

UMS 3420



université  
de BORDEAUX

**Inserm**  
Institut national  
de la santé et de la recherche médicale

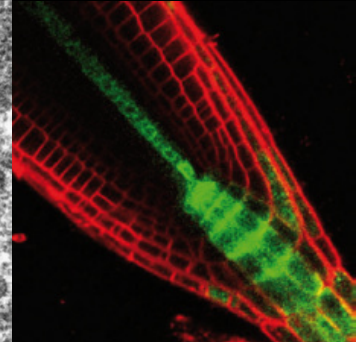
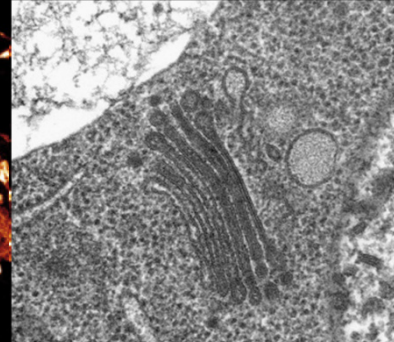
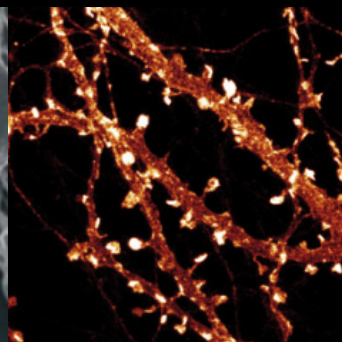
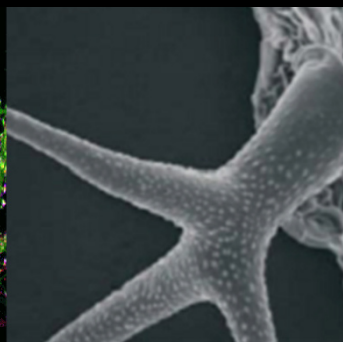
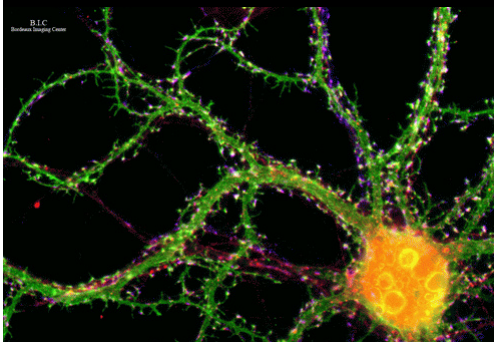
US 4

[www.bic.u-bordeaux2.fr](http://www.bic.u-bordeaux2.fr)



# BIC

## Bordeaux Imaging Center



# BIC

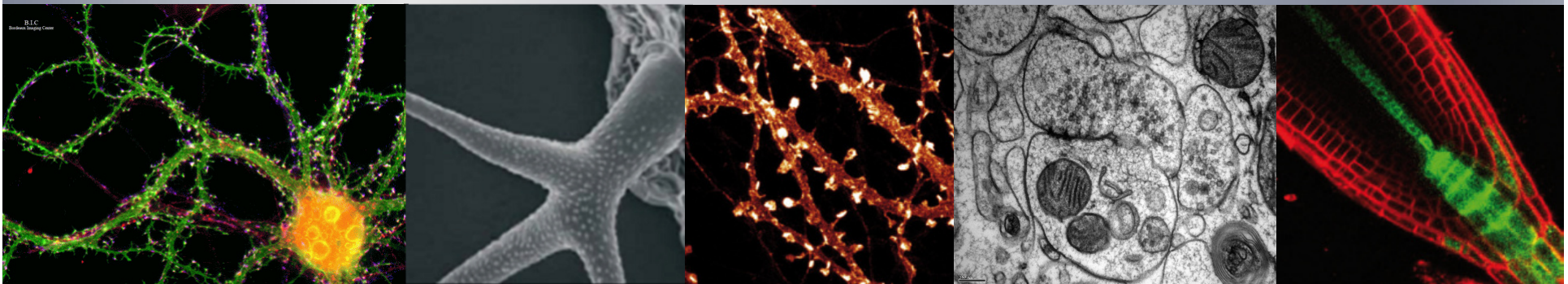
Bordeaux Imaging Center

**I - CONGELATION SOUS HAUTE PRESSION**

**II - CRYO-SUBSTITUTION**

**TISSUS ANIMAUX/CELLULES ADHERENTES.**

***Etienne GONTIER – Melina PETREL***



# *I - CONGELATION SOUS HAUTE PRESSION*

## *Les bases de la congélation haute pression*

Fixation chimique = limitations



Le fixateur pénètre **lentement** dans les tissus et son action est progressive  
→ stabilisation complète des structures après un certain délai:

=> Pendant lequel des **remaniements structuraux** = modification morphologique

=> Perte des Antigènes = immunodétection faible

=> Redistribution des électrolytes inorganiques = composition chimique

⇒ **Chercher une alternative**

# *I - CONGELATION SOUS HAUTE PRESSION*

## *Les bases de la congélation haute pression*

### La **CRYO-FIXATION**

Définition: *stabiliser les structures biologiques Hydratées  
par congélation de la phase aqueuse*

Objectif : *Maintenir l'eau dans l'échantillon => se rapprocher de l'état natif*



## ***La congélation à haute pression***

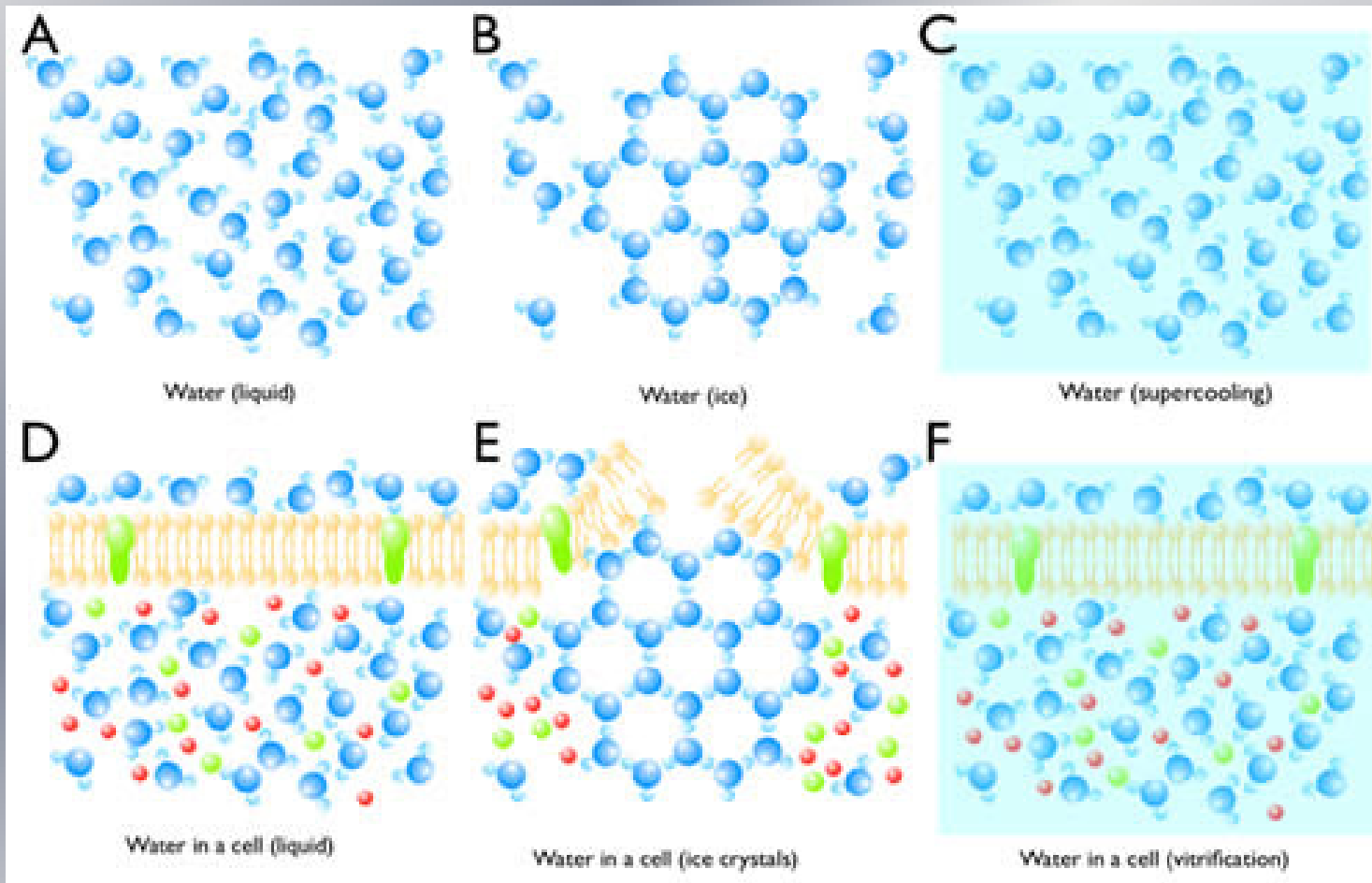
- fut développée dans les années 1960
- par **Moor H. & Riehle U.** (1968) à École polytechnique fédérale de Zurich

se base sur le principe de la **vitriification de l'eau**



*Transformation de l'eau liquide en eau solide sans formation de cristaux  
=> obtenir une glace vitreuse amorphe*

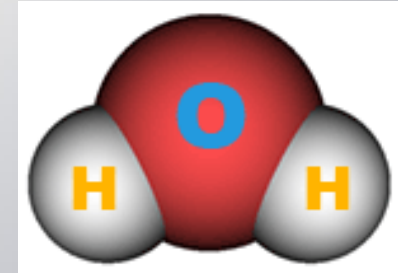
Moor, H. & Riehle, U. (1968) Snap freezing under high-pressure: a new fixation technique for freeze-etching. Proceedings of the 4th Eur. Reg. Conference Electron Microscopy, Vol. 2 (ed. by D.Bocciarelli), pp. 33-34.



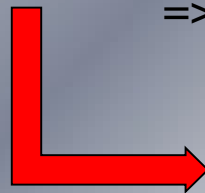
**Principe :**

**Etat vitreux = état métastable**

$T^{\circ} < -135^{\circ}\text{C}$  ( $T_g$  eau)

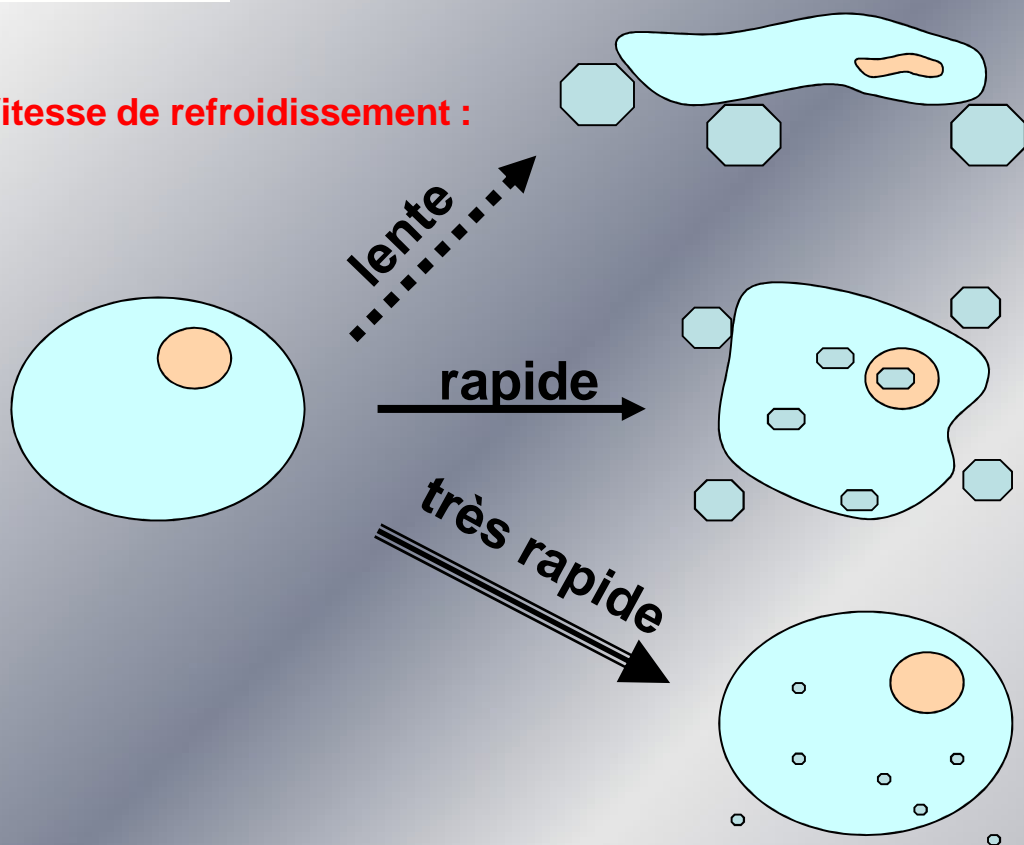


*vitesse de refroidissement ou abaissement de la  $T^{\circ}$  de l'eau pure  
=> au moins  $10^6^{\circ}\text{C/s}$  à une  $T^{\circ} < -196^{\circ}\text{C}$*



- $\Rightarrow$  Concentration de l'eau dans l'échantillon
- $\Rightarrow$  Pression

Vitesse de refroidissement :



glace hexagonale

$T^{\circ} > -73^{\circ}\text{C}$

formes cristalline

glace cubique

$T^{\circ} > -90^{\circ}\text{C}$

Plus la congélation est **rapide**  
plus les cristaux sont **petits**

Plus les cristaux sont petits  
mieux l'ultrastructure est  
préservée

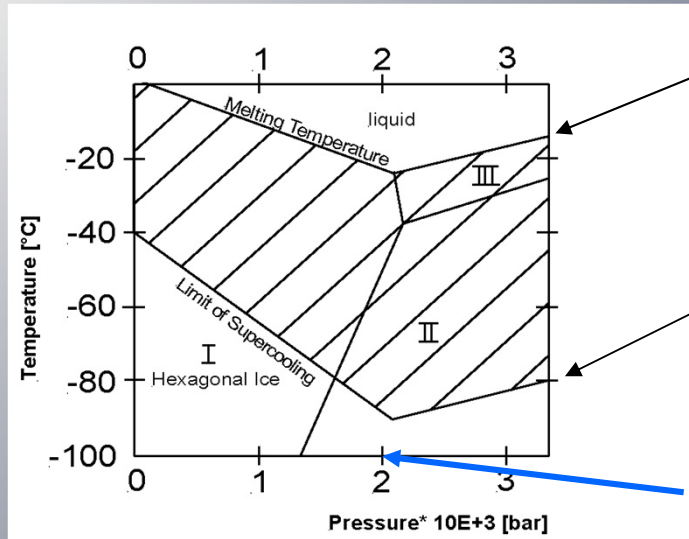
La préservation **optimale** est obtenue lorsque l'eau congèle à **l'état vitreux**



Nécessité de congélation **ultra-rapide**



**Diagramme de phase de l'eau**



congélation de l'eau

nucléation de l'eau

A 2050 bars / à -90°C :

- ❖ L'eau est 1500 fois plus visqueuse qu'à pression ambiante  
⇒ Réduction du potentiel de cristallisation
- ❖ Vitesse de refroidissement nécessaire moins importante

	Eau pure	Echantillon
P ambiante	$10^6$ °C/s	$10^4$ °C/s
P = 2050bars	$10^5$ °C/s	$10^3$ °C/s

~2050 bars : point de congélation et de vitrification de l'eau les plus bas



**COMMENT RÉALISER  
LA CRYO-FIXATION  
HAUTE PRESSION?**

Automate => permettent d'appliquer

- ❖ forte pression
- ❖ forte vitesse de refroidissement
- ❖ la congélation par l'azote liquide

**Principe:**

2 méthodologies ont été développées:

**A/** L'échantillon est installé dans une petite chambre de pression

=> Azote liquide est mis sous pression puis envoyé dans la chambre

**La série des « HPM »**

**B/** La pression est appliquée sur l'échantillon via un liquide puis cet état est congelé.

**La série des « EM-PACT »**

**Historique:**

- En 1968, le premier prototype fut mis au point mais n'était aboutit
- C'est en 1973 que la première machine fut mis au point.  
(Peu rapide, dangereuse et difficile à utiliser)

*HPM: High pressure Machine*

**La série des HPM**

*Historique: Machine par Moor en 1980*



**HPM-010**

**ABRA Fluid AG (constructeur)**

*BAL-TEC ( distributeur jusqu'en 2007 )  
depuis 2008 => RMC*

*BAL-TEC (distributeur jusqu'en 2007 )  
depuis 2008 => LEICA*



**HPM-100**

**Points importants :**

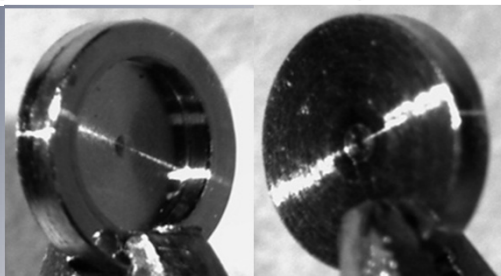
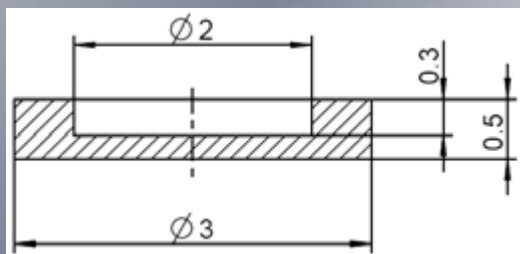
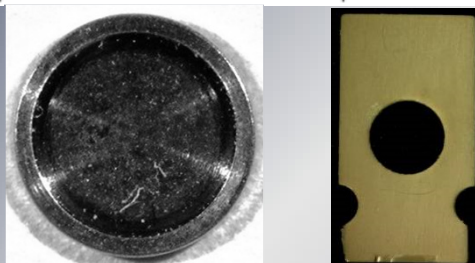
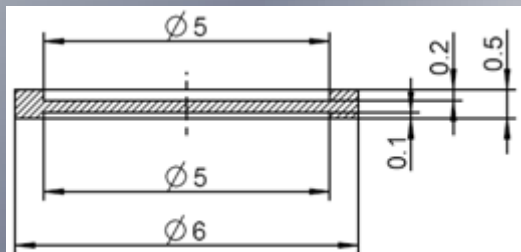
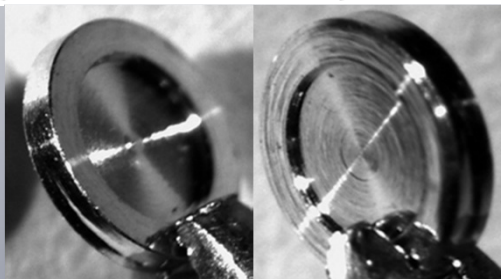
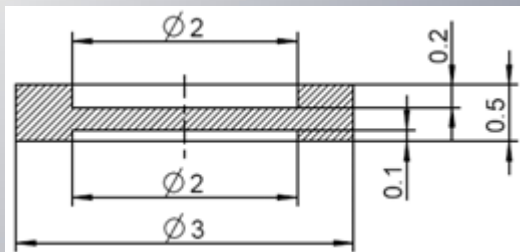
- Jet d'éthanol pour faire coïncider la pression et la diminution de la température
- Un système de sandwich de porte-objet
- Porte-objet en aluminium



**Les supports de congélation**

**HPM - 100**

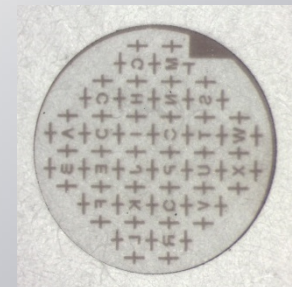
2 mm ou 5mm de diamètre  
100 µm à 600 µm d'épaisseur



**Cryo-fracture**  
Ø 3,0 x 0,8 mm

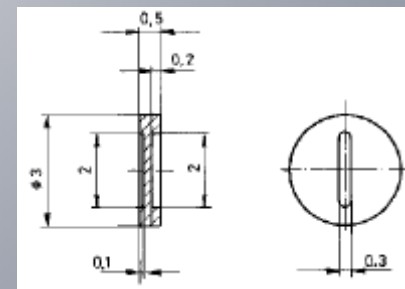


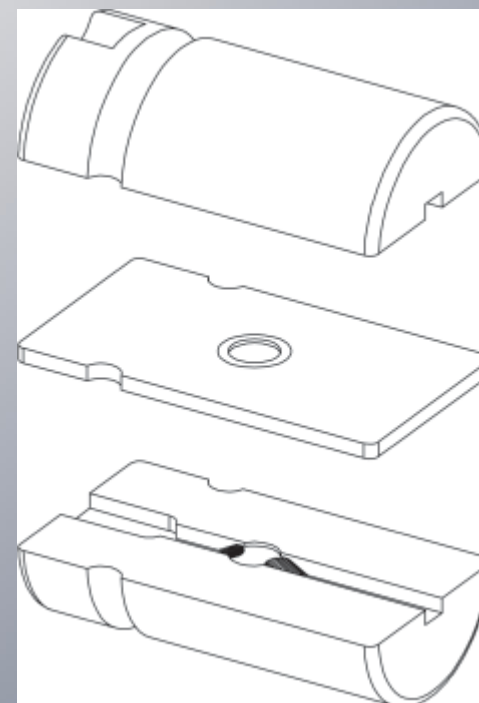
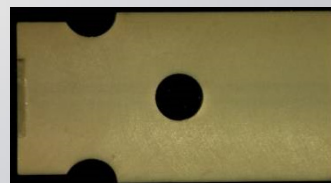
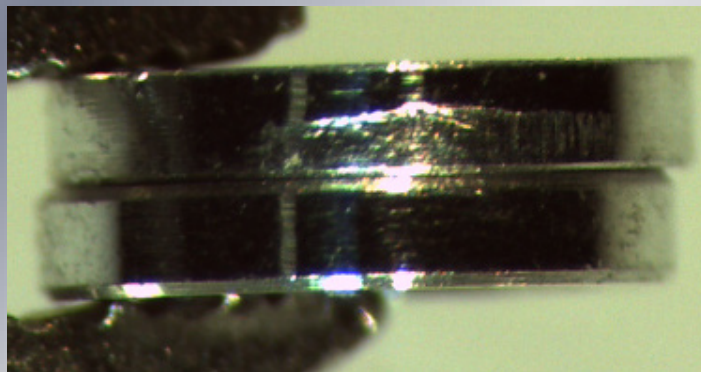
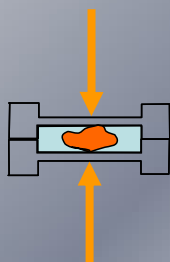
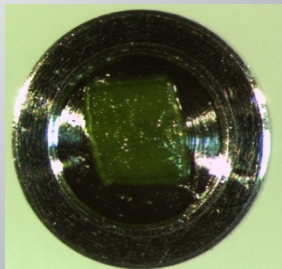
**Disque de Saphir**  
pour culture  
adhérente et CLEM



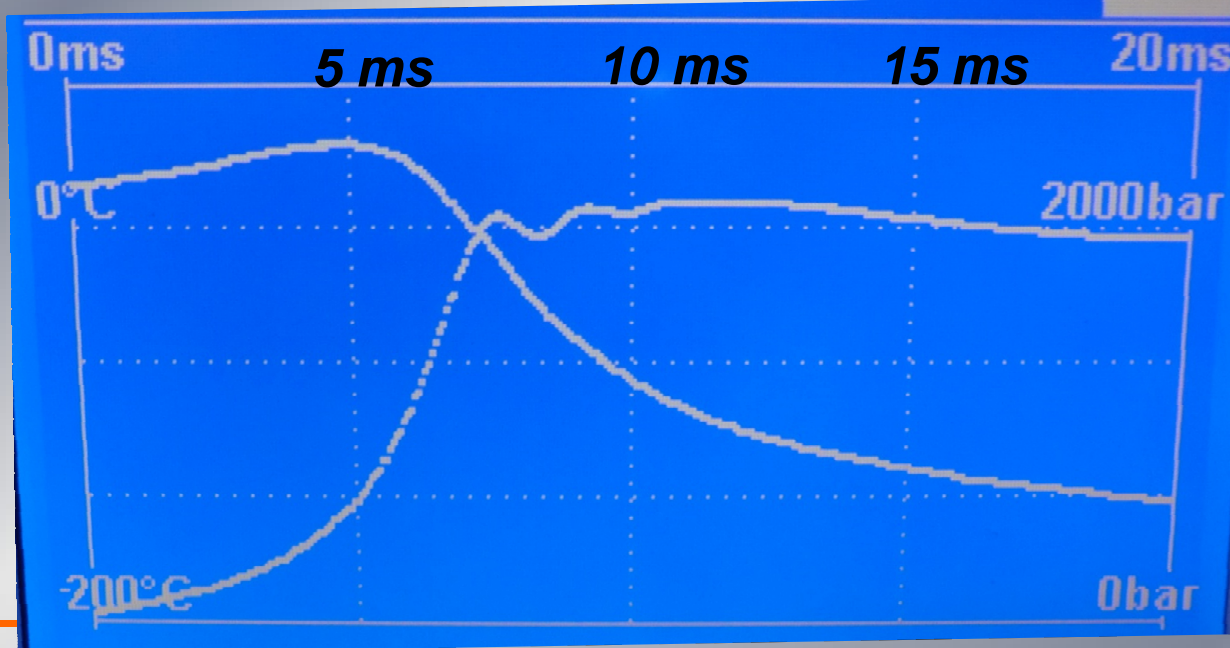
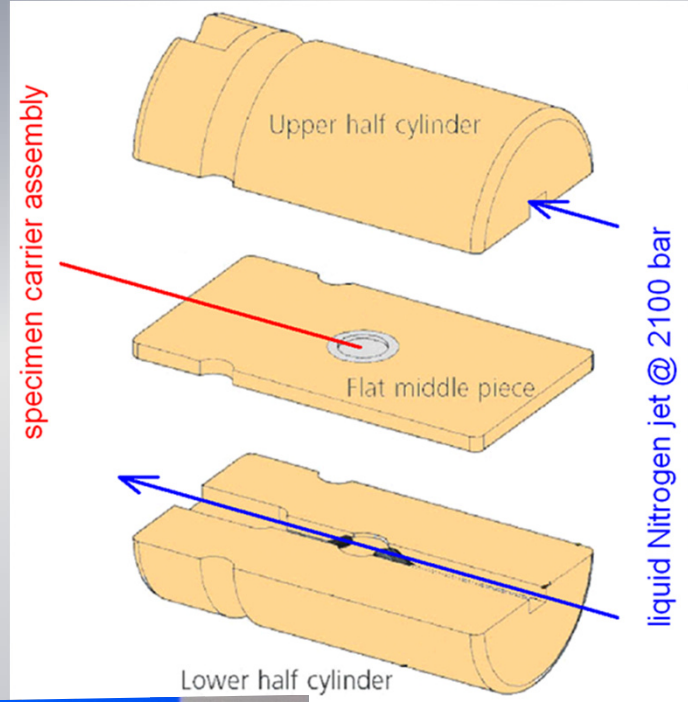
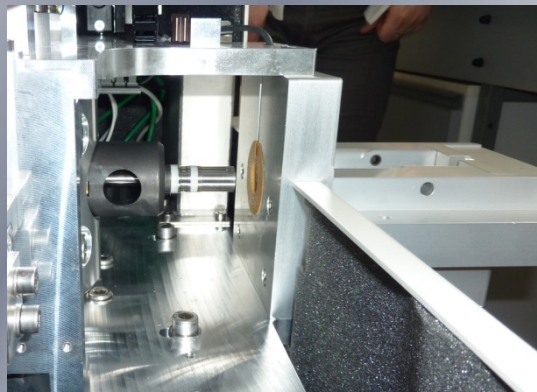
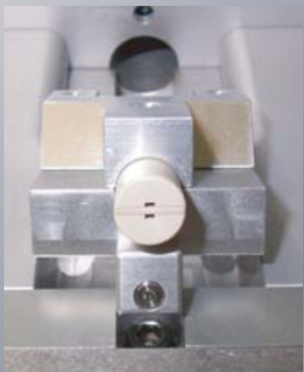
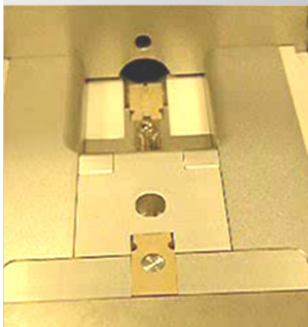
Ø 6 mm / 120 µm ép

**Biopsie de tissu**





# Le Fonctionnement





*EM-PACT : Electron Microscopy comPACT*  
**LEICA (constructeur et distributeur)**

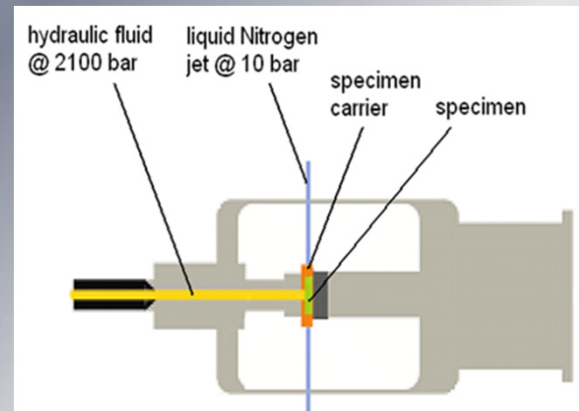
*Historique: 1<sup>ère</sup> Machine par Riehle en 1973*

*Développée par D. Studer.*



**HIGH PRESSURE  
FREEZING MACHINE  
EMPACT-1**

*Commercialement : 2001*



**HIGH PRESSURE  
FREEZING MACHINE  
EMPACT-2**

*Commercialement : 2006*

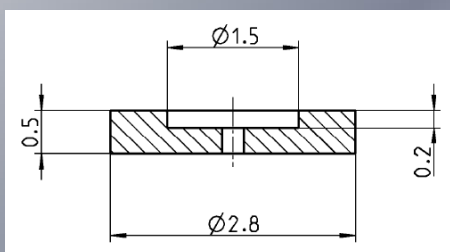
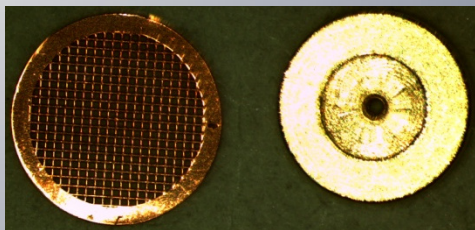
**Points importants :**

- **Utilisation du méthylcyclohexane (MCH) permet d'appliquer sur l'échantillon la haute pression**  
↳ MCH état métastable pendant les 5ms entre HP et LN2
- **Un seul porte-objet**
- **Porte-objet en cuivre recouverte d'or**



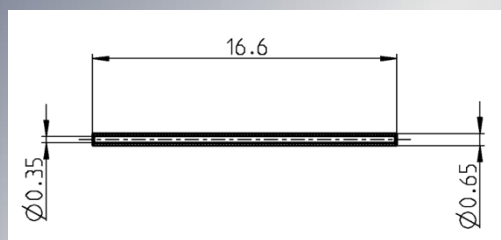
**Cupule à plat**

=> Tissus, ...



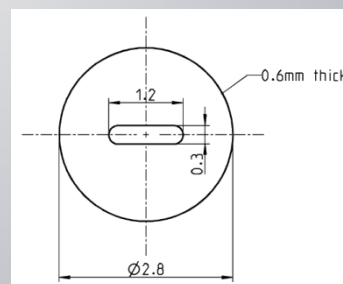
**Système de tube pour suspension**

=> CEMOVIS

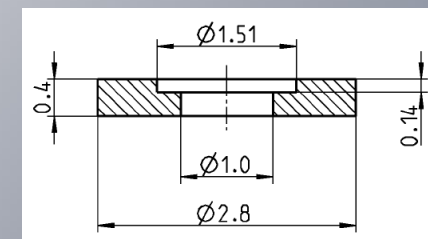
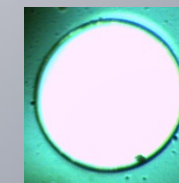
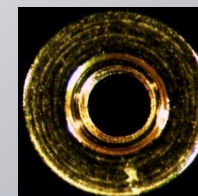


**Cupule pour biopsie**

=> tissus

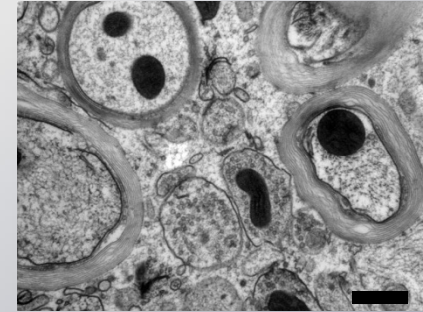


**Cupule pour culture**  
=> cellules adhérentes et CLEM





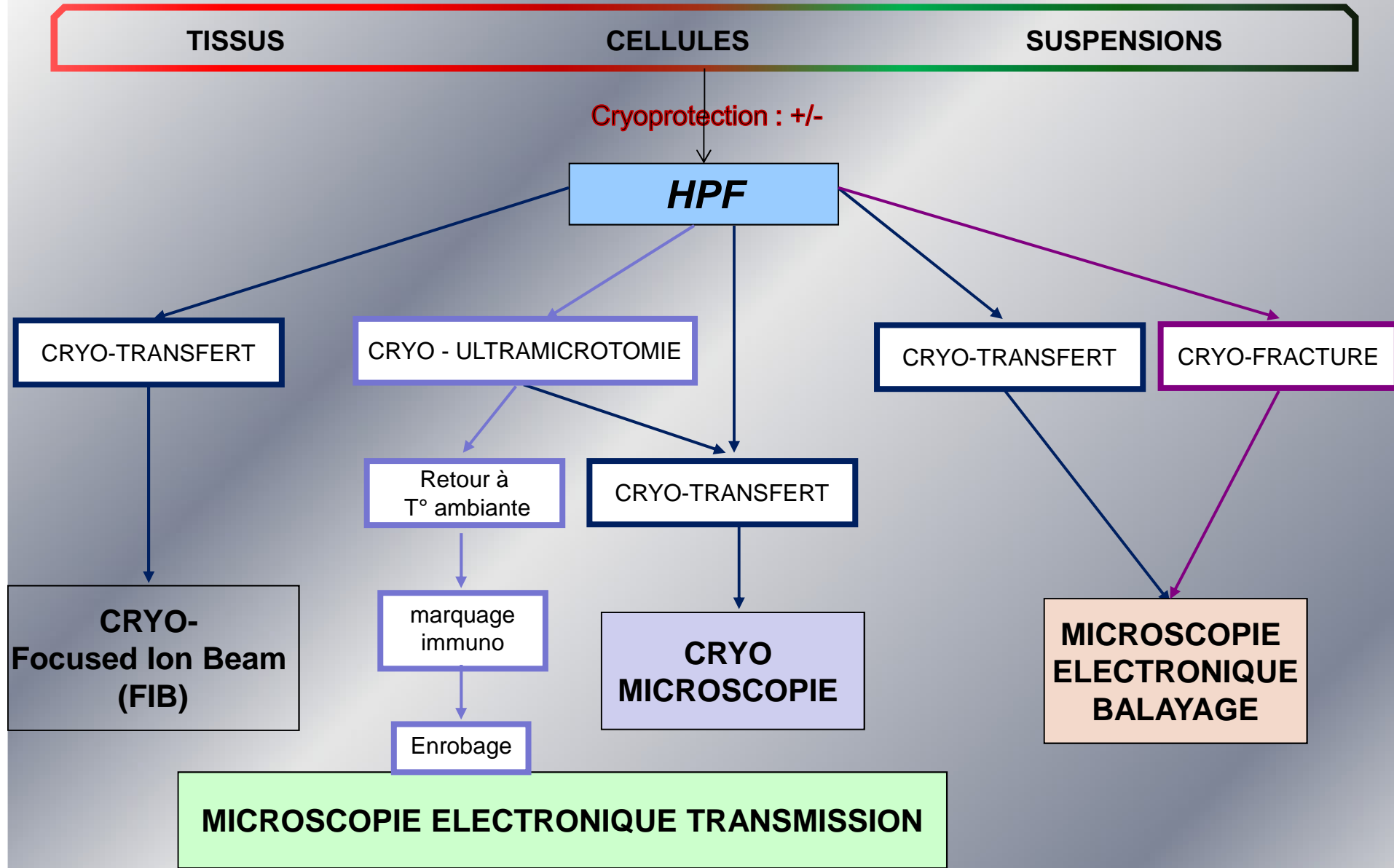
## Intérêts de la Cryo-fixation par Haute pression



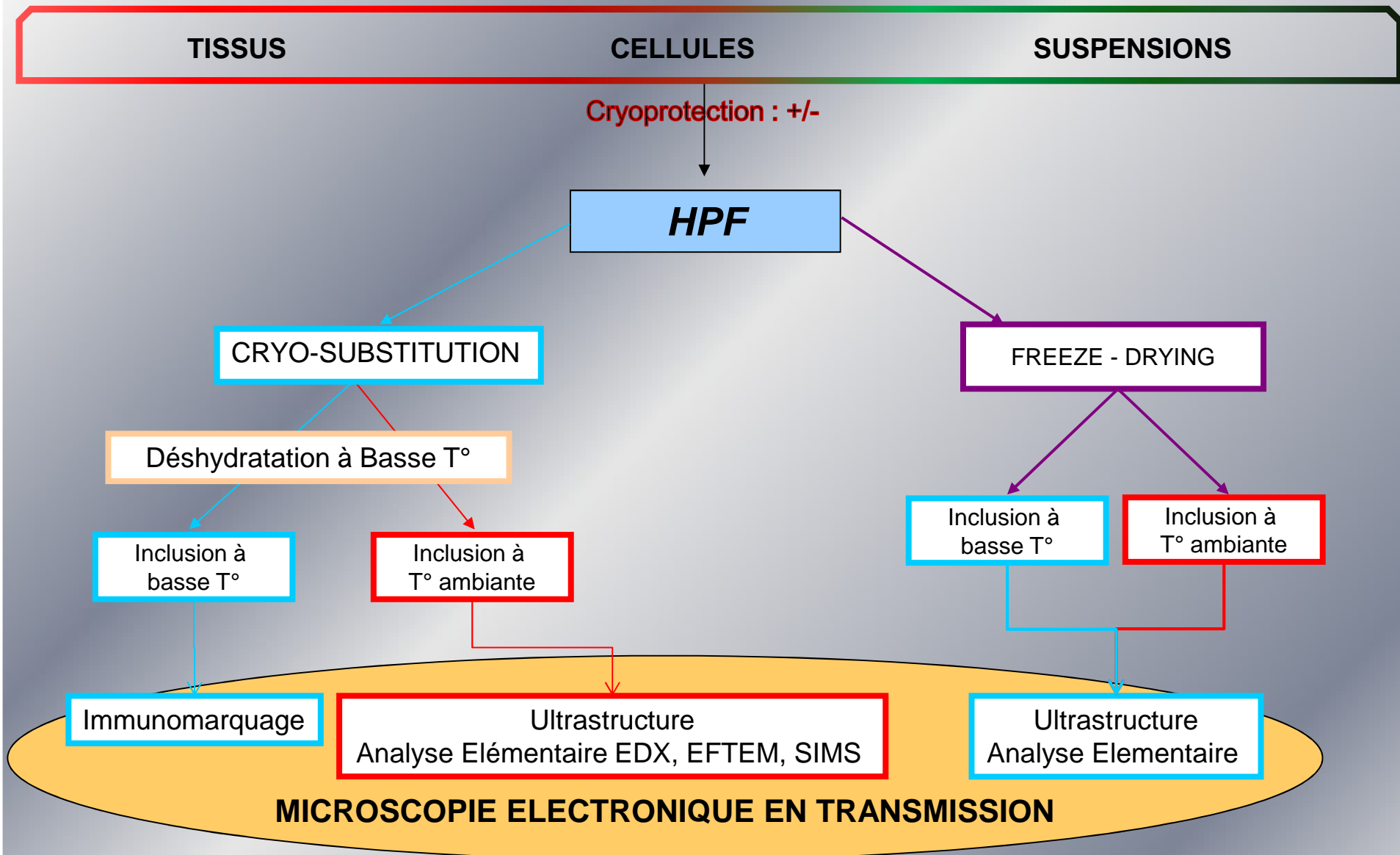
- ❖ Exploiter des échantillons fortement **hydratés**.
- ❖ Vitriification d'un échantillon biologique de **0,5 à 1mm<sup>3</sup>**.
- ❖ Permet l'observation à **haute résolution**.
- ❖ Meilleure **fidélité de l'ultrastructure** => préservation de l'eau => organisation 3D.
- ❖ «**Capture** » des **phénomènes rapides**, figer un mécanisme biologique (endocytose, fusion de vésicules...) => études dynamiques possibles.
- ❖ Permet la détection **d'antigène fragile**, peu nombreux.
- ❖ Maintient des **éléments diffusibles** (ex: ions).
- ❖ Maintient d' **éléments** normalement **extraits** (protéines, lipides, autres molécules).

"Recent advances in high-pressure freezing: equipment- and specimen-loading methods. KL McDonald, M Morphew, P Verkade, and T Muller-Reichert. Methods Mol Biol. 2007; 369: 143. »

- ❑ **Chercher à congeler de l'eau (libre ou liée) donc il faut limiter l'eau au maximum.**  
=> Mauvais coefficient de transfert de chaleur / très mauvais conducteur
- ❑ **Le temps de préparation avant la cryofixation => essentiel.**  
=> la dissection n'engendre pas d'altération
- ❑ **Travail sur des petits échantillons.**
- ❑ **La présence de compartiment gazeux dans l'échantillon ou la présence d'air autour.**  
=> collapse ou empêche la vitrification
- ❑ **Le caractère « facile – difficile » de l'échantillon => impossible à dire avant l'HPF**  
=> Seule l'expérimentation le dira
- ❑ **Le coût et la durée d'une manip.**







# Cryo-substitution et inclusion en résine d'échantillons biologiques

## **Préambule**

La **substitution à basse température** avec des agents déshydratants et des fixateurs

⇒ **réticulation des composants cellulaires**

⇒ **remplacement de l'eau**

à des températures suffisamment basse pour éviter les effets néfastes de la déshydratation à température ambiante,



conserver l'**ultrastructure** au plus près de l'**état natif** de l'échantillon.

Les avantages de l'enrobage basse température ont grandement contribué à la capacité de **préserv**er et **localiser précisément les antigènes** à haute résolution.

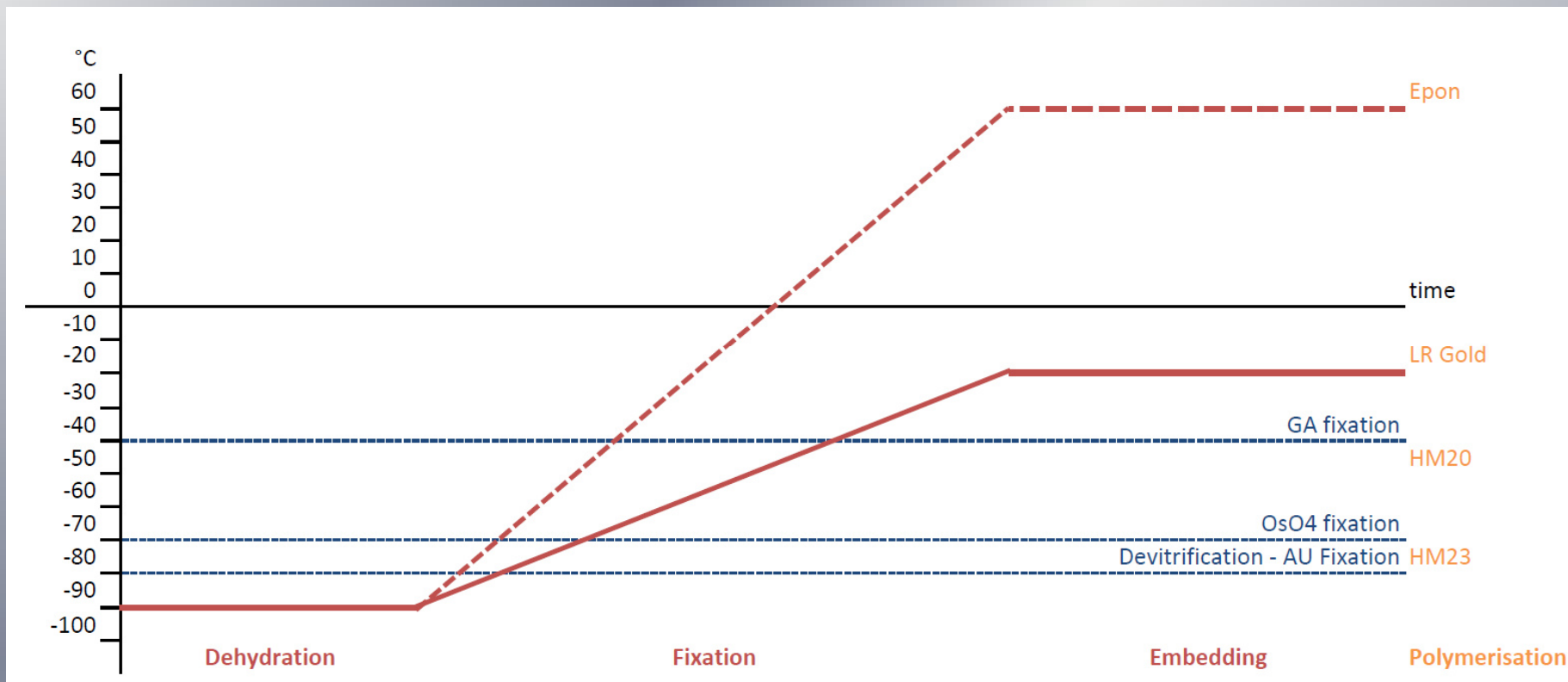
**Principe général** : *Substituer l'eau congelée sans altérer l'ultrastructure native de l'échantillon.*

**But** : *Provoquer une stabilisation chimique et une déshydratation à l'état congelé*

**Les étapes principales** :

- Déshydratation*
- Fixation chimique*
- Infiltration en résine*
- Polymérisation*
- Coupes*
- (Immunomarquage)*

# Processus général



## Déshydratation

**Principe** : La glace est soluble dans le solvant.

**But** : Remplacement de l'eau par le solvant.

- Débute à  $-90^{\circ}\text{C}$ .
- Utilisation d'un mix congelé contenant :
  - un **solvant anhydre** (acétone, éthanol, méthanol).
  - un ou plusieurs **fixateurs chimiques** (osmium, acétate d'uranyl, aldéhydes...).
  - de l'**eau**.
- 8h minimum → le temps d'échange avec l'eau dépend de l'épaisseur de la paroi/membrane à traverser.
  - plus la déshydratation est lente, moins il y a d'artefacts (distribution des ions, rétrécissement...).

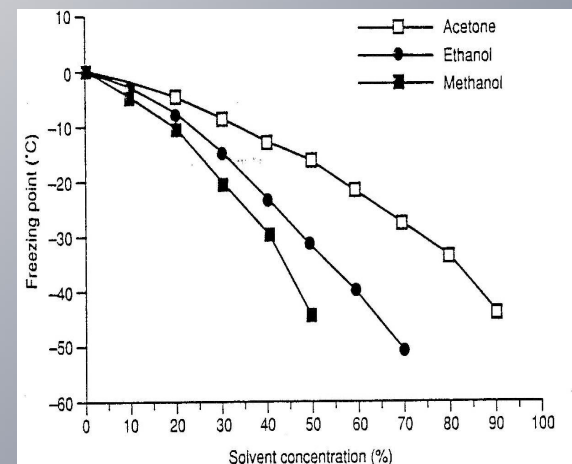


## Fixation chimique

**Principe** : Combiner les propriétés fixatives de plusieurs produits au fur et à mesure des changements de température.

**But** : Stabilisation et réticulation des constituants cellulaires.

- Les fixateurs chimiques agissent pendant la remontée en température.
- Dévitrification  $T^{\circ}\text{C} > -90^{\circ}\text{C}$  → libération des charges négatives des acides nucléiques et accessibilité des groupements phosphate → action de l'acétate possible.
- Action du tétroxyde d'osmium à partir de  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- Action du glutaraldéhyde à partir de  $-40^{\circ}\text{C}$ .



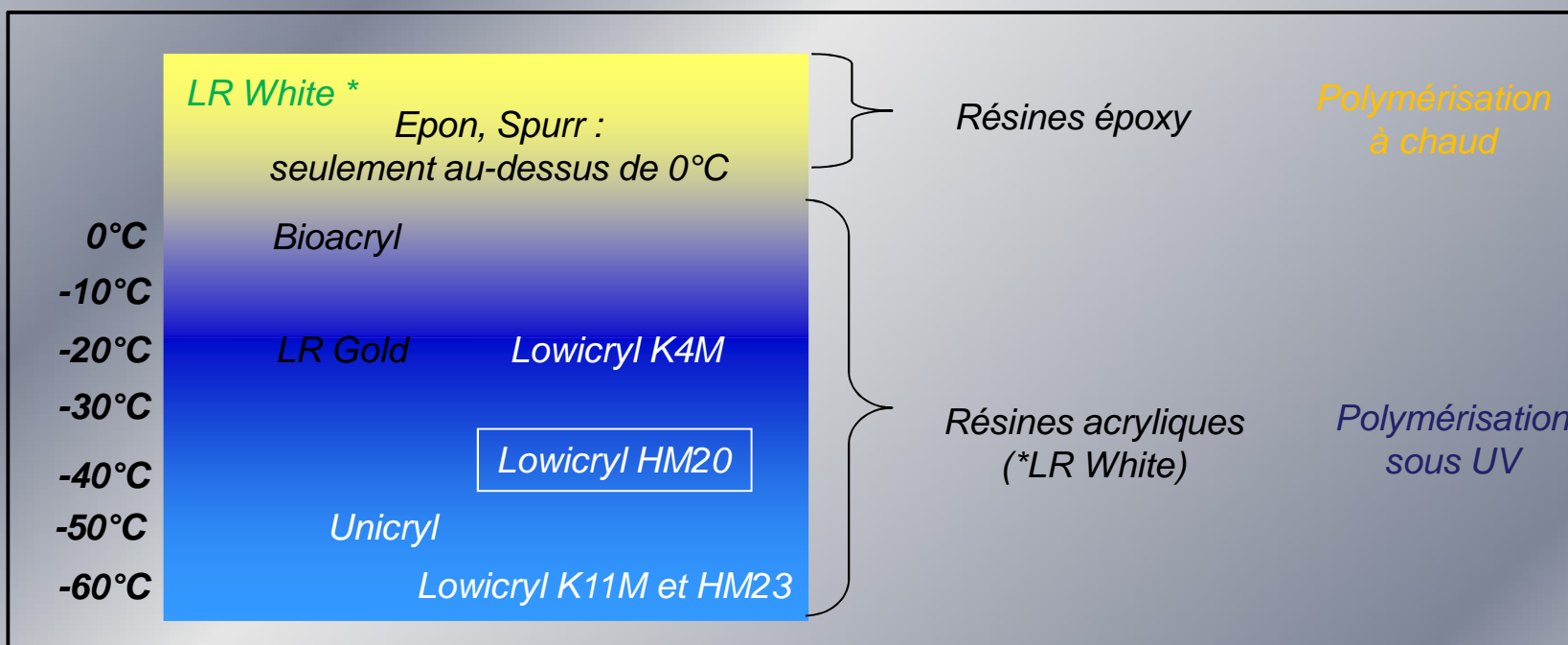
## Infiltration en résine et polymérisation

**Principe** : Le solvant est miscible dans la résine.

**But** : Inclure l'échantillon pour obtenir un bloc suffisamment dur pour être coupé en ultrafines.

→ Par bains progressifs solvant/résine.

→ Remontée en  $T^\circ$  jusqu'à la  $T^\circ$  de **polymérisation** de la résine utilisée.



## Exemples de protocoles

### Ultrastructure

at -90°C in acetone + OsO4 1% + UA 0,25% + Glutaraldehyde 0,25% + 1% d'eau


Start	07/07/14 (dd/mm/aa)	13:00 (hh:mm)	Time (h)
T1	-90	20	
S1 (°C/h)	5	12	
T2	-30	21	
S2 (°C/h)	3	16,67	
T3	20	6	
<b>Estimated time</b>	3 days	3 hours	40 minutes

**End** samedi 12 juillet 2014 16:40

mercredi 9 juillet 2014

jeudi 10 juillet 2014

12:00	- go to -30	5 °C/h
	- at -30°C in mix	15 h
	- rinse acetone remove samples from carriers	2 h
14:00	- EPON / Acetone 1/2	2 h
16:00	- EPON / Acetone 1/1	2 h
18:00	- EPON / Acetone 2/1	3 h
	- go to room temperature	3 °C/h
10:40	- EPON 3X (change every 2 hours)	6 h
16:40	- polymerise at 60 °C	48 h



### Immunomarquage

The week end at -90°C in acetone + UA 0,25% + H2O 5%

Start	13/05/14 (dd/mm/aa)	11:00 (hh:mm)	Time (h)
T1	-90	42	
S1 (°C/h)	2	22,5	
T2	-45	6	
S2 (°C/h)	3	21	
T3	18	48	
<b>Estimated time</b>	5 days	19 hours	30 minutes

**End** jeudi 22 mai 2014 9:30


vendredi 16 mai 2014

samedi 17 mai 2014

lundi 19 mai 2014

mardi 20 mai 2014

09:30	- go to -50	2 °C/h
	- at -50°C in mix	6 h
	- rinse acetone, then in ethanol remove samples from carriers (4h)	2 h
11:30	- HM20 /EtOH 1/4	2 h
13:30	- HM20 /EtOH 1/2	2 h
15:30	- HM20 /EtOH 2/1	2 h
17:30	- HM20	16 h
09:30	- HM20 3X (change every hour)	3 h
12:30	- UV at -50°C	48 h
12:30	- go to room temp	3 °C/h
9:30	- UV at room temp	48 h



## Exemples d'inclusion après cryosubstitution

**En moule classique**



**En moules hauts (Leica EM-AFS2)**



**A plat**



*Moule aclar - fabrication maison*

**En moules à plat (Leica EM-AFS2)**





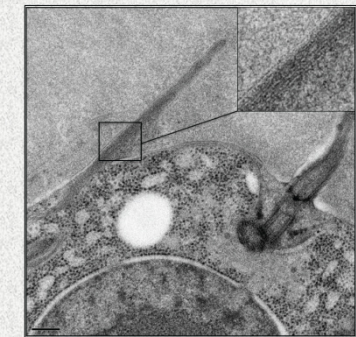
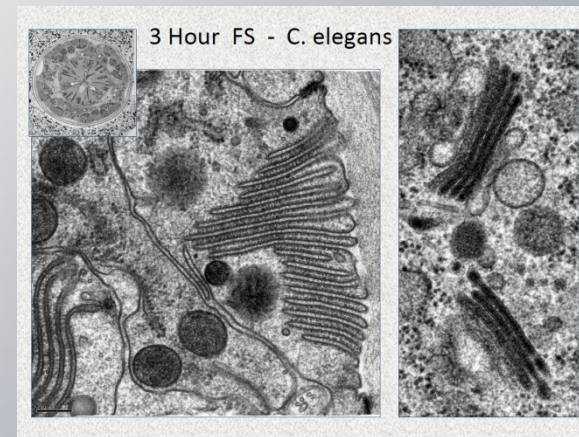
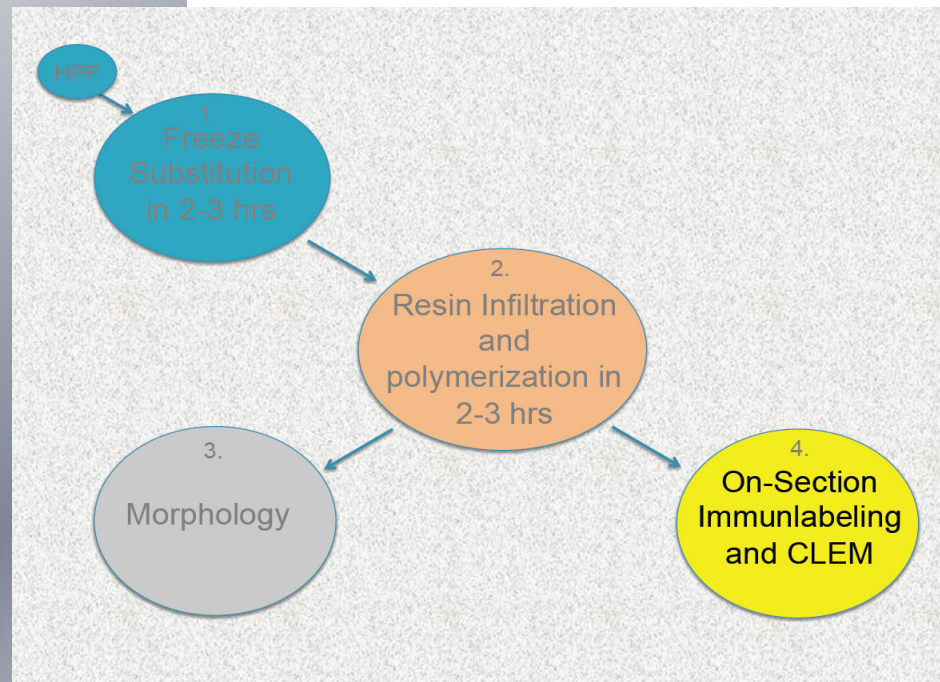
## Freeze substitution in 3 hours or less

K.L. McDONALD\* & R.I. WEBB†

\*Electron Microscope Laboratory, University of California, Berkeley, CA, U.S.A.

†Centre for Microscopy and Microanalysis, University of Queensland, Queensland, Australia

**Nouveauté**

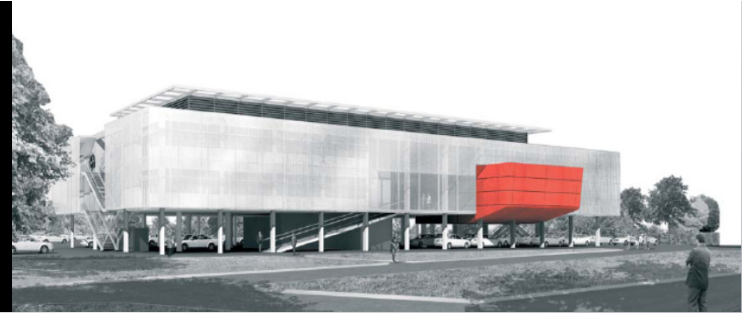


Cells courtesy of Pawel Burkhardt and Nicole King, UC Berkeley

→ **Enorme gain de temps sans perte de qualité sur le résultat.**

→ **Pour l'ultrastructure et l'immuno.**

**BIC**  
Imagerie électronique



MERCI DE VOTRE  
ATTENTION



[www.bic.u-bordeaux2.fr](http://www.bic.u-bordeaux2.fr)

