



# Méthodes conventionnelles de préparation d'échantillons en microscopie électronique pour la biologie.

Alexis Canette

**Service de Microscopie Electronique**

**Institut de Biologie Paris-Seine**



# 1) L'échantillon biologique

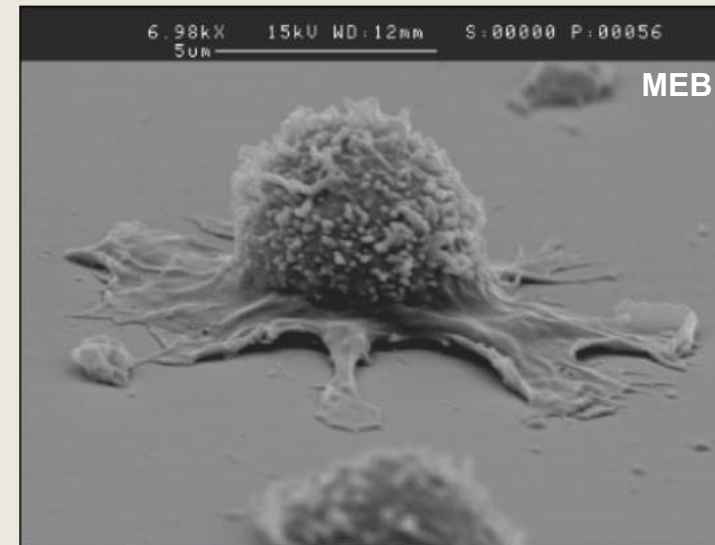
## Propriétés:

- Hydraté
- Peu dense aux électrons
- Non conducteur
- de Taille variable
- Libre
- Sensible : osmolarité, pH, température, ions, rayonnements, contraintes mécaniques
- ...

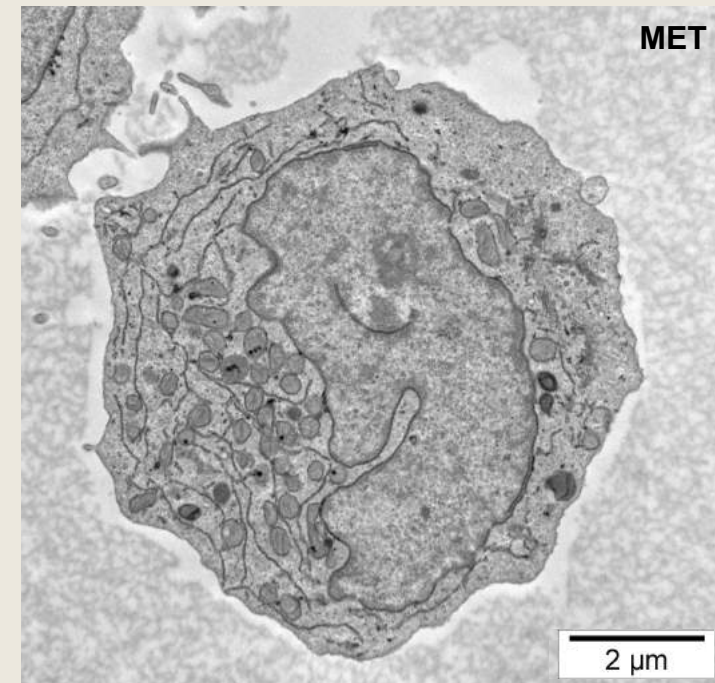
## Pour la ME:

- Stable sous Vide
- Contrasté
- Conducteur
- Perméable aux  $e^-$
- Figé sur un support
- Le plus près de son état initial

**Préparation d'échantillons quasi indispensable**



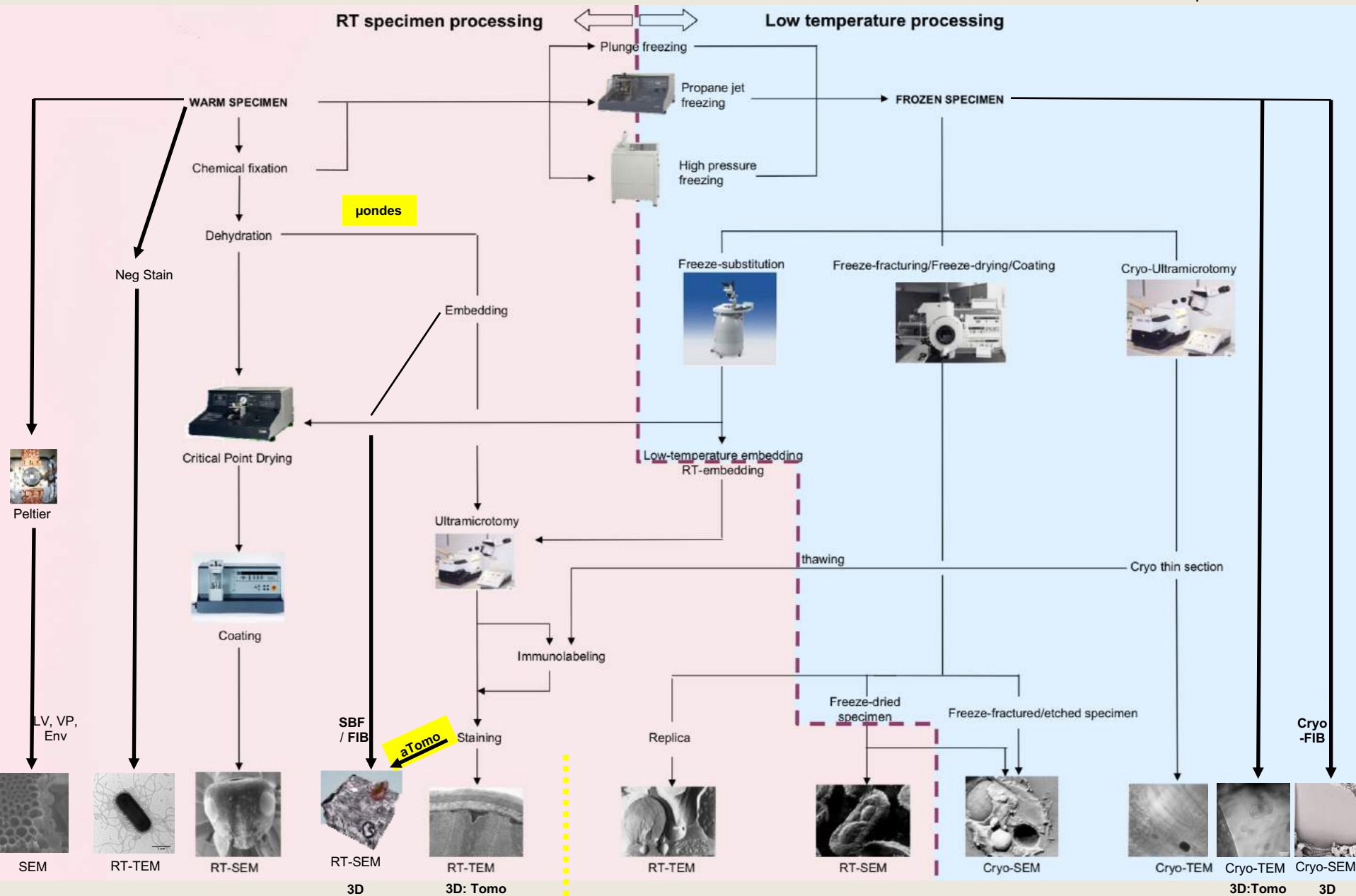
V. Bazin



M. Trichet

# 2) Les méthodes de préparation

d'après Andres Kaech



### 3) préparation à minima

Platine Peltier  
(Vide partiel)

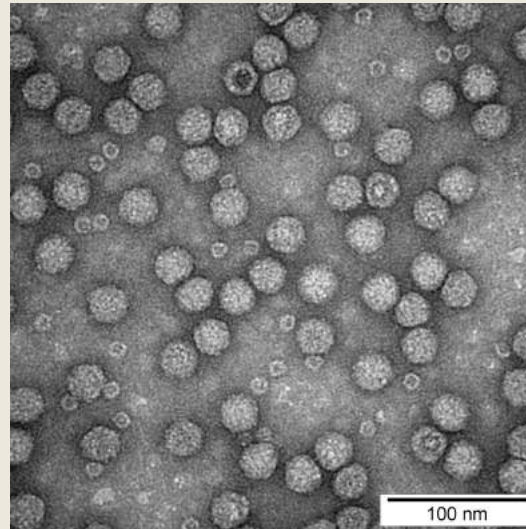


T. Meylheuc

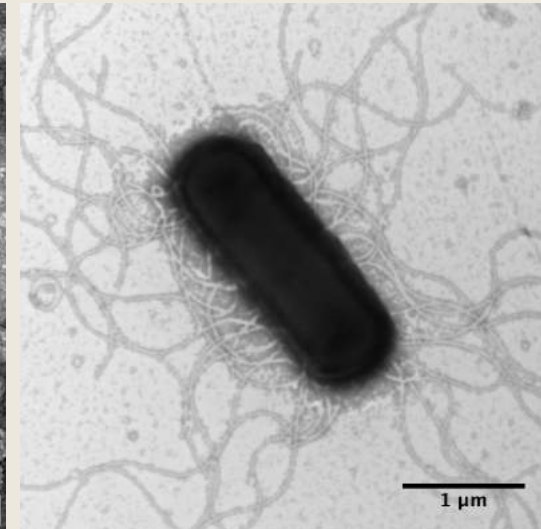
Dépôt sur grille formvar

**Contraste**

« coloration négative » : PTA, UA



A. Canette E. Clérin



A. Canette R. Briandet

# 4) La préparation conventionnelle en MEB

## Fixation chimique

GA, PFA

## Post-fixation

OsO<sub>4</sub>

## Déshydratation

éthanol

## Séchage

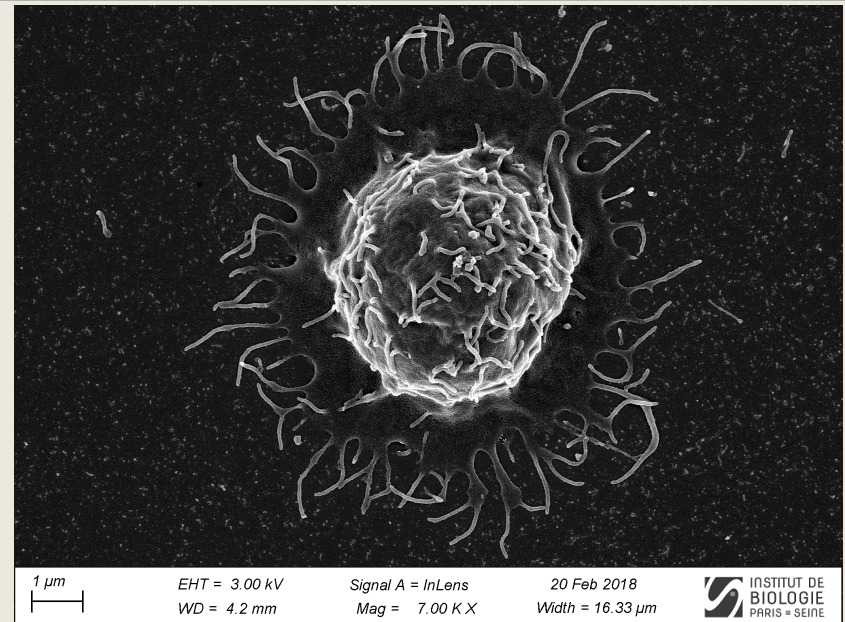
CPD  
ou HMDS

## Montage

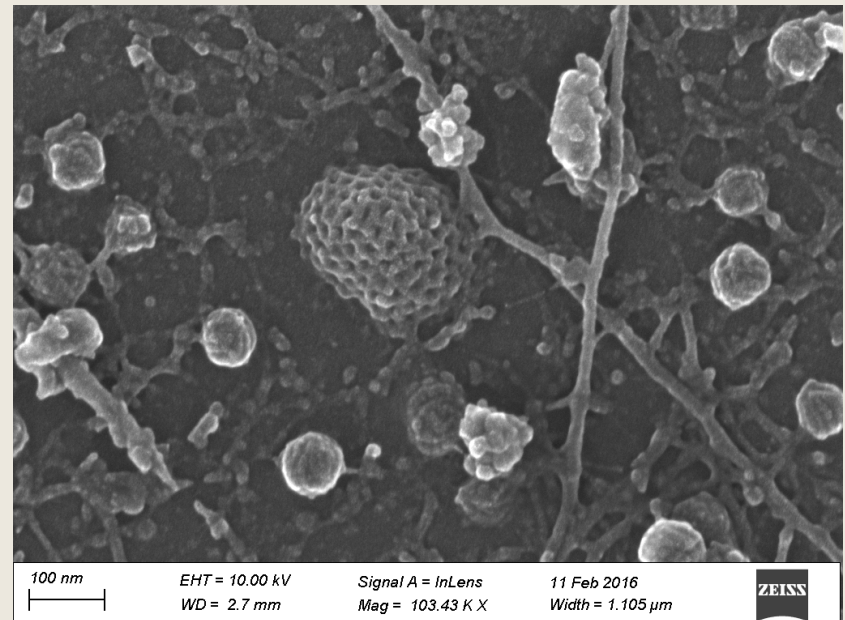
collage sur plot

## Métallisation

Au, Pd, Pt, C...



V. Bazin C. Hivroz

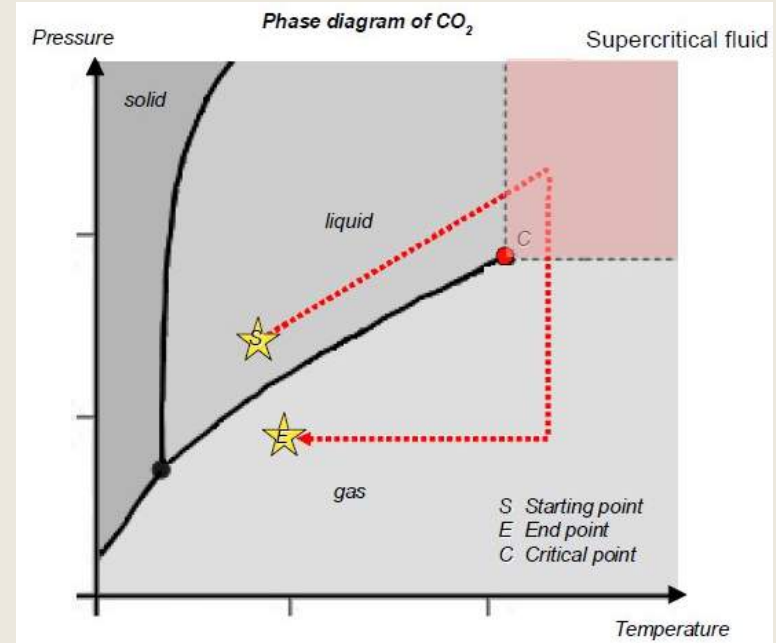


M. Trichet V. Vassilopoulos

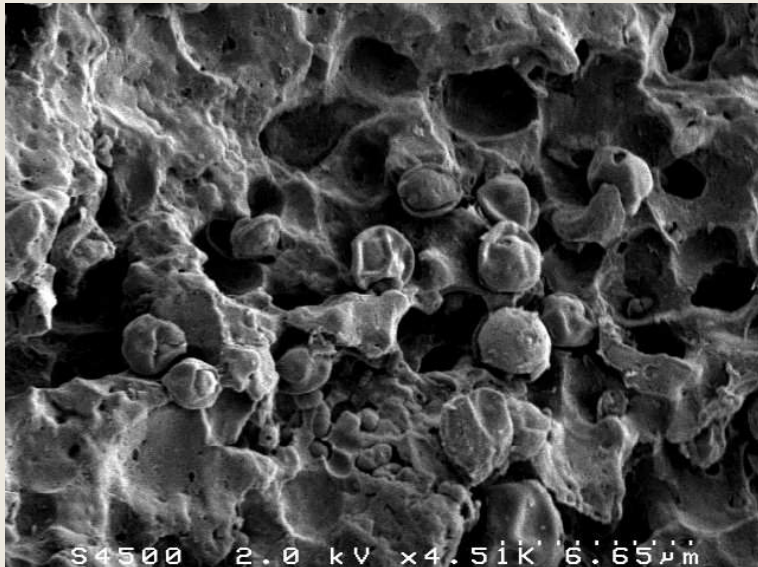
# 4) La préparation conventionnelle en MEB

Séchage

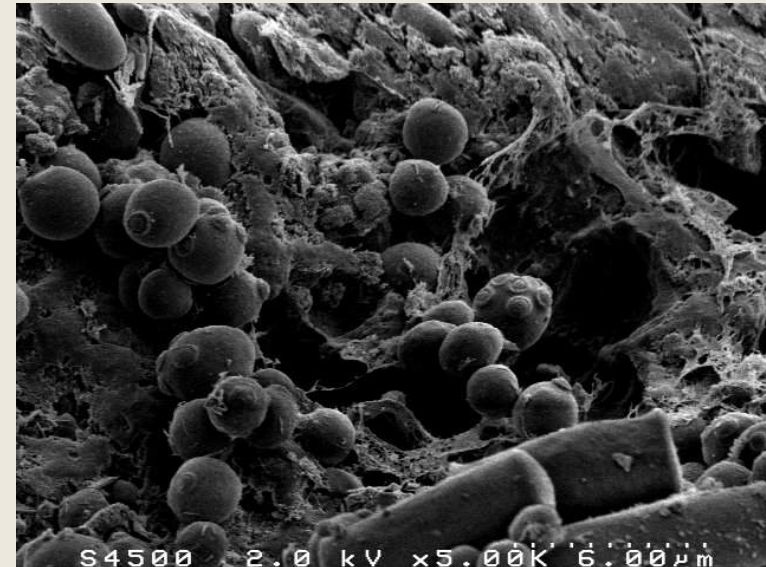
à l'air libre



CPD

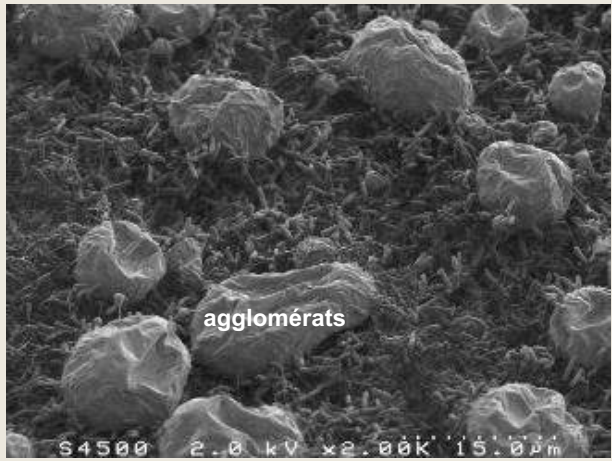
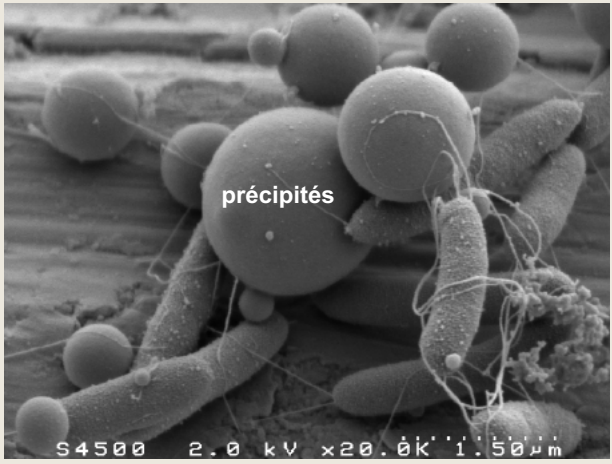


A. Canette R. Ferrier

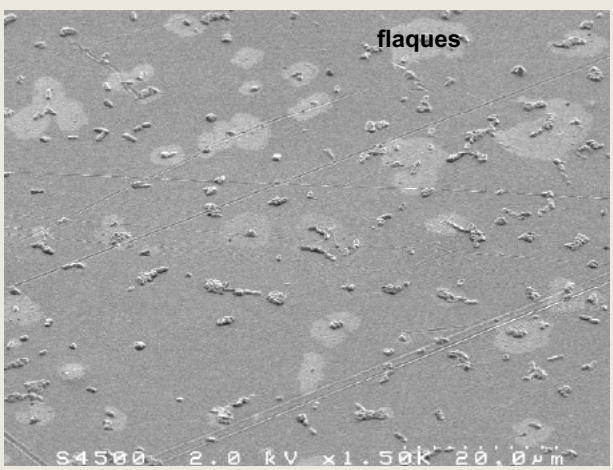
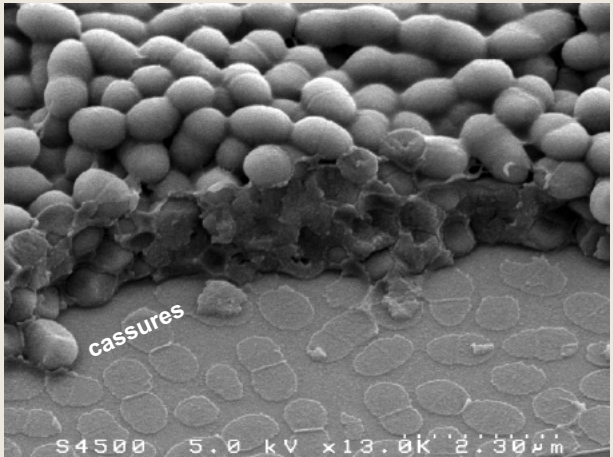


# 4) La préparation conventionnelle en MEB

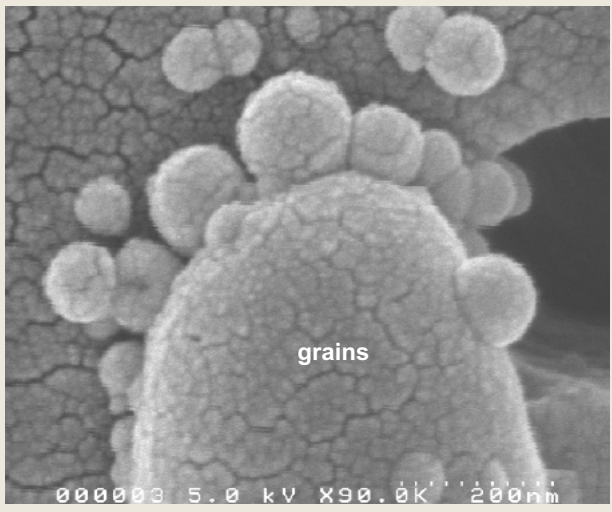
## Artéfacts!



de fixation



de séchage



de métallisation

# 5) La préparation conventionnelle en MET

**Fixation chimique**

GA, PFA

**Post-fixation**

$\text{OsO}_4$

**Déshydratation**

éthanol / acétone

**Inclusion**

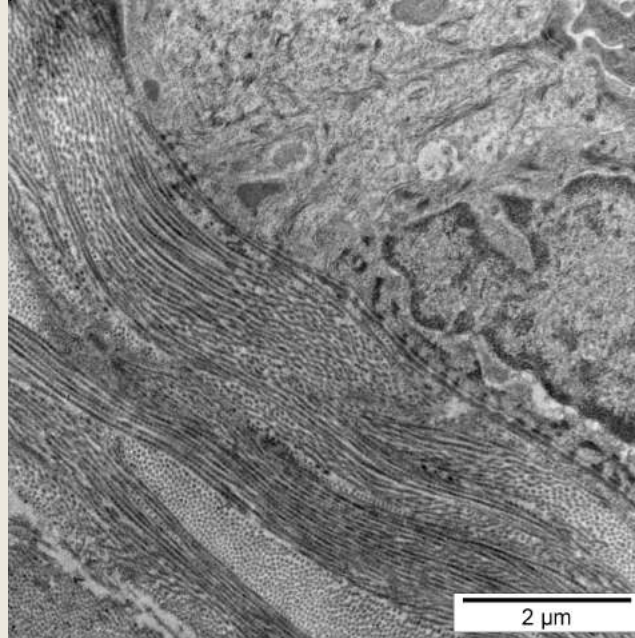
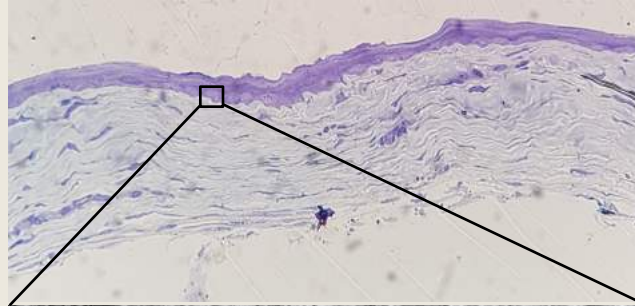
résines époxy ou acryliques

**Ultramicrotomie**

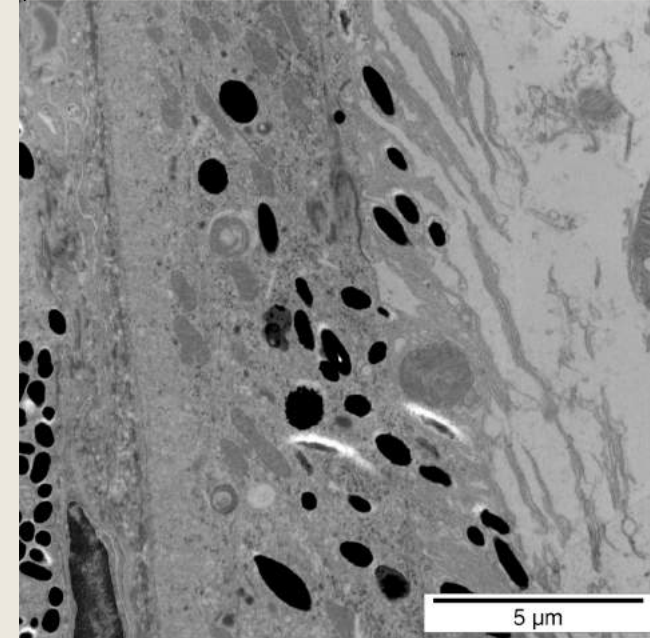
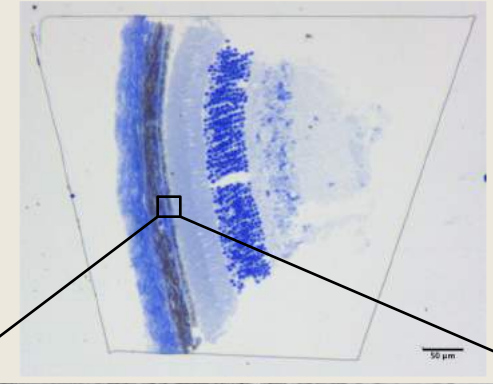
montage sur grille

**Contraste**

UA, Pb

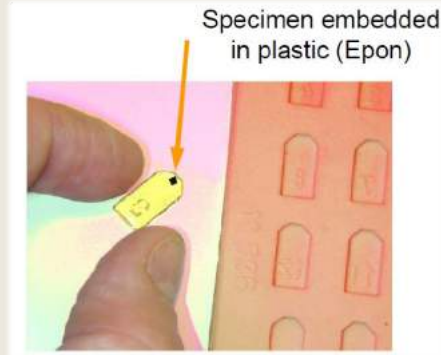


A. Canette D. Ghoubay



M. Trichet V. Fontaine

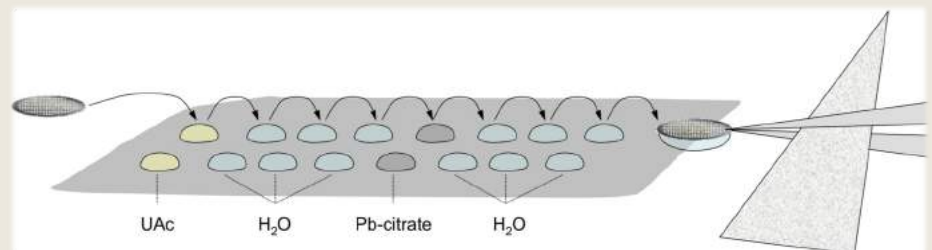
# 5) La préparation conventionnelle en MET



**Ultramicrotomie**  
montage sur grille

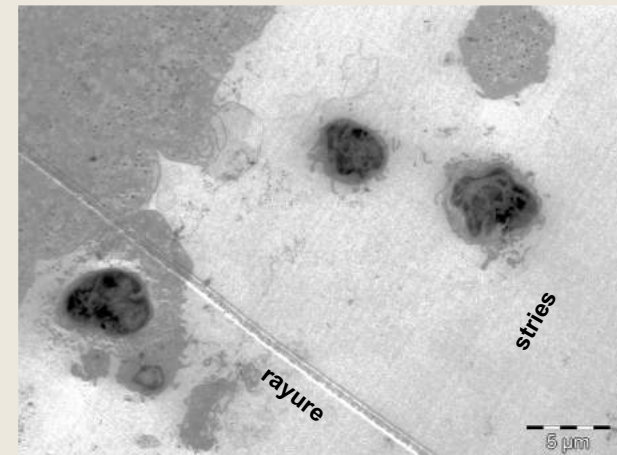
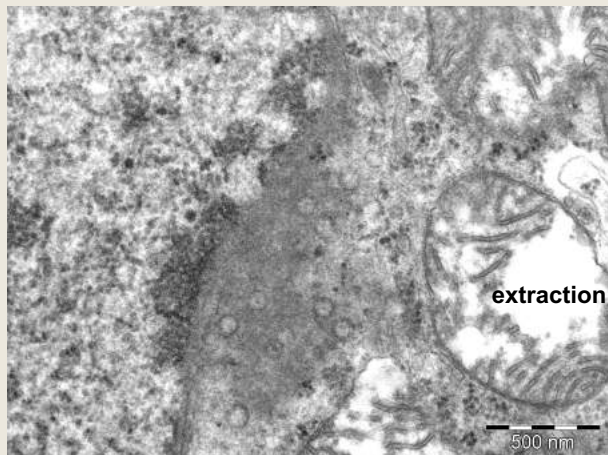
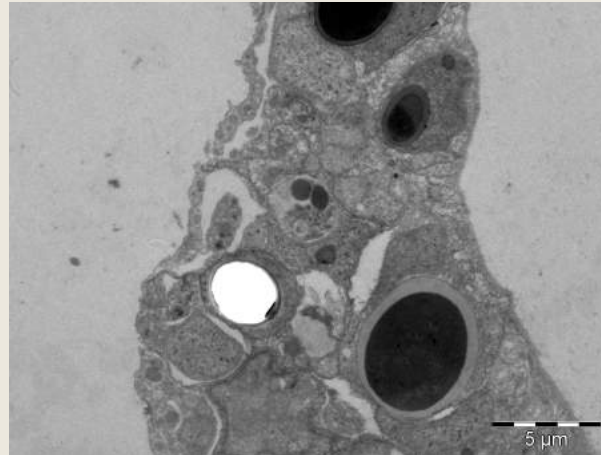
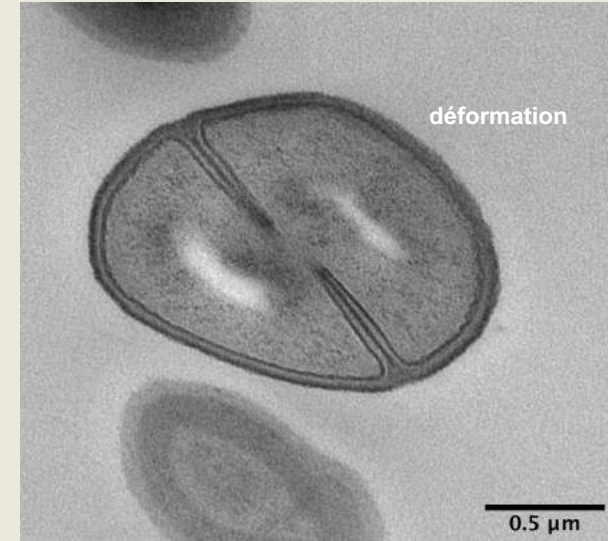
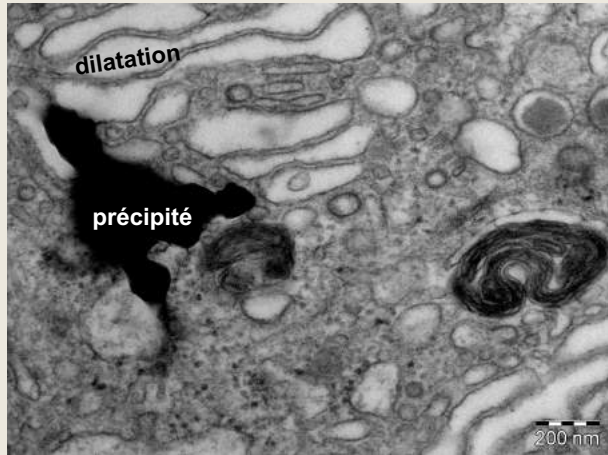


**Contraste**  
UA, Pb



# 5) La préparation conventionnelle en MET

## Artéfacts!



# 5) La préparation conventionnelle en MET – développements récents

## Fixation chimique

GA, PFA

jondes

## Post-fixation

OsO<sub>4</sub>

jondes

## Déshydratation

éthanol / acétone

jondes

## Inclusion

résines époxy ou acryliques

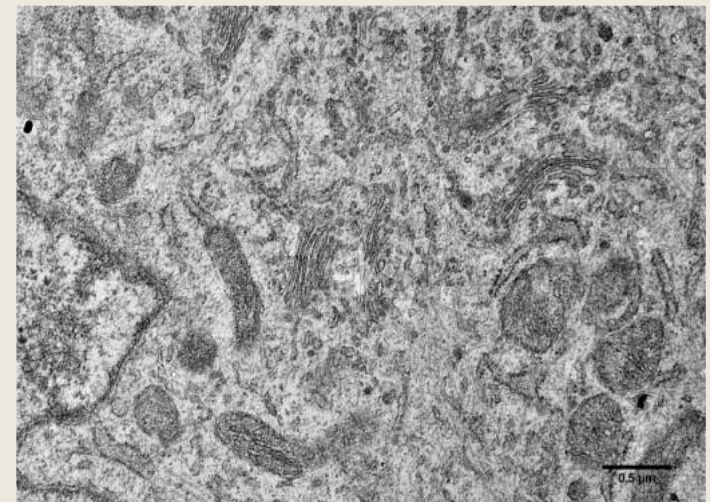
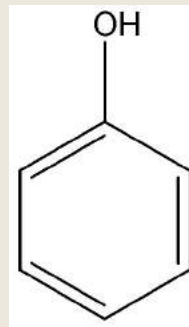
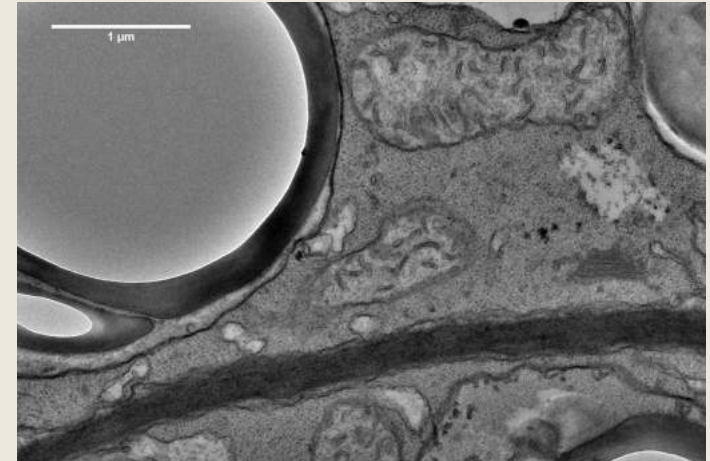
jondes

## Ultramicrotomie

montage sur grille

## Contraste

UA OTE, Pb



# 6) La préparation pour l'immuno-localisation en MET

**Fixation chimique**

GA, PFA

**Post-fixation**

OsO<sub>4</sub>

**Déshydratation**

éthanol

**Inclusion**

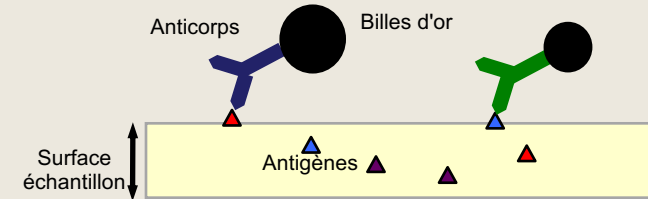
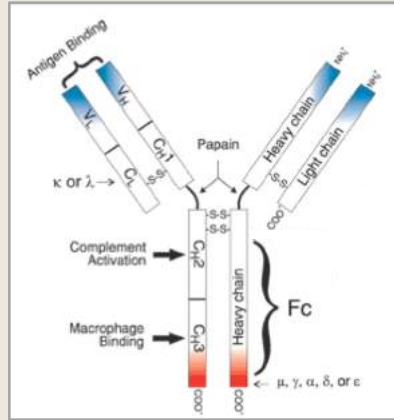
résines époxy ou acryliques

**Ultramicrotomie**

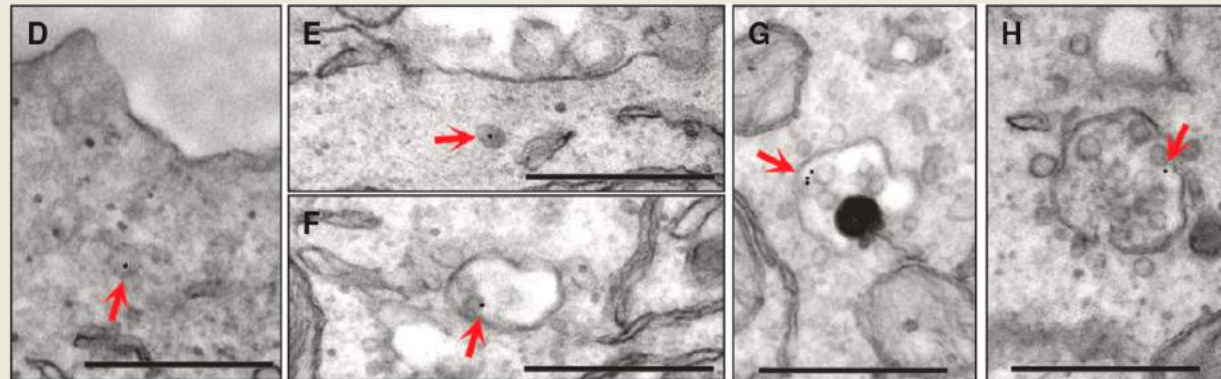
montage sur grille

**Contraste**

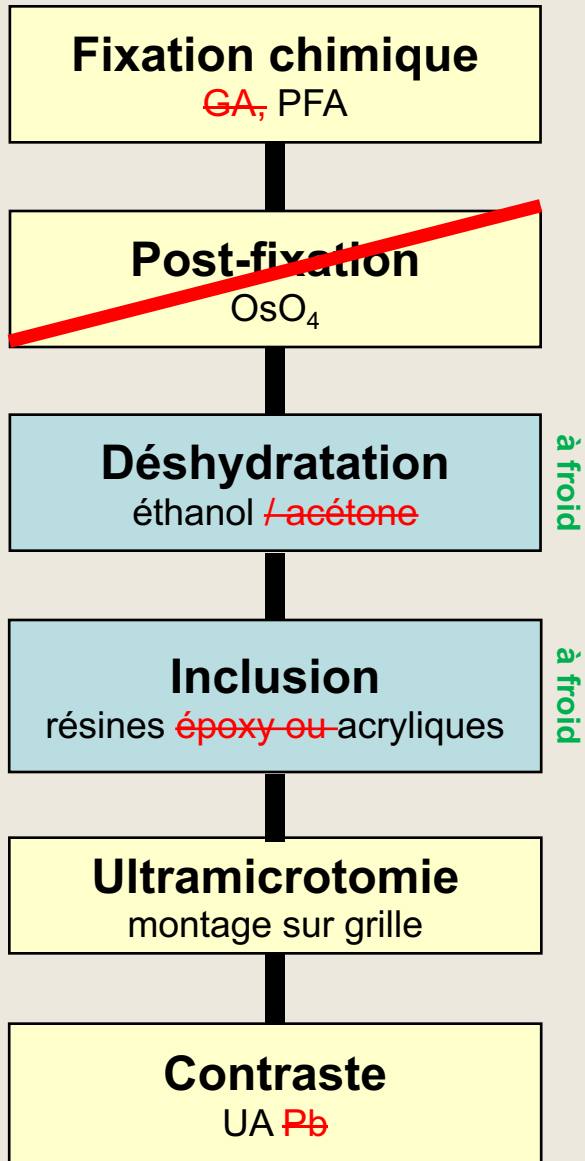
UA, Pb



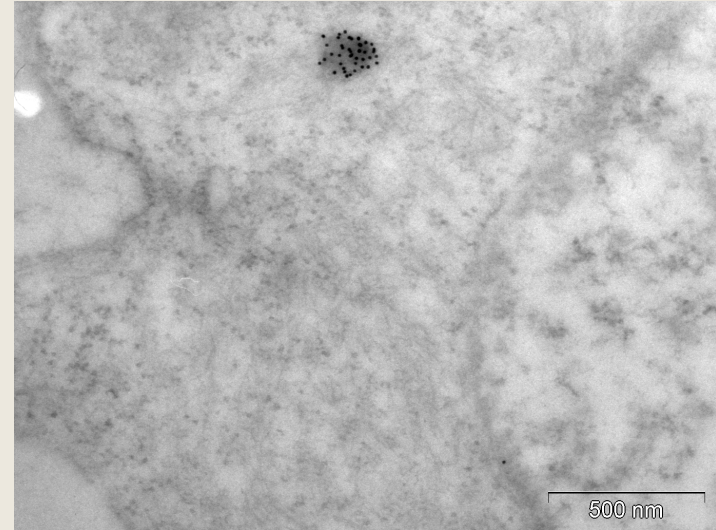
**en pré-inclusion**



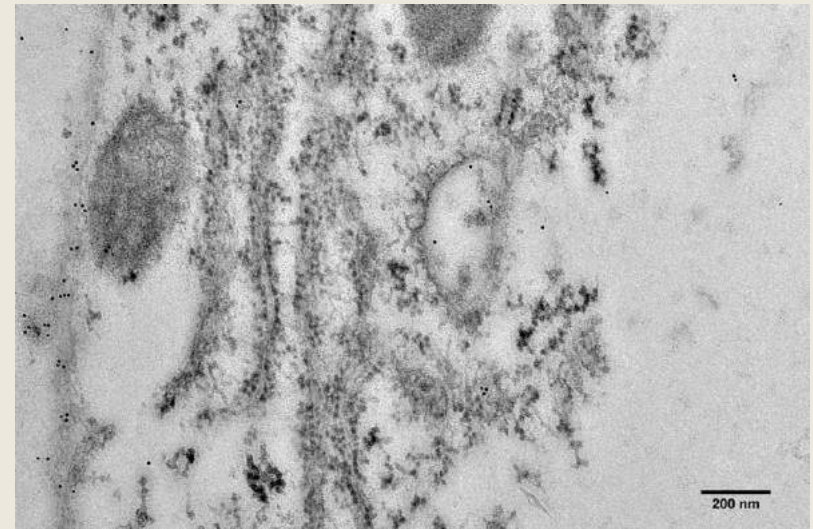
# 6) La préparation pour l'immuno-localisation en MET



## en post-inclusion: PLT



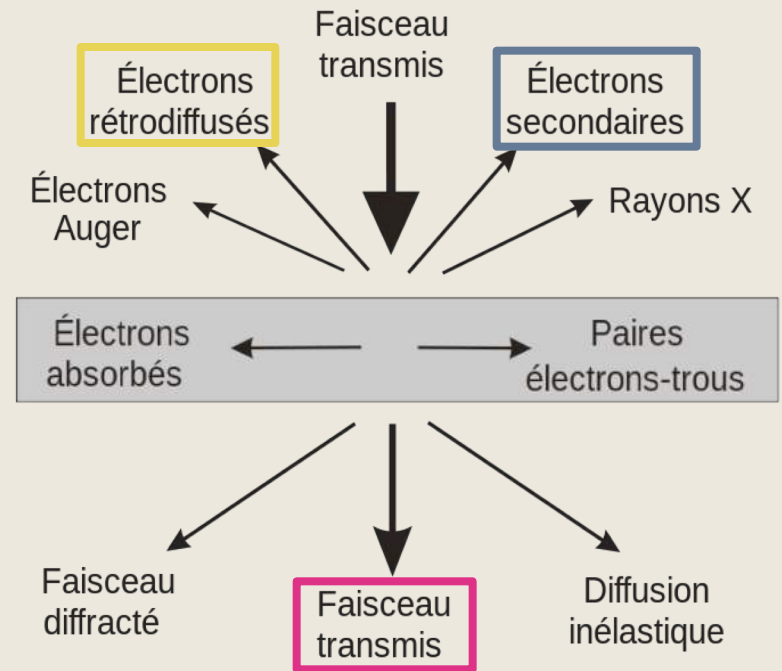
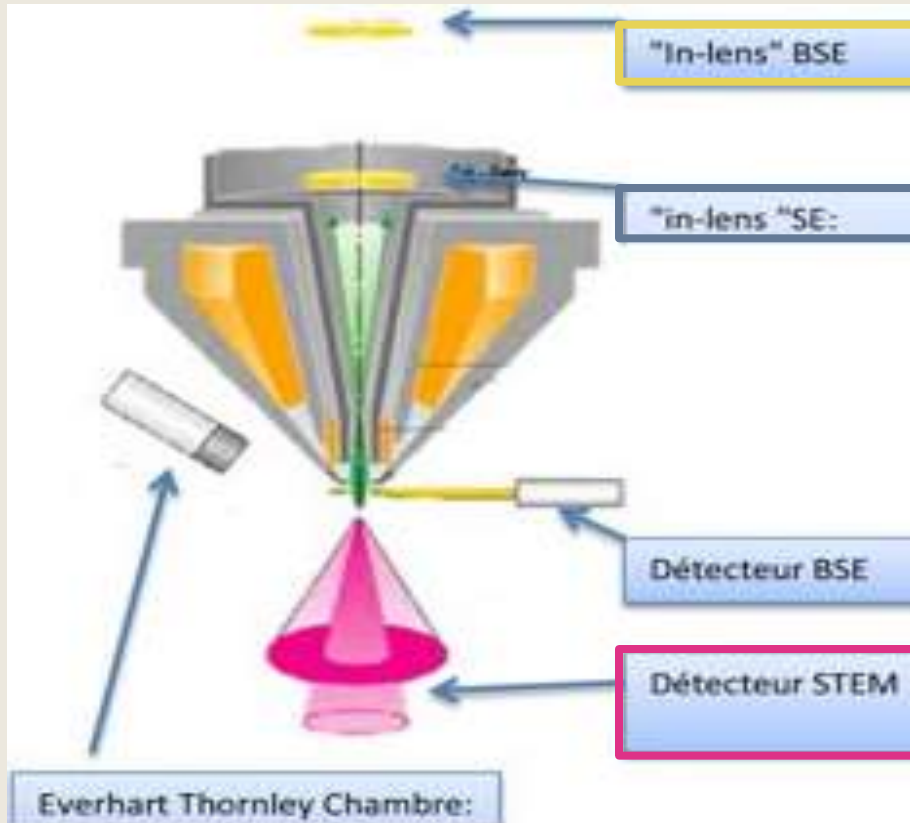
A. Canette O. Ait-Mohamed



A. Canette A. Carpentier

# 7) Images de sections dans un MEB

« réflexion » → contraste inverse au MET



transmission → contraste équivalent au MET

# 7) Images de sections dans un MEB : STEM

**Fixation chimique**

GA, PFA

**Post-fixation**

OsO<sub>4</sub>

**Déshydratation**

éthanol / acétone

**Inclusion**

résines époxy ou acryliques

**Ultramicrotomie**

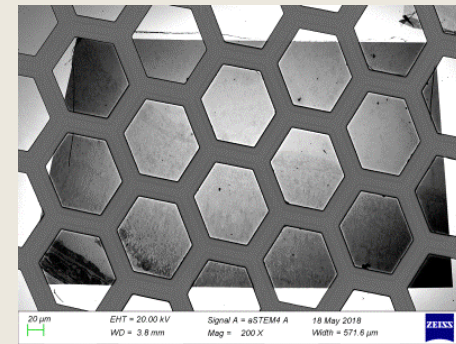
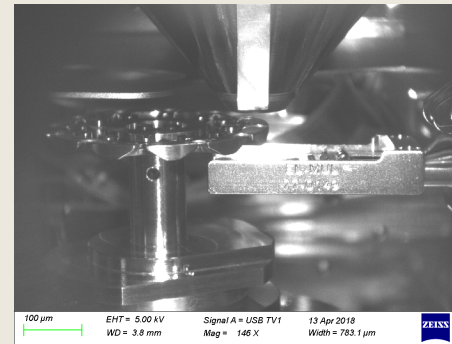
montage sur grille **FORMVAR**

~~**Contraste**~~

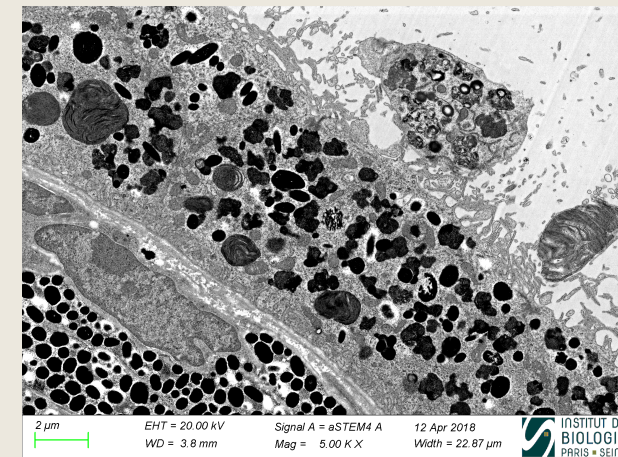
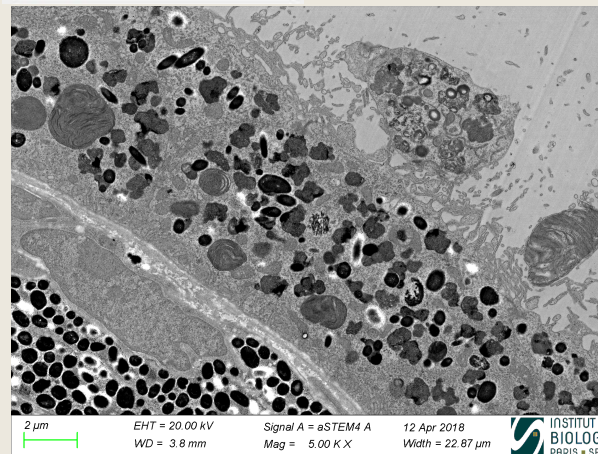
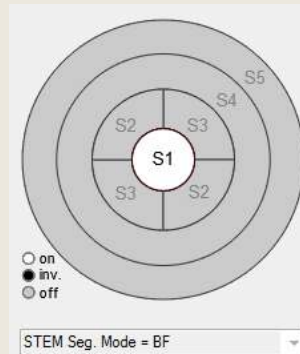
UA, Pb

**Irradiation  
pré-acquisition**

A. Canette E. Monteiro M. Trichet



**Barreaux**



# 6) Images de sections dans un MEB : détection In Lens

**Fixation chimique**

GA, PFA

**Post-fixation**

OsO<sub>4</sub>

**Déshydratation**

éthanol / acétone

**Inclusion**

résines époxy ou acryliques

**Ultramicrotomie**

**Effluage préliminaire**

montage sur **WAFER**

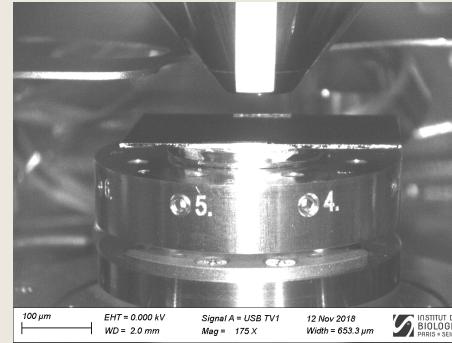
**Effluage préliminaire**

**Contraste**

UA, Pb

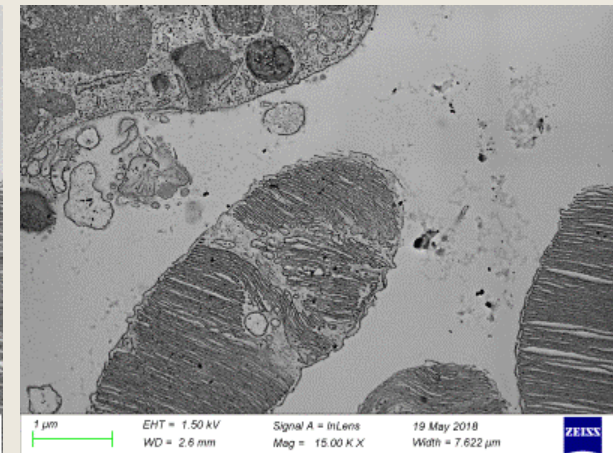
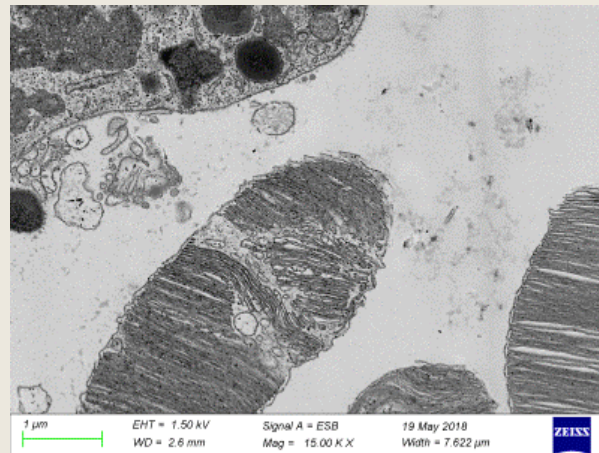
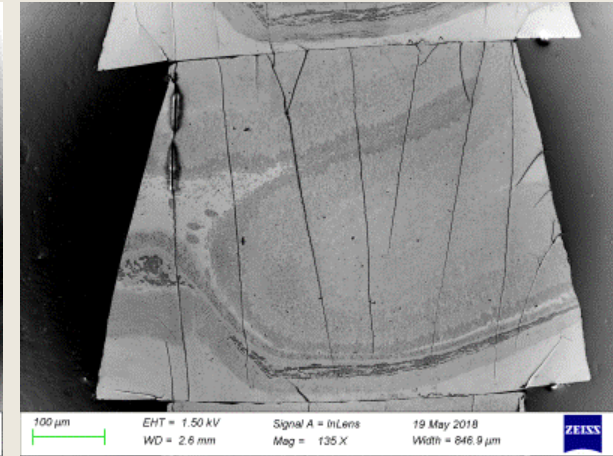
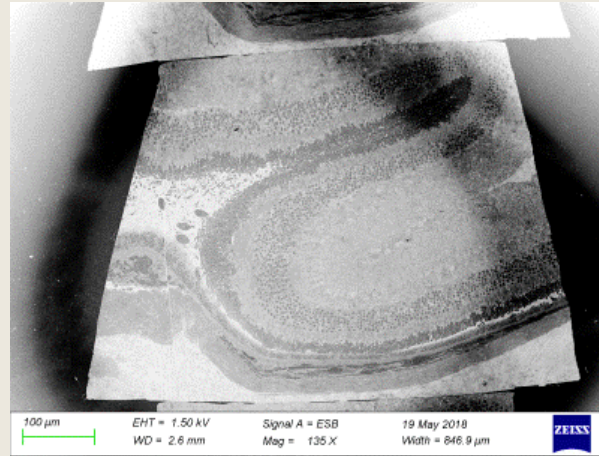
**Plasma Cleaning**

Pas de barreaux  
Grande surface stable et solide  
Épaisseur de la coupe



A. Canette E. Monteiro M. Trichet

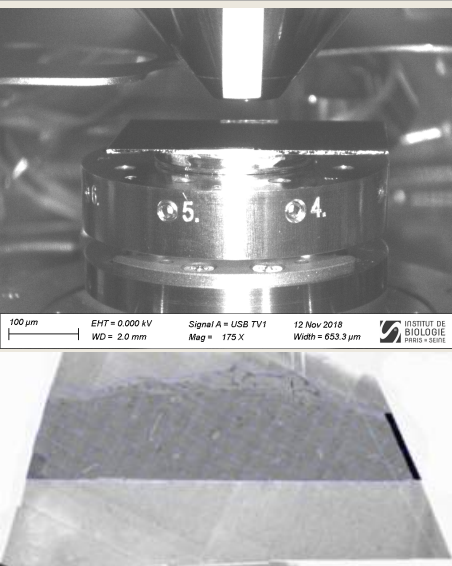
In lens SE



**Temps d'acquisition long,  
Mauvais à faible grandissement**

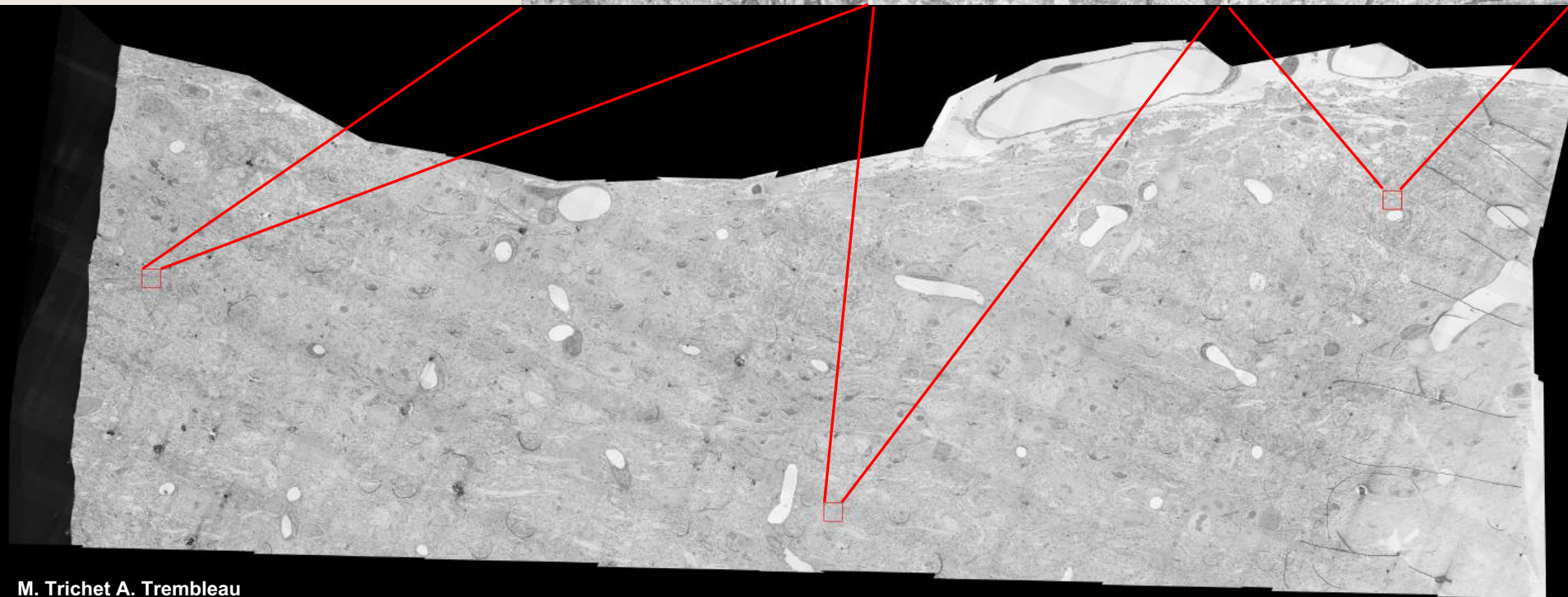
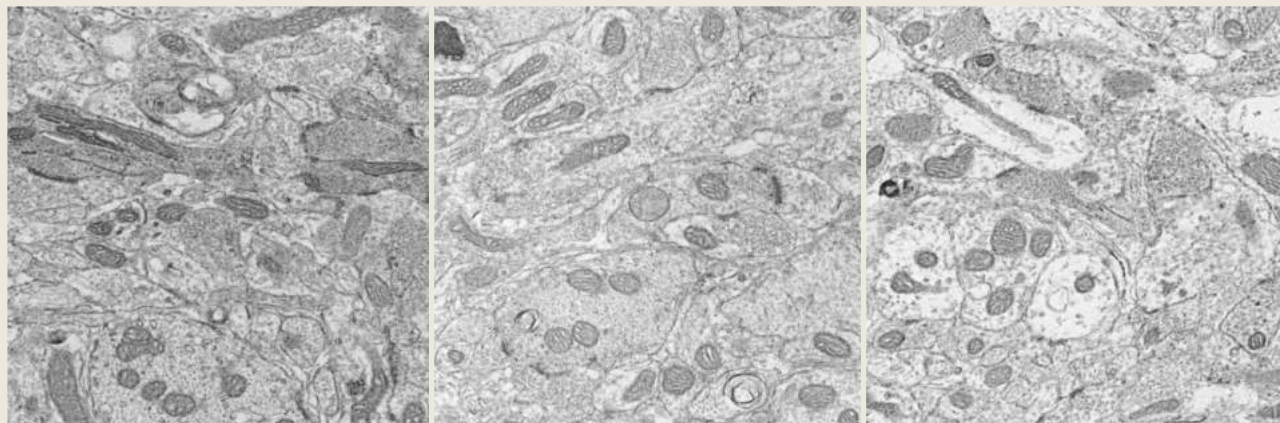
**Sensible à la topo (marques  
de scan, plis de résine...)**

## 6) Images de sections dans un MEB : Grand Champ

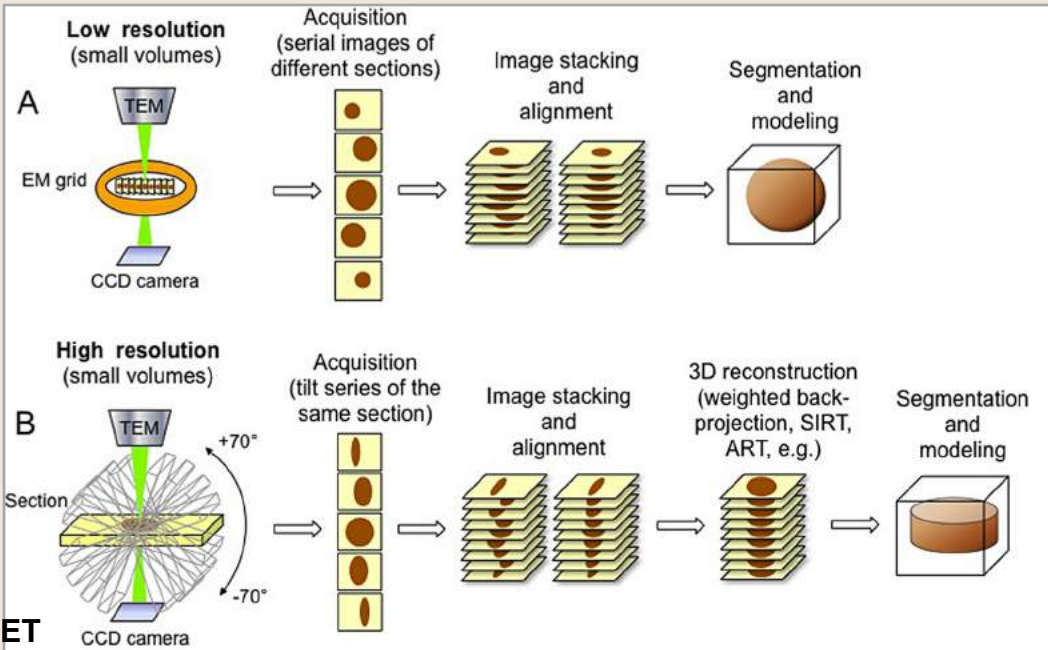


- FOV 487  $\mu$ m x 342  $\mu$ m
- 145 tuiles

- 1,2 Gpix, 12 nm/pix
- Temps d'acquisition: 11h



# 7) Piles d'images pour la 3D en ME



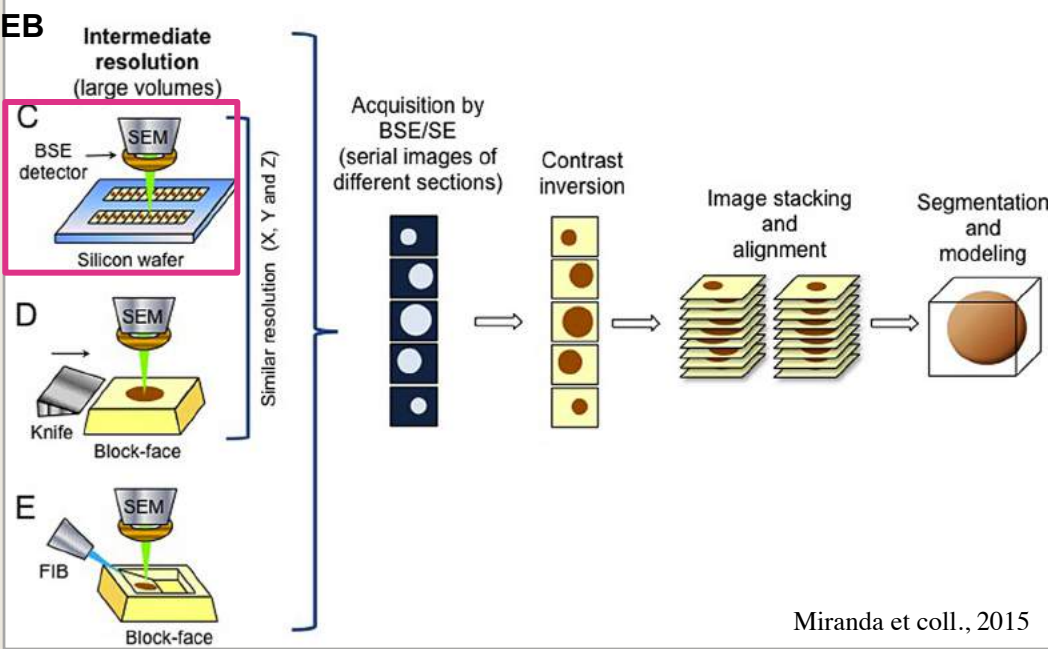
Réalisable avec un MET classique

« A la main »

Meilleures résolutions x,y,z  
 Résolution isotrope

Petit volumes

MET



Coupes contrastables et réutilisables  
 FOV

Récupération des rubans

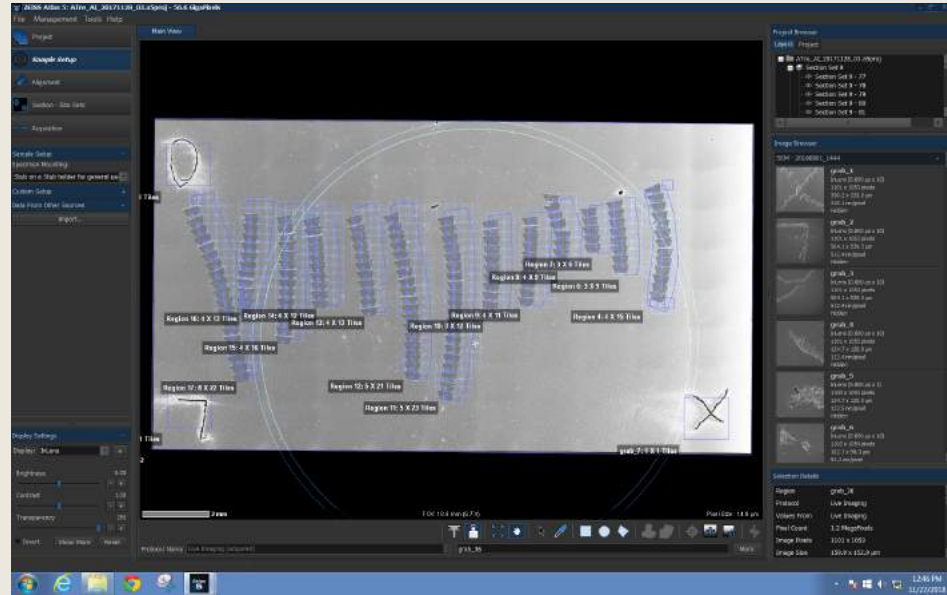
Coupes automatisées  
 FOV

Forcer le contraste en bloc  
 Coupes perdues

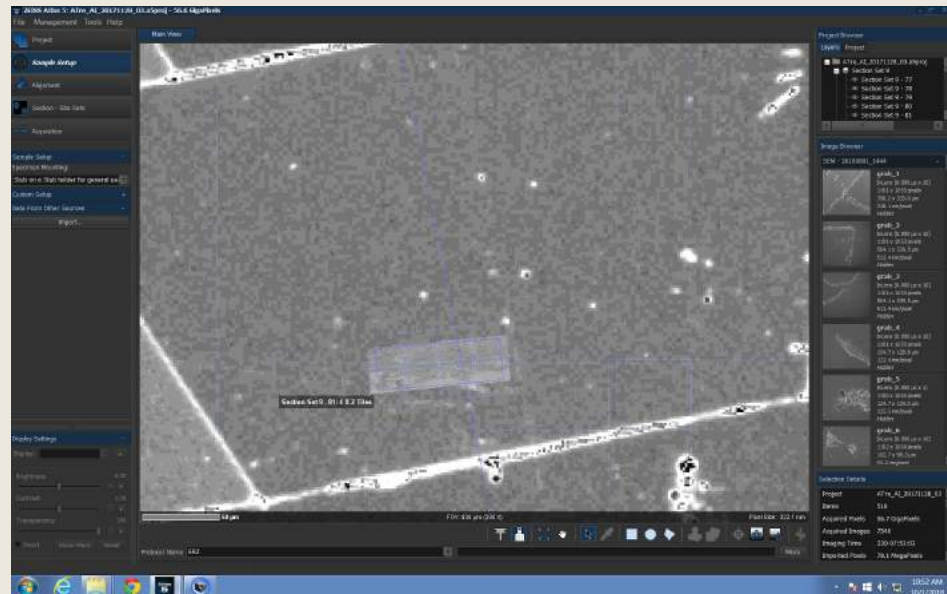
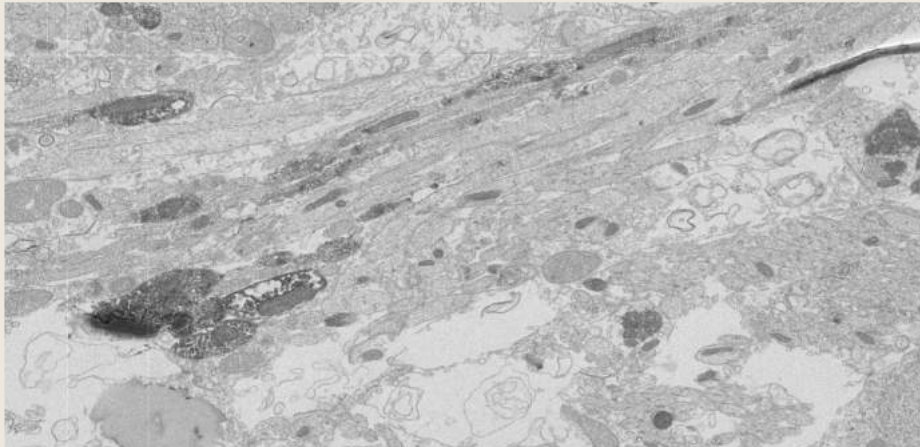
Coupes automatisées  
 Résolution en z

Forcer le contraste en bloc  
 Coupes perdues

# 7) Piles d'images pour la 3D en ME : Array Tomography



- FOV 96  $\mu\text{m}$  x 38  $\mu\text{m}$
- 150 sections
- 8 tuiles / section
- Temps d'acquisition: 12j



## 7) Piles d'images pour la 3D en ME : Array Tomography

