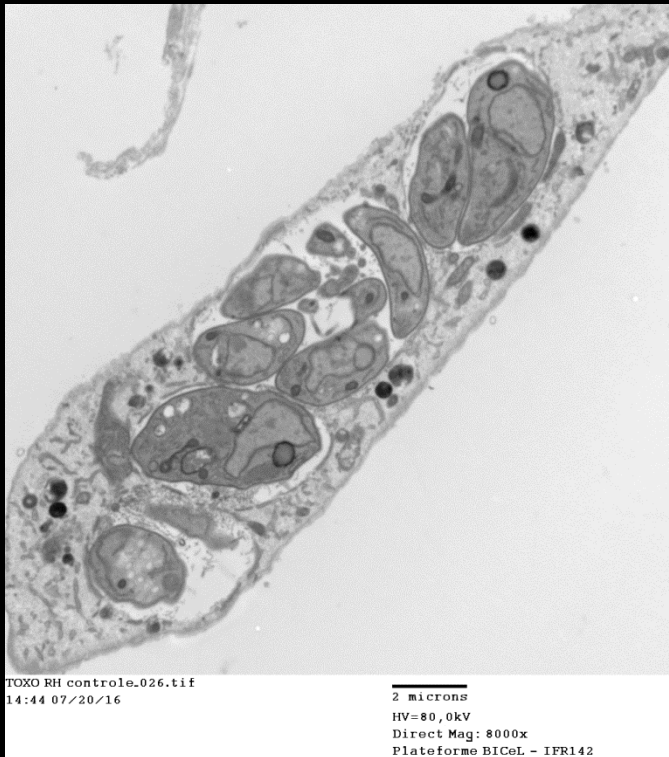
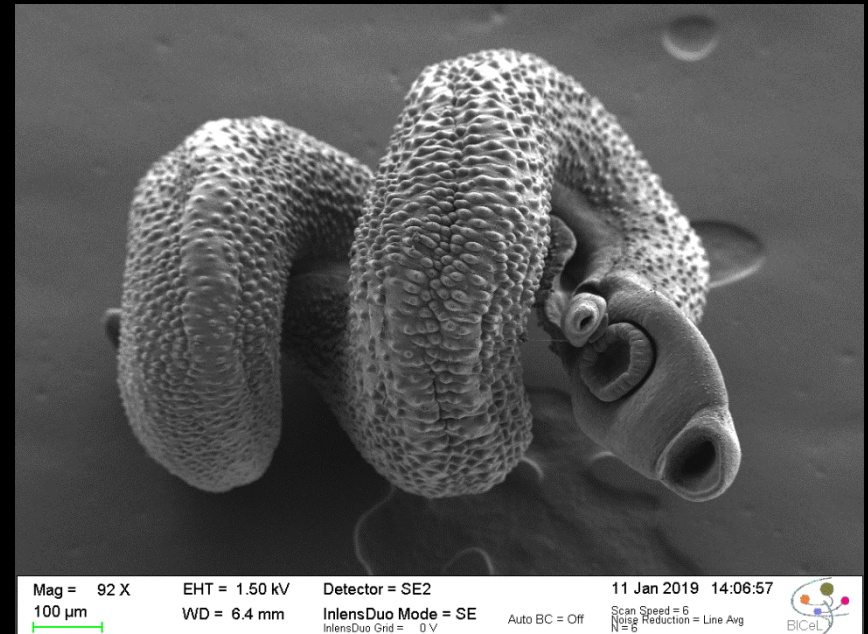


La microscopie électronique

Microscope électronique en transmission



Microscope électronique à balayage



Un peu d'histoire et de physique

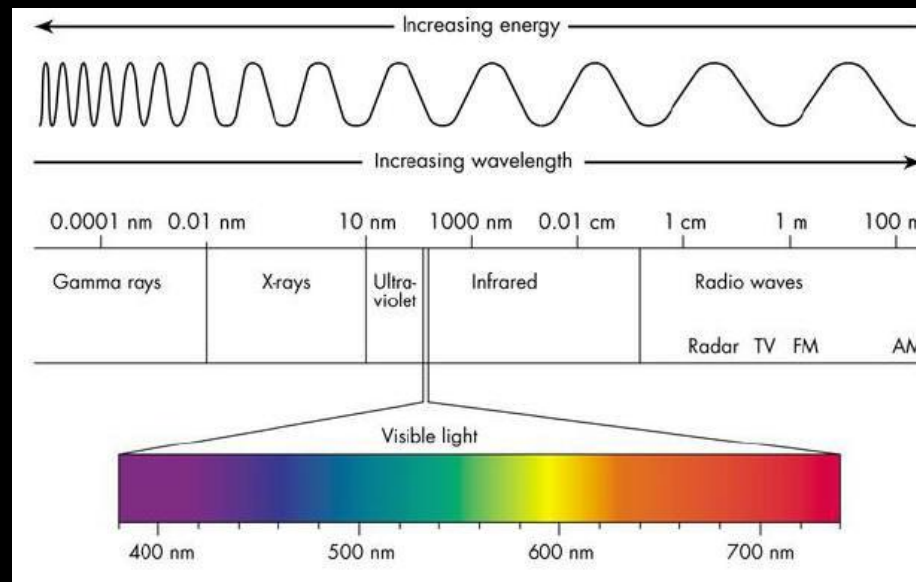
- En 1893, Ernst Abbe met en équation le pouvoir de résolution:

$$d = \frac{0,61 \times \lambda}{\text{N.A.}}$$

longueur d'onde
ouverture numérique de l'objectif

λ UV 365 nm $d=160$ nm
 λ rouge 600 nm $d=264$ nm
avec N.A. à 1,4

- la résolution augmente lorsque la longueur d'onde diminue.



Un peu d'histoire et de physique

- En 1924, Louis-Victor de Broglie théorise les propriétés corpusculaires et ondulatoires des particules comme les électrons:

$$\lambda_{e^-} = \frac{h}{(2 \times m_{e^-} \times E_{e^-})^{1/2}}$$

constante de Planck

masse de l'électron énergie

$$E_{e^-} = m_{e^-} \times c^2 = U \times q_{e^-}$$

potentiel électrique

vitesse charge de l'électron

- Avec $U = 100\,000\text{ V}$, résolution théorique $d = 0.0037\text{ nm}$.

Microscopie électronique

- En 1931, Max Knoll et Ernst Ruska construisent le premier microscope électronique en transmission et Manfred von Ardenne construit le premier microscope électronique à balayage.
- En 1986, Ernst Ruska obtient le prix Nobel de physique pour l'invention du microscope électronique en transmission.
- En 2017, Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson obtiennent le prix Nobel de chimie pour la technique d'observation de biomolécules en cryo-ME.



1937



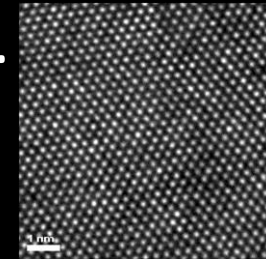
1930



Aujourd'hui

Microscopie électronique

- **Avantage:**
 - La résolution atteinte est de l'ordre du nanomètre.
 - La plus grande résolution atteinte est de 0,05 nm (0,5 Angströms) en science des matériaux. A cette échelle, les atomes sont vus individuellement.
- **Inconvénient:**
 - Les échantillons sont observés sous vide poussé.
 - Les échantillons biologiques doivent être déshydratés ou congelés pour être observés.



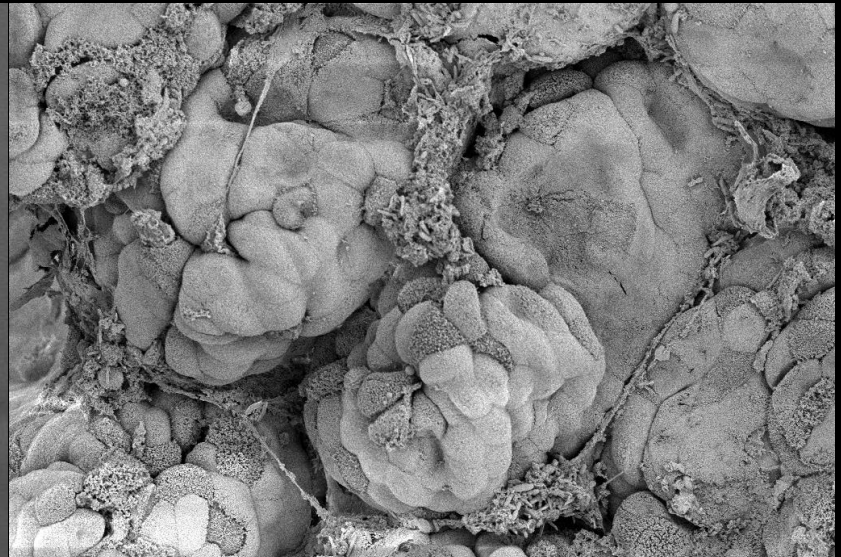
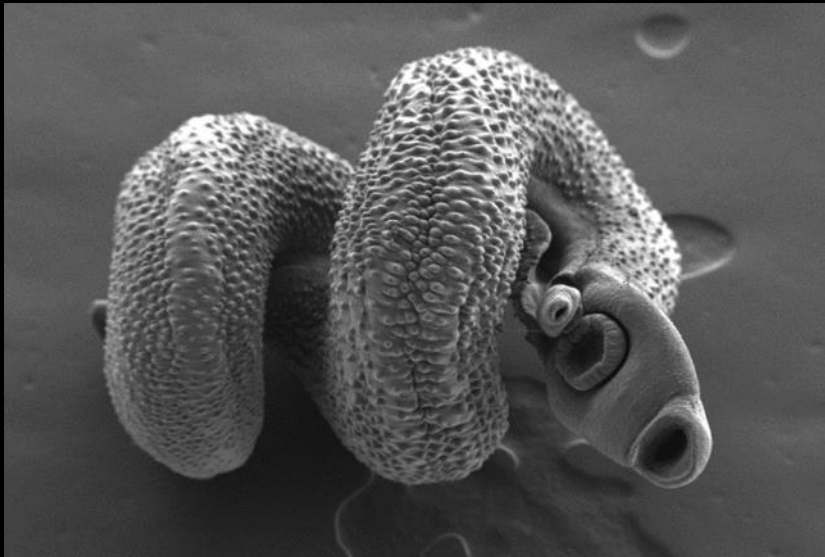
Deux technologies différentes

- Microscope électronique à balayage MEB (SEM):
 - un fin faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon.
 - l'image obtenue correspond à l'interaction ponctuelle des électrons avec la surface de l'échantillon.



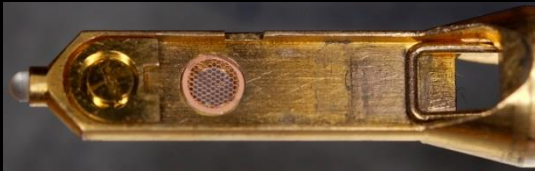
Deux technologies différentes

- Microscope électronique à balayage MEB (SEM):
 - un fin faisceau d'électrons balaye la surface de l'échantillon.
 - l'image obtenue correspond à l'interaction ponctuelle des électrons avec la surface de l'échantillon.



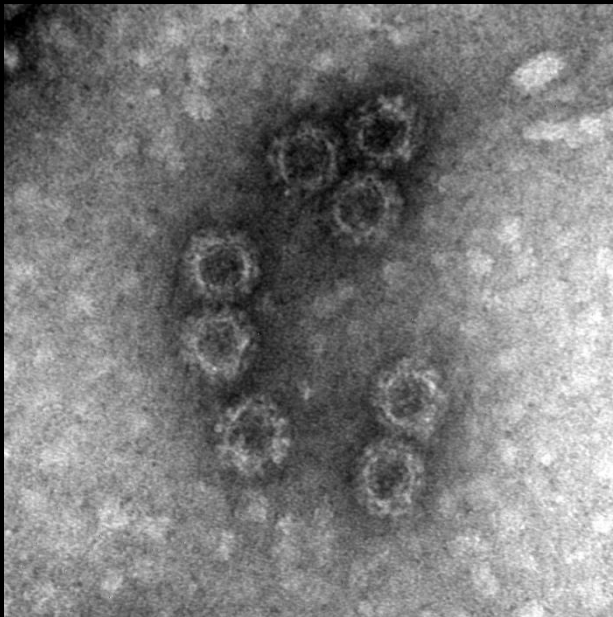
Deux technologies différentes

- Microscope électronique en transmission MET (TEM):
 - un large faisceau d'électrons est envoyé sur l'échantillon (ou un faisceau d'électron balaye l'échantillon – STEM).
 - l'image de l'échantillon est une projection correspondant aux électrons qui ont traversé par rapport à ceux qui sont arrêtés ou déviés.
 - L'échantillon doit être très fin (quelques centaines de nm max).



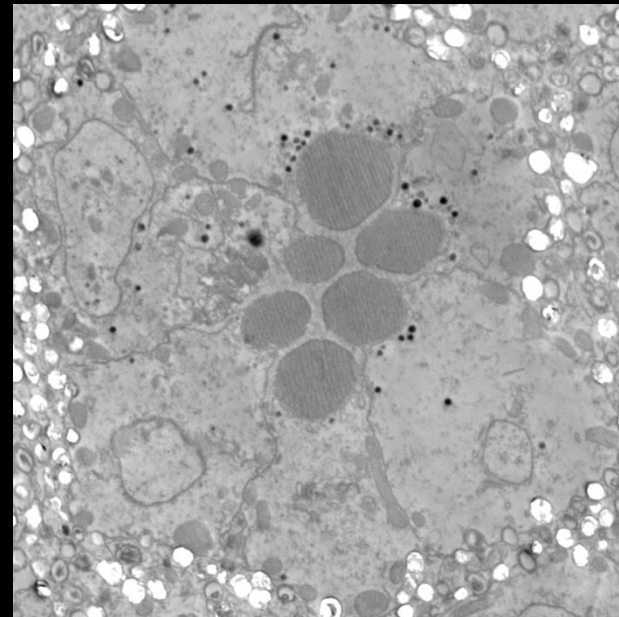
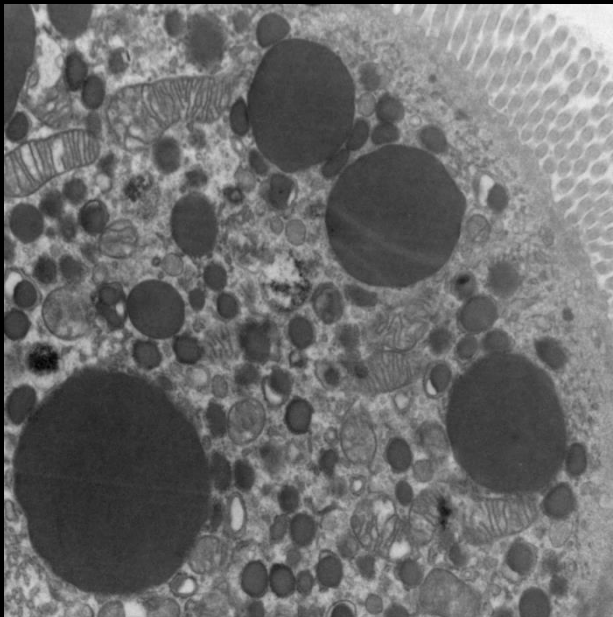
Microscopie électronique

- La microscopie électronique offre de nombreuses techniques:
 - Coloration négative pour les petits objets: protéines, virus, bactéries).



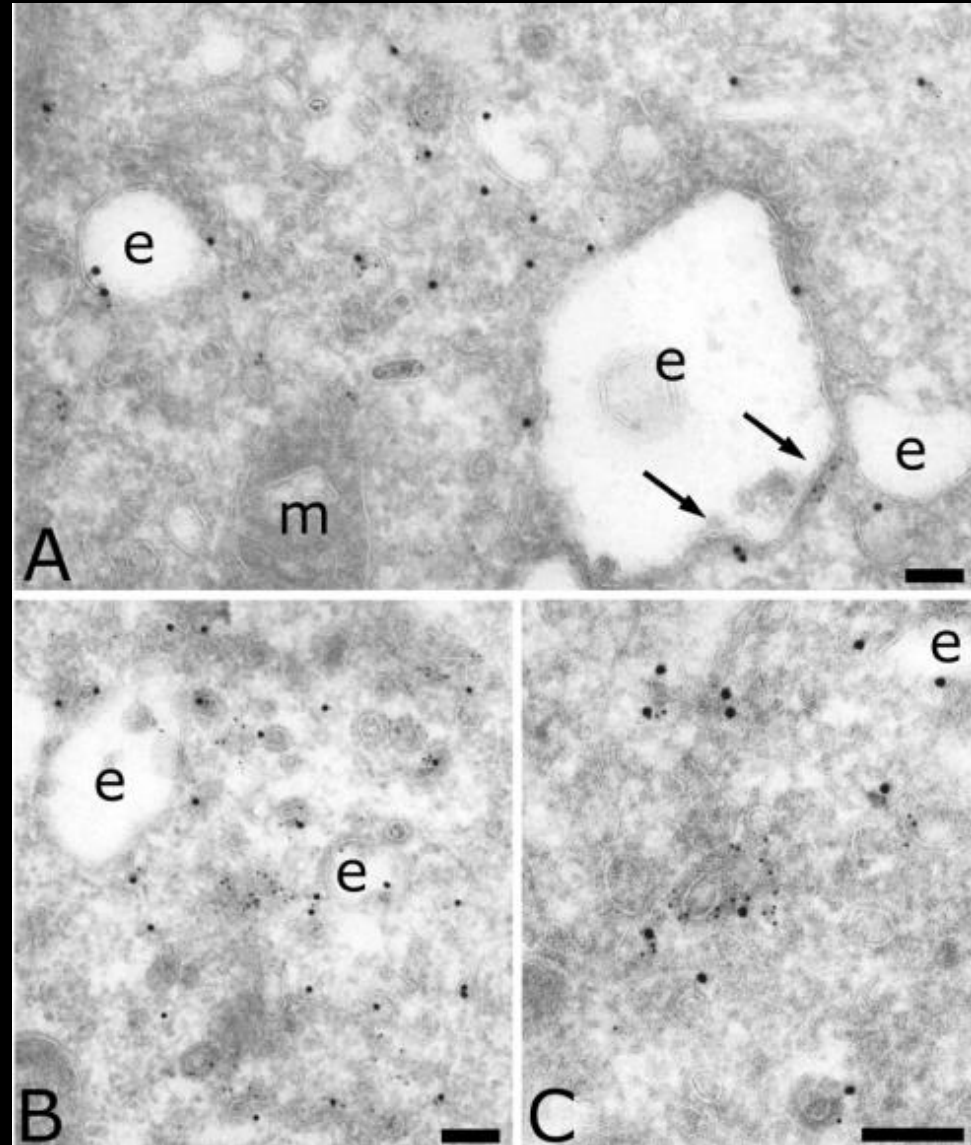
Microscopie électronique

- La microscopie électronique offre de nombreuses techniques:
 - Inclusion en résine (ou congélation) et coupe ultrafine (cryo-coupe) pour les objets épais: cellules, tissus.



Microscopie électronique

- La microscopie électronique offre de nombreuses techniques:
 - Immunomarquage à l'or colloïdal.



Microscopie électronique

- La microscopie électronique à bientôt 100 ans.
- Elle a connue de nombreux développements dans les dernières décennies:
 - Microscopes et caméras/détecteurs.
 - Préparation des échantillons (cryo, microscopie corrélative).
 - Sondes (GFP, microscopie corrélative).
 - Informatique et logiciels (automatisation, analyse et traitement des images, reconstruction 3-D, IA).

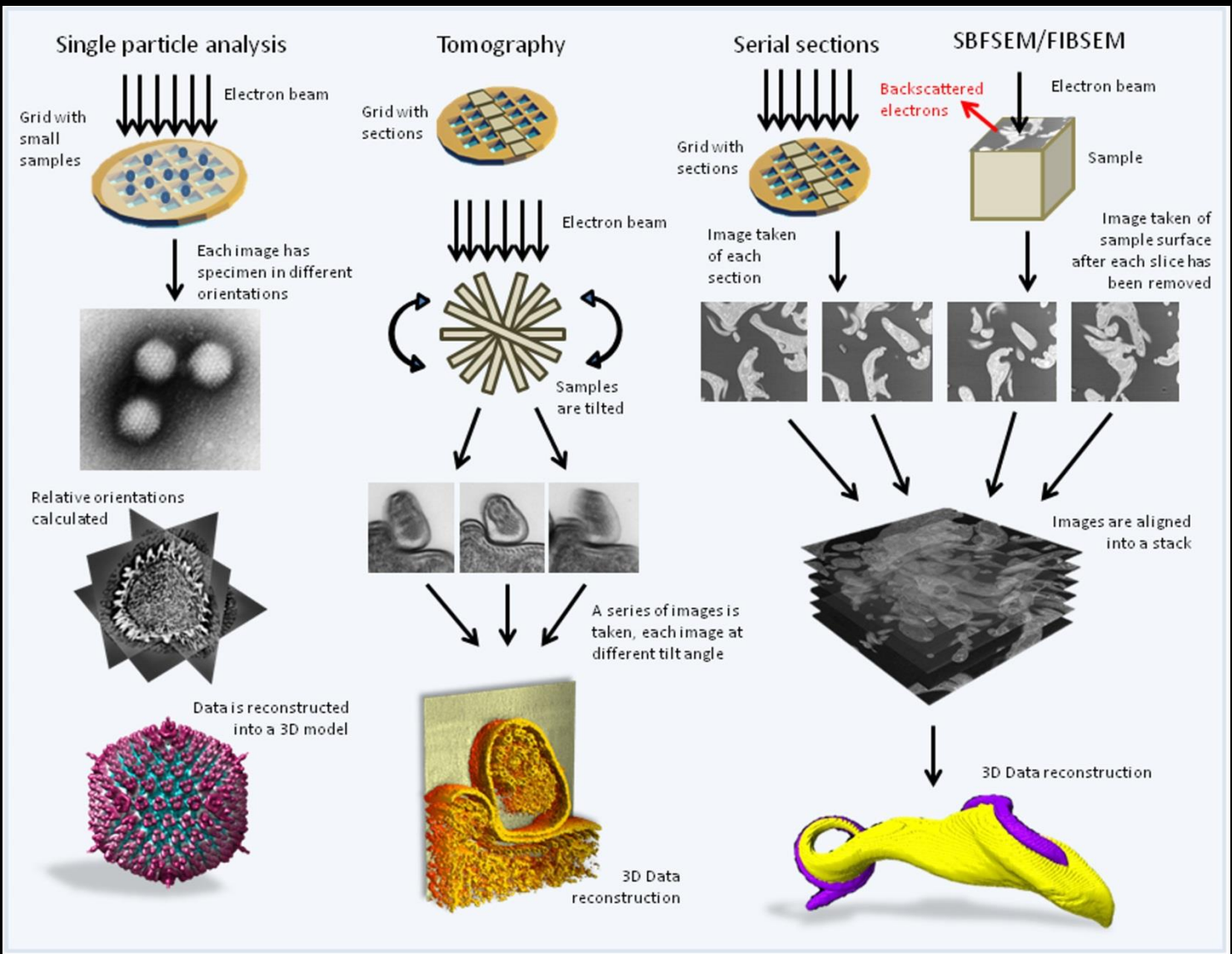
Microscopie électronique

- La microscopie électronique offrait de nombreuses techniques dites classiques:
 - Coloration négative pour les petits objets: protéines, virus, bactéries).
 - Inclusion en résine (ou congélation) et coupe ultrafine (cryo-coupe) pour les objets épais: cellules, tissus.
 - Immunomarquage à l'or colloïdal.
- A suivre les nouvelles techniques offertes par la microscopie électronique:
 - ME 3-D.
 - Cryo-ME.
 - Microscopie corrélative.

Microscopie électronique 3-D

- En MET:
 - Tomographie. L'échantillon tourne de -70° à $+70^\circ$ dans le microscope. Une image est prise à chaque degrés.
 - Sections de 200-300 nm d'épaisseur d'un échantillon inclus dans une résine.
 - Un échantillon directement congelé.
- En MEB:
 - FIB (Focused-Ion Beam). Un faisceau d'ion vient abraser la surface un bloc de résine ou un bloc de glace.
 - SBF (Serial Block-Face). Un ultra-microtome installé dans le MEB coupe la surface d'un bloc de résine avec un couteau.
 - Une série de coupe-image de la surface du bloc.

Microscopie électronique 3-D



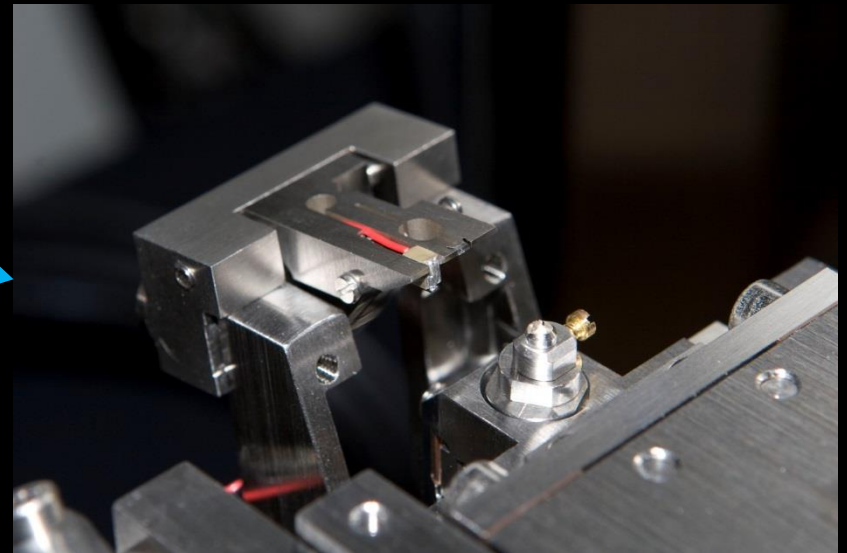
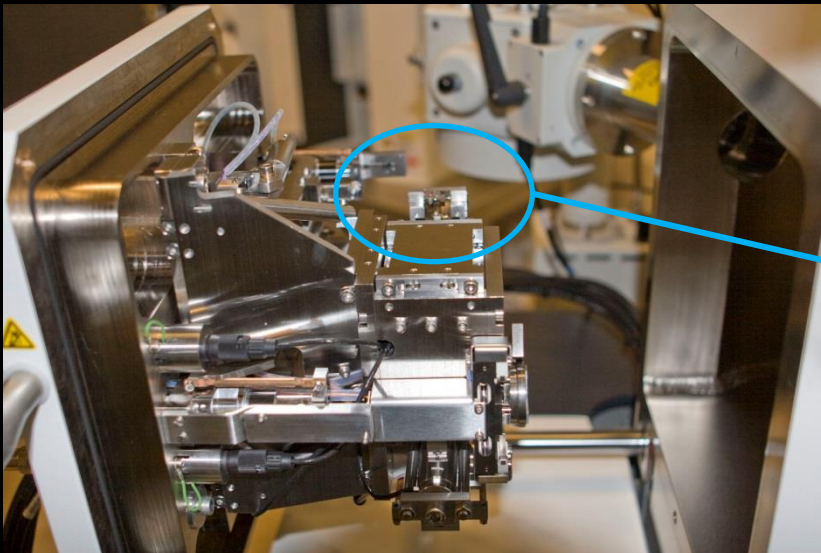
MEB 3-D avec un ultra-microtome (SBF SEM)

- Préparation de l'échantillon comme pour le MET:
 - Fixation
 - Post-fixation (incorporation d'agents contrastants, métaux lourds)
 - Déshydratation
 - Inclusion en résine
 - Polymérisation

 - Détection des électrons rétrodiffusés provenant des métaux lourds

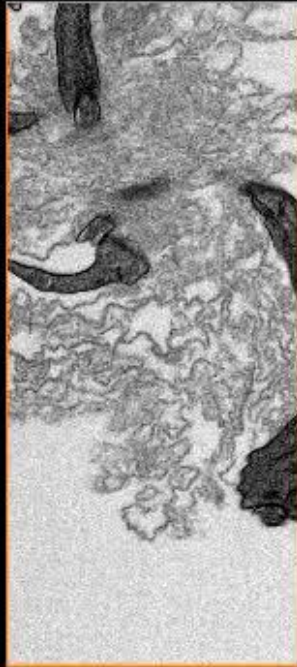
MEB 3-D avec un ultra-microtome (SBF SEM)

- Le 3View:
 - Ultra-microtome (couteau en diamant) dans la chambre du MEB
 - Remplacement de la porte du MEB



Microscopie électronique 3-D

- Utilisation de logiciels d'analyse d'images 3-D.
- Sélection des objets d'intérêt (segmentation).
- Visualisation en 3-D.



Cryo-ME et biomolécules

- Structure 3-D des biomolécules:
 - La cristallographie par rayon X. Elle ne fonctionne que si on peut obtenir un cristal de la protéine.
 - La spectroscopie en RMN. Elle ne fonctionne pas sur les grosses protéines et les complexes.
 - La cryo-ME. Observation de protéines de toutes tailles ou de complexes protéiques dans leur forme naturelle après congélation.

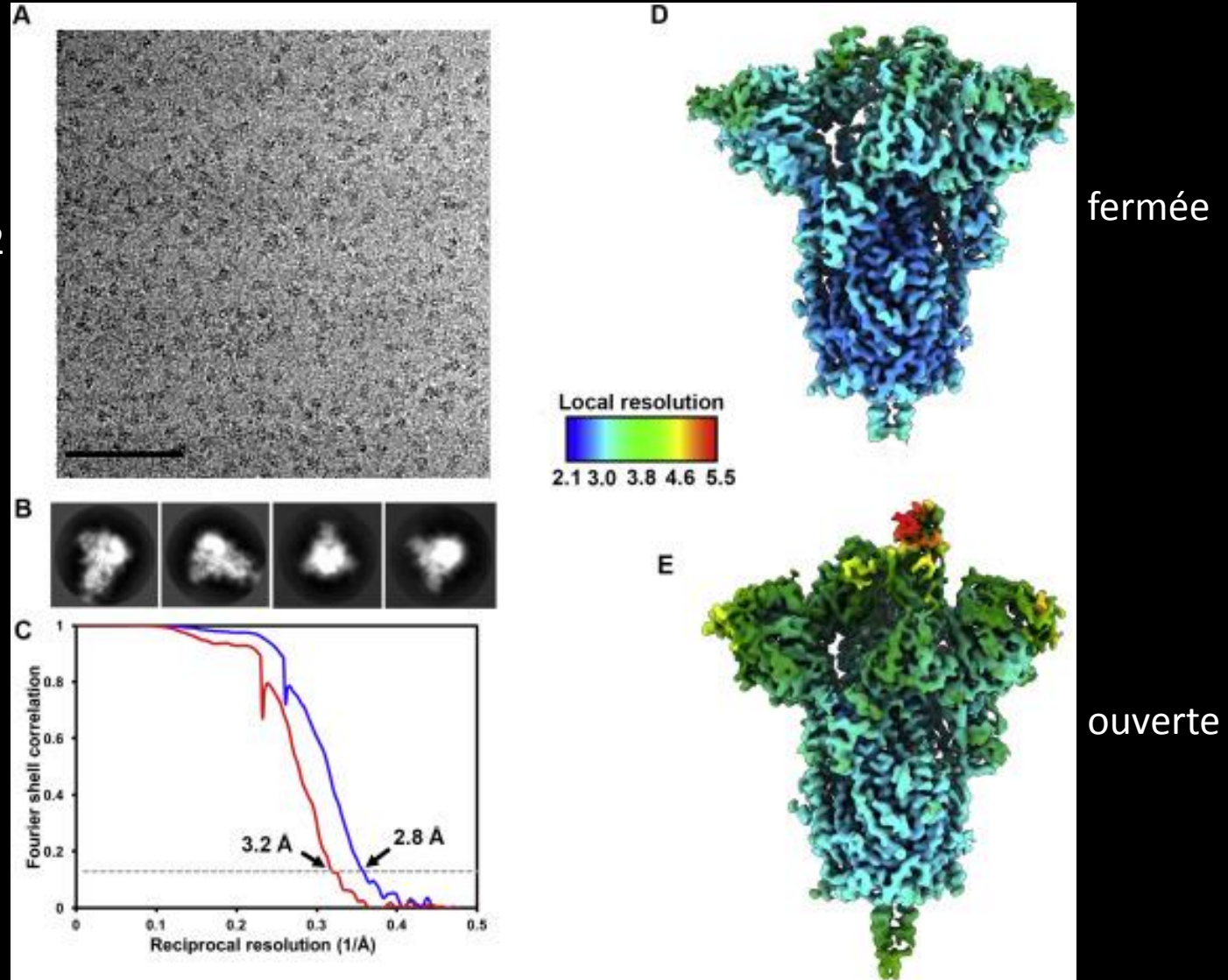
Cryo-ME et biomolécules

- Congélation de la protéine purifiée.
- Observation dans un cryo-MET:
 - Faible illumination, détecteur sensible.
 - Collection automatique d'images.
- Analyse des images:
 - Extraction des différentes orientations de la protéine.
 - Classification.
 - Visualisation 3-D de la protéine.
- La séquence protéique, les données de cristallographie ou de RMN donnent un model structural (hélice- α , feuillet- β) que l'on fait ensuite entrer dans la visualisation 3-D de la protéine.

Cryo-ME et biomolécules

Protéine Spike
du SARS-CoV-2
de la Covid-19

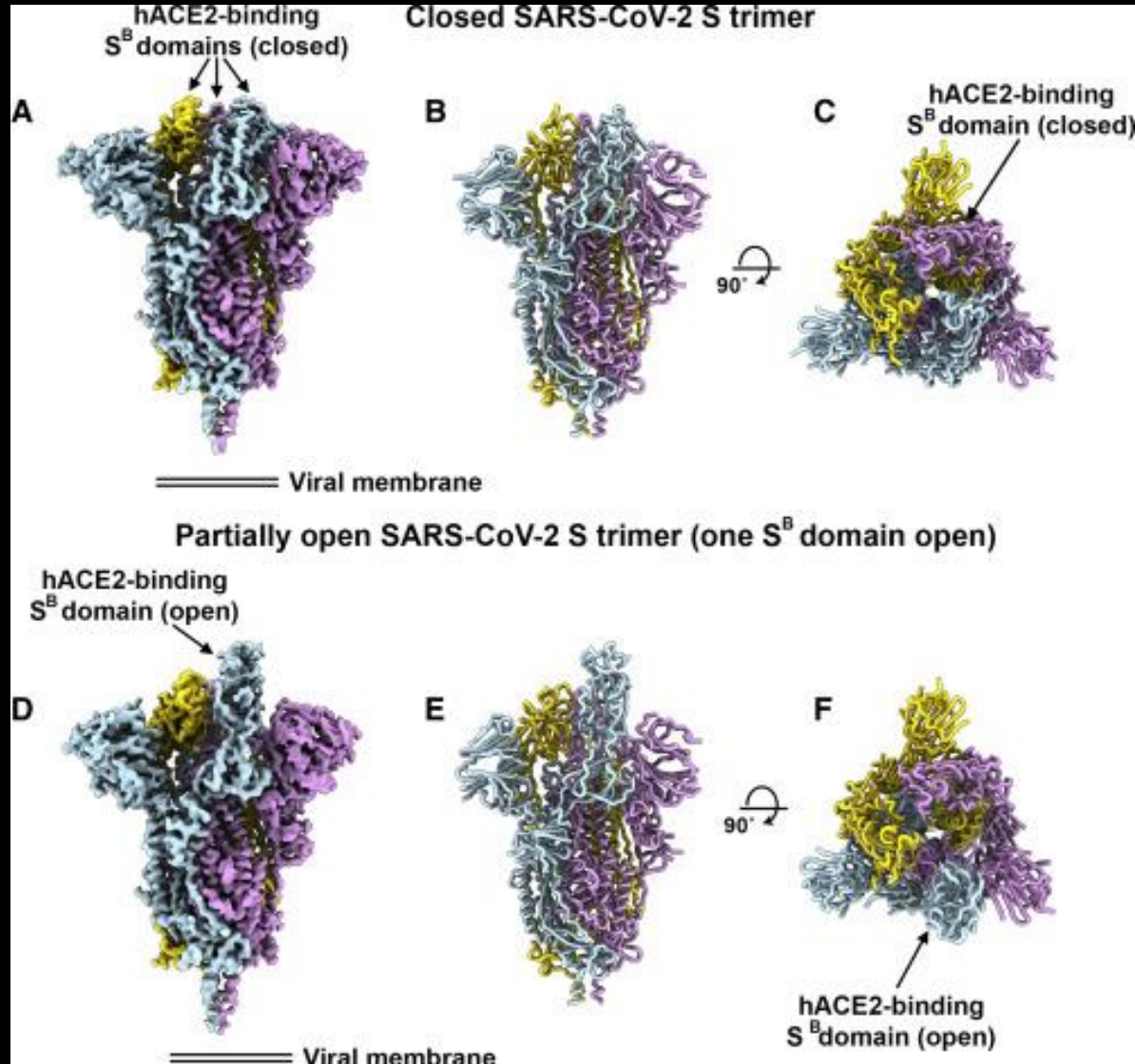
Classification



fermée

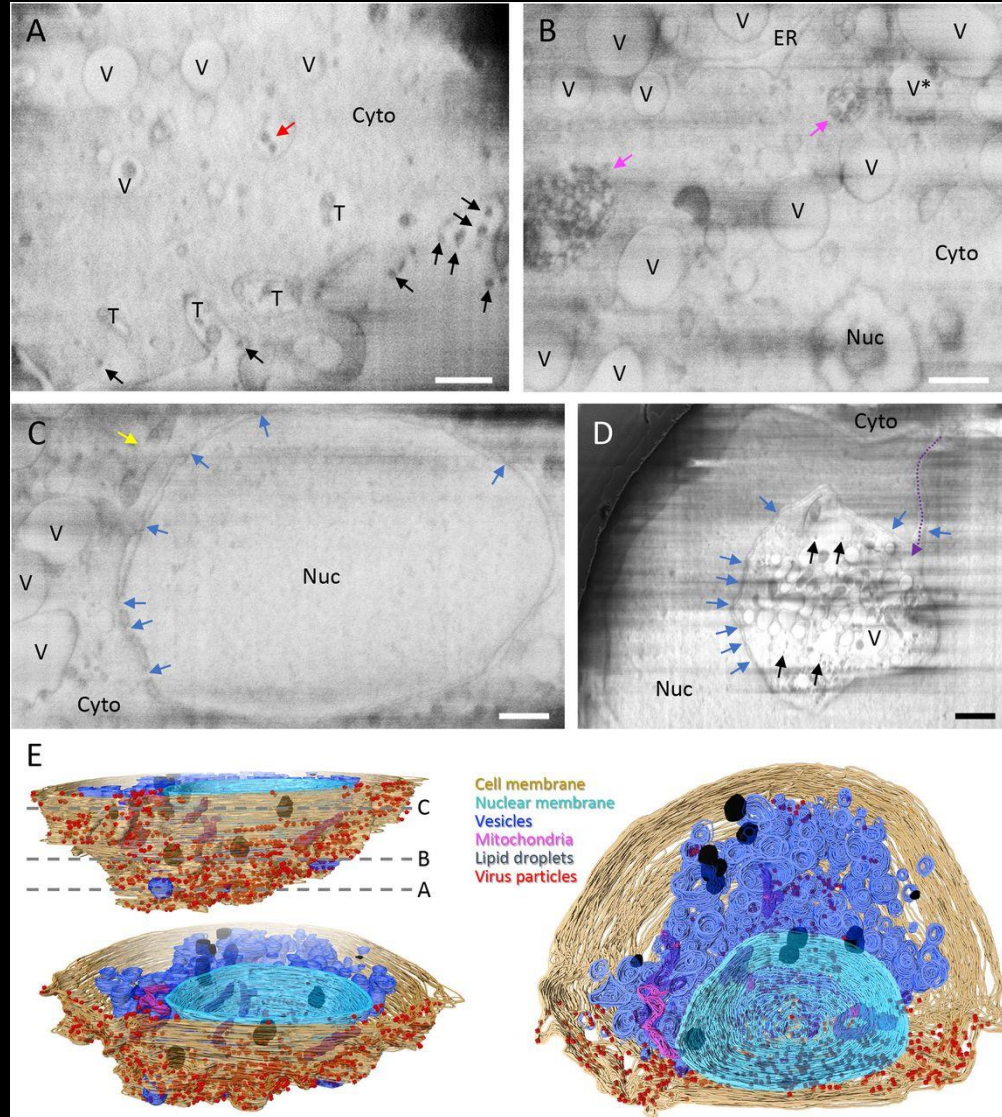
ouverte

Cryo-ME et biomolécules

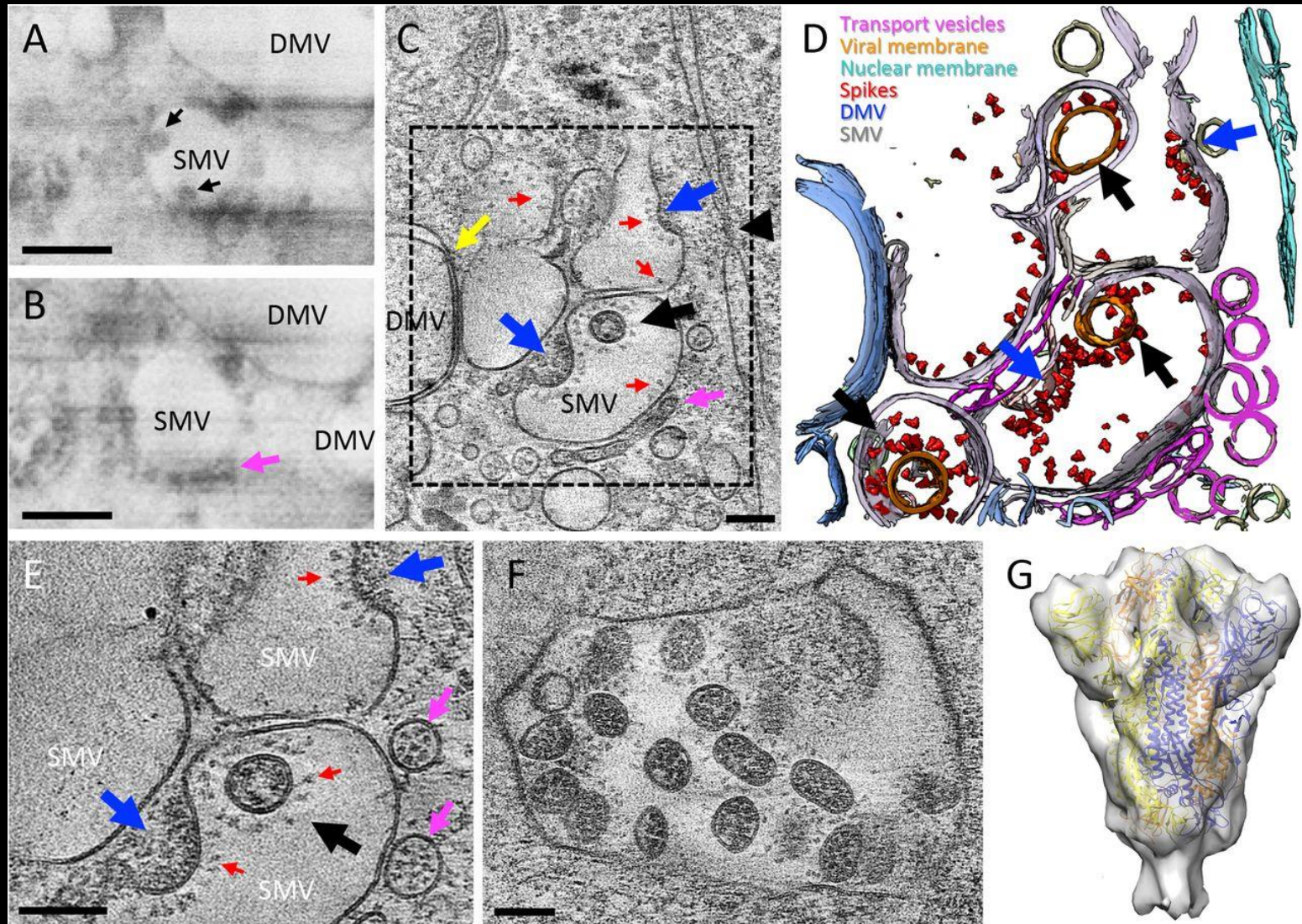


Cryo-3-D-ME et cellules

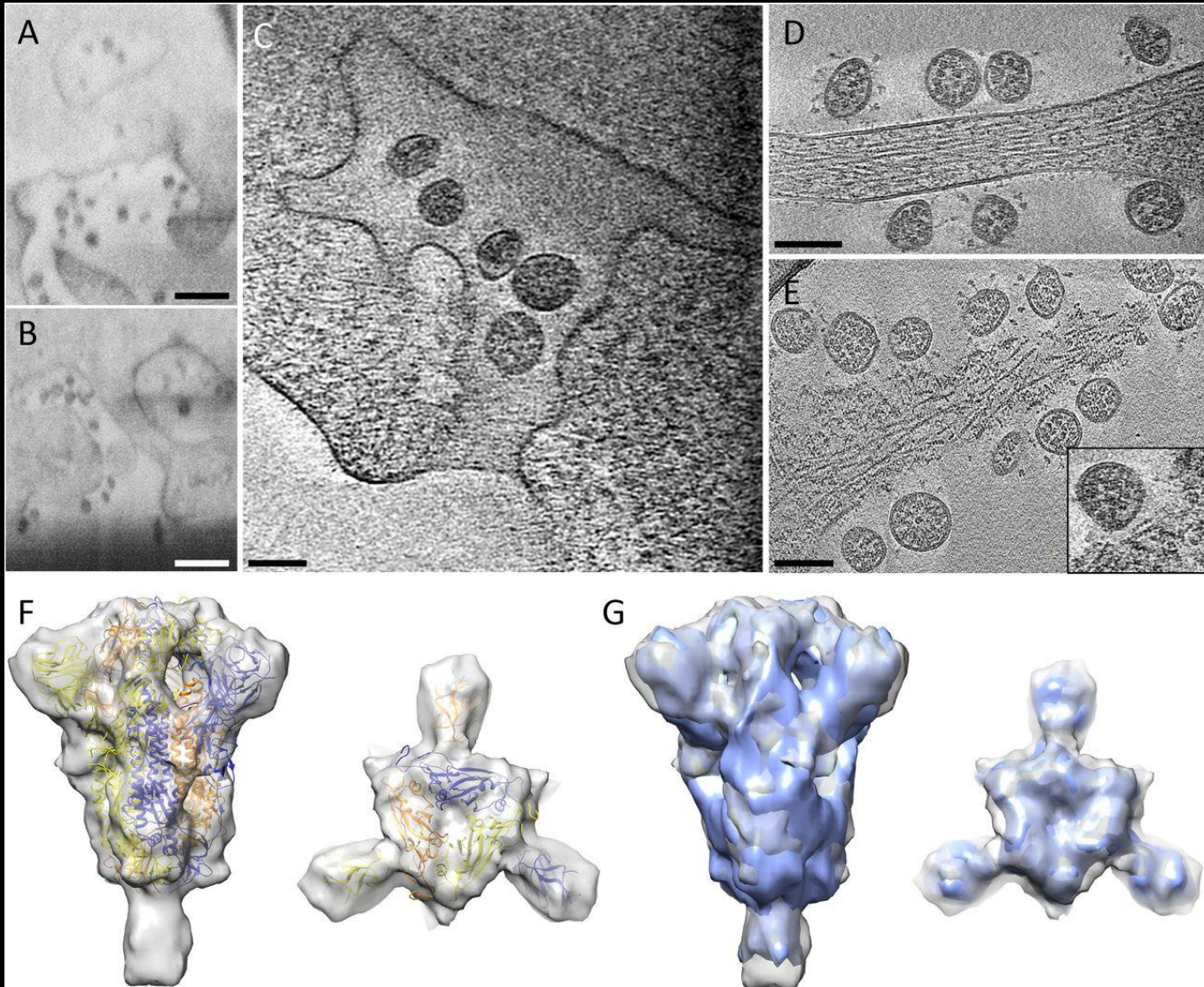
Assemblage et relargage du SARS-CoV-2 de la Covid-19 dans les cellules par cryoFIBSEM



Cryo-3-D-ME et cellules



Cryo-3-D-ME et cellules



Microscopie corrélative

- Voir le même objet avec différents types de microscopes à différentes résolutions:
 - Microscopie photonique (MP plein champ, confocal, vidéo-microscopie, super-résolution).
 - Microscopie à force atomique (AFM).
 - Microscopie électronique (MET et MEB).
 - Microscopie à rayon X.

Microscopie corrélative

- Avoir les différentes informations données par les différents microscopes sur un même échantillon.
- Pouvoir observer les événements rares en microscopie électronique.
 - Microscopie photonique (MP).
 - Sur du vivant.
 - Large population cellulaire, tissu.
 - Suivie de protéines fluorescentes (vidéo-microscopie).
 - Distribution de protéines en super-résolution (nanoscopie).
 - Microscopie à force atomique (AFM).
 - Topographie.
 - Mesure de l'élasticité/dureté.
 - Microscopie électronique (ME).
 - Ultrastructure cellulaire.

Microscopie corrélative

- CLEM:
 - Correlative Light Electron Microscopy.
- CVLEM:
 - Correlative Video Light Electron Microscopy.
- SuperCLEM:
 - Super-resolution Correlative Light Electron Microscopy.
- CLAFEM:
 - Correlative Light Atomic Force Electron Microscopy.

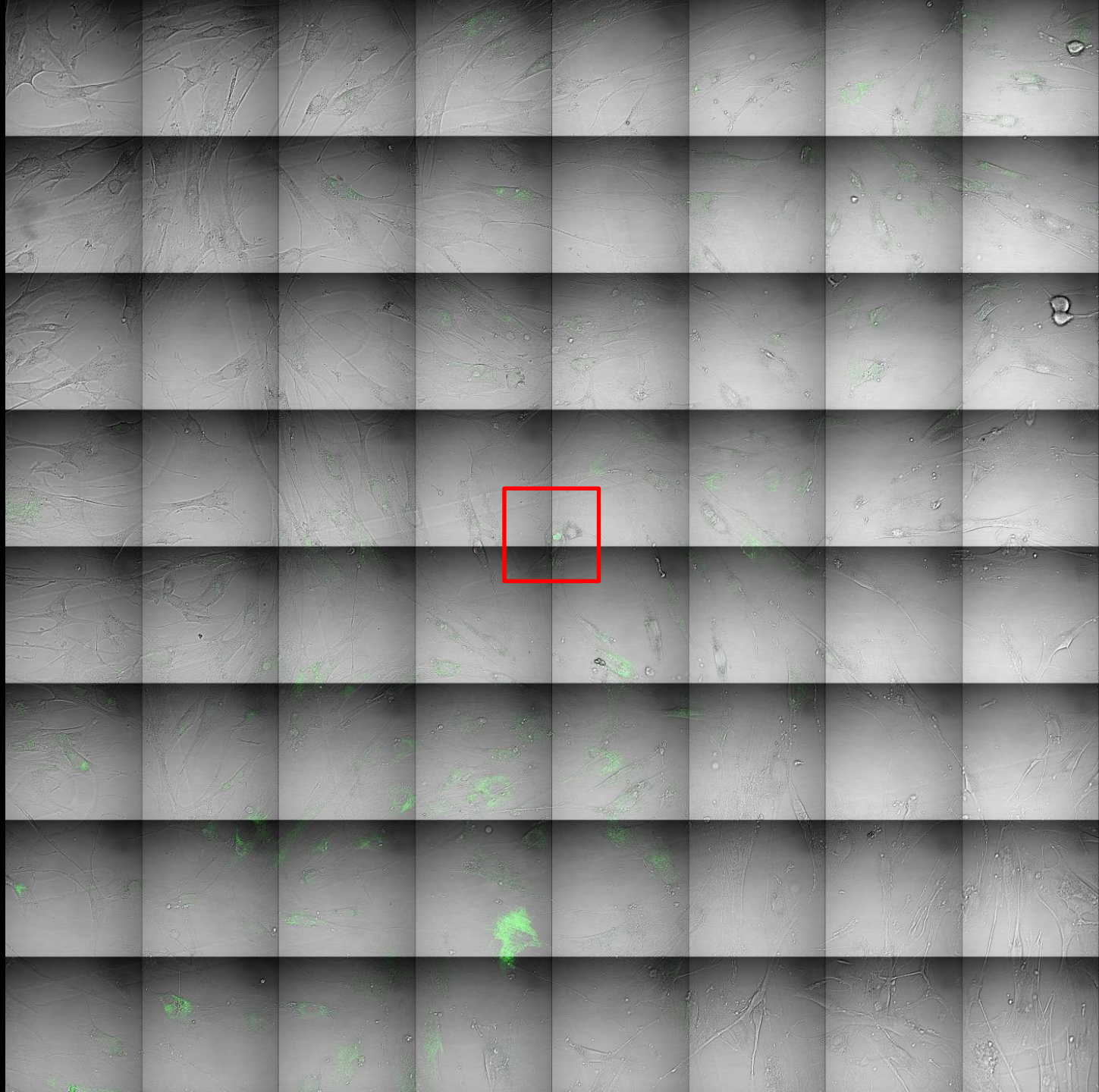
Microscopie corrélative

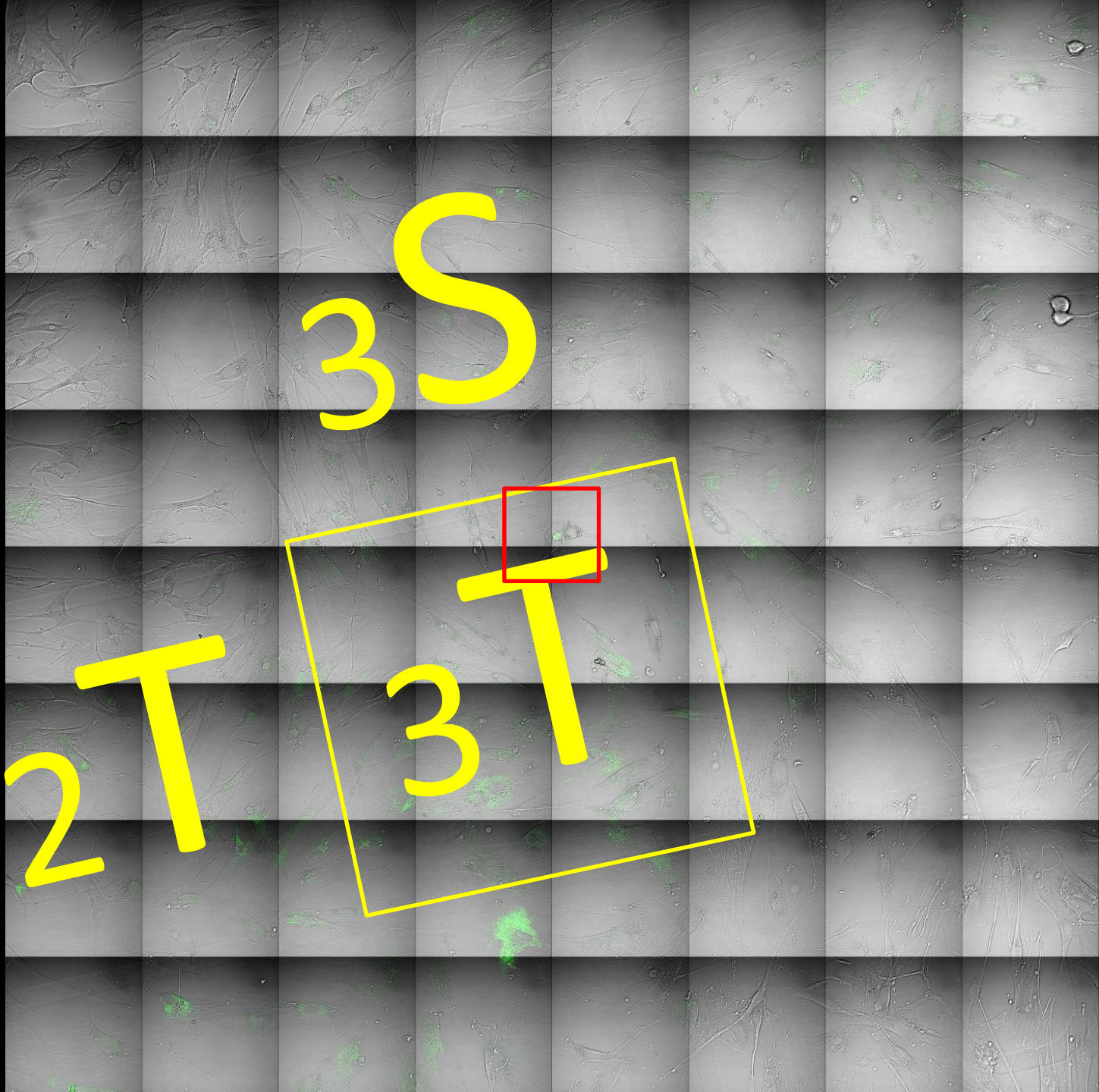
- Pour retrouver la zone d'intérêt d'un microscope à l'autre il faut utiliser un système de repérage.
 - Lamelle de verre avec un système de coordonnées gravé à sa surface

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| 0A | 1A | 2A | 3A | 4A | 5A | 6A | 7A | 8A | 9A | AA | BA | CA | DA | EA | FA | GA | HA | IA | JA |
| 0B | 1B | 2B | 3B | 4B | 5B | 6B | 7B | 8B | 9B | AB | BB | CB | DB | EB | FB | GB | HB | IB | JB |
| 0C | 1C | 2C | 3C | 4C | 5C | 6C | 7C | 8C | 9C | AC | BC | CC | DC | EC | FC | GC | HC | IC | JC |
| 0D | 1D | 2D | 3D | 4D | 5D | 6D | 7D | 8D | 9D | AD | BD | CD | DD | ED | FD | GD | HD | ID | JD |
| 0E | 1E | 2E | 3E | 4E | 5E | 6E | 7E | 8E | 9E | AE | BE | CE | DE | EE | FE | GE | HE | IE | JE |
| 0F | 1F | 2F | 3F | 4F | 5F | 6F | 7F | 8F | 9F | AF | BF | CF | DF | EF | FF | GF | HF | IF | JF |
| 0G | 1G | 2G | 3G | 4G | 5G | 6G | 7G | 8G | 9G | AG | BG | CG | DG | EG | FG | GG | HG | IG | JG |
| 0H | 1H | 2H | 3H | 4H | 5H | 6H | 7H | 8H | 9H | AH | BH | CH | DH | EH | FH | GH | HH | IH | JH |
| 0I | 1I | 2I | 3I | 4I | 5I | 6I | 7I | 8I | 9I | AI | BI | CI | DI | EI | FI | GI | HI | II | JI |
| 0J | 1J | 2J | 3J | 4J | 5J | 6J | 7J | 8J | 9J | AJ | BJ | CJ | DJ | EJ | FJ | GJ | HJ | IJ | JJ |
| 0K | 1K | 2K | 3K | 4K | 5K | 6K | 7K | 8K | 9K | AK | BK | CK | DK | EK | FK | GK | HK | IK | JK |
| 0L | 1L | 2L | 3L | 4L | 5L | 6L | 7L | 8L | 9L | AL | BL | CL | DL | EL | FL | GL | HL | IL | JL |
| 0M | 1M | 2M | 3M | 4M | 5M | 6M | 7M | 8M | 9M | AM | BM | CM | DM | EM | FM | GM | HM | IM | JM |
| 0N | 1N | 2N | 3N | 4N | 5N | 6N | 7N | 8N | 9N | AN | BN | CN | DN | EN | FN | GN | HN | IN | JN |
| 0O | 1O | 2O | 3O | 4O | 5O | 6O | 7O | 8O | 9O | AO | BO | CO | DO | EO | FO | GO | HO | IO | JO |
| 0P | 1P | 2P | 3P | 4P | 5P | 6P | 7P | 8P | 9P | AP | BP | CP | DP | EP | FP | GP | HP | IP | JP |
| 0Q | 1Q | 2Q | 3Q | 4Q | 5Q | 6Q | 7Q | 8Q | 9Q | AQ | BQ | CQ | DQ | EQ | FQ | GQ | HQ | IQ | JQ |
| 0R | 1R | 2R | 3R | 4R | 5R | 6R | 7R | 8R | 9R | AR | BR | CR | DR | ER | FR | GR | HR | IR | JR |
| 0S | 1S | 2S | 3S | 4S | 5S | 6S | 7S | 8S | 9S | AS | BS | CS | DS | ES | FS | GS | HS | IS | JS |
| 0T | 1T | 2T | 3T | 4T | 5T | 6T | 7T | 8T | 9T | AT | BT | CT | DT | ET | FT | GT | HT | IT | JT |
| 0U | 1U | 2U | 3U | 4U | 5U | 6U | 7U | 8U | 9U | AU | BU | CU | DU | EU | FU | GU | HU | IU | JU |
| 0V | 1V | 2V | 3V | 4V | 5V | 6V | 7V | 8V | 9V | AV | BV | CV | DV | EV | FV | GV | HV | IV | JV |
| 0W | 1W | 2W | 3W | 4W | 5W | 6W | 7W | 8W | 9W | AW | BW | CW | DW | EW | FW | GW | HW | IW | JW |
| 0X | 1X | 2X | 3X | 4X | 5X | 6X | 7X | 8X | 9X | AX | BX | CX | DX | EX | FX | GX | HX | IX | JX |
| 0Y | 1Y | 2Y | 3Y | 4Y | 5Y | 6Y | 7Y | 8Y | 9Y | AY | BY | CY | DY | EY | FY | GY | HY | IY | JY |
| 0Z | 1Z | 2Z | 3Z | 4Z | 5Z | 6Z | 7Z | 8Z | 9Z | AZ | BZ | CZ | DZ | EZ | FZ | GZ | HZ | IZ | JZ |

CLEM

- Cellules infectées avec des parasites *Toxoplasma gondii*.
- Induction une délétion du gène $AP\mu 1$ avec le système Crelox dans les parasites.
- Après incubation avec la rapamycine, le gène $AP\mu 1$ est éliminé et un gène GFP est exprimé.
- Les vacuoles contenant des parasites avec la délétion deviennent **fluorescentes**.
- **Problème**: seulement 12% des vacuoles contenant des parasites deviennent fluorescentes.





Vacuole avec parasites ayant la délétion AP μ 1



Vacuole avec parasites sauvages

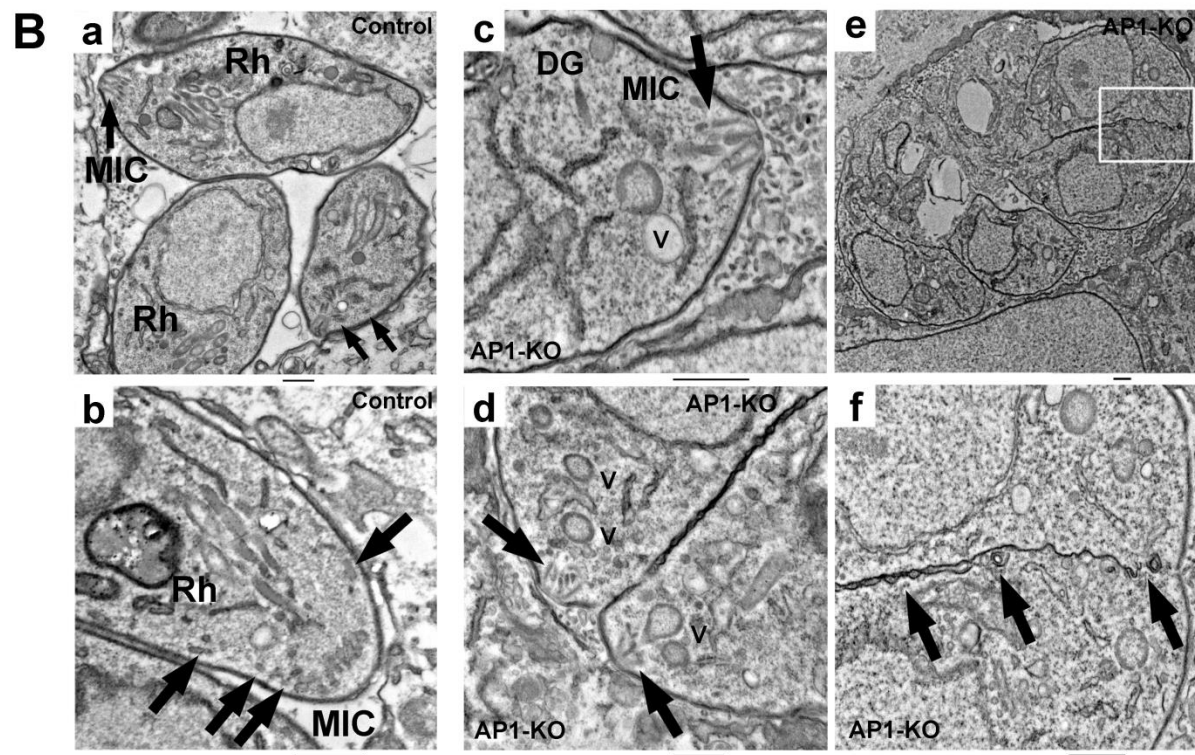
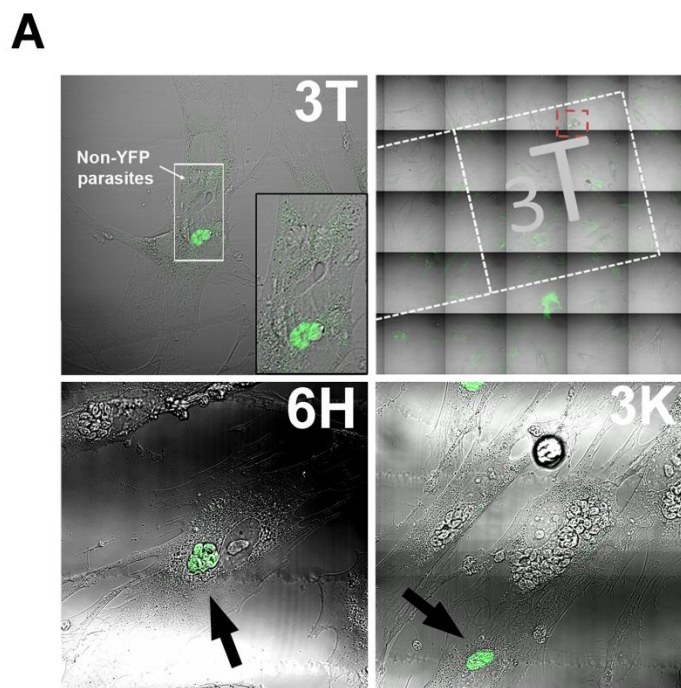
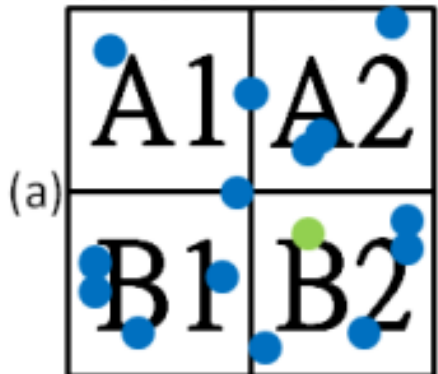
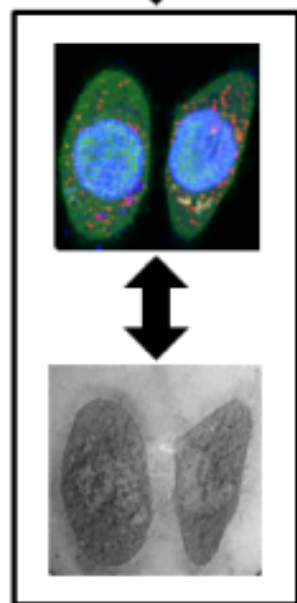


Photo-etched coverslip



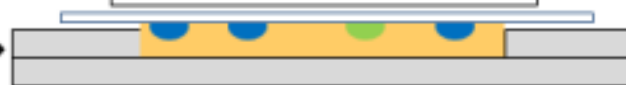
(b) Fluorescence microscopy



CLEM

(d)

Processing for TEM
Flat embedding



Imprinted resin



Transmitted light microscopy

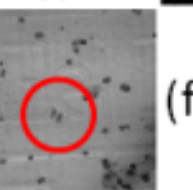
(c)

coverslip

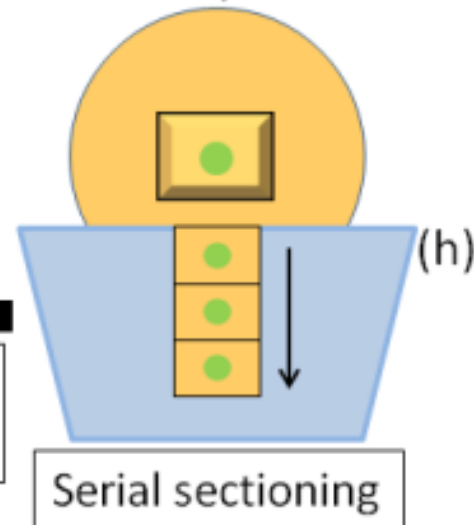


Relocation

resin



Cell retrieval
Mounting on block
trimming



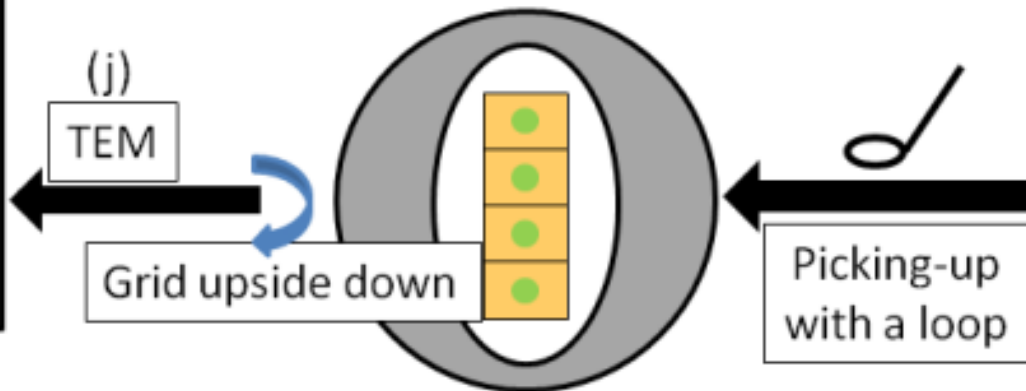
(i)

Carbon/formvar slot grid

(j)

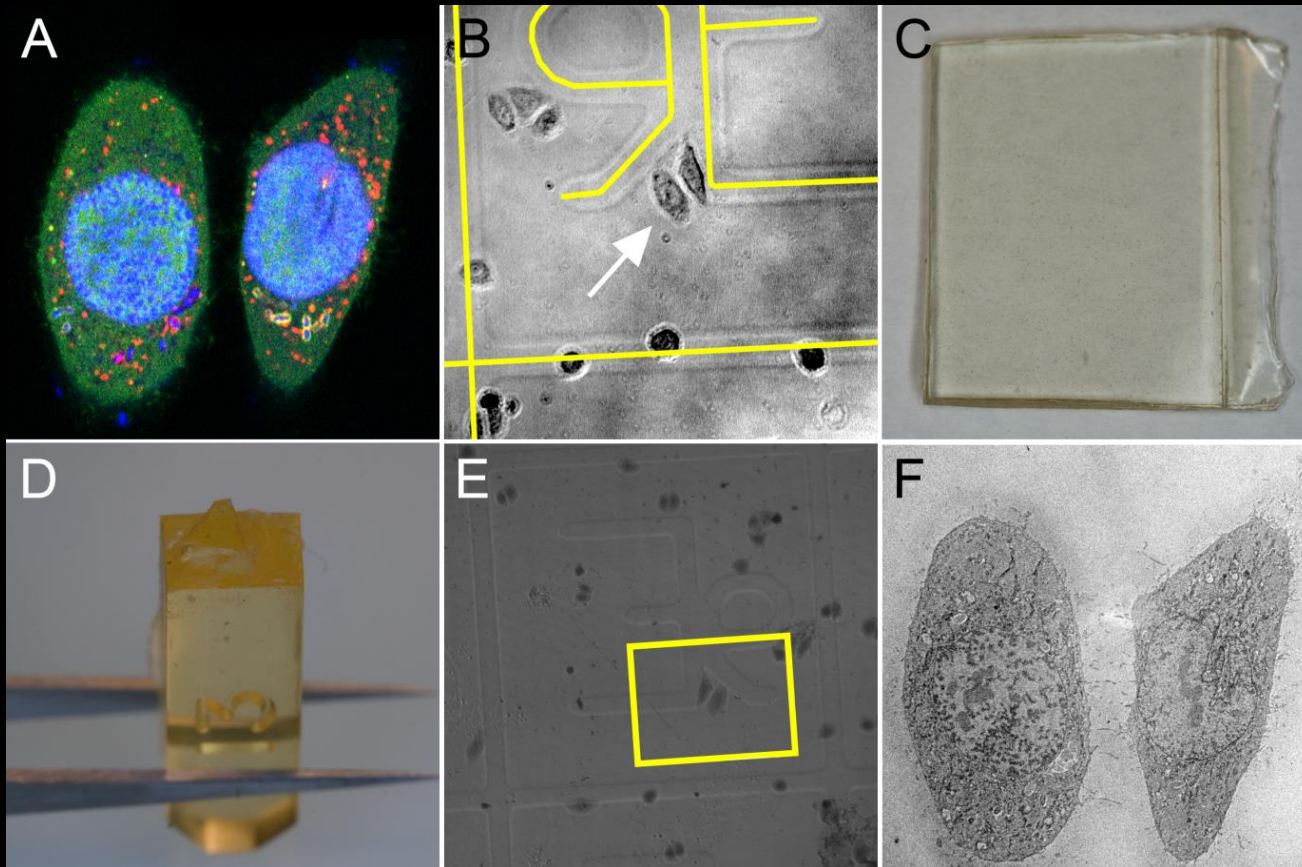
TEM

Grid upside down

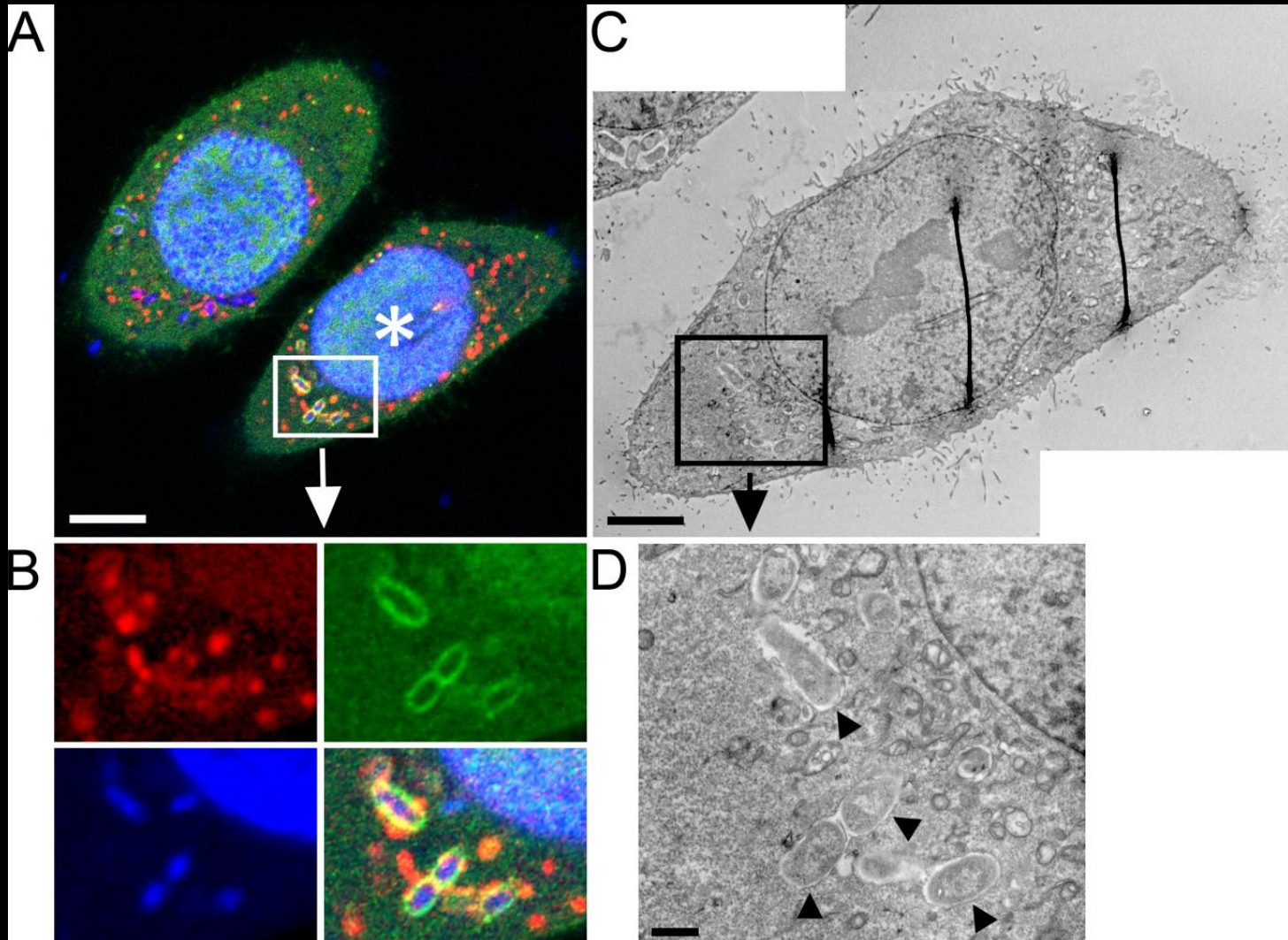


CLEM

- Microscopie confocale et MET



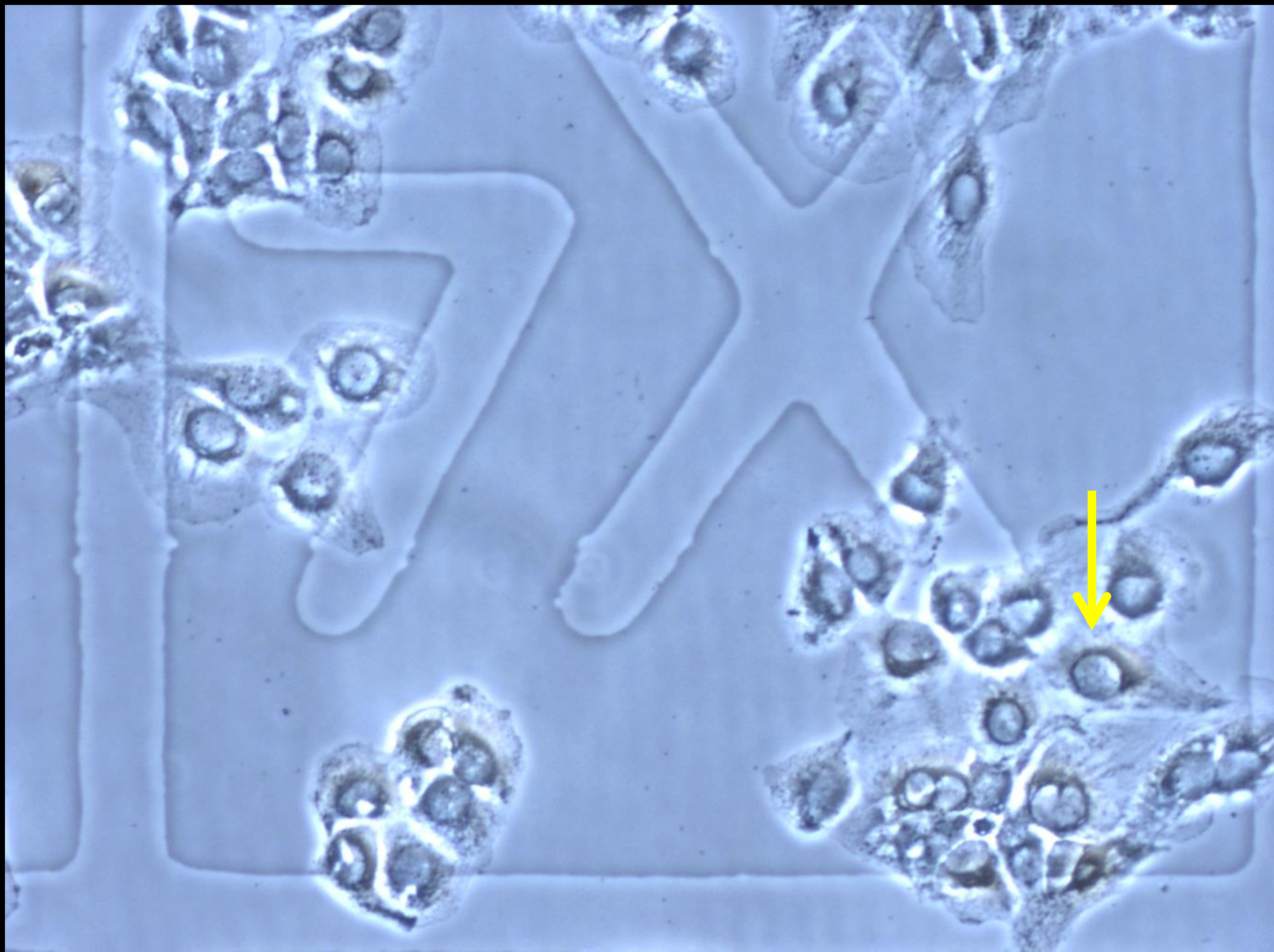
CLEM



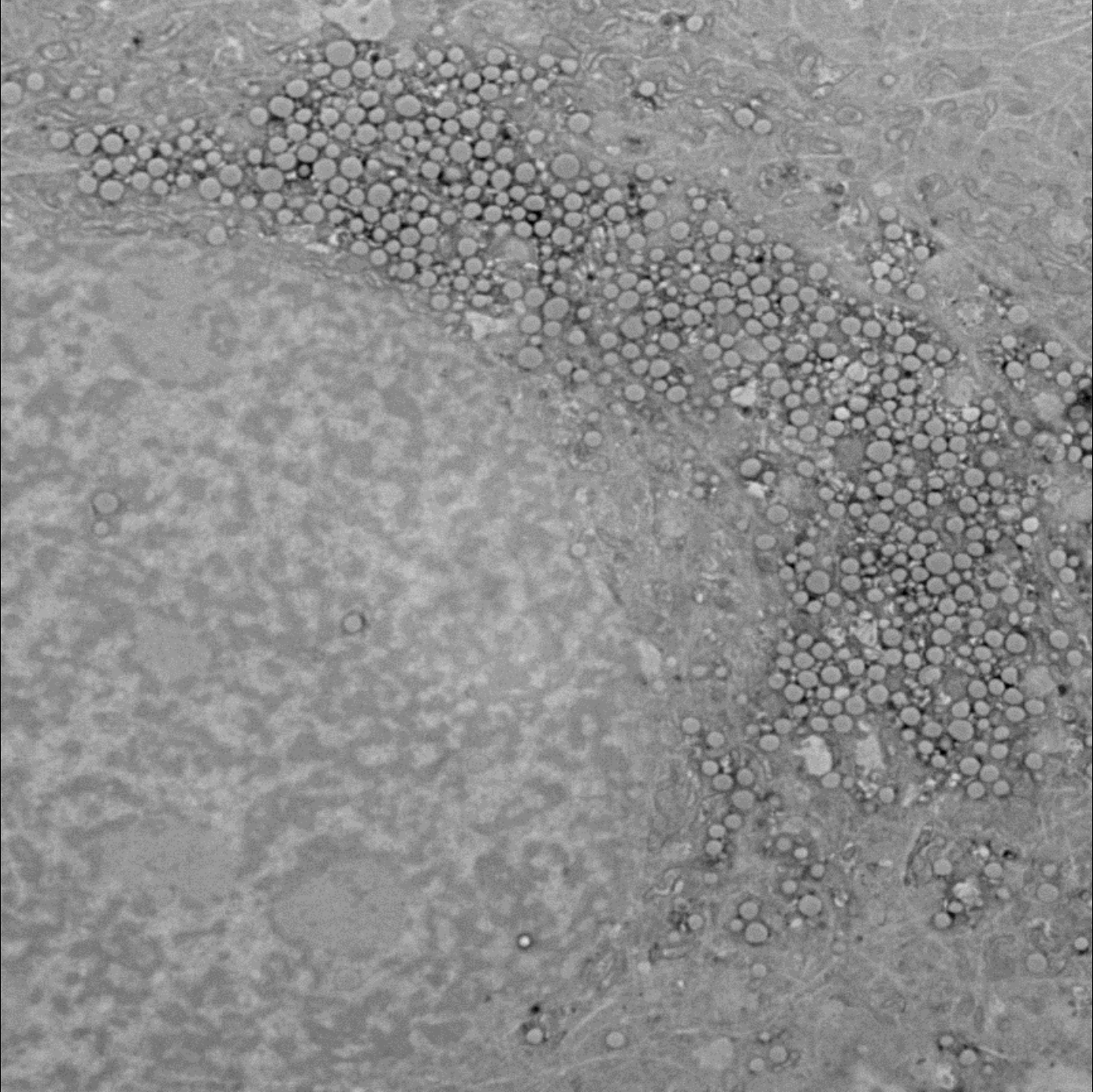
CLEM

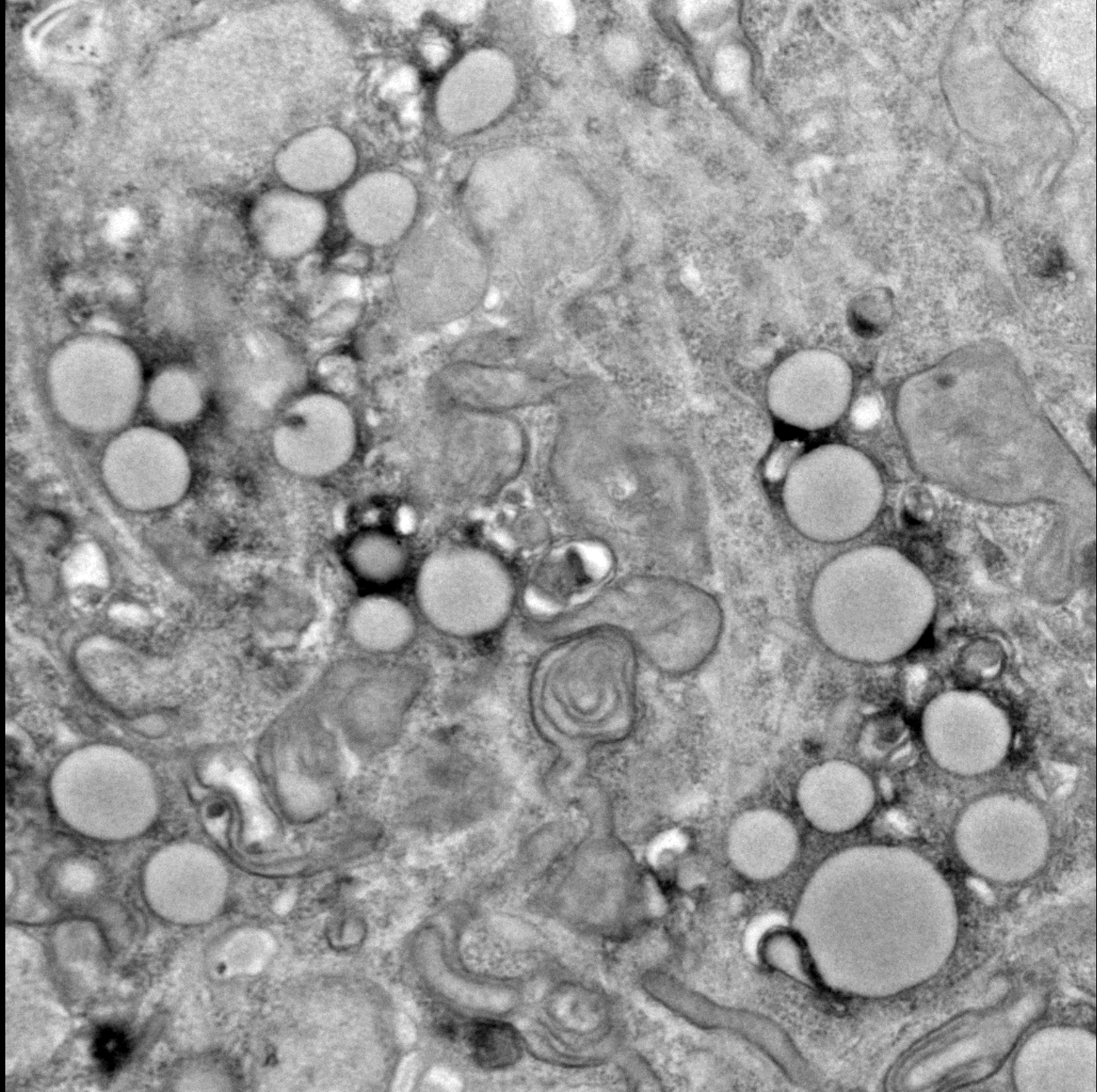
- Virus de l'hépatite C (HCV) avec une de ses protéines non-structurales couplée à l'APEX2:
 - Peroxidase ascorbate de soja.
 - Diaminobenzidine (DAB)+H₂O₂.
 - > Le DAB donne un précipité marron, visible en microscopie optique, là où est localisée la protéine virale.
 - + osmium, le précipité est visible en microscopie électronique.



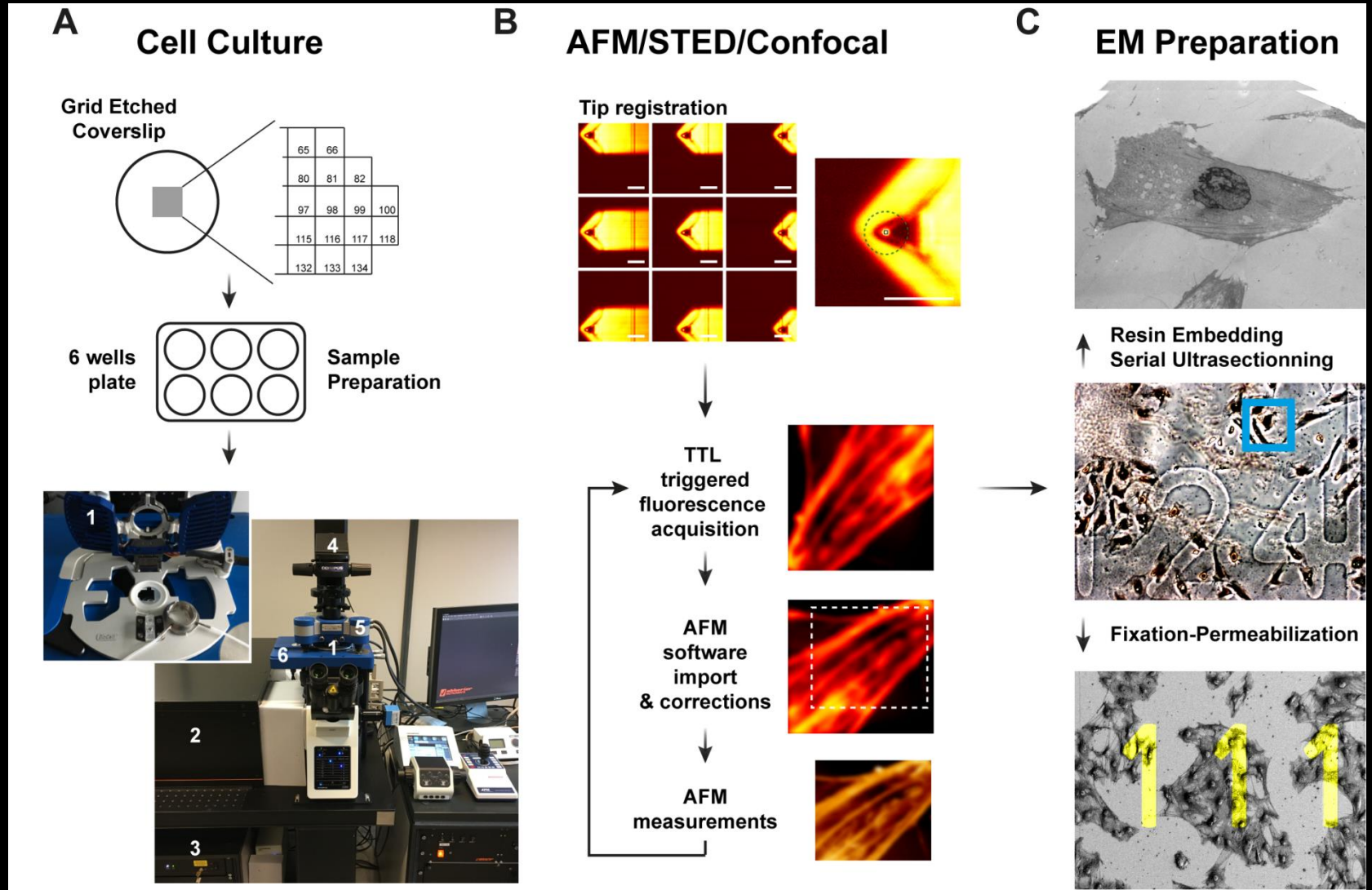




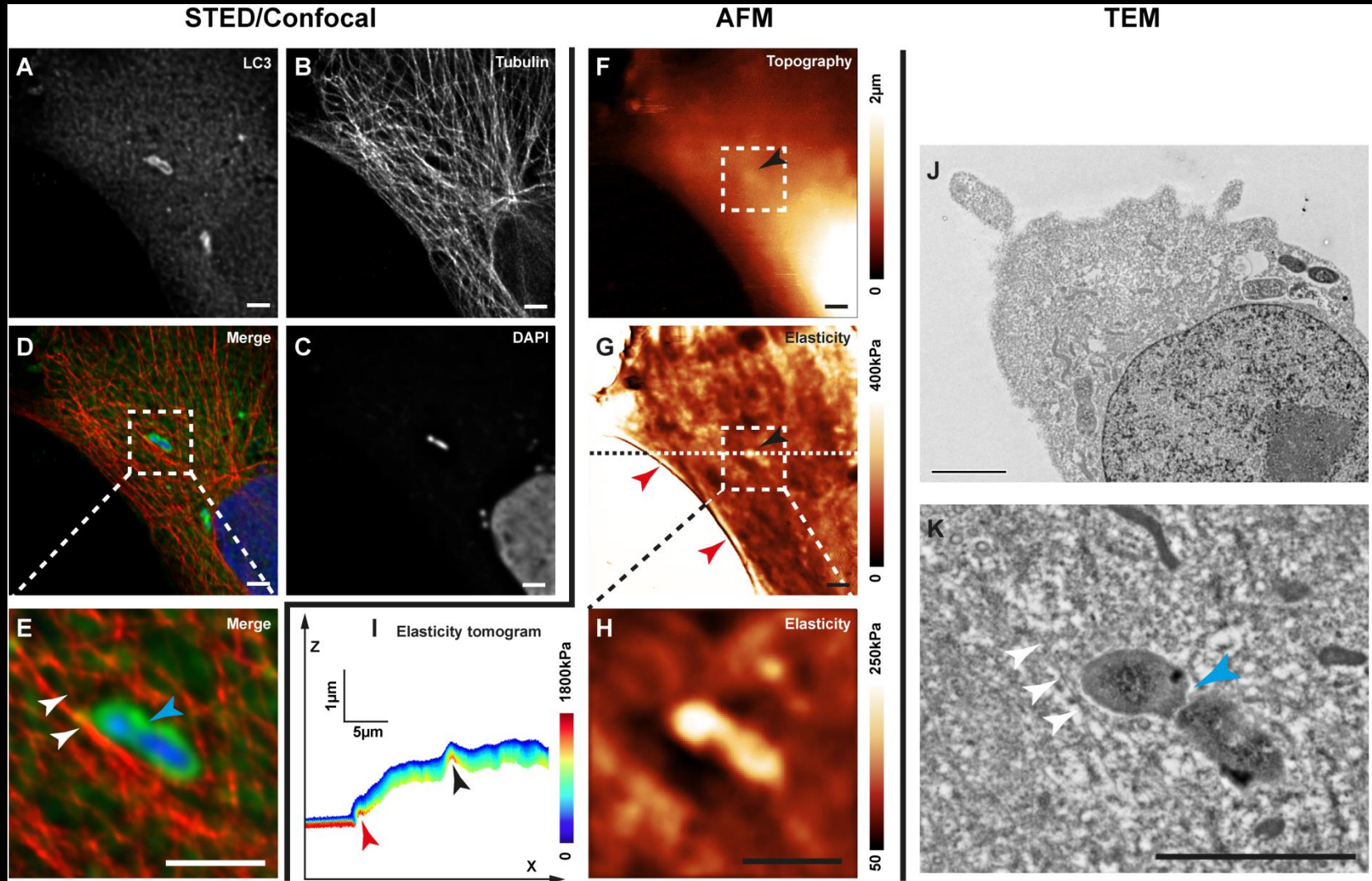




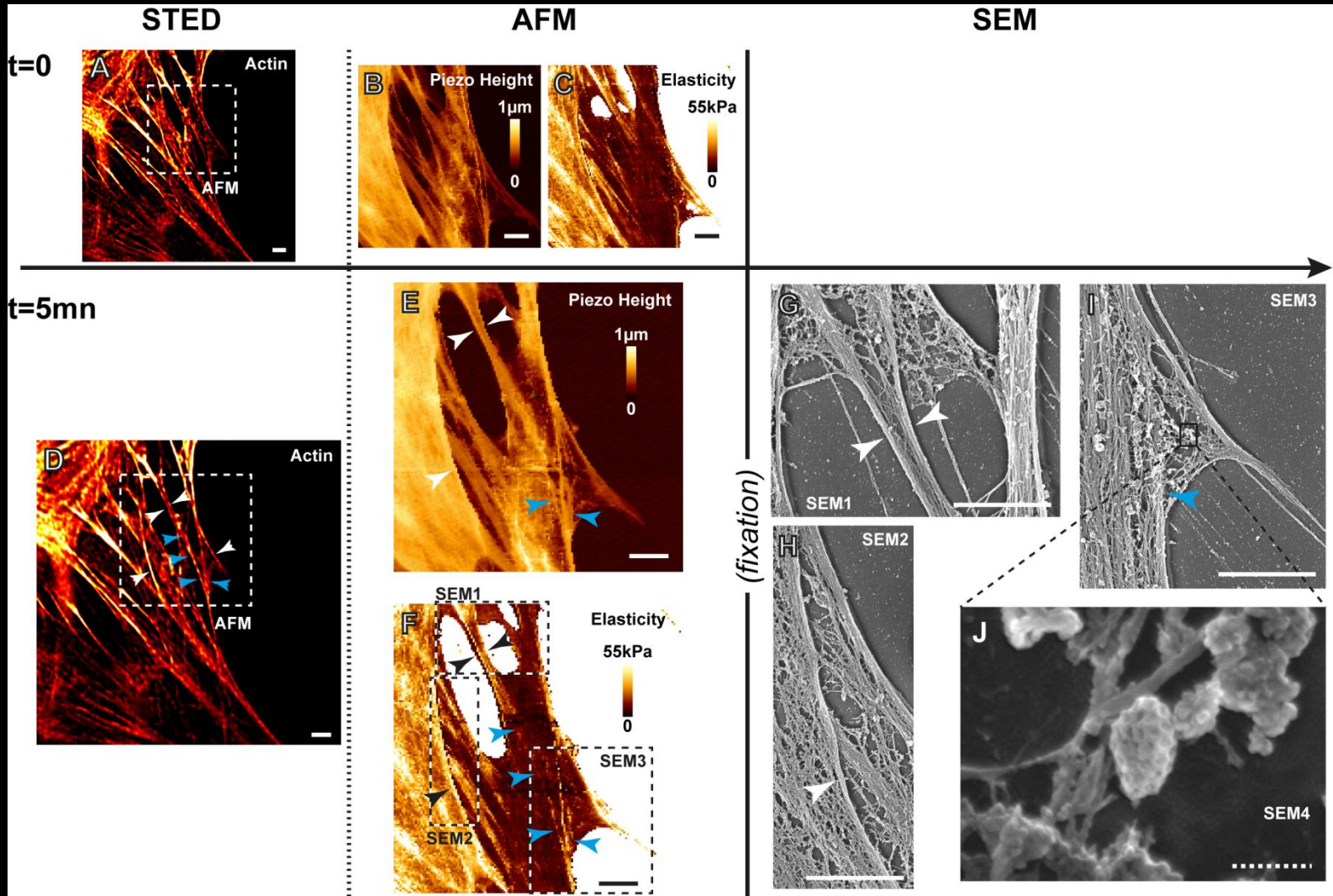
CLAFEM



CLAFEM



CLAFEM



CLEM

- Combiner différentes préparations et différents modes d'observation de l'échantillon pour chaque microscopie:
 - En MP et AFM, échantillons vivants en milieu liquide à pression atmosphérique.
 - En ME, échantillons déshydratés sous vide.
- Besoin d'adapter les protocoles pour associer les différentes microscopies.

En conclusion

- Avec la microscopie électronique on peut:
 - Voir des échantillons à très grande résolution (nm et Å) – virus, protéines, structures intracellulaires.
 - Finement localiser des protéines par rapport aux structures intracellulaires (immunomarquage).
 - Faire des analyses élémentaires (EDX et EELS).
 - Faire de la reconstruction 3-D.
 - Combiner avec d'autres techniques de microscopies.