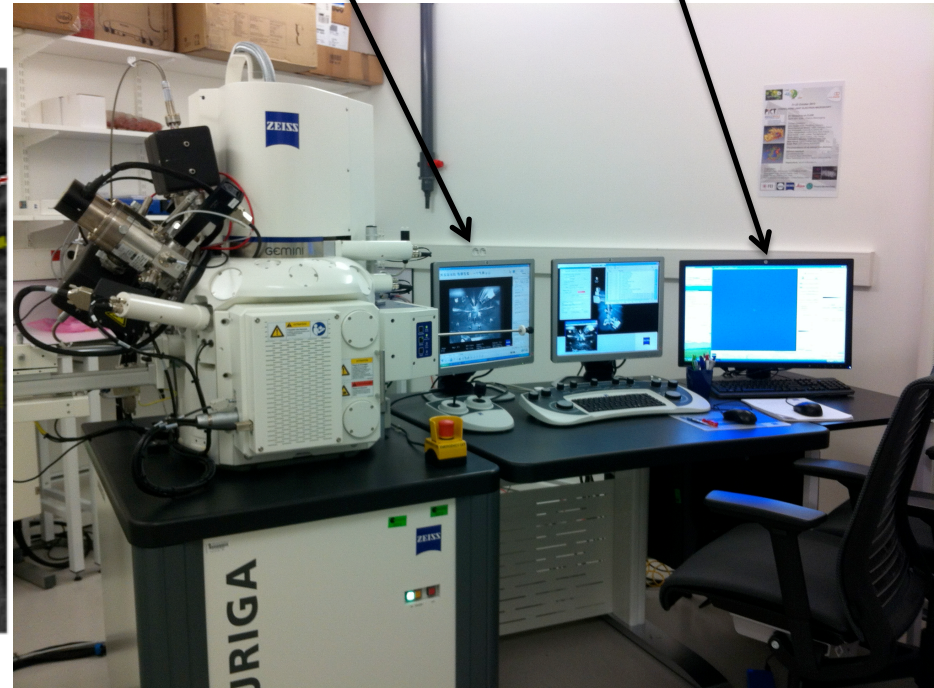


FIB-SEM



Smart SEM

FIBICS, ATLAS 3D



ATLAS 3D

Imaging (SEM)

Beam 1.5 kV | 60.0 μm HC

Scan Settings (Pixel size = 3.0 μm)

Fast 1.0 μs dwell Slow

256 512 1024

512* 1024 Customize

Frame Time: 1.3 s RAI HR S X

Single Continuous Grab

VE-Viewer

Nanopatterning (SEM)

No Active Shapes

Parallel Patterns Pause Start

No Shape Selected

ID Name

Active Activate Selection

Shape Geometry

Width μm X μm

Height μm Y μm

Angle $^\circ$

Void Outline Thickness μm

Standard Parameters

Operation

Beam Don't Change Int: 20.0 nm

Gas None Edit

Duration

Continuous Reset

Time 0:00 of

Dose 0:000 of $\text{nC}/\mu\text{m}^2$

Repeats 0 of

Depth 0:000 of μm

SEM FIB More >>

Fibrics NPVE (for Zeiss Systems) v4.0

ATLAS 3D Sample Preparation

- Generate FIB Registration Marks
- Deposit Protective Pad
- Pattern 3D Tracking and SEM AutoTune marks
- Enhance Marks with SEM deposition
- Protect 3D Tracking and SEM AutoTune marks
- Mill Coarse Trench
- Polish cross-section face

Info

Click the configure button of the first step to select the appropriate FIB aperture and make sure the GIS is ready

Est. time remaining 0

Prepare GIS Abort Close

ATLAS 3D - Nanotomography

General | salm_se#8

Job Name salm_se#8 New

Description Load Save

Parent Folder C:\Documents and Settings\User\...\Adeline

Backup Folder

Turn FIB gun OFF when job is complete

Turn EHT OFF when job is complete

FIB Sample Preparation

FIB Setup | Rate = 12.0 nm/min • Imaging time > Minimum Milling time

SEM Setup | Continuous mill • 10.0 nm pixel x 10.0 nm slice

Detector Setup | ESB

SEM AutoTune | Disabled

3D Tracking | No marks defined in FIB Sample Preparation

Progress

Imaging ROI AutoTune! Key Frame! Apply Histogram

Milling Depth + - Retract Mill Advance Mill

Message

Start Pause Cancel Viewer Z = 0.000 of 34.32 μm

Autoswitch Display FFT

Imaging Patterning



ZEISS

Beam Status 1.5 kV | 60.0 μm HC 1.052 nA

SEM: [A] TV Vac = 3.96e-7 Torr

View Status FOV = 3.088 mm [MR=3] x = -49911.83 μm , y = -22.25 μm

Last Scan Status 0 x 0 μm (0 x 0 dw. pts) 0.000 μm x 0.000 μm spacing 0 μs dwell Time per scan sequence 0 ms

Stopped • Stopped 17-Nov-2014 11:28 AM

SEM FIB (3, 960) Stage View

FIB-SEM en biologie

Challenges fixés

- Résolution sur larges volumes 3D

→ Organisme isolé :

Trypanosomes

- Microscopie corrélative (CLEM)

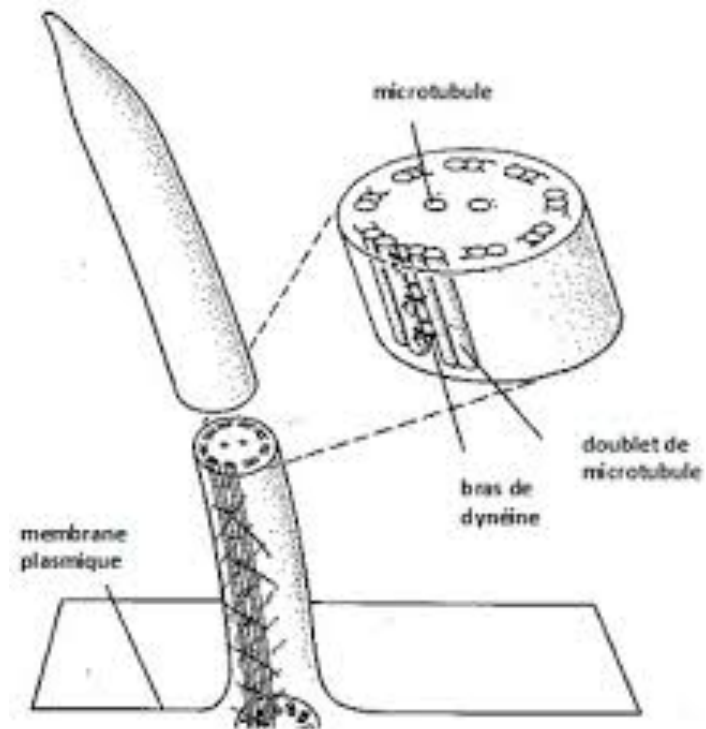
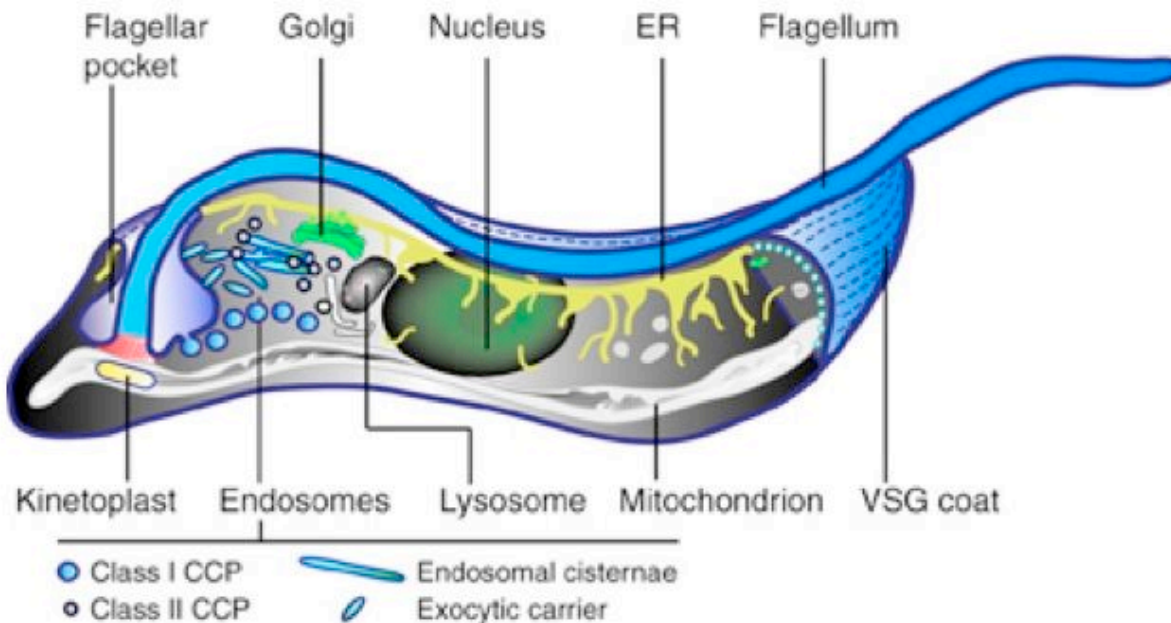
→ Interactions hôte-pathogènes

Cellules infectées par *Salmonella thyphimurium*

Organisme isolé : Trypanosomes

→ Parasite responsable de la maladie du sommeil

→ Etude des maladies génétiques liées à des défauts de cils ou flagelles



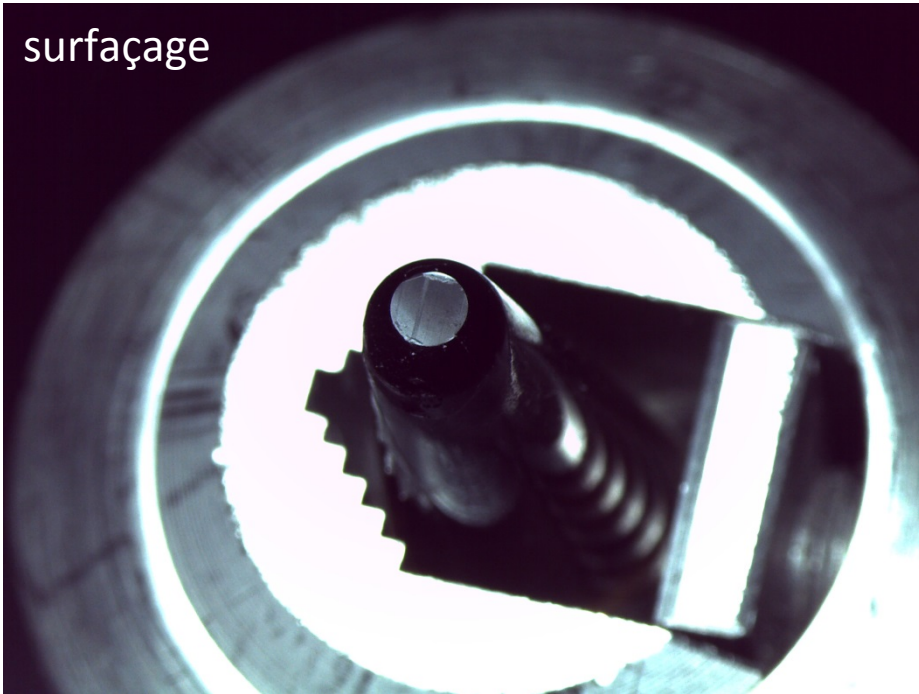
Organismes isolés : Trypanosomes

Préparation Protocole « OTO » sur cellules en culot (Eppendorf®)

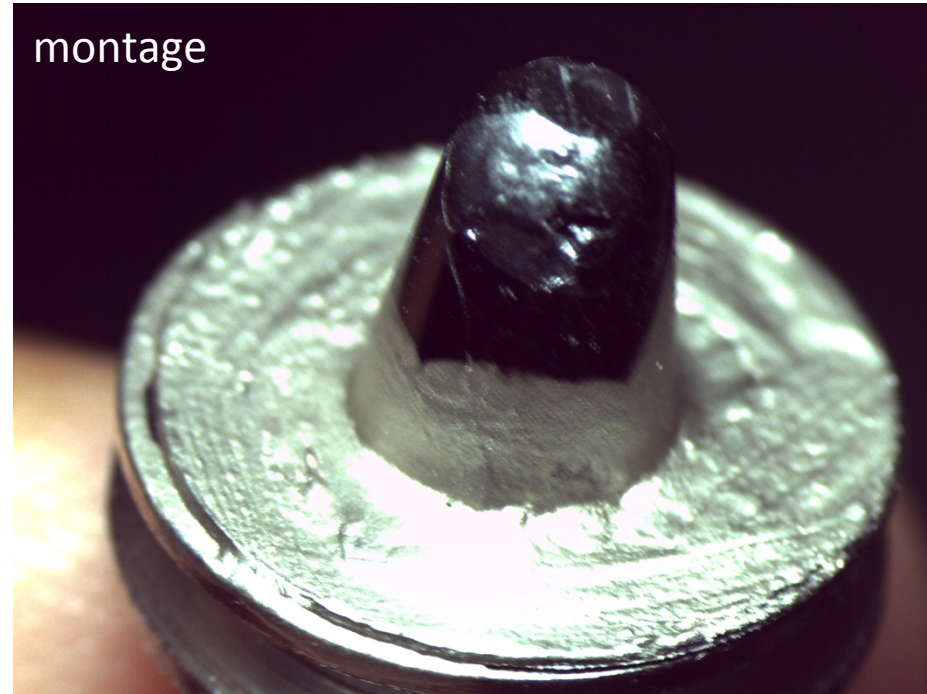
Préparation surface plane par microtomie
Laque d'argent + métallisation 20nm Au/Pd



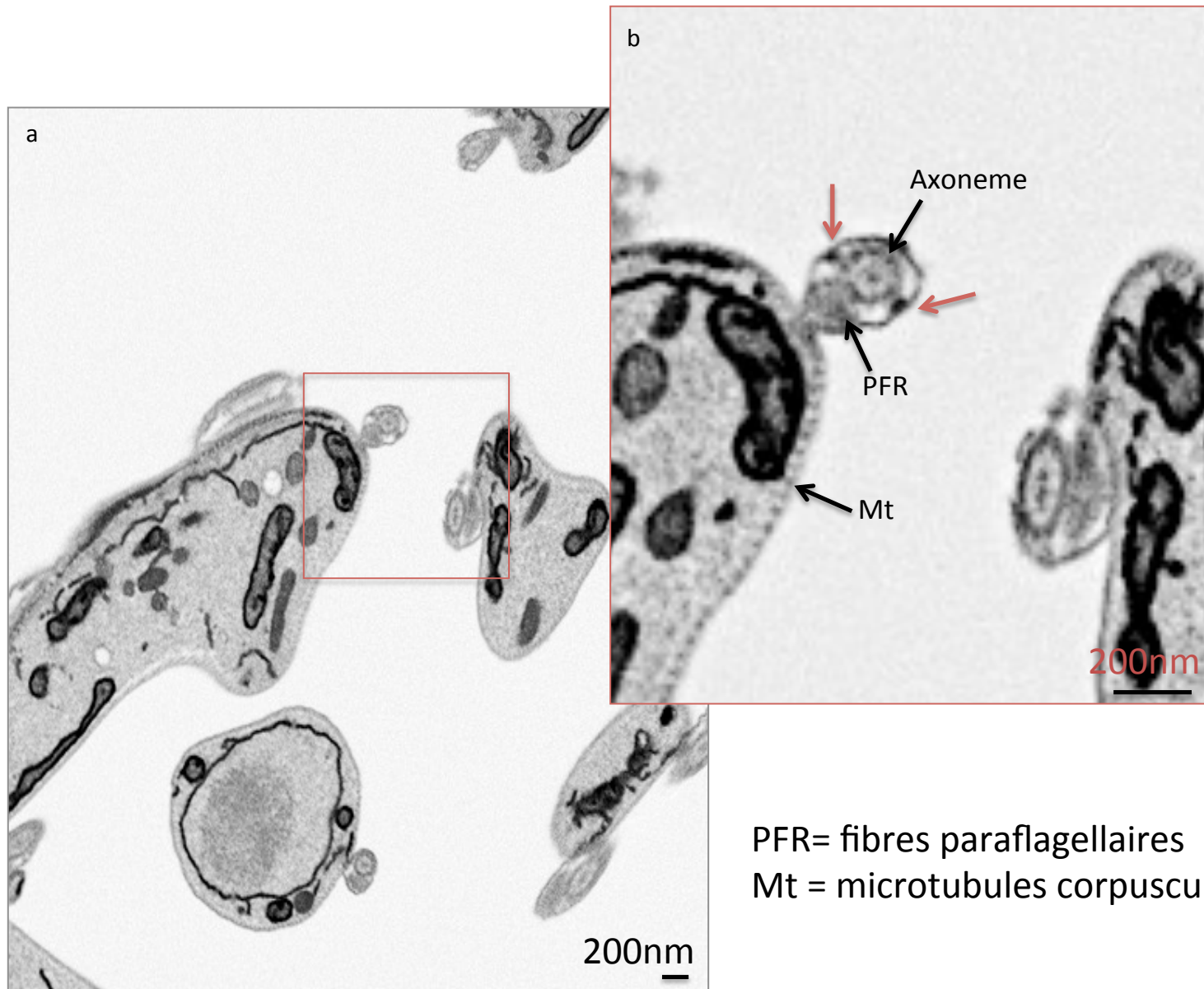
surfaçage



montage

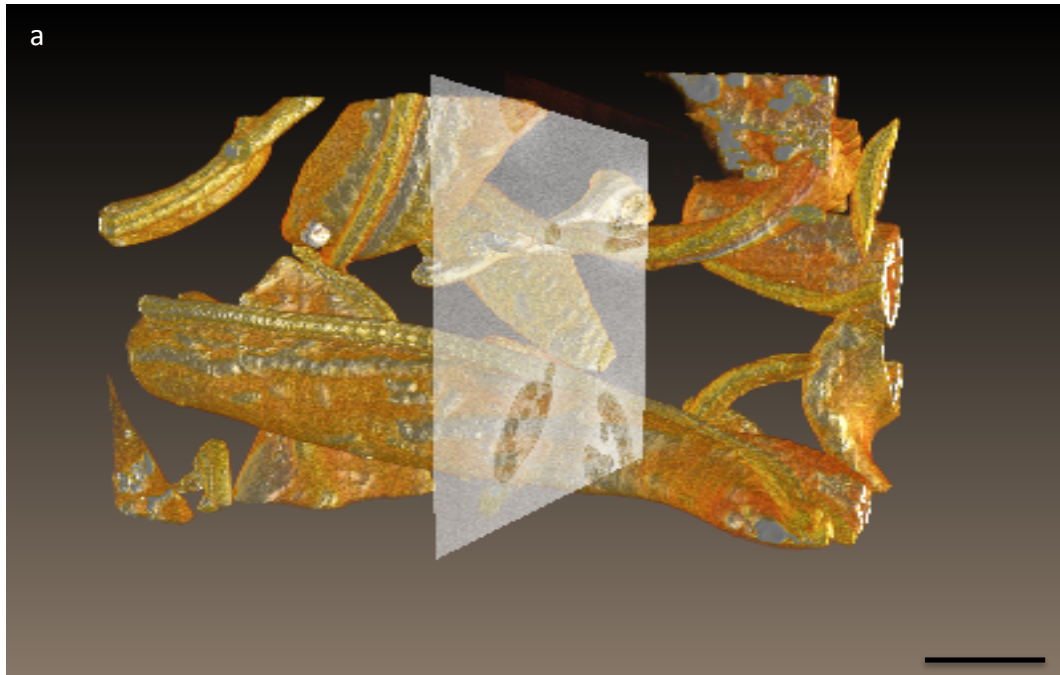


Organismes isolés : Trypanosomes



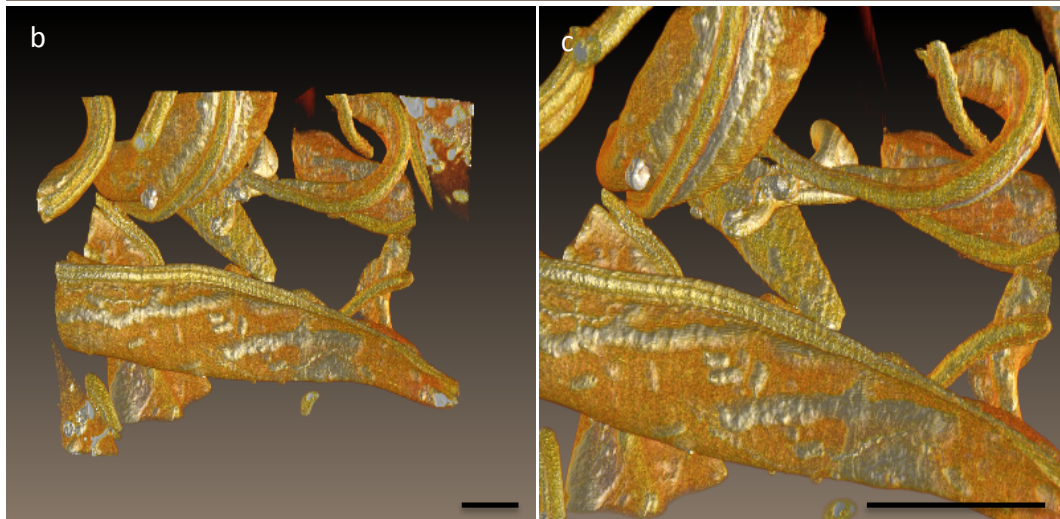
PFR= fibres paraflagellaires
Mt = microtubules corpusculaires

Organismes isolés : Trypanosomes



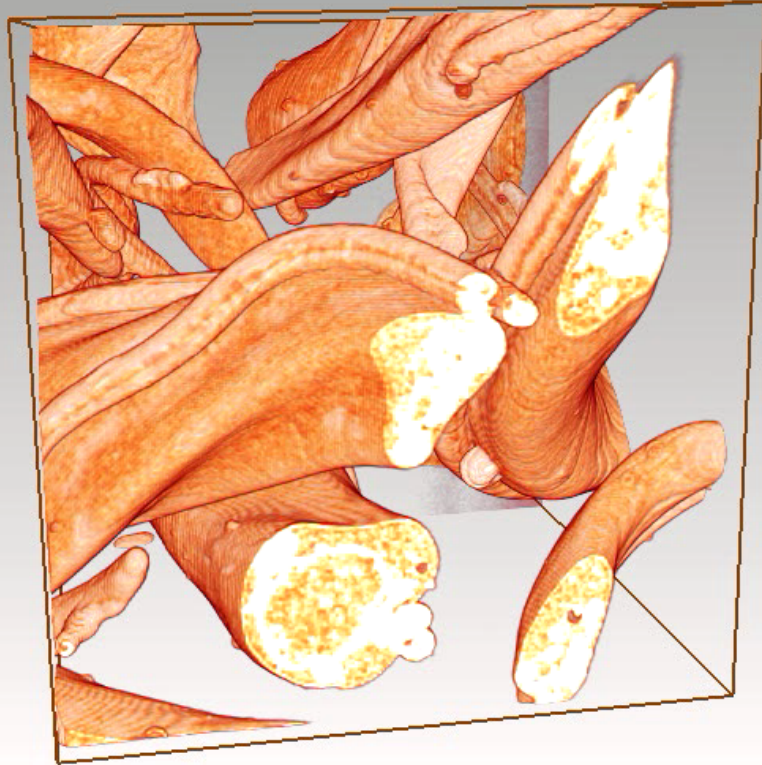
Alignement : 1070 images
→ ImageJ

Modélisation :
ICY (free!)
Amira



Amira
Barre échelle = 2 μ m

800

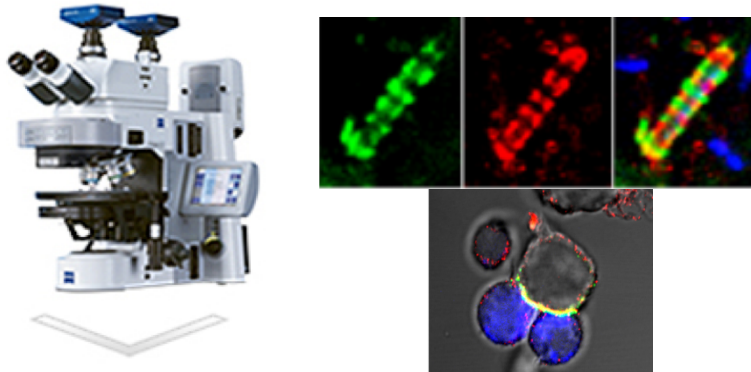


Organismes isolés : Trypanosomes

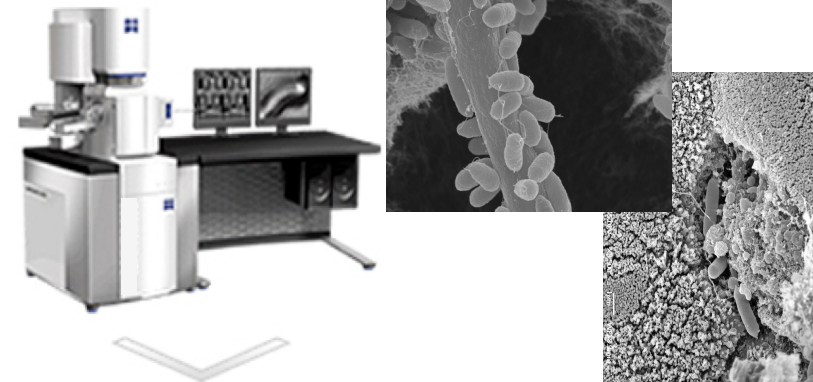
→ Résolution: Taille de Voxel = 10nm pour un volume de 10 μm

En biologie, evenements rares : approche CLEM

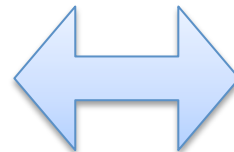
Light Microscope (LM)



Electron Microscope (EM)



Définir une région d'intérêt par immunofluorescence



Informations de structure, haute résolution, localisation de protéines de surface

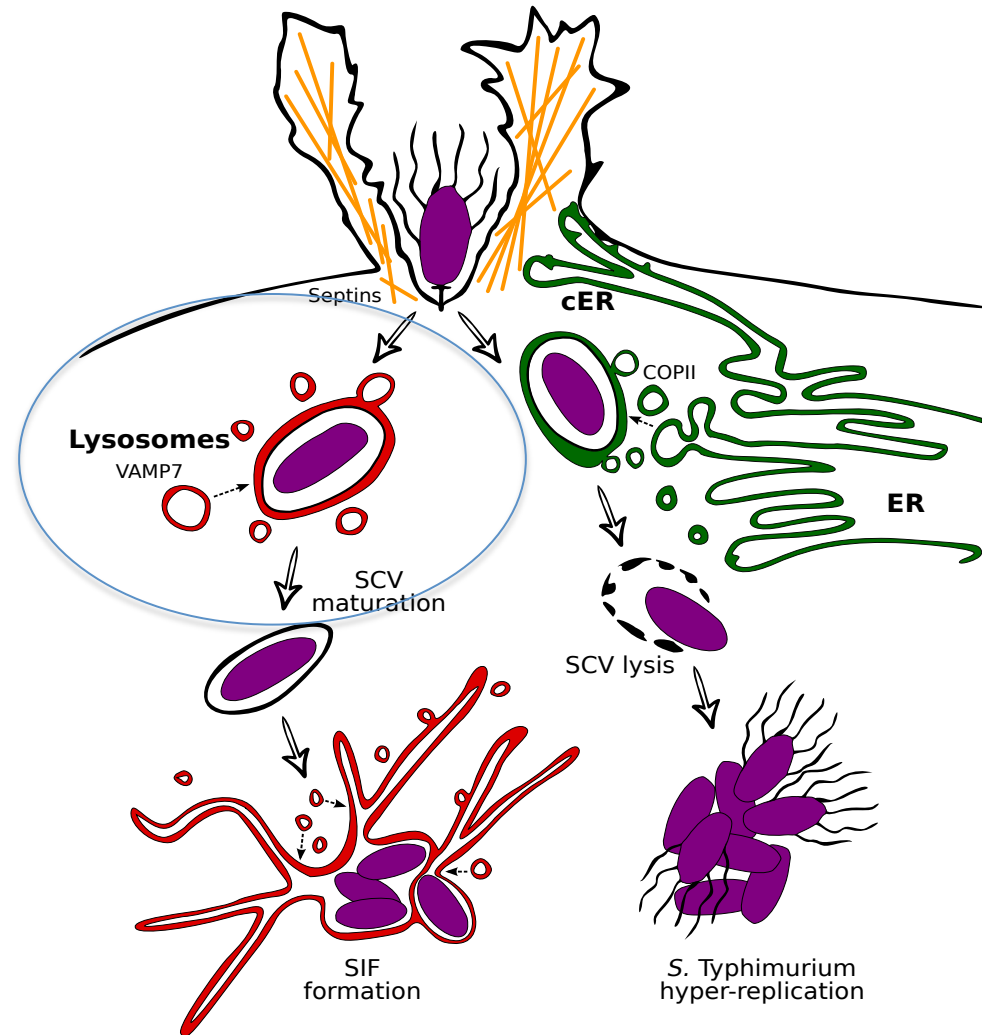
Interaction Hôte-pathogène

Salmonella typhimurium

→ Responsable intoxications alimentaires

Etude infection stade précoce

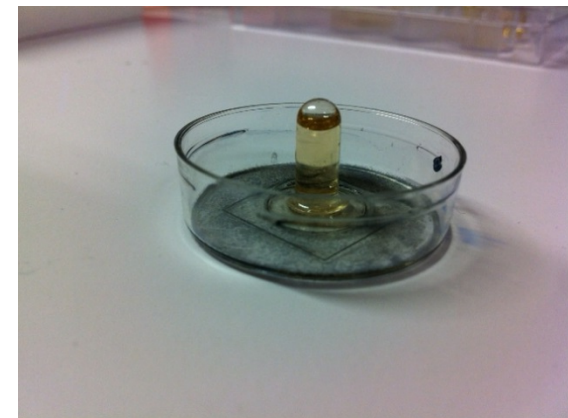
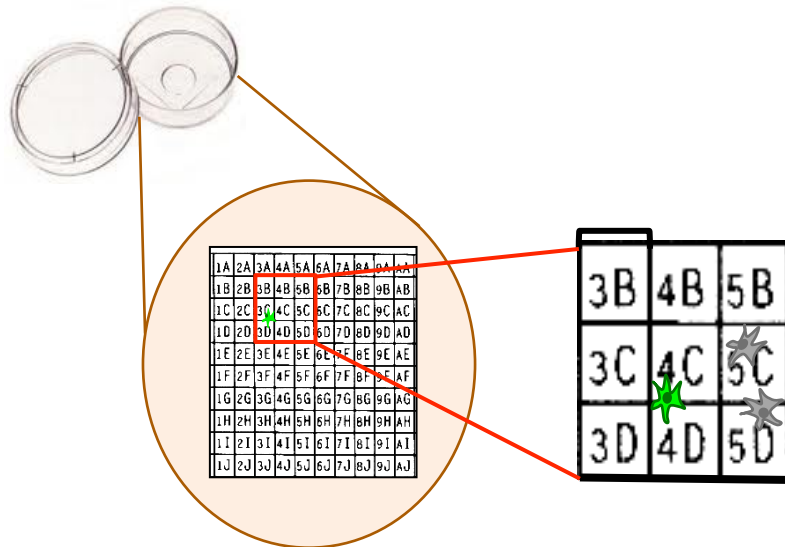
Implication de protéines impliquées dans l'endocytose (VAMP7)



Interaction Hôte-pathogène

Échantillons : Cellules infectées par *S. typhimurium* en culture sur des boîtes spécifiques (repères alphanumériques)

→ Imagerie FLM : Région d'intérêt



Fixation

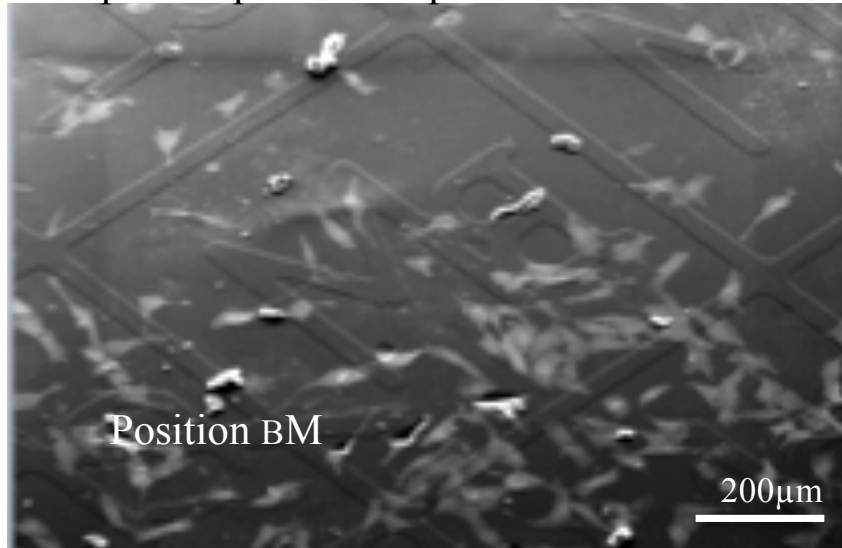
Post fixation / Contrastants

Déshydratation

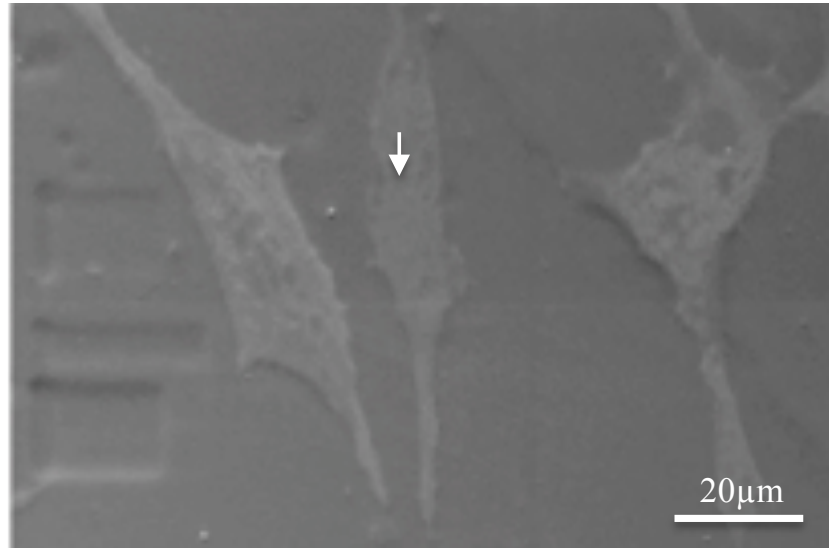
Inclusion en résine

3. Préparation de la surface à imager

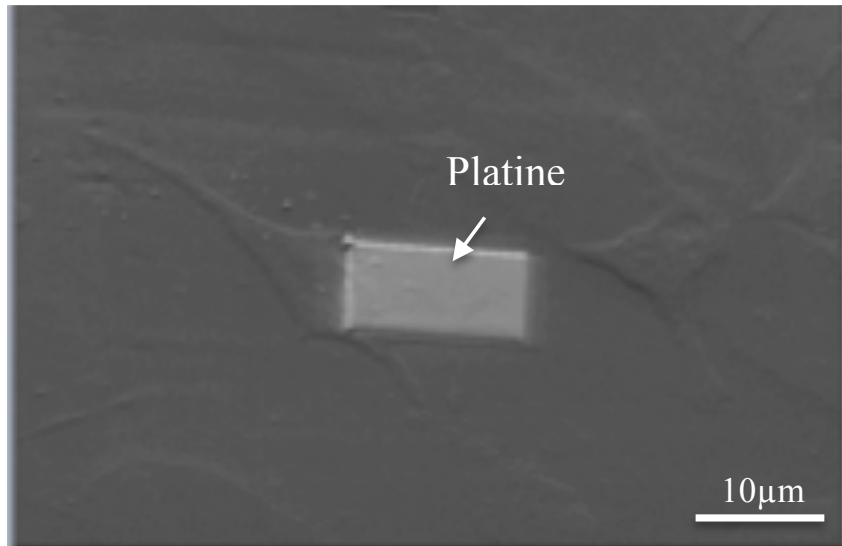
a. Repères alphanumériques



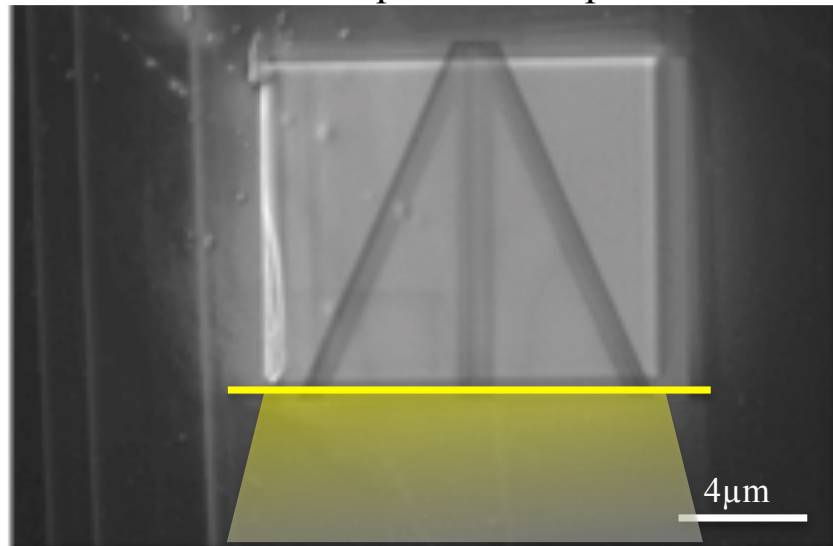
b. Cellule d'intérêt



c. Protection de la zone d'intérêt

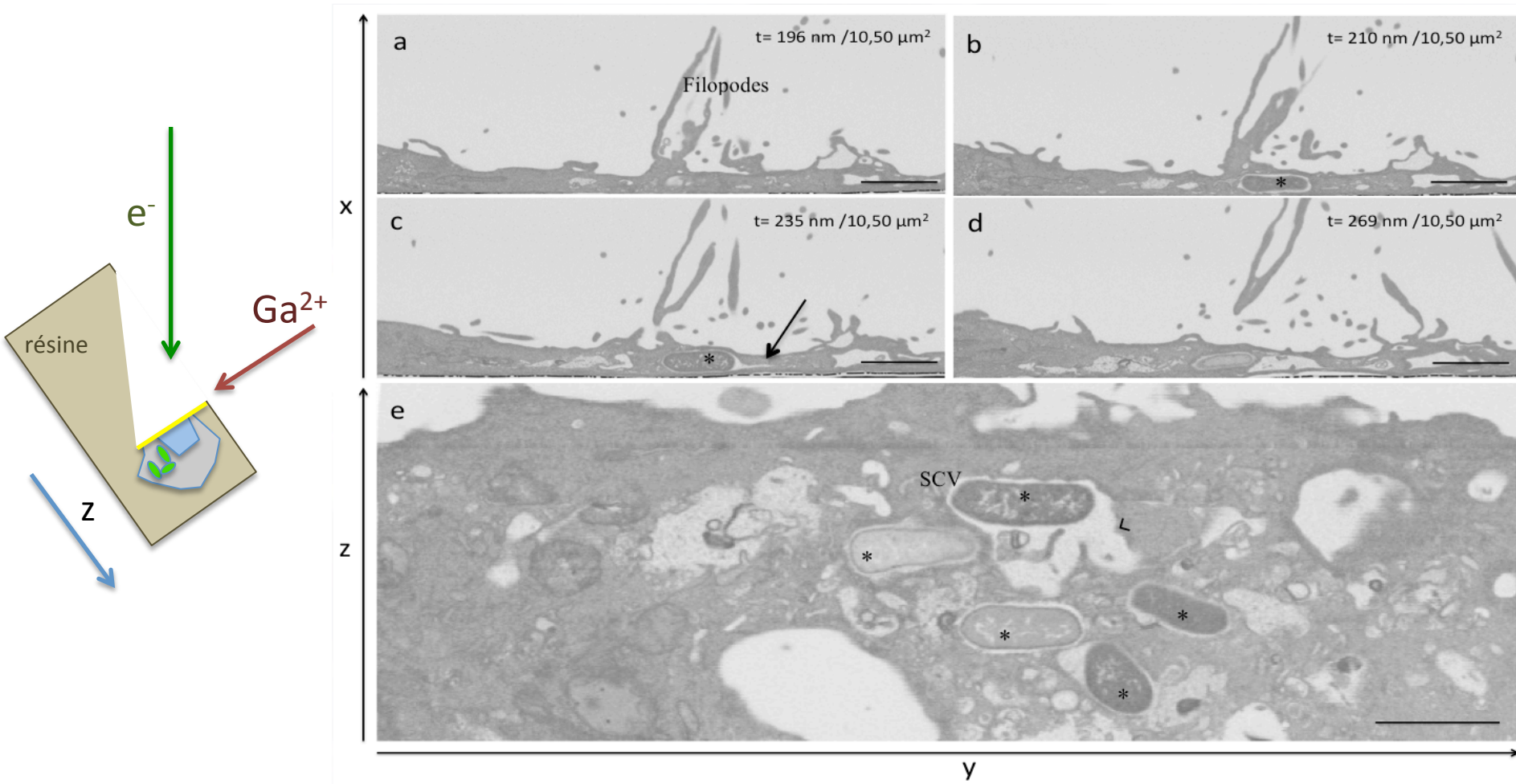


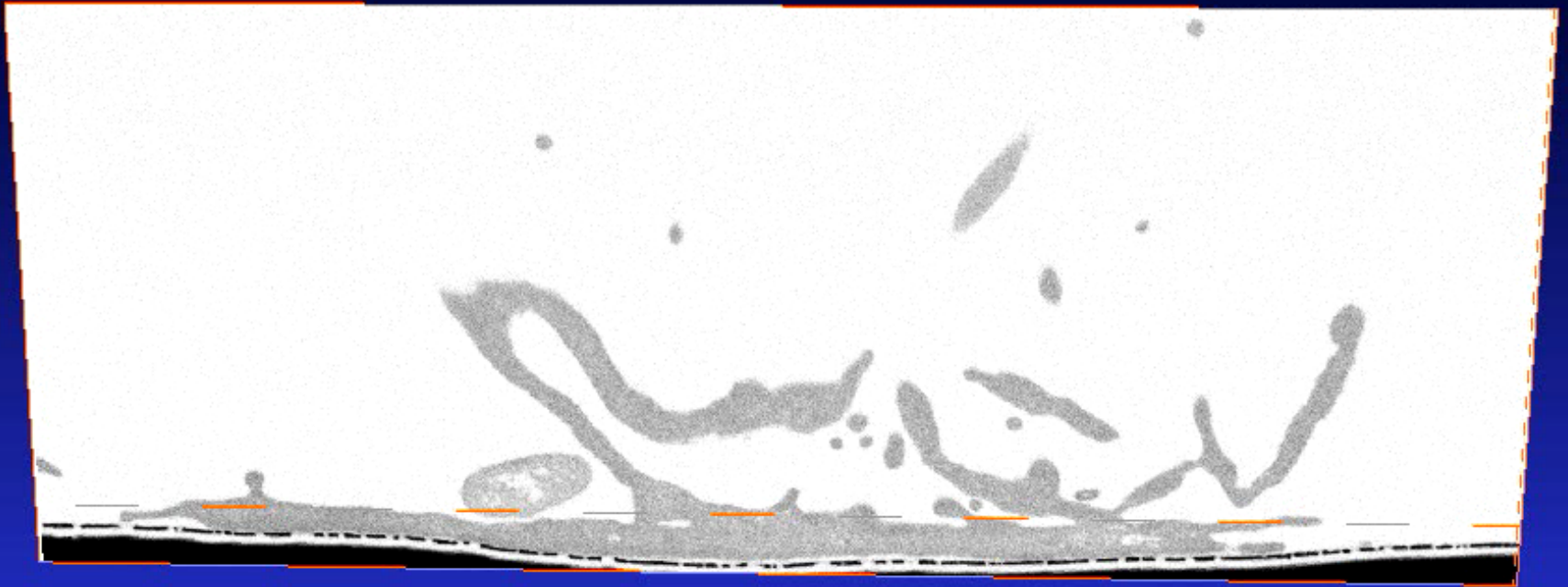
d. Création des marques dans le platine



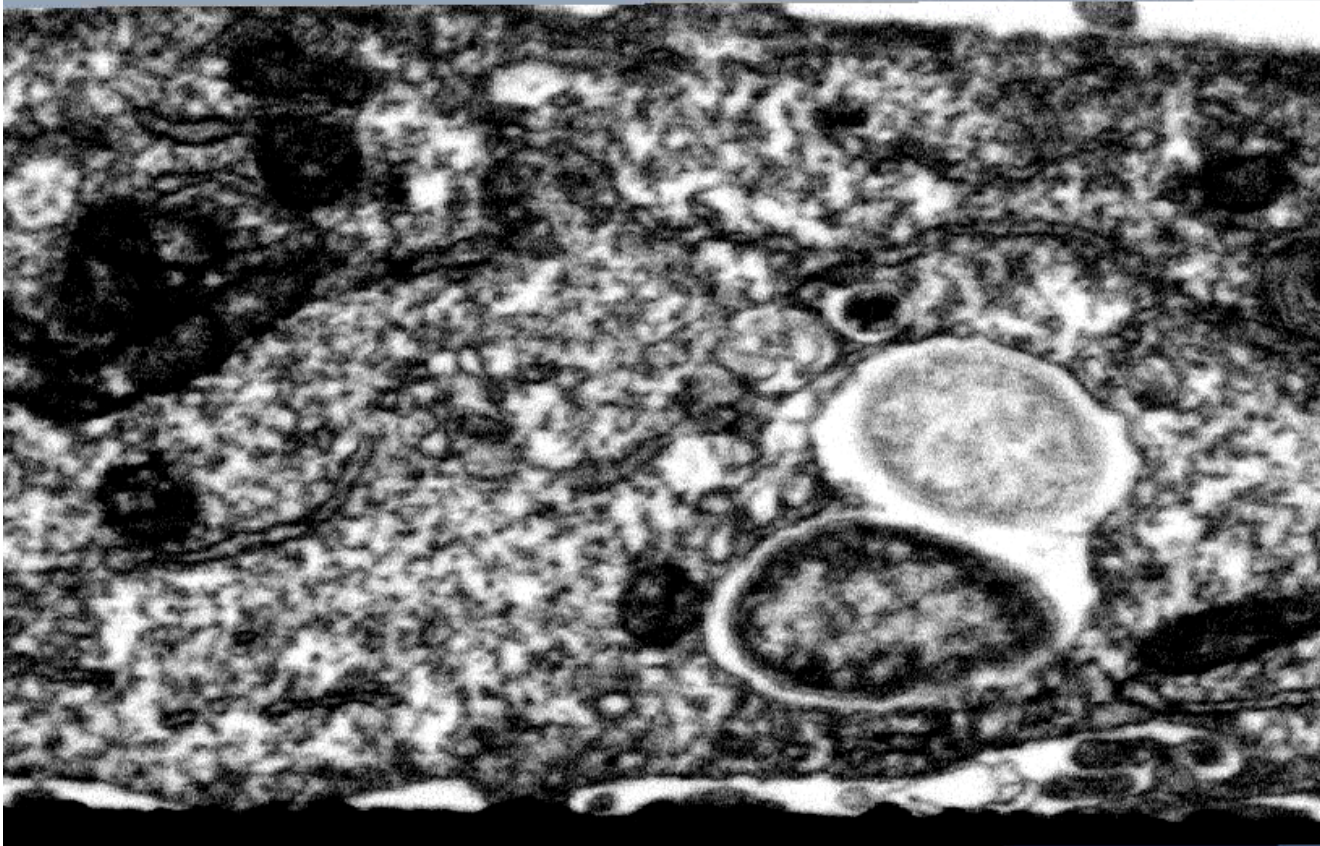
Interaction Hôte-pathogène

Traitement d'images: ImageJ (contraste inversé, alignement, isotropie)





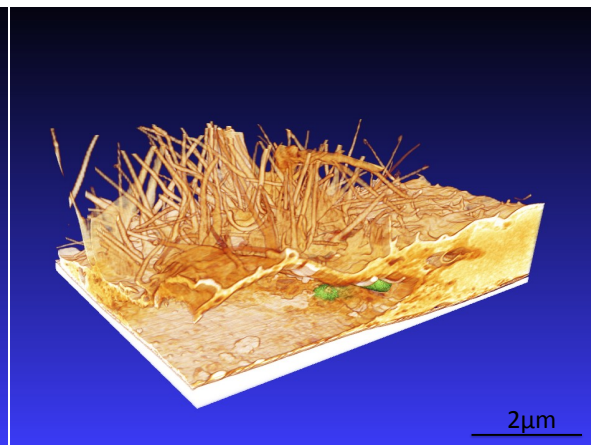
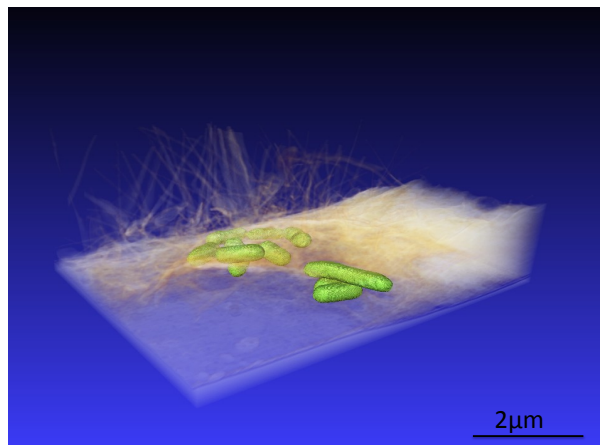
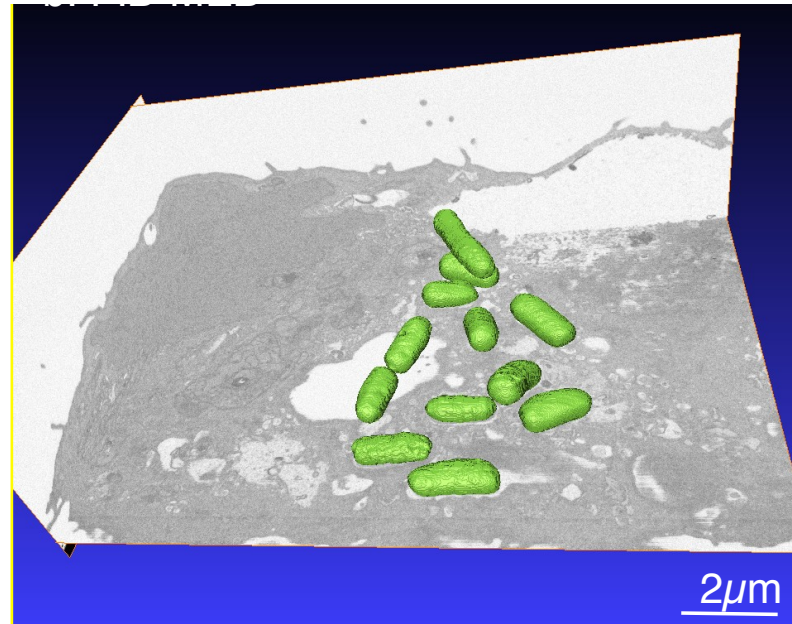
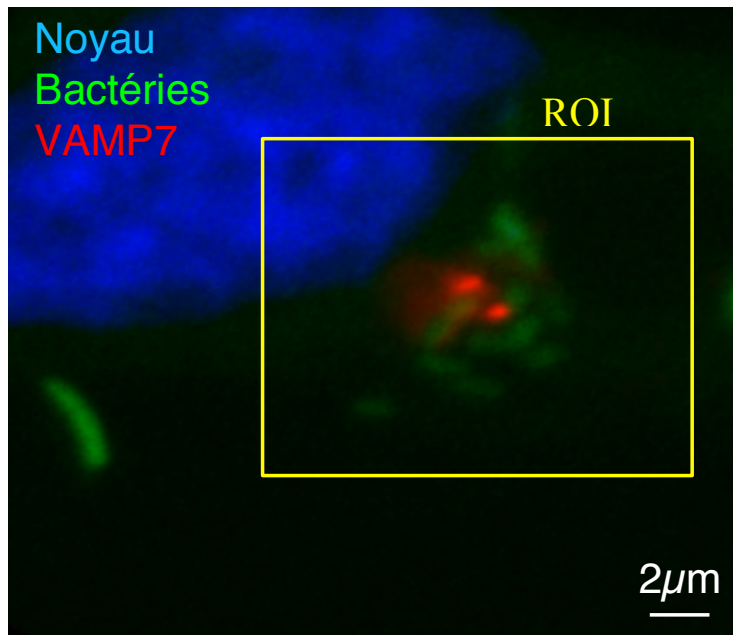
Voxel size 5nm



XY

Amira

Interaction Hôte-pathogène



- Corrélation des informations obtenues en fluorescence
- Haute résolution SEM
- Visualisation 3D intracellulaire & surface

Conclusions

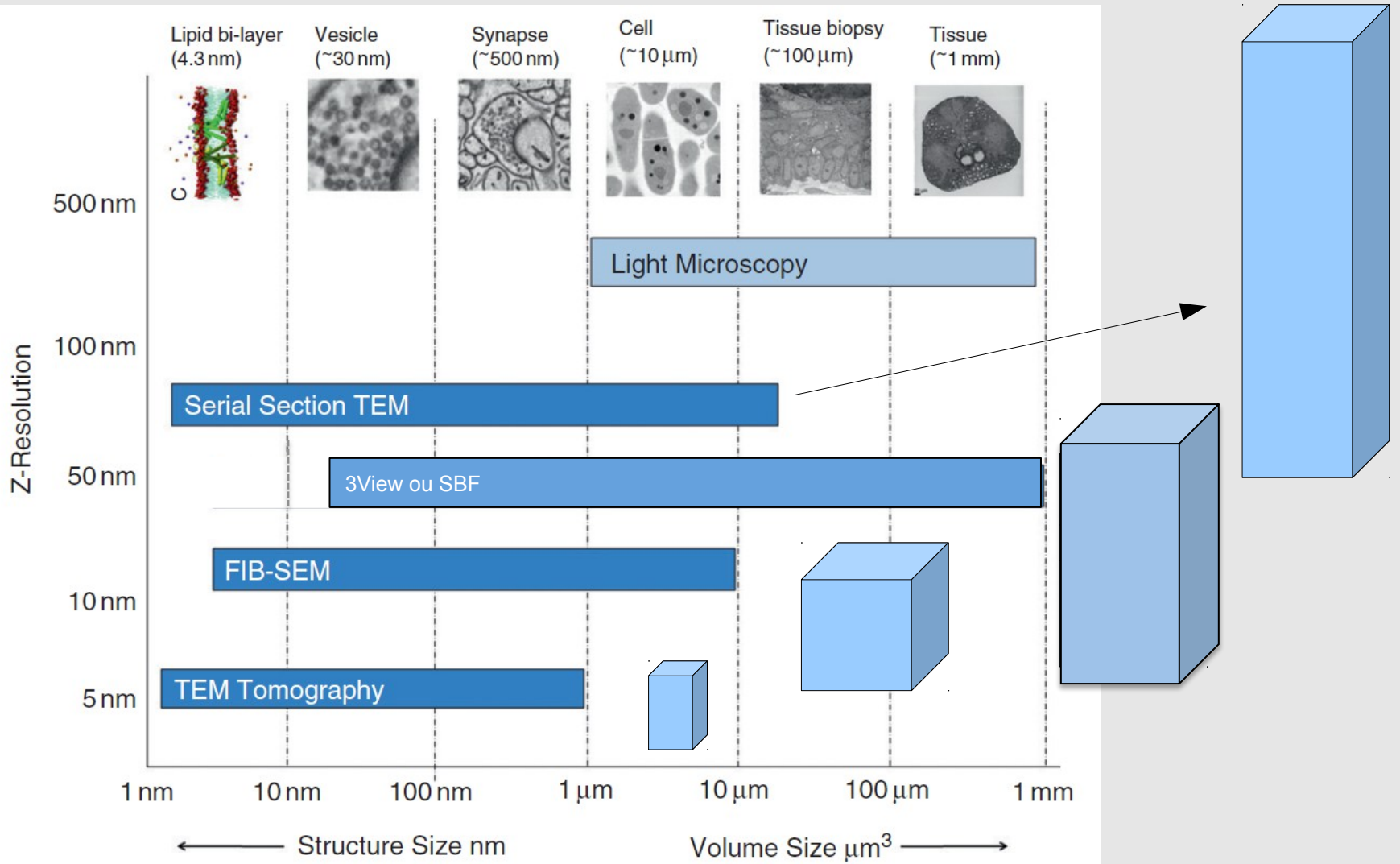
- FIB-SEM : information surface et intracellulaire
- Atlas 3D → confort larges volumes
- Méthode - longue
 - couteuse

Le + :

Surface SEM / info. Intracellulaire TEM


Larges Volumes, isotropes, 10nm (voxel size)

3D en Biologie



JM. Verbavatz

Perspectives



Continuer à
optimiser
préparation

Clem : Mise
au point pour
applications
FLM Haute
résolution

CRYO-FIB SEM

Remerciements

Ultrapole

Jacomine Krinjse Locker

Martin Sachse

Perrine Bomme

Équipe Ultrapole

Contact : amallet@pasteur.fr

ultrapole@pasteur.fr

Unité de Biologie Cellulaire des trypanosomes

Philippe Bastin

Cécile FORT



Dynamique des interactions hôtes-pathogènes (DIHP)

Jost Enninga

José Vieira Dos Santos

Allon Weiner

FIB-SEM en biologie

Préparation

	“classique”	Kilisilyaprak et al.	Jimez et al.
Fixations	GA + Acide tannique	GA+ Osmium + ferrocyanide de potassium	GA+ Osmium + ferrocyanide de potassium
		Acétate d'uranyle	Acide tannique
			Osmium
Déshydatation	éthanol	éthanol	éthanol
Inclusion	Résine	Résine	Résine
Métallisation	20nm Au/Pd	20nm Au/Pd	20nm Au/Pd

2 Résines testées