Mise au point d'un nouvel adaptateur pour coupler la congelation à haute pression au Microscope Electronique à Balayage
Application à l'étude ultrastructurale des cardiomyocytes de souris

Payre B.*, Gontier E.*, Jarray A.*, Martinez Y.* Laugier J.P., Delalleau A., Gaillard B.M., Anselme I., Goudounèche D., Fourquaux I., Delisle M.B., Guilbeau-Frugier C.

Le défit de la microscope électronique est de pouvoir observer les échantillons au plus prêt de leur état natif. Ainsi la cryofixation qui ne nécessite pas de fixation chimique et de contrastant semble devenir la clé pour observer les échantillons. Cependant elle doit être utilisée dans des conditions optimums afin d'éviter l'apparition de cristaux d'eau qui peuvent modifier de façon importante l'ultrastructure des échantillons. La cryofixation à haute pression est la seule technique actuellement qui permet de cryofixer les échantillons sans utilisation de cryoprotectant sur des épaisseurs proches de 200µm. C'est pour cette raison que nous avons utilisé le cryofixateur haute pression afin de préparer nos échantillons pour l'observation après cryofracture en cryo-MEB.
Le verrou technologique rencontré était l'absence d'adaptateur permettant la fixation des cupules du cryofixateur haute pression.
L'objectif au sein du groupe de travail du RCCM a donc été de fabriquer un adaptateur permettant : - la fixation des cupules du cryofixateur haute pression (EM-ICE ou HPM100, Leica), - de se fixer au support des modules de Cryo-préparation en MEB (Alto, Gatan ou PP300 et PP3010T Quorum).
Nous avons testé et appliqué cette technique pour l'observation de l'ultrastructure de cardiomyocytes de souris dont la morphologie est bien connue et qui permet donc d'identifier facilement les artéfacts.

Verrou technologique

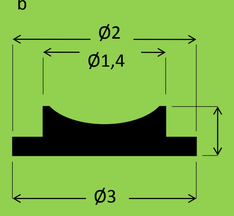
?

Contraintes

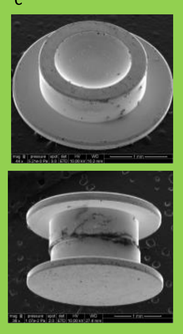
- Fixation des cupules en sandwich (c) sur l'adaptateur dans l'azote liquide.
- La fixation doit résister à la force de la lame du scalpel pour réaliser la cryofracture.
- L'adaptateur doit se fixer sur le support de transfert du module de cryopréparation (e).

a

b



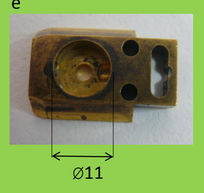
c



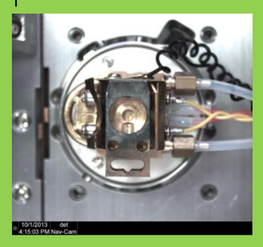
(a) cryofixateur haute pression ICE Leica, (b) schéma technique de la cupule, (c) photo MEB de la cupule seule (haut) ou avec un échantillon en sandwich (bas).

d

e



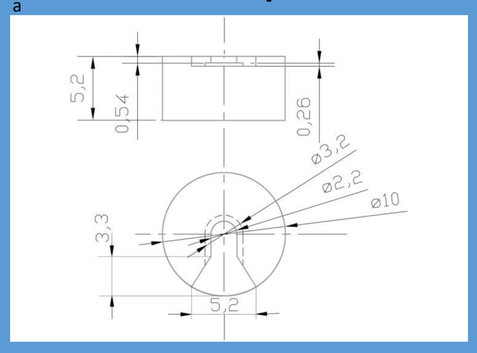
f



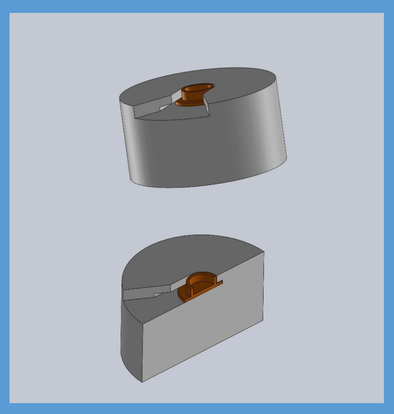
(d) MEB quanta 250 FEG équipé d'un module de cryopréparation PP3000T Quorum, (e) support de transfert adapté à la platine cryo du module de cryopréparation et (f) de la platine cryo du MEB.

1 - Conception

a



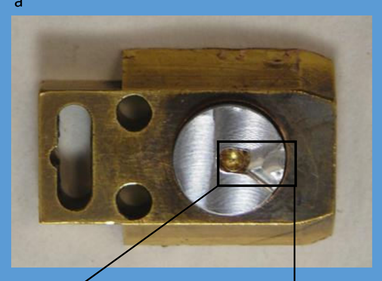
b



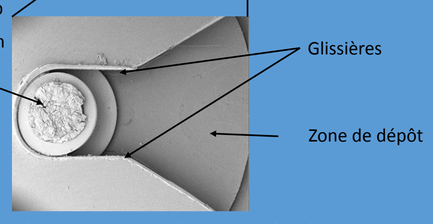
(a) schéma technique du nouvel adaptateur permettant de fixer une cupule du cryofixateur haute pression, (b) vue tridimensionnelle de la cupule du cryofixateur haute pression placée dans la zone de fixation du nouvel adaptateur.

2 - Réalisation

a



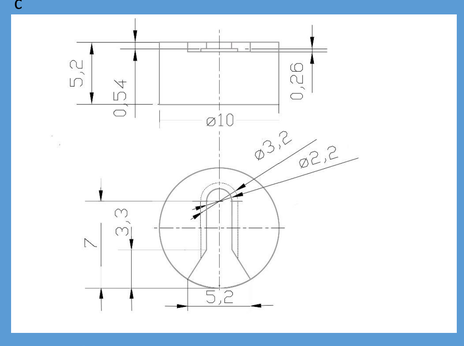
b



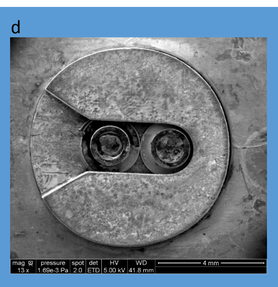
(a) photo du système complet : cupule du cryofixateur haute pression, adaptateur et support des platines cryo, (b) photo MEB de la cupule du cryofixateur haute pression dans l'adaptateur permettant de distinguer les trois zones de l'adaptateur.

3 - Optimisation

c



d



(c) nouveau schéma technique et (d) photo MEB d'une évolution de l'adaptateur permettant de fixer deux cupules du cryofixateur haute pression.

4 - Utilisation - Cryofracture

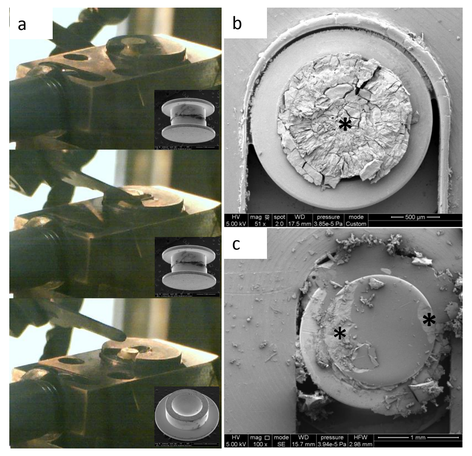
Cryofracture de l'échantillon à l'intérieur du module de cryopréparation Quorum PP3000T à l'aide de la lame de scalpel.

(a) : (image du haut) cupule en sandwich placée sur la platine du module de cryopréparation Quorum PP3000T, (image du milieu) la lame du scalpel pousse la cupule supérieure du sandwich, (image du bas) la cupule supérieure du sandwich a été enlevée ce qui a produit la fracture de l'échantillon, (b) cryofracture (*) provoquée par la dissociation des deux cupules, (c) cryofracture (*) réalisée avec la lame du scalpel directement sur l'échantillon dans le cas où il n'y a pas de fracture au moment de la séparation des cupules.

a

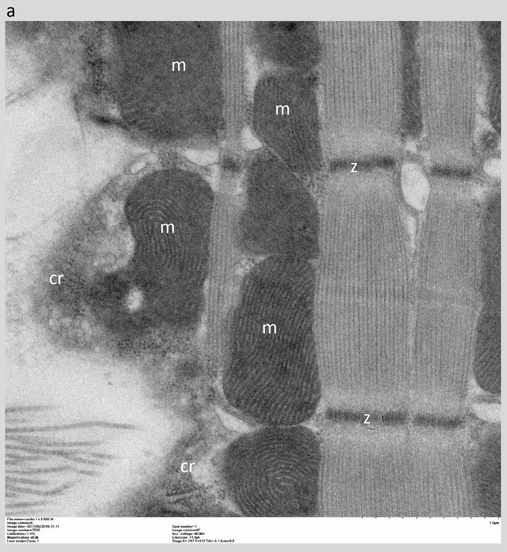
b

c

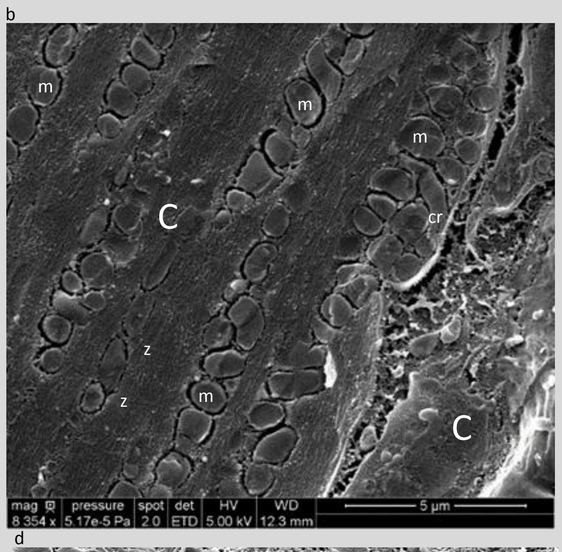


5 – Résultats : ultrastructure du cardiomyocyte

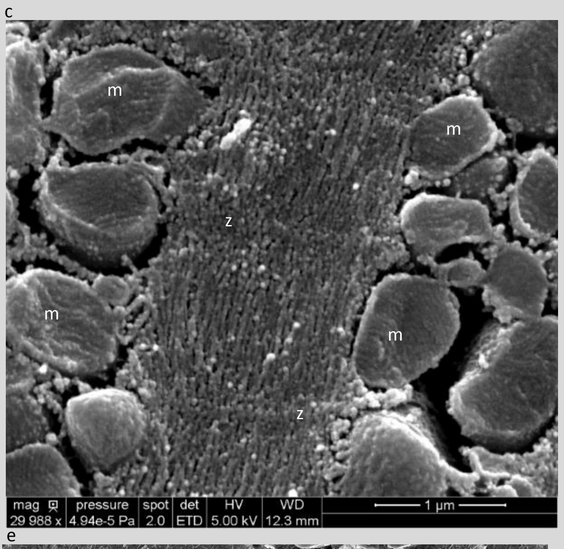
a



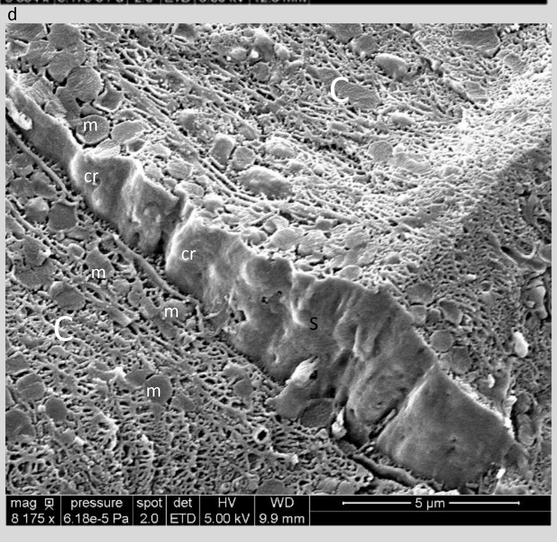
b



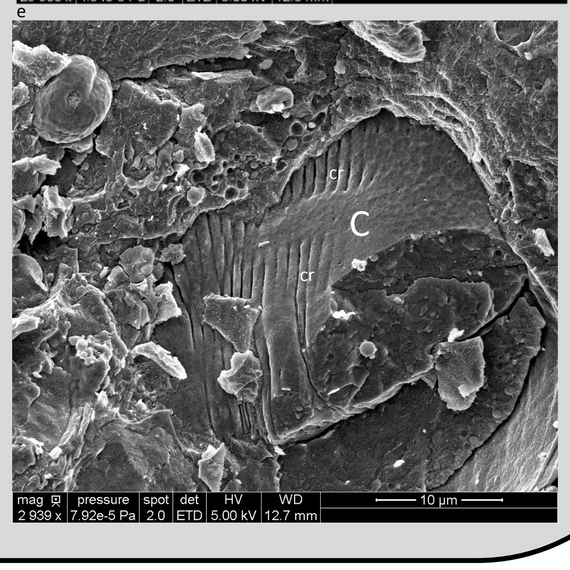
c



d



e



(a) ultrastructure du cardiomyocyte de souris en MET,

(b - e) ultrastructure du cardiomyocyte de souris après cryofracture, sublimation à -95°C durant 30 min et métallisation au platine :
(b) jonction entre deux cardiomyocytes,
(c) organisation des fibres musculaires et des mitochondries,
(d) visualisation des crêtes formées par le sarcolemme,

Légende : m : mitochondrie
z : strie Z
s : sarcolemme
C : Cardiomyocyte
cr : crêtes

6 - Conclusion

Le groupe de travail du RCCM « cryo-MEB » a mis en place un système qui permet de visualiser en cryo-MEB des échantillons cryofixés au cryofixateur haute pression. Ce système est facile d'utilisation et reste à la disposition de tous les membres du RCCM qui souhaiteraient l'utiliser sur simple demande au responsable du groupe.

L'utilisation de ce nouvel adaptateur permettra de mieux appréhender les réseaux tridimensionnels d'échantillons biologiques et chimiques.

Il offre une préservation maximale des échantillons par :
- l'utilisation de la cryofixation à haute pression sans utilisation de molécules chimiques.
- L'utilisation de la sublimation à -110°C qui protège l'échantillon d'une recristallisation supérieure à 1nm et permet de faire apparaitre les structures 3D emprisonnées dans l'eau libre.

Cette technique permet donc la mise en évidence de structures en 3D difficiles à visualiser ou à comprendre avec d'autres techniques comme l'organisation des crêtes dans le cœur de souris.

Journées de formation RCCM 2018 à Clermont Ferrand