

# Observations de différents échantillons en microscopie corrélative intégrée : fluorescence et microscopie électronique à balayage (iLSEM)

I. Pignot-Paintrand<sup>1,2\*</sup>, K. Monier<sup>3</sup>, L. Voortman<sup>4</sup>, B. Burdin<sup>5</sup> et J-P Chauvin<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, LMGP, F-38000 Grenoble, France

<sup>2</sup>CNRS, LMGP, F-38000 Grenoble, France

<sup>3</sup>Laboratoire Joliot Curie, CNRS UMS 3010, ENS, F-69000 Lyon, France

<sup>4</sup>Société Delmic, 2629 JA Delft, Netherlands

<sup>5</sup>CTμ, UCB, F-69000 Lyon, France

<sup>6</sup>Institut de Biologie du Développement de Marseille, UMR 7288  
13288 Marseille cedex 9, France

\* isabelle.paintrand@grenoble-inp.fr; Téléphone : +33 456529332

## 1. INTRODUCTION

Différentes modalités de CLEM (Correlative Light Electron Microscopy) ont été rapportées, mais il faut savoir que toutes ces approches sont de façon générale un véritable challenge à plusieurs point de vue : 1) pour retrouver la région d'intérêt, 2) pour aligner avec précision les images de microscopie électronique et de microscopie optique, 3) pour collecter des données sur plusieurs structures, 4) requiert des utilisateurs expérimentés tant en microscopie photonique qu'en microscopie électronique. Ainsi, la procédure généralement utilisée pour pratiquer la CLEM se passe en 2 temps [1] : 1) imagerie des échantillons en fluorescence, 2) imagerie des échantillons en microscopie électronique (MEB ou TEM), comprenant différentes étapes intermédiaires en fonction du résultat escompté. Une nouvelle stratégie permettant de réaliser de la microscopie corrélative intégrée, iCLEM, a été récemment développée et rapportée par différents groupes [2, 3, 4]. Elle permet de réaliser la microscopie photonique à fluorescence et la microscopie électronique à balayage de l'échantillon dans le même microscope.

L'avantage de la stratégie iCLEM est de pouvoir passer directement d'une modalité d'imagerie à une autre sur l'échantillon. Grâce à un système d'auto-alignement des 2 modalités d'imagerie, les 2 images sont directement superposables et le résultat est visualisé avec une précision de 50 nm. Cette stratégie intégrée est avantageuse en termes de gain de temps et du nombre accru de cellules analysables par rapport à la stratégie en deux temps.

Nous rapportons les observations, de plusieurs types d'échantillons, réalisées en microscopie intégrée à l'aide de la plateforme SECOM insérée dans un MEB-FEG Quanta 250 FEI, lors d'un atelier de démonstration.

## 2. RESULTATS

### 2.1 Conditions expérimentales

La plateforme SECOM était équipée d'un objectif 40x NA 0.95, d'une source d'excitation quadribande permettant des longueurs d'ondes de 387/11, 485/20, 560/25 et 650/13 et d'une caméra CMOS permettant un champ de vue de 330x330μm.

Le microscope à balayage Quanta 250 ESEM FEG, (FEI) a été utilisé sous haut vide, avec une tension d'accélération de 3kV. Le détecteur Everhart-Thornley a été utilisé pour la détection des électrons secondaires et l'imagerie sur cellules entières, le détecteur vCD a permis la détection des électrons rétrodiffusés et l'imagerie des sections de cellules.

Les protocoles de préparation des échantillons ont été optimisés pour maintenir au mieux la fluorescence des échantillons.

### 2.2 Résultats sur cellules entières

Observation de cellules, exprimant la nucléoline en fusion avec la mcherry, cultivées sur lamelle. On observe les nucléoles marqués en relief sous la membrane.



Figure 1. Cellules HeLa avec un marquage nucléoline mcherry

### 2.3 Résultats sur section de cellules

Observation de coupe de cellules HeLa fixées et incluses en résine HM20. Les coupes sont observées en microscopie de fluorescence pour repérer les cellules exprimant la nucléoline mcherry. L'ultrastructure est analysée en microscopie électronique à balayage par détection des électrons rétrodiffusés. La superposition des images électroniques et optiques montre que la nucléoline est exclue des centres fibrillaires des nucléoles.

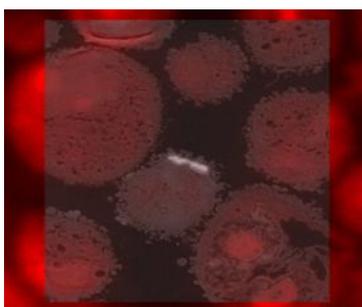


Figure 2. Cellules HeLa avec un marquage nucléoline mcherry

## 3. CONCLUSION

La co-détection de la nucléoline fluorescente dans des nucléoles dont l'ultrastructure est bien conservée, permet de corréliser la localisation de la protéine avec la structure observée en microscopie électronique à balayage par détection des électrons rétrodiffusés. Cette approche s'avère prometteuse pour analyser l'ultrastructure des nucléoles dans un contexte cellulaire où la nucléoline est absente et permettre de préciser sa localisation dans d'autres compartiments comme la membrane plasmique ou les centrosomes.

Au cours des 4 sessions de démonstration, nous avons pu observer une quinzaine d'échantillons préparés par différentes méthodes. Nous avons constaté que la fluorescence de certains fluorochromes était mieux conservée et nous avons décelé les techniques inappropriées à ce type d'observation. Nous proposons des pistes d'amélioration des protocoles permettant de préserver la fluorescence et la qualité de l'ultrastructure.

La technique iLSEM est une technique très prometteuse qui présente l'avantage de réaliser des observations en microscopie corrélative de façon rapide et précise.

## REFERENCES

- [1] Gibson, K.H., D. Vorkel, J. Meissner, and J.M. Verbavatz., *Methods in cell biology*. **124**, 23-54 (2014)
- [2] Oberti, D., M.A. Kirschmann, and R.H. Hahnloser, *Frontiers in neuroanatomy*. **4**, 24 (2010)
- [3] Peddie, C.J., N. Liv, J.P. Hoogenboom, and L.M. Collinson, *Methods in cell biology* **124**, 363-389 (2014)
- [4] Faas, F.G., M. Barcena, A.V. Agronskaia, H.C. Gerritsen, K.B. Moscicka, C.A. Diebolder, L.F. van Driel, R.W. Limpens, E. Bos, R.B. Ravelli, R.I. Koning, and A.J. Koster, *Journal of structural biology*, **181**, 283-290 (2013).

**Remerciements** : Nous remercions les personnes suivantes pour nous avoir confié leurs échantillons : G. Carron, IBCP, Lyon, K. Gorgy, DCM, Grenoble, S. Lehmann, ISTERre, Grenoble, F. Orange, CCMA, Université de Nice Sophia, M.Rippe, CERMAV, Grenoble. Le CMTC (INP Grenoble) et B. Doisneau (LMGP, Grenoble) pour la mise à disposition du microscope électronique à balayage. S. Aguy de la société EDEN-Instruments pour les relations avec la société DELMIC.