

Restitution des ateliers pratiques « 5^{ème} JST du RµI » Dijon 12-14 novembre 2014

Thème des journées : Imagerie cellulaire en sciences du vivant : cryo-microscopies, dynamiques *in vivo* et interactions moléculaires.

Les présentations ont été axées sur différentes applications autour de l'imagerie cellulaire en sciences du vivant (animal, végétal et micro-organismes). Ont été abordées plus précisément les problématiques sur la préservation des échantillons par utilisation de cryométhodes en microscopie électronique, mais également sur la dynamique *in vivo* et les interactions moléculaires en microscopie photonique de fluorescence.

Un large choix d'ateliers pratiques a été mis en place pour permettre aux participants de s'initier ou d'approfondir leurs connaissances en présence de spécialistes en ultracryomicrotomie, congélation haute pression/cryosubstitution, MEB et MET haute résolution, microscopie bi-photonique, FRET/FLIM et FRAP.

I- Cryo-méthodes :

cf présentations : Bruno Humbel, Etienne Gontier et Mélina Petrel, Lysiane Brocard, Christine Longin-Péchoux et Cédric Gaillard.

Atelier 1 : Cryo-méthodes : ultra cryo-microtomie (Helmut Gnaegi, Mélina Pétreil et Laure Avoscan)
Cryo-coupes basées sur la technique de Tokuyasu (1973).

Principe et objectif de la technique

La technique de Tokuyasu permet de congeler rapidement à très basse température des échantillons biologiques.

Cette technique s'applique pour des localisations fines de molécules (protéines ou acides nucléiques) au sein d'un tissu ou cellules à l'échelle de l'organite. Cette technique peut s'appliquer dans le cas de marquage trop faible en résines hydrophiles.

Matériels/Equipements (Figure 1)

Equipement : Ultramicrotome Leica équipé d'une chambre de coupe cryo

Liste du petit matériel nécessaire à la coupe cryo : des clous dégraissés, du papier filtre sans cendres, de la glace, de l'azote liquide, un dewar, des pinces, des cils, un pinceau très fin, des pipettes plastiques, une oese ou « perfect loop », un diamant de préparation « Trim » et un diamant de coupes à 35°, des grilles de nickel – formvar, des lames de verres, du bleu de toluidine et des tubes plastiques cryo.

Tous les instruments de préparation doivent être refroidis soit sur la glace (mettre entre du parafilm) et les essuyer pour éviter la formation de condensation.

Procédure

Avant l'étape de la coupe, les échantillons sont fixés chimiquement, enrobés en saccharose 2.3M, déposés sur un support (clou) et congelés par immersion dans l'azote liquide. A partir de là les

échantillons pourront être coupés, la coupe se fait en 2 étapes : l'étape de préparation du bloc qui correspond à retirer l'excédent de saccharose autour de l'échantillon afin d'obtenir une surface plane et d'environ 1 à 2 mm². Cette étape est réalisée à l'aide d'un diamant de dégrossissage « Trimmer » à la température de -80°C.

Cette étape peut également être appliquée pour réaliser des coupes « semi-fines » de 500 nm à 1 µm d'épaisseur. Ces coupes serviront à réaliser des immuno-localisations révélées par des fluorochromes ayant pour but, si nécessaire, de tester de nouveaux anticorps primaires, des protocoles et d'avoir une 1^{ère} idée de la présence (quantité et localisation) des antigènes d'intérêts.

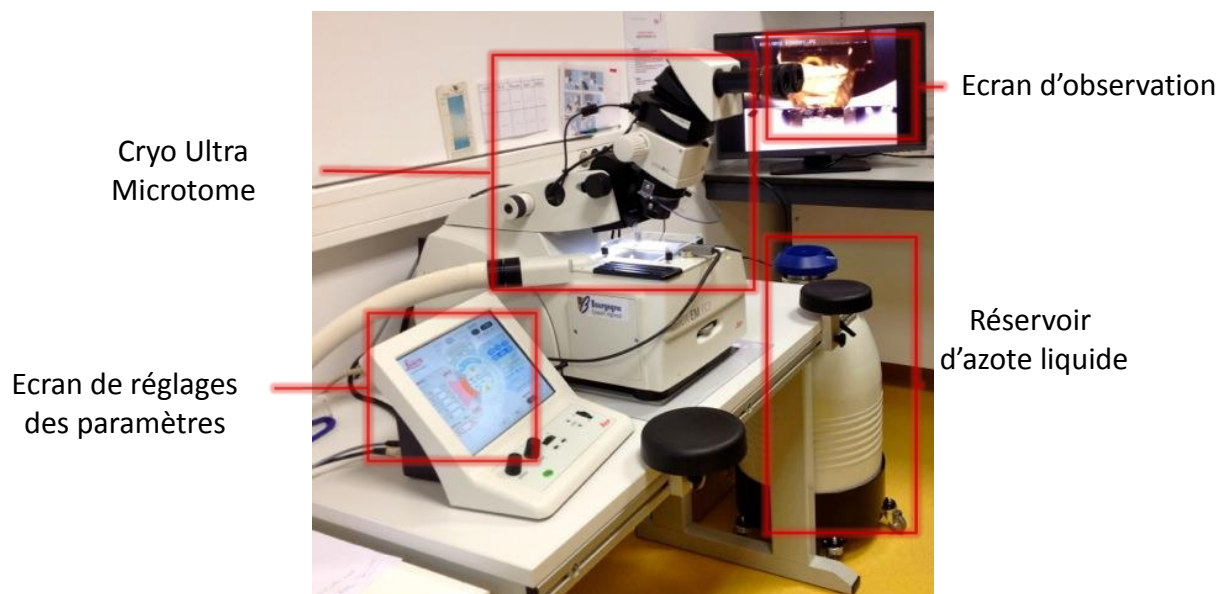
NB : récupération : saccharose 2.3M sur lame de verre sans chauffer

La 2^{ème} étape, délicate, est la coupe « fine » de 70 à 100 nm d'épaisseur, la température varie entre -110°C et -120°C en fonction de la concentration de glutaraldéhyde présente dans le mélange de fixation: ie plus la concentration en glutaraldéhyde est élevée plus les blocs sont durs et la température de coupe sera élevée (-100°C/-110°C).

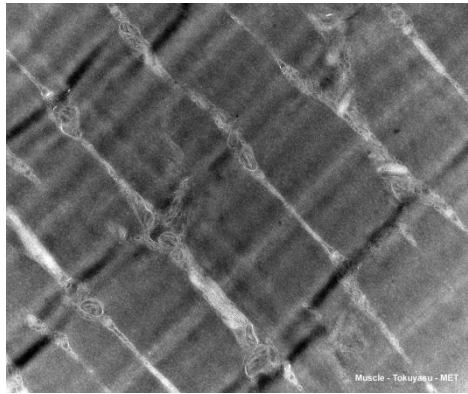
Les coupes sont réalisées à l'aide du diamant de coupes avec un angle de 35° ce qui limite les compressions, pour limiter aussi les effets électrostatiques un ioniseur est installé dans l'axe du couteau, en ajustant la puissance des ions projetés dans l'enceinte de coupe, on peut soit « décoller » le ruban soit « coller » le ruban sur la surface du couteau. Lorsqu'on a obtenu un ruban de 3-5 coupes, on l'amène délicatement à l'aide d'un cil sur la surface du couteau et on récupère le ruban à l'aide d'une « oese » contenant une goutte de mélange méthyle cellulose/saccharose 2.3M (V/V), si on veut une petite goutte plonger et retirer lentement l'oese du tube. Approcher l'oese du ruban est lorsque les bords commencent à blanchir « piquer » le ruban, sortir le tout de l'enceinte, attendre que la goutte se décongèle ce qui permet l'étalement des coupes à la surface et déposer sur une grille de nickel. Déposer la grille sur du parafilm étalé sur le fond d'une boîte de pétri elle-même reposant sur de la glace pendant la durée de la coupe.

L'élimination des poussières, coupes etc sur le couteau peut se faire à l'aide de pipettes plastiques après avoir prélevé de l'air froid dans l'enceinte de coupe.

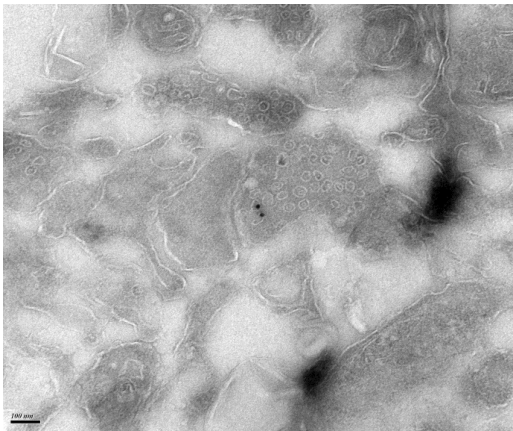
Figure 1



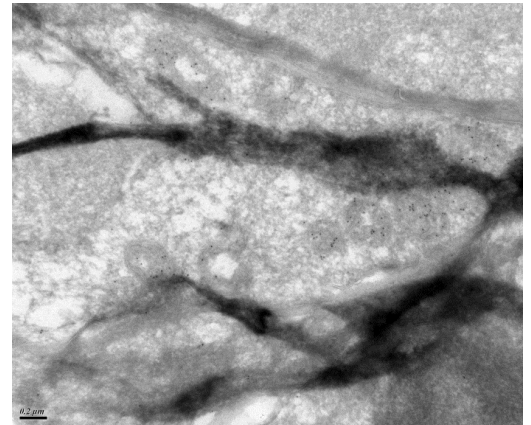
Muscle de souris – sans marquage



Immuno-marquage



Cortex préfrontal de rat marqué pour un récepteur D1
Photos Méлина Пётrel, BIC Bordeaux



Levure marquée pour les mitochondries

Atelier 2 : Cryo-méthodes : Congélation sous haute pression, cryosubstitution (Etienne Gontier, Jeannine Lherminier, Véronique Aubert)

Principe et objectif de la congélation sous haute pression (livre cryo-méthode)

La congélation sous haute pression (HPF) est une technique de fixation permettant le maintien optimal de l'ultrastructure native des échantillons par conservation de l'eau congelée à l'état vitreux.

Le but est de pouvoir stabiliser et observer en microscopie un échantillon hydraté le plus proche possible de son état natif, par vitrification de la phase aqueuse.

La congélation sous haute pression est une congélation ultra-rapide (de l'ordre de quelques ms) à une pression élevée (2 100 bars) avec ou sans cryo-protectant. On peut ainsi traiter des échantillons massifs, des suspensions cellulaires et des cellules adhérentes en culture.

Matériels/Equipement

Equipement : HMP [100 Leica] Figure 1

cryo-protectants : hexadécène 100% ou dextran 15 % ou BSA 20%

Petits matériels : Figure 2

Procédure

L'échantillon est pris en sandwich dans une cupule, éventuellement en présence de cryoprotectant. L'azote liquide est utilisé comme milieu de refroidissement mis sous pression.

La cupule contenant l'échantillon est placée dans la chambre du HMP (Figures 3 – 4) cette dernière est refermée. L'échantillon est congelé en quelques milli-secondes sous haute pression par simple pression d'un bouton !

L'épaisseur optimum cryo-congelée dépend de la méthode appliquée et du contenu en eau libre de l'échantillon. En HPF, l'épaisseur parfaitement congelée varie entre 100 à 300µm.

L'échantillon ainsi congelé peut être soit conservé, coupé et observé à froid (CEMOVIS), soit inclus en résines hydrophobes ou hydrophiles : on parle alors de cryo-substitution.

Principe et objectif de la cryo-substitution

La phase liquide des échantillons après être solidifiée par cryo-fixation, sera substituée à basse température par un solvant organique. L'imprégnation et l'enrobage en résines se font à basse température.

Matériels/Equipement

Figures 1 -2

Procédure

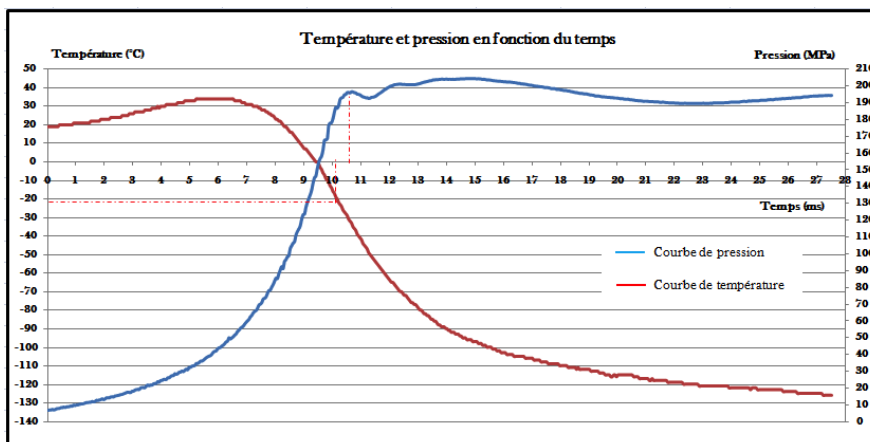
Les échantillons cryo-fixés sont déposés dans les cupules dans la chambre de préparation de l'AFS (Leica) à -90°C en présence d'un milieu composé d'un solvant organique (acétone, éthanol ou méthanol) contenant un fixateur chimique (acétate d'uranyle, tétroxyde d'osmium ou aldéhydes). Les échantillons sont ainsi fixés entre 8 et 80 heures. La durée de cette étape dépend de la nature de l'échantillon, les échantillons à paroi épaisses i.e. plantes, levures, bactéries...nécessitent de plus

longs temps de substitution que les cellules animales. En résumé, plus la déshydratation est lente et longue meilleure est la préservation du tissu, et donc permet de diminuer les artefacts.

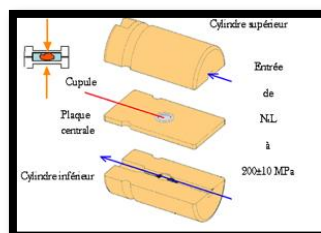
Cette étape est suivie par l'étape d'imprégnation en résine avec une remontée en température. La température sera choisie en fonction des résines, par exemple pour du Lowicryl HM20 l'imprégnation se fera entre -50°C à -30°C, alors qu'elle sera de -70°C pour du HM23 (ref humbel)

La température de polymérisation se fera aussi en fonction de la résine utilisée, de -50°C à -30°C pour les résines lowicryl, +56°C pour l'épon.

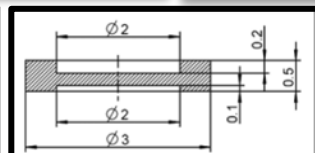
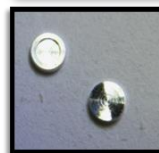
Courbe de température et de pression



Figures 1 et 2



Cartouche tri-partite



Cupules aluminium 3 et 6 mm

II- Les F-Techniques

Cf présentations : Corentin Spriet/François Waharte, Christophe Der, Anouck Habrant, Alain Jauneau et Jean-Marie Perrier-Cornet.

Atelier 3 : FRAP

Principe et objectif

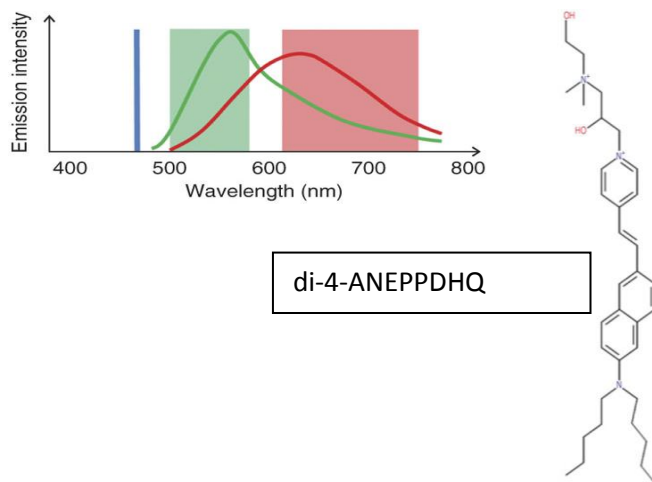
La sonde fluorescente incorporée dans la membrane plasmique (figures 1 et 2A) est photoblanchie dans une zone donnée (2B, carré à bordure blanche). Le retour de fluorescence dans cette zone est observé (2C) dans le temps.

Matériels et équipements

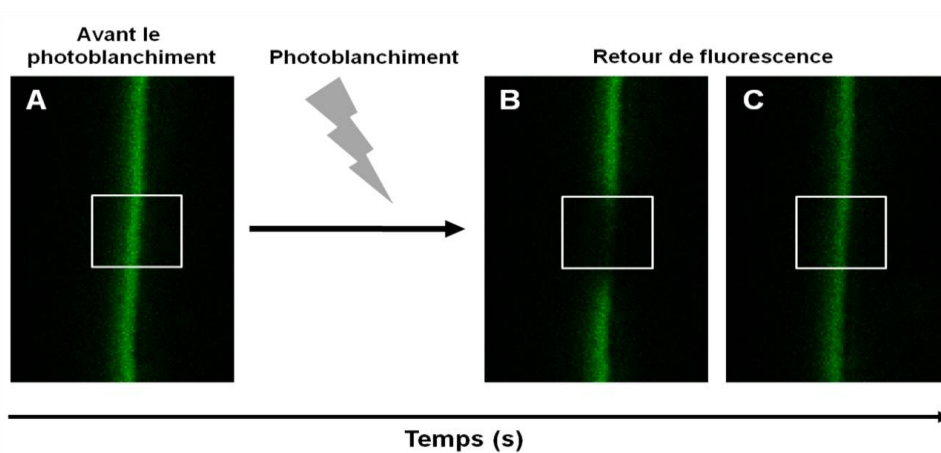
Cellules BY2, sonde di-4-ANEPPDHQ, microscope confocal Leica SP2

Procédure

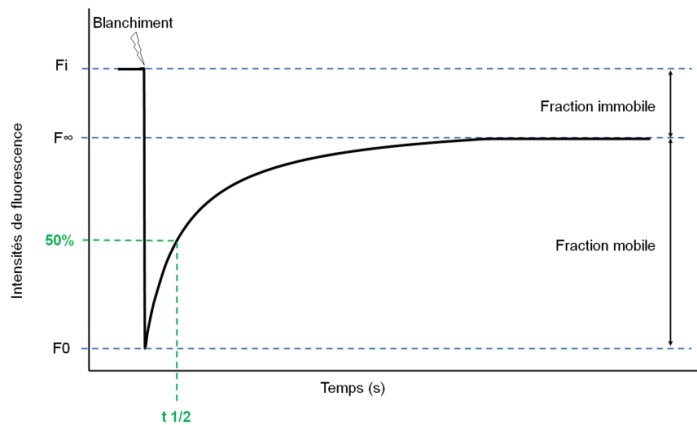
1



2



3



La technique de FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), connue depuis plus de 30 ans, a fait l'objet d'un important développement avec l'introduction de protéines fluorescentes chimériques, marquées par la GFP, dont la stabilité photochimique est grande. Deux paramètres peuvent être dérivés d'une expérience de FRAP (figure 3) : la fraction mobile (mf) (qui correspond à la quantité de fluorescence effectivement récupérée après photobleaching) et le temps de diffusion ($t_{1/2}$). La valeur de la fraction mobile est influencée par les interactions d'une protéine fluorescente avec d'autres molécules ou une membrane (des microdomaines lipidiques par exemple vont limiter les mouvements d'une protéine). Le temps de diffusion est proportionnel à la constante de diffusion (D) qui dépend elle-même des propriétés hydrodynamiques de la molécule observée et de son environnement (c'est-à-dire du milieu cellulaire). La technique de FRAP est donc particulièrement bien adaptée à la mesure du trafic et des mouvements dans et entre les compartiments cellulaires. Cette technique a ainsi été utilisée pour mesurer l'intensité et la vitesse du passage d'une protéine de son lieu de synthèse, le réticulum endoplasmique, à son lieu de maturation, l'appareil de Golgi [1], ainsi que la vitesse de renouvellement d'une protéine membranaire, sa vitesse de diffusion latérale dans les membranes, et la vitesse comparée des différentes voies d'endocytose [2-4]

Techniques de dynamique complémentaires:

- SPT (Single Particle Tracking)
- FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy)
- FRET (Förster Resonance Energy Transfer)

[1] Presley JF, Cole NB, Schroer TA, et al. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 1997; 389 : 81–5.

[2] Reits EA, Neefjes JJ. From fixed to FRAP : Measuring protein mobility and activity in living cells. *Nat Cell Biol* 2001; 3 : E145–7.

[3] Oancea E, Meyer T. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell* 1998; 95 : 307–18.

[4] Oancea E, Teruel MN, Quest AF, Meyer T. Green fluorescent protein (GFP)-tagged cysteine-rich domains from protein kinase C as fluorescent indicators for diacylglycerol signaling in living cells. *J Cell Biol* 1998; 140 : 485–98.

Atelier 4 : FLIM-FRET

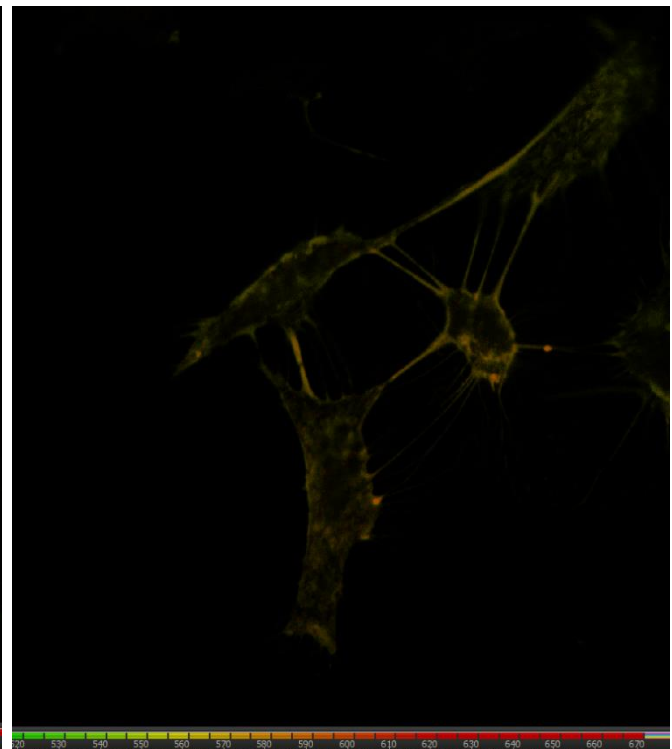
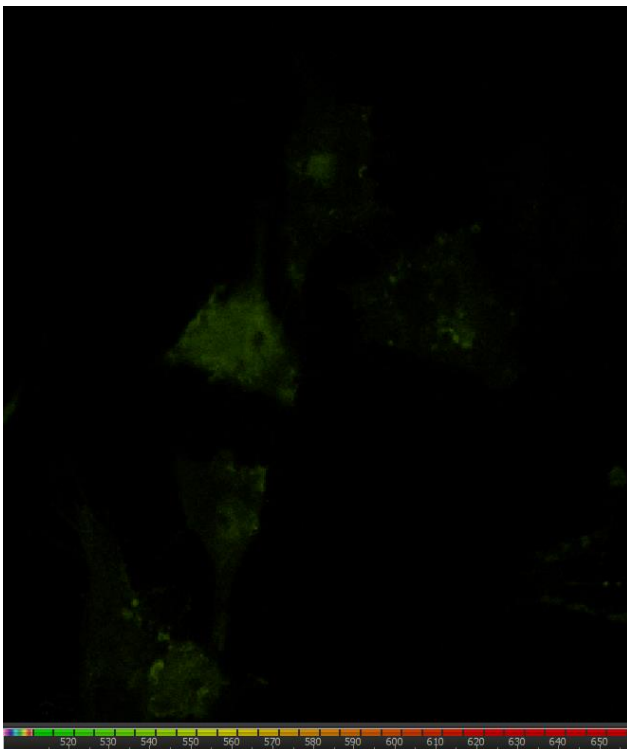
Principe et objectif

FRET – détecter l'interaction entre deux molécules en visualisant leur proximité, le FRET modifie le temps de vie de la fluorescence du donneur

FLIM – technique de mesure du temps de vie

Matériels et équipements

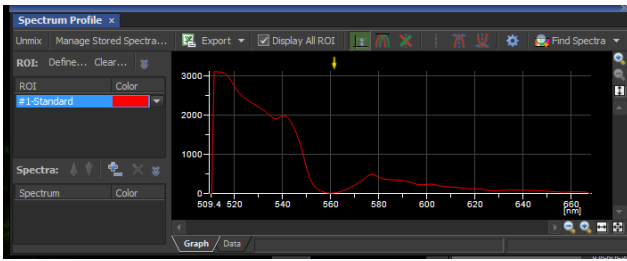
- Un microscope confocal
- Un laser pulse (ici 485nm), on peut contrôler la fréquence du pulse
- Un détecteur, il va détecter un photon et le positionner dans le temps
- 2 types d'échantillons – 1 avec juste le donneur – 1 avec le donneur et l'accepteur (ici le donneur et l'accepteur sont liés par un linker de 40aa)
- Une carte de comptage électronique
- Un logiciel d'acquisition et d'analyse (ici SymPhoTime)



Procédure

Images



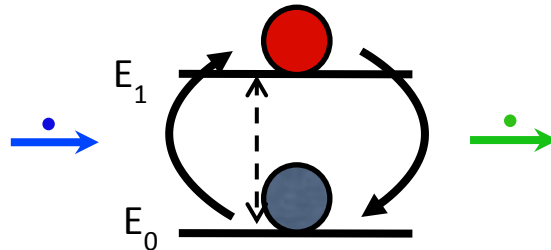


Atelier 5 : Biphoton

Principe et objectif

Excitation à 1 photon

$$\Delta E = hc/\lambda$$



Retour à l'état fondamental :
émission d'un photon de fluorescence

Excitation à 2 photons

$$\Delta E = 2hc/\lambda$$

Densité de photon nécessaire :
 10^6 x plus que pour l'excitation à 1P.



absorption simultanée
de 2P

Intérêt de l'excitation à 2P

- amélioration du contraste par diminution du bruit de fond
- peu de photodégradation en dehors du plan observé
- pénétration 2 à 3x supérieure du faisceau IR dans les échantillons épais par rapport à de la lumière bleue. (jusqu'à 500 micromètres)

$$\text{Limite de diffraction} = \frac{1.22\lambda}{NA}$$

La limite de résolution reste la même que pour la microscopie confocale.

Matériels et équipements

Microscope Biphoton – Nikon A1-MP

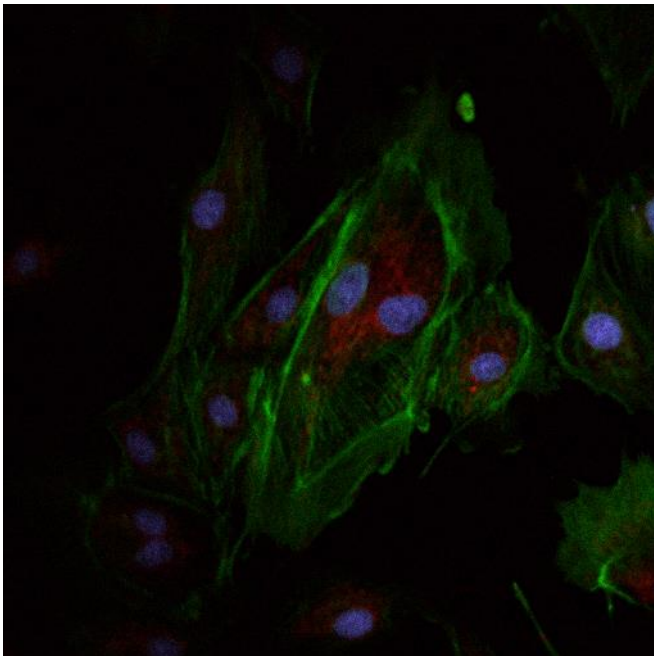


Images

DAPI

Alexafluor 488

Mitotracker



III- Microscopie Electronique à Haute Résolution

Atelier 6 : MEB-FEG et MET-FEG (haute résolution) (Frédéric Herbst, Rémi Chassagnon, Aline Bonnotte)

Principe et objectif

La microscopie en haute résolution, à l'aide de microscopes électroniques soumis à des hautes tensions d'accélération (de 200 à 300kV) est essentiellement utilisée par des physiciens (métallurgistes, mécaniciens...) travaillant à l'échelle de l'atome. Mais ces modes d'observation peuvent aussi être appliqués à la biologie, permettant des observations d'interactions ou des observations sur des coupes épaisses en vue de réaliser des analyses tomographiques. Avec la haute résolution il est possible d'observer des nanostructures au sein des cellules, matériaux de plus en plus utilisés dans les nanotechnologies.

Plusieurs sources d'électrons possibles : filament de tungstène, cristal de lanthane, ou les canons à électrons (FEG) qui sont des sources très brillantes et donnent une meilleure résolution.

MEB-FEG : JEOL JSM7600F

Canon à émission de champ à cathode chaude Scottky

Tension d'accélération : 0.1 kV à 30 kV courant de sonde : 1pA à 400nA

Ultra haute résolution en imagerie (1nm @ 15KV, 1.5nm @ 1KV, 3nm @ 15kV 5nA)

Excellentes capacités analytiques courant de sonde jusqu'à 400 nA

Equipements pour l'imagerie

Images en électrons secondaires

- détecteur LEI (Everhart et Thornley)
- détecteur SEI dans la dernière lentille

Images en électrons rétrodiffusés

- détecteur RBEI (compo-topo)
- détecteur LABE sous la dernière lentille

Images de localisation de la protéine Muc5B dans des muqueuses buccales (A Bonnote)

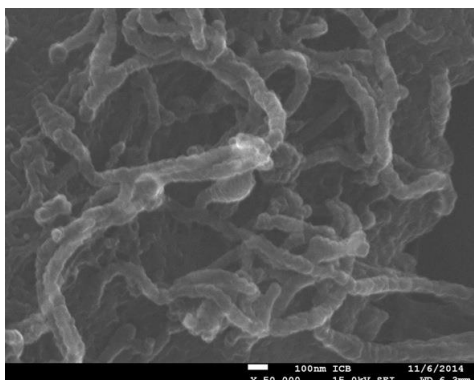


Image en électrons secondaires à 15kV

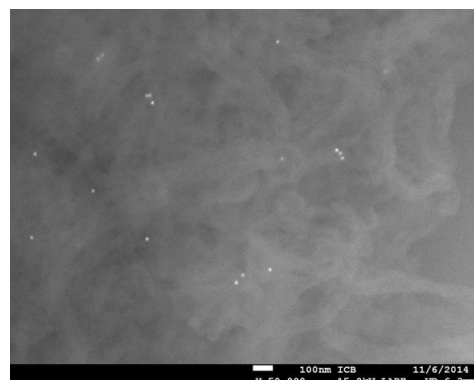


Image en électrons rétrodiffusés à 15kV

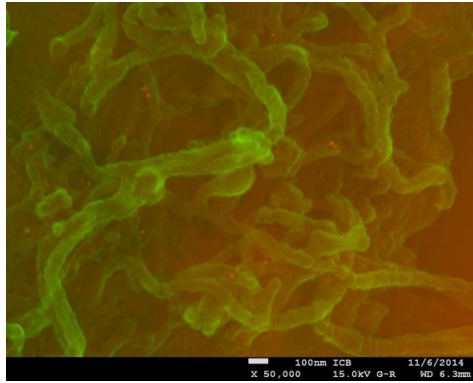


Image en électrons secondaires à 15kV « colorisée »

MET-FEG : JEOL JEM 2100 LaB6

résolution à 200kV → 0.19 nm

	Emission thermique		Emission de champ
	W	LaB ₆	Schottky ZrO/W
Brillance (A/cm ² /str) @ 200kV	5.10 ⁵	5.10 ⁶	5.10 ⁸
Taille de la source	50 μm	10 μm	0.1-1 μm
Courant (nA)	1-10	50-100	1-10000

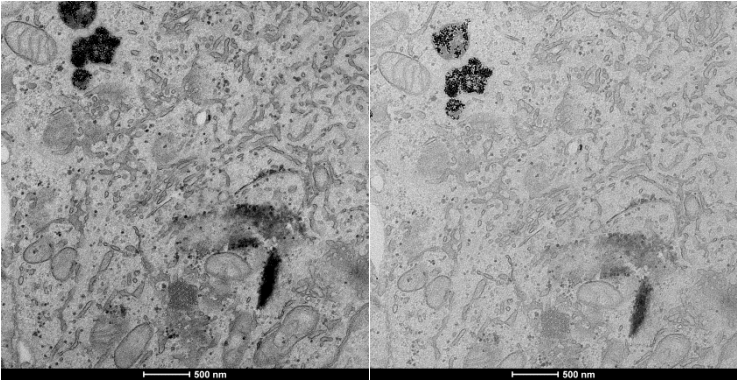
Intérêts de l'émission de champ

- La cohérence du faisceau (e⁻ monocinétiques), moins d'aberration chromatique, meilleure résolution
- La brillance, diminution temps acquisition en mode EDS, EELS, GIF
- Couplage STEM, meilleure résolution, diminution tps d'exposition, STEM/ADF, STEM/3D
- Taille de sonde, analyse locale

Inconvénients

- Irradiation, diminution taille diaphragme condenseur, spot size, => cryo-MET
- Effets de charge, vent électrostatique, => « métallisation » de l'échantillon, utilisation d'un diaphragme motorisé (plus près de l'échantillon)

Images comparatives de la même structure à différentes tensions

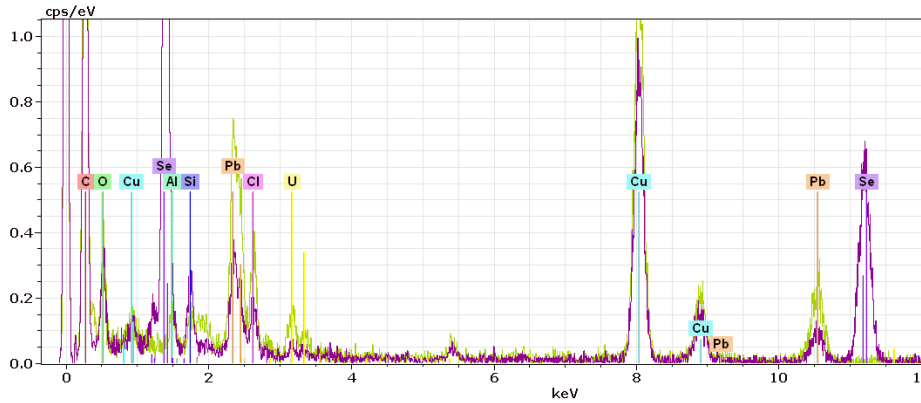
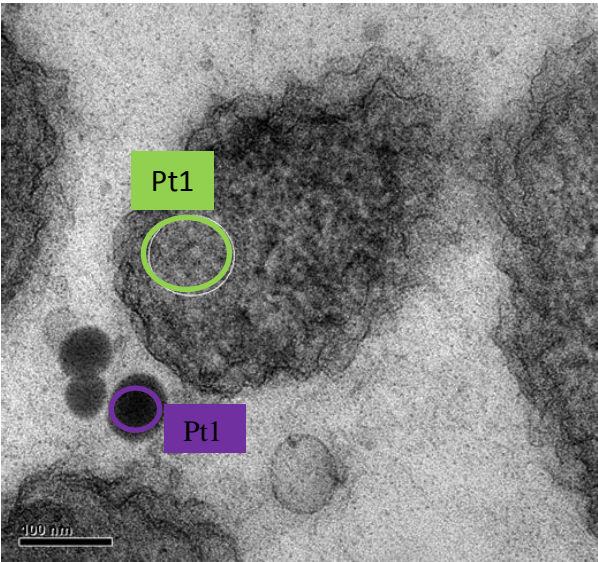


80kV

120kV

Le MET- JEOL JEM 2100 est équipé d'un système d'analyse EDS qui permet de réaliser des analyses chimiques.

Exemple d'analyse chimique sur des bactéries exposées ou non au sélénite 2mM



Le MET- JEOL JEM 2100 est équipé d'un système STEM (Scanning Transmission Electron Microscopy), ceci couplé à l'EDS permet une cartographie analytique sur coupes minces

