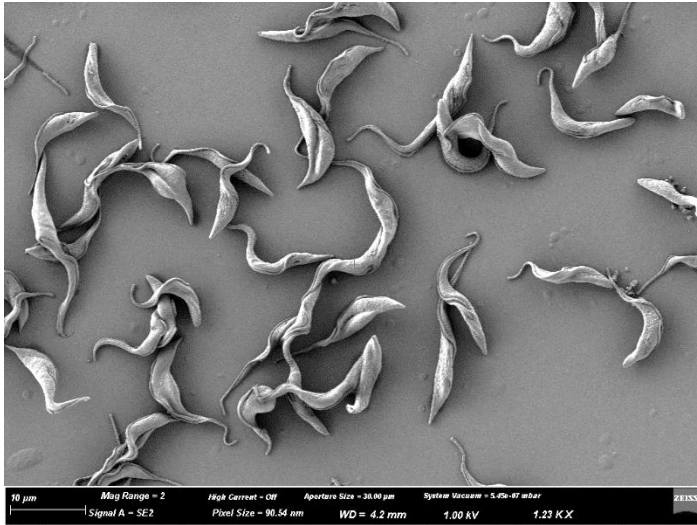


Imagerie 3D sur échantillons biologiques en résine époxy Ultramicrotomie en chambre

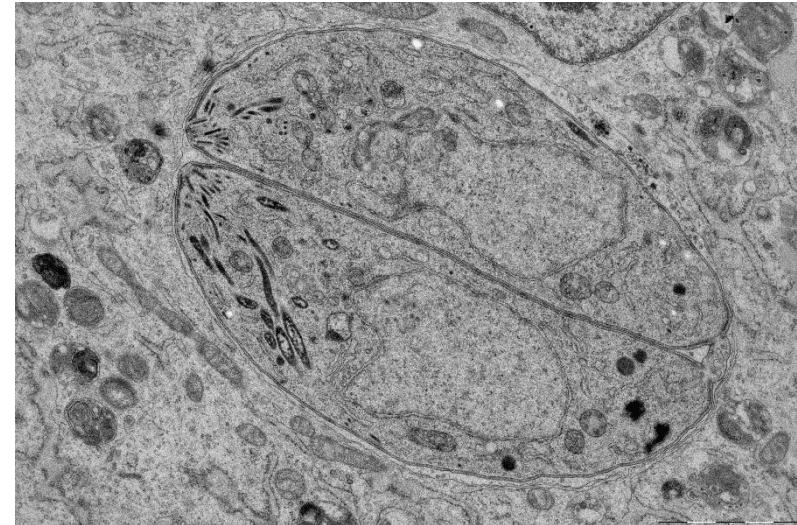
Journées du GN-MEBA 2025, Toulouse
Laurence Berry

MEB



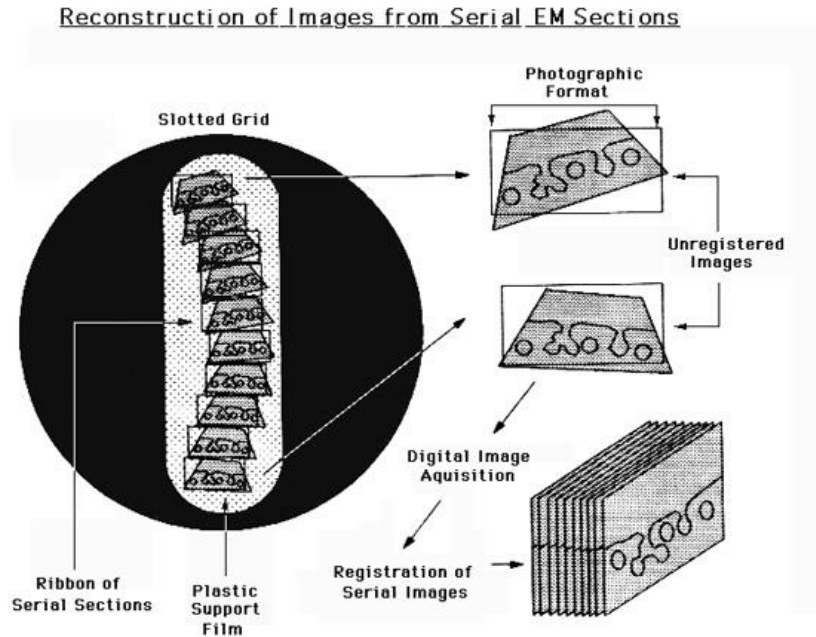
Imagerie Topographique

MET



Imagerie ultrastructurale

Serial sections imaging



Limité en volume

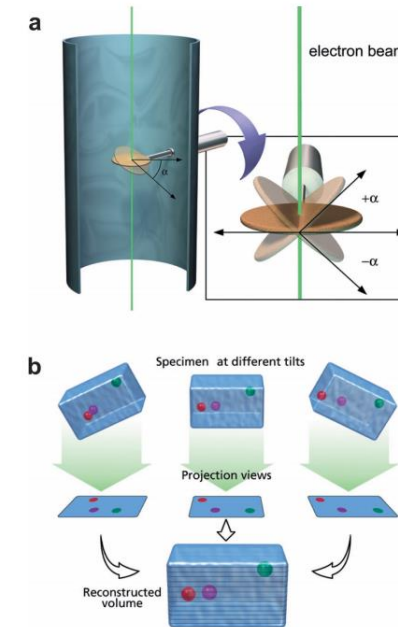
Très technique

Mauvaise résolution en Z

(très) Long

Pas cher !

Tomographie



Limité à quelques centaines de nm en Z

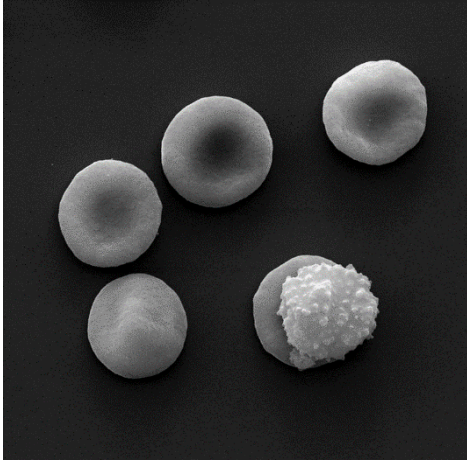
+ cher

Analyse d'image ++

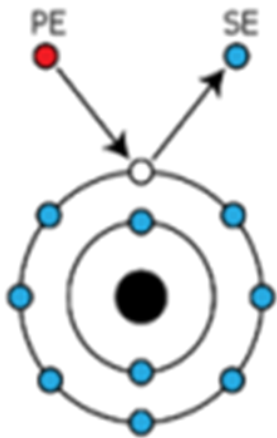
Meilleure résolution en x,y,z

La révolution MEB

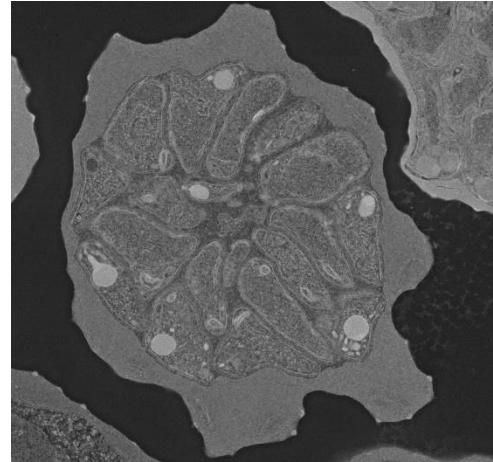
Electrons secondaires



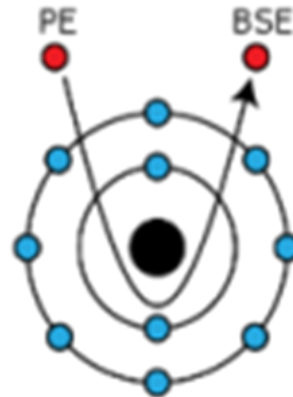
⇒ Information topographique



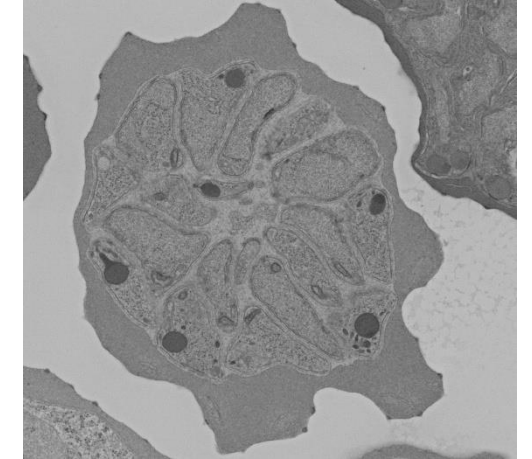
Electrons rétrodiffusés



⇒ Contraste chimique

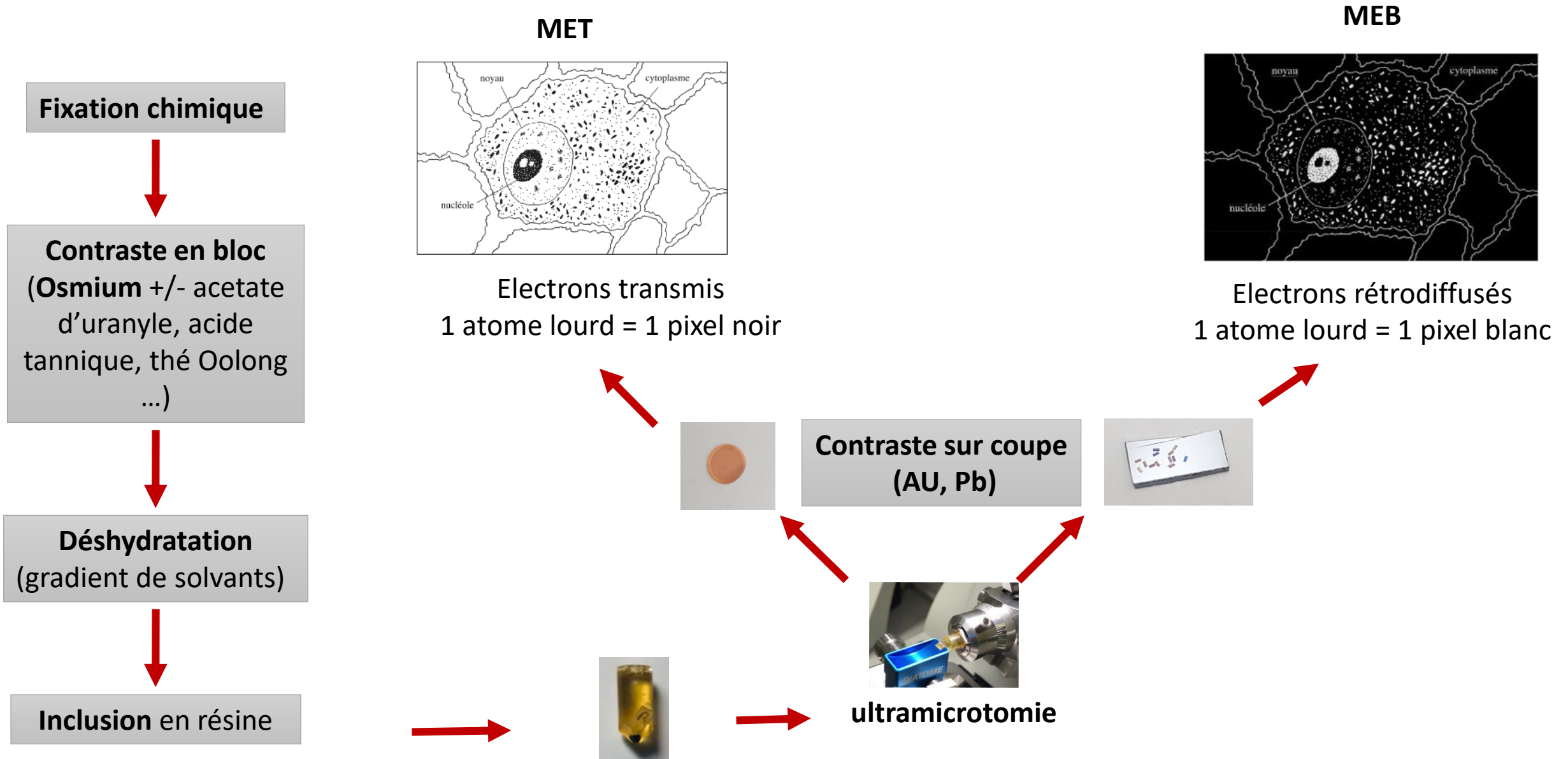


Inversion de contraste



⇒ Images "TEM-like"

Pourquoi ??

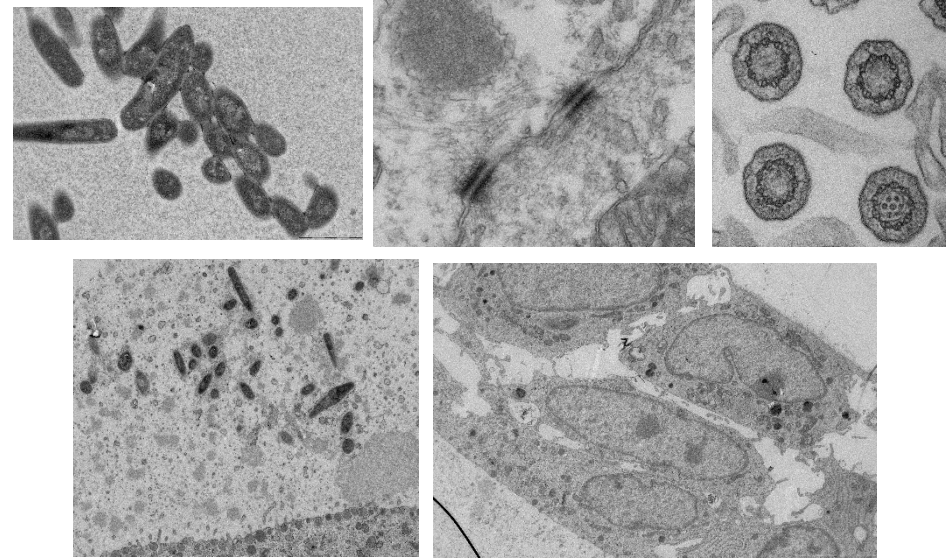


La révolution MEB

- ↳ Essentiellement basée sur la detection des électrons rétrodiffusés
- ↳ A tiré parti des methods développées pour le MET, basée sur l'impregnation en métaux lourds qui produit également un excellent signal en BBSE
- ↳ Le contraste obtenu est similaire au TEM, mais inversé
- ↳ L'optimisation des détecteurs BSE pour les basses tensions a permis de réduire la difference de resolution entre MET et MEB et d'augmenter la vitesse des acquisitions

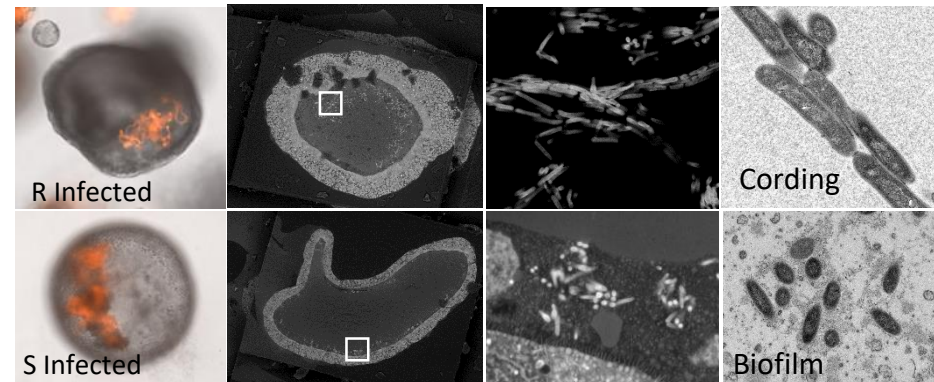
Ca change quoi ???

La gamme de grandissement
La taille de la surface imagée
=> Voir des grands objets biologiques en
entire et à très haute résolution



MEB - BSE

MET



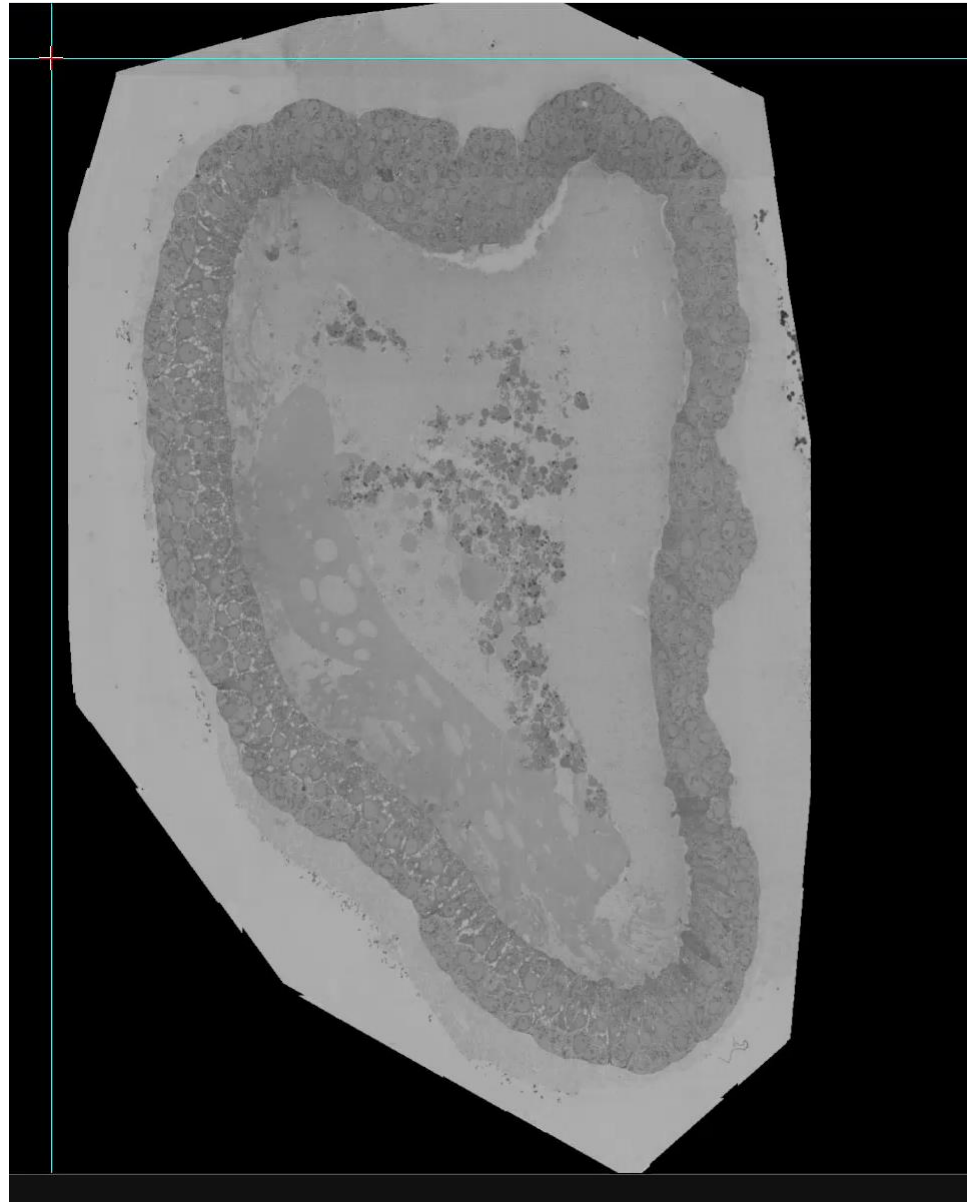
Acquisition automatisable

Information & Channels >>

Information
REGION 12

Sense BSD

DETECTOR	Sense BSD
ORIGINAL PIXEL COUNT	9,1 GigaPixels
EXPORTED PIXEL COUNT	9,4 GigaPixels
ORIGINAL MOSAIC PIXELS	81920 x 122880
EXPORTED MOSAIC PIXELS	84529 x 126794
ORIGINAL PIXEL SIZE	5,00 nm
EXPORTED PIXEL SIZE	4,84 nm
MOSAIC SIZE	409,5 x 614,3 μ m
TILE PIXELS	10240 x 10240
TILE SIZE (FOV)	51,2 x 51,2 μ m
MOSAIC TILES	8 x 12
NUMBER OF IMAGES	96
IMAGING TIME	07:42:15
ACQUISITION DATE	28/06/2023 17:55:01
DWELL TIME	3,200 μ s
LINE AVERAGE	1
SCAN ROTATION	112,3 °
MACHINE	GeminiSEM 360- 8217010201
BEAM	SEM
APERTURE	[1] 30 μ m (1,5 kV)
WORKING DIST.	4,676 mm
STIGMATION	X = 2,6 %, Y = -2,1 %
STAGE X	-57919 μ m
STAGE Y	-59479 μ m
STAGE Z	48000 μ m
STAGE M	0 μ m
STAGE R	352,78 °
STAGE T	0,00 °



Nanotomy: imagerie
2D Grande surface
haute résolution

Grandes mosaïques
Recherche d'évènements rares
Vue d'ensemble
Ultra haute résolution

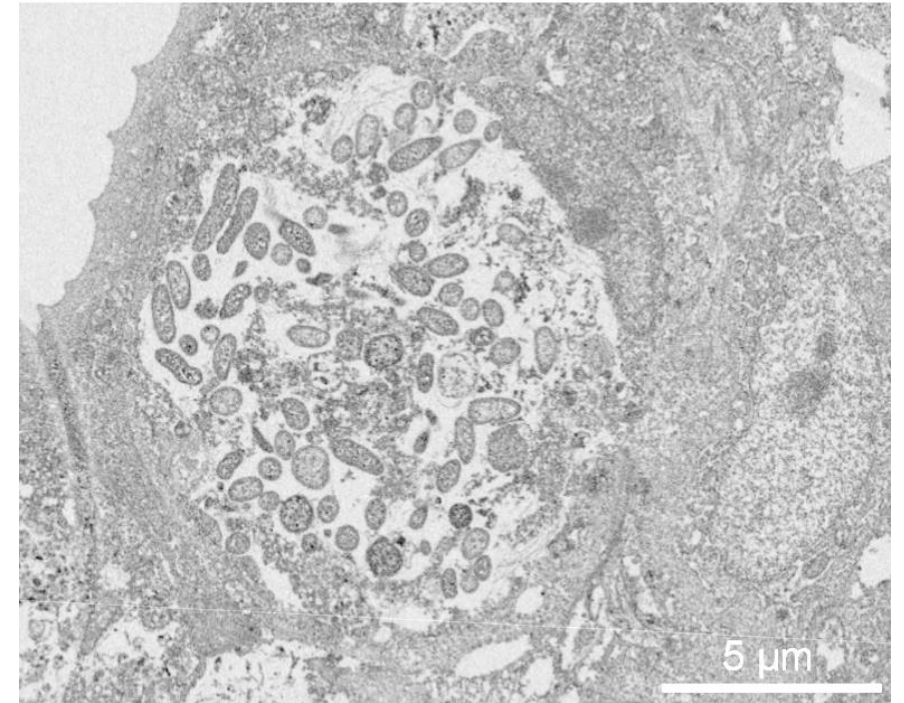
Pour chercher une aiguille dans une botte de foin !

Imagerie Multi-modale et multi-échelle

Image live confocal Spinning disk

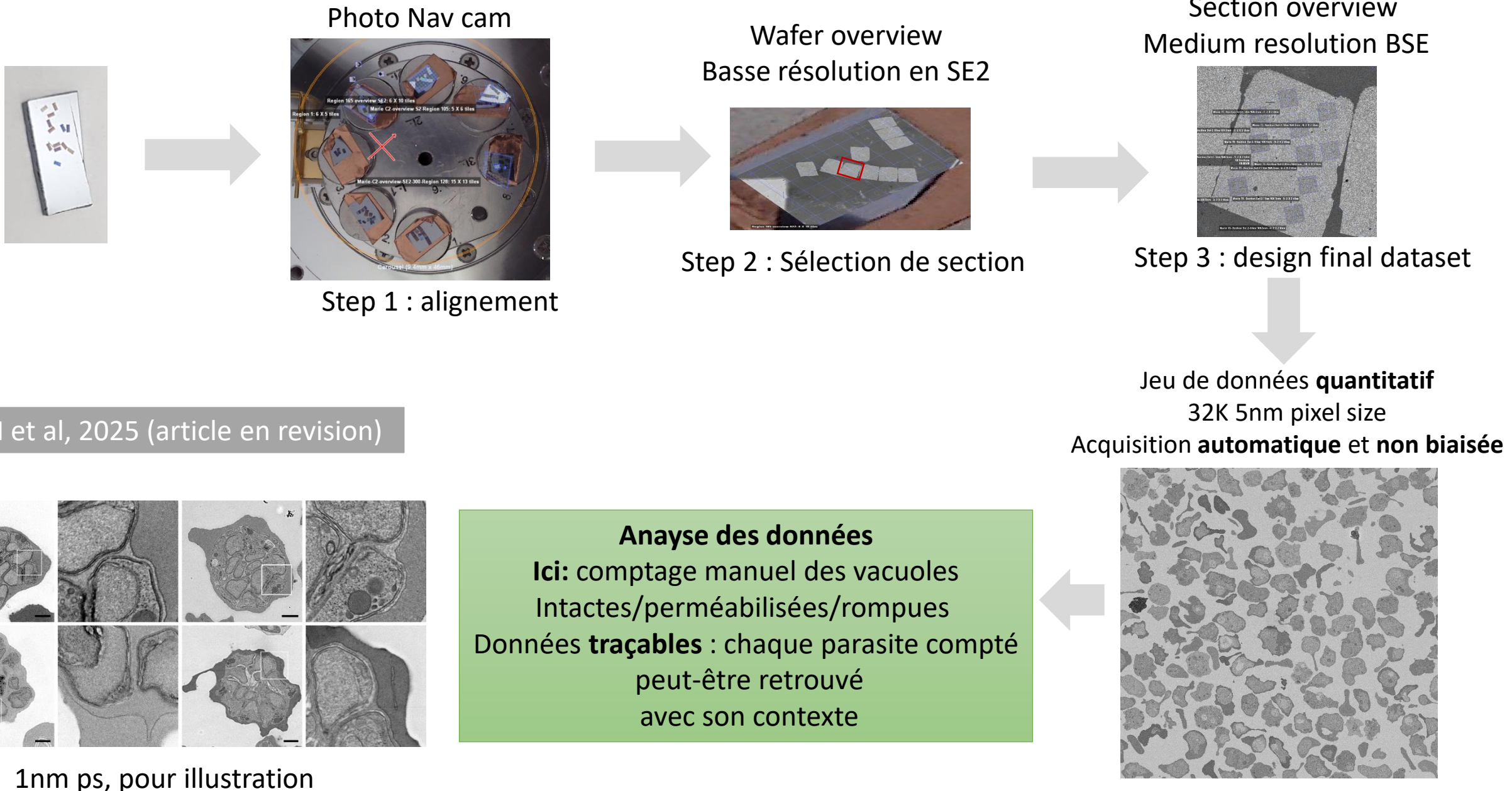


Sections sérieées
scannées à faible grandissement



Régions d'intérêt
scannées à haute résolution

Pour avoir des données quantitatives !



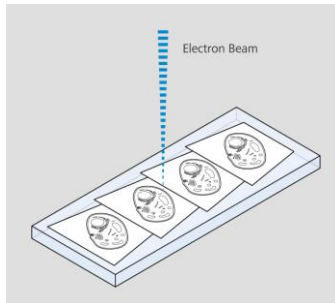
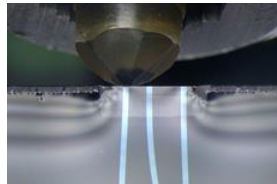
Ali M et al, 2025 (article en revision)

Et le 3D ?

Ultramicrotomie ex-situ

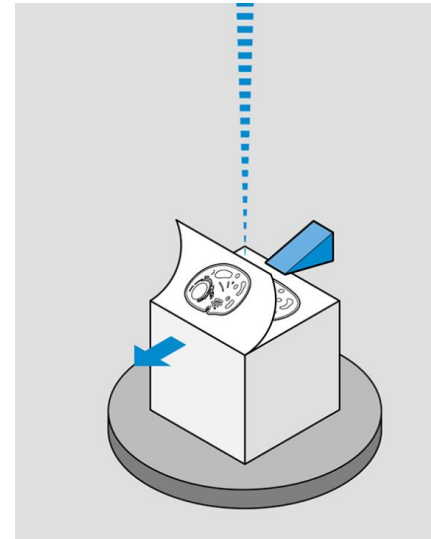
Array Tomography

Serial sectioning *ex situ*

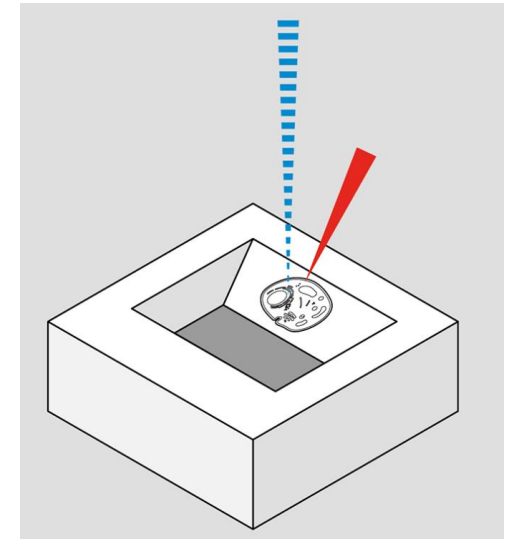


Imagerie sur coupes

Ultramicrotomie in-situ
(serial block face)



FIB SEM
“slice an view”



Imagerie de bloc

Le MEB le couteau Suisse des biologistes Cellulaires



SE2 detector:
Topography

Volume BSD Detector
TEM-like images
Large FOV

STEM Detector
TEM-like High resolution

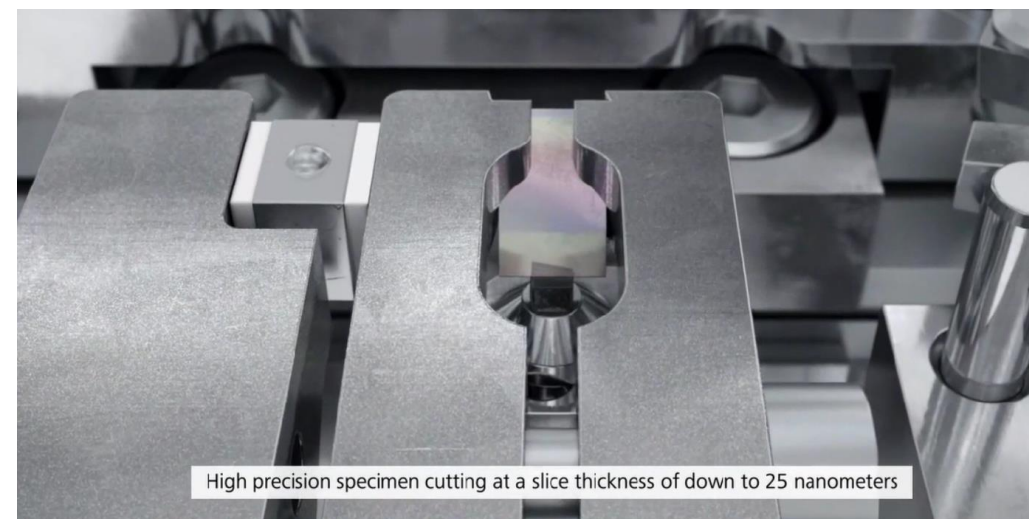
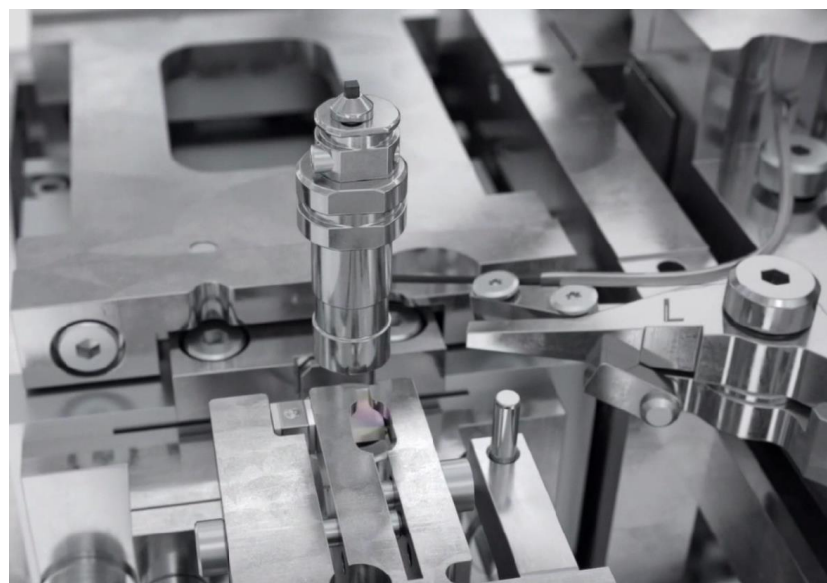
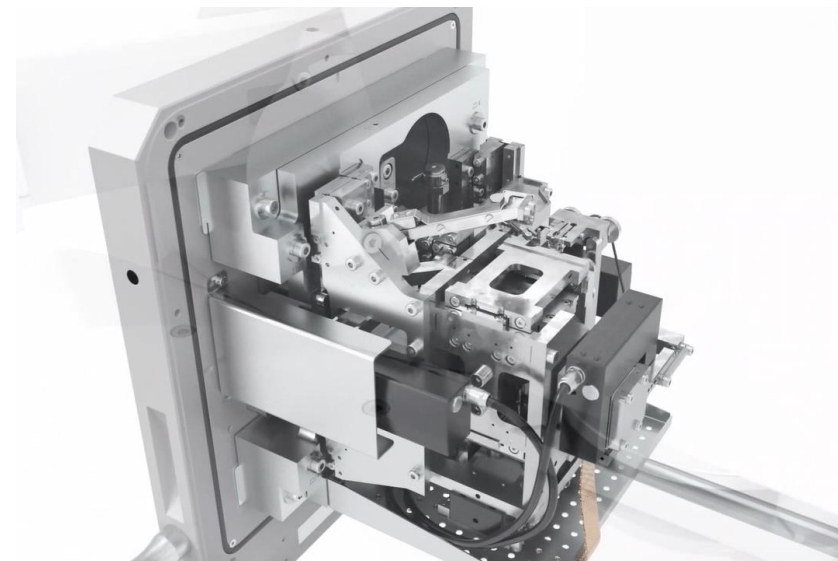
Volutome:
In situ serial block face

Arrivis/Apeer
Deep learning
Segmentation
Quantification
3D reconstruction



ATLAS 5 software
Automated acquisition
Mosaics
Multiposition
Multiscale

ATLAS 5 array tomography
Ex-situ serial sections imaging
CLEM



Les outils décisifs



Détecteur Sense BSD Zeiss (Volume BSD avec Diode amincie)

Utilisation 1,5 – 2 kv

Distance de travail < 4mm en 2D.

Distance de travail fixe 5,1 mm en mode volume

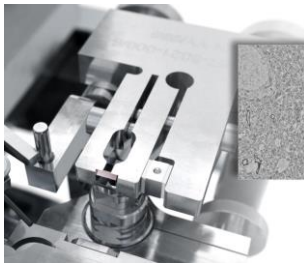
Optimisé pour les faibles tensions et faible dose

Sensible et rapide



Focal Charge Compensation

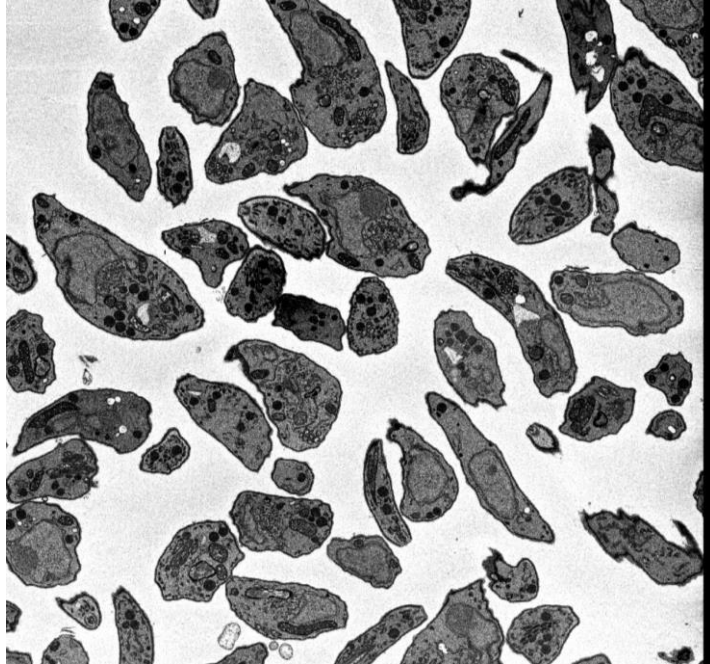
Un tube de carbone insufflé un flux d'azote à la surface de l'échantillon pour neutraliser les effets de charge



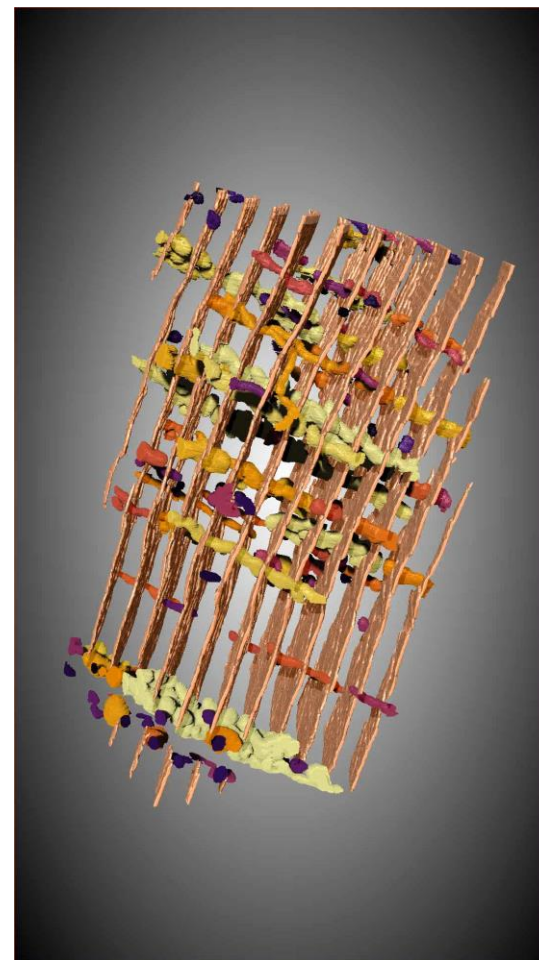
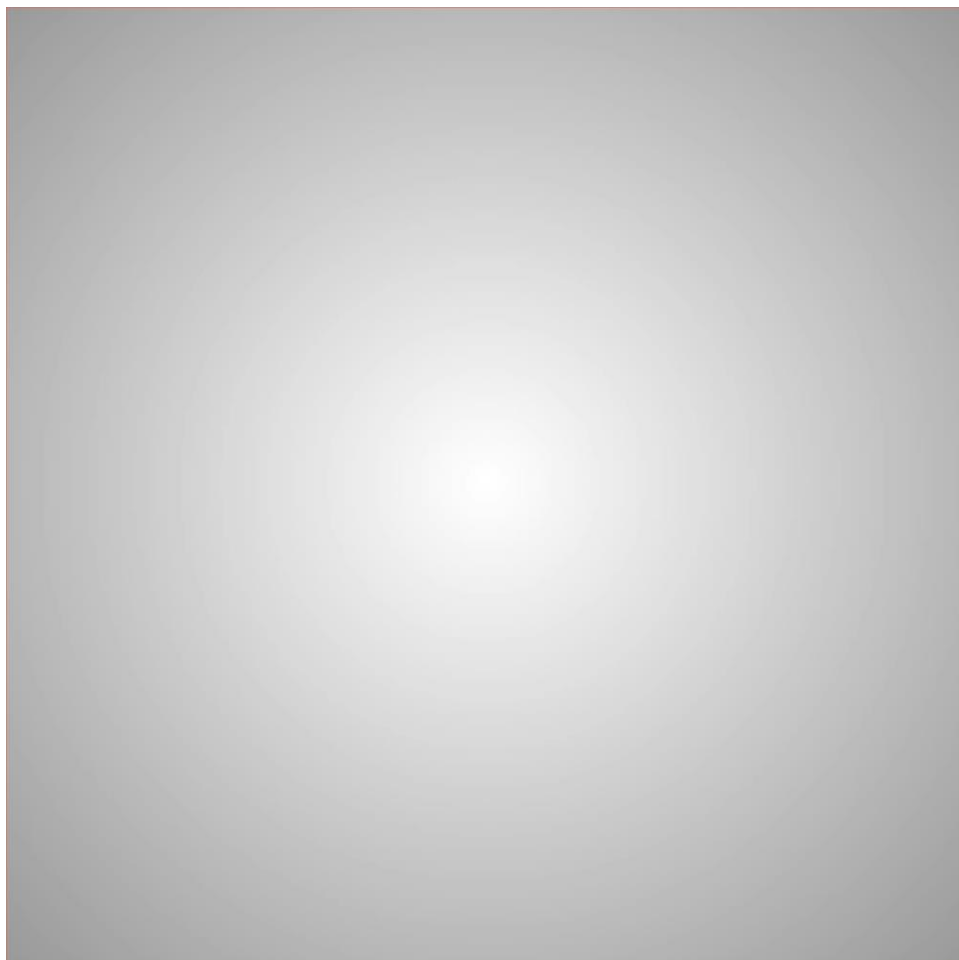
Couteau de diamant vibrant Diatome

Disponible en 1,4 et 2,4 mm

Automated 3DSEM : serial block face



Automated acquisition of the BLOCK surface



- Méthodologie robuste et efficace
- Coût d'exploitation modéré par rapport au FIB-SEM
- Outil très polyvalent
- Permet de répondre à la majorité des questions biologique en biologie cellulaire

- Utilisation en mode volume reste très technique
- Nécessite une forte impression en métaux lourds dans la préparation
- Comme toutes les méthodes de volume EM demande un gros travail de segmentation pour exploiter les données.



MRI-EM4Bio



Lucien Daunas



Salomé Belec

Merci pour votre attention !



Projet cofinancé par le Fonds Européen de Développement Régional
Financement dans le cadre de la réponse de l'Union à la pandémie de COVID-19

Which technique for what ?

EM4B

Nanotomography

Tissue characterisation
Small organisms...
Organoids
Organs-on-a-chip

Quantitative ME

Everyone

Array tomography 2D

Rare events
Correlative microscopy
Small budget

Array tomography 3D

ROI position unknown
CLEM 3D
Large volumes
Monolayers

Volumetry (SBF)

Homogeneous sample
ROI localisable
Large volume without any loss required

If too Big

μCT MRI ISEM (max voxel 4μm)
XRM Toulouse ?

If too small /isotropic required

FiB SEM funded CPER Occit'EM 2025

TEM Tomo :

MEA : RT material sciences

INM : RT Biology

CBS : cryo

STEM 3D : under development EM4B