



GRUPEMENT NATIONAL DE
MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE
ET DE MICROANALYSES



En convention de coopération avec la Société Française de Physique



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur

**Ecole d'été de microscopie électronique à balayage et de microanalyses
Cité scientifique de Lille, du 2 au 6 juillet 2012**

TD au choix : Biologie cryo-MEB (durée 1h30)

Coordinateur : Jean-Pierre LECHAIRE

jplechaire@yahoo.fr

Les échantillons biologiques sont fortement hydratés. Les méthodes conventionnelles de préparation pour leur observation au MEB conventionnel nécessitent une fixation chimique qui est lente suivie d'une déshydratation à l'aide d'un solvant et d'une métallisation. Toutes ces méthodes introduisent des artefacts puisqu'elles consistent à éliminer l'eau en entraînant l'extraction, la modification ou le déplacement de constituants cellulaires.

Les méthodes cryogéniques ont été largement développées en MET (microscopie électronique à transmission) pour remédier à ces artefacts introduits lors de la préparation des échantillons. Les nouvelles générations de MEB peuvent être équipées d'une platine cryogénique refroidie à l'azote liquide permettant l'observation directe de l'échantillon biologique à l'état congelé, de l'échantillon massif (1) aux macromolécules (2). Pour les échantillons massifs cette observation peut se faire par exemple après une cryofracture et une légère sublimation. Les volumes observés sont plus proches du vivant et les structures cellulaires internes sont mieux préservées. Un MEB-FEG permet de travailler à faible tension d'accélération (quelques kV) tout en gardant une résolution spatiale de l'ordre du nanomètre préservant ainsi l'échantillon biologique. Le MEB-FEG en mode cryogénique a l'avantage par rapport au MET de réduire les étapes de préparation (gain de temps) et d'obtenir des champs d'observation plus larges.

Le TD proposé permet de voir la mise en œuvre d'un type de préparation cryogénique pour un échantillon biologique. Puis son introduction directement dans la chambre d'observation du MEB-FEG équipé d'une platine refroidie à l'azote liquide où il sera observé et photographié.

Le cryo-MEB-FEG équipé d'une platine cryogénique, d'une station cryogénique et d'un cryotransfert permet d'observer des échantillons biologiques à froid qui ont été congelés dans l'azote dit « pâteux », ou en surfusion, de préférence sans fixation chimique, directement dans la station cryogénique. Avant la cryofixation l'échantillon est collé à l'aide d'une colle au graphite sur le support pour être plongé dans l'azote pâteux.

Les différents types de cryofixations et de cryopréparations pour les échantillons biologiques (3) seront discutés et comparés : avantages et inconvénients.

L'échantillon est ensuite fracturé à l'aide d'une pointe métallique ou d'un couteau à température de

l'azote liquide puis sublimé. L'échantillon peut être sublimé soit en agissant sur la température de la chambre d'observation, soit directement sous le faisceau en augmentant la température de la platine. Lorsque les structures internes de l'échantillon sont apparentes il peut être métallisé ou non par sputtering grâce au métalliseur intégré dans la station cryogénique permettant de mettre en relief les structures dégagées. L'intérêt de la métallisation et du type de métallisation sera discuté pour un échantillon biologique en mode cryogénique.

Nous retrouvons dans cette méthodologie celle utilisée en MET pour l'obtention et l'observation de « répliques » après cryofracture. L'avantage du MEB-FEG réside dans l'étendue du champ observable d'un seul tenant, et non pas fragmenté comme en MET, et dans la rapidité d'obtention du résultat puisqu'il évite toutes les étapes de lavage d'une réplique qui prennent plus de 2 jours. L'utilisation d'un MEB-FEG en mode cryogénique pour les échantillons biologiques donne des résolutions spatiales de l'ordre de quelques nanomètres comparables à celles obtenues en MET pour les répliques de cryofracture.

- (1) P. WILD, M. ENGELS, C. SENN, K. TOBLER, U. ZIEGLER, E. M. SCHRANER, E. LOEPFE, M. ACKERMANN, M. MUELLER, and P. WALTHER. Impairment of Nuclear Pores in Bovine Herpesvirus 1-Infected MDBK Cells. *Journal of Virology*, 2005, p. 1071–1083 Vol. 79, No. 2
- (2) J.D. WOODWARD, R. WEPF & B.T. SEWELL. Three-dimensional reconstruction of biological macromolecular complexes from in-lens scanning electron micrographs. *Journal of Microscopy*, Vol. 234, Pt 3 2009, pp. 287–292
- (3) A.W. ROBARDS, U.B. SLEYTR, Practical Methods in Electron Microscopy, vol. 10 : Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy, Editeur A.M. GLAUERT, Elsevier Science Publisher (1985).