

ECOLE D'ETE GN-MEBA

Microscopie Electronique à Balayage et Microanalyses

APPLICATIONS AUX ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES
Jean-Pierre LECHAIRE

*IFR 83, Université P. et M. Curie, Jussieu, Paris
France*

Organisation :



GEOSYSTEMES

Supports techniques :



SYNERGIE⁴



Autres supports :



Plan

- **Rappels**
- **Préparations pour la MEBc**
- **Applications :**
 - **échantillons minces et massifs,**
 - **Chambres humides**
- **MEB-FEG et MEB à pression contrôlée**
- **cryo-MEB**
 - **les principales voies**
 - **les cryofixations**
 - **la cryofracture**
- **Détecteur STEM**
- **FIB (Focused Ion Beam)**
- **MEB 3D**
- **MEB de table**

RAPPELS

L'échantillon biologique est un échantillon hydraté et classiquement son étude en microscopie électronique va nécessiter sa deshydratation.

Les techniques dites conventionnelles de préparation des échantillons biologiques pour l'observation en microscopie électronique induisent de nombreux artefacts :

- fixations chimiques (aldéhydiques et osmiques) provoquent des modifications de l'ultrastructure cellulaire (« shrinkage » dû aux pontages chimiques),**
- deshydratations (alcools, acétone) accentuent ce phénomène,**
- les inclusions en résine de type époxy peuvent également perturber, la polymérisation se faisant à 60° C.**

Préparations des échantillons biologiques

Dans le mode conventionnel, le vide poussé et la haute tension impliquent que les échantillons soient deshydratés et conducteurs

MET conventionnelle

- *Fixation chimique :*
glutaraldéhyde,
puis OsO₄,
- *Deshydratation alcoolique,*
- *Inclusion dans des résines époxy,*
- *Réalisation de coupes ultra-fines*
(50 et 80 nm),
- *Contrastants : acétate d'uranyl et*
citrate de plomb.

MEB conventionnelle

- **Fixation chimique :**
glutaraldéhyde (protéines),
puis OsO₄ (phospholipides),
- **Deshydratation alcoolique puis**
- **contournement du point critique CO₂**
(31° C; 7,4 MPa) ou par l'HMDS
(hexamethyldisilizane),
- **Sputtering à l'or.**

Amphibian lampbrush chromosomes

Observation
Contraste de phase

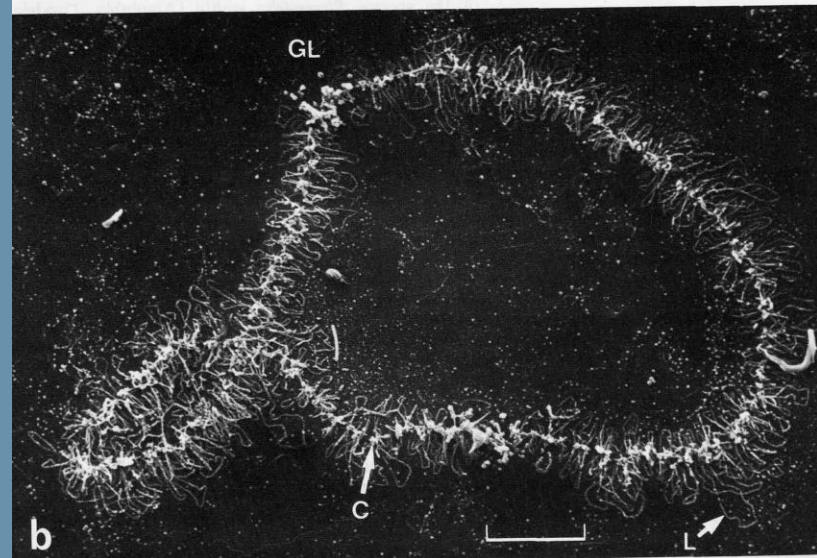
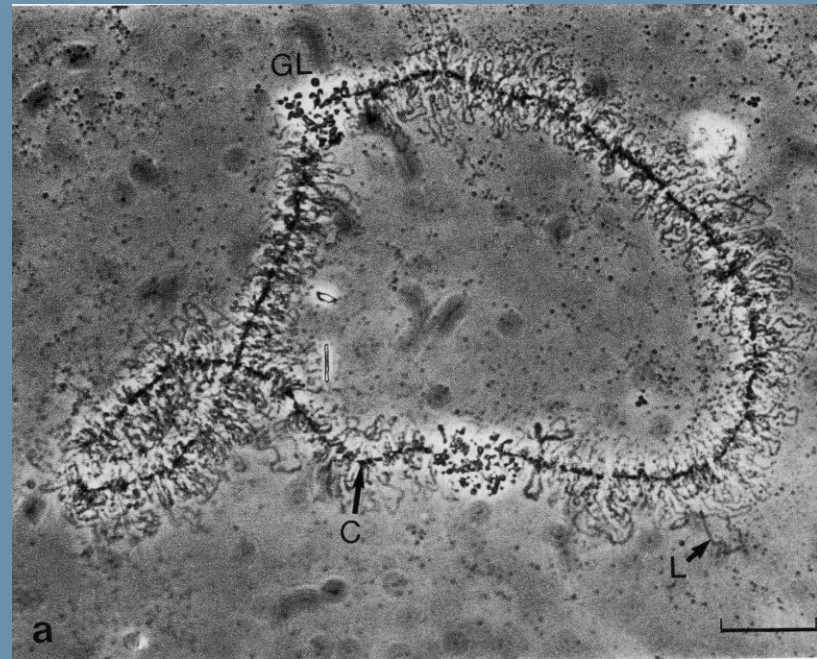
*Microscopie corrélative
MP et MEB*

Fixation au glutaraldéhyde,
deshydratation à l'alcool,
passage au point critique.

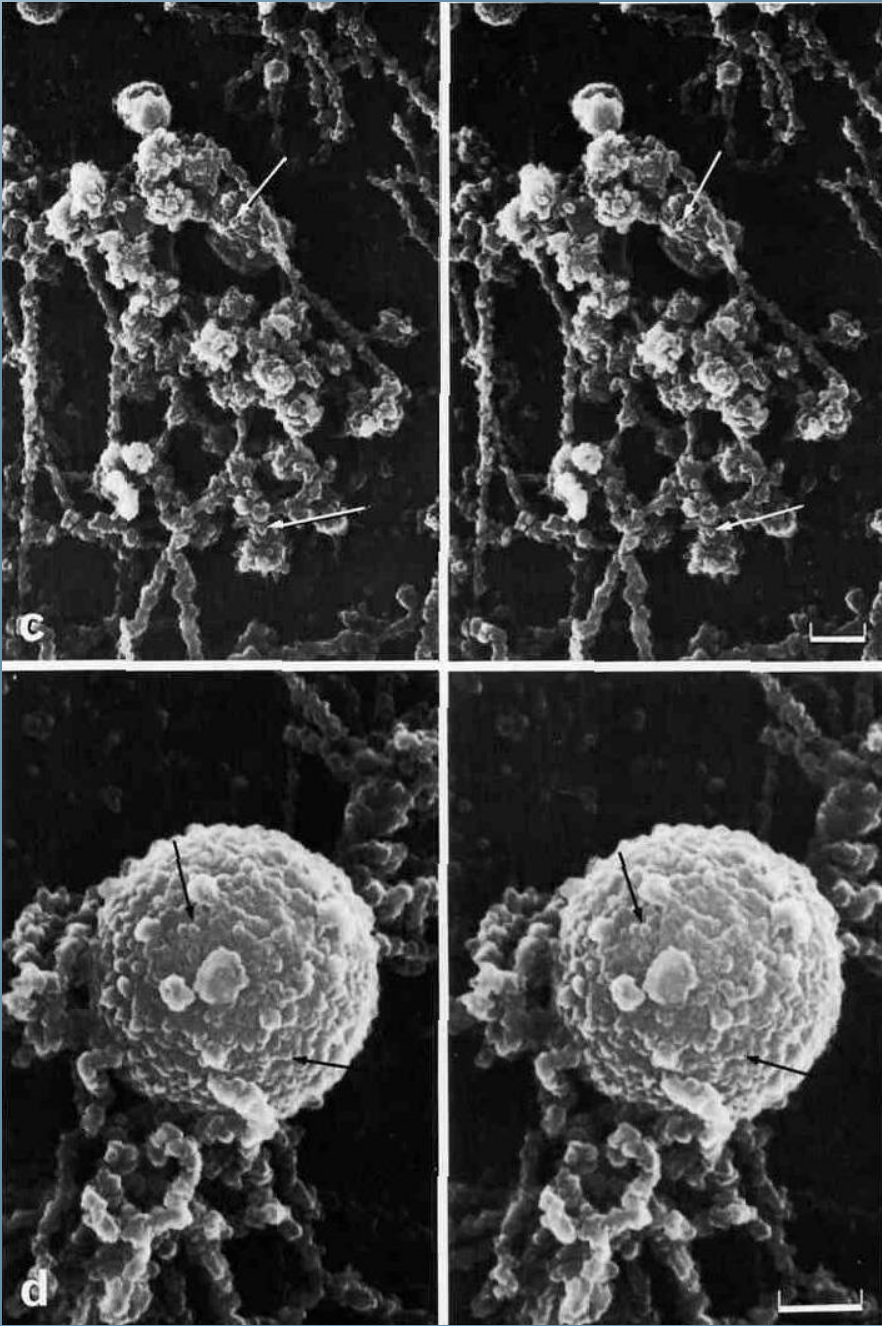
métallisation à l'or.

MEB tungstène, 15kV.
Bars 20 µm

Angelier N. et al
Chromosoma, 1984, 89, 243-253

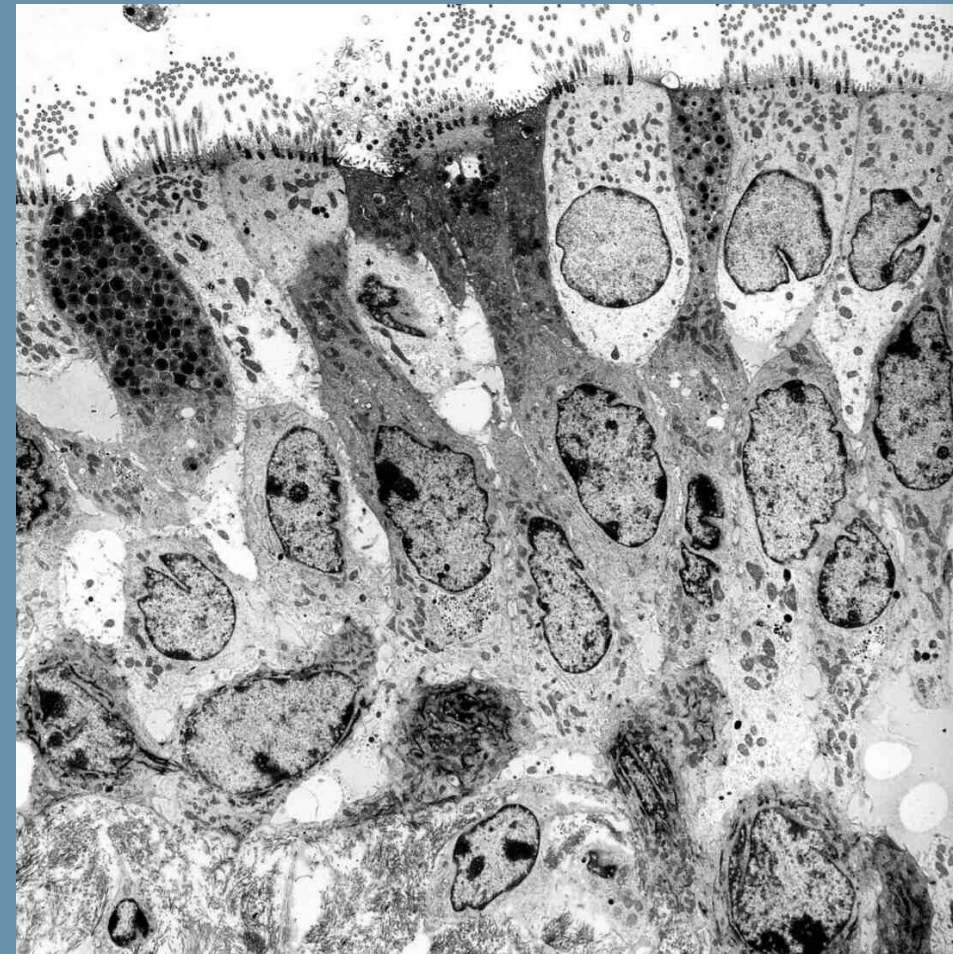
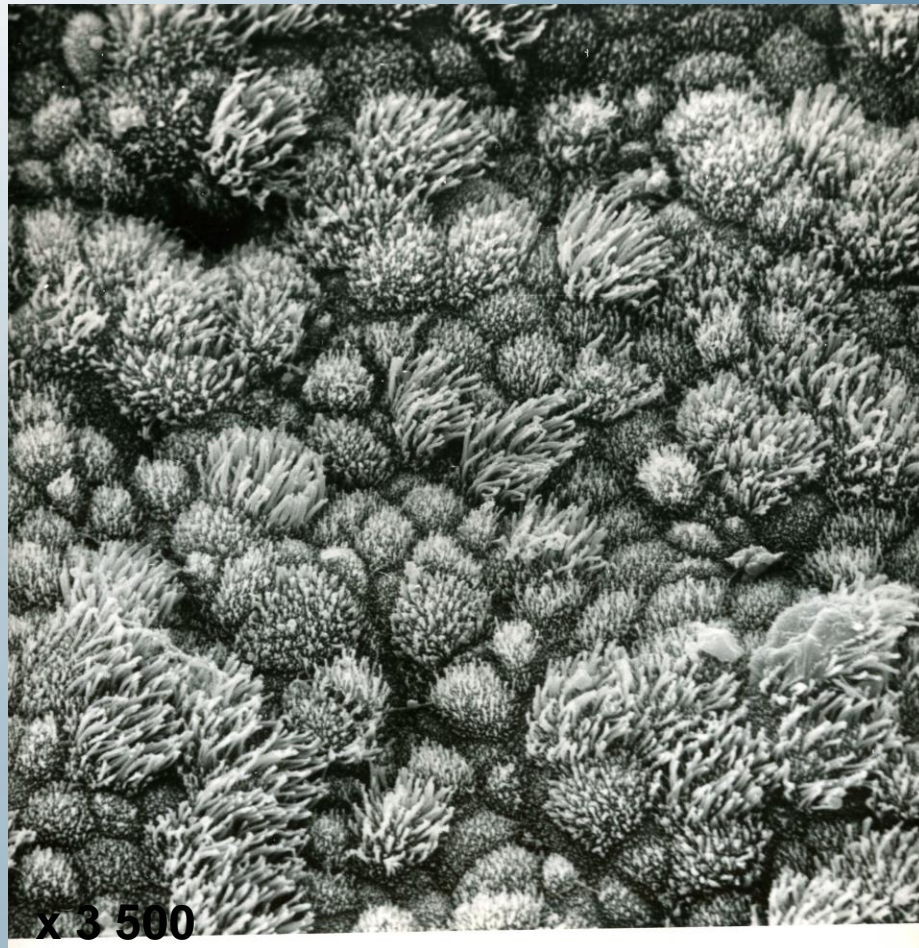


Amphibian lampbrush chromosomes



Bars 1 μ m

Angelier N. et al
Chromosoma, 1984, 89, 243-253



Fixation au glutaraldéhyde, post-fixation à l'osmium, déshydratation à l'alcool,

Contournement du point critique.

MEB tungstène, 15kV,

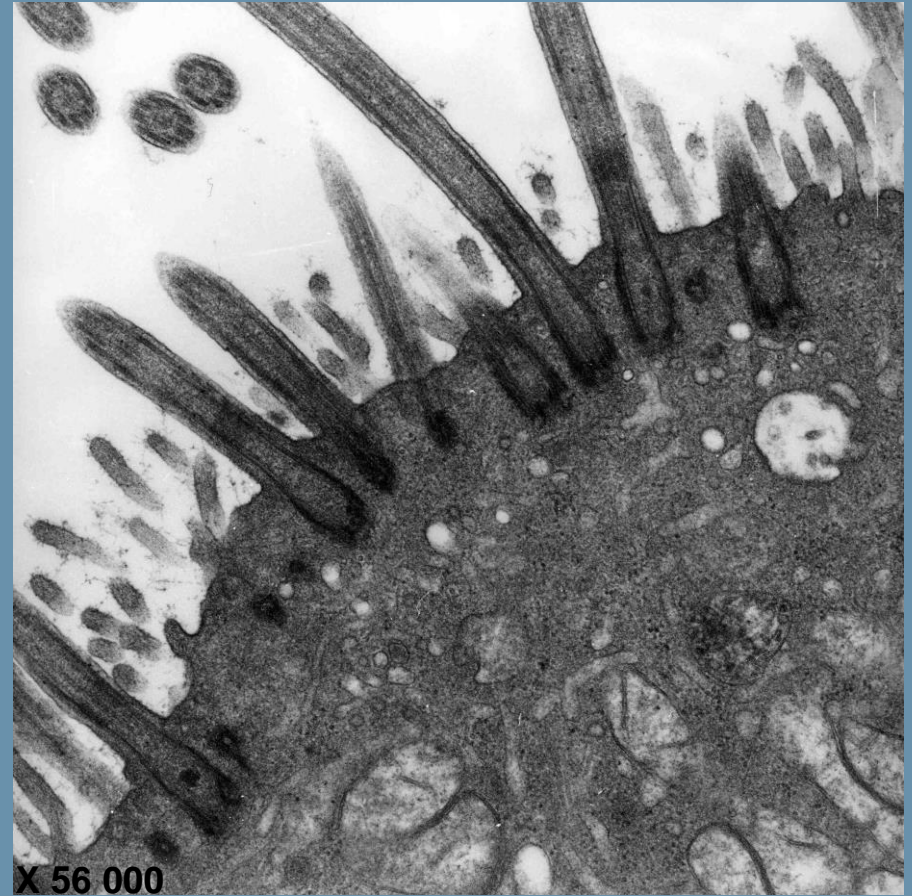
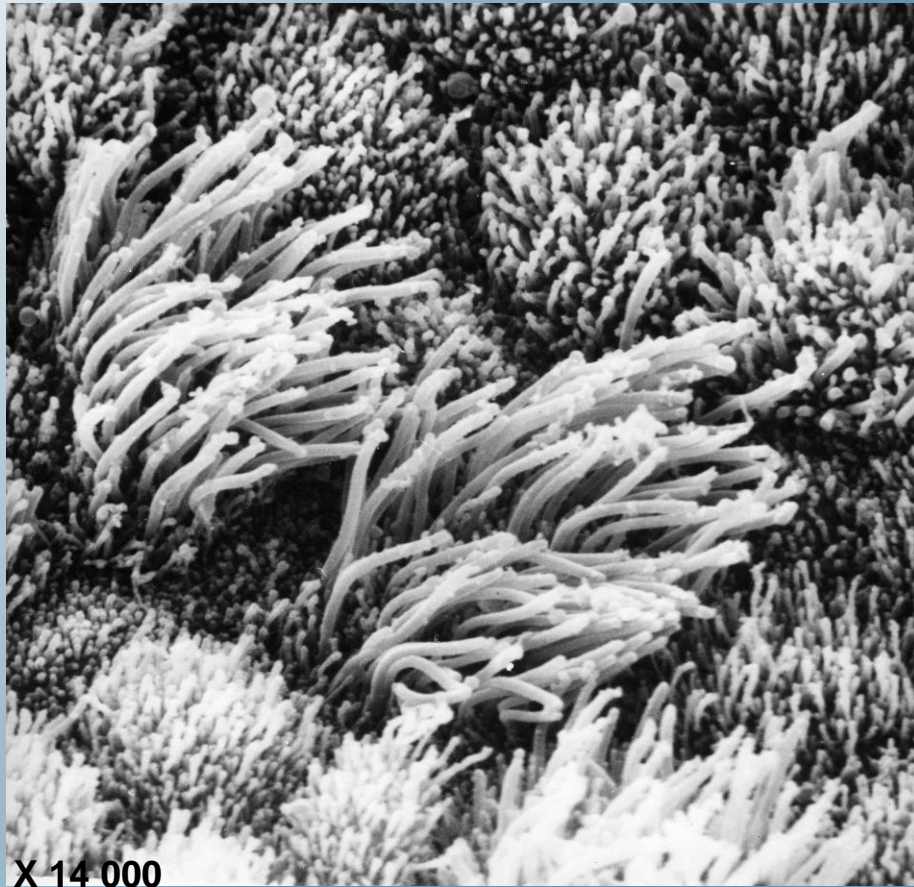
métallisation à l'or.

Inclusion en araldite

METc 80 kV

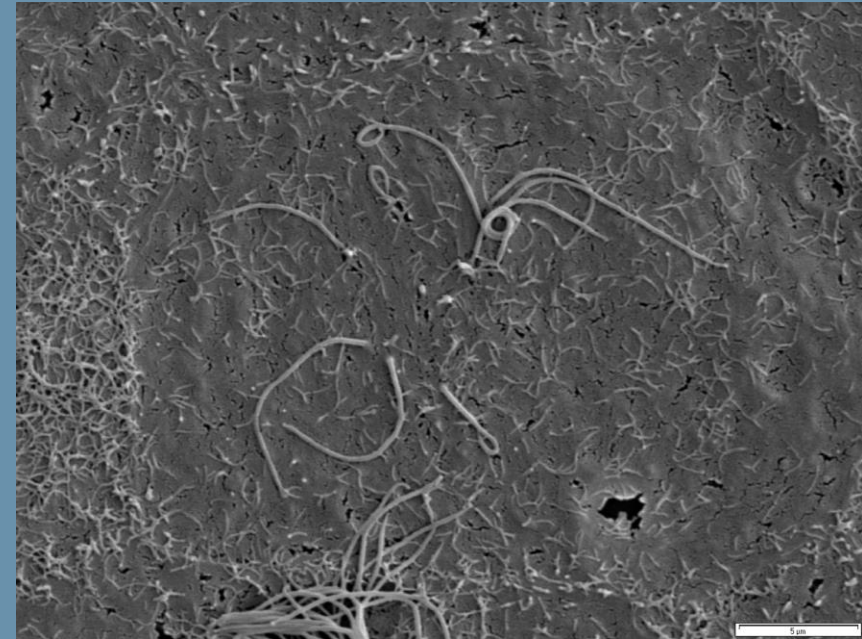
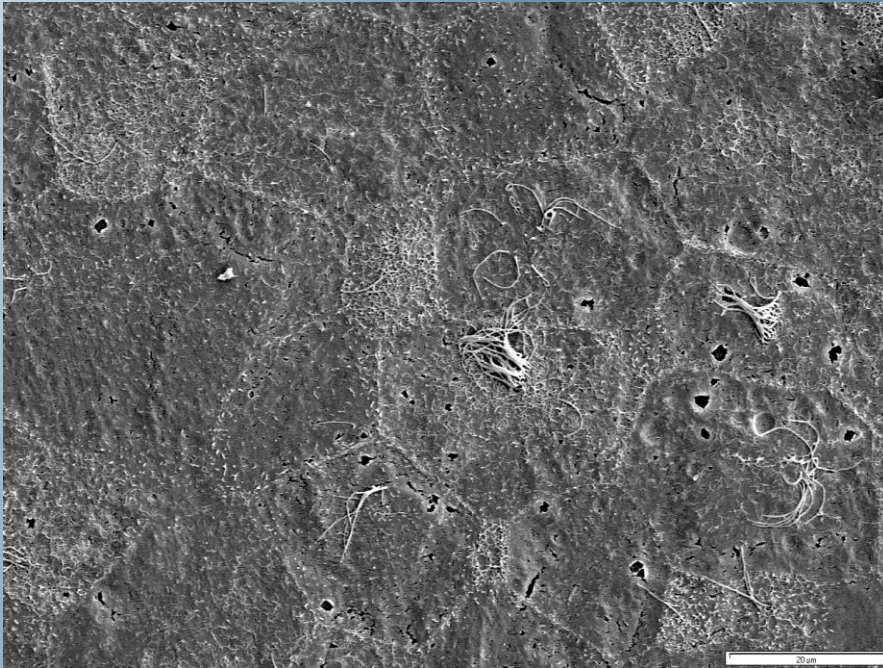
Contraste ac.uranyl et citrate de Pb

Epithélium de trachée de Cobaye



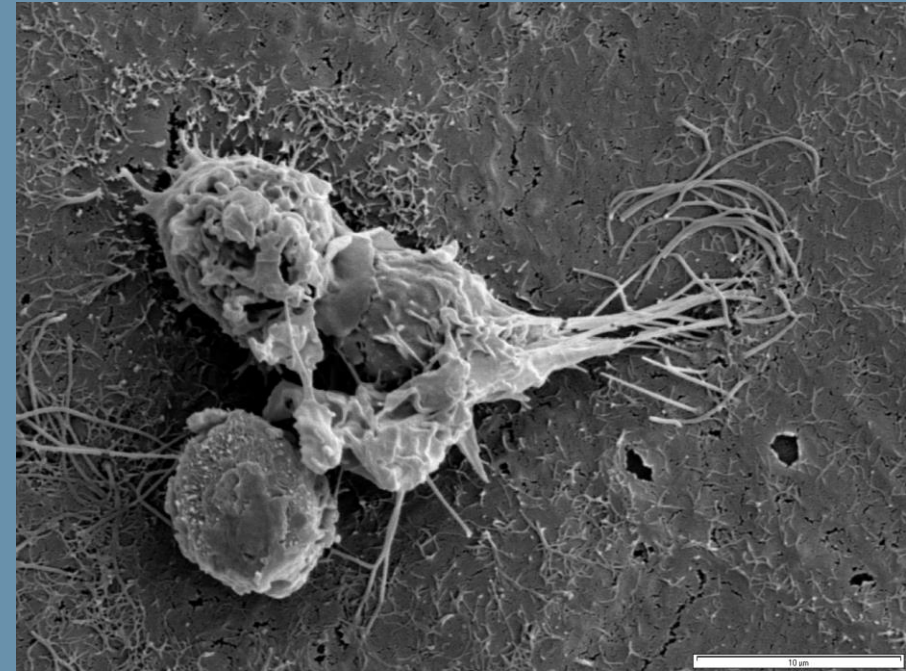
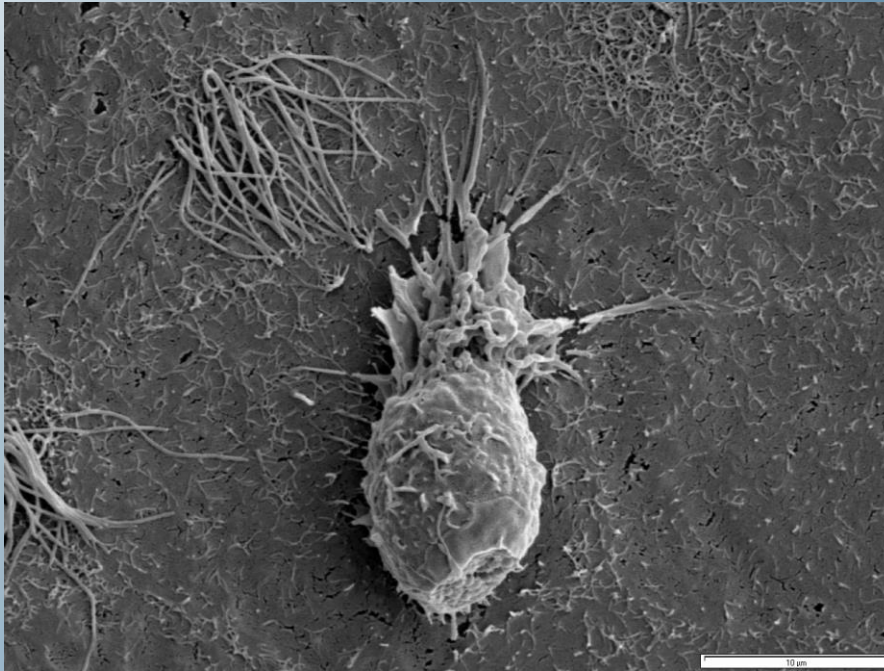
*Microscopie corrélative
MEB et METc*

Cellules souches neuronales en culture: cellules à confluence



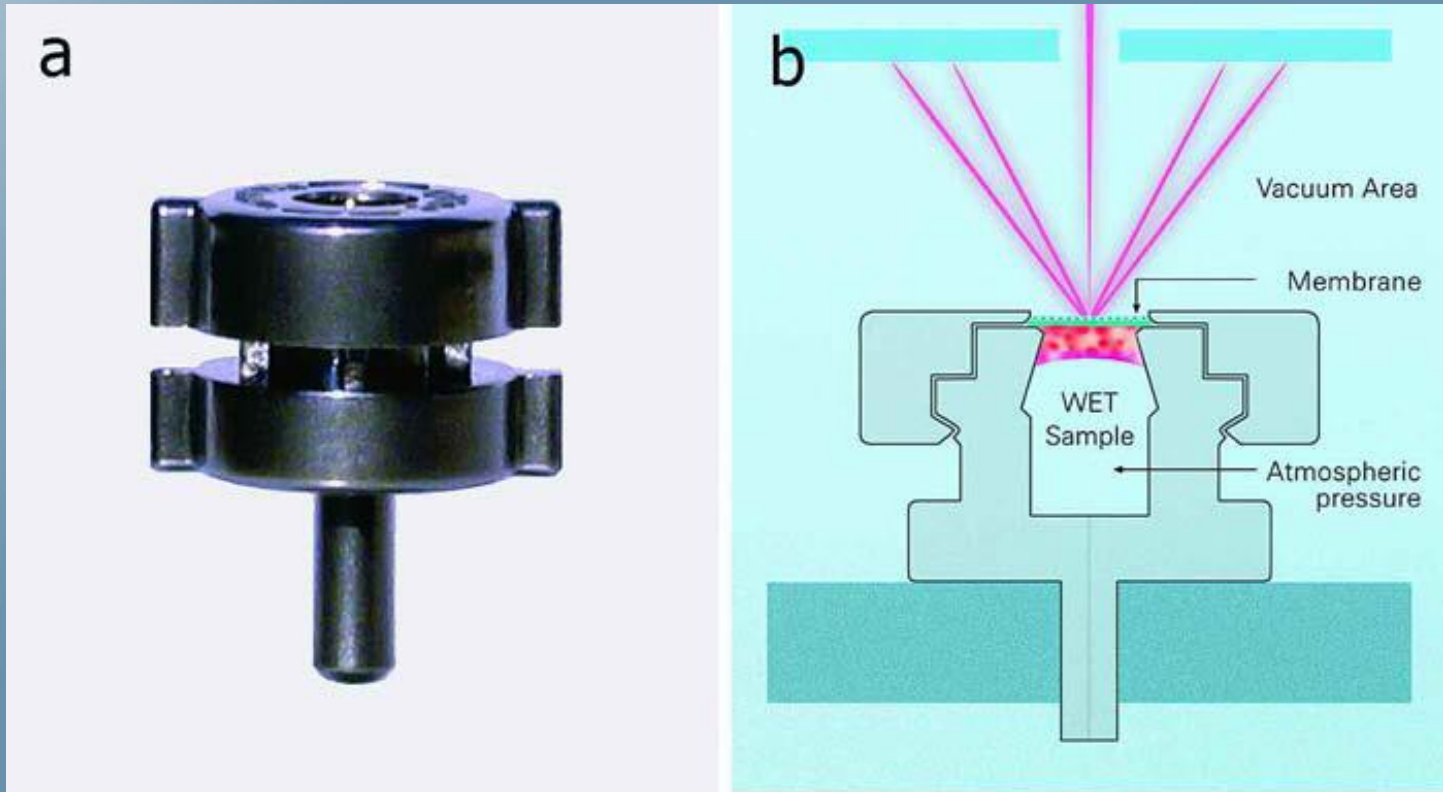
Doc. I. Le Disquet et N. Spassky, IFR Biologie Intégrative, Jussieu

Cellules souches neuronales en culture: cellules en division



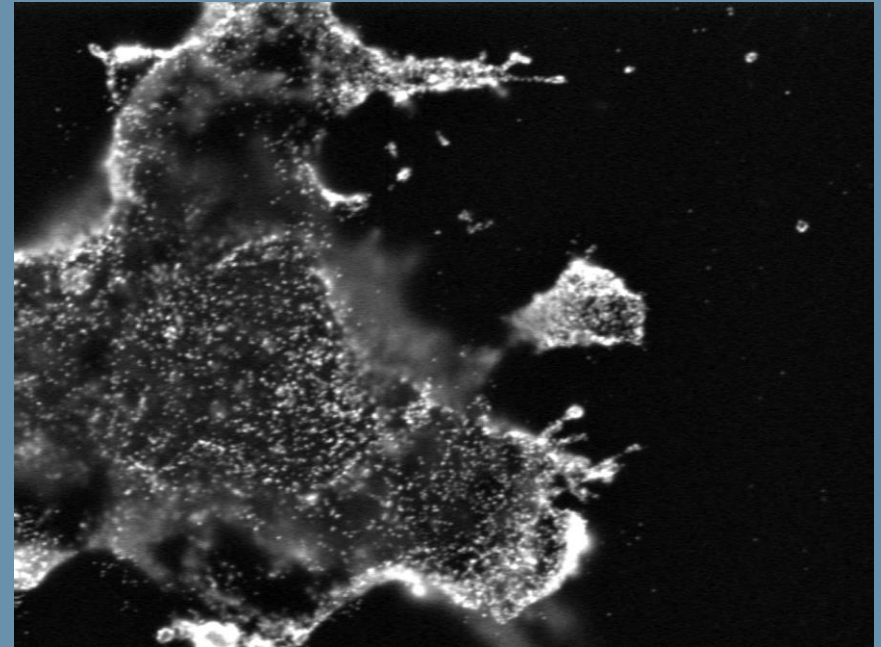
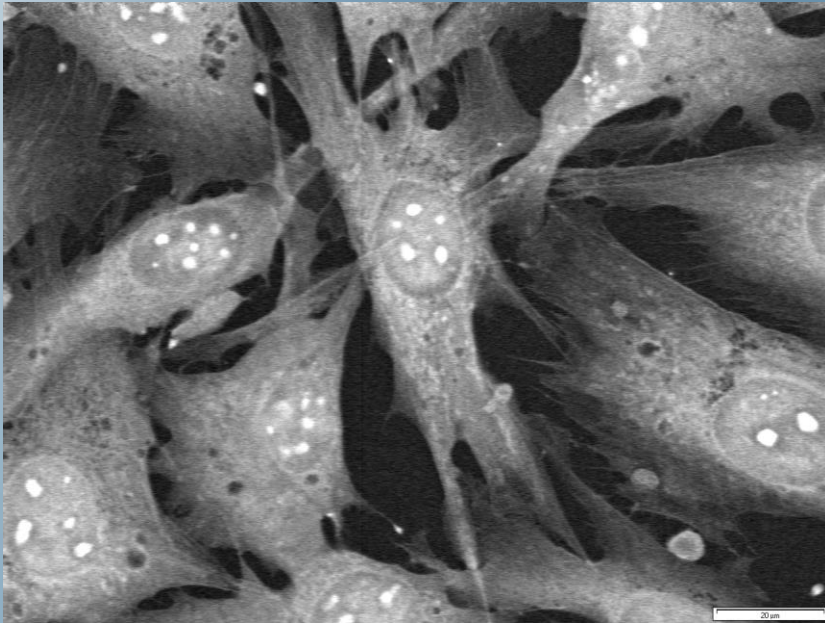
Doc. I. Le Disquet et N. Spassky, IFR Biologie Intégrative, Jussieu

Pour **éviter la deshydratation**
Chambre de culture et observation **en électrons rétro-diffusés**



Irit Ruach-Nir et al, Eur Microsc and Analysis, July 2006, 15-17

**Observation directe d'échantillons hydratés
en MEB conventionnelle :
utilisation des chambres de culture
Observation en électrons rétrodiffusés**



Cellules musculaires en culture. Après immunomarquage à l'or à droite

MEB-FEG



Collagène après prétraitement à l'enzyme hyaluronidase.

La périodicité du collagène (64 nanomètres) est bien visible.

Fixation au glutaraldéhyde, post-fixation à l'osmium, déshydratation à l'alcool, utilisation de HMDS. *MEB-FEG* (canon à émission de champ), 12kV, métallisation au *platine*.

Marqueur : 1 micromètre

Hallegot P. L'Oréal Recherche et Innovation

LA MICROSCOPIE A PRESSION CONTROLEE ET LA MICROSCOPIE A CHAMBRE ENVIRONNEMENTALE

Principe et rappels:

Goutte d'eau à l'équilibre à T ambiante	: 2000 à 2500 Pa
à 0° C	: 610 Pa
à -10° C	: 260 Pa

Microscope à pression contrôlée : environ 260 Pa

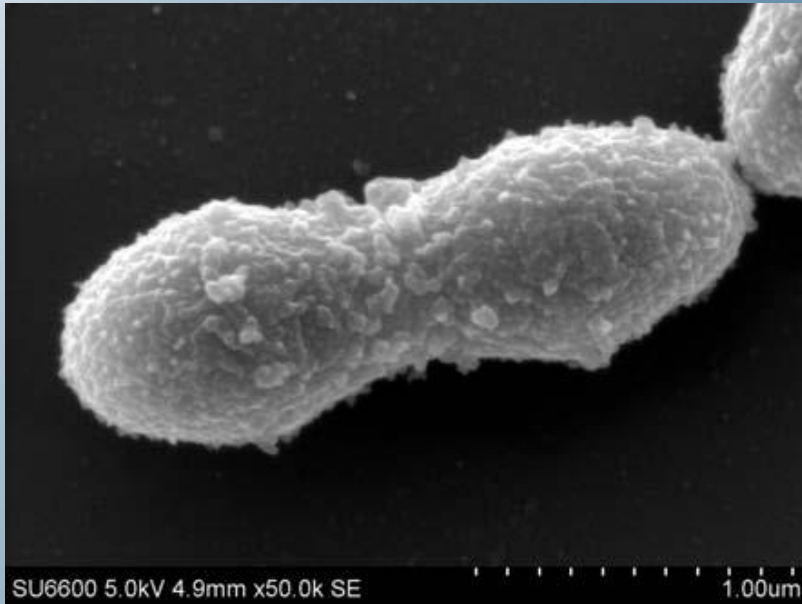
Microscope environnemental : 6000 à 7000 Pa

Conclusion : **possibilité d'observer les échantillons hydratés.**

Hallegot P., L'Oréal Recherche et Innovation

MEB-FEG

Techniques d'observation à température ambiante



SE Image (Vacc: 5kV)
Mag: 50k Vacuum: High)
Sample: Pneumococcus (uncoated),
Schottky Emission VP FE-SEM

Doc. Elexience

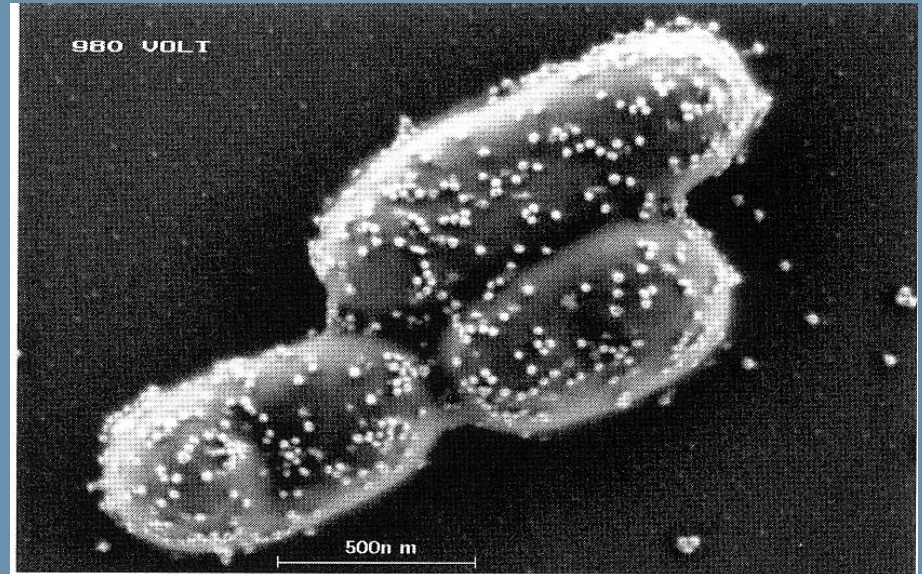
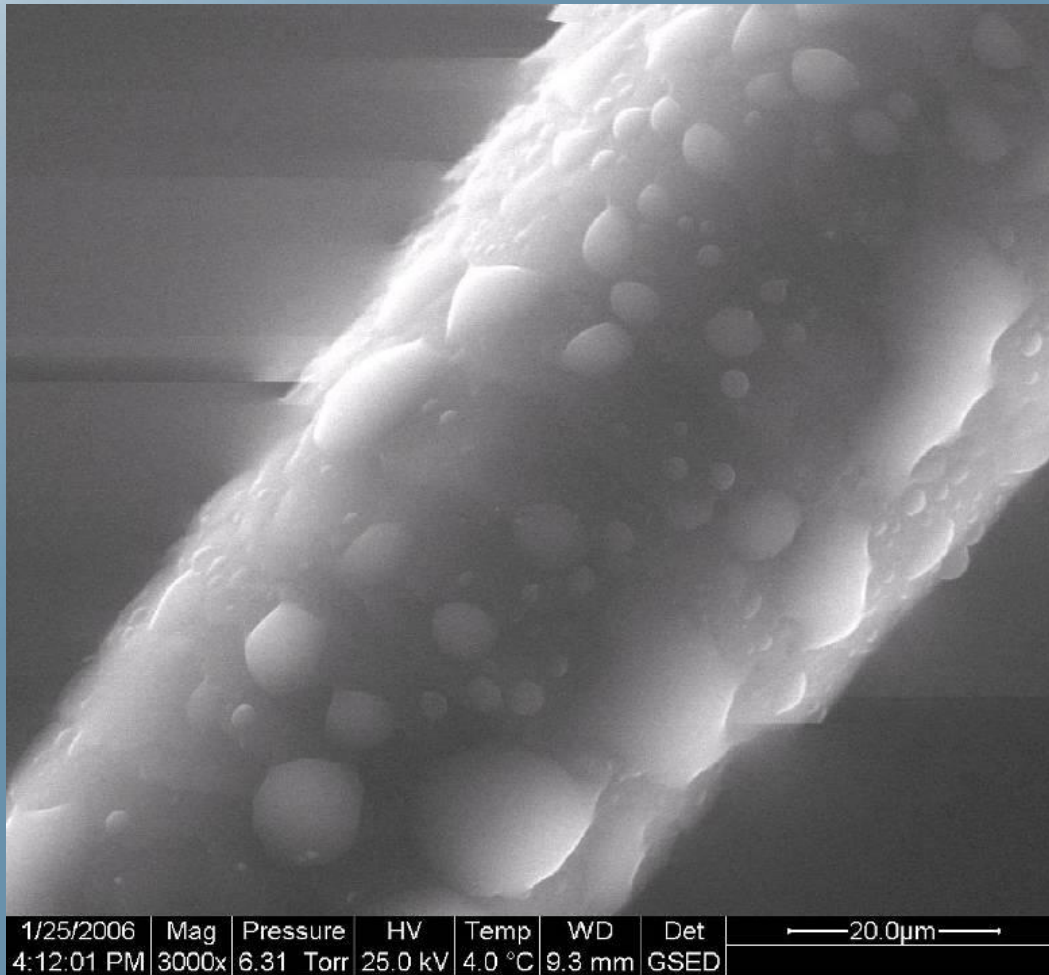


image BSE (à faible tension <1kV)
accès aux immunomarquages
de surface (20 nm Au) uncoated
specimen, VP FEG

Doc. Zeiss



Condensation d'eau à la surface d'un cheveu dans la chambre d'un microscope environnemental.

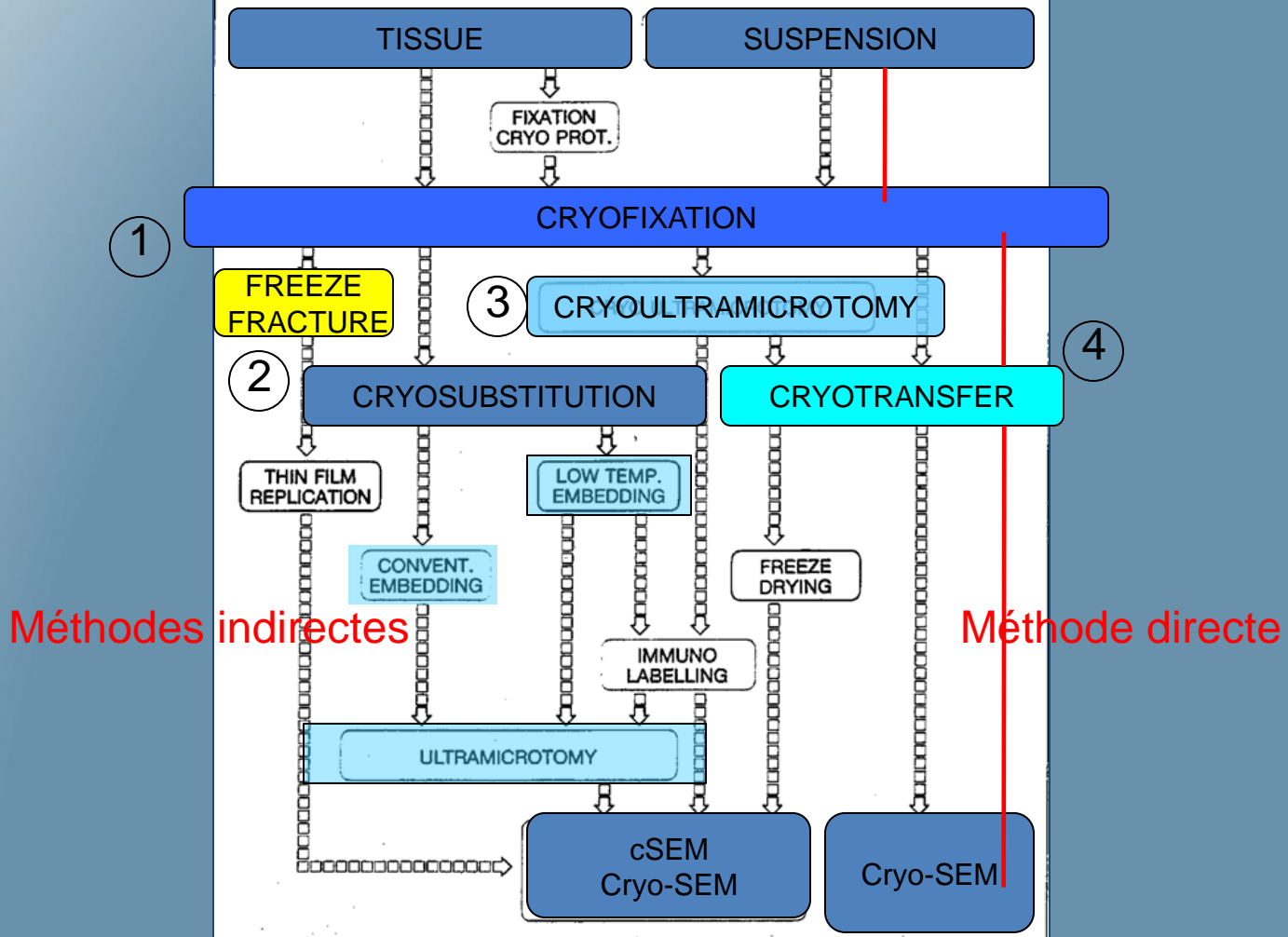
Hallegot P. L'Oréal Recherche et Innovation

Techniques cryogéniques: permettent l'observation d'un échantillon hydraté

La cryofixation (azote pâteux, haute pression...) peut être suivie

- soit d'une lyophilisation avec observation à température ambiante,**
- soit d'une cryofracture et d'une sublimation puis d'une métallisation ultrafine (chrome) avant observation avec platine froide (azote liquide ou effet Peltier) sous ultra-vide ou vide partiel.**
- Il est possible d'observer des répliques avec une résolution comparable avec celle de la MET.**

Principales étapes de cryométhodes



A titre comparatif, le tableau suivant reprend les taux de conductivité thermique de quelques liquides et solides (en $\text{Jm}^{-1}\text{s}^{-1}\text{K}^{-1}$) :

<i>Élément</i>	<i>Température de fusion T_M</i> (K)		<i>Conductivité thermique au T_M</i>		
Eau liquide	273		0.5551		
→ Eau solide	273		2.2		
→ Azote	63		0.1322		
Hélium	1.75		0.0181		
Ethanol	156		0.2064		
Halocarbone 12	115		0.129		
Halocarbone 22	113		0.143		
→ Propane	84		0.1		
→ Ethane	90		0.24		

<i>Élément</i> solides	<i>Conductivité thermique à la température de (K)</i>				
	273	173	77	20	4
Saphir	46	82	960	15700	410
Aluminium	210	210	410	-	15000
Cuivre	400	400	460	1200	380
→ Cuivre (pur)	398	413	570	10500	11300
Argent	427	430	471	5100	14700
Or	315	327	352	1500	1710
Titane	22	25	34	28	5.76

La conductivité thermique varie avec la température de l'élément. On constate que le propane, l'éthane, les halocarbones et l'azote présentent les meilleurs rapports conductivité thermique / température de fusion, soit une haute conductivité thermique et une température de fusion basse. Dans le cas des solides, on ne retiendra que le cuivre pur qui présente une conductivité thermique élevée et relativement stable entre 20 et 4 K.

Ces éléments sont donc, par leur conductivité thermique, de bons cryogènes.

Cryogènes

Freezing

TABLE 2.11
Depth of ice crystal-free zone in tissue without cryoprotection

<i>Depth (μm)</i>	<i>Method of quenching</i>	Reference
10-15	Impact on Ag block (66 K) (1.0 m s^{-1})	Van Harreveld et al. (1974)
12	Impact on Cu block (77 K) (unspecified rate)	Dempsey and Bulivant (1976a,b)
15	Impact on Cu block (4 K) ($\leq 0.8 \text{ m s}^{-1}$)	Heuser and Reese (1976)
20	LN ₂ (77 K); motor-driven entry	Sactersdal et al. (1977)
5-8	LN ₂ slush (65 K); 'rapid-entry'	Sevéus (1978)
25-30	Freon 22 (113 K); spring-driven entry	Handley et al. (1981)
10	Freon 22 (109 K)	Frederick and Busing (1981)
5-10	Freon 22 (109 K); compressed air-driven entry (0.6 m s^{-1})	Somlyo and Silcox (1979)
5-10	Propane (83 K), Freon 22 (113 K); gravity entry	Elder et al. (1982)
10	Propane jet (83 K)	Moor et al. (1976)
<1	Propane jet (83 K)	Pscheid et al. (1981)
500	Hyperbaric LN ₂ at $2.1 \times 10^8 \text{ Pa}$ (77 K)	Moor et al. (1980)

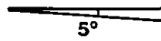
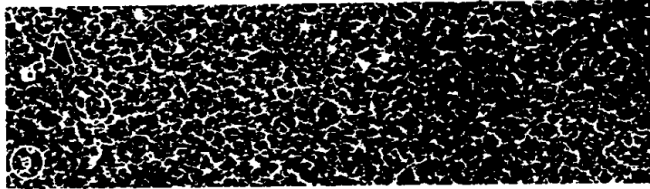
Slam-
freezing

Haute-
Pression

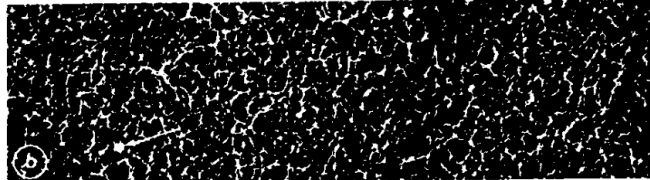
Augmented and reproduced from Elder et al. (1982).

Labelling sample surface for quick-freeze

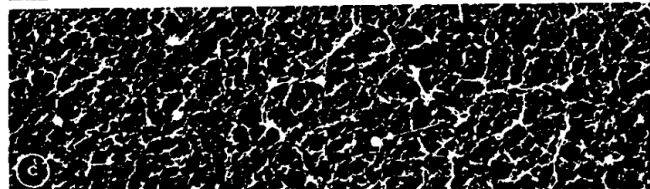
205



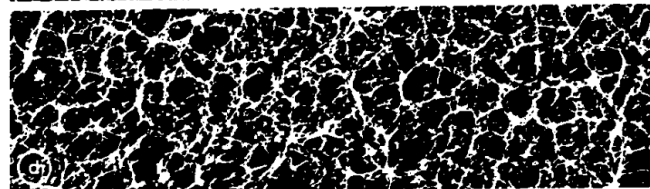
d 0-4 μm



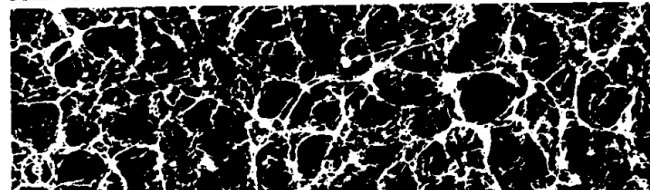
d 6-10 μm



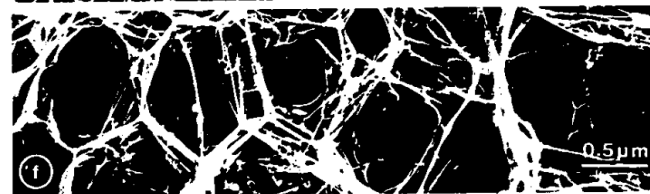
d 12-16 μm



d 18-20 μm



d 20-22 μm



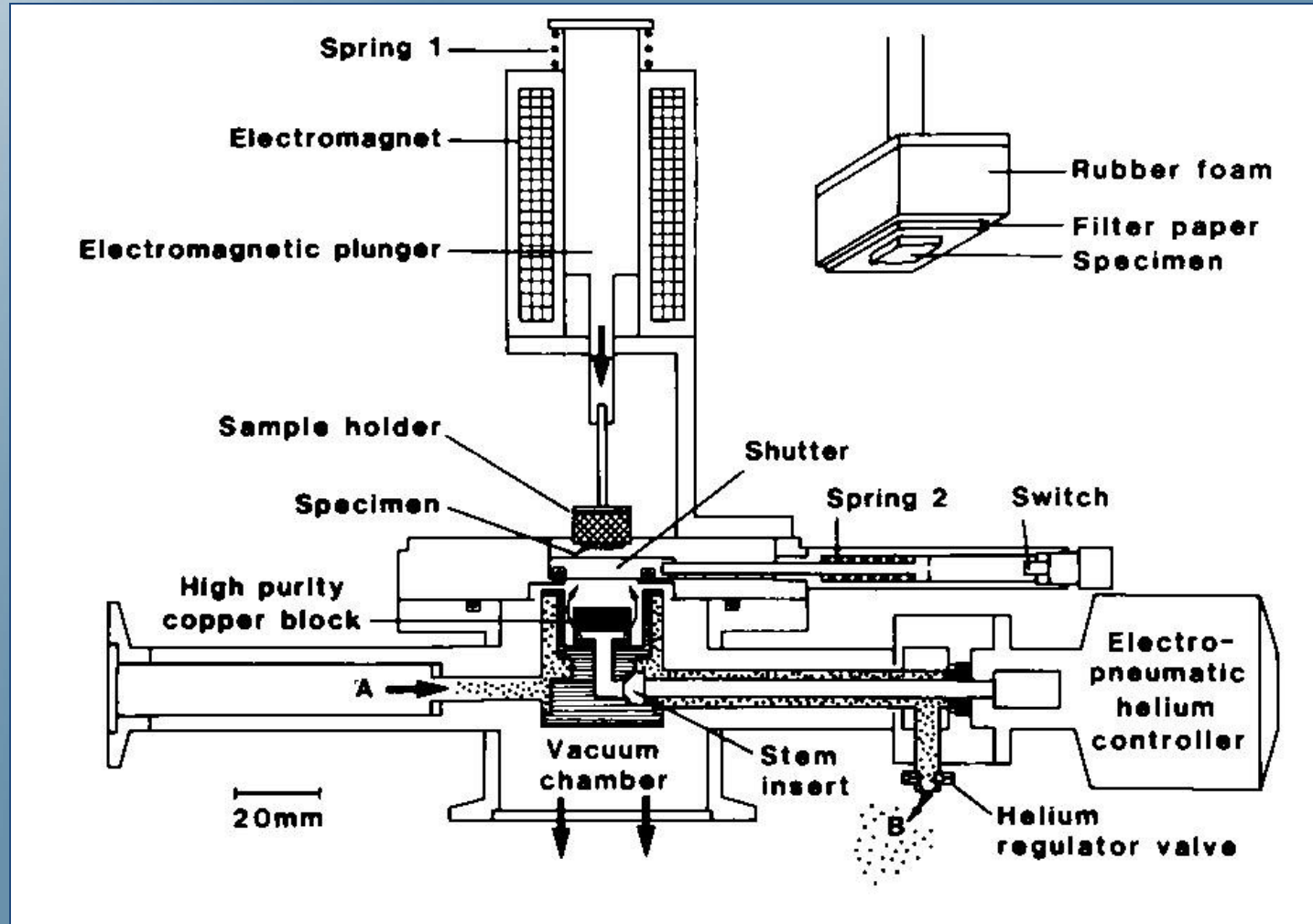
d 24-28 μm

Cryodécapage d'un gel de gélatine 2% (slam-freezing). Observation en MET

Mise en évidence de
la formation de
cristaux de glace

*Favard P., Lechaire J-P.,
Maillard M., Favard
N., Djabourov M.
and Leblond J.,
Biol Cell, 1989, 67, 201-207.*

Schéma du « Slam-freezing » Cryofixation ultrarapide à 4K (Hélium liquide). Méthode physique

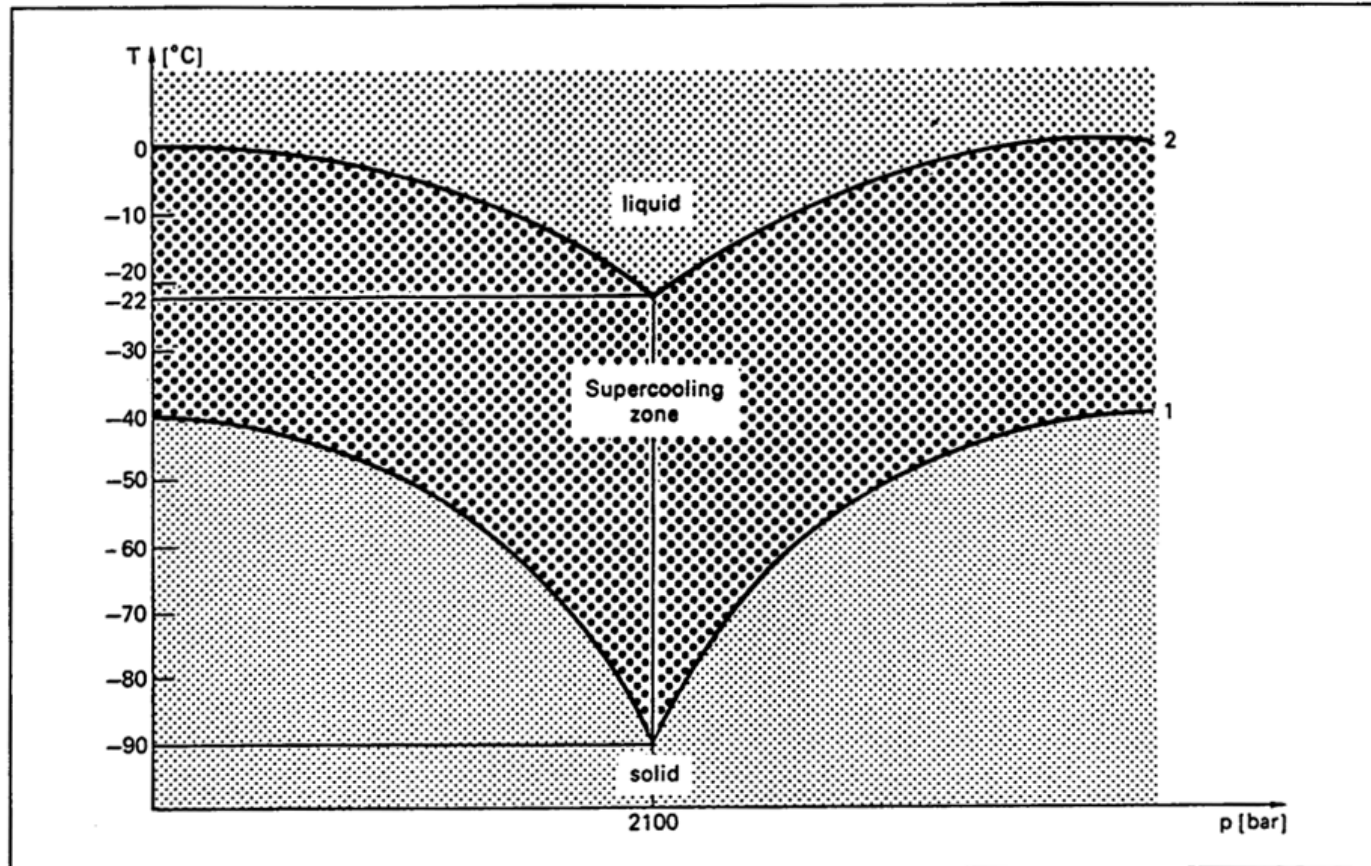


from Escaig, 1982

Cryofixation sous haute-pression: méthode physique

2100 bars, Azote liquide

**Échantillons massifs 200 μ m, sans cryoprotectant,
méthode rapide quelques millisecondes**

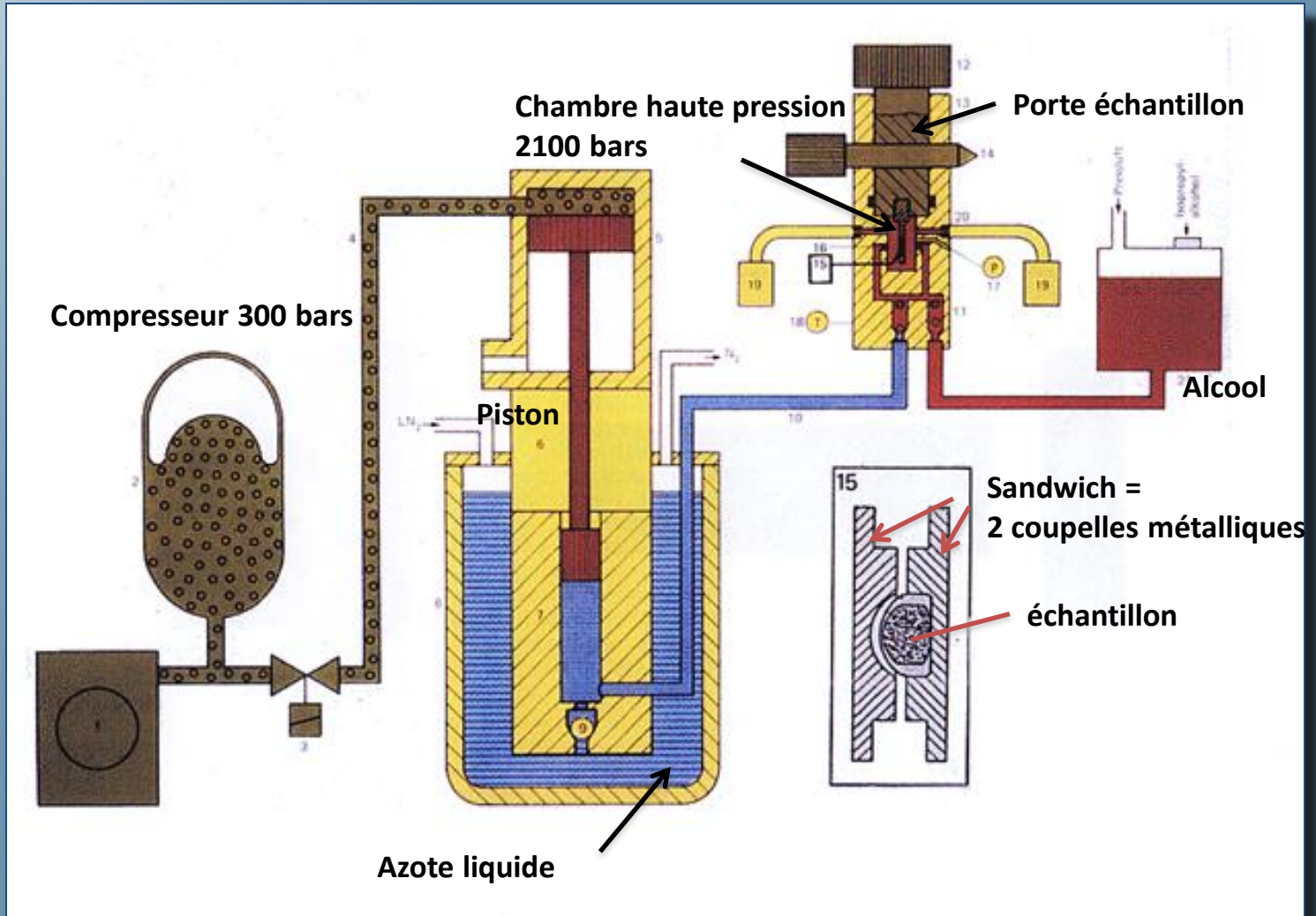


H₂O Phase Diagram

- 1 Supercooling capability curve
- 2 Melting point curve

Cryofixation sous haute pression

Schéma de machine



from Moor et al., 1980

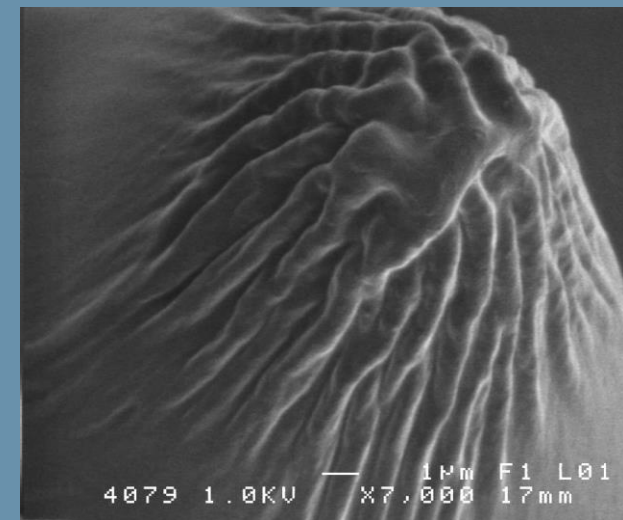
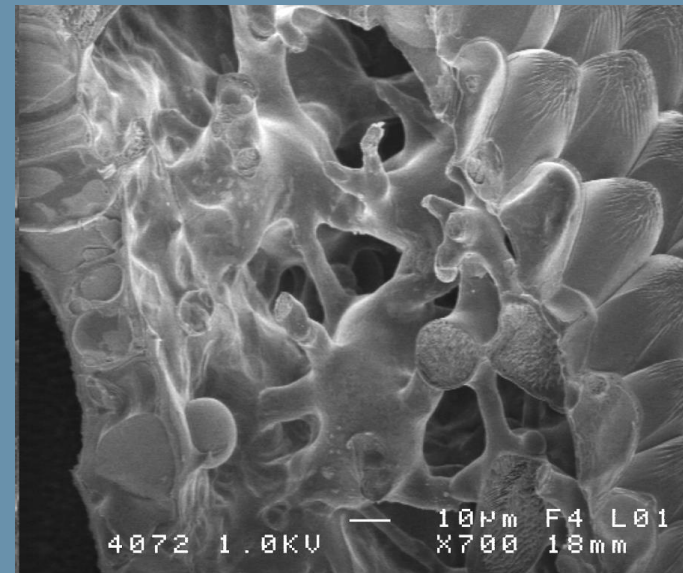
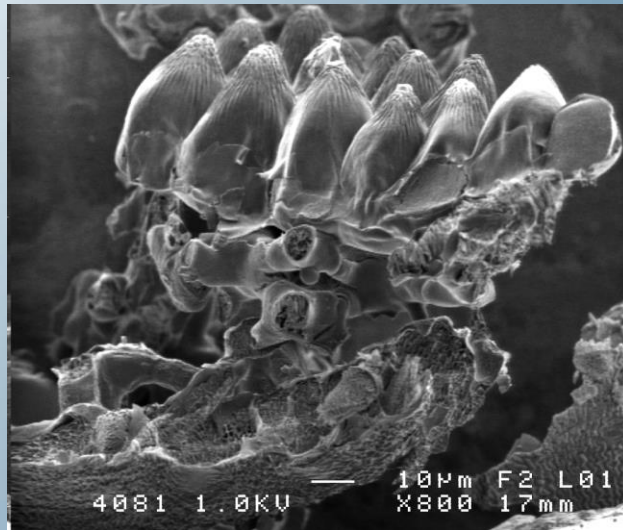
Observation des échantillons après congélation

1- La lyophilisation (freeze-etching)

**exemple : 1 journée à -150° C, 3 jours à -100° C,
une remontée de 1° /h jusqu'à la température ambiante.**

**L'observation de l'échantillon à l'état congelé,
sur une platine refroidie à l'azote liquide,
éventuellement après cryo-fracture, décapage ou
cryo-section.**

Pétale de rose, MEB à canon à émission de champ, métallisation au platine



Lyophilisation: 1 journée à -150°C , 3 jours à -100°C , remontée de $1^{\circ}/\text{h}$ jusqu'à la température ambiante.

Observation à -130C

Hallegot P., L'Oréal Recherche et Innovation

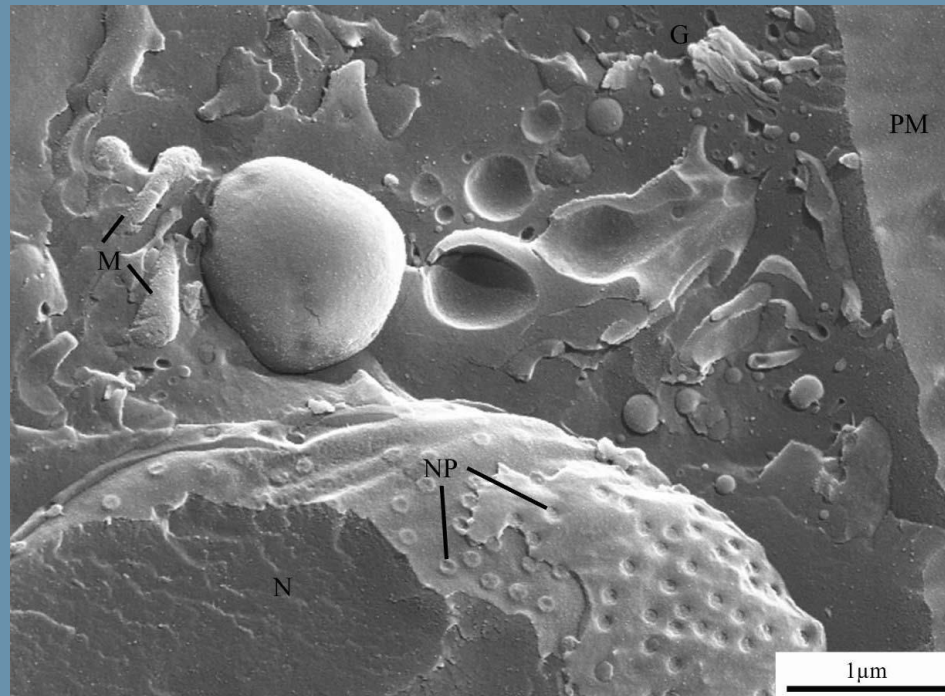
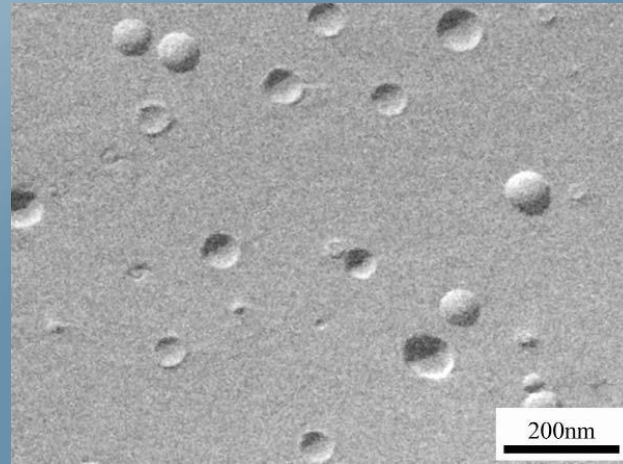
Platines de Cryotransfert destinée aux MEB-FEG

1- Systèmes intégrés sous vide permettant la congélation de l'échantillon à l'azote pâteux, la cryofracture, la métallisation et un sas de transfert dans la chambre d'observation du MEB.

2- L'opérateur a le choix de la cryofixation. Le cryotransfert est un accessoire qui peut s'adapter sur une machine de cryofracture où s'effectue la réalisation de la réplique de l'échantillon: cryofracture + métallisation. Le cryotransfert permet le passage au cryoMEB .

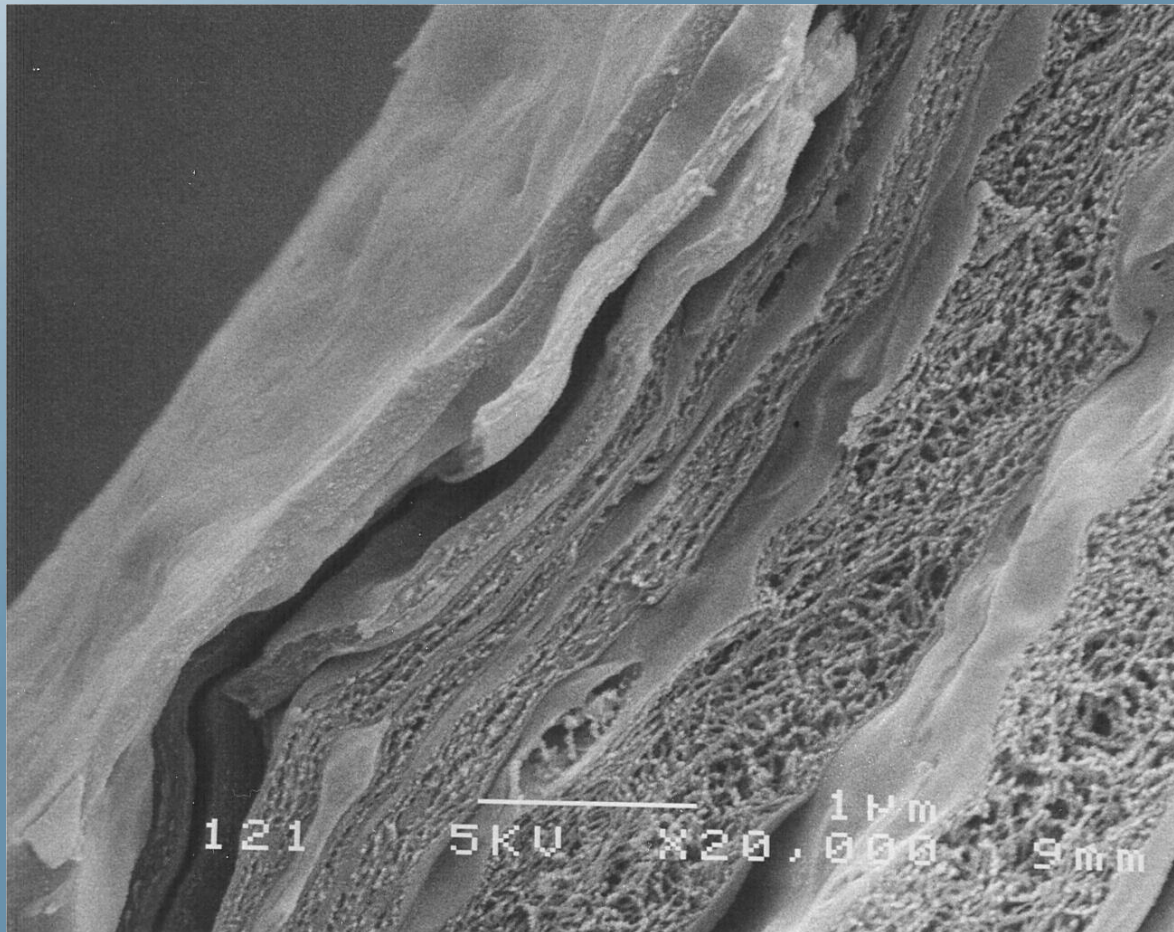
Exemples de Cryofracture haute résolution et Cryotransfert

liposomes



cellule cryofracturée

Doc. Leica



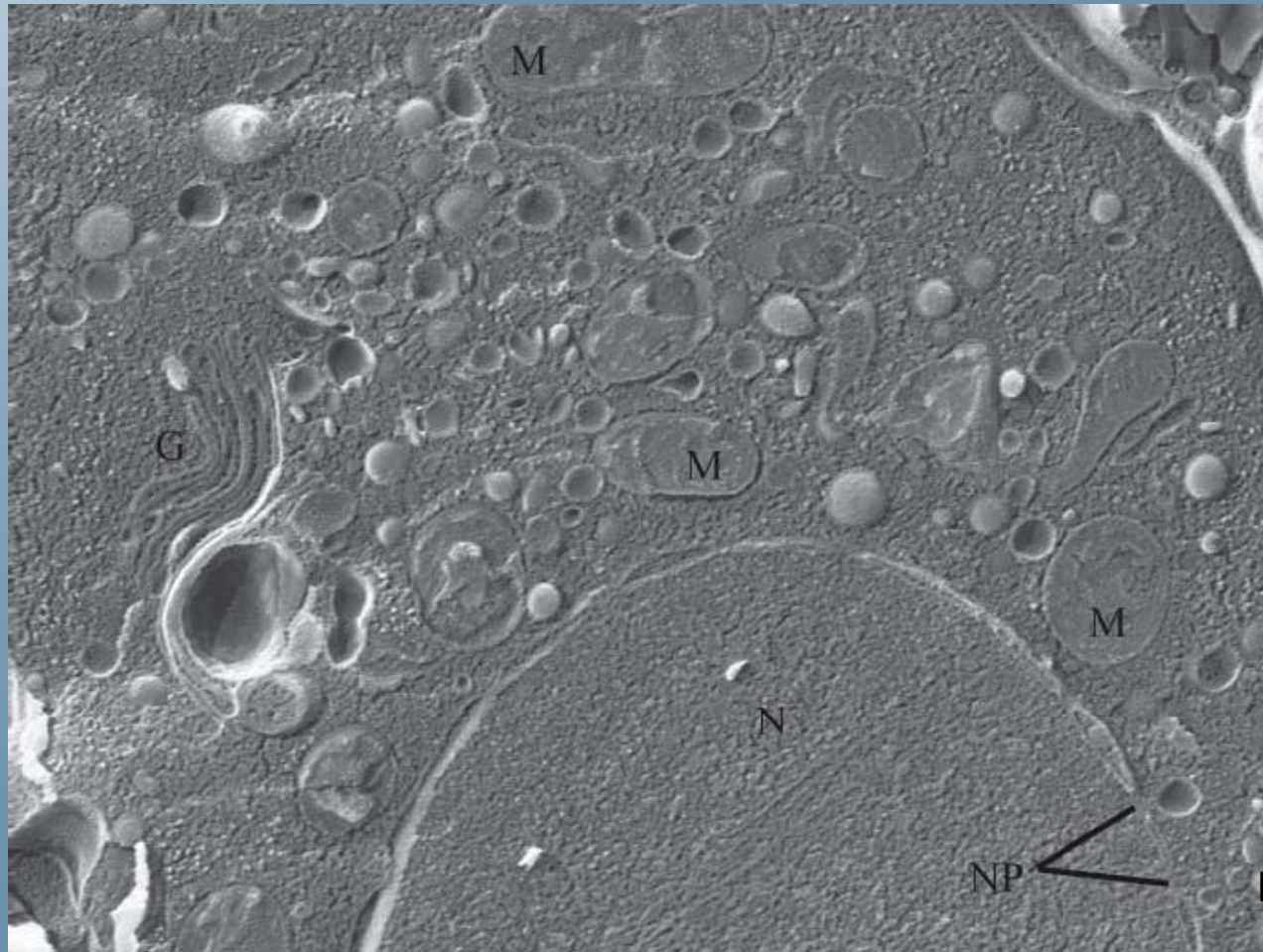
Cryo-fracture transversale de l'épiderme supérieur kératinisé de peau humaine, deux types de cornéocytes sont visibles.

Echantillon observé hydraté et à basse température, après décapage.

MEB à canon à émission de champ, 5kV, métallisation platine.

Hallegot P. et al., 1999, J. Microsc. 196, 35-39

Cryofracture : observation d'une cellule en MEB haute résolution



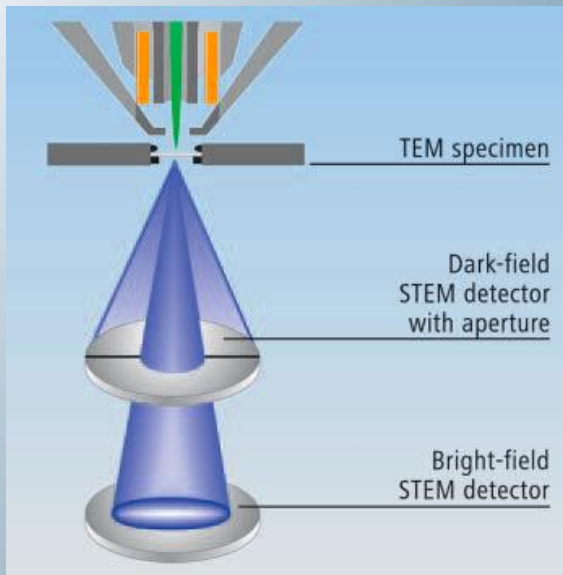
G= Golgi

M=Mitochondrie

N=Noyau

NP= pore nucléaire

Doc. Leica

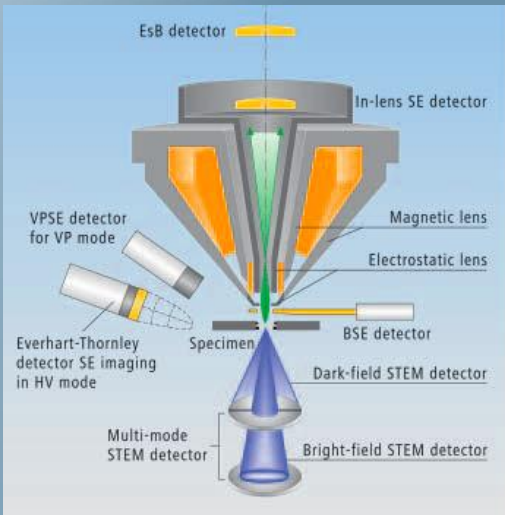


Multi-Mode STEM principle

Détecteur STEM



Cross section of stained ciliate (30kV)



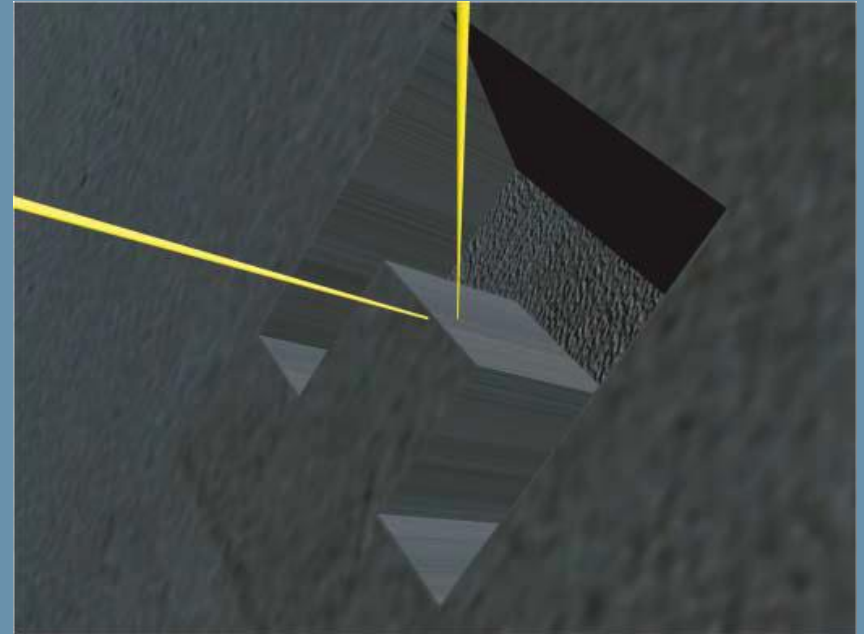
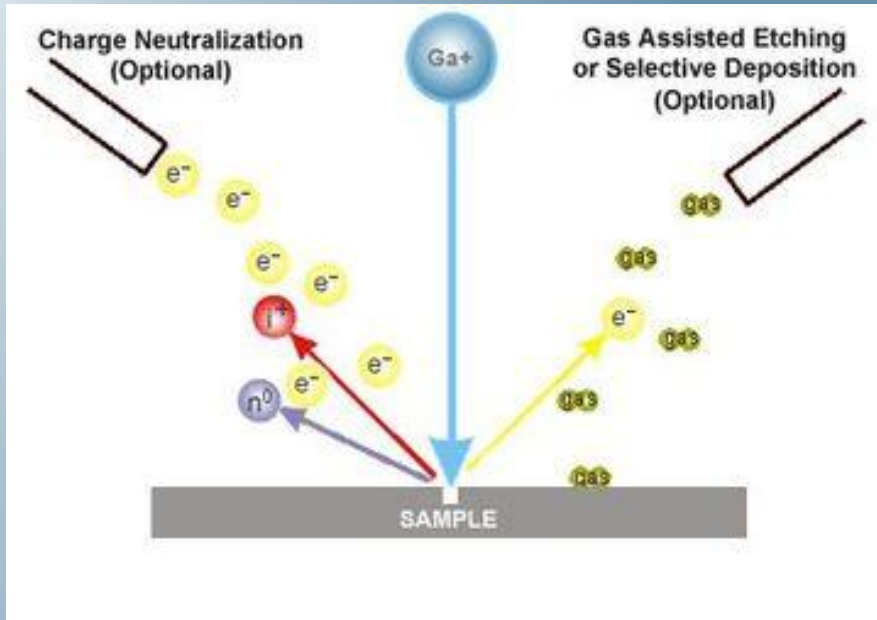
Detector systems for the FESEM

Resolution of 0.8 nm at 30 kV

J. Vermeulen and H. Jaksch, *Imaging & Microscopy 01/2005*



FIB (Focused Ion Beam)

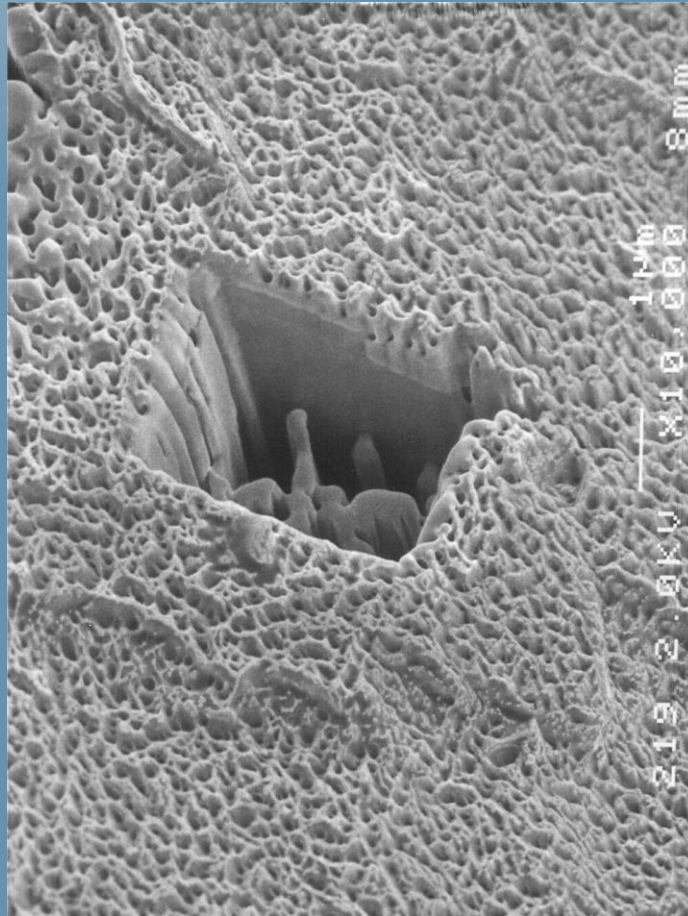


Principe du FIB

Schematic illustration of a sample cube and geometrical relationships of the imaging plane with electron and ion beams.

J. Holzer et al, 2004, J Microsc, 216, 84–95.

Application du FIB (Focused Ion Beam) :
Microdissection d'un cheveu au moyen d'une sonde gallium.



Dimensions du trou central ($2.5\mu\text{m}^3$).

Observation par MEB à canon à émission de champ, 3kV, métallisation à l'or/palladium.

MEB 3D

(SBF-SEM: Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy)

Denk W, Horstmann H (2004). PLoS Biol 2(11): e329

Conditions techniques:

Fixation chimique et inclusion en **epon**

Microtome motorisé

Diamant Diatome 35 °

Coupes 50-70 nm vitesse 0,05 à 5 mm/s

Low-vacuum (20–60 Pa H₂O)

conditions prevent charging of the uncoated block face.

Conditions d'observation:

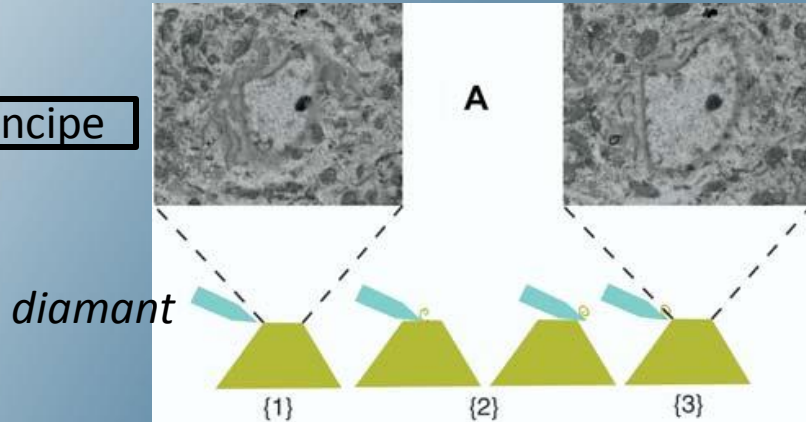
FEG SEM pression variable (40-80 Pa)

3-7 kV WD 6 mm

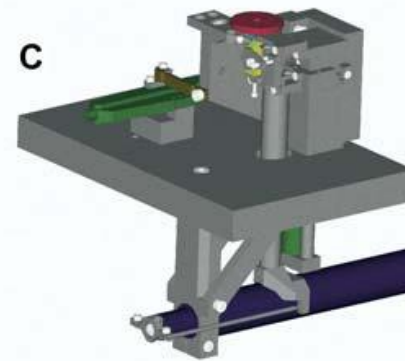
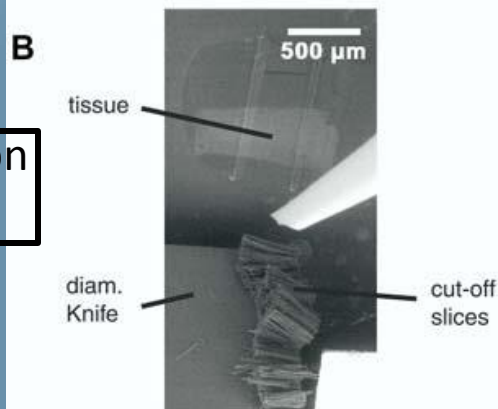
backscattered electron detector (BSED)

*This specimen preparation along with the wide field of view of 3View allowed targeting of the circuit of interest in **over 6,000 serial images, roughly 300µm** of tissue in the z orientation. The image acquisition process was completely automated, collecting 50GB of data, and took **under two weeks**.*

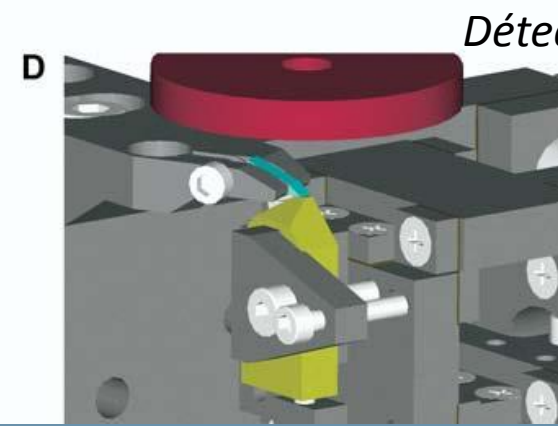
A - Principe



B - Réalisation des coupes



C,D – Microtome dans le MEB

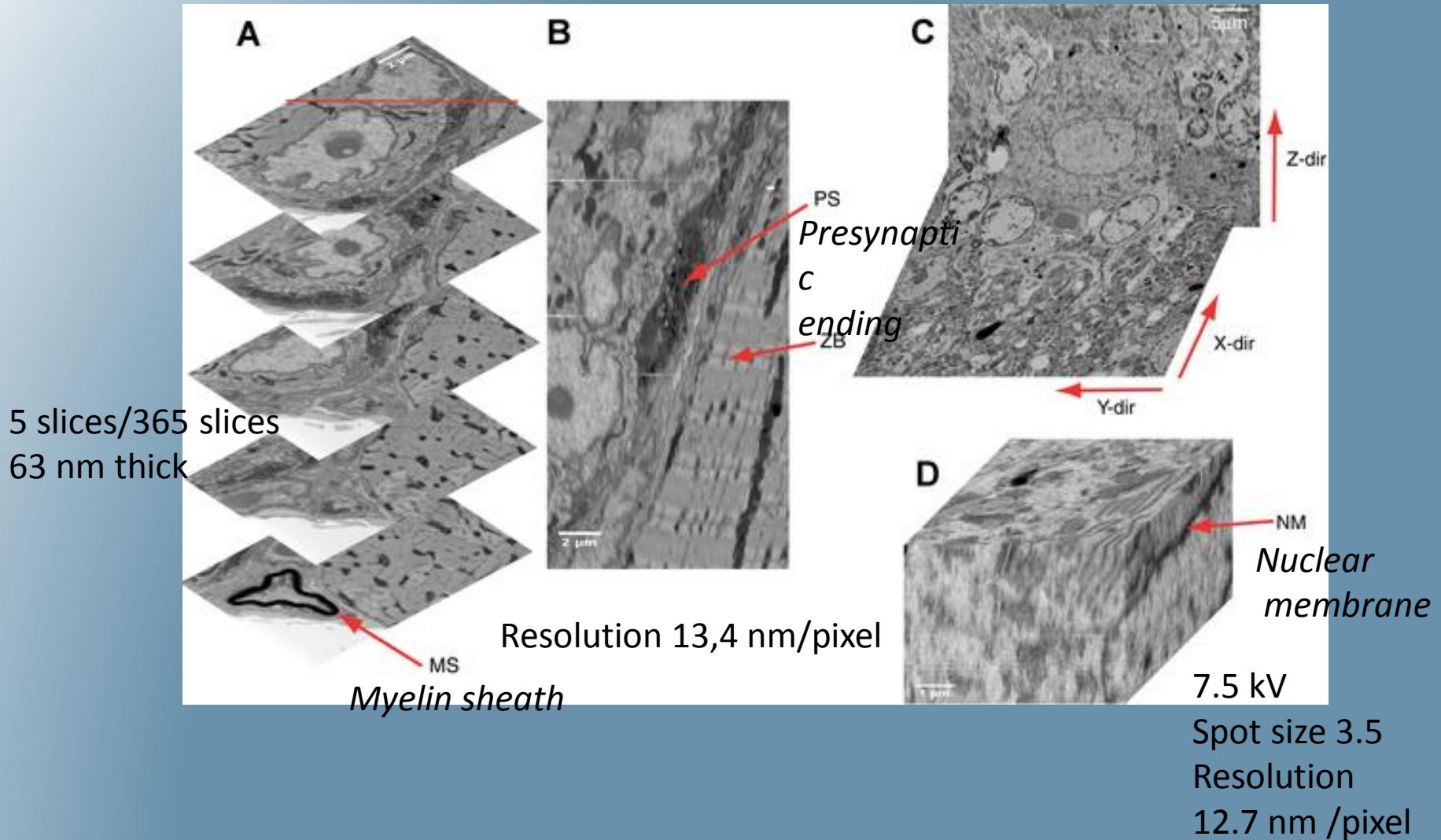


Détecteur BSE
Motorisation piezo
Métaux
non magnétiques

Tissu nerveux (*cortex cerebelleux*)

Denk W, Horstmann H (2004). *PLoS Biol* 2(11): e329

Tissu nerveux (cortex cerebelleux)



Denk W, Horstmann H (2004). *PLoS Biol* 2(11): e329

MEB de table

Caractéristiques communes:

5 kV, Source thermo-ionique (1500h),

Résolution 25 nm (45 000x)

Pression variable

Observation **sans métallisation**

Détecteur **d'électrons rétro-diffusés** (contraste chimique et topographique)

Avantages:

- Simplicité d'utilisation, accessible aux étudiants.

Applications

