



Le CCMA, une plateforme pluridisciplinaire spécialisée en microscopie électronique

Installée à la Faculté des Sciences de l'Université Nice Côte d'Azur depuis 1985, le Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA) fonctionne à la fois comme une plateforme de service pour les équipes scientifiques, et comme une unité de recherche qui développe de nouvelles techniques d'imagerie. A la découverte de cette plateforme d'excellence !

Un centre au service de la recherche interdisciplinaire

Le Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA) – devenu Unité d'Appui et de Recherche (UAR) en septembre 2023 – apporte un soutien technique en microscopie électronique (ME) aux projets scientifiques portés par les équipes des Instituts de l'Université Côte d'Azur. Les projets sont de disciplines variées, allant de la biologie à la chimie, en passant par la physique et l'archéologie.

L'expertise scientifique du centre se concentre particulièrement sur les applications en biologie, notamment l'étude des cellules et des tissus, aussi bien dans des conditions normales que pathologiques. Les domaines de recherche couverts sont vastes : développement cellulaire et tissulaire (y compris embryonnaire), cancer, pharmacologie cellulaire et moléculaire, troubles métaboliques, interactions hôte-pathogène, apoptose, différenciation cellulaire, vieillissement et maladies neurodégénératives.

La plateforme est dirigée par une équipe de quatre spécialistes :

- Sandra Lacas-Gervais, responsable scientifique
- François Orange, responsable des microscopes électroniques à balayage (MEB)
- Sophie Pagnotta, responsable du microscope électronique en transmission (MET)
- Christelle Boscagli, responsable des automates de préparation d'échantillons

Des techniques complémentaires pour explorer la matière

Au CCMA, la MET et la MEB sont les deux méthodes principales mises en œuvre, chacune répondant à des besoins spécifiques selon les types d'échantillons et d'analyses. La MET pour l'observation de l'ultrastructure interne des cellules, et la MEB pour l'étude des surfaces et la topographie des échantillons. La préparation de ces derniers demande de suivre un ordre de techniques très précises et rigoureuses.

→ La fixation

La première étape essentielle dans la préparation d'échantillons est la fixation. Celle-ci permet de stopper toutes les réactions enzymatiques et de figer le tissu dans l'état où il se trouve au moment du prélèvement. Contrairement à l'histologie classique qui utilise généralement du paraformaldéhyde (PFA), la ME nécessite un fixateur plus puissant : le glutaraldéhyde.

Le glutaraldéhyde présente plusieurs avantages majeurs. En tant que dialdéhyde, il réagit avec les groupements amines des protéines pour former des liaisons irréversibles, créant ainsi un réseau dense de ponts stabilisants. Ce réseau, résistant mieux aux traitements ultérieurs, permet une

meilleure conservation de la morphologie cellulaire. En revanche, cette forte fixation présente un inconvénient. Elle rend les antigènes peu accessibles, ce qui complique les techniques d'immunomarquage.

Après la fixation des protéines, c'est au tour des lipides. Fixés avec du tétroxyde d'osmium, cette seconde étape est cruciale pour préserver l'intégrité des membranes cellulaires, qui sont des éléments essentiels pour l'observation des organites en ME. De plus, le tétroxyde d'osmium a l'avantage de donner un premier contraste aux structures membranaires.

→ L'inclusion en résine

Une fois les échantillons doublement fixés, ils doivent être déshydratés pour remplacer l'eau des tissus par une résine dure. Cette résine, qui encapsule l'échantillon biologique et qui se distingue par sa couleur ambrée caractéristique, est suffisamment dure pour permettre la réalisation de coupes ultra-fines destinées à l'observation. Résistante au faisceau d'électrons, celle-ci ne fond pas et conserve sa forme sous l'effet du bombardement électronique.

→ La coupe ultra-fine

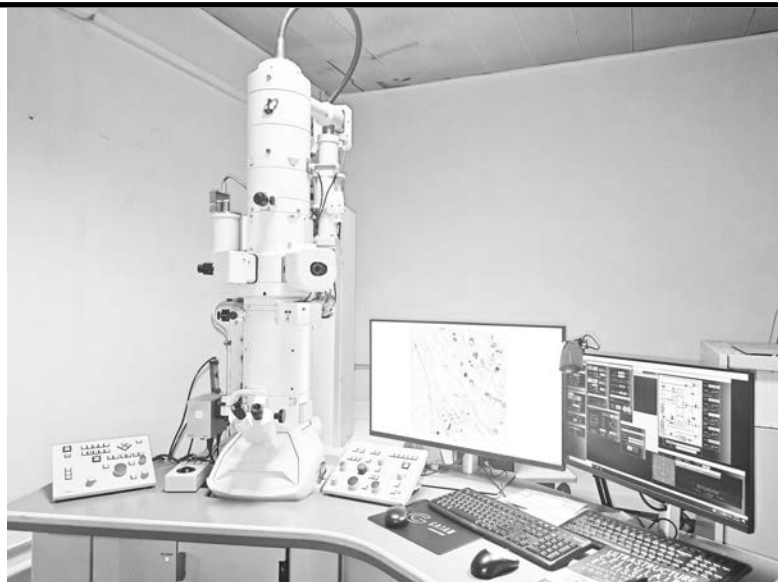
La coupe des échantillons est réalisée à l'aide d'un appareil appelé ultra-microtome, et qui fonctionne selon un principe mécanique. Cette étape requiert une grande précision et un savoir-faire particulier. Le bloc est fixé sur un porte-objet. Un bras avance progressivement le bloc vers un couteau (en verre ou en diamant). À chaque rotation de la manivelle, le bras avance de l'épaisseur souhaitée, et les coupes réalisées flottent sur un bassin d'eau. Celles-ci sont récupérées à l'aide d'outils spécifiques, puis déposées sur des grilles de microscopie électronique. Les coupes font 70 nanomètres, une épaisseur considérablement plus fine que pour les coupes d'histologie classique qui font minimum 3 micromètres d'épaisseur.

→ Le contraste des coupes

Les coupes obtenues ne sont pas directement observables au ME, car elles manquent de contraste. En effet, le principe du MET repose sur le fait que les électrons traversent l'échantillon : les zones traversées apparaissent blanches, tandis que les zones où les électrons sont arrêtés apparaissent noires. Pour améliorer ce contraste, des métaux lourds sont ajoutés, se fixant sur les structures cellulaires (protéines, lipides, acides nucléiques). Ce sont ces métaux qui vont arrêter les électrons pour faire apparaître les structures en noir. A savoir que certaines structures comme les sucres ne sont pas naturellement contrastées par cette méthode et nécessitent des colorations spéciales.

Observer sans dénaturer

Bien que largement utilisée, la technique par fixation chimique conventionnelle présente des inconvénients, comme une possible déformation des structures, due à la rétraction des tissus pendant la déshydratation, une extraction de certains composants cellulaires par les solvants, ou encore une perte de fluorescence des protéines marquées. Pour obtenir des échantillons plus proches de l'état natif, le CCMA utilise alors des techniques de cryo-fixation à haute pression. Cette approche sophistiquée repose sur une congélation ultrarapide des échantillons sous haute pression, permettant de vitrifier



Microscope Electronique à Transmission (MET) 120 kV Jeol JEM 1400 équipé d'une caméra CMOS GATAN RIO9

l'eau sans formation de cristaux de glace, qui endommageraient les structures cellulaires.

Après la cryo-fixation, les échantillons sont soumis à une cryosubstitution : un processus lent et progressif de remontée en température, de déshydratation à froid et d'inclusion en résine, toujours à basse température. Cette méthode contrebalance les inconvénients de celle chimique en préservant de manière optimale les structures cellulaires, en réduisant les artefacts liés à l'extraction de composants et en maintenant la fluorescence. L'équipement nécessaire pour cette technique comprend un automate de congélation à haute pression refroidi à l'azote liquide, un automate de cryosubstitution pour une remontée contrôlée en température et des résines spéciales polymérisables aux UV à basse température.

Le CCMA repousse les limites de l'observation

L'un des développements récents du CCMA est l'imagerie tridimensionnelle. L'observation classique en MET ne donne en effet qu'une vue en deux dimensions des structures cellulaires, pouvant conduire à des interprétations erronées de leur organisation dans l'espace. C'est pourquoi l'ingénieur de recherche François Orange développe des techniques d'imagerie 3D, qui permettent de reconstituer la véritable organisation spatiale des structures cellulaires. Ces techniques sont essentielles pour comprendre correctement la morphologie et les relations spatiales entre les différents organites cellulaires. Un projet d'avenir de la plateforme consiste à acquérir un microscope électronique à balayage plus automatisé et à haute résolution pour faire de l'imagerie 3D sur des coupes serialisées, dans le but de reconstruire l'ultrastructure à travers une cellule entière, voire un petit organisme en entier.

Un autre axe de développement majeur de la plateforme est l'imagerie corrélative, qui consiste à observer le même échantillon à la fois en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique. Cette approche est particulièrement utile pour localiser des événements rares ou des structures difficiles à identifier.

Le processus commence dans les laboratoires, où les cellules – généralement modifiées pour exprimer des protéines couplées à des marqueurs fluorescents comme la GFP – sont cultivées sur des supports spéciaux comportant un quadrillage de repérage. Les scientifiques observent ces cellules dans un premier temps au microscope à fluorescence, ou au microscope confocal, afin de localiser

les structures d'intérêt. Une fois celles-ci identifiées, l'échantillon est transmis au service de microscopie électronique, où la microscopiste procède à une préparation conventionnelle de l'échantillon pour la ME. Le quadrillage présent sur le support initial se retrouve imprimé à la surface du bloc de résine, permettant de retrouver précisément la même cellule d'intérêt.

La mise en œuvre de cette approche innovante présente cependant plusieurs défis techniques : i) la perte de fluorescence lors des traitements pour la ME, ii) la rétraction des tissus pendant la préparation, rendant difficile la superposition exacte des images, et iii) la difficulté de retrouver le bon plan de coupe en Z correspondant à ce qui a été observé en fluorescence. Pour surmonter certaines de ces limitations, des techniques alternatives sont développées, comme l'utilisation de résines spéciales qui préservent la fluorescence, permettant d'observer la même coupe ultra-fine en fluorescence et en ME successivement.

La ME, toujours essentielle !

La ME occupe une place essentielle dans le paysage des techniques d'analyse scientifique. Loin d'être supplantée par les avancées en biologie moléculaire, elle a connu au contraire un regain d'intérêt grâce à ces nouvelles approches. Les outils de biologie moléculaire ont en effet suscité de nouveaux besoins en imagerie de précision.

Par exemple, la création d'organismes génétiquement modifiés nécessite maintenant d'observer les conséquences structurales de ces modifications. Contrairement à la microscopie à fluorescence, qui ne permet de visualiser que les structures spécifiquement marquées, la ME offre une vue d'ensemble, révélant à la fois les structures ciblées et leur environnement. Elle s'impose donc comme un outil essentiel pour étudier les interactions entre organites et les altérations de l'architecture cellulaire.

En conclusion, ces co-évolutions garantissent la pérennité et la pertinence de la microscopie électronique face aux défis scientifiques actuels.

Pour en savoir plus :

Centre Commun de Microscopie Appliquée
Sandra LACAS-GERVAIS
Sandra.LACAS-GERVAIS@univ-cotedazur.fr
<https://sites.google.com/view/ccmao6/acueil>