



Cryométhodes en microscopie électronique pour la biologie

Michaël Trichet

Service de Microscopie Electronique

Institut de Biologie Paris-Seine



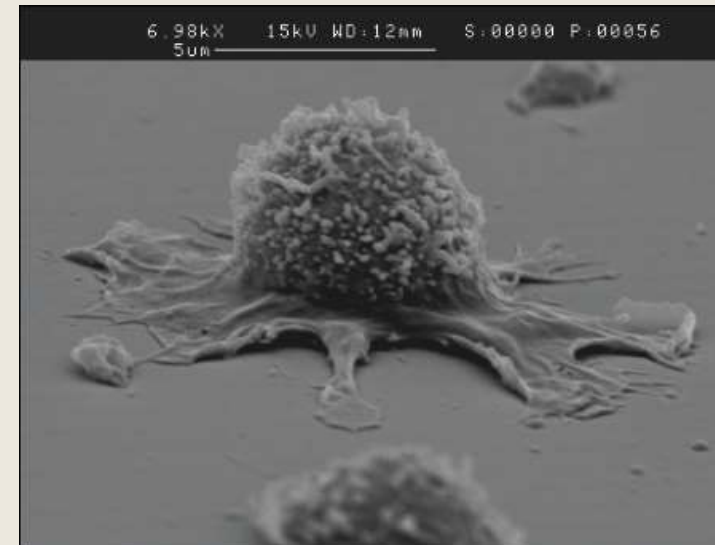
1) L'échantillon biologique

Propriétés:

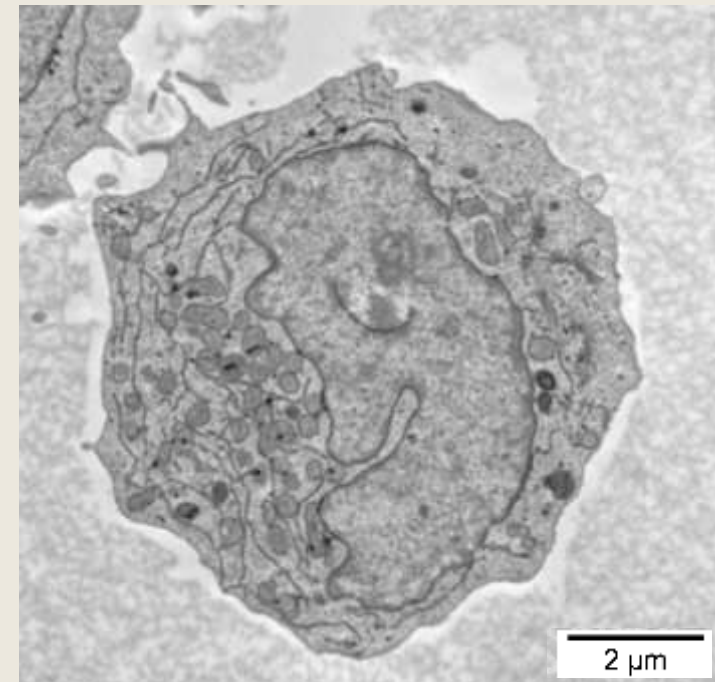
- Hydraté
- Peu dense aux électrons
- Non conducteur
- de Taille variable
- Libre
- Sensible : osmolarité, pH, température, ions, rayonnements, contraintes mécaniques
-

Dans le ME:

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



V. Bazin



M. Trichet

Préparation d'échantillons quasi 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

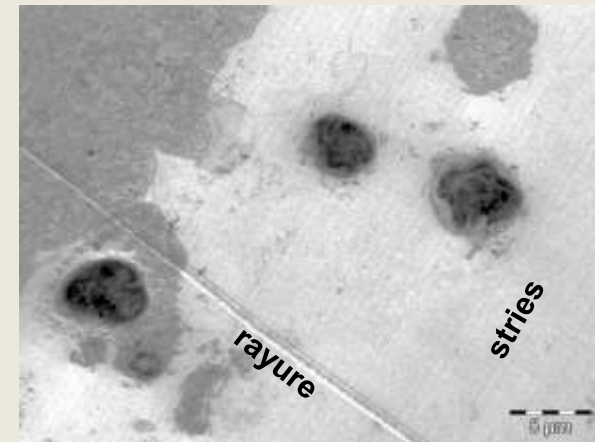
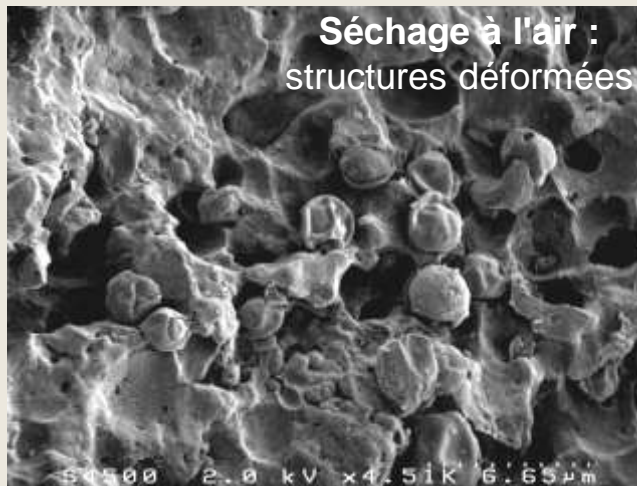
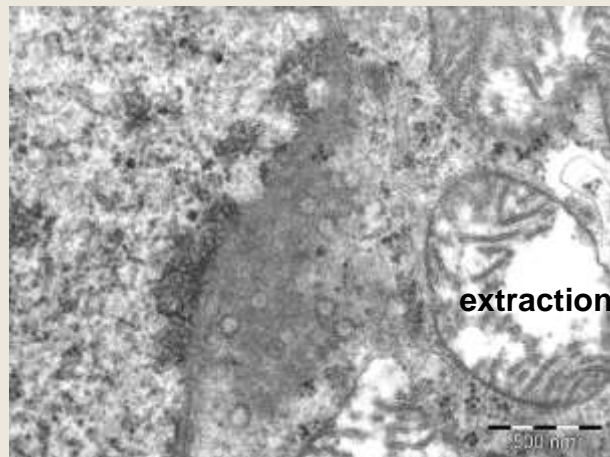
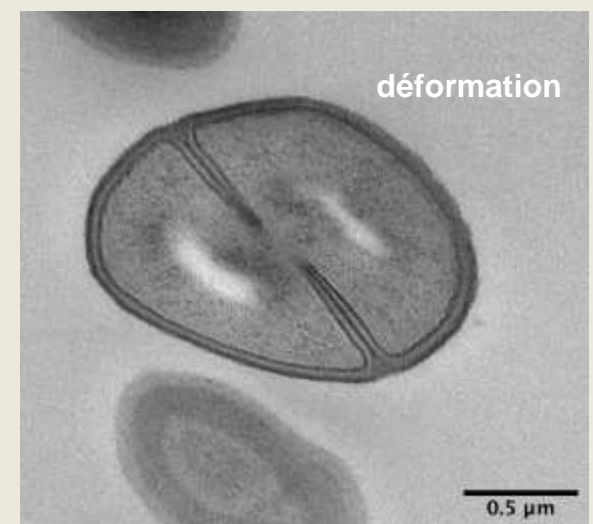
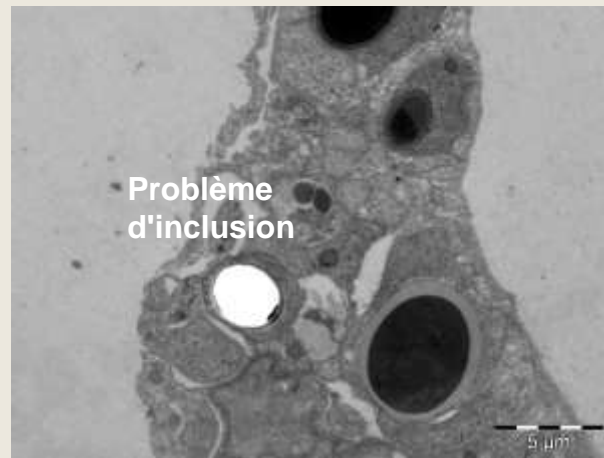
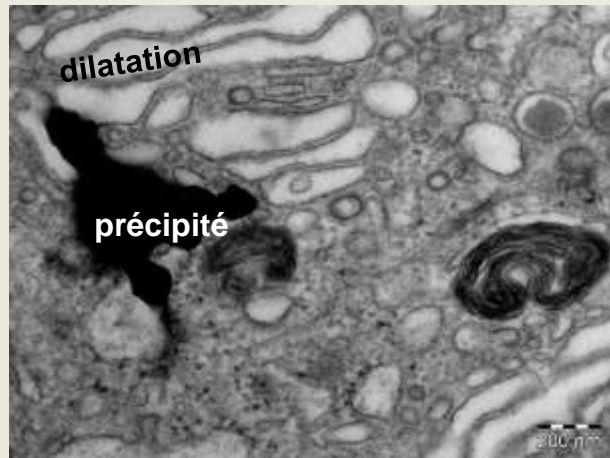
Inclusion
Résines époxy ou acryliques

Ultramicrotomie

Contraste
Pb, U, Lanthanes



1) ME conventionnelle : exemples d'artefacts



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

Comment diminuer artefacts ?

Supprimer des étapes
Les rendre moins "nocives"

CRYOMETHODES

Préparation MET

Fixation chimique
aldéhydes

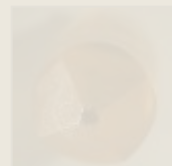
Post-fixation
tétroxyde d'osmium

Déshydratation
éthanol / acétone

Inclusion
Résines époxy ou acryliques

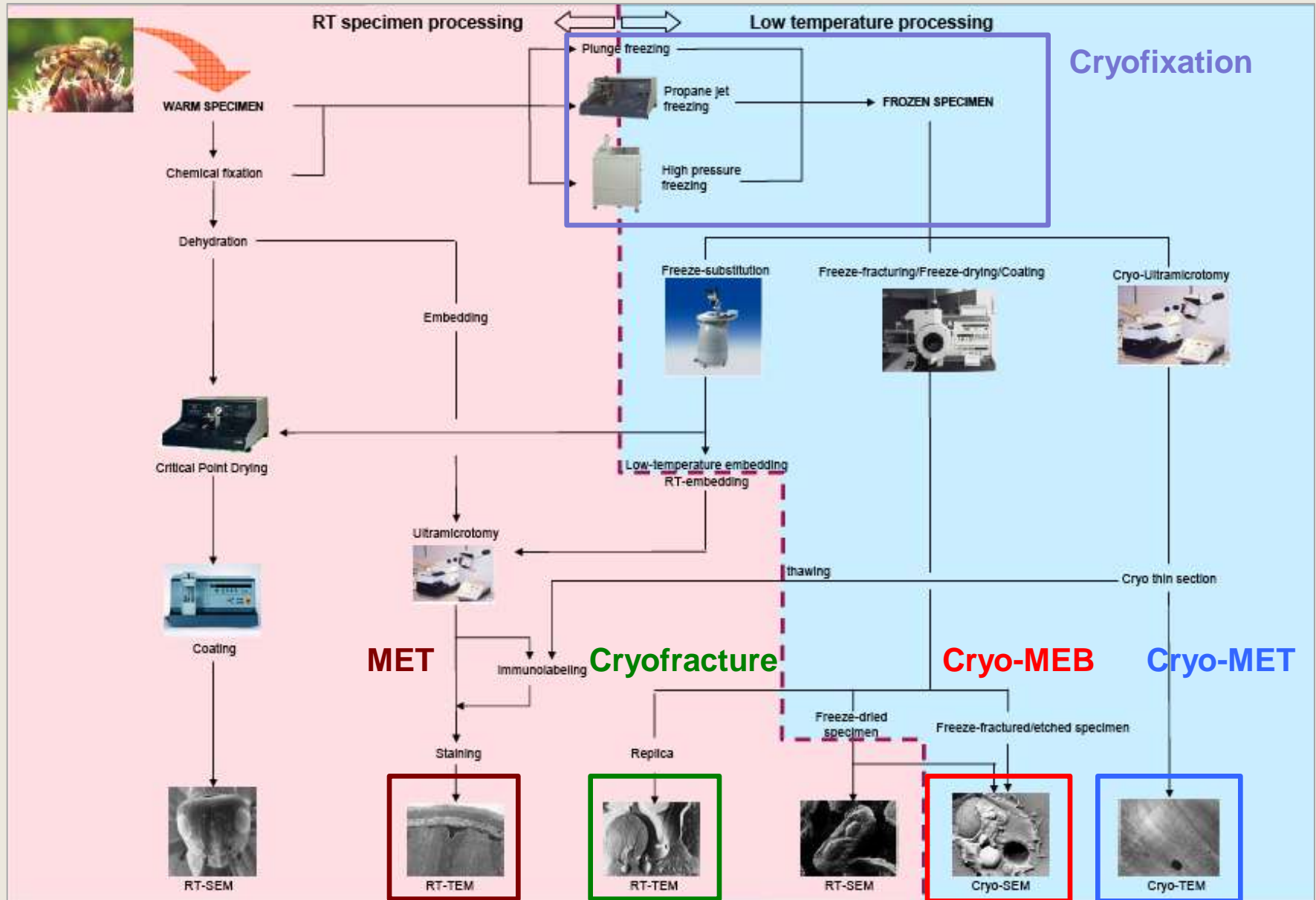
Ultramicrotomie

Contraste
Pb, U, Lanthanes



2) La cryo en microscopie électronique

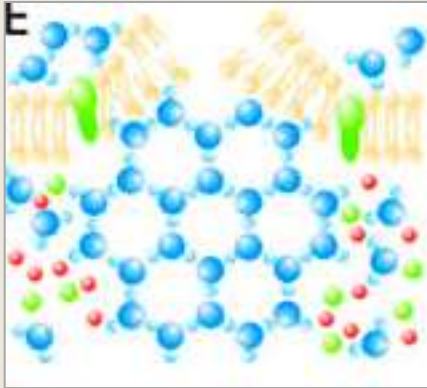
Comment observer des échantillons massifs préparés à minima ?



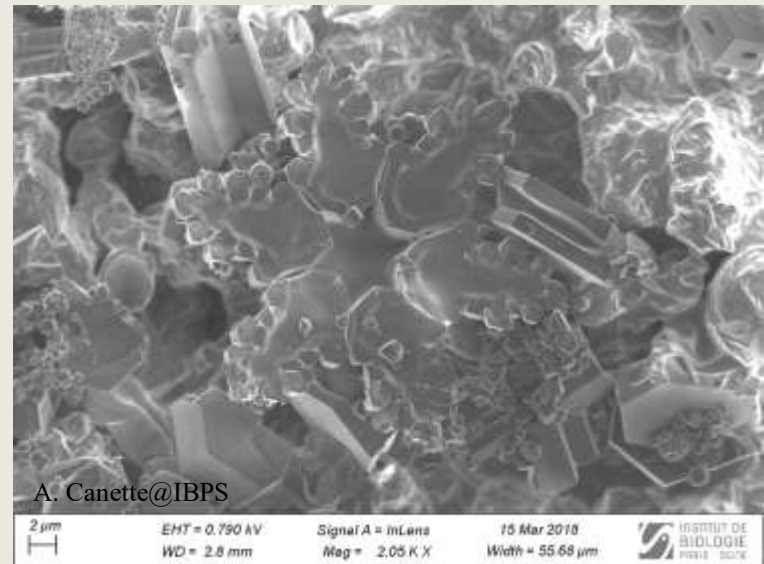
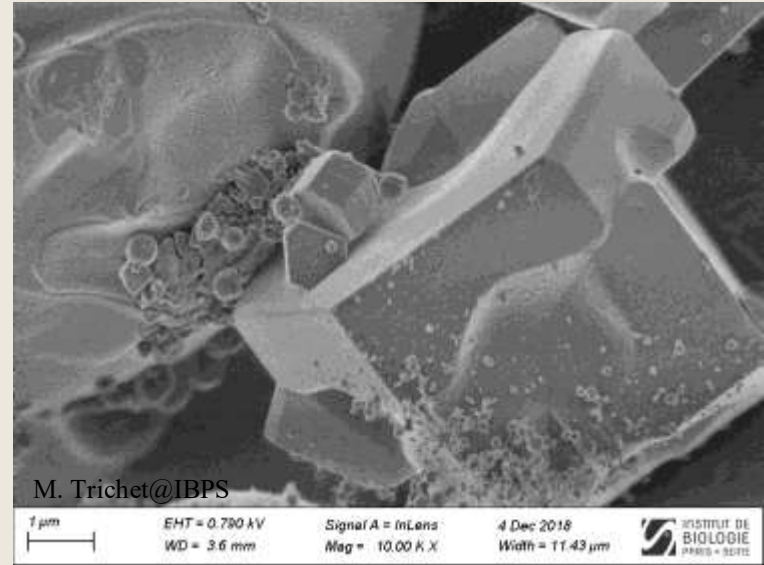
2) Cryofixation

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

Glace hexagonale



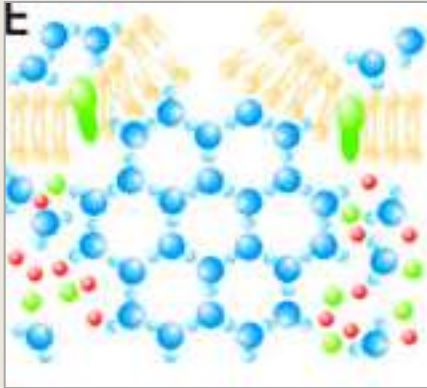
Han et coll., 2012



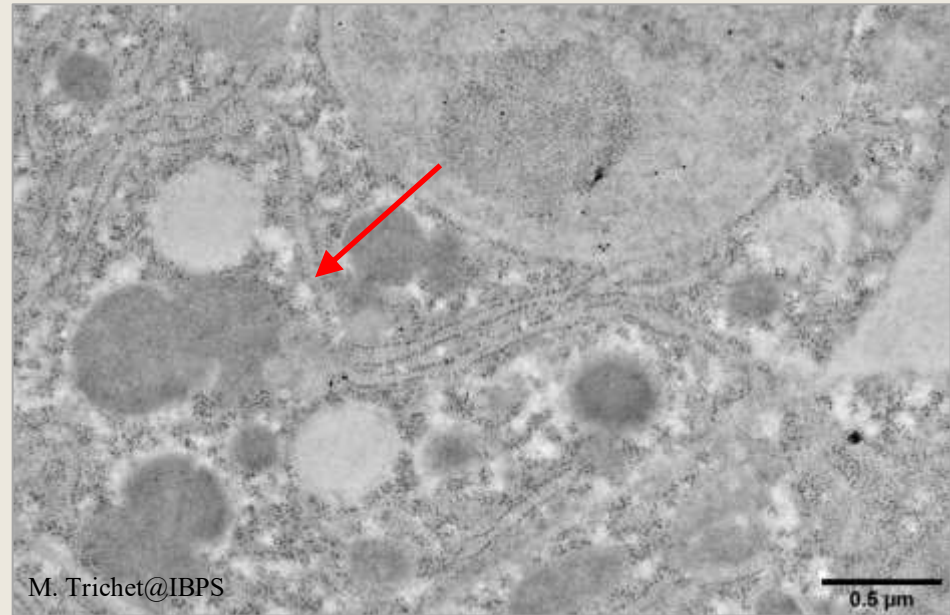
2) Cryofixation

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

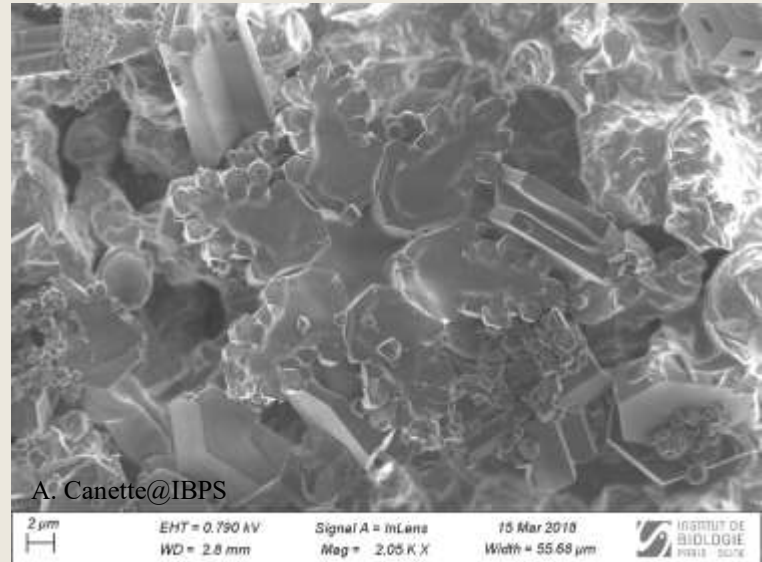
Glace hexagonale



Han et coll., 2012



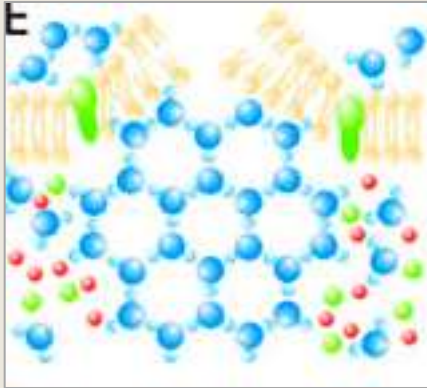
M. Trichet@IBPS



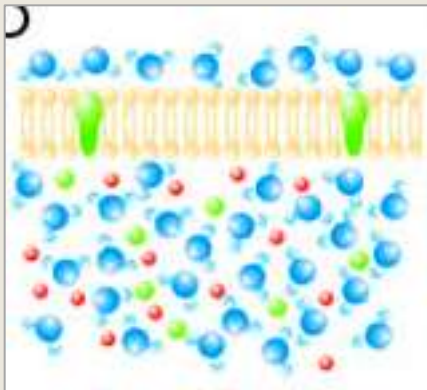
2) Cryofixation

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

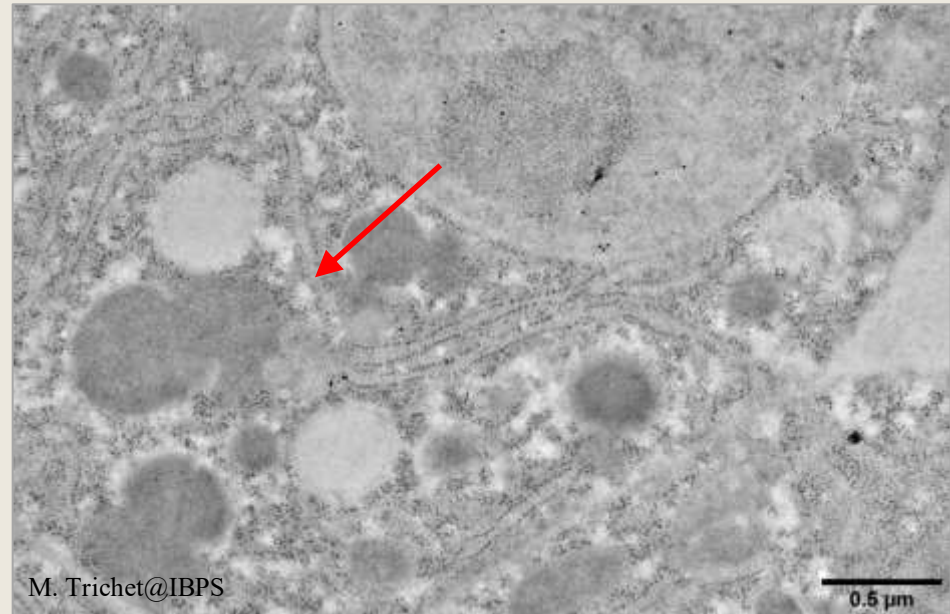
Glace hexagonale



Eau vitreuse amorphe



Han et coll., 2012



Congélation et préservation structures :

Vitrification : "congélation" sans formation de cristaux

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

2) Cryofixation

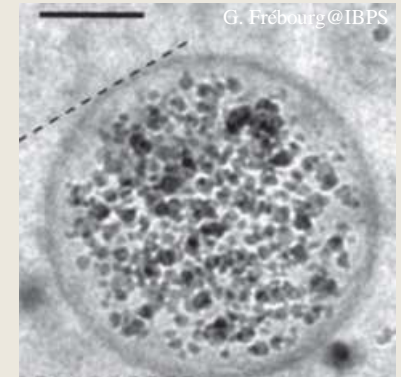
Plonge dans l'azote pâteux

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



Plonge dans l'éthane liquide

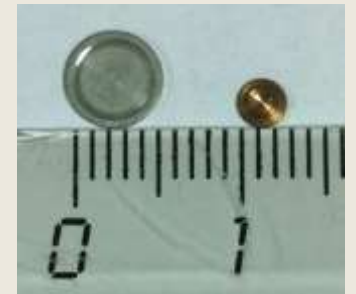
- Congélation ++
- Echantillons de composition varié
- Echantillons biologiques de tailles restreintes (< 200 nm)



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

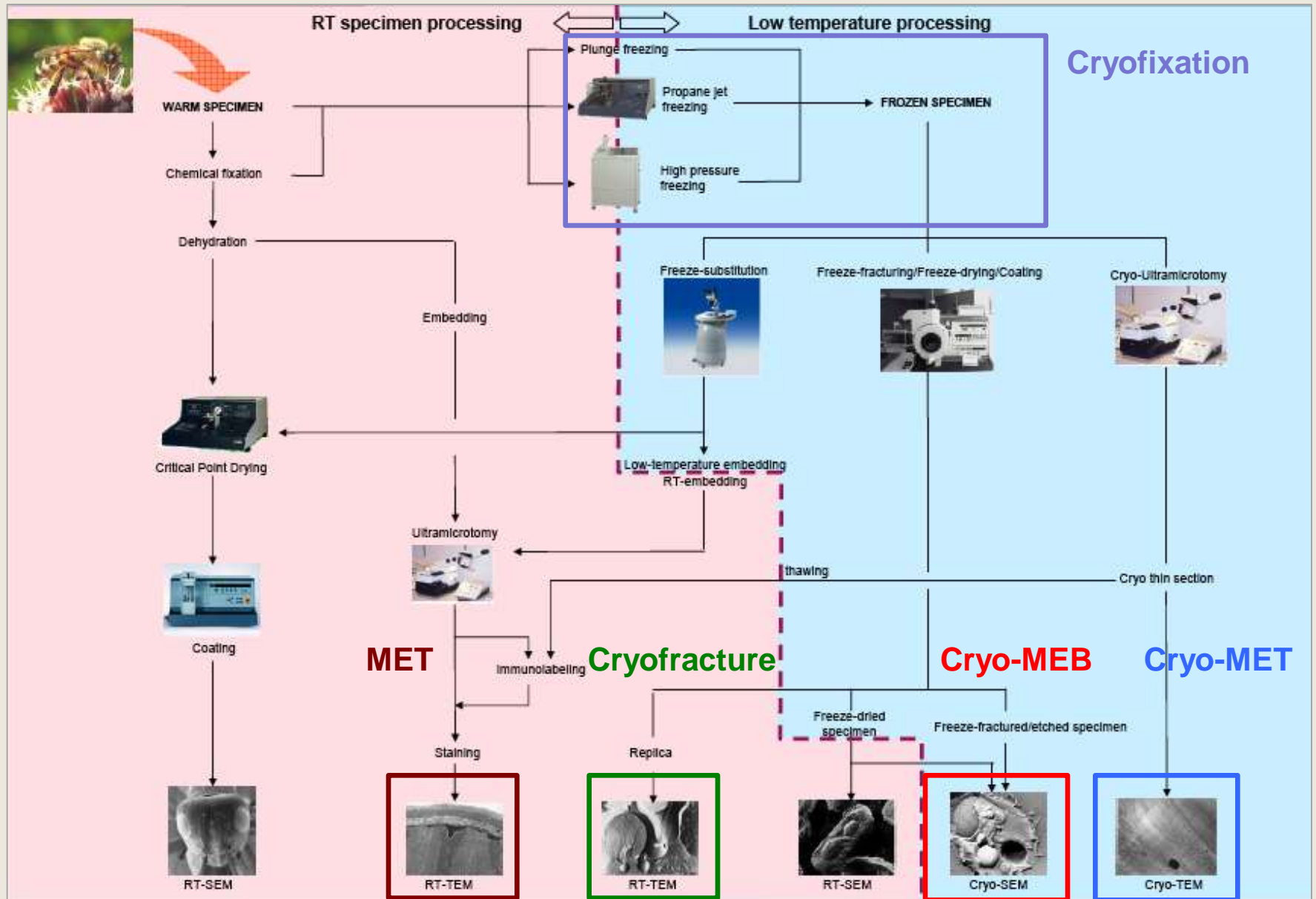
La cryo-fixation haute-pression

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



2) La cryo en microscopie électronique

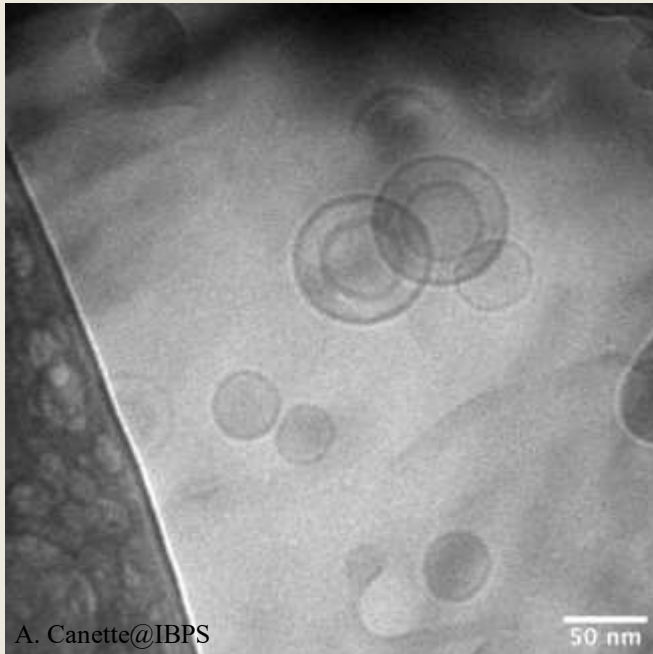
Comment observer des échantillons massifs préparés à minima ?



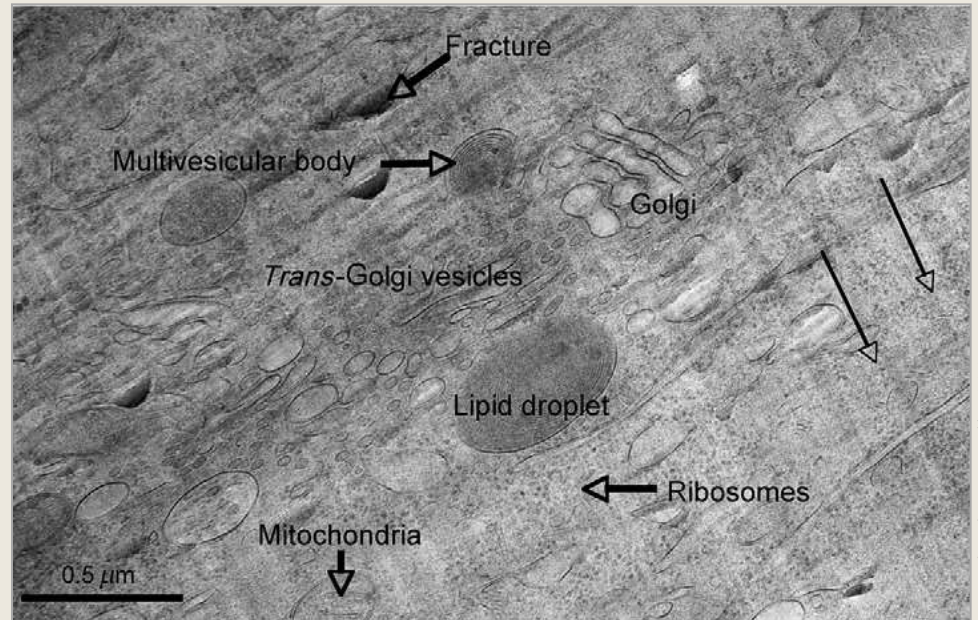
2) La cryo-MET



Liposomes en cryo-MET



Cellule en CEMOVIS (cryo-ultramicrotomie)



2) La cryo-MET

Points (-) de la cryo-MET :

- Echantillons < 300 nm épaisseur
- Sensible dommages irradiation
- Sensible à la contamination
- Faible contraste

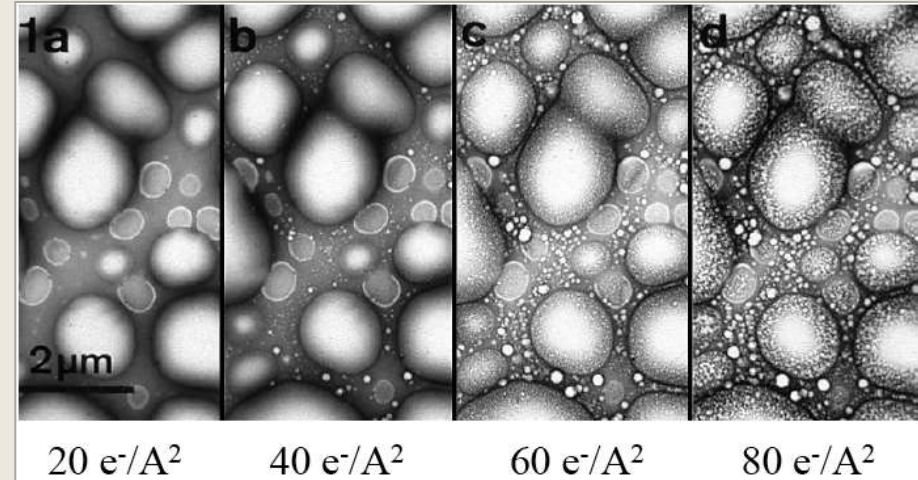
Points (+) de la cryo-MET :

- Ø Traitements
- Rapide
- Observation directe de l'échantillon

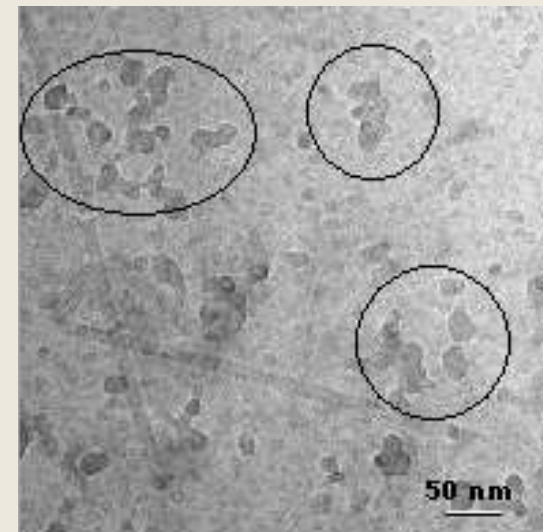
Echantillon dans son état natif

Méthode de choix pour étude ultrastructurale

Effet des dommages d'irradiation sur de la glace vitreuse



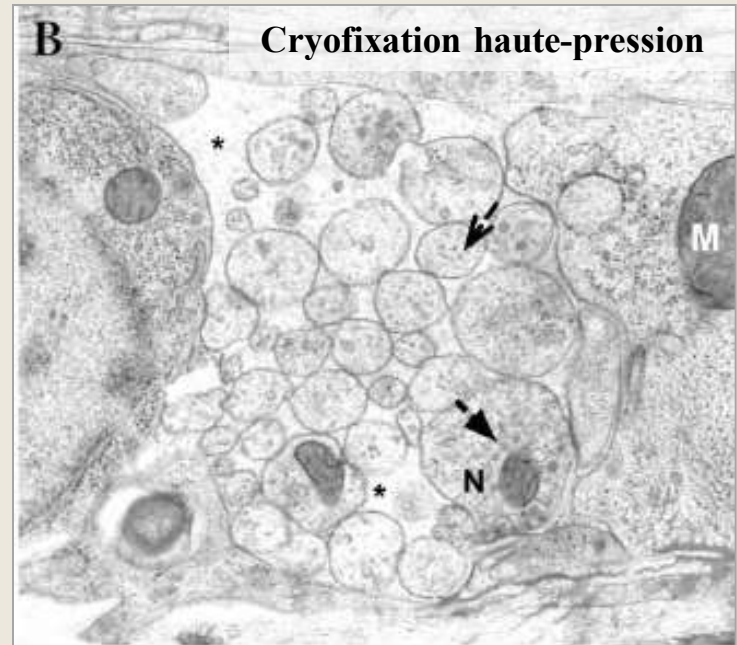
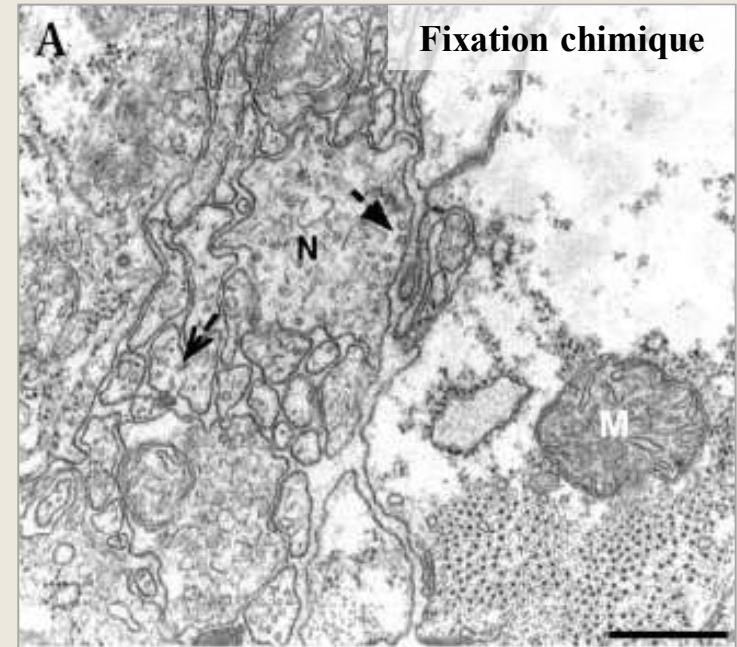
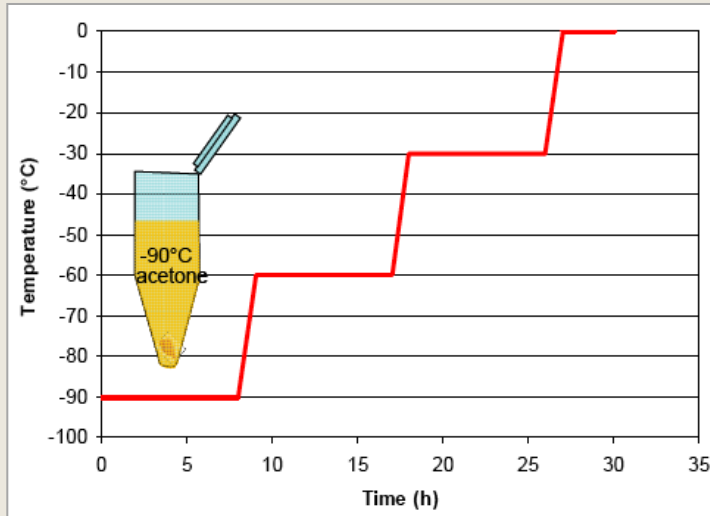
Dépôt d'eau à la surface de la glace vitreuse



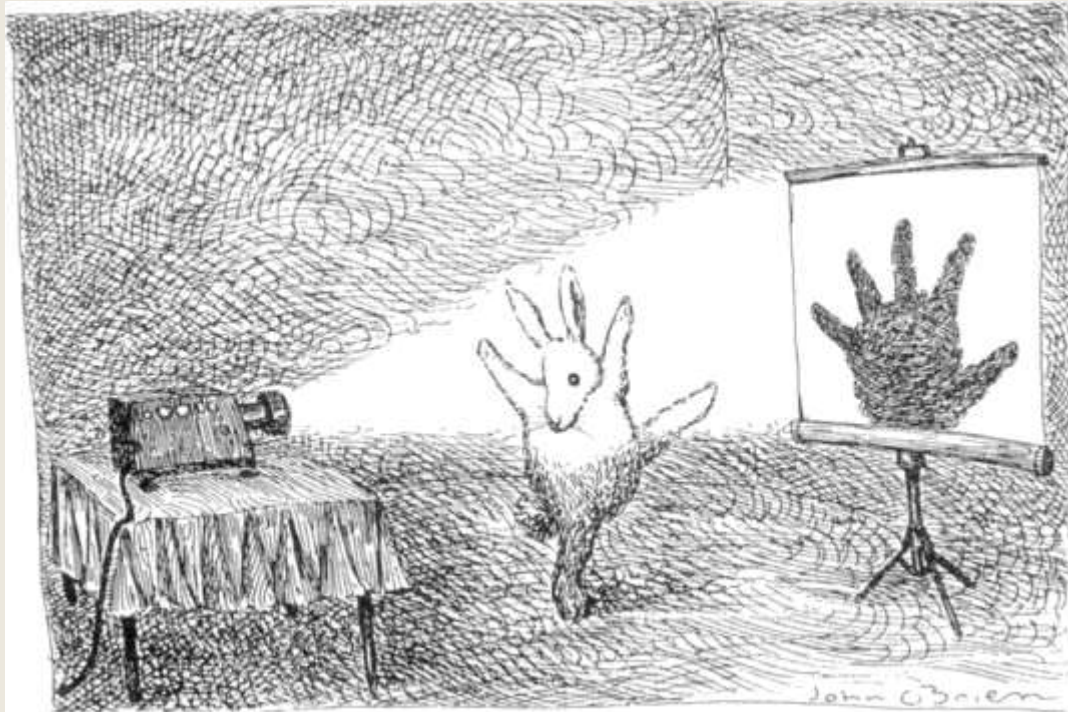
3) La cryosubstitution (CS)

Peut-on inclure en résine après cryofixation ?

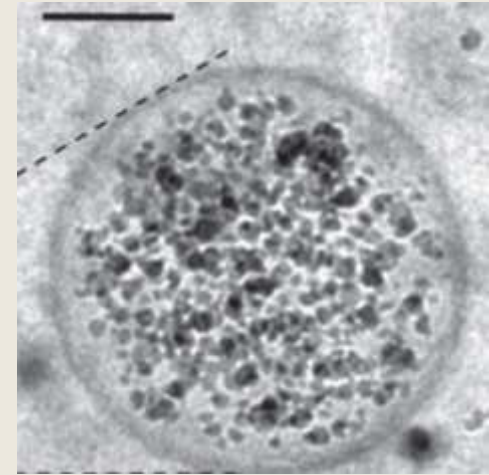
Montée en température progressive :



4) L'intérêt de la topologie en ME

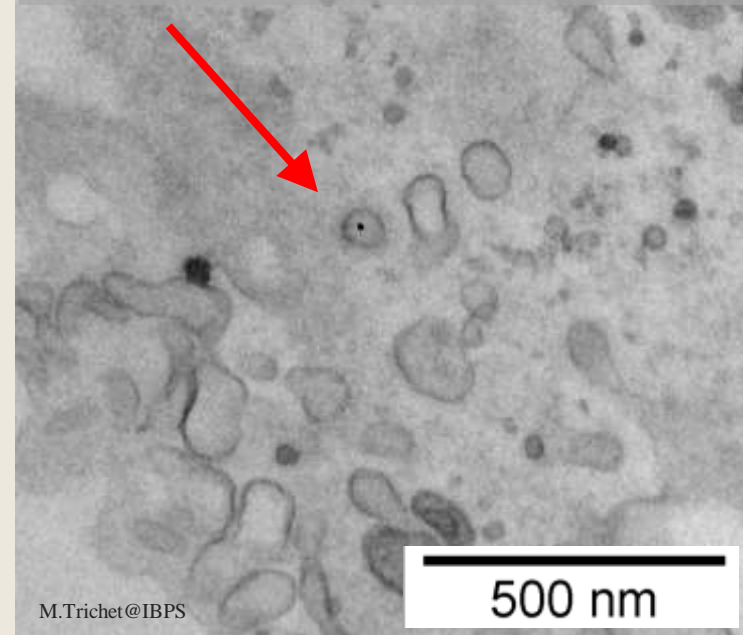


Micrographes en MET :
projections 2D de structures 3D



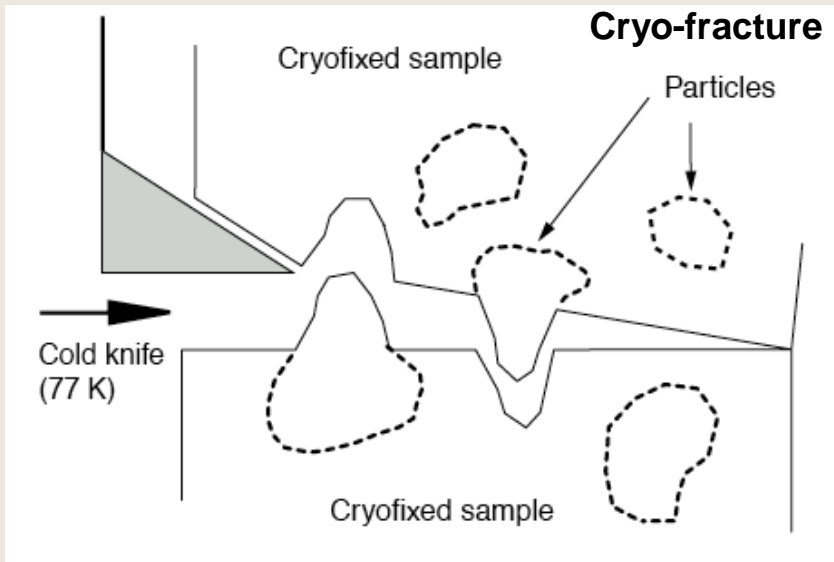
Marie and al., 2015, Adv. Funct. Mater.

Vésicule ou tubule sectionné ?



M.Trichet@IBPS

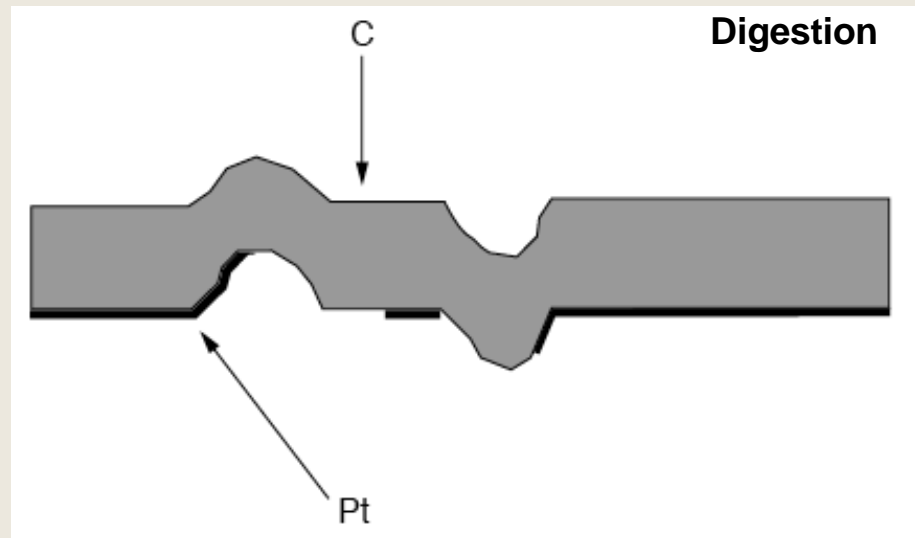
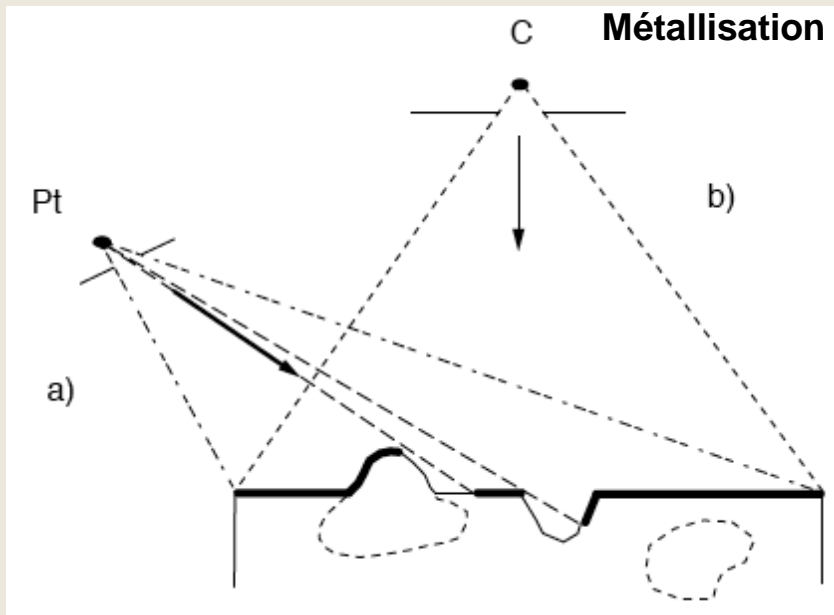
4) Topologie en cryo-ME : la cryofracture



Principe :

- casser un échantillon durci par congélation
- observation en MET

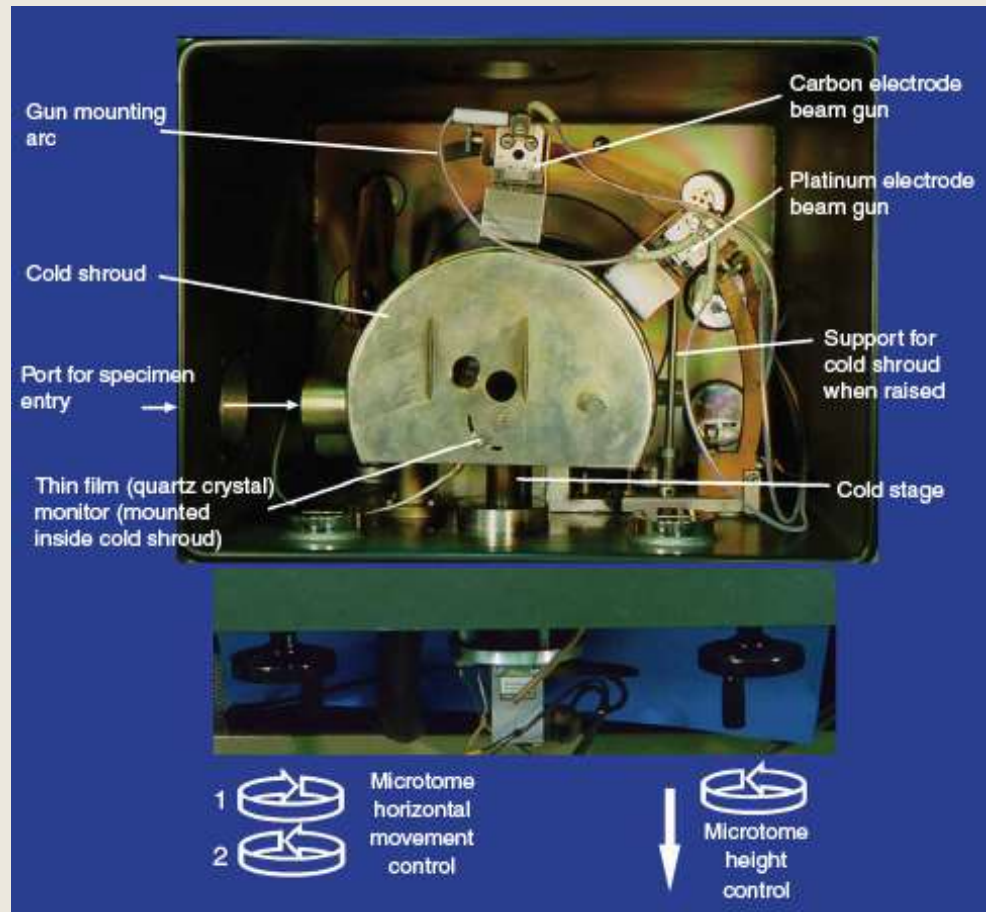
- Cryofixation
- Transfert dans appareil de cryofracture
- Cryofracture (-150°C)
- Métallisation de la surface (Pt + C)
- Digestion échantillon
- Observation de la réplique en MET



4) 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

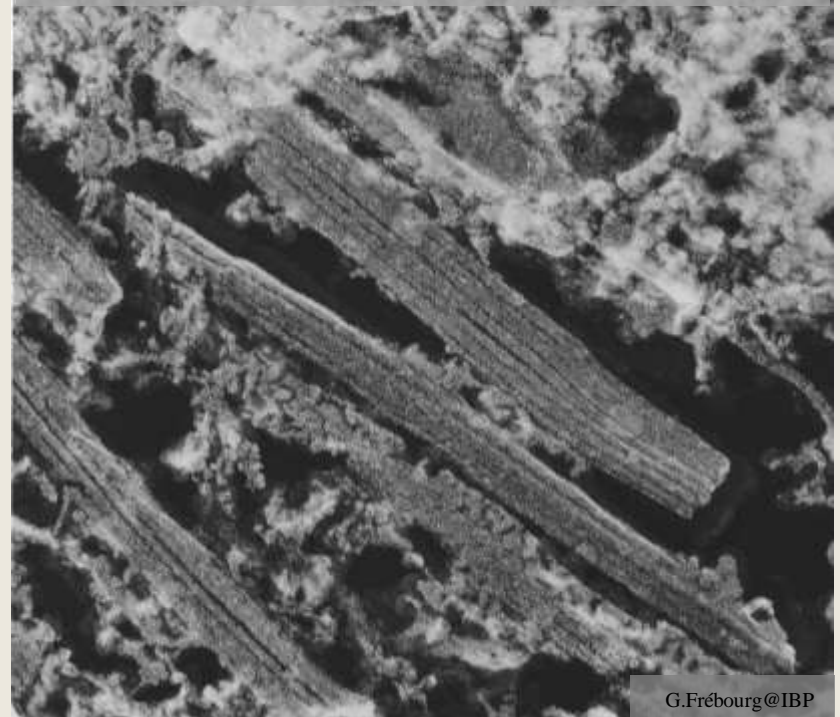
Chitine de *Riftia pachyptila*



G.Frébourg@IBP

S

Chitine de *Riftia pachyptila*



G.Frébourg@IBP

S

5) Topologie en cryo-ME : le cryo-MEB

La cryofracture :

Avantages :

- échantillon dans son état natif
- structure de l'échantillon en 3-D
- résolution MEB vs MET

Inconvénients :

- digestion (temps + "recette à adapter")
- champs d'observation réduits

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

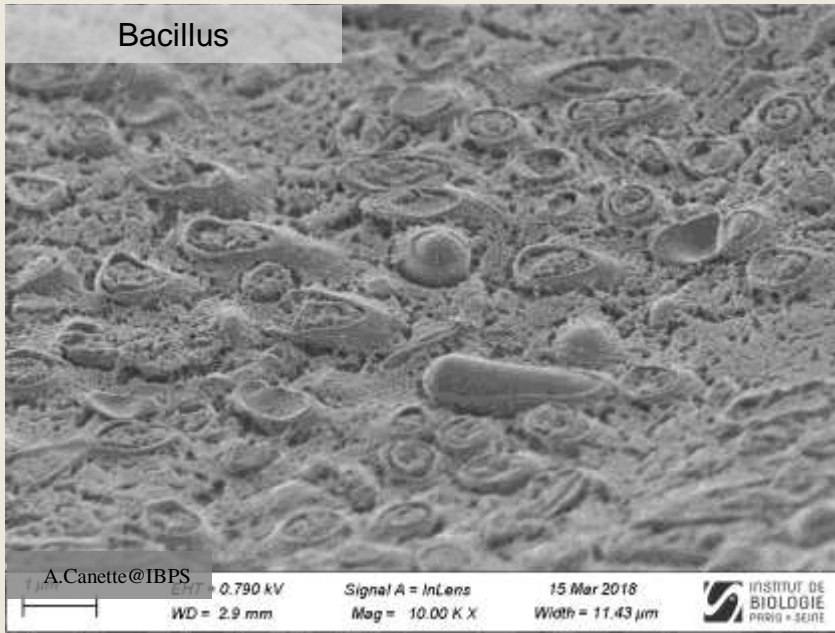
Inconvénients :

- résolution MEB vs MET
- finesse du dépôt métallique

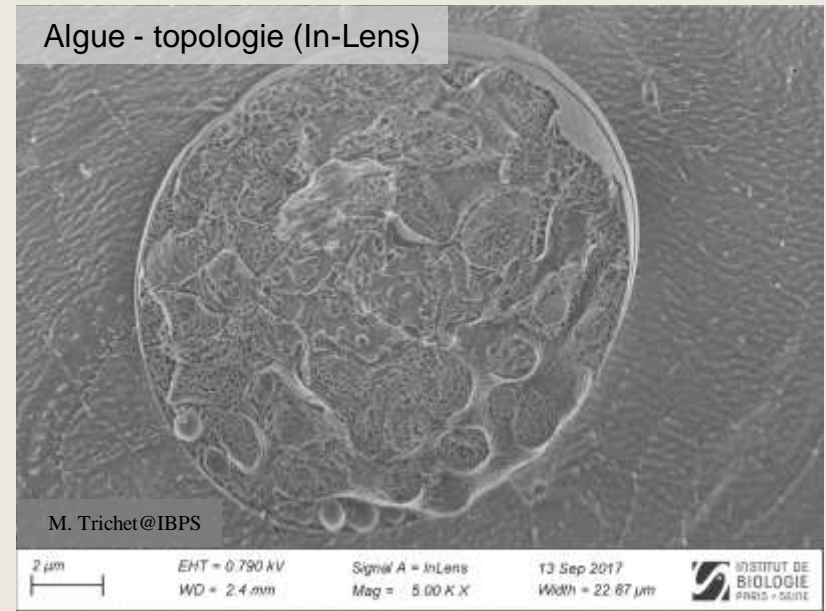


5) Topologie en cryo-ME : le cryo-MEB

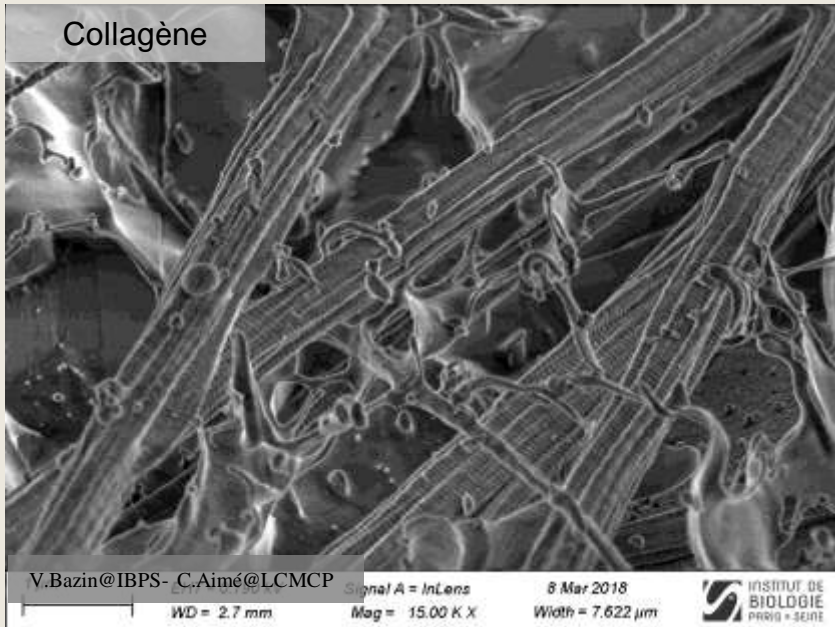
Bacillus



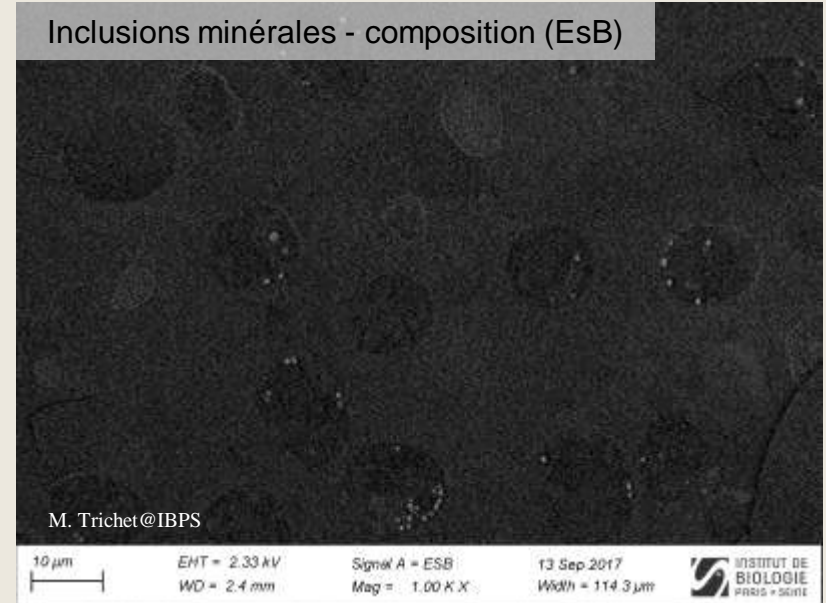
Algue - topologie (In-Lens)



Collagène

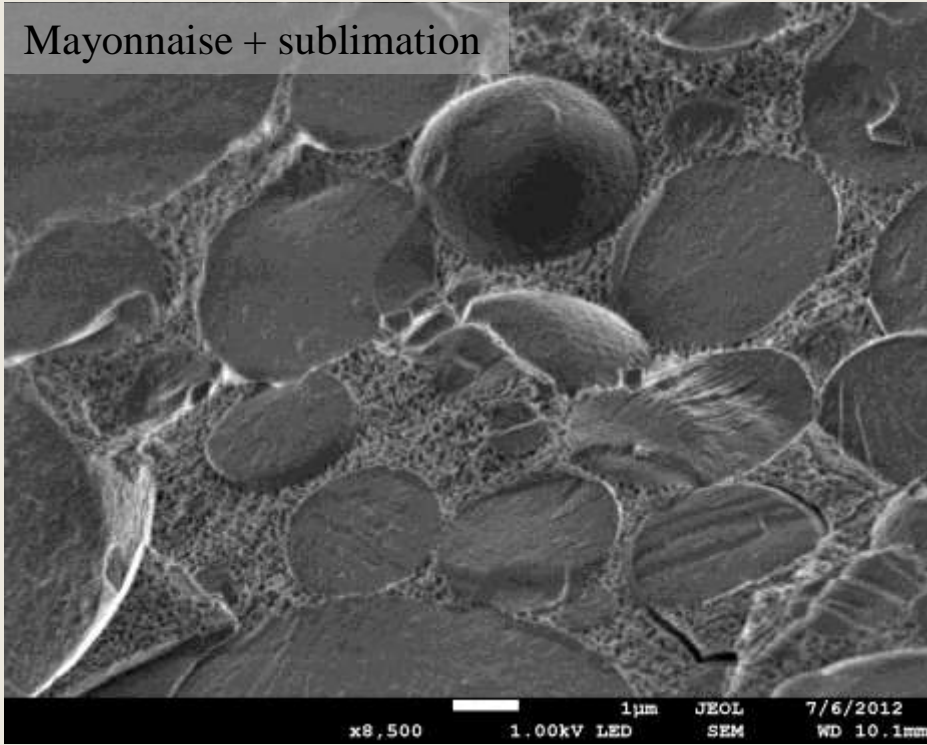


Inclusions minérales - composition (EsB)

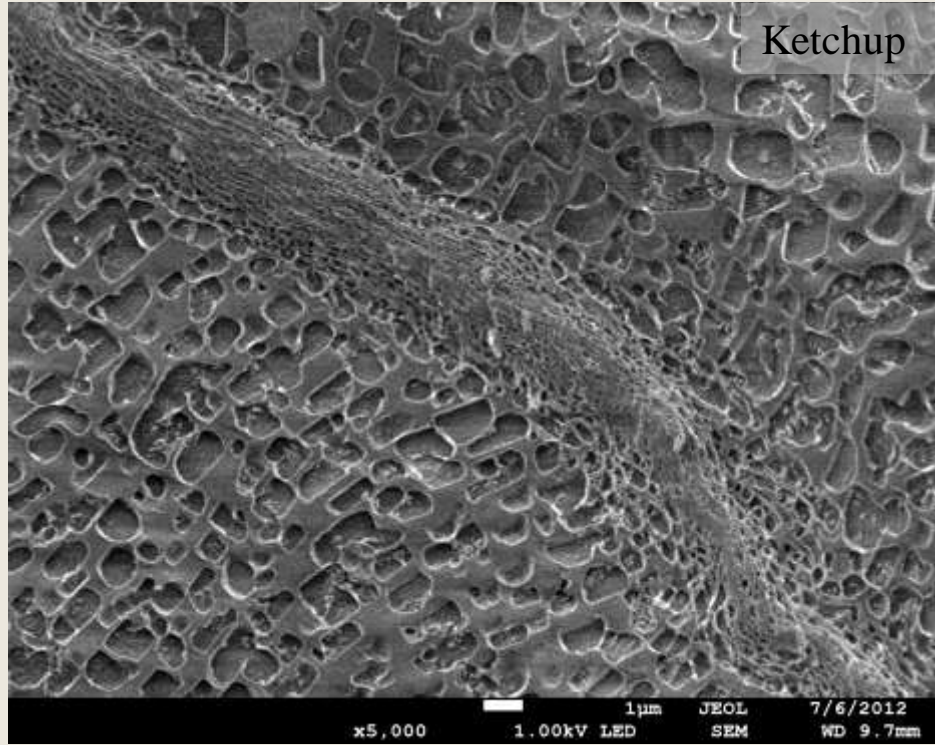


3) Introduction au cryo-MEB

Mayonnaise + sublimation



Ketchup



IBPS, le Service de Microscopie Electronique



Alexis Canette
Virginie Bazin
Michaël TRICHET

